

氏名(本籍)	もり 森	しま 島	ゆう 裕	こ 子	(茨城県)
学位の種類	博士(医学)				
学位記番号	博甲第2401号				
学位授与年月日	平成12年3月24日				
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当				
審査研究科	医学研究科				
学位論文題目	気道のリモデリング過程における筋線維芽細胞誘導の検討				
主査	筑波大学教授	医学博士	草刈	潤	
副査	筑波大学教授	医学博士	田中	直見	
副査	筑波大学助教授	医学博士	鬼塚	正孝	
副査	筑波大学講師	医学博士	范	江霖	

論文の内容の要旨

(目的)

近年、喘息において、気道炎症による上皮細胞剥離が生じる度に非可逆的な線維化が進行するという考えがある。気道上皮は剥離後、リモデリングと呼ばれる通常では認められない組織再構築を示すが、その組織修復機転は様々な細胞やサイトカン等によって複雑に調節されており、その詳細は明らかでない。本研究は、炎症細胞が混入しない培養系において単純な傷害修復系を作成し、修復過程に伴う筋線維芽細胞の発現と線維化をもたらす機構について検討することを目的とした。

(対象と方法)

1) 気道上皮の傷害-修復モデルの作成

羊膜を細胞支持体として、気道上皮細胞と気道繊維芽細胞とを共培養した後、上皮細胞を機械的に約1 mm幅で剥離し、傷害後の再上皮化について経時的に形態学的観察を行った。

2) 筋繊維芽細胞誘導の検討

上皮細胞傷害前後の繊維芽細胞における α -smooth muscle actin (α -SMA)の発現を免疫組織化学的手法およびNorthern blot解析法にて検討した。また、筋線維芽細胞誘導を超微形態学的に観察した。

3) 筋線維芽細胞誘導に対するtransforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)の関与について

上皮細胞傷害と同時に抗TGF- β 1中和抗体を添加し、傷害前後の線維芽細胞における α -SMAの発現を免疫組織化学的に検討した。また、傷害前後の培養上清中TGF- β 1を経時的に測定した。さらに、傷害前後の上皮細胞、線維芽細胞、羊膜におけるTGF- β 1の発現をNorthern blot解析法または免疫組織化学的手法にて検討した。

4) TGF- β 1活性化に対するthrombospondin-1 (TSP-1)の関与について

上皮細胞傷害と同時に抗TSP中和抗体を添加し、傷害前後の繊維芽細胞における α -SMAの発現を免疫組織化学的に検討した。傷害前後の繊維芽細胞におけるTSP-1の発現をNorthern blot解析法および免疫組織化学的手法にて解析した。

5) 筋線維芽細胞における細胞外基質産生の検討

傷害前後の繊維芽細胞における細胞外基質増生を超微形態学的に観察した。また、プロコラーゲン α 1(I)、P

ロコラーゲン $\alpha 1$ (III) の発現を Northern blot 解析法にて検討した。

(結果)

気道上皮細胞を線維芽細胞と共に培養すると、線毛細胞、杯細胞、基底細胞から成る偽重層構造を呈した。気道上皮細胞傷害後、剥離部は24時間で扁平上皮、4日目には立方上皮、8日目には偽重層上皮によって被覆され、その再上皮化の過程において傷害4日目をピークに筋線維細胞誘導が認められた。筋線維芽細胞誘導は抗TGF- $\beta 1$ 中和抗体によって抑制された。傷害後の培養上清中の潜在型TGF- $\beta 1$ 濃度は傷害4日目をピークに増加していたが、上皮細胞、線維芽細胞においては傷害前後でTGF- $\beta 1$ 発現に変化はなく、羊膜におけるTGF- $\beta 1$ 免疫活性が傷害4日目をピークに著明に低下していた。さらに、傷害4日目の線維芽細胞においてTSP-1発現が亢進しており、筋線維芽細胞の誘導は抗TSP抗体によっても抑制された。筋線維細胞における細胞外基質産生に関しては、傷害4日目をピークにプロコラーゲン $\alpha 1$ (I)、プロコラーゲン $\alpha 1$ (III) の発現が亢進し、形態学的に筋線維芽細胞周囲の細胞外基質増生を認めた。

(考察)

機械的気道上皮傷害により、一過性に線維芽細胞が筋線維芽細胞へと形質転換することが明らかとなった。本培養系には炎症細胞の介入がないため、筋線維芽細胞誘導に炎症細胞が重要であるという従来からの示唆に加えて、上皮自体も極めて重要な働きを担っていることが分かった。さらに上皮細胞剥離による筋線維芽細胞の誘導にはTGF- $\beta 1$ が関与し、その供給源は上皮細胞や線維芽細胞もさることながら、細胞外基質からの動員も示唆された。但し培養上清中のTGF- $\beta 1$ は全て潜在型であり、上皮傷害後何らかの因子により線維芽細胞局所においてTSP-1の発現が亢進し、それにより潜在型TGF- $\beta 1$ が活性化され、筋線維芽細胞へと形質転換されたものと推察された。また、筋線維芽細胞の出現と一致して、I型およびIII型プロコラーゲンmRNAの発現が亢進し、筋線維芽細胞周囲の細胞外基質沈着が認められたことから、誘導された筋線維芽細胞によりコラーゲン産生が亢進したと考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

気道上皮細胞は空気とともに吸入される物質により刺激され、また時には傷害される。この傷害の機序は物質自体の細胞毒性による直接傷害と各種生理活性物質を介した炎症細胞との相互作用に大別される。これらの傷害に対して気道上皮にはリモデリングと言われる特異的な組織再構築が認められているが、この修復機構には傷害機序と同様種々の細胞やサイトカイン等が複雑に関与しており、その詳細は明らかになっていない。本研究は、気道上皮傷害モデルを炎症細胞の存在しない培養系において構築し、この状態での気道上皮修復機構を調べた。その結果、リモデリングに重要な役割を果たしている筋線維芽細胞は線維芽細胞がTSP-1やTGF- $\beta 1$ により形質変換したもので、この機序には気道上皮自体も重要な役割をはたしており、必ずしも炎症細胞の存在が必要でないことを明らかにした。気道のリモデリング過程における重要な新知見を示した価値ある研究である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。