

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 10 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2022

課題番号：15K09225

研究課題名(和文) 気管支喘息における上皮間葉転換の発現機序に関する研究

研究課題名(英文) EMT in bronchial asthma

研究代表者

工藤 誠(Kudo, Makoto)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授

研究者番号：80405000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：気道上皮ではEMTの現象は一過性にしか確認できなかった。また平滑筋細胞の肥大、増殖、収縮反応による効果も一過性であった。この効果を安定的にするものとしてサイトカインの相乗効果を検討した。IL-13とIL-17Aにより、収縮能の亢進で相乗効果が認められているが、これはRhoAのmRNAの生存延長をもたらしていることも明らかにできた。またRhoAはリン酸化によって活性化することが必要で、これもIL-17AによるPKC-αを介したもので、サイトカインネットワークの中での相乗効果による平滑筋の収縮能の亢進が示唆された。この作用へのTGF-βとの相乗効果に関する研究を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

This EMT phenomenon could be the mechanism in bronchial asthma severity. The patient with severe asthma could reduce their severity and this phenomenon could be new target of asthma treatment.

研究成果の概要(英文)：In airway epithelium, EMT was transient in both cadherin expression and cytokines' effect on smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, and contractile response. We investigated the synergistic effects of cytokines to stabilize these effects and found that IL-13 and IL-17A had a synergistic effect in increasing smooth muscle contractility and that this effect also resulted in prolongation of RhoA mRNA survival (manuscript in preparation). In addition, RhoA must be activated by phosphorylation, and we observed sustained phosphorylation of RhoA via PKC-α by IL-17A, suggesting the possibility of a transition from EMT to remodeling under cytokine stimulation and a synergistic effect within the cytokine network that is more similar to real pathological conditions. The results suggest a possible transition from EMT to remodeling under cytokine stimulation and a synergistic effect within the cytokine network (in preparation for submission for publication).

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支平滑筋 気管支喘息

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は今なお、喘息死亡、重症化などが問題になっている疾患である。この重症化については、気道のリモデリングと表現される気道上皮下の気管支平滑筋の増生、基底膜の肥厚など不可逆的な変化が経年にもたらされることにより生じると考えられている。気道炎症の十分なコントロールにも関わらずこのような変化がおこるが、その機序として上皮間葉転換(以下、EMT)が考えられている。研究者はこれまでに気道平滑筋の収縮能の亢進に関して、サイトカインの直接作用を研究してきた。またこれまでの海外の研究で繰り返す気道収縮が平滑筋の肥大、増殖を引き起こすことも知られており、この機序が喘息患者の呼吸機能の悪化、増悪の頻度増加をもたらし喘息の重症化につながるとされてきた。

2. 研究の目的

EMTの発生メカニズムを明らかにし、その抑制あるいは可逆的变化が可能かどうかを検討することで重症喘息患者のコントロール、喘息死予防の戦略を立て、新たな喘息治療の軸を確立する。

3. 研究の方法

EMTへのTGF- β の影響を検討する。

integrin α 5 β 1 KO マウスの気道においては、EMTが誘導されない可能性が高い。WTを対照コントロールとして、卵白アルブミン + アジュバントでの慢性感作のアレルギー性炎症モデル、繰り返すメサコリン吸入での慢性気道収縮モデルを作成し、一定刺激後気道上皮の組織形態学的変化、気道抵抗などを測定する。これらのマウスの気道刺激のモデルもすでに確立している。またブロッキング抗体などを用いて、TGF- β の活性化に関与するintegrinの関与を明らかにする。さらにTGF- β を外来性に与え、EMTの誘導が生じるか、またこれらのKOマウスでTGF- β によるrescueができるかも検討する予定である。まず初年度にはEMTの誘導に関してのTGF- β の関与を明らかにしていき、機序が明らかになった場合の評価に使用できる実験系の確立を行っていく予定としている。

EMTの発生機序の検討、気管支平滑筋細胞の収縮刺激による増殖を検討する。

WT、KOマウスから気道上皮細胞、気道平滑筋細胞のprimary cultureを作成し、細胞レベルでの表面マーカーの変化を α -sma、E-cadherinなどのマーカーの発現変化を観察する。一般的にEMTの評価は、上皮マーカーの発現抑制/消失、間葉系マーカーの発現亢進さらに運動性、浸潤能などの亢進で行われる。正常な気道上皮でおこったEMTで、遊走能の獲得は不明であるが、細胞遊走能チャンバーを応用し遊走能の評価を行う予定である。マーカーについては、RT-PCR、免疫組織染色、western blotさらにHGFなどでscattering後、フローサイトメーターで評価していく。さらに上皮細胞でのE-cadherinの発現調節にはSnail、SIP1、Twist、E2A(E47/E12)といった転写調節因子の確認を行う。

4. 研究成果

セルラインでの気道上皮細胞を用いて、TGF- β を外来性に与え、細胞レベルでの表面マーカーの変化を α -sma、E-cadherinなどのマーカーの発現変化を観察した。一般的にEMTの評価は、上皮マーカーの発現抑制/消失、間葉系マーカーの発現亢進さらに運動性、浸潤能などの亢進で行われ、これら

によりEMTの誘導を確認した。しかし、気道上皮ではEMT現象のカドヘリンの発現は一過性で、継代のうちにカドヘリンの発現は消失した。リモデリングに繋がる安定的な持続的な変化ではなかった。一方、気道平滑筋細胞に対しての作用では、TGF- β 単独での細胞の肥大、増殖も確認はできたが一過性であった。メサコリンによる繰り返し刺激でのマーカーの変化は見られたが、これも一過性で消失していく傾向にあった。

そこで喘息の病態により近いと思われる複数のサイトカインが働く、サイトカインネットワークでのこれらの反応を再現するために複数のサイトカイン刺激による相加的あるいは相乗的效果を検討することとした。

研究者はこれまでに平滑筋の作用について、複数のサイトカインの相乗効果があることを確認してきたが、今回この相乗効果の機序について検討した。例えば、IL-13 と IL-17A により、より病態の実像を表す低い濃度で、平滑筋の収縮能の亢進が認められている。この作用は細胞骨格に関わる RhoA などの mRNA の生存延長をもたらしていることが示唆された。(論文投稿準備中)。

またこの RhoA はリン酸化によって活性化し、下流の Rho kinase をさらに活性化させて平滑筋のカルシウム感受性を亢進させ、結果として収縮能を亢進させるのに必要である。この RhoA の活性化の機序におけるサイトカインの役割が明らかでなかったため、これまでに収縮能の亢進が確認できている IL-17A を用いて、活性化を検討した。この RhoA の活性化について IL-17A による直接作用で PKC- α を介して RhoA の持続的なリン酸化をもたらすことが確認された。これらのサイトカインの相乗効果などが、TGF- β と相加的あるいは相乗的に働いて上皮や平滑筋への効果の増強、延長をもたらす可能性を検討している。この現象はサイトカイン刺激下での EMT からリモデリングへの移行の可能性とより現実の病態に近いと考えられる。また今回確認できたこれらの現象は、気管支喘息におけるサイトカインネットワークでの相乗効果によって平滑筋の収縮能の亢進による重症化に寄与していることが確認できた。

現在、このサイトカイン刺激での RhoA の活性化についても論文投稿を準備中である。研究期間は過ぎたが気道上皮細胞での EMT の持続的な変化と、気道平滑筋の肥大増殖へのサイトカインの相乗効果に関する研究を開始し、追加実験を行なっている。これについても、1-2年以内に論文投稿ができるものと考えている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 工藤誠
2．発表標題 サイトカインの直接作用による気道平滑筋の収縮増強効果についてステロイド抵抗性の新しい機序
3．学会等名 日本アレルギー学会
4．発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------