

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790973
 研究課題名（和文） 気道粘膜における TIM-1 の機能および気管支喘息への関与についての解析
 研究課題名（英文） Analysis of the effects of TIM-1 on respiratory epithelial cells on bronchial asthma
 研究代表者
 小林 法元（KOBAYASHI NORIMOTO）
 信州大学・医学部・助教
 研究者番号：00362129

研究成果の概要（和文）：

気道上皮 TIM-1 の機能を解析するため、ヒト肺胞 II 型上皮セルライン A549 を用いた。A549 は、細胞表面に TIM-1 を強発現しているが、アポトーシス細胞の貪食も確認できなかった。また、A549 の TIM-1 はクローンにより異なる多数の変異を認めることが明らかとなった。この変異が、TIM-1 とアポトーシス細胞との結合に影響した可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

To access the function of TIM-1 on respiratory epithelial cells, the human type II alveolar epithelium cell line A549 was used. Although A549 expressed high level of TIM-1 on the cell surface, it was not able to phagocyte apoptotic cells. Moreover, A549 has different TIM-1 mutations among each cell clone. These mutations probably affect the binding between TIM-1 and apoptotic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・小児科学

キーワード：T cell Immunoglobulin mucin domain protein (TIM)-1, 気管支喘息、気道上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

T-cell immunoglobulin mucin domain protein (TIM)-1 は気道過敏性に関与する分子として 2003 年に報告された IgV ドメインとムチンドメインからなる糖蛋白である。ヒ

トにおいて、いくつかの塩基多型が気管支喘息などのアレルギーの発症に関与している可能性が示唆されている。その機能として、マウスモデルでは、TIM-1 は Th2 細胞、TIM-3 は Th1 細胞、TIM-4 は抗原提示細胞に発現し、

Th1 および Th2 を制御していることが報告されている。しかし、ヒトにおける TIM-1、TIM-3 の T 細胞への発現は証明されておらず、我々の検討でも末梢血 T 細胞を *in vitro* で Th1、Th2 に分化させたが、TIM-3、TIM-1 の発現は確認できなかった。ヒトにおける TIM のアレルギー発症機序への作用は不明な点が多い。TIM family は非特異的にさまざまな分子に結合するが、われわれは、TIM-1 および TIM-4 の IgV ドメインがアポトーシス細胞のホスファチジルセリン (PS) に結合することを発見し、TIM がアポトーシス細胞のクリアランスを促進することにより、自己免疫反応や炎症を抑制している可能性を報告した。TIM-1 は傷害を受けた尿細管上皮細胞上に発現し、また一部は尿中に分泌され、尿細管上皮の TIM-1 は、上皮細胞によるアポトーシス細胞の貪食に関与していることが確認されているが、気道上皮の TIM-1 の機能については検討されていない。

また、近年、気道上皮細胞は、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、Interleukin-33 (IL33) などサイトカインおよびケモカイン産生を介してアレルギーの病態に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

2. 研究の目的

TIM-1 は、アポトーシス細胞のクリアランスに関与していることから、細胞傷害による炎症の抑制に関与していると考えている。われわれは、免疫組織染色により気道上皮細胞にも発現していることを報告している。本研究では、気道上皮細胞セルラインに発現する TIM-1 の機能を解析することにより、TIM-1 の気管支喘息における気道炎症への関与を明らかにする。

研究の方法

(1) 上皮細胞における TIM-1 の発現の解析

①細胞表面への TIM-1 の発現。II 型肺胞上皮由来のセルライン A549 と、気管上皮細胞由来 BEAS-2B、腎癌由来細胞 769P、神経が細胞由来 NE-1 を腎癌由来 769P について検討した。抗ヒト TIM-1 モノクロナル抗体 MAB1790 を biotin 化し、avidin-PE を用いてフローサイトメトリーで検出した。

② 抗ヒト TIM-1 モノクロナル抗体 (MAB1790)

、ポリクロナル抗体 (AF1790) を用いウェスタンブロットティングにより、TIM-1 蛋白の発現を確認した。

③長時間培養また死細胞による TIM-1 の発現への作用を検討するため、気道上皮細胞 BEAS-2B を、死細胞と共培養し TIM-1 の細胞表面への発現をフローサイトメトリーにより検討した。

(2) 肺胞上皮細胞セルライン A549 に発現する TIM-1 のアポトーシス細胞に対する作用
ヒト単球セルライン U937 を $50 \cdot M$ の etoposide によりアポトーシスを誘導し、A549 と 2 時間共培養後、0.05% trypsin と 0.02% EDTA を含む PBS で洗浄した後に、光学顕微鏡でアポトーシス細胞の A549 細胞表面への付着の傾向を確認した。また、A549 を剥離し、フローサイトメトリーにより A549 のアポトーシス細胞の貪食について定量した。

(3) 肺胞上皮細胞セルライン A549 の TIM-1 mRNA の全シーケンス解析
QIAamp RNA blood Mini kit を用いて A549 の mRNA を抽出し、PCR で増幅した。Primer は、sense CAGCTTTCCTGTCCTTTGGA、antisense CCCAGTATCACTGACATGTTGGA を用いた。

(4) ヒト気道上皮細胞における TIM-1 発現解析
健常および気道感染症ボランティアの痰より RT-PCR で mRNA を抽出し、TIM-1 の mRNA の発現を検討した。肺胞上皮細胞の確認のため、II 型肺胞上皮細胞より産生する SFTPC mRNA も確認した。SFTPC の primer は、sense ATGGATGTGGCAGCAAAGAGGTCCTG、antisense CCGGAGGCGTCCTAGATGTAG を用いた。

(5) Real-time PCR によるアレルギーに関する上皮細胞由来サイトカイン、自然免疫に関する Nod ファミリーの発現解析システムの構築

上皮細胞由来サイトカイン (TSLP、IL33) および Nod ファミリー (TLR4、TLR5、CARD12、CARD15、NOD2 mRNA) の発現を realtime PCR を用いて定量した。Realtime PCR のプライマーは Applied Biosystems の Taqman プローブを使用し、StepOnePlus リアルタイム PCR システムで解析する。

4. 研究の成果

(1) 上皮細胞における TIM-1 の発現の解析。

①フローサイトメトリーにより、TIM-1 は腎

癌由来のセルライン769P およびII型肺胞上皮細胞由来のセルラインA549において発現を認めたが、気管上皮細胞由来のBEAS-2Bでの発現はほとんど認めなかった。また、神経芽細胞腫由来のNE-1では発現を認めなかった。(図1)

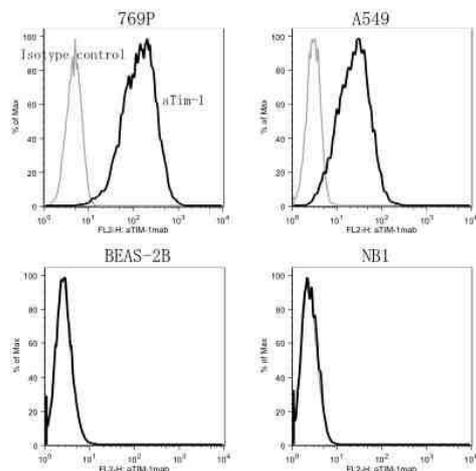


図1

②769Pでは、80~90kDaに強い発現を認めた。A549でもバンドが検出されたが769Pと比較し発現は弱かった。ヒト胎盤由来セルラインJEGでもA549とほぼ同等の発現を認めた。また、AF1750の方が特異的にTIM-1を検出できた。(図2)

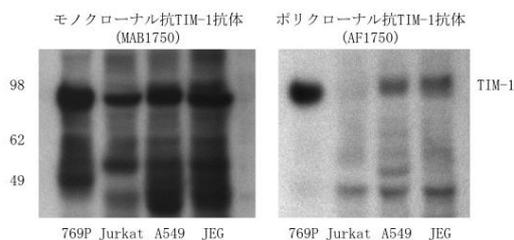


図2

③TIM-1はPSを認識する。PSは細胞膜の内側に分布しストレス環境で外側に表出される。気道上皮細胞セルラインBEAS-2Bを、長時間培養(死細胞を認めるまで)またアポトーシス細胞と共培養しTIM-1の発現を検討したが発現を認めなかった。

(2)肺胞上皮細胞セルラインA549に発現するTIM-1のアポトーシス細胞に対する作用
BEAS-2BはTIM-1の発現を認めなかったため、A549用いて、アポトーシス細胞の細胞質内への取り込みを検討した。A549では、光学顕微鏡でアポトーシス細胞の細胞表面への付

着は認められたが、フローサイトメトリーでは、有意な取り込みを認めなかった。腎癌由来の769Pでは高度に取り込みを認め、この取り込みは、抗TIM-1抗体により阻害された。

(3)肺胞上皮細胞セルラインA549のTIM-1mRNAの全シーケンス解析

肺胞上皮細胞セルラインA549は蛋白レベルでの発現と細胞表面での発現が認められたが、アポトーシス細胞を用いた解析では機能を明らかにできなかったため、A549のTIM-1についてmRNAのシーケンスを行った。報告されているTIM-1は3つのvariantが存在するが、A549のTIM-1mRNAは、多数の変異を認め、シーケンスの波形が重なっていた。また3回の検討で異なる結果を認めたことから複数のクローンが存在することが推測された。

(4)ヒト気道上皮細胞におけるTIM-1発現解析

検討した8例のすべてで、II型肺胞上皮細胞より合成、分泌されるサーファクタントプロテインCをコードするSFTPC mRNAの発現が認められII型肺胞上皮細胞が存在することを確認したが、TIM-1 mRNAの発現はA549以外に認めなかった(図3)。

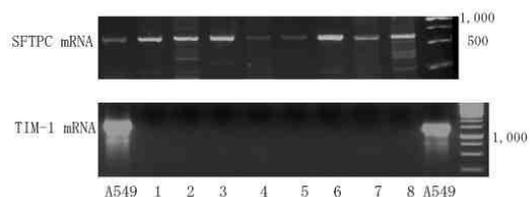


図3

(5) Real-time PCRによるアレルギーに關与する上皮細胞由来サイトカイン、自然免疫に關与するNodファミリーの発現解析システム TSLP, IL33, TLR4, TLR5, CARD12, CARD15, NOD2についてGAPDHをコントロールとしたmRNA発現定量システムを作成した。

本研究では、TIM-1のII型肺胞上皮細胞由来A549細胞膜上への発現を認めたものの、肺胞上皮細胞におけるアポトーシスの処理への関与を証明することはできなかった。TIM-1についてRNAシーケンスを確認した結果、複数の変異を認めており、A549細胞を用いる実験系の限界と考えられた。今回の研究期間では行えなかったが、現在、ヒト末梢血単核球よりTIM-1mRNAを抽出し、A549および

BEAS-2B に正常 Tim-1 を強発現させる実験系を構築中である。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 法元 (KOBAYASHI NORIMOTO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：00362129