

氏 名・（本籍）	やま もと り え 山 本 梨 絵（秋田県）
専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医博甲第851号
学位授与の日付	平成26年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題名	Adiponectin attenuates human eosinophil adhesion and chemotaxis: implications in allergic inflammation (adiponectin はヒト好酸球の接着能と遊走能を抑制する：アレルギー炎症に 関連して)
論文審査委員	(主査) 教授 山 田 祐一郎 (副査) 教授 眞 鍋 求 教授 石 井 聡

学位論文内容要旨

Adiponectin attenuates human eosinophil adhesion and chemotaxis: implications in allergic inflammation

(adiponectin はヒト好酸球の接着能と遊走能を抑制する：アレルギー炎症に関連して)

申請者氏名 山本梨絵

研究成績

研究目的

近年、先進国を中心に肥満人口の増加は社会問題になっており、さらに喘息の罹患率も増加傾向にある。疫学的研究では body mass index(BMI)と喘息の発症に相関性がみられ、さらに肥満によって気道過敏性が悪化することや、喘息治療の効果が減弱すること、肥満の改善により喘息症状も改善することが知られている。一方、脂肪組織はアディポサイトカインと呼ばれる機能性分子を分泌する内分泌器官として働き、免疫反応に影響を及ぼすことが明らかになってきた。adiponectin は血中に多量に存在し、肥満で血中濃度が低下するアディポサイトカインである。抗炎症分子として機能する adiponectin は、肥満によるインスリン抵抗性の改善効果を有し、アテローム性動脈硬化症に対しては保護的役割をもつことが知られている。近年の研究から、adiponectin が喘息の病態を改善する可能性が示唆されているが、その詳細なメカニズムについては不明である。そこで、喘息の病態に重要な働きをもつ好酸球の機能に対し、adiponectin が何らかの影響を及ぼしている可能性を検討するため、本研究を行った。

研究方法

ヒト末梢血から CD16 negative selection 法により高純度分離した好酸球を用い、2つの adiponectin 受容体である AdipoR1 と AdipoR2 の発現を RT-PCR 法と flow cytometry で検討した。なお、これまでに受容体の発現が報告されているヒト単球を末梢血から高純度分離し、ポジティブコントロールとして用いた。次に、adiponectin の好酸球機能への影響を検討するため、生存能は annexinV と propidium iodide 染色を用いて行った。さらに、eotaxin の細胞接着増強効果に対する adiponectin の影響を検討するため、adiponectin 前処理後

ICAM-1 でコーティングされたプレートを用い、接着した好酸球をライト-ギムザ染色後、顕微鏡下で観察・カウントした。eotaxin に対する好酸球遊走活性への影響は、Boyden chamber 法と細胞動態測定装置 (TAXIScan 法) を用いて検討した。eotaxin の細胞機能を抑制する経路を確認するため、eotaxin の受容体である CCR3 の好酸球表面発現と細胞内 Ca^{2+} 変化を flow cytometry で測定した

ヒト単球と同様に、ヒト好酸球において、adiponectin 受容体の AdipoR1 および AdipoR2 が mRNA、蛋白レベルで発現していることが明らかになった。adiponectin の存在下で好酸球を培養したところ、生存能には影響を認めなかった。一方で、eotaxin により増強された接着能は、1~20 μ g/ml の adiponectin で1時間前処理することで有意に抑制された。さらに、Byden chamber 法で eotaxin に対する遊走活性を測定したところ、adiponectin で前処理することで eotaxin に対する遊走能が抑制され、TAXIScan 法によって細胞遊走の速さと方向性を測定した結果、好酸球の遊走速度と遊走の直線性を妨げていることが観察された。adiponectin 前処理により CCR3 の表面発現に変化はみられなかったため、細胞内シグナルを検討したところ、eotaxin 濃度 0.1nM で誘導された細胞内 Ca^{2+} 流入は、adiponectin 前処理した場合は減弱し、eotaxin 濃度 50nM で誘導された細胞内 Ca^{2+} 流入は、adiponectin 前処理で明らかな変化を認めなかった。

結論

今回の検討から、生理的血中濃度の adiponectin はヒト好酸球生存能に影響することなく、eotaxin によって誘導された好酸球接着能と遊走能を抑制することがわかった。この抑制効果は、細胞表面の eotaxin 受容体である CCR3 の発現を変化させることなく、細胞内 Ca^{2+} シグナルの反応性を減弱することが関連しているものと考えられた。アレルギー性炎症において、好酸球は eotaxin により選択的に組織に遊走し、接着能の増強などの細胞活性化をおこすことで、炎症の増悪に寄与している。これらの好酸球機能に対してアディポサイトカインの影響を検討することは、喘息と肥満の関連を解明するために重要である。喘息マウスモデルでは、adiponectin を投与することで病態の改善が認められ、ヒトでは adiponectin を増加するとされる PPAR γ アゴニストが喘息の症状を改善することが報告されている。これらのことをふまえると、肥満を伴う喘息患者において血中の adiponectin を増加させることは、過剰な好酸球の活性化を抑制する新しい治療戦略になる可能性が示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：山田祐一郎

申請者：山本 梨絵

論文題名：Adiponectin attenuates human eosinophil adhesion and chemotaxis: implications in allergic inflammation (adiponectin はヒト好酸球の接着能と遊走能を抑制する：アレルギー炎症に関連して)

要旨

先進国を中心に肥満人口の増加と喘息の罹患率の増加傾向があり、BMI と喘息の発症に疫学的研究では相関性が認められる。著者の研究は、論文内容要旨に示すように、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一つである **adiponectin** が喘息の病態に重要な働きをもつ好酸球に対し、その接着能や遊走能を抑制することを明らかにした。すなわち、**adiponectin** が肥満と喘息を結びつける一つの因子であることを明らかにし、**adiponectin** を増加させることは過剰な好酸球の活性化を抑制する新たな治療戦略となる可能性を示した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

先進国を中心に肥満人口の増加と喘息の罹患率の増加傾向があり、BMI と喘息の発症に疫学的研究では相関性が認められるが、この分子機構は十分に解明されていない。**Adiponectin** は脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一つであるが、その血中レベルは BMI と逆相関することがわかっている。また、**adiponectin** は動脈硬化に対して保護的に作用することも明らかになっている。本研究では、**adiponectin** が喘息の病態に関連するのではないかとの仮説を、ヒト好酸球に 2 種類の **adiponectin** 受容体がいずれも発現すること、**eotaxin** で活性化された好酸球の接着能が **adiponectin** の前処理によって有意に抑制されること、好酸球の **eotaxin** に対する遊走能が **adiponectin** の前処理によって有意に低下すること、**eotaxin** で誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制することで検証した。このように、正常血中レベルの **adiponectin** がヒト好酸球の機能を直接作用で抑制することを示した点に斬新さがある。

2) 重要性

アレルギー性炎症において、好酸球の接着能や遊走能は、炎症の増悪に寄与している。今回の研究において、生理的血中濃度の **adiponectin** が **eotaxin** によって誘導される好酸球の接着能と遊走能を抑制することが明らかにされた。肥満を改善することや、**PPAR γ** アゴニストの投与は喘息の症状を改善することが示されているが、これらはいずれも **adiponectin** の血中レベルを増加させることがわかっている。肥満を伴う喘息患者において血中の **adiponectin** を増加させることが、過剰な好酸球の活性化を抑制する新しい治療戦略になる可能性を示した点で重要である。

3) 実験方法の正確性

健常人から採取した血液から、既報に基づき好酸球を単離し、**RT-PCR** 法やフローサイト法を用いた **adiponectin** 受容体の遺伝子ならびに蛋白発現の検討、**ICAM-1** でコーティングしたプレートを用いた接着能の検討、**Boyden chamber** や細胞動態測定装置を用い遊走能の検討、フローサイト法を用いた細胞内カルシウム濃度の検討を行っている。研究のプロトコールは倫理委員会で承認されたものであり、的確に統計学的検討が行われており、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

これまでの問題点の解決に向けた、研究目的、方法、実験結果、考察を明瞭に記載している。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。