

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591125

研究課題名(和文)腫瘍壊死因子スーパーファミリーLIGHTによる上皮間葉転換の機序の解明

研究課題名(英文)Mechanism of epithelial mesenchymal transition induced by LIGHT/TNFSF14

研究代表者

山内 康宏(Yamauchi, Yasuhiro)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：00323585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：重症喘息などの気道炎症において発現が亢進しその病態に関与していると考えられているLIGHT/TNFSF14分子は、気道上皮細胞において上皮間葉転換を誘導し気道リモデリングに関与し、さらに気道上皮細胞からの炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導し気道炎症に関与している可能性が示唆された。LIGHT/TNFSF14分子は、重症喘息などの炎症性気道疾患における分子標的治療のターゲットとして、その候補になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：LIGHT/TNFSF14 has been reported to be up-regulated in airway inflammation in severe asthma and has been recognized to be related to the pathogenesis of severe asthma. LIGHT enhanced TGF- $\beta$ -induced epithelial mesenchymal transition in vitro, and further LIGHT itself induced epithelial mesenchymal transition in human airway epithelial cells through Erk1/2 pathway. LIGHT would be associated with the pathogenesis of airway remodeling. In addition, LIGHT induced several cytokines and chemokines from human bronchial epithelia cells, some of which are suggested to be important in the pathogenesis of severe asthma. LIGHT/TNSFS14 would be suggested to be one of the candidates for the molecular target therapy for inflammatory airway diseases, including severe asthma.

研究分野：8204 呼吸器内科学

キーワード：上皮間葉転換 LIGHT/TNFSF14 E-cadherin Vimentin

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息において、長期にわたる反復性の慢性炎症は、気道壁の構造改築「気道リモデリング」を促進し、気道可逆性の消失を来し、気流制限の治療抵抗性を来すこととなるため、難治性重症喘息の病態形成において気道リモデリングは、極めて重要な役割を果たす。この気道リモデリングは、上皮下の線維化・平滑筋の増加・血管新生などを特徴とし、特に間葉系細胞からの細胞外基質の過剰な産生と沈着が可逆性の消失につながると考えられている。炎症細胞や産生される液性因子・気道構成細胞なども相互に関連し、喘息気道の病態が形成されと考えられている。しかしながら、気道リモデリングの形成には、未だ解明されていない点も多く、重症難治性喘息における気道炎症と気道リモデリング形成に関わる機序解明は重要である。

重症喘息では、ステロイド抵抗性の気道炎症が持続しており、eosinophilic な炎症や non-eosinophilic な phenotypes があることが指摘されており、好酸球性炎症に加え、好中球性炎症が病態に深く関与していることが示唆されている。さらに、喘息患者の喀痰上清の cytokine profile の検討で、TNF- $\alpha$ 、LIGHT/TNFSF-14 などの炎症性サイトカインが重症喘息の呼吸機能に関連していることが報告され、さらに LIGHT/TNFSF-14 分子はマウスの喘息モデルにおいて炎症細胞からの TGF- $\beta$  や IL-13 の産生を介して喘息の気道炎症と気道リモデリングを促進することが報告されている。従って、LIGHT/TNFSF14 が重症喘息患者の好中球性の慢性気道炎症や気道リモデリング形成に重要な役割を果たしていることが推察される。しかしながら、LIGHT/TNFSF-14 の喘息における役割は未だ明らかになっていないことも多い。

以上の経緯より、LIGHT/TNFSF-14 分子が気道上皮細胞に対して、気道リモデリングに関

与しうる気道炎症や上皮間葉転換への影響に関して検討することとし、重症喘息への分子標的治療の候補となりうる可能性や気道リモデリングや線維化への target になりうるかを検討することとした。

2. 研究の目的

LIGHT/TNFSF-14 分子が重症喘息の気道リモデリング形成や気道炎症に関与し、分子標的治療としての target の候補となりうる可能性について、検討することを目的とする。本研究では LIGHT による EMT 誘導の機序 LIGHT と TGF- $\beta$  との相互作用の機序と EMT の制御機構を究明することを目的として、LIGHT が新たな気道リモデリングの治療 target となり得ることを探索し、気道リモデリング治療への新展開となることを目指す。また、LIGHT による気道上皮細胞からの炎症性サイトカイン・ケモカインの産生への影響について検討する。

3. 研究の方法

LIGHT および TGF- $\beta$  による気道上皮細胞の EMT を検討するために、まず形態学的変化(顕微鏡下での概観・蛋白・mRNA)と機能獲得(細胞外基質の産生能・遊走能・収縮能・増殖能)を検討する。また、EMT による間葉系細胞のサイトカイン・ケモカインの産生能を検討し、線維化への影響を検討する。また、LIGHT と TGF- $\beta$  との併用による EMT の相互作用に関しては、受容体・細胞内シグナル伝達経路について探索し、それらの阻害剤や siRNA による target のノックダウンシステムの導入により、EMT の制御の可能性を検討する。

また LIGHT による気道上皮細胞からの炎症性サイトカインの産生について、サイトカインアレイを用いて誘導されるサイトカインを評価する。また、誘導されるサイトカインについて、LIGHT の受容体やシグナル伝達経路を評価し、炎症性サイトカインの産生の機序を検討する。

#### 4. 研究成果

まず気道系上皮細胞として A549 細胞を用い、LIGHT が A549 細胞の EMT に及ぼす影響について評価を行った。TGF- $\beta$ :5ng/ml と LIGHT:10ng/ml を用いて刺激を行い、48 時間後に形態学的に評価を行った。A549 細胞は、無刺激の状態では敷石様外観の上皮細胞に特徴的な所見であったが、TGF- $\beta$  単独刺激で A549 細胞は紡錘形の延長した間葉系細胞様の外観となっていた。さらに LIGHT との共刺激にてより細長い細胞となっていた。また、LIGHT の単独刺激でも A549 細胞は典型的な敷石様外観から紡錘型の細胞へと変化していた。これについて、Western blotting により、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現と間葉系マーカーである Vimentin の発現を検討したところ、TGF- $\beta$  単独刺激と比べて、LIGHT+TGF- $\beta$  の共刺激では、より E-cadherin の発現が抑制され、Vimentin の発現が増加し、加えて mRNA レベルでのこれらの発現を評価したところ、蛋白レベルと同様に LIGHT + TGF- $\beta$  で EMT がより増強されたことが判明した。また、LIGHT 単独でも同様の変化を認められた。

次に LIGHT および TGF- $\beta$  での刺激で間葉系細胞の特徴の一つである収縮能を獲得しているか否かについて、Gel contraction 法を用いて評価したところ、LIGHT+TGF- $\beta$  でより強い収縮能を獲得していることが確認でき、LIGHT は TGF- $\beta$  による EMT を増強することが判明した。

さらに上述したが LIGHT 自身が EMT を誘導する可能性が出現したため、LIGHT 単独刺激で濃度依存性の評価を行ったところ、E-cadherin の発現は、蛋白レベルと mRNA レベルで濃度依存性に発現が抑制され、vimentin を始とする間葉系マーカーの発現は逆に蛋白・mRNA レベルで濃度依存性に発現が促進されることを確認し、LIGHT 自身が EMT を誘導していることが判明した。

さらに LIGHT による EMT の誘導機序に関して検討した。TGF- $\beta$  による EMT では smad - snail シグナリングを介した系が指摘されており、A549 細胞にても TGF- $\beta$  による刺激では同様の系が関与しているが、LIGHT による刺激では、smad-snail シグナリングを介していないことが判明した。さらに LIGHT による EMT においては、Erk のリン酸化を介して E-cadherin の発現が調整されている経路が存在することが判明した。

次に気道系上皮細胞として BEAS-2B 細胞を用い、LIGHT によるサイトカイン・ケモカインの産生について評価を行った。まず BEAS-2b 細胞における LIGHT の受容体である LT R および HEVIM の発現について評価をし、BEAS-2B 細胞に LT R の発現が強いことを確認した。そこで、LIGHT: 100ng/ml を用いて BEAS-2B 細胞から産生されるサイトカイン（刺激 24 時間後）についてサイトカインアレイで評価を行った。LIGHT による刺激にて ENA-78, GM-CSF, GRO, GRO- $\alpha$ , IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MCP-3, MCSF, MDC, MIG, EGF, IGF-1, Oncostatin M, Eotaxin-2, IGFBP-1, IGF-BP-2, MIP-3a, NAP などのサイトカイン・ケモカイン・増殖因子が誘導されることが判明した。特に、我々は重症喘息での好中球性炎症に着目していたため、IL-8 の産生について評価を行うこととした。そこで、LIGHT による IL-8 産生として、受容体の関与について検討するために、LT R を siRNA にて knock down し IL-8 の産生を検討したところ、IL-8 の産生は抑制され、また LIGHT の blocking antibody を用いて、検討したところ同様に IL-8 の産生が抑制された。このことより、LIGHT により LT R を介して IL-8 が産生される経路が存在することが確認できた。さらに、その下流のシグナル伝達経路の評価として、MAPK 阻害剤や NF $\kappa$ B 阻害剤および Western blotting を用いて IL-8 の産生を検討したところ、Erk, NF $\kappa$ B を介したシグナ

ル伝達経路が存在することが判明し、LIGHT による IL-8 産生のシグナル伝達経路において、LT R の下流に Erk および NFkB を介するシグナル伝達経路が存在することを確認した。

以上より、LIGHT は気道上皮細胞において TGF- による EMT を増強し、さらに LIGHT 自身が smad-snail の系ではなく、Erk を介した経路で EMT を誘導しうることが判明した。さらに、LIGHT は気道上皮細胞において、LT R より Erk および NFkB の経路を介して、IL-8 を産生することが判明した。LIGHT は気道上皮細胞に種々のサイトカイン・ケモカインの産生を介した気道炎症、および EMT を介した気道リモデリングに関与している可能性が示唆され、今後、分子標的治療の target の候補になりうることが示唆された。

#### 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 2 件)

Y Mikami, Y yamauchi, M Horie, M Kase, T Jo, H Takizawa, T Kohyama, T Nagase. Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces epithelial-mesenchymal transition in A549 human alveolar epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012; 428: 451-457. 査読あり

Y Mikami, H Matsuzaki, M Horie, S Noguchi, T Jo, O Narumoto, T Kohyama, H Takizawa, T Nagase, Y Yamauchi. Lymphotoxin  $\beta$  receptor signaling induces IL-8 production in human bronchial epithelial cells. PLOS ONE 2014; 9 (12); 1-21. 査読あり

[学会発表](計 5 件)

Y Mikami, Y Yamauchi, T Kohyama, M Horie, A Saito, T Jo, H Takizawa, T Nagase.

Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT (TNFSF14) induces epithelial-mesenchymal transition in A549 human airway epithelial cells. American Thoracic Society International conference 2012. (San Fransisco, USA)

Y Yamauchi, M Horie, A Saito, T Jo, Y Mikami, H Takizawa, T Nagase, T Kohyama. Chemokine profiles of A549 human alveolar epithelial cells that underwent epithelial -mesenchymal transition by TGF-b and/or TNF-a. European Respiratory Society Annual Congress 2012. (Vienna, Austria)

Y Mikami, Y Yamauchi, M Horie, S Noguchi, O Narumoto, T Jo, T Kohyama, H Takizawa, T Nagase. Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces CXCL-8 production in BEAS-2B human bronchial epithelial cells via Erk1/2 pathway. American Thoracic Society International Conference 2013. (Philadelphia, USA)

Y Yamauchi. Cellular and molecular mechanisms of epithelial mesenchymal transition in airway epithelial cells under airway inflammation. Asian Pacific Society of Respirology International Conference 2013. (Invited Speaker) (Kanagawa, Japan)

Y Yamauchi. Mechanisms of epithelial mesenchymal transition in airway epithelial cells. Asian Pacific Society of Respirology International Conference 2013. (Invited Speaker) (Bali, Indonesia)

[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：  
出願年月日：  
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

山内 康宏 (YAMAUCHI Yasuhiro)  
東京大学・保健健康推進本部・保健センタ  
ー助教  
研究者番号：00323585

### (2)研究分担者

幸山 正 (KOHYAMA Tadashi )  
帝京大学医学部・教授  
研究者番号：00302703

### (3)連携研究者

城 大祐 (JO Taisuke)  
東京大学・保健健康推進本部・保健センタ  
ー助教  
研究者番号：30376470