

論文の内容の要旨

論文題目 肝細胞増殖因子、Interferon- $\gamma$ による  
ヒト気道上皮細胞の増殖制御に関する研究

氏名 高見 和孝

気道上皮細胞は、細菌、ウイルス、タバコ、大気汚染物質などの外的な有害物質や好中球エラスターゼ、好酸球 cationic protein などの内的因子に常時暴露されている。気道上皮細胞は、これらの外的、内的な有害因子により障害を受けており、気道上皮細胞の障害とそれに引き続く修復反応が、呼吸器疾患の発症、増悪に重要な役割を演じている。気道上皮細胞の増殖や、分化の調節の破綻は、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患などに見られる気道のリモデリングへとつながり、それゆえ気道上皮細胞の増殖調節の分子生物学的なメカニズムを明らかにすることは、重要であると思われる。実際、気管支喘息患者では、高率に気道上皮の剥離脱落などの障害とともに、杯細胞の増生が観察される。この気道上皮細胞の剥離脱落は、軽症安定期から認められ、気道の過敏性とも相関が指摘されている。気道上皮細胞の増殖は、気道、肺の恒常性の維持に必要不可欠であり、各種増殖因子や、サイトカインによって、正および負の増殖の調節を受けている。

慢性閉塞性肺疾患やびまん性汎細気管支炎の初期病態としては、直径 2mm 以下のいわゆる small airway が重視されている。また、気管支喘息においても、その重症化、不可逆性の要因として末梢気道の障害が注目されている。従来、この small airway の領域は手術、剖検肺でのみ検討する事が可能であった。近年田中らの開発した極細気管支鏡を用いて、直視下にこの領域から選択的にヒト末梢気道上皮細胞を採取する事が可能となった。極細気管支鏡を用いて採取された、ヒト末梢気道上皮細胞を用いて、気道上皮細胞の増殖機構を解明する事は、慢性閉塞性肺疾患、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息などの末梢気道領域を障害する疾患の病態解明において重要であると考えられる。

肝細胞増殖因子 (HGF) は、もともとラットの肝細胞の増殖因子として同定された。その後の研究により、いろいろな臓器において増殖、遊走、分化、器官形成など様々な生理活性をもつ多能性増殖因子であることが明らかとなった。HGF の受容体 c-Met と HGF は、両者ともに肺において強く発現しており、HGF は気道上皮細胞の増殖において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。実際、ラットの急性肺障害モデルにおいて、HGF が肺胞 II 型上皮細胞の増殖を促進し、組織の修復に関与すること、ブレオマイシンによる肺線維症モデルにおいて、肺胞 II 型上皮細胞の増殖を促進し、線維化を抑制することが報告されている。また肺線維症の患者、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の患者において、肺の線維芽細胞からの HGF の産生の減少が報告されており、HGF による気道上皮細胞の増殖を含めた組織再生能の低下が、肺の破壊、リモデリングにつながっている可能性が示唆されている。このように HGF は、肺においても組織再生において重要な役割を果たしており、ヒトの末梢気道上皮細胞の増殖に対する HGF の効果を見ることは、気道上皮細胞の剥離が見られる、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患などの病態解明に重要であると考えられる。Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) は、活性化 T 細胞、特に Th1 タイプの T 細胞より産生されるサイトカインである。IFN- $\gamma$  は、気管支喘息

を初めとする気道炎症にも重要な役割を果たしており、気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄液中の IFN- $\gamma$  の増加も報告されている。以前我々は、IFN- $\gamma$  が、ヒト気道上皮細胞の増殖を抑制することを報告した。IFN- $\gamma$  の負の増殖シグナルは、損傷を受けた気道粘膜の修復過程において、過度の気道上皮細胞の増殖を抑え、適切な修復を行うことに重要な役割を果たしている可能性があり、そのメカニズムの解明は重要であると思われる。

この研究において我々は、極細気管支鏡を用いて採取されたヒト末梢気道上皮細胞を用いて、HGF 及び IFN- $\gamma$  の気道上皮細胞の増殖に対する効果を検討した。さらに、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B 細胞を用いて、HGF および IFN- $\gamma$  の増殖に対する作用の分子生物学的なメカニズムを検討した。

HGF は、極細気管支鏡を用いて採取されたヒト末梢気道上皮細胞の増殖を促進した。HGF は、血清の存在下においてのみ気道上皮細胞の増殖活性を示し、無血清下では、増殖活性を示さなかった。この HGF によるヒト末梢気道上皮細胞の増殖は、IFN- $\gamma$  により抑制された。HGF の増殖促進および IFN- $\gamma$  の増殖抑制効果は、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B 細胞においても同様に観察された。HGF によるヒト気道上皮細胞の増殖効果のメカニズムを検討するため、増殖に重要な細胞内シグナル伝達物質である extracellular signal-regulated kinases(ERK1/2)のリン酸化に対する HGF の効果を検討した。無血清下では、HGF は細胞の増殖活性は示さなかったが、興味深いことに ERK のリン酸化は誘導した。さらに我々は、ERK の上流で ERK をリン酸化する MEK1 の特異的な阻害剤である PD98059 を用いて、HGF の気道上皮細胞増殖効果における ERK の役割を検討した。PD98059 は、HGF および血清刺激に対する ERK のリン酸化も、細胞増殖もともに阻害した。さらに p38 mitogen-activated protein kinase(p38 MAP kinase)、phosphatidylinositol 3-kinase(PI 3-K)のヒト気道上皮細胞の増殖に対

する役割を検討するために、同様に薬理的阻害実験を行った。p38 MAP kinase の特異的阻害剤である SB203580 は、ERK のリン酸化にも細胞増殖にも共に影響を与えなかった。PI 3-K 経路の特異的な阻害剤である LY294002 は、HGF および血清刺激に対する ERK のリン酸化に影響を与えず、細胞増殖を部分的に阻害した。増殖すなわち細胞周期に対する直接の影響を見るため、G1 期より S 期への移行に重要な役割をはたす G1 cyclin の一つである cyclin D1 (正の調節因子) および p27<sup>kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor (負の調節因子) の発現に対する HGF の効果を検討した。無血清下において、HGF 刺激により cyclin D1 の発現は増強されたが、p27<sup>kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor の発現の抑制は見られなかった。PD98059 を用いて、HGF による cyclin D1 の発現に対する ERK の役割を検討したが、PD98059 は HGF による cyclin D1 の発現には影響を与えなかった。次に、HGF による気道上皮細胞の増殖を、IFN- $\gamma$  が抑制するメカニズムを検討した。IFN- $\gamma$  は、HGF による ERK のリン酸化および cyclin D1 の発現に対しては影響を与えなかった。HGF と血清刺激により、p27<sup>kip1</sup> の発現は経時的に減弱したが、IFN- $\gamma$  を投与することにより p27<sup>kip1</sup> の発現は逆に増強することが観察された。これらの結果より以下のことが示された。ヒト気道上皮細胞の損傷からの修復過程において、HGF は正の増殖因子、IFN- $\gamma$  は負の増殖因子として、気道上皮細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。HGF によるヒト気道上皮細胞の増殖作用に、ERK の活性化は、必要条件ではあるが十分条件ではないことがわかった。IFN- $\gamma$  は、HGF による気道上皮細胞の増殖を抑制したが、そのメカニズムとして、p27<sup>kip1</sup> の発現の誘導が関与していることが示唆された。実際に *in vivo* においてヒト末梢気道のどの上皮細胞が増殖しているかを明らかにすることは、再生医療の観点から見ても興味深いことと思われる。また IFN- $\gamma$  がヒト気道上皮細胞の p27<sup>kip1</sup> の発現を調節するメカニズムについては、今後の課題である。