

## 喘息の病態形成に関与する気道上皮バリア脆弱化機序の検討

### The investigation of the mechanism of vulnerability of airway epithelial barrier integrity in the pathogenesis of asthma

岡本真一<sup>1),2)</sup>、丸岡秀一郎<sup>1),2)</sup>、津谷恒太<sup>1),2)</sup>、水村賢司<sup>1)</sup>、井上寿男<sup>1)</sup>、神津 悠<sup>1),2)</sup>、新谷榮崇<sup>3)</sup>、鹿野壯太郎<sup>1),2)</sup>、坪井絵莉子<sup>1)</sup>、曾田香織<sup>1)</sup>、竹下郁子<sup>1)</sup>、橋本 修<sup>1),3)</sup>、權 寧博<sup>1),2)</sup>  
Shinichi OKAMOTO<sup>1),2)</sup>, Shuichiro MARUOKA<sup>1),2)</sup>, Kota TSUYA<sup>1),2)</sup>, Kenji MIZUMURA<sup>1)</sup>, Toshio INOUE<sup>1)</sup>, Yutaka KOZU<sup>1),2)</sup>, Yoshitaka SHINTANI<sup>3)</sup>, Sotaro SHIKANO<sup>1),2)</sup>, Eriko Tsuboi<sup>1)</sup>, Kaori SODA<sup>1)</sup>, Ikuko TAKESHITA<sup>1)</sup>, Shu HASHIMOTO<sup>1),4)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1),2)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部 内科学系呼吸器内科学分野、<sup>2)</sup>日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター  
<sup>3)</sup>赤羽中央病院、<sup>4)</sup>湘南医療大学

#### [要旨]

初代ヒト気管支上皮細胞(NHBE)および気道基底細胞(VA10)への dsRNA(polyI:C)刺激は、有意に上皮バリア機能形成を減弱した。TLR3、TRIF 特異的 siRNA を導入した VA10 は、polyI:C による上皮バリア機能減弱を有意に抑制したことから、polyI:C による気道上皮バリア形成の減弱化は、気道上皮分化誘導前の基底細胞内の TLR3-TRIF 経路を介しておこることがわかった。気道基底細胞へのウイルス感染が、喘息患者の上皮バリア機能の脆弱化を誘導する可能性が示唆された。

#### [背景]

気道上皮バリア機構は、ウイルスやアレルゲンなどの環境因子の侵入を防ぐ重要な生体防御機構である。気管支喘息(以下、喘息)患者の上皮バリア機能は、健常者と比較して脆弱であり、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ことがわかった。<sup>1)</sup>我々はこれまで気道上皮細胞を用いてウイルス感染を模倣する dsRNA(PolyI:C)刺激による上皮バリア形成に及ぼす影響について報告してきた。<sup>2)</sup>また、幼少期のウイルス感染が、その後の喘息発症を誘導する可能性を示唆する報告もあり、<sup>3)</sup>上皮バリア機能が形成される初期段階に脆弱化を決定する何らかの機序が存在することが推測される。気道には気道上皮細胞への分化能を有する基底細胞が存在している<sup>4)</sup>が、基底細胞へのウイルス感染が上皮バリア形成の初期段階におよぼす影響を検討した報告はない。

#### [目的]

本研究の目的は、気道上皮の前駆細胞である基底細胞に着目し、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。そのために初代ヒト気管支上皮細胞(NHBE)および気道基底細胞株 VA10 を用いて、ウイルス感染を模倣する dsRNA(polyI:C)刺激による上皮バリア形成に及ぼす影響について検討した。

## [対象及び方法]

### (1) 細胞培養

NHBE、VA10 はトランスウェルに3日間培養液中で培養した(Liquid Covered Culture, LCC)。その後、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。

### (2) 上皮バリア機能測定

上皮バリア機能はトランスウェル上層と下層に置いた電極に電流を流し、細胞層間の電気抵抗を計測する経上皮電気抵抗(Trans Electric Resistance, TER)および FITC-デキストラン溶剤の拡散から、細胞間の透過性を評価する傍細胞透過率を用いた。ALI 前3日間のみ dsRNA で刺激し、その後、polyI:C 非存在下の ALI で培養し、上皮バリア機能を測定した。(図1)

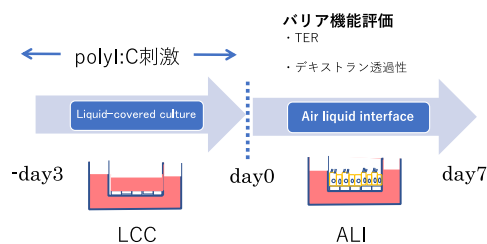


図1 細胞培養方法および気道上皮バリア機能測定のタイムライン

NHBE、VA10 はトランスウェル上で3日間培養液中で培養した後(LCC)、気道上皮細胞への分化を誘導する培養系 ALI として培養した。ALI 前3日間のみ polyI:C で刺激し、その後は polyI:C 非存在下の ALI とし、TER、デキストラン透過性を測定した。

### (3) 遺伝子発現解析

分化誘導前の NHBE に基底細胞が存在することを確認するために、基底細胞マーカーである CK5、CK14 のリアルタイム PCR を行なった。

### (4) TLR3、TRIF 特異的 small interfering RNA(siRNA)トランスフェクション

基底細胞への polyI:C 刺激が TLR3、TRIF の経路を介してバリアの減弱に関与しているかを検討するため、特異 siRNA を用いて実験を行った。VA10 に TLR3、TRIF 特異的 siRNA を Lipofectamine™ RNAiMAX を用いてトランスフェクションし、24時間後にトランスウェル上に移し、polyI:C による刺激および ALI 培養を前述と同様に行った。経時的な TER 測定とデキストラン透過性の測定によりバリア機能への影響を検討した。

### (5) 統計解析

データは Graphpad Prism7 Software(La Jolla, CA, USA)を使用し解析した。2群間の比較は Student's *t* 検定あるいは Mann-Whitney *U* test、多群間の比較は ANOVA 検定を行った。*p* 値は 0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

## [結果]

ALI 前 3 日間のみに poly-I:C 刺激群はコントロール群と比較して、polyI:C 非存在下 ALI 培養後の上皮バリア機能形成が減弱した。VA10 においても同様の結果が得られた (図 1)。

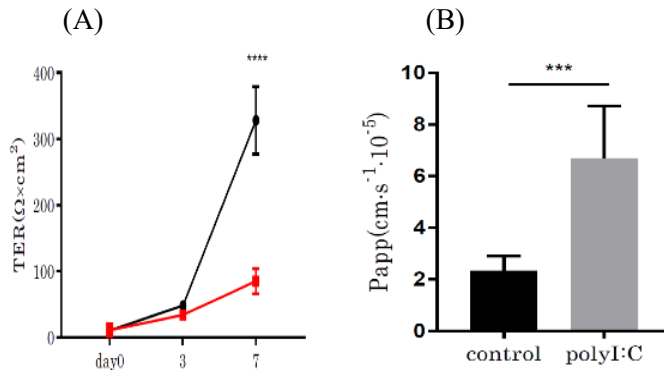


図 1 気道基底細胞株 VA10 への polyI:C 刺激が上皮バリア形成に与える影響

(A)コントロール群 (黒線) と polyI:C 刺激群 (赤線) で、ALI 培養開始時を第 0 日とし、第 3 日、第 7 日で TER を測定し経時変化を検証した。成績は平均値±SDs, n=9; \*\*\*\*p<0.0001 で示した。(B) ALI 培養開始時を第 0 日とし、第 7 日にデキストランをトランスウェル上層に添加し、蛍光吸光度でデキストラン透過性を測定した。成績は実験の平均値±SDs, n=3; \*\*\*p<0.001。

ALI により分化を誘導する前の NHBE は、基底細胞のマーカーである *KRT5*、*KRT14* を発現しており、その遺伝子発現は ALI 培養により減弱した。以上より分化誘導前の NHBE は主に基底細胞であることが証明できた。

TLR3、TRIF 特異的 siRNA を導入した VA10 は、コントロール siRNA を導入した VA10 と比較して、polyI:C による上皮バリア機能減弱を有意に抑制した。

## [考察]

dsRNA は、気道上皮分化誘導前の基底細胞内の TLR3-TRIF 経路を介して、気道上皮バリア形成を減弱させると考えられた。

## [結論]

気道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。上皮バリア機能が形成される初期段階に脆弱化を決定する何らかの機序が存在することが推測され、さらなる検証が必要である。

## [参考文献]

- <sup>1)</sup>Holgate ST: Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120: 1233-1244.
- <sup>2)</sup>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.* 2016; 65

Suppl: S56-S58.

<sup>3</sup>Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, Printz MC, Lee WM, Shult PA, Reisdorf E, Carlson-Dakes KT, Salazar LP, DaSilva DF, Tisler CJ, Gern JE, Lemanske RF Jr: Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178: 667-672.

<sup>4</sup>Halldorsson S, Asgrimsson V, Axelsson I, Gudmundsson GH, Steinarsdottir M, Baldursson O, Gudjonsson T: Differentiation potential of a basal epithelial cell line established from human bronchial explant. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007; 43: 283-289.