

論文の内容の要旨

論文題目: 気道上皮細胞における Interleukin-17A 及びウイルス double-stranded RNA によるケモカイン産生の影響と細胞内シグナリングの研究

氏名: 松崎 博崇

【背景・目的】

気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患といった慢性炎症性呼吸器疾患は、世界的に罹患率が高く、現在もなお高い死亡率で推移している。慢性炎症性呼吸器疾患の病態の一つである急性増悪は、主にウイルス感染が主因となる。各疾患の重症度とともに急性増悪の頻度は高くなり、患者の呼吸機能や全身状態の悪化、高い死亡率の誘因となっている。急性増悪中の気道炎症の特徴として、好中球遊走性ケモカインである CXC chemokine ligand (CXCL)8 及び好中球の増加、それに引き続く好中球性の気道炎症が挙げられるが、その詳細な病態はいまだ十分に解明されていない。

Interleukin (IL)-17A は分子量が約 21KDa のポリペプチドから成るホモ二量体の糖蛋白質で、主に T helper type 17 細胞により産生される。IL-17A は様々な自己免疫疾患の病態に関与するが、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患患者の肺組織にも高発現し、その発現が呼吸機能の低下と関連することが報告されており、また好中球性の気道炎症に関与することが示唆されている。しかしながら、IL-17A が急性増悪時にどのように影響しているかいまだに十分に解明されていない。本研究では、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患患者で発現が増加している IL-17A がウイルス感染時においてどのように好中球性炎症に影響するかを調べることを目標とし、気道上皮細胞のウイルス感染モデルにおいて IL-17A の CXCL8 産生への影響およびその機序を検討した。

【方法・結果】

ウイルス感染のモデルとしては、Toll-like receptors (TLRs) 中の TLR3 のリガンドであり、ウイルス dsRNA アナログである poly(I:C) を使用した。TLRs は自然免疫において、細菌やウイルスの構成成分を認識する受容体蛋白質であり、炎症性サイトカインやケモカインを誘導することにより免疫応答の誘導に重要な役割を担う。中でも TLR3 がウイルス由来の double-stranded (ds) RNA を認識することで、その後の免疫応答を誘導する。まず、IL-17A 及び poly(I:C) の刺激に伴う気道上皮細胞からのケモカイン産生について評価した。ケモカインアレイアッセイを行い、刺激に伴う BEAS-2B 細胞からのケモカイン産生について網羅的に評価を行った。デンシトメトリー解析の結果、IL-17A 単独刺激群では無刺激群に比べて 3 倍以上の上昇を示すケモカインは認めなかったが、poly(I:C) 単独刺激群では GRO, CXCL1, CCL1, CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL5 などのケモカインにおいて無刺激群に比べ 3 倍以上の上昇を認めた。さらに IL-17A 及び poly(I:C) の共刺激群において GRO, CXCL1, CXCL8 の 3 つのケモカインが poly(I:C) 単独刺激群に比べて 3

倍以上の上昇を認め、IL-17A と TLR3 signaling において相互作用があることを確認した。続いて、IL-17A や poly(I:C)による CXCL8, CXCL1 の mRNA 発現や蛋白の産生について、qRT-PCR, ELISA を用いて validate し、IL-17A, poly(I:C)による共刺激で BEAS-2B 細胞及び NHBE 細胞から相乗的に CXCL8, CXCL1 の mRNA の発現及び蛋白の産生が誘導されることを確認した。

次に、細胞内シグナリングの解析のために、TLR3/TRIF 経路の関与について、TLR3 または TRIF を標的とした siRNA を用いて検討した。TLR3 または TRIF をノックダウンすることにより、poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 及び CXCL1 mRNA の発現が有意に抑制され、poly(I:C)によるケモカイン産生は、TLR3/TRIF を介していることを明らかにした。次に IL-17A 及び poly(I:C)による CXCL8 産生の相乗効果における MAPK の関与について検討した。まず、共刺激により p38, Erk1/2 のリン酸化が単独刺激より増強されることを確認し、またその MAPK の選択的阻害薬(SB203580, U0126)で、CXCL8 の相乗的な産生が著明に抑制されることを確認し、IL-17A/TLR3 signaling による CXCL8 の相乗的な産生において p38, Erk1/2 を介していることを明らかにした。さらに共刺激によるケモカイン産生における NF- κ B の関与についても検討した。I κ B α リン酸化は共刺激で誘導され、その阻害薬(BAY11-7082)で CXCL8 の産生が抑えられることを確認し、CXCL8 の産生には NF- κ B を介していることも判明した。そこで、IL-17A, poly(I:C) 刺激での NF- κ B, AP-1 の転写活性について、ルシフェラーゼレポーターアッセイで検討を行ったが、poly(I:C)単独刺激群と共刺激群による活性に有意差を認めず、また刺激後の NF- κ B の核内移行について、核抽出物内の NF- κ B-p65 を Western blotting で解析することで評価したが、poly(I:C) 単独刺激群と共刺激群では大きな差を認めなかった。つまり、IL-17A/TLR3 signaling による CXCL8 相乗的産生においては、p38, Erk1/2 を介しているが、相乗効果においては NF- κ B の関与がないことが判明した。

さらに、IL-17A の転写後調節の評価目的に actinomycin D chase study を試行した所、共刺激群で poly(I:C)単独刺激群に比べて経時的に actinomycin D 投与後の CXCL8 mRNA の高い発現を維持し、mRNA の安定化が相乗効果に寄与していることも明らかとなった。加えて、p38 シグナルの下流にある mRNA の翻訳・転写や mRNA の安定化に重要な役割を果たすとされている MK2, MNK1/2, MSK1/2 の関与について、そのリン酸化阻害薬である MK-2 inhibitor III, ETP-45835, SB747651A を用いて評価を行ったが、CXCL8 の産生に有意な抑制を認めず、これらの系は介していないことが判明した。

【結論】

IL-17A は、poly(I:C)刺激による気道上皮細胞からの CXCL8 をはじめとするケモカイン産生を相乗的に誘導することが判明した。さらにその CXCL8 産生における IL-17A と TLR3 signaling の相互作用においては、p38, Erk1/2 を介する経路および mRNA の安定化が誘導されることによると判明した。

慢性呼吸器疾患の急性増悪中の好中球性気道炎症において、IL-17A は気道上皮細胞において TLR3 signaling を介して、気道炎症の増強に関与することが示唆された。