

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16134

研究課題名（和文）喫煙曝露誘導肺気腫モデルにおけるTARC/CCL17の機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis of TARC/CCL17 on a model of smoke-induced emphysema

研究代表者

佐藤 建人（Sato, Kento）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60723749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：COPD患者の呼吸機能低下とTARC/CCL17との関連が報告されている。TARC/CCL17、受容体であるCCR4がCOPDの病態にどのように関与するかを、ノックアウトマウスを用いて検討した。TARC/CCL17ノックアウトマウスでは、エラスターゼ投与後の肺気腫形成、短期間喫煙曝露後のマクロファージ集積が軽減していた。またCCR4ノックアウトマウスでは、短期間喫煙曝露後のマクロファージ集積、長期間喫煙曝露後の肺気腫形成が軽減していた。これらの結果から、TARC/CCL17-CCR4の経路が、マクロファージの誘導に関わり、喫煙誘導炎症、肺気腫形成の病態に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TARC/CCL17はこれまでに主にアレルギー疾患での解析が多く、COPDの病態形成に関して、どのような役割があるのかという機能解析はこれまでに報告がない。またTARC/CCL17はTh2細胞のケモカインと認識されており、マクロファージに対する作用の報告は少なく、明らかになっていない点が多い。今回、ノックアウトマウスに対して研究を行ったことで、病態の解明に近づくことが出来た。今後更に研究を続けることで、COPDの病態への理解や、治療薬の開発といった医学の進歩に大きく貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：It is reported that TARC/CCL17 is related to decreased respiratory function in COPD patients. We used knockout mice to examine how TARC/CCL17 and its receptor CCR4 are involved in the pathology of COPD. In TARC/CCL17 knockout mice, emphysema formation after elastase administration and macrophage accumulation after short-term cigarette smoke exposure were reduced. In CCR4 knockout mice, macrophage accumulation after short-term cigarette smoke exposure and emphysema formation after long-term smoking exposure were reduced. These results suggest that the TARC/CCL17-CCR4 pathway is involved in macrophage accumulation and is involved in the pathology of cigarette smoke-induced inflammation and emphysema formation.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：COPD

## 1. 研究開始当初の背景

**COPD** は喫煙や粉塵、大気汚染によって生じる呼吸器疾患であり、全世界的で患者が増加している。全世界の死因の第**3**位で、年間**300**万人が死亡しており、その対策は急務である(**WHO 2020**)。しかし現在に至っても根本的な治療法は確立していない。

**COPD** の病態を評価する方法は、症状や呼吸機能、画像検査などが主体である。呼吸機能の指標である一秒量の急速な低下は死亡率の予測因子となる。このことから呼吸機能の低下と関連するバイオマーカーは、**COPD** の病態に関連すると考えられ、その病態を解明することで、**COPD** の新たな治療につながると考えられる。

申請者等は外来通院している安定期 **COPD** 患者を前向きに追跡したところ、血清中 **Thymus- and activation-regulated chemokine (TARC)/Chemokine (C-C motif) ligand 17(CCL17)** が、一秒量の経年低下を予測する独立したバイオマーカーであることを明らかにした。

**TARC/CCL17** は本邦の今井らによって発見されたケモカインである。**Th2** 細胞に高発現している **CCR4** に結合し、細胞の遊走に関わる。臨床的には、**TARC/CCL17** は **Th2** 細胞優位の炎症であるアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患との関連が多く報告されている。しかし **COPD** と **TARC/CCL17** との関連を詳細に検討したものは殆ど見られない。

**TARC/CCL17** は胸腺での発現が強いが、肺や腸管にも発現を認めている。申請者等の研究で、酸化ストレスやタバコ抽出液が、気道上皮細胞株(**BEAS-2B** 細胞)での **TARC/CCL17** の発現を誘導することを認めている。またマウスに喫煙曝露刺激を行うことで、気道上皮での **TARC/CCL17** が増加することも認めている。**CCR4** はマクロファージにも発現しており、申請者等の研究で、**TARC/CCL17** の経気道投与が、肺泡マクロファージの増加をきたすことを認めており、*in vitro* では **TARC/CCL17** がマクロファージ細胞株 (**Raw264.7** 細胞) の遊走を増加させることを認めている。これらの結果から『喫煙刺激によって気道上皮で誘導される **TARC/CCL17** が、マクロファージを集積させ、**COPD** の病態に関わる』という仮説を立てた。

申請者等は、**COPD** の動物モデルであるエラストラーゼ誘導肺気腫での検討をまず行った。**TARC/CCL17** の経気道投与ではエラストラーゼ誘導肺気腫が増強し、また **TARC/CCL17** ノックアウトマウスではエラストラーゼ誘導肺気腫が軽減することを認め、**TARC/CCL17** が **COPD** の病態に関与することが強く示唆された。

しかし **COPD** の主たる原因は喫煙刺激であり、**COPD** における **TARC/CCL17** の役割を明らかにするためには喫煙曝露下での検討が必要である。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、**COPD** の主たる原因である喫煙曝露を行うことで、**COPD** の病態に **TARC/CCL17** がどのように関与するかを評価することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) **TARC/CCL17** がエラストラーゼ誘導肺気腫に及ぼす影響

9週から10週の雄の **C57BL/6** マウスに、**TARC/CCL17** を経鼻投与した。その後エラストラーゼを経鼻投与し、肺気腫形成を行った。病理標本作成を行い、肺気腫形成の程度を評価した。

また9週から10週の雄の **TARC/CCL17** ノックアウトマウスにエラストラーゼを経鼻投与し、肺気腫形成を行った。病理標本作成を行い、肺気腫形成の程度を評価した。肺気腫形成の程度は、平均肺胞間距離(**Mean linear intercept; MLI**)を測定することで評価した。

### (2) **TARC/CCL17** が喫煙誘導炎症に及ぼす影響

**TARC/CCL17** ノックアウトマウスに、喫煙曝露(**CS**)を 2 日間行い、気道炎症を誘導した。気管支肺胞洗淨(**BAL**)を行い、細胞数を評価した。

しかし **TARC/CCL17** ノックアウトマウスを使用できなくなってしまい、**TARC/CCL17** の受容体である **CCR4** のノックアウトマウスを新たに作成し研究を行った。

9 週から 10 週の雄の **CCR4** ノックアウトマウスに、喫煙曝露(**CS**)を 2 日間行い、気道炎症を誘導した。気管支肺胞洗淨(**BAL**)を行い、細胞数を評価した。

### (3)**TARC/CCL17** が喫煙誘導肺気腫に及ぼす影響

9 週から 10 週の雄の **CCR4** ノックアウトマウスに、喫煙曝露(**CS**)を 24 週間行い、肺気腫形成を行った。病理標本作成を行い、肺気腫形成の程度を評価した。肺気腫形成の程度は、**MLI** を測定することで評価した。

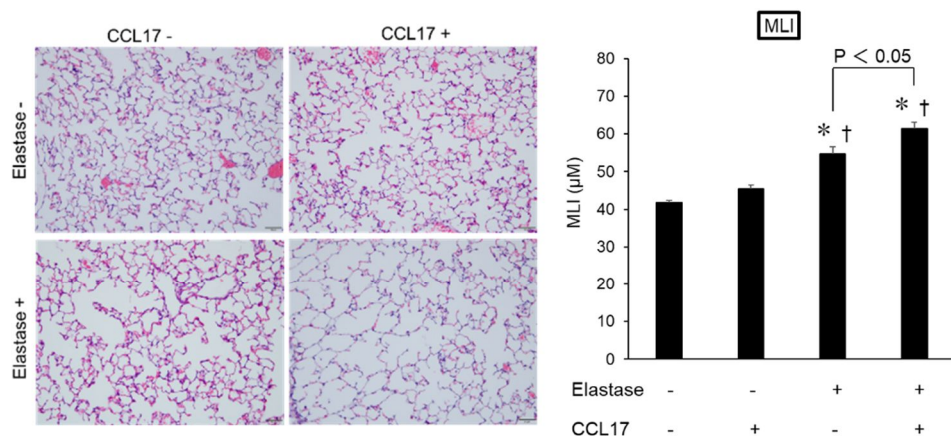
## 4. 研究成果

### (1)**TARC/CCL17** がエラスターゼ誘導肺気腫に及ぼす影響

エラスターゼ投与により、マウスの肺は気腫性変化を呈した(図 1、2)。**TARC/CCL17** を投与した群では、気腫性変化が増強し、**MLI** が増加していた(図 1)。また **TARC/CCL17** ノックアウトマウスでは、気腫性変化が軽減していた(図 2)。

**TARC/CCL17** により、エラスターゼ誘導の肺気腫形成が変化することが明らかとなった。このことは、**TARC/CCL17** が肺気腫形成に強く関与し、**COPD** の病態に関与することを示唆する。

図 1



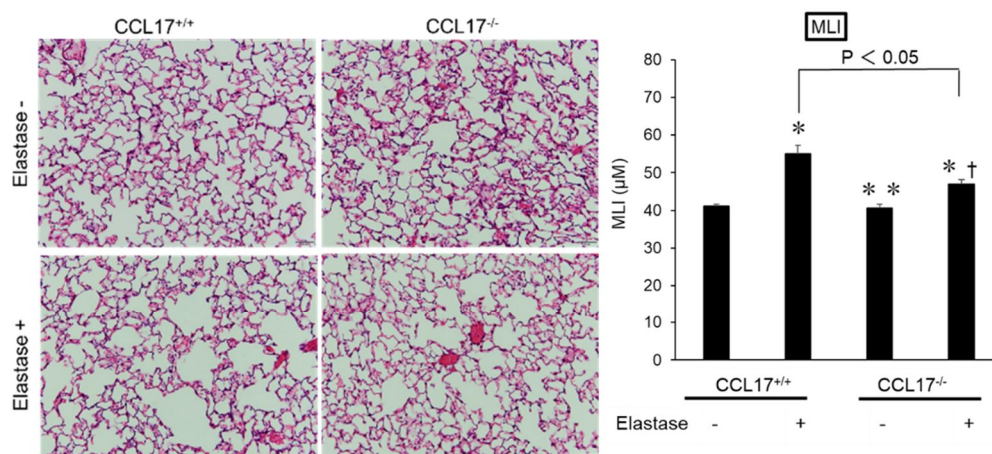
N = 4-7 in each group. Data were expressed as mean ± SE.

\* P < 0.05 vs Control (Elastase-/CCL17-).

† P < 0.05 vs Elastase-/CCL17+.

Tukey-Kramer

図 2



N = 4-5 in each group. Data were expressed as mean ± SE.

\* P < 0.05 vs CCL17<sup>+/+</sup> or CCL17<sup>-/-</sup>/Elastase-

\*\* P < 0.05 vs CCL17<sup>+/+</sup>/Elastase+

† P < 0.05 vs CCL17<sup>+/+</sup>/Elastase-.

Tukey-Kramer

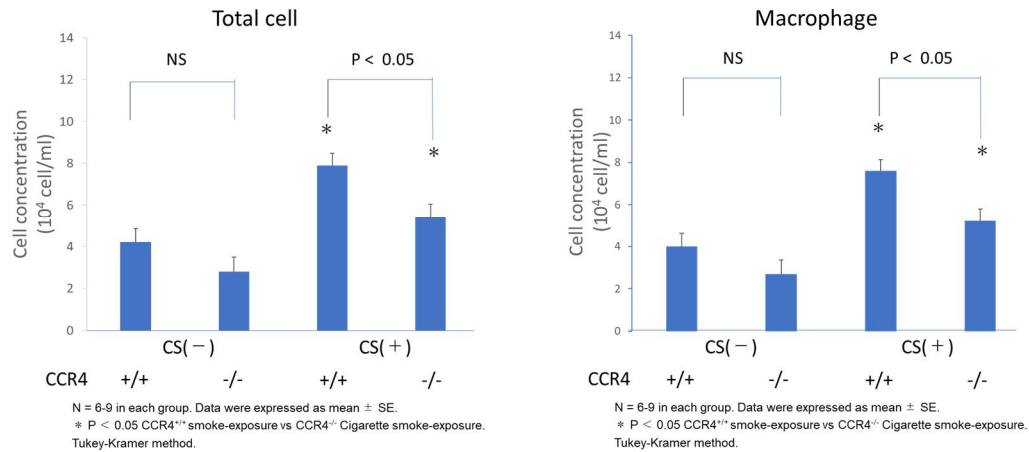
**(2)TARC/CCL17 が喫煙誘導炎症に及ぼす影響**

短期間の喫煙曝露を行った **TARC/CCL17** ノックアウトでは、**BAL** 液中のマクロファージの増加が有意に抑えられていた。

また短期間の喫煙曝露を行った **CCR4** ノックアウトマウスでも、**BAL** 液中のマクロファージの増加が有意に抑えられていた(図 3)。

**TARC/CCL17**、**CCR4** ノックアウトマウスのいずれでも、喫煙曝露によるマクロファージの肺への集積が抑制されることが明らかとなった。このことは、**TARC/CCL17-CCR4** の経路が喫煙負荷によるマクロファージの誘導、喫煙曝露誘導炎症に強く関与することを示唆する。

図 3

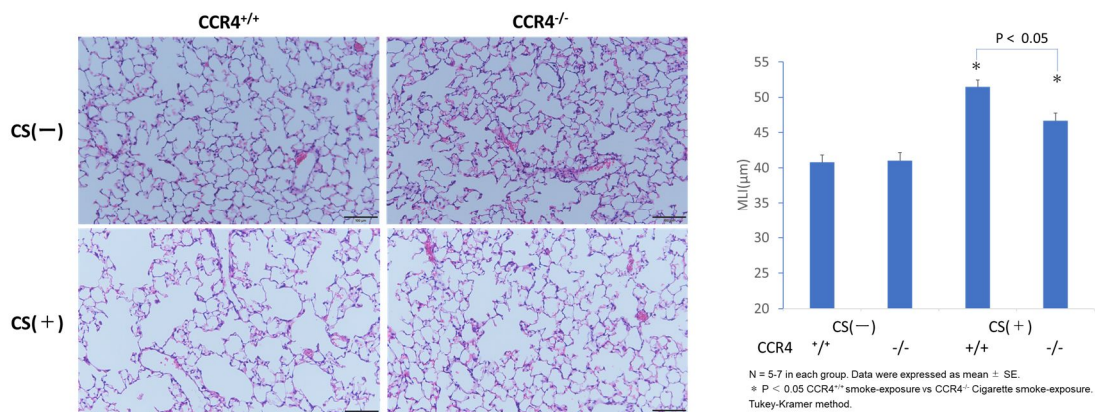


**(3)TARC/CCL17 が喫煙誘導肺気腫に及ぼす影響**

喫煙曝露により、**CCR4** 野生型、ノックアウトマウスとも、気腫性変化を呈していた(図 4)。しかし **CCR4** ノックアウトマウスは、野生型に比べ、気腫性変化の程度は有意に少なく、**MLI** も低値であった(図 4)。

**CCR4** ノックアウトマウスにおいて、喫煙曝露による肺気腫形成が抑制されることが明らかとなった。このことは、**TARC/CCL17-CCR4** の経路が喫煙負荷による肺気腫形成の誘導に強く関与することを示唆する。

図 4



以上の結果から、**TARC/CCL17-CCR4** の経路が、喫煙負荷によるマクロファージの誘導に関わり、肺気腫形成の病態に関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Machida Hiroyoshi, Inoue Sumito, Igarashi Akira, Saitoh Shinichi, Yamauchi Keiko, Nishiwaki Michiko, Nemoto Takako, Otaki Yoichiro, Sato Masamichi, Sato Kento, Nakano Hiroshi, Yang Sujeong, Furuyama Kodai, Murano Hiroaki, Ishibashi Yu, Ota Takahito, Nakayama Takashi, Shibata Yoko, Watanabe Masafumi	4. 巻 66
2. 論文標題 Role of CC Chemokine Ligand 17 in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 428-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2021-00690C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodai Furuyama, Noriyuki Hirama, Shigeyuki Fukushima, Minoru Inage, Hiroki Ota, Kento Sato, Keiko Yamauchi, Masamichi Sato, Akira Igarashi, Sumito Inoue, Masafumi Watanabe	4. 巻 20
2. 論文標題 A case of pulmonary tuberculosis with hemoptysis from a peripheral pulmonary aneurysm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EXCLI Journal	6. 最初と最後の頁 1482-1485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17179/excli2021-4279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Nakano, Sumito Inoue, Yukihiro Minegishi, Akira Igarashi, Yoshikane Tokairin, Keiko Yamauchi, Tomomi Kimura, Michiko Nishiwaki, Takako Nemoto, Yoichiro Otaki, Masamichi Sato, Kento Sato, Hiroyoshi Machida, Sujeong Yang, Hiroaki Murano, Masafumi Watanabe & Yoko Shibata	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hyperhomocysteinemia on a murine model of smoke-induced pulmonary emphysema	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16767-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Murano, Sumito Inoue, Kento Sato, Masamichi Sato, Akira Igarashi, Shouichi Fujimoto, Kunitoshi Iseki, Toshiki Moriyama, Yugo Shibagaki, Masato Kasahara, Ichiei Narita, Kunihiro Yamagata, Kazuhiko Tsuruya, Masahide Kondo, Koichi Asahi, Tsuyoshi Watanabe, Tsuneo Konta, Masafumi Watanabe	4. 巻 13
2. 論文標題 The effect of lifestyle on the mortality associated with respiratory diseases in the general population	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-34929-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sumito Inoue, Yoko Shibata, Osamu Miyazaki, Toshinari Hanawa, Yukihiro Minegishi, Hiroaki Murano, Kento Sato, Maki Kobayashi, Masamichi Sato, Takako Nemoto, Michiko Nishiwaki, Akira Igarashi, Kazunobu Ichikawa, Tetsu Watanabe, Masafumi Watanabe	4. 巻 63
2. 論文標題 Participant Selection from the General Japanese Population for Pulmonary Function Tests Using a Questionnaire on Symptoms and Smoking Habits During Annual Health Checkups: The Yamagata-Takahata Study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1053-1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1807-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osamu Miyazaki, Akira Igarashi, Kento Sato, Sumito Inoue, Ryuto Yokoyama, Masaki Nakane, Sahoko Kodama, Ryo Hasegawa, Shigeharu Ueki, Takashi Yaguchi, Akira Watanabe, Masafumi Watanabe	4. 巻 31
2. 論文標題 Rapidly progressive mucus plugs in allergic bronchopulmonary mycosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Asthma	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02770903.2024.2312429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Murano, Sumito Inoue, Tomomi Hashidate-Yoshida, Hideo Shindou, Takao Shimizu, Yoichiro Otaki, Yukihiro Minegishi, Takumi Kitaoka, Mitsuru Futakuchi, Akira Igarashi, Michiko Nishiwaki, Takako Nemoto, Masamichi Sato, Maki Kobayashi, Kento Sato, Toshinari Hanawa, Osamu Miyazaki, Masafumi Watanabe	4. 巻 70
2. 論文標題 Lysophospholipid Acyltransferase 9 Promotes Emphysema Formation via Platelet-activating Factor	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American journal of respiratory cell and molecular biology	6. 最初と最後の頁 482-492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2023-02530C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎収, 佐藤正道, 花輪翁有, 石橋悠, 邨野浩義, 峯岸幸博, 佐藤建人, 根本貴子, 西脇道子, 山内啓子, 五十嵐朗, 井上純人, 渡辺昌文
2. 発表標題 呼吸器悪性疾患におけるバイオマーカー 血液CCL17/TARCが肺癌薬物治療後の薬剤性肺障害発症の予測因子となりうるか?
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 町田浩祥, 太田隆仁, 石橋 悠, 邨野浩義, 古山広大, 梁 秀鼎, 中野寛之, 佐藤建人, 根本貴子, 西脇道子, 山内啓子, 佐藤正道, 五十嵐朗, 井上純人, 渡辺昌文
2. 発表標題 Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) KOマウスを用いたCOPDの病態についての検討
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	町田 浩祥  (Machida Hiroyoshi)		
研究協力者	邨野 浩義  (Murano Hiroaki)		
研究協力者	峯岸 幸博  (Minegishi Yukihiro)		



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	古山 広大  (Furuyama Kodai)		
連携研究者	井上 純人  (Inoue Sumito)  (70466621)	山形大学・医学部・講師   (11501)	
連携研究者	五十嵐 朗  (Igarashi Akira)  (40637170)	山形大学・医学部・助教   (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関