

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15913

研究課題名（和文）LC3を標的とした新たな喘息治療法の検討

研究課題名（英文）The study of new asthma treatment methods targeting LC3

研究代表者

南 幸範（Minami, Yoshinori）

旭川医科大学・大学病院・助教

研究者番号：10545445

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：購入した細胞（BEAS-2B）をヒトの気道環境を模した培養方法であるair-liquid interface（ALI）で培養し、検討を行った。まずはコントロール群とIL-13付加群の検討を行ったが、走査電子顕微鏡の結果は、IL-13付加群での変化が若干認められたが、その他の検討では有意な変化は認められなかった。そのため、喘息患者もしくは非喘息患者から得られた細胞を用いての検討を行ったが、こちらでも有意差は今のところ認められていない。培養条件の再検討を行うとともに、違うcell lineを用いての検討も並行して行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、まだ、ヒトの気道環境を模した気道上皮培養方法（ALI）を用いて、IL-13付加によって気管支喘息と同様の気道上皮の変化があることを確認するところまでにとどまっている。しかしながら、現在検討している条件が整うことで先の検討へ進むことができれば、Autophagyには細胞からの分泌を促進する機構が存在することも指摘されており、Autophagy関連タンパクであるLC3を制御することで気道上皮細胞からのムチン産生が抑制されることが予想される。LC3を制御することでムチン産生が抑制されれば、重症喘息を含む様々な難治性の呼吸器疾患の増悪の抑制または病態の改善に大いに役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We examined each matter by using the purchased cells (BEAS-2B) in an air-liquid interface (ALI), which is a culture method that imitates the human airway environment. First, we compared the control group with the IL-13-added group. The results of the scanning electron microscope showed some changes in the IL-13-added group, but no significant changes were observed in the other studies. Therefore, we conducted a study using cells obtained from asthmatic or non-asthmatic patients, but no significant difference has been observed here either. So, we are reexamining the culture conditions and also examining using different cell lines in parallel.

研究分野：呼吸器疾患

キーワード：気管支喘息 IL-13 LC3 air-liquid interface

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Autophagy (macroautophagy)は、飢餓状態によるストレスやサイトカインシグナルによって誘導され、飢餓時に自己消化で栄養源を確保するとともに通常の状態でも細胞成分の代謝に関わっている(①)。飢餓状態やシグナル存在下では細胞質に隔離膜という二重膜構造体が形成され細胞内構造物を巻き込みながら伸長し、その先端同士が融合し、autophagosome が形成される。Autophagosome に lysosome が融合し autolysosome となるとその内包物が分解され、得られたアミノ酸は細胞増殖に再利用させる(②)。Autophagosome の形成には 2 つのユビキチン様結合反応系が関与し、今回は LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3)に着目する。LC3 は ATG4 によって C 末端のアミノ酸が除去され LC3-I となる。LC3-I は隔離膜や autophagosome 膜の phosphatidylethanolamine (PE) と共有結合し LC3-II となる(③)。この共有結合は ATG4 によって切断され再び LC3-I に戻り、再び PE との結合系へと回る(④)。LC3-II は autophagosome の形成に重要な役割を果たすことが知られており(⑤)、また LC3-II の量は autophagosome の数と相関するため、autophagy の活性の指標として使われている。現在、様々な分野で autophagy の関与やその制御が検討、報告されているが、呼吸器分野においても急性肺障害、呼吸器感染症、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患などにおいて autophagy の関与が検討されてきた(⑥)。気管支喘息においても autophagy の関与を示唆する報告がなされてきている。

一方、気管支喘息においては気道上皮細胞からのムチン産生が気管支喘息の重症例や発作に大きく関係している(⑦)。Th2 サイトカインのひとつである IL-13 は気管支喘息で上昇しており、気道上皮細胞の杯細胞への分化を制御しており、喘息の重症度と相関する(⑧)。IL-13 を投与された気道上皮細胞は、mucin 5AC (MUC5AC)産生細胞の数が増え、培養上清中への MUC5AC 分泌量も増える(⑨)。

Autophagy 関連タンパクとムチン産生の関係は、autophagy gene の ATG5 や ATG14 を欠損させると MUC5AC の分泌が抑制されるという報告がなされている(⑩)が、LC3 との関連の報告はまだなく、LC3 がムチン産生の key タンパクとなるのか、また喘息治療のターゲットとなるのかは明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

Autophagy (macroautophagy)における autophagosome の形成に必要な ATG タンパク質である LC3 と気道上皮細胞のムチン産生の関係について検討する。この検討にはまずヒト気道上皮細胞の cell line を用い、その後、喘息患者もしくは非喘息患者から得た気道上皮細胞を用いる。気道上皮細胞のみを用いるため T 細胞などの免疫細胞との相互作用をみることはできないが、逆に LC3 とムチン産生の関係を気道上皮細胞のみに限定して検討することができる。また、Th2 サイトカインのひとつである IL-13 のシグナルの有無による比較を同時に行うため、Th2 型喘息の気道上皮細胞における LC3 とムチン産生の関係を検討することができる。本研究の特色は、cell line と喘息患者もしくは非喘息患者から提供される細胞の両方を用い、それらを実際のヒトの気道に近い状態(air-liquid interface:ALI)で培養し、LC3 に焦点を当て、autophagy と気道上皮の恒常性に重要な役割を果たすムチンの産生との関係を比較検討するという点である。Autophagy には細胞からの分泌を促進する機構が存在することも指摘されており、LC3 を制御することでムチン産生が抑制されることが予想される。LC3 を制御することでムチン産生が抑制されれば、重症喘息を含む様々な難治性の呼吸器疾患の増悪の抑制または病態の改善に大いに役立つと考えられる。

### 3. 研究の方法

気道上皮細胞のムチン産生への LC3 の関与を調べるために、autophagy inhibitor を用いる系と LC3 の RNA をノックダウンする系を使用する。まずヒト気道上皮細胞の cell line を用いて検討する。細胞を air-liquid interface (ALI)で培養し、ALI 開始と同時に IL-13 投与群と非投与群に分け培養を継続する。Autophagy inhibitor として 3-methyladenine (3-MA) を用い、LC3 の RNA をノックダウンする方法として、Dicer-substrate short interfering RNA (DsiRNA)を用いる。その後、免疫染色し共焦点顕微鏡で MUC5AC 陽性細胞数、LC3 陽性細胞数を比較し、走査電子顕微鏡で杯細胞内のムチン顆粒を比較する。qPCR で MUC5AC と LC3 の気道上皮細胞内 mRNA 発現量を比較し、Western blotting で LC3 の気道上皮細胞内タンパク発現量を、ELISA で MUC5AC の気道上皮細胞外タンパク分泌量を比較する。その後、喘息患者もしくは非喘息患者から得た気道上皮細胞を用いて同様の実験を行う。

まず、ヒト気道上皮細胞の cell line である BEAS-2B を用いて検討する。

気道上皮細胞のムチン産生への LC3 の関与を調べるために、autophagy inhibitor を用いる系と LC3 の RNA をノックダウンする系を使用する。

<細胞培養方法>

・ Autophagy inhibitor の系

タイプ I コラーゲンコーティングをしたディッシュに BEAS-2B をまき、70~80%コンフルエンス

一になるまで培養する。その後、細胞をトリプシン処理しコラーゲンコーティングした 12well の transwell insert の膜上にまく (4x10<sup>4</sup> cells/insert)。100%コンフルエンスになったら上側のコンポーネントの方の培地を取り除き ALI を開始する。ALI 開始と同時に IL-13 投与群と非投与群に分け、2~3 日ごとに下側のコンポーネントの培地を交換しつつ、その都度 IL-13 投与群の下側のコンポーネントに IL-13 (10 ng/ml) を投与する。計 10 日間培養を継続する。Autophagy inhibitor として 3-MA を 5mM の濃度で投与し、投与 6 時間後に下記の各検討を行う。

・LC3 の RNA をノックダウンする系

LC3 の RNA をノックダウンする系には DsiRNA を用いる。DsiRNA の系はまず 12well transwell plate 1 枚あたり 2x10<sup>6</sup> cells/3ml の細胞液を準備し、DsiRNA の最終濃度が 50nM となるように Opti-MEM と Lipofectamine RNAiMAX で調整し、調整した細胞液を 12well の transwell insert の膜上にまく。24~48 時間後 100%コンフルエンスになったことを確認し ALI へ移行し、同時に IL-13 投与群と非投与群に分けて培養を 10 日間継続する。その後、autophagy inhibitor の系と同様に下記の各検討を行う。

<検討 1：免疫染色し共焦点顕微鏡で MUC5AC 陽性細胞数、LC3 陽性細胞数を比較>

上記の方法で培養された細胞が存在する transwell insert を取り外したものをを用いる。まず細胞がはがれないように慎重に PBS で膜を洗浄する。その後、2% paraformaldehyde で 20 分間固定する。再度 PBS で洗浄し、0.1% Triton X-100 で 15 分間 permeabilization を行う。5% serum+PBS+0.5% BSA で blocking を 45 分間行い、PBS+0.5% BSA で洗浄する。一次抗体として MUC5AC 抗体もしくは LC3B 抗体を適切な濃度で滴下し、4℃で 24 時間インキュベートする。24 時間後 PBS+0.5% BSA で洗浄し、適切な二次抗体で室温で 45 分間インキュベートする。この際に細胞数をカウントしやすくするため F-actin を染色する phalloidin も同時に用いる。45 分間インキュベート後 PBS+0.5% BSA で洗浄し、さらに PBS で洗浄する。DAPI を滴下し室温で 1 分間インキュベート後 PBS で洗浄し、封入剤で封入する。共焦点顕微鏡を用いて autophagy inhibitor を用いる系と DsiRNA の系それぞれで、IL-13 投与群と非投与群の MUC5AC 陽性細胞数、LC3 陽性細胞数を比較する。

<検討 2：走査電子顕微鏡で杯細胞内のムチン顆粒を比較>

本学の解剖学講座顕微解剖学分野の協力を得て、autophagy inhibitor を用いる系と DsiRNA の系それぞれで、IL-13 投与群と非投与群のムチン顆粒を比較する。

<検討 3：Quantitative PCR で MUC5AC と LC3 の気道上皮細胞内 mRNA 発現量を比較>

RNeasy Spin column kit を用いて気道上皮細胞の RNA を抽出し、cDNA Reverse Transcription kit で cDNA を作成する。Pre-designed primers and probe sets (Assays on Demand; AOD) を用い、Lightcycler 480 で増幅させ、autophagy inhibitor を用いる系と DsiRNA の系それぞれで、IL-13 投与群と非投与群の MUC5AC と LC3 の気道上皮細胞内 mRNA 発現量を比較する。

<検討 4：Western blotting で LC3 の気道上皮細胞内タンパク発現量を比較>

Lysis buffer を用いてタンパクを抽出後、BCA assay でタンパク濃度を計測する。タンパクは 1 レーン 25~30 μg となるように NuPAGE LDS sample buffer、NuPAGE Reducing agent、Mili Q を用いて調整する。4-12% Bis-Tris gel を用いて泳動し、その後 gel を PVDF 膜に転写する。膜を TBST(with 5% milk+1% BSA) で blocking した後、LC3B 抗体(1:1000)で 4℃、24 時間インキュベートし、TBS で洗浄後、適切な HRP 標識二次抗体で室温で 2 時間インキュベートする。TBS で洗浄後、化学発光法を用いてバンドを検出する。ローディングコントロールとして β-actin もしくは GAPDH を用いる。Image J を用いて densitometry を行い、autophagy inhibitor を用いる系と DsiRNA の系それぞれで、IL-13 投与群と非投与群の LC3 の気道上皮細胞内タンパク発現量を比較する。

<検討 5：ELISA で MUC5AC の気道上皮細胞外タンパク分泌量を比較>

10 日間培養後 37℃の PBS で計 4 回 5 分ずつ insert の膜上の細胞表面を洗浄する。その後 100 μl の 37℃の PBS を細胞表面に滴下し、37℃で 1 時間インキュベートする。それを回収し MUC5AC ELISA kit を用いて、autophagy inhibitor を用いる系と DsiRNA の系それぞれで、IL-13 投与群と非投与群の MUC5AC の気道上皮細胞外タンパク分泌量を比較する。

以上の検討の後、説明と同意を得た喘息患者もしくは非喘息患者から得られた細胞を用いて上記の cell line での検討と同様の検討を行う。細胞培養の過程で計画通りに進まないときは ALI ではなく、通常の培養方法を用い検討し、A549、PC9 など他の cell line を用いる。3-MA で autophagy が阻害されない場合は LY294002 や wortmannin などの他の inhibitor を用いて検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 購入した細胞 (BEAS-2B) が正常に増殖するかを推奨培地である BEBM/BEGM 培地で確認した。

その後、今後の実験に足りるように BEAS-2B を増やし、CELLBANKER 2 (無血清タイプ細胞保存液、ZENOAQ) を用いて-80℃で保存した。また、培養条件の確認のため、一部の細胞を推奨培地である BEBM/BEGM 培地と、文献上は同細胞を培養可能とされている 10%ウシ胎児血清 (FBS) を付加した RPMI-1640 培地 (R10 培地)、RPMI-1640 培地 (血清付加なし) で培養し、増殖速度を比較した。結果は、R10 培地と RPMI-1640 培地 (血清付加なし) で培養した細胞は BEBM/BEGM 培地で培養した細胞と比較し、増殖速度がかなり遅いことが判明した。また、R10 培地で培養した細胞の一部に細胞質が他と比較し多い細胞群が見られるようになり、FBS による意図せぬ分化が起こった可能性が示唆された。このため、以後の実験は BEBM/BEGM 培地で行うこととした。

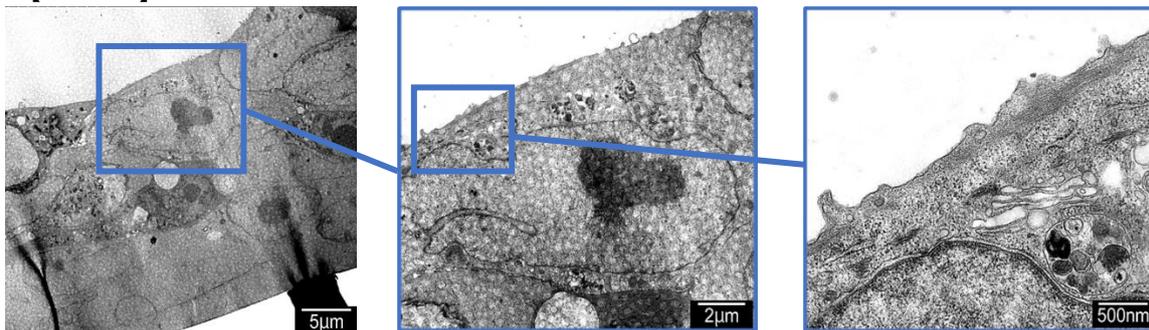
細胞を air-liquid interface (ALI) で培養し、その後、走査電子顕微鏡で杯細胞内のムチン顆粒を各群で比較する部分は本学の解剖学講座顕微解剖学分野の協力のもとで行うため、使用する transwell insert が走査電子顕微鏡の前処置に耐えられるか確認した。十分前処置に耐えられると確認できたため、まずはコントロール群と IL-13 付加群を ALI で 7 日間と当初の計画の 10 日間で培養した。顕微鏡で確認したが、7 日間の培養も 10 日間の培養も細胞の分化が思わしくないと判断した。

このため、ALI での培養期間を 14 日間に変更し細胞の分化を確認した。培地などの他の条件に関しては以前の検討で得られた結果をもとに調整した。

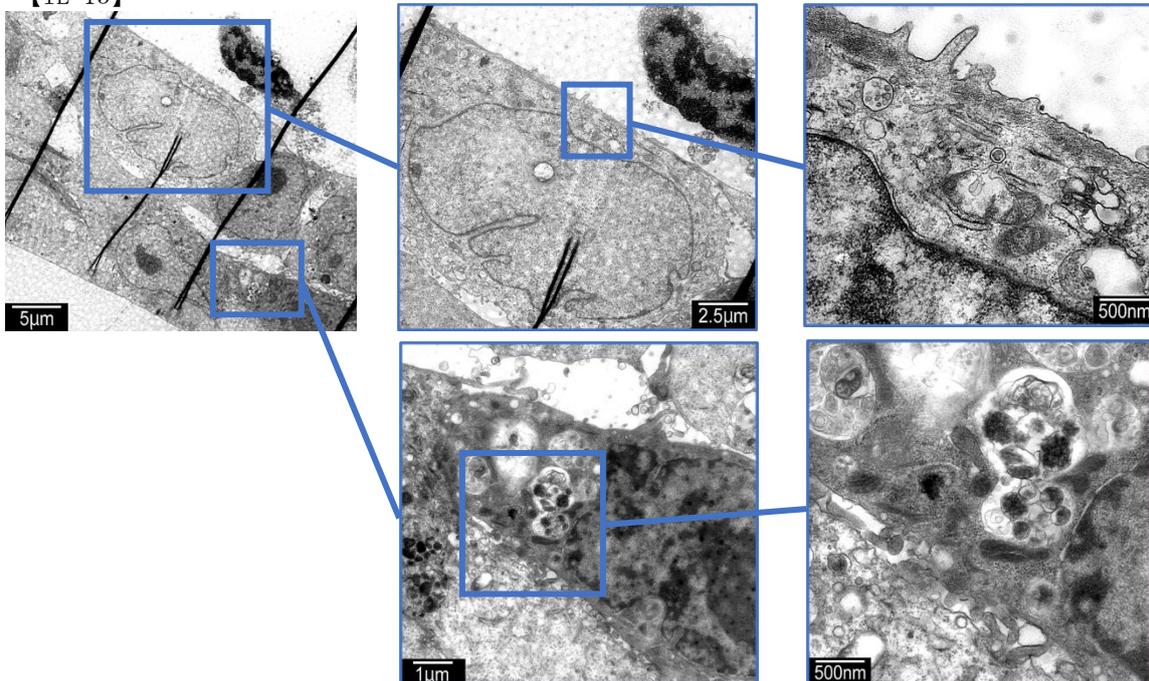
IL-13 付加群と非付加群で検討し、それぞれの群で Quantitative PCR による mRNA 発現、Western blotting によるタンパク発現、走査電子顕微鏡による構造変化を確認した。走査電子顕微鏡に関しては、当初、本学の解剖学講座顕微解剖学分野の協力をお願いしていたが、同講座の事情もあり、本学の皮膚科学講座に依頼した。

Quantitative PCR の結果は、LC3 と線毛細胞の指標として測定した Tubulin は IL-13 付加群で若干増加がみられたが、MUC5AC はどちらの群でも検出されなかった。Western blotting の結果は、LC3 と Tubulin のタンパク量が IL-13 付加群で若干増加していた。Quantitative PCR で MUC5AC が検出されなかったため、ELISA での MUC5AC の気道上皮細胞外タンパク分泌量の測定は行わなかった。走査電子顕微鏡の結果は、どちらの群でも短い線毛を有した細胞がみられ、IL-13 付加群では細胞の重層化がみられ IL-13 非付加群よりもはっきりとした胞体を有した細胞がみられた。

#### 【Control】



#### 【IL-13】



以上の結果から、14 日間の培養条件でも細胞分化が思わしくないため、説明と同意を得た喘息患者もしくは非喘息患者から得られた細胞を用いての検討の方に進むことにした。同意を得ることができた非喘息患者が現れたため、その患者の気管支肺胞洗浄液から得られた気道上皮細胞を用いて、検討を行った。7 日間の培養期間でまずは検討した。IL-13 付加群と非付加群で検討し、それぞれの群で Quantitative PCR による mRNA 発現、Western blotting によるタンパク発現を確認した。Quantitative PCR の結果は、LC3 と線毛細胞の指標として測定した Tubulin は IL-13 付加群で若干増加がみられたが、MUC5AC はどちらの群でも検出されなかった。Western blotting の結果は、LC3 と Tubulin のタンパク量が IL-13 付加群で若干増加していた。Quantitative PCR で MUC5AC が検出されなかったため、ELISA での MUC5AC の気道上皮細胞外タンパク分泌量の測定は行わなかった。以上の結果から、患者から得られた気道上皮細胞でも 7 日間の培養条件では細胞分化が思わしくなかった。そのため 14 日間に延長して同検討を行ったが、7 日間の培養条件の結果と大きな差はなかった。そこで、培養条件を文献などからも再検討したところ、使用していた培地の hEGF 量が既存の文献と比較し少ないことが判明した。そのため、現在それを既存の文献でも使用されている量に増量して再検討を行っている。また、気道上皮細胞の分化に影響を与えることが懸念される Hydrocortisone の量についても濃度を振り分けた条件を設定して検討を行っているところである。また、患者から得られる気道上皮細胞は、SARS-CoV-2 感染が拡大している状況で患者のリクルートが不安定なこともあるため、A549 という別の cell line を用いた検討も並行して行っている。

#### <引用文献>

- ① J.Harris, Cytokine. 2011 Nov;56(2):140-4
- ② N.Mizushima, Cell Struct Funct. 2002 Dec;27(6):421-9
- ③ T.Kirisako, J Cell Biol. 2000 Oct 16;151(2):263-76
- ④ T.Kirisako, J Cell Biol. 1999 Oct 18;147(2):435-46
- ⑤ Y.Kabeya, EMBO J. 2000 Nov 1;19(21):5720-8
- ⑥ A. A. Zeki, Allergy. 2016 Jan;71(1):5-14
- ⑦ S.Kanoh, Clin Exp Allergy. 2011 Dec;41(12):1747-56
- ⑧ DA.Kuperman, Nat Med. 2002 Aug;8(8):885-9
- ⑨ YG.Alevy, J Clin Invest. 2012 Dec;122(12):4555-68
- ⑩ J.D.Dickinson, Autophagy. 2016;12(2):397-409

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------