

Effects of HMGB1 on Tricellular Tight Junctions via TGF- β Signaling in Human Nasal Epithelial Cells

Int J Mol Sci. 2021 Aug 4; 22(16): 8390. doi: 10.3390/ijms22168390

Ohwada K, Konno T, Kohno T, Nakano M, Ohkuni T, Miyata R, Kakuki T, Kondoh M, Takano K, Kojima T

要旨 様々な組織の炎症性疾患と密接な関係がある High mobility group box-1 (HMGB1) は、主に核内に局在して転写の制御を行うとともに、細胞死や炎症性の刺激によって細胞外に放出され細胞障害性のシグナルを誘導するとされている。アレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎の病態において HMGB1 が密接な関連があり、今回われわれは HMGB1 が TGF- β シグナリングを介して 3 細胞間接着分子である angulin-1/LSR の発現を低下させることでバリア機能を低下させることを明らかとした。

緒言)

タイト結合分子は 2 細胞間もしくは 3 細胞間に存在し、バリア機能やフェンス機能、そしてシグナリング機能を有している¹⁾。2 細胞間タイト結合分子としてクローディンやオクルディンなどが、3 細胞間タイト結合分子としては angulin-1/LSR やトリセルリンが主に知られており、鼻粘膜上皮細胞のバリア機能の破綻は様々な疾患 (アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎など) と密接に関連があるとされている。

High mobility group box-1 (HMGB1) は非ヒストン性クロマチン結合蛋白の一つであり、主に核内に存在し、DNA 安定化や転写制御に働く。一方で、HMGB1 は danger associated molecular pattern (DAMPs) としても知られており、細胞外に放出された HMGB1 は TLR や RAGE といった受容体と結合し、細胞障害性シグナルを誘導する。近年 HMGB1 はアレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎、好酸球性副鼻腔炎といった鼻副鼻腔疾患と関連があるとされているが、そのバリア機能との関連については不明な点が多い。

TGF- β は気道上皮細胞において上皮透過性の亢進を誘導することが知られている。以前ヒト肺胞上皮細胞について HMGB1 が TGF- β を介して、バリア機能の低下を引き起こすことが報告されており²⁾、今回われわれはヒト正常鼻粘膜上皮細胞において HMGB1 によってバリア機能が低下し、TGF- β 受容体キナーゼ阻害薬が HMGB1 のバリア機能低下作用を抑制するのではないかと仮説を立て、検討を行った。

方法)

本研究において、肥厚性鼻炎に対して下鼻甲介切除術にて得られた手術検体であるヒト下鼻甲介を使用し、ヒト鼻粘膜上皮細胞を分離培養した。タンパクレベルの解析は Western blotting, 免疫染色にて行った。またバリア機能は TEER, FITC-dextran 4kD の透過率測定にて評価を行った。

結果)

1. ヒト正常鼻粘膜上皮細胞の 3 細胞間タイト結合分子の局在と angulin-1/LSR の役割

ヒト鼻粘膜上皮細胞においてタイト結合蛋白の局在について免疫染色を検討したところ、3 細胞間タイト

結合分子である angulin-1/LSR およびトリセルリンは 3 細胞間においてのみではなく、2 細胞間においても発現を認めていた (図 1)。

次に angulin-1/LSR を knock down し、その他のタイト結合分子への影響やバリア機能の変化について検討したところ CLDN-1, 4 の発現亢進および CLDN-7 の発現低下を認めた。また TEER において上皮バリア機能の低下を認めた (未掲載データ)。

2. HMGB1 投与によるヒト正常鼻粘膜上皮細胞のバリア機能への影響

HMGB1 をヒト鼻粘膜細胞に投与し、タイト結合分子の発現変化やバリア機能の変化について検討した。HMGB1 投与によって Western blotting にて angulin-1/LSR, CLDN-4 のタンパク発現の低下を認めた (図 2A)。TEER では HMGB1 投与によって、正常群と比較し有意なバリア機能の低下し、また免疫染色では angulin-1/LSR の発現が低下し、オクルディンの構造が破壊を認めた (図 2B)。

3. TGF- β 受容体キナーゼ阻害薬 EW-7197 投与による HMGB1 投与によるバリア機能低下作用の抑制

次に TGF- β 受容体キナーゼ阻害薬 EW-7197 は気道上皮細胞において上皮透過性亢進や上皮バリアの阻害を抑制することが知られており、今回われわれは EW-7197 がヒト鼻粘膜上皮細胞に与える影響や、HMGB1 を共処置し、HMGB1 のバリア機能阻害効果が抑制されるかについて検討した。

HMGB1 と共処置したところ、Western blotting では HMGB1 処置にて発現が低下した angulin-1/LSR や CLDN-4 が EW-7197 を共処置することによって、これらの変化が抑制された (図 2A)。またヒト鼻粘膜細胞を 2.5D で培養し、FITC-dextran 4kD を用いてヒト鼻粘膜細胞における HMGB1 および EW-7197 + HMGB1 の透過性評価を行った。HMGB1 処置ではルーメン内に FITC-dextran が侵入し、バリア機能が低下していることがわかるが、EW-7197 を共処置することによって FITC-dextran のルーメン内への侵入が抑制され、このことから HMGB1 処置で低下したバリア機能低下が EW-7197 を共処置することでこれらの反応を抑制することが判明した (図 3)

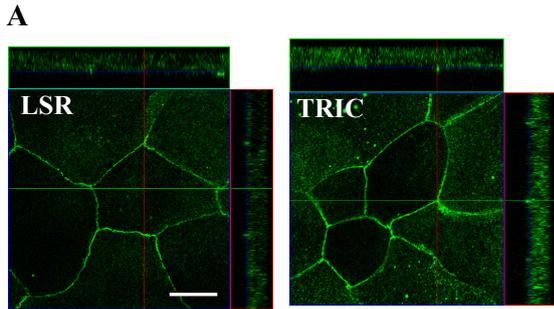


図1 正常ヒト鼻粘膜上皮細胞の3細胞間タイト結合分子の局在免疫染色によって正常ヒト鼻粘膜上皮細胞の *angulin-1/LSR* およびトリセルリンの発現の局在を検討した。*Angulin-1/LSR* およびトリセルリンは3細胞間に多く発現するが、2細胞間にもその発現を認めた。
Scale bar : 20 μm

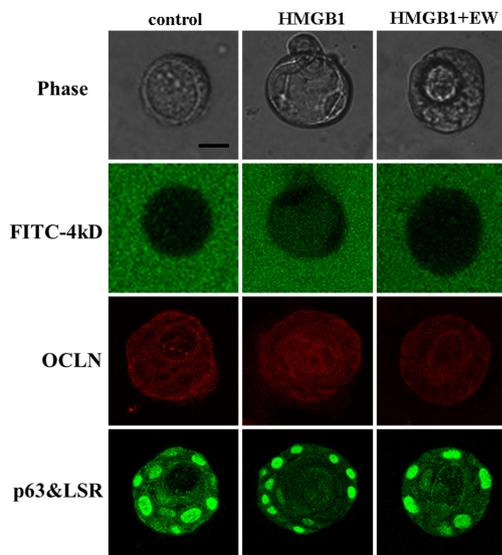


図3 ヒト鼻粘膜上皮細胞に HMGB1 と TGF- β 受容体キナーゼ阻害薬 EW-7197 を合わせて投与した際のバリア機能やタイト結合分子への影響
2.5D Matrigel にて培養を行ったヒト正常鼻粘膜上皮細胞にて FITC-dextran および免疫染色を用いてバリア機能の評価した。HMGB1 投与ではルーメン内に FITC-dextran が侵入するが EW-7197 を共投与することでルーメン内への侵入が抑制された。 Scale bar : 20μm

考察)

今回の検討ではヒト鼻粘膜上皮細胞において *angulin-1/LSR* を knock down することによってバリア機能を抑制することが示された。*angulin-1/LSR* はさまざまな細胞においてバリア機能における重要な役割を果たしていると考えられており、鼻粘膜上皮細胞においても同様であることが示された。ヒト正常肺上皮細胞においては HMGB1 を投与することによって、*angulin-1/LSR* やトリセルリン、CLDN-1・4・7 の発現低下を誘導し、バリア機能が低下する²⁾。また鼻副鼻腔疾患においては重症慢性副鼻腔炎患者において血清 HMGB1 量が増加するなどといった報告がされているが、ヒト鼻粘膜上皮細胞においてバリア機能と HMGB1 との関連については今日まで不明な点が多くあった。今回の検討でわれわれは HMGB1 が *angulin-1/LSR* の発現を低下させることによってバリア機能を低下させることを報告した。

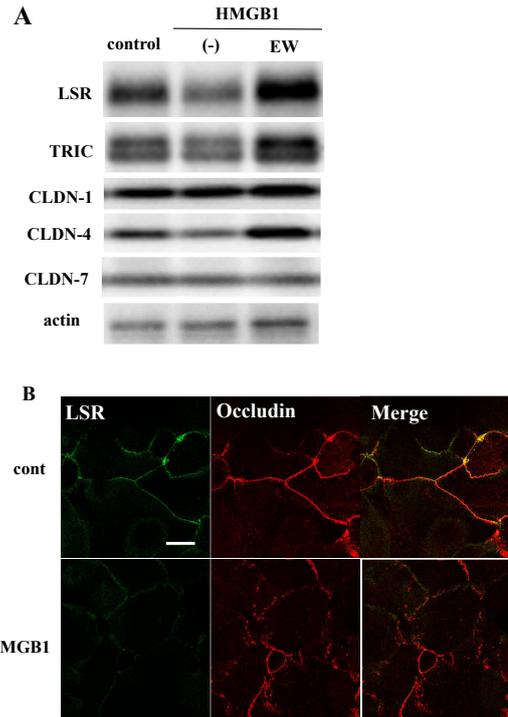


図2 ヒト鼻粘膜上皮細胞に HMGB1 を投与した際のバリア機能やタイト結合分子への影響
(A) Western blotting によるタイト結合分子の比較を行ったところ、*angulin-1/LSR* および CLDN-4 の発現低下を認めた。一方で HMGB1 投与によって低下した *angulin-1/LSR* の発現が TGF- β 受容体キナーゼ阻害薬 EW-7197 を投与することで発現低下が抑制された。(B) HMGB1 投与による免疫染色での *angulin-1/LSR* およびオクルディンの変化を検討したところ、HMGB1 投与によってタイト結合分子の構造の破壊を認めた。 Scale bar : 20 μm

また TGF- β 受容体キナーゼ阻害薬 EW-7197 は HMGB1 投与によって生じるバリア機能低下を抑制することが示された。以上のことから *angulin-1/LSR* がタイト結合におけるバリア機能は重要な役割を果たしていると考えられており、本研究では HMGB1 がバリア機能低下の一因として可能性が考えられた。また TGF- β 受容体キナーゼ阻害薬 EW-7197 が HMGB1 の作用を抑制することで、鼻副鼻腔疾患の新規治療薬となりうる可能性が示唆された。

参考文献

1. Kojima T, Go M, Takano K, et al. Regulation of tight junctions in upper airway epithelium. *Biomed Res Int* 2013; 2013: e947072. doi: 10.1155/2013/947072.
2. Kodera Y, Kohno T, Konno T, et al. HMGB1 enhances epithelial permeability via p63/TGF- β signaling in lung and terminal bronchial epithelial cells. *Tissue Barriers* 2020; 8: e1805997. doi: 0.1080/21688370.2020.1805997.

大和田 築

略歴

2015年3月 札幌医科大学医学部卒業
2015年4月～2017年3月 函館五稜郭病院初期臨床研修
2017年4月～2019年3月 札幌医科大学附属病院耳鼻咽喉科
2019年4月～2020年3月 KKR 札幌医療センター耳鼻咽喉科
2020年4月～2021年8月 札幌医科大学附属病院耳鼻咽喉科
2021年9月～ 帯広厚生病院耳鼻咽喉科