

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	末 木 茜
論文審査担当者	主 査 花 岡 正 幸 副 査 多 田 剛・大 森 栄
論文題目	Epithelial-mesenchymal transition of A549 cells is enhanced by co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxia conditions (低酸素環境下における THP-1 マクロファージとの共培養は A549 細胞の EMT を誘導する)
(論文の内容の要旨)	<p>〔背景と目的〕 特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) は、肺野領域に炎症が生じ、持続的に線維化が進行する原因不明の難治性疾患である。最近、肺野上皮細胞の transforming growth factor (TGF)-β1 を介した上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition; EMT) が、肺線維化誘導の原因のひとつと考えられている。肺線維症は線維芽細胞増殖、炎症細胞浸潤および肺野隔壁肥厚が特徴的な所見で、肺野領域のまだらな局所的低酸素環境を容易に推測できる。また、低酸素環境下で肺野マクロファージは活性化され、サイトカイン分泌が亢進する。本研究では、II 型肺野上皮細胞の EMT に注目し、低酸素環境におけるマクロファージの活性化が肺野の線維化を誘導するか検討した。</p> <p>〔方法〕 THP-1 細胞は 500 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 4 日間培養を行いマクロファージに分化させた (以下、THP-1 マクロファージ)。細胞を通さないポアサイズ 1.0 μm のメンブレンを用い、下部のウェル内で A549 細胞 (II 型肺野上皮細胞)、上部のインサート内で THP-1 マクロファージを培養し、物質の透過量が確保された環境にて共培養を行った。A549 細胞あるいは THP-1 マクロファージの単培養もしくは両者の共培養を、室内気酸素濃度 (21% O₂)あるいは低酸素濃度 (2% O₂) 環境下で行った。EMT 確認のための分子マーカーとして、E-cadherin (上皮系蛋白マーカー)、vimentin と fibronectin (間葉系蛋白マーカー) の発現をウェスタンブロット法と蛍光免疫染色法を用いて解析した。また、A549 細胞の EMT 誘導における TGF-β1 と IL-1β の関与を検討するため、TGF-β1 type I receptor kinase inhibitor (SB-431542) または IL-1β 中和抗体を用いて EMT 誘導の阻害実験を行った。TGF-β1 と IL-1β の mRNA の発現は、real-time PCR 法にて解析した。</p> <p>〔結果〕 THP-1 マクロファージとの共培養により、A549 細胞は EMT に特徴的な形態を示し、低酸素環境下ではより EMT の形態変化が鮮明となった。また、低酸素環境下で THP-1 マクロファージと共培養すると、A549 細胞において E-cadherin 低下および vimentin と fibronectin 増加が蛋白発現レベルで確認された。これらの変化は、TGF-β1 type I receptor kinase inhibitor (SB-431542)にて阻害され、A549 細胞の EMT に TGF-β1 の関与が示唆された。低酸素環境下で A549 細胞と THP-1 マクロファージを共培養すると、両細胞で TGF-β1 mRNA 発現が有意に増加し、THP-1 マクロファージでは TGF-β1 の上流調節因子である IL-1β mRNA の発現も有意に増加した。さらに、IL-1β を中和抗体で阻害すると、低酸素環境下における共培養の培養上清にて TGF-β1 分泌量が有意に低下した。</p> <p>〔考察〕 低酸素環境下において THP-1 マクロファージが活性化されることで、A549 細胞の EMT を強く誘導した。低酸素環境下のみでは A549 細胞の EMT は誘導されず、室内気酸素濃度にて THP-1 マクロファージと共培養しても EMT は誘導されなかった。したがって、A549 細胞の EMT には、低酸素環境およびマクロファージ活性化の 2 つの条件が必要であり、生体でも肺野の線維化が生じる場合、この 2 つの条件が同時に満たされる必要性を示唆した。低酸素下にて共培養を行うことにより、両細胞の TGF-β1 産生が有意に増加しており、A549 細胞の EMT 化に TGF-β1 の関与が示唆された。さらに、低酸素環境は</p>

THP-1 マクロファージの IL-18 の発現を増加させ、その IL-18 が A549 細胞と THP-1 マクロファージ自身の TGF- β 1 の発現を増加させた。

〔結語〕 II 型肺胞上皮細胞の EMT には TGF- β 1 および IL-18 が関与しており、低酸素環境下における II 型肺胞上皮細胞とマクロファージの相互作用が必要であった。この結果は、肺線維症のメカニズム解明に大きな役割を果たすと考えられた。