

喘息モデルマウスの気道では4型コラーゲン及びびラミニンが増加する

岩下淳, 安田将人, 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, COPD 患者の気道では粘液ムチン 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以前報告した. これまでの結果から, 喘息に類似した症状を示す喘息モデルマウスでは気道における細胞外マトリックス構成タンパク質の発現が変化し, MUC5AC の過剰分泌を誘起している可能性がある. この可能性を検証するため本研究では, 喘息モデルマウスの気道における細胞外マトリックス成分の変動を解析した. 喘息病態を誘起するオボアルブミンでヘアレスマウスを感作した結果, 血中での抗オボアルブミン抗体の増加が観察された. さらに喘息モデルの指標である MUC5AC の気道での過剰分泌も検出され, 喘息モデルマウスの作製が確認された. 喘息モデルマウス及び対照群の気道を摘出し, 気道組織に含まれる細胞外マトリックスタンパク質を western blot で検出し, 比較した. その結果, 細胞外マトリックスの主要な成分の一つであるフィブロネクチンの量に変化は見られなかった. しかし MUC5AC の産生を制御する 4 型コラーゲン及びびラミニンは, 喘息モデルマウス気道における増加が初めて観察された. これらの結果から, 生体での喘息症状を誘起する気道 MUC5AC の過剰産生に, 細胞外マトリックス成分の変化が関与している可能性が示された.

キーワード: 喘息, モデルマウス, MUC5AC, 細胞外マトリックス, 4 型コラーゲン, ラミニン

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). 代表的な細胞外マトリックス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 キナーゼが介在している (Iwashita et al., 2013; Iwashita et al., 2014).

これらの研究成果から生体の気道において, 細胞外マトリックスの構成成分が変化して, MUC5AC の産生を制御している可能性がある. 本研究では最初に喘息モデルマウスを作製した. さらにマウス気道を摘出して総タンパク質の量を揃えて western blot による解析を行い, 喘息症状に伴う MUC5AC の増加と細胞外マトリックス構成タンパク質の関連について解析を行った.

喘息モデルマウスは, 喘息病態を再現したマウスである. マウスにオボアルブミン (OVA) を投与し, 気道に炎症を誘起して, 喘息様のアレルギーを引き起こし作製する (Kumar et al., 2008). OVA を投与し

たマウスが喘息病態となった確認には、一般的な指標として血中抗 OVA 抗体量や気道での MUC5AC 分泌量の増加が用いられる。

今回喘息モデルマウス作製にはヘアレスマウス (Hos:HR-1) を用いた。Hos:HR-1 は、Hr^{hr}/Hr^{hr} 遺伝子の導入により、体毛を欠失したマウスであるが、ヌードマウスとは異なり正常な免疫系を有している。さらに一般的に用いられるマウス種である C57/BL6 よりも、OVA 噴霧による MUC5AC の増加が顕著であることから、ヘアレスマウスを用いて本研究を行った。

細胞外マトリックスには様々な構成成分が含まれる。そのうち代表的なものがフィブロネクチン、ラミニン、4型コラーゲンなどであり、細胞膜表面の特異的レセプターであるインテグリンを介して機能する。フィブロネクチンは、細胞外マトリックスを形成する糖タンパク質である。分子量約 250kDa のポリペプチドが二量体を形成して構成されており、主に繊維芽細胞、肝細胞などの接着を促進し、細胞接着、細胞移動などに関わっている。ラミニンは、ほとんどの組織の基底膜の主成分であり、基底膜を構成すると共に様々な機能を担っている。細胞の接着、移動、増殖、分化促進など多くの活性を示す。4型コラーゲンは基底膜の主要な成分であり、接する細胞に対して、増殖、分化シグナルを与え、情報を伝達することが報告されている。骨や腱に多く発現する 1型コラーゲンとは異なり、上皮細胞の裏打ちをする基底膜に多く含まれて作用する (Halper, J et al., 2014)。ラミニンと 4型コラーゲンは MUC5AC の産生を増減させることが培養細胞を用いた系で報告されている (Iwashita et al., 2010)。

本研究では、ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスを作製し、その気道における喘息症状に伴う MUC5AC の増加と細胞外マトリックス構成成分の変動の関連について解析を行ったので報告する。

材料と方法

喘息モデルマウス作製

ヘアレスマウス (Hos:HR-1) を喘息モデルマウス作製に用いた。本実験では星野試験動物飼育所から

6週齢マウス雌を購入し、実験に供した。

マウスに気道炎症を誘起し、喘息モデルとするため、腹腔注射と、噴霧により OVA を投与した。腹腔注射では、マウス 1 匹当たり OVA 20 μ g、水酸化アルミニウム 2 mg in 200 μ L PBS を注射した。OVA の噴霧では 1% OVA in PBS をネブライザーで霧化し、2 週間 1 日あたり 30 分間噴霧した。Sacrifice には学内規定に則り、エーテルを用いた。

血中における抗 OVA 抗体の検出

マウスを固定器に入れ、尾静脈より採取した血液を材料として、血中に含まれる抗 OVA 抗体を Anti-ovalbumin IgG EIA Kit : cayman, (MI, USA) を用いて定量した。

Dot Blot

マウスの気道を 100 μ L の PBS で 3 回洗浄した後、回収し、これを気道洗浄液とした。この気道洗浄液 3 μ L を PBS で 300 倍希釈し、サンプル中の MUC5AC 産生量を検出した。PVDF 膜 (MILLIPORE, MA, USA) を 1 分間メタノールに浸した後、10 分間 \times 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 μ L のサンプルを加えた。PVDF 膜に Western BLoT Blocking Buffer (Takara, Shiga, Japan) を加え、4°C で一晩ブロッキングした。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 \times 5 回 TBS-T 溶液で振とう洗浄した。二次抗体である ECL 抗マウス IgG HRP 標識抗体で 1 時間反応後、5 分間 5 回 TBS-T 溶液で振とう洗浄した。PVDF 膜を Luminata Forte HRP 液で 5 分間処理し、Chemidoc image analyzer (MILLIPORE, MA, USA) でシグナルを検出した。

Western blot

マウスの気道を摘出し、laemmli SDS sample buffer に溶解した。95度 5分加熱した後、NuPAGE3-8% Tris Acetate gel (invitrogen, CA, USA) に電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。Western BLoT Blocking Buffer を用いて 4°C で一晩ブロッキングし

た。一次抗体に 1 時間室温で浸した。5 分間×5 回 TBS-T 溶液で振とう洗浄した。二次抗体である ECL 抗マウス、抗ラビット IgG HRP 標識抗体 (Madison, WI, USA) で 1 時間反応後、5 分間 5 回 TBS-T 溶液で振とう洗浄した。ニトロセルロース膜を Luminata Forte HRP 液で 5 分間処理し、Chemidoc image analyzer でシグナルを検出した。

細胞外マトリックスの検出に用いた一次抗体は、抗フィブロネクチン抗体: Anti-Fibronectin Polyclonal Antibody (Bioss ANTIBODIES, MA, USA), 抗ラミニン抗体: Anti-Laminin, Rabbit-Poly, HRP (Novus Biologicals, SW, USA), 抗 4 型コラーゲン抗体: Anti-Collagen Type IV, Mouse-Mono (IV-4H12) (EMFRET Analytics, DE) である。

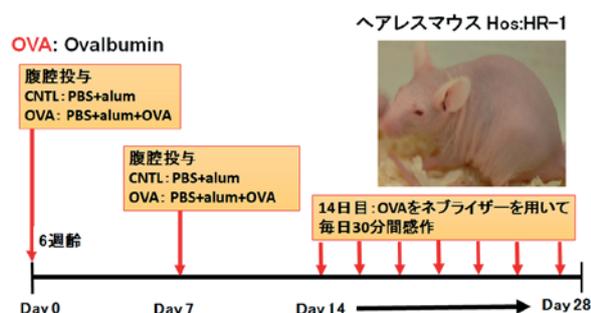


図 1 OVA 投与による喘息モデルマウスの作製 (模式図)

結果

OVA を投与したマウスでは血中の抗 OVA 抗体及び気道での MUC5AC 分泌量が増加する。

OVA 投与によりヘアレスマウスの喘息モデル作製を行った (図 1)。喘息となったマウスでは血中の抗 OVA 抗体が増加する。ELISA 法を用いて血中の抗 OVA 抗体を検出した結果、OVA で処理したヘアレスマウス群 (喘息モデルマウス群) では OVA で処理しない対照群と比較して OVA に対する抗体量が 50 倍以上増加した (data not shown)。さらに気道で分泌される MUC5AC ムチンの産生量を解析した。その結果 OVA で処理したヘアレスマウス群 (喘息モデルマウス群) の気道では OVA で処理しない対照群と比較して 10 倍以上 MUC5AC の分泌が増加した (図 2)。これらの結果から、OVA 投与によっ

て喘息モデルマウスが作製されたことを確認し、以後の実験に用いた。

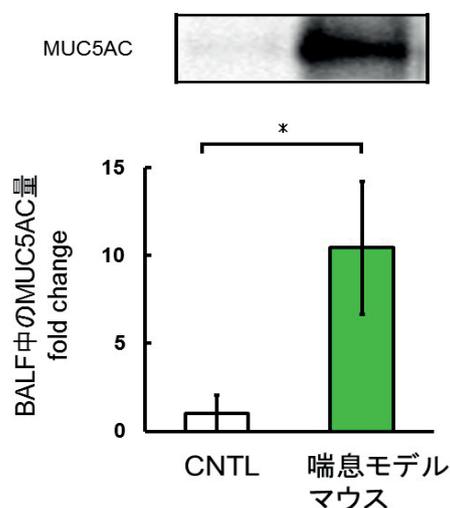


図 2 喘息モデルマウスにおける気道洗浄液 (BALF) に含まれる MUC5AC への影響. 対照群 (CNTL), OVA 処理群 (喘息モデルマウス群) * : $p < 0.05$

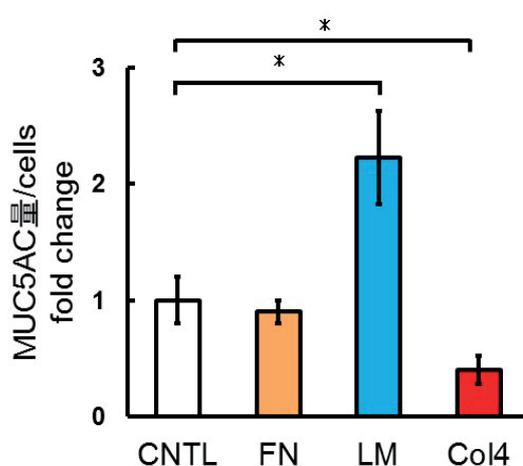


図 3 ヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 における細胞外マトリックスタンパク質による MUC5AC 産生への影響. 対照群 (CNTL), フィブロネクチン (FN), ラミニン (LM), IV型コラーゲン (Col4) * : $p < 0.05$

喘息モデルマウスの気道ではフィブロネクチンタンパク質の発現量は変化しない。

培養細胞株を用いた実験では、フィブロネクチンからのシグナルによる MUC5AC の発現への影響は観察されない (図 3)。喘息モデルマウス群と対照群よ

り抽出した気道組織に含まれるフィブロネクチタンパク質を western blot 法を用いて測定した. その結果, 対照群と喘息モデルマウス群気道の間で, フィブロネクチタンパク質の発現量に変動は観察されなかった (図 4).

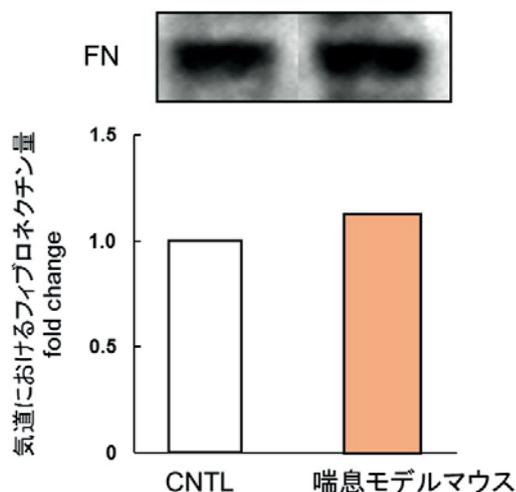


図 4 喘息モデルマウスの気道におけるフィブロネクチタンパク質の発現. 対照群 (CNTL), フィブロネクチン (FN)

喘息モデルマウスの気道では 4 型コラーゲン及びラミニタンパク質の発現が増加する.

培養細胞株を用いた実験では, 4 型コラーゲンからのシグナルによって MUC5AC の発現は減少する. それに対し, ラミニンからのシグナルでは MUC5AC の発現は増加する (図 3).

喘息モデルマウス群と対照群より抽出した気道組織に含まれる 4 型コラーゲンとラミニタンパク質を western blot 法を用いて測定した. その結果, 対照群と比較して, 喘息モデルマウス群の気道では 4 型コラーゲンとラミニタンパク質の発現が 3 倍程度増加していた (図 5, 図 6).

これらの結果から喘息モデルマウスの気道では, フィブロネクチンの発現は変化しないが, ラミニンと 4 型コラーゲンの発現は共に増加していることが示唆された.

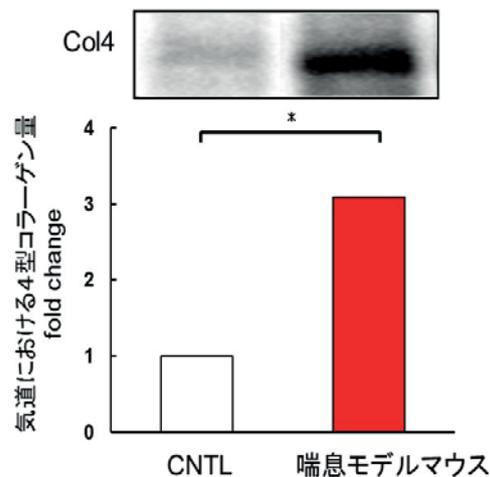


図 5 喘息モデルマウスの気道における 4 型コラーゲンタンパク質の発現. 対照群 (CNTL), 4 型コラーゲン (Col4) * : $p < 0.05$

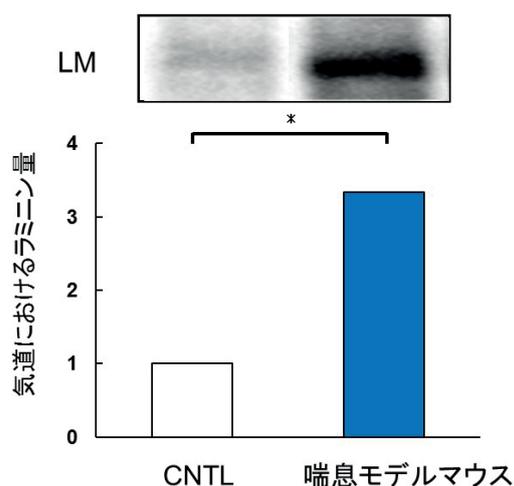


図 6 喘息モデルマウスの気道におけるラミニタンパク質の発現. 対照群 (CNTL), ラミニン (LM) * : $p < 0.05$

考察

喘息患者の気道では 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。さらに 4 型コラーゲンからのシグナルが MUC5AC を抑制することを示した。これらの結果は、今後インテグリン経路の活性化や 4 型コラーゲンの投与などにより、喘息症状を改善する手法の開発につながる結果である。またこの改善効果を評価するために、今回のヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスを用いた系が有用である可能性がある。

喘息モデルマウスでは OVA 投与によりマウスに炎症を誘起して喘息病態に近づける手法が確立されている (Nials et al., 2008)。これまでは C57BL/6 や BALB/c などのマウス種を使用している喘息モデル作製が一般的である (Kumar et al., 2008, Boyce et al., 2005)。今回ヘアレスマウスを用いて喘息モデルマウスを作製するにあたって、まずヘアレスマウスが OVA 投与によって喘息モデルマウスになっていることを、喘息モデルの指標である抗 OVA 抗体量及び気道中の MUC5AC 産生量を用いて確認した。その結果、全て OVA 投与群で増加した(図 2)。これらの結果から、ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスの作製には成功したと考えられる。

次に喘息状態になると、気道での MUC5AC 過剰分泌が誘起されるが、これに細胞外マトリクスが関与している可能性がある。これまでの研究からフィブロネクチンは MUC5AC 産生に影響を与えないが、4 型コラーゲンは MUC5AC 産生を減少させ、ラミニンは増加させることが明らかとなっている。しかし生体内で喘息症状を示す個体の気道で、これらの細胞外マトリクス成分の発現の変動はこれまで解析されていない。喘息モデルマウス気道では MUC5AC 過剰分泌が見られることから、ラミニンの増加、4 型コラーゲンの減少が起きている可能性について、本研究で解析を行った。

本研究での解析から、①ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスの気道では MUC5AC ムチンが過剰発現する②喘息モデルマウス群の気道におけるフ

ィブロネクチンの発現量に、正常なマウス群との間で有意な差は観察されない(図 4)③喘息モデルマウス群の気道における 4 型コラーゲンとラミニンの発現量は、有意に増加する(図 5, 図 6)、という結果が得られた。

これらの結果において、喘息モデルマウスの気道において有意な発現の変動が観察された 4 型コラーゲンとラミニンは、生体内でも MUC5AC の産生を制御していることが示唆された。また予測と一部異なり、MUC5AC を減少させると考えられる 4 型コラーゲンと、増加させると考えられるラミニンが共に喘息モデルマウス気道で増加した。しかし最終的に喘息モデルマウス気道で分泌される MUC5AC ムチンは増加していることから、4 型コラーゲンやラミニンの発現に気道での地域差がある可能性がある。今後は気道の切片の作製などにより、気道各部での 4 型コラーゲンやラミニンの発現パターンを明らかにする。そして発現パターンと MUC5AC 分泌の関連を解析し、生体気道での MUC5AC 分泌の抑制機構を明らかにしていく予定である。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 29 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

- Boyce J. A., Austen K. F. (2005). No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *J. Exp. Med.* 201, 1869-1873
- 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.
- 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.
- Kumar R. K., Herbert C., Foster P. S. (2008). The ‘classical’ ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr. Drug Targets*, **9**, 485-494.
- 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.
- Nials, A. T., Uddin, S. (2008). Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*, **1**, (4-5), 213-220.
- 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 30 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 30 年 7 月 10 日受理〕

Increment of type IV collagen and laminin in the airways of asthmatic mice

Jun Iwashita, Masato Yasuda, Jun Murata

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

Asthma or COPD causes breathing problems and is defined as a chronic inflammatory disease of the airways. The ovalbumin-induced asthma model in mouse is a strong tool for the assessment of the *in vivo* efficacy of anti-asthma remedies. This murine model features many similarities to human allergic asthma including the presence of lung inflammation, the release of inflammatory cytokines, the hypersecretion of MUC5AC mucin, and the presence of airway hyper-responsiveness. In the previous study conducted by the authors of this paper, extra cellular matrix proteins were found to regulate MUC5AC production in the human airway cell lines. However, the expression pattern of extra cellular matrix proteins in the airways has not been established *in vivo*. For this report, the authors analyzed the change of expression of the extra cellular matrix proteins that affect MUC5AC production in the airways of asthmatic mice. The ovalbumin challenge induced the increment of anti-ovalbumin antibodies in the blood and caused the hyper-secretion of MUC5AC protein in the airways, which were representative markers of asthmatic mice. No significant difference of fibronectin expression was detected in the airway tissues of an asthmatic mice and an unchallenged mice. In contrast, type IV collagen and laminin both increased in the airways of asthmatic mice. These results suggest that type IV collagen and laminin regulate the secretion of MUC5AC *in vivo*.

Keywords: asthma, MUC5AC, extra cellular matrix, type IV collagen, laminin.