

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 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成 21 年度 ～ 平成 23 年度
 課題番号：21590975
 研究課題名（和文） 気道の上皮透過性制御因子の同定と、気道炎症への関与について
 研究課題名（英文） Identification of regulatory factors for airway epithelial barrier and study for the role on airway inflammation
 研究代表者
 権 寧博（YASUHIRO GON）
 日本大学・医学部・准教授
 研究者番号：80339316

研究成果の概要（和文）：

気道上皮の物質透過性制御の破綻は、気管支喘息などの慢性気道炎症の発症と深く関係している。我々は、気道における気道透過性制御のメカニズムについて、ヒト気道上皮細胞株 Calu-3 を用い検討し、上皮バリアに影響を及ぼす遺伝子発現を GeneChip で解析した。解析結果、気道における気道透過性バリアは EGF によって制御されており、EGF 受容体が Rac1/JNK 経路を介して透過性バリアを安定化に関係していることを明らかにした。また、heregulin (HRG) が ErbB3 シグナルを介して、気道の上皮透過性バリア形成において重要な役割を果たしていることを明らかにしており、ErbB2 と ErbB3 受容体のヘテロダイマーによるシグナルが、気道における上皮バリア形成において重要であることを明らかにした。また、ステロイドが EGFR を介して、気道上皮バリア機能に対し促進する作用を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The airway epithelial barrier provides defenses against inhaled antigens and pathogens, and alterations of epithelial barrier function have been proposed to play a significant role in the pathogenesis of chronic airway diseases. In this study, we demonstrated that EGFR positively regulates permeability barrier development through the Rac1/JNK-dependent pathway. We also found that heregulin activation of ErbB2/ErbB3 heterodimers is essential for the regulation of permeability barrier in the airway epithelial cells. We also found that glucocorticoids have an effects of improving epithelial barrier integrity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,800,000	540,000	2,340,000

22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,040,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：気道上皮、気管支喘息、タイトジャンクション、気道炎症、気道上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞はからだの内外を隔てる生理学的バリアであり、上皮によるバリアが感染防御に果たす役割は大きい。吸入された免疫原性物質が粘膜下に達し免疫細胞により認識され免疫応答が惹起されるには、物質が上皮によるバリアを通過する必要がある。気管支上の物質の透過性の変化は、気道の免疫原性物質の感受性を調節する重要な因子であり、気道の脆弱性は、気管支喘息や COPD などの慢性気道炎症の病態と深く関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、気道上皮の透過性に影響を及ぼす分子を同定し、気道上皮透過性の制御機構の全体像を明らかにすることで、これらの病態との係わりについて明らかにすることで、気道炎症性の発症予知や病態評価のための新たなバイオマーカーの検索や治療法の開発などの臨床応用の可能性を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト気道上皮細胞株を Transwell chamber で培養し、各種薬剤及び阻害剤で処理。

TER(transepithelial resistance)を測定し、また、デキストランの透過性を測定した。さらに遺伝子発現は real-time PCR, Genechip で解析した。

4. 研究成果

ヒト気道上皮細胞株 Calu-3 を Transwell chamber で培養し各種阻害剤で前処理後、EGF を添加し TER(transepithelial resistance) を測定した。遺伝子発現は GeneChip で解析した。低濃度 EGF (1ng/ml) 刺激は透過性バリア機能を上昇させ、高濃度 EGF (50ng/ml) 刺激はこれを抑制した。低濃度 EGF による透過性バリア機能上昇は、Rac1 及び JNK 特異的阻害剤により抑制され、Erk1/2 及び、p38MAPK、PI3K の阻害剤は影響しなかった。Genechip による解析では、低濃度 EGF 刺激下で 1003 個の遺伝子発現の上昇がみられ、高濃度 EGF では 668 個の遺伝子発現がみられた。両者に共通した遺伝子はわずか 73 個であった。EGFR は Rac1/JNK 経路を介して透過性バリアを安定化するが、過剰な EGFR 刺激は逆に抑制的に作用する。喘息や COPD 患者の気道上皮では EGFR 発現が亢進しているが、EGF 濃度の違いが遺伝子発現パターンを大きく変化させることから、EGFR 活性化レベルの違いが気道の上皮透過性機能やその他の上皮機能に大きく影響する可能性が示唆された。

EGFR ファミリーが上皮透過性バリア形成に及ぼす影響についてさらに詳細に解析した。ヒト気道上皮細胞株 Calu-3 と air-liquid interface (ALI) 法により培養した 16HBEco-細胞、及び、正常ヒト気道上皮細胞を Erbb2/3 リガンドである Heregulin- β 1 (HRG) で刺激した。上皮バリア機能は、Trans Electric Epithelial Resistance (TER)、Dextran(Dx) 透過率、ZO-1 と Occludin の免疫染色により

評価した。HRG は、Calu-3 及び 16HBEco-において、コントロールに比べて透過性バリア形成を促進した。ErbB3 siRNA によるノックダウンは、HRG による TER 上昇作用を抑制した。ErbB2 の siRNA は、ErbB3 同様に、HRG による TER 上昇作用を抑制した。ErbB1 の siRNA は、HRG による TER 上昇作用に影響を及ぼさなかった。正常ヒト気道上皮細胞において、HRG の添加は、Liquid、ALI 法のいずれの条件においても、透過性バリア機能を促進した。HRG は ErbB3 シグナルを介して、気道の上皮透過性バリア形成において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。ErbB3 は dead キナーゼであることから、ErbB2/3 のヘテロダイマーによるシグナルが、気道における上皮バリア形成において重要であると考えられた。

吸入ステロイドは慢性気道炎症性疾患の有効な治療薬であり、その作用機序として抗炎症作用はよく知られているが、気道上皮バリアへの影響については明らかでない。今回我々は、ステロイドが気道上皮の透過性に及ぼす影響について検討した。ヒト気管支上皮細胞株 Calu3 と 16HBEco-を Transwell 上で培養し、デキサメサゾン (DEX)、プロピオン酸フルチカゾン (FP)、ブデソニド (BUD) 添加後、細胞間物質透過性を Trans epithelial Electric Resistance (TER) と蛍光デキストラン (FD) 透過率を用いて検討した。また免疫染色とウェスタンブロット法により、タイトジャンクション (TJ) を形態的に観察した。また siRNA により上皮成長因子受容体 (EGFR) のノックダウンを行った。DEX, FP, BUD は濃度依存的に TER を増強し、FD の透過率を低下させ、免疫染色では DEX が TJ 形成を促進することが観察された。EGF の添加は DEX による作用を増強し、さらに、EGFR ノックダウンでは DEX によるバリア形成促進作用は消失した。

ステロイドは EGFR を介して、気道上皮バリア機能に対し促進する作用を有することが明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Gon Y, Matsumoto K, Terakado M, Sekiyama A, Maruoka S, Takeshita I, Kozu Y, Okayama Y, Ra C, Hashimoto S : Heregulin activation of ErbB2/ErbB3 signaling potentiates the integrity of airway epithelial barrier. *Exp Cell Res.* 2011; 317(13): 1947-53.

2. Terakado M, Gon Y, Sekiyama A, Takeshita I, Kozu Y, Matsumoto K, Takahashi N, Hashimoto S : The Rac1/JNK pathway is critical for EGFR-dependent barrier formation in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011; 300(1): L56-63.

3. Sekiyama A, Gon Y, Terakado M, Takeshita I, Kozu Y, Maruoka S, Matsumoto K, Hashimoto S : Glucocorticoids enhance airway epithelial barrier integrity. *Int Immunopharmacol.* 2012 Feb;12(2):350-7

[学会発表] (計 1 件)

1. Terakado M, Gon Y, Sekiyama A, Takeshita I, Kozu Y, Matsumoto K, Takahashi N and Hashimoto S. The Rac1/JNK pathway is critical for EGFR-dependent barrier formation in human airway epithelial cells. *ATS international conference, Denver. USA, 2011, 5*

2. Sekiyama A, Gon Y, Terakado M, Takeshita I, Kozu Y, Matsumoto K, and Hashimoto S. Glucocorticoids Enhance Airway Epithelial Barrier Integrity. *ATS international conference, Denver. USA, 2011, 5*

3. Gon Y, Terakado M, Sekiyama A, Matsumoto K, Kozu Y, Hashimoto S.: Heregulin-activation of Erb2/Erb3 heterodimers is essential for the regulation of permeability barrier in

airway epithelial cells. 14th Congress of the Asian-Pacific Society of Respiriology. Seoul, Korea, 2009, 11

4. 権 寧博, 橋本 修: シンポジウム 気管支喘息の病態解明の新展開 気道上皮細胞 第61回 日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2011. 11
5. 権 寧博, 橋本 修: シンポジウム: 気道構成細胞から喘息の発症メカニズムを探る. 気道上皮細胞. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010, 11
6. 権 寧博, 羅 智靖, 橋本 修: シンポジウム 気管支喘息の病態の新知見-TLR の関与. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010, 4
7. 権 寧博, 寺門正裕, 関山昌子, 神津 悠, 竹下郁子, 松本 健, 岡山吉道, 羅 智靖, 橋本 修: Erb 受容体シグナルにおける気道上皮透過性バリア機能の役割. 第59回日本アレルギー学会秋季臨床大会, 秋田, 2009, 11

[図書] (計2件)

1. 1. Gon Y, Hashimoto S: 21 epithelial growth factors. Inflammation and Allergy Drug Design. 263-273, Blackwell Publishing Ltd. 2011
2. 2. 権 寧博, 橋本 修: 気管支喘息の病態におけるTLRの関与 Annual review of 呼吸器 2011 84-90, 中外医学社, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 権 寧博 (GON YASUHIRO)
日本大学 医学部 准教授
研究者番号: 80339316

(2)研究分担者 羅 智靖 (RA CHISEI)
研究者番号: 60230851
日本大学 医学部 教授

(3)連携研究者 林 伸一 (HAYASHI SHINICHI)
日本大学 医学部 助教
研究者番号: 20445745

