

原 著

培養ヒト気管支上皮細胞における各種サイトカイン刺激が TGF- β シグナルに及ぼす影響

獨協医科大学 内科学 (呼吸器・アレルギー)

笛木 直人 太田 真弓 岡田 壮令

笛木 真 相良 博典

上武呼吸器科内科病院

笛木 直人 笛木 真 牧野 莊平

獨協医科大学 医学総合研究所

秋元 一三

要 旨 気管支喘息の基本病態は好酸球, T細胞 (特にTh2細胞), 肥満細胞, などの炎症細胞を中心とする慢性の気道炎症と気道リモデリングによって矛盾なく説明できる. 気道リモデリングの分子レベルでの形成機序は未だ不明な部分が多く, 最近線維化サイトカインTGF- β の役割が注目されている. 特にシグナル伝達分子Smadの制御機構の不均衡により起こって来ることにも解明されつつある. 今回我々はTh2サイトカインIL-5, GM-CSFおよび調節性サイトカインIL-10が気道上皮細胞における抑制型Smad7発現に与える影響についてReal time RT-PCR法を用いて検討した. IL-10刺激は, コントロールに比較して, Smad7の発現が増強し, 一方でIL-5, GM-CSFはその発現は誘導されなかった. また, その発現はIL-10との混合培養にて増強した. 更に, IL-10はSmad7発現を減弱させることが知られている遺伝子TIEG発現に関しても抑制することを見出し, IL-10が制御性サイトカインとして気道炎症の抑制に関与していることが示唆された.

Key Words : TGF- β シグナル, Smad7, 気管支喘息, IL-10

緒 言

気管支喘息の特徴は発作性の呼吸困難と喘鳴であり, これは可逆性の気道閉塞に基づく. しかし, 慢性・難治化した患者は恒常的にあるいは労作時にも呼吸困難, 喘鳴を呈し, これに加えて症状の急性増悪が発作的に起こる. 恒常的にみられる呼吸困難の原因は不可逆的な気道閉塞による.

喘息の臨床的特徴は, 近年明らかになってきた喘息特有の気道炎症と気道リモデリングによって矛盾なく説明できる^{1~6)}. 喘息における気道炎症の特徴は, 好酸球,

T細胞 (特にTh2細胞), 肥満細胞, 好中球などの炎症細胞浸潤, 血管拡張, 気道上皮の剥離, 粘膜・粘膜下浮腫と粘液栓の充満である⁴⁾. 気道リモデリングの分子レベルでの形成機序は未だ不明な部分が多いが, 浸潤してきた炎症細胞と気道組織の構成細胞が分泌する種々の炎症性メディエーター, Th2サイトカイン (Interleukin 5 (IL-5), Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)), 調節性サイトカインInterleukin 10 (IL-10) およびケモカインの相互作用の結果生じると考えられている⁵⁾. これまでに, リモデリングの特徴の一つであるsubepithelial fibrosisはtype III, type Vのコラーゲンやfibronectinが長期間にわたり沈着して生じることが明らかにされている. また, これらtype III, type VのコラーゲンやfibronectinはTGF- β (Transforming growth factor- β) に刺激されたfibroblastから放出されることが判明し, リモデリング形成過程にTGF- β が深

平成18年4月21日受付, 平成18年4月27日受理

別刷請求先: 笛木直人

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880

獨協医科大学 内科学 (呼吸器・アレルギー)

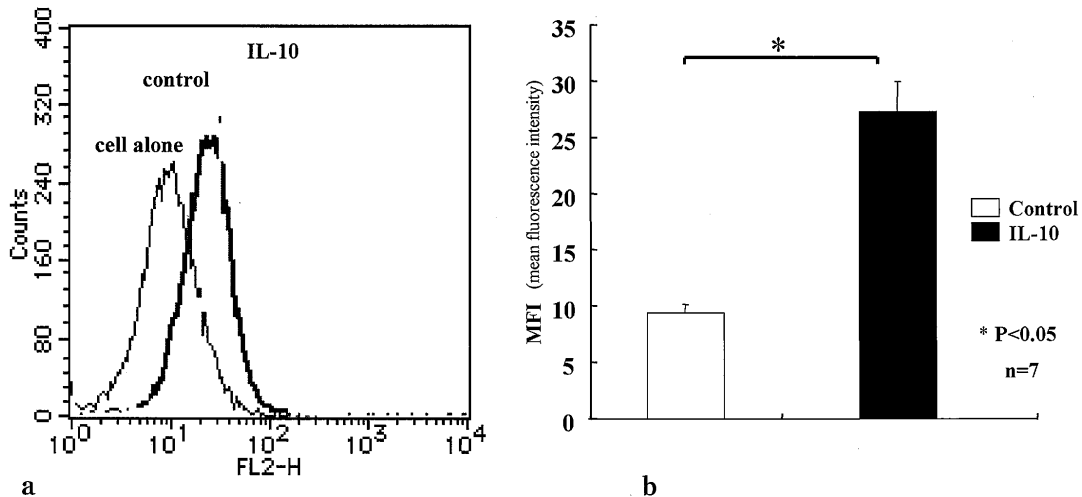


図1 a, b 気道上皮細胞におけるIL-10受容体発現

BEAS-2Bに10 ng/mlのIL10を刺激することによりcontrolと比較し有意なIL-10受容体発現を認めた ($p < 0.05$, $n = 7$, mean \pm SE).

く関与していることが分かってきた^{7~12)}。その中で明らかにされてきたTGF- β のシグナル分子調節機構のSmadの役割は未だ不明の点が多い。中でもシグナル伝達抑制型分子のSmad7の発現を調節することは今後喘息患者病態において形成されてくるリモデリング抑制に重要な鍵を握っていると思われる。今回我々はこれらの調節機構に対する各種サイトカインの役割を解明する目的で培養気道上皮細胞におけるTh2サイトカインのIL-5, GM-CSF, また調節性サイトカインIL-10がTGF- β シグナル, 特に抑制型Smad7の発現およびTGF- β が過剰発現することにより誘導されるTIEG (TGF- β inducible early gene) 発現に与える影響について検討を行った。

方 法

細胞培養

正常ヒト気管支上皮細胞cell lineであるBEAS-2Bを, 10% FBS (fatal bovine serum) (Gibco BRL, New York, USA) を加えたDMEM (Dulbecco's minimum essential medium) (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) で37°C, 5% CO₂の条件下で培養した。

免疫蛍光抗体, フローサイトメトリー

免疫蛍光抗体法はJacksonらによる方法¹³⁾に若干の修正を加えた方法でおこなった。BEAS-2Bは洗浄後medium (10% FBS添加DMEM) 100 μ l中に 1×10^6 個となるように調整 (1×10^7 cells/ml) し, IL-10 (recombinant human IL-10, Genzyme Techno, MN, USA, 10 ng/ml) を加えて37°Cで1時間培養した。その後

PBSで洗浄しFITC標識モノクローナルラット抗ヒトIL-10 Receptor抗体 CD210 (Becton Dickinson Bioscience, CA, USA) 20 μ lを添加し4°Cで30分間暗所静置した。その後細胞をPBSで洗浄し, PBS 1 mlの浮遊液とし, 直ちに測定を行った。それぞれの細胞群の平均蛍光強度 (MFI) は, FACS calibur flow cytometer (Becton-Dickinson, CA, USA) にて5000個の蛍光を測定することで認識させた。非特異的蛍光は使用したモノクローナル抗体と isotype をマッチングさせたIgG抗体にて測定し, 各細胞群の平均蛍光強度は非特異的蛍光を引いた値で示した。

Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real time RT-PCR)

BEAS-2Bからのtotal RNA抽出は, ISOGEN solution (Nippon Gene, Japan) を使用し, acid guanidinium-phenol-chloroform法で行った。そしてcomplementary DNA (cDNA) 合成は, Takara RNA PCR kit (AMV) Ver.2.1 (Takara Bio INC., Shiga, Japan) を用いて行った。

Real time RT-PCRはTaq man universal PCR master mix (Applied Biosystems, Chiba, Japan) と後述のprobeおよびprimerを使用して, ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) で計測した。

使用したSmad7のprimerは5'-GGTGCTCCCTGCTTTCCA-3'(sense) と5'-GCAGAGAAGCTCCAGAA TGG-3'(antisense) (ESPEC OLIGO SERVICE CORP, Japan) を, probeは5'-TTTCTCCATGGCTCCGGCCG-3'(Applied Biosystems, Chiba, Japan) を用いた。また

Experimental protocol 1

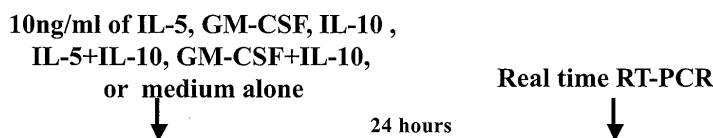


図2 実験プロトコール 1

気道上皮細胞における各種サイトカイン（最終濃度10 ng/mlのIL-5, GM-CSF, IL-10および混合培養）刺激における real time PCR解析

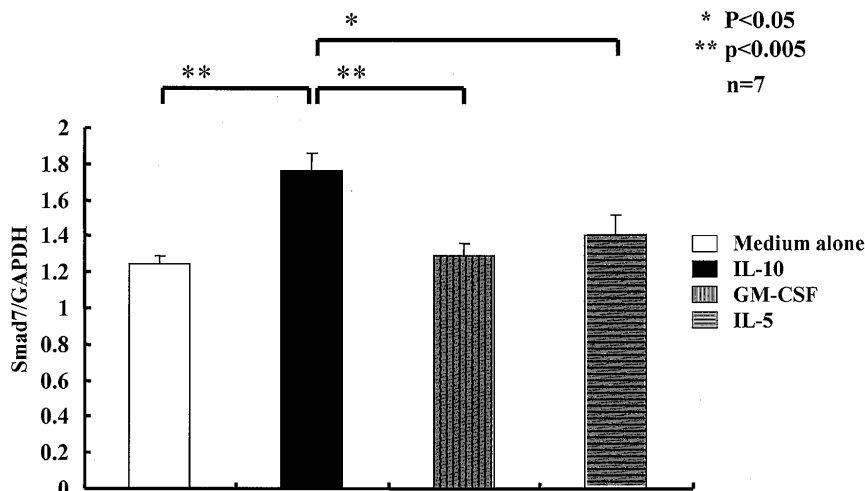


図3 BEAS-2Bにおける各種サイトカイン刺激による Smad7発現の検討

10 ng/ml IL-10はコントロールと比較し有意に Smad7発現を誘導した ($p < 0.005$, $n = 7$, mean \pm SE). 一方 Th2 サイトカイン IL-5, GM-CSF はコントロールと比較しその発現を誘導しなかった.

TIEGは TIEG probe and primers mixture; Assay-on-demand Hs00194622-m1 (GeneBank ID: U21847) (Applied Biosystems, CA, USA) を用いた.

実験プロトコール 1 (図2)

IL-10, IL-5, GM-CSF 刺激による Smad7 発現の検討

BEAS-2Bにおける Smad7発現に対する各種サイトカインの役割を検討するため, IL-5 (recombinant human IL-5, Genzyme Techno, MN, USA), GM-CSF (recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor, Genzyme Techno, MN, USA), IL-10, IL-5 + IL-10, GM-CSF + IL-10 (各サンプル最終濃度: 10 ng/ml) で BEAS-2B を 24 時間刺激し, Smad7 の発現を Real time RT-PCR 法にて測定した.

実験プロトコール 2 (図5)

TIEG の発現に与える IL-10 の効果

TGF- β 刺激による TIEG の発現およびその発現に対

する IL-10 刺激が与える影響を検討するため, BEAS-2B を TGF- β (recombinant human TGF- β 1, Pepro Tech, London, UK) (10 ng/ml) で 1 時間刺激し, TIEG 発現, また, IL-10 (10 ng/ml) で 12 時間の前処置した後の TIEG 発現に与える影響を Real time RT-PCR 法にて測定した.

統計学的有意差検定

結果は mean \pm SE で示した. 統計学的有意差検定は, 対応のない Student's t 検定で検討し, $p < 0.05$ をもって有意差ありとした.

結 果

IL-10 受容体の発現

ヒト気管支上皮細胞において, IL-10 受容体が確実に発現しているか検討するために, BEAS-2B を IL-10 (10 ng/ml) で 1 時間刺激した後に, フローサイトメトリーにて IL-10 受容体の発現を計測した. 図1に示すごとく IL-10 刺激で BEAS-2B において有意に IL-10 受容体が

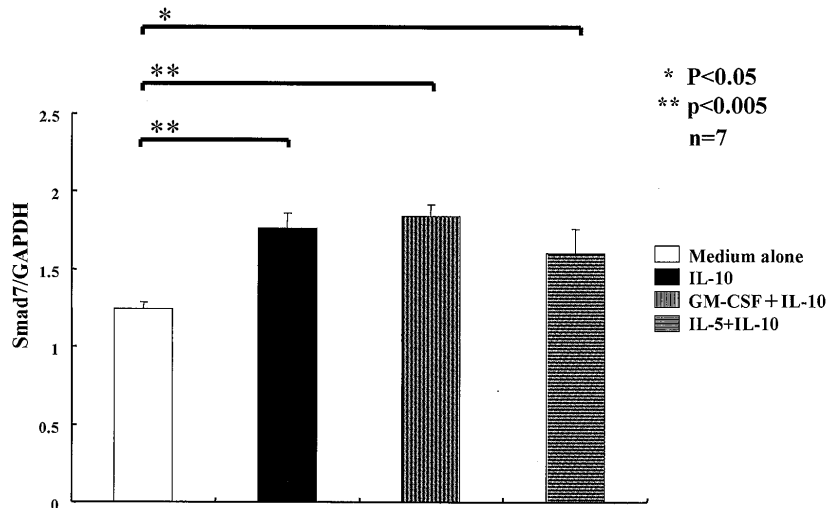


図4 混合培養におけるSmad7発現の検討

GM-CSFおよびIL-5にIL-10を添加することによりIL-10単独刺激と同様にSmad7発現が誘導された (IL-5: $p < 0.005$, $n = 7$, mean \pm SE, GM-CSF: $p < 0.05$, $n = 7$, mean \pm SE)

Experimental protocol 2

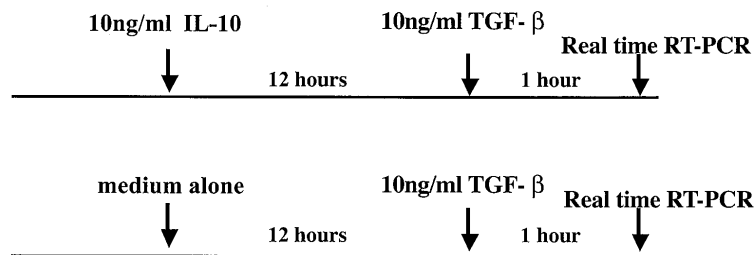


図5 実験プロトコール 2

気道上皮細胞におけるTGF- β 刺激によるTIEG発現およびIL-10添加におけるreal time PCR解析

発現していることが確認された (コントロール群 9.39 ± 0.78 , IL-10刺激群 27.28 ± 2.67 , $p < 0.05$).

IL-5, GM-CSF, IL-10刺激によるSmad7発現

図3に示すように制御性T細胞 (Treg) から産生されるサイトカインであるIL-10による24時間刺激後, 有意に抑制型Smad7の発現は増強された (コントロール群 1.24 ± 0.05 , IL-10群 1.76 ± 0.10 , $P < 0.001$). しかし, Th2サイトカインであるIL-5, GM-CSFではその発現は誘導されなかった (IL-5群 1.40 ± 0.12 , GM-CSF群 1.29 ± 0.07). この結果からTh2サイトカインはTGF- β シグナルを正の方向へ誘導していることが示唆された. また, IL-10がTh2サイトカインに与える影響を検討する目的でIL-5, GM-CSFおよびIL-10の混合培養についても検討を行った.

IL-10で同時に刺激すると抑制型Smad7の発現はコントロール群 (1.24 ± 0.05) に比べてIL-5 (IL-5 + IL-10群 0.60 ± 0.16 , $P < 0.001$), GM-CSF (GM-CSF + IL-10群 1.84 ± 0.07 , $P < 0.05$) とともにその発現が有意に増強され, IL-10はTh2サイトカインIL-5およびGM-CSF作用を調節している可能性およびIL-10の単独作用の可能性が示唆された (図4).

IL-10前処置によるTIEG発現の効果

次に我々はTGF- β 刺激により誘導されるTIEG発現に対するIL-10の影響について検討を加えた. TIEGは発現することによりSmad7発現を抑制することが知られており, IL-10がその発現にどのように影響しているか検討を加えた.

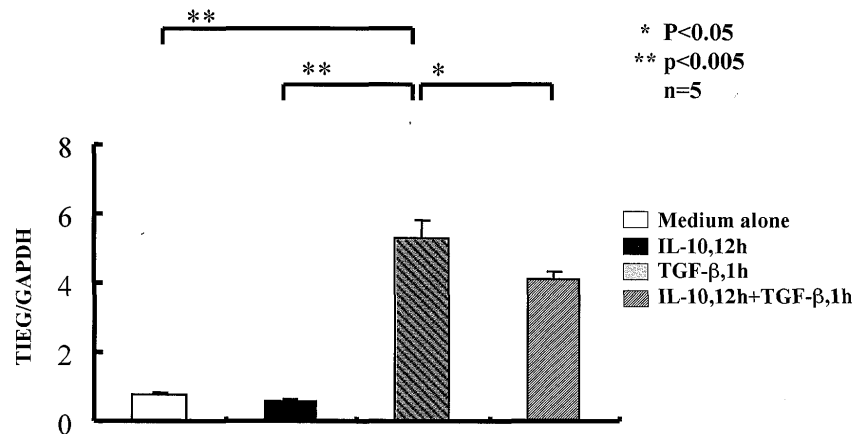


図6 気道上皮細胞における TGF- β 刺激による TIEG 発現および IL-10 が及ぼす影響
10 ng/ml TGF- β 刺激によりコントロールおよび IL-10 刺激と比較し有意に TIEG 発現が誘導された ($p < 0.005$, $n = 5$, mean \pm SE). また, その発現は IL-10 を 12 時間前処置する事により有意に抑制された ($p < 0.05$, $n = 5$, mean \pm SE).

TGF- β 刺激による TIEG 発現に対する IL-10 の効果 (図6)

BEAS-2B を TGF- β (10 ng/ml) で 1 時間刺激し, TIEG の発現を Real time RT-PCR 法にて測定した. また, IL-10 により 12 時間前処置した後の TGF- β 刺激 TIEG 発現に対しても同様の検討を行った. 図6に示すように TGF- β 刺激により有意に TIEG の発現を認めた (コントロール群 0.76 ± 0.09 , TGF- β 群 5.29 ± 0.51 , $P < 0.001$). IL-10 刺激では TIEG の発現は認められなかった (IL-10 群 0.56 ± 0.08). また, IL-10 前処置では TGF- β による TIEG の発現が有意に抑制された (TGF- β 群 5.29 ± 0.51 , IL-10, 前処置群 4.04 ± 0.31 , $p < 0.05$).

考 察

気管支喘息の基本病態が T 細胞, 肥満細胞, 好酸球を中心とする慢性の気道炎症と理解されて以来, その発症機序が様々な方面から分かりつつあるが, 特に慢性・重症喘息患者にみられる気道リモデリング形成機序に関してはまだまだ不明の点も多い. 気道リモデリングの特徴的所見として上皮杯細胞化生, 粘膜下腺過形成, 血管新生, 上皮下線維増生 (基底膜肥厚), 弾力線維の破壊, 平滑筋肥大, 気道外膜の線維化などがあげられる⁵⁾. 特に最近リモデリング形成における線維化サイトカイン TGF- β が重要な役割をしていることが分かってきた. TGF- β は喘息患者の気道上皮細胞, 好酸球, 線維芽細胞で産生され^{15,16)}, その発現の程度と基底膜の厚さ, 重症度に相関があり¹⁷⁾, 気道リモデリングに重要な役割を果たしていると考えられている. そして最近 TGF- β の細胞内シグナル伝達因子として Smad 蛋白が知られてい

る¹⁸⁾. 現在 Smad1~8 の存在が知られており, Smad2, Smad3 は Smad4 と複合体を形成し, 核内に移行して転写因子と結合したり, 直接 DNA に結合したりして標的遺伝子の転写を促し, 生物学的な反応を引き起こすと考えられている. これに対して inhibitory smad (I-smad) とよばれる Smad7 は TGF- β R に結合して Smad2, 3 がリン酸化されるのを阻害し, シグナル伝達に対しフィードバックとして働き, TGF- β の作用を, さらには気道リモデリングを制御していると考えられている¹⁹⁾. 今回我々は TGF- β の細胞内シグナル伝達因子の抑制型 Smad7 の発現に Th2 サイトカインおよび調節性サイトカイン刺激がどのような影響を及ぼすか検討した. 特に Th2 サイトカインである IL-5, GM-CSF は抑制型 Smad7 の発現に影響を与えなかった. 一方 IL-10 は Smad7 発現を誘導し, IL-5, GM-CSF 刺激で誘導されなかった Smad7 の発現を増強させた. この結果は Th2 型気道炎症が気道リモデリング形成過程においてその増悪に重要な役割を演じている可能性を示唆させるものである. また, IL-10 の単独作用でも十分に抗炎症効果を持ち合わせる可能性も示唆された. Smad7 に抑制される TGF- β 作用として, これらの現象から 1 つの仮説が立てられるが, TGF- β シグナル伝達に抑制的に作用する Smad7 が過剰に発現した場合, TGF- β を介した現象は起こらないというものである. この仮説の妥当性を中尾ら¹¹⁾ が支持している. 通常, マウスにプレオマイシンを 1 週間連続投与すると, 組織学的に強い肺線維症が起きるが, 最初に TGF- β のシグナル伝達を抑制する Smad7 の遺伝子をアデノウイルスベクターにサイトメガロウイルスプロモーターのコントロール下で移入しておくくと, プレオマイシンで刺激を与えても肺線維症は起

こらないことが示されている。今回我々の実験系でIL-10はSmad7の発現を誘導し、Th2サイトカインのIL-5, GM-CSFの存在下でもSmad7の発現を誘導した。IL-10が過剰発現すればSmad7を誘導しTGF- β のシグナル伝達が抑制されるためにfibrosisが起きず、気道リモデリングを抑制しうる可能性が考えられる。事実、気管支喘息患者の重症度が高くなるほどSmad7の発現が減弱しており、subepithelial fibrosisと負の相関が示されている²⁰⁾。さらにTGF- β 刺激により誘導されるSmad7発現抑制遺伝子TIEG発現²¹⁾に対してもIL-10はその発現を抑制する事が確認された。最近IL-10は抗炎症性サイトカインとしての役割も注目されてきており^{22~27)}、我々の結果もそれを支持している。

喘息患者においてTGF- β 産生源として重要な細胞の一つである好酸球がほぼ同等にあるにもかかわらず、subepithelial fibrosisの強さや喘息の重症度に差がみられるのは、発現しているSmadの違いにより核内のTGF- β シグナル伝達様式が異なるからではないかと考えられる。その調節機構にIL-10は重要な役割を演じる可能性が今回の結果より示唆された。今後喘息をコントロールしていく上でこれらサイトカインの調節機構の重要性が考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省免疫・アレルギー研究班：喘息予防・管理ガイドライン。2003改訂版。牧野莊平，古庄巻史，宮本昭正（監），協和企画，東京，2003。
- 2) National Heart, Lung, and Blood Institute：Global Strategy for Asthma Management and Prevention：revised 2002. Bethesda, MD：US Department of Health and Human Services；2002. NIH Pub, No.02-3659
- 3) 福田 健：呼吸器領域における病気の変遷と未来一気管支喘息。臨床成人病，**30**：83-90，2000。
- 4) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al：Asthma. From broncho-constriction to airways inflammation and remodeling. Am J Respir Crit Care Med, **161**：1720-1745, 2000。
- 5) Vignola AM, Kips J, Bousquet J.：Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. J Allergy Clin Immunol, **105**：1041-1053, 2000。
- 6) Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, et al：Eosinophils as a potential source of platelet-derived growth factor B-chain (PDGF-B) in nasal polyposis and bronchial asthma. Am J Respir Cell Mol Biol, **13**：639-647, 1995。
- 7) Massague J.：Transforming growth factor- β signal transduction. Annu Rev Biochem, **67**：753, 1998。
- 8) Nakao A, Imamura T, Souchenlynskyi S, et al：TGF- β receptor-mediated signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. EMBO J, **16**：5353, 1997。
- 9) Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P.：TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. Nature, **390**：465, 1997。
- 10) Nakao A, Afrankhte M, Moren A, et al：Identification of smad7 a TGF- β inducible antagonist of TGF- β signaling. Nature, **389**：631, 1997。
- 11) Nakao A, Fuji M, Matsumura R, et al：Transient gene transfer and expression of smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. J Clin Invest, **104**：5-11, 1999。
- 12) Sagara H, Okada T, Okumura K, et al：Activation of TGF- β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma, Journal of Allergy and Clinical Immunology, **110**：249-254, 2002。
- 13) Jackson AL, Warner NL.：Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology (3rd edition)". ed by Rose NR, Friedman M, Fahey HL. American Society for Microbiology, Washington DC, 226-235, 1986。
- 14) Chomczynski P.：A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA,DNA, and protein from cell and tissue samples. Biotechniques, **15**：532-536, 1993。
- 15) Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, et al：Transforming growth factor- β 1 gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol, **15**：404-409, 1996。
- 16) Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, et al：Eosinophil-associated TGF- β 1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. Am J Respir Cell Mol Biol, **17**：326-333, 1997。
- 17) Vignola A, Chanez P, Chiappara G, et al：Transforming growth factor- β expression in mucosa biopsies in asthma and chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med, **156**：591-599, 1997。
- 18) Massague J.：How cells read TGF- β signals. Nat Rev Mol Cell Biol, **1**：169-178, 2000。
- 19) Moustakas A, Souchenlynskyi S, Heldin CH.：Smad regulation in TGF- β signal transduction. J cell Sci, **14**：4359-4369, 2001。

- 20) Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, et al : Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **110** : 873-878, 2002.
- 21) Johnsen SA, Subramaniam M, Katagiri T, et al : Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGF beta/Smad signaling by TGF beta inducible early gene. *J Cell Biochem*, **87** : 233-41, 2002.
- 22) Prete GD, Carli MD, Almerigogna F, et al : Human IL-10 is produced by both type1 helper (Th1) and type2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*, **150** : 353-360, 1993.
- 23) Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D, et al : Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest*, **95** : 2644-2651, 1995.
- 24) Grung G, Corry DB, Leach MW, et al : Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med*, **185** : 1089-1099, 1997.
- 25) Groux H, Bigler M, de Vries JE, et al : Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4 + T cells. *J Exp Med*, **184** : 19-29, 1996.
- 26) D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, et al : Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, **178** : 1041-1048, 1993.
- 27) Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, et al : Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **97** : 1288-1296, 1996.

Various Cytokines Regulate TGF- β Signaling in Cultured Airway Epithelial Cells

Naoto Fueki^{1,2}, Mayumi Ota¹, Kazumi Akimoto³, Takenori Okada¹
Makoto Fueki^{1,2}, Sohei Makino² and Hironori Sagara¹

¹*Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo Medical University*

²*Jobu Hospital for Respiratory Disease*

³*Institute for Medical Science, Dokkyo Medical University*

Transforming growth factor- β (TGF- β) is an important pro-fibrogenic growth factor implicated in airway remodeling and pulmonary fibrosis. TGF- β signals from membrane to nucleus by using Smad proteins. Recently, Smad7 has been identified as an intracellular antagonist for TGF- β signaling and it inhibits TGF- β -induced transcriptional responses. And Interleukin10 (IL-10) is general inhibitor of proliferative and cytokine responses in T cells and is produced by mononuclear phagocytes, natural killer cells and by both Th1 and Th2 type lymphocytes. Therefore, we examined the relationship between expression of smad7 in cultured epithelial cells (Beads 2B) stimulated with IL-10.

We thought to determine the relationships between Smad7 expression in human bronchial cell line, BEAS-2B cells stimulated with Th2 type cytokine and regulatory cy-

tokine IL-10. Expression levels of Smad7 was expressed in cultured epithelial cells. Interestingly, Th2 cytokines IL-5, GM-CSF exhibited less Smad7 expression in BEAS-2B cells than IL-10 stimulation. In addition, combination with IL-10 and IL-5 stimulation inhibited decreased Smad7 expression. TGF- β induced TIEG expression in BEAS-2B cells were also decreased in a IL-10 stimulation.

These findings suggest that Smad7 in a key molecule that defines the susceptibility of bronchial epithelial cells to TGF- β action and regulation of Smad7 expression in bronchial epithelial cells may be related to the development of airway remodeling.

Key Word : TGF- β signaling, Bronchial asthma, IL-10, Smad7