

(様式4)

学位論文の内容の要旨

西田 豊

(学位論文のタイトル)

Oxidative stress induces MUC5AC expression through mitochondrial damage-dependent STING signaling in human bronchial epithelial cells
(ヒト気道上皮細胞における酸化ストレスによるミトコンドリア障害依存性 STINGシグナルを介したMUC5AC発現の誘導)

(学位論文の要旨)

気道ムチンは、気道の水分喪失の低減や、吸入した異物に対する防御などの役割を担っている。一方で、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患などで過剰に産生されると症状を悪化させるため、その産生制御は重要である。気道の杯細胞から産生される主要ムチンMUC5ACは様々な要因によって産生が増加するが、タバコ煙などの酸化ストレスもその一つである。細胞に対する酸化ストレスはミトコンドリア障害を引き起こすが、障害されたミトコンドリアはミトコンドリアDNA (mtDNA) を細胞質内に放出し、細胞質内DNAセンサーを介して自然免疫系を活性化させる。細胞質内DNAセンサーの下流で活性化される分子の一つであるSTING (stimulator of interferon genes) は細胞質内mtDNAに対する細胞応答において重要な役割を担っており、抗ウイルス作用や抗腫瘍免疫の活性化作用を有するのに加えて、その病的な活性化は自己免疫疾患の発症の原因となる。しかし、気道上皮細胞におけるムチン産生へのミトコンドリア障害やSTINGなどの自然免疫関連分子の役割は不明なままである。そこで、我々は酸化ストレスによる気道上皮細胞からのムチン産生増強のメカニズムの一つとして、増加したmtDNAによるSTINGの活性化が関与している可能性を検証することとした。本研究ではこの仮説について検討し、ムチン産生における自然免疫の役割を解明することを目的とした。

正常ヒト気管支上皮 (NHBE) 細胞およびヒト気道上皮細胞株 (NCI-H292) を用いて、酸化ストレスモデルとして過酸化水素 (H_2O_2) 刺激後のMUC5AC mRNAを定量的に評価した。ミトコンドリアを介した酸化ストレスの影響は、ミトコンドリア抗酸化剤を用いて検討した。CRISPR-Cas9法を用いて、NCI-H292細胞からSTINGノックアウト (KO) およびSTINGの代表的な上流分子であるcGASのKO細胞を作製し、各細胞からのMUC5AC mRNA発現を検討した。

NHBE細胞を H_2O_2 で24時間刺激すると、MUC5AC mRNA発現は有意に増加した。NCI-H292細胞でも同様に増加していた。気道上皮細胞からのムチン産生を誘導させる代表的な刺激であるタバコ煙の抽出液 (cigarette smoke extract; CSE) による刺激でもMUC5AC mRNA発現は増加した。次に H_2O_2 刺激のミトコンドリアへの影響を検討した。免疫染色では、刺激前には細胞質全体に分布していたミトコンドリアは、刺激後に集簇していた。細胞質内の遊離mtDNAは、 H_2O_2 刺激1時間後と6時間後に有意な増加を認め、 H_2O_2 による酸化ストレスに応答してmtDNAが細胞質中に放出されることを確認した。ミトコンドリア抗酸化剤であるMitoTEMPOの前処理により、MUC5ACの発現増強は、mRNAおよび蛋白質レベルで有意に抑制された。一方で、小胞体ストレスを起こして細胞質へのmtDNA放出を誘発するThapsigargin刺激では、MUC5AC mRNA発現は増加した。これらの結果から、

細胞質中に放出されるmtDNAがMUC5AC発現に関与することが示唆された。

続いて、STINGおよびcGASの関与について、STING-KO、cGAS-KO細胞を用いて検討した。H₂O₂刺激後24時間で、野生型（WT）細胞ではMUC5ACは、mRNAおよび蛋白質共に発現が増加したが、STING-KO細胞ではその増加は抑制された。しかし、CSE刺激ではSTING-KO細胞でもWTと同様に増加しており、CSEによるムチン産生にはSTINGは必須ではないことが示唆された。さらにcGAS-KO細胞ではH₂O₂刺激でWTと同様に転写は増加していた。最後に、正常細胞であるNHBE細胞を用いた検討でも、H₂O₂刺激にて誘導されるMUC5ACの転写活性化は、MitoTEMPOあるいはSTINGインヒビター-H151の前投与により抑制され、ミトコンドリアとSTINGの関与が示された。

本研究で得られた結果は、酸化ストレスによるミトコンドリア障害によりmtDNAが細胞質内に放出され、STINGを介した経路を活性化し、最終的にMUC5ACの転写活性化を誘導するという我々の仮説を支持するものであった。この結果は酸化ストレスによって誘導される気道ムチンの産生には、自然免疫機構が強く関与していることを示唆している。さらに、ミトコンドリアは酸化ストレスに対する気道上皮の初期反応に重要な役割を担っている。ミトコンドリアとSTINGは、喘息やCOPDなどの酸化ストレスに関連する気道炎症性疾患の治療標的となる可能性がある。