

平成21年5月13日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791205

研究課題名（和文）上気道慢性炎症でのリモデリングにおけるTGFβ1の役割

研究課題名（英文） The role of TGFbeta1 on remodeling for chronic upper airway epithelium

研究代表者 石永 一（Hajime Ishinaga）

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50335121

研究成果の概要

炎症性サイトカインのTNFalphaとTGFbeta1を加えることにより、MUC2遺伝子発現の亢進はみられた。しかしMUC5AC遺伝子発現については、TGFbeta1はTNFalpha刺激で誘導されるMUC5AC遺伝子発現を抑制していた。これは当初の予想と異なり、TGFbeta1はムチンの種類によってはリモデリングを抑制する方向に働く可能性を示唆していると思われた。また今回の結果からはMUC2とMUC5AC遺伝子発現に関しTGFbeta1は異なった細胞内シグナル伝導経路を用いていることも判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	330,000	2,530,000

研究分野：上気道粘膜の粘液産生の機構、上気道における各種刺激物質に対する細胞内シグナル伝達

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：ムチン遺伝子、TGFβ、リモデリング、粘液分泌

1. 研究開始当初の背景

慢性拘束性肺疾患(COPD)患者では肺組織の繊維化や粘液過分泌が認められ、これが主病態

となっている。近年、成長因子の一つである Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) は COPD 患者でその発現亢進が認められ、かつその繊維化などのリモデリングに対し深く関わっていると報告する論文が多くみられている。このように下気道領域では十分なエビデンスがあるため、上気道においても、慢性副鼻腔炎や鼻茸組織中などの慢性炎症に伴うリモデリングについて議論されるようになり、下気道疾患と同様に TGFbeta1 が深く関与している可能性が高いのではないかと推測されている。しかしながら、現在までのところ、耳鼻咽喉科領域では、慢性副鼻腔炎や鼻茸組織中の TGFbeta1 の発現量は亢進するとの報告は散見されるが、十分なエビデンスはなく、上気道リモデリングにおける TGFbeta1 の役割については、十分議論、検討されていないのが現状である。

2. 研究の目的

慢性副鼻腔炎や鼻茸などの上気道慢性炎症疾患において、ヒト鼻組織が慢性炎症による不可逆的変化、いわゆる上気道リモデリングを起こし、難治性になることを臨床的にしばしば経験する。今回は本研究により、これまですでに報告されている TGFbeta1 の粘膜下組織の繊維化や杯細胞の増生、粘液産生亢進に対する役割に焦点をあて、まず TGFbeta1 の上気道リモデリングに対する関連性の有無を調べる事とする。そのうえでさらに、上気道のリモデリングのおこるメカニズムの解明(細胞内シグナル伝達経路の解明)、ならびに、その制御方法について検討し、慢性副鼻腔炎や鼻茸治療に対する、今後の新しい治療法への発展の一助にしたい。

3. 研究の方法

1) 実際の臨床検体を用い、正常人と比較して慢性副鼻腔炎や鼻茸患者の組織中の TGFbeta1 の発現量の違いを定量的 PCR 法また

は免疫組織化学を用いて検討する。検体採取については慢性副鼻腔炎患者ならびに眼窩底骨折患者から同意を得た上で鼻粘膜組織を採取する。

2) ヒト細胞株を用いた実験では、まずヒト上皮細胞の一つで粘液産生細胞として知られているヒト大腸がんの細胞株の HM3-細胞やヒト気道上皮細胞株である A549 細胞、およびヒト鼻茸よりトリプシン処理で剥がした鼻上皮細胞を培養して用いるヒト鼻初代培養細胞を実験に用いることにした。炎症性サイトカインの一つである TNFalpha 刺激により、TGFbeta1 の発現量の亢進が見られるかを定量的 PCR 法あるいは ELISA 法にて検討する。

その後炎症性サイトカインと TGFbeta1 の共処理下で MUC2 や MUC5AC などの分泌型ムチンのムチン遺伝子発現亢進やコラーゲン遺伝子の発現亢進の有無を定量的 PCR 法あるいは luciferase assay を用いて検討する。

3) 動物実験では、TNFalpha 刺激による炎症モデルラットを作成し、TGFbeta1 の発現量の亢進、ムチン遺伝子発現の亢進、粘膜下組織の肥厚が認められるかどうかを検討する。その際 TNFalpha 刺激の至適濃度、至適投与回数、至適刺激時間を定量的 PCR および免疫組織化学にて検討する。

4. 研究成果

まずヒト細胞株を用いた実験より行ったが、ヒト大腸がんの細胞株に MUC2 や MUC5AC のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をコードしたベクターを stable にトランスフェクションしてある、HM3-MUC2 細胞ならびに HM3-MUC5AC 細胞を用いた。これらの細胞をプレートに播き、70%コンフルエントの状態になった後、TNFalpha 刺激(濃度 10 ng/ml)や TGFbeta1

(1ng/ml) 単独刺激、あるいは共刺激を行い、5 時間刺激を行った。その後ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TGFbeta1 単独ではムチン遺伝子の一つであるMUC2 遺伝子発現の亢進は認められなかったが、TNFalpha 刺激で誘導されるMUC2 遺伝子発現の亢進はTGFbeta1 によって増強された。(Fig1) MUC5AC遺伝子発現の場合でも、TGFbeta1 単独ではMUC5AC遺伝子発現の亢進は認められなかった。しかしながら TNFalpha 刺激で誘導されるMUC5AC遺伝子発現に対し、TGFbeta1 はその発現を抑制する方向ではたらいっていた。(Fig2) これらは我々の予想を覆すものであった。

Fig 1、TNFalpha+ TGFbeta1 刺激でMUC2 遺伝子発現は相乗的に亢進された。

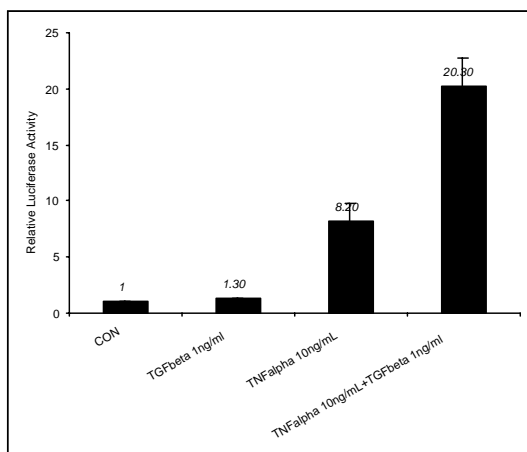
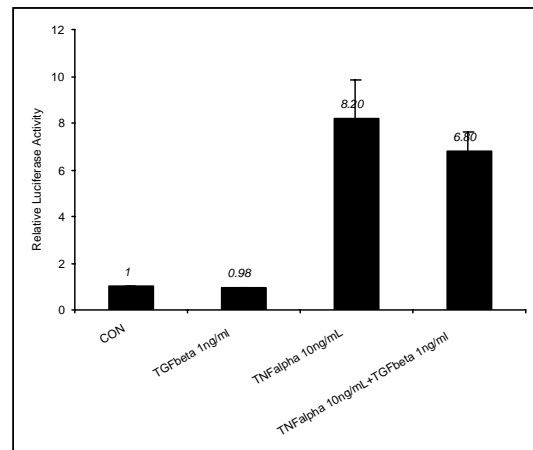


Fig 2、TNFalpha 刺激で増強するMUC5AC 遺伝子発現は TGFbeta1 で抑制される。



次に別の細胞系でも同様な反応がみられるかどうかを確かめるため、A549細胞を用い、MUC5ACルシフェラーゼベクターを遺伝子導入させたものに、上記と同じ条件で細胞刺激し実験を行った。細胞はプレートに播いた後、50-60%コンフルエントの状態になった状態で遺伝子導入を行い、実験には 80%コンフルエントの状態で行った。結果は、HM3-MUC5AC 細胞を用いたものと同様に TNFalpha 刺激で誘導されるMUC5AC遺伝子発現に対し、TGFbeta1 はその発現を抑制する方向ではたらいっていた。

続いて、臨床検体を用いた実験では、定量的PCR法を用いて、TGFbeta1 の発現量を正常人と慢性副鼻腔炎患者とで比較検討した。これは眼窩底骨折その他の外傷での手術中に得られた検体や慢性副鼻腔炎に対する内視鏡下鼻内手術で得られる検体から中鼻甲介粘膜を採取し、これから RNA を抽出したのち、逆転写を行い cDNA を作成した。これらの cDNA から定量的PCR法を用い TGFbeta1 の発現量を検討したが、この 2 群間で明らかな有意差は認められなかった。

また蛍光免疫染色を用いて、正常人と慢性副鼻腔炎患者と TGFbeta1 の発現量の差も検討し

てみた。これも上記と同様にして手術で得られた臨床検体をホルマリン固定した後、凍結切片を作成した。これを蛍光標識された TGFbeta1 抗体を用いて染色し、TGFbeta1 の発現量を検討したが、こちらの結果もこの2群間で有意差は認められなかった。

動物実験

今回は培養細胞での実験結果、ならびにヒト臨床検体の結果から当初の予想と反するものであり、TGFbeta1 のリモデリングに対する役割が明確にならなかったため、動物実験は施行しなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石永 一 (Hajime Ishinaga)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50335121

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし