

令和元年6月19日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16042

研究課題名(和文) COPD急性増悪におけるIL-17Aの関与の解明

研究課題名(英文) Role of IL-17A in the development of COPD exacerbation

研究代表者

松崎 博崇 (MATSUZAKI, HIROTAKA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00782187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：好中球性気道炎症や気腫への関与が示唆されるIL-17AであるがCOPD急性増悪における役割は未解明な事が多い。本研究ではCOPDや急性増悪マウスモデルにおけるIL-17Aの関与を解析した。急性増悪の気道炎症はIL-17A KOマウスで有意に減弱し、IL-17Aの病態への関与が示唆された。野生型マウス、IL-17A KOマウスのウイルス感染モデルにおける全肺での遺伝子発現変動の差異を解析した所、ADAM 10、ADAM17の両分子に着目した。各モデルの全肺での発現を定量的PCRで評価した所、COPDや急性増悪モデルでADAM10、17の発現が変動しそこにIL-17Aが関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染を主因とするCOPD急性増悪におけるIL-17Aの関与や機序は未解明な事が多い。本研究の結果から、マウスモデルにおいて急性増悪の気道炎症にIL-17Aが関与する可能性が示唆された。さらに上述したRNA-seq解析から気道炎症や気腫化に対する治療標的分子として注目を集めるADAM 10及びADAM17の2つの分子に着目した。両分子の急性増悪における病態への関与は未解明な事が多い。COPDや急性増悪モデルにおいてmRNAの発現変動を認めた事、その発現変動にIL-17Aの関与が示唆された事はADAM10及びADAM17両分子に新たな知見をもたらすものと考え、今後のさらなる研究が望まれる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that IL-17A is involved in the development of neutrophilic inflammation and emphysema; however, the role of IL-17A in the development of COPD exacerbation remains to be clarified. We developed COPD and exacerbation mice model. Wild type mice and IL-17A KO mice were evaluated in these mice model. In exacerbation mice model, airway inflammation was attenuated in IL-17A KO mice. The finding suggested that IL-17A is involved in the development of COPD exacerbation. Then, we evaluated the difference of gene expression in viral infection model between wild type mice and IL-17A KO mice. As a result, Adam10 and Adam17 were focused. The analysis of mRNA expression in whole lung suggested that the expression of Adam10 and Adam17 varied in COPD and exacerbation mice model under the effect of IL-17A.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：IL-17A COPD exacerbation adam10 adam17

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、世界で 2 億 1 千万人の患者の罹患が推測されており、毎年 300 万人の患者が死亡し、全体で第 4 位の死亡原因である (Diaz-Guzman E, et al. Clin Chest Med, 2014)。本邦でも、500 万人以上の患者の罹患が推測され、2014 年において COPD を原因とした死亡順位は 10 位で主要な死亡原因となっている (人口動態統計: 厚生労働省 2014)。COPD は最近の若年での喫煙開始や高齢者の増加による罹患患者数の増加が予測されており、COPD の病態解明及び治療開発が重要視され、世界的に研究が行われている。

COPD は、喫煙を主要因として末梢気道病変と肺の気腫性病変が様々な程度で複合的に作用し不可逆な気流制限を呈する進行性の病態である。COPD の病態形成には、気道炎症が中心的な位置を占めるとされており、CD8 陽性 T リンパ球、マクロファージ、好中球が主に関与しており、Interferon-gamma や Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  や IL-6, CXCL chemokine ligand (CXCL)8 など様々なメディエーターが関与する事が報告されている (Larsson K, et al. J Intern Med 2007)。

COPD の重要な病態の一つに急性増悪がある。急性増悪はウイルス感染が主因とされ、疾患の重症度と共に頻度が増加する。ステロイドを初めとした現行の治療に抵抗性で COPD 患者の緊急入院や高い死亡率の重要な原因であり、世界的にも急性増悪による入院が COPD 患者全体の医療費の 70% に及ぶという報告もある。COPD 急性増悪時には平常時と比べ、喀痰中での CXCL8, IL-6, TNF- $\alpha$  などのサイトカインの増加に加え、特に好中球の増加が平常時より顕著で増悪時における呼吸機能の低下や低酸素血症といった重症度を示す指標と相関する事が報告されている (Papi A, et al. Am J Respir Crit Care Med 2006)。また、このような気道中の好中球増加は慢性呼吸器疾患患者において重症度以外に治療抵抗性にも関与する事が知られている。増悪時に発現が増加している CXCL8 は、好中球性気道炎症において主たるメディエーターであり、その発現と好中球数の相関が報告されている。以上から、COPD 急性増悪は、気道中の CXCL8 と好中球の増加を特徴とし、その重症度及び難治性に深く寄与している事が考えられる。しかしながら、その CXCL8 や好中球の増加の機序については、いまだ十分に解明されておらず、そこに関与する分子の解明及びそれを標的とした治療の開発が強く期待される。

申請者は、COPD 急性増悪の気道炎症に関与する分子として IL-17A に着目した。IL-17A は健康人の喀痰中での発現はほとんどが検出感度以下である一方、COPD を含めた慢性呼吸器疾患患者の肺組織、喀痰中で高発現し (Roos AB, et al. Am J Respir Crit Care Med 2015)、呼吸機能低下との相関が報告されている。気道炎症の形成において IL-17A は気道上皮細胞から CXCL8 の産生を促進する事が分かっている。マウスモデルの研究においては、野生型マウスに比べ IL-17A KO マウスでウイルス感染後の気道中の好中球数低下を認めたことから IL-17A が好中球性気道炎症に関与する事が示唆されている。

COPD では、COPD 患者の肺組織や気道中で IL-17A の発現が増加し、その発現が重症度と相関する事や COPD 患者由来の上皮での IL-17 受容体の発現増加が報告されている。マウスの肺気腫モデルの研究では、IL-17A KO マウスでは野生型マウスに比べて気道中の好中球増加や気腫化が抑制されたとの報告がある。このように平常時の COPD における好中球性気道炎症や気腫化形成への関与を示唆する報告がされている。しかしながら、平常時に比べ好中球性気道炎症が顕著なウイルス感染を主因とする COPD 急性増悪における IL-17A の関与の報告は無い。

### 2. 研究の目的

以上の経緯から、申請者は COPD の急性増悪時の気道炎症形成における IL-17A の関与の解明やそれを標的とした治療に対する可能性を探索する事を目的として実験を行う事を目的とした。申請者は、過去にウイルス感染モデルとして poly (I:C) を使用した実験系で IL-17A との同時刺激によりケモカイン産生の主要な細胞である気道上皮細胞から相乗的に CXCL8 の産生が誘導され、その内部機構について p38, Erk1/2 経路の活性化や mRNA stabilization が寄与する事を見出した (Matsuzaki, et al. Plos One 2015)。TLR3 は二本鎖 RNA 以外に一本鎖 RNA やウイルス感染細胞由来の RNA を感知し、速やかに免疫系を発動させる事が推測されており、ライノウイルスやインフルエンザ A 等含めた呼吸器感染症においても、その認識機構及びケモカイン産生に重要な役割を果たす事が分かっている。そのため慢性呼吸器疾患の気道中に増加している IL-17A と TLR3 signaling の相互作用を in vitro で示した結果を大変有意義と考え、さらなる実験の発展としてマウスモデルへの応用による検討を行う事とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 肺気腫ウイルス感染増悪モデルの確立

C57BL/6J マウス (雄・10-12 週齢) を用いる。野生型マウス及び IL-17A KO マウスに対してエラストアーゼを用いた肺気腫モデルを作成する。具体的には、マウスに気管内挿管を行い、気管チューブよりスプレーを用いて両肺にエラストアーゼの気管内噴霧を行う (day1)。肺気腫モデル作成後は次のステップとしてウイルス感染モデルとして気管内に 1mg/ml の濃度で 100  $\mu$ l の poly (I:C) 投与を day22 から day24 (3 日間) まで連日行う事で、肺気腫のウイルス感染増悪モデルを確立させる。小動物用ベンチレーター flexivent を用いて、人工呼吸器管理 (分時換気回数 150、一回換気量 6ml/kg) を行う。気道抵抗とコンプライアンスを測定し、気道の総エラストアーゼ及び末梢肺のエラストアーゼを測定・評価する。次いで、人工呼吸器管理終了後に生理食塩水

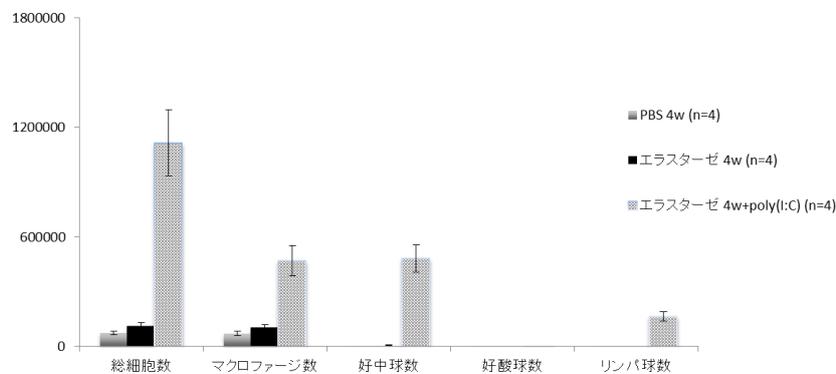
(1ml×3本:計3ml)により気管支肺胞洗浄を行い、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数・細胞分画の評価を行う。

2)1)で有意な所見が得られた場合は、さらに IL-17A がウイルス感染を主因とする急性増悪に関与する機序を探索する目的で、野生型マウス、IL-17A KO マウス両群の poly(I:C) 投与後の全肺での遺伝子発現変動の差異の解析を RNA-seq を用いて行い評価する。また、そこから抽出された分子に関しては、定量的 PCR、ウェスタンブロット、免疫蛍光染色によって組織中の発現や局在について評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 申請者は増悪モデルでの IL-17A の影響を検討するために野生型マウス及び IL-17A KO マウスを用いてエラストラーゼ投与により COPD モデルを作成し、さらに poly(I:C) を投与し急性増悪モデルを作成した。まず、各群（野生型マウス）における気管支肺胞洗浄液の細胞分画を下記に示す（図1）。

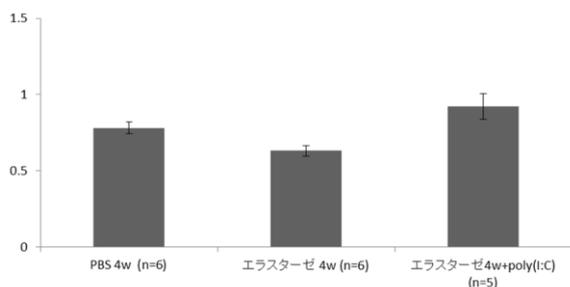
(図1)



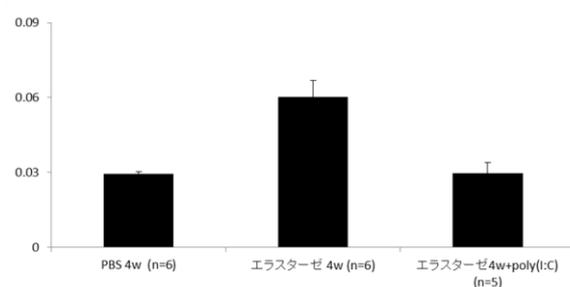
エラストラーゼ群ではマクロファージ、好中球を主体とした気管支肺胞洗浄液中の細胞数の増加が見られ、COPD 急性増悪モデルでは、好中球を主体とした顕著な細胞数の増加が認められた。

さらに各群（野生型マウス）での呼吸機能検査での気道抵抗（図2）、コンプライアンス（図3）の結果を示す。

(気道抵抗:図2)



(コンプライアンス:図3)



急性増悪群では、気道感染に伴うと考えられる気道抵抗の増加およびコンプライアンスの低下を認めた。エラストラーゼ群は既報通り、コンプライアンスの上昇を認めた。（図2，3）

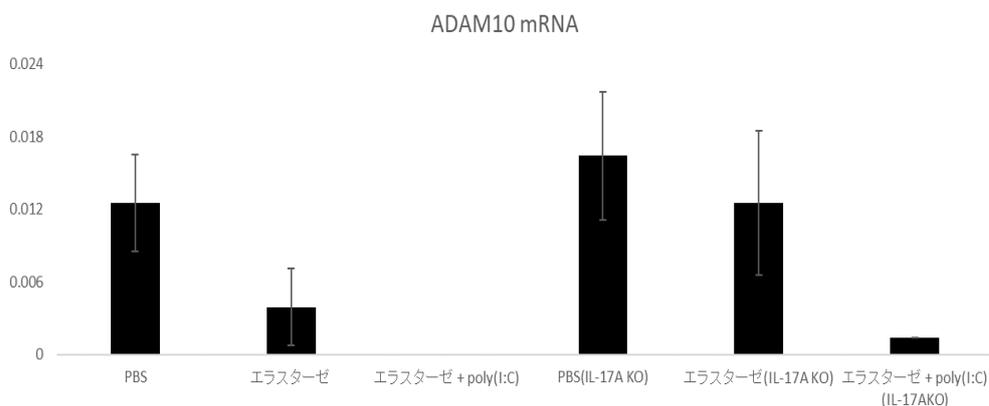
さらに、IL-17A KO マウスにおいても同様にコントロール群(PBS)、肺気腫モデル、急性増悪モデルを作成し、野生型マウスと比較した。

既報通り IL-17A KO マウスでエラストラーゼ投与による気腫の形成や呼吸機能におけるコンプライアンスの上昇は抑制された。さらに急性増悪モデルにおいて気管支肺胞洗浄液中の細胞数及分画を解析した所、好中球を含めた細胞数の増加が有意に抑制された事から急性増悪モデルにおいても IL-17A の病態への関与が示唆された。

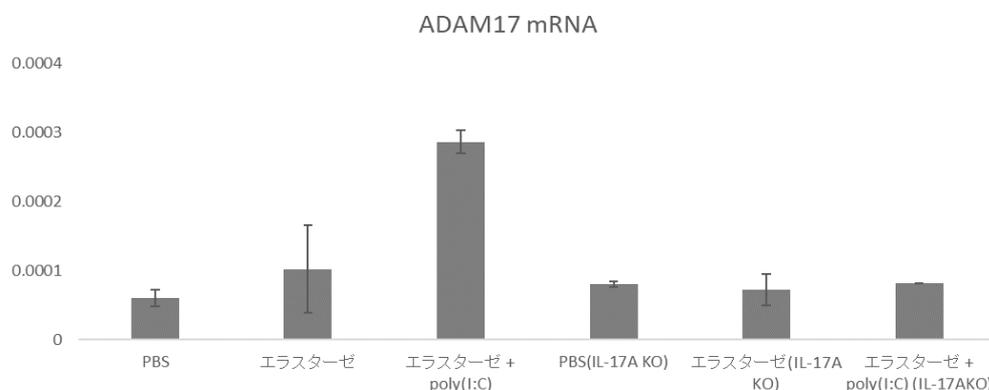
(2)さらに申請者は IL-17A がウイルス感染を主因とする急性増悪に関与する機序を探索する目的で、まず野生型マウス、IL-17A KO マウス両群の poly(I:C) 投与後の全肺での遺伝子発現変動の差異の解析を RNA-seq を用いて行い、IL-17A KO マウスで 2 倍以上発現が減弱した全 2540 遺伝子の中で同時に COPD モデルへの関与が報告されている分子の検索を行った。その結果、気道炎症や気腫化に対する治療標的分子として注目を集めている a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10 及び ADAM17 の 2 つの分子に着目した。

次にこれらの mRNA の全肺での発現を前述の COPD モデル及び急性増悪モデルを作成し検討した。興味深い事に、COPD モデルで ADAM17 は発現が亢進し、逆に ADAM10 の発現は低下を認めた。急性増悪モデルではよりその傾向が顕著となった。さらに、これらの発現の増減は IL-17A KO マウスで有意に減弱した (図 4, 5)。以上から COPD、急性増悪モデルにおいて ADAM10、17 の発現が変動し、その発現変動に対して IL-17A が関与する可能性が示唆された。

(図 4)



(図 5)



気道炎症やCOPD研究で注目を集めているADAM10及びADMA17の両分子であるが急性増悪における病態への関与の役割や機序は未解明な事が多い。本結果はADAM10及びADAM17両分子に新たな知見をもたらすものと考え、野生型マウス、IL-17A KO両マウスにおけるCOPDモデルや急性増悪モデルでのADAM10、17の発現変動を前述のmRNAの発現に加えて評価し、その発現と気道炎症、呼吸機能、病理像との相関を検討している段階である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Naftopidil reduced the proliferation of lung fibroblasts and bleomycin-induced lung fibrosis in mice. Urushiyama H, Terasaki Y, Nagasaka S, Kokuho N, Endo Y, Terasaki M, Kunugi S, Makita K, Isago H, Hosoki K, Souma K, Ishii T, Matsuzaki H, Hiraishi Y, Mikami Y, Noguchi S, Tamiya H, Mitani A, Yamauchi Y, Shimizu A, Nagase T. J Cell Mol Med. 2019 May;23(5):3563-3571.

②CISH is a negative regulator of IL-13-induced CCL26 production in lung fibroblasts. Takeshima H, Horie M, Mikami Y, Makita K, Miyashita N, Matsuzaki H, Noguchi S, Urushiyama H, Hiraishi Y, Mitani A, Borok Z, Nagase T, Yamauchi Y. *Allergol Int.* 2018 Sep 6. pii: S1323-8930(18)30102-3.

③Mechanism of Periostin Production in Human Bronchial Smooth Muscle Cells. Makita K, Mikami Y, Matsuzaki H, Miyashita N, Takeshima H, Noguchi S, Horie M, Urushiyama H, Iikura M, Hojo M, Nagase T, Yamauchi Y. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;175(1-2):26-35.

④Integrative CAGE and DNA Methylation Profiling Identify Epigenetically Regulated Genes in NSCLC. Horie M, Kaczkowski B, Ohshima M, Matsuzaki H, Noguchi S, Mikami Y, Lizio M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest ARR, Takai D, Yamaguchi Y, Micke P, Saito A, Nagase T. *Mol Cancer Res.* 2017 Oct;15(10):1354-1365.

⑤TAZ contributes to pulmonary fibrosis by activating profibrotic functions of lung fibroblasts. Noguchi S, Saito A, Mikami Y, Urushiyama H, Horie M, Matsuzaki H, Takeshima H, Makita K, Miyashita N, Mitani A, Jo T, Yamauchi Y, Terasaki Y, Nagase T. *Sci Rep.* 2017 Feb 14;7:42595.

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者: なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。