

# 論文要旨

## TNF- $\alpha$ upregulates VCAM-1 and NF- $\kappa$ B in fibroblasts from nasal polyps

〔 鼻茸由来線維芽細胞において TNF- $\alpha$ は VCAM-1 発現と  
NF- $\kappa$ B 活性化を亢進する 〕

大堀純一郎

### 【序論および目的】

鼻茸は我々耳鼻咽喉科医が日常診療にてよく目にする疾患である。慢性副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎、好酸球増多性鼻炎において認められる鼻茸の組織中には、好酸球の浸潤を認める。また、好酸球増多性鼻炎における鼻茸ではその再発性が高いことも良く知られている。鼻茸の治療効果が悪い原因として好酸球が増悪因子として働いていると考えられており、好酸球の浸潤に着目することは、その病態の解明、治療戦略につながると考えられる。

好酸球の局所浸潤には、好酸球と接着分子を介する血管内皮細胞との相互作用が必要とされ、好酸球上に VLA-4・LFA-1・MAC-1 などが、一方、血管内皮細胞上に VCAM-1・ICAM-1 などが発現し、双方が好酸球の選択的な病変部への浸潤に関与すると考えられている。とりわけ、VLA-4 は、好中球には発現せず好酸球のみに発現しているので、VLA-4 と VCAM-1 を介した接着は、アレルギー性炎症における好酸球の選択的病変部への浸潤に関与すると考えられている。

肺由来線維芽細胞や関節線維芽細胞は TNF- $\alpha$ 刺激により、VCAM-1 を産生することが知られている。一方で鼻茸の fibroblast から発現される VCAM-1 については未だ報告がない。

そこで今回我々は、鼻アレルギー患者における鼻茸由来の線維芽細胞における、VCAM-1 の発現について検討したので報告する。

### 【材料および方法】

#### 1) 細胞

鼻茸線維芽細胞は、手術によって得られたヒト鼻茸から分離培養し、4 世代目のヒト鼻茸培養線維芽細胞を用いた。

#### 2) ELISA

TNF- $\alpha$ 刺激 24 時間後の鼻茸線維芽細胞の培養上清中の VCAM-1 濃度を ELISA 法にて測定した。

#### 3) RT-PCR

TNF- $\alpha$ 刺激 6 時間後の鼻茸線維芽細胞より mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて VCAM-1 mRNA を測定した。

#### 4) flow cytometry

TNF- $\alpha$ 刺激 24 時間後の鼻茸由来線維芽細胞膜表面上の VCAM-1 を flow cytometry にて測定した。

#### 5) EMSA

TNF- $\alpha$ 刺激 30 分後の鼻茸線維芽細胞から核タンパクを抽出し、EMSA 法にて NF- $\kappa$ B 活性化を測定した。

#### 6) proteasome inhibitor による NF- $\kappa$ B に対する効果

proteasome inhibitor にて 4 時間前処理した鼻茸線維芽細胞を TNF- $\alpha$ にて刺激し、鼻茸線維芽細胞から発現する VCAM-1 を ELISA 法(上記 2)、RT-PCR 法(上記 3)を用いて測定した。また、NF- $\kappa$ B の活性化を EMSA 法(上記 5)にて測定した。

#### 【結 果】

##### 1) TNF- $\alpha$ 刺激による VCAM-1 発現

ELISA 法にて培養上清中の sVCAM-1 を測定したところ、無刺激の状態にても sVCAM-1 の発現が認められ、TNF- $\alpha$  (0.1ng/ml) 刺激より統計学的有意に sVCAM-1 の発現が亢進した。また TNF- $\alpha$  (10ng/ml) の濃度にて sVCAM-1 の発現はプラトーに達した。RT-PCR 法により、mRNA レベルにても同様の結果であった。

##### 2) 鼻茸線維芽細胞膜表面上の VCAM-1

フローサイトメトリー法による膜表面上の VCAM-1 測定にて、VCAM-1 は無刺激の状態でも発現しており、TNF- $\alpha$ 刺激によりその発現は統計学的有意に亢進した。

##### 3) TNF- $\alpha$ 刺激による NF- $\kappa$ B 活性化

EMSA 法による NF- $\kappa$ B 活性化の検討にて、TNF- $\alpha$ 刺激は NF- $\kappa$ B 活性化を亢進させた。

##### 4) proteasome inhibitor による VCAM-1 発現に対する効果

TNF- $\alpha$ により活性化された NF- $\kappa$ B は、MG-132 にて濃度依存性にその活性化が抑制された。また MG-132 の前処理により VCAM-1 発現もタンパクレベル、mRNA レベルにて抑制された。

#### 【結論及び考察】

本研究により、鼻茸線維芽細胞は恒常的 VCAM-1 を発現してるが、TNF- $\alpha$ の刺激で有意にその発現が亢進することが示された。さらに、線維芽細胞における VCAM-1 の産生には、NF- $\kappa$ B の活性化が関与していることが明らかとなった。これらの知見は、難治性であり再発を繰り返す好酸球浸潤型の鼻茸に対して、NF- $\kappa$ B を標的とした治療の有用性を示唆すると考えられる。

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 641 号	氏名	大堀純一郎
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	山田 勝士	金蔵 拓郎

## TNF- $\alpha$ upregulates VCAM-1 and NF- $\kappa$ B in fibroblasts from nasal polyps

(鼻茸由来線維芽細胞において TNF- $\alpha$  は VCAM-1 発現と NF- $\kappa$ B 活性化を亢進する)

肺由来線維芽細胞や関節線維芽細胞は TNF- $\alpha$  刺激により、VCAM-1 を産生することが知られている。VCAM-1 は血管内皮に発現し、好酸球の選択的な組織への浸潤に関わっていることが知られている。人の鼻茸には、たくさんの好酸球浸潤があるにもかかわらず、人の鼻茸線維芽細胞からの VCAM-1 産生については、いまだよく知られていない。そこで、本研究では、鼻茸由来線維芽細胞からの VCAM-1 産生とそのメカニズムについて検討をした。

VCAM-1 は、無刺激の鼻茸線維芽細胞からも発現しており、TNF- $\alpha$  刺激によって有意にその発現が亢進することが示された。VCAM-1 の発現は培養上清中の可溶性 VCAM-1、細胞表面上の VCAM-1、VCAM-1 mRNA のいずれも TNF- $\alpha$  刺激に対し、統計学的有意に発現の亢進が認められた。VCAM-1 発現の転写因子である NF- $\kappa$ B は TNF- $\alpha$  刺激にて活性化され、NF- $\kappa$ B proteasome 抑制剤により抑制されることが示された。また、同時に可溶性 VCAM-1 の発現も NF- $\kappa$ B proteasome 抑制剤により有意に抑制された。

本研究により、鼻茸線維芽細胞は恒常的 VCAM-1 を発現しているが、TNF- $\alpha$  の刺激で有意にその発現が亢進することが示された。さらに、線維芽細胞における VCAM-1 の産生には、NF- $\kappa$ B の活性化が関与していることが明らかとなった。

本研究は、難治性であり再発を繰り返す好酸球浸潤型の鼻茸に対して、NF- $\kappa$ B を標的とした治療の有用性を示唆すると考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第	641	号	氏名	大堀純一郎
審査委員	主査	丸山 征郎			
	副査	山田 勝士		金蔵 拓郎	

主査および副査の3名は、平成18年12月14日、学位請求者 大堀純一郎 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Result 3 に記されている discrepancy とは何を意味するか。

(回答) ELISA の結果では、TNF- $\alpha$  の濃度依存性に sVCAM-1 が増加しているが、RT-PCR の結果では、TNF- $\alpha$  1 ng/ml の刺激より、TNF- $\alpha$  0.1 ng/ml の刺激のほうが強いという解離を認めたことを意味している。

質問2) ELISA 法、RT-PCR 法、flow cytometry 法における培養時間の決定の根拠は何か。

(回答) 各々の方法を用いて測定した際、VCAM-1 発現がピークになる時点を培養時間として決定した。

質問3) EMSA 法の p50 抗体で supershift が認められないのはなぜか。

(回答) p50 抗体が作用することは確認してあるが、今回の結果において p50 抗体による supershift が認められなかった理由はわからない。

質問4) 核蛋白を抗体とインキュベートしてからオリゴプローブと反応させているが、逆の順で試みたか？

(回答) その可能性も考えられるので今後検討したい。

質問5) MG-132 は、NF- $\kappa$ B 特異的阻害剤としてよいか。

(回答) MG-132 は NF- $\kappa$ B 特異的阻害剤として報告されているが、その作用はリン酸化阻害である。そのため、他のリン酸化にて活性化する転写因子の影響がないとは言いきれない。

質問6) NF- $\kappa$ B に対する特異的な阻害作用を調べるためにどのような実験系を考えたか。

(回答) NF- $\kappa$ B decoy を用いた阻害方法を試みた。しかし、decoy 導入に再現性が無く今回の実験では用いなかった。

質問7) NF- $\kappa$ B を標的とした治療戦略としてどのようなものを考えているか。

(回答) NF- $\kappa$ B decoy の局所投与による VCAM-1 発現抑制を1つの治療戦略と考えている。

質問8) 線維芽細胞の純度を検討したか。

(回答) 偏光顕微鏡による形態学的同定と、線維芽細胞特異抗体を用いた FACS にて99%以上の純度であることを確認した。

質問9) 抑制剤として MG-132 を選んだ理由は何か。

(回答) 他の抑制剤でも検討を行ったが、MG-132 の抑制効果が最も強かったためこの薬剤を選択した。

質問10) 抑制剤にて処理することにより恒常的な発現も抑えられているがどう考えるか。

(回答) 恒常的な VCAM-1 の発現も NF- $\kappa$ B の活性化を介していると考ええる。

質問 1 1) 未刺激の細胞においても最初から何らかの刺激を受けているのではないか。

(回答) 予備実験として未刺激の血管内皮細胞培養株で観察したが、VCAM-1 の発現は、まったく認められなかった。一方、今回の実験で用いた線維芽細胞は未刺激の状態においても VCAM-1 を発現しているため何らかの刺激による恒常的な発現があると考えられる。

質問 1 2) 第 4 世代の培養細胞を使用した理由は何か。

(回答) 細胞数を増やすためと、未刺激の状態を安定させるために第 4 世代を用いた。それ以降の継代培養を行うと刺激に対する反応性が落ちてくるためこの世代の細胞を使用した。

質問 1 3) 鼻茸は全身的な疾患と考えられるか。

(回答) 全身的な疾患であるとは言い切れないが、ステロイドの全身投与が局所投与よりも効果的であること、アスピリン喘息に合併することが多いことなどを考えると全身の影響も関連すると考えられる。

質問 1 4) 組織中の sVCAM-1 が好酸球の活性化や遊走に関与していると考えているか。

(回答) そう考えている。また、sVCAM-1 は血管新生にも関わっていることがすでに知られている。

質問 1 5) 鼻茸中の好酸球は生存期間が延長していると考えられるが、その因子は何か。

(回答) IL-5 の刺激が好酸球の生存を延長することがすでに報告されている。また、鼻茸中には IL-5 の濃度が高いことも証明されている。

質問 1 6) 好酸球浸潤のない鼻茸は存在するのか。

(回答) 感染によって生じる鼻茸には好酸球の浸潤がほとんどなく、好中球やリンパ球が多く認められる。しかし、最近では好酸球浸潤を伴う鼻茸が増加している。

質問 1 7) 好酸球の浸潤の有無で VCAM-1 の発現に差があるか。

(回答) 好酸球性鼻茸と好酸球浸潤のない鼻茸で線維芽細胞からの VCAM-1 の産生を比較したところ、両者間に有意な差は認めなかった。

質問 1 8) 鼻茸が出来やすい体質があるか。

(回答) 鼻茸は慢性副鼻腔炎の一亜型と考えられており、喘息とくにアスピリン喘息患者に多く認められる。しかし、アレルギー性鼻炎に鼻茸を伴うことはきわめて稀である。したがって、鼻茸が出来やすい体質はあるが、I 型アレルギーとは関連性が少ないと考えられる。

質問 1 9) 鼻茸の本態は線維芽細胞の増殖か。

(回答) 鼻茸は、線維芽細胞の増殖、炎症細胞の浸潤、間質の浮腫が病理組織学的な特徴であり、様々なタイプに分類される。したがって線維芽細胞の増殖のみが本態とは考えられない。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を十分に具備しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。