

## [課程－ 2]

### 審査の結果の要旨

氏名 竹島 英之

本研究は気管支喘息のリモデリングにおいて重要な役割を果たす線維芽細胞と IL-13 を用いて、IL-13 シグナリングにて変動する遺伝子群を網羅的な解析により同定し、喘息の気道炎症や気道リモデリングに影響を与えるような因子、治療ターゲットの候補や新たなバイオマーカーの候補となるような因子を探索することを目的とした。Suppressor of cytokine signaling (SOCS)ファミリーの1種であるサイトカイン誘導性 SH2 含有タンパク質 (CISH)が候補として抽出され、好酸球を気道に誘導するケモカイン産生への影響および機序を検討し、下記の結果を得ている。

1. 肺線維芽細胞での IL-13 刺激によるトランスクリプトームの変化を Agilent SurePrint G3Human Gene Expression 8x60K v3 を用いて解析した。canonical pathway 解析にてエオタキシンファミリーは IL-13 刺激の1時間後に有意に亢進していた。upstream regulators 解析では正の制御因子として IL-13 を認め、負の制御因子として IFN シグナル関連の制御因子を認めた。disease and bio functions 解析では好酸球やリンパ球の活性化と相関があることが確認された。これにより IL-13 に刺激された肺線維芽細胞がケモカインファミリーを産生し、好酸球を含めた炎症細胞を気道に誘導している可能性が示された。
2. IL-13 刺激の24時間後に発現が亢進していた387個の遺伝子と、51名の気管支喘息の気道生検データにて IL-13 の発現と強い相関を有していた215個の遺伝子と比較したところ、CISH や CCL26 を含む11個の遺伝子が共通して認められた。実際に気管支喘息患者の気道組織において CISH と IL-13 との間に強い相関が認められた。SOCS ファミリーのうち CISH は IL-13 によって強く発現の亢進を認め、エオタキシンファミリーの中で CCL26 は IL-13 により強く誘導された。以上より、CISH は肺線維芽細胞における IL-13 シグナルの重要な制御因子である可能性が示唆された。
3. CISH、SOCS1、CCL26 遺伝子の発現変化を定量的 RT-qPCR によって検証した。IL-13 刺激の1時間後に CISH、SOCS1 の発現が最大となり、CCL26 の発現は24時間後まで増加することが示された。また、CISH、SOCS1 の上昇は、ウエスタンブロットによってタンパク質レベルでも確認された。ELISA により IL13 が CCL26 を強力に誘導することをタンパク質レベルで確認した。

4. IL-13によって刺激された肺線維芽細胞における STAT6 のリン酸化と CISH と CCL26 の誘導における役割を検討した。STAT6 のリン酸化は IL-13 刺激の 30 分後に最も増強され、STAT6 の siRNA を用いたノックダウンにより CISH、CCL26 の IL-13 に誘導された発現が著明に減少した。以上より、IL-13 は肺線維芽細胞における STAT6 シグナル伝達を介して CISH および CCL26 の発現を誘導していることが明らかになった。

5. CCL26 の発現における CISH の役割を検討した。loss of function として CISH の siRNA を用いたノックダウンにより、IL-13 刺激の 24 時間後における CCL26 の発現は増強されることが分かった。次に、gain of function として発現ベクターをトランスフェクションし CISH を過剰発現させた肺線維芽細胞を IL-13 で刺激したところ、IL-13 により誘導される CCL26 の産生が減弱している事が確認できた。以上より CISH は肺線維芽細胞における IL-13 誘導性の CCL26 の産生における重要な制御因子であることが分かった。

6. 気管支喘息患者における CISH の発現の臨床的意義を公開データベースからの遺伝子発現プロファイルを入手し検討した。56 名の気管支喘息患者では、喀痰中の CISH 発現が IL-13 発現と強く相関していた。CISH の発現は 17 名の好酸球性気管支喘息患者の喀痰において、30 名の非好酸性気管支喘息患者の喀痰より有意に高かった。重症気管支喘息患者からの気管支肺胞洗浄液の CISH 発現は、健康な対照群または中等度の気管支喘息患者と比較して有意に高かった。

以上、本論文は CISH が肺線維芽細胞における IL-13 シグナル伝達経路の制御における重要な分子であり、CISH の制御不全により CCL26 などのケモカイン産生が増強され喘息における気道リモデリングが進展する可能性がある。本研究により CISH が新たなバイオマーカーや治療ターゲットの候補となりうる可能性が示唆され、今後の重症気管支喘息の治療に寄与すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。