

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591554

研究課題名(和文) 小児気管支喘息発症および気道炎症に関わるクラス3セマフォリンの役割の解明

研究課題名(英文) Human bronchial epithelial cells produce Semaphorin 3A; possible involvement of Semaphorin 3A in neutrophilic airway inflammation

研究代表者

山本 修一 (Yamamoto, Shuichi)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30359947

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)：Semaphorin 3A (Sema3A) は元来、神経軸索伸長を抑制する因子である。しかし気道におけるSema3Aの産生や働きは知られていない。

2種類の気道上皮細胞はSema3AのmRNA、蛋白を恒常的に発現していた。poly(IC)は濃度依存性にSema3Aの産生を誘導した。好中球はSema3Aの受容体を発現している。Sema3Aは好中球のアポトーシス、遊走、メディエーター産生には影響しなかったが、貪食作用を増強した。以上よりウイルス気道感染により気道上皮細胞から産生されるSema3Aは、気道に遊走してきた好中球の貪食能を増強することを通じ、気道炎症に関与していると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Semaphorin 3A (Sema3A) has been originally known as the axonal guidance cue in the nerve system. However, the expression of Sema3A in the airway is unknown. This study investigated the expression and the role of Sema3A in the airway.

A human bronchial epithelial cells, BEAS-2B and NHBE, showed constitutive mRNA expression and protein production of Sema3A. Poly inosinic-cytidylic acid (poly(IC)), enhanced both mRNA expression and protein production of Sema3A in a dose dependent manner. As neutrophils express Sema3A receptors, we postulated that Sema3A produced from bronchial epithelial cells might modulate functions of neutrophils. Although Sema3A showed no effects on apoptosis and migration of neutrophils, Sema3A enhanced phagocytosis of neutrophils. These findings demonstrate that airway epithelial cells produce Sema3A, and suggest a possibility that Sema3A might modulate a pathogenesis of viral airway infections through up-regulation of phagocytosis of neutrophils.

研究分野：小児アレルギー学

キーワード：気道上皮細胞 ウイルス気道感染 気道炎症

1. 研究開始当初の背景

Semaphorin は元来 axon guidance にかかわる物質として同定された物質で、7 つのクラスに分類される。Semaphorin は心臓の発生、血管伸長、腫瘍増成や免疫応答にも関与していることが明らかになってきた。そのうちで class 3 Semaphorin は分泌型 Semaphorin で、Semaphorin 3A-3F までの 6 型の Semaphorin が同定されている。これらの Semaphorin は plexinA および neuropilin (NRP1) を受容体とすることにより細胞内にシグナルを伝達することが知られている。

免疫系において NRP1 および plexinA1 は T 細胞、樹状細胞、マクロファージに発現しており Semaphorin 3A (Sema3A) は細胞のアポトーシス、増殖、遊走に関与している。Sema 3A はアトピー性皮膚炎の病態に関与していることが明らかになってきた。Sema 3A はアトピー性皮膚炎の局所では発現が減少しており、このため表皮への c 線維への伸長が促進されることによりかゆみに関与していると考えられている。アレルギー性鼻炎の病態にも同様な機序で関与していることが報告されているが、気管支喘息の病態への関与は知られていない。

2. 研究の目的

気道上皮細胞は様々なメディエーターを産生することにより気道炎症に深く関与していることが明らかになってきた。そこで本研究では気道上皮細胞が Semaphorin 3A (Sema 3A) を分泌するかどうか、Sema 3A の分泌を誘導する物質は何か、気管支喘息をはじめとする気道炎症の病態にどのように Sema 3A が関与しているのかを培養気道上皮細胞株を使用して検討することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト培養気道上皮細胞株である BEAS-2B は American Type Culture Collection から購入した。細胞は LHC-9 medium にて培養した。正常ヒト気道上皮細胞 (NHBE) (Lonza, Basel, Switzerland) は BEBM (Lonza) 培養液中で培養した。

RT-PCR

Total RNA は Isogen (Nippon-Gene, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。抽出した total RNA 1 μ g を oligo(dT) をプライマーとして reverse transcriptase (Toyobo, Osaka, Japan) を用い First-stranded cDNA を作成した。PCR 産物は 1.5% agarose gel にて電気泳動した。Taqman probe (ABI) を用い Sema3A の定量的 PCR を行った。内部コントロールとして GAPDH を用いた。相対的な mRNA 発現量を Δ Ct 法を用いて定量化した。

Sema3A の ELISA の確立

細胞培養後の培養上清を採取し、培養液中の Sema 3A 蛋白産生量の測定を行った。まずマイクロプレート (Corning, NY, USA) を各 well あたり 50 μ l の培養上清または recombinant human Sema3A Fc chimera (R&D, MN, USA) で 4°C 一晩コートした。recombinant human Sema3A Fc chimera はスタンダードとして用いた。PBS で洗浄後、200 μ l per well の 3% non-fat dry milk in PBS で 37°C 1 h ブロッキングを行った。PBS で洗浄後、50 μ l のウサギ抗ヒト Sema3A (H-130) ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を加え 37°C 1 h インキュベートした。PBST で 3 回洗浄後、100 μ l の HRP-ヤギ抗ヒト IgG (Santa Cruz) を加え 1 時間 37°C で培養した。PBST で 3 回洗浄後、substrate として 100 μ l の tetramethylbenzidine liquid

(SIGMA, MO, USA) を加えた。その後 100 μ l の 2N H_2SO_4 を加え反応を停止した。microplate reader をもちい 450 における吸光度を測定した。

Western blotting

通常の方法で細胞抽出液を作成後、蛋白量を定量した。そのうち 20 μ g を 10% SDS-PAGE ゲルを用い展開した。nitrocellulose membrane に転写後、抗 Sema3A 抗体を用いてプロットした。

培養細胞の免疫組織染色

細胞を type 1 collagen (Nitta gelatin, Osaka, Japan) でコートした chamber slide (Nalge Nunc, NY, USA) 内で培養後、Bouin's solution を用い固定した。固定した細胞を PBS で洗浄後、0.05% SDS と 0.1% Triton X-100 にて 5 分間処理した。さらに rabbit anti-human Sema3A (H-130) polyclonal antibody (Santa Cruz; dilution 200:1) とともに 45 分間室温で放置した。その後細胞を goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa488 (Invitrogen; 1000:1) で 1 時間、DAPI で 5 分間処理した。スライドを aqueous mounting medium (Thermo, Waltham, MA, USA) でマウントし経口顕微鏡で観察した。

多核白血球(PMNs)の分離

健康なボランティアからのヘパリン採血により dextran 沈殿、Ficoll-Paque 比重勾配遠心法にて PMNs を採取した。混入した赤血球を低張溶解した後 PBS で 2 回洗浄した。Hansel 染色による PMNs の純度は >95% と算定された。細胞を 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) を加えた RPMI1640 medium (Sigma) で培養し以下の実験に使用した。

アポトーシスの検討

分離した PMNs を 1 μ g/ml の Sema3A または 10^{-6} M の dexamethason とともに

16 時間培養した。その後 Annexin V-FITC apoptosis detection kit (TREVIGEN, Gaithersburg, MD, USA) を用い、FACS Calibur によりフローサイトメトリー法にてアポトーシスを検討した。

PMNs の Transmigration assay

PMNs の transmigration を Transwell system (Corning) を用い検討した。PMNs (1×10^5 /well) を insert membrane (pore size 5 μ m) の上方の compartment に入れ、下方の compartment には Sema3A-Fc (1 μ g/ml) および IL-8 (50 ng/ml) の両方またはどちらか一方加えた。30 分 37°C で細胞を培養後、情報の compartment から下方の compartment に移動してきた PMNs の数を顕微鏡下で観察した。

Phagocytosis assay

PMNs を 1×10^6 cells/ml に調整し、Sema3A-Fc (1 μ g/ml) を加え 3 時間、または β -Leukotriene B4 (Cayman, Ann Arbor, MI, USA; 10^{-7} M) で 30 分 37°C 培養した。100 μ l/ml of Latex beads-rabbit IgG-FITC solution (phagocytosis assay kit, Cayman) を加えさらに 45 分間培養した。その後 FACS Calibur を用いフローサイトメトリー法で phagocytosis の有無を検出した。さらに LY294002 (50 μ M, 30 min, Sigma) の phagocytosis に対する効果も同様の方法で検討した。

統計処理

データは平均 \pm SD で表した。Student's t test で検定し、p 値が 0.05 未満を有意と判断した。

4 . 研究成果

気道上皮細胞における Sema3A 産生

私たちはまず、気道上皮細胞 BEAS-2B および NHBE における Sema3A mRNA 発現について検討した。これらの細胞はいずれも Sema3A mRNA を恒常的に発現して

いた。2本鎖RNAであるpoly(IC)は濃度依存性にSema3A mRNA発現を増強した。BEAS-2Bの免疫染色でも細胞質内に陽性シグナルを観察した。またWestern blottingにおいてもBEAS-2Bの細胞溶解液中のSema3A蛋白を確認した。ELISA法では培養液中のSema3A分泌が認められ、これもpoly(IC)の添加により濃度依存性、時間依存性に産生が増強した。IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml)およびリポポリサッカライド (LPS) (100 μg/ml)はSema3Aの産生を増強する効果は見られなかった。

多核白血球における NRP1 および PlexinA1 の発現

Poly(IC)で刺激した気道上皮細胞はいわば気道におけるウイルス感染症モデル、特に気道好中球性炎症モデルとして考えることができる。好中球はウイルス気道炎症における中心的炎症細胞である。そこで私たちは気道上皮細胞が産生したSema3Aが好中球に対し何らかの作用があるのではないかと考え以下の検討を行った。NRP1 および PlexinA はヒトにおいてSema3A受容体として機能していることが知られている。好中球におけるこれらの受容体発現を検討したところ、PMNsはいずれのmRNAも恒常的に発現しておりPMNsには機能的なSema3A受容体が発現していると考えられた。このことはSema3Aの重要なターゲットの一つが好中球である可能性を意味する。

Sema3A は PMNs のアポトーシスには関与しない

ヒトT細胞株およびマクロファージでは、Sema3AはFasを介したアポトーシスを増強することが報告されている。そこで私たちはPMNsのアポトーシスにSema3Aが

関与しているかどうかを検討した。TNF-αはPMNsにアポトーシスを誘導することが知られている。一方dexamethasoneはPMNsの生存を延長する。しかしながらSema3Aはこれらに対し何の効果も与えなかった。

Sema3A の PMNs transmigration に対する作用

私たちはTranswellシステムを使いSema3AのPMNs transmigrationに対する作用を検討した。好中球に対する強力な遊走因子であるIL-8を下部のcompartmentに入れると、上部から下部compartmentへのPMNs transmigrationが観察される。Sema3Aをいずれのcompartmentへ入れた場合もPMNs transmigrationに変化は認められなかった。

Sema3A の PMNs phagocytosis に対する作用

LTB4はPMNs phagocytosisを強力に増強することが報告されている。そこでPMNsを1μg/mlのSema3Aで3時間刺激したところ、フローサイトメトリー分析によりPMNsのphagocytosisが増強することが観察された。LTB4により誘導されるPMNs phagocytosisはSema3A添加によりさらに増強された。

PI3K阻害薬であるLY294002はSema3Aによるphagocytosis増強効果を打ち消した。

考察

本研究で気道上皮細胞はSema3Aを恒常的に産生することが確認された。さらにpoly(IC)はSema3A産生を有意に増強することが分かった。気道上皮細胞は気道感染症において、生体における最初の防御線で

ある。

ssRNA ウイルスが気道上皮細胞に感染するとウイルス複製のために dsRNA を産生する。気管支喘息や慢性閉塞性呼吸器疾患はウイルス感染によりその病態が悪化するが、これはウイルスに感染した気道上皮細胞がケモカインを含む種々のケミカルメディエーターを産生することに関係している。本研究では Sema3A がウイルス気道感染症の病態に関与している可能性が考えられた。

免疫担当細胞において好中球は重要な炎症細胞である。好中球は病原体から生体を防御するために、血管から遊走し、病原体を貪食し、さらにアポトーシスを起こす。本研究では、Sema3A は好中球の貪食作用に関わっていることが明らかになった。これまでの報告によると、好中球の貪食作用には actin polymerase による細胞骨格の変化が必要である。Fc 受容体依存性の貪食作用には PI3K and Rho family proteins (Rac, Cdc42) など Syk の下流に存在する蛋白の活性化が必要である。マクロファージでは、LTB4 は Fc 受容体依存性細胞貪食を Rac および PI3K を介して増強する。神経細胞伸長は PlexinA からの Sema3A シグナルは PI3K および Rac を介して伝達され細胞骨格が変化することにより抑制される。本研究においても PI3K 阻害薬は Sema3A による細胞貪食を抑制した。This result suggests that between may be identified at the level of. これは PI3K のレベルで Sema3A-PlexinA と IgG-Fc の cross-talk があることを示唆するものである。

気管支喘息においては、気道上皮下の知覚神経分布が気道過敏性に関与している。本研究ではこれに関する検討はできなかったが、本来の Sema3A の役割から考えると、これに Sema3A が関与している可能性が

ある。今後の検討課題である。

結論

本研究では Sema3A が気道上皮細胞に恒常的に発現し、さらにその発現は 2 本鎖 RNA である poly (IC) により増強された。Sema 3A は好中球の貪食作用を増強することから、気道上皮が産生する Sema 3A はウイルス気道感染症、特に好中球性気道炎症に深く関与している可能性が示唆された。

参考文献

1. Capparuccia, L. and L. Tamagnone, *Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 11): p. 1723-36.
2. Suzuki, K., A. Kumanogoh, and H. Kikutani, *Semaphorins and their receptors in immune cell interactions.* Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 17-23.
3. Takamatsu, H., et al., *Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II.* Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 594-600.
4. Ji, J.D., K.H. Park-Min, and L.B. Ivashkiv, *Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages.* Hum Immunol, 2009. **70**(4): p. 211-7.
5. Tominaga, M., H. Ogawa, and K. Takamori, *Decreased production*

- of semaphorin 3A in the lesional skin of atopic dermatitis. Br J Dermatol*, 2008. **158**(4): p. 842-4.
6. Sawaki, H., et al., *Intranasal administration of semaphorin-3A alleviates sneezing and nasal rubbing in a murine model of allergic rhinitis. J Pharmacol Sci*, 2011. **117**(1): p. 34-44.
7. Costa, C., G. Germena, and E. Hirsch, *Dissection of the interplay between class I PI3Ks and Rac signaling in phagocytic functions. ScientificWorldJournal*, 2010. **10**: p. 1826-39.
8. Okamoto, F., et al., *Leukotriene B4 augments and restores Fc gammaRs-dependent phagocytosis in macrophages. J Biol Chem*, 2010. **285**(52): p. 41113-21.
9. Gallo, G., *Semaphorin 3A inhibits ERM protein phosphorylation in growth cone filopodia through inactivation of PI3K. Dev Neurobiol*, 2008. **68**(7): p. 926-33.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

投稿中 査読あり

Human bronchial epithelial cells produce Semaphorin 3A; Possible involvement of Semaphorin 3A in neutrophilic airway inflammation.

Inada Y, Yamamoto S, Hitomi E, Muro E, Hamasaki Y.

〔学会発表〕(計 1 件)

第 63 回 日本アレルギー学会学術集会 (2013/11/28): 稲田由紀子、山本修一、浜

崎雄平「気道上皮細胞における semaphorin 3A 産生について」(東京)

〔図書〕なし

〔産業財産権〕

○出願状況 なし

〔その他〕

ホームページ等なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本修一 (YAMAMOTO, Shuichi)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30359947

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし