

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 13 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19435

研究課題名(和文) CD163遺伝子欠損マウスを用いたCOPD肺病変部のM2マクロファージ解析

研究課題名(英文) Analysis of M2 macrophage in the lung of chronic obstructive pulmonary disease by using CD163 knockout mice.

研究代表者

坂崎 優樹 (Sakazaki, Yuki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80597386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：M2マクロファージは慢性炎症の病態に深く関わっていることが知られている。今回、慢性閉塞性肺疾患(COPD)におけるM2マクロファージの役割について検討した。野生型マウスに豚膵臓エラスターゼ(PPE)を気管内投与しCOPDマウスモデルを作製した。PPE投与7日目、14日目、21日目、35日目に肺組織を取り出し、免疫染色を用いて検討したが、浸潤細胞数が少数であり解析できていない。次にCD163遺伝子欠損(KO)マウスを用いて同様の実験を行った。野生型B6マウス及びCD163KOマウスにPPEを投与し、肺組織を採取し検討したが、ほとんど差を認めなかった。まだ少数例の検討であり、実験継続中である。

研究成果の概要(英文)：M2 macrophage is known to play important roles of chronic inflammation. In this study, we evaluated the roles of M2 macrophage in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We made COPD mice model by intratracheal administration of porcine pancreatic elastase (PPE). Although we obtained the lungs at 7, 14, 21 and 35 days after PPE administration and performed immunohistochemical staining, very few inflammatory cells were observed in the lungs. Next wild type mice and CD163 knockout mice were given PPE intratracheally and induced pulmonary emphysema. We analyzed at 21 days after treatment, the degree of emphysema was not difference between wild type mice and CD163 knockout mice.

研究分野：呼吸器

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

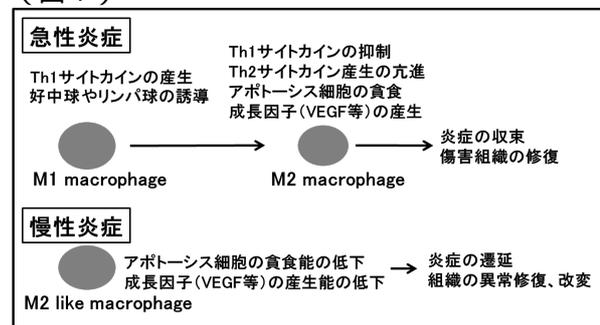
慢性閉塞性肺疾患 (Chronic obstructive pulmonary disease; COPD) は気管支拡張薬や吸入ステロイドなどの治療により、生活の質や予後が改善することが報告されている。しかしこれらの治療では、禁煙しているにも関わらず、気道や肺の炎症を止めることができず、気道及び肺の構造変化をきたし、気道狭窄及び肺泡破壊をきたすと考えられる。この遷延する慢性炎症には、炎症局所に多数出現するマクロファージや炎症性サイトカインの過剰産生が重要な役割を果たしていると思われる。実際、我々の教室では、炎症性サイトカインである IL-18 の強発現が気管支喘息や COPD を含む慢性炎症性肺疾患の病態に関与することを報告してきた。最重症 COPD に対する外科的処置である肺容量減量手術 (Lung Volume Reduction Surgery; LVRS) の際に採取した肺組織で、マクロファージが多数浸潤しており、それらが炎症性サイトカインである IL-18 を産生することを発見し、血清中の IL-18 値は COPD の重症度と相関することを報告した 1)。すなわち、マクロファージ及びそれが産生する炎症性サイトカインが COPD の病態に深く関わっていることが示唆された。近年、慢性炎症における M2 様マクロファージの関与が報告されるようになった。本来 M2 マクロファージは Th1 サイトカインを抑制し、Th2 サイトカイン産生を促進することで過剰な炎症を抑える働きをする。また炎症により生じたアポトーシス細胞の貪食、蛋白分解酵素の産生、血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) などの成長因子の産生など、傷害された組織の修復に重要な役割を果たしている。一方、慢性炎症における M2 様マクロファージはアポトーシス細胞貪食能の低下、VEGF などの組織修復因子産生の低下などが報告されており、試験管内の M2 マクロファージとは異なる。近年、COPD は動脈硬化性疾患や内分泌代謝疾患、骨粗鬆症といった合併症を引き起こす全身炎症性疾患として認識されており、肺の局所における炎症だけにとどまらず、全身の慢性炎症性疾患として注目されている。このような点からも、COPD において M2 マクロファージの関与が示唆される。我々の研究室で COPD 患者の肺組織において M2 マクロファージの表面マーカーである CD163、CD204、CD206 陽性の細胞が増加しており、COPD の病勢と強い相関関係があることを報告した 2)。加えて、我々は M2 マーカーであるキチナーゼ様蛋白と COPD についても研究を進めてきた。恒常的に肺特異的に IL-18 を強発現するトランスジェニックマウスは肺気腫をきたし 3)、COPD のように体重減少や筋萎縮、骨粗鬆症、耐糖能異常をきたす 4)。この COPD マウスモデルの遺伝子を DNA マイクロアレイ法を用い網羅的に検索したところ、キチナーゼ様

蛋白 (Chi3l1、Chi3l3、AMCase) が増加していた。このマウスでは蛋白レベルにおいても血清中の Chi3l1 が増加していた。また COPD 患者の血清中において優位にキチナーゼ様蛋白 (YKL-40) が増加しており、CT での気腫性変化の程度と強い正の相関関係があることを報告した 5)。しかし M2 マクロファージが COPD の病態にどのように関与しているのかは不明な点が多い。

2. 研究の目的

COPD の発症においてマクロファージや炎症性サイトカインが関与していることが示唆されるが、その働きについては不明である。前述のように慢性炎症における M2 マクロファージの関与が報告されており、COPD においても同様の機序が示唆された。すなわち慢性炎症性肺疾患である COPD では、肺局所において増加した異常な M2 マクロファージが、炎症の遷延、組織修復の抑制に関与していると考えた (図 1)。

(図 1)

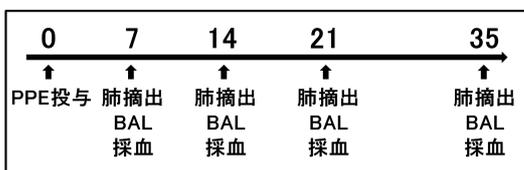


CD163 は M2 マクロファージのマーカーとして知られているが、CD163 遺伝子欠損マウスにおいて M2 マクロファージの機能がどうなるか不明である。本研究では COPD における M2 マクロファージの関与について、CD163 欠損マウスを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

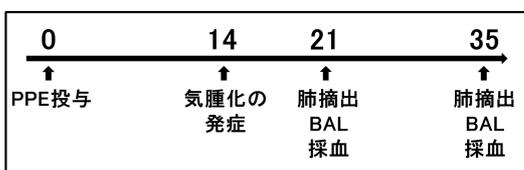
野生型 C57BL/6 マウスに豚膀胱エラストラーゼ (PPE) をマイクロスプレーを用いて気管内投与し、COPD マウスモデルを作製する (Kinoshita T et al. Biochem Biophys Res Commun 2007;354:712-719)。作製したマウスモデルを用いて様々な解析を行う。PPE 投与後、7、14、21、35 日目にそれぞれ肺の摘出、気管支肺胞洗浄、採血を行う (図 1)。肺組織についてはまず病理学的に気腫化ができていないかを評価する。気腫化ができていないのを確認したのち、各時系列において肺に浸潤したマクロファージについて、数やフェノタイプ、サイトカインの発現について免疫染色を用いて解析する。血清中および気管支肺胞洗浄液中のサイトカインを測定する。

(図1)



続いてC57BL/6バックグラウンドCD163遺伝子欠損マウスを用いて解析する。まず野生型C57BL/6マウスとバッククロスし、C57BL/6バックグラウンドCD163遺伝子欠損マウスを樹立する。このマウスにPPEを投与し21日目、35日目に肺を摘出し気腫化の程度に差があるかを検討する(図2)。血清中および気管支肺胞洗浄液中のサイトカインを測定し検討する。

(図2)



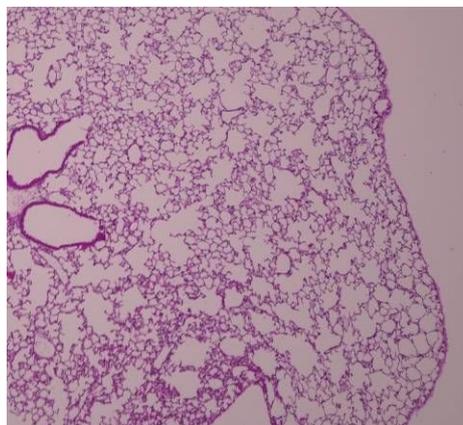
気腫化の評価としては、解析ソフト(WinROOF, Mitani co. japan)を用いて平均肺胞間距離を測定し客観的に評価する。また肺局所におけるマクロファージのフェノタイプやサイトカイン、キチナーゼ様蛋白の発現について免疫染色を用いて解析する。同様に気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン、キチナーゼ様蛋白についても検討する。気腫化の評価としては、生理学的な検討として静肺コンプライアンスについても測定する。

#### 4. 研究成果

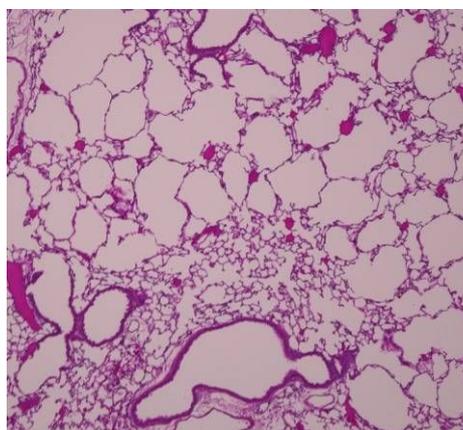
はじめに野生型C57BL/6マウスに豚膵臓エラストラーゼ(PPE)をマイクロスプレーを用いて気管内投与し、COPDマウスモデルの作製を行った。PPEの至適濃度を設定するために、生理食塩水、及び3種類の濃度のPPE(0.0625、0.125U、0.25U)を投与し、21日目に肺を取り出し病理学的に肺気腫が起こるかを検討した。その結果、最低濃度の0.0625Uでも十分、肺の気腫化ができていたことが確認できた(図3)ため、以降の実験は0.0625Uで行った。

(図3)

生理食塩水投与群



PPE投与群



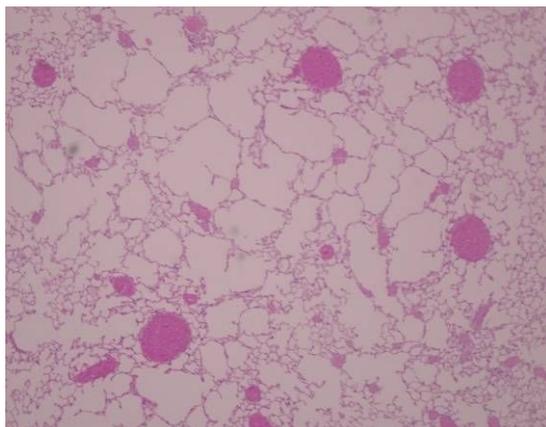
PPE投与後、肺気腫ができる課程でのマクロファージのフェノタイプの動向を見るために、PPE投与7日目、14日目、21日目、35日目に肺組織を取り出し検討した。14日目以降で肺に気腫化が起きていることを確認した。マクロファージのマーカーであるIba1とM2マクロファージマーカーであるCD163について、各時系列において免疫染色を行った。しかしどの時系列においてもマクロファージを少数しか認めず解析できなかった。過去の我々の実験結果とは大きな乖離があり、手技やPPE濃度について再度検討する必要があると思われた。

次にCD163遺伝子欠損マウスを用いた実験を行った。M2マクロファージマーカーであるCD163の遺伝子欠損マウスにおいて、肺の気腫化が抑制されるかを検討した。野生型C57BL/6マウス及びC57BL/6バックグラウンドCD163遺伝子欠損マウスにPPE0.0625Uをマイクロスプレーを用いて気管内投与した。21日目、35日目に肺組織を採取し、病理学的な検討を行った。M2マクロファージが肺の気腫化に関与するという作業仮説のもと実験を行っており、CD163遺伝子欠損マウスでは気腫化が抑制されると予測をしていたが、少数の検討ではほとんど差がないか、あるいはむしろCD163遺伝子欠損マウスでやや気腫

化が促進している印象であった。まだ少数の検討で、統計学的な検討に至っておらず、今後症例数を増やし検討を行う予定である(図4)。

(図4)

野生型マウス

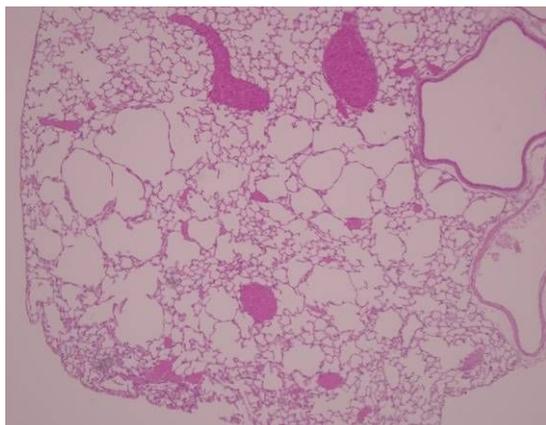


CD163 遺伝子欠損マウス

<引用文献>

Imaoka H et al. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur Respir J.* 2008; 31(2):287-97.

Kaku Y et al. Overexpression of CD163,



CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2014; 9(1):e87400.

Hoshino T et al. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176(1): 49-62.

Takenaka S et al. The progression of comorbidity in IL-18 transgenic chronic obstructive pulmonary disease mice model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 445(3):597-601

Sakazaki Y et al. Overexpression of chitinase 3-like 1/YKL-40 in lung-specific IL-18-transgenic mice, smokers and COPD. *PLoS One.* 2011; 6(9):e24177.

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 坂崎優樹 (Sakazaki, Yuki)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号 80597386
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし
- (4) 研究協力者 なし