

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591481

研究課題名(和文)呼吸器感染症が慢性炎症を増悪させる分子病態の解明：異型肺炎とCOPD

研究課題名(英文)Chronic inflammation and molecular mechanism: atypical pneumonia and COPD

## 研究代表者

和田 裕雄 (WADA, HIROO)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50407053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肺炎マイコプラズマ肺炎が慢性閉塞性肺疾患chronic obstructive pulmonary disease (COPD)を増悪させる原因となるという臨床的観察から、両者に共通のメカニズムがあると仮説をたて、両者のマウスモデルを解析することにより検討した。

肺炎マイコプラズマ肺炎マウスモデルでは、好中球性炎症が誘導され、IL-23の発現が増加した。また、喫煙曝露マウスモデルの解析からは、IL-10欠損マウスで好中球性炎症の亢進が認められた。文献的考察も行った結果、両者の共通のメカニズムとしてIL-17の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Because it is observed that Mycoplasma pneumonia (Mp) pneumonia exacerbates COPD, both Mp pneumonia and COPD may share common molecular pathogenesis. In order to the common pathogenesis, mice were exposed to either Mp components or to cigarette smoke, and then analyzed.

Immunohistochemical analyses on mice exposed to Mp pneumonia revealed that pulmonary migration of neutrophil increased which increasingly expressed IL-23 protein. Mice deficient with IL-10 gene showed that pulmonary chemotaxis and MMP-9 expression in the lung were enhanced, compared to the wild type controls. Both data suggested that IL-17 was involved in the pathogenesis. Since IL-17 has at least 6 subtypes, and its detection is rather difficult, further analyses, probably using IL-17 deficient mice, are essential.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：IL-10 IL-17 マウスモデル マイコプラズマ 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 緒言

感染性の肺炎や気管支炎により慢性閉塞性肺疾患 chronic obstructive pulmonary disease (COPD)の増悪が惹起され、著明な肺生理機能の低下や死亡の原因となることが知られている[1]。しかし、この分子病態は未解明である。その理由として、COPDや肺炎などのいわゆる「良性疾患」の肺のサンプルの入手は困難であること、さらに、COPD急性増悪時の患者は呼吸状態が不良で研究目的のサンプリングはほぼ不可能であることが挙げられる。このため、分子病態を解明するためには、COPDの肺で生じている慢性炎症の分子病態の解明 感染の病原微生物が肺に与える分子病態の解明 が可能な2種類のモデル動物を確立する必要があると考えられる。そこで、申請者は のマウスとして「タバコ煙曝露モデルマウス」を[2]、 を解析する目的で「マイコプラズマ肺炎モデルマウス」を確立し解析してきた[3-5]。

### (2) タバコ煙曝露モデルマウス

従来の COPD マウスモデルはプロテアーゼ等により気腫病変を作成するモデル、あるいは、タバコ曝露条件も気腔の拡大という病理所見を作成することに主眼が置かれていた。理由として、COPDは数十年にわたるタバコ煙曝露により形態的变化を来す疾患で、せいぜい寿命が2年のマウスでは十分な検討が出来ないため、と考えられた。

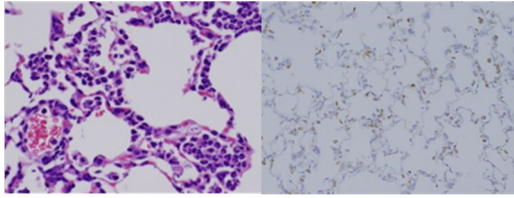
我々は、COPDで重要な分子病態の変化は、かなり初期の段階から惹起しているであろうと予想し、タバコ曝露の初期変化に注目した。まず、短期のタバコ曝露での分子病態を

検討した。その結果、1週間から2週間のタバコ煙曝露により好中球が肺へ集簇した。肺組織の検討の結果、Histone deacetylase (HDAC)-2の発現の低下、SIRT-1の発現・活性低下を認め、これらとMMP-9の発現が有意な負の相関を認めた。また、ヒトIL-8/CXCL-8に相当すると考えられているKCやMIP-2が増加していた。これらは、COPD患者のサンプルの解析と合致していた[2]。以上より、我々が作成したタバコ煙への短期曝露マウスの分子状態はCOPD患者と分子病態がほぼ同じ状態であることが明らかとなった。

### (3) マイコプラズマ肺炎モデル

次に、我々はマイコプラズマ肺炎モデルを作成・解析した。*M. pneumoniae*の生菌を使用すると、感染量の違いにより炎症反応に差が出る事が予想されたこと、さらに、*M. pneumoniae*が炎症惹起する細胞成分を有していることが明らかになってきたことから、*M. pneumoniae*菌体成分抽出液を作成し、マウスに気管投与を行うこととした。マイコプラズマの菌体成分を1回投与後1週間(モデルC)、1~2週間ごと3回投与(モデルK)[3]、菌体成分とアジュバントとを3回共投与したマウス(モデルS)を作成した[4]。これらのマウスを比較したところ、モデルKでは、IL-17/IL-23が賦活化しており[3]、さらに、モデルSでは、気管支周囲にリンパ球と形質細胞の集簇を認め、劇症型のマイコプラズマ肺炎と似ていることが判明した(右図参照)。興味深いことに、このマウスの炎症は、マクロライド系抗菌薬とステロイドとの共投与にて抑制されたが、いずれか一方のみの投与

では抑制効果ははっきりしなかった。



リンパ球の集簇(モデルS)

IL-23の発現(モデルK)

これは、重症マイコプラズマ肺炎の臨床像と一致していた。[4]

以上の通り、我々はタバコ煙曝露マウスモデル及びマイコプラズマ肺炎モデルを作成した。

さて、慢性炎症の際に炎症細胞は、無刺激状態でも炎症性メディエーターを産生している。炎症性メディエーターで刺激されると、反応が大きくなる、と考えられる。これは、同じ遺伝子を有しながら慢性的に炎症性メディエーターが発現するように細胞の表現系が変化したと考えられる。我々は、このような遺伝子の慢性発現には Histone H3Lys4 の tri-methylation の亢進が原因であることを示してきた[6,7]。

#### 参考文献

1. Tutherford ER & Martin RJ. *Chest* 132; 1962-1966 (2007).
2. Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, et al. *FASEB J* 2009; 23:2810-2819
3. Kurai D, Wada H et al. *Eur Respir J* 30, 722s (2007), abstract presented in ERS 2007.
4. Hirao S, Wada H et al. *Eur Respir J* 34, 360s (2009), abstract presented in ERS 2009.
5. Wada H et al., *Eur Respir J* 34, 370s (2009), abstract presented in ERS 2009

93-99 (2005).

6. Wada H et al. *Biochem Biophys Res Comm* 331: 93-99 (2005).
7. 和田裕雄ら, 日呼誌 46; 176-179 (2008).

## 2. 研究の目的

呼吸器感染症は、COPD や気管支喘息などの慢性炎症性疾患が急性増悪する原因となるが、この分子病態は未解明である。本研究では、我々がこれまでに確立した、タバコ煙曝露マウスモデル マイコプラズマ肺炎マウスモデル を用いて、炎症性遺伝子の発現制御を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 方法の概要

我々がこれまでに確立してきたマイコプラズマ肺炎モデルマウスの肺組織の分子病態を解析する。また、両モデルマウスの分子病態を、炎症を変化させる化合物(マクロライド系抗菌薬)や分子あるいは該当分子の遺伝子改変マウスを用いて検討する。

タバコ煙曝露モデルマウスに *M. pneumoniae* の菌体成分を投与し、から予想される分子病態が実現するかを検討した。

### [1] 喫煙曝露マウスモデル

#### (1) 喫煙曝露マウスモデルの作出

C57BL/6J マウス(6wk, ♀)に合計12日間喫煙曝露する。曝露には、マウス喫煙曝露装置(MIPS社、大阪)を用いた。曝露終了後に採材した。

#### (2) 喫煙曝露マウスモデルの採材と測定

申請者がこれまでの先行研究で確立した方法[1-3]により行う。即ち、採材は、気管支

肺胞洗浄 (BAL) と肺組織を採取、気管支肺胞洗浄は総細胞数と細胞分画を検討し、BAL 液中の IL-17、GM-CSF、IL-6、TNF- $\alpha$  を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (R&D, Minneapolis, MN) により測定した[2-3]。MMP-9 と KC の発現を定量的 RT-PCR 法で測定した[1]。

### (3) 遺伝子改変マウスの解析：IL-10 の役割

これまでの報告から、タバコ煙曝露である時点から炎症が抑制されることが示された。申請者の予備的実験では、タバコ煙曝露マウスでは IL-10 が増加していた。IL-10 が抗炎症作用を有するため、その増加によりタバコ煙曝露による炎症を抑制したと考えられた。この結果を明らかにするため、IL-10 遺伝子欠損マウス (既に入手済み) を用いてタバコ煙曝露モデルおよびマイコプラズマ肺炎モデルを作成し、解析をおこなった。解析項目と方法は上記の通り。本研究により IL-10 の役割と可能性が明らかになると予想された。

### [2] マイコプラズマ肺炎マウスモデル

(1) マイコプラズマ菌体成分の作成 *M. pneumoniae* (ATCC29342) を培養し、超音波破碎によりマイコプラズマ菌体成分を作成した。

(2) マイコプラズマ肺炎マウスモデル K の作出と解析

BALB/c マウス (6wk, ♀) にマイコプラズマ菌体成分とアジュバントを 2 回腹腔内投与する。その後、マイコプラズマ菌体成分を気管内に投与する。採材は、第 4 日に行う。

(3) マイコプラズマ肺炎マウスモデルの採

材と測定

申請者がこれまでの先行研究で確立した方法[1-3]により施行した。即ち、採材は、気管支肺胞洗浄 (BAL) と肺組織を採取、気管支肺胞洗浄は総細胞数と細胞分画を検討し、BAL 液中の IL-17、GM-CSF、IL-6、TNF- $\alpha$  を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (R&D) により測定した。また、MMP-9 と KC の発現を定量的 RT-PCR 法で測定した[1]。さらに組織学的解析も行った。

### 参考文献

1. Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, et al. *FASEB J* 23:2810-2819 (2009).
2. Hirao S, Wada H et al. *Eur Respir J* 34, 360s (2009), abstract presented in ERS 2009.
3. Kurai D, Wada H et al. *Eur Respir J* 30, 722s (2007), abstract presented in ERS 2007.
4. Wada H et al. *Biochem Biophys Res Comm* 331, 93-99 (2005).
4. Ito K et al. *N Engl J Med* 352, 1967-1976 (2004).

### 4. 研究成果

#### (1) 肺炎マイコプラズマ肺炎モデル

肺炎マイコプラズマ肺炎マウスモデル K では、肺炎マイコプラズマ肺炎マウスモデル S と同様に好中球の肺への遊走が誘導された。しかし、モデル K の肺炎像はモデル S ほど明瞭なものではなかった。肺炎マイコプラズマ抽出液のみでびまん性肺病変を誘導できる

ほど強力な炎症を誘導しているわけではなさそうであった。しかし、好中球と並行して IL-23 の発現が増加しており、IL-17/IL-23 axis が亢進していると考えられた。

## (2) 喫煙曝露マウスモデル

一方、喫煙曝露マウスモデルの解析を施行した。

野生型マウスにタバコ煙を連日曝露すると、8日目に好中球の肺への遊走が最大となり、さらに、MMP-9、KC、GM-CSF、TNF- $\alpha$  の発現も最大となり、12日目には、好中球の肺への遊走も低下し、並行して、前記の炎症性メディエーターも低下する。興味深いことに、IL-10 の発現は12日目に最大値に達する。

一方、喫煙曝露処理を行った IL-10 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスより多くの好中球の遊走の増加が認められた。さらに、MMP-9、KC、GM-CSF、TNF- $\alpha$  の発現亢進が認められた。

以上より、IL-10 には喫煙曝露による炎症を抑制する作用があると考えられた。

この作用をより明確に示すため、マウス腹腔マクロファージを採取し、培養を行った。また、喫煙曝露は LPS 様の作用を示すことが知られていることから、腹腔マクロファージに LPS を作用させてその反応を検討した。

野生型マクロファージに LPS を処理すると、TNF- の産生が誘導されるが、IL-10 をとよよすることにより、TNF- は抑制される。また、LPS 処理により IL-10 遺伝子欠損細胞では野生型細胞より多くの TNF- を産生した。

以上より、IL-10 は細胞レベル、個体レベルで起点曝露により炎症反応を抑制する作

用を有することを示した。

## (3) 文献的考察

以上より、マイコプラズマ菌体抽出液では IL-17 の活性化、喫煙曝露モデルでは、IL10 の関与が示された。文献的には、IL-10 が IL-17 の発現をコントロールしているという報告があることから、両者の共通した炎症性メカニズムとして、IL-17 の関与が示唆された。しかし、IL-17 は A から F の subtype があり、肺胞気管支洗浄液での測定が困難であるが、解析の必要があると考えられた。

## 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3件)

1. Kurai D, Nakagaki K, Wada H, Saraya T, Kamiya A, Fujioka Y, Nakata K, Takizawa H, Goto H. *Mycoplasma pneumoniae* extract induces an IL-17-associated inflammatory reaction in murine lung: implication for mycoplasmal pneumonia. *Inflammation* 2013; 35: 285-293.[ doi: 10.1007/s10753-012-9545-3] (査読有)
2. Wada H, Takizawa H. Future Treatment for COPD: targeting oxidative stress and its related signal. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2013; 7: 1-11.[ doi: 10.2174/1872213X11307010001] (査読有)

3. 和田裕雄、檜垣学、菅間博、伊藤一洋、Barnes, Peter J、後藤元 「サーチュインと COPD」呼吸器内科 2011; 20: 249-256. (査読無)

[学会発表](計2件)

1. 檜垣学、和田裕雄、新倉保、安武哲生、三倉真一郎、中村益夫、神谷茂、菅間博、小林富美恵、滝澤始、後藤元 「タバコが惹起する肺の炎症への IL-10 の抑制的影響」(第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日、福岡)
2. Higaki M, Wada H, Mikura S, Yasutake T, Nakamura M, Niikura M, Kobabyashi F, Kamma H, Kamiya S, Takizawa H, Goto H. Enhanced neutrophilic inflammation in IL-10-deficient mice exposed to cigarette smoke via TNF- $\alpha$  regulation. Eur Respir J 2012; 40: Suppl. 56, 303s. [abstract presented in ERS 2012 in Vienna, Austria, 3 September 2012]

[図書](計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/aboutus/outline/model/respir-med/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田裕雄 (WADA, Hiroo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 5 0 4 0 7 0 5 3

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

後藤元 (GOTO, Hajime)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 8 0 1 3 4 6 1 7