

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09211

研究課題名（和文）気道炎症におけるZC3H12A/MCPIPの機能解析

研究課題名（英文）Evaluation of functions of ZC3H12A/MCPIP in airway inflammation

研究代表者

山内 康宏（YAMAUCHI, YASUHIRO）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00323585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：気道上皮細胞において、IL-17やTNF- α の存在下ではZC3H12A/MCPIPが誘導され、IL-17及びTNF- α の両者の存在下では、相乗的にZC3H12A/MCPIPが誘導された。また、ZC3H12A/MCPIPは、気道上皮細胞内において、気道炎症に関連する細胞内シグナリングに影響する可能性が示唆された。気道炎症性病態において、ZC3H12A/MCPIPは重要や役割や機能を有する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性の気道炎症性疾患における炎症性病態の制御に向けて、吸入療法による治療targetとなり得る気道上皮細胞に着目し、細胞内でのZC3H12A/MCPIPの発現や機能について検討した。気道上皮細胞内のZC3H12A/MCPIPは、炎症性病態の条件で誘導され、また免疫調整因子として細胞内のsignaling pathwayに影響している可能性がある。

気道炎症性疾患の治療targetの候補として、今後、更なる検討が必要な状況であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The expression of ZC3H12A/MCPIP in airway epithelial cells was induced by stimulation with IL-17 and TNF- α . Co-stimulation with both IL-17 and TNF- α enhanced the expression of it, synergistically. ZC3H12A/MCPIP may affect some of the intracellular signaling pathway associated with airway inflammation in airway epithelial cells.

The ZC3H12A/MCPIP may have important roles and function in the airway inflammatory disease.

研究分野：呼吸器内科領域

キーワード：慢性気道炎症性疾患 気道上皮細胞 ZC3H12A/MCPIP 細胞内シグナリング経路 免疫調整因子

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) は、全世界における死亡原因として第3位の死者数の多い疾患であり、また高齢者の罹病頻度が高く今後の高齢化社会の進行とともに罹病者がさらに増加することが予測されており、その疾患制御にむけた取り組みが必要な状況である。COPD は、タバコ煙などの有害物質の長期吸入暴露により末梢気道の炎症性病態と肺実質の破壊による気腫性病態を生じ、これらの病変が相互に不可逆的な気流閉塞を生じ、進行性の慢性呼吸不全を来す疾患である。更に感染等を契機とした気道炎症の増悪は急性増悪を来し、COPD の病状進行が加速され、生命予後に影響を与える。

現在の世界的あるいは我が国の COPD 治療ガイドラインでの COPD 治療において第一選択としての推奨される標準的治療法は、呼吸器症状に直結する気流制限を改善するための気管支拡張剤による気管支拡張療法である。残念ながら、病態の中心的役割を果たすと考えられる炎症性病態への有効なアプローチが未だ確立されていないのが現状である。従って、COPD の発症及び進行抑制につながると考えられる気道炎症を target とした有効な治療法の探索と開発が望まれる状況である。

COPD の気道炎症は、マクロファージ・好中球・リンパ球(CD8 や CD4 陽性) などの炎症性細胞が主体となり病態を形成する。更にこれら気道炎症の形成には、気道構成細胞である気道上皮細胞から産生される Interleukin (IL) -6 や IL-8, Monocyte Chemotactic Protein (MCP)-1, Interferon- γ -inducible protein (IP)-10 などの cytokines/ chemokines が重要な役割を果たす事が知られている。

近年、感染防御や免疫応答に関与する Th17 細胞や IL-17 が炎症性疾患においても重要な役割を果たしていることが報告され、COPD の発症に IL-17 が重要な役割を果たしていることが報告され、慢性気道炎症においても IL-17 の重要性が示唆されるようになってきている。我々は、COPD の気道炎症の病態や増悪のモデルとして、IL-17 による IL-8 産生とマクロライド系薬剤によるその抑制効果や IFN- γ および IL-17 による IP-10 産生の相乗効果と細胞内シグナル伝達経路の解析を行い、また IL-17 および TLR3 ligand である poly (I:C) を用いた IL-8, MCP-1 などのケモカイン産生と相乗効果についての細胞内シグナル伝達の検討を行い、IL-17 が気道上皮細胞において炎症性メディエータの産生を通して気道炎症性病態において重要な役割を果たしている可能性を示唆してきた。

さらに近年、Zinc finger CCCH-type containing 12A (ZC3H12A)/ Monocyte Chemotactic Protein Induced Protein (MCPIP) は、MCP により誘導されアポトーシスを惹起する新規の転写因子として報告され、その後、IL-1 β や Toll-like receptor による刺激でも誘導されることが報告され、その作用には apoptotic gene families を誘導したり、血管新生を誘導する転写因子としての作用を有し、また Nuclear factor-kB 活性化の阻害作用や RNase 作用(Regnase-1)による IL-6 mRNA の不安定化を誘導する作用等、複数の機能を有することが報告されており、炎症性病態において免疫調節因子として関与している可能性が示唆され、その重要性が非常に注目されてきている分子である。しかしながら、ZC3H12A/MCPIP に関しては、未だ不明な点も多く、特に気道炎症における役割や呼吸器疾患における機能については、現時点では十分な検討はなされていないのが現状である。

本研究においては、気道の炎症性病態として種々のサイトカインの存在に着目し、その存在下での気道上皮細胞における ZC3H12A/MCPIP の発現とその機能、特に気道炎症性病態へのその影響について検討することとした。

2. 研究の目的

気道炎症性病態における気道上皮細胞での ZC3H12A/MCPIP の発現に関して評価を行い、その機能を評価することを目的とした。特に ZC3H12A/MCPIP による炎症性メディエータの産生への影響や、細胞内で発現変動する遺伝子群の網羅的な解析を行い、炎症性病態への評価を行い、気道炎症性呼吸器疾患での役割や影響について探索することとした。

3. 研究の方法

気道上皮細胞として、BEAS-2B 細胞および A549 細胞を用いて、in vitro の系としての気道炎症性病態をモデルとして、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-13, IL-17, IFN- γ , LIGHT (TNF super family-14) やリモデリングで重要な役割を果たす増殖因子である Transforming growth factor (TGF) - β を用いて、各種適切な濃度で培養細胞を刺激した。各刺激後 4 時間で RNA を抽出し、また刺激後 24 時間の細胞培養上清および細胞内蛋白を回収した。mRNA の発現については、回収した total RNA を用いて cDNA を作成し、qPCR 法にて各 mRNA の発現 (内部 control として GAPDH) を評価した。また、細胞培養上清中の蛋白発現については、ELISA 法にて評価を行い、細胞内発現については、western-blotting 法にて、その発現の評価を行った。

また、ZC3H12A/MCPIP の機能解析を目的として、ZC3H12A/MCPIP siRNA を用いてその制御 (抑制) 下における細胞内 RNA を用いて、RNA-seq により網羅的に遺伝子の発現に関する検討を行った。

4. 研究成果

(1) 炎症性病態下での気道上皮細胞における ZC3H12A/MCPIP mRNA の発現

気道上皮細胞を様々なサイトカインの存在下として、IL-4, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , LIGHT, TGF- β の存在下での ZC3H12A/MCPIP の発現に関して、刺激後 4 時間での mRNA の発現を評価した。IL-4, IL-13, IFN- γ , LIGHT, TGF- β による刺激では、無刺激の control と比較して、ZC3H12A/MCPIP mRNA の発現に有意な差を認めなかったが、IL-17, TNF- α による刺激で、有意に ZC3H12A/MCPIP mRNA の発現を認めた。更に IL-17 と TNF- α との共刺激で、ZC3H12A/MCPIP mRNA の相乗的な発現亢進を認めた (図 1)。

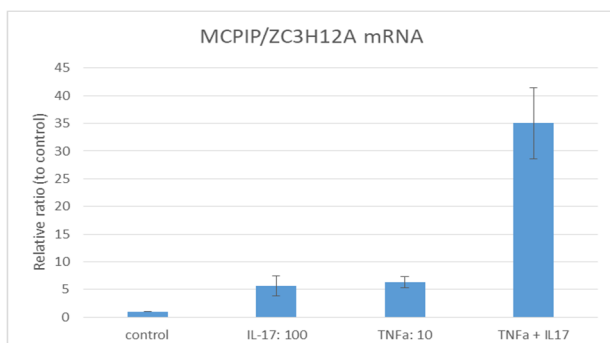


図 1) BEAS-2B 細胞における ZC3H12A/MCPIP mRNA の発現

BEAS-2B 細胞を IL-17 (100ng/ml), TNF- α (10ng/ml), IL-17 (100ng/ml) with TNF- α (10ng/ml) で刺激後 4 時間での ZC3H12A/MCPIP mRNA の発現 (n=3)。

(2) 気道上皮細胞における ZC3H12A/MCPIP protein の発現

次に ZC3H12A/MCPIP の蛋白発現に関して、Western blotting 法にて、刺激後 1, 3, 6, 12, 24 時間後でのその発現を確認したが、各時間帯でのその発現に関して特に変化を認めず、時間依存性的な変動を認めなかった。この為、ZC3H12A/MCPIP が細胞外に分泌される蛋白の可能性も念頭において、IL-17+TNF- α での刺激 24 時間後の培養上清を用いて、ELISA kit により ZC3H12A/MCPIP の定量を試みたが、測定検出感度以下の反応となり、細胞が分泌される ZC3H12A/MCPIP の定量は行えなかった。

気道上皮細胞にて上記刺激で ZC3H12A/MCPIP mRNA の発現が亢進しているにもかかわらず、蛋白レベルでの発現の変動を確認できなかった点に関しては、細胞内での局在や刺激後のサンプル回収の時間帯の影響、また購入した ELISA kit の検出能力の問題等も考えられた。この蛋白レベルでの検出については更なる検討課題として、次なる細胞内での機能解析の検討を行う事とした。

(3) 炎症性病態下の気道上皮細胞における ZC3H12A/MCPIP による遺伝子発現への影響

気道炎症性病態下での ZC3H12A/MCPIP の細胞内での機能解析の目的にて、気道上皮細胞内における ZC3H12A/MCPIP の knock down での遺伝子発現の変化を評価する事とした。

まず、気道上皮細胞内に ZC3H12A/MCPIP siRNA を導入し、上記 ZC3H12A/MCPIP の発現亢進する様な条件下での、細胞内遺伝子発現の変動を網羅的に解析することとした。

ZC3H12A/MCPIP siRNA の導入にあたり、まずは気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞を用いてその導入を試みた。ZC3H12A/MCPIP siRNA を 3 種類 (#1~#3) 用いて、BEAS-2B 細胞へ siRNA 導入したが、48 時間後の培養にて BEAS-2B 細胞の細胞死が多くなり、遺伝子変動の解析に適さず、BEAS-2B 細胞への siRNA 導入は難しいと判断した。

用いる細胞株として、BEAS-2B 細胞とは異なる気道系上皮細胞株である A549 細胞を用いることとして、上記の 3 種の siRNA の導入を試みた。A549 細胞では siRNAs 導入後の細胞状態に著変なく、siRNA の効果を評価検討した。(図 2)

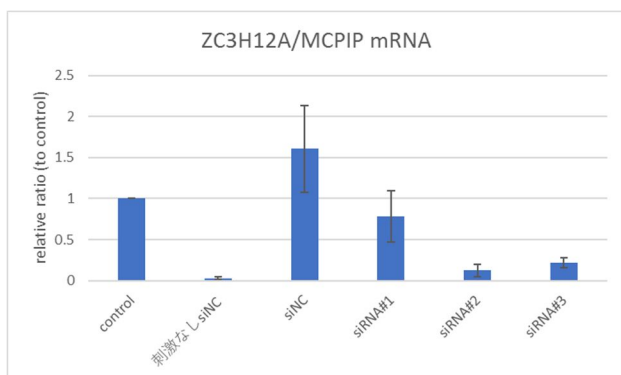


図 2) A549 細胞における ZC3H12A/MCPIP siRNA 導入後の ZC3H12A/MCPIP mRNA の発現

A549 細胞に各 siRNA を導入(48 時間)後、IL-17 (100ng/ml)+TNF- α (10ng/ml)にて刺激し刺激 4 時

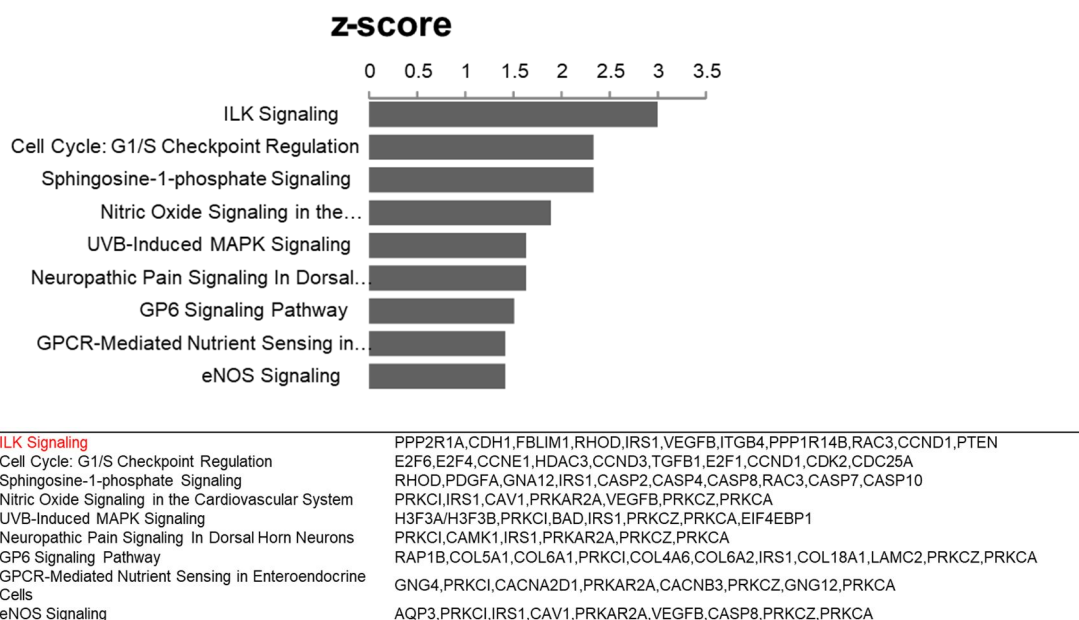
間後に RNA を回収した (n=3)。siNC: negative control for siRNA, siRNA #1-3: ZC3H12A/MCPIP の異なる siRNA

上記検討により、ZC3H12A/MCPIP siRNA として、#1 は knock down 効率が不十分であり、#2 (および #3) で十分な knock down 効果が得られていると判断し、今後の遺伝子発現の変動の検討には、#2 の siRNA を用いて行うこととした。

気道炎症病態下での遺伝子発現の変動の解析について、A549 細胞で siRNA (negative control) と #2 ZC3H12A/MCPIP siRNA を用いて、IL-17 + TNF- α での刺激後 4 時間での total RNA を回収し、RNA-seq 法を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。ZC3H12A/MCPIP siRNA の導入により 411 種類の遺伝子の発現が 2 倍以上上昇し、774 種類の遺伝子の発現が半分以下に低下していた。

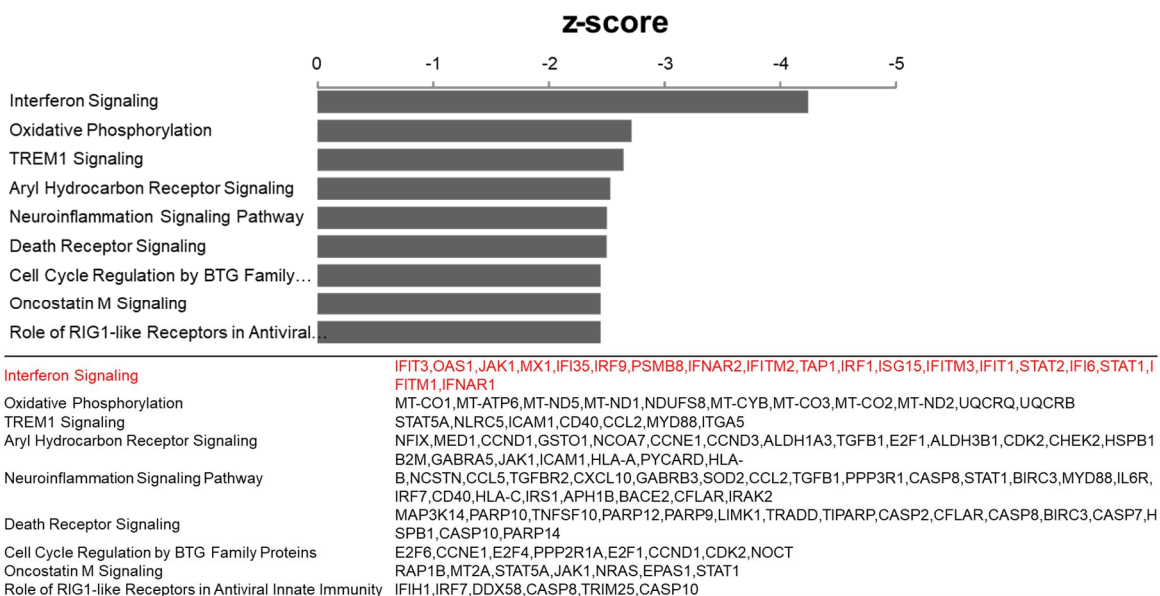
各条件で変化した pathway を明らかにするために、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) pathway 解析を用いて、発現亢進する遺伝子群、発現低下する遺伝子群に関する評価を行った。

ZC3H12A/MCPIP siRNA にて発現亢進する遺伝子群では、Integrin linked kinase (ILK) signaling に関連する遺伝子群、Cell Cycle, Sphingosine-1-phosphate signaling, Nitric Oxide Signaling 等に関連する遺伝子群等が存在した。(図 3)



(図 3) siZC3H12A/MCPIP で発現亢進する遺伝子群

ZC3H12A/MCPIP siRNA にて発現低下する遺伝子群では、Interferon (IFN) Signaling に関連する遺伝子群、Oxidative phosphorylation, TREM1 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 1) signaling, Neuroinflammation signaling に関連する遺伝子群等が存在した。(図 4)



(図 4) siZC3H12A/MCPIP で発現低下する遺伝子群

(4) 考察

炎症性病態下での気道上皮細胞における ZC3H12A/MCPIP の発現と ZC3H12A/MCPIP による細胞内遺伝子発現への影響を検討した。炎症性病態下として、IL-17 および TNF- α の存在下ではその発現が誘導され、更に両者の存在下ではその発現が相乗的に誘導された。

また、ZC3H12A/MCPIP の siRNA を用いた網羅的な遺伝子発現の解析により、ZC3H12A/MCPIP が細胞内において様々なシグナリングに影響している可能性が示唆された。これまでに ZC3H12A/MCPIP は NF- κ B の阻害作用や Regnase-1 としての作用等を含め種々の作用が報告されているが、今回の検討では、Interferon Signaling や Neuroinflammation Signaling 等への影響、また ILK Signaling への影響などの可能性が示唆された。

今後は、更にこれら遺伝子変動を受ける個々の遺伝子への影響やその機能解析をすすめ、更なる検討を要すると考える。加えて、in vivo での炎症性病態に及ぼす影響等についての解析も進め、炎症性病態における ZC3H12A/MCPIP の機能やその役割を更に解析していく必要があると考える。

(5) まとめ

気道上皮細胞において、IL-17, TNF- α の存在下で ZC3H12A/MCPIP は相乗的に誘導され、細胞内でのシグナリングに影響する可能性が示唆された。気道炎症性病態において、ZC3H12A/MCPIP は、重要や役割や機能を有する可能性が示唆された。

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〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：城 大祐

ローマ字氏名：Jo, Taisuke

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院医学系研究科 (医学部)

職名：特任准教授

研究者番号 (8 桁): 30376470

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。