

喘息病態における気道上皮前駆細胞の役割

丸岡秀一郎¹⁾, 権 寧博¹⁾

The role of bronchial epithelial progenitor cell in the pathogenesis of asthma

Shuichiro MARUOKA¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾

要旨

喘息の病態形成に上皮バリア機能が重要な役割を担っている。本研究の目的は、気道上皮細胞の前駆細胞である基底細胞に着目し、喘息病態に関与する環境因子の代表であるウイルス感染による上皮バリアの脆弱化機序を解明し、喘息病態形成につながる分子病態を明らかにすることである。ヒト正常気管支上皮細胞 (NHBE) の初期段階および気道基底細胞株 VA10 に、ウイルス感染を模倣する dsRNA を刺激したところ、上皮バリアが減弱した。以上より dsRNA は基底細胞に作用し、気道上皮バリアを減弱させる。基底細胞へのウイルス感染が、その後の上皮バリア形成を減弱させ、喘息病態形成に関与する可能性が示唆された。

1. はじめに

喘息は、世界的に増加傾向にある呼吸器疾患であり、現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。喘息病態にはいまだに不明な点が多く、新たな治療につながる病態解明は急務である。近年、喘息の病態形成に上皮細胞のバリア機能の脆弱性が注目されている¹⁾。著者は、これまでヒト気道上皮細胞株を用いて喘息病態における気道上皮バリア機能形成、増強の機序を明らかにしてきた^{2), 3)}。その研究過程で、様々な環境因子 (ハウスダストダニ抗原 (House Dust Mite:HDM) や細菌感染, ウイルス感染など) が気道上皮の分化及び上皮バリア機能形成の早期段階に影響することが、バリアの脆弱化の決定要因となっていることが推測された。気道基底細胞は、気道上皮細胞への分化能を有する前駆細胞であり、喘息のみならず、呼吸器疾患の発症に関与するといわれている⁴⁾ が、喘息病態における上皮バリア脆弱化メカニズムについての詳細な検討はなされていない。

本研究の目的は、気道上皮前駆細胞である基底細胞に着目し、喘息病態に関与する気道上皮細胞バリア脆弱化の分子メカニズムを解明し、臨床的意義を見出す基盤となる成果をあげることである。今回はウイルス感染に焦点をあて、ウイルス感染を模倣する double-strand RNA (dsRNA) 刺激による上皮バリア形成に及ぼす影響についてヒト正常気管支上皮細胞 (NHBE) および気道基底細胞株 VA10 を用いて検討した。

2. 対象及び方法

細胞および培養

NHBE, VA10 は Transwell 上で 3 日間培養液中で培養 (Liquid-covered culture: LCC) した後、気道上皮細胞への分化を誘導する培養系 Air Liquid Interface (ALI) を用いて培養した。

気道基底細胞マーカーの発現確認

LCC 下の NHBE をスライドガラスに付着させ、

1) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野
丸岡秀一郎: maruoka.shuichiro@nihon-u.ac.jp

4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、基底細胞のマーカーである抗CK5抗体、抗CK14抗体を1次抗体、2次抗体を抗マウスIgG抗体 Alexa Fluor 488として蛍光免疫染色を行なった。また、確認のためVA10についても同様に行なった。

上皮バリア機能測定

上皮バリア機能はTrans Electric Resistance (TER)を用いて経時的に測定した。また、傍細胞透過率 (Apparent permeability coefficient : Papp) を測定した。

統計学的解析

データは、平均値±標準偏差値 (SD) で記載した。実験群間の統計的有意性は、2群の値においては Student's t検定を用いて評価し、多群間の比較においてはANOVA検定を行い、* P < 0.05を有意とし

た。データはGraphPad Prism Software (La Jolla, California, USA) を用いて解析、作図をした。

3. 結果

LCCの3日間のみには dsRNA (poly (I:C) 10ug/ml) で刺激し、その後、poly (I:C) 非存在下のALIで上皮バリア機能を測定した (図1A)。LCC下でのNHBEは、基底細胞のマーカーであるCK5, CK14陽性細胞であった (図1 B)。このLCC下でのpoly (I:C) 刺激群はコントロール群と比較してALI培養下のNHBEのTER減弱を認めた (図1 C)。気道基底細胞株であるVA10は、CK5, CK14陽性細胞であり、LCC下でのpoly (I:C) 刺激群はコントロール群と比較してALI培養下のVA10のTER減弱および傍細胞透過率の亢進を認めた (図2 A, B)。

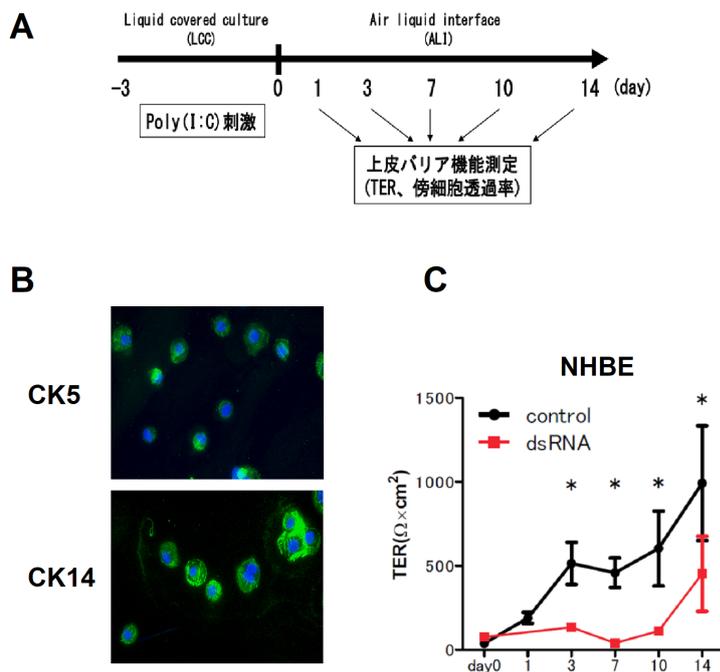


図1 NHBEの初期に存在する基底細胞へのdsRNA刺激は上皮バリア機能を脆弱化する

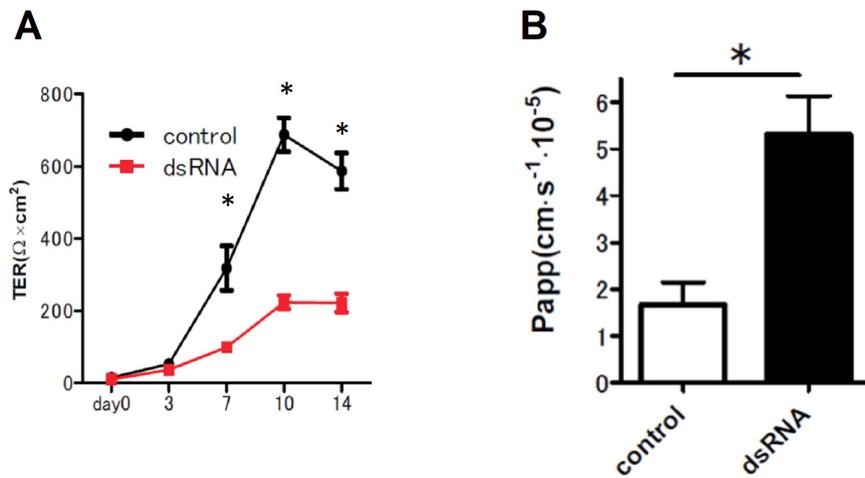


図2 気道基底細胞株 (VA10) への dsRNA 刺激は上皮バリア機能を脆弱化する

4. 考 察

以上より気道基底細胞への poly (I:C) 刺激は、上皮バリアの脆弱化を惹起することが証明された。

5. 結 語

dsRNAは気道上皮分化誘導前の基底細胞に作用し、気道上皮バリアを減弱させる。基底細胞へのウイルス感染が、その後の上皮バリア形成を減弱させ、喘息病態形成に関与する可能性が示唆された。

今後は、dsRNAによる上皮バリアの脆弱化の分子病態を解明するために、VA10におけるサイトカイン、ケモカインプロファイル解析、網羅的遺伝子発現解析などを行う。これにより、前駆細胞におけるバリア機能形成、上皮分化に関与する分子病態に関与する標的分子の同定を試みる。また、喘息病態形成に関与するその他の環境因子 (HDM, ATP, 細菌構造物質 (LPS, フラジェリン, CpG) など) についても随時解析を進めていく予定である。

文 献

- 1) Xiao C, Puddicombe SM, Field S, Haywood J, Broughton-Head V, Puxeddu I, Haitchi HM, Vernon-Wilson E, Sammut D, Bedke N, Cremin C, Sones J, Djukanovic R, Howarth PH, Collins JE, Holgate ST, Monk P, Davies DE : Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128:549-556 e541-512, 2011.
- 2) Gon Y, Maruoka S, Kishi H, Kozu Y, Kuroda K, Mizumura K, Nomura Y, Oshima T, Hashimoto S : DsRNA disrupts airway epithelial barrier integrity through down-regulation of claudin members. *Allergol Int* 65 Suppl:S56-58, 2016.
- 3) Shintani Y, Maruoka S, Gon Y, Koyama D, Yoshida A, Kozu Y, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) regulates airway epithelial barrier integrity. *Allergol Int* 64 Suppl:S54-63, 2015.
- 4) Rock JR, Randell SH, Hogan BL : Airway basal stem cells : a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech* 3:545-556, 2010.