

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石本 容子

腸管上皮細胞は食品の消化吸収をおこなうほか、異物に対する防御機構を備えている。中でも、その上皮直下の粘膜固有層に存在する免疫細胞とは液性因子などを介して互いに制御しあっており、その破綻が、近年増加している炎症性腸疾患などの腸炎症の一因であることが知られている。本研究は、サイトカインの異常産生により引き起こされる腸炎症の *in vitro* モデル系として構築された腸管上皮細胞とマクロファージ細胞の複合培養系を用い、腸炎症発症時に起こる細胞間の相互作用に関する分子レベルでの解析を試みたもので、序論および3章からなる。

研究の背景と目的が述べられている序章に続き、第1章では、透過性膜上にヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を単層培養して小腸上皮様に分化させ、その基底膜側に PMA 処理によりマクロファージ様に分化させたヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞を配置した複合培養系では Caco-2 細胞が傷害を受けること、その傷害に THP-1 細胞の産生する TNF- $\alpha$ などの液性因子が関与していることが述べられている。第1章第1節では、顕微鏡を用いた形態観察やカスパーゼ3の活性測定、Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量変化の結果から、複合培養した Caco-2 細胞で誘導される傷害にアポトーシスとネクローシスの両方が関与していることが示された。また第2節では、各種中和抗体や阻害剤を用いた実験から、THP-1 細胞の産生する TNF- $\alpha$ が Caco-2 細胞膜上の TNFR1 を介してそのシグナルを伝達すること、この傷害に NF- $\kappa$ B が関与していることが示された。さらに、細胞内の抗酸化物質グルタチオン量が減少していることから、複合培養によって Caco-2 細胞内に活性酸素種が増加している可能性も示唆された。第3節では、Caco-2 細胞と複合培養することで THP-1 細胞も傷害を受けること、このとき TNF- $\alpha$ 産生量も同時に低下していることが示唆され、両細胞は一方向ではなく、双方向に影響を与え合っていることが示された。

第2章では、複合培養によって Caco-2 細胞中に起こる遺伝子発現パターン変化を網羅的に解析すべく、THP-1 細胞と0、1、3、6、24、48時間複合培養した Caco-2 細胞について DNA マイクロアレイ解析をおこなっている。複合培養初期、特に培養1時間以降に発現量が変動する遺伝子を抽出するために、maSigPro という時系列解析用にデザインされた R のパッケージを用い、発現量の経時変化が2次曲線で近似できるプローブセットを抽出したところ、複合培養初期時に発現量が上昇する遺伝子群には免疫やアポトーシス、プロテインキナーゼカスケードに関わる遺伝子が、発現量が低下する遺伝子群には酸化的リン酸化や転写、翻訳、細胞周期に関わる遺伝子が多く含まれていることが示され、複合培養した Caco-2 細胞が炎症状態にあるということ、また初期防御反応と細胞死へと向かう動きが同時に起こるものの、結果的には細胞傷害が進行して行くという動的な変化が観察された。

第3章では、複合培養初期に発現量が上昇した遺伝子の中で最も発現量変動が大きい

immediate early response gene (IEX-1) に注目し、複合培養時の Caco-2 細胞でみられる現象にこの分子がどのように関与しているか検討している。まず、複合培養開始時に TNF- $\alpha$  のモノクローナル抗体を添加し、IEX-1 の mRNA 発現に与える影響を調べたところ、IEX-1 の発現に TNF- $\alpha$  刺激が関与していることが示された。また IEX-1 の過剰発現させた Caco-2 細胞あるいはノックダウン Caco-2 細胞を THP-1 細胞と複合培養し、細胞傷害の指標である LDH 放出量、カスパーゼ 3 活性、TNFR1 mRNA 発現量を測定したところ、IEX-1 がカスパーゼ 3 活性の抑制や TNFR1 の発現の低下に寄与することで、複合培養時に Caco-2 細胞で誘導される傷害を抑制する方向に働いている可能性が示唆された。

総合討論では本研究の意義や課題についての考察がなされており、本複合培養系が、免疫細胞からの絶え間ない刺激に曝された時に腸管上皮細胞で引き起こされる傷害の分子メカニズムに関する新しい知見をもたらしたことが述べられている。

腸の炎症性疾患は近年増加しており、その予防や治療のための情報が求められている。本研究は、ヒトマクロファージ様細胞とヒト腸管上皮細胞の複合培養系を用いて、腸の炎症性疾患の原因の一つと考えられる免疫細胞の活性化が引き起こす上皮細胞傷害を新しい視点から詳細に解析したもので、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。