

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06641

研究課題名(和文) COPDの気道上皮リモデリングにおけるAxl受容体チロシンキナーゼの役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of Axl receptor tyrosine kinase in COPD airways

研究代表者

藤野 直也 (Fujino, Naoya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10633670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Axl受容体チロシンキナーゼはマクロファージ等の免疫細胞上に発現するアポトーシス認識分子であるが、申請者は先行研究にて気道上皮における基底細胞にもAxlが発現することを見出した。そこで本研究では、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の気道上皮細胞におけるAxlの役割をヒト肺組織、培養細胞を用いて検討した。その結果、Axlは気道上皮細胞の増殖および炎症制御に重要な分子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Axl receptor tyrosine kinase is known to be expressed by macrophages and dendritic cells. The applicant previously found that Axl was also expressed by airway basal cells. However the role of Axl in airway basal cells of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has not been determined. We found that the number of Axl+/P63+ basal cells increased in COPD ex-smokers bronchioles compared to control never-smokers and control ex-smokers. In vitro experiments using human bronchial epithelial cell line Beas2B cells indicated that Axl did not regulate epithelial-to-mesenchymal transition, which was reported to be associated with cancer progression. However we found that Axl kinase regulated chemokine and cytokine expression in Beas2B cells, which promote neutrophil inflammation. These data suggested that Axl kinase in the airway has roles in cellular proliferation and regulation of inflammation.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気道上皮細胞 炎症 Axl受容体チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) は、タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じる肺の炎症性疾患であり、2020年には全世界の死亡の第3位になると予測されている。COPDの主病態の一つは炎症性変化に伴う気道上皮の修復機構の破綻、及び異常な組織再構築 (リモデリング) であるため、COPD新規治療薬開発のためには気道組織の修復・リモデリングを制御するシグナル伝達経路を明らかにすることが必要である (Hogg JC. *Lancet* 2004;364:709).

(2) 近年、気道上皮傷害後の修復・リモデリングの過程において、自己複製能と多分化能を有する上皮幹細胞群が重要な役割を果たすことが明らかにされ、幹細胞制御システムが組織修復やリモデリングに関与することが報告されてきた (図1; Hogan BLM *et al. Cell Stem Cell* 2014;15:123). しかし、これらの研究は胚発生や発癌、他臓器の幹細胞機能制御に関与することが既に知られている分子に着目して行われた限局的なものであり、気道上皮幹細胞の機能制御因子を新規に同定するためには新たな発想に基づく網羅的探索が必要であった。

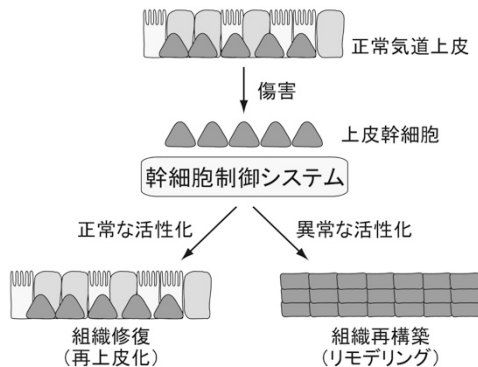


図1 幹細胞制御システムと修復・リモデリング

(3) 申請者は世界に先駆けてヒト肺組織から増殖能と多分化能を有する前駆細胞株を樹立した (Fujino N, *et al. Lab Invest* 2011;91:363). そしてヒト肺組織前駆細胞株を利用した網羅的遺伝子発現解析と化合物ライブラリーのスクリーニングにより、気道上皮幹細胞の新規機能制御因子の候補として Ax1 受容体チロシンキナーゼを同定した (Fujino N, *et al. Respir Investig* 2012;50:110; Fujino N, *et al. Eur Respir J* 2013;42:P3138).

(4) Ax1 受容体チロシンキナーゼは樹状細胞、マクロファージ、癌細胞に発現し、それぞれ自然免疫反応の制御、アポトーシス細胞の認識と貪食、癌の浸潤・転移に関与することが知られている (Lemke G. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a009076). 一方で、

この Ax1 キナーゼはあらゆる臓器の上皮組織において、その発現や機能が現在まで全く知られていなかった。申請者は、マウス気道上皮の幹細胞である気管基底細胞に Ax1 が選択的に発現することを見出した。申請者のこれまでの研究成果から、Ax1 キナーゼ経路が COPD における気道上皮リモデリングに関与するのではないかと推定し、COPD 患者の末梢肺組織を用いて免疫組織化学的に検討を行った。その結果、COPD 患者の末梢気道上皮では非 COPD 患者に比し Ax1 陽性上皮細胞数の増加傾向を認め、Ax1 が COPD の末梢気道病変に関与する可能性があることを見出した (図2)。

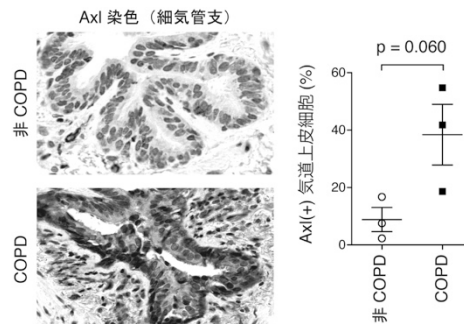


図2 COPD 細気管支における Ax1(+) 上皮細胞の増加

2. 研究の目的

以上の背景より本研究は COPD の気道上皮リモデリングにおける Ax1 キナーゼ経路の役割を明らかにすることを目的とし、以下の3点に着目して研究を行なった。

- (1) COPD の臨床病態と Ax1 キナーゼ発現・活性化との関連を明らかにする。
- (2) 気道上皮リモデリングにおける Ax1 キナーゼの役割を解明する。
- (3) Ax1 キナーゼの下流シグナル伝達経路を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) COPD の臨床病態と Ax1 キナーゼ発現との関連の解明

① 肺組織切片を用いた検討

Ax1 発現細胞を決定するために、ホルマリン固定パラフィン包埋をしたヒト肺組織切片を用い基底細胞マーカーである P63 と二重経口免疫染色を行なった。ImageJ を用いた画像解析により気道上皮単位長さあたりの Ax1 (+)P63 (+) 陽性細胞数を計測し、臨床情報との相関を検討した。

② 血清を用いた検討

可溶性 Ax1 (s-Ax1) は Ax1 リン酸化によってその産生が増加するため、Ax1 活性化の代替マーカーとして用いることが可能である (Zagorska A, *et al. Nat Immunol*

2014;15:920). 健常非喫煙者, 健常喫煙者及び COPD 患者の血清中の s-Ax1 を ELISA 法により測定し臨床情報との相関を解析した.

## (2) 気道上皮リモデリングにおける Ax1 キナーゼの役割の解明

COPD における気道上皮リモデリングでは気道上皮のバリア機能が低下することが示唆されている (Shaykhiev R, et al. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11:S252). そこで本研究では, 傷害後の気道上皮細胞のバリア機能維持における Ax1 キナーゼの役割を決定するために, ヒト気道上皮細胞株である Beas2B 細胞の Ax1 蛋白発現を siRNA にてノックダウンし, バリア機能維持に重要な上皮細胞間結合に関する蛋白発現の変化を評価した.

## (3) Ax1 キナーゼの下流シグナル伝達経路の解明

Ax1 キナーゼが制御する遺伝子群を同定するために, Beas2B 細胞を Ax1 キナーゼ選択的阻害剤で処理し網羅的遺伝子発現解析を行なった (Agilent SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ Ver 3.0).

## 4. 研究成果

### (1) COPD の臨床病態と Ax1 キナーゼ発現との関連の解明

コントロール非喫煙者 (control never-smokers, CNS, N=8), コントロール既喫煙者 (control ex-smokers, CES, N=10), COPD 既喫煙者 (COPD, N=11) から提供された切除肺組織のパラフィン切片を用い, Ax1 と P63 (基底細胞マーカー) との二重蛍光免疫染色を行なったところ, P63 陽性基底細胞の Ax1 の発現が観察された (図 4).

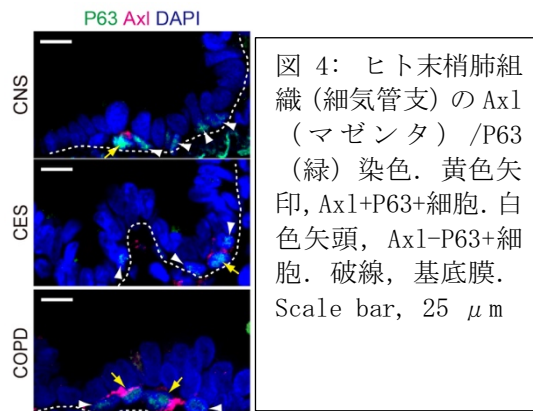


図 4: ヒト末梢肺組織 (細気管支) の Ax1 (マゼンタ) /P63 (緑) 染色. 黄色矢印, Ax1+P63+細胞. 白色矢頭, Ax1-P63+細胞. 破線, 基底膜. Scale bar, 25  $\mu$ m

気管支上皮単位長さあたりの Ax1+/P63+細胞, および P63+基底細胞に占める Ax1+/P63+細胞の割合は, COPD で有意に増加していた (図 5). さらに, Ki67+Ax1+/P63+細胞 (細胞周期にある

Ax1+/P63+細胞) の数も COPD で有意に増加していた (図 6). 以上から, COPD の細気管支上皮では Ax1 を発現する基底細胞が増殖していることが明らかになった.

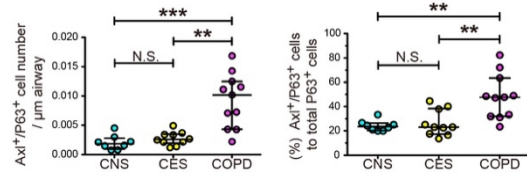


図 5: 細気管支上皮単位長さ  $\mu$ m あたりの Ax1+P63+細胞数 (左). P63+基底細胞における Ax1+P63+細胞の割合 (%), (右). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. CNS.

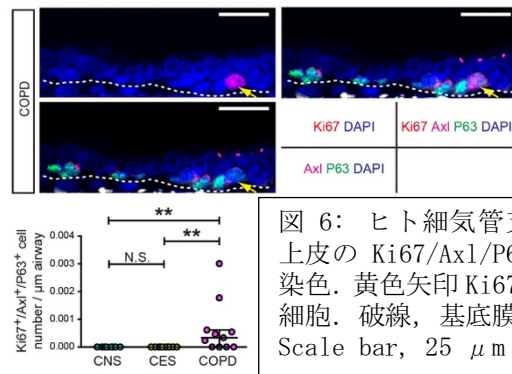


図 6: ヒト細気管支上皮の Ki67/Ax1/P63 染色. 黄色矢印 Ki67+細胞. 破線, 基底膜. Scale bar, 25  $\mu$ m

次に COPD 患者血清 (1/2/3/4 期, 20/37/24/10 名) を用いて sAx1 を測定した. しかし, 血清 sAx1 値と COPD の病期, 年齢, 喫煙歴, %一秒量 (予測値), 労作時息切れの程度 (mMRC) といった臨床パラメーターの間では有意な相関を認めなかった (data not shown). 以上より Ax1 は細気管支上皮といった肺局所で活性化していると考えられた.

### (2) 気道上皮リモデリングにおける Ax1 キナーゼの役割の解明

Ax1 キナーゼは, 肺癌, 乳癌などの固形癌において上皮間葉移行 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) を誘導することが知られている. COPD の細気管支上皮における Ax1 陽性細胞の増加が, COPD 細気管支上皮の EMT を促進し上皮バリア機能を低下させる可能性を検討した.

ヒト気道上皮細胞株として Beas2B 細胞を用いた. Beas2B 細胞は, mRNA, 蛋白レベルで Ax1 発現を示すことをそれぞれ PCR 法, ELISA 法にて確認した (data not shown). さらに, Ax1 はリガンドである Gas6 を外的に投与しなくてもリン酸化されていることから機能的であると思われた (data not shown). Beas2B における Ax1 の機能を検証するため, siRNA にて

ノックダウン実験を行なった。ノックダウン効率は>90%と十分効率的であった (図7)。

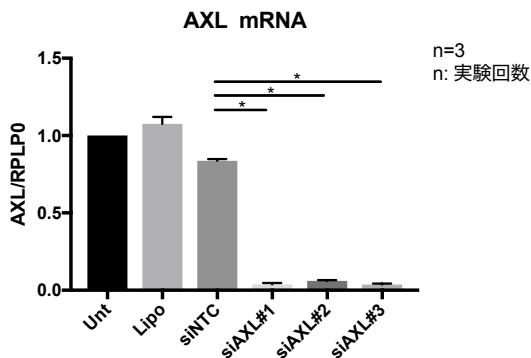


図7: Axl に対する siRNA の効率の検証. 3 種類の標的配列の異なる siRNA を用いた. Unt: 無刺激群, Lipo: リポフェクタミン投与群, siNTC: 無標的 siRNA, siAXL: Axl に対する siRNA. \*p<0.05. Axl 発現は定量的 PCR で確認した. 内因性コントロールとして RPLP0 を使用した.

次に, siRNA 感染 3 日後に細胞を回収し, 上皮細胞の細胞接着分子である E-cadherin, ZO-1, Occludin と間葉系細胞の細胞骨格分子である vimentin の mRNA 発現を qRT-PCR 法にて確認した. 予想に反して, Beas2B 細胞において, Axl のノックダウンこれら上皮・間葉系細胞マーカーの遺伝子発現を変化させなかった.

以上の検討より, ヒト気道上皮細胞では癌細胞と異なり Axl は上皮細胞のバリア機能に影響を与えないことが示唆された.

### (3) Axl キナーゼの下流シグナル伝達経路の解明

気道上皮における Axl の役割を明らかにするために, Axl キナーゼ阻害薬で処理をした Beas2B 細胞を用いて網羅的遺伝子発現マイクロアレイを行なった. 0.1%DMSO を対照群とした. 解析の結果, Axl 阻害剤処置群では表 1 に示すように, 好中球性炎症に関与するサイトカイン, ケモカインの遺伝子群の発現増加を認めた. 以上から, 気道上皮 Axl は好中球性気道炎症を抑制している可能性が示唆された.

表: Axl 阻害剤投与した Beas2B で発現が増加する遺伝子群 (ケモカイン, サイトカインのみ表示).

Chemokines		
RANK	Fold Change	GENE_SYMBOL
2	196.4	CCL20
6	114.4	CXCL8
10	77.0	CXCL3
69	23.6	CXCL2
83	18.5	CXCL12
193	9.0	CCL2
263	7.1	CXCL1
279	6.8	CXCL6
Cytokines		
RANK	Fold Change	GENE_SYMBOL
4	138.5	CSF2
12	65.3	IL6
21	52.2	IL24
45	32.2	IL11
104	15.9	IL1A
113	14.4	IL2
234	7.8	IL1B
286	6.7	IL17C
296	6.4	CSF3

### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 藤野直也 (代表), Sensing of apoptotic cells via Axl kinase triggers cell cycle re-entry of airway basal cells in mice. Annual Congress of American Thoracic Society. 2017 年 5 月 23 日. 「ワシントン DC (アメリカ)」

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤野 直也 (FUJINO, Naoya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10633670

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ( )