

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	古川 聖美
論文審査担当者	主 査 樋口 京一 副 査 花岡 正幸 ・ 瀬戸 達一郎
論文題目	NLRP3 upregulation in A549 cells co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxia via deregulated TGF- β signaling (低酸素環境下で THP-1 マクロファージと共培養した A549 細胞における TGF- β 経路を介した NLRP3 発現増加)
(論文の内容の要旨)	<p>〔背景と目的〕 NLRP3 は、マクロファージや線維芽細胞、上皮細胞など様々な細胞で発現が確認されており、ASC や caspase-1 と共にインフラマソームを構成し、IL-1β の成熟を介して炎症に関与する。一方で、インフラマソーム非依存的な働きとして NLRP3 が TGF-β 経路を制御し線維化に関与するという報告もある。当教室では、ヒト II 型肺胞上皮細胞 (A549 細胞) とヒト単球由来 THP-1 マクロファージを低酸素環境で共培養することで、IL-1β や TGF-β1 を介して、A549 細胞の上皮間葉転換 (EMT) が促進することを報告している。本研究では、低酸素環境下で THP-1 マクロファージと共培養した A549 細胞の NLRP3 発現が増加する機序を解析した。</p> <p>〔材料及び方法〕 ヒト II 型肺胞上皮細胞由来の A549 細胞とヒト単球由来の THP-1 細胞を PMA で刺激し、マクロファージに分化させた細胞を使用した。共培養は 6well plate に A549 細胞を播種し、上清のみが通過できる 1μm の穴の開いたインサートに THP-1 マクロファージを播種し、普通酸素 (21%) または低酸素 (1%) で 24 時間培養した。</p> <p>〔結果〕 A549 細胞を低酸素環境下で THP-1 マクロファージと 24 時間共培養したところ、A549 細胞の NLRP3 発現量が有意に増加した。しかし、IL-1β の分泌量は通常酸素と低酸素で変化はなかった。また、IL-1β の阻害剤である IL-1R antagonist を用いたところ、NLRP3 発現誘導に IL-1β は関与していなかった。次に NLRP3 発現への TGF-β 経路の関与を検討した。上清中の TGF-β1 量は共培養で増加したが、通常酸素と低酸素では変化はなかった。しかし、siRNA を用いて A549 細胞と THP-1 マクロファージの TGF-β1 の発現抑制したところ、低酸素環境下での共培養により増加した A549 細胞の NLRP3 の発現量は抑制された。A549 細胞の TGF-β1 への感受性が高まっている可能性が考えられたため、TGF-β1 受容体(TGFBR1 と TGFBR2)の発現量を検討したところ、TGFBR1 は低酸素刺激と共培養で増加した A549 細胞でより発現量が増加していた。TGFBR1 の阻害剤である SB431542 を添加した A549 細胞では、NLRP3 の発現量が抑制された。また、TGF-β1 経路の抑制因子である SMAD7 の発現量が低酸素状況下の共培養で減少していた。TGF-β1 経路の主流は SMAD2/3 のリン酸化による経路だが、SMAD3 の阻害剤である SIS3 では、NLRP3 の発現増加は抑制されなかった。一方で、SMAD 非依存的な経路である p38 MAPK の阻害剤である SB203580 によって、NLRP3 の発現増加が抑制された。</p> <p>〔考察〕 本研究の結果から、低酸素環境で THP-1 マクロファージと共培養した A549 細胞では、TGF-β1/p38 MAPK 経路を介して NLRP3 の発現が誘導されることが示唆された。TGFBR1 の増加および SMAD7 の減少を伴っていることから、低酸素環境で共培養することで、A549 細胞の TGF-β1 に対する感受性が増加していると考えられる。</p>