

論文の内容の要旨

論文題目 : Tumor necrosis factor superfamily member 14 (TNFSF14; LIGHT)による

気道系上皮細胞からの CXCL8 の産生と上皮間葉転換の誘導

三上 優

[背景]

線維化は組織の障害に対する過剰反応によって、線維芽細胞が必要以上に活性化・集簇することによって生じると考えられている。線維化を来している組織において、病理像では線維芽細胞の集簇が認められるが、従来はこれらの線維芽細胞のソースとして、組織に元々存在する線維芽細胞と循環中の線維細胞が集簇することで生じると考えられていた。しかし、近年上皮細胞が間葉系細胞に形質を変化させることで間葉系細胞としての機能を獲得する上皮間葉転換によって生じた細胞が、慢性炎症を生じている組織の線維化を生じる可能性が示唆されてきている。

肺における線維化は、特発性肺線維症をはじめとした特発性間質性肺炎だけでなく、重症喘息患者に見られる気道リモデリングにおいても上皮下の線維化病変として認められ、非可逆的な気道閉塞に関与すると考えられている。これらの病態には TGF- β をはじめとした成長因子や様々な炎症性サイトカインの関与が示唆されている。腫瘍壊死因子スーパーファミリーの LIGHT(homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes)は 2 型膜タンパクの一種で、活性化 T 細胞(他に単球、顆粒球、樹状細胞)から生成される。当初は HVEM に HSV グリコプロテイン D と競合的に結合することを見いだされたことから命名された、14 番目の腫瘍壊死因子スーパーファミリー (TNFSF14)である。主な機能として T 細胞の増殖や様々な癌細胞のアポトーシスを生じると考えられているが、近年リウマチや炎症性腸疾患などの炎症性疾患に関与している可能性が示唆されている。呼吸器領域においては、2011 年に Doherty らはハウスダストダニ(house dust mite; HDM)誘発喘息マウスモデルに LIGHT 抗体を使用することで気道の線維化および平滑筋過形成といった気道リモデリングや気道過敏性の亢進が減弱することを示し、さらに LIGHT ノックアウトマウスにおいて気道リモデリングの減弱だけでなく TGF- β と IL-13 といった気道リモデリングに関与するサイトカインの肺での発現低下を認めたことを報告した。実際の臨床においては、中等症以上の喘息患者の喀痰中で軽症患者と比較して LIGHT 濃度の増加を認め、喀痰中の LIGHT 濃度と%FEV1 は負の相関を示し、LIGHT と喘息の重症度との間に関連がある可能性が報告されている。また、肺線維症を生じた強皮症患者の気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid ;BALF)中の LIGHT 濃度が健常人及び肺線維症を生じていない強皮症患者と比較して上昇していることから、肺の線維化関与している可能性が示唆されている。これらの背景から重症喘息および肺線維症の新たな治療ターゲットとして注目されている。

しかしながら、LIGHT が線維化に関与する機序や重症喘息に関与する機序については不明な点が多い。このため、我々は LIGHT が上皮間葉転換を通じて組織の線維化に関与する可能性と、気

道上皮細胞からのサイトカイン・ケモカインの誘導に関与する可能性を検討した。特に我々は重症喘息の病態において好中球性の気道炎症に注目し、好中球のケモアトラクタントである CXCL8 産生に焦点を当て、解析を行った。

[方法]

上皮間葉転換の研究において、肺上皮細胞の機能解析に広く用いられている A549 細胞を用い、10%FBS+DMEM 培地で培養した。上皮間葉転換の指標として、上皮のマーカーである E-cadherin と間葉系細胞のマーカーである vimentin を中心に発現の変化を検討した。以前より上皮間葉転換を誘導する因子として知られている TGF- β による上皮間葉転換に及ぼす LIGHT の影響について、免疫細胞染色による形態学的変化、qRT-PCR および western blotting による上皮および間葉系マーカーの発現変化、間葉系細胞としての機能評価としての gel contraction assay を用いて評価した。また、LIGHT 単独での上皮間葉転換誘導の機序について細胞内のシグナルを検証した。

LIGHT による気道上皮細胞からの CXCL8 産生においては、気道上皮細胞株の BEAS-2B 細胞と正常ヒト気道上皮細胞 NHBE 細胞を BEBM 培地で培養し検討した。まず受容体の発現をフローサイトメトリーで確認後、サイトカインアレイを用いて LIGHT による気道上皮細胞からのサイトカインプロファイルを検討した。続いて、LIGHT による CXCL8 産生における時系列、濃度依存的変化について検討した。気道上皮細胞による CXCL8 産生に至る細胞内シグナルの解明には、初めに siRNA を用いた受容体のノックダウンを行い CXCL8 産生に与える影響を検討した。その後 MAPK、NF- κ B シグナルの活性化を western blotting で確認し、それらの活性阻害剤を投与することで CXCL8 産生への影響を検討した。

[結果]

LIGHT は TGF- β による上皮間葉転換を増強した。また、LIGHT は gel contraction assay で TGF- β が生じた上皮間葉転換細胞の収縮能を増強した。また、LIGHT 投与によって A549 細胞の上皮マーカーである E-cadherin の減弱と vimentin, N-cadherin をはじめとした間葉系マーカーを増強し単独で上皮間葉転換を誘導することを初めて見いだした。LIGHT による上皮間葉転換の機序として、当初は A549 細胞からの TGF- β 産生誘導による機序を想定したが、LIGHT は TGF- β 産生を誘導しなかった。また、TGF- β による上皮間葉転換において知られている smad-snail シグナルを LIGHT は誘導せず、Erk1/2 シグナルの活性化によって生じることを見いだした。

LIGHT の受容体として LT β R(Lymphotoxin beta receptor)と HVEM(Herpes virus entry mediator)が知られているが、BEAS-2B 細胞および NHBE 細胞においては、LT β R のみ発現していた。サイトカインアレイを用いた検討において、LIGHT は CXCL8, IL-6, GRO などの様々な炎症性サイトカインを BEAS-2B 細胞から誘導した。また、LIGHT は CXCL8 および IL-6 mRNA を刺激後 1 時間で有意に誘導し、濃度依存的に CXCL8, IL-6 産生を誘導した。続いて LIGHT による CXCL8 産生に至る経路の検討として、その受容体である LT β R の siRNA を細胞に導入することで CXCL8 産生が低下した。また、MAPK リン酸化酵素阻害剤のうち Erk1/2 リン酸化酵素阻害剤である U0126 投与により CXCL8 産生が抑えられたことから、Erk のリン酸化が CXCL8 産生に関与することが示唆された。また、以前より CXCL8 産生における核内転写因子として NF- κ B が知られているが、気道上

皮細胞に NF- κ B 阻害剤を使用することで LIGHT による CXCL8 産生を抑制した。このことから LIGHT による CXCL8 産生において、まず LT β R からシグナルが Erk を活性化し、NF- κ B を誘導する機序を想定した。しかし、我々の想定に反し、U0126 投与によっても LIGHT による NF- κ B の核内移行を阻害しなかった。以上の結果から、これらの経路は独立して CXCL8 産生に寄与することが示唆された。

[結論]

LIGHT は、TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強し、間葉系細胞の機能として、より強い収縮能を獲得した。さらに LIGHT は単独でも上皮間葉転換を誘導した。さらに、LIGHT は気道炎症に関係するサイトカイン・ケモカイン産生を気道上皮細胞から誘導することにより、気道炎症を増強させる可能性が示唆された。特に CXCL8 の産生においては Erk1/2 経路および NF- κ B 経路を活性化することで生じることが示された。また、LIGHT によるこれらの反応は、呼吸器疾患における肺の線維化や重症喘息の病態と深く関与している可能性が示唆された。気道上皮細胞では LIGHT の受容体として LT β R が発現しており、LT β R を阻害するような分子標的薬を開発することで、これらの病態に関する新たな治療のターゲットとなる可能性が考えられた。