

学 位 論 文 題 名

Enhancement of Goblet Cell Hyperplasia  
and Airway Hyperresponsiveness by Salbutamol  
in a Rat Model of Atopic Asthma

(アトピー喘息のラットモデルにおけるサルブタモール投与による  
杯細胞過形成および気道過敏性亢進の増強)

学位論文内容の要旨

【研究目的】：気管支喘息において、気道上皮の杯細胞過形成は特徴的な組織学的変化の1つである。喘息死患者では著しい杯細胞過形成の存在が報告されており、粘液分泌亢進が高度な気道狭窄の一因と考えられている。アトピー喘息の動物モデルにおいて抗原感作後に反復抗原吸入を施行すると気道に杯細胞過形成が惹起されることから、気道のアレルギー炎症が杯細胞過形成の生成に関与するものと推測される。実際、IL-4、IL-13などのアトピー喘息に重要な役割をもつサイトカインが杯細胞の分化増殖と関係することが報告されている。一方、杯細胞過形成はいくつかの非アレルギー刺激においても惹起されることが報告されており、中でも注目すべきは喘息治療薬である $\beta_2$  刺激薬がラットの気道や唾液腺で杯細胞過形成を惹起したとの報告である。今回我々は、杯細胞過形成の惹起に関してアレルギー炎症と $\beta_2$  刺激薬であるサルブタモールと間に相互作用が存在するか否かをラットのアトピー喘息モデルを用いて検討した。

【対象と方法】：Brown Norway (BN) ラット 6 週齢雄に卵白アルブミン (OA)1mg を皮下投与して感作し、2 週後より 5%OA エアゾルの吸入を 4 日おきに 4 週間施行した。4 週間の期間中、皮下に埋め込んだ浸透圧ミニポンプより持続的に薬剤の投与を行った。最終吸入の 24 時間後にメサコリンに対する気道過敏性を測定した後、肺を取り出してホルマリン固定し、中枢気道における上皮の杯細胞数、粘膜下の浸潤好酸球数、気道面積 (平滑筋・気道壁・上皮) を評価した。メサコリン過敏性は気道内圧を 150%に増加させる吸入メサコリン濃度(PC150Mch) にて評価した。杯細胞数は基底膜の長さが 2mm 以上の中枢気道における気道上皮 1000 個あたりの杯細胞数で比較した。好酸球数は同様の気道において基底膜 1mm あたりの粘膜下浸潤細胞数で比較した。気道面積計測はコンピューター画像解析装置を用いて行った。

**実験 1** 感作ラット群は投与する薬剤により、生食コントロール群 (n = 5)、サルブタモール投与群 (0.5mg/kg/day, n = 5)、メチルプレドニゾン投与群(0.5mg/kg/day, n = 4)の 3 群にわけ、非感作ラット群 (n = 5)を加えた 4 群において気道過敏性および組織学的変化を比較検討した。

**実験 2** 実験 1 の結果サルブタモール投与が感作ラットにおける杯細胞過形成を著しく増強することが明らかとなったため、次にサルブタモール単独の杯細胞過形成惹起の有無を検討するため、非感作

ラットにサルブタモールを投与し生食投与コントロールと比較した。また、感作ラットにおけるサルブタモールの杯細胞過形成増強作用が、ステロイド薬の同時投与により抑制されるか否か検討する目的で、感作ラットにサルブタモールとメチルプレドニゾロンの同時投与を行い比較検討した。

【結果】：気道上皮の杯細胞数は非感作ラット群に比し感作ラット(生食投与)群で著しい増加を認めた ( $4.8 \pm 1.3$  vs  $53.7 \pm 7.3$ ,  $p < 0.01$ )。感作ラットにおいて、サルブタモール投与群では生食投与群のさらに2倍以上の有意な杯細胞数増加を示し ( $114.5 \pm 11.8$ ,  $p < 0.01$ )、メチルプレドニゾロン投与群では完全に増加が抑制された ( $10.0 \pm 3.2$ ,  $P < 0.01$ )。粘膜下好酸球数は、同様に感作ラット群で著しい増加を認めた ( $3.4 \pm 0.4$  vs  $25.6 \pm 3.0$ ,  $p < 0.01$ ) が、サルブタモール投与群においても同様であり ( $26.5 \pm 6.0$ )、メチルプレドニゾロン投与で完全に抑制された ( $6.8 \pm 1.4$ ,  $p < 0.01$ )。気道面積計測においては、非感作ラット群に比し感作ラット(生食投与)群で気道壁と上皮面積の有意な増加を認めたが、サルブタモール投与群と生食投与群の間には差を認めなかった。この面積増加はメチルプレドニゾロン投与群では完全に抑制された。メサコリンに対する気道過敏性は非感作ラット群に比し感作ラット(生食投与)群で著しく亢進し ( $-0.03 \pm 0.1$  vs  $-0.60 \pm 0.2$ ,  $p < 0.01$ )、サルブタモール投与群ではさらに有意に亢進した ( $-0.95 \pm 0.05$ ,  $p < 0.05$ )。メチルプレドニゾロン投与群では過敏性亢進は完全に抑制された ( $-0.07 \pm 0.03$ ,  $p < 0.05$ )。非感作ラットにおいては、杯細胞数はサルブタモール投与群と生食投与群とで差を認めなかった。感作ラットにおけるサルブタモールの杯細胞過形成増強作用は、メチルプレドニゾロンの同時投与により完全に抑制された。

【考察】：本研究により我々は、抗原感作を受けたラットに4週間の反復抗原吸入を行うことで惹起される杯細胞過形成は、サルブタモールの投与により有意に増強されることを示した。しかし、粘膜下の好酸球浸潤や気道壁の肥厚はサルブタモールの投与の影響を受けなかった。また、サルブタモール単独投与による杯細胞過形成は認められなかった。これらの結果から、サルブタモールが喘息における杯細胞過形成を特異的に増強する可能性が示唆された。これまで大量の非選択的 $\beta$ 刺激薬あるいは選択的 $\beta_2$ 刺激薬が腺細胞の肥大増殖を引き起こすという報告はあったが、喘息モデルにおける作用を検討した報告はない。我々の用いた臨床投与量におけるサルブタモールの全身投与で、非感作ラットでは杯細胞過形成が惹起されないにもかかわらず、感作ラットでは著しく杯細胞過形成が増強したメカニズムに関してはいくつかの可能性が推察された。第一に、 $\beta_2$ 刺激薬が直接あるいは間接的に杯細胞過形成に関与する免疫反応を増強する可能性があげられる。IL-4、IL-13、TNF- $\alpha$ 、上皮由来成長因子(EGF)などが杯細胞を分化・増殖させることが報告されており、 $\beta_2$ 刺激薬がこれらのサイトカインの作用を強めるならば杯細胞過形成が増強すると考えられる。第二に、 $\beta_2$ 刺激薬の気道拡張作用により、より多くの抗原が肺に吸入されて気道炎症を強めた可能性があげられる。第三に、第一の仮説とは相反するが、 $\beta_2$ 刺激薬がヒスタミンやロイコトリエン、TNF- $\alpha$ 、最近ではIL-4やIL-13の放出を抑制するという報告があり、長期の $\beta_2$ 刺激薬投与により $\beta_2$ アドレナリンレセプターのdown regulationやtachyphylaxisが起り、それらの抗炎症作用が阻害される可能性があげられる。最後の可能性としては、サルブタモールの杯細胞過形成増強が $\beta_2$ アドレナリンレセプターを介さない非特異的なものである可能性も除外できない。今回の実験では、サルブタモールは杯細胞過形成とともに気道過敏性亢進の増強も引き起こした。両者に共通のメカニズムが働いているか否かは明らかではないが、杯細胞過形成による上皮のバリア機能の変化が過敏性亢進に影響を与える可能性や、サルブタモールによる気道炎症の増強が両者を共に増強した可能性が考えられる。

【結語】：今回我々は、ラットのアトピー喘息モデルにおいて臨床投与量のサルブタモールの全身持続投与が、杯細胞過形成と気道過敏性亢進をともに増強すること、それらはステロイドの同時投与で抑制されることを明らかにした。ヒトの喘息においてもこのような現象が起る可能性を念頭に置く必要がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 上 出 利 光  
副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

## Enhancement of Goblet Cell Hyperplasia and Airway Hyperresponsiveness by Salbutamol in a Rat Model of Atopic Asthma

(アトピー喘息のラットモデルにおけるサルブタモール投与による  
杯細胞過形成および気道過敏性亢進の増強)

気道上皮の杯細胞過形成は、気管支喘息の特徴的な組織学的変化の一つであり、それによる過剰な粘液分泌は気道狭窄の一因となる。感作ラットに抗原吸入を行うと気道上皮に杯細胞過形成が惹起される。一方、喘息治療薬である $\beta_2$  刺激薬の全身投与が、ラットの気道や唾液腺に杯細胞過形成を惹起したとの報告もある。これらの背景より、喘息の治療に $\beta_2$  刺激薬を用いることで、気道上皮の杯細胞過形成がより増強される可能性が考えられた。そこで我々は、 $\beta_2$  刺激薬であるサルブタモールの投与が、アトピー喘息モデルラットにおいて惹起される気道上皮の杯細胞過形成にどのような影響を与えるか検討した。6週齢の Brown Norway (BN) ラットを卵白アルブミンで感作し、4週間の反復抗原吸入を施行した。その間、サルブタモール とメチルプレドニゾロン (各 0.5mg/kg/day) の持続投与を行い、これらの薬剤が中枢気道における上皮の杯細胞数、粘膜下の浸潤好酸球数、気道面積 (平滑筋・気道壁・上皮) およびメサコリン気道過敏性に与える影響を調べた。抗原反復吸入後の著しい気道上皮杯細胞の増加はサルブタモールの投与でさらに有意に増強し、メチルプレドニゾロンの投与で完全に抑制された。粘膜下の好酸球浸潤や気道壁の肥厚はサルブタモール投与の影響を受けなかったが、メチルプレドニゾロン投与でほぼ完全に抑制された。メサコリン気道過敏性亢進は杯細胞過形成と同様に、サルブタモールの投与で有意に増強しメチルプレドニゾロンの投与で有意に抑制された。サルブタモールの非感作ラットへの投与では杯細胞過形成は惹起されず、感作・抗原反復吸入ラットへの投与で認められた杯細胞過形成増強作用はメチルプレドニゾロンの同時投与により完全に抑制された。これらの結果は、サルブタモールが喘息における杯細胞過形成を特異的に

増強する可能性を示唆した。これまで大量の $\beta 2$  刺激薬が杯細胞過形成を引き起こすという報告はあったが、喘息モデルにおける $\beta 2$  刺激薬投与の影響を検討した報告はない。我々は臨床投与量のサルブタモールの全身投与が、非感作ラットでは杯細胞過形成を惹起せず、感作ラットでは著しく杯細胞過形成を増強することを明らかにした。ヒトの喘息においても $\beta 2$  刺激薬の投与が杯細胞過形成や気道過敏性亢進を増強し病態の悪化を招く可能性を念頭に置く必要がある。

発表後、副査上出教授から本実験において杯細胞増生および過敏性亢進は好酸球とは独立した動きを示したが、同じ Th2 応答の中でそれぞれどのようにレギュレートされているのか質疑があった。杯細胞増生や過敏性亢進の惹起には IL-4 や IL-13 などが重要であり、IL-5 や好酸球は関与しないと回答した。次に、杯細胞増加は hyperplasia であるか metaplasia であるか質疑があり、正常上皮細胞に MUC5 遺伝子の発現を介して形質変化することから metaplasia の可能性があるかと回答した。また、IgE の上昇や、種差による違いに関して質疑があった。IgE は2週をピークに上昇し、他のラットでは必ずしも喘息様の反応を起こさないと回答した。次に、主査小林教授から、杯細胞過形成がアレルギー炎症で起るものと、タバコなどによる単なる炎症で起るものとで違いがあるのかという質疑があった。アレルギー炎症以外での杯細胞増生機序に関する報告はなく、同じ機序で惹起されるか否か解明するためには非アレルギー性炎症を惹起するコントロールを作成する必要があると回答した。本研究ではさらに杯細胞過形成のメカニズムを調べるのが重要であるとのコメントがあった。また、臨床的に $\beta 2$  刺激薬の吸入を行うことと本研究の結果との関連についての質疑があった。吸入においてもおそらく同様の変化が惹起される可能性があり、レギュラーユースは喘息に対して悪影響をもたらす可能性があるかと回答した。副査西村教授から過敏性亢進のメカニズムに関する質疑があった。杯細胞増性と同様にアレルギー炎症の増強を介した機序や、上皮の機能的・形態的变化による二次的な機序が考えられると回答した。次に、 $\beta 2$  刺激薬の杯細胞増生作用が $\beta 2$  受容体を介するか否か、実際にメディエーターとの相互作用を介するか否かを証明するために今後如何なる実験を行うべきかという質疑があった。 $\beta 2$  受容体ブロッカーを投与する実験や、細胞内での転写因子レベルでの相互作用を調べる実験などを行う必要があると回答した。

この論文は、 $\beta 2$  刺激薬の喘息モデルラットにおける投与が気道上皮の杯細胞過形成と過敏性をともに増強することを示した初めての論文あり、臨床的な示唆に富む研究とであると高く評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。