

審査の結果の要旨

氏名 奥田 謙一

本研究は、肺の恒常性を維持するために必要不可欠な防御機能である気道粘液線毛クリアランスにおいて重要な役割を果たす分泌性ムチン MUC5AC と MUC5B の気道内における領域および細胞特異的発現を明らかにするため、正常のヒト肺組織およびヒト気道上皮細胞を用いて、形態学および分子生物学的な手法を用いて解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 不慮の事故で死亡した喫煙歴および肺疾患の既往のない患者から得られた肺組織を気管から終末細気管支まで7つの領域に分類し、それぞれの領域において MUC5AC、MUC5B の mRNA および蛋白質の発現分布を免疫組織化学染色、RNA in situ hybridization によって解析した。中枢気道においては、粘膜下腺で MUC5B のみが発現しており、表層上皮では MUC5AC、MUC5B ともに発現していた。一方、気道壁に粘膜下腺や軟骨を含まない、直径2mm未満の細気管支においては、MUC5AC の発現はほとんど見られず、MUC5B のみが発現していた。細気管支から肺胞への移行領域である終末細気管支では、MUC5AC、MUC5B いずれの発現も認められなかった。既知の肺における形態学的パラメーターを用いてそれぞれの気道領域における表層上皮の MUC5AC、MUC5B の mRNA 発現量を定量したところ、MUC5AC mRNA の発現は中枢気道表層上皮に集中しており、MUC5B mRNA の発現は細気管支表層上皮において最大であった。以上の結果より、気道内における2つの主要な分泌型ムチンである MUC5AC と MUC5B は、正常ヒト気道内において互いに異なる領域特異的な発現をしていることが示された。また、正常のヒト終末細気管支においてムチンの発現が抑制されていることは、肺胞でのガス交換機能を保つための重要な肺の機能である可能性が示唆された。
2. 上記同様に得られたヒト肺組織を気管表層上皮、区域気管支表層上皮、細気管支、肺胞領域に分類し、それぞれの組織より抽出された RNA を用いて、droplet digital PCR assay にて各領域における MUC5AC および MUC5B mRNA の絶対定量を行った。中枢気道である気管および区域気管支では、MUC5AC と MUC5B mRNA の発現量に有意な差は認められなかったが、細気管支においては MUC5B mRNA の発現量が MUC5AC と比較し有意に多かった。この結果は、上記のヒト肺組織における MUC5AC、MUC5B の mRNA および蛋白質の発現分布と一致するものであった。
3. ヒト気道内における MUC5AC および MUC5B の発現細胞を明らかにするため、

MUC5AC および MUC5B mRNA の発現と club cell のマーカーである CCSP mRNA の共発現を蛍光 RNA in situ hybridization を用いて解析した。中枢気道である主気管支表層上皮では、CCSP 陽性細胞が MUC5AC および MUC5B をともに発現しており、末梢気道である細気管支では CCSP 陽性細胞は MUC5B のみを発現していた。終末細気管支においては、MUC5AC および MUC5B mRNA 陰性の CCSP 陽性細胞が表層上皮の多くを占めていた。以上の結果より、ヒト正常気道表層上皮では、CCSP 陽性 club cell が領域特異的に MUC5AC、MUC5B の産生を担っていることが示された。また、これまでヒト気道では細気管支に限局して存在していると考えられていた CCSP 陽性 club cell が分泌型ムチン産生細胞として中枢から末梢気道にかけて広く分布していることが明らかにされた。

4. 中枢および末梢気道から別々に得られたヒト気道上皮細胞である large airway epithelial (LAE) 細胞と small airway epithelial (SAE) 細胞を conditional reprogramming cell method を用いて培養し、分化させたところ、中枢および末梢気道の特徴を維持した異なる phenotype を示し、これらがヒトの中枢および末梢気道の in vitro モデルとなりうることを示した。これら LAE および SAE 細胞から分泌された分泌型ムチン MUC5AC と MUC5B を質量分析にて定量したところ、LAE、SAE 細胞両者において MUC5B が MUC5AC と比較し有意に多く分泌されていることが示された。また、これらの in vitro モデルにおいて MUC5B の産生細胞を明らかにするため蛍光 RNA in situ hybridization にて MUC5B と CCSP 陽性 club cell の共発現を解析したところ、ヒト肺組織で見られた結果と同様に、LAE、SAE 細胞いずれにおいても、CCSP 陽性 club cell が MUC5B mRNA を発現していた。これらの in vitro の実験系から得られた結果は、ヒト肺組織を用いた解析によって得られた結果と矛盾しないものであった。

以上、本論文はヒト肺組織およびヒト気道上皮細胞を用いた系統学的および緻密な解析から、正常ヒト気道内における分泌型ムチン MUC5AC と MUC5B の領域および細胞特異的発現を明らかにした。本研究で明らかとなった、正常気道内の MUC5AC および MUC5B の発現分布は、これら分泌型ムチンの機能解明および気道閉塞疾患の病態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。