

気道上皮バリア形成における Nrf2 の役割

(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系呼吸器内科学専攻

新谷 栄崇

2014 年

指導教員 橋本 修

I. 研究の目的

気管支喘息は、気道過敏性亢進、アレルギー性気道炎症や粘液産生細胞の過形成などを起こし、可逆性の気道狭窄をきたす疾患である¹。気管支喘息の免疫学的メカニズムの一つとして、獲得免疫を中心とした Th2(2型ヘルパーT細胞)型免疫応答があり、Th2 サイトカインが産生され、好酸球を中心としたアレルギー性気道炎症、粘液細胞の過形成産生、気道過敏性亢進などの病態を形成する¹。

そのアレルギー性気道炎症に対する治療として吸入ステロイド療法が普及したことにより喘息症状の軽減や Quality of Life の向上、呼吸機能の改善が飛躍的にもたらされた²。しかし未だにステロイド抵抗性の重症気管支喘息も少なくはなく、その治療に難渋することが多い。

気管支喘息の病態に、気道上皮細胞下の樹状細胞やマクロファージなどにおける Toll 様 receptor (TLR)を介した自然免疫が関与していることが報告されている³。気管支喘息の病態に気道上皮細胞が重要な役割を担っており、さらにダニ抗原などのアレルゲンやウイルス、細菌などの環境因子に対する第一の防御機能として気道上皮バリア機能が重要である。気管支喘息患者の気道上皮バリア機能は、健常者と比べると脆弱であると報告されており⁴、気道上皮において細胞間結合装置である tight junction が障害を受けているため、環境因子が容易

に気道内に侵入することとなり、アレルギー性気道炎症を引き起こすと報告されている⁴。

これまでに Terakado, Sekiyama らによって上皮成長因子(epidermal growth factor ; EGF) / 上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor ; EGFR)を介してステロイドが気道上皮バリア機能を増強する作用を有すると報告している^{5,6}が、そのメカニズムはまだ不明なことが多い。今回、そのメカニズムを解明するために網羅的遺伝子解析を行い、治療標的となりうる気道上皮バリア機能増強に関わるステロイド誘導性遺伝子の同定を試みた。

II. 材料と方法

1) 細胞培養

ヒト気道上皮細胞株 (16HBE14 ; 16HBE 細胞と略す)⁷は、10% FBS(fetal bovine serum) (SAFC Biosciences, Lenexa, KS)を含有した Minimum Essential Medium (MEM)で培養した。16HBE 細胞をトランスウェル(Costar, New York, NY)チャンバー上において 1×10^5 cells/cm²で単層培養した。通常培養群に対してデキサメサゾン(DEX)添加群では24時間後に DEX 10^{-6} Mの刺激を行った。

2) 経上皮電気抵抗(Transepithelial electrical resistance ; TER)の測定

16HBE 細胞をトランスウェル(Costar, New York, NY)チャンバー上において 1×10^5 cells/cm² で単層培養した。チャンバー上に置いた電極とトランスウェル内の電極に電流を流し、電気抵抗を連日測定した。細胞層の電気抵抗を測定することによって、細胞層のバリアの形成や変化を測定した。TER は、Millicell-ERS (Millipore Co., Bedford, MA)で測定した。

また、TER (Ohms \times cm²) は、(TER sample – TER blank) \times 表面積で算出した。

3) 傍細胞透過率(Apparent permeability coefficient ;Papp)の測定

FITC-デキストラン溶剤の拡散の程度により、単層細胞の透過性を測定した。培養 3 日目に FITC-デキストランを含む溶液をインサート上層に加え、60 分後にインサート下層から溶液を採取し、フルオロメーターを用いて蛍光測定した。FITC-デキストラン蛍光度は、PTI 蛍光光度計 (excitation ; 492 nm、emission ; 520 nm.) で測定した。デキストラン透過率(Papp)は、以下の通りに算出した⁸。

$$Papp \text{ (cm/s)} = dQ/dt(1/AC_0)$$

(dQ/dt ; 透過率 (μ g/s)、 C_0 ; トランスウェル上層に加えたデキストランの初期

濃度($\mu\text{g/ml}$)、 A :トランスウェルの表面積(cm^2)

4) 網羅的遺伝子解析

16HBE 細胞を、通常培養群と DEX 添加群に分けて 3 日間培養した。培養第 0,3 日に QIAGEN RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA)を用いて 16HBE 細胞から total RNA を抽出した。RNA のサンプル調整は The Ambion® WT Expression Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) 、GeneChip WT Terminal Labeling Kit を用いて製品プロトコールに従い行った。ジーンチップは Gene Chip HU Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix)を用いた。アレイへのハイブリダイゼーションを行い、Genechip Fluidics Station 450, Genechip Scanner 3000(Affymetrix)を用いて蛍光強度を測定し、数値化した。得られた遺伝子データを Gene Spring 12.5 software (Agilent Technologies UK Limited, South Queensferry, UK) を用いて統計学的解析を行い、バリア機能増強候補遺伝子を同定した。更に IPA (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA, USA)を用いてパスウェイ解析を行った。

5) siRNA トランスフェクション

16HBE 細胞にバリア機能増強候補遺伝子の siRNA(small interference RNA)

を Lipofectamine™ RNAiMAX (life technologies) を用いてトランスフェクションし、24 時間後、トランスウェルチャンバー上に移し、DEX を添加した培養液で培養し、TER を測定することでバリア機能への影響を検討した。

6) 蛍光免疫染色

16HBE 細胞を単層培養後、37°C で 60 分間 4% パラホルムアルデヒドで処理した。PBS にて洗浄を行い、3% のウシ血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin) を添加し 10 分間室温でブロッキングした。その後、さらに PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma) で洗浄を行った後、一次抗体として、抗ヒト zonula occludens-1 (ZO-1) マウスモノクローナル抗体 (Zymed Laboratories Inc. San Francisco, CA)、抗ヒト occludin (OCLN) マウスモノクローナル抗体 (Zymed Laboratories)、抗ヒト E-cadherin (E-cad) ラビットポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, MA) を用い、二次抗体は抗マウス IgG 抗体 Alexa 488,594 と抗ウサギ IgG 抗体 Alexa 488,594 (life technologies) で反応させた。蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

III. 結果

16HBE 細胞を用いて DEX による TER の経時的変化と FITC-デキストラン

透過率を測定し、DEX による気道上皮バリア機能増強作用を確認した。次に DEX による気道上皮バリア機能増強のメカニズムを同定するために 16HBE 細胞から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子解析を行った。通常の気道上皮バリア形成およびステロイド添加によって発現が亢進する遺伝子が 16 遺伝子、減弱する遺伝子が 5 遺伝子同定された。DNA マイクロアレイで得られた気道上皮バリア形成、増強に関わる遺伝子群にもっとも関与しているパスウェイを同定するために IPA を用いて解析した。その結果、NRF2-mediated Oxidative Stress Response が古典的経路の最上位にあげられた。次に Nrf2 がバリア機能増強に実際に関与しているのか検討するために特異的 siRNA を用いて Nrf2 遺伝子のノックダウンを行い、DEX による TER の経時的変化と FITC-デキストラン透過率を測定した。さらに、気道上皮バリア形成および増強における Nrf2 の役割を評価するために、Nrf2 をノックダウンし、気道上皮バリアを形成する接着結合、密着結合の形態的变化を蛍光顕微鏡でみた。その結果、Nrf2 をノックダウンすることで気道上皮バリア形成およびステロイドによる気道上皮バリア機能増強が抑制されることが確認された。

IV. 考察

近年、気管支喘息の発症や病態に気道上皮バリアの脆弱性が関与していると

考えられるようになってきている⁹。これまでに Sekiyama らは DEX による EGFR へのリガンド結合活性の促進作用が気道上皮バリア機能増強に関与している可能性があるとして報告している⁶。しかし、ステロイドによる気道上皮バリア機能増強のメカニズムについては明らかにされていないことが多い。そこで今回網羅的遺伝子解析を行い、気道上皮バリア機能増強に関わるステロイド誘導性遺伝子の同定を試み、16 遺伝子を同定した。さらに、それらの遺伝子群の上流または下流に存在するシグナル経路を同定するためにパスウェイ解析を行った結果、バリア機能増強に Nrf2 経路が関与している可能性を見いだした。次に特異的 siRNA を用いて Nrf2 遺伝子のノックダウンを行い、気道上皮バリア機能への関与を検討した結果、Nrf2 が気道上皮バリア機能増強に関与している可能性が示唆された。

Nrf2 は抗酸化作用を有する、塩基性ロイシンジッパー(b-Zip)構造を持つ転写因子である¹⁰。気管支喘息では、様々な環境因子により活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)が増加しており、酸化ストレスが病態形成に影響を及ぼすと言われている¹¹。卵白アルブミンを用いた気管支喘息モデルにおいて、Nrf2 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、アレルギー性気道炎症が重症化しやすいという報告¹²より、Nrf2 は抗酸化作用によりアレルギー性気道炎症を抑制的に制御している可能性がある。アレルギー性気道炎症だけでなく、気

道上皮バリア形成が気管支喘息の発症機序の一つとして注目されており、今回の結果より Nrf2 は抗酸化作用だけでなく、気道上皮バリア機能形成および増強に関わる新たな気管支喘息の治療標的分子となる可能性が示唆された。

V. 引用文献

1. 喘息予防・管理ガイドライン 2012: 社団法人日本アレルギー学会喘息ガイドライン専門部会監修. 東京: 協和企画; 2012.
2. Suissa, S., Ernst, P., Benayoun, S., Baltzan, M. & Cai, B. Low-dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma. *The New England journal of medicine* 343, 332-336 (2000).
3. Hammad, H., *et al.* House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nature medicine* 15, 410-416 (2009).
4. Holgate, S.T. Epithelium dysfunction in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120, 1233-1244; quiz 1245-1236 (2007).
5. Terakado, M., *et al.* The Rac1/JNK pathway is critical for EGFR-dependent barrier formation in human airway epithelial cells.

- American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 300, L56-63 (2011).
6. Sekiyama, A., *et al.* Glucocorticoids enhance airway epithelial barrier integrity. *International immunopharmacology* 12, 350-357 (2012).
 7. Kelly, C., *et al.* Toll-like receptor 4 is not targeted to the lysosome in cystic fibrosis airway epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 304, L371-382 (2013).
 8. Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S. & Illum, L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharmaceutical research* 11, 1358-1361 (1994).
 9. Xiao, C., *et al.* Defective epithelial barrier function in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128, 549-556 e541-512 (2011).
 10. Motohashi, H. & Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in molecular medicine* 10, 549-557 (2004).
 11. Andreadis, A.A., Hazen, S.L., Comhair, S.A. & Erzurum, S.C. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free radical biology &*

medicine 35, 213-225 (2003).

12. Rangasamy, T., *et al.* Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *The Journal of experimental medicine* 202, 47-59 (2005).