

学位授与番号：乙 3 0 7 7 号

氏 名：小島 淳

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 26 年 2 月 12 日

学位論文名：

慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive pulmonary disease ; COPD）の肺胞マ  
クロファージにおける apoptosis inhibitor of macrophage（AIM）の発現

主論文名：

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression in alveolar macrophages  
in COPD.

(慢性閉塞性肺疾患(COPD)の肺胞マクロファージにおける Apoptosis inhibitor  
of macrophage (AIM)の発現)

学位審査委員長：宇都宮一典教授

学位審査委員：南沢享教授、中川秀己教授

## 論文要旨

論文提出者名	小島 淳	指導教授名 桑野 和善
<p data-bbox="212 663 437 696">主論文題名</p> <p data-bbox="212 712 1356 790">“Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression in alveolar macrophages in COPD”</p> <p data-bbox="212 806 1356 884">(慢性閉塞性肺疾患(COPD)の肺胞マクロファージにおける Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)の発現。)</p> <p data-bbox="212 900 734 934">誌名 Respiratory Research 2013, 14:30</p> <p data-bbox="212 994 300 1028">要旨</p> <p data-bbox="212 1043 1356 1939">アポトーシス抵抗性によってもたらされる肺胞マクロファージの著明な蓄積は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)の病因に関与することが知られている。一方 Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM)は、組織マクロファージから産生され、様々なアポトーシス誘導刺激に対して抗アポトーシス作用を持つことが知られている。よって我々は、AIM のヒト肺胞マクロファージにおける発現、そしてタバコ煙抽出液(CSE)刺激下で AIM がアポトーシス調節へ関与しているのかどうか検討を試みた。COPD 患者 5 例、COPD を有さない喫煙者 5 例、非喫煙者 5 例から採取した肺組織検体を用いて AIM の免疫組織染色を行い、肺胞マクロファージ数及び AIM 陽性肺胞マクロファージ数を評価することで、AIM の免疫組織学的検討を行った。次に、COPD を有さない被験者の気管支肺胞洗浄液より肺胞マクロファージを分離培養し、肺胞マクロファージにおける CSE 刺激に対する AIM の発現レベルの変化を検討した。抗アポトーシス分子である Bcl-xL のノックダウンは siRNA トランスフェクションを用いた。また、単球-マクロファージ系細胞株である U937 細胞を用いて、AIM の抗アポトーシス作用機序に関して検討した。COPD 患者の肺組織検体において、肺胞マクロファージ数と AIM 陽性肺胞マクロファージ数の明らかな増加を認めた。AIM の発現は、肺胞マクロファージにおいて mRNA 及び蛋白レベルで示され、さらに CSE 刺激によりその発現は亢進した。また AIM は、肺胞マクロファージにおける Bcl-xL の発現を有意に亢進させた。さらに U937 細胞において、Bcl-xL は CSE 刺激下における AIM の抗アポトーシス機序に一部関与していた。これらの結果から、喫煙による AIM の発現が COPD 患者における肺胞マクロファージの蓄積に関与している可能性が示唆された。</p>		

## 論文審査の結果の要旨

小島 淳の Thesis は、慢性閉塞性肺疾患の肺胞マクロファージにおける apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) の発現と題され、Respiratory Research (IF 3.64)に2013年に発表された同名の主論文と他2編の副論文から構成されており、呼吸器内科 桑野和善教授のご指導によるものである。

慢性閉塞性肺疾患(以下、COPDと略す)は、我が国でも主要な死亡原因の一つになりつつあり、喫煙がその主な原因である。これまでの報告から、肺胞マクロファージ集積の機序を明らかにすることは、COPDの病態を理解する上で重要と考えられている。しかしながら、COPD肺における肺胞マクロファージ数の増加が、マクロファージの局所での増殖によるものなのか、単球の流入増加によるものなのか、もしくはアポトーシス抵抗性による寿命の延長によるものなのかは、未だ明らかになっていない。一方、Apoptosis inhibitor of macrophage (以下、AIMと略す)は、組織マクロファージによってのみ産生され、マクロファージ自身のアポトーシスを強く抑制する作用を持つことが知られているが、肺組織での発現の有無に関し、検討例はない。そこで、小島氏は、ヒト肺胞マクロファージにおけるAIMの発現を検討し、タバコ煙抽出液刺激下における動態と肺胞マクロファージのアポトーシスとの関係を明らかにする目的で、本研究を行なった。

COPD患者5例、COPDでない喫煙者5例、非喫煙者5例から採取した肺組織を用いて、AIM発現の免疫組織学的検討を行ったところ、COPD患者の肺組織検体において、肺胞マクロファージ数とAIM陽性肺胞マクロファージ数の明らかな増加を認めた。そこで、肺胞マクロファージを、COPDを有さない患者の気管支肺胞洗浄液より分離し、タバコ抽出物刺激によるAIM発現の変化を検討したところ、濃度依存的にタバコ抽出液はAIMの発現を亢進することが判明した。そこで、単球-マクロファージ系細胞株であるU937細胞を用いて、リコンビナントAIMのタバコ抽出物誘導性アポトーシスに対する効果を、DNA断片抽出法、カスパーゼ活性化、FACSによるDNA含有分析により検討した。U937細胞では、AIMは抗アポトーシス子であるBcl-xLの発現を有意に亢進させた。タバコ抽出物は、U937細胞におけるカスパーゼ8ならびに9の活性化とともにアポトーシスを誘導した。これらのapoptoticシグナルの活性化とアポトーシスはAIMの前処置により抑制され、この抑制効果はAIMのsiRNAによってキャンセルされることが判明した。これらの研究結果から、小島氏は、肺胞マクロファージに発現したAIMが、パラクライン的に作用し、Bcl-xLなど抗アポトーシスシグナルの活性化などを介して、肺胞マクロファージ集積に関与している可能性が示唆されたと結論した。

本 thesis の公開審査は、南沢 享教授、中川秀巳教授を審査委員として、平成 26 年 2 月 3 日に行われた。席上、以下のような質問があった。

- 肺組織標本で AIM の発現を免疫組織学的に検討しているが、特異性はどの程度期待できるのか。肺胞壁にも染まっているが、細胞種は何か。他の細胞種からの AIM の産生の意義をどのように考えるか。
- 健常者からの肺胞洗浄液を用いているが、喫煙者あるいは COPD 患者からの洗浄液からのマクロファージを検討すべきではないか。
- タバコ抽出液の主成分は何か。用いた濃度の生理的意義は検討したか。タバコ喫煙本数との関係は、どのようなものか。
- 抗アポトーシス効果について、Bax 系への影響を検討したか。
- COPD 動物モデルでは、同じ知見がえられているか。
- AIM 自体の誘導因子は何か。TNF- $\alpha$  など、他のアポトーシス誘導因子の関与はないか。
- AIM の抗アポトーシス作用のみで、COPD におけるマクロファージの浸潤を説明しうるか。COPD における肺胞上皮細胞のアポトーシスは、むしろ病態の増悪に関与している。この乖離をどのように説明するか。
- AIM は肝臓などでは抗腫瘍効果が知られている。タバコの発がん作用について、AIM の関与はないのか。

小島氏はこれらの質問に対して、いずれも的確に回答した。

その後、南沢教授、中川教授と慎重に審議し、本研究は肺疾患における AIM の意義を初めて明らかにした興味深いものであり、学位請求論文として十分に価値のあるものとの結論に至った。