

Short Report

MUC5AC ムチンの産生に及ぼすラミニン/インテグリン経路の影響

岩下淳, 高橋直, 村田純

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

喘息や COPD 患者の気道では粘液を構成するムチン MUC5AC が過剰に産生され、気道閉塞、呼吸困難等の症状が誘発される。我々はヒト気道初代細胞及び、ヒト気道上皮細胞株を用いて細胞外マトリックスからのシグナルが、インテグリンや ERK 経路等を介して MUC5AC の産生を制御することを報告してきた。その中で、代表的な細胞外マトリックスの一つであるラミニンからのシグナルが、MUC5AC ムチンの産成を増加させることを示した。しかし、どのような機構でラミニンが MUC5AC の産成を増加させるか未だ明らかになっていない。我々は本研究でヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 を用いて、ラミニンが MUC5AC の産成を制御する分子機構を解析した。ラミニンなど細胞外マトリックスからのシグナルは、主にインテグリン/PI3K/Akt シグナルを介して細胞内に伝達される。定量 RT-PCR 法を用いた解析で、NCI-H292 ではインテグリン $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ などのサブユニットが発現していた。各サブユニットに対する抗体を用いて、その機能を阻害した結果、 $\beta 3$, $\beta 4$ を阻害した場合にラミニンによる MUC5AC の増加が抑制された。さらにインテグリンにより活性化される PI3K の阻害も、ラミニンによる MUC5AC の増加を抑制した。それに対し Akt の阻害はラミニンによる MUC5AC 産成を、さらに増加させた。これらの結果から、ラミニンによる MUC5AC 産成の増加はインテグリン $\beta 3$, $\beta 4$ サブユニット、そして PI3K を介して細胞内に伝わり MUC5AC を増加させる。そして Akt の活性はラミニンによる MUC5AC の増加を抑制していることが示唆された。

キーワード：喘息, MUC5AC, ラミニン, インテグリン, PI3K, Akt

気道表面を覆う粘液の主成分であるムチンタンパク質は物理的な生体防御に重要な役割を果たす (Fahy et al., 2010)。しかし喘息や COPD 患者の気道では、ムチンの一種である MUC5AC が過剰に産生されて閉塞し、呼吸を困難にする (Fahy et al., 2002; Rose et al., 2006; Lai et al., 2010; Button et al., 2012)。我々は喘息症状悪化の原因となる MUC5AC ムチンの産生の制御機構を明らかにして、その分泌を減らし、症状の予防、改善を目的とした研究を行ってきた。

我々はこれまでにヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 において、細胞外マトリックス (ECM) からのシグナルが、粘液ムチン MUC5AC 及び MUC5B の産生を制御することを発見した (Iwashita et al., 2011; Ito et al., 2015; Iwashita et al., 2016)。代表的な ECM 構成

タンパク質である 4 型コラーゲンからのシグナルは MUC5AC を減少させる (Iwashita et al., 2010)。この減少には細胞と ECM を結ぶ接着分子インテグリン、そしてその下流にある Akt や ERK キナーゼが介在している (Iwashita et al., 2013; Iwashita et al., 2014)。

4 型コラーゲンからのシグナルが MUC5AC を減少させるのに対し、ラミニンからのシグナルは MUC5AC を増加させる (Iwashita et al., 2011)。しかしどのような機構によってラミニンからのシグナルが MUC5AC の産成を増加させるかについては、不明な点が多く残っている。

ECM はインテグリン分子を介して細胞と接着する。インテグリンは α と β の二つのサブユニットで構成されるヘテロダイマーの膜タンパク質である。このうち β サブユニットには、細胞内シグナル伝達

分子の結合部位が存在していることから、シグナル伝達に大きく関与していると考えられる。インテグリンの下流にある主な経路には、細胞内で働く PI3K や Akt などのシグナル伝達分子がある。

これまでの研究によって ECM とインテグリンの接着が MUC5AC の産生量に影響を与える事が示されている。このことから、本研究ではラミニンによる MUC5AC 産生制御機構についてヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 を用いて解析を行なった。シグナル伝達に関与する可能性があるインテグリンの β サブユニットと、その下流の主要なシグナル伝達分子である PI3K, Akt の阻害実験を行い、ラミニンによる MUC5AC 産生増加への影響を解析したので報告する。

材料と方法

細胞培養

ヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 を 37°C, 5%CO₂ の恒温器 (ShinMaywa, Japan) で培養した。細胞はトリプシン-EDTA 2 ml をフラスコに添加し、10 分間 37°C 処理した後 1200rpm, 4°C で 10 分遠心して細胞を集め、その一部を継代培養に用いた。

ヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 : Human mucoepidermoid pulmonary carcinoma

Culture Medium: RPMI1640medium (SIGMA, Missouri, USA)

1%penicillin-streptomycin (GibcoOriental, Tokyo, Japan)

10% fetal bovine serum (cell culture technologies, Switzerland)

トリプシン-EDTA : Trypsin-EDTA (Gibco Oriental, Tokyo, Japan)

FCS の濃度

NCI-H292 細胞の密度を 1.0×10^4 cells/100 μ l に調整し、異なる FCS 濃度 (0.5, 10%) のメディアウムで、PBS (CNTL) またはラミニン (LM; 50 μ g/ml, BD, CA, USA) をコートした 96well プレートで 30 時間培養した。Dot blot 法により、MUC5AC を検出した。

RNA の抽出

細胞に TRIZOL solution (株式会社インビトロゲン Tokyo Japan) を 1 mL 加え、ピペッティングして溶解した。約 5 分放置し、クロロホルムを 200 μ l 加えた。3 分放置した後、高速微量遠心機を用いて 15 分、4 度、15K rpm で遠心した。上清を新しい 1.5 mL チューブに移しイソプロパノールを 500 μ l 加え、10 分放置した後、高速微量遠心機を用いて 15 分、4 度、15 K rpm で遠心した。上清を捨て、ペレットに 1mL の 75%エタノールを加え、高速微量遠心機を用いて 15 分、4 度、15 K rpm で遠心した。dH₂O を 100 μ l 加えタッピングにより混和したのち、溶液中の RNA 濃度を Nano Drop により測定した。

定量 RT-PCR

RT-PCR 試薬 (QuantitectTMSYBR Green RT-PCR Master Mix 10 μ l, QuantiTectTM RT Mix 0.2 μ l, 10pmol sense primer 1 μ l, 10pmol antisense primer 1 μ l, dH₂O 3.8 μ l, Total Volume 16 μ l) を作成した。LightCycler capillaries (キャピラリー) をサンプル数分 LightCycler Centrifuge Adapters に立てた。各キャピラリーに濃度を調節した RNA サンプルを 4 μ l ずつ加え、計 20 μ l として遠心を行った。LightCycler (Roche Diagnostics, Switzerland) で定量 RT-PCR を行った。定量 RT-PCR の条件は逆転写 50°C 20min, initial activation 95°C 15min, PCR を 94°C 15sec, 60°C 20sec, 72°C 20sec のサイクルを 45 回繰り返した。定量 RT-PCR 終了後、サンプルを回収し、1.5%アガロースゲルを用いて泳動した。泳動したゲルを FASIII (TOYOBO) によって撮影した。

使用した Primer の塩基配列

integrinbeta1SE: AAG TTT CAA GGG CAA ACG TG (ファスマック)

integrinbeta1AS: GGG GTA ATT TGT CCC GAC TT (ファスマック)

integrinbeta3SE: CCG TGA CGA GAT TGA GTC A (エキシジェン)

integrinbeta3AS: AGG ATG GAC TTT CCA CTA GAA (エキシジェン)

integrinbeta4SE: AGA CGA GAT GTT CAG GGA

CC (エキシジェン)

integrinbeta4AS: GGT CTC CTC TGT GAT TTG

GAA (エキシジェン)

integrinbeta5SE: GGA GCC AGA GTG TGG AAA

CA (エキシジェン)

integrinbeta5AS: GAA ACT TTG CAA ACT CCC TC

(エキシジェン)

NCI-H292 細胞におけるインテグリン β サブユニットの検出

ヒトインテグリンの $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ サブユニットの primer を用いて RT-PCR を行った。定量 PCR (qRT-PCR) によって得られたサンプルを回収し、1.5%アガロースゲルで泳動し、FASIII (TOYOBO) によって cDNA 断片を検出した。

抗体を用いたインテグリンの阻害

ラミニン (50 $\mu\text{g/ml}$) または PBS (CNTL) を 96 穴プレートに 100 μl ずつ添加し、一晩コーティングした。NCI-H292 細胞を 1×10^4 cells/well に調整し、1 μl /100 μl になるように抗インテグリン抗体を加えた後、100 μl ずつ 96 well plate (Sumilon, Tokyo, Japan) に播種した。コントロールも同様に調製した NCI-H292 細胞に、同量の Mouse IgG を加え 100 μl ずつ播種した。30 時間培養後、0.1%SDS in TBS-T を 100 μl ずつ加えサンプルとした。Dot blot 法により、MUC5AC を検出した。

抗インテグリン抗体：

Integrin beta1 Rabbit Ab (Cell Signaling, MA, USA),

Integrin beta3 Rabbit Ab (Cell Signaling, MA, USA),

Integrin beta4 Rabbit Ab (Cell Signaling, MA, USA),

Integrin beta5 Rabbit Ab (Cell Signaling, MA, USA)

PI3K の阻害

NCI-H292 細胞を 1.0×10^4 cells/100 μl に調整し、PI3K の阻害剤である LY294002 を 25 μM の濃度で、CNTL として DMSO を加えた。ラミニン (50 $\mu\text{g/ml}$) または PBS (CNTL) を 100 μl ずつ添加し、一晩コーティングした 96 穴プレートに各々の NCI-H292 細胞を 100 μl ずつ播種した。37°C で 30 時間培養後、

Dot Blot を用いて MUC5AC タンパク質を検出した。

免疫蛍光抗体法

NCI-H292 細胞を 1.0×10^4 cells/100 μl に調整し、そこに溶媒コントロールの DMSO 或いは Akt の阻害剤である Akt inhibitor I (Invitrogen, CA, USA) を 20 μM の濃度で加えた。ラミニン (50 $\mu\text{g/ml}$)、PBS (CNTL) を 100 μl ずつ添加し、一晩コーティングしたプレートに各々の NCI-H292 細胞を 100 μl ずつ播種した。37°C で 30 時間培養後、培養液を除去し、固定液 (4%パラホルムアルデヒド) を 140 μl 添加し、30 分間静置した。固定液を除去し、PBS で 3 回洗浄した。透過液 (0.5% Triton X-100 in PBS) 150 μl を添加し、10 分間静置し、PBS で 3 回洗浄した。Blocking solution を 150 μl 添加し、1 時間静置した。Blocking solution を除去し、1.0% BSA in PBS で希釈した一次抗体を 150 μl を添加し、一晩静置した。一次抗体を除去し、1.0% BSA in PBS で希釈した蛍光標識二次抗体を 100 μl 加え、2 時間静置した。二次抗体を除去し、PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡で撮影した。

Dot Blot 法

PVDF 膜を 1 分間メタノールに浸した後、10 分間 $\times 2$ 回 TBS-T 溶液の中に静置した。メンブレンを Dot Blot 装置 (Scie-Plas) にセットし、ピペットで 40 μl のサンプルを加えた。PVDF 膜に 4%スキムミルクを加え、4°C で一晩あるいは常温で 1 時間ブロッキングした。

PVDF 膜 : Immobilon-transfer Membranes (0.45 μm pore size, MILLIPORE)

TBS 溶液 : 0.02 M Tris-HCL (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 0.1 % Tween-20

4%スキムミルク : 4% skim milk (Wako) in TBS-T

ブロッキングした PVDF 膜を一次抗体である抗 MUC5AC 抗体 (1:2000) に 1 時間室温で浸した。5 分間 $\times 5$ 回 TBS-T 溶液で振とうさせながら洗浄した。二次抗体である ECL 抗マウス IgG HRP 標識抗体で 1 時間浸した。5 分間 $\times 5$ 回 TBS-T 溶液で振とうさせながら洗浄した。PVDF 膜を ECL 液 (Amersham Biosciences) で 1 分間処理し、LAS-4000 plus image

analyzer (FUJI FILM) でムチンタンパク質のスポットを検出した。

一次抗体 : Mouse Monoclonal Anti MUC5AC Antibody (Clone45M1) (Thermo SCIENTIFIC, Kanagawa, Japan)
 二次抗体 : ECL Anti-Mouse IgG (GE Healthcare, Tokyo, Japan)

結果

FCS 濃度の MUC5AC 産成への影響

細胞培養に用いる FCS にはラミニンなどの ECM 成分が含まれており, MUC5AC 産生に影響を及ぼす可能性がある。そのため, 最初に FCS 濃度と MUC5AC 産成の関係を解析するために以下の実験を行った。1×10⁴ cells/well に調整した NCI-H292 細胞を異なる FCS 濃度(0.5, 10%)で 30 時間培養後, Dot Blot 法で MUC5AC 産生量を検出した。その結果, 10%FCS 存在下で培養した細胞が MUC5AC を多く産成した。またいずれの FCS 濃度でも, ラミニン上での MUC5AC 産生増加が見られた (図 1)。これらの結果から以降の実験では, 培養液に含まれる FCS に含まれる ECM 成分の影響を最小にするため, 30 時間培養する際の FCS 濃度は 0.5%を用いた。

インテグリンβサブユニットに特異的な primer

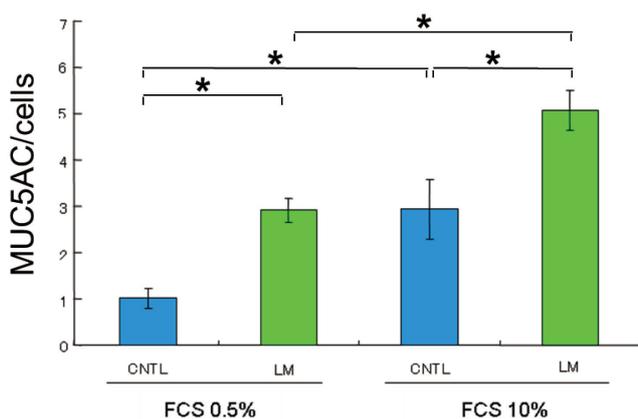


図 1 FCS 濃度による MUC5AC 産成への影響

細胞を 1.0×10⁴cells/100μl に調整し, FCS 濃度 0.5%, 10%の培養液で, PBS (CNTL)またはラミニン (LM) でコートした 96well プレートで 30 時間培養し, Dot blot 法により, MUC5AC を検出した。* : p < 0.05

NCI-H292 細胞におけるインテグリンβサブユニットの発現

を用いて, 定量 RT-PCR を行い, NCI-H292 細胞におけるインテグリンサブユニットβ3, β4, β5 mRNA の発現を検出した。その結果, インテグリンサブユニットβ3, β4, β5 の増幅が検出された (図 2)。

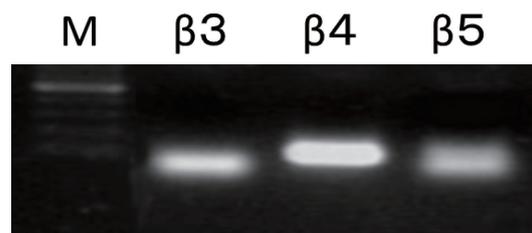


図 2 インテグリンβ3, β4, β5 mRNA の発現
 インテグリンβ3, β4, β5 サブユニットに対する primer を用いて定量 RT-PCR を行いマーカーDNA (M) と共に電気泳導して cDNA を検出した。

インテグリンの阻害による MUC5AC 産成への影響

インテグリンに対する抗体を用いて, インテグリンの機能を阻害し, PCR で検出されたβ3, β4, β5 各サブユニットの機能阻害を行った。NCI-H292 細胞に抗インテグリン抗体を加え, 底面を PBS で処理,

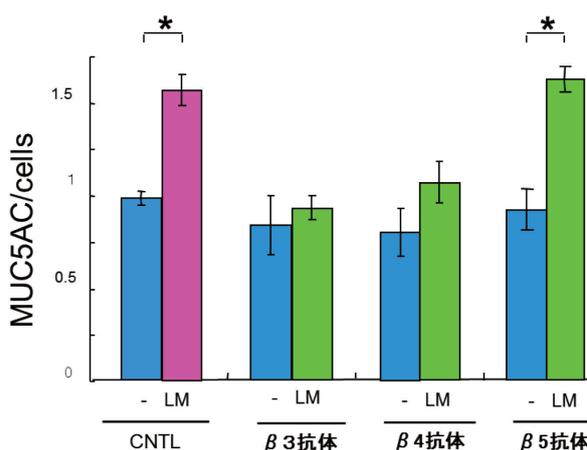


図 3 インテグリンβサブユニットの阻害による MUC5AC 産成への影響

LM または PBS (CNTL) でコートしたプレート上で NCI-H292 細胞を阻害抗体又は Mouse IgG と共に 30 時間培養した後, サンプルングを行い, Dot blot 法により, MUC5AC を検出した。* : p < 0.05

またはラミニンでコートした 96 穴プレート上で 30 時間培養し、MUC5AC のタンパク質量を測定した。その結果、 $\beta 3$ と $\beta 4$ の阻害によってラミニン上で培養された細胞における MUC5AC 産生が抑制された (図 3)。しかし $\beta 5$ の阻害では MUC5AC の抑制は観察されなかった。

PI3K の阻害による MUC5AC 産成への影響

NCI-H292 細胞を 1×10^4 cells/well に調整し、インテグリンの下流に位置する PI3K の阻害剤である LY294002 を加え、底面を PBS で処理、またはラミニンでコートした 96 穴プレート上で 30 時間培養した。培養後、細胞中の MUC5AC のタンパク質量を測定した。その結果、PBS 処理とラミニン上の両方で、LY294002 により MUC5AC 産生が減少した (図 4)。この結果はラミニン上における MUC5AC 産成の増加に PI3K の活性化が関与している可能性を示している。

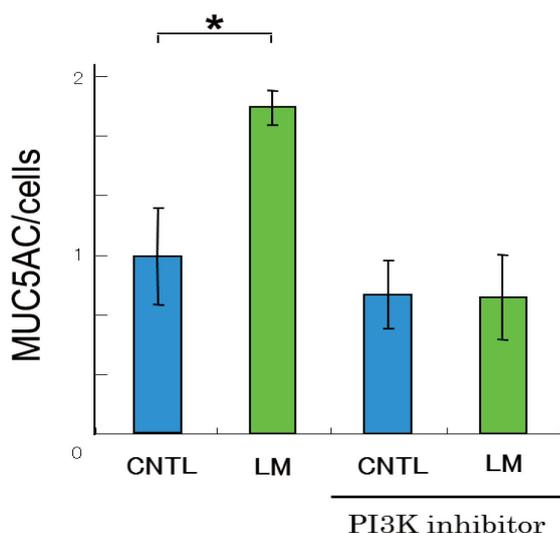


図 4 PI3K の阻害による MUC5AC 産成への影響

LM または PBS (CNTL) でコートしたプレート上で NCI-H292 細胞を PI3K の阻害剤である LY294002 ($25 \mu\text{M}$)、CNTL として DMSO と共に 30 時間培養した後、サンプリングを行い、Dot blot 法により MUC5AC を検出した。* : $p < 0.05$

Akt 阻害による MUC5AC の免疫染色

NCI-H292 細胞の密度を 1×10^4 cells/well になるように調整し、そこに PI3K の下流に位置する Akt の

阻害剤である Akt inhibitor I を加え、底面を PBS で処理、またはラミニンでコートした 96 穴プレート上で 30 時間培養した。培養後、MUC5AC に特異的な抗体を用いて、免疫染色を行った。その結果、CNTL と比較し、Akt inhibitor I を加えた場合では MUC5AC 産生が増加し、ラミニン上ではさらに MUC5AC 産成が増加した (図 5)。この結果はラミニン上における MUC5AC 産成の増加を Akt の活性が抑制している可能性を示している。

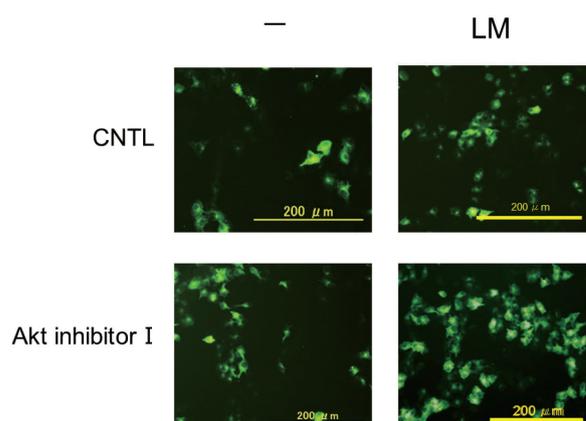


図 5 Akt 阻害による MUC5AC 産成への影響

LM または PBS (CNTL) でコートしたプレート上で NCI-H292 細胞を Akt の阻害剤である Akt inhibitor I ($20 \mu\text{M}$)、CNTL として DMSO と共に 30 時間培養した後、固定し、MUC5AC に特異的な抗体を用いて、免疫染色を行った。

考察

喘息や COPD 患者の気道では MUC5AC ムチンが過剰に分泌され、呼吸を困難にする一因となる。MUC5AC ムチンの抑制は喘息症状の緩和につながると考え、我々はこれまでヒト気道上皮細胞株 NCI-H292、及び喘息患者気道から抽出した初代細胞の実験系 MucilAir を用いて MUC5AC 産生機構の解析を行ってきた。その結果、培養細胞株、初代細胞双方において ECM からのシグナルに関与するインテグリンの活性化が MUC5AC 産生を抑制する、そしてインテグリン経路の主要なキナーゼである Akt が MUC5AC 産生を抑制し、MEK/ERK 経路は MUC5AC 産生を増加させることを報告した。

ヒト喘息患者などの気道では大きな ECM 成分の

構成変動が起きることがこれまでに報告されている。その中では 4 型コラーゲンに加えてラミニンの変化も報告されている (Chung et al., 2000, Johnson et al., 2001, Christie et al., 2004)。ラミニンの増加は MUC5AC 産成を増加させるが、この機構についての解析は行なわれていない。我々の今回の結果から、NCI-H292 細胞にはインテグリン $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ などのサブユニットが発現していることが明らかとなった (図 2)。これらのサブユニットを抗体で阻害したところ、インテグリン $\beta 3$, $\beta 4$ の阻害でラミニンによる MUC5AC の増加が抑制された。この結果はラミニンによる MUC5AC の増加にインテグリン $\beta 3$, $\beta 4$ サブユニットが関与するが、 $\beta 5$ は関与しないことを示唆している (図 3)。次にインテグリンシグナル経路の下流に位置する PI3K の関与を調べたところ、PI3K の阻害によってもラミニンによる MUC5AC の増加が抑制された (図 4)。これらの結果はインテグリン $\beta 3$ や $\beta 4$ の活性化が PI3K を介して細胞内に伝わり、MUC5AC の増加を誘起することを示唆している。また PI3K などにより活性が変化する Akt の阻害は細胞における MUC5AC の産成を増加させ、さらにラミニンによる MUC5AC の増加をさらに加速した。この結果は、Akt はラミニンによる MUC5AC 産成の増加を抑える働きを持つ可能性を示している。

今回の解析によって、ラミニンからのシグナルがインテグリン $\beta 3$, $\beta 4$ と PI3K/Akt シグナルを介して細胞内に伝わり、MUC5AC を増加させることが示唆された。喘息や COPD の症状緩和という観点からは、インテグリン $\beta 3$, $\beta 4$, PI3K の阻害そして、Akt の活性化などが、気道における MUC5AC の過剰産生の抑制に効果的である可能性が示された。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 30 年度学長プロジェクト(創造的研究費)によって行われたものであり、ここに謝意を表します。

文献

Button, B., Cai, L. H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D. B.,

Sheehan, J. K., Boucher, R. C., and Rubinstein, M. (2012). A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science (New York, N.Y.)*, **337**, 937-941.

Christie, P. E., Jonas, M., Tsai, C. H., Chi, E. Y., and Henderson, W. R., Jr. (2004) Increase in laminin expression in allergic airway remodelling and decrease by dexamethasone. *Eur Respir J*, **24**, 107-115.

Chung, K. F. (2000) Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J*, **15**, 961-968.

Fahy, J. V. (2002) Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. *Chest*, **122**, 320S-326S.

Fahy, J. V., and Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine*, **363**, 2233-2247.

Halper, J and Kjaer M.(2014). Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*, **802**,31-47.

Ito, Y., Iwashita, J., Kudoh, A., Kuramata, C., and Murata, J. (2015). MUC5B mucin production is upregulated by fibronectin and laminin in human lung epithelial cells via the integrin and ERK dependent pathway. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **79**, 1794-1801.

Iwashita, J., Yamamoto, T., Sasaki, Y., and Abe, T. (2010). MUC5AC production is downregulated in NCI-H292 lung cancer cells cultured on type-IV collagen. *Molecular and cellular biochemistry*, **337**, 65-75.

Iwashita, J., Ose, K., Ito, H., Murata, J., and Abe, T. (2011). Inhibition of E-cadherin dependent cell-cell contact promotes MUC5AC mucin production through the activation of epidermal growth factor receptors. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **75**, 688-693.

Iwashita, J., Hongo, K., Ito Y, Abe T, Murata J. (2013). Regulation of MUC5AC mucin production by the

cell attachment dependent pathway involving integrin β 1 in NCI-H292 human lung epithelial cells. *Advances in Biological Chemistry*, **3**, 1-10.

Iwashita, J., Ito, Y., Yokoo, M., Takahashi, S., and Murata, J. (2014). Akt induces down regulation of MUC5AC production in NCI-H292 human airway epithelial cells cultured on extracellular matrix. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **78**, 212-221.

Iwashita, J., Ito, Y., Kudou, A., Murata, J. (2016). MUC5B production is unaffected by Akt inhibition in human lung epithelial NCI-H292 cells. *Advances in Biological Chemistry*, **6**, 35-42.

Johnson, P. R. (2001) Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **28**, 233-236.

Lai, H. Y., and Rogers, D. F. (2010). Mucus hypersecretion in asthma: intracellular signalling pathways as targets for pharmacotherapy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, **10**, 67-76.

Rose, M. C., and Voynow, J. A. (2006). Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological reviews*, **86**, 245-278.

〔 2019年6月30日受付 〕
〔 2019年7月9日受理 〕

The regulation of the MUC5AC production by the laminin/integrin pathway in the human lung epithelial cell line

Jun Iwashita, Sunao Takahashi, Jun Murata

Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

Asthma or COPD is defined as a chronic inflammatory disease of the airways, and causes breathing problems. These diseases are characterized by the presence of lung inflammation, the release of inflammatory cytokines, and the hypersecretion of MUC5AC mucin in the airway. In our previous study, we found that laminin, an extra cellular matrix (ECM) protein, increases MUC5AC production in the human airway cell line. However, the mechanism incrementing MUC5AC production by laminin remained unclear. In this study, we investigated the molecular mechanism incrementing MUC5AC production by laminin in the NCI-H292 human lung epithelial cell line. The association of cells to the ECM molecule, e.g., laminin, was mediated by the integrin/PI3K/Akt signaling pathway. In NCI-H292 cells, the expression of mRNA integrin β 3, β 4, and β 5 subunits was detected. The inhibition of integrin β 3 and β 4 subunits suppressed the increase of MUC5AC production induced by laminin, but the inhibition of the β 5 subunit did not. The inhibition of PI3K also suppressed the increase in MUC5AC production induced by laminin. In contrast, the inhibition of Akt promoted an increase in MUC5AC production induced by laminin. These results suggest that laminin increases MUC5AC production with integrin β 3 and β 4 subunits via PI3K, and Akt suppresses MUC5AC overproduction by laminin. The ovalbumin-induced asthma model in a mouse is a strong tool for assessing the *in vivo* efficacy of anti-asthma remedies.

Keywords: asthma, MUC5AC, laminin, integrin, PI3K, Akt