

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591135

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患病態における自然免疫の役割の解明

研究課題名(英文)Role of innate immunity in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

小荒井 晃(KOARAI, AKIRA)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80458059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫における主要構成要素であるToll様受容体(TLRs)は病原体などの外来因子の特定の構造パターンを認識し、生体防御機構における初期免疫応答のセンサーとして重要である。本研究では慢性閉塞性肺疾患(COPD)の病態形成に重要と考えられるタバコ煙刺激によりマクロファージや気道上皮においてTLR3の発現および反応性が亢進することを明らかにし、この機序がCOPDおよび喫煙者の肺における好中球性炎症および肺構造破壊、気道粘液産生増強に關与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptors (TLRs), which recognize pathogen-associated molecular patterns, have a key role in the innate immune system. In the present study, we demonstrated that cigarette smoke, which is involved in the pathogenesis of COPD, augments the expression and responses of TLR3 in human macrophages and airway epithelial cells, and this may contribute to neutrophilic airway inflammation, parenchymal destruction, and mucus hypersecretion in the lungs of smokers and patients with COPD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 自然免疫 toll様受容体 マクロファージ 気道上皮 増悪 タバコ煙

## 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、その病態解明および制御が肺疾患において最も重要な課題のひとつである。肺は外界と直接に接し、病原体や環境因子に常にさらされている臓器であるが、その恒常性を保つための生体防御機構として自然免疫は重要である。自然免疫は病原体などの外来因子の特定の構造パターンである病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識し、炎症性サイトカインやケモカイン、インターフェロン産生などのさまざまな生体防御反応を生じ、初期免疫応答のセンサーとしての役割に加え、リンパ球に対する抗原提示による獲得免疫を誘導する。TLRs を主とする PAMPs を認識する受容体はパターン認識受容体 (PRRs) といわれ、近年では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) も同様に認識することが示され、感染を伴わない肺障害時の炎症病態への関与も示唆されている [Opitz B, et al. *AJRCCM* 2010]。

COPD は慢性炎症性疾患であるが、主な自然免疫機構である TLRs の反応性低下が易感染性を生じ、持続感染や増悪への関与を示唆する報告がある [Chen H, et al. *J Immunol* 2007]。一方で、炎症細胞や気道上皮において TLRs の発現および反応性亢進を示す報告 [Karimi K, et al. *Respir Res* 2006] や high-mobility group box 1 が気道で増加し DAMPs として作用する報告もあり [Ferhani N, et al. *AJRCCM* 2010]、これらの結果は自然免疫応答の増強が COPD 病態形成を促進する可能性を示しているが、COPD 病態における自然免疫の役割は未だ明確ではない。

タバコ煙や炎症細胞由来の酸化・窒素化ストレスは COPD 機序および病態形成に重要と考えられるが、我々は以前より COPD 病態におけるその重要性を報告してきた [Ichinose M, et al. *AJRCCM* 2000]。また、我々は近年、酸化ストレスが気道上皮および好中球においてウイルス由来の RNA を認識する TLRs である TLR3 および TLR8 の反応性をそれぞれ増強することを示し [Respir Res 2009; 研究業績 9] [AJRCMB 2010; 研究業績 7]、また、線維芽細胞において TLR3 刺激により線維化反応が促進されることも報告した [AJRCMB 2009; 研究業績 10]。これらの結果から COPD では酸化ストレスにより TLRs 反応が亢進し、COPD 増悪の主因と考えられるウイルス刺激により、TLR3 または TLR8 を介した気道炎症増強および気道線維化促進反応が生じている可能性がある。

マクロファージは上皮同様、自然免疫の中心的役割を担う細胞であるが、COPD および喫煙者では肺においてその増加が認められており、タバコ煙や炎症細胞由来の酸化ストレスにより活性化され、炎症性サイトカイン

やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの産生を促進し、肺胞構造破壊などの COPD 病態において重要な役割を担うと考えられている。しかしながら COPD 病態でのマクロファージにおける TLRs をはじめとする自然免疫機構の役割については未だ詳細は不明である。今回、我々は COPD 病態における TLRs をはじめとする自然免疫の役割を主にマクロファージにおいて明確にすることで、その病態制御につながる新たな治療法の開発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 病態における TLRs をはじめとする自然免疫の役割に関しては未だ不明な点が多く、主に COPD 病態における TLR3 を介したマクロファージの活性化という機序を解明し COPD 病態形成および増悪機序を明らかにすることである。また、同様の手法を用い、気道上皮におけるタバコ煙による TLR3 の発現及び反応性亢進が気道分泌に及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象と検体の採取

肺癌疑いの手術対象者において十分な説明と文章 (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肺癌組織より十分離れている部分の肺組織を使用する。肺組織は術前の呼吸機能検査により非喫煙健常者、喫煙者、GOLD のガイドラインを満たす COPD 症例に分けて用いる。

また、単球由来マクロファージによる検討の目的のため上記同様、十分な説明と文章による同意を得た非喫煙健常者より事前に呼吸機能検査を施行の上、末梢血を通常の採血法で 20ml 採取する。

### (2) 手術肺組織を用いた検討

肺マクロファージ上における TLR3 発現  
得られた手術肺を、固定・包埋後、組織切片を作成する。抗原賦活処理を行った後、抗 TLR3 抗体および抗 CD68 抗体 (マクロファージに陽性) を用いて免疫染色し、陽性細胞数の割合を顕微鏡下に計測する。

肺マクロファージ上における TLR3 発現と喫煙歴および肺機能との関連の検討

TLR3 陽性マクロファージの割合と喫煙歴および肺機能 (1 秒量、肺拡散能など) との関連を検討する。

### (3) 単球由来マクロファージを用いた検討 単球の分離・培養および単球由来マクロファージへの分化

末梢血は採血後ただちにモノ・ポリ分離溶液に重層して遠心分離を行い、非重遠心法により単核球層を回収する。さらに細胞培養ブ

レートで 2 時間培養後、浮遊細胞を洗浄し、プレートに接着した細胞を単球とする接着による単球精製法を用いる[SeIdon PM, *et al. Mol Pharmacol* 1995]。精製後の単球は GM-CSF を加えた培養液にて 12 日間分化培養の後、単球由来のマクロファージとして以下の検討に用いる[Tudhope SJ, *et al. J Pharmacol Exp Ther* 2008]。

#### タバコ煙による TLR3 発現に与える影響の検討

COPD ではタバコ煙がその病態において重要な要因であり、その影響を調べる目的でタバコ抽出液(CSE)前処置を行い、TLR3 の発現が増強するか western blot 法にて検討する。

#### タバコ煙による TLR3 シグナルに与える影響の検討

TLR3 のリガンドである poly(I:C)刺激による単球由来マクロファージにおける好中球ケモカイン (CXCL8) および MMP-9 産生に対するタバコ煙の影響を検討する。また、抗酸化物質である N-アセチルシステイン (NAC) 前処理によるタバコ煙による増強作用に対する抑制効果を検討する。

#### (4) 気道上皮を用いた検討

##### タバコ煙の TLR3 刺激による MUC5AC ムチン産生に与える影響の検討

TLR3 のリガンドである poly(I:C)刺激による培養ヒト気道上皮細胞 (NCI-H292) における MUC5AC ムチン産生に対するタバコ煙の影響を検討する。poly(I:C)刺激により MUC5AC ムチン産生が増加し、CSE 前処置でより MUC5AC ムチン産生が増強するか ELISA および mRNA、細胞免疫染色にて確認する。また、抗酸化物質である NAC 前処理によるタバコ煙による増強作用の抑制実験を検討する。

#### タバコ煙による TLR3 発現に与える影響の検討

COPD ではタバコ煙がその病態において重要な要因であり、その影響を調べる目的で CSE 前処置を行い、TLR3 の発現が増強するか Real-time PCR 法および western blot 法にて検討する。

#### タバコ煙による TLR3 リガンド刺激による MUC5AC ムチン産生に与える影響のメカニズム検討

上述の予備実験より CSE 前処置で TLR3 を介する MUC5AC ムチンの産生が増強することが証明されたが、そのメカニズムを検討するため、培養ヒト気道上皮細胞 (NCI-H292) を用いて以下の検討を行う。MUC5AC ムチン産生のシグナル経路として報告されている上皮成長因子受容体 (EGFR)-ERK 経路に関して EGFR や ERK のリン酸化が CSE 前処置により TLR3 受容体刺激後に増強するか western blot 法を用いて検討し、その阻害薬 (AG1478,

BIBX1382, U0126) や中和抗体を用いて MUC5AC ムチン産生増強が抑制されるかを検討する。また、CSE が EGFR のリガンドである TGF- $\alpha$  や amphiregulin の産生を増強するかを ELISA にて測定し検討する。

#### 三次元培養健常者ヒト気道上皮細胞を用いた検討

培養ヒト気道上皮細胞 (NCI-H292) での検討で得られた結果を確認するため、健常者ヒト気道上皮細胞を Lonza 社の B-ALI Bronchial Air Liquid Interface Medium Bullet Kit を用いて三次元培養し、CSE 前処置の TLR3 刺激による MUC5AC ムチン産生に与える影響を mRNA および ELISA で確認する。

#### 4. 研究成果

(図 1 - 10 は Koarai A, *et al. Respiriology* 17:2012, 1018-1025. および Kanai K, Koarai A, *et al. Respir Investig.* 2015, In press. より一部引用した)

#### (1) 手術肺組織を用いた肺泡マクロファージにおける TLR3 発現の比較検討

手術肺組織を用いて TLR3 に対する免疫組織学的検討を行った。肺腔内の形態学的にマクロファージと認識される細胞のうち TLR3 陽性細胞の割合を調べ、TLR3 陽性細胞が単球マクロファージ系細胞マーカーである CD68 陽性であることも 2 重染色で確認を行った。健常者に比し、健常喫煙者および COPD 患者では TLR3 発現が肺泡マクロファージにおいて有意に増強し (図 1)、その程度は喫煙歴と正の相関が、肺拡散能と負の相関が認められた (図 2)。

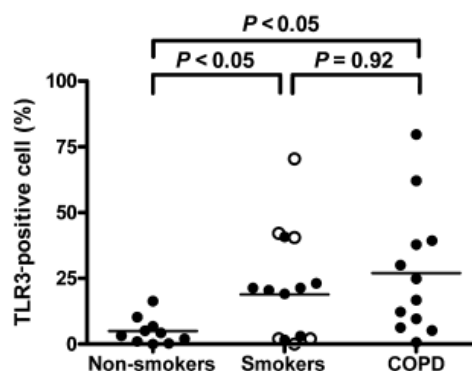


図 1 手術肺組織を用いた肺泡マクロファージにおける TLR3 発現の比較検討

#### (2) タバコ煙のマクロファージにおける TLR3 発現に与える影響の検討

単球由来マクロファージ (MDM) を用いてタバコ煙抽出液 (CSE) 刺激による TLR3 発現を western blot 法にて検討した。CSE 刺激により TLR3 発現は有意に 5% までは濃度依存性に増強されたが、さらなる高濃度 (10%) ではその増強効果は減弱した (図 3)。

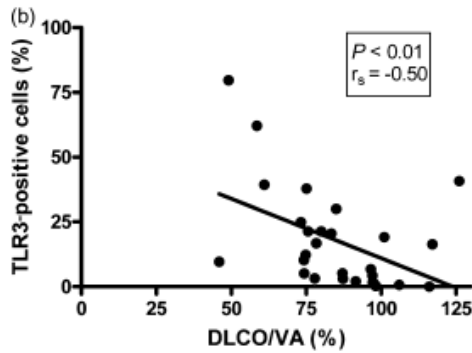


図2 TLR3 陽性肺胞マクロファージ数と肺拡散能との相関関係

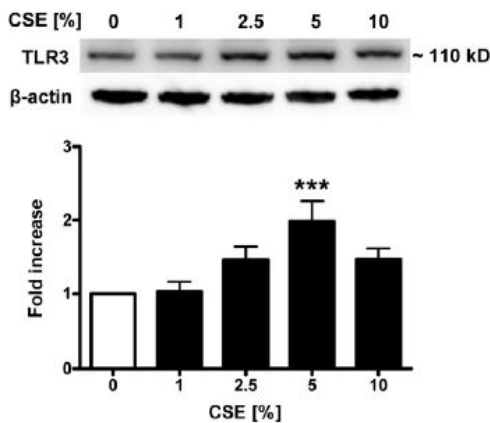


図3 タバコ煙の単球由来マクロファージにおける TLR3 発現に与える影響の検討

(3) マクロファージにおけるタバコ煙前処置による TLR3 刺激誘導性好中球ケモカインおよび MMP 産生に与える影響の検討

MDM を用いて 5% CSE 前処置後 TLR3 のリガンドである poly(I:C) 刺激による CXCL-8 および MMP-9 産生を調べた。5% CSE 前処置により CXCL-8 および MMP-9 産生は有意に増強された (図 4)。

(4) マクロファージにおけるタバコ煙前処置による poly(I:C) 刺激後の CXCL8 放出増強作用に対する NAC の抑制効果の検討

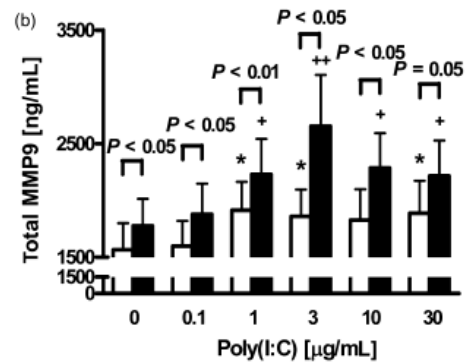
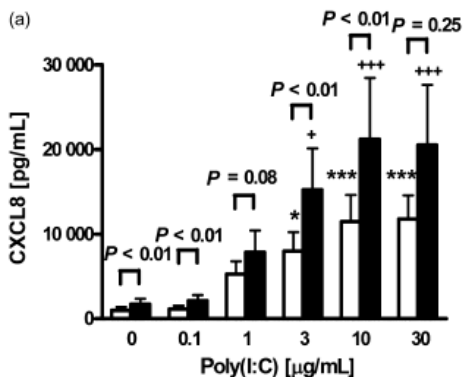


図4 単球由来マクロファージにおけるタバコ煙前処置による TLR3 刺激誘導性 CXCL8 (a) および Total MMP9 (b) 産生に与える影響の検討

MDM を用いて 5% CSE 前処置後の poly(I:C) 刺激による CXCL-8 および MMP-9 産生増強作用に対する抗酸化物質である N-アセチルシステイン (NAC) による効果を検討した。NAC はタバコ煙による poly(I:C) 刺激後の CXCL8 および MMP-9 産生増強を有意に抑制した (図 5)。

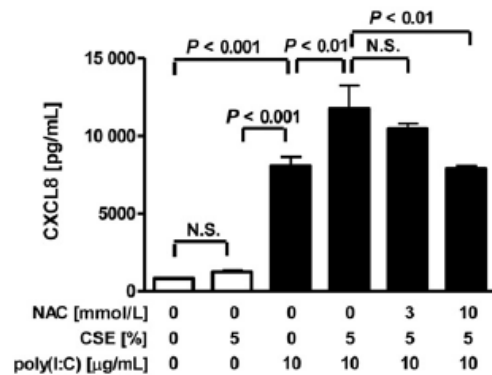


図5 単球由来マクロファージにおけるタバコ煙前処置による poly(I:C) 刺激後の CXCL8 産生増強作用に対する NAC の抑制効果

(5) ヒト気道上皮培養細胞 (NCI-H292) を用いたタバコ煙前処置による TLR3 刺激後の MUC5AC 産生に与える影響の検討

ELISA 法、Real-time PCR および細胞免疫染色法を用いた検討において 5% CSE 前処置は濃度依存性および時間依存性に poly(I:C) 刺激後の気道上皮における MUC5AC 産生を有意に増強した (図 6)。

(6) タバコ煙前処置による TLR3 刺激後の MUC5AC 産生増強機序の解明; EGFR-ERK 経路の関与の検討

MUC5AC ムチン産生のシグナル経路として報告されている上皮成長因子受容体 (EGFR)-ERK 経路の関与に関して検討を行った。CSE 前処置が EGFR のリガンドである TGF-

や amphiregulin の産生を増強するか ELISA にて検討した。5% CSE 前処置は TGF- $\beta$  や amphiregulin の産生を有意に増強した。また、抗 EGFR 抗体前処理によりタバコ煙前処置による TLR3 刺激後の MUC5AC 産生増強効果は有意に抑制された (図 7)。

次に EGFR や ERK のリン酸化が CSE 前処置により TLR3 受容体刺激後に増強するか western blot 法を用いて検討したところ、EGFR のリン酸化は poly(I:C) および CSE 刺激により増強されたが、両刺激による相乗効果は認められなかった。しかし、その下流のシグナルである ERK のリン酸化は poly(I:C) および CSE 刺激単独刺激で時間依存性に増強され、両刺激による相乗効果も認められた (図 8)。また、増強された MUC5AC 産生および ERK のリン酸化は EGFR 阻害薬 (AG1478, BIBX1382) および ERK 阻害薬 (U0126) により有意に抑制された。以上の結果よりタバコ煙は EGFR-ERK 経路の中でも主として ERK を介し TLR3 刺激後のムチン産生を増強することが示唆された。

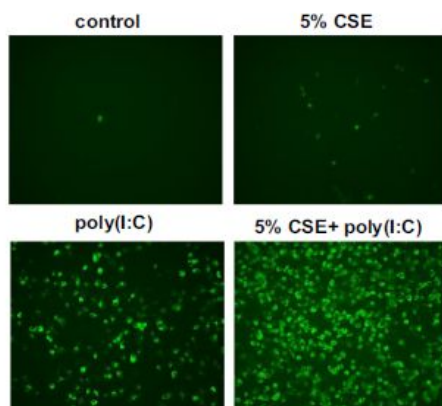


図 6 ヒト気道上皮培養細胞 (NCI-H292) を用いたタバコ煙前処置による TLR3 刺激後の MUC5AC 産生に与える影響の検討

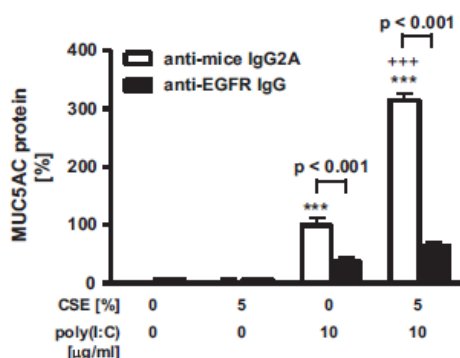


図 7 気道上皮培養細胞におけるタバコ煙前処置による TLR3 刺激後の MUC5AC 産生増強作用に対する抗 EGFR 抗体の抑制効果

(7) タバコ煙前処置による TLR3 刺激後の ERK リン酸化増強および MUC5AC 産生増強作用に対する NAC の抑制効果  
また、タバコ煙前処置による TLR3 刺激後の

ERK リン酸化増強および MUC5AC 産生増強作用の機序として酸化ストレスの関与を考え、NAC を用いた検討を行った。抗酸化物質である NAC 前処理によりタバコ煙前処置による TLR3 刺激後の ERK リン酸化増強および MUC5AC 産生増強作用は有意に抑制された (図 8)。以上の結果より、本検討におけるタバコ煙による増強機序に酸化ストレスの関与が示唆された。

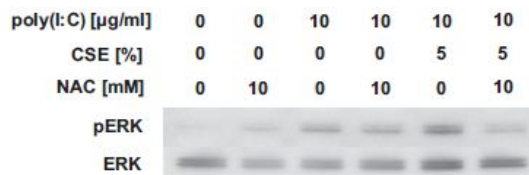


図 8 気道上皮培養細胞におけるタバコ煙前処置による TLR3 刺激後の ERK リン酸化増強作用に対する NAC の抑制効果

(8) 三次元培養における検討

上記結果を確認するため三次元培養ヒト気道上皮細胞を用いて検討を行った。三次元培養ヒト気道上皮細胞においても CSE 前処置により TLR3 刺激後の MUC5AC mRNA および蛋白産生の有意な増強が確認された (図 9)。

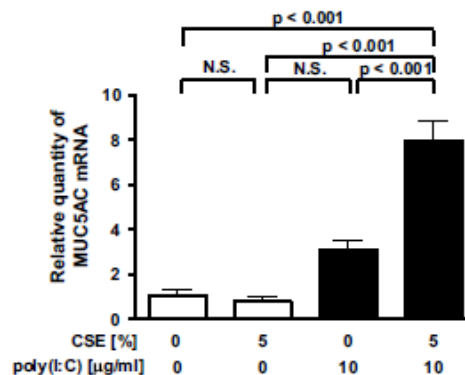


図 9 三次元培養ヒト気道上皮細胞におけるタバコ煙前処置による TLR3 刺激後の MUC5AC mRNA 発現増強作用の検討

(9) 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、健常者に比し、健常喫煙者および COPD 患者では TLR3 発現が肺胞マクロファージにおいて増強し、肺拡散能と負の相関が認められることを初めて示した。また、単球由来マクロファージ細胞を用いた検討において、喫煙刺激により TLR3 発現が増強し、TLR3 刺激後の CXCL8 および MMP-9 産生も増強されることを初めて示した。この結果は、喫煙によるヒトマクロファージにおける TLR3 発現および受容体反応増強作用が喫煙者および COPD 患者における好中球性炎症および肺胞破壊に關与する可能性を示唆しており、この結果はすでに Respiriology に掲載されている。

気道上皮に関する検討に関しても、喫煙がヒト気道上皮細胞においてTLR3刺激後のムチン産生を増強し、その機序としてEGFR-ERK経路の増強を介することを初めて示した。この結果は今後 Respir Investig に掲載される予定である。

#### (10) 今後の展望

今回、本研究ではタバコ煙刺激によりマクロファージや気道上皮においてTLR3の発現および反応性が亢進することを明らかにし、この機序が COPD および喫煙者の肺における好中球性炎症および肺構造破壊、気道粘液産生増強に関与する可能性を示した。近年では炎症の場において ATP を始めとする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)]により炎症が増強されることが明らかになってきている。このことから、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味しながら、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る。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

(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6件)

Koarai A, et al. (著者 12 名 2 番目) Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells. Respir Investig. 査読有 2015. In press.

Koarai A, et al. (著者 16 名 3 番目) TLR3 activation augments matrix metalloproteinase production through reactive nitrogen species generation in human lung fibroblasts. J Immunol. 査読有 192: 2014, 4977-88. DOI 10.4049/jimmunol.1302919.

小荒井晃, COPD と自然免疫, 医学のあゆみ, 査読無 245: 2013, 169-173.

小荒井晃, 呼吸器病学 TOPICS 2012-13 閉塞性肺疾患 COPD と自然免疫, 分子呼吸器病, 査読無 17: 2013, 31-35.

Koarai A, et al. (著者 10 名 1 番目) Cigarette smoke augments the expression and responses of toll-like receptor 3 in human macrophages. Respiriology. 査読有 17: 2012, 1018-1025. DOI 10.1111/j.1440-1843.2012.02198.x

Koarai A, et al. (著者 12 名 1 番目) 25-Hydroxycholesterol enhances cytokine release and Toll-like receptor 3 response in airway epithelial cells. Respir Res. 査読有 31: 2012, 63-73. DOI 10.1186/1465-9921-13-63

[学会発表](計10件)

小荒井晃, COPD 増悪病態における自然免疫の役割. 第 100 回 日本呼吸器学会東北地方会, 2015.03.07, フォレスト仙台(仙台市)

小荒井晃, Role of toll-like receptors in the pathogenesis of COPD. TOKYO ASIA COPD SYMPOSIUM 2014, 2014.07.05, 経団連会館(東京都)

K. Kanai, A. Koarai, et al. Cigarette Smoke Augments MUC5AC Mucin Production Via TLR3-EGFR Pathway In Airway Epithelial Cells. ATS International Conference 2014, 2014.05.19, San Diego.

金井一修, 小荒井晃, タバコ煙は気道上皮において TLR3-EGFR 経路を介したムチン産生を増強する, 第 54 回 日本呼吸器学会学術講演会, 2014.04.26, 大阪国際会議場(大阪市)

小荒井晃, 閉塞性肺疾患の増悪病態における自然免疫の役割の解明, 第 22 回 Pneumo Forum, 2013.11.09, 経団連会館(東京都)

K Kanai, A. Koarai, et al. Cigarette smoke augments MUC5AC mucin production via TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells. ERS Annual Congress 2013, 2013.09.10, Barcelona.

小荒井晃, COPD の増悪 ~ 自然免疫をめぐって, COPD Expert Seminar, 2013.04.23, 江陽グランドホテル(仙台市)

金井一修, 小荒井晃, Toll 様受容体刺激による気道上皮におけるムチン産生およびその機序に関する検討, 第 53 回 日本呼吸器学会学術講演会, 2013.04.21, 東京国際フォーラム(東京都)

小荒井晃, 25-hydroxycholesterol の気道上皮における TLR3 受容体反応増強作用およびその機序に関する検討, 第 53 回 日本呼吸器学会学術講演会, 2013.04.21, 東京国際フォーラム(東京都)

小荒井晃, 喫煙のヒトマクロファージ TLR3 発現および受容体反応に与える影響の検討, 第 85 回閉塞性肺疾患研究会, 2012.07.21, 大手町サンケイプラザ(東京都)

[図書](計1件)

小荒井晃, COPD と自然免疫; Annual Review 2014 呼吸器, 永井厚志, 巽浩一郎, 桑野和善, 高橋和久編, 中外医学社, 2014, 1-8.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小荒井 晃 (KOARAI AKIRA)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 80458059