

平成22年2月

# 岡崎亮太 学位論文審査要旨

主 査 清 水 英 治  
副主査 重 政 千 秋  
同 佐 藤 慶 祐

## 主論文

インターロイキン8による気道平滑筋細胞の増殖および遊走についての検討

(著者：岡崎亮太、山崎章)

平成22年 米子医学雑誌 61巻 6頁～19頁

# 学 位 論 文 要 旨

## インターロイキン8による気道平滑筋細胞の増殖および遊走についての検討

Interleukin-8 (IL-8) は好中球や単球、マクロファージ、気道上皮細胞、血管内皮細胞などから産生される炎症性メディエーターであり、細胞表面上に発現しているCXCR1およびCXCR2を介して様々な作用を発する。気管支喘息患者の喀痰、肺泡洗浄液などで上昇しており、気管支喘息の病態に関与していることが示唆されている。また、IL-8は培養平滑筋細胞の増殖および遊走に関与しており、気道リモデリングの関与が示唆されている。しかしながらその機序についての報告は少ない。そこで本研究ではIL-8刺激による気道平滑筋細胞の増殖および遊走に関連するシグナル伝達機構を検討した。

## 方 法

実験にはテロメラーゼを恒常的に発現させ不死化させた気道平滑筋細胞を用いた。不死化気道平滑筋細胞におけるCXCR1およびCXCR2受容体の発現についてウエスタンブロッティング法により検討した。細胞増殖や遊走の検討では、気道平滑筋細胞を24時間以上血清除去した後、1、10、100 nMのIL-8で刺激を行った。細胞増殖はWST法を用い、細胞遊走についてはTranswell chamberを用いて検討した。細胞内シグナル伝達機構についてはMitogen-activated protein kinase (MAPK) およびRhoAのIL-8による活性化についてウエスタンブロッティング法を用いて検討した。IL-8刺激による細胞増殖や遊走にどのようなシグナル伝達機構が関与しているかについて、CXCR1およびCXCR2に対する中和抗体、MAPKsの阻害薬であるMEK阻害薬 (U0126)、Rho kinaseを阻害するROCK阻害薬 (Y-27632)、HMG-CoA reductase阻害薬 (simvastatin) をIL-8刺激の1時間前に添加し検討した。RhoAの活性化はin vivo Rho guanine nucleotide exchange assayを用いた。1、10、100 nMのIL-8を用いて、24時間以上血清除去を行った平滑筋細胞を刺激し、1分後のRhoAの活性化についてウエスタンブロッティング法で検討した。IL-8の気道平滑筋細胞のCXCR1およびCXCR2受容体の発現量への影響をウエスタンブロッティング法で検討した。また、IL-8が気管支平滑筋細胞の肥大、筋線維芽細胞への分化に関与するか否か、収縮性蛋白 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -sm-actin) の発現についてウエスタンブロッティング法で検討した。

## 結 果

本研究で用いた5種類の不死化平滑筋細胞では、いずれの細胞においてもCXCR1、CXCR2の発現が認められた。次にIL-8による平滑筋細胞の増殖および遊走について検討した。IL-8は濃度依存性に気道平滑筋細胞の増殖刺激効果が認められた。細胞遊走についても同様にIL-8の濃度依存性に細胞遊走が引き起こされた。IL-8によるシグナル伝達機構に関する検討では、p42/p44 MAPKのリン酸化とRhoAの濃度依存的な活性化が認められた。また、CXCR1およびCXCR2の中和抗体により、IL-8によるp42/p44 MAPKのリン酸化、RhoAの活性化は抑制され、平滑筋細胞の増殖および遊走も有意に抑制された。また、IL-8による細胞増殖および遊走は、U0126およびY-27632、simvastatinにより有意に抑制された。次にIL-8によるCXCR1およびCXCR2の発現について検討した。100 nMのIL-8によってもCXCR1、CXCR2の発現に変化が認められなかった。 $\alpha$ -sm-actinの発現では、TGF- $\beta$ 刺激により $\alpha$ -sm-actinの発現が増強したのに対して、IL-8刺激ではその発現に変化が認められなかった。

## 考 察

これまでに重症の気管支喘息での好中球性気道炎症の重要性が報告され、またIL-8と気道リモデリングとの関連性が示唆されている。本研究では、IL-8によって気道平滑筋細胞の増殖や遊走が引き起こされること、またIL-8による増殖や遊走に関わるシグナル伝達はCXCR1およびCXCR2を介し、p42/p44 MAPKのリン酸化およびRhoAの活性化によることを明らかにした。また、IL-8は気道平滑筋細胞のCXCR1およびCXCR2の発現には影響を及ぼしておらず、また $\alpha$ -sm-actinの発現には影響を及ぼさないことが明らかになった。IL-8は好中球などより産生される炎症性メディエーターである。本研究は気道平滑筋細胞の増殖および遊走が引き起こされること、また、これはp42/p44 MAPKおよびRhoAを介することを明らかにしており、IL-8およびそのシグナル伝達経路を標的とした治療法の確立が、好中球が関与する重症気管支喘息において重要であることを示唆した。

## 結 論

IL-8はCXCR1およびCXCR2を介し、p42/p44 MAPKおよびRhoAを活性化することによって気道平滑筋細胞の増殖および遊走を引き起こした。これらの結果から、難治性の気管支喘息患者における好中球性の気道炎症が、気管支平滑筋細胞の遊走および増殖を引き起こしている可能性が示唆された。したがって、IL-8およびそのシグナル伝達経路に対する治療が今後難治性の気管支喘息患者において有用である可能性が示唆された。