

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591121

研究課題名(和文)呼吸器系生活習慣病におけるSOCS分子の病的意義の解明と新規治療の探索

研究課題名(英文)The roles of SOCS in obstructive pulmonary diseases

研究代表者

福山 聡 (Satoru, FUKUYAMA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50380530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：気道上皮特異的SOCS3欠損マウスを用いて、疾患モデルの作成とその解析を行った。(1)卵白アルブミンで感作、吸入曝露しアレルギー性喘息反応を野生型マウスと比較したところ、SOCS3欠損マウスにおいて、喘息反応性が減弱していた。(2)タバコ煙曝露による肺気腫モデルを作成し、気道炎症や気腫性病変、気道上皮からのIL-6産生、それらのSOCSによる調節を解析する予定であったが、モデルの確立ができなかった。(3)肺胞マクロファージのエフェロサイトーシスに関しては、SOCS分子との関連は明らかでなかったが、エフェロサイトーシスはタバコ煙曝露により減弱し、ヒストン脱アセチル化酵素活性低下が関与していた。

研究成果の概要(英文)：Allergic airway inflammation and airway responsiveness to inhaled Ach were attenuated in airway epithelium specific SOCS3 knockout (SOCS3/CC10Cre) mice than in wild type mice. Apoptotic cell phagocytosis by alveolar macrophage (AM) is called efferocytosis. Pre-treatment of alveolar macrophage (AMs) with cigarette smoke extract (CSE) or trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor, suppressed efferocytosis and CSE reduced HDAC activity. TSA inhibited the activity of Rac, a key mediator of efferocytosis. These TSA-induced impairments were restored by treatment of AMs with aminophylline, a potent activator of HDAC. TSA profoundly down-regulated the expression of CD9 on AMs. The expression of CD9 was partially down-regulated by the Rac inhibitor. Pretreatment with an anti-CD9 mAb or CD9 siRNA inhibited efferocytosis, which was attributable to the reduced binding of AMs to apoptotic cells. These results suggest that smoking impairs efferocytosis via inhibition of HDAC/Rac/CD9 pathways.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学・閉塞性肺疾患

キーワード：SOCS 喘息 COPD エフェロサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD) および気管支喘息は気流閉塞により呼吸困難を呈する疾患である。2001 年の我が国における大規模調査では、40 歳以上での COPD の有病率が 8.5% におよぶことが明らかにされ大きな話題をよんだ。喘息の有病率も 3-5% とされており、両疾患を合わせると全人口の 1 割に達する。その発症や進行には喫煙や生活環境中のアレルゲンが関わっており、「呼吸器系の生活習慣病」と位置づけられている。高血圧や糖尿病、高脂血症など従来の生活習慣病との最大の違いは、それら疾患が直接的な自覚症状として顕在化しにくいものに対して、COPD や喘息は重症化が呼吸困難として患者本人の QOL を大きく損なう点にある。また重症例では細菌性肺炎や慢性呼吸不全が頻回に生じ、医療経済的に多大なコストを要する。治療の選択肢という点でも、COPD や喘息は従来の生活習慣病と比べ遅れをとっている。COPD では禁煙が必須であるが、禁煙後も呼吸機能の経年的低下の速度は健常者レベルまで減速ができない。気管支拡張薬は症状の軽減をもたらすが長期予後の改善効果は限定的である。喘息ではアレルゲン回避や吸入ステロイド療法をもってしても、気道ウイルス感染などの負荷によって容易に急性増悪が生じる。また、ステロイドなど各薬剤を用いてもコントロール困難な難治性喘息も存在し、長期にわたる罹患による気道リモデリングと呼ばれる気道壁の再構築もステロイド治療にも抵抗する不可逆性変化と考えられている。そのため、疾患の病態成立にかかわる標的分子群の同定とこれまでとは作用機序の異なる新規薬剤による人為的制御が求められている。

COPD も喘息も病変の主座がそれぞれ肺胞、気道という違いがあるが、本質的には慢性の炎症に基づく生活習慣病である。炎症にはサイトカインとその作用の調節機序の障害が深く関わる。本研究は、サイトカインの抑制性シグナル伝達因子を標的とした細胞特異的遺伝子改変マウスの病態モデルを確立し、新規の治療法を探索する。

サイトカインシグナルは、Jak-STAT 系や Ras-ERK 系を介して伝達されていく。我々は、この Jak-STAT 系に抑制的に働く Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 分子について、実験的喘息モデルを先行モデルとして解析し

てきた。in vitro で分化させた Th1/Th2 細胞では各 SOCS の発現に選択性があり、Th2 細胞では SOCS3 が高発現していた。喘息患者の末梢血 T 細胞では SOCS3 発現が亢進し、SOCS3 発現は血中 IgE 値と相関していることを見出した。さらに、T 細胞特異的に SOCS3 を高発現するマウスの喘息モデルでは、Th2 分化が亢進し著明な喘息反応を呈することを示した (Nature Medicine 2003)。また、CD4T 細胞に特異的な SOCS3 欠損マウスではアレルギー性喘息反応が減弱し、T 細胞に対する SOCS3 siRNA を導入することでも同様に喘息反応が減弱することを報告した (AJRCCM 2010)。すなわち、サイトカインシグナル伝達に抑制的に働く SOCS ファミリー分子が喘息発症に重要な役割を担っていると考えられる。さらに、SOCS1/IFN-gamma KO マウスの解析では喘息反応が亢進しており、アデノウイルスを用いて強制発現させると喘息反応が減弱し、喘息患者の気道平滑筋細胞は IL-13 刺激後の SOCS1 発現が健常者に比べて減弱していることも見出した (AJRCCM 2009)。これは SOCS1 が JAK/STAT6 経路の抑制性因子になっているためと考えられた。

T 細胞機能の是正を治療に用いようとする研究や肺疾患モデルに対する骨髓幹細胞移植は国内外のいくつかの研究グループが精力的に行っている。しかし、Th1 細胞移入療法や IL-12 投与は、喘息には無効であったことは既に報告されている。これにも、Th1 サイトカインシグナルに対する抑制機構が働いている可能性があり、本研究のようにシグナル抑制因子を直接利用することで解消できると考えられる。臨床応用を念頭に置いたナノ粒子やミセルを用いる点は早期に必要な研究といえる。

一方、COPD の病態では IL-6、IFN-gamma が関与している。IL-6 シグナルは SOCS3 で、また IFN-gamma は SOCS1 で抑制的に制御を受ける。そこで本研究ではこれまでの研究成果を COPD の病態解明にも応用発展させ、細胞

内 SOCS 分子の作用・発現を調節することにより COPD の進行にかかわる細胞内での機能障害の解明とその是正を試みる。すなわち、T 細胞や気道上皮細胞での SOCS3 の役割について各細胞特異的 SOCS3 ノックアウトマウスを用いて検討する。さらに、SOCS 発現プラスミドをナノ粒子に封入、あるいはミセル化することにより気道への導入効率を高め、治療への臨床応用を目指す。

アポトーシス細胞の速やかな除去(**エフェロサイトーシス**)は生体の恒常性維持に必須であり、これが障害されると死細胞から多様な起炎症分子が放出され、2 次的な炎症が生じる。近年、肺胞マクロファージによる**エフェロサイトーシス**能(アポトーシス細胞の貪食能)が COPD 患者では低下していることが報告されている。しかしながら、エフェロサイトーシスとサイトカインに関する報告は少ない。エフェロサイトーシスと SOCS との関連が明らかになれば新たな治療法につながる発見といえる。

COPD では **IL-6**、TNF- α などの炎症性サイトカインや **IFN- γ** などの Th1、CD8T 細胞系のサイトカイン、喘息では IL-4、IL-5、IL-13 などの **Th2** 型サイトカインが関与している。我々は、サイトカインシグナル伝達に抑制性に働く **SOCS** ファミリー分子が Th2 や制御性 T 細胞 (Treg) や CD8T 細胞の分化に影響している可能性を示してきた。本研究では、T 細胞内の SOCS 分子の作用・発現を人為的に調節することにより Th1/Th2 バランスや Treg、CD8T 細胞分化の是正を行う。また COPD や喘息の発症に関与している **気道上皮** における SOCS の役割も明らかにする。また、肺胞マクロファージのエフェロサイトーシスにおける SOCS の役割についても明らかにする。さらに、SOCS 分子を発現したプラスミドを **ナノ粒子** に封入あるいは **ミセル化** して直接気道へ投与することにより免疫反応・炎症反応への新規治療法の確立をめざす。

本研究は、偏倚したシグナル伝達を是正することにより細胞機能やサイトカイン発現制御をめざし、呼吸器系の生活習慣病に応用するという非常に独創的なものである。さらに、通常の遺伝子導入法のみでなくナノ粒子やミセルを用いることにより直接薬剤として応用可能なトラ

ンスレーショナルリサーチへ発展できることも特色である。

ノックアウトマウスの検討では、サイトカイン抑制因子を欠損させるため炎症が増強することが予想される。従って、ナノ粒子やミセルを利用して SOCS 分子を気道へ導入することにより炎症が抑制されることが予想され、閉塞性肺疾患への新たな治療法の確立へつながるものと期待される。

2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患や気管支喘息は呼吸器系の生活習慣病として位置づけられる。慢性閉塞性肺疾患は有病率・死亡率ともに増加傾向であり、気管支拡張薬以外の治療法の確立が望まれる。また、喘息もステロイド抵抗性の難治性喘息患者は存在しており、新規治療法の確立が急務である。サイトカインの **抑制性シグナル伝達因子** である **Suppressor of cytokine signaling (SOCS)** を標的とした **遺伝子改変マウス** を用いて閉塞性肺疾患病態モデルを確立し、これまでとは作用機序の異なる新規治療法を探索する。

3. 研究の方法

気道上皮特異的 SOCS3 欠損マウス、T 細胞特異的 SOCS1 欠損マウス、骨髄細胞特異的 SOCS1、SOCS3 欠損マウスを使用して、タバコ煙曝露による COPD モデル、卵白アルブミン感作曝露による喘息モデル、LPS 投与による急性肺損傷モデルにおける SOCS の役割を明らかにする。また、マクロファージのエフェロサイトーシス能の検討では、*in vivo*、*in vitro* 両面から SOCS の役割を検討する。各モデルでの SOCS の役割が明らかになれば、SOCS 発現プラスミドをナノ粒子に封入、あるいはミセル化することにより気道への導入効率を高め、新規治療への応用を目指す。

平成 23 年度

(1) 気道上皮特異的 SOCS 3 欠損マウスによる疾患モデル作成とその解析

COPD や喘息ではタバコ煙やアレルゲン、あるいは病原体由来分子 (LPS やウイルス由来 RNA など) によって気道上皮が最も傷害を受けるため、その病態解析は重要である。我々は最近、気道上皮特異的な SOCS3 欠損マウス (SOCS3/CC10Cre マウス) の作成に成功した。本マウスを用いて以下の検討をおこなう。

タバコ煙曝露 COPD モデルを作成し、気腫性病変の程度や気道上皮からの IL-6 の産生とその SOCS3 による調節的意義について形態測定法や ELISA、RT-PCR、免疫組織染色、などを用いて検討する。

抗原となる卵白アルブミン (OVA) で

感作後、OVA を吸入曝露し喘息反応（吸入アセチルコリンに対する気道過敏性、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞とサイトカイン・ケモカイン濃度、PAS/AB 組織染色による杯細胞化生）を比較解析する。

LPS 気管内投与モデルを作成し、好中球性炎症の程度や気道上皮からの IL-6 の産生とその SOCS3 による調節的意義について ELISA や RT-PCR、免疫組織染色などを用いて検討する。

(2) T 細胞特異的 SOCS 1 欠損マウスによる疾患モデル作成とその解析

COPD や喘息では好中球、マクロファージ、好酸球、肥満細胞といった骨髄由来細胞だけでなく、T 細胞の病的活性化によるサイトカインの過剰産生が病態の進展をもたらしている。この病的活性化には何らかの制御分子の機能不全が想定され、SOCS1 はその有力な候補である。そこで我々は T 細胞特異的な SOCS1-KO マウス(SOCS1/Lck-Cre マウス)を作成した。本マウスでは T 細胞において SOCS 1 が欠損しており、COPD や喘息の T 細胞における SOCS1 の病態生理学的意義を検討するのに最適といえる。

タバコ煙曝露 COPD モデルを作成し、気腫性病変の程度や T 細胞由来の IFN-gamma や IL-6 などのサイトカイン産生状況について形態計測法、ELISA、フローサイトメトリーなどで検討する。

OVA 喘息モデルでの気道過敏性、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞とサイトカイン・ケモカイン濃度、PAS/AB 組織染色による杯細胞化生を比較解析する。

SOCS1 欠損によって最も産生が過剰になるサイトカインとして IFN-gamma が想定される、そこでタバコ煙やアレルゲン曝露の途中で抗 IFN-gamma 中和抗体を投与し、病変に対するその影響を解析する 3. 骨髄細胞特異的 SOCS 1、SOCS3 欠損マウスによる COPD モデル作成とその解析

特に COPD ではマクロファージによる異物の排除やアポトーシス細胞の排除が重要である。この現象はエフェロサイトーシスと呼ばれ、COPD ではエフェロサイトーシス能が低下していることが報告されている。最近、我々は肺泡マクロファージのエフェロサイトーシス能がタバコ煙曝露によって減弱し、その過程にはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)活性の低下が関わることを明らかにした(論文投稿中)、HDAC はサイトカインの産生やサイトカインシグナル伝達におけるエピジェネティックな制御を担う重要な酵素群と考

えられている。しかし、サイトカインとエフェロサイトーシスの機能の関連は報告がなく、SOCS との関連も不明である。SOCS 欠損によりマクロファージ機能が障害されていれば新たな治療法となる可能性がある。そこで、骨髄細胞特異的な SOCS1、SOCS3-KO マウス(SOCS1/Lys-Cre, SOCS3/Lys-Cre マウス)を作成した。本マウスでは骨髄細胞において SOCS が欠損しており、肺泡マクロファージにおける SOCS の病態生理学的意義を検討するのに最適といえる。

(3)上記 COPD マウスモデルに、アポトーシスに陥った好中球を気管内投与し、気管支肺胞洗浄によりマクロファージを回収する。回収したマクロファージの中から、好中球を貪食している細胞数を計測することによりエフェロサイトーシス能を検討する。SOCS1、SOCS3 ノックアウトマウスと野生型マウスを比較することにより、エフェロサイトーシスに対する SOCS の役割を *in vivo* にて検討する。

(4) *in vitro* においても、タバコ煙曝露後のエフェロサイトーシス能を野生型と SOCS1、SOCS3 欠損マクロファージと比較検討する。

平成 24 年度以降

(1) 気道上皮特異的 SOCS 3 欠損マウスによる疾患モデル作成とその解析

前年度の結果をもとに、ナノ粒子に封入した、あるいはミセル化した SOCS3 発現プラスミドを経気道投与し、その導入効率や病変形成に対する治療効果を検討する。導入効率に関しては免疫組織染色や、気道から mRNA を抽出して real time PCR を用いて解析する。

(2) T 細胞特異的 SOCS 1 欠損マウスによる疾患モデル作成とその解析

前年度の検討結果を踏まえて、ナノ粒子に封入した、あるいはミセル化した SOCS 1 発現プラスミドを経気道投与し、その導入効率や喘息反応・気腫化に対する効果を検討する。

(3) 骨髄細胞特異的 SOCS 1、SOCS3 欠損マウスによる COPD モデル作成とその解析

前年度の結果をもとに、SOCS 欠損マクロファージにトランスフェクション法により SOCS 分子をノックインすることによりエフェロサイトーシス能への影響を検討する。また、マクロファージに SOCS 発現プラスミドを強制発現させ、タバコ煙曝露後のマクロファージのエフェロサイトーシス能を検討することにより、SOCS の役割を検討する。

4. 研究成果

気道上皮特異的 SOCS3 欠損マウス

(SOCS3/CC10CRe マウス)の作成に成功したため、疾患モデルの作成とその解析を行った。(1) 卵白アルブミン(OVA)で感作、吸入曝露しアレルギー性喘息反応を野生型マウスと比較検討したところ、SOCS3欠損マウスにおいて、気道炎症および気道反応性ともに減弱することを確認した。(2) タバコ煙曝露によるCOPDモデルを作成し、気道の好中球性炎症や気腫性病変の程度、気道上皮からのIL-6産生、それらのSOCS3による調節機構を解析する予定であったが、本モデルの作成自体が確立できなかった。(3) 肺泡マクロファージのエフェロサイトーシス能に関しては、SOCS分子との関連は明らかに出来なかったが、エフェロサイトーシス能はタバコ煙曝露によって減弱し、その過程にはヒス論脱アセチル化酵素(HDAC)活性の低下が関与していることを報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Cigarette smoke impairs phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages via inhibition of the histone deacetylase/Rac/CD9 pathways.

Noda N, Matsumoto K, Fukuyama S, Asai Y, Kitajima H, Seki N, Matsunaga Y, Kan-O K, Moriwaki A, Morimoto K, Inoue H, Nakanishi Y.

Int Immunol. 2013;25(11):643-50. 査読あり

A zinc chelator TPEN attenuates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice in vivo.

Fukuyama S, Matsunaga Y, Zhanghui W, Noda N, Asai Y, Moriwaki A, Matsumoto T, Nakano T, Matsumoto K, Nakanishi Y, Inoue H.

Allergol Int. 2011 Sep;60(3):259-66. 査読あり

[学会発表](計 5件)

慢性抗原曝露と気道リモデリング

福山 聡

第24回日本アレルギー学会春季臨床大会
2012.5.12 大阪

亜鉛キレート剤 TPEN のマウス喘息モデルにおける気道過敏性と好酸球性気道炎症への抑制効果

福山 聡、松永悠子、浅井友香里、神尾敬

子、北島裕子、濱野紗朱、松元幸一郎、井上博雅、中西洋一
第51回日本呼吸器学会学術講演会
2011.4.22 東京

[図書](計 0件)

[その他]

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院胸部疾患研究施設 (<http://www.kokyu.med.kyushu-u.ac.jp>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山 聡 (SATORU FUKUYAMA)

九州大学病院 助教

研究者番号: 50380530

(2) 研究分担者

松元 幸一郎 (KOICHIRO MATSUMOTO)

九州大学病院 講師

研究者番号: 60325462

(3) 連携研究者

平井 裕子 (HIRAI HIROKO)

九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学
大学院生

田尻 友香里 (YUKARI TAJIRI)

九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学
大学院生

野田 直孝 (NAOTAKA NODA)

九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学
大学院生

松永 悠子 (YUKO MATSUNAGA)

九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学
大学院生