

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

論 文 題 目

Induction of epithelial-mesenchymal transition by flagellin  
in cultured lung epithelial cells  
(フラジェリン刺激による培養肺胞上皮細胞での上皮間葉移行の誘導)

氏名 辻 淳 豊



【目的】レジオネラ肺感染症において、肺線維症が起こりやすいことが知られている。肺線維症には、Ⅱ型肺胞上皮細胞の上皮間葉移行 (endothelial-mesenchymal transition: EMT) が関与する可能性が報告されている。しかし、レジオネラが EMT を誘導する分子機構については不明である。レジオネラは鞭毛を有し、その構成タンパク質であるフラジェリンは肺胞上皮細胞の Toll-like receptor 5 (TLR5) を刺激することが知られている。本研究ではⅡ型肺胞上皮細胞の培養株細胞である A549 細胞に、精製したフラジェリンを添加し、細胞応答について検討した。




【方法・結果】 *Bacillus subtilis* から精製したフラジェリンを実験に用いた。NF- $\kappa$ B のプロモーター活性は濃度依存性に増加し、 $2.0 \mu\text{g/ml}$  フラジェリンの 8 時間刺激で最大となった。次にマイクロアレイ法によりフラジェリン刺激により発現が 1.4 倍以上に変化する遺伝子を検討した。調べた 22,148 遺伝子の中で 209 遺伝子の発現がフラジェリンにより変化した。フラジェリンで増加した 121 遺伝子のう

ち、43 遺伝子が TGF- $\beta$  1 でも増加した。またフラジェリンで減少した 88 遺伝子のうち 44 遺伝子が TGF- $\beta$  1 でも減少した。フラジェリンで変化しなかった 18,232 遺伝子のうち 15,398 遺伝子は TGF- $\beta$  1 でも変化が認められなかった。これらの結果から、フラジェリンによる遺伝子発現の変化は TGF- $\beta$  1 による変化と類似していることが明らかになった。TGF- $\beta$  1 は肺胞上皮細胞に EMT を起こすことから、フラジェリンにより、EMT が起こる可能性を検討した。ウエスタンブロット法でフラジェリンにより、フィブロネクチンタンパク質が増加し、E-カドヘリンタンパク質が減少した。TGF- $\beta$  1 刺激による A549 細胞の形態変化は、フラジェリンにより増強された。またフラジェリン刺激により MAP キナーゼファミリーである ERK, JNK, p38MAP キナーゼが活性化された。その中で p38MAP キナーゼの活性化が最も強く認められた。フィブロネクチンタンパク質の増加は、p38 MAP キナーゼの阻害剤 (SB203580) により抑制されたが、E-カドヘリンタンパク質の減少は抑制されなかった。

【まとめ】フラジェリン刺激により A549 細胞で EMT が誘導された。本反応の一部には、p38 MAP キナーゼが関与していた。TLR5 の刺激に必要なアミノ酸はレジオネラのフラジェリンにも保存されている。これらの結果は、レジオネラのフラジェリンが II 型肺胞上皮細胞に EMT を誘導して肺の線維化を起こす可能性を示唆している。

(別紙様式第 7 号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	近藤 豊
論文審査委員	審査日	平成 25 年 1 月 11 日	
	主査教授	荻谷 研一	
	副査教授	丸山 一郎	
	副査教授	田中 勇悦	
(論文題目) Induction of epithelial-mesenchymal transition by flagellin in cultured lung epithelial cells (フラジェリン刺激による培養肺胞上皮細胞での上皮間葉移行の誘導)			
(論文審査結果の要旨)			
<p>1. 研究の背景と目的：Toll-like receptor 5 (TLR5) は細菌の鞭毛構成蛋白質であるフラジェリンを認識し、主に NF-<math>\kappa</math>B 経路を介して宿主の炎症反応を誘導するとされる。一方、レジオネラなど鞭毛を有する細菌は肺線維症を引き起こしやすいが、肺線維症の発症における TLR5 刺激の意義は明らかでない。そこで著者らは、培養肺胞上皮細胞に精製したフラジェリンを加え、その細胞応答を詳細に検討した。</p> <p>2. 研究方法と結果：II 型肺胞上皮細胞の培養細胞である A549 細胞を、<i>Bacillus subtilis</i> から精製したフラジェリンで処理し、細胞応答を検討した。まずフラジェリン刺激による NF-<math>\kappa</math>B のプロモーター活性変化を調べたところ、2.0 <math>\mu</math>g/ml まで濃度依存性に増加し、刺激後 8 時間でピークを示した。一方マイクロアレイ法では、調べた 22,148 遺伝子の中で 209 遺伝子の発現がフラジェリン刺激により変化したが、この変化は上皮間葉移行 (EMT) の主要因子である TGF-<math>\beta</math>1 によるものと類似していた。すなわち、フラジェリンで増加した 121 遺伝子のうち 43 遺伝子 (35.5%) が TGF-<math>\beta</math>1 でも増加し、フラジェリンで減少した 88 遺伝子のうち 44 遺伝子 (50.0%) が TGF-<math>\beta</math>1 でも減少した。TGF-<math>\beta</math>1 は肺胞上皮細胞の EMT を誘導して肺線維症の発症に関与する。そこでフラジェリン刺激も肺胞上皮細胞の EMT を誘導するか検討したところ、フィブロネクチン蛋白質の増加、E-カドヘリン蛋白質の減少、さらに TGF-<math>\beta</math>1 による A549 細胞の形態変化の増強作用が認められた。また、フラジェリン刺激は ERK、JNK、p38MAPK などの MAP キナーゼ群、特に p38MAPK を強く活性化し、p38MAPK 阻害剤がフィブロネクチン蛋白質の増加を抑制した。</p> <p>3. 研究の意義と学術的水準：本研究は、フラジェリン刺激の肺胞上皮細胞 EMT への関与と p38MAPK の重要性、さらにフラジェリンが鞭毛を持つ細菌による肺線維症の発症に関与する可能性を示唆するものであり、救急医学領域における重症感染症後の肺線維症の発症機構の理解に大きく寄与する高い水準の研究と言える。</p>			
以上の結果から、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。			

- 備考 1 用紙の規格は、A 4 とし縦にして左横書きとすること。  
 2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。  
 3 \*印は記入しないこと。