

Short Report

気道上皮初代細胞におけるインテグリン経路を介した MUC5AC 産生制御の解析

岩下淳¹, 伊藤佑歩¹, 村田純¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

喘息、COPD 患者の気道では粘液の産生亢進が起き、気流閉塞や気道閉塞等の症状が誘発される。気道で過剰に産生される粘液の主成分は MUC5AC ムチンである。我々は 4 型コラーゲンからのシグナルが MUC5AC の産生を抑制することを見出し、そのシグナルを細胞内に伝達するインテグリンを介した経路による MUC5AC 産生制御について解析を行った。材料としてヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 に加え、ヒト喘息患者由来の初代細胞 MucilAir を用いた。阻害剤を用いてインテグリンを阻害すると、MUC5AC は初代細胞、NCI-H292 双方で増加した。インテグリン経路の下流に位置する主要なキナーゼ Akt の阻害では NCI-H292 では MUC5AC が増加したが、初代細胞では MUC5AC の増加は見られなかった。また同じく主要なキナーゼ経路である MEK/ERK 経路の阻害は MUC5AC を初代細胞、NCI-H292 双方で減少させた。これらの結果から、インテグリンを介した経路は MUC5AC の産生を減少させるが、ERK は増加させる方向で働くことが示唆された。また、より生体に近い初代細胞では NCI-H292 と異なり、Akt が MUC5AC の産生に影響しないことが示唆された。

キーワード: 喘息、ムチン、MUC5AC、インテグリン経路、Akt、ERK

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生体防御に重要である (Fahy et al., 2010)。しかし喘息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、空気の流れを妨げ、呼吸を困難にする (Fahy et al., 2002; Rose et al., 2006; Button et al., 2012)。現在喘息治療薬としては、狭くなった気道を一時的に拡張するステロイド剤などが主流であるが、動悸・手の震えなど副作用が強いため長期に渡る治療には向かず、新たな治療法が求められている。我々は喘息症状の原因となる 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、改善を目指す本研究を着想した。

我々はこれまでにヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 において、細胞間接着因子 E カドヘリンや、細胞外マトリックス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; Iwashita et al., 2016)。代表

的な細胞外マトリックスである 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細胞外マトリックス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 キナーゼが重要であった (Iwashita et al., 2013; Iwashita et al., 2014) (図 1)。本研究による細胞外マトリックスからインテグリンを介したシグナルの解明は、気道での粘液ムチン産生の減少を可能とし、喘息の症状緩和に向けた新たな治療法の開発につながることを期待できる。本研究ではこれまで用いてきた NCI-H292 細胞に加え、喘息患者由来の気道上皮初代細胞を用いた 3D モデル MucilAir を用いて、インテグリンを介したシグナルが、粘液ムチン MUC5AC の産生を制御する機構について解析を行ったので報告する。

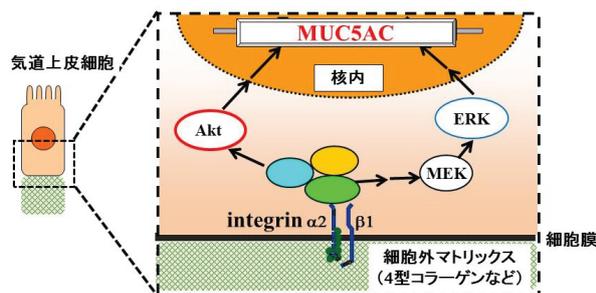


図1 インテグリン経路と MUC5AC の発現
(模式図)

材料と方法

ヒト細胞と培養条件

ヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 は培養液 (RPMI1640 medium (SIGMA, Missouri, USA)、10% fetal bovine serum (Cell Culture Technologies, Gravesano, Switzerland)、1% penicillin-streptomycin (Gibco Oriental, Tokyo, Japan)) で 37°C、5% CO₂ の恒温器 (ShinMaywa, Tokyo, Japan) で培養した。細胞の継代では、トリプシン-EDTA (Gibco) で 10 分間 37°C 処理し、剥離した細胞の一部を継代培養に用いた。

喘息患者由来初代細胞 MucilAir (Epithelix Sarl, Geneva, Switzerland) は専用培養液 (Epithelix Sarl, Geneva, Switzerland) で NCI-H292 同様に培養した。

インテグリン、Akt 及び MEK/ERK 経路阻害剤

阻害剤として、インテグリン阻害剤である 200µM の TC-II5 (Funakoshi, Tokyo, Japan)、Akt 阻害剤である 25 µM の Akt inhibitor I (Biosource, CA, USA)、MEK/ERK 阻害剤である 30µM の U0126 (Wako, Tokyo, Japan) を用いた。NCI-H292 は培養液を除去した後に、阻害剤入り培養液を添加し、37°C、5% CO₂ の恒温器で 30 時間培養した。初代細胞では、阻害剤で処理する前日に、チャンバーに培養液を添加し、1 時間培養して累積しているムチンを除去した。翌日、一度培養液でサンプリングした後、阻害剤を加えた培養液を添加して 6 時間培養した。最初にサンプリングした培養液に含まれるムチンを基準値として、6 時間培養したサンプルのムチン産生量を算出した。また、各チャンバーの細胞数は、6µM レザズリン入

り生理食塩水を用いて測定した。その後 MUC5AC の産生量を測定した。

Western Blot 法

Laemli バッファーに溶解したサンプルを 95°C、5 分間加熱処理した後、SDS-PAGE 電気泳動を行った。電気泳動終了後、トランスファー装置 (Cima Biotech, Chiba, Japan) を用いて、ニトロセルロース膜 (GE Healthcare, Tokyo, Japan) に転写した。トランスファー後、4% スキムミルク (Wako, Tokyo, Japan) を加え、4°C で一晩ブロッッキングした。ブロッッキングが完了したニトロセルロース膜を 2000 倍希釈した一次抗体で 4°C 一晩反応させた。5 分間×5 回 TBS-T 溶液で振とうさせながら洗浄した。二次抗体として 2000 倍希釈した IgG HRP 標識抗体で 1 時間浸した。5 分間×5 回 TBS-T 溶液で振とうさせながら洗浄した。ニトロセルロース膜を Luminata Forte HRP 液 (MILLIPORE, MA, USA) で 5 分間処理し、Chemidoc image analyzer (Biorad, Tokyo, Japan) でシグナルを検出した。抗体は以下を用いた。

一次抗体 : Monoclonal Anti-β-Actin antibody produced in mouse (SIGMA, Tokyo, Japan)、A rabbit anti-ERK 1/2 antibody (V1141, Promega, Madison, WI, USA)、A mouse anti-ERK antibody (E-4 : Santa Cruz, Tokyo, Japan)、リン酸化型-ERK 抗体 (sc-101760, Santa Cruz, Tokyo, Japan)、Akt (pan) (40D4) mouse mAb (Cell Signaling, Tokyo, Japan)、phospho-Akt (Ser473) (193H12) Rabbit mAb (Cell Signaling)

二次抗体 : ECL Anti-Mouse IgG (GE Healthcare, Tokyo, Japan)、ECL Anti-Rabbit IgG (Promega, Madison, WI, USA)

Dot Blot 法による MUC5AC タンパク質の検出

PVDF 膜 (MILLIPORE, MA, USA) を 1 分間メタノールに浸した後、10 分間×2 回 TBS-T 溶液 (0.02 M Tris-HCL (pH 7.5)、0.1 M NaCl、0.1 % Tween-20) の中に静置した。メンブレンを Dot Blot 装置 (Scie-Plas, Cambridge, UK) に装着し、40 µl のサンプルを加えた。PVDF 膜に 4% スキムミルク in TBS-T を加え、4°C で一晩ブロッッキングした。一次抗体である抗 MUC5AC 抗体 (Thermo SCIENTIFIC, Kanagawa,

Japan)に1時間室温で浸した。5分間×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×5回TBS-T溶液で振とうさせながら洗浄した。PVDF膜をLuminata Forte HRP液で5分間処理し、Chemidoc image analyzerでシグナルを検出した。

結果

初代細胞においてインテグリン経路の阻害はMUC5ACの産生を増加させる

初代細胞におけるMUC5AC産生へのインテグリン経路を解析するため、細胞をインテグリン阻害剤であるTC-II5で処理した。その結果MUC5ACの産生量は増加した。これはNCI-H292を処理した場合と同様の結果であった(図2)。

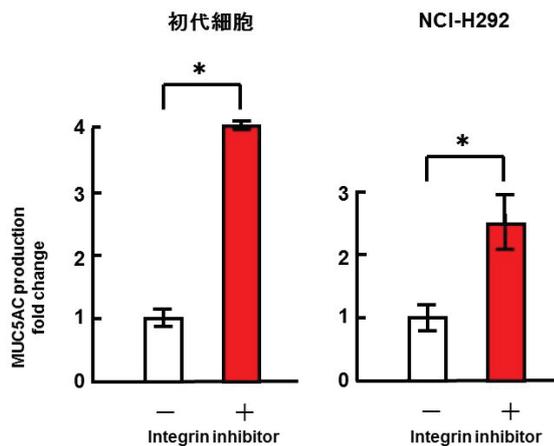


図2 初代細胞とNCI-H292におけるインテグリン経路の阻害によるMUC5AC産生への影響* : $p < 0.05$

初代細胞においてAktの阻害はMUC5ACの産生に影響しない

初代細胞をインテグリン経路の下流にあるAktキナーゼの阻害剤(Akt inhibitor I)で処理した。その結果、リン酸化型Aktは減少し、活性が抑制された(図3A)。しかしMUC5ACの産生量に、有意な差は観察されなかった(図4)。これは同様の処理によってMUC5ACの増加が観察されたNCI-H292とは異なる結果であった。

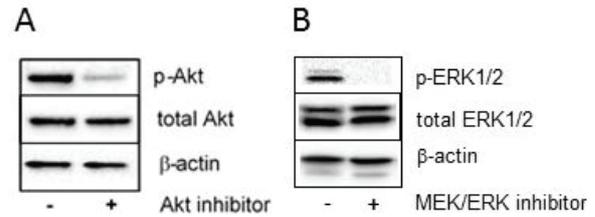


図3 リン酸化型(活性化型)Akt、及びリン酸化型(活性化型)ERKへの阻害剤の影響

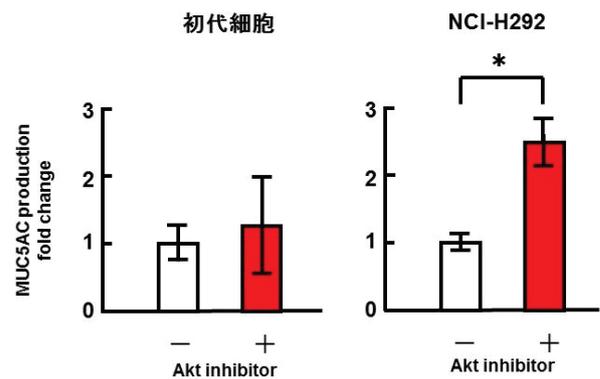


図4 初代細胞とNCI-H292におけるAkt経路の阻害によるMUC5AC産生への影響* : $p < 0.05$

MEK/ERK経路の阻害はMUC5ACの産生を減少させる。

初代細胞をインテグリン経路の下流にあるMEK/ERK経路阻害剤U0126で処理した。処理の結果、リン酸化され活性化したERKは減少した(図3B)。その結果MUC5ACの産生量は減少した。これはMUC5ACの増加が観察されたNCI-H292と同様の結果であった。

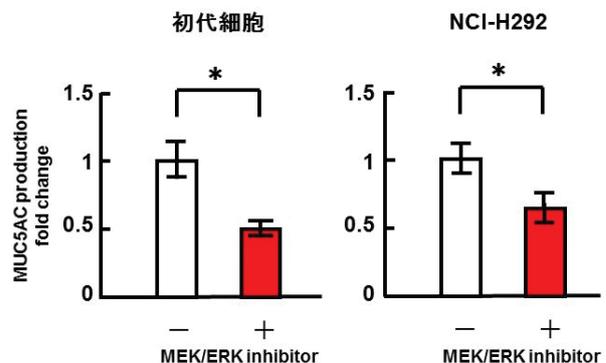


図5 初代細胞とNCI-H292におけるMEK/ERK経路の阻害によるMUC5AC産生への影響* : $p < 0.05$

考察

継代可能とするために株化した細胞では、生体反応を必ずしも反映しない場合がある。生体内の反応をより明らかにするために、今回株化細胞である NCI-H292 に加え、喘息患者気道から摘出した初代細胞の実験系 MucilAir を用いて解析を行い、比較した。

インテグリンの阻害は MUC5AC 産生を増加させた (図 2)。この結果は初代細胞においてもインテグリンの活性化が MUC5AC 産生を抑制することを示唆する。また、この結果は生体での喘息症状改善にインテグリンの活性化が有用であることを示唆している。

インテグリン経路の主要なキナーゼである Akt と MEK/ERK 経路について、同様に阻害剤を用いて解析を行った結果、MUC5AC は MEK/ERK 経路の抑制によって減少したが、Akt の阻害は NCI-H292 と異なり影響を与えなかった (図 3-5)。これらの結果は、喘息患者由来の初代細胞において、インテグリンの活性は MUC5AC 産生を抑制し、ERK の活性は増加させることを示している。また Akt に関しては初代細胞では NCI-H292 などの細胞株とは異なるシグナル経路が働くことを示唆しており、治療法を探る上で注意が必要である。本研究での成果は、今後インテグリン経路の活性化、MEK/ERK 経路の抑制などにより、喘息症状を改善する手法の開発につながる結果である。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 27 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、ここに深甚なる謝意を表します。また、MucilAir と詳細な情報をご提供いただいた、イワキ株式会社様に心よりお礼申し上げます。

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.

- 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.
- 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 $\beta 1$ 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.
- 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.

〔 平成 28 年 7 月 20 日 受付 〕
〔 平成 28 年 7 月 31 日 受理 〕

The regulation of MUC5AC production by integrin-mediated pathways in human primary airway epithelial cells

Jun Iwashita, Yuho Ito, Jun Murata

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

MUC5AC mucin overproduction is a key feature of asthma and contributes to airway obstruction. The production of MUC5AC is downregulated in parts by signals from type IV collagen via integrin-mediated pathways; however, the specific mechanism remains largely unclear. We investigated the function of integrin, the MEK/ERK pathway, and Akt, a representative signal transducer in the integrin pathway, in the regulation of MUC5AC production in human airway epithelial NCI-H292 cells and primary airway epithelial cells. Inhibition of integrin induced the upregulation of MUC5AC in primary cells and NCI-H292 cells. Akt inhibitor I decreased Akt phosphorylation and activation; however, MUC5AC production was unaffected in primary airway cells. In contrast, MUC5AC production was downregulated by MEK/ERK pathway inhibition in primary cells and NCI-H292 cells. These results suggest that the production of MUC5AC is downregulated by integrin, upregulated by the MEK/ERK pathway, and unaffected by Akt in human primary airway cells.

Keywords: asthma, mucin, MUC5AC, integrin pathway, Akt, ERK