

Interleukin-13 誘起性杯細胞における
ペリオスチン分泌と Toll 様受容体 4 の発現に関する研究

かわの しゅういち
河野 修一
(呼吸器病学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成 2 7 年度

目 次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 IL-13誘起性杯細胞過形成モデルにおけるペリオスチン分泌能の検討	
第 1 節 目的	7
第 2 節 方法	7
第 3 節 結果	11
第 4 節 小括	13
第 3 章 IL-13誘起性杯細胞におけるTLR4発現の検討	
第 1 節 目的	15
第 2 節 方法	16
第 3 節 結果	18
第 4 節 小括	20
第 4 章 考察	22
第 5 章 結論	27
謝辞	28
引用文献	29
図表	38

第1章 緒言

気管支喘息は、好酸球をはじめとする種々の炎症細胞浸潤と気道上皮細胞の傷害ならびに気道リモデリングによって特徴づけられる慢性の炎症性気道疾患である。気管支喘息における気道では、正常気道と比較して杯細胞の過形成やそれに起因する粘液の過分泌が生じる。さらに、気道上皮直下の基底膜や気道平滑筋の肥厚もみられることで、機能的のみならず、物理的な気流制限がみられる(図1)。気管支喘息の悪化に関わる要因は多々挙げられるが、その中でも、気道リモデリングは「遷延する炎症反応により気道の組織学的再構築が生じることで、気道内腔の不可逆的な狭小化やそれに伴う気道抵抗の増大をきたす状態」と定義され、気管支喘息の難治化と深く関わっている(1)。気管支喘息患者の気道を対象とした近年の詳細な組織学的・病理学的検討により、気道リモデリングにおける主たる変化は、杯細胞の過形成による気道上皮の肥厚、気道上皮直下の基底膜肥厚、気道平滑筋の肥大・増生によって特徴づけられ、これらが密接に関連し合い病態を形成することが明らかにされた(2)。

杯細胞の過形成に関して、健常人では気道上皮における杯細胞の割合は線毛細胞の10%程度であるが、喘息患者ではその割合が著しく増加することが知られており、このような変化は杯細胞の過形成と定義される(3)。Ordonezらの検討によれば、喘息患者の気道上皮における杯細胞の割合は、健常者のものと比

較し、3 倍程度に増加していたと報告されており(4)、杯細胞の過形成の割合に対する明確な定義は存在しないものの、喘息患者においては少なくともその割合が数倍程度に増加していると考えられる。このような杯細胞の過形成により、肥厚した気道上皮により気流障害が生じるだけでなく、気道内腔への過剰な粘液産生をもたらし、粘液線毛クリアランスを障害して気道感染を助長するものと考えられている。また、気道平滑筋の収縮により狭窄した気道内腔に粘液が貯留すると、閉塞性換気障害を増悪させ、致命的な気道閉塞へとつながる。気道内腔が粘液によって満たされ閉塞した状態は「粘液栓」と呼ばれ、これによる窒息が重症喘息患者の一般的な死因として知られている(5)。実際に喘息重積発作により死亡した患者の剖検例の殆どにおいて、粘液栓が認められており(6, 7)、病理学的にも気道上皮における杯細胞の著明な増加が確認されている(8)。

このような気管支喘息の基本病態には、慢性炎症により誘導される Helper T-cell type 2 (Th2) サイトカインが深く関与するものと考えられており、事実、気管支喘息患者の気道粘膜生検材料や気管支肺胞洗浄液中からは Th2 サイトカインが多量に検出されている(9)。その中でも、Interleukin-13 (IL-13) は主として好酸球、リンパ球、肥満細胞などから遊離され、杯細胞の過形成と強く関連している(4)。例えば、重症喘息患者の気道組織には IL-13 の過剰発現が認められているほか(10)、動物実験においても気道に局所投与した IL-13 が

杯細胞の増生を伴い粘液の過分泌を引き起こすことが報告されている(11, 12)。
また、正常ヒト気道上皮細胞を用いた *in vitro* の研究においても、IL-13 が気道上皮細胞を杯細胞に分化誘導することが複数の研究で証明されており(13-15)、IL-13 により誘導された気道上皮の杯細胞化とそれに伴う粘液産生は強力な抗炎症副腎皮質ステロイドであるデキサメタゾンの存在下でも抑制されないことも分かった(16)。このことから IL-13 による杯細胞の過形成はステロイド抵抗性気管支喘息の重症化メカニズムの一因と推察されている。

さらに IL-13 は、気道リモデリングのもう一つの特徴である気道上皮直下の基底膜肥厚とも関連している(図 1)。ペリオスチン(periostin)は主として粘膜下の線維芽細胞から分泌される細胞外マトリックス蛋白質であるが、IL-13 はこのペリオスチンの産生を誘導することにより、線維芽細胞自身の増生を促すとともにコラーゲンを沈着させ、基底膜肥厚や粘膜下の線維化を起こすことが明らかとなっている。このような事実から、重症喘息の鋭敏な新規バイオマーカーとして注目されており(17)、近年開発された抗 IL-13 モノクローナル抗体(Lebrikizumab)を使用した分子標的治療では、血清ペリオスチンが高値の喘息患者に対して高い有効性を示し(18)、治療によってその値が変動することから気管支喘息の治療効果判定にも有用であるとの報告がなされている(19)。さらに最近、重症喘息患者の喀痰中でもペリオスチンが高値を示すことが分かっ

てきた(20, 21)。これらの知見から、ペリオスチンは IL-13 が関連する重症喘息において非常に重要な役割を果たしているものと考えられるようになってきた。ペリオスチンの起源については、線維芽細胞からの分泌が知られているが、喀痰中に同物質が検出されるという事実を勘案すると、気道上皮ないし気管支腺から気道粘液中に分泌されている可能性も考えられる。しかし、IL-13 刺激によって気道上皮からペリオスチンが分泌されるかどうかに関しては、現時点では不明である。

一方、気道上皮は生体と外界との境界に位置することから、経気道的に侵入してきた病原体に対する解剖学的な障壁となるだけでなく、粘液分泌や線毛運動を介して病原体を体外に排出する生理学的な役割を担っている。さらには、病原体を認識することでその排除に関わる自然免疫を惹起するプレーヤーとしての機能も有している。侵入してきた病原体関連分子を認識するパターン認識受容体として、Toll 様受容体 (Toll like receptors : TLRs)、NOD 様受容体、C 型レクチン受容体などが知られている(22, 23)。これらのうち、その存在が最初に認識されたのが TLRs で、これまでヒトにおいて 10 種類が同定された。現在、TLRs の構造や機能に関する理解が急速に進んでおり(24)、呼吸器系においては、気道上皮細胞をはじめ、Ⅱ型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、血管内皮細胞などに発現していることが明らかとなっている(25)。このうち、TLR4

は lipopolysaccharide (LPS) を認識することが知られていたが、ウイルス抗原、エンベロープ蛋白、pneumolysin など様々な分子も認識することが明らかになってきている。さらに、病原体のみならず、熱ショック蛋白や high mobility group box 1 (HMGB1) など様々な炎症や細胞傷害に伴って放出される内因性物質によっても活性化されることが分かっており、多様な炎症性疾患の病態にも関与している (26)。

TLRs を介する自然免疫の活性化は、アレルギー性疾患の発症に重要な役割を果たしている (27)。中でも気管支喘息と TLR4 を介したアレルギーとの関連については複数の研究があり、ダニに含まれる微量 LPS を気道上皮の TLR4 が認識することが気管支喘息の発症に関与するとの報告や (28)、暴露される LPS の濃度が気道のアレルギー性炎症の制御に関わっているとの動物実験 (29) など、TLR4 の重要性が注目されている。しかし、TLR4 が気道上皮に発現することは分かっているものの、線毛細胞と杯細胞における差異など、その詳細は明らかではない。

我々は、これまで正常ヒト気道上皮細胞を用いて気相液相界面培養法 (Air liquid interface method : ALI 法) を行い、気道上皮分化の *in vitro* モデルを確立してきた。そして線毛細胞が優位に分化する ciliated phenotype 及び IL-13 存在下で杯細胞が優位に分化する goblet phenotype の 2 つの系を比較すること

により、様々な検討を行ってきた(16, 30-32)。本研究の目的は、この ALI 法による *in vitro* 気道上皮分化モデルを用いて、IL-13 誘起性杯細胞の①ペリオスチン分泌能および②TLR4 発現を検討し、気管支喘息の病態解明を進めることである。これまで単に粘液の過分泌を起こすことしか知られていなかった IL-13 誘起性杯細胞が、気道リモデリングや気道炎症の悪化因子にどう関わるのかを明らかにすることは、重症・難治性気管支喘息の病態についての新たなメカニズムの提唱につながるものと期待できる。

第2章 IL-13 誘起性杯細胞過形成モデルにおけるペリオスチン分泌能の検討

第1節 目的

IL-13 が関与する重症気管支喘息においては、緒言で述べたようにペリオスチンが基底膜肥厚や粘膜下の線維化を引き起こすことから、血清ペリオスチン値は気道リモデリングの重要な指標となる。ペリオスチンは線維芽細胞から分泌されることが知られているが、重症気管支喘息においては喀痰からも検出される。このことから気道上皮側から内腔側へとペリオスチンが分泌されていると考えられるが、その詳細は明らかにされていない。また、気道上皮における分泌細胞も特定されていない。

そこで本章では、線毛細胞及び IL-13 誘起性杯細胞から分泌されるペリオスチン量を測定し、気道上皮におけるペリオスチン産生起源細胞を特定することを目的とした。

第2節 方法

(1) 正常ヒト気道上皮細胞 (Normal Human Bronchial Epithelial cells:NHBEc) の培養

NHBEc は Lonza 社 (メリーランド州、米国) より購入した。NHBEc はラット I

型コラーゲン (Sigma-Aldrich 社：ミズーリ州、米国) で処理した 75cm² フラスコに 3.5×10^3 cells/cm² の密度で播種した。培地は、気管支上皮細胞培養添加因子セット (BEGM SingleQuot kit) を添加した気管支上皮細胞培地 (Bronchial epithelial growth medium: BEGM) (Lonza 社) を用いて、温度 37℃、二酸化炭素濃度 5% の条件下で培養した。培地は 48 時間毎に交換を行い、約 5 日間培養後、約 2.0×10^5 cells/mL の細胞保存液を作成し、液体窒素で保存した。2 継代目の NHBEc も同様に培養し、その後 ALI 法 (次項) にて分化誘導培養を行った。

(2) Air liquid interface method (ALI 法) を用いた分化誘導培養

3 継代目の NHBEc を、ラット I 型コラーゲンで処理した直径 6.5mm のトランスウェル (Corning 社：マサチューセッツ州、米国) に、 1.0×10^6 cells/mL の密度で播種した。分化誘導培地には、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)

(Sigma-Aldrich 社) と F-12 培地 (Sigma-Aldrich 社) を 1:1 で混合したものの (DMEM/F-12) に 0.5ng/mL 上皮成長因子 (EGF) (Invitrogen 社：米国、カリフォルニア州)、1% Insulin-Transferrin-Selenium-A (ITS-A) (Invitrogen 社)、30µg/mL ウシ下垂体抽出物 (BPE) (Invitrogen 社)、 1.0×10^{-7} M レチノイン酸 (Sigma-Aldrich 社)、2.0µg/mL ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich 社)、0.5µg/mL ハイドロコルチゾン (MP Biomedicals 社：オハイオ州、米国)、10ng/mL トリヨードサイロニン (MP Biomedicals 社) を添加したものを用了。NHBEc

は前述のトランスウェルで3日間浸水下培養 (submerged culture) した後、上部 (管腔側) の培地を吸引し、ALI 法 (図 2A) にて計 14 日間培養した。従来の報告(31)を参考に、同培地の下部 (基底膜側) に IL-13 (R&D system 社: ミネソタ州、米国) を 5, 10, 20ng/mL の各濃度になるように添加して 14 日間培養し、培養細胞の殆どが杯細胞に分化したものを goblet phenotype、IL-13 を添加せずにその殆どが線毛細胞に分化したものを ciliated phenotype とした。ここで、IL-13 添加培養により goblet phenotype となった培養細胞のうち真に杯細胞の形質を示すものを IL-13 誘起性杯細胞と呼ぶこととした。また、分化の完了した ciliated phenotype 及び goblet phenotype における IL-13 の影響を確認する際には、培養第 14 日目に一旦 IL-13 を含まない通常培地に交換し、その 24 時間後に IL-13 による刺激を行った。細胞培養プロトコールについては、図 3 にその詳細を記載する。本論文では、ALI 法で得られた細胞の分化形態をもとに、気相側を管腔側、培地側を基底膜側と呼称することとした。

(3) 免疫組織化学的評価

前述のとおり培養した気道上皮細胞 (ciliated phenotype 及び goblet phenotype) は、培養第 14 日目に 10%ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋を行い、8 μ m の薄切切片を作成した。得られた検体にヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) および Periodic acid-Schiff (PAS) 染色 (粘液多糖体染色)

を行った。MUC5AC の免疫組織化学染色に関しては、anti-MUC5AC antibody (Santa Cruz 社：テキサス州、米国) を一次抗体として用い、二次抗体には DAKO Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Dako 社：カリフォルニア州、米国) を用いた。発色基質にはジアミノベンジジン (Dako 社) を用い、顕微鏡下に観察して評価した。

(4) Reverse Transcription quantitative PCR 法 (RT-qPCR 法) による気道上皮細胞ペリオスチン mRNA の測定

前述の条件で 14 日間培養した気道上皮細胞 (ciliated phenotype 及び goblet phenotype) に対する IL-13 刺激の効果を検討する目的で、RT-qPCR 法によるペリオスチン mRNA の測定を行った。Total RNA の抽出には、Aurum total RNA Mini kit (Bio-Rad 社：カリフォルニア州、米国) を用いた。抽出した total RNA は、Nano Drop 2000 (Thermo Scientific 社：マサチューセッツ州、米国) を用いて純度、濃度を計算し、RNase free water を用い濃度の均一化を行った。その後、qScript cDNA SuperMix (Quanta BioSciences 社：メリーランド州、米国) を用いて、total RNA を cDNA へと変換し、real-time PCR に用いた。得られた結果については、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を内部コントロールとした発現量の補正を行った。使用したプライマー (17, 33) を表 1 に示す。Real-time PCR には PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quanta BioSciences

社)を使用した。

(5) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) によるペリオスチン分泌量の測定

ALI 法 14 日間の培養により分化の完了した気道上皮細胞(ciliated phenotype 及び goblet phenotype) に対する IL-13 刺激の効果を検討する目的で、管腔側及び基底膜側培地中に分泌されるペリオスチン量を ELISA にて測定した。細胞培養 14 日目の培地交換の際に、すべての群は IL-13 を含まない培地に変更し、1 日置いた。培養 15 日目に測定のため、管腔側に Hanks' balanced salt solution (Lonza 社)250 μ L を添加した。IL-13 刺激は前述の図 3B に示した要領で行った。72 時間後に管腔側、基底膜側それぞれの培地を回収し、Human periostin/OSF-2 DuoSet (R&D Systems 社) を用いてペリオスチン分泌量を測定した。

(6) 統計解析

測定結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計解析は JMP バージョン 10 (SAS 社: ノースカロライナ州、米国) を用いた。群間差に関する統計解析は分散分析及び Fisher 多重分析を行い、 p 値が 0.05 未満を有意と判断した。

第 3 節 結果

(1) 免疫組織化学染色による ALI 法での分化の検討

培養細胞の薄切切片に対し HE 染色、MUC5AC 免疫染色及び PAS 染色を行った。Ciliated phenotype と比較して、培地に IL-13 5ng/mL を 14 日間添加し培養した goblet phenotype では培養細胞の殆どが濃染するムチン蛋白や粘液を有する杯細胞に分化していることを確認した (図 2B)。

(2) RT-qPCR 法による気道上皮ペリオスチン mRNA 発現の検討

ALI 法で 14 日間培養した後の気道上皮細胞中のペリオスチン mRNA 発現をみたところ (図 4)、ciliated phenotype ではほとんど認められなかったが、goblet phenotype では基底膜側培地に添加した IL-13 の濃度依存性に有意に発現が増加していた ($p < 0.001$)。一方、図 3B のプロトコールに示すように、ALI 法 14 日間終了後に一旦 IL-13 非添加の通常培地に戻して 1 日培養すると、goblet phenotype と ciliated phenotype において、ペリオスチン mRNA の発現に有意な差異を認めなかった。しかし、IL-13 刺激を加えると、goblet phenotype において顕著にペリオスチンの mRNA 発現が上昇した (図 5: IL-13 刺激群)。Ciliated phenotype においては、IL-13 刺激によりペリオスチン mRNA が上昇する傾向はみられたものの統計的に有意な変化ではなかった。

(3) ELISA によるペリオスチン分泌量の測定

ELISA によりペリオスチンの分泌を調べたところ、IL-13 10ng/mL の刺激により goblet phenotype では基底膜側の分泌が顕著に亢進することが分かった (図

6A)。また、ciliated phenotype でも少量ながら基底膜側へのペリオスチン分泌が増えることが分かった。一方、管腔側へのペリオスチン分泌はもっぱら goblet phenotype で観察され、ciliated phenotype による分泌は見られなかった (図 6B)。なお、IL-13 5ng/mL の刺激では両群の分泌に有意差は認められなかった (データ割愛)。

第4節 小括

ALI 法により分化した気道上皮細胞はペリオスチン mRNA を発現しており、その程度は goblet phenotype の方が ciliated phenotype よりも数倍強いことが分かった。さらに ELISA による計測においても goblet phenotype は ciliated phenotype と比較して、数倍量のペリオスチンを分泌することが分かった。特に、goblet phenotype でのペリオスチン分泌は基底膜側のみならず、管腔側にも観察された。IL-13 刺激はペリオスチンの分泌を亢進させるが、管腔側への分泌はもっぱら goblet phenotype でのみで見られ、ciliated phenotype は管腔側への分泌を全く来たさなかった。

以上の結果から、IL-13 刺激は、気道リモデリングにおいて重要なペリオスチンの基底膜側への分泌を亢進させた。ペリオスチンは上皮直下基底膜肥厚と密接に関連しているため(17)、気道上皮から分泌されるペリオスチンもこれに関

連している可能性が考えられた。さらに、goblet phenotype のみが管腔側にペリオスチンを分泌するという結果は、重症喘息において喀痰中にペリオスチンが検出されるという臨床報告をうまく説明しうるものと推測された。Goblet phenotype が主として IL-13 誘起性杯細胞から構成されていることを考慮すると、以上の結果は IL-13 誘起性杯細胞の持つ新たな特徴を示すものと考えられる。

第3章 IL-13 誘起性杯細胞における TLR4 発現の検討

第1節 目的

気道上皮に発現した TLR4 は、単に LPS を認識する受容体としての役割だけでなく、その他の様々な内因性の物質を認識するほか、気管支喘息の発症や気道炎症の制御に働き、気道上皮における免疫応答に深く関与している(25-29)。

Tanabe らは、IL-13 誘起性杯細胞が、線毛細胞と比較して Th2 サイトカインのみならず、様々な炎症性メディエーターを分泌し、気道における免疫を修飾する immune effector 細胞となる可能性を指摘した(34)。自然免疫を修飾するという観点から、IL-13 誘起性杯細胞には TLR4 をはじめとしたパターン認識受容体の発現増加がみられる可能性が考えられるが、線毛細胞と杯細胞における TLR4 発現の差異は明らかではない。

そこで本章では、重症気管支喘息の気道上皮モデルの一つである IL-13 誘起性杯細胞が、TLR4 発現の増加を介して気道上皮における過剰な免疫応答を惹起することを想定し、ALI 法により分化させた ciliated phenotype と goblet phenotype を比較することにより、気道上皮における TLR4 発現の相違について検討した。

第2節 方法

(1) RT-qPCR 法による NHBEc における TLR4 mRNA 発現の検討

前章第2節(1)と同様の方法により培養した NHBEc を用い、RT-qPCR を行った。Total RNA の抽出は前章第2節(4)の方法を用いた。細胞培養プロトコールについては、図 7A にその詳細を記載する。また、比較対象として TLR4 同様、気管支喘息の病態の成立や増悪と関係していると報告されている TLR3, 7, 8 の mRNA (35)についても測定した。分化の完了した ciliated phenotype 及び goblet phenotype における IL-13 の影響を確認する際には、培養第 14 日目に一旦 IL-13 を含まない通常培地に交換し、その 24 時間後に IL-13 による刺激を行った(図 7B)。

(2) 細胞内シグナル伝達阻害薬を用いた TLR4 mRNA 発現抑制の検討

細胞内シグナル伝達阻害剤で前処理した気道上皮(ciliated phenotype)で TLR4 mRNA 発現がどのように変化するのかについて、RT-qPCR による評価を行った。細胞内シグナル伝達阻害剤としては、IL-13 受容体からの固有シグナル伝達経路[Janus kinase (JAK) 及びその下流に位置する signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6)]に対する阻害薬である leflunomid (Sigma-Aldrich 社) 40 μ M, 120 μ M の各量、もしくは IL-13 によっても活性化され細胞の増殖や分化に関わる MAP キナーゼ経路の主要分子である MAP Kinase

Kinase (MEK) に対する阻害薬 PD98059 (Sigma-Aldrich 社) 10 μ M, 20 μ M の各量を用いた。RT-qPCR に使用したプライマー(33, 36)は表 2 に示す。また、細胞内シグナル伝達阻害薬の効果を検討するにあたり、図 8 のプロトコールに従って検討した。すなわち、ALI 法による培養 14 日目の気道上皮を、シグナル伝達阻害剤を含む IL-13 非含有培地で 2 時間処理し、その後に IL-13 (5ng/mL) による刺激を 24 時間加えた。なお、IL-13 受容体からの固有シグナル経路をブロックすることにより、goblet phenotype は ciliated phenotype へと分化することが明らかとなっているため(32)、本実験は ciliated phenotype を用いて行った。

(3) 免疫組織化学的評価

培養した気道上皮細胞 (ciliated phenotype 及び goblet phenotype) を 10% ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋を行い、8 μ m の薄切切片を作成した。得られた検体にはすべて HE 染色を行った。TLR4 の発現に関する免疫組織化学染色には、sc-10741 TLR4 antibody (Santa Cruz 社) を一次抗体として用い、二次抗体には DAKO Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Dako 社) を用いた。発色基質にはジアミノベンジジン (Dako 社) を用い、検鏡下に評価した。

(4) LPS 刺激後の IL-8 分泌量の測定

ALI 法により分化した気道上皮細胞 (ciliated phenotype 及び goblet pheno-

type) に対して、TLR4 のリガンドである LPS (5 μ g/mL) または IL-13 (5ng/mL)、もしくはその両方で基底膜側から刺激を行い、管腔側細胞上清及び基底膜側培地に含まれる IL-8 を ELISA にて測定した。まず、細胞培養 14 日目の培地交換の際に、すべての群で IL-13 非添加の通常培地に変更した後、1 日おいて刺激を行った。管腔側に分泌される IL-8 を測定するため、培養 15 日目に管腔側に Hanks' balanced salt solution (Lonza 社) 250 μ L を添加した。24 時間後、管腔側細胞上清及び基底膜側培地を回収し、Human CXCL8/IL-8 DuoSet (R&D Systems 社) を用いて IL-8 濃度を測定した。本実験のプロトコールの詳細は図 9 に示す。

(5) 統計解析

測定結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計解析には JMP バージョン 10 (SAS 社) を用いた。群間差に関する統計解析には分散分析及び Fisher 多重分析を行い、 p 値が 0.05 未満を有意と判断した。

第 3 節 結果

(1) RT-qPCR 法による TLR4 mRNA の発現の検討

ALI 法で 14 日間分化させた気道上皮細胞の TLR4 mRNA 発現をみたところ、ciliated phenotype に比較して goblet phenotype (2, 5, 10 ng/mL の各濃度の IL-13 で培養) ではその発現が有意に増加した ($p < 0.0001$) (図 10)。一方、TLR3,

7, 8 の mRNA 発現については、各群に差は見られなかった。次に、一旦分化した気道上皮細胞 (ciliated phenotype 及び goblet phenotype) を IL-13 非添加の培地で 1 日置いた後、再度 IL-13 (5ng/mL) で刺激して TLR4 mRNA の発現を調べた (図 11)。どちらの群も IL-13 の刺激により TLR4 の mRNA の発現が有意に増加した ($p < 0.0001$)。

(2) 細胞内シグナル伝達阻害薬を用いた TLR4 mRNA 発現抑制の検討

IL-13 が気道上皮 (ciliated phenotype) に及ぼす影響を細胞内シグナルの面から検討するため、シグナル伝達阻害薬を用いた時の TLR4 mRNA 発現について調べた (図 12)。IL-13 シグナル伝達の直下にある JAK/STAT-6 の阻害薬である leflunomid により TLR4 mRNA 発現は有意に抑制された ($p < 0.0001$)。これに対し、MEK 阻害薬である PD98059 を添加しても IL-13 刺激後の TLR4 mRNA 発現は影響を受けなかった。

(3) TLR4 免疫組織化学染色による検討

ALI 法による分化誘導後の気道上皮について、TLR4 の免疫組織化学染色を行ったところ、goblet phenotype は ciliated phenotype と比較して管腔側細胞膜に明らかな極性を持ってより濃染した TLR4 を認めた (図 13)。

(4) LPS 刺激による IL-8 分泌量の検討

TLR4 のリガンドである LPS (5 μ g/mL) で気道上皮細胞を刺激し、管腔側及び

基底膜側への IL-8 の分泌について調べた (図 14)。IL-13 非添加の状態では ciliated phenotype は基底膜側にはほとんど IL-8 を分泌せず、管腔側にのみ分泌していた。これに対し、goblet phenotype は基底膜側と管腔側の両方に IL-8 を分泌していた。LPS (5 μ g/mL) で刺激すると、基底膜側への IL-8 分泌は ciliated phenotype、goblet phenotype いずれにおいても著明に増加した ($p < 0.0001$)。これに対し、管腔側では、goblet phenotype においてのみ有意な IL-8 の分泌増加を認めた。Ciliated phenotype 及び goblet phenotype のいずれにおいても、IL-13 は LPS による IL-8 分泌促進効果を更に増強した。

第 4 節 小括

Goblet phenotype は、ciliated phenotype と比較して有意に TLR4 mRNA の発現が増加していた。さらに、免疫組織化学的検討において、IL-13 誘起性杯細胞では管腔側に極性をもって強く TLR4 の発現が見られた。このことは気道上皮に対する IL-13 刺激が細胞を goblet phenotype へと分化誘導し、併せて TLR4 の発現を増強させることを示唆する。そして、leflunomid が ciliated phenotype の TLR4 mRNA 発現を有意に抑制したことから、TLR4 の発現には IL-13 からの固有のシグナル伝達経路である JAK/STAT シグナリングが関与していることが示唆された。また、goblet phenotype は ciliated phenotype と比較して LPS 刺激に

応答して IL-8 を分泌する能力も亢進していた。

TLR4 が IL-13 誘起性杯細胞の管腔側に強く発現しているという結果から、杯細胞は、線毛細胞と比較して、経気道的に侵入した病原体やアレルゲンを認識しやすくなっていることが考えられた。そして、TLR4 が刺激を受けると、IL-8 の分泌などを介して好中球の遊走を促進し、局所での炎症の遷延化を起こしているものと推測できる。本実験の結果より、IL-13 誘起性杯細胞は、TLR4 の発現増強を介して、経気道的に侵入した病原体等による様々な免疫応答を修飾し、結果として炎症の増悪や粘液分泌の亢進を招くことで、気管支喘息の病態悪化に関わっている可能性が示唆された。

第4章 考察

本研究により、IL-13 誘起性杯細胞の役割に関して、従来考えられていた粘液分泌細胞としての働き以外に二つの新たな機能を有することを見出した。

一つは、気道リモデリングと密接な関わりを有するペリオスチンを分泌することであり、ALI 法にて分化させた IL-13 誘起性杯細胞は、基底膜側のみならず管腔側にもペリオスチンを分泌することが分かった。これまで、ペリオスチンは主に気道上皮下の線維芽細胞から分泌すると考えられていた(17)。しかしながら、気道上皮細胞自体が IL-13 の刺激によりペリオスチンを分泌する能力を有すること、また IL-13 誘起性杯細胞では線毛細胞に比べその分泌能が大きいこと、さらには IL-13 誘起性杯細胞が線毛細胞では見られない管腔側へのペリオスチン分泌能を有することが新たな知見として示された。

もう一つは、気道上皮においてパターン認識受容体の一つである TLR4 の発現が IL-13 の刺激により亢進することで、特に IL-13 誘起性杯細胞では TLR4 mRNA の発現が強く認められたこと、また、免疫組織化学染色により管腔側に明らかな極性を持って TLR4 の発現が見られたことは新知見であった。さらに、ペリオスチン分泌及び TLR4 発現のいずれも、線毛細胞に比較して IL-13 誘起性杯細胞そのものでより強く認められただけでなく、IL-13 刺激がその反応をさらに修飾することが分かった。

これまで、気管支喘息の増悪に関与する IL-13 の役割として、気道上皮における杯細胞の過形成とそれに引き続く粘液産生の亢進が分かっており (11-15)、これが気道の狭小化に関わるものと考えられてきた。しかし、本研究により、IL-13 誘起性杯細胞そのものが粘液分泌以外の新たな機能を有し、気管支喘息の重症化や難治化のメカニズムをより複雑にする役割の一端を担っている可能性が示唆された。

種々の臨床報告により、IL-13 が気道上皮の杯細胞の過形成を惹起し、気道粘膜の肥厚や細胞増生を主体とする「リモデリング」という現象を引き起こすことが分かっている (37)。そして、このリモデリングが気管支喘息の病態悪化の重要な鍵を握っている (17)。本研究において、IL-13 誘起性杯細胞が基底膜方向に多量のペリオスチンを分泌することが分かった。その量は線毛細胞と比較して 4 倍程度であったことから、血清ペリオスチンにも影響を与えるとも考えられる。実際の臨床例においても、杯細胞がペリオスチンを分泌して基底膜肥厚や粘膜下の線維化などに関与していることが推察される。また、IL-13 誘起性杯細胞のみが管腔側にもペリオスチンを分泌する能力を持っていたことから、重症気管支喘息患者の喀痰中から検出されるペリオスチンは、増生した杯細胞から分泌されているのではないかとの仮説が考えられた。これらのことから、血清ペリオスチン値が、気管支喘息における重症度を鋭敏に反映するバイオマ

カーになるだけでなく、血清ペリオスチン値の上昇と気道粘液中のペリオスチンの存在が、気道上皮における杯細胞の増生やその活性化の程度を推し量るバイオマーカーとして有用となる可能性がある。

IL-13 刺激は、気道上皮細胞における TLR4 の発現を誘導し、特に IL-13 誘起性杯細胞においては管腔側で強い発現が見られた。このことから、IL-13 誘起性杯細胞は TLR4 を介して気道局所における免疫応答を修飾し、気管支喘息の病態悪化に関わっている可能性が考えられた。TLR4 は、LPS だけでなく多くの内因性の物質によっても活性化されることが知られている(26)。気管支喘息では杯細胞が増生し、その管腔側(気道内腔側)に TLR4 が過剰に発現することにより、経気道的に侵入してきた病原体やアレルゲンなどを鋭敏に認識するようになるものと予想される。喘息の発症や重症化にはエンドトキシンが関与しているとの報告(38)もあり、IL-13 刺激による気道上皮の goblet phenotype 化はエンドトキシンや種々の内因性物質に対する感受性を増大させ、気道上皮での様々な免疫応答が起こりやすくなる病的基盤を形成しているのではないかと考えられる。実際に、ハウスダストを経気道的に投与した喘息動物モデルでは、TLR4 アンタゴニストの投与により有意に気管支肺胞洗浄液中のリンパ球や好酸球が減少することが報告されている(28)。それに加え、重症気管支喘息の患者の中には、好酸球浸潤のみならず好中球浸潤を主体とした好中球性気道炎症がみられ

る群もある(39)。IL-8 は好中球の局所集積に重要な役割を果たすことが分かっており(40)、実際に気管支喘息の好中球性の気道炎症は、環境暴露や細菌のエンドトキシンなどで誘発されるとの報告もある(41)。本実験で IL-13 誘起性杯細胞が LPS に反応して IL-8 の分泌を増大させたことを考えると、IL-13 誘起性杯細胞上の TLR4 を介した免疫応答が気管支喘息の炎症増悪サイクルにおいて非常に重要な役割を果たす可能性が考えられる。さらに、気道感染症そのものが気管支喘息の発症に関与するという報告(42-44)もあり、TLR4 を介する免疫応答が気道炎症の修飾のみならず、気管支喘息の発症にも影響を及ぼすかもしれない。

本研究から得られた結果にこれまでの知見を交え、気管支喘息における IL-13 誘起性杯細胞の役割を仮説として示す(図 15)。気管支喘息患者の気道上皮においては、種々の炎症細胞から分泌された IL-13 を代表とする Th2 サイトカインが局所環境を形成している。これが気道上皮に杯細胞化を誘導し、増生した杯細胞がペリオスチン分泌を介して気道のリモデリングに関与するだけでなく、炎症細胞により傷害された上皮から放出される内因性の物質を TLR4 などのパターン認識受容体により杯細胞が認識し、過剰な免疫応答を引き起こすことで、そこに更なる炎症細胞を誘導するといった悪化のサイクルを形成し、喘息の難治化が引き起こされている可能性が考えられる。また、気道感染が重なると、

過剰に発現した TLR4 を介してエンドトキシンや pneumolysin など病原体の構成成分が認識され、免疫応答をさらに修飾することが推察され、これが更なる増悪のメカニズムとなっているものと考えられる。

本研究の限界としては、*in vitro* において気道上皮のみを培養したモデルを使用している点が挙げられる。実際の生体においては、各種炎症細胞の浸潤が見られ、様々な細胞が相互に影響を及ぼし合い、複雑な病態を形成している。本実験系ではそのような他因子の影響は考慮されておらず、必ずしも生体内で起こりうる反応を再現できているとは言えない。しかしながら、上皮細胞に局限して、IL-13 による作用を純粹に見ることができるという点は、逆に利点であるともいえる。IL-13 による杯細胞の過形成自体に関しては、これまで動物のみならず、ヒトにおける研究でも多くの報告があり、よく知られた事実であった。しかし、このような IL-13 誘起性杯細胞に気道リモデリングや外界の物質を認識する自然免疫活性化の役割があることを示したのは本研究が初めてであり、今後は動物モデルや実際の喘息患者の病理に関してこのような観点からの検討を行うことで、杯細胞のより明確な役割が解明できる可能性がある。

第5章 結論

本研究により，以下のことが明らかとなった。

1. Air Liquid Interface (ALI) 法により 14 日間培養した気道上皮細胞は、IL-13 存在下では goblet phenotype (IL-13 誘起性杯細胞を中心とする上皮) に、非存在下では ciliated phenotype (線毛細胞を中心とする上皮) に分化した。
2. IL-13 刺激は、気道上皮細胞からのペリオスチンの基底膜方向への分泌を惹起した。この作用は、線毛細胞に比較し IL-13 誘起性杯細胞でより顕著であった。また、IL-13 誘起性杯細胞は、基底膜側のみならず管腔側にもペリオスチンを分泌する能力を有していた。
3. IL-13 刺激は、気道上皮細胞における TLR4 mRNA の発現を亢進させた。本作用は、leflunomid により阻害されることから JAK/STAT-6 経路を介したものと考えられた。
4. 免疫組織化学染色で、IL-13 誘起性杯細胞は管腔側（気道内腔側）に TLR4 を強く発現していた。
5. IL-13 誘起性杯細胞を LPS で刺激すると IL-8 産生が顕著に亢進したことから、本作用は発現増大した TLR4 を介して起きているものと考えられた。

謝辞

本稿を終えるに当たり、御指導、御高閲を賜りました、防衛医科大学校分子生体制御学講座 教授 四ノ宮成祥博士、防衛医科大学校内科学講座 教授 川名明彦博士、防衛医科大学校外科学講座 准教授 尾關雄一博士に衷心より感謝申し上げます。

本研究の実施、遂行及び論文の作成に際し御指導頂きました、防衛医科大学校内科学講座 叶宗一郎博士、米国 Virginia Commonwealth University School of Medicine Bruce K. Rubin 教授に深謝申し上げます。

本研究の遂行に関し、貴重な御助言、御協力を賜りました、町立信越病院内科 田名部毅博士、大分医科大学呼吸器内科 小宮幸作博士、昭和大学耳鼻咽喉科学 洲崎勲夫博士、防衛医科大学校内科学講座教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

本研究の主旨は、米国胸部疾患学会（2015 年 5 月、コロラド州、米国）で発表した。

引用文献

1. Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Current opinion in pharmacology*. 2010;10(3):236-45.
2. Busse W, Elias J, Sheppard D, Banks-Schlegel S. Airway remodeling and repair. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(3):1035-42.
3. Soderberg M, Hellstrom S, Sandstrom T, Lundgren R, Bergh A. Structural characterization of bronchial mucosal biopsies from healthy volunteers: a light and electron microscopical study. *The European respiratory journal*. 1990;3(3):261-6.
4. Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(2):517-23.
5. Rubin BK, Tomkiewicz R, Fahy JV, Green FH. Histopathology of fatal asthma: drowning in mucus. *Pediatric pulmonology*. 2001;Suppl 23:88-9.

6. Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax*. 1969;24(2):176-9.
7. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *The American review of respiratory disease*. 1993;147(2):405-10.
8. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*. 1992;101(4):916-21.
9. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999;54(9):825-57.
10. Saha SK, Berry MA, Parker D, Siddiqui S, Morgan A, May R, et al. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(3):685-91.
11. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al.

Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(6):779-88.

12. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998;282(5397):2258-61.
13. Atherton HC, Jones G, Danahay H. IL-13-induced changes in the goblet cell density of human bronchial epithelial cell cultures: MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase regulation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285(3):L730-9.
14. Zhen G, Park SW, Nguyenvu LT, Rodriguez MW, Barbeau R, Paquet AC, et al. IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007;36(2):244-53.
15. Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, Nakata J, Nagai A. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell

- culture from Guinea pig tracheal epithelium. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2002;27(5):536-41.
16. Kanoh S, Tanabe T, Rubin BK. IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2011;41(12):1747-56.
 17. Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, et al. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. The Journal of allergy and clinical immunology. 2006;118(1):98-104.
 18. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. The New England journal of medicine. 2011;365(12):1088-98.
 19. Hanania NA, Wenzel S, Rosen K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. American journal of respiratory and critical care medicine. 2013;187(8):804-11.
 20. Song JS, You JS, Jeong SI, Yang S, Hwang IT, Im YG, et al. Serum

- periostin levels correlate with airway hyper-responsiveness to methacholine and mannitol in children with asthma. *Allergy*. 2015.
21. Bobolea I, Barranco P, Del Pozo V, Romero D, Sanz V, Lopez-Carrasco V, et al. Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes. *Allergy*. 2015;70(5):540-6.
 22. Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(12):1294-309.
 23. Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011;366(1579):2748-55.
 24. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
 25. Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I. Toll-like receptors and chronic lung disease. *Clinical science*. 2005;109(2):125-33.
 26. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation

- by high mobility group box 1 protein. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(9):7370-7.
27. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews Immunology*. 2010;10(4):225-35.
28. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nature medicine*. 2009;15(4):410-6.
29. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(12):1645-51.
30. Tanabe T, Shimokawaji T, Kanoh S, Rubin BK. IL-33 stimulates CXCL8/IL-8 secretion in goblet cells but not normally differentiated airway cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2014;44(4):540-52.
31. Tanabe T, Shimokawaji T, Kanoh S, Rubin BK. Secretory phospholipases A2 are secreted from ciliated cells and increase mucin

and eicosanoid secretion from goblet cells. *Chest*.

2015;147(6):1599-609.

32. Tanabe T, Kanoh S, Tsushima K, Yamazaki Y, Kubo K, Rubin BK. Clarithromycin inhibits interleukin-13-induced goblet cell hyperplasia in human airway cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(5):1075-83.
33. Kanoh S, Tanabe T, Rubin BK. Dapsone inhibits IL-8 secretion from human bronchial epithelial cells stimulated with lipopolysaccharide and resolves airway inflammation in the ferret. *Chest*. 2011;140(4):980-90.
34. Tanabe T, Webb-Parker SR, Tokita E, Rubin BK. Secretory Inflammasome profiling by multiplex analysis in airway goblet cell culture. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187:A4780.
35. Bezemer GF, Sagar S, van Bergenhenegouwen J, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD, et al. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological reviews*. 2012;64(2):337-58.

36. Chen Z, Cheng Y, Xu Y, Liao J, Zhang X, Hu Y, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clinical immunology*. 2008;128(3):400-8.
37. Izuhara K, Conway SJ, Moore BB, Matsumoto H, Holweg CT, Matthews JG, et al. Roles of periostin in respiratory disorders. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2016
38. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *The New England journal of medicine*. 2002;347(12):869-77.
39. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *The European respiratory journal*. 2003;22(3):470-7.
40. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest*.

2001;119(5):1329-36.

41. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*. 2002;57(7):643-8.
42. Gern JE. Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;105:497-502.
43. Gern JE, Busse WW. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(2):132-138.
44. Message SD, Johnston SL. Viruses in asthma. *British Medical Bulletin*. 2002;61:29-43.

図・表

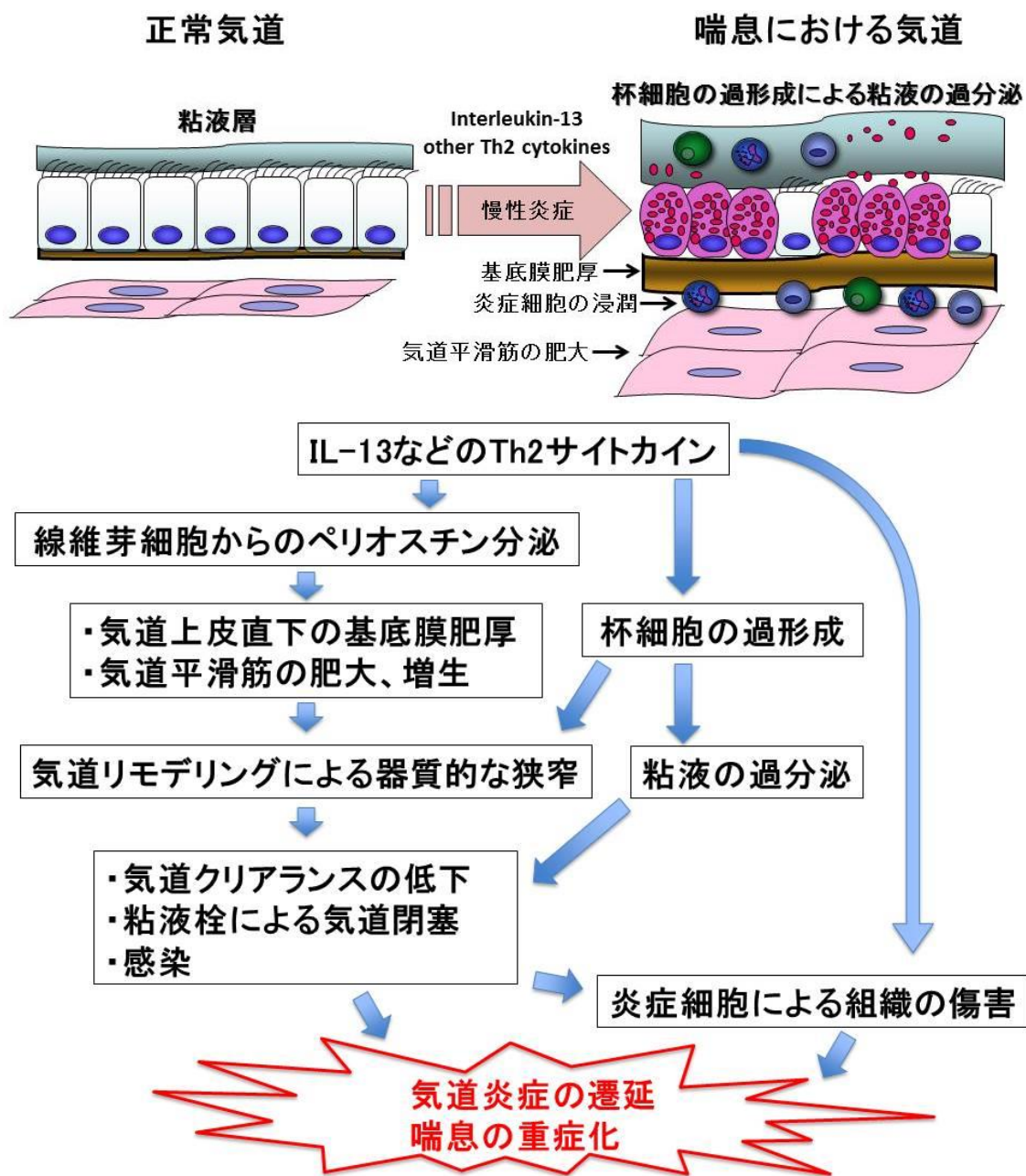


図 1：気管支喘息における気道炎症の模式図

喘息患者の気道では、Interleukin-13 (IL-13) をはじめとする Helper T-cell type2 (Th2) サイトカイン主体の気道炎症が起きる結果、杯細胞の増生、基底膜肥厚、気道平滑筋の肥大といった気道リモデリングが生じる。それにより器質的な狭窄が生じるだけでなく、粘液の過分泌により気道クリアランスが低下し、粘液貯留による気道閉塞や感染が病態を悪化させ、気道炎症が遷延し喘息の重症化に関与する。

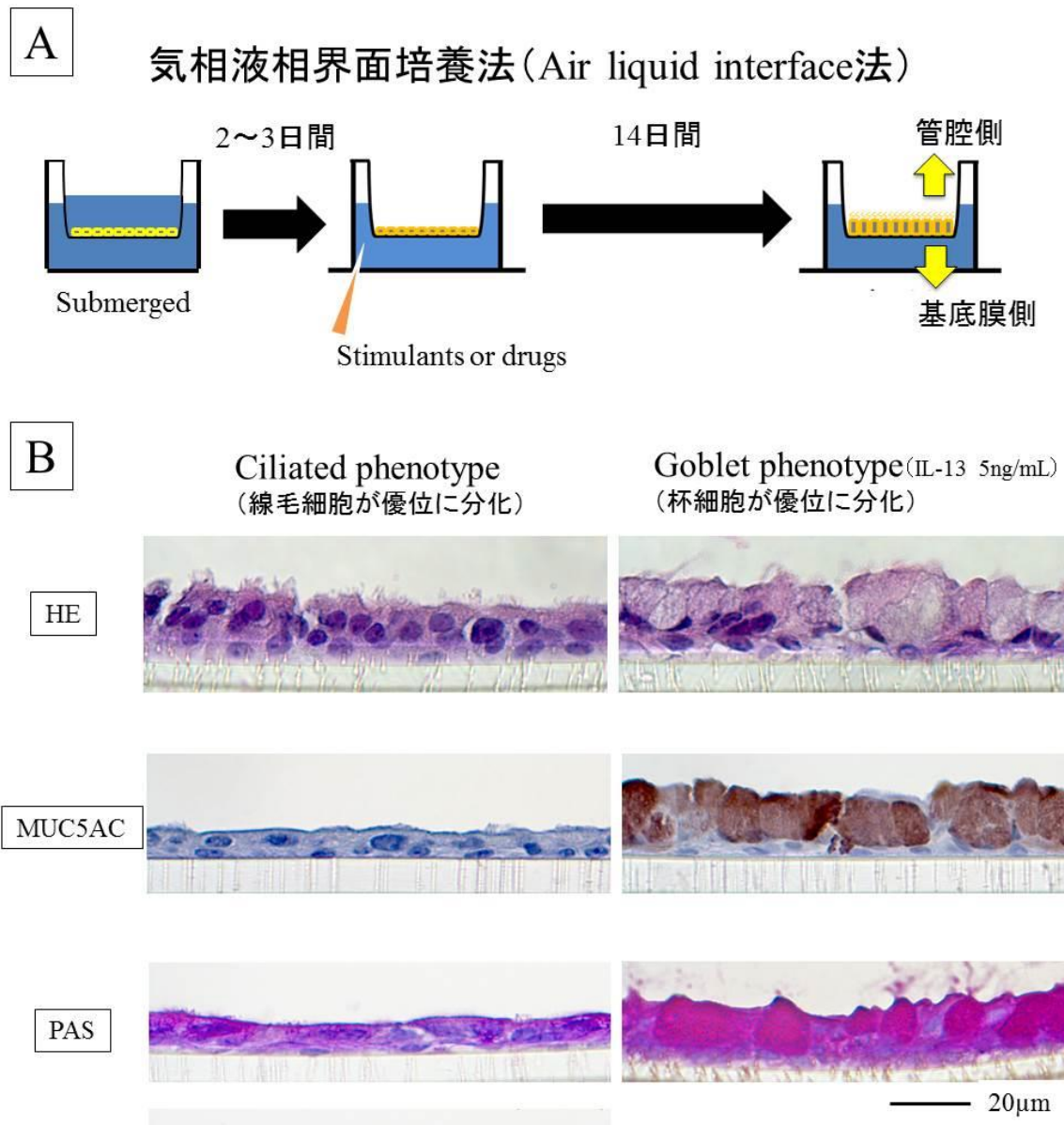


図 2 : 気相液相界面培養法 (ALI : Air liquid interface 法)

(A) トランスウェルに細胞を播種し、2~3 日後に上部の培地を吸引して気相と液相に分離し、さらに 14 日間培養した。培地側に IL-13 を添加することにより、goblet phenotype に、通常培地で培養することにより、ciliated phenotype に分化誘導することが可能である。

(B) 培養細胞の拡大像 (×400、黒線 : 20μm) を示す。上段はヘマトキシリン・エオジン染色 (HE)、中段は MUC5AC 免疫染色、下段は Periodic acid-Schiff (PAS) 染色である。MUC5AC 免疫染色や PAS 染色において、goblet phenotype では濃染するムチン蛋白や粘液を有する杯細胞に特徴的な変化を認める。

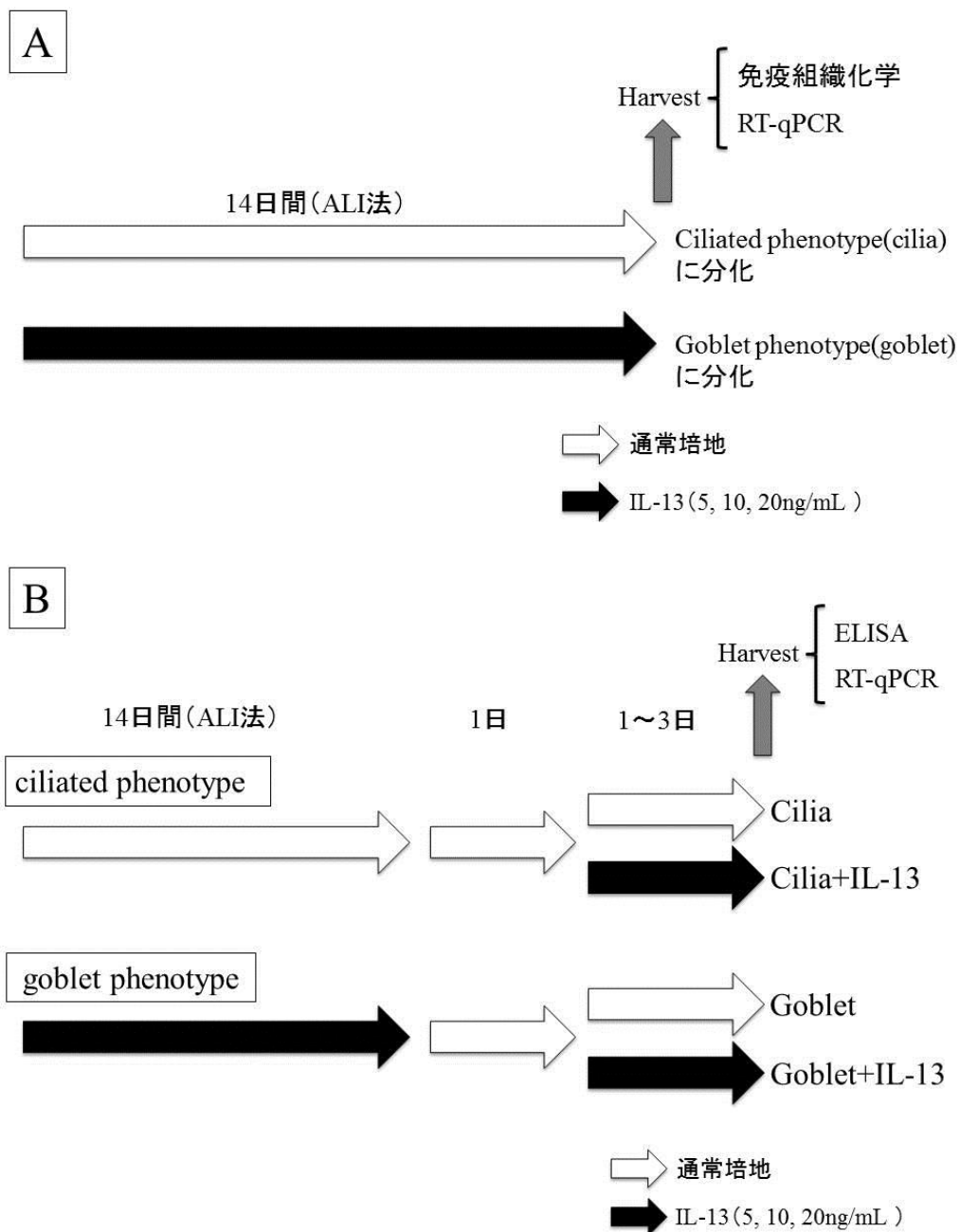


図 3：細胞培養プロトコール

(A) 通常培地で 14 日間分化誘導培養を行ったものを ciliated phenotype (cilia)、IL-13 を培地に添加し 14 日間分化誘導培養を行ったものを goblet phenotype (goblet) とした。

(B) それぞれの phenotype の細胞に対し、IL-13 による効果を確認するために、第 14 日目に両群に対し一旦 IL-13 を含まない培地に交換し 1 日培養した後、第 15 日目に各条件で刺激した。

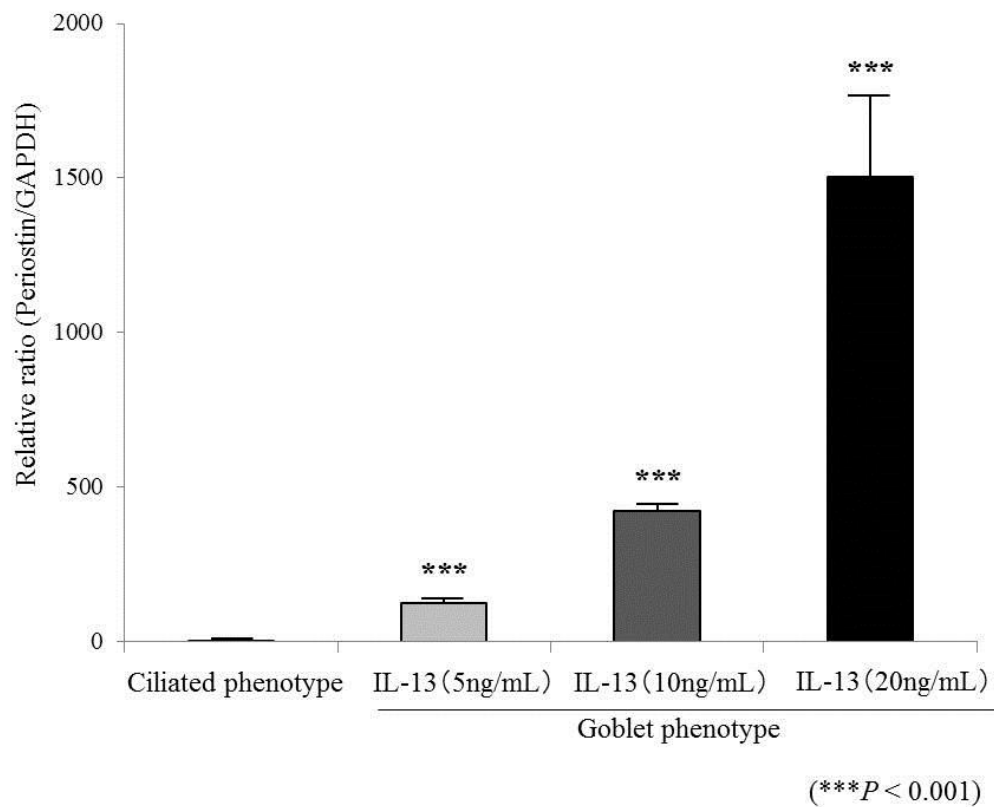


図 4 : ALI 法で分化させた気道上皮細胞 (ciliated phenotype 及び goblet phenotype) におけるペリオスチン mRNA の発現

ALI 法により気道上皮細胞を 14 日間培養し分化誘導を行った。各濃度 (5, 10, 20ng/mL) の IL-13 を基底膜側培地中に添加し培養した気道上皮細胞 (goblet phenotype に分化) におけるペリオスチン mRNA は、IL-13 非添加培養気道上皮細胞 (ciliated phenotype に分化) に比較して有意に高値であった ($p < 0.001$)。また、goblet phenotype におけるペリオスチン mRNA の発現は IL-13 の濃度依存性に上昇した。

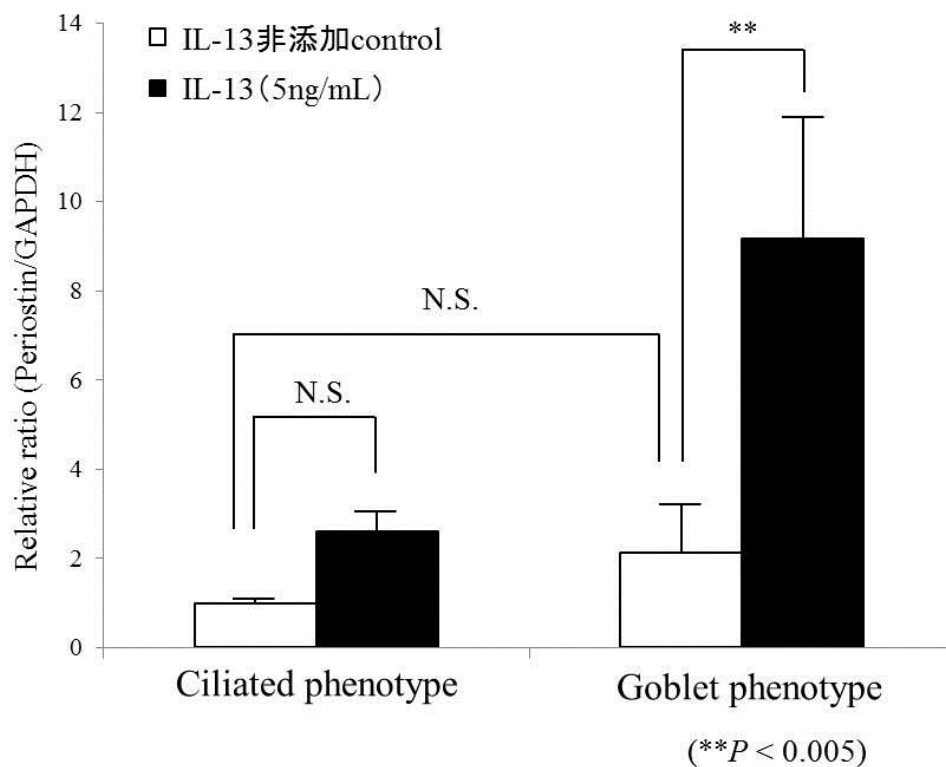
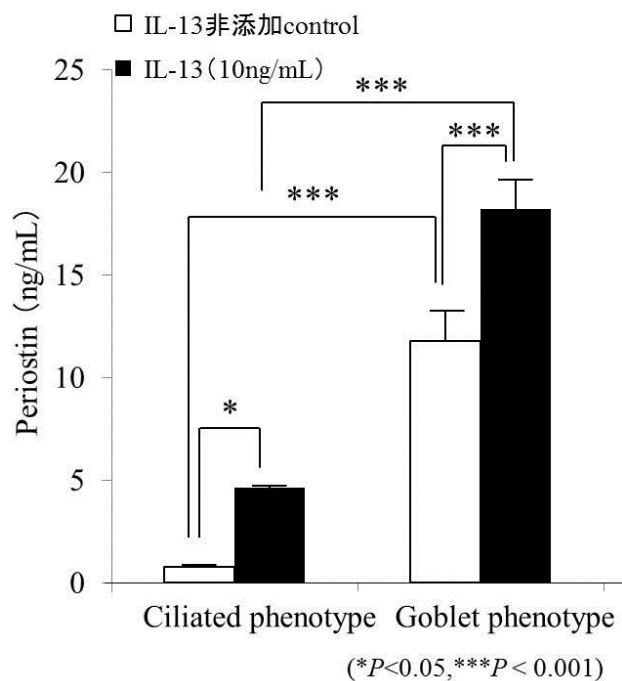


図 5 : IL-13 刺激が気道上皮細胞 (ciliated phenotype 及び goblet phenotype) のペリオスチン mRNA 発現に及ぼす効果

ALI 法 14 日間の培養により分化した気道上皮細胞に対して、一旦 IL-13 を含まない通常培地で 24 時間培養した後に、再度 IL-13 (5ng/mL) を添加して 24 時間刺激を行った。Ciliated phenotype でのペリオスチン mRNA 発現は軽度上昇する傾向が見られたものの、有意差は認められなかった。一方、goblet phenotype でのペリオスチン mRNA 発現上昇は顕著であった ($p < 0.005$)。IL-13 で刺激をしない場合、ciliated phenotype と goblet phenotype の両方でペリオスチン mRNA 発現に有意な差は見られなかった。

A：基底膜側



B：管腔側

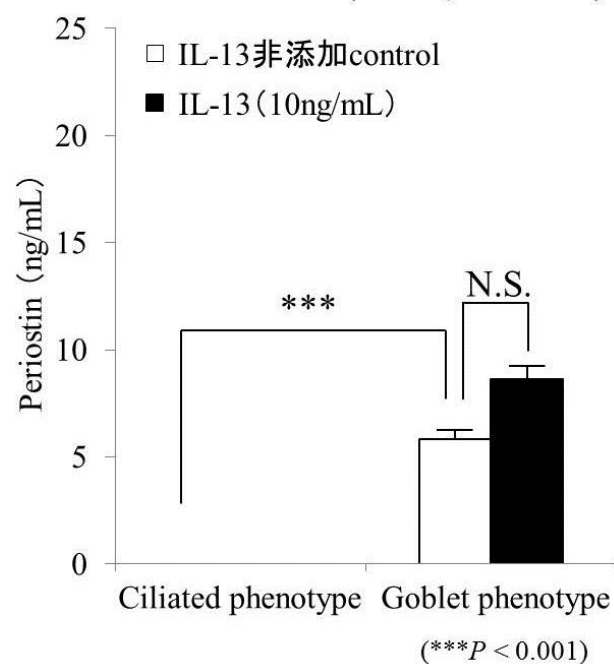


図6： IL-13 刺激による気道上皮細胞のペリオスチンタンパク分泌

(A) 基底膜側：IL-13 刺激後の基底膜側におけるペリオスチンタンパク分泌は、ciliated phenotype 及び goblet phenotype のいずれも有意に上昇した ($p < 0.05$, $p < 0.001$)。また、goblet phenotype は ciliated phenotype に比較して有意に高値の ($p < 0.001$) ペリオスチンを分泌した。

(B) 管腔側：管腔側へのペリオスチンの分泌は、goblet phenotype でのみ見られた。

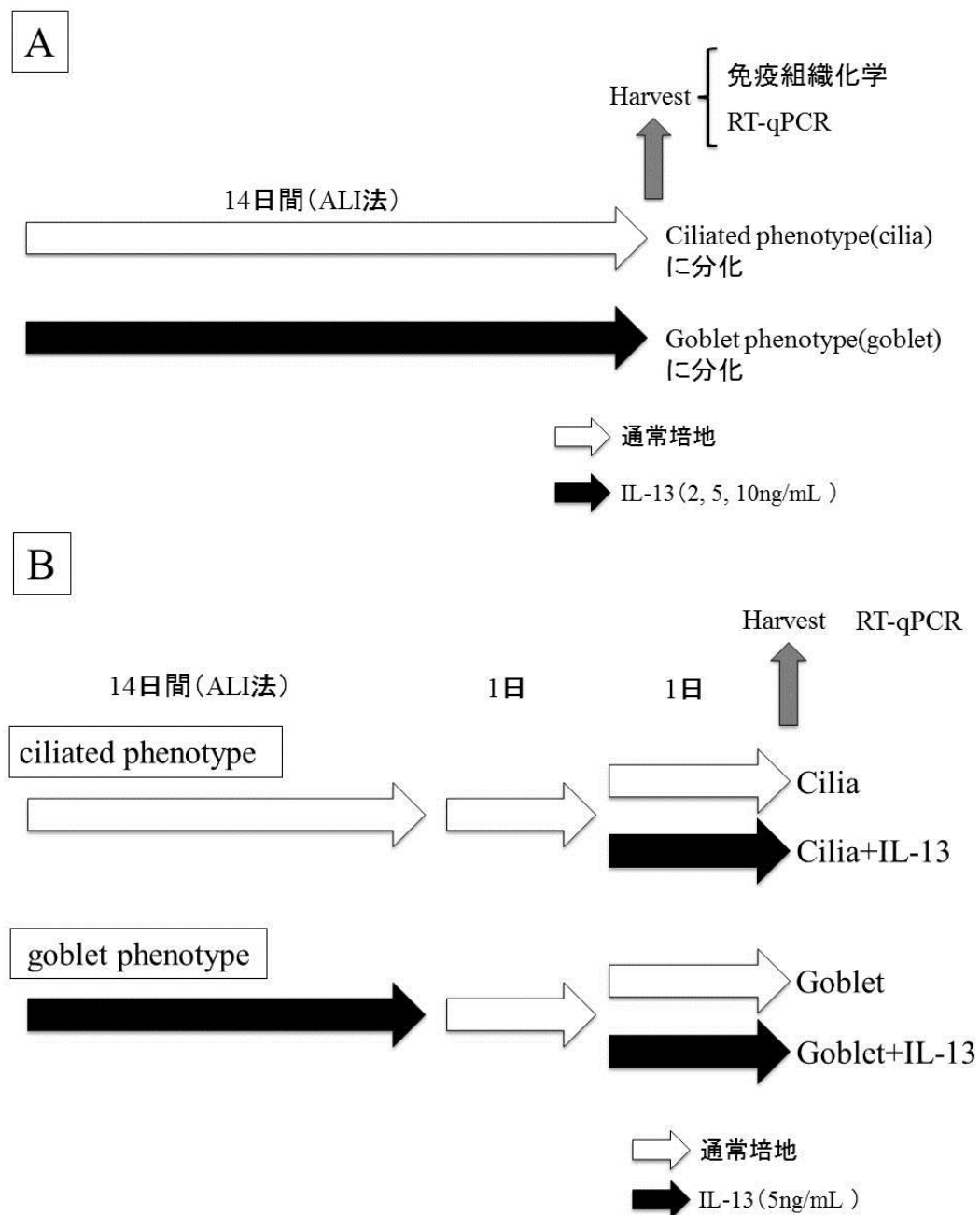


図 7：細胞培養プロトコール

(A) 気道上皮細胞を通常培地及び各濃度の IL-13 (2, 5, 10ng/mL) で 14 日間培養し ciliated phenotype (cilia) 及び goblet phenotype (goblet) に分化誘導した。

(B) それぞれの phenotype の細胞に対し、IL-13 による効果を確認するために、第 14 日目に両群に対し一旦 IL-13 を含まない培地に交換し 1 日培養した後、第 15 日目に各条件で刺激した。

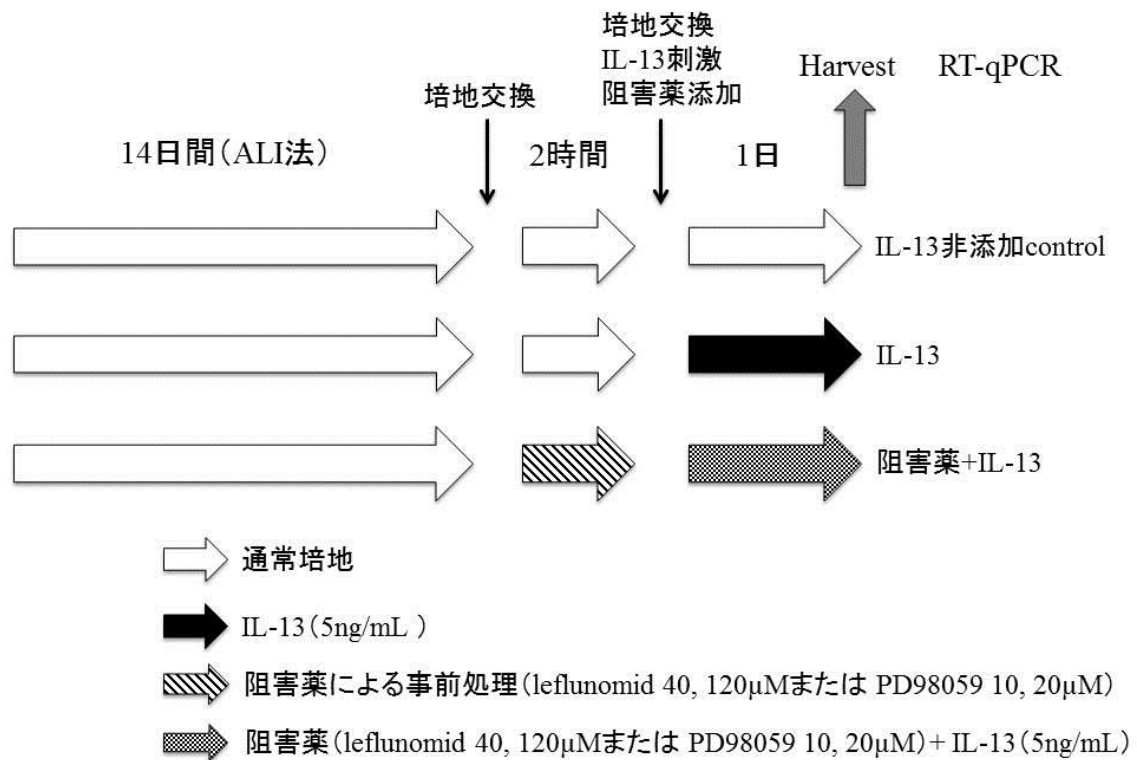


図 8：細胞内シグナル伝達阻害薬を使用した際の培養プロトコール

IL-13 が ciliated phenotype における TLR4 mRNA 発現に及ぼす影響を検討するため、IL-13 刺激の下流に位置するシグナルの阻害薬である leflunomid (JAK/STAT-6 inhibitor) 40μM, 120μM または PD98059 (MEK inhibitor) 10μM, 20μM で 2 時間の事前処理を行い、その後 IL-13 (5ng/mL) を培地に添加した。

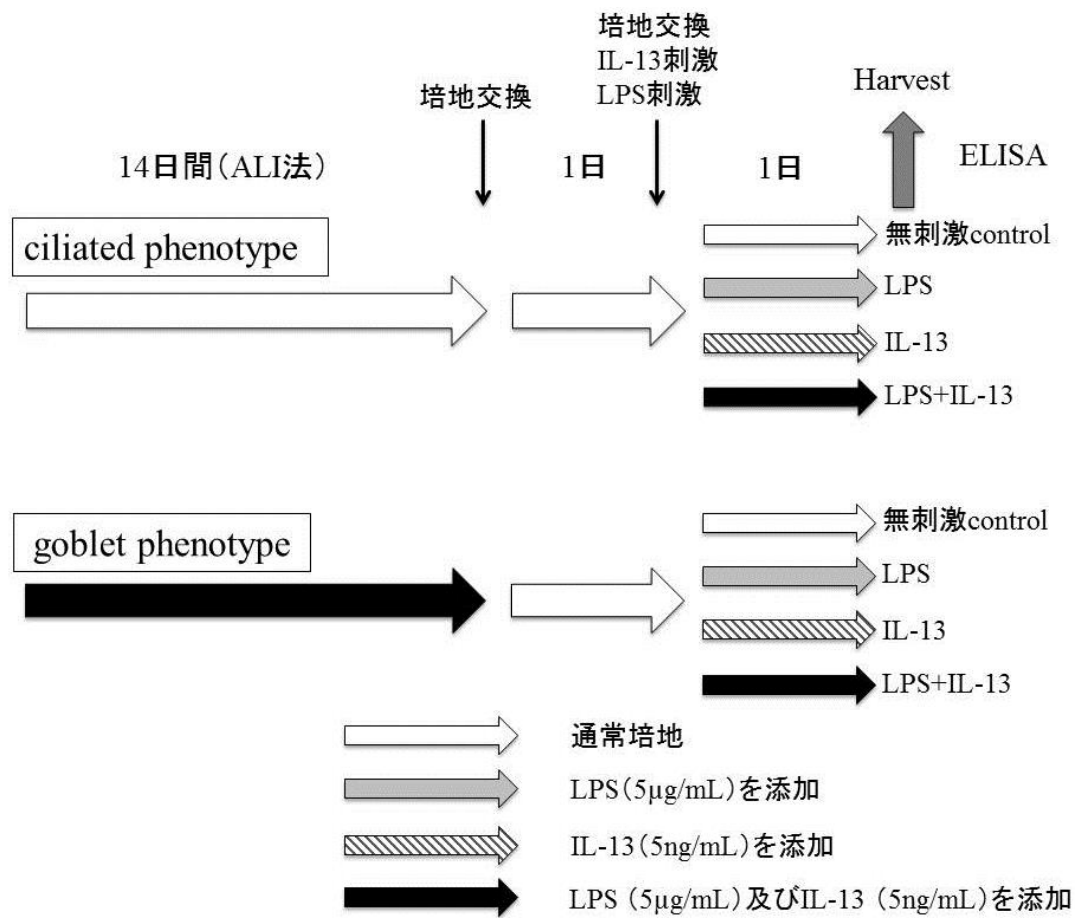


図 9 : LPS 刺激後の IL-8 分泌量測定の際の培養プロトコール

ALI 法により分化した気道上皮 (ciliated phenotype 及び goblet phenotype) に対し、TLR4 のリガンドである LPS (5 μ g/mL) または IL-13 (5ng/mL) もしくはその両方で基底膜側より刺激を行い、管腔側細胞上清及び基底膜側培地に分泌される IL-8 を測定した。ALI 法培養後第 14 日目に基底膜側培地を IL-13 非添加の培地に交換して 1 日置いた後、第 15 日目に各条件で刺激した。

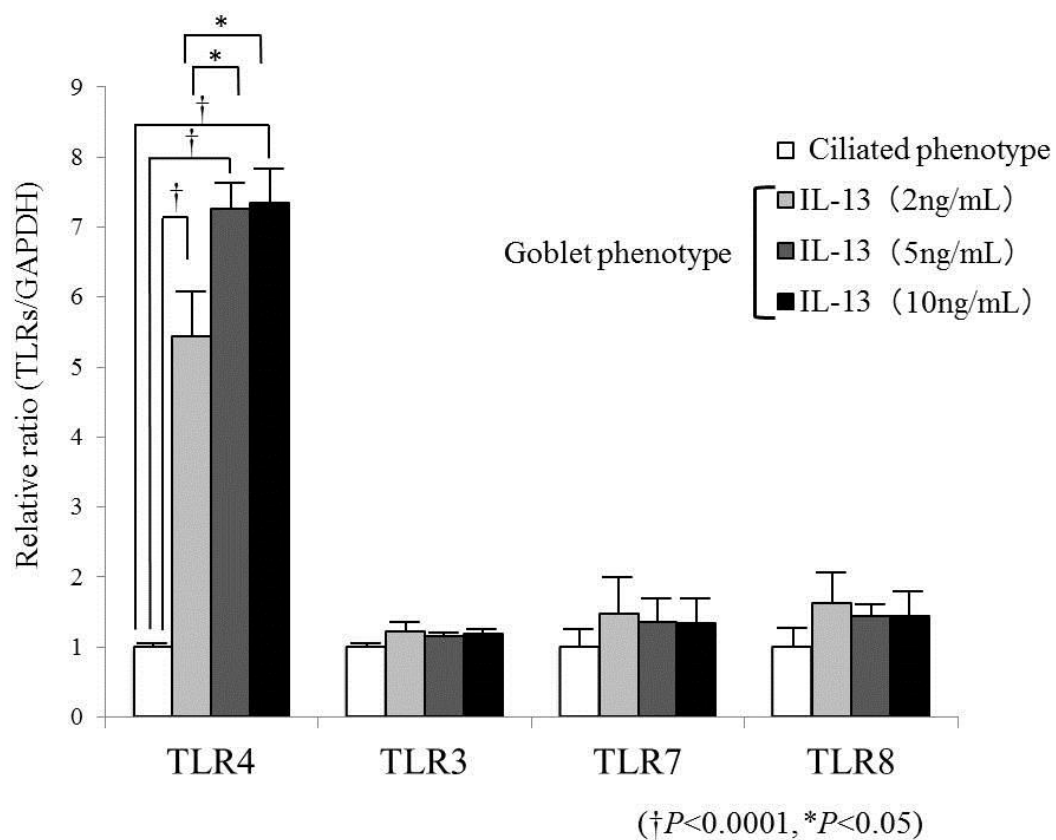


図 10 : ALI 法で分化した気道上皮細胞 (ciliated phenotype 及び goblet phenotype) の TLRs mRNA の発現

TLR4 の mRNA 発現は IL-13 刺激により有意に増加した ($p < 0.0001$) が、TLR3, 7, 8 の mRNA 発現については IL-13 による影響を受けなかった。

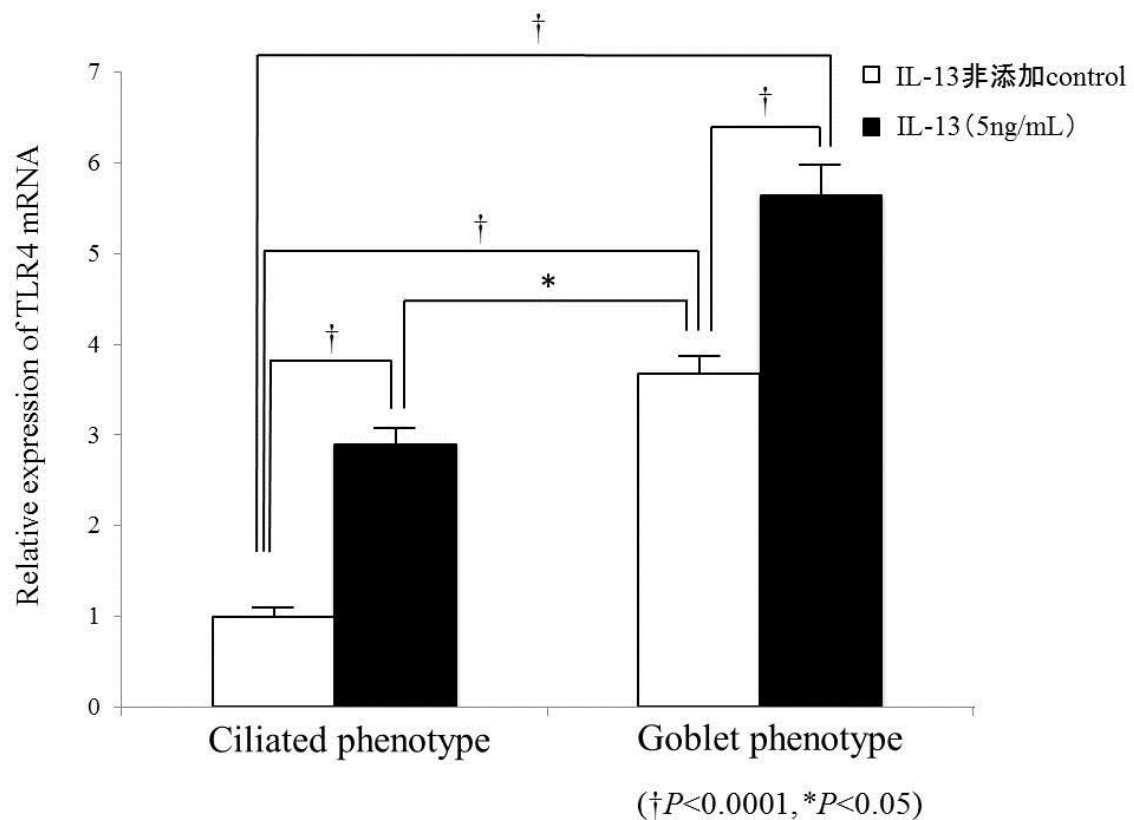


図 11：気道上皮細胞（ciliated phenotype 及び goblet phenotype）の TLR4 mRNA 発現に対して IL-13 刺激が及ぼす効果

IL-13 刺激により、ciliated phenotype と goblet phenotype の両方で TLR4 の発現が有意に増加した ($p < 0.0001$)。また、goblet phenotype では、IL-13 の非存在下でも ciliated phenotype と比較して TLR4 の発現が有意に増加していた ($p < 0.0001$, $p < 0.05$)。

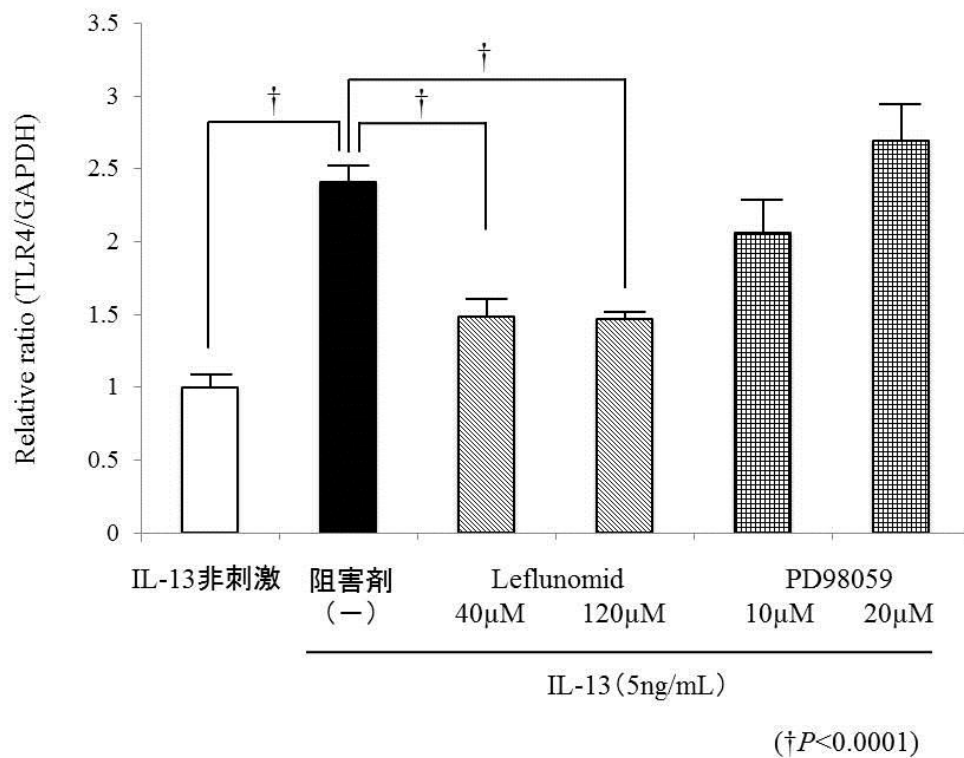


図 12 : Ciliated phenotype に細胞内シグナル伝達阻害薬を用いた TLR4 mRNA 発現抑制の検討

ALI 法 14 日間により分化した ciliated phenotype に IL-13 刺激 (5ng/mL) を加え、RT-qPCR 法により TLR4 mRNA の発現を調べた。TLR4 mRNA 発現は、JAK/STAT-6 阻害薬により有意な抑制を受けた ($p < 0.0001$) が、MEK 阻害薬による影響は受けなかった。

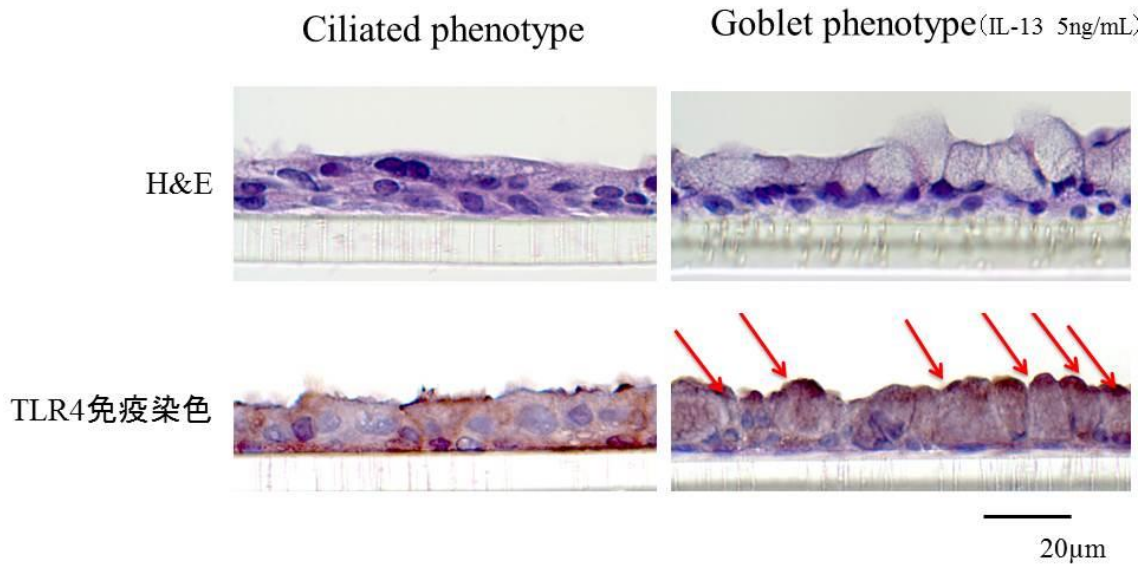


図13:免疫染色による気道上皮細胞(ciliated phenotype 及び goblet phenotype)の TLR4 発現の比較

ALI 法で 14 日間培養した気道上皮細胞のヘマトキシリン・エオジン染色（上段）及び TLR4 免疫染色（下段）を示す。左側の ciliated phenotype と比較して、右側の goblet phenotype では、赤矢印で示すように細胞の管腔側に極性をもって TLR4 が強く発現していた（×400、黒線：20μm）。

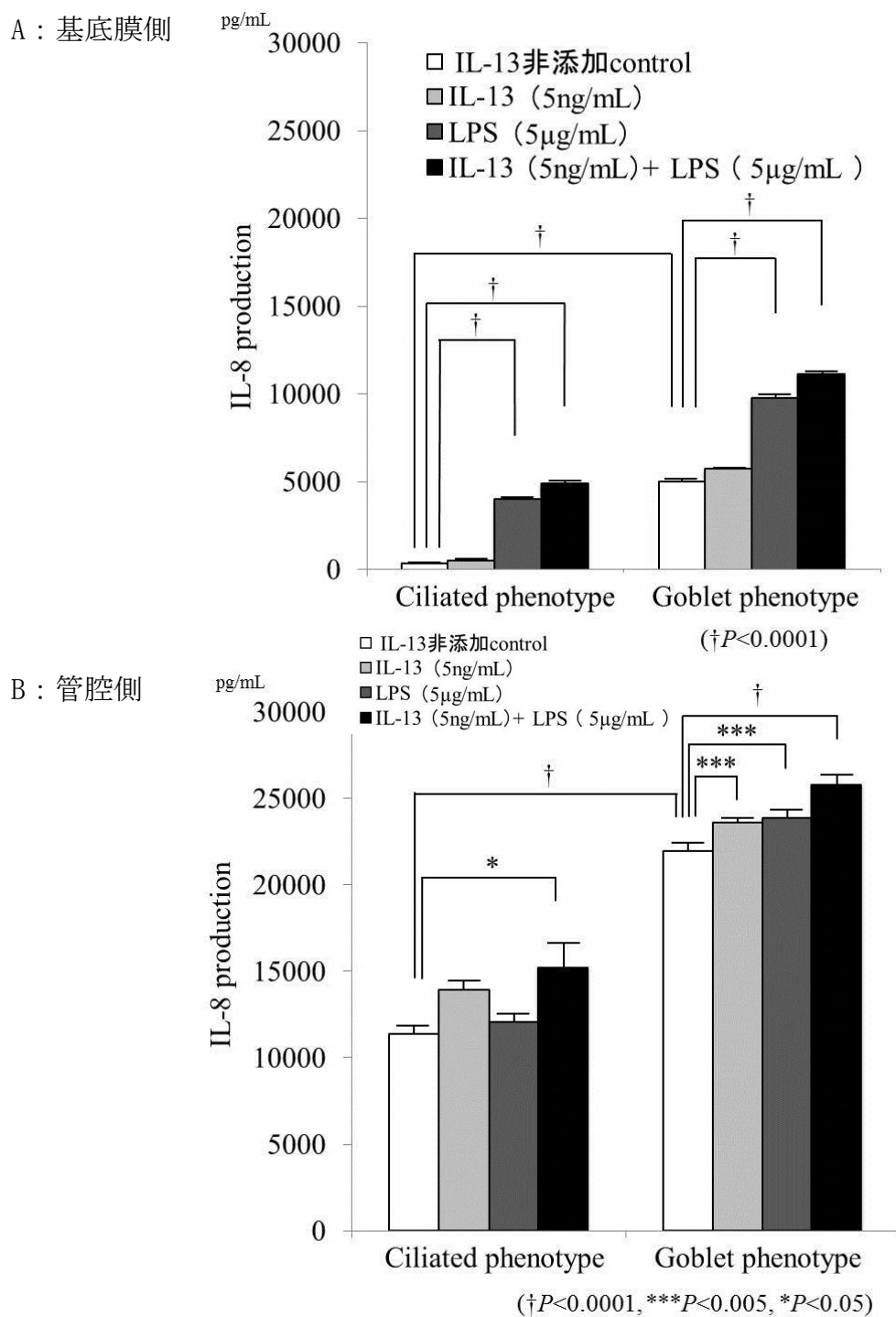


図 14 : LPS 刺激による気道上皮細胞からの IL-8 の分泌

Goblet phenotype は ciliated phenotype に比較して IL-8 を基底膜側及び管腔側により多く分泌していた ($p < 0.0001$)。また、ciliated phenotype 及び goblet phenotype のいずれの細胞においても IL-13 は LPS 刺激による IL-8 分泌効果を有意に増強した。

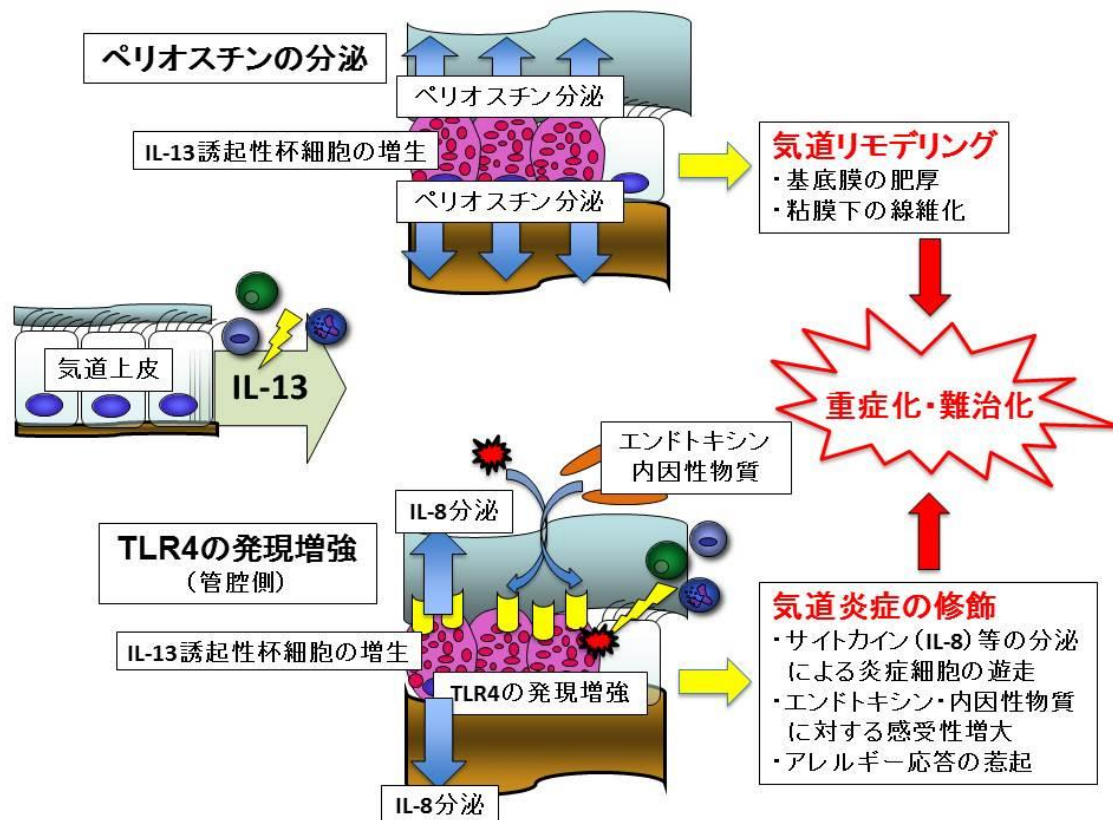


図 15：気管支喘息重症化における IL-13 誘起性杯細胞の役割（仮説）

本研究により、IL-13 誘起性杯細胞はペリオスチンを分泌し、上皮下のリモデリングに関与する可能性が示唆された。また、TLR4 を管腔側に強く発現することで、病原体やアレルゲンを認識しやすくするほか、気道炎症により傷害された上皮より放出される内因性の物質を認識し、IL-8 をはじめとした炎症性メディエーターを分泌することで、さらに気道炎症を悪化させ、炎症を遷延・修飾して気管支喘息の病態形成に関与する可能性が示唆された。

表1. Primer sequences

Target Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward (19mer)	TGAACGGGAAGCTCACTGG
	Reverse (20mer)	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
Periostin	Forward (21mer)	CAGAGAAATCCCTCCATGAAA
	Reverse (21mer)	CAGGAGCTCTTTCAAGTCTGC

表2. Primer sequences

Target Gene		Primer	Sequence
GAPDH	Forward	(19mer)	TGAACGGGAAGCTCACTGG
	Reverse	(20mer)	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
TLR-3	Forward	(21mer)	ACAACTTAGCACGGCTCTGGA
	Reverse	(21mer)	ACCTCAACTGGGATCTCGTCA
TLR-4	Forward	(24mer)	AATCTAGAGCACTTGGACCTTTCC
	Reverse	(23mer)	GGGTTCAGGGACAGGTCTAAAGA
TLR-7	Forward	(21mer)	GGAGGTATTCCCACGAACACC
	Reverse	(23mer)	TGACCCCAGTGGGAATAGGTACAC
TLR-8	Forward	(26mer)	AAACTTGACCCAACTTCGATACCTAA
	Reverse	(22mer)	GATCCAGCACCTTCAGATGAGG