

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 30 日現在

機関番号：84103

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591471

研究課題名(和文) 気管支喘息重症化に関わる気道リモデリングの成立機構解明：上皮間葉移行制御

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of airway remodeling responsible for severe bronchial asthma: possible involvement of epithelial mesenchymal transition

研究代表者

藤澤 隆夫 (Fujisawa, Takao)

独立行政法人国立病院機構三重病院(臨床研究部)・その他部局等・教授

研究者番号：20511140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：喘息における気道リモデリング形成の機序に上皮間葉転換(EMT)が関与する。好酸球が気道上皮細胞に作用してEMTを誘導するとの仮説を共培養およびマウスの実験系において検証した。まず、好酸球と気道上皮細胞株BEAS-2Bを共培養すると、上皮細胞は円形から紡錘形へと形態的变化を起こし、上皮系分子発現低下、間葉系分子発現減少がみられた次に、マウス気道に好酸球を投与すると、肺組織の線維化と共に、上記の分子変化が誘導された。以上の変化はSmad3リン酸化を伴い、抗TGF- β 1抗体とTGF- β 1 siRNA処理によって抑制された。好酸球はTGF- β 1を介してEMTを誘導、リモデリング成立に関わる。

研究成果の概要(英文)：Eosinophilic inflammation and remodeling of the airways are characteristic pathology of bronchial asthma. Epithelial to mesenchymal transition(EMT) plays a critical role in airway remodeling. We hypothesized that infiltrating eosinophils directly induce EMT. EMT was assessed in mice that were intratracheal instilled mouse bone marrow derived eosinophils and in human bronchial epithelial cells co-cultured with eosinophils purified from healthy individuals or with eosinophilic leukemia cell lines. EMT was induced in bronchial epithelial cells co-cultured with human eosinophils and associated with increased expression of TGF- β 1 and Smad3 phosphorylation in the bronchial epithelial cells. Intratracheal instillation of eosinophils caused enhanced fibrosis and increased lung concentration of TGF- β 1. Treatment with anti-TGF- β 1 antibody and siRNA blocked the development of EMT in bronchial epithelial cells. Eosinophils may contribute to the pathogenesis of airway remodeling through EMT.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・アレルギー内科学

キーワード：気管支喘息 好酸球 気道リモデリング 上皮間葉間移行 Bronchial asthma eosinophils airway remodeling

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患であるが、その難治化の病態に気道リモデリングが大きく関わる事が明らかとなっている。気道リモデリングにおける基底膜部の肥厚、線維化は最近の研究から基底膜自体には変化がなく、基底膜直下にフィブロネクチン、型、型、型コラーゲンからなる細胞外マトリックスが沈着し肥厚していることが判明した。subepithelial fibrosis と呼称されているこの現象は、気道の TGF- β の発現と関連している。気管支喘息の主要なエフェクター細胞の一つである好酸球はその TGF- β を産生することにより気道リモデリングと強く関わっているとされている。上皮間葉移行 (EMT; Epithelial Mesenchymal Transition) とは上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化することにより、運動性亢進や細胞外基質沈着を呈する現象であり、主に TGF- β にて制御を受けているとされている。EMT は癌細胞浸潤や様々な線維症との関連についてこれまで多数の報告がなされている。しかし、気道リモデリングと EMT は共に TGF- β にて制御を受け細胞外基質の沈着を引き起こす現象であるにも関わらず、これまでその関連についてほとんど検討がなされていない。

2. 研究の目的

気管支喘息の主要なエフェクター細胞の一つである好酸球が TGF- β -EMT という経路を介して気道リモデリングの一部である subepithelial fibrosis を引き起こすと仮説を立て、気管支喘息の気道リモデリングにおける EMT の関与、好酸球を介した気道リモデリングの機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

1) ヒト末梢血好酸球と好酸球性白血病細胞 (EoL-1) が気道上皮細胞に及ぼす影響

健康成人ボランティアよりの末梢血より、Percoll 液を用いた比重遠心分離及び抗 CD16 immunomagnetic beads を用いた CD16 negative selection 法にて精製分離した好酸球または EoL-1 を、気道上皮細胞 (BEAS-2B) と共培養し、光学顕微鏡にて気道上皮細胞の形態学的変化を観察した。さらに、EMT の確認のため、Western blotting 法、real time PCR 法にて上皮系マーカー分子である E-cadherin、間葉系マーカー分子である vimentin、 α -SMA を定量した。boyden chamber を用いて、上記実験を行い、direct contact の必要性についても検討した。

EMT への TGF- β の関与を明らかにするため、共培養後の上清中 TGF- β を ELISA 法にて測定するとともに、抗 TGF- β 抗体による抑制を検討した。EMT における TGF- β の細胞内シグナル分子 Smad3 のリン酸化を Western blotting 法で定量した。

2) マウスモデルにおける好酸球誘導 EMT の検証

野生型マウスの骨髓細胞を分離し、IL-5、SCF、Flt3 ligand を用いた好酸球精製培養法にて多量のマウス好酸球を生成、野生型マウスの気管内に投与した。肺組織の線維化は Masson trichrome 染色、Collagen I の免疫化学染色にて評価、EMT は肺組織の E-cadherin、 α -SMA の蛍光免疫染色にて定量した。TGF- β 1 の siRNA 投与による上記マーカーの変化も定量した。

4. 研究成果

1) 好酸球による気道上皮細胞の EMT 誘導 (in vitro 培養モデル)

EoL-1 ないしヒト好酸球と気道上皮細胞 (BEAS-2B 細胞) の共培養を 48 時間行い、形態を phalloidin 染色後、レーザー顕微鏡で観察すると、気道上皮細胞は敷石状の形態から間葉細胞に特徴的な紡錘状の形態に変化した。これが EMT であることを確認するために、上皮細胞マーカーである E-cadherin と間葉細胞マーカーである Vimentin の遺伝子発現を RT-PCR、蛋白発現を Western blotting 法で定量すると、遺伝子と蛋白共に、好酸球または EoL との培養後に、E-cadherin が低下、Vimentin が有意に増加した。好酸球の代わりに、TGF- β 1 添加後の培養においても、同様の変化が認められた。

培養上清中の TGF- β 1 濃度を ELISA 法にて測定したところ、気道上皮細胞単独、EoL-1 ないしヒト好酸球単独と比較してこれら細胞の共培養群での培養上清中の TGF- β 1 濃度は有意に増加した。さらに、好酸球と気道上皮細胞の培養系に抗 TGF- β 1 抗体を添加すると、形態変化、E-cadherin 低下、Vimentin 増加という変化は全て有意に抑制された。

次に TGF- β 1 の細胞内下流シグナルの Smad3 の活性化について、活性化の指標である総 Smad3 に対するリン酸化 Smad3 の割合 (pSmad3/Smad3) を Western blotting 法にて調べたところ、気道上皮細胞の pSmad3/Smad3 は EoL-1 ないしヒト好酸球と共培養を行うことにより有意に上昇した。以上より、好酸球は TGF- β 1 の産生を介して、気道上皮細胞の EMT を起こすと考えられた。

また、EoL-1 ないしヒト好酸球と気道上皮細胞の直接接触を行わない Boyden chamber を用いた上記共培養系、EoL-1 ないしヒト好酸球を 4% paraformaldehyde (PFA) にて固定した後に気道上皮細胞と上記共培養を行う系にて実験を行ったところ、いずれも TGF- β 1 産生増強並びに気道上皮細胞の形態学的変化 (EMT) は認められず、生理活性を有する EoL-1 ないしヒト好酸球の気道上皮細胞との direct contact が必須であることが判明した。

さらに、種々の細胞内シグナル抑制剤を上記共培養系に添加し上清の TGF- β 1 を測定したところ、本実験系の EMT 誘導に必須である TGF- β 1 の産生は MEK1/2 inhibitor (MU0126)、

p38 kinase inhibitor (SB203580)では抑制されなかったが、PI3 kinase inhibitor (LY294002)、JNK inhibitor (SP600125) で抑制された。

以上より、EoL-1 ないしヒト好酸球による気道上皮細胞の EMT は EoL-1 ないしヒト好酸球の生理活性、気道細胞への direct contact が必須であり、シグナル経路として TGF- β 1 - Smad3 依存性、PI3 kinase, JNK pathway 依存性であることが明らかとなった。

2) 好酸球による気道上皮細胞の EMT 誘導 (マウス in vivo モデル)

in vivo においても好酸球が気道上皮細胞に EMT を引き起こし得るのか野生型マウスを用いて検討した。野生型マウスの骨髓細胞を分離し、IL-5、SCF、Flt3 ligand を用いた好酸球精製培養法にて多量のマウス好酸球を生成し、野生型マウスの気管内に投与し、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織を採取し各種検討を行った。好酸球気管内投与群は control 群 (PBS 気管内投与群) と比較して、BALF 中の総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数が有意に増加していた。また、好酸球気管内投与群は EMT の主要な誘導因子である TGF- β 1 が BALF 中で control 群と比べ有意に増加していた。次に肺組織を検討したところ、好酸球気管内投与群は control 群と比較して気管周囲の炎症細胞浸潤、線維化、type I collagen の沈着が著明であった。EMT の確認のために、肺組織を上皮系マーカーである E-cadherin と間葉系マーカーである Vimentin に対する蛍光抗体で染色し、蛍光顕微鏡にて観察を行い E-cadherin と Vimentin を定量化したところ、好酸球気管内投与群は control 群と比較して E-cadherin の低下と Vimentin の上昇が認められた。以上の結果より、好酸球が気道上皮細胞の EMT を誘導することが in vivo においても確認できた。

EMT の TGF- β 1 依存性をさらに証明するため、マウスを TGF- β 1 siRNA で前処置した後に、好酸球を投与する群と (前処置群)、前処置なしの好酸球の投与を受けた群 (前処置なし群) で気管周囲の線維化について比較した。前処置群は前処置なし群と比較して気管周囲の線維化が有意に低下した。これらより in vitro で確認した好酸球-TGF- β 1-EMT の系が in vivo でも起こることが確認できた。以上より、好酸球による EMT には TGF- β 1 が必須であることが明らかとなった。

3) 研究成果のまとめと今後の方向性

本研究では気管支喘息の中心的エフェクター細胞である好酸球が気道上皮細胞の EMT を起こし、気道リモデリングに関わる EMT を引き起こすことを、in vitro, in vivo 双方の実験系にて証明した。この病態モデルの中心は、好酸球並びに TGF- β 1 とそのシグナル伝達経路であり、これらを制御することが気管支喘息の難治化予防への新しい治療戦略と

なりえると考えられ、将来の治療薬開発に画期的な基礎的情報を提供することができたと考える。

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 2 件)

1. Yasukawa A, Hosoki K, Toda M, Miyake Y, Matsushima Y, Matsumoto T, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Nagao M, Sugimoto M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Naito M, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Suga S, Kobayashi T, Fujisawa T, Taguchi O, Gabazza EC. Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. PLoS One 2013; 8: e64281.
2. Hosoki K, Kainuma K, Toda M, Harada E, Chelakkot-Govindalayathila AL, Roen Z, Nagao M, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujisawa T, Gabazza EC. Montelukast suppresses epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells induced by eosinophils. BiochemBiophysResCommun 2014; 449: 351-356.

[学会発表] (計 3 件)

1. 細木興亜. 好酸球による気道上皮細胞の上皮間葉移行
第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会
2011 年 11 月 10-12 日 (東京)
2. A Yasukawa, K Hosoki, T Fujisawa, M Toda, EC Gabazza. Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27-29 日 (千葉)
3. K Hosoki, T Fujisawa, M Toda, EC Gabazza. Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. 2012.3.2 -6 Orland, USA

〔図書〕(計0件)

〔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0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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤澤 隆夫 (Takao Fujisawa)
独立行政法人国立病院機構三重病院(臨床
研究部)・教授
研究者番号：20511140

(2) 研究分担者

細木 興亜 (Koua Hosoki)
独立行政法人国立病院機構三重病院(臨床
研究部)・その他
研究者番号：90422831

戸田 雅昭 (Masaaki Toda)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
講師
研究者番号：10202201

G a b a z z a E s t e b a n
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：00293770

(3) 連携研究者

なし()
研究者番号：