

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：15K19411

研究課題名(和文)喫煙誘導実験肺気腫におけるケモカインCCL1の役割の探究

研究課題名(英文)The role of chemokine CCL1 in experimental pulmonary emphysema induced by smoking exposure.

研究代表者

木村 友美(KIMURA, Tomomi)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：50536935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：雄7～9週齢の野生型マウスと、SPC-CCL1 Tgマウスに対し、喫煙負荷を行った。1週間後、2週間後に気管支肺胞洗浄を行い、総細胞数、細胞分画を検討した。2週間後の気管支肺胞洗浄では、回収液中の総細胞数はSPC-CCL1 Tgマウスにおいて野生型マウスより有意に増加していた。細胞分画の大多数はマクロファージであった。SPC-CCL1 Tgマウスにおいて、喫煙曝露によりマクロファージがより強く誘導されることが明らかとなった。このことは、CCL1が喫煙負荷による肺内の炎症において、中心的な役割を担っている肺胞マクロファージの分化、および誘導について大きな役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wild type mice 7 to 9 weeks old and SPC - CCL 1 Tg mice were exposed by cigarette smoking. After 1 week and 2 weeks, bronchoalveolar lavage (BAL) was performed, and total cell number and cell fraction were examined. In BAL fluid two weeks later, the total number of cells was significantly increased in the SPC-CCL1 Tg mice than in the wild type mice. The majority of the cellular fraction was alveolar macrophage. It was revealed that macrophages were more strongly induced by smoking exposure in SPC-CCL1 Tg mice. These results suggested that CCL1 might play a major role in the differentiation and induction of alveolar macrophages, which plays a central role in inflammatory response in the lung due to smoking exposure.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 肺気腫 CCL1

1. 研究開始当初の背景

長期の喫煙によって慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は発症する。発症機序に関して諸説があるが、吸入された有害粒子により惹起された肺の炎症の増強・慢性化がその一つとして挙げられる。その結果、肺胞組織が破壊された上に、正常な組織修復が阻害され、肺実質の肺気腫や末梢気道の線維化という肺組織のリモデリングが生じる。喫煙者の約 20% が 70 歳台に差し掛かると COPD を発症する一方で、重喫煙を繰り返しても全く肺機能が損なわれない人も存在する。この個体差の原因として、発症する喫煙者と発症しない喫煙者の間に炎症反応に質的・量的違いがあると考えられる。炎症反応の違いは個人の体質であり、遺伝子塩基配列により決定される。体質を決定づける遺伝子の塩基配列として single nucleotide polymorphism (SNP) が着目され、様々な疾患において研究がなされている。以前、我々は山形県内の 276 名の COPD 患者に対し、急性増悪を頻回に繰り返す表現型を決める SNP 解析を行った。その結果、ケモカインのひとつ CCL1 の遺伝子多型 (NCBI : rs2282691) と増悪の頻度の間に有意な関連を認めた。さらに、その遺伝子多型の違いによる有意な生存率の低下が観察された。rs2282691 は遺伝子プロモーター領域の SNP であり、アリルの違いで CCL1 の発現量が低下し、増悪リスクが高くなると想定された (Takabatake, Am J Respir Crit Care Med 2006)。

CCL1 は活性化した単球・マクロファージ、リンパ球などから産生され、アレルギー、免疫修飾、組織修復、リモデリングに関与することが明らかとされている。CCL1 の受容体は CCR8 であり、CCL1 は CCR8 発現細胞を呼び寄せる働きを有する。近年、CCR8 を発現している癌細胞をリンパ節転移に導く働き (Das, J Exp Med 2013) や、CCR8 発現マクロファージを慢性炎症肝に導き肝臓の線維化形成に関与すること (Heymann, Hepatology 2012) などが報告されている。すなわち、CCL1-CCR8 axis は細胞の局所への誘導を介して、組織リモデリングなどに関与していると想定される。さらに CCL1 は、regulatory T 細胞に介して免疫応答を抑制することも注目されている (Hoelzinger, J Immunol 2010)。

前述のように、我々は CCL1 の発現量の低下が COPD 急性増悪の頻度と関連することを示した。この機序としては、免疫応答の低下による気道感染の機会の増加が想定される。しかし、COPD を含めた呼吸器疾患における CCL1 の正確な役割はまだ解明されていない。COPD の発症に炎症反応の増強・慢性化が必要であることを踏まえると、CCL1 の発現量の変化は、COPD 増悪の頻度みならず COPD の発症や進展においても影響すると考えられる。

実際に、GOLD ステージ 期の COPD 患者

の肺組織中のマクロファージで CCR8 の過剰発現が認められたという報告 (Reimer, Clin Vaccine Immunol 2011) や、喘息患者の気道上皮および気管支肺胞洗浄液中に CCL1 の過剰発現を認めたという報告 (Montes-Vizuet Eur Respir J 2006) があり、様々な呼吸器疾患の病態形成や組織リモデリングにも関与している可能性がある。

我々は、CCL1 の肺組織における役割を検討するため、Surfactant Protein-C (SP-C) プロモーターを用いて肺組織特異的に CCL1 を高発現させる遺伝子改変マウスを作成した。これまでの検討では、無刺激の状態では外観、成長、生存率などにおいて、野生型と変化がないが、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液の肺胞マクロファージ数は有意に減少し、FACS 解析にてマクロファージ分化マーカー F4/80 発現が減じていることが確認された (Springerplus, 2016)。

生体内の免疫応答は複雑なネットワークを形成しており、喫煙刺激が加わった肺に対して CCL1 が、保護的あるいは障害的のどちらに作用するのかわかり不明である。最近 regulatory T 細胞の構成の変化が COPD では認められることも報告されており (Hou, Thorax 2013)、CCL1 が regulatory T 細胞構成に変化を与えることで COPD の進展に影響を及ぼすことも考えられる。以上より、CCL1 遺伝子改変マウスに長期間喫煙曝露を施し、CCL1 が COPD の発症や進展に与える影響を解明することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺組織特異的 CCL1 強制発現マウスを用いて、CCL1 が COPD の発症や進展に影響するかどうかが解明することである。本遺伝子改変マウスと野生型マウスに喫煙負荷をかけ、肺の気腫化の強さ、気流閉塞の強度、肺の炎症の強さ、肺組織のアポトーシスの程度の差異を比較する。さらに網羅的に 2 つのマウスの遺伝子発現の違いを検討する。

3. 研究の方法

平成 28 年度

計画：肺組織特異的 CCL1 強制発現マウスにおける喫煙肺気腫進展の評価

研究方法：肺組織特異的 CCL1 強制発現マウスとコントロールマウスに対して代表的な肺気腫作成モデルとして知られる長期間喫煙曝露を施行する。喫煙曝露は当大学動物実験施設内に設置されている MIPS 社喫煙曝露装置にて、1 日 2 本・週 5 日・6 ヶ月間喫煙曝露を施行する。両マウスから採血、気管支肺胞洗浄 (BAL)、肺組織摘出、その他の臓器摘出を行い、臓器からは組織標本作製、RNA 抽出、蛋白質抽出を行う。そして、各サンプルから以下の測定を行う。

血液：赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値、白血球数・分画、炎症性ならびに抗炎症性サイトカイン濃度

BAL 液：酸化ストレス (lipid peroxide)、炎症性ならびに抗炎症性サイトカイン濃度、matrix metalloproteinases (MMPs) 濃度・活性

BAL 細胞 (サイトスピン検体)：免疫染色 [matrix metalloproteinases (MMPs)、HO-1、Nrf2]、ヒドロキシラジカル産生量定量

組織標本：免疫染色 (MMPs、HO-1、Nrf2、CCR8 陽性 Treg 細胞の評価 < CCR8 & Foxp3 二重陽性細胞の組織分布・定量 >)

Total RNA：RT-PCR (MMPs、HO-1、Nrf2)

蛋白質：ELISA もしくはウェスタンブロット (MMPs、炎症性サイトカイン)

さらに以下の評価を行う。

(1) 肺組織：気腫化程度の定量評価

Mean liner intercept：COPD 形成の程度を肺胞腔の mean liner intercept を計測

Point counting 法による単位面積当たりの肺実質の比率計測

Destructive index：喫煙負荷に肺胞破壊の程度を評価

(2) 呼吸機能検査：COPD 類似の呼吸機能変化を生じているか検討

0.1 秒量と肺コンプライアンスの評価：喫煙負荷により肺に気腫化が生じることは、気流閉塞とマウス肺弾性収縮力の低下につながる。マウス肺機能測定装置 (Buxco Research Systems) を用いて、これらを測定することで、群間での気流閉塞と肺コンプライアンスの差異を評価する。

喫煙負荷後に両マウス間で気腫化肺形成に有意な差異が認められない場合には、エラストアーゼ気管内投与による実験肺気腫を作成することも検討する。

平成 29 年度

計画：実験肺気腫マウスにおける DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現変化の検討

研究方法：前述の行程で抽出した total RNA に対して、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現変化の解析を委託にて行い、コントロールマウスと比べて特に蛋白分解酵素 分解酵素阻害因子間で不均衡が生じていないか、酸化ストレス応答因子が減少していないか、肺細胞のアポトーシス関連因子の発現に差はないかなどに着目し解析する。解析の結果、本モデルで浮かびあがってきた候補因子については、RT-PCR もしくはウェスタンブロットなどで、群間での差異を確認する。

計画：実験肺気腫マウスにおける肺細胞のア

ポトーシスの程度の比較とアポトーシス経路の検討

研究方法：喫煙によってもたらされるアポトーシスが、CCL1 により影響されるかどうかを以下の項目で検討する。

- (1) TUNEL 染色法：肺組織標本にて、
- (2) Annexin V 染色法：BAL 細胞にて、
- (3) カスパーゼ活性定量：肺抽出蛋白質および気管支肺胞洗浄液にて

4. 研究成果

雄 7~9 週齢の野生型マウスと、SPC-CCL1 Tg マウスに対し、喫煙曝露装置を用いて喫煙負荷を行った。喫煙による炎症の発生を評価するため、喫煙負荷 1 週間後、2 週間後に気管支肺胞洗浄を行い、総細胞数、細胞分画を検討した。曝露後 1 週間で気管支肺胞洗浄を行ったところ、回収液中の総細胞数、分画には両群間に有意差を認めなかった。2 週間後の気管支肺胞洗浄では、回収液中の総細胞数は SPC-CCL1 Tg マウスにおいて野生型マウスより有意に増加していた。細胞分画を検討したところ、細胞の大多数はマクロファージであった。SPC-CCL1 Tg マウスは、無刺激の状態では野生型と比較してマクロファージ数が有意に少なかったことから、SPC-CCL1 Tg マウスにおいて、喫煙曝露によりマクロファージがより強く誘導されることが明らかとなった。このことは、CCL1 が喫煙負荷による肺内の炎症において、中心的な役割を担っている肺胞マクロファージの分化、および誘導について大きな役割を担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Impact of cigarette smoking on decline in forced expiratory volume in 1s relative to severity of airflow obstruction in a Japanese general population: The Yamagata-Takahata study. Sato K, Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Nemoto T, Sato M, Nakano H, Machida H, Nishiwaki M, Kobayashi M, Yang S, Minegishi Y, Furuyama K, Yamamoto T, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. *Respir Investig.* 2018 Mar;56(2):120-127. doi: 10.1016/j.resinv.2017.11.011. Epub 2017 Dec 24. 査読有

Prevalence of diabetes mellitus in individuals with airflow obstruction in a Japanese general population: The Yamagata-Takahata Study. Machida H, Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Sato

K, Nakano H, Nishiwaki M, Kobayashi M, Yang S, Minegishi Y, Furuyama K, Yamamoto T, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. *Respir Investig.* 2018 56: 34-39. doi: 10.1016/j.resinv.2017.11.003. Epub 2017 Dec 7. 査読有

MafB enhances efferocytosis in RAW264.7 macrophages by regulating Axl expression. Sato M, Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Nemoto T, Sato K, Nakano H, Abe S, Nishiwaki M, Kobayashi M, Yang S, Minegishi Y, Furuyama K, Kubota I. *Immunobiology.* 2018; 223: 94-100. doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.007. 査読有

MafB silencing in macrophages does not influence the initiation and growth of lung cancer induced by urethane. Nemoto T, Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Sato M, Sato K, Nakano H, Abe S, Nishiwaki M, Kobayashi M, Yang S, Minegishi Y, Furuyama K, Machida H, Kubota I. *EXCLI Journal* 2017; 16: 914-920. 査読有

Decreased left ventricular stroke volume is associated with low-grade exercise tolerance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Inoue S, Shibata Y, Kishi H, Nitobe J, Iwayama T, Yashiro Y, Nemoto T, Sato K, Sato M, Kimura T, Igarashi A, Tokairin Y, Kubota I. *BMJ Open Respir Res.* 2017; 4: e000158. doi: 10.1136/bmjresp-2016-000158. 査読有

MafB enhances the phagocytic activity of RAW264.7 macrophages by promoting Fcgr3 expression. Nemoto T, Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Sato M, Sato K, Nakano H, Abe S, Nishiwaki M, Kubota I. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 482: 375-381. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.070. 査読有

Role of chemokine C-C motif ligand-1 in acute and chronic pulmonary inflammations. Kishi H, Sato M, Shibata Y, Sato K, Inoue S, Abe S, Kimura T, Nishiwaki M, Yamauchi K, Nemoto T, Igarashi A, Tokairin Y, Nakajima O, Kubota I. *Springerplus.* 2016; 5: 1241. doi: 10.1186/s40064-016-2904-z. 査読有

Predictors for mortality from respiratory failure in a general population. Kobayashi M, Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Sato K, Sato M, Nemoto T, Abe Y, Nunomiya K, Nishiwaki M, Tokairin Y, Kimura T, Daimon M,

Makino N, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. *Sci Rep.* 2016; 6: 26053. doi: 10.1038/srep26053. 査読有

〔学会発表〕(計 12件)

肺炎患者における日常生活動作レベル低下の予測因子の検討．峯岸幸博，井上純人，佐藤建人，佐藤正道，根本貴子，木村友美，山内啓子，五十嵐朗，東海林佳兼，柴田陽光．第57回日本呼吸器学会学術講演会．2017年4月22日．東京国際フォーラム（東京）

COPD増悪時の予後とシスタチンCとの関連．佐藤建人，古山広大，峯岸幸博，梁秀鼎，中野寛之，佐藤正道，根本貴子，木村友美，山内啓子，五十嵐朗，東海林佳兼，井上純人，柴田陽光，久保田功．第57回日本呼吸器学会学術講演会．2017年4月22日．東京国際フォーラム（東京）

血清E-selectin濃度と炎症性肺疾患の予後との関連について．中野寛之，井上純人，五十嵐朗，東海林佳兼，山内啓子，木村友美，根本貴子，佐藤正道，佐藤建人，梁秀鼎，古山広大，峯岸幸博，八木橋崇仁，久保田功，柴田陽光．第57回日本呼吸器学会学術講演会．2017年4月21日．東京国際フォーラム（東京）

非小細胞肺癌における病期と血清ヘプジンとの関連．佐藤建人，古山広大，峯岸幸博，梁秀鼎，中野寛之，佐藤正道，根本貴子，木村友美，山内啓子，五十嵐朗，東海林佳兼，井上純人，柴田陽光，久保田功．第57回日本呼吸器学会学術講演会．2017年4月21日．東京国際フォーラム（東京）

下気道感染症患者における血清LYVE1濃度の解析．佐藤正道，柴田陽光，井上純人，五十嵐朗，東海林佳兼，山内啓子，木村友美，根本貴子，佐藤建人，中野寛之，梁秀鼎，古山広大，峯岸幸博，久保田功．第57回日本呼吸器学会学術講演会．2017年4月23日．東京国際フォーラム（東京）

鉄欠乏状態下での喫煙曝露の影響についての検討．佐藤建人，古山広大，峯岸幸博，梁秀鼎，中野寛之，佐藤正道，根本貴子，木村友美，山内啓子，五十嵐朗，東海林佳兼，井上純人，柴田陽光，久保田功．第57回日本呼吸器学会学術講演会．2017年4月21日．東京国際フォーラム（東京）

Association of Smaller Erector Spinae Muscle Size on Admission with Unrecovered Activities of Daily Living After Pneumonia Treatment. Minegishi Y, Inoue S, Sato K, Furuyama K, Yang S, Nakano H, Sato M, Nemoto T, Kimura T, Yamauchi K, Igarashi A, Tokairin Y, Shibata Y. *American Thoracic Society.*

2017年5月21日 . Washington DC, (USA)
Serum Level of Lymphatic Vessel
Endothelial Hyaluronan Receptor-1
(LYVE1) During Acute Lower Respiratory
Infection. Nakano H, Shibata Y, Inoue
S, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K,
Kimura T, Nishiwaki M, Nemoto T, Sato
M, Sato K, Yang S, Furuyama K,
Minegishi Y, Kubota I. American
Thoracic Society. 2017年5月22日 .
Washington DC, (USA).

低鉄状態が Lipopolysaccharide 誘発急性
性肺障害に及ぼす影響についての検討 .
佐藤建人, 阿部祐紀, 佐藤正道, 根本貴
子, 西脇道子, 木村友美, 山内啓子, 五
十嵐朗, 東海林佳兼, 井上純人, 柴田陽
光, 久保田功 . 第56回日本呼吸器学会総
会 . 2016年4月10日 . 国立京都国際会
館 (京都府).

転写因子 MafB のマクロファージ貪食能
に与える影響の検討 . 根本貴子, 阿部祐
紀, 小林真紀, 佐藤建人, 佐藤正道, 西
脇道子, 木村友美, 山内啓子, 五十嵐朗,
東海林佳兼, 井上純人, 柴田陽光, 久保
田功 . 2016年4月9日 . 国立京都国際
会館 (京都府).

高齢者肺炎における血清鉄と予後の関係 .
佐藤建人, 阿部祐紀, 佐藤正道, 根本貴
子, 西脇道子, 木村友美, 山内啓子, 五
十嵐朗, 東海林佳兼, 井上純人, 柴田陽
光, 久保田功 . 2016年4月8日 . 国立
京都国際会館 (京都府).

Effect of Iron Deficiency on
Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung
Injur. Sato K, Abe Y, Kobayashi M, Sato
M, Nemoto T, Nishiwaki M, Kimura T,
Yamauchi K, Igarashi A, Tokairin Y,
Inoue S, Kubota I, Shibata Y. American
Thoracic Society. 2016年5月15日 .
San Francisco, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 友美 (KIMURA Tomomi)

山形大学・医学部・医員

研究者番号 : 50536935

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

柴田 陽光 (Shibata Yoko)

佐藤 正道 (Sato Masamichi)

佐藤 建人 (Sato Kento)

根本 貴子 (Nemoto Takako)