

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590913

研究課題名（和文）慢性気道炎症に対する気道上皮細胞の制御機構の解析と新規治療の開発

研究課題名（英文）Role of BCL6 a transcriptional repressor in the pathogenesis of chronic pulmonary inflammatory disease.

## 研究代表者

有馬 雅史 (ARIMA MASAFUMI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：00202763

研究成果の概要（和文）：本研究は、気道炎症におけるケモカイン産生の機能調節方法の研究を行うことによって、多くの慢性肺炎症性疾患に対する新規の治療法の開発を目指す。申請者らはヒトとマウスで類似した MCP-1 を含むケモカイン遺伝子群のクラスター領域を見出しており、この領域において転写抑制因子である BCL6 の結合領域が数多く存在することを見出している。生体内で BCL6 が気道上皮細胞においてこれらケモカイン遺伝子クラスターに対して発現をクロマチンレベルで統合的に抑制することによって気道炎症を抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：There is synteny in the CC-type chemokine gene clusters between humans (*CCL2/MCP-1*, *CCL7/MCP-3*, *CCL11/Eotaxin*, *CCL8/MCP-2*, *CCL13/MCP-4*, and *CCL1/I-309*) and mice (*CCL2*, *CCL7*, *CCL11*, *CCL12/MCP-5*, *CCL8*, and *CCL1*). Since many putative Bcl6/STAT-binding sequences are observed in the clusters, we examined roles of a transcriptional repressor Bcl6 in expression of these chemokine genes in alveolar epithelial cells. We showed that expression of the chemokine genes in the cluster is coordinately repressed by Bcl6 and the airway inflammation is potentially mediated by the chemokines produced by pulmonary epithelium.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：気道上皮細胞, 気道炎症, 転写因子, BCL6, Th2/Th1 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 転写抑制因子の1つである BCL6 は、標的遺伝子の染色体ヒストンを脱アセチル化することにより転写抑制因子として機能する。BCL6 はあらゆるタイプの細胞に発現し、生理的に重要な蛋白であり、その機能は多彩である。

(2) 最近、申請者らは、BCL6 が気道上皮細胞において複数のケモカイン遺伝子の発現を統合的に抑制することを見出した。ヒトとマウスでは、MCP-1 を含むケモカイン遺伝子群が類似して存在している。この領域には多くの BCL6 の結合が予想される塩基配列 (Chemokine Gene BCL6-Binding Sequence: CGBS) が存在することを見出しており、気道上皮細胞内の BCL6 は各 CGBS に結合して、この遺伝子群のヒストンの脱アセチル化を誘導し、各ケモカイン遺伝子に対して統合的な抑制性転写調節を行うことを明らかにしている。

(3) これらのケモカインはいずれも、間質性肺炎や慢性気管支炎および気管支喘息など様々な慢性気道炎症性疾患で重要な役割を果たしている。

## 2. 研究の目的

本研究は、気道上皮細胞におけるケモカイン産生など、様々な生物学的機能を解析し、さらに、その機能調節方法の研究を行うことによって、多くの慢性肺炎炎症性疾患に対する新規の治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 気管支喘息モデルの解析：動物疾患モデルの解析をするために、サーファクタントプロテイン C (SPC) 遺伝子プロモーターを利用して肺上皮細胞の内因性 BCL6 の機能を抑制する SPC-BCL6-DN-Tg と BCL6 の過剰発現させた SPC-BCL6-Tg マウスを作製した。

(2) 気管支喘息モデルの解析：野生型マウ

ス、SPC-BCL6-Tg マウス、SPC-BCL6-DN-Tg マウスの気管支喘息モデルの経時的な解析によって、発症のみならず病態の維持について検討する。各マウスそれぞれに対し、卵白アルブミン (OVA) /alum で腹腔感作を day1、day5 に行い、day15 に 2 回 1%OVA を吸入暴露する。抗原吸入最終曝露 48 時間に気管支肺胞洗浄 (BAL) および肺組織より RNA を抽出する。BAL 液中の炎症細胞の解析および CCL2 濃度を測定する。また、肺組織中の各ケモカインの mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法で測定する。

(3) 肺線維症モデルの解析：各マウスに対しブレオマイシン 5 $\mu$ g/g を経気道的に投与する。その後、14 日目に BAL 液中コラーゲンの測定および肺線維化について組織学的解析を行った。

(4) 肺線維症に対する Th2 サイトカインの役割：T 細胞に特異的に BCL6 が過剰発現する Lck-BCL6-Tg マウスは T 細胞の Th2 サイトカインの産生が抑制される。そこで肺線維症に対する Th2 サイトカインの役割を明らかにするために、Lck-BCL6-Tg および野生型マウスに対し喘息モデルと同様に OVA/alum で腹腔感作し、OVA を吸入させた。その後ブレオマイシン 5 $\mu$ g/g を経気道的に投与し、14 日後に BAL 液中の炎症細胞の解析およびコラーゲンの測定をした。また、肺線維化について組織学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 気管支喘息モデルにおける BCL6 の役割：OVA 経気道投与後の BAL 中の炎症細胞の中で、好酸球およびマクロファージは野生型マウスと比べて SPC-BCL6-DN-Tg マウスで増加し、PC-BCL6-Tg マウスで有意に減少した。また、肺組織中の CCL2、CCL7、CCL11、CCL8、CCL1、各ケモカインの mRNA の発現は野生型マウスと比べて、SPC-BCL6-DN-Tg マウスで亢

進し、PC-BCL6-Tg マウスで有意に減弱した。これらのケモカインはいずれも気管支喘息の病態に関与することがすでに知られていることから、肺上皮細胞における CCL2 を含むケモカイン遺伝子群に対する BCL6 の転写抑制活性が気管支喘息の肺炎を抑制的に作用すること考えられる。

(2) 肺線維症モデルにおける BCL6 の役割：ブレオマイシン経気道投与後の肺線維化は、野生型マウスと比べて SPC-BCL6-DN-Tg マウスで増悪し、SPC-BCL6-Tg マウスで軽減した。また、BAL 中のコラーゲン量は野生型マウスと比べて、SPC-BCL6-DN-Tg マウスで増加し、PC-BCL6-Tg マウスで有意に減少した。これらのケモカインはいずれも肺線維症の病態に関与することがすでに知られていることから、肺上皮細胞における CCL2 を含むケモカイン遺伝子群に対する BCL6 の転写抑制作用は気管支喘息と同様に肺線維症の病態に抑制的に働くと考えられる。

(3) 肺線維症に対する T 細胞の役割：肺線維症に Th2 サイトカイン関与することが今までに示唆されており、BCL6 は Th2 サイトカインの産生を抑制することから、ヘルパー T 細胞からのサイトカインの影響を明らかにする目的で、リンパ球に BCL6 が過剰発現する Lck-BCL6-トランスジェニックマウスを用いたアレルギーモデルにおけるブレオマイシンによる肺線維症について解析した。その結果、BAL 中 Th2 サイトカイン量は野生型マウスに比べて Lck-BCL6-トランスジェニックマウスで有意に減少し、また、好酸球やマクロファージおよびリンパ球数は減少した。しかし、Lck-BCL6-トランスジェニックマウスの肺線維化は野生型マウスと比べ明らかな差異を認めず、肺線維化に対して Th2 サイトカインの明らかな関与を認めなかった。これらの結果から、肺線維化には気道上皮細胞から

産生される CCL2 を含む複数のケモカインが重要な役割をしていると考えられた。

(5) まとめ：以上の解析より、BCL6 は肺上皮細胞のケモカイン遺伝子クラスターに存在するケモカイン遺伝子群の発現を網羅的に制御することによって様々な炎症性肺疾患の病態に対して抑制的な役割を果たすことが示唆された。したがって、BCL6 の機能調節法の確立が新たな慢性炎症性肺疾患の新規治療法の開発に繋がる可能性があると考えられる。

#### 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 7 件)

1. Ohtsuka, H., Sakamoto, A., Horigome, S., Ichii, H., Arima, M., Hatano, M., Okada, S., and Tokuhisa, T. Bcl6 is required for the development of mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Immunol.* 2011, 186:255-63. 査読有
2. Hirata, H., Arima, M., Fukushima, Y., Honda, K., Tokuhisa, T., Fukuda, T. MD. Overexpression of the leukotriene C<sub>4</sub> synthase gene in mice reproduces human aspirin-induced asthma. *Clinical & Experimental Allergy.* 2011, in press. 査読有
3. Yoshida, N., Kitayama, D., Arima, M., Sakamoto, A., Inamine, A., Takano, H., Grusby, M.J., Hatano, M., Koike, T., Tokuhisa. CXCR4 expression on activated B cells is down-regulated by CD63 and IL-21. *J Immunol.* 2011, 186: 2800-8. 査読有
4. Hirata, H., Arima, M., Fukushima, Y., Ishii, Y., Tokuhisa, T., Fukuda, T. Effects of Th2 pulmonary inflammation in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

- Respirology*. 2008, 13:788-98. 査読有
5. Kitayama, D., Sakamoto, A., Arima, M., Hatano, M., Miyazaki, M., Tokuhisa, T. A role for Bcl6 in sequential class switch recombination to IgE in B cells stimulated with IL-4 and IL-21. *Mol Immunol*. 2008, 45:1337-45. 査読有
  6. Saito, T., Kitayama, D., Sakamoto, A., Tsuruoka, N., Arima, M., Hatano, M., Miyazaki, M., Tokuhisa, T. Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. *Immunobiology*. 2008, 213:545-55. 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Arima Masafumi: A critical role of the intron enhancer element of the IL-4 gene in Th2 cytokine expression. 日本免疫学会総会・学術集会. 2010年12月3日 大阪市
2. 有馬雅史：転写抑制因子 BCL6 によるアレルギー性炎症の網羅的制御機序（教育講演）。第 60 回日本アレルギー学会。2010年11月25日 東京都
3. 有馬雅史：ヘルパーT細胞 Th1/Th2 細胞を中心としたその発生分化に迫る：Th2 サイトカイン発現に対する IL-4 遺伝子イントロンエンハンサーの機能。日本免疫学会総会・学術集会。2008年11月1日 京都市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devgen/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有馬 雅史 (ARIMA MASAFUMI)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：00202763

### (2) 研究分担者

幡野 雅彦 (HATANO MASAHIKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：20208523