

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09183

研究課題名(和文)喘息・COPDオーバーラップ症候群(ACOS)における気道分泌制御の重点的研究

研究課題名(英文)Regulation of mucus secretion in ACO

研究代表者

新海 正晴 (SHINKAI, Masaharu)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10535214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：喘息とCOPDをともに合併した病態としてACO(Asthma COPD Overlap)が注目されている。ACOは単独発症時と比較し症状を増悪しやすく、予後が悪いと言われている。我々は、正常ヒト気道上皮細胞に喘息を想定したIL-13刺激、COPDを想定したTGF β 刺激、ACOを想定したTGF β ・IL-13共刺激を加え、炎症・分泌関連シグナルのリン酸化やmRNA発現量を網羅的に解析した。ANO1及びCLCA1に関しては、TGF β ・IL-13共刺激において相加効果も見られた。今回の解析により、IL-13刺激とTGF β 刺激から始まるシグナル経路はクロストークを有していることが示唆された。

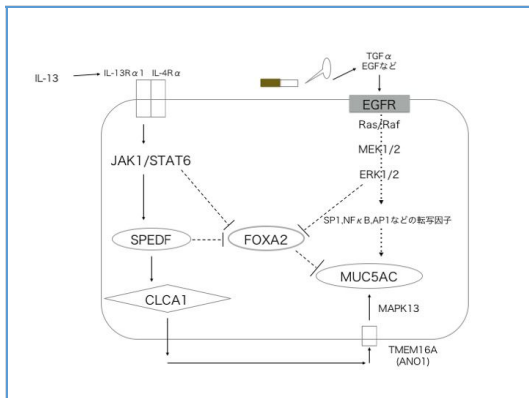
研究成果の概要(英文)：Compared with their counterparts with asthma or COPD alone, patients with ACO have significantly increased risk of exacerbations and worse respiratory symptoms. Activation of the interleukin-13 (IL-13) receptor leads to signal transducer and induction of chloride channel accessory 1 (CLCA1) and anoctamin-1(ANO1), increasing secretion of the gel-forming mucin MUC5AC. Activation of TGF β also leads to MUC5AC production via extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2). We examined the effect of both IL-13 and TGF β signaling leading to mucin production. Histochemical analysis was performed using hematoxylin and eosin (HE) staining and MUC5AC immunostaining. MUC5AC, ANO1 and CLCA1 mRNA expression were evaluated by real-time PCR. Western analysis was used to assess phosphorylation. Our data suggest that the effect of both IL-13 and TGF β signaling increased mucus secretion perhaps via cross talk among cell-signaling transduction pathways.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 慢性閉塞性肺疾患 IL-13 TGF β anoctamin-1 CLCA-1

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は好酸球性炎症で気道狭窄に可逆性を有し、慢性閉塞性肺疾患は好中球性炎症で非可逆的な気道狭窄が起こすという点で異なるが、粘液過分泌が起こるという点で共通している。気管支喘息における粘液分泌は、アレルゲンを認識した樹状細胞の働きにより分化した Th2 細胞から放出される IL-13 が気道上皮細胞に働きかけることが契機となると考えられている。一方、COPD における粘液分泌はタバコ煙等に含まれる有害物質によりマクロファージにおいて炎症タンパク遺伝子の転写活性化が起き、マクロファージから CXCL8 が放出されることから始まる。CXCL8 は好中球を集簇させ、好中球からは protease が放出される。これにより気道上皮細胞にアンカーされていた TGF α が切り離され、気道上皮細胞の EGFR を刺激する。気管支喘息、COPD のさらに下流の粘液分泌経路として、我々は以下の仮説を考えている (下図)。



気道上皮細胞における粘液過分泌のメカニズム (仮説)

MUC5AC と呼ばれる粘液の主成分であるタンパク質の発現が増強し、気道上皮細胞は杯細胞化生を起こし、結果的に粘液過分泌となる。

以上のように気管支喘息、COPD それぞれには多くの炎症・分泌関連シグナルが存在する。我々は、『ACO (Asthma COPD Overlap) におい

て、気管支喘息の生体内のシグナル伝達、COPD の生体内シグナル伝達にクロストークが存在し、ACO の病態に関与する種々の因子で相加もしくは相乗的に働く』という仮説を立て、検証を行った。

2. 研究の目的

正常ヒト気道上皮細胞 (NHBE cell) に IL-13 (喘息モデル) 及び TGF α (COPD モデル) の単独刺激、あるいは TGF α 、IL-13 の共刺激を加え (ACO モデルの作成)、粘液過分泌・好中球の遊走など喘息・COPD の病態形成に関与する種々の因子 (GAPDH, CLCA1, ANO1, FOXA2, CXCL8, IL-33, TGF α , IL-13) の mRNA の発現量を網羅的に測定し、刺激の条件ごとに比較すること、また、関連するタンパク質のリン酸化も比較し、相乗効果が見られるか確かめることである。

3. 研究の方法

正常ヒト気道上皮細胞 (Normal Human Bronchial Epithelial cell: NHBE 細胞) の培養

NHBE 細胞 (ロットナンバー: 0000357048、0000442483) は Lonza 社 (米国、メリーランド州ウォークーズビル) から購入した。データシートに記載された細胞情報から、細胞の提供者は順に 4 歳、46 歳の非喫煙男性だった。ラットの型コラーゲン (Sigma-Aldrich 社: 米国、ミズーリ州セントルイス) を用いてコラーゲンコートした細胞培養フラスコに 3,500 cells/cm² の密度で NHBE 細胞を播種し、培養した。気管支上皮細胞基本培地 (Bronchial epithelial basal medium: BEBM) (Lonza 社) に気管支上皮細胞添加因子セット (BEGM SingleQuot®) を添加した気管支上皮細胞培地 (Bronchial epithelial growth medium: BEGM) (Lonza 社) を培地として用い

た。温度 37 度、二酸化炭素濃度 5%の条件下で細胞培養を実施した。培養開始後 5~7 日で細胞を回収し、約 200,000 cells/mL の細胞保存液を作成し、液体窒素内で保存した。使用する際は 2 継代目の NHBE 細胞をコーゲンコートしたフラスコに播種し、播種後 24 時間後に培地交換を行い以後 48 時間毎に培地交換を行った。5~6 日間培養し 70~80% コンフルエントになった段階で培養容器に継代した。

TGF、IL-13 による刺激

継代してから 3 日後、プレート上の well を 4 群（無刺激群/TGF 刺激群/IL-13 刺激群/TGF・IL-13 刺激群）に分け、TGF (100 µg/ml Recombinant Human TGF PeptoTech)及び IL-13(50 µg/ml Recombinant Human IL-13)を培地に加えることで刺激を開始した。TGF、IL-13 の培地中での濃度はそれぞれ 50ng/ml、5ng/ml とした。

RT-PCR

種々の因子の mRNA 発現を調べるために、刺激開始時点から 2, 4, 6, 12, 24 時間後のタイミングで全 RNA を抽出した。これには、RNeasy minikit(Qiagen, Hilden, Germany)を用い、また、cDNA 合成には、iScript cDNA 合成キット(Bio-Rad, Hercules, CA)を用いた。

使用したプライマーは以下: GAPDH, CLCA1, ANO1, FOXA2, CXCL8, IL-33, TGF-, IL-13。増幅された DNA 定量をモニターするための DNA インターカラー色素としては SsoFast EvaGreen Supermix with low ROX(Bio-Rad, Hercules, CA)を使用し、RTPCR を Mx-3000P(Stratagene, La Jolla, CA)にて行った。ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)の mRNA 発現量をウェルごとの細胞数の違いによる影響をなくするための補正として用い、Ct 法にて相対定量を行なった。

Western analysis

STAT6 及び Erk1/2 のリン酸化を調べるために、刺激開始時点から 0 分後、30 分後に細胞溶解物を採取した。タンパク質濃度は、10%SDS-PAGE 上で等量のタンパク質抽出物を分画し、PVDF 膜に電気転写して、DC protein assay system(Bio-Rad)により決定した。メンブレンは 0.1%Tween20 を含有する Tris-buffered saline 中の 5%ECL 遮断剤(GE Healthcare, United Kingdom)を用いて室温で 1 時間ブロックし、ついで Phospho-Stat6(Tyr6411)、Stat6(D3H4)、phosphoErk1/2(Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP, Erk1/2(137F5)抗体(Cell Signaling Technologies)液に浸し、3 回洗浄した後、メンブレンを西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG(Cell Signaling Technology)を用いて室温で 1 時間インキュベートした。タンパク質を ECL 選択 western blotting 試薬(GE Healthcare)で検出し、画像を ImageQuant TL ソフトウェア(GE Healthcare)で分析した。尚、GAPDH タンパク質を用いて、同じメンブレン上の全組織溶解物を標準化している。

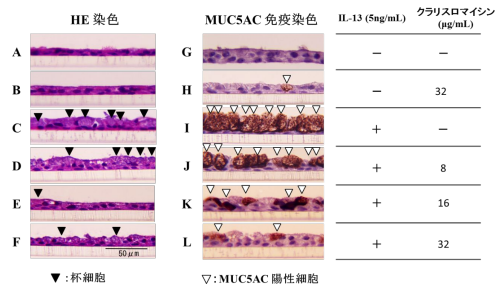
統計学的手法

全ての実験は、1 群につきウェルを 6 つ用意した。データは、平均値 ± SEM として表される。F 検定で等分散かそうでないかを確かめたのち、t 検定により分析し、0.05 未満の p 値を有意とみなした。

4. 研究成果

IL-13 誘導杯細胞過形成に及ぼす影響

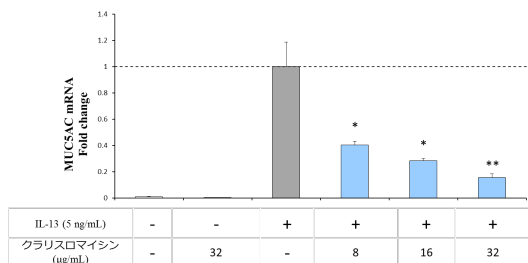
以下に組織学的検討の結果を示す(下図)。A~F が HE 染色であり G~L が MUC5AC 免疫染色の結果である。



組織学的検討

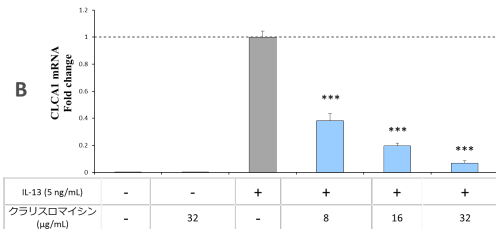
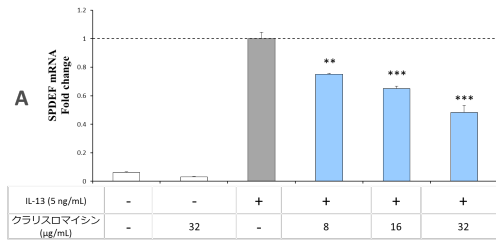
ALI 培養を行い分化誘導の結果、線毛上皮を認めた (A)。IL-13 刺激によって杯細胞が増加し (C)、クラリスロマイシンの投与によって抑制された (D-F)。MUC5AC 染色についても、IL-13 刺激によって MUC5AC 陽性細胞が増加し (I)、クラリスロマイシンの投与によって MUC5AC 陽性細胞は減少した (J-L)。クラリスロマイシンは細胞培養に影響を与えなかった (B, H)。IL-13 投与によって MUC5AC mRNA 発現量は増加し、クラリスロマイシンの投与によって IL-13 誘導 MUC5AC mRNA は濃度依存的に抑制された (下図)。

(*p<0.05, **p<0.01 : IL-13 単独投与群と比較)



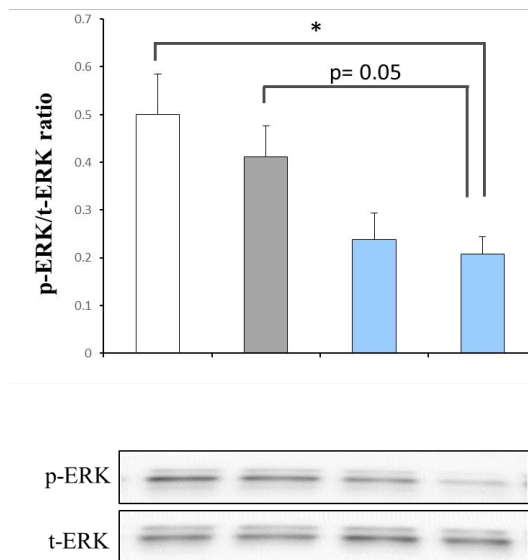
IL-13 刺激及びクラリスロマイシン投与による MUC5AC mRNA 量への影響 (IL-13 単独投与群 (3 群 : IL-13+ , クラリスロマイシン - , DMSO+) との比較 , *p<0.05, **p<0.01)

IL-13 刺激によって SPDEF、CLCA1 mRNA 発現量は増加し、クラリスロマイシンの投与によって IL-13 誘導 SPDEF、CLCA1 mRNA は濃度依存的に抑制された (A・B)。特にクラリスロマイシン 32 μg/mL の条件下では CLCA1 mRNA 発現量の減少が顕著であった (B)。(**p<0.01, ***p<0.001 : IL-13 単独投与群と比較)



IL-13 刺激及びクラリスロマイシン投与による SPDEF(A)、CLCA1(B) mRNA 量への影響 (IL-13 単独投与群 (3 群 : IL-13+ , クラリスロマイシン - , DMSO+) との比較 , **p<0.01, ***p<0.001)

IL-13 刺激によって ERK1/2 リン酸化は影響を認めなかったが、クラリスロマイシンの投与によってコントロール群 (1 群 : IL-13 - , クラリスロマイシン -) と比較し ERK1/2 リン酸化の抑制を認めた (下図)。



IL-13 刺激及びクラリスロマイシン投与による ERK1/2 への影響 (コントロール)

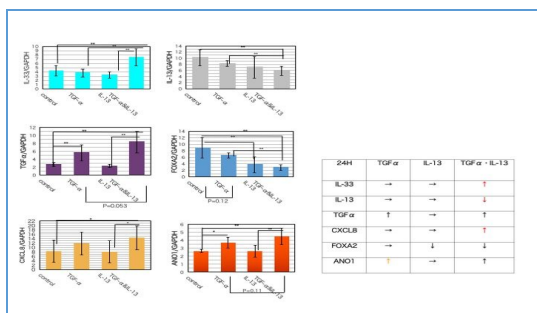
群 (1 群 : IL-13 - , クラリスロマイシン - , DMSO+) との比較 , *p<0.05)

CAM : クラリスロマイシン , p-ERK : リン酸化 ERK , t-ERK : トータル ERK

染色の結果である .

TGF β , IL-13, TGF β + IL-13 刺激による mRNA 発現の変化

ANO1 に関しては、TGF β , IL-13 刺激どちらにおいても発現が増強する傾向が見られ、12 時間後では相加効果も見られた。



5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Clarithromycin suppresses CLCA1 and inhibits IL-13-Induced goblet cell hyperplasia in human bronchial epithelial cells. / Nagashima A, Shinkai M, Shinoda M, Shimokawaji T, Kimura Y, Mishina K, Sato T, Toda M, Inayama Y, Bruce K. Rubin and Kaneko T: *Antimicrob Agents Chemother*, (2016, 60(11): 6585-6590). 査読有

2. 気道分泌・粘液線毛輸送系の病態, 長島哲理, 新海正晴: *アレルギー・免疫*, 24 (4): 474-484, 2017. 査読無

[学会発表] (計 6 件)

[図書] (計 3 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

新海 正晴 (SHINKAI Masaharu)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10535214

(2) 研究分担者

金子 猛 (KANEKO Takeshi)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 90275066