

審査の結果の要旨

氏名 松崎 博崇

本研究は、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患などの慢性炎症性肺疾患患者の気道中で発現が増加している IL-17A がウイルス感染を主因とする急性増悪時においてどのように好中球性気道炎症に影響するかを明らかにすることを目標とした。気道上皮細胞のウイルス感染モデルにおいて IL-17A のケモカイン産生への影響およびその機序を検討し、下記の結果を得ている。

1. ウイルス感染モデルとして、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。IL-17A 及び poly(I:C) の刺激に伴う BEAS-2B 細胞からのケモカイン産生についてケモカインアレイアッセイで網羅的に評価を行ったところ、単独刺激に比べて IL-17A 及び poly(I:C) の共刺激で CXCL8, CXCL1, GRO といった好中球遊走性ケモカインの発現亢進を認め、これらのケモカインの産生に関して IL-17A と TLR3 signaling において相互作用があることが明らかとなった。
2. IL-17A や poly(I:C) 刺激による 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が示された。
3. 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。
4. 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。共刺激により p38, Erk1/2 のリン酸化が単独刺激より高度に誘導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。
5. 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の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。

6. IL-17Aの転写後調節の評価目的にactinomycin D chase studyを試行したところ、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。

7. 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。

以上、本論文はIL-17Aが、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を明らかにした。さらにそのCXCL8産生におけるIL-17AとTLR3 signalingの相互作用は、p38, Erk1/2を介する経路の活性化およびmRNAの安定化が誘導されることによると判明した。本研究は、慢性炎症性肺疾患の急性増悪において重症度や治療抵抗性の原因となる好中球性気道炎症にIL-17Aが関与していることを明らかにし、今後の急性増悪の病態解明やIL-17Aやその受容体をターゲットにした治療解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。