

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21790782

研究課題名（和文）COPD 増悪機序と制御の研究—好中球活性化における toll-like 受容体の役割

研究課題名（英文）Mechanisms and management of COPD exacerbations: role of toll-like receptors on the activation of neutrophil

研究代表者

小荒井 晃（KOARAI AKIRA）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80458059

研究成果の概要（和文）：本研究では、好中球における toll-like 受容体、主に TLR8 が COPD 病態で重要である酸化ストレスにより NF- κ B 経路の活性化を介してその機能が促進されることを示した。この機序がウイルスによる COPD 増悪時の好中球性炎症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we demonstrated that one of toll like receptors, TLR8-mediated neutrophilic responses were markedly potentiated via NF- κ B signaling by oxidative stress which is important in the pathophysiology of COPD. This might potentiate the neutrophilic inflammation during the viral-induced COPD exacerbations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患、急性増悪、酸化ストレス、ウイルス、toll 様受容体

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease: COPD）は世界的にみて罹患率と死亡率の高い疾患であり、2020 年までには世界で 3 番目に多い死因となると予想されている。COPD において急性増悪はその病態進行のみならず増悪時の入院費増大など社会的負荷の観点からもその制御が重要である。最も関連の高い増悪因子のひとつがウイルス感染と考えられているが [Wedzicha JA. *Proc Am Thorac Soc* 2004]、ウイルス感染による COPD 急性増悪の機序は未だ不明である。近年、ウイルス感染時に

産生される 1 本鎖および 2 本鎖 RNA が toll-like 受容体（TLR）3, TLR7, TLR8 などの受容体を介し、上皮やマクロファージ、樹状細胞などを刺激することで気道炎症を惹起する報告が散見される [Heil F. *et al Science* 2004]。近年 TLR8 がヒト好中球上にも同定され、受容体刺激によりサイトカイン産生などが亢進することが示されている [Hattermann K. *et al FASEB J* 2007]。

好中球は好中球エラスターゼ、カテプシン G、プロテイナーゼ 3 やマトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloprotease; MMP）などの蛋白分解酵素を産生・放出す

ることで気道や肺胞構造の破壊をもたらし、COPD の病因において重要な役割を果たすと考えられており、COPD 気道炎症病態における好中球の関与を示唆する多くの報告がある。近年、我々は好中球上の表面マーカーである CD18b と CXC ケモカイン受容体である CXCR1 の発現が健常喫煙者に比し増加し、重症度と相関があることを報告し、COPD 病態における好中球の関与を示している [Yamagata T. *et al Chest* 2007]。

COPD 急性増悪時には気道において好中球および好中球エラスターゼが増加していることが示されており、好中球は急性増悪機序においてもその関与が示唆されている。COPD では喫煙や炎症細胞由来の酸化ストレスがその病態形成に重要と考えられ、活性酸素種を始めとする酸化ストレスによりマクロファージなどの炎症細胞は活性化し、COPD 気道においても酸化ストレスが増加していることが報告されており、我々もまたその機序として活性酸素種の関与を示してきた [Ichinose M. *et al AJRCCM* 2000]。

今回、我々は急性増悪時における TLR8 を介した好中球活性化反応は酸化ストレスがその病態で重要である COPD 患者においては健常者に比して増強しており、そのことが COPD 増悪時の炎症反応増強および COPD 病態の進行に重要であり、その機序の解明が新たな治療法に貢献できるのではないかと考え今回の研究を計画した。

2. 研究の目的

COPD の急性増悪はウイルス感染により惹起されるが、その機序はまだ不明な点が多く、急性増悪時における TLR8 を介した好中球活性化という機序を解明し COPD 急性増悪の機序を明らかにすることである。予想される結果としては、(1) 酸化ストレスは好中球の TLR8 シグナル経路を活性化する (2) 酸化ストレスによる NF- κ B 系の増強メカニズムの関与 (3) COPD 群では TLR8 受容体刺激に対する免疫応答がより亢進している (4) 増悪時にはより TLR8 受容体刺激反応が亢進していることである。

また、上記機序に関し、他の炎症細胞やレジデント細胞において TLR 受容体反応性を検討し、COPD およびその増悪機序における TLR 受容体システムの役割を解明する上で糸口を模索した。

3. 研究の方法

以下の様に患者検体を採取し、分離したヒト好中球を用いて研究を行った。

(1) 対象と検体の採取

対象は非喫煙健常者、喫煙者、GOLD のガイドラインを満たす COPD 症例とした。それぞ

れの対象患者において事前に呼吸機能検査を施行し、十分な説明と文章 (和歌山県立医科大学における臨床研究応用についての倫理審査委員会で認められたもの) による同意を得た上で、採血を行った。具体的には、末梢血は通常の採血法で 20ml 採取を行った。

(2) 検体採取法および解析法

① 好中球の分離・培養

末梢血は採血後ただちに Dextran および Radioselectan を含む PBS 溶液に加え、好中球を沈降し分離した。Ficoll-Paque 液に加え遠心分離を行い、好中球層を回収した。

回収後の好中球はただちに TLR8 や下位シグナル伝達物質である MyD88 および TRAF6 の蛋白量測定に用いるとともに、 1×10^6 個/ml に調整し、RPMI1640 培養液を用いて 6~24 wells の培養プレートで培養し、TLR7/8 のリガンドである R848 と TLR7 のリガンドである R837 で刺激し、その上清および細胞成分を回収し以下の実験に用いた。

② 好中球上における TLR8 発現

末梢血から分離した好中球を、抗 TLR8 抗体を用いて免疫染色し、また、陽性細胞数の割合を Flow cytometry を用いて検討した。

③ サイトカインの測定

末梢血より分離した好中球を TLR7/8 のリガンドである R848 および TLR7 のリガンドである R837 で刺激し、24 時間後の上清中の IL-8 を ELISA 法を用いて検討した。また、上清中の IL-1 β , IL-6, TNF- α は cytokine Beads array kit を用いて測定した。

④ スーパーオキシドの測定

R848 刺激 1 時間後に好中球を DHR-123 および 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate で処理後 flow cytometer で DHR-123 の蛍光強度を測定し比較検討した。

⑤ 好中球遊走能の測定

IL-8 (0.3ng/ml) に対する好中球の遊走を plastic chemotaxis chamber (3 μ m) を用い、1 時間後に膜を透過した細胞数を flow cytometer で計測し、比較検討した。

⑥ エラスターゼ産生の測定

Human PMN elastase ELISA kit を用いた。

(3) 酸化ストレスによる好中球 TLR8 シグナルへの影響の検討

H₂O₂ で前処置を行い、R848 刺激による好中球の IL-8 放出に対する酸化ストレスの影響を検討した。また、抗酸化物質である N-acetyl-L-cysteine 前処理による H₂O₂ 作用の抑制実験を行った。

(4) 酸化ストレスによる好中球 TLR8 シグナルへの影響のメカニズム検討

①NF-κB のリン酸化

H₂O₂ および R848 刺激 1 時間後に NF-κB のリン酸化を BD phosflow を用いて検討した。

②western blot 法による受容体および細胞内シグナルの定量

細胞質分画を抽出、電気泳動後、抗ヒト MyD88 抗体、抗ヒト TRAF6 抗体、抗ヒト IκBα 抗体を用い、western blot 法により検討を行い、内因性のコントロールとして用いた β-actin に対する割合で示した。

(5) 疾患群および COPD 増悪時との比較
健常者および COPD 患者、COPD 増悪時の患者から末梢血好中球を分離し、TLR8 リガンドである R848 刺激による IL-8 放出を比較検討した。

(6) 酸化ストレスの TLR3 刺激による単球由来マクロファージ IL-8 放出に与える影響の検討

健常者末梢血単球を分離し、GM-CSF 存在下で培養 12 日後、マクロファージ様に分化した細胞である単球由来マクロファージを用い、H₂O₂ 前処置の TLR3 のリガンドである poly(I:C) 刺激による IL-8 放出に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(図 1-6 は Yanagisawa S, Koarai A, et al. Respir Res 10: 2009, 50-62. より引用した)

(1) ヒト多核白血球における TLR8 の発現および機能の同定

健常者ヒト末梢血好中球において TLR8 が発現しているか否か免疫染色および Flow cytometry にて検討したところ、TLR8 は免疫染色で好中球にその発現が認められ、

Flow cytometry での検討では、エンドゾームなどの細胞内だけでなく、細胞表面にも発現していることが確認された (図 1、2)。

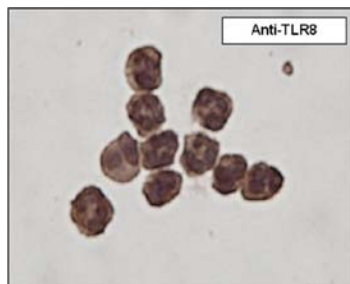


図 1 好中球における TLR8 の発現 (免疫染色)

次に、その受容体の機能を確認する目的で、TLR7 のリガンドである R837 や TLR7/8 の

リガンドである R848 刺激による IL-8 放出を検討した。R837 刺激では反応が認められな

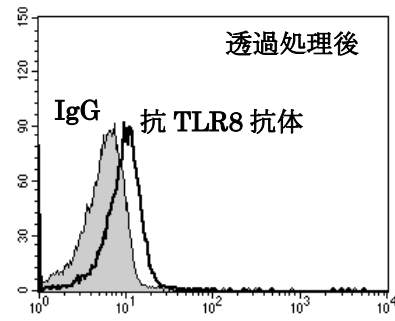


図 2 好中球における TLR8 の発現 (Flow cytometry)

かったが、R848 刺激により、時間および濃度依存性に好中球からの IL-8 の放出が増強された。

IL-8 の放出が TLR のシグナルを介しているか調べるために、endosome の酸性化を抑制することで TLR8 のシグナルを抑制する薬剤である bafilomycin による前処置を行ったところ、Bafilomycin は R848 刺激により増強された IL-8 放出を濃度依存性に抑制した。

また、COPD 増悪時に治療として用いられるステロイドである dexamethasone も R848 刺激により増強された IL-8 放出を濃度依存性に抑制した。

(2) 酸化ストレスの TLR8 刺激によるサイトカイン放出、スーパーオキシド産生、エラスターゼ産生、好中球遊走能に与える影響の検討

酸化ストレス物質である H₂O₂ の TLR8 刺激による IL-8 放出に与える影響を検討したところ、H₂O₂ 前処置は R848 刺激による IL-8 放出を濃度依存性に増強した (図 3)。

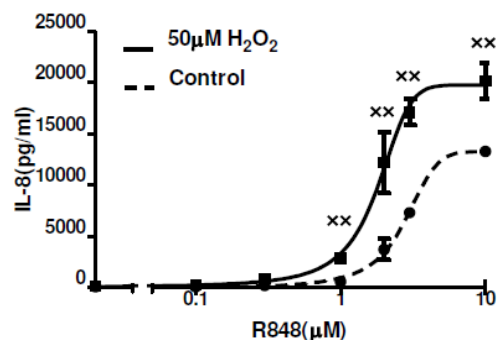


図 3 好中球における H₂O₂ 前処置による R848 刺激後の IL-8 放出増強効果

この増強効果は抗酸化物質である N-acetyl-L-cysteine により有意に抑制された (図 4)。

次に、H₂O₂ のサイトカイン産生に与える影響を検討したところ、H₂O₂ 前処置は IL-8 同様に TLR8 刺激による TNF-α, IL-6 放出を有意に増強したが、IL-1β 放出には影響を与

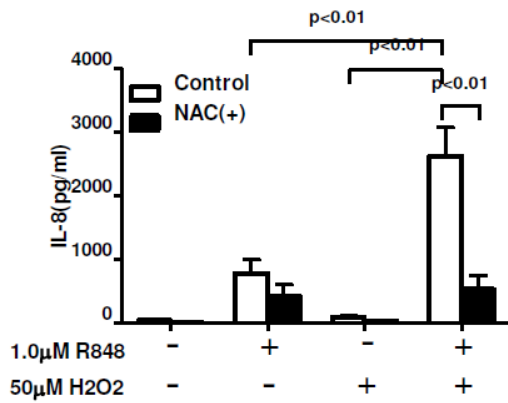


図4 好中球における H₂O₂ 前処置による R848 刺激後の IL-8 放出増強作用に対する N-acetyl-L-cysteine の抑制効果

えなかった。

さらに、H₂O₂ の R848 刺激によるスーパーオキシド産生、エラスターゼ産生、好中球遊走能などの好中球機能促進作用を増強するか否かを検討したところ、H₂O₂ および R848 単独ではスーパーオキシド産生を増強しなかったが、その共刺激では有意にスーパーオキシド産生を増強した。

しかし、エラスターゼ産生や好中球遊走能に関しては H₂O₂ 前処置は増強効果が認められなかった。

(3) 酸化ストレスの TLR8 シグナルに与える影響の検討

H₂O₂ 前処置による R848 刺激による好中球反応の増強効果の機序を解明するために、R848 刺激による TLR の活性化に重要なシグナルである NF-κB 活性化への H₂O₂ の影響を検討した。H₂O₂ および R848 単独刺激により NF-κB p65 のリン酸化は有意に増強したが、NF-κB p65 のリン酸化は共刺激により有意に増強された (図5)。

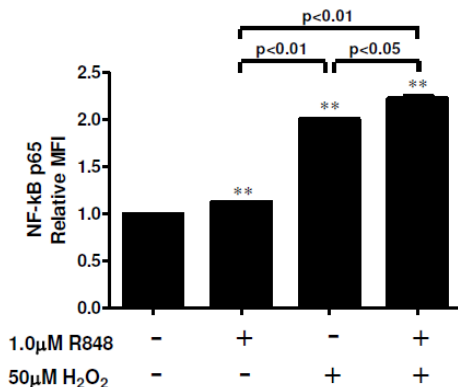


図5 好中球における H₂O₂ 前処置による R848 刺激後の NF-κB p65 リン酸化増強効果

また、R848 は IκBα の発現を濃度依存性に減少し、H₂O₂ 前処置は R848 による IκBα 発現をさらに減弱した。また、NF-κB シグナルを

抑制する薬剤である MG-132 による前処置は R848 刺激による IκBα 発現減弱を抑制し、H₂O₂ 処置による R848 刺激による IL-8 放出増強効果を有意に抑制した (図6)。さらに、H₂O₂ の TLR8 の発現や、TLR の細胞内シグナル蛋白である MyD88, TRAF6 に与える影響を検討したが明らかな影響は認められなかった。

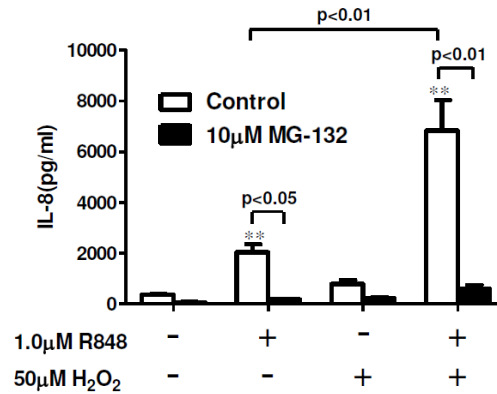


図6 好中球における H₂O₂ 前処置による R848 刺激後の IL-8 放出増強作用に対する MG-132 の抑制効果

(4) 健常者、COPD および COPD 増悪時における末梢血好中球を用いた TLR8 反応性の比較検討

健常者および COPD 患者の末梢血好中球を用いて、TLR8 リガンド刺激による IL-8 放出能を比較検討した。COPD 患者の末梢血好中球は健常者に比し、R848 刺激による IL-8 放出能が有意に亢進していた (図7)。しかし、健常者と COPD 患者では年齢が健常者において有意に低く、年齢のマッチングの問題が残された。COPD 増悪時における好中球 TLR8 反応性が亢進する可能性について検討を試みたが、増悪時の好中球は活性化のためか赤血球との分離が困難であり、今回は検討困難であった。

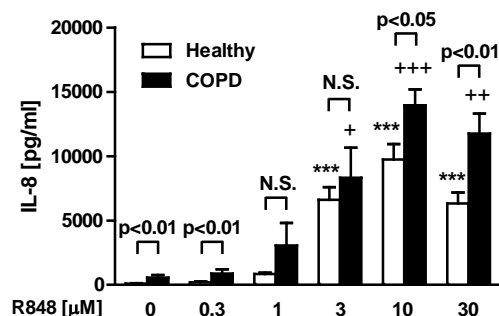


図7 TLR8 刺激による末梢血好中球 IL-8 放出反応に関する疾患群の比較検討

(5) 末梢血単核球由来マクロファージを用いたマクロファージにおける TLR3 および酸

化ストレスに対する反応性に関する検討

マクロファージは COPD の病態において重要な役割を担うと考えられており、COPD 増悪機序においてはウイルス由来の dsRNA を認識する TLR3 の発現がマクロファージにおいてすでに同定されている。今回、好中球において酸化ストレスがウイルス由来の ssRNA を認識し TLR8 の反応性を増強することを我々は示しており、マクロファージにおいても同様の機序が存在する可能性を考え、単球を GM-CSF で刺激し、マクロファージ様に分化後に TLR3 のリガンドである poly(I:C)を用いて、H₂O₂ 前処置の poly(I:C) 刺激後の IL-8 放出能を検討した。Poly(I:C) 刺激により IL-8 放出は濃度依存性に増加したが、100 μ M H₂O₂ 前処置は有意にこの反応を増強しなかった。このことは、マクロファージ系では酸化ストレスに対する防御能が好中球よりも高い可能性も考えられるが、今回の結果を解釈する上では、さらなる検討が必要と考えられた。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、酸化ストレス物質である H₂O₂ により好中球における TLR8 刺激による IL-8 や IL-6、TNF- α 放出、スーパーオキシド産生が増強し、主に NF- κ B 経路の活性化がその機序に関与していることを初めて示した。この結果は、酸化ストレス下の病態ではウイルス感染時にはウイルス由来の RNA 刺激による TLR8 を介した IL-8 放出が増強され、オートクライン的機序により好中球性炎症が増強される可能性を示唆しており、Respir Res に掲載された。

(7) 今後の展望

今回、好中球における tol-like 受容体、主に TLR8 が COPD 病態で重要である酸化ストレスにより NF- κ B 経路の活性化を介してその機能が促進され、COPD 増悪機序に関与する可能性を示した。近年では tol-like 受容体はウイルスや細菌由来の病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識するのみではなく、細胞障害時に放出される内因性分子[「ダメージ」関連分子パターン (DAMPs)]を認識することが明らかになってきている。このことから今後の検討では tol-like 受容体を介した DAMPs の COPD 病態における役割を解明することを目的とした研究も加えて、COPD 病態における自然免疫の役割を明らかにしていく予定であり、この機序の解明により COPD およびその増悪に対する新たな治療法の開発への道が開かれると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Koarai A, et al. (著者 9 名 1 番目) Expression of muscarinic receptors by human macrophages. Eur Respir J. 査読有 39: 2012, 698-704. DOI 10.1183/09031936.00136710
- ② Sugino A, Koarai A, et al. (著者 9 名 5 番目) Validation of a compact motion sensor for the measurement of physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respiration. 査読有 83: 2012, 300-307. DOI 10.1159/000330046
- ③ Furukawa K, Koarai A, et al. (著者 12 名 5 番目) Increase of nitrosative stress in patients with eosinophilic pneumonia. Respir Res. 査読有 12: 2011, 81-91. DOI 10.1186/1465-9921-12-81
- ④ Matsunaga K, Koarai A, et al. (著者 7 名 4 番目) Exhaled nitric oxide cutoff values for asthma diagnosis according to rhinitis and smoking status in Japanese subjects. Allergol Int. 査読有 60: 2011, 331-337. DOI 10.2332/allergolint.10-OA-0277
- ⑤ Akamatsu K, Koarai A, et al. (著者 7 名 4 番目) Improvement of Airflow Limitation by Fluticasone Propionate/Salmeterol in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: What is the Specific Marker? Front Pharmacol. 査読有 2: 2011, 36-41. DOI 10.3389/fphar.2011.00036
- ⑥ 小荒井 晃, 拡散, 呼吸, 査読無 30: 2011, 358-364.
- ⑦ 小荒井 晃, COPD と自然免疫, 総合臨床, 査読無 60: 2011, 508-514.
- ⑧ 小荒井 晃, COPD の新しい臨床研究 -UPLIFT-TORCH 以後, 呼吸と循環, 査読無 59: 2011, 1009-1015.
- ⑨ Koarai A, et al. (著者 9 名 1 番目) Oxidative stress enhances toll-like receptor 3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 査読有 42: 2010, 651-660. DOI 10.1165/rcmb.2008-0345OC
- ⑩ Minakata Y, Koarai A, et al. (著者 11 名 7 番目) High COPD prevalence in patients with liver disease. Intern Med 査読有 49: 2010, 2687-91. URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21173543
- ⑪ Yanagisawa S, Koarai A, et al. (著者 11 名 2 番目) Oxidative stress augments toll-like receptor 8 mediated neutrophilic responses in healthy

- subjects. *Respir Res* 査読有 10: 2009, 50-62. DOI 10.1186/1465-9921-10-50
- ⑫ Sugiura H, Koarai A, et al. (著者 9 名 3 番目) Activation of toll-like receptor 3 augments myofibroblasts differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 査読有 40: 2009, 654-662. DOI 10.1165/rcmb.2008-0371OC
- ⑬ Yanagisawa S, Koarai A, et al. (著者 12 名 7 番目) The possible role of hematopoietic cell kinase in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 査読有 135: 2009, 94-101. DOI 10.1378/chest.07-3020
- ⑭ Matsunaga K, Koarai A, et al. (著者 9 名 5 番目) Clinical Application of Exhaled Breath Condensate Analysis in Asthma: Prediction of FEV(1) Improvement by Steroid Therapy. *Respiration* 査読有 78: 2009, 393-398. DOI 10.1159/000243551
- ⑮ Matsunaga K, Koarai A, et al. (著者 9 名 5 番目) Molecular mechanism of the additive effects of leukotriene modifier in asthmatic patients receiving steroid therapy. *Allergol Int.* 査読有 58: 2009, 89-96. DOI 10.2332/allergolint.08-OA-0014
- ⑯ 小荒井晃, 杉浦久敏, 喘息と COPD の増悪をめぐって 増悪から回復期の喘息治療, 呼吸と循環, 査読無 57: 2009, 169-174.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 神田佳典, 小荒井 晃, 非結核性抗酸菌症に合併した ANCA 関連血管炎の一例, 第 78 回日本呼吸器学会近畿地方会, 2011.12.3, 大阪
- ② 小荒井 晃, 25-Hydroxycholesterol の気道上皮におけるサイトカイン産生および TLR3 受容体応答に与える影響の検討, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2011.11.10, 東京
- ③ A Koarai, et al. Oxidative stress enhances toll-like receptor 3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells. AAAS and AP Airway Disease Summit, 2011.10.15, Taipei, Taiwan
- ④ A Koarai, et al. Cigarette smoking augments toll-like receptor 3 expression and responses in macrophages. ERS Annual Congress, 2011.9.25, Amsterdam, Netherlands
- ⑤ A Koarai, et al. 25-hydroxycholesterol enhances cytokines release and toll-like receptor 3 responses in human airway epithelial cells. ATS International Conference, 2011.5.17, Denver, USA
- ⑥ 小荒井 晃, COPD 急性増悪機序の解明および薬物療法の可能性, 第 19 回 Pneumo forum, 2010.11.13, 東京
- ⑦ Koarai A, et al. Expression of toll-like receptor 3 in alveolar macrophages from patients with COPD. ERS Annual Congress, 2010.9.21, Barcelona, Spain
- ⑧ Koarai A, et al. Oxidative stress enhances TLR3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells. COPD symposium in ASIA2010, 2010.7.31, Tokyo, Japan
- ⑨ 小荒井 晃, 酸化ストレスの dsRNA ウイルス刺激応答に与える影響の検討, 第 81 回 閉塞性肺疾患研究会, 2010.7.24, 東京
- ⑩ Koarai A, et al. Oxidative stress enhances TLR3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010.6.16, Kyoto, Japan
- ⑪ 小荒井 晃, 酸化ストレスのヒト気道上皮における dsRNA ウイルス刺激応答に対する影響の検討, 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会, 2010.4.25, 京都
- ⑫ 中谷佳裕, 小荒井 晃, 化学療法が奏効した肺大細胞癌 (LCNEC) の 1 例, 第 37 回 和歌山悪性腫瘍研究会, 2009.12.5, 和歌山
- ⑬ 小荒井 晃, 酸化ストレスの気道上皮における dsRNA ウイルス刺激応答に対する影響の検討, 第 49 回日本呼吸器学会総会, 2009.6.13, 東京
- ⑭ Koarai A, et al. Oxidative stress enhances TLR3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells. ATS International Conference, 2009.5.18, San Diego, California

[図書] (計 2 件)

- ①. 小荒井晃, 一ノ瀬正和, 医薬ジャーナル社, 薬物療法: 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のマネジメント改訂版, 橋本 修 編, 2010, 87-103.
- ② 小荒井晃, 医学書院, 肺胞蛋白症: 今日の治療指針 2010、総編集 山口 徹 他, 2010, 261-262.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小荒井 晃 (KOARAI AKIRA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80458059