

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	小柳 貴人
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 711 号
学位授与の日付	平成 28 年 9 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Suppression of <i>MUC5AC</i> expression in human bronchial epithelial cells by interferon- $\gamma$ (インターフェロン $\gamma$ によるヒト気道上皮細胞 <i>MUC5AC</i> 発現抑制)
論文審査委員	主査 教授 菊地 利明 副査 教授 中田 光 副査 教授 齋藤 昭彦

### 博士論文の要旨

#### 【背景と目的】

気道上皮細胞からのムチン分泌は、気道からの病原体排除に重要であるが、過剰に産生されると粘液栓を形成し、呼吸不全や窒息死の原因となりうる。したがって、粘液分泌は適切にコントロールされる必要がある。

*MUC5AC* は主に杯細胞から分泌され、気道粘液の主成分である。*MUC5AC* は気管支喘息や気道感染などにおける IL-4 や IL-13、TGF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインやウイルス感染、喫煙などの外的因子によって発現および分泌が誘導されることが知られる。ウイルス感染モデルとして汎用される合成二本鎖 RNA である polyI:C は EGF 受容体リガンドである TGF- $\alpha$  と相乗的に作用し *MUC5AC* 発現を増強することが報告されている。この相乗効果の機構として、TGF- $\alpha$  による MAPK 伝達経路分子 ERK1/2 の活性化を、polyI:C が ERK 抑制分子 DUSP6 の発現阻害をすることにより増強することが重要であることが示されている。

炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  は、Th1 型免疫の代表的サイトカインであり、マクロファージの活性化、IL-4、IL-13 などの Th2 サイトカインの機能への拮抗作用など、多くの機能を有している。IFN- $\gamma$  受容体欠損マウスに RS ウイルスを感染させると強い気道炎症が誘導され、過剰なムチン分泌が起きることが報告されており、IFN- $\gamma$  がウイルス感染防御に重要であり、気道分泌を制御していると考えられている。しかしながら、IFN- $\gamma$  による気道分泌抑制の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

今回、申請者らはヒト気道上皮細胞におけるムチン産生、特に *MUC5AC* の転写制御に IFN- $\gamma$  がどのような役割を果たしているのかを検討した。

#### 【方法および結果】

ヒト気道上皮細胞株 H292 を、TGF- $\alpha$  と polyI:C (以下 TP) もしくは TGF- $\alpha$  および polyI:C、IFN- $\gamma$  (以下 TPI) により刺激し、12 時間後に細胞を回収し、RT-PCR にて *MUC5AC* の mRNA 発現量を検討した。TP 刺激により誘導された *MUC5AC* mRNA 発現は IFN- $\gamma$  により用量依存性に抑制された。また、フローサイトメトリーにて *MUC5AC* 蛋白質の発現の解析も行ったが、mRNA 発現と同様に IFN- $\gamma$  により抑制された。

次に、IFN- $\gamma$ の作用機序を検討するため、IFN- $\gamma$ の主要な信号伝達経路である JAK1/STAT1 経路の関与を検討した。siRNAによる JAK1 と STAT1 の同時ノックダウンにより、IFN- $\gamma$ による MUC5AC mRNA 発現抑制作用は完全に消失した。このことから、IFN- $\gamma$ による MUC5AC の転写抑制には JAK/STAT 経路が必須であることが示された。

さらに、TGF- $\alpha$ の受容体である EGF 受容体の活性化に対する IFN- $\gamma$ の効果を検討した。ウェスタンブロットティング法により TP 刺激による EGF 受容体のリン酸化を確認した後、IFN- $\gamma$ によるリン酸化への影響を検討したが変化は見られなかった。TGF- $\alpha$ による MUC5AC 発現増強作用には MAPK 経路の活性化が必須であることが報告されているため、ERK1/2 のリン酸化についてもウェスタンブロットティング法により検討したが、TP 刺激により増強された ERK1/2 のリン酸化は、IFN- $\gamma$ により抑制されなかった。次に、ERK のリン酸化を抑制する DUSP6 について検討したが、IFN- $\gamma$ は、DUSP6 発現に mRNA レベルでは増強するものの、蛋白質レベルではほとんど影響を与えなかった。以上の結果から、IFN- $\gamma$ は EGF 受容体やその下流の MAPK 経路の抑制ではなく、他のメカニズムで MUC5AC 発現を抑制していると考えられた。

ヒト気道上皮細胞における MUC5AC の発現誘導に、NF- $\kappa$ B、Sp1 などの転写因子が重要な役割を果たしていることが報告されている。IFN- $\gamma$ による MUC5AC 発現抑制には二者のどちらかの転写因子の抑制が関与していることが考えられる。すでに、申請者らは TP 刺激による MUC5AC の発現増強には NF- $\kappa$ B の関与は少ないことを確認しているため、まず、Sp1 の MUC5AC 発現誘導への関与を確認した。TP 刺激による MUC5AC 発現増強は、Sp1 の DNA 結合を阻害する Mithramycin A により抑制されることから、Sp1 は TP による MUC5AC 発現誘導に重要であることが分かった。さらに、クロマチン免疫沈降法により Sp1 の結合部位を検討し、TP 刺激により MUC5AC 転写開始部位の 3.5kb 上流部 (CS-UP-3.5k) への Sp1 の結合が増強することを確認した。最後に、IFN- $\gamma$ により同部位への Sp1 の結合が阻害されることを確認し、IFN- $\gamma$ の MUC5AC 発現阻害に、MUC5AC 遺伝子プロモーター領域への Sp1 結合阻害が重要であることを明らかにした。

#### 【考察と結論】

IFN- $\gamma$ は MUC5AC 発現に抑制的に作用することが過去に報告されているが、その機序はほとんどわかっていなかった。申請者らは今回の研究により、IFN- $\gamma$ の MUC5AC 発現抑制作用には JAK/STAT 経路が必須であること、IFN- $\gamma$ は EGFR やその下流の ERK の活性化 (リン酸化) にはほとんど影響を与えていないこと、IFN- $\gamma$ は ERK の抑制因子である DUSP6 蛋白質の発現は増加させないこと、IFN- $\gamma$ は MUC5AC プロモーター領域への Sp1 結合を阻害することで MUC5AC 発現を抑制していることを突き止めた。

MUC5AC の分泌には Sp1 放出メカニズムなど、未だその機序に不明な部分も多く、さらなる解明が期待される。

#### 審査結果の要旨

気道の感染防御に働くムチンは過剰に産生されると呼吸不全や窒息死の原因となりうる。そのため、ムチン分泌は適切に制御される必要がある。今回、申請者らはヒト気道上皮細胞におけるムチン産生、特に MUC5AC の発現に関して感染防御性サイトカインである IFN- $\gamma$ がどのような役割を果たしているのかを検討した。具体的には、ヒト気道上皮細胞株 H292 を、TGF- $\alpha$ (炎症性サイトカイン)と polyI:C(疑似ウイルス感染刺激)および IFN- $\gamma$ により刺激し、12 時間後に細胞回収し、RT-PCR・ウェスタンブロットティング・クロマチン免疫凝集などを用いて種々の解析を行った。その結果、IFN- $\gamma$ は ①MUC5AC 発現を抑制し、その作用には JAK/STAT 経路が必須であること、②EGFR やその下流の ERK の活性化にはほ

とんど影響を与えないこと、③ERK の抑制因子 DUSP6 蛋白質の発現は増加させないこと、④MUC5AC プロモーター領域への Sp1 結合を阻害することで MUC5AC 発現を抑制していることを突き止めた。IFN- $\gamma$  が MUC5AC 発現を抑制することは過去にも報告があるが、その機序は不明であった。申請者らは今回の研究により、その機序の一部を解明した。

本論文は、IFN- $\gamma$  の MUC5AC 発現抑制機構の一つを初めて明らかにしたものであり、この点に博士論文としての価値を認める。