

論文の内容の要旨

論文題目 上皮間葉転換による A549 細胞の外来由来抗原に対する反応性亢進について

氏名 小林 宏一

【背景】

気管支喘息の大多数の症例では吸入ステロイド薬の普及に伴って病状のコントロールが可能になってきたものの、重症・難治症例の克服が課題として残されている。重症・難治化の機序の一つとして、不可逆的な気流制限と気道過敏性を引き起こす気道リモデリングが重要な役割を果たしていると考えられており、気道リモデリングには Transforming growth factor- β ; TGF- β を含めた種々の成長因子の作用とそれにより引き起こされる上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition; EMT)が関与している。気管支喘息の他、慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease; COPD)や特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)といった呼吸器の common disease においても EMT およびその主要なメディエーターとして TGF- β の関与が示されている。これら EMT および TGF- β がその病態に関与する呼吸器疾患において、感染症を契機とした急性増悪が共通にみられ臨床上大きな問題となっているが、EMT と急性増悪の一因である呼吸器感染症とのかかわりは明らかにされてこなかった。そこで本研究では、上述の呼吸器疾患において EMT に密接に関与していると考えられる TGF- β で EMT 誘導したヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞を用いて、Toll-like receptor 9; TLR9 に認識されることで

pathogen-associated molecular patterns; PAMPs として作用する CpG oligodeoxynucleotides; CpG ODN に対する反応性の変化を解析し、EMT により病原菌由来抗原に対する反応性が変化するか検討した。

【方法】

A549 細胞に TGF- β 1 を 72 時間作用させ EMT を誘導した後、CpG ODN 刺激を加えた。細胞表面蛋白の発現、および CpG ODN の細胞内取り込みはフローサイトメトリーで、上清中のサイトカイン濃度は Cytometric Bead Assay で測定した。IkB α の発現は Western blot analysis で、その他の細胞内蛋白発現は細胞内染色後にフローサイトメトリーで測定した。mRNA 発現量は逆転写後 real time PCR を用いてサイクル比較法で相対定量した。連続変数の 2 群間比較は両側 t 検定で、多群間比較は ANOVA 後 Tukey 検定で、有意水準 0.05 として解析した。

【結果】

先行文献に基づき TGF- β 1 10 ng/ml で A549 細胞を 72 時間刺激すると、A549 細胞は間葉系細胞に特徴的な形態を示し、上皮系マーカーである E-cadherin の発現低下と、間葉系マーカーである N-cadherin の発現増加が認められた。これらの結果から、本実験系においても EMT 誘導が再現できていると考えられた。

同様にして A549 細胞に EMT 誘導した後 CpG ODN で刺激したところ、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 の産生が濃度・時間依存的に有意に増加した。また、mRNA レベルでの発現量も有意に増強していた。TGF- β 1 処理単独でもベースラインのサイトカイン産生量が増加傾向であったが、CpG ODN 刺激との interaction はいずれのサイトカインについても統計学的有意であり、TGF- β 1 による EMT 誘導と CpG ODN 刺激との間に相乗効果が存在することを示す結果であった。一方、EMT 誘導しなかった A549 細胞においてはこれらのサイトカインの有意な産生増加は認められなかった。また、TGF- β signaling 非

依存的な EMT 誘導が報告されているタバコ煙抽出液(Cigarette Smoke Extract; CSE)による EMT 誘導では、CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生の増加は認められなかった。

TLR9 の特異的な suppressive ODN である ODN H154 の添加により、EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進は著明に抑制され、TLR9 は EMT 誘導後 CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生において必須のレセプターであると考えられた。EMT 誘導により A549 細胞における TLR9 の発現は亢進せずむしろ低下していたが、細胞内への CpG ODN の取り込みが亢進していた。CpG ODN の取り込みに関わる既知の受容体である CD14 および CD205 の発現は EMT 誘導後も変化しておらず、EMT による細胞内への CpG ODN 取り込み亢進の機序は不明であった。

NF κ B 活性化の特異的阻害である BAY11-7082 を使用し阻害実験を行ったところ、EMT 誘導後 CpG 刺激によるサイトカイン産生は BAY11-7082 投与により有意に抑制され、EMT 誘導後 CpG 刺激によるサイトカイン産生は NF κ B 依存的であると考えられた。I κ B α の発現量は TGF- β 1 刺激単独で有意に低下し、TGF- β 1 によるベースラインでのサイトカイン産生亢進は、NF- κ B の活性化によるものと考えられた。一方、TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞に CpG ODN 刺激を加えても I κ B α の発現量に変化は見られず、mRNA 安定化作用も認められなかった。IL-6 と MCP-1 の産生は JNK 経路の阻害で部分的に低下する傾向が見られ、p38 経路の阻害で有意に低下したが、IL-8 の産生はこれらの経路の阻害で抑制されず、IL-6、IL-8、MCP-1 いずれの産生にも共通して関与する MAP キナーゼ経路は確認されなかった。

【考察】

IL-6、IL-8、MCP-1 は先述の呼吸器疾患における急性増悪に関与し、IL-8、MCP-1 については好中球性炎症を惹起することでステロイド抵抗性に関与していると考えられている。TGF- β 1 による EMT 誘導が CpG ODN 刺激に対する反応性を亢進させ、これらのサイトカイン産生を誘導することで、リモデリングを伴う気管支喘息、COPD、IPF

といった呼吸器疾患の急性増悪に関与している可能性が考えられた。また、TGF- β 1 による EMT 誘導時にはベースラインのサイトカイン産生が亢進し、難治喘息における好中球性炎症や COPD における全身性の炎症反応の維持に関与している可能性が考えられた。TGF- β 1 によるベースラインでのサイトカイン産生亢進は、NF- κ B の活性化によるものと考えられたが、EMT 誘導で取り込みが亢進した CpG ODN がどのようなシグナル経路でサイトカイン産生を誘導したのかは解明できず、今後の課題として残された。

本研究で使用した CpG ODN は B-class ODN のみであり、作用が異なることが知られている A/C-class ODN による刺激や、ヒト正常気道上皮細胞および肺胞上皮細胞を使用していない点が **limitation** として挙げられる。また、ウイルスも呼吸器疾患における急性増悪の原因として細菌と同様に重要な病原体であり、特にその大部分を占める RNA ウイルス由来抗原を認識する他の TLR 刺激についても検討する必要があると考えられた。

【結論】

本研究により、TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞では、CpG ODN の細胞内取り込みと、それに続くサイトカイン産生応答が亢進していることが明らかになった。これらの現象は CSE による EMT 誘導では認められなかった。TGF- β 1 による EMT 誘導が外来由来抗原への反応性を亢進させ、リモデリングを伴う気管支喘息、COPD、IPF といった呼吸器疾患の急性増悪に関与している可能性が示唆された。