

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08619

研究課題名(和文) エストロゲン欠乏によりヒト気道上皮細胞において発現変化をきたす遺伝子の網羅探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of changing gene expression of human bronchial epithelial cells by estrogen deficiency

研究代表者

宮林 亜希子 (MIYABAYASHI, AKIKO)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部 病理科・研究員

研究者番号：40834726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：非結核抗酸菌感染症、特に肺Mycobacterium avium complex (MAC) 症が近年増加している。痩身の中老年の女性に多い結節・気管支拡張型は、閉経後に発症する 경우가多く、女性ホルモン欠乏との関連が考えられる。本研究は、ヒト気道上皮細胞において、女性ホルモンにより発現に影響を受ける遺伝子を同定するため、女性由来の不活化ヒト気道上皮細胞株HBE1細胞を用い、次世代シーケンサーによる網羅的mRNA発現解析を実施した。その結果、エストロゲンの有無により有意な発現差の見られる遺伝子が52個確認された。特にNEAT1発現量は変動が大きく、エストロゲン刺激応答状態の指標となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

弱毒な環境菌のMACの持続感染が成立するためには、環境因子、菌側の因子、宿主側の因子の複雑な関与があると考えられる。肺に器質的障害をもたない痩身の中老年の女性が肺MAC症を発症し、長期にわたり慢性気道炎症状態が続く病態には、もともと何らかのMAC感受性因子があるところに、閉経後のエストロゲンの欠乏による気道の抵抗性の低下あるいは炎症状態の増悪が関わっている可能性がある。気道上皮細胞において女性ホルモンの有無により発現差が見られる遺伝子の検討の成果は、将来的に肺MAC症の病態、エストロゲンの関与、その作用点等に関わる遺伝子・パスウェイの解明につながる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary Mycobacterium avium complex (MAC) disease caused by major nontuberculous mycobacterial pathogens, has been increasing in recent years. The nodular bronchiectatic form of the disease often develops after menopause in thin elderly women, suggesting that the deficiency of female hormones may be related to its pathogenesis. In this study, using a next generation sequencer, we performed mRNA-sequencing analysis of HBE1 cells, an immortalized human airway epithelial cell line of female origin, and compared the gene expression patterns in the presence and absence of estrogen. As a result, 52 differentially expressed genes were identified. Of these, NEAT1 was a representative gene, and can serve as an indicator for monitoring the estrogen-stimulated response.

研究分野：結核菌ゲノム

キーワード：エストロゲン 気道上皮 肺MAC症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)感染により起きる NTM 症、特に肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC)症が近年増加している。弱毒な環境菌の MAC の持続感染が成立するためには、環境因子、菌側の因子、宿主側の因子の複雑な関与があると考えられており、特に肺に器質的障害をもたない痩身の中老年の女性が肺 MAC 症(気管支拡張型)を発症し、長期にわたり慢性気道炎症状態が続く病態には、もともと何らかの MAC 感受性因子があるところに、閉経後のエストロゲン低下あるいは欠乏による気道の抵抗性の低下や炎症状態の増悪が関わっている可能性がある。しかしながら、女性ホルモンの気道上皮細胞における機能、役割にはまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト気道上皮細胞において女性ホルモンの有無により発現差が見られる遺伝子の中に、肺 MAC 症の病態に関わる遺伝子が存在する可能性を考え、女性由来の HPV-18 E6/E7 による不死化ヒト気道上皮細胞株 HBE1 を用いて、エストロゲンの有無による遺伝子発現の違いを網羅的 mRNA 発現解析により明らかにすることを目的とする。本研究により見出された遺伝子、パスウェイは、中老年女性の肺 MAC 症の病態に関わる遺伝子の候補となると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、女性由来のヒト気道上皮細胞株 HBE1 細胞を用いた。HBE1 細胞は、60 歳女性の手術切除肺組織より HPV-18 E6/E7 による不死化で樹立された細胞株で(Yankaskas JR, *et al.* Am J Physiol 264:C1219-30, 1993. 浜松医科大学藤澤朋幸先生より供与)、IL-1 , IL-17A 刺激で *MUC5AC*, *MUC5B* の mRNA 発現が誘導されることが報告されている(Fujisawa T, *et al.* J Immunol. 183:6236-43, 2009. Fujisawa T, *et al.* Am J Respir Cell Mol Biol 45:246-52,2011)。

(1) エストロゲン刺激で誘導されるとこれまでに報告された遺伝子の mRNA 発現量解析
HBE1 細胞のエストロゲン(17 β -Estradiol)刺激応答状態をモニターするために、同刺激で発現誘導されるとされる mRNA の発現を qRT-PCR により検討した。エストロゲン濃度は 10nM とした。候補 mRNA は、ヒト乳がん細胞株(MCF-7)において既に報告されているものから 12 個(*NRF1*・*FOXA1*・*CTSD*・*UGT1A1*・*ABCC3*・*TFF1*・*AREG*・*MYC*・*IGFBP4*・*NOV*・*DLEU2*・*IRS1*)、3 個のエストロゲン受容体(*ESR1*・*ESR2*・*GPER*)を選定し、エストロゲン添加後、6, 24, 48, 72 時間後の細胞から RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて RNA を抽出して mRNA 発現を確認した。なお、培地中のホルモン物質の影響を取り除くため、エストロゲン添加 24 時間前にウシ脳下垂体抽出物を除いた培地に置き換えた。また、陽性コントロールとして MCF-7 細胞用いて、エストロゲン添加後 24 時間後の mRNA 発現を検討した。なお、エストロゲン添加 24 時間前にチャコール処理した FBS を使用した培地に置き換えた。

(2) ウシ脳下垂体抽出物(BPE)を除くことによる HBE1 細胞の影響の確認
一般的に細胞培養においてホルモン・ステロイドの影響を検討する際には、チャコール処理したホルモン含量が少ない血清を使用する。HBE1 細胞培養では、血清ではなく BPE を使用しているが、BPE にも成長因子を含め、様々なホルモンが含まれている。BPE の細胞の成長に対する影響を検討するため、BPE の添加の有無で、cell counting kit 使用(細胞内のエステラーゼ活性を吸光度にて測定)して、細胞の増殖試験を実施した。

(3) エストロゲン刺激で誘導される遺伝子の網羅的探索
BPE 添加の有無、エストロゲン添加の有無の条件下で、HBE1 細胞における遺伝子発現の違いを mRNA-seq を用いて検討した。エストロゲン添加の有無の条件下で 24 時間培養後、細胞から RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて全 RNA を抽出した(n=3)。抽出した全 RNA 1000 ng を Illumina® Stranded mRNA Prep, Ligation(Illumina)を用いて Library を調整し、NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Cycles)(Illumina)を使用して NetSeq500 sequencer(Illumina)にてシーケンシングを行った。解析は、Trim Galore でトリム、HISAT2 で参照ゲノムにマッピングし、Featurecounts、edgeR で DEG 解析を行った。

(4) エストロゲン有無の条件下での MAC の刺激試験
BPE 存在下で培養した HBE1 細胞の MAC の刺激に対する反応をエストロゲンの有無の条件で検討した。細胞培養後、エストロゲン有無で 24 時間、その後 MAC 刺激の有無で 24 時間培養した細胞を回収し、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて全 RNA を抽出した(n=3)。qRT-PCR を用いてエストロゲンの刺激に対する反応を *NEAT1* の発現にて、MAC の刺激に対する反応を *IL-6*, *IL-8* の発現にて評価した。

4. 研究成果

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
研究分担者	瀬戸 真太郎 (SETO SHINTARO) (50383203)	公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部 免疫科・科長 (82801)	
研究分担者	慶長 直人 (NAOTO KEICHO) (80332386)	公益財団法人結核予防会 結核研究所・副所長・副所長 (82801)	
研究分担者	土方 美奈子 (MINAKO HIJIKATA) (90332387)	公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部・部長 (82801)	

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