

審査の結果の要旨

氏名 三上 優

本研究は気管支喘息および肺線維症形成過程において重要な役割を演じていると考えられる腫瘍壊死因子 **superfamily member LIGHT** の気道上皮に与える影響を明らかにするために、ヒト肺胞上皮癌由来細胞である **A549** 細胞を用いて **TGFβ** による上皮間葉転換(EMT)への影響を検討し、次に不死化ヒト気道上皮細胞株 **BEAS-2B** 細胞および正常ヒト気道上皮細胞 (**NHBE** 細胞)を用いて気道上皮細胞からの **LIGHT** 刺激によるサイトカイン産生を検討し下記の結果を得ている。

1. **A549** 細胞に **TGFβ1** で刺激を行うと、**E-cadherin** の発現減弱と **vimentin** の発現上昇を認め、上皮間葉転換を誘導した。**LIGHT** はその作用を mRNA, タンパクレベルで増強した。また、間葉系細胞としての機能解析として用いられるゲルコントラクションアッセイにおいて、**A549** 細胞は **TGFβ1** 刺激による上皮間葉転換を生じることで収縮能を獲得し、**LIGHT** との共刺激を行うと収縮能は増強した。これらの結果から **LIGHT** が **TGFβ** による上皮間葉転換を増強することが示された。
2. **A549** 細胞に **LIGHT** 単独で刺激を行うと、濃度依存的に **E-cadherin** を減弱し、**vimentin**, **αSMA**, **N-cadherin** の発現を増強した。このことから **LIGHT** 単独で上皮間葉転換を生じることが示された。この機序として、**TGFβ** シグナルの誘導が考えられたが、**LIGHT** は **A549** 細胞からの **TGFβ** 産生を誘導せず、**TGFβ** シグナルの直下に存在する **smad** シグナルを誘導しなかった。一方、**LIGHT** は **Erk** シグナルを誘導し、**Erk** のリン酸化酵素選択的阻害薬である **U0126** を投与することによって **LIGHT** による上皮間葉転換を抑制した。これらの結果から **LIGHT** による上皮間葉転換は **Erk** シグナルを介したものであることが示された。
3. サイトカインアレイを用いた検討で、**LIGHT** は **BEAS-2B** 細胞から **CXCL8**, **IL-6**, **IL-10** といった炎症性サイトカインを誘導した。重症喘息

における好中球性炎症に関与していると考えられている CXCL8 に注目したところ、LIGHT 刺激により mRNA およびタンパクレベルで有意に発現を亢進させ、LIGHT の好中球性炎症への関与が示された。

4. LIGHT の受容体として LT β R と HVEM が知られているが、フローサイトメトリーを用いた検討で BEAS-2B 細胞は LT β R のみを発現していた。そして、LT β R に対する siRNA を作成し、受容体の発現を減弱させたところ、LIGHT 刺激による CXCL8 産生を有意に減弱した。このことから気道上皮細胞における LIGHT 刺激による CXCL8 産生には LT β R が関与していることが示された。
5. LIGHT 刺激により気道上皮細胞の MAPKs のリン酸化を誘導した。また、NF- κ B の核内移行を誘導した。阻害剤を用いた検討で、Erk のリン酸化を阻害すること、NF- κ B 核内移行を阻害することで CXCL8 の誘導が減弱したことから、LIGHT による CXCL8 産生にはこれらの経路が関与していることが示された。
6. Erk リン酸化を阻害しても NF- κ B の核内移行を阻害しないことから、LIGHT による CXCL8 産生には Erk を介した経路と NF- κ B を介した経路の 2 つが独立して作用している可能性が示された。

以上、本論文は気道上皮細胞において LIGHT 刺激を行うことで上皮間葉転換を誘導することや、CXCL8 産生を誘導することが示された。本研究によって LIGHT による重症喘息および肺線維症の発症機序についての解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。