

## 喘息病態における phosphoinositide 3-kinase $\gamma$ の役割と 治療応用の可能性\*

竹田 正秀

秋田大学大学院医学系研究科 感染・免疫アレルギー・病態検査学講座

(平成 22 年 4 月 26 日掲載決定)

**Key words:** phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ , 喘息, アレルギー, 気道リモデリング

### はじめに

近年、副腎皮質ステロイドの吸入薬を中心とした治療の発展により、喘息患者の QOL は飛躍的に改善してきている。しかしながら、現在でも年間 3,000 人近い患者が喘息で命を落としており、この事実は見逃すことができない<sup>1)</sup>。服薬へのアドヒアランスが不良であることが理由のひとつと考えられているが、適切に吸入ステロイド薬をはじめとした治療薬を使用しても喘息により死亡する症例が認められている。こういった患者の多くはステロイド治療による反応性が悪く、その病態のひとつとして、慢性・持続的な炎症により形成される気道の不可逆性の構造変化である、気道リモデリングの存在が指摘されている。こういった背景のもと、① 副腎皮質ステロイド薬とは異なる機序で、② 特に気道の炎症細胞集積を抑え、結果として気道リモデリング形成を抑制しうる分子が、今後の喘息治療薬開発のターゲットとなりえる。本稿では、喘息治療の新規治療薬に繋がる可能性を秘めた分子として PI3K (phosphoinositide 3-kinase) を取り上げ、現在までの知見を紹介する。

### 喘息のメカニズム

図 1 に喘息のメカニズムの概略を示した。主に気道を通じて生体内に抗原(アレルゲン)が侵入すると、樹状細胞をはじめとした抗原提示細胞が T 細胞(ナイーブ T 細胞; Th0) に抗原を提示する。抗原提示を受けた T 細胞は、Th2 細胞へと分化し、一部はメモリー T 細胞となり抗原刺激が記憶される。そこに再度、抗原が生体内に侵入すると Th2 細胞への分化が誘導され、Th2 細胞の放出する interleukin (IL)-4 により、B 細胞が形質細胞へと変換され、アレルゲン特異的な IgE が産生される。ここまでの抗原提示から IgE 産生までは、アレルギー反応の induction phase と呼ばれている。さらに、この IgE は肥満細胞表面の Fc $\epsilon$ R1 に結合し、架橋(クロスリンク)を介して、肥満細胞を活性化させ、ヒスタミンやロイコトリエンといったケミカルメディエーターの放出を誘導する。これら物質に加えて、抗原が侵入する気道局所では、気道上皮細胞などから、ケモカインが産生され、好酸球・リンパ球といった炎症細胞が流血中から気道局所に遊走する。そして、局所に集積し、活性化した好酸球やリンパ球は EDN や EPO といった好酸球顆粒蛋白の放出や種々のサイトカインを産生し、気道上皮細胞が傷害を受け、気道過敏性の亢進と、それに伴う気道収縮といった変化がもたらされるのである。この炎症細胞集積から気道傷害までの反応はアレルギーにおける effector phase と呼ばれ、副腎皮質ステロイド薬など多くの喘息治療薬は effector phase の反応抑制をターゲットとして開発されている。さらに好酸球やリンパ球などの炎症細胞は IL-13, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor (PDGF)

〒010-8543 秋田市本道 1-1-1

秋田大学大学院医学系研究科 感染・免疫アレルギー・病態検査学講座

Correspondence: Masahide Takeda, M.D., Ph.D.

Department of Infection, Allergy, Clinical Immunology and Laboratory Medicine, Akita University Graduate School of Medicine

Tel: 81-18-884-6209

Fax: 81-18-884-6209

E-mail: takeda-56@hos.akita-u.ac.jp

\*第 20 回秋田医学会学術奨励賞受賞

といったサイトカイン・Growth factor の産生を介して、① 杯細胞の過形成、② 上皮下の線維化、③ 気道平滑筋の肥厚を特徴とした気道リモデリング形成に関わることが知られている。このように、喘息の病態形成には、好酸球を中心とした炎症細胞の気道局所への集積が極めて重要であるといえる。

### イノシトールリン脂質と細胞機能

細胞の脂質二重膜にはグリセロリン脂質が存在しており、なかでもイノシトールリン脂質は細胞膜上に豊富に存在している。このイノシトールリン脂質は、6環構造のイノシトール環と脂肪酸構造から成り立っており、イノシトール環の3位、4位、5位の水酸基はリン酸化を受ける。そのため、生体内には、リン酸化の様式に応じて、合計8種類のイノシトールリン脂質が存在する(図2)。このなかでも3~5位の水酸基が全てリン酸化を受ける phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) は細胞内でセカンドメッセンジャーとして働き、Aktをはじめとした下流シグナル経路を

活性化させることで、細胞の分化・生存・遊走といった細胞機能に関わることが知られている<sup>3)</sup>。このPIP<sub>3</sub>を産生するリン酸化酵素としてPI3Kが同定されている。すなわち、PI3KはPIP<sub>3</sub>産生を制御することで、炎症細胞をはじめとした細胞機能に関わっているのである。

PI3Kには、複数のクラスが既に同定されている<sup>4)</sup>。なかでもclass I PI3Kは受容体刺激を介して、活性化されるという特徴を持つことからこれまで、多くの研究が行われてきている。このclass I PI3Kには、さらにclass IAとIBに大別される。Class IAには、PI3K $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ の三種類が同定されており、それぞれチロシキナーゼ型受容体刺激により活性化される。チロシキナーゼ型受容体のligandは主に、サイトカインやgrowth factorであり、癌免疫をはじめ多くの疾患への影響が検討されている。一方で、class IBにはPI3K $\gamma$ がある。これはG protein-coupled receptor (GPCR)刺激により活性を受ける。GPCRのligandとしては、ケモカインが主たるものであり、この意味でPI3K $\gamma$ は細胞の遊走に関与することが想定される。事実、こ

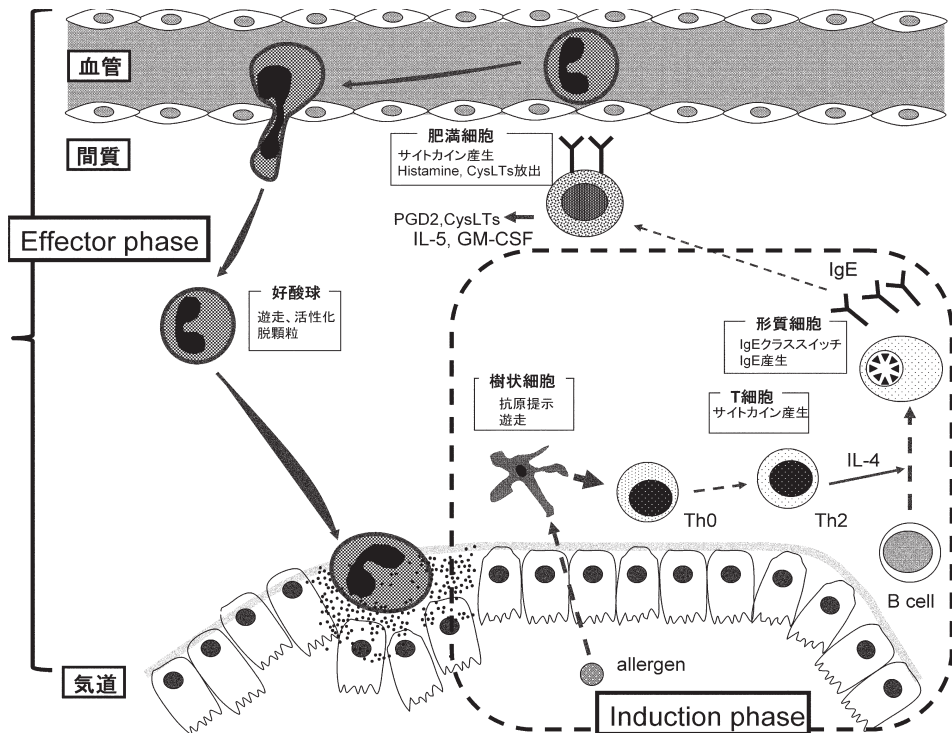
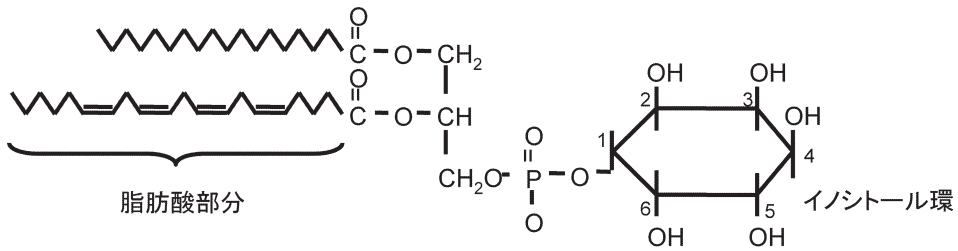


図1



イノシトールリン脂質の代謝経路

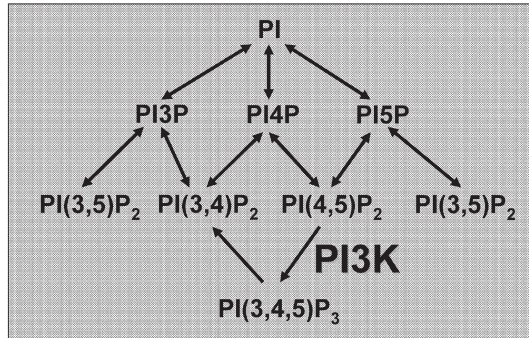


図 2

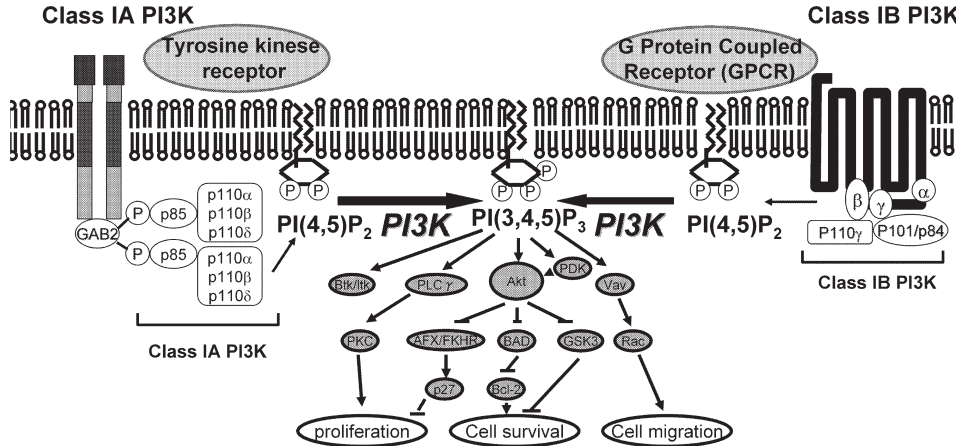


図 3

れまで、好中球・好酸球・リンパ球など多くの細胞遊走に関わることが証明されている (図 3)。

喘息病態における PI3K の関わり

炎症細胞の遊走を含めた細胞機能に PI3K が関与す

ることから、マウス喘息疾患モデルを用いた実験系で PI3K の影響が既に検討されている。Duan らは class IA, IB すべての isoform を阻害する pan-PI3K 阻害薬である LY294002 を経気道的に投与することによって、卵白アルブミン (ovalbumin ; OVA) 誘導性の喘息疾患モデルへの影響を検討した。その結果、LY294002

(24)

喘息病態における phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  の役割と治療応用の可能性

の投与により、炎症局所である気道での好酸球集積が有意に低下し、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 中での IL-5, IL-13 などの Th2 サイトカイン産生も有意に低下した<sup>5)</sup>。このことから、喘息病態への PI3K の関与が想定され、PI3K 阻害薬の治療薬としての可能性が示されている。しかしながら、PI3K の isoform に目を向けてみると、PI3K $\alpha, \beta$  のノックアウトマウスは胎生死することが報告されている<sup>6,7)</sup>。すなわち pan-PI3K 阻害薬を治療応用する場合、生体への副作用が無視できないものであると考えられる。そのため、PI3K の各 isoform の影響を検討することは、治療的観点からも極めて重要な知見となり得る。喘息の effector phase の主体は好酸球などの炎症細胞の気道局所への遊走・集積であり<sup>8)</sup>、我々は、GPCR 刺激により活性化する PI3K $\gamma$  が炎症細胞の遊走を制御することで喘息病態に関わっているのではないかと考え、PI3K $\gamma$  のノックアウトマウスを用いて、喘息病態への関与を検討した<sup>9)</sup>。

### PI3K $\gamma$ の喘息病態への関わり

図 4A に実験のプロトコールを提示する。アジュバンドとして Alum を用いて OVA を抗原として、腹腔内に投与することにより、マウスに感作を成立させたのち、3日連続の 1%OVA 吸入を計 5 週間続け、組織学的に気道リモデリング形成が形成される疾患モデルを作成した。これにより、PI3K $\gamma$  の喘息病態のみならず、難治性喘息に重要な気道リモデリング形成への影響についても検討を加えた。

結果のまとめを表 1 に示す。陽性コントロールとしての Wild Type の喘息モデルでは、BALF 中に好酸球・リンパ球の集積を認め、組織学的に気道リモデリングが形成されていたが、PI3K $\gamma$  ノックアウトマウスでは、これらが有意に低下していた。加えて、実際のヒト喘息における症状の発現を表す、気道過敏性についても Methacholine に対する気道抵抗を測定することで検討したところ、同様に Wild Type で Methacholine の濃度依存性に亢進した気道過敏性がノックアウトマウスでは有意に低下しており、PI3K $\gamma$  をノックアウトすることで、OVA 誘導性のアレルギー反応が引き起こされ

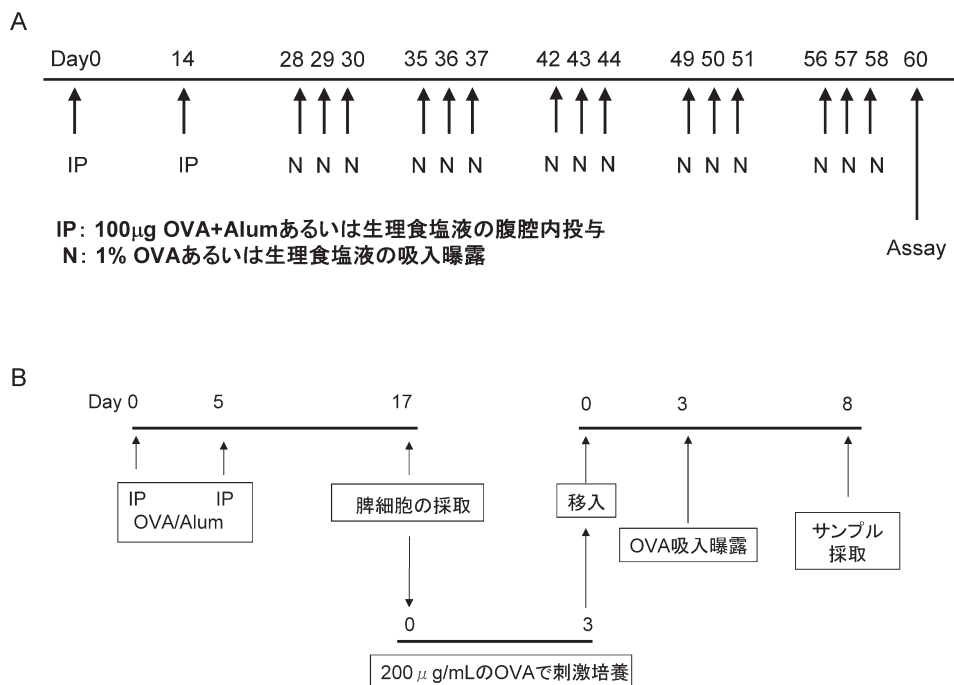


図 4

表 1

	炎症細胞集積	AHR	気道リモデリング形成			血清 IgE	Th2 サイトカイン (BALF)
			杯細胞過形成	上皮下線維化	平滑筋肥厚		
Wild type+OVA	++	++	++	++	++	+	++
PI3K $\gamma$ KO+OVA	+	-	-	-	-	+	+

ないことが示された。さらに、BALF 中の Th2 サイトカインや気道リモデリング形成に重要な TGF- $\beta$ 、PDGF といった Growth factor 産生についてもノックアウトマウスで減少が認められた。これらの結果については、Th2 サイトカイン、Growth factor の主な産生細胞が好酸球やリンパ球であることから、ノックアウトマウスでの炎症細胞の局所集積の低下が、結果として局所でのサイトカインや Growth factor の産生低下につながり、アレルギー性気道炎症ならびに気道リモデリング形成が引き起こされなかったのではないかと推測された。以上の結果から、PI3K $\gamma$  は気道炎症や気道リモデリング形成に関わる重要な分子であると考えることができた。

つづいて我々は、PI3K $\gamma$  が喘息病態の induction, effector, どちらの phase に関わっているか、同様の実験系において血清総 IgE, OVA 特異的 IgE について ELISA 法を用いて検討を行った。血清総 IgE, OVA 特異的 IgE については、PI3K $\gamma$  のノックアウトマウスでも Wild Type と同程度まで産生が亢進していることが確認された。また、BALF 中の T 細胞の phenotype を検討するため、三重染色を用いてフローサイトメトリーにより CD4/CD8 比を検討したところ、非 OVA 感作・曝露のコントロール群と比較して、Wild Type, ノックアウトマウスいずれの群でも CD4 陽性 T 細胞の割合が有意に上昇しており、2 群間に有意な差は認められなかったことより、PI3K $\gamma$  は感作やリンパ球の phenotype には影響を及ぼさないことが考えられた。これらの結果から我々は、ノックアウトマウスでも induction phase は成立しており、その後の effector phase を制御することで PI3K $\gamma$  は喘息病態に関わっているという仮説を立て、この仮説を検証するためにマウスの脾細胞移入の実験を行った (図 4B)。具体的な方法としては、Wild Type, PI3K $\gamma$  ノックアウトマウスに OVA で感作を行ったのち、脾細胞をとりだし、OVA と 3 日間共培養を行う。この脾細胞を Wild Type, ノックアウトマウスそれぞれのナイーブマウスに腹腔

内投与し、その後 OVA 吸入曝露を行い、BALF 中への好酸球集積を検討した。その結果、移入先 (Recipient) が Wild Type の場合においてのみ BALF 中に好酸球の集積が認められた。ノックアウトマウスの脾細胞を Wild Type に移入しても好酸球集積を認めたという結果より、PI3K $\gamma$  のノックアウトマウスでも感作までは成立していたことが推察された。一方で Wild Type の脾細胞をノックアウトマウスに移入したところ、好酸球の集積を認めなかったことより、ノックアウトマウスでは感作後の反応、すなわち effector phase の反応が起こらなかったということが考えられた。以上の実験により、PI3K $\gamma$  は induction phase ではなく、effector phase を制御することで喘息病態に関わっていることが示唆されたのである。

喘息病態と PI3K の isoform との関わりについては、class IA に属する PI3K $\delta$  についても検討が行われており、PI3K $\delta$  の選択的阻害薬 IC87114 を経気道投与することによって、OVA 誘導性の気道炎症や気道過敏性が有意に抑制されることが報告されている<sup>10)</sup>。そのため PI3K $\delta$  も喘息病態への関与が注目されているが、作用点という意味で、PI3K $\gamma$  と相違点がありそうである。Nashed らは、PI3K $\delta$  のノックアウトマウスを用いて、我々と同様に脾細胞移入の実験を行っている。それによると、Wild Type の脾細胞を移入すると Wild Type, ノックアウトマウスの如何に関わらず、BALF 中の好酸球集積が認められていた<sup>11)</sup>。すなわち、PI3K $\delta$  に関しては主に induction phase を修飾することで喘息病態に関わっていると考えられるわけである。PI3K $\gamma$  と  $\delta$  でアレルギーの病態における作用点が異なるというのは、大変興味深いところであるが、喘息の治療的観点からは、喘息患者を治療する場合、すでに患者は感作が成立した状態であることから、effector phase を調整する PI3K $\gamma$  がより喘息治療のターゲット分子として期待できるのではないかと考えられた。

### PI3K の炎症細胞への影響

ここまで、主に PI3K $\gamma$  および  $\delta$  に関するマウスを用いた *in vivo* の結果をまとめてきたが、前述したように、喘息の病態には様々な細胞の機能的関与が必須である。*in vitro* の PI3K の細胞機能への影響はどうか。Salogni らは PI3K $\gamma$  の樹状細胞機能への影響をノックアウトマウスを用いて検討している。その結果、PI3K $\gamma$  ノックアウトマウスでは、樹状細胞の CCL3 に対する遊走活性が減弱していた<sup>12)</sup>。また、Del Prete らは、同じく PI3K $\gamma$  ノックアウトマウスから抽出した樹状細胞の抗原提示能を検討し、Wild Type と比較して抗原提示能が有意に低下することを報告している<sup>13)</sup>。肥満細胞に対しては、PI3K $\gamma$  および PI3K $\delta$  の選択的阻害薬を用いて、サイトカイン産生や脱顆粒への影響が検討されている。結果はいずれの選択的阻害薬においても肥満細胞からのサイトカイン産生、脱顆粒を抑制するというものであり、肥満細胞に対しても PI3K $\gamma$ 、PI3K $\delta$  がその細胞機能に重要な役割を果たし、アレルギー反応形成に関わっていることが示されている<sup>14-16)</sup>。また、好中球に関しても近年特にステロイド抵抗性の難治性喘息に関与することがわかってきている。ステロイド抵抗性喘息の患者の喀痰や BALF 中の細胞には好酸球だけではなく、好中球が認められる症例が報告され、好中球性喘息として、好中球も喘息病態を引き起こす effector cell として注目されはじめている。この好中球機能について、Sasaki らは、2000 年に Science の中で、好中球の遊走や活性化が PI3K $\gamma$  ノックアウトマウスでは有意に低下することを報告している<sup>17)</sup>。この知見は、PI3K $\gamma$  の選択的阻害薬が好中球性喘息に対しても有効性を示唆しており、興味深い。さらに好酸球の細胞機能についての検討としては、pan PI3K inhibitor である Wortmannin と LY294002 を用いて遊走能を検討した結果が 2005 年に Allergy 誌に報告されている。これによると、Wortmannin 刺激により、好酸球の遊走のみならず、活性酸素産生も抑制することが観察された。PI3K 阻害薬の effector phase の反応抑制が期待できる結果であるが、さらに PI3K の各 isoform と好酸球機能との関連はどうか。これに関しても、すでに PI3K $\gamma$  ノックアウトマウスの骨髄由来好酸球を用いた実験系で、mouse recombinant eotaxin に対する遊走能が低下することが報告されている<sup>19)</sup>。我々の実験系でも喘息疾患モデルで、PI3K $\gamma$  ノックアウトマウスでは BALF 中の

好酸球の有意な低下が認められていたが、やはり好酸球上に存在している PI3K $\gamma$  の機能的阻害により、好酸球の遊走能が低下し、その結果として炎症局所への好酸球集積が認められなかったことが推察され、今後さらなる検討を進めていきたいと考えている。

### おわりに

本稿では、PI3K のなかでも主に、PI3K $\gamma$  に焦点を絞り、喘息治療への可能性について述べてきた。PI3K に関する研究はこれまで Wortmannin や LY294002 といった pan-PI3K 阻害薬を用いた検討が多くなされてきたが、各 isoform のノックアウトマウスの出現によって、喘息のみならず様々な疾患に対する isoform の影響が検討されるようになった。喘息治療については、まだまだ検討の余地を多く残しているが、例えば急性心筋梗塞に対しては、PI3K $\gamma/\delta$  阻害薬 TG100-115 を用いた、第 I 相および第 II 相臨床試験が行われるに至っており、PI3K $\gamma$  や  $\delta$  をターゲットとした臨床応用が現実のものになろうとしている。PI3K $\gamma$  は *in vitro*、*in vivo* ともに、喘息に関与していることが判明してきており、今後喘息治療の臨床試験において、PI3K $\gamma/\delta$  阻害薬や PI3K $\gamma$  の選択的阻害薬の効果が検討される日も遠くはないのではないかと考えている。

厚生労働省は、喘息の治療目標として「喘息死ゼロ作戦」を掲げ、ガイドラインの作成などを通して、吸入ステロイドの普及や服薬アドヒアランスの向上を図っている。この目標を現実のものとするためには、吸入ステロイドの普及のみならず新規治療薬の開発も必須事項であろう。その意味で、これまで概説した PI3K $\gamma$  をターゲットとした治療薬の臨床応用が進められ、喘息治療の発展・患者の QOL の改善に寄与することを期待してやまない。

### 謝 辞

本研究にあたり、研究活動を支え、ご指導を頂きました荏原順一教授に深く感謝致します。また研究のご指導・ご協力を頂きました感染・免疫アレルギー・病態検査学の先生方ならびに中央検査部の皆様に深い感謝の意を表します。最後に、実験マウスをご提供頂き、実験のアドバイスを頂きました微生物学講座の佐々木雄彦教授に深く感謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) 社団法人 日本アレルギー学会 喘息ガイドライン専門部会監修 (2009) 喘息の疫学. 喘息予防・管理ガイドライン, pp. 21-28.
- 2) Davies, D.E., Wicks, J., Powell, R.M., Puddicombe, S.M. and Holgate, S.T. (2003) Airway remodeling in asthma: New insights. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111**, 215-225.
- 3) Toker, A. and Cantley, L.C. (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide 3-OH kinase. *Nature*, **387**, 673-676.
- 4) Wymann, M.P., Björklöf, K., Calvez, R., Finan, P., Thomast, M., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, F., Hirsch, E. and Laffargue, M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 275-280.
- 5) Duan, W., Aguinaldo-Datiles, A.M., Leung, B.P., Vlahos, C.J. and Wong, W.S. (2005) An anti-inflammatory role for a phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 in a mouse asthma model. *Int. immunopharmacol.*, **5**, 495-502.
- 6) Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., Wynshaw-Boris, A. and Nussbaum, R.L. (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10963-10968.
- 7) Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J. and Nussbaum, R.L. (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm. Genome*, **13**, 169-172.
- 8) Chihara, J. (2005) Molecular mechanisms of eosinophil activation in allergic diseases. *Clin. Exp. All. Rev.*, **5**, 46-49.
- 9) Takeda, M., Ito, W., Tanabe, M., et al. (2009) Allergic airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **123**, 805-812.
- 10) Lee, K.S., Lee, H.K., Hayflick, J.S., Lee, Y.C. and Puri, K.D. (2006) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. *FASEB. J.*, **20**, 455-465.
- 11) Nashed, B.F., Zhang, T., Al-Alwan, M., Srinivasan, G., Halayko, A.J., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B., Hayglass, K.T. and Marshall, A.J. (2007) Role of the phosphoinositide 3-kinase p110delta in generation of type 2 cytokine responses and allergic airway inflammation. *Eur. J. Immunol.*, **37**, 416-424.
- 12) Salogni, L., Musso, T., Bosisio, D., Mirolo, M., Jala, V.R., Haribabu, B., Locati, M. and Sozzani, S. (2009) Activin A induces dendritic cell migration through the polarized release of CXC chemokine ligands 12 and 14. *Blood*, **113**, 5848-5856.
- 13) Del-Prete, A., Vermi, W., Dander, E., et al. (2004) Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO. J.*, **23**, 3505-3515.
- 14) Ali, K., Bilancio, A., Thomas, M., et al. (2004) Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature*, **431**, 1007-1011.
- 15) Ali, K., Camps, M., Pearce, W.P., Ji, H., Rückle, T., Kuehn, N., Pasquali, C., Chabert, C., Rommel, C. and Vanhaesebroeck, B. (2008) Isoform-specific functions of phosphoinositide 3-kinases: p110 delta but not p110 gamma promotes optimal allergic responses in vivo. *J. Immunol*, **180**, 2538-2544.
- 16) Endo, D., Gon, Y., Nunomura, S., Yamashita, K., Hashimoto, S., and Ra, C. (2009) PI3Kgamma differentially regulates FcepsilonRI-mediated degranulation and migration of mast cells by and toward antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **149**, 66-72.
- 17) Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., et al. (2000) Function of PI3Kγ in Thymocyte Development, T cell Activation, and Neutrophil Migration. *Science*, **287**, 1040-1046.
- 18) Mishra, R.K., Scaife, J.E., Harb, Z., Gray, B.C., Djukanovic, R. and Dent, G. (2005) Differential dependence of eosinophil chemotactic responses on phosphoinositide 3-kinase (PI3K). *Allergy*, **60**, 1204-1207.
- 19) Thomas, M., Edwards, M.J., Sawicka, E., et al. (2009) Essential role of phosphoinositide 3-kinase gamma in eosinophil chemotaxis within acute pulmonary inflammation. *Immunology*, **126**, 413-422.