

学 位 論 文 題 名

Mechanisms of epidermal growth factor—induced
contraction of guinea pig airways

(上皮増殖因子によるモルモット気道収縮の機序)

学位論文内容の要旨

〔背景・目的〕近年、気管支喘息において平滑筋の肥大・増殖を含む気道のリモデリングが注目を集めている。また、上皮増殖因子 (epidermal growth factor、以下EGFと略す) を含む増殖因子は平滑筋増殖作用を持つことが知られている。一方、これらの増殖因子は血管平滑筋の収縮作用をもつことが報告されており、増殖因子は動脈硬化病変において機能異常にも関与している可能性が示唆されている。そこで我々はEGFがモルモットの気道平滑筋を収縮させるか否か、収縮作用を有するのであればその機序の解明を目的として実験を行った。

〔方法〕350-550gのハートレー系雄性モルモットを用い、約3mm幅の気管条片を作成し、組織槽を用いKlebs-Henseleit液の存在下で等尺収縮力を測定した。マウス顎下腺由来のEGFを用いて以下の実験を行った。(1)上皮を剥離した条片 (以下、剥離条片) と健全上皮を持つ条片 (以下、健全条片) において、3-1000ng/mlのEGFによる濃度依存性の反応を測定した。(2)剥離条片を用いて、種々の薬剤の影響を検討した。これは、薬剤添加前後でEGF 30ng/mlにより惹起される張力を比較することにより行った。(3)試験管内で剥離条片と健全条片それぞれをEGF 300ng/mlで30分間刺激し、上清のプロスタグランジンF₂ α (PGF₂ α)、プロスタグランジンE₂ (PGE₂)の測定を行った。二群のサンプルを最初の30分間はKlebs-Henseleit液のみでインキュベートしサンプルの上清を採取、その後Klebs-Henseleit液を全て交換した後に、蒸留水またはEGF300ng/ml添加後30分間刺激し再び上清を採取した。

〔結果〕(1)剥離条片は100ng/mlにて最大となる濃度依存性の収縮を示し、EC₅₀は12.3 $\pm$ 1.6ng/mlであった。健全条片では一定の反応が得られなかったが、全体としては収縮は著明に抑制された。(2)サイクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシン・イブプロフェンはEGFによる気管の収縮をほぼ完全に抑制した。5-リポキシゲナーゼ阻害薬であるAA-861、ロイコトリエン受容体拮抗薬であるONO1078もほぼ完全に抑制した。トロンボキサンA₂合成阻害薬であるOKY046、トロンボキサン A₂ 受容体拮抗薬であるONO 3708 は収縮に影響を与えなかった。以上の結果より、アラキドン酸代謝産物がこの収縮において重要と考えられたので、アラキドン酸の遊離経路について検討を加えた。ホ

スホリパーゼA₂阻害薬であるメパクリン 10mMは収縮に影響を与えなかったが、100 mMではほぼ完全に抑制した。ジアシルグリセロールリパーゼ阻害薬であるU-57908、ホスホリパーゼD阻害薬であるヴォルトマンニンとも収縮に影響を与えなかった。一方、チロシンキナーゼの活性化は、増殖因子の増殖作用において重要な反応であるため、収縮作用における影響を検討した。阻害薬であるゲニスタインにより収縮は完全に抑制された。また、プロテインキナーゼCについてはその阻害薬であるH-7は収縮を完全に抑制したが、カルホスチンCは収縮に影響を与えなかった。(3)EGFは上皮の有無に関わらず、気管条片のPGF₂ α 産生を促進しなかった。EGFは健常条片のPGE₂産生を有為に促進したが、剥離条片ではコントロールの蒸留水に比して有為ではなかった。また、EGF添加後のPGE₂産生は健常条片は、剥離条片に比し有為に多かった。

〔考察〕EGFはin vitroにおいて、上皮を剥離したモルモット気管条片を濃度依存性に収縮し、健常上皮の存在によりその収縮は著明に抑制された。この収縮はサイクロオキシゲナーゼ阻害薬、5-リポキシゲナーゼ阻害薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬により抑制され、トロンボキサンA₂合成阻害薬、トロンボキサン A₂ 受容体拮抗薬により影響を受けなかったことより、ロイコトリエンないし収縮性プロスタノイドによると考えられた。しかし、ロイコトリエンについては合成阻害薬、受容体拮抗薬ともに抑制したこと、EGFが気管条片のPGF₂ α 産生を促進しなかったことより、ロイコトリエンが主な収縮物質と考えられた。サイクロオキシゲナーゼ阻害薬により完全に抑制された点については、1)ロイコトリエンがプロスタノイドを介して作用している、2)両者が相補的に作用している、3)EGF受容体刺激からアラキドン酸遊離の過程にサイクロオキシゲナーゼ阻害薬に阻害される酵素が存在する、などの可能性が考えられる。しかし、我々はモルモット気管条片のロイコトリエンD₄による収縮がインドメタシンにより増強されることを別に確認しているので、第一の可能性は否定的である。第二、第三の可能性については更なる検討が必要と考える。健常条片の収縮が剥離条片に比して著明に抑制された点については、PGE₂測定の結果より、EGFが気道上皮細胞のPGE₂産生を促進することによると考えられた。アラキドン酸の遊離経路については、ホスホリパーゼA₂阻害薬により抑制されたが、ジアシルグリセロールリパーゼ阻害薬、ホスホリパーゼD阻害薬により抑制されなかったことより、ホスホリパーゼA₂の活性化を介するものとする。チロシンキナーゼ阻害薬による抑制の結果より、増殖作用と同様、一連の収縮反応の基本にチロシンキナーゼ活性化の関与が推測された。また、プロテインキナーゼC については、H-7は収縮を完全に抑制したが、より特異的な阻害薬であるカルホスチンCでは影響がなかったことから、EGFによる収縮への関与は否定的と考えられた。

EGFが増殖作用のみならず気道平滑筋の収縮という機能的な作用を持つことは非常に興味深い。慢性喘息における気道の病理学的変化については平滑筋の肥大、腺細胞の増加、基底膜の肥厚が認められるが、これらの変化におけるEGFの関与は明かではなかった。しかし、共同研究者の網島らの免疫組織学的染色による検討では、喘息患者の肺では非喘息患者の肺に比して、上皮細胞・平滑筋・腺細胞などにEGF、EGF受容体が有為に高率に陽性であったことより、EGFの関与が推測されている。EGFは慢性喘息の非可

逆的な気道閉塞において病理学的のみならず機能的にも関与し、気道収縮を増強している可能性も示唆される。

〔結語〕 EGFはモルモット気道平滑筋の収縮作用を有し、その収縮には、チロシンキナーゼとホスホリパーゼA₂の活性化によるアラキドン酸の遊離と、引き続くロイコトリエンの産生が関与していると推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 盛 夫
副 査 教 授 小 山 富 康
副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

Mechanisms of epidermal growth factor—induced contraction of guinea pig airways

(上皮増殖因子によるモルモット気道収縮の機序)

気管支喘息において、平滑筋の肥大、増殖を含む気道のリモデリングが注目を集めており、平滑筋増殖作用を持つ上皮増殖因子（以下EGF）の関与が示唆されている。EGFは、血管平滑筋の収縮作用を持つことが知られているが、気道平滑筋への影響は未検討である。そこで、EGFのモルモット気道平滑筋に対する作用を検討した。

上皮を剥離した気管条片と健常上皮を持つ気管条片を用いて、収縮反応を測定した。上皮剥離条片は濃度依存性の収縮を示し、 EC_{50} は $12.3 \pm 1.6 \text{ ng/ml}$ (mean $\pm$ SE)であった。上皮健常条片では一定の反応が得られなかったが、全体としては収縮は著明に抑制された。以上より、EGFはモルモット気道平滑筋の収縮作用を有することが判明し、上皮はその収縮を抑制していると推測された。さらに、EGFによる収縮反応および上皮健常状態における収縮反応抑制の細胞内機序について検討を加えた。上皮剥離条片を用いた検討で、シクロオキシゲナーゼ阻害薬、5-リポキシゲナーゼ阻害薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬はEGFによる収縮をほぼ完全に抑制した。トロンボキサン A_2 合成阻害薬、トロンボキサン A_2 受容体拮抗薬は収縮に影響を与えなかった。以上より、アラキドン酸代謝産物がこの収縮において重要と考えられた。アラキドン酸の遊離経路については、チロシinkinase活性化によるホスホリパーゼ A_2 の活性化が関与することを明らかにした。また、プロテインキナーゼCについては、2種の阻害薬で結果が異なった。さらに、気管条片をEGFで刺激し、上清のプロスタグランディン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)、プロスタグランディン E_2 (PGE_2)を測定した。EGFは上皮の有無に関わらず、気管条片の $PGF_{2\alpha}$ 産生を促進しなかった。EGFは上皮健常条片の PGE_2 産生を有意に促進したが、上皮剥離条片では認められなかった。以上の結果から、EGFによる収縮はロイコトリエンと収縮性プロスタノイドによると考えられた。しかし、ロイコトリエンについては合成阻害薬、受容体拮抗薬ともに収縮を抑制したこと、EGFが気管条片の $PGF_{2\alpha}$ 産生を促進しなかったことより、ロイコトリエンが、関与する主な収縮物質と考えられた。シクロオキシゲナーゼ阻害薬により収縮が完全に抑制された点については、更なる検討が必要である。また、プロテインキナー

ゼC については、H-7 が収縮を完全に抑制したが、より特異的な阻害薬であるカルホスチンCが影響を与えなかったことよりEGFによる収縮には関与していないと考えられた。

EGFはモルモット気道平滑筋の収縮作用を有し、その収縮には、チロシンキナーゼとホスホリパーゼA₂の活性化によるアラキドン酸の遊離と、引き続くロイコトリエンの産生が関与していると結論された。また、上皮細胞のPGE₂産生を促進することにより、健康条片の収縮を抑制することが明かとなった。

発表後、まず主査および副査から質疑があった。総論的には、喘息患者の気道におけるEGF発現の有無や上皮の障害について、EGF産生細胞の種類、EGFの臓器特異性といった、EGFの実際の喘息における関わりについて、また、血管系との比較、気管を用いた実験結果がより末梢気道の病気である喘息の病態を反映しているか否かについての質疑があった。各論では、実験方法について、上皮剥離の際に放出されるメディエーターの影響、用いたEGFや薬剤濃度の妥当性について、indomethacin添加後の弛緩がEGFによる収縮に対して与える影響についての質疑、結果・解釈については、他の拡張性prostaglandinの検討の有無、prostaglandin系とleukotriene系とのバランスを規定しているものは何か、indomethacinのEGFレセプターへの影響の有無についてなどの質疑があった。また、会場からは、喘息においてEGFの上皮治癒における役割と増悪因子としての役割の関係、G蛋白の関連について質問があった。これらの質疑に対し申請者は、EGFの喘息における関与については、共同研究者の研究結果を引用して、喘息患者の肺では非喘息患者の肺に比して、平滑筋、腺細胞、基底膜にEGF、EGF受容体が有意に陽性であったことより、EGFは慢性喘息の非可逆的な気道閉塞において病理学的に関与している可能性があるとの回答を行った。加えて、その他の質疑においても申請者は、質問者を納得させる妥当な回答を行った。また、後日、主査、副査による審査委員会を開催し、本研究の斬新性、実験法、結果の解釈の妥当性、関連領域の知識、さらに研究者としての申請者の資質について審議をおこない、いずれの点についても高く評価できるとの結論に達した。

審査員一同は、これらの成果を認め、博士(医学)の学位に値するものと判定した。