

京都大学	博士 (医学)	氏 名	仲 恵
論文題目	Oxidative stress induced Interleukin-32 mRNA expression in human bronchial epithelial cells. (ヒト気道上皮細胞における酸化ストレスによる IL-32 mRNA 発現の誘導)		
(論文内容の要旨)			
<p>慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、気流制限と遷延する肺の炎症を特徴とする。喫煙は最大の危険因子であり、喫煙により肺にもたらされる酸化ストレスは、禁煙後も長期にわたって存在し続け、肺における炎症反応を修飾するなど COPD の病因に寄与する重要な因子である。IFN<math>\gamma</math>はウイルス感染と関連するサイトカインであるが、安定期の COPD 患者においてもその発現が増加していることが報告されている。Interleukin-32(IL-32)は単球やマクロファージから産生される炎症性サイトカインの1つで、T細胞のアポトーシス誘導、単球のマクロファージへの分化などの作用を有する。これまでに、COPDの肺組織においてIL-32の発現が増加していることが報告されている。</p> <p>本研究では、ヒト気道上皮細胞においてIFN<math>\gamma</math>はIL-32の発現を誘導し、酸化ストレス(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)がその作用をさらに増強させると仮説を立て、その転写制御の機序についても研究を行った。</p> <p>ヒト気道上皮細胞は、事前に承諾を得られた、京都大学医学部附属病院で肺切除術を受けた患者の気管支から初代培養したものを用いた。IFN<math>\gamma</math>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いた各刺激の細胞生存率への影響については、MTTアッセイ法にて確認し、各刺激間に有意な差は認めなかった。</p> <p>気道上皮細胞をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>およびIFN<math>\gamma</math>で刺激し、IL-32mRNA発現と蛋白の発現を検討した。その結果、IFN<math>\gamma</math>刺激単独でIL-32の発現は有意に増加したが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>単独刺激では増加を認めなかった。しかしながら、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とともにIFN<math>\gamma</math>で刺激を行うと、IFN<math>\gamma</math>単独刺激と比較してIL-32の更なる発現増加を認めた。</p> <p>IL-32発現を制御する細胞内シグナル伝達経路について検討するため、MAPK阻害剤、JAK阻害剤の存在下でIFN<math>\gamma</math>およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による刺激を行った。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるIFN<math>\gamma</math>のIL-32発現増強作用はJNK阻害剤によって抑制され、MEK阻害剤、p38阻害剤、JAK阻害剤では抑制されなかった。IL-32プロモーター配列上には、JNKにより活性化される転写因子c-Jun/CREBの結合配列が存在するため、IFN<math>\gamma</math>およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によるこれら転写因子c-Jun、CREBのIL-32プロモーターへの結合および遺伝子転写制御を確認した。クロマチン免疫沈降(ChIP)法によりIL-32プロモーターへのc-JunおよびCREBの結合は、IFN<math>\gamma</math>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によって有意に増加した。IL-32プロモーター上のc-Jun、CREB結合配列に変異を導入したところ、転写活性の著明な低下が見られた。さらにsiRNA(small interfering RNA)を用いて気道上皮細胞のc-JunまたはCREB発現を抑制したところ、c-Jun siRNAはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるIFN<math>\gamma</math>のIL-32発現増強作用を有意に抑制し、CREB siRNAはIFN<math>\gamma</math>単独およびIFN<math>\gamma</math>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるIL-32発現増強作用をと共に抑制することが確認された。</p> <p>気道上皮細胞におけるIL-32発現は、急性増悪の主要な原因の1つであるウイルス感染やそれに伴う炎症により誘導され、喫煙などによる酸化ストレスが、さらにIL-32発現を増強させることが示された。またIFN<math>\gamma</math>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるIL-32遺伝子の転写制御に関わる転写因子としては、c-JunおよびCREBが重要であることが示唆さ</p>			

れた。

(論文審査の結果の要旨)

IL-32はIFN $\gamma$ などCOPD(慢性閉塞性肺疾患)の病態と関連する炎症性サイトカインを誘導することが知られており、COPDの肺組織での発現増加が報告されている。本研究では、ヒト気道上皮細胞においてIFN $\gamma$ はIL-32の発現を誘導し、酸化ストレス(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)がその作用をさらに増強すると仮説を立て、遺伝子発現と転写制御機序について検討を行った。

IL-32 mRNAと蛋白の発現はIFN $\gamma$ 刺激単独で増加し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+IFN $\gamma$ 刺激により更なる発現増加を認めた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+IFN $\gamma$ によるIL-32発現はJNK阻害剤によって抑制され、MEK阻害剤、p38阻害剤、JAK阻害剤では抑制されなかった。その発現制御機序としてIL-32プロモーター領域のc-Jun/CREBの結合配列に着目し、クロマチン免疫沈降法によるc-Jun/CREBプロモーターへの結合の確認、c-Jun/CREB結合配列への変異導入による転写活性への影響や、siRNAによるc-JunまたはCREB発現抑制によるIL-32発現への影響を検討した。その結果、ヒト気道上皮細胞においてIFN $\gamma$ 刺激によるIL-32の転写制御にはCREBが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>発現増強にはc-Junが関与していることが明らかとなった。

本研究はCOPDの気道炎症におけるサイトカインおよび酸化ストレスの関与の解明に寄与し、病態の理解を進めたことに対する貢献度は高いと考えられる。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成24年7月30日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 2012年 7月 30日 以降