

学位論文題名

Retinoic acid inhibits interleukin-4-induced eotaxin production  
in a human bronchial epithelial cell line

(レチノイン酸はヒト気道上皮細胞において  
インターロイキン-4によるエオタキシン生産を抑制する)

学位論文内容の要旨

【背景】気管支喘息を代表とするアレルギー性疾患において、局所の好酸球性炎症はその病態に重要な役割を果たしている。エオタキシンは最も強力な好酸球の遊走因子であり、気管支喘息においてもその役割が注目されている。エオタキシン発現のメカニズムについては、signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6)と nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)が重要な役割を担っていることが、気道上皮細胞をはじめいくつかの細胞において証明されている。一方、all-trans retinoic acid (ATRA) は古くから創傷治癒や細胞分化を促すことが報告されており、近年、ラットの肺気腫モデルにおいて破壊された肺胞の再生を促すことが報告され注目されている。しかし、ATRA が抗炎症作用を有するか否かについての検討はされていない。ATRA は核内受容体に属するレチノイン酸受容体 (RARs) に結合して作用を発揮するため、転写因子との相互作用により炎症性サイトカインやケモカインなどの産生に影響を与えることが推測されるが、ATRA とエオタキシンの関係を検討した報告はない。

【目的】ATRA がエオタキシンの産生に影響を及ぼすか否かをヒト気道上皮細胞 cell line (BEAS-2B)を用いて検討する。

【方法】BEAS-2B に ATRA またはその stereodimer である 9-cis retinoic acid (9-cis RA) を  $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$ M の濃度で前投与し、interleukin-4 (IL-4)または tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (10ng/ml)で刺激し、下記について検討を行った。1. エオタキシン蛋白：刺激後 24 時間で上清を回収し、ELISA 法により測定した。2. エオタキシン mRNA：刺激後 4 時間で回収し、RT-PCR 法で測定した。3. エオタキシンプロモーターの転写活性については STAT6 と NF- $\kappa$ B の結合サイト(このほか AP-1 も含む)を含む領域 (-1363 から-1) をルシフェラーゼプラスミドに組み込み transfection し、その活性を検討した。4. IL-4 刺激による STAT6 の活性化に対する ATRA の影響について、1) STAT6 のリン酸化に対する ATRA の影響をウェスタンブロット法で検討した。2) STAT6 の核内移行に対する ATRA の影響を核抽出物を用いたウェスタンブロット法で検討した。3) STAT6 の DNA 結合能に対する影響をゲルシフトアッセイにより検討した。5. ATRA の影響における AP-1 の関与について、AP-1 結合サイトを有するルシフェラーゼプラスミドを作成し、transfection 法にて検討した。6. IL-4 または TNF- $\alpha$ 刺激による monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) 産生に対する ATRA の影響について、上清を用いた ELISA 法により検討した。

【結果】ATRA および 9-cis RA は IL-4 によるエオタキシンの産生を濃度依存性に抑制し、ともに  $10^{-7}$ M、 $10^{-6}$ M の

濃度で有意差が認められた。一方、ATRA および 9-cis RA はともに、TNF- $\alpha$ によるエオタキシン産生には影響を与えなかった。mRNA の検討でも、ATRA および 9-cis RA は IL-4 によるエオタキシン mRNA の発現を濃度依存性に抑制した。mRNA においても、ATRA と 9-cis RA は TNF- $\alpha$ によるエオタキシン産生には影響を与えなかった。転写活性における検討では、ATRA は IL-4 によるエオタキシンプロモーター転写活性の亢進を濃度依存性に抑制した。ATRA は IL-4 による STAT6 のリン酸化、核内移行、DNA 結合能いずれに対しても影響を与えなかった。AP-1 結合サイトを有しない短いプロモーター領域 (-300 から-1) を用いた検討でも、ATRA は IL-4 によるエオタキシンプロモーター転写活性の亢進を濃度依存性に抑制した。さらに、ATRA は 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) による AP-1 依存性転写活性亢進についても影響を与えなかった。ATRA は  $10^{-6}$ M の濃度で、IL-4 による MCP-1 産生を有意に抑制した。

【考察】我々は、ATRA がヒト気道上皮細胞 cell line において、IL-4 によるエオタキシンの産生を転写レベルで抑制していることを明らかにした。一方、TNF- $\alpha$ により産生されるエオタキシンに対しては抑制効果を示さなかった。我々が用いた BEAS-2B 細胞では、IL-4 は STAT6、TNF- $\alpha$ は NF- $\kappa$ B をそれぞれ特異的に介してエオタキシン産生を増強することが既に報告されており、我々の実験系でも確認した。このことより、ATRA は STAT6 の経路を特異的に抑制することが予想された。しかし、ATRA は STAT6 の活性化には影響を与えなかった。さらに、転写因子が DNA 結合サイトへの結合後に不安定となり DNA から解離する可能性についても検討を加えたが、8時間まで検討したが、STAT6 の DNA 結合能は ATRA による影響を受けなかった。また、エオタキシン同様、IL-4 により産生が刺激される MCP-1 についても、ATRA は  $10^{-6}$ M の濃度で MCP-1 産生を有意に抑制したことより、ATRA の抑制作用はエオタキシンに限定された作用ではないことが判明した。

今回の検討では、ATRA による抑制機序については正確には解明することはできなかったが、次のような機序が推測される。転写因子はターゲットとなる遺伝子のプロモーターに結合することにより転写の調節を行うが、RNA polymerase と転写因子を媒介する co-activator または co-repressor が存在する。つまり、co-activator が関与すると転写が亢進し、co-repressor が関与すると転写が抑制される。ATRA が STAT6 に関与する co-activator の抑制または co-repressor の活性を惹起しているとする、我々の得た結果の説明が可能となる。これらの因子の検討には、co-activator または co-repressor の過剰発現などによる実験が必要であり、今後検討していかなければならない。

【結語】ATRA はヒト気道上皮細胞 cell line において、IL-4 刺激によるエオタキシンの産生を転写レベルで抑制した。ATRA は気管支喘息をはじめとする好酸球性炎症を主とする疾患において、エオタキシンの産生抑制を介して好酸球性炎症を減少させる可能性があることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

## Retinoic acid inhibits interleukin-4-induced eotaxin production in a human bronchial epithelial cell line

(レチノイン酸はヒト気道上皮細胞において  
インターロイキン-4によるエオタキシン生産を抑制する)

気管支喘息などのアレルギー性疾患において、局所の好酸球性炎症はその病態に重要な役割を果たしている。エオタキシンは好酸球の遊走因子であり、その発現の機序については、STAT6とNF- $\kappa$ Bが重要な役割を担っていることが証明されている。一方、all-trans retinoic acid (ATRA) は古くから創傷治癒や細胞分化を促すことが報告されている。しかし、ATRAの好酸球性炎症に及ぼす影響は検討されていない。ATRAは核内受容体のレチノイン酸受容体に結合して作用を発揮するため、転写因子との相互作用により炎症性サイトカインの産生に影響を与えることが推測されるが、ATRAとエオタキシンの関係を検討した報告はない。そこで、ATRAがエオタキシンの産生に与える影響とその機序をヒト気道上皮細胞cell line (BEAS-2B)を用いて検討した。BEAS-2BにATRAまたはそのstereodimerである9-cis RAを $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$ Mの濃度で前投与し、IL-4またはTNF- $\alpha$  (10ng/ml)で刺激し、次の検討を行った。エオタキシン蛋白をELISA法により、mRNAはRT-PCR法で測定した。エオタキシンプロモーターの活性についてSTAT6とNF- $\kappa$ Bの結合配列をルシフェラーゼプラスミドに組み込み、AP-1の関与については、AP-1結合配列を有するプラスミドを用い、transfection法で検討した。IL-4刺激によるSTAT6の活性化に対するATRAの影響については、STAT6のリン酸化、核内移行に対する影響をウェスタンブロット法で検討し、STAT6のDNA結合能に対する影響をゲルシフトアッセイにより検討した。

ATRA、9-cis RAはBEAS-2Bにおいて、IL-4によるエオタキシンの産生を蛋白、mRNAレベルのいずれにおいても抑制したが、TNF- $\alpha$ により産生されるエオタキシンに対しては抑制効果を示さなかった。ATRAはプロモーターを用いたtransfectionによる検討において、IL-4刺激によるエオタキシン産生を転写レベルで抑制した。AP-1はATRAによるエオタキシン産生抑制に関与していなかった。ATRAはSTAT6の核内移行、リン酸化、DNA結合能には影響を与えなかった。ATRAはIL-4刺激によるMCP-1の発現も抑制した。

結論として、ATRAはBEAS-2Bにおいて、IL-4刺激によるエオタキシンの産生を転写レベルで抑制した。今回の検討では、その抑制機序については正確に解明することができなかつ

たが、ATRA は気管支喘息をはじめとする好酸球性炎症を主とする疾患において、エオタキシンの産生抑制を介して好酸球性炎症を減少させる可能性があることが示唆された。

審査にあたり、副査清水宏教授より、1) 本研究を着眼するに至った背景、2) 好酸球性炎症における本論文で示された結果の意義について質問があった。主査上出利光教授より、1) 気管支喘息の気道過敏性に対するエオタキシンの役割、2) TNF- $\alpha$ 刺激によるエオタキシン産生の抑制効果がみられない理由、についての質問とコメントがあった。また副査西村正治教授より、共同実験者としての本研究に関するコメントと、in vitroの研究と臨床応用に関する質問があった。申請者はこれらの質問に対して大概適切に回答した。

本研究の成果は、ATRA がBEAS-2Bにおいて、IL-4 刺激によるエオタキシンの産生を転写レベルで抑制することを初めて示した点において高く評価される。この研究結果は、気管支喘息をはじめとする好酸球性炎症を主とする疾患において、エオタキシンの産生抑制を介して好酸球性炎症を減少させる可能性を示唆する。

審査員一同は、本研究の成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。