

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570238

研究課題名(和文)細胞外マトリックスからのシグナルによる粘液ムチンの産生制御の解析

研究課題名(英文)The regulation of MUC5AC mucin production by extra cellular matrix

研究代表者

岩下 淳(Iwashita, Jun)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：70315597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト気道細胞株NCI-H292において、喘息の原因となる粘液ムチンMUC5ACの産生を細胞外基質4型コラーゲンが抑制し、ラミニンは逆に促進することを見出した。細胞外基質からのシグナルを伝える接着分子インテグリンをsiRNA等で阻害した結果、インテグリン 1の阻害がMUC5ACムチンの産生を促進した。インテグリン経路のAktキナーゼの阻害でもMUC5ACムチン産生は増加した。本研究の結果、ヒト気道上皮細胞において、細胞外基質からのシグナルはインテグリン 1/Akt経路の活性化によってMUC5AC産生を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：MUC5AC mucin overproduction is a key feature of asthma as contributes to airway obstruction. We found the production of MUC5AC is regulated in part by signals from extracellular matrix via integrin pathways. We investigated the role of Akt, a typical signal transducer in the integrin pathway, in the regulation of MUC5AC production. When NCI-H292 human airway epithelial cells were cultured on laminin or Matrigel, we found that the activity of Akt was suppressed, as compared to control cells with upregulated MUC5AC production. In contrast, Akt was activated in cells cultured on type IV collagen with downregulated MUC5AC production. These results suggest that a signal from laminin or Matrigel induces upregulation of MUC5AC by suppressing Akt activity, whereas a signal from type IV collagen induces downregulation of MUC5AC, mediated by Akt activation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：mucin MUC5AC collagen laminin integrin

## 1. 研究開始当初の背景

気道表面を覆う粘液の主成分であるムチンタンパク質は生体防御(免疫)に重要である。しかし喘息患者の気道ではムチンの一種である MUC5AC が過剰に産生されて、空気の流れを妨げ、呼吸を困難にする。

我々はこれまでにヒト気道上皮由来の肺癌細胞株 NCI-H292 において、細胞外マトリックスからのシグナルが粘液ムチン MUC5AC の産生を制御することを発見した (Iwashita, et al, MCB 2010)。代表的な細胞外マトリックスである 4 型コラーゲンからのシグナルは MUC5AC を減少させる。逆にラミニンからのシグナルは MUC5AC を増加させる。この制御には細胞と細胞外マトリックスを結ぶ接着分子インテグリンの働きが重要である。細胞外マトリックスからのシグナルを解明すれば、気道での粘液ムチン産生を減少させることが可能となり、喘息の症状緩和に向けた新たな治療法の開発につながる。

## 2. 研究の目的

本研究では、4 型コラーゲンやラミニンなどによって活性化されるシグナル経路の因子群、特にインテグリン、Akt などの分子が MUC5AC ムチンの産生において、どのように制御されているか解析することを目的とした。細胞における MUC5AC 産生への細胞外マトリックスの機能が明らかになれば、新しい喘息の長期治療薬開発へと結びつけることができる。

## 3. 研究の方法

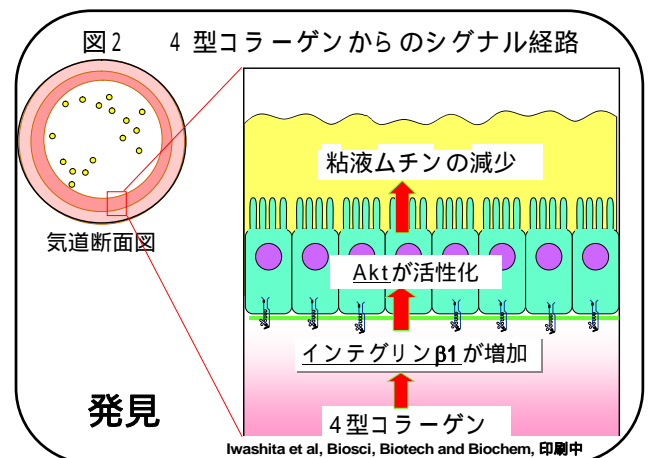
研究材料には主として、ムチン産生の研究に広く使われるヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 を用い、以下の実験を行った。

- (1)底面を 4 型コラーゲンやラミニン、フィブロネクチン、マトリゲルなどの細胞外マトリックスでコートした 96 穴プレート上に NCI-H292 細胞を播種し、30 時間培養した。培養後、細胞をサンプリングした後、産生された MUC5AC ムチンの量をドットプロット、RT-PCR などの手法を用いて測定した。
- (2)底面を 4 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスでコートした 96 穴プレート上に NCI-H292 細胞を上記同様に播種し、時間を様々に変えてサンプリングした。細胞内における MUC5AC ムチン産生量、Akt などのキナーゼの活性化を Western blot などの手法で測定した。
- (3)底面を 4 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスでコートした 96 穴プレート上に NCI-H292 細胞を同様に播種し、48 時間培

養した。siRNA を用いてインテグリンの mRNA を分解し、MUC5AC 産生への影響を検討した。

## 4. 研究成果

- (1)細胞と細胞外マトリックスの結合を人為的に減弱させて、MUC5AC 産生への影響を観察した。その結果、細胞外マトリックスへの結合力が弱くなると、細胞における MUC5AC 産生量が増大する結果が得られた。この際、インテグリン 1 の発現量が細胞外マトリックスによって変動していた。これらの結果はインテグリンなどを介した細胞接着が MUC5AC 産生を抑制していることを示唆している。
- (2)4 型コラーゲン上で培養した NCI-H292 細胞において、siRNA によりインテグリン 1 の発現を抑制した。その結果、コントロールと比較し、MUC5AC の産生量は増加した。また siRNA によりインテグリン 1、サブユニットの発現を同時に抑制した場合、MUC5AC の産生量に変化は観察されなかった。これらの結果から、Col4 と結合する細胞膜上のインテグリン 1 は MUC5AC の産生を抑制することが示唆された
- (3)インテグリンによって細胞内では Akt キナーゼが活性化される。Akt キナーゼの活性と MUC5AC 産生制御の関係を解析した。Akt の阻害は MUC5AC 産生を増加させた。逆に Akt を遺伝子導入によって活性化させた場合は MUC5AC が減少した。これらの結果は Akt が MUC5AC 産生を抑制することを示唆している。
- (4)以上の結果から 4 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスはインテグリン 1 /Akt を活性化させ、細胞内で MUC5AC 産生を減少させることが示唆された。これらのシグナルを制御する薬剤を用いることによって、喘息の症状緩和が図れる可能性がある。



(5)細胞を相互に結合させる代表的な分子はカドヘリンである。我々はE - カドヘリンの MUC5AC 産生への影響を解析した。その結果、E - カドヘリンの阻害により、MUC5AC 産生量が増加した。この結果はE - カドヘリンが MUC5AC 産生を抑制する働きがあることを示唆している。また、このE - カドヘリンのMUC5AC産生への働きはEGF受容体の活性化を介していた。

#### 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9件)

Akt induces down-regulation of MUC5AC production in NCI-H292 human airway epithelial cells cultured on extracellular matrix  
Iwashita, J., Ito, Y, Yokoo, M., Takahashi, S. (他1名、1番目, corresponding author) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有 印刷中 (2014)

Histone deacetylase induces accelerated maturation in *Xenopus laevis* oocytes  
Iwashita, J., Kodama, A., Konno, Y., Abe, T. (他1名、1番目, corresponding author) Dev Growth Differ, 査読有 55 巻, 3 号, 319-329 頁(2013)

Intact structure of EGAM1 homeoproteins and basic amino acid residues in the common homeodomain of EGAM1 and EGAM1C contribute to their nuclear localization in mouse embryonic stem cells.  
Sato, S., Morita, S., Iha, M., Mori, Y., Sugawara, S., Kasuga, K., Kojima, I., Ozaki, N., Muraguchi, H., Okano, K., Iwashita, J., Murata, J., Hosaka, M., Kobayashi, M.  
(11番目) J Biosci Bioeng, 査読有 S1389-1723, 13号, 00049-2頁(2013)

Differentiation- and apoptosis-inducing activities of rice bran 5 extracts in a human colon cancer cell line.  
Takashima, A., Ohtomo, M., Kikuchi, T., Iwashita, J., Abe, T., Hata, K (4番目) J Food Sci Technol, 査読有 50 巻, 3 号, 595-599 頁(2013)

Regulation of MUC5AC mucin production by the cell attachment dependent pathway involving integrin 1 in NCI-H292 human lung epithelial cells.  
Iwashita J., Hongo, K., Ito, Y., Abe, T.

(他1名、1番目, corresponding author) Advances in Biological Chemistry, 査読有 3巻, 1号, 1-10頁 (2013)

Effects of ectopic expression of EGAM1 homeoproteins and an HDAC inhibitor sodium butyrate on the induction of endogenous gene expression in mouse fibroblast NIH3T3 cells. Mori Y., Suzuki A., Sato Sho, Sugawara S., Kasuga K., Kojima I., Iwashita J. and Kobayashi M Mori, Y., Iwashita, J and Kobayashi, M. (他5名、7番目) Tohoku Journal of Animal Science and Technology, 査読有 62巻, 8-14頁.(2012)

Generative cell-specific activation of the histone H2A gene promoter of *Lilium longiflorum* in tobacco.  
UEDA, K., Ono, M., Iwashita, J., Wabiko, H., Inoue, M. (3番目) Sexual Plant Reproduction 査読有 25 巻 4号, 247-255 頁 (2012)

The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell cycle arrest and rapid upregulation of gadd45 in LS174T human colon cancer cells.  
Taniguchi, T., Iwashita, J., Murata, J, Ueda, K. (前半2名が筆頭著者) (他1名、2番目, corresponding author) Advances in Biological Chemistry, 査読有 2巻, 43-50頁. (2012)

Inhibition of E-cadherin dependent cell-cell contact promotes MUC5AC mucin production through activation of epidermal growth factor receptors.  
Iwashita, J., Ose, K., Ito, H., Murata, J.  
(他1名、1番目, corresponding author) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 査読有 75巻4号: 100830-1-6頁 (2011)

[学会発表](計5件)

Type IV collagen down-regulates MUC5AC production through integrin 1/phospho-Akt pathway in NCI-H292 human lung epithelial cells  
伊藤佑歩、岩下淳、工藤志帆、木村大地、村田純  
日本分子生物学会 2013年12月3日 神戸市

インテグリンを介した細胞外基質からのシグナルによるMUC5ACムチン産生の制御  
伊藤 佑歩、岩下 淳、工藤 志帆、横尾 万里

、村田 純  
第45回日本結合組織学会 2013年6月28日  
和歌山市

演題名：Regulation of MUC5AC mucin  
production by cell adhesion-dependent  
pathway involving integrin beta1  
伊藤 佑歩、横尾 万里、工藤 志帆、岩下  
淳 2012年12月 第35回日本分子生物学会  
年会  
横浜市

インテグリン経路によるムチン産生の制  
御  
高橋 直、宮田 阿依、岩下 淳  
2012年5月 第78回日本生化学会東北支部会  
例会・シンポジウム 山形市

Inhibition of Akt kinase induces  
overproduction of MUC5AC mucin in NCI-H292  
human lung cancer cells  
宮田 阿依、岩下 淳  
第34回日本分子生物学会年会 2011年12月  
福岡市

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩下 淳 (Jun Iwashita)  
秋田県立大学・生物資源科学部・助教  
研究者番号：70315597

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：