

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 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：2012～2014

課題番号：24591141

研究課題名(和文) 気道上皮のバリア制御因子の同定と喘息治療への応用

研究課題名(英文) Identification of regulatory factors on airway epithelial barrier integrity and its clinical application for bronchial asthma

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：喘息患者では気道上皮バリアが脆弱である。上皮バリア機能を制御する新たな分子を同定するため、気道上皮細胞モデルを用いて網羅的遺伝子発現解析を行いNDRG1を同定した。さらに、バリア形成過程でmir-155の発現が上昇し、上皮バリア制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。疾患感受性遺伝子であるPCDH1は、機能が不明であったが、PCDH1の上皮バリア機能への関与を検討し、気道上皮細胞においてPCDH1の発現が上皮バリア形成に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Airway epithelial barrier dysfunction plays an important role on the pathogenesis of bronchial asthma. To identify the regulatory molecules, we used an in vitro model using airway epithelial cells. We identified NDRG1 is involved in the regulation of airway epithelial barrier. We also found that mir-155 is important for the development of epithelial barrier. PCDH1 was recently identified as a susceptibility gene in asthma. PCDH1 was upregulated with the development of epithelial barrier function in cultured airway epithelial cells. PCDH1 gene knockdown disrupted both tight and adhesion junctions. Immunohistochemical analysis revealed strong PCDH1 expression in nasal and bronchial epithelial cells; however, expression decreased in inflamed tissues sampled from patients with CRS or bronchial asthma. These results suggest that PCDH1 is important for airway function as a physical barrier, and its dysfunction is involved in the pathogenesis of allergic airway inflammation.

研究分野：気管支喘息の病態研究

キーワード：気管支喘息 上皮バリア機能 タイトジャンクション 気道上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は体の内外を隔てる生理学的バリアであり、病原物質に曝され易いという特徴をもつ気道において、上皮バリアが感染防御に果たす役割は大きい。気道に吸入された抗原が粘膜下に到達し、これが樹状細胞などの抗原提示細胞により認識され、免疫応答が惹起されるためには、物質が上皮によるバリアを通過する必要がある。このため、気道上皮細胞の物質の透過し易さ(気道上皮透過性)の亢進を伴う気道の脆弱化は、気管支喘息の慢性気道炎症の病態と深く係わっていると考えられる。

吸入された物質が、気道上皮バリアを通過するルートには、細胞内ルートと、細胞間ルートの二つがあり、多くの可溶性物質は細胞間ルートを通ると考えられている。細胞間ルートにおける物質の通過は、主に tight junction (TJ) からなる細胞接着装置によって制限されるが、病原性物質がどのようにしてこの TJ によるバリアを通過するのかについては現在も不明な点が多い。喘息患者の上皮は、健常者に比べて脆弱であることが報告されており、これは、炎症による上皮傷害だけではなく、喘息患者の上皮細胞が生来脆弱であるか、または、環境因子との相互作用により発症前から脆弱化していることに起因している可能性が指摘されている。これまで申請者らは、気道において、上皮透過性バリアがどのような因子を介して形成され、その安定性はどのように維持されているのかについて研究を行ってきた。また、ウイルス感染や喫煙、大気汚染物質など、様々な外的ストレスが気道上皮バリアにどのような影響を及ぼすのかを解析してきた。本研究では、これまで我々が確立した気道上皮バリア制御因子のスクリーニング法を用いて、これまでに同定した因子の機能解析をさらに進め、また、新たな因子のスクリーニングを行うことで、気道上皮透過性の制御機構の全体像を明らかにする。また、本研究では、上皮バリア機能の喘息における役割の解明と、上皮バリアを安定化させ、粘膜免疫を制御する新たな治療法の開発の可能性を探る。

## 2. 研究の目的

### (1) 新たな気道上皮バリア制御因子の同定と、創薬ターゲットとしての評価

これまでに我々は、気道上皮のバリア形成・維持に係る因子を同定するスクリーニング法を確立し、上皮バリアの形成に重要な分子を同定し報告してきた。本研究では、さらにスクリーニングを続け、気道上皮バリア制御に重

要なマスター分子、情報伝達経路を同定する予定である。スクリーニング後の実験の Step1 としては、候補遺伝子として同定された分子を siRNA でノックダウンし、気道上皮機能(上皮バリア機能、増殖能、サイトカイン産生能)に及ぼす影響について評価する。Step2 は、上皮機能、特に、バリア機能に影響を及ぼす分子を中心に、アレルギー性副鼻腔炎、喘息、COPD の病変組織中での発現レベルの変化検討し、病態への寄与について評価する。さらに、Step3 として、同定した分子の創薬ターゲットとしての可能性を明らかにするために、喘息や COPD の動物モデルを用いて、KO マウス、阻害抗体、刺激/阻害薬の効果を評価する予定である。

本申請では、これまで上記スクリーニングによって同定された、気道上皮のバリア機能に関係するいくつかの因子について、Step2, Step3 へと解析を進め、気道炎症の病態における役割、上皮バリアの破綻と粘膜免疫の活性化との関係を明らかにし、上皮バリア機能の安定化による新たな喘息の治療法の確立と、臨床応用について検討を進めていく予定である。

### (2) TLR3 受容体を介する上皮バリアの破壊の情報伝達機能の解明と治療薬の開発

RS ウイルスやライノウイルス感染は、細胞死を誘導することなく上皮バリアを破壊することが知られているが、そのメカニズムは明らかでない。我々は、TLR3 のリガンドとして知られる dsRNA が、TLR3 を介して上皮バリアを傷害することを明らかにした。本研究では、TLR3 を介する上皮バリア傷害の情報伝達経路を明らかにし、ウイルス感染によるバリア傷害のメカニズムを解明することで、TLR3 のバリアの脆弱性が粘膜免疫に果たす役割、喘息の病態への関与について明らかにする。

### (3) ステロイド薬による上皮バリア形成促進作用と喘息の新たな治療標的の探索

我々は、ステロイド薬には強力なバリア機能促進作用があることを見出した。この作用は、これまで知られていなかったステロイドの新たな薬理作用であり、その作用機序は、喘息の新たな治療標的となる可能性がある。本研究では、ステロイド薬による、上皮バリア促進作用の分子メカニズムを解明し、喘息の新たな治療法の確立を目指す

## 3. 研究の方法

### (1) 新たな気道上皮バリア制御因子の同定

正常気道上皮細胞を SV40 で不死化した細胞株、16HBE14o-細胞を Transwell チャン

パーで細胞シートになるように培養すると、TJによる上皮バリアが形成されるが、これは、Transepithelial electrical resistance (TER)の上昇とデキストラン透過率の低下の経時的な変化として観察できる。我々は、この過程をDNA microarrayで詳細に解析し、バリアの形成過程で上昇する遺伝子と、逆に減少する遺伝子の同定を行った。既に、いくつかの遺伝子については解析を行っているが、本研究では、バリアの形成過程で変化した遺伝子の解析対象をさらに広げて、これら分子を特異的 siRNA のトランスフェクションによりノックダウンし、気道上皮細胞機能への影響を検討する予定である。上皮機能としては、上皮のバリア機能以外に、dsRNA に対するサイトカイン産生能、細胞増殖などについて検討する予定である。また、これらの分子の病態生理学的な役割を解明するために、喘息と関連性が深い慢性好酸球性副鼻腔炎患者の鼻粘膜上皮細胞におけるこれら分子の発現を解析する予定である。また、解析するサンプル数は少なくなるが、喘息やCOPD患者から採取した手術肺における発現も合わせて解析する予定である。

#### (2) ErbB3 アゴニストの喘息治療薬としての可能性についての検討

我々は、EGF や HB-EGF などによる EGFR の刺激が、気道上皮細胞のバリア機能を亢進させることを明らかにした。EGFR 刺激によるバリア形成作用も ErbB3 に依存しており、また、ErbB3 のアゴニストである Heregulin は、上皮バリア形成の促進作用があることから、ErbB3 は、上皮バリアの重要な制御因子であることを明らかにした。本研究では、マウス、ダニ感作喘息モデルに ErbB3 アゴニストを投与し、ErbB3 刺激による上皮バリアの安定化が、アレルギー性気道炎症や気道のリモデリングを改善するかどうかを検討する。TLR3 を介するバリア傷害の経路と、サイトカイン産生経路の情報伝達経路の違いを明らかにする。また、TLR3 のバリア傷害のメカニズムに関係した分子の KO マウスや阻害抗体を入手し、ウイルス感染によるバリア傷害の抑制が、ウイルスの感染制御に果たす役割を検証する。さらに、マウス喘息モデルにおけるこれら分子の役割を明らかにする。

#### (3) ステロイド薬による上皮バリア形成促進

#### 作用と喘息の新たな治療標的の探索

平成 25 年度までの検討で、上皮バリア機能に関わる分子が同定されたら、アレルギー性副鼻腔炎、喘息、COPD の病理検体を用いて、これら分子の疾患における関与を明らかにする。また、KO マウスや阻害抗体を入手し、マウス喘息モデルにおけるこれら分子の役割を明らかにする。これまで我々は、デキサメサゾンやフルチカゾン、ブデソニド (BD) などの吸入ステロイド薬が、上皮のバリア機能に対して促進的な作用を持つことを明らかにしている。平成 24 年度は、ステロイド処理によって、発現量が変化する遺伝子を DNA microarray で同定し、さらに、発現の見られた遺伝子を siRNA により、ノックダウンすることで、ステロイドによるバリア機能促進に関わる遺伝子を同定する。平成 25 年度までの検討で、上皮バリア機能に関わる分子が同定されたら、アレルギー性副鼻腔炎、喘息、COPD の病理検体を用いて、これら分子の疾患における関与を明らかにする。また、KO マウスや阻害抗体を入手し、マウス喘息モデルにおけるこれら分子の役割を明らかにする。

#### 4. 研究成果

正常気道上皮細胞由来細胞株である 16HBE 細胞の細胞シートを Transwell チャンバー上に培養し、上皮バリア形成によって増加する遺伝子群と、減少する遺伝子群を GeneChip を用いて網羅的遺伝子発現解析した。変化が見られた遺伝子を遺伝子解析ソフト GENESPRING を用いて解析し、さらに、遺伝子情報統合解析ソフト IPA によって、バリア形成時に発現が変動する遺伝子群の情報伝達経路を網羅的に解析した。以前我々は、前回の申請において気道上皮バリアに EGFR を介するシグナル伝達が重要であることを報告しているが、本研究の解析においても同様に EGFR のパスウェイの気道上皮バリア形成において重要であることが改めて明らかとなった。

次に、同様の実験系を用いて気管支喘息の疾患感受性遺伝子である PCDH1 の上皮バリア形成における役割について検討した。免疫細胞染色法によって PCDH1 の発現を観察すると 16HBE 細胞の PCDH1 は細胞間隙に染色され、その発現は上皮バリアが形成されるとともに上昇することが観察されたが、PCDH1 の siRNA によるノックダウン細胞においては、上皮バリア形成が阻害され、デキストランの細胞透過性が亢進し、さらに経上皮電気抵抗が低下することが観察された。ウェスタンブロット法による解析では、PCDH1 には 2 つの

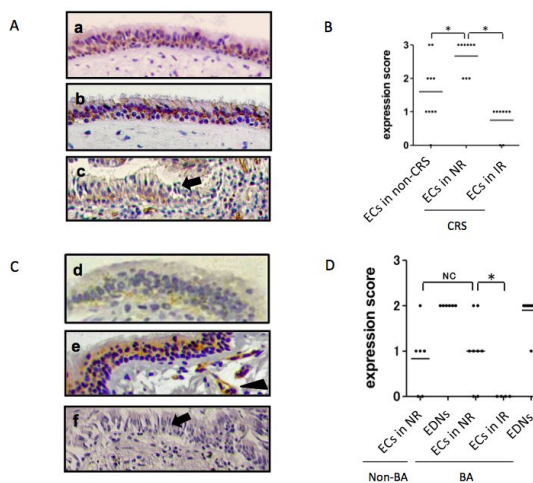
アイソフォームが存在し、さらに、これらのうち膜貫通部分を有するアイソフォームが、上皮バリア形成には特に重要であることが示された。前述の 16HBE 細胞を用いた上皮バリア形成過程における遺伝子発現の網羅的解析で、最も変動が遺伝子として NDRG1 遺伝子が同定された。NDRG1 をノックダウンした細胞においては、PCDH1 同様に細胞のバリア機能を抑制することが明らかになった。以上のことから、PCDH1 や NDRG1 は、これまで報告されていない新規の上皮バリア制御因子であると考えられた。

慢性副鼻腔炎と気管支喘息患者における PCDH1 と NDRG1 の発現は、組織中の気道上皮において低下しており、発現レベルと上皮の脆弱性との関連性が示唆された。気道過敏性や好酸球性炎症を示す喘息患者における上皮バリアの脆弱性は、これら環境要因に加えて、遺伝素因が関係する可能性がある。PCDH1 は、喘息や気道過敏性に関する疾患感受性遺伝子のひとつであることが報告されているが、気道における生物学的機能は不明であった。

喘息患者や慢性副鼻腔炎患者の粘膜上皮における PCDH1 発現の検討では、炎症巣にある上皮での PCDH1 の発現は低下していた(図 1)。以上より、PCDH1 を介した上皮バリアの機能の制御は、喘息やアレルギー炎症の病態において、重要な役割を担っている可能性が示唆された。

microRNA (miRNA) は 20 塩基長前後の短い RNA 分子であり、遺伝子の転写後発現調節により細胞機能の制御に関わっている。上皮細胞においては、様々な分子がバリア機能の制御に関係しているが、どのような miRNA が気道上皮のバリア機能の制御に関わっているかは明らかでない。そこで我々は、マイクロアレイを用い上皮バリア形成過程で発現が上昇する miRNA の網羅的解析を行った。その結果、16HBE 細胞のバリア形成過程で、mir-155 の発現が最も亢進することが観察された(表 1)。

図 1



また、Mir-155 の過剰発現や抑制は、いずれも上皮バリアの形成を阻害することが明らかになった。Mir-155 の欠損は、マウスにおいて Th2 反応の亢進と肺上皮の発達を遅延させることが知られ、人においては、cystic fibrosis 患者の気道において過剰発現していることが報告されている。Mir-155 は、TLR 刺激などの外的刺激によって誘導されるため、Mir-155 の上皮機能の制御とその破綻は、気道のバリア機能や慢性炎症の制御に重要な役割を担っている可能性があると考えられた。

表 1

mir ID	p-value(day3 vs. day1)	Fold-Change(day3 vs. day1)
hsa-miR-155	3.62E-06	20.767
hsa-miR-3185	7.28E-06	3.79668
hsa-miR-4532	0.000167052	3.59261
hsa-miR-4449	0.000599886	3.25929
hsa-miR-4497	8.16E-07	3.20251
hsa-miR-4745-5p	0.000443679	2.47064
hsa-miR-4734	0.000204244	2.14951
hsa-miR-4488	0.000104339	2.05431
hsa-miR-572	0.000154241	1.91677
hsa-miR-4707-5p	0.000527573	1.88356

dsRNA は、RNA ウイルスが宿主細胞に感染し複製する際に生じるが、合成の dsRNA である polyinosinic- polycytidylic acid (poly (I:C)) はウイルスの dsRNA と同様の免疫活性を持ち、TLR3 がこの dsRNA の認識に関わっている。我々は、dsRNA が気道上皮細胞のタイトジャンクションを崩壊することを明らかにした。この dsRNA による上皮バリアの崩壊は、TLR3 や TRIF のノックダウン細胞では観察されないことから、TLR3/TRIF の経路の活性化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。dsRNA は、我々が明らかにしたタイトジャンクション形成促進に寄与する分子である NDRG1 の機能を変調させ、タイトジャンクションを崩壊させることがメカニズムに関係していることを明らかにした。上皮バリアを安定化させることは、ウイルス感染に対する防御機能を高め、ひいては気管支喘息や COPD といった慢性気道炎症の増悪や重症化を抑制する治療戦略となる。我々は、ステロイドが強力な気道バリアの安定化作用を有していることを明らかにし、このステロイドが dsRNA による上皮バリアの崩壊を抑制する作用を有することを明らかにした。また、TLR9 のリガンドである非メチル化 CpG が上皮バリア形成を促進する作用を有することが明らかになり、これを特許申請するとともに、そのメカニズムの解明と臨床応用に向けて解析を行っているところである。

## 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 1 件)

榎 寧博、橋本 修. 特集 II. 気管支喘息の病態機序解明の新展開. 気道上皮細胞と喘息病態. 臨床免疫・アレルギー科, 59(1):71-75, 2013, 査読なし

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 新谷榮崇、丸岡秀一郎、榎 寧博、関山晶子、神津 悠、小山大輔、曾田香織、竹下郁子、橋本 修: 気道上皮バリア機能におけるステロイド誘導性遺伝子の役割, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, ホテルニューオータニ(東京都、千代田区), 2013.11.30
2. 榎 寧博、丸岡秀一郎、平沼久人、関山忠孝、小山大輔、新谷榮崇、曾田香織、竹下郁子、井上寿男、橋本 修: 喘息病態におけるエクソソームを介した新たな遺伝子発現制御機構, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, ホテルニューオータニ(東京都、千代田区), 2013.11.28
3. Gon Y, Maruoka S, Shintani Y, Koyama D, Sekiyama T, Hiranuma H, Inoue T, Takeshita I, Soda K, Hashimoto S: Selective Secretion Of Exosomal Micrnas In A Mice Model Of Bronchial Asthma. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市), 2013.11.13
4. Shintani Y, Maruoka S, Koyama D, Kozu Y, Hiranuma H, Sekiyama T, Gon Y, Hashimoto S: Steroid-Inducible Genes Regulate Airway Epithelial Barrier Function. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市), 2013.11.12
5. Shintani Y, Maruoka S, Koyama D, Kozu Y, Hiranuma H, Sekiyama T, Gon Y, Hashimoto S: Steroid-Inducible Genes Regulate Airway Epithelial Barrier Function. American Thoracic Society International Conference, Philadelphia(USA), 2013.5.21
6. Gon Y, Kozu Y, Maruoka S, Sekiyama A, Terakado M, Tsuboi E, Takeshita I, Hashimoto S: PCDH1, An AHR Susceptibility Gene, Promotes Epithelial Barrier Integrity And Is Induced By Glucocorticoids In The

Human Airway. American Thoracic Society International Conference, Philadelphia(USA), 2013.5.21

7. 神津 悠、榎 寧博、関山晶子、寺門正裕、竹下郁子、松本 健、丸岡秀一郎、橋本 修: 気道過敏性感受性遺伝子である PCDH1 の気道バリア機能における役割, 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区), 2013.4.20
8. 新谷榮崇、丸岡秀一郎、小山大輔、平沼久人、関山忠孝、松本 健、榎 寧博、橋本 修: 気道上皮バリア機能におけるステロイド誘導性遺伝子の役割, 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区), 2013.4.20
9. Gon Y, Hashimoto S, Airway epithelial cells in pathogenesis of asthma. The 17 Congress of the APSR. Hong Kong(China), 2012.12.15
10. 神津 悠、榎 寧博、関山晶子、寺門正裕、竹下郁子、丸岡秀一郎、吸入ステロイドによる気道バリア増強作用による PCDH1 の役割, 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪国際会議場(大阪府、大阪市), 2012.11.30

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 上皮バリア機能の増強剤

発明者: 榎 寧博

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2012-151120

出願年月日: 2012-07-05

国内外の別: 国内のみ

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

なし

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 なし

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

( )

研究者番号：