

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：82690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09633

研究課題名(和文) 気道上皮細胞の上皮間葉転換による自然免疫応答修飾作用の解明

研究課題名(英文) Effect of epithelial mesenchymal transition on innate immune responses by airway epithelial cells

研究代表者

大島 信治 (Ohshima, Nobuharu)

独立行政法人国立病院機構東京病院(臨床研究部)・臨床研究部・アレルギー科医長

研究者番号：10724023

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)：重症喘息の不可逆的な病態であるリモデリングの発生機序の一つに、上皮間葉転換(EMT)の存在が示唆されている。本研究は、気道上皮細胞がEMTを起こすことによる、自然免疫系生体防御反応に対する修飾作用とその成立機序を明らかにすることを目的とした。A549細胞において、TGF- β 1を作用させてEMTを誘導すると、LPSおよびCpG ODNに対するサイトカイン産生応答が有意に増強した。LPSに対する反応には、受容体SREC-1の関与が示唆された。また、CpG ODNに対する反応には、NF- κ Bの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症喘息では気道リモデリングを伴うことが多く、またしばしば呼吸器感染症に伴う急性増悪によりQOLが大きく妨げられる。本研究では、気道リモデリングの原因の一つである気道上皮細胞のEMTにより、外来微生物由来抗原に対するサイトカイン・ケモカイン産生応答が亢進することで、病態がより重篤化する可能性が示唆された。喘息のみならず、EMTが関与すると考えられている間質性肺炎や肺癌においても、呼吸器感染症による急性増悪に同様の機序が関与している可能性も推察され、本研究結果を用いてその機序を明らかにし、治療ターゲットまで解明することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is reported to be one of the mechanisms involved in induction of airway remodeling in severe asthma. The present study was performed to clarify the role of EMT caused by airway epithelial cells in the innate immune response. EMT-induced A549 cells by TGF- β 1 showed significantly greater production of inflammatory cytokines in response to LPS stimuli via SREC-1 as a receptor. On the other hand, those cells showed significantly greater production of inflammatory cytokines in response to CpG stimuli through activation of NF- κ B. In conclusion, upon induction of EMT, airway epithelial cells showed a stronger immune response against pathogens in terms of inflammatory cytokine production, which may be a cause of acute exacerbation of asthma in patients with a respiratory tract infection.

研究分野：呼吸器、アレルギー、内科

キーワード：EMT 喘息 気道上皮細胞 サイトカイン 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界において喘息患者数は増え続けており、中でも重症喘息はしばしば急性増悪を来すことから患者 QOL を低下させ、アレルギー診療の問題となっている。喘息を含む慢性呼吸器疾患の急性増悪を来す原因として、最も高頻度に認められるのは呼吸器感染症である。重症喘息の不可逆的な病態であるリモデリングの発生機序の一つに、上皮間葉転換(EMT)の存在が示唆されているが、EMT と呼吸器感染症に対する自然免疫応答との関係を検討した報告は見当たらない。

2. 研究の目的

本研究は、気道上皮細胞がEMTを起こすことによる、自然免疫系生体防御反応に対する修飾作用とその成立機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

気道上皮細胞株、A549細胞を用いた。

(2) A549細胞のEMT誘導

TGF- β 1 10 ng/mlまたは10% Cigarette Smoke Extract(CSE)含有のmediumで72時間培養し、EMTを誘導した。

(3) サイトカイン濃度の測定

EMTを誘導したA549細胞を、LPSまたはCpG ODNで刺激して得られた上清中のサイトカイン濃度をCytometric Bead Assay; CBAおよびELISA法で測定した。

(4) Real-time PCR

細胞を刺激した後、細胞からtotal RNAを抽出した。その後mRNAからcDNAに逆転写を行い、レファレンス遺伝子を β -actinとして Ct法で相対定量した。

(5) siRNAを用いたノックダウン

siRNAをHiPerFect Transfection Reagent(Qiagen)に懸濁しノックダウンを行なった。ノックダウンの評価についてはFACSおよびPCRで解析し、確認を行った。

(6) フローサイトメトリーによる解析

細胞表面発現は、各種特異抗体で標識後、FACSVerse(BD Biosciences)で測定した。

(7) Western blot analysis

刺激後の細胞をlysis buffer (RIPA buffer)で溶解し、SDS化、還元熱処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。ウェット式でpolyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写し、抗体で標識後化学発光し、Amersham Imager 600(GE Healthcare Japan)で撮影した。

(8) 統計解析

連続変数の二群間比較はMann-Whitney's U検定で、多群間比較はKruskal-Wallis検定で評価し、統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) EMT 誘導後 A549 細胞の LPS 刺激に対するサイトカイン産生応答

TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞を、LPS 0.01, 0.1 ng/ml で 48 時間刺激し培養上清中の IL-6、IL-8、GM-CSF 濃度を測定したところ、これらのサイトカインの産生が有意に上昇した (Fig. 1)。IL-6、IL-8、GM-CSF mRNA 発現レベルも有意に増強した。

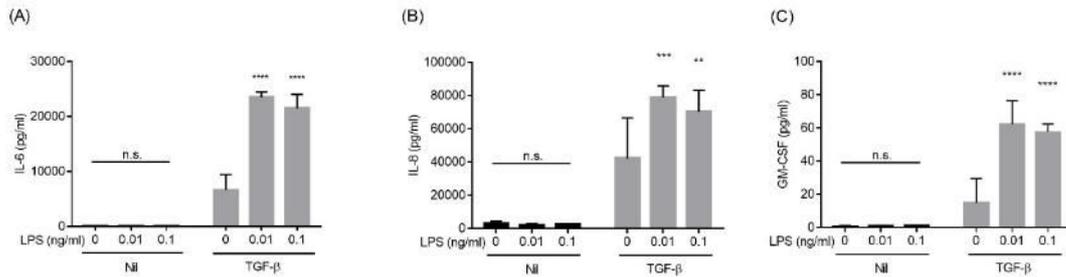


Fig. 1 EMT 誘導後 A549 細胞の LPS 刺激に対するサイトカイン産生応答

A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 72 時間培養した後、図中に示す LPS 濃度で 48 時間刺激し、上清中の IL-6(A)、IL-8(B)、GM-CSF(C)濃度を測定した。エラーバーは標準偏差(n = 4)を示す。

n.s., not significant; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****p<0.0001

(2) EMT 誘導による A549 細胞の LPS 受容体の発現レベルの変化および LPS 刺激に対するサイトカイン産生応答における SREC-1 の関与

LPS 受容体として、TLR4, CD14, Caspase-4 および SREC-1 が報告されている。これらの受容体発現レベルの変化が関係している可能性を考え、EMT 誘導の有無によるこれら受容体の発現レベルを解析した。A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 24 時間培養し、EMT を誘導すると TLR4, CD14 および Caspase-4 mRNA 発現レベルが有意に低下した。その一方で、SREC-1 mRNA 発現レベルは EMT 誘導により増強した。さらに、SREC-1 に対する siRNA を用いて SREC-1 をノックダウンしたところ、LPS による IL-8 および GM-CSF mRNA 発現レベルが抑制された(Fig.2)。

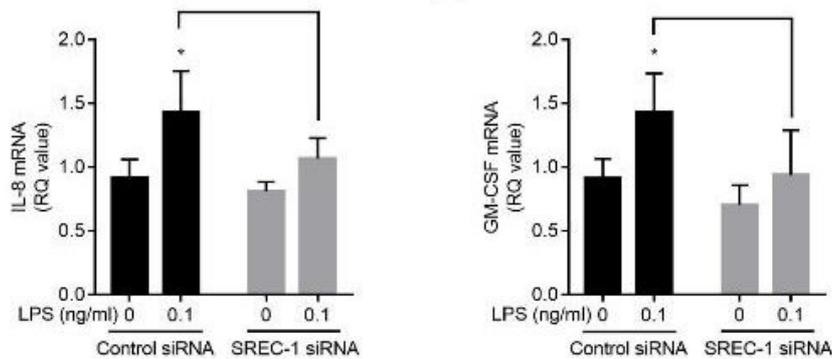


Fig. 2 EMT 誘導による A549 細胞の LPS 刺激に対するサイトカイン産生応答における SREC-1 の関与

A549 細胞に SREC-1 siRNA 10nM を 48 時間作用させ、LPS 0.1 ng/ml で 4 時間刺激した。total RNA を抽出し、real time PCR で IL-8 および GM-CSF の mRNA 発現量を相対定量した。エラーバーは標準偏差(n =3-9)を示す。*P<0.05

(3) EMT 誘導による A549 細胞の CD14、CD205 の発現レベルの変化

我々はこれまでに EMT 誘導により、A549 細胞が CpG ODN の取り込みを亢進することを論文発表している。CpG ODN の細胞内への取り込みに関与する受容体として、CD14 および CD205 が報告されている。そこで、EMT 誘導による CpG ODN の取り込み亢進に、これらの受容体発現レベルの

変化が関係している可能性を考え、EMT 誘導の有無によるこれら受容体の発現レベルを解析した。

EMT 誘導の有無による CD14 および CD205 の細胞表面発現の変化をフローサイトメトリーで測定した。結果、CD14 の細胞表面発現は感度以下であり、CD205 の細胞表面発現は EMT 誘導の有無により変化しなかった。

(4) EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答における NF- κ B および MAP キナーゼ経路の関与

我々はこれまでに EMT 誘導により、A549 細胞が IL-6、IL-8 および MCP-1 の産生を亢進することを論文発表している。NF- κ B はいずれのサイトカイン発現にも関与する転写因子であることから、NF- κ B の特異的阻害である BAY11-7082 を使用し阻害実験を行った。EMT 誘導後 CpG ODN 刺激による IL-6、IL-8、MCP-1 の産生はいずれも BAY11-7082 添加により有意に抑制され (Fig. 3)、EMT 誘導後 CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生は NF- κ B 依存적であると考えられた。

NF- κ B の他、TLR9 の下流シグナルとして MAP キナーゼ経路が知られており、TGF- β 1 の非古典経路も MAP キナーゼ経路を活性化することから、代表的な MAP キナーゼ経路である JNK 経路、p38 経路、および ERK 経路の関与についても検証した。JNK、p38 MAPK、MEK1/2 に対する特異的阻害剤である SP600125、SB203580、U0126 を使用して阻害実験を行ったところ、IL-6 と MCP-1 の産生は JNK 経路の阻害で部分的に低下する傾向が見られ、p38 経路の阻害で有意に低下したが、IL-8 の産生はこれらの経路の阻害で抑制されず、ERK 経路の阻害で部分的に低下する傾向が見られた。

以上の結果から、NF- κ B は IL-6、IL-8、MCP-1 いずれの産生にも関与しており、TGF- β 1 は NF- κ B を活性化しベースラインのサイトカイン産生を亢進させることが明らかになった。一方、IL-6、IL-8、MCP-1 いずれの産生にも共通して関与する MAP キナーゼ経路は認められなかった。

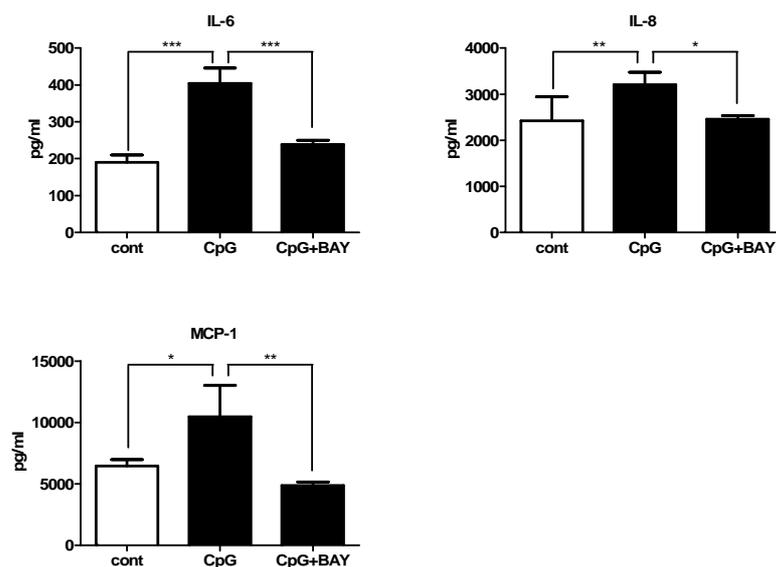


Fig. 3 EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答における NF- κ B の関与

A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 72 時間培養した後、図中に示す各条件下で 24 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を測定した。

エラーバーは標準偏差 (n =3-6) を示す。

cont, control ODN 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CpG, CpG ODN 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; BAY, BAY11-7082 5 μM
n.s., not significant; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

(5) CpG ODN による mRNA 安定化への影響

CpG ODN が炎症性サイトカイン産生を誘導する別の機序として、炎症性サイトカインの mRNA 安定化が報告されているため、EMT 誘導後の A549 細胞における作用を検討した。TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞に actinomycin D を添加し転写を停止させた後、IL-6、IL-8、MCP-1 の mRNA 発現量を測定したところ、mRNA の継時的な減少は CpG ODN により有意な影響を受けなかった (AUC 平均 \pm 標準偏差/ Control ODN vs. CpG ODN: IL6 34.8 ± 3.4 vs. 40.9 ± 11.2 , IL-8 48.7 ± 13.6 vs. 57.6 ± 5.5 , MCP-1 71.0 ± 14.7 vs. 80.6 ± 5.6)。これらの結果から、EMT 誘導後の A549 細胞において CpG ODN は mRNA の安定性に影響を与えないと考えられた。

(6) CSE による A549 細胞の EMT 誘導と CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答の変化

CSE は A549 細胞および正常ヒト気道上皮細胞に TGF- β signaling 非依存的に EMT を誘導することができる。EMT による CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答の亢進が、TGF- β 1 以外の EMT 誘導因子でも認められる現象であるか否かを明らかにするため、CSE で EMT 誘導した A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答を解析した。

CSE により 72 時間刺激したところ、A549 細胞は細胞極性の喪失、周囲細胞との接着の減弱、紡錘状の形態を示し、TGF- β 1 による EMT 誘導時と同様の形態学的変化を示した。

CSE で EMT 誘導した A549 細胞を、CpG ODN 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 48 時間刺激し培養上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を測定したところ、TGF- β 1 による EMT 誘導時とは異なり、これらのサイトカインの有意な産生増強は認めなかった。

以上、TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞において、LPS 刺激により SREC-1 を介してサイトカイン産生が亢進した。我々はこれまでに TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞において、CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生が亢進したこと報告しているが、TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞の CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生は NF- κ B 依存的であることが示された。一方、CSE による EMT 誘導においては、これらの現象は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Ryota, Nagai Hideaki, Matsui Hirotooshi, Yamane Akira, Kawashima Masahiro, Higa Katsuyuki, Nakamura Sumie, Ohshima Nobuharu, Tamura Astuhisa, Hebisawa Akira	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Ten Cases of Intestinal Tuberculosis which Were Initially Misdiagnosed as Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.2361-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Takahiro, Kawashima Masahiro, Masuda Kimihiko, Takeda Keita, Okuda Kenichi, Suzuki Junko, Ohshima Nobuharu, Horibe Mitsuko, Tamura Atsuhisa, Nagai Hideaki, Matsui Hirotooshi, Ohta Ken	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Exacerbation of chronic pulmonary aspergillosis was associated with a high rebleeding rate after bronchial artery embolization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resinv.2018.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Takahiro, Kawashima Masahiro, Matsui Hirotooshi, Takeda Keita, Sato Ryota, Ohshima Nobuharu, Nagai Hideaki, Kitani Masashi, Hebisawa Akira, Ohta Ken	4. 巻 96
2. 論文標題 Clinical Features and Prognosis of Nontuberculous Mycobacterial Pleuritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiration	6. 最初と最後の頁 507～513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000490548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa Sayaka, Suzukawa Maho, Ohshima Nobuharu, Tashimo Hiroyuki, Asari Isao, Matsui Hirotooshi, Kobayashi Nobuyuki, Shoji Shunsuke, Nagase Takahide, Ohta Ken	4. 巻 67
2. 論文標題 Expression of Siglec-8 is regulated by interleukin-5, and serum levels of soluble Siglec-8 may predict responsiveness of severe eosinophilic asthma to mepolizumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 S41～S44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2018.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato T, Kobayashi K, Suzukawa M, Saito M, Okuda K, Koyama K, Igarashi S, Arakawa S, Ohshima N, Matsui H, Nagase T, Ohta K	4. 巻 66S
2. 論文標題 Epithelial-mesenchymal transition of human lung adenocarcinoma A549 cells up-regulates cytokine production upon LPS stimulation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 56-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計5件

1. 著者名 井上 恵理, 大島 信治, 池田 みき, 渡辺 将人, 川島 正裕, 鈴木 純子, 益田 公彦, 山根 章, 松井 弘稔, 永井 英明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (一社)日本結核病学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 結核 (0022-9776)93巻11-12号 日本で増加傾向にある粟粒結核の予後因子の検討 (INVESTIGATION OF POTENTIAL PROGNOSTIC FACTORS FOR THE INCREASINGLY PREVALENT MILIARY TUBERCULOSIS IN JAPAN) (英語) (原著論文)	

1. 著者名 宮川 和子, 大島 信治, 田村 厚久, 松井 弘稔, 永井 英明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (一社)日本結核病学会	5. 総ページ数 5
3. 書名 結核 (0022-9776)93巻9号 頸部および縦隔リンパ節結核から頸部皮膚瘻と食道結核をきたしたHIV感染症合併結核の1例 (原著論文/症例報告)	

1. 著者名 渡邊 直昭, 大島 信治, 永井 英明, 加藤 貴史, 齋藤 美奈子, 五十嵐 彩夏, 鈴川 真穂, 川島 正裕, 浅里 功, 松井 弘稔	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (一社)日本呼吸器学会	5. 総ページ数 7
3. 書名 日本呼吸器学会誌 (2186-5876)7巻4号 成人における4価インフルエンザ不活化スプリットワクチンの免疫原性と安全性の検討 (原著論文)	

1. 著者名 大島 信治	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (一社)日本内科学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 日本内科学会雑誌 (0021-5384)107巻6号 【呼吸器コモンディーズ診療における多面的アプローチの重要性】 進化する気管支喘息治療 進化する気管支喘息治療(解説/特集)	

1. 著者名 大島信治、杉山温人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)朝日新聞出版	5. 総ページ数 2
3. 書名 週刊朝日 難治性の気管支喘息 内視鏡で気道を温め喘息発作を予防	

〔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
---------------------------	-----------------------	----