

論文の内容の要旨

論文題目 三次元共培養法を活用した肺上皮間葉相互作用の解明

氏名 堀江真史

肺の発生過程において、原腸陥入以降 **branching morphogenesis** に至るまで、上皮-間葉の相互作用は極めて重要な役割を果たす。同様に肺癌や気管支喘息など様々な呼吸器疾患では、上皮-間葉の相互作用が疾患の維持・進展において不可欠であり、これらの相互作用を再現できる簡便な実験系の樹立が疾患の病態解明や治療法の検証において必要である。三次元培養法はこのような細胞-細胞間や細胞-マトリックス間の相互作用の分子メカニズムの解明に有用である。本論文では下記の3つのモデルにおいて三次元培養法を活用し、疾患の病態解明・治療法の検証をおこなった。モデル1:三次元コラーゲン培養法を用いたヒスタミンの肺線維芽細胞によるゲル収縮への効果と気流制限における役割解明、モデル2:肺癌細胞との癌間質線維芽細胞 (**cancer associated fibroblast:CAF**) の三次元共培養によるCAFの機能解析、モデル3:三次元培養法を活用した **TGF- β** (**transforming growth factor- β**) リガンドを標的とする肺癌治療効果の検討。

モデル1において、コラーゲンゲルコントラクションアッセイにてヒスタミンは時間、及び濃度依存的に **HFL-1** 胎児肺由来肺線維芽細胞を含むコラーゲンゲル収縮を誘導することを示した。他の胎児肺由来肺線維芽細胞株である **WI-38** や **IMR-90**、及び4例の成人肺由来の初代培養から得られた正常肺線維芽細胞においてもヒスタミンはコラーゲン収縮を誘導することを示した。阻害剤を用いた検討で、この効果はヒスタミンの4種類ある受容体の中で **H1** 受容体を介していることが明らかとされた。**RT-PCR** により、3種類の胎児肺由来の肺線維芽細胞株、及び4例の成人肺由来の肺線維芽細胞においてヒスタミン **H1** 受容体の発現を確認した。ヒスタミン **H1** 受容体の古典的経路として **diacylglycerol** と **inositol 4,5-trisphosphate (IP3)** が存在しているが、これらの阻害剤を用いた検討では **IP3** 経路を介していることを示した。さらに細胞内カルシウム濃度の測定により、気道平滑筋細胞でよく知られている細胞の収縮のメカニズムと同様に線維芽細胞でも細胞内カルシウムシグナリングがコラーゲンゲル収縮に関与していることが示唆された。以上よりヒスタミンは肺線維芽細胞に作用することにより気流制限に関与することが示唆された。また気流制限が起きている難治性気管支喘息のマネージメントにおける抗 **H1** 受容体拮抗薬の可能性を示すことができた。

モデル2ではまず癌間質線維芽細胞、及び正常肺由来線維芽細胞 (**normal fibroblast:NF**) の初代培養の樹立に成功した。引き続いてCAFとNFの比較を行い、定量 **RT-PCR**、及びウエスタンブロットにてCAFはより **α -SMA (α -smooth muscle actin)** を高発現しており筋線維芽細胞のフェノタイプを有していることを示した。またコラーゲンゲル収縮能をCAFがNFと比較して増強していることを示した。新たに肺癌細胞とCAFの三次元共培養法を樹立し、CAFは3例のうち2例で **A549** 肺

癌細胞のコラーゲンゲルへの浸潤を増強していることを示した。以上より、今回樹立した三次元共培養モデルは *in vivo* の癌組織を再現し、癌細胞の浸潤を評価することができた。そしてこのモデルで使って CAF の肺癌における役割を解析することができた。

モデル 3 では合成 miRNA (micro RNA) 発現レンチウイルスベクターの構築に成功した。フローサイトメトリーによる EmGFP (emerald green fluorescent protein) の検出を行ったところこれらのレンチウイルスベクターの A549 と HFL-1 への導入効率は極めて良好であった。また ELISA を用いた上清中の濃度測定では 30% 以下の TGF- β リガンドのノックダウン効率を認め両細胞で効率的・選択的にノックダウンすることに成功した。細胞増殖アッセイでは TGF- β リガンドのノックダウンは両細胞の増殖抑制をした。さらに A549 では EMT (epithelial-mesenchymal transition) マーカーや線維化関連の成長因子が修飾されて、HFL-1 では I 型コラーゲンの発現が減少した。これらの細胞の機能に関して TGF- β リガンドのサイレンシングは HFL-1 によるコラーゲンゲル収縮を抑制した。さらに A549 と HFL-1 の三次元共培養モデルにおいて、A549 での TGF- β リガンドのサイレンシングは肺癌細胞の浸潤を抑制に成功した。さらにヌードマウスへの肺癌異種移植モデルでは TGF- β リガンドのノックダウンは肺癌の成長を抑制する傾向を認めた。これらの所見は TGF- β の腫瘍促進能と、TGF- β のノックダウンによる腫瘍間質相互作用の阻害する利点を示唆した。

このように上皮-間葉の相互作用は肺の発生・分化の過程のみならず様々な呼吸器疾患においてきわめて重要な役割を果たしている。本論文では三次元培養法を用いて *in vivo* で実際に起こっている病態を *in vitro* で再現することにより気管支喘息や肺癌など代表的な呼吸器疾患の病態解明、治療の有効性の検証などを行うことができた。