

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域消化器外科学分野 氏名 島田 拓
<p>(論文題目)</p> <p>CCL5 is induced by TLR 3 signaling in HuCCT1 human biliary epithelial cells: possible involvement in the pathogenesis of biliary atresia</p> <p>(HuCCT1 ヒト胆管上皮細胞において CCL5 は TLR 3 シグナルにより誘導される : 胆道閉鎖症の発症機序への関与の可能性)</p>	
<p>【背景】</p> <p>胆道閉鎖症 (BA; biliary atresia) は、新生児期における難治性の肝胆道系疾患の一つであり、放置すると胆汁性肝硬変症から不可逆的な肝不全に至る。組織学的には肝外胆管の硬化性胆管炎と線維性閉塞が基本病態であるが、その病因は未だ不明である。</p> <p>生後間もないマウスに RNA ウイルスの一つであるレオウイルスを人為的に感染させると、胆道閉鎖症に類似した病態を呈し、胆道閉鎖症の動物モデルとして使われている。このマウスの胆道閉鎖症モデルの胆管上皮細胞で、いくつかのケモカインが過剰に発現していることが報告されている。したがって、RNA ウイルスの感染と胆管上皮細胞でのケモカインの過剰な発現が、BA の病態形成の原因に関与していると推測されている。しかし、その詳細は未だ明らかにされていない。</p> <p>生体に侵入してきたウイルスの構成成分は、種々の細胞においてパターン認識受容体によって認識され、その下流で自然免疫系が活性化される。ヒトの胆管上皮細胞においては、RNA ウイルスの感染と自然免疫応答に関連したケモカインの発現動態を調べた研究は、これまで存在しない。</p> <p>そこで、本研究では、ヒト胆管上皮細胞癌由来細胞株である HuCCT1 を用いて、BA への関与が示唆されるケモカインのうち、CCL5 (別名、RANTES; regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) に注目し、RNA ウイルス感染との関連および CCL5 の発現に関与する細胞内シグナル伝達を検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>HuCCT1 細胞を培養し、ウイルス RNA を mimic する試薬である人工的な二本鎖 RNA の polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) で処理し、CCL5 の発現を調べた。CCL5 mRNA およびタンパク質の発現解析は、定量 RT-PCR 法および ELISA 法を用いた。また、RNA 干渉法を用いて、二本鎖 RNA に対するパターン認識受容体である Toll-like receptor 3 (TLR3)、自然免疫応答の key cytokine である Interferon (IFN)-β、転写因子である nuclear factor-κB (NF-κB) の p65 サブユニットおよび IFN regulatory factor 3 (IRF3) のノックダウンを行い、CCL5 の発現におけるこれらの分子の関与を調べた。p65 と IRF3 タンパク質の発現は、western blotting で調べた。</p> <p>また、過去に本学附属病院にて手術を行ったヒト胆道閉鎖症 2 症例の肝門部組織のホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いて、CCL5 の免疫組織化学を行った。小児肝芽腫 1 症例の肝切除標本の非炎症部分を対照群として用いた。</p>	

【結果】

培養した HuCCT1 細胞を poly IC で処理すると、CCL5 の mRNA およびタンパク質の発現が亢進した。また TLR3、p65、IRF3 のノックダウンにより、poly IC 処理による CCL5 の発現亢進は減弱したが、IFN- β のノックダウンは CCL5 の発現に影響を与えなかった。

CCL5 の免疫組織化学では、ヒト胆道閉鎖症症例の肝門部組織の胆管上皮細胞に CCL5 が強く発現していたが、ヒト正常肝組織の胆管上皮細胞では発現は認められなかった。

【考察】

今回、我々は HuCCT1 細胞を poly IC で処理すると CCL5 の発現が誘導されることを見出した。この CCL5 の発現誘導は、TLR3、NF- κ B p65、IRF3 のノックダウンにより抑制されたことから、poly IC は TLR3 シグナリングを活性化し、転写因子の NF- κ B と IRF3 を活性化して CCL5 の発現が誘導されたと考えられた。一方、CCL5 の発現は IFN- β に依存しないと考えられた。

これらの結果は、RNA ウイルスの感染がヒトの胆管上皮細胞において CCL5 の発現を亢進させることを示唆している。また、NF- κ B と IRF3 二つの転写因子は CCL5 の発現を亢進させることにより BA の病態に関与している可能性が示唆された。

ヒトの組織標本を用いた免疫組織化学では、胆道閉鎖症症例の胆管上皮細胞に CCL5 が強く発現していたが、正常組織の胆管上皮細胞には発現していなかった。

以上の結果から、ヒトにおいて、二本鎖 RNA ウイルスの感染が胆道上皮細胞における TLR3 下流の自然免疫応答を活性化し、それにより過剰に発現した CCL5 などのケモカインが BA の病態形成に関与する可能性が考えられた。BA に対する治療は現在では外科的治療しかなく、BA の発症機序に着目した治療法の開発が望まれる。CCL5 などの炎症性ケモカインの細胞内シグナル伝達経路の解明は今後 BA の治療法開発につながる可能性がある。

※1 乙の場合、〇〇領域〇〇教育研究分野にかえて、所属の〇〇講座を記入すること。

※2 論文題目が英文の場合は（ ）内に和訳を付記すること。