

機関番号 : 14301

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20590895

研究課題名 (和文) 慢性閉塞性肺疾患における炎症遷延に Th17 の果たす役割の解明

研究課題名 (英文) Role of Th17 for persistent lung inflammation in COPD

研究代表者

星野 勇馬 (HOSHINO YUMA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 00378746

研究成果の概要 (和文) :

喫煙曝露により疾患感受性マウスにのみ Th17 が誘導された。ナイーブマウスを喫煙マウス肺 lysate で感作、喫煙チャレンジしたが、Th17 炎症の増強を認めなかった。タバコ煙抽出物質で感作し Th17 を誘導した脾臓細胞をマウスに移入、喫煙チャレンジしたが、Th17 炎症の増強を認めなかった。以上より、喫煙による肺気腫発症と Th17 炎症の関連が証明されたが、その因果関係に関して直接証明するには至らなかった。

研究成果の概要 (英文) :

Involvement of Th17 in the persistent neutrophil inflammation in COPD was examined using a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. Smoke exposure upregulated mRNA expression of interleukin-17 and increased Th17 cells in the lungs and spleen of “smoke-susceptible” mouse strain but not in those of “smoke-resistant” strain. To explore mechanisms of the Th17 induction by cigarette smoke, naive mice were sensitized with lung-lysate of smoke-exposed mice and challenged with cigarette smoke itself. The sensitization, however, was not sufficient for Th17 induction. We then examined adaptive transfer of splenic cells or bone marrow-derived dendritic cell exposed to cigarette smoke extract-treated lung lysate in advance. The adaptive transfer of the immune cells, however, did not induce Th17 response in the lungs of smoke-challenged mice. In conclusion, Th17 was indeed induced by cigarette smoking in mice and was related to disease susceptibility. Further studies are required to prove causal relationship between Th17 and emphysema progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、慢性進行性の呼吸困難を呈する疾患で、我が国では喫煙がその主たる原因である。その高い罹病率(喫煙者の10-20%)、及び死因の高い割合を占める疾患(米国では4位)であることから、新規治療戦略の開発が医療経済の面からも大きなインパクトをもつと考えられる。COPDの治療法としては、現在までに長期酸素療法、気管支拡張薬等が確立されている。しかしながらこれらの治療法は病態を一時的に改善させるものの、本質的に病態の進展を抑制するものではない。また、禁煙が病態の進展を遅らせる唯一の因子であるが、その成功率は高々20%程度である。さらに、COPD症例の中には、禁煙後も気道炎症が遷延するサブセットが存在することも知られており、こういった症例では禁煙のみで病態の進展を抑制できないことが想定される。以上より、特に気道炎症遷延のメカニズムを解明し、病態に即した新規抗炎症治療薬の開発が望まれている。

慢性喫煙という反復刺激に対する生体防御として、刺激早期には好中球を中心とする初期炎症反応が引き起こされるのは生理的な反応と思われる。しかしながらその後の生体防御反応として、初期炎症反応がそのままの性質で遷延する可能性は低いと思われる。即ち、異物排除のためのより効率的なリンパ球性炎症反応が引き起こされるか、若しくは、排除すべき異物とは見なさずに免疫学的寛容が働くはずである。多くの喫煙者では後者の要素が強いと思われ、免疫応答に乏しく、肺の破壊性変化を伴う肺気腫のような病態は起こらない。しかし一部の喫煙者では前者の反応が過剰となり、肺気腫に至ると考えられる。喫煙によるリンパ球性炎症反応として、これまでTh1, Th2炎症の関与に関し様々な報告がなされてきた。近年新たに提唱されたTh17はinterleukin-17産生性T細胞による、好

中球を主体とした炎症反応の遷延、自己免疫疾患の病態に重要な役割を果たす免疫応答である。これまでにCOPD患者の急性増悪期に誘発喀痰中にIL17の産生が亢進すること、IL17の遺伝子多型が気管支喘息・COPD患者で見られることが示されている。またin vitroでは、IL17が気道上皮細胞のmucin分泌を亢進させること、in vivoでは、喫煙刺激によるIL17産生亢進がCXCケモカインやICAM1を介した末梢気道への好中球浸潤に関連すること、IL17の経鼻投与により、肺のMMP9産生・活性亢進が引き起こされること、が示されている。以上より、IL17が喫煙による肺の炎症に深く関わる可能性が示唆されるが、IL17が疾患発症に関わる直接的な因子かどうかは証明されていない。

我々はこれまで、COPDの病態研究をするために不可欠な、慢性喫煙曝露によるマウス肺気腫モデルを確立してきた。そのなかで、ヒトにおける疾患感受性の個体差に相当すると思われる現象を、マウスの系による肺気腫発症性の違いという観点で発見した。即ち、慢性喫煙後も気腫を発症しない抵抗性マウス(NZW/LacJ)、気腫発症する中程度感受性マウス(C57BL/6J等)、高度の肺気腫を発症する高感受性マウス(AKR/J)である。さらにこれらのマウスの気腫発症性と肺の炎症細胞プロファイルの違いの関連、網羅的遺伝子解析による疾患感受性に関連する候補遺伝子の同定を行ってきた。一方、このモデルをCOPD新規治療戦略の開発にも活用してきた。すなわち抗炎症・抗酸化物質であるthioredoxinの過剰発現マウスでは対象マウスに比べ気腫発症抵抗性であること、thioredoxin誘導物質の投与により喫煙による炎症が抑制されること等、同モデルを用いて証明してきた。

以上の背景に基づき、我々は、COPD発症へと至る喫煙による肺炎の病態の一つとして、Th17免疫反応を介した遷延性好中球炎症があ

り、そのメカニズムを探求することで、新たな治療戦略を開発しようと考えている。

## 2. 研究の目的

まず、喫煙肺気腫の疾患感受性と Th17 の関連に関して、喫煙マウスモデルを用いて検討する。

次に、喫煙による肺気腫発症において、Th17 を誘導するメカニズム、特に関与するシグナル伝達物質の同定、及びそのエフェクター分子を同定する。

最後に、治療応用を視野に入れ、Th17 の選択的抑制が喫煙による肺気腫発症を抑制するかどうか検討する。

## 3. 研究の方法

喫煙による肺気腫発症と Th17 免疫応答の関連について、疾患感受性の異なるマウスの系を用い、肺組織の IL17 発現及び Th17 細胞の有無を指標に、喫煙開始から肺気腫発症までの 6 か月間、経時的に評価する。

次に、喫煙による Th17 の活性化と肺気腫発症の因果関係を検証するため、(1)肺組織破壊産物による感作、(2) *in vitro* で感作した免疫細胞移入の効果に関し、喫煙チャレンジ後の Th17 免疫応答及び肺炎症を指標に検討した。

最後に、マウスにおける喫煙肺炎症、特に遷延性の好中球炎症を IL17 抗体投与によって抑制しようか検討した。

## 4. 研究成果

(疾患感受性と Th17 の関連)

喫煙肺気腫感受性の C57 野生型マウスでは、喫煙曝露後の肺組織で IL-17 の mRNA 発現亢進を認めた。一方 C57 をバックグラウンドにもち、肺気腫発症抵抗性であるチオレドキシシン過剰発現マウスでは、喫煙後も IL-17 の発現亢進を認めず、肺気腫発症と IL-17 発現の関連が示唆された。

(喫煙による Th17 誘導の確認)

そこで、実際に感受性マウスで Th17 免疫応答が誘導されているかどうか検討を行った。C57 マウスでは、喫煙開始 2 週間後より肺及び脾臓に Th17 細胞 (IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞) を検出したが、非喫煙マウスでは Th17 細胞を認めなかった。

(喫煙による Th17 誘導メカニズムの検討)

次に、喫煙による Th17 免疫誘導のメカニズムを検討した。喫煙により破壊された肺組織構成成分が免疫原性をもつと考え、既成のエラスチン分解ペプチド、若しくは喫煙マウス肺の lysate を、アジュバントとともに非喫煙マウスに皮下注射し感作を行った。その後喫煙チャレンジを行い、肺及び脾臓で Th17 細胞出現の有無を検討したが、Th17 免疫応答

の誘導を検出し得なかった。なおアジュバントとして用いた curdlan は、喫煙の有無にかかわらず肺の IL-17、IL-23 mRNA 発現を亢進させており、*in vivo* での喫煙感作に改善の余地があると考えられた。

そこで、*in vitro* での感作の検討を行った。ナイーブマウスの脾細胞を、TGF $\beta$ 、IL-6、IL-23 存在下に、抗原と想定するタバコ煙抽出物質処理を施したマウス肺 lysate と共に培養し、培養後の細胞に Th17 細胞の存在を確認した。この Th17 細胞を含む脾臓細胞浮遊液をナイーブマウスに腹腔内投与し、更に喫煙チャレンジを行った後に、肺組織の IL17 発現及び好中球炎症に関して検討を行ったが、免疫細胞移入によるマウス肺の Th17 炎症の促進を検出し得なかった。理由として、脾臓細胞浮遊液中に感作に足る成熟した抗原提示細胞が十分含まれていなかった、若しくは喫煙刺激に弱いリンパ球が、感作の段階で細胞毒性を受けてしまったことなどが考えられた。更に、抗原提示細胞を予め抗原曝露した上で移入し、*in vivo* での感作を試みた。マウス骨髄細胞を GM-CSF 処理して得られた成熟した抗原提示細胞に、アジュバントと共に、タバコ煙抽出物質処理を施したマウス肺 lysate を曝露し、活性化樹状細胞に富む細胞浮遊液を作成した。これをナイーブマウスに腹腔内投与し、*in vivo* での喫煙感作～チャレンジを行った。しかしながら、この検討においても免疫細胞移入による、肺炎症の促進効果を検出し得なかった。

(IL17 抗体投与の肺炎症抑制効果)

最後に、喫煙肺炎症を IL17 の阻害により抑制しようかどうか検討を行った。1 か月喫煙マウスに抗 IL-17 抗体を投与し、好中球炎症抑制の指標として、肺の MIP2 発現に関して検討したが、IL-17 抗体投与による有意な抑制効果を検出し得なかった。なお、今回の検討では喫煙による MIP2 の発現誘導自体を認めておらず、再検討が必要と考えられる。以上より、喫煙により、確かに Th17 免疫応答が引き起こされるものの、この免疫応答と肺炎症～肺気腫伸展の因果関係に関しては証明し得なかった。Th17 に限らず、様々な炎症細胞・構成細胞の産生する IL17 が、喫煙による肺炎症の遷延～肺気腫の病態に関与する可能性を含め、今後の検討が望まれる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Tanabe N, Muro S, Hirai T, Oguma T, Terada K, Marumo S, Kinose D, Ogawa E, Hoshino Y, Mishima M. Impact of Exacerbations on Emphysema Progression in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am

J Respir Crit Care Med 2011.

2. Terada K, Muro S, Ohara T, Kudo M, Ogawa E, Hoshino Y, Hirai T, Niimi A, Chin K, Mishima M. Abnormal swallowing reflex and COPD exacerbations. *Chest* 2010;137(2):326-32.
3. Sakai H, Nakano Y, Muro S, Hirai T, Takubo Y, Oku Y, Hamakawa H, Takahashi A, Sato T, Chen F, Sahara H, Fujinaga T, Sato K, Sonobe M, Shoji T, Miyahara R, Okubo K, Bando T, Hirata T, Date H, Mishima M. Age-related changes in the trachea in healthy adults. *Adv Exp Med Biol* 2010;662:115-20.
4. Nishioka M, Ogawa E, Kinose D, Haruna A, Ohara T, Ito I, Hoshino Y, Ito Y, Matsumoto H, Niimi A, Mio T, Chin K, Hirai T, Muro S, Mishima M. Lipopolysaccharide induced connective tissue growth factor gene expression in human bronchial epithelial cells. *Respirology* 2010;15(4):669-76.
5. Haruna A, Oga T, Muro S, Ohara T, Sato S, Marumo S, Kinose D, Terada K, Nishioka M, Ogawa E, Hoshino Y, Hirai T, Chin K, Mishima M. Relationship between peripheral airway function and patient-reported outcomes in COPD: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med* 2010;10:10.
6. Haruna A, Muro S, Nakano Y, Ohara T, Hoshino Y, Ogawa E, Hirai T, Niimi A, Nishimura K, Chin K, Mishima M. CT scan findings of emphysema predict mortality in COPD. *Chest* 2010;138(3):635-40.
7. Terada K, Muro S, Ohara T, Haruna A, Marumo S, Kudo M, Ogawa E, Hoshino Y, Hirai T, Niimi A, Mishima M. Cough-reflex sensitivity to inhaled capsaicin in COPD associated with increased exacerbation frequency. *Respirology* 2009;14(8):1151-5.
8. Ogawa E, Nakano Y, Ohara T, Muro S, Hirai T, Sato S, Sakai H, Tsukino M, Kinose D, Nishioka M, Niimi A, Chin K, Pare PD, Mishima M. Body mass index in male patients with COPD: correlation with low attenuation areas on CT. *Thorax* 2009;64(1):20-5.
9. Terada K, Muro S, Sato S, Ohara T, Haruna A, Marumo S, Kinose D, Ogawa E, Hoshino Y, Niimi A, Terada T, Mishima M. Impact of gastro-oesophageal reflux disease symptoms on COPD exacerbation. *Thorax* 2008;63(11):951-5.
10. Sato A, Hoshino Y, Hara T, Muro S, Nakamura H, Mishima M, Yodoi J. Thioredoxin-1 ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation and

emphysema in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325(2):380-8.

11. Ohara T, Hirai T, Sato S, Terada K, Kinose D, Haruna A, Marumo S, Nishioka M, Ogawa E, Nakano Y, Hoshino Y, Ito Y, Matsumoto H, Niimi A, Mio T, Chin K, Muro S, Mishima M. Longitudinal study of airway dimensions in chronic obstructive pulmonary disease using computed tomography. *Respirology* 2008;13(3):372-8.
12. Ohara T, Hirai T, Muro S, Haruna A, Terada K, Kinose D, Marumo S, Ogawa E, Hoshino Y, Niimi A, Chin K, Mishima M. Relationship between pulmonary emphysema and osteoporosis assessed by CT in patients with COPD. *Chest* 2008;134(6):1244-9.
13. Hoshino Y, Mishima M. Redox-based therapeutics for lung diseases. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(4):701-4.

[学会発表] (計 5 件)

1. Kiyokawa H, Hoshino Y, Tanabe N, Marumo S, Ogawa E, Muro S, Hirai T, Mishima M. Animal Model Of Cigarette Smoke Induced Airway Disease Without Emphysema In Mice And Effect Of Dexamethasone On It. 2011 International Conference of American Thoracic Society. May 16, 2011, Denver.
2. Tanabe N, Hoshino Y, Kiyokawa H, Marumo S, Ogawa E, Muro S, Hirai T, Mishima M. Distinct Responses Against Polyinosine-Polycytidylic Acid In Smoke-Exposed Mouse Strains With Different Susceptibility To Emphysema. 2010 International Conference of American Thoracic Society. May 18, 2010, New Orleans.
3. Hoshino Y, Mishima M. COPD Patients' Unmet Needs: The Japanese Experience. First World Conference of COPD Patients. A Global Mandate for COPD Care. June 14, 2009 Rome.
4. Marumo S, Hoshino Y, Tanabe N, Sato A, Ito I, Ogawa E, Muro S, Hirai T, Mishima M. Pathophysiology of cigarette smoke induced emphysema after smoking cessation in a murine model. 2009 International Conference of American Thoracic Society, May 17, 2009, San Diego.
5. Tanabe N, Hoshino Y, Marumo S, Ito I, Ogawa E, Muro S, Hirai T, Mishima M. Systemic immune activation by polyinosine-polycytidylic acid evokes lung inflammation similar to COPD exacerbation in smoke-exposed mice. 2009 International Conference of American

Thoracic Society, May 17, 2009, San Diego.

〔図書〕(計3件)

1. 室繁郎, 星野勇馬, 三嶋理晃. 疾患の病因と病態 COPD P38MAPK inhibitor. Annual Review 呼吸器 2010;p68-73.
2. 室繁郎, 小川恵美子, 星野勇馬, 三嶋理晃. 【COPD 新ガイドラインで期待される予防と治療】慢性安定期の診療 慢性安定期の治療. 治療学;43(9);p947-952.
3. 星野勇馬, 室繁郎, 三嶋理晃. 【薬物療法の新展開】薬物療法の未来 COPD の新規治療薬. COPD FRONTIER;8(1);p93-99.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星野 勇馬 (HOSHINO YUMA)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00378746

### (2) 研究分担者

室 繁郎 (MURO SHIGEO)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：60344454

伊藤 功朗 (ITO ISAO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40447975

### (3) 連携研究者

中村 肇 (NAKAMURA HAJIME)  
田附興風会北野病院・健診部長  
研究者番号：70303914