

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：82690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461168

研究課題名(和文) アレルギー性炎症に及ぼすメタボリック症候群の影響の解析と治療応用への試み

研究課題名(英文) Analysis of metabolic syndrome on allergic diseases.

## 研究代表者

鈴川 真穂 (Suzukawa, Maho)

独立行政法人国立病院機構東京病院(臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：20453699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、メタボリック症候群と喘息との関連のメカニズムを解明することを目的とした。まずヒト気道上皮細胞株、BEAS-2Bがレプチンのレセプター、Ob-Rを遺伝子およびタンパクレベルで発現することを確認した。さらにBEAS-2Bをレプチンで刺激すると、接着因子の発現およびサイトカイン産生が増強し、細胞死が抑制された。また、レプチンは正常ヒト気道上皮細胞の遊走能を増強した。以上の結果から、肥満による喘息増悪の機序として、レプチンによる気道上皮細胞に対する活性作用が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the effects of leptin on human airway epithelial cells by using human primary airway epithelial cells and a human airway epithelial cell line, BEAS-2B. Airway epithelial cells expressed leptin receptor (Ob-R). Leptin enhanced ICAM-1 expression and production of CCL11, G-CSF, VEGF, and IL-6 by BEAS-2B cells. Leptin induced migration of primary airway epithelial cells toward leptin, suppressed BEAS-2B apoptosis, and enhanced proliferation of primary airway epithelial cells. In summary, leptin was able to directly activate human airway epithelial cells.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：喘息 肥満 レプチン 気道上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦のみならず世界において気管支喘息を始めとしたアレルギー疾患は増加の一途にあり、その病態解明は大きな課題である。肥満は喘息の重要な増悪因子として指摘されているが、最新の喘息ガイドライン(JGL 2009)でも喘息の発症・増悪の危険因子として肥満が記載されている。しかしながら現在までに肥満やメタボリック症候群とアレルギー疾患との関連メカニズムを検討した研究は極めて少ない。

肥満は、呼吸生理面への影響のみならず、様々な液性因子(アディポカイン)を介してアレルギー疾患に影響することが近年明らかになってきた。申請者は、アディポカインであるレプチンがヒト好塩基球を強力に活性化することを最近報告した(J Immunol 186:5254,2011)。そこで肥満や糖尿病を含むメタボリック症候群と喘息との関連のメカニズムを、気道構成細胞に対する影響を含めさらに包括的に検討し明らかにするため、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症の場でもある気道および肺の構造細胞に対するアディポカイン、レプチンの作用と、その機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト培養気道上皮細胞株、BEAS-2B、ヒト気管支上皮細胞(NHBE)を用いた。

帝京大学倫理委員会による承認を受けた後、患者のインフォームドコンセントを得た上で、帝京大学呼吸器外科において腫瘍等により肺葉切除手術を受けた患者切除肺から、NHBEを分離し、LHC-9メディウムで培養した。継代数1~3の細胞を用いて、実験を行った。

(2) 細胞表面分子発現

細胞表面に発現しているレプチンレセプター、Ob-R、および接着分子、ICAM-1の発現は、Carboxyfluorescein (CFS)-conjugated mouse antileptin receptor mAb (IgG2b, clone 52263)、FITC-conjugated mouse antihuman ICAM-1 mAb (IgG1, clone 84H10)を用いて染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

(3) ELISA

細胞を24 well culture plateで72時間レプチン刺激し、プロテアーゼインヒビターを加えたRIPAバッファーでcell lysateを作成した。そのcell lysateのICAM-1を、human ICAM-1 ELISA kit (Abcam)を用いて測定した。

(4) ウェスタンブロット

細胞をレプチンと100 nMカリクリンで刺激した後、プロテアーゼインヒビターを加えたRIPAバッファーでcell lysateを作成した。電気泳動、転写を行った後、antihuman RelA/NFκB p65, antihuman phospho-RelA/NFκB p65, antihuman GAPDH antibodiesで染色を行った。

(5) Real-time PCR

Taqmanプローブと、プライマーを用いて、7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)でReal-time PCRを行った。

(6) LUMINEXアッセイ

細胞培養上清中の27種類のサイトカイン値は、Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex (Bio-Rad Laboratories) およびLUMINEX 200 (Luminex)を用いて、測定した。

(7) 細胞遊走

Boyden chamber法を用いて、細胞遊走能を解析した。

(8) 細胞アポトーシス

MEBCYTO apoptosis kit (MBL)を用いて細胞を染色後、フローサイトメトリーでアポトーシスを解析した。

(9) 細胞増殖

Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (Roche)を用いて染色後、iMark (Bio-Rad Laboratories)で細胞増殖能を解析した。

(10) 統計

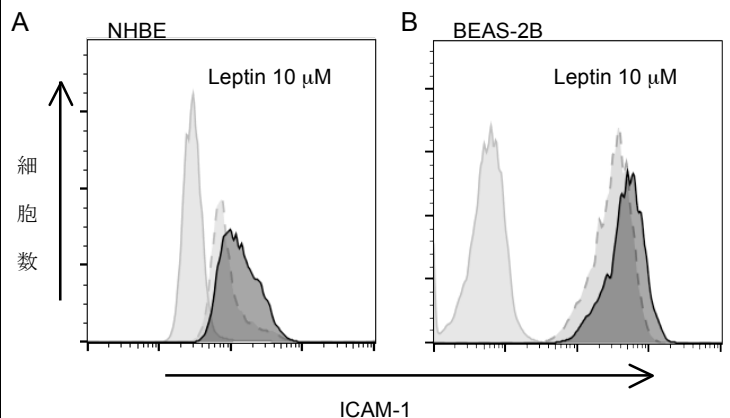
群間の差は one-way ANOVA を用いて解析した。two-way ANOVA を用いて interaction test を行い、相乗/相加作用を解析した。

4. 研究成果

(1) レプチンによる気道上皮細胞の ICAM-1 発現増強

レプチンは、NHBE および BEAS-2B の細胞表面 ICAM-1 発現レベルを増強した(図1)。

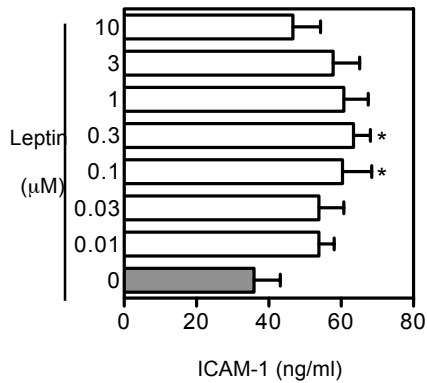
図1. 気道上皮細胞表面の ICAM-1 発現。A. NHBE, B. BEAS-2B を、レプチン 0 (点線)、10 (黒実線) mM で 24 時間刺激後、細胞表面の ICAM-1 発現をフローサイトメトリーで解析した。灰実線は、コントロール抗体で染色した細胞を示す。



その作用は濃度依存的に増強し、10 mM で最大となった。また、cell lysate を用いて ELISA で測定した ICAM-1 も、レプチンの濃度依存的に上昇し、レプチン 0.1-0.3 mM で最大となった(図2)。以上の結果より、レプチンは気道上皮細胞の ICAM-1 発現を亢進することが明らかになった。

図2. 気道上皮細胞表面の ICAM-1 発現。

BEAS-2B をレプチンで 72 時間刺激後に cell lysate を回収し、細胞内の ICAM-1 を ELISA で測定した。バーは SEM を示す (n = 4). \*  $P < 0.05$  vs. レプチン刺激無しの細胞。



(2) レプチンによる NFκB p65 のリン酸化  
上記のレプチンによる BEAS-2B 細胞表面の ICAM-1 発現増強作用は、NFκB の阻害薬である BAY11-7082 を添加することで、著明に抑制された (図 3)。BEAS-2B における NFκB p65 のリン酸化は、レプチン刺激後 15 分程度から認められ、30 分、60 分後と経時的に増強した (図 4)。以上の結果より、レプチンは、NFκB のリン酸化を介して気道上皮細胞の ICAM-1 発現を亢進することが明らかになった。

図 3. BEAS-2B の ICAM-1 発現。BEAS-2B を、レプチン 0 (点線)、10 (黒実線) mM で 24 時間刺激後、細胞表面の ICAM-1 発現をフローサイトメトリーで解析した。レプチンと同時に、BAY11-7082 を添加した細胞を灰色で示す。

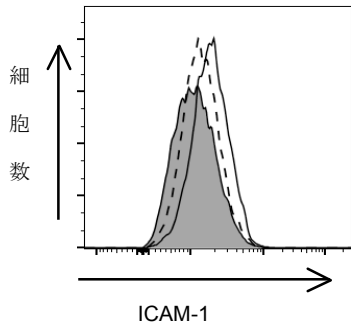
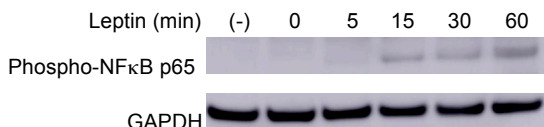


図 4. BEAS-2B における NFκB p65 のリン酸化。レプチン刺激後 0-60 分後のリン酸化 NFκB p65 および GAPDH の発現をウェスタンブロットで解析した。



(3) 気道上皮細胞による Ob-R の発現  
real-time PCR およびフローサイトメトリーにより、BEAS-2B に Ob-R の発現を認めた (図 5)。Ob-R に対する siRNA をトランスフェクトすると、BEAS-2B の Ob-R 発現は抑制された (図 6)。さらに、Ob-R siRNA

をトランスフェクトした細胞においては、レプチンによる ICAM-1 mRNA 発現増強作用を認めなかった (図 7)。以上の結果より、レプチンは Ob-R を介して、気道上皮細胞の ICAM-1 発現増強作用を示していることが明らかになった。

図 5. BEAS-2B 細胞表面の Ob-R 発現。フローサイトメトリーにより、BEAS-2B 細胞表面の Ob-R 発現 (点線) を解析した。コントロール抗体で染色された細胞を灰色で示す。レプチン 10 mM で刺激後 (黒塗り) の細胞は、Ob-R の表面発現が低下していた。

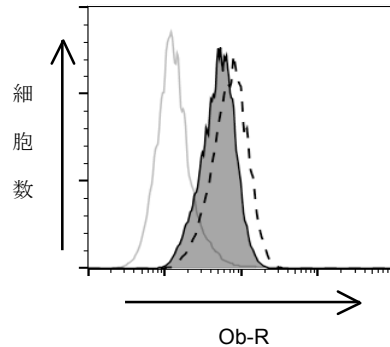


図 6. BEAS-2B による Ob-R mRNA の発現。Real-time PCR で Ob-R mRNA の発現を解析した。Control RNA (白色)、Ob-R siRNA (黒色) をトランスフェクトした細胞を示す。バーは SEM を示す (n = 4). \*  $P < 0.05$  vs. control RNA をトランスフェクトした細胞。

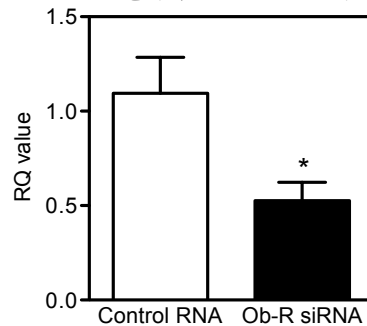
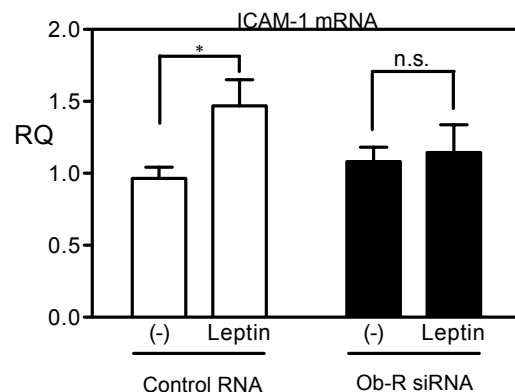


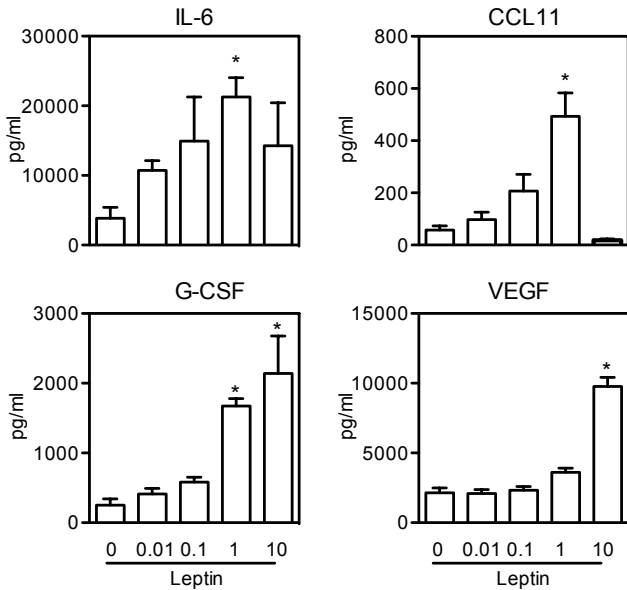
図 7. BEAS-2B による ICAM-1 mRNA の発現。Real-time PCR で ICAM-1 mRNA の発現を解析した。Control RNA (白色)、Ob-R siRNA (黒色) をトランスフェクトした細胞をレプチン 0 または 10 mM で刺激した細胞を示す。バーは SEM を示す (n = 6). \*  $P < 0.05$ .



(4) レプチンによる気道上皮細胞のサイトカイン産生

BEAS-2B をレプチンで刺激すると、IL-6、CCL11、G-CSF、VEGF の産生が増強した (図 8)。

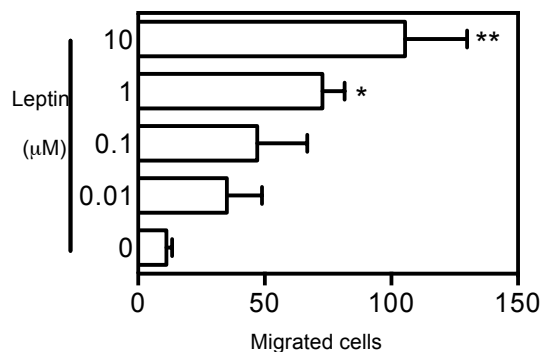
図 8. BEAS-2B からのサイトカイン産生。BEAS-2B をレプチン (mM) で 24 時間刺激し、上清中のサイトカインを LUMINEX 法により測定した。バーは SEM を示す (n = 5)。\*  $P < 0.05$  vs 無刺激の細胞。



(5) レプチンによる気道上皮細胞の遊走能

NHBE の遊走能は、レプチンの濃度依存的に増強し、レプチン 10 mM で最高の遊走能を認めた (図 9)。

図 9. レプチン刺激による NHBE の遊走能。Boyden chamber の上室に  $10^4$  個の NHBE を入れ、下室にレプチンを入れて、6 時間後の下室への遊走細胞数をカウントした。バーは SEM を示す (n = 3)。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs レプチンなしの自然遊走能。

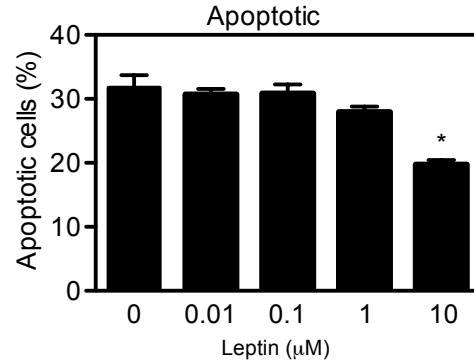


(6) レプチンによる気道上皮細胞のアポトーシス

BEAS-2B のアポトーシス細胞の割合はレプチンの濃度依存的に減少し、レプチン 10

mM で有意に抑制された (図 10)。

図 10. レプチン刺激による BEAS-2B のアポトーシス。TNF- $\alpha$  10 ng/ml, IFN- $\gamma$  15 ng/ml と共に、レプチンを入れて 72 時間培養した BEAS-2B のアポトーシス細胞の割合を、フローサイトメトリーで測定した。バーは SEM を示す (n = 4)。\*  $P < 0.05$  vs レプチンなしの細胞。



以上、本研究から、レプチンは、気道上皮細胞の ICAM-1 発現を増強し、遊走、サイトカイン産生、生存を誘導することが明らかになった。肥満による喘息増悪の機序として、レプチンによる気道上皮細胞に対する作用が関与する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Suzukawa M, Koketsu R, Baba S, Igarashi S, Nagase H, Yamaguchi M, Matsutani N, Kawamura M, Shoji S, Hebisawa A, Ohta K. Leptin enhances ICAM-1 expression, induces migration and cytokine synthesis, and prolongs survival of human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;309(8):L801-11. doi: 10.1152/ajplung.00365.2014. 査読有
2. Tanaka Y, Yamaguchi M, Suzukawa M, Arai H, Nagase H, Ohta K. Modulation of human basophil activation by resveratrol. *Allergol Int* 2015;64 Suppl:S80-2. doi: 10.1016/j.alit.2015.05.003. 査読有
3. Koyama K, Ohshima N, Suzuki J, Kawashima M, Okuda K, Sato R, Suzukawa M, Nagai H, Matsui H, Ohta K. Evaluation of clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonary aspergillosis depending on the underlying lung diseases: Emphysema vs prior tuberculosis. *J Infect Chemother* 2015;S1341-321X(15)00189-0. doi: 10.1016/j.jiac.2015.08.006. 査読有
4. Niki M, Suzukawa M, Akashi S, Nagai H, Ohta K, Inoue M, Niki M,

- Kaneko Y, Morimoto K, Kurashima A, Kitada S, Matsumoto S, Suzuki K, Hoshino Y. Evaluation of Humoral Immunity to Mycobacterium tuberculosis-Specific Antigens for Correlation with Clinical Status and Effective Vaccine Development. *J Immunol Res.* 2015;2015:527395. doi: 10.1155/2015/527395. 査読有
5. Baba S, Kagoya R, Kondo K, Suzukawa M, Ohta K, Yamasoba T. T-cell phenotypes in chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Japanese patients. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2015;11:33. doi: 10.1186/s13223-015-0100-2. 査読有
  6. Miller M, Rosenthal P, Beppu A, Mueller JL, Hoffman HM, Tam AB, Doherty TA, McGeough MD, Pena CA, Suzukawa M, Niwa M, Broide DH. ORMDL3 transgenic mice have increased airway remodeling and airway responsiveness characteristic of asthma. *J Immunol.* 2014 Apr 15;192(8):3475-87. doi: 10.4049/jimmunol.1303047. 査読有
  7. Baba S, Kondo K, Toma-Hirano M, Kanaya K, Suzukawa K, Ushio M, Suzukawa M, Ohta K, Yamasoba T. Local increase in IgE and class switch recombination to IgE in nasal polyps in chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(5):701-12. doi: 10.1111/cea.12287. 査読有
  8. Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 Is a Direct Receptor for Mannose-Capped Lipoarabinomannan of Mycobacteria. *Immunity.* 2014 Sep 18;41(3):402-13. doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.005. 査読有
  9. Baba S, Kondo K, Kanaya K, Suzukawa K, Ushio M, Urata S, Asakage T, Kakigi A, Suzukawa M, Ohta K, Yamasoba T. Expression of IL-33 and its receptor ST2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope.* 2014 Apr;124(4):E115-22. doi: 10.1002/lary.24462. 査読有
  10. Nakase Y, Yamaguchi M, Sugimoto N, Suzukawa M, Arai H, Nagase H, Ohta K. Modulation of human basophil degranulation by geranylgeranyl compounds. *Allergol Int.* 2014 May;63 Suppl 1:49-51. doi: 10.2332/allergolint.13-LE-0637. 査読有
  11. Suzukawa M, Miller M, Rosenthal P, Cho JY, Doherty TA, Varki A, Broide D. Sialyltransferase ST3Gal-III regulates Siglec-F ligand formation and eosinophilic lung inflammation in mice. *J Immunol.* 2013 Jun 15;190(12):5939-48. doi: 10.4049/jimmunol.1203455. 査読有
  12. Koketsu R Yamaguchi M, Suzukawa M, Tanaka Y, Tashimo H, Arai H, Nagase H, Matsumoto K, Saito H, Ra C, Yamamoto K, Ohta K. Pretreatment with low levels of FcεRI-crosslinking stimulation enhances basophil mediator release. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161 Suppl 2:23-31. doi: 10.1159/000350339. 査読有
  13. Nakanishi W Yamaguchi S, Matsuda A, Suzukawa M, Shibui A, Nambu A, Kondo K, Suto H, Saito H, Matsumoto K, Yamasoba T, Nakae S. IL-33, but not IL-25, is crucial for the development of house dust mite antigen-induced allergic rhinitis. *PLoS One.* 2013 Oct 25;8(10):e78099. doi: 10.1371/journal.pone.0078099. 査読有
  14. Nagai H Suzukawa M, Sakakibara Y, Ohta K, Reche PA, Suzuki K and Hoshino Y Immunological responses and epitope mapping by tuberculosis-associated antigens within the RD1 region in Japanese patients. *J Immunol Res.* 2014;2014:764028. doi: 10.1155/2014/764028. 査読有
- [学会発表] (計 13 件)
1. Maho Suzukawa, Rikiya Koketsu, Shintaro Baba, Sayaka Igarashi, Hiroyuki Nagase, Masao Yamaguchi, Noriyuki Matsutani, Masafumi Kawamura, Shunsuke Shoji, Akira Hebisawa, Ken Ohta. Leptin induces migration and cytokine production, and inhibits apoptosis, of human airway epithelial cells. American Thoracic Society 2015 International Conference 2015/5/17. Colorado, USA.
  2. 鈴木 真穂, 大島信治, 田下浩之, 長瀬洋之, 山口正雄, 庄司俊輔, 小林信之, 蛇澤晶, 大田健. Analysis of asthma control and inflammatory mediators in severe asthmatics during omalizumab therapy. The 25th Congress of Interasma Japan/North Asia 2014/9/3. 横浜.
  3. 鈴木 真穂, 大島信治, 田下浩之,

- 長瀬洋之, 山口正雄, 庄司俊輔, 小林信之, 蛇澤晶, 大田健. 重症成人喘息に対するオマリズマブ使用の効果予測因子の検討 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015/5/28. 東京.
4. 鈴川 真穂, 瀨藤力也, 長瀬洋之, 山口正雄, 松谷哲行, 川村雅文, 庄司俊輔, 蛇澤晶, 大田健. レプチンによる気道上皮細胞の活性化 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 2015/4/17. 東京.
  5. 鈴川 真穂. 炎症細胞を標的としたアレルギー疾患に対する新規治療法の可能性: Siglec を中心としたトピックス. 第 1 回東京 Asthma & COPD 研究会 2014/6/27. 東京.
  6. 鈴川 真穂. 好塩基球が重症喘息に関与している可能性 (基礎) 第 34 回六甲カンファレンス 2014/7/26. 京都.
  7. 鈴川 真穂, 瀨藤力也, 田下浩之, 大島信治, 長瀬洋之, 山口正雄, 小林信之, 庄司俊輔, 蛇澤晶, 大田健. レプチンによるヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B) のサイトカイン産生増強作用. 第 24 回国際喘息学会 2014/8/18. 名古屋.
  8. Maho Suzukawa. Regulatory roles of basophils in Th2 immune responses. International Symposium on Homeostasis through development, life, and diseases 2014/11/7. 群馬.
  9. Maho Suzukawa, Rikiya Koketsu, Hiroyuki Nagase, Masao Yamaguchi, Ken Ohta. Leptin induces cytokine synthesis by human airway epithelial cell line by signaling via its receptor, Ob-R. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014/12/10. 京都.
  10. 鈴川 真穂, 蛇澤 晶, 庄司 俊輔, 大田 健, Broide David. 好酸球性気道炎症の基礎と臨床 肺における好酸球性炎症制御機構. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013/11/28. 東京.
  11. 鈴川 真穂, Miller Marina, Rosenthal Peter, Cho Jae Youn, Doherty Taylor, Varki Ajit, Broide David, 大田 健. マウスにおける Siglec-F リガンドの発現パターンおよび好酸球性気道炎症に及ぼす作用. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013/11/30. 東京.
  12. Maho Suzukawa, Ken Ohta, and David Broide. Effect of siRNA inhibition of sialyltransferases and fucosyltransferases on Siglec-F ligand expression by epithelial cells in vitro. 2014 AAAAI Annual Meeting 2014.3.2. San Diego, USA.
  13. Maho Suzukawa, Marina Miller, Peter Rosenthal, Jae Youn Cho, Taylor Doherty, Ajit Varki, David

Broide, Ken Ohta Sialyltransferase ST3Gal-III plays an important role in Siglec-F ligand formation and eosinophilic lung inflammation in mice 第 42 回日本免疫学会学術集会 2013/12/12. 幕張.

〔図書〕 (計 11 件)

1. 鈴川真穂, 大島信治. 連載「学会印象記」第 46 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会. アレルギー・免疫 2015;23:126-128.
2. 鈴川真穂, 大田健. アレルギー性皮膚疾患が喘息に及ぼす影響. 臨床免疫・アレルギー科 2015;64:53-57.
3. 鈴川真穂. 肥満がフェノタイプに及ぼす意義. アレルギー・免疫 2015;22:846-851.
4. 鈴川真穂. 喘息の難治化因子 肥満. Respiratory Medical Research 2015;3:25-29.
5. 鈴川真穂. ブロンコレアとはどんな疾患でしょうか? アレルギーの臨床 2015;35:398.
6. 鈴川真穂【喘息に影響する種々の側面とその課題をめぐって】 修飾因子の種々の側面を考慮した治療 肥満(解説/特集) Progress in Medicine 2014;34(6):1017-21
7. 鈴川真穂, 中江進. 【気管支喘息における新規生物学的製剤開発の可能性を探る】 IL-17(解説/特集) Respiratory Medical Research 2014;2(3):158-63.
8. 鈴川真穂. Siglec によるアレルギーの抑制(解説) 臨床免疫・アレルギー科 2014;62(4):418-22.
9. 鈴川真穂, 中江進. 【アレルギー疾患と生物学的製剤】 標的分子の基礎医学的追求(解説/特集) アレルギーの臨床 2014;34(14):1239-42.
10. 鈴川真穂. 【難治性喘息 Up-Date-病態から治療まで】 喘息の難治化因子 - 肥満 Respiratory Medical Research 2014;3(1):25-9.
11. 鈴川真穂, 大田健. 【I 型アレルギーを究める】 I 型アレルギー診療の最近の動向. 臨床検査 2014;58(2):225-30.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴川 真穂 (SUZUKAWA MAHO)

国立病院機構 東京病院 臨床研究部 生化学研究室長 研究者番号: 20453699

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし