京都大学	博士（　医　学）	氏　名	西　岡　慶　善
論文題目	Lipopolysaccharide induced connective tissue growth factor gene expression in human bronchial epithelial cells　(ヒト気道上皮細胞における Lipopolysaccharide による connective tissue growth factor 遺伝子発現の亢進)		

（論文内容の要旨）

呼吸器は感染症疾患に代表されるように、外界と直接に接し、病原微生物やタバコ煙など有害物質に曝露される臓器である。病原微生物の侵入時には、まず宿主自然免疫反応が惹起される外来因子の特定の構造を認識する受容体として、Toll like receptors (TLRs)があるが、中でも TLR4 はグラム陰性菌由来の lipopolysaccharide (LPS)を認識し、肺を含む全身に分布していることが知られている。慢性閉塞性肺疾患 (COPD)の病態の主要因は喫煙曝露であるが、感染を契機とした急性増悪は、肺機能の低下を促進することが知られている。タバコ煙には LPS が含まれ、COPD の病態に LPS 曝露が関与している可能性が示唆される。一方、近年、COPD 患者の気道上皮細胞では、線維芽細胞増殖や細胞外マトリックス産生に関与する connective tissue growth factor (CTGF)の発現が亢進しており、気道リモデリングに関与している可能性が示唆されている。本研究では、LPS-TLR を介した免疫学的機序が COPD における気道リモデリングに関与していると仮説を立て検討を行った。

気道上皮細胞、BEAS-2B を用いて LPS 刺激を行い、CTGF mRNA の発現を realtime PCR 法にて　また蛋白発現をウェスタンブロッティング法にて検討した。その結果、LPS 濃度依存性に刺激 2 時間後に CTGF mRNA の発現は有意に亢進した。CTGF 蛋白発現は LPS による刺激 8 時間後に有意に亢進した。Transforming growth factor (TGF)-β1 mRNA 及び細胞培養上清中の蛋白は刺激により変化しなかった。LPS 刺激 2 時間では、TGF-β1 の下流にある、SMAD のリン酸化の増強も認めなかった。また、TLR4 の発現は変化を認めなかった。次に、Nuclear factor-κB (NF-κB)に対する阻害剤(MG132)を用いたところ LPS 刺激による CTGF mRNA 発現亢進は抑制された。CTGF の 5'遺伝子調節領域約 1000bp をクローニングし、deletion mutant を作製し、ルシフェラーゼアッセイにて CTGF 転写調節部位の検討を行った。その結果、NF-κB および SMAD 結合領域の関与が示唆された。一方、ゲルシフトアッセイでは、CTGF promoter 領域の NF-κB 結合部位への p65 の結合が LPS 刺激により増加することが確認された。また、クロマチン免疫沈降法にても、LPS 刺激により CTGF promoter 領域の NF-κB 結合部位において RNA ポリメラーゼ II との共沈が有意に増加し、また p65 との共沈は増加する傾向を認めた。つまり、LPS 刺激により NF- κB subunit である p65 が CTGF promoter 部位へ結合することが *in vitro* および *in situ*.で確認されたが、その転写活性の亢進に SMAD の関与は認められなかった。

以上より、気道上皮細胞において、LPS 刺激は CTGF の発現を亢進し、その機序には、TGF-β非依存性に NF- κB を介していることが明らかとなった。COPD 患者において喫煙曝露や繰り返す細菌感染が、気道上皮細胞での LPS 刺激となり、その結果 CTGF 遺伝子発現を亢進し、気道リモデリングに関与している可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

慢性閉塞性肺疾患(以下 COPD)患者では、喫煙や細菌感染などにより慢性的な lipopolysaccharide (LPS)曝露を受けていると考えられる。一方、connective tissue growth factor (CTGF)は COPD 患者の肺で発現が亢進し、線維芽細胞増殖や細胞外マトリックス産生により気道リモデリングに関与することが示唆されている。本研究では、LPS が直接気道上皮細胞を刺激し CTGF の発現を亢進すると仮説を立て、正常気道上皮細胞、BEAS-2B を用いて、LPS 刺激による CTGF の発現亢進とその機序を明らかにした。LPS 刺激 2 時間後には CTGF mRNA および蛋白の発現が亢進し、その機序は、transforming growth factor (TGF)-β1 の遺伝子発現や蛋白発現に影響されず、TGF-β1 非依存性であることを示した。更に、NF-κB の活性化を抑制する試薬での検討や、遺伝子転写調節領域のクローニング、転写活性の責任領域の解明により、この CTGF 遺伝子発現の亢進は NF-κB を介していることを示した。

以上の研究は気道上皮細胞での LPS 刺激による CTGF 発現亢進とメカニズムの解明に貢献し COPD の気道リモデリング進展阻止に向けた新たな治療法の開発に寄与するところが多い。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２２年３月１５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：　　年　　月　　日　以降