

論文の内容の要旨

論文題目 気道上皮細胞の上皮間葉転換

指導教員 長瀬 隆英

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 神谷 寿美子

(研究の背景)

近年、慢性炎症性肺疾患である気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患の患者数、死亡者数は増加傾向であり、その病態解明が必要である。慢性炎症性肺疾患の病態の特徴として、気道リモデリングが挙げられる。気道リモデリングは創傷治癒過程の異常と考えられており、慢性炎症の結果、生じると考えられる。気管支喘息においては気道リモデリングの結果、不可逆性の気道閉塞に進行し、呼吸機能低下やステロイド治療抵抗性呈するようになる。また、慢性閉塞性肺疾患においては末梢気道の気道リモデリングが気流閉塞の主な原因とされている。気道リモデリングは以上のように臨床上、重要であるが、その形成に関与する線維芽細胞や筋線維芽細胞の由来をはじめ、機序は不明である。

上皮間葉転換という現象は上皮細胞が間葉系細胞様に形態変化する現象である。発生における器官形成に重要な役割をすることが明らかとなっているが、近年、この上皮間葉転換が癌の悪性化や臓器の線維化に関与するとの報告がなされている。

Transforming growth factor β 1 (TGF β 1)は上皮間葉転換の強力な誘導因子であると同時に、慢性炎症性肺疾患において気道リモデリングをはじめ、病態に関与すると考えられている。また、**TNF α** も上皮間葉転換および慢性炎症性肺疾患に関与するとの報告がある。

以上より、気道上皮細胞において **TGF β 1** や **TNF α** の刺激により上皮間葉転換が誘導され、気道リモデリングに関与すると仮定し、実験を行った。

(方法)

1. 細胞の培養

ヒト気道上皮細胞の細胞株である BEAS-2B を使った。細胞の培養はラットの臍由来の I 型コラーゲンでコーティング済みの細胞皿の使用した。培養液は気道上皮細胞培養専用の無血清培養液(BEGM)を使用した。37°C 5% CO₂ 内で培養した。

2. 細胞の刺激

TGF β 1(1.25 - 5 ng/ml)もしくは TNF α (2.5 - 10 ng/ml)もしくは両方を培養液に加え、細胞を刺激した。刺激時間は適宜変更した。

3. 定量 RT-PCR

上記の通り 24 時間から 72 時間刺激した細胞を用い、定量 RT-PCR により E cadherin, vimentin mRNA、および細胞外基質の type I collagen, versican mRNA の発現を検討した。特異的プライマーの以下の通り各々作成した。

E-cadherin (5')CCCATCAGCTGCCAGAAAATGTTT,
(3') CTGTACCTTCAGCCATCCTGTTT

vimentin (5') GACAATGCGTCTCTGGCACGTCTT
(3') TTCTTCTGCCTCCTGCAGGTTCTT

type I collagen (5') CTGGTCCCCAAGGCTTCCAAGG
(3') CTTACCCCTTAGCACCAACAGC

versican (5')GGTATAGCCCATCTTCCATTTCC
(3')GAATTGGAGACCCAACCAGGA

GAPDH (5') GGTGAAGGTCCGAGTCAACGCA
(3')CAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA

4. 形態変化の観察および免疫染色

TGF β 1 5 ng/ml, TNF α 10ng/ml および両方で 72 時間刺激した細胞の形態変化を観察した。また pan-keratin、vimentin の免疫染色を Envision+kit/HRP を用いて行った。

5. 遊走実験

TGF β 1 5 ng/ml, TNF α 10ng/ml および両方で 72 時間刺激した後、刺激を取り除いて通常の培養液で一晩インキュベートした細胞を用いて遊走実験を行った。遊走実験は Boyden blindwell chamber technique に従って行った。chemoattractant は fibronectin (5 μ g/ml)を用いた。

6. 増殖能の評価

BrdU (bromodeoxyuridine) cell proliferation assay kit を使用した。TGF β 1 5 ng/ml, TNF α 10ng/ml および両方で 72 時間刺激した後、刺激を取り除いて通常の培養液で一晩インキュベートした細胞を用いた。

7. Smad 系、MAPK 系への TGF β 1、TNF α の影響

ウェスタンブロッティング法を用いて、TGF β 1、TNF α が Smad 系である Smad3、Smad 1,5,8、また MAPK 系の ERK1/2、p38 MAPK を活性化するかを検討した。

(結果)

1. 上皮系マーカー・間葉系マーカーの mRNA の発現

TGF β 1 の刺激により上皮系マーカーの E cadherin の発現は有意に低下した。一方、間葉系マーカーの vimentin の発現は有意に増加しなかった。また TNF α の刺激によって E cadherin および vimentin の発現は変化しなかった。TGF β 1 および TNF α の共刺激により E cadherin は低下するが、TGF β 1 で単独刺激した細胞と比較すると有意な変化はなかった。vimentin の発現は有意に増加した。形態変化を認め、上皮系マーカーの E cadherin mRNA 発現と pan-keratin の発現低下および type I collagen, versican mRNA 発現上昇を認めた。

2. 形態変化

BEAS-2B は通常、上皮細胞の特徴である細胞同士が密着した敷石状の形態を呈している。TGF β 1 の刺激により細胞同士の接着がなくなり、一部の細胞は紡錘状に変化した。更に TGF β 1 と TNF α の共刺激により形態変化はより増強した。TNF α のみの刺激では形態変化は明らかではなかった。

3. 上皮マーカー、間葉系マーカーの蛋白質レベルでの発現

免疫染色により pan-keratin, vimentin の発現を検討したところ、無刺激の細胞ではほとんどの細胞に pan-keratin が発現していた。TGF β 1 で刺激した細胞では pan-keratin の発現が減少し、TNF α との共刺激によりさらなる減少を認めた。vimentin は無刺激の細胞でも一部、発現を認めたが、TGF β 1 や TGF β 1 と TNF α の共刺激によりその発現の増強を認めた。TNF α のみの刺激ではそれぞれの発現に変化を認めなかった。

4. 遊走能

TGF β 1 で刺激した細胞は遊走能の増強を認めるものの有意ではなかった。TGF β 1 と TNF α で共刺激した細胞は遊走能が有意に増強した。TNF α のみで刺激した細胞では増強効果は認めなかった。

5. 細胞外基質の発現

TGF β 1 単独刺激、TNF α との共刺激により、細胞外基質の I 型 collagen と versican の発現上昇を認めた。両者間では有意差はなかった。

6. 増殖能の評価

TGF β 1 と TNF α で共刺激した細胞は増殖能は有意に抑制された。

7. TGF β 1、TNF α により Smad 活性化への影響

TGF β 1 の刺激により Smad 3 はリン酸化されるが、Smad1,5,8 はリン酸化されなかった。また TNF α の刺激はこれらの活性化に影響を与えなかった。

8. ERK および p38 MAPK の活性化への影響

TGF β 1 および TNF α により ERK1/2 の活性化が認められた。また TNF α の刺激により p38 MAPK の活性化が認められた。

9. ERK および p38 MAPK の EMT に対する影響

TGF β 1 と TNF α の共刺激による BEAS-2B の形態変化および E cadherin, vimentin の発現の変化に、ERK 阻害剤と p38 MAPK 阻害剤は影響を与えなかった。

(結論)

ヒト気道上皮細胞の BEAS-2B は TGF β 1 単独刺激により上皮系マーカーの E cadherin, pan-keratin の発現低下を認めるが、形態変化は一部の細胞に認めるのみで、間葉系マーカーの発現上昇や遊走能の増強は認めなかった。TGF β 1 と TNF α の共刺激により形態が上皮細胞の特徴である敷石状形態から紡錘状に変化し、その変化に伴い E cadherin および pan-keratin の発現低下と vimentin の発現上昇を認め、上皮間葉転換が引き起こされたと考えられた。また遊走能の増強と細胞外基質 (type I collagen, versican) の発現上昇を認め、間葉系細胞の機能も獲得したことが認められた。本研究の結果より気道上皮細胞は TGF β 1 の刺激により部分的に上皮間葉転換が誘導され、TNF α との共刺激によりさらに上皮間葉転換が進んだと考えられた。本研究の結果より TGF β と TNF α により刺激を受けた気道上皮細胞が上皮間葉転換を獲得することにより気道リモデリングに関与している可能性が示唆された。BEAS-2B において TGF β 1 は Smad3, ERK1/2 を活性化し、TNF α は ERK1/2, p38 MAPK を活性化することが明らかとなったが、これらが BEAS-2B の上皮間葉転換に関与するかは本研究では明らかとできなかった。機序については更なる研究が必要と考えられる。