

審査の結果の要旨

氏名 小林 宏一

本研究は、上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition; EMT) が病態に深く関わる呼吸器疾患において、EMT が感染症を契機とした急性増悪にどのような影響を与えるかを明らかにするため、呼吸器疾患における EMT に密接に関与する Transforming growth factor- $\beta$ ; TGF- $\beta$  で EMT 誘導したヒト肺胞上皮癌細胞株 A549 細胞を用いて、EMT による病原菌由来抗原に対する反応性の変化について解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. TGF- $\beta$ 1 刺激による A549 細胞の EMT 誘導について、形態学的変化、上皮系マーカー、間葉系マーカーの発現変化から、再現性を確認した。
2. TGF- $\beta$ 1 刺激により EMT 誘導した A549 細胞では、CpG oligodeoxynucleotides; CpG ODN 刺激に対する IL-6、IL-8、MCP-1 の産生がタンパクおよび mRNA レベルで有意に増加したが、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。TGF- $\beta$ 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有意であり、TGF- $\beta$ 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。
3. Toll-like receptor 9; 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ことが示された。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 誘導後も不変であった。
4. NF $\kappa$ B 活性化の特異的阻害である BAY11-7082 により、EMT 誘導後 CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生は有意に抑制され、EMT 誘導後 CpG 刺激によるサイトカイン産生は NF $\kappa$ B 依存的であることが示された。I $\kappa$ B $\alpha$  の発現量は TGF- $\beta$ 1 刺激単独で有意に低下しており、TGF- $\beta$ 1 によるベースラインでのサイトカイン産生亢進は、NF- $\kappa$ B の活性化によるものと考えられた。一方、TGF- $\beta$ 1 で EMT 誘導した A549 細胞に CpG ODN 刺激を加えても I $\kappa$ B $\alpha$  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。
5. 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。

6. TGF- $\beta$  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。

以上、本論文は TGF- $\beta$ 1 で EMT 誘導した A549 細胞において、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を明らかにした。感染症を契機とした呼吸器疾患の急性増悪に対する EMT の関与を示唆する重要な知見をもたらしたと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。