

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）  
研究期間： 2008～2009  
課題番号：20790563  
研究課題名（和文） CCL1 遺伝子改変マウス作成による呼吸器感染症の病態研究  
研究課題名（英文） The study of pathogenesis during respiratory tract infection using CCL1 gene targeted mouse  
研究代表者  
井上 純人（INOUE SUMITO）  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号：70466621

## 研究成果の概要（和文）：

CCL1 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターをマウスへ導入し、肺組織特異的に CCL1 を強発現する遺伝子改変マウスを作製した。本マウスの肺組織において CCL1 遺伝子の発現が亢進していることを確認した。以上の解析により CCL1 が肺特異的に発現する遺伝子改変マウスが作製されたことが確認された。今後は遺伝子改変マウスの個体数を確保した上で細菌感染症や肺気腫の誘導による病態の検討を行う計画である。

## 研究成果の概要（英文）：

We originally established novel gene targeted mice, which can strongly express the CCL1 only in the lung tissues under the control of surfactant protein C (SP-C) promoter. To date, we confirmed that significantly higher expression of CCL1 in bronchial alveolar fluid (BALF) in CCL1 gene targeted mice, compared with control mice. To evaluate the role of CCL1 during the respiratory infection or pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, bacterial infection or pulmonary emphysema will be induced in these mice.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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：CCL1, COPD, 呼吸器感染症

## 1. 研究開始当初の背景

肺気腫をはじめとする慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) は主に喫煙を原因として末梢気道が障害され、肺胞が破壊されることにより発症する疾患である。重喫煙者の約 15% が COPD に罹患するといわれ、本邦の疫学的研究では 530 万人以上、40 歳以上の成人男子の少なくとも 8% 以上に潜在的な COPD 患者がいるという報告がなされている。また全世界的にも発症数、死亡者数が増加しており、現在 WHO の統計においても全世界の死亡原因の 4 位であり、2020 年までにはその順位が更に上昇することが予想されている重要な疾患である。現在に至っても根治的な治療法は確立しておらず、本疾患の病態を理解し新しい治療法を確立することは急務の課題と言える。

COPD 患者の転帰における重要な課題は、咳嗽や喀痰の増加、呼吸困難の増悪といった症状を呈し、ときに致死的な呼吸不全に至る急性増悪という病態である。急性増悪は COPD 管理のためのガイドラインでも、治療の最重要項目の一つに挙げられている。その原因は呼吸器感染症、心不全、不整脈などが挙げられているが、中でも呼吸器感染症が原因の大半を占めている。そのため呼吸器感染症対策が COPD 患者にとって最も重要な対策と考えられている。しかし COPD 患者の感染防御機構減弱のメカニズムに関しては、未だ十分に解明されていなかった。

我々は COPD の代表的疾患である肺気腫を動物モデルに再現し、市中肺炎の代表的な起炎菌である肺炎球菌の感染で、気腫化肺に惹起される炎症及び免疫反応の特異性を検討した。すなわちマウスへブタ隣エラストラーゼを投与し肺気腫を作成後、肺炎球菌を感染させた。結果肺気腫形成群では感染後の肺局所での炎症防御反応が低下し、重篤な全身性炎症により死亡率が上昇するということを見出した (Inoue S, et.al. Am J Respir Crit Care Med. 2003)。

引き続いての研究では、肺気腫形成群における肺胞マクロファージ上の Toll like receptor (TLR) 2,4 の発現が有意に亢進しており、細菌感染後の肺局所における免疫反応が修飾されていることを発見した (Tokairin et.al Respirology 2008)。

また臨床的な知見としては、山形県内に

おける 276 名の COPD 患者の疫学的調査により、頻回に急性増悪を起こす群では、そうでない群に比較して有意に体格指数 (BMI) 予測一秒量が減少していた (Logistic 解析、Fisher's exact test)。そして遺伝子多型解析により、免疫細胞の遊走における中心的な役割を演じるとされる Chemokine (C-C motif) ligand の一つである CCL1 の遺伝子多型 (NCBI: rs2282691, CCL1-SNP-3) が優性遺伝モデルにて気道感染回数と有意な相関関係が認められた。更に多変量解析を加えると、BMI 及び予測一秒量は急性増悪回数との間に有意な相関は認められなくなり、CCL1-SNP-3 のみが有意な相関を残した。

すなわち、CCL1-SNP-3 が COPD 患者における気道感染性を支配する最も重要な因子であることが示唆された。また CCL1-SNP3 の遺伝子多型の中で A アレルを有する場合有意に生存率が低下し、更に AA アレルのホモを有する場合は AT のヘテロより生存率が低下しているという、非常に興味深い結果を得た (Takabatake et.al Am J Respir Crit Care Med. 2006)。

これまでの我々の知見を総括すると、COPD の病態においては感染症への対策が最も重要であり、侵入する病原体を受けとめる宿主の免疫学的特性を理解することは、感染症における病態形成において最も重要な要素であると考えられる。特に CCL1 は宿主気道感染性を決定付ける因子である可能性が極めて高いと考えられる。

これまでに CCL1 の機能についてはアレルギー疾患、気管支喘息において報告が散見されるが、呼吸器感染症領域における報告はなく、我々の研究による新知見である。この点からも当研究は非常に独創性が高いと考えられる。

更に前述の通り CCL1 は我々の行った COPD 患者における呼吸器感染症と強い相関性を有することが証明されている。よって CCL1 は宿主気道感染性を決定づける因子である可能性が高いと考えられる CCL1 の呼吸器感染症における役割を解明することは、COPD の急性増悪だけでなく、広く呼吸器感染症全般における臨床病態の解明に直結し、治療に結びつけることが期待できる。

## 2. 研究の目的

我々は CCL1 遺伝子改変マウスを作成し、その機能を深く検討することを計画した。

呼吸器感染症の免疫反応において CCL1 がどのような役割を演じているのかを検討する計画を立てた。具体的には CCL1 遺伝子を導入した遺伝子改変マウスを作成し、その後細菌性気道感染を引き起こすことにより、肺での免疫反応を観察することとした。

CCL1-SNP-3 はアミノ酸変異を伴わない遺伝子プロモーター領域の SNP である。当 SNP A-allele では転写因子 C/EBPB への結合が高度に障害されており CCL1 の発現量が減弱しているものと予測される。そのため遺伝子改変マウスにて肺内の CCL1 発現量を変動させることになり、その肺内での役割が明らかにされるものと思われる。

## 3. 研究の方法

### (1)肺組織特異的 CCL1 発現マウスの作成

肺組織に特異的に遺伝子発現を可能にする SP-C プロモーターを用いて、CCL1 遺伝子を融合させたプラスミドベクターを作成する。SP-C プロモーターベクターは Dr Whitsett JA (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, OH, USA) より譲渡されており、当実験計画に関しても了解を得ている。当年度では、この作成したプラスミドベクターを用いて、SP-C 制御下に肺組織に特異的に CCL1 を発現させるマウスを、当大学の遺伝子実験施設において作成する。

### (2)SP-CCCL1 プラスミドベクターの作成

CCL1 cDNA の作成；ヒトマクロファージ培養細胞を Interferon-gamma で刺激し、RT-PCR 法にて full length CCL1 cDNA を増幅し、クローニングベクターに挿入する。この際プライマーに制限酵素の切断部位が入るようにデザインする。正しい cDNA が挿入されていることをシークエンスを行い確認する。

SP-CCCL1 プラスミドの作成；譲渡されたオリジナルの SP-C プロモータープラスミドベクターのプロモーター下流を制限酵素で切断する。さらにクローニングされた CCL1 プラスミドベクターもコンピテントセル内で増幅後に制限酵素で切断し、CCL1 cDNA を精製する。制限酵素で切断した SP-C プロモータープラスミドベクターと CCL1 cDNA をライゲーション

することによって、目的とするプラスミドが完成する。

### (3)肺特異的 CCL1 発現マウスの作成

マウス胚細胞へ、SP-C プロモーター CCL1 プラスミドベクターをマイクロインジェクションにより導入する。その後雌マウス卵管へ戻してやることによって、キメラマウスを作製する。野生株のマウスと交配して得られた子孫の尾 DNA よりマウスの Genotype を判定し、肺特異的 CCL1 強発現マウスと対照マウスを選別する。

当計画は当大学遺伝子実験施設へ受託され遂行される。

### (4)肺特異的 CCL1 発現マウスの表現型の検討

得られたマウスの全身の病理組織を検討し、異常の有無を確認する。特に肺組織や気管支肺胞洗浄液中の所見がどのような変化をしているかを詳細に検討する。また肺組織特異的に強発現しているかを免疫染色で検討する。

### (5)CCL1 発現マウスへの喫煙負荷

本遺伝子改変マウスと対照マウスに対して喫煙負荷装置(MIPS 社)を用いて、2本/日×6ヶ月間(週5日間)の長期間にわたり全身暴露喫煙負荷をかける。我々は以前この方法を用いてマウスに肺気腫が形成されることを報告している(Hirama N et al. Respiriology 2007)。よって当方法にて確実に肺気腫が形成されることが期待できる。

### (6)喫煙負荷 CCL1 発現マウスにおける細菌性気道感染後の病態の検討

喫煙負荷により当マウスは肺気腫が形成されていることから、肺気腫における細菌感染症を実験的に作成し、肺局所での免疫反応を検討する。前年度に施行予定の遺伝子改変マウスへの細菌性呼吸器感染症の作成と同様の方法で検討を行う計画である。

## 4. 研究成果

平成20年度にはCCL1遺伝子を組み込んだプラスミドベクター(図1)をマウスへ導入し、遺伝子改変マウスを作製した。平成21年度には遺伝子改変マウスの表現型の確認を行い、目的遺伝子が遺伝子改変マウスに発現していることを確認した。更に肺特異的に発現する遺伝子を導入したため、肺組織におけるCCL1遺伝子の発現が亢進していることを確

認した。血清及び気管支肺胞洗浄液中のCCL1発現量をELISA法で測定した。遺伝子改変マウスにおいて、特に気管支肺胞洗浄液中でCCL1が有意に高値を示した(図2)。

以上の解析によりCCL1が肺特異的に発現する遺伝子改変マウスが作製されたことが確認された。今後は遺伝子改変マウスの個体数を確保した上で細菌感染症や肺気腫の誘導による病態の検討を行う計画である。

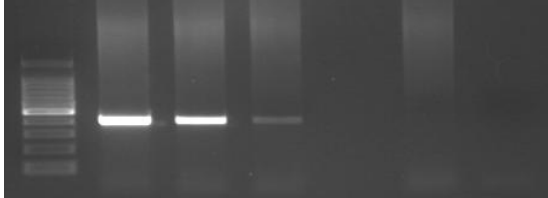


図1 CCL1 遺伝子導入を行ったプラスミドの作製

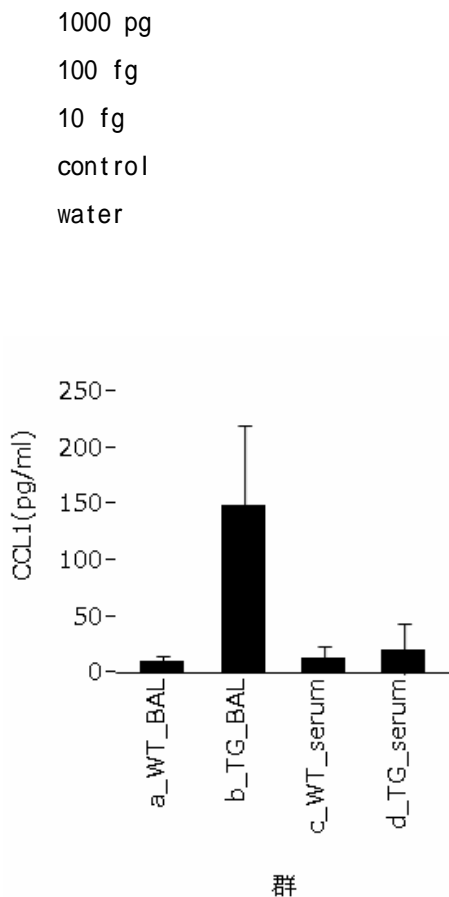


図2 CCL1 発現量の検討

a, 野生型マウス 気管支肺胞洗浄液

b, 遺伝子改変マウス 気管支肺胞洗浄液

c, 野生型マウス 血清

d, 遺伝子改変マウス 血清

遺伝子改変マウスにおいて、気管支肺胞洗浄液中の CCL1 発現量は他群に比較して有意に亢進していた。

## 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)

Yamauchi K, Shibata Y, Kimura T, Abe S, Inoue S, et.al. Azithromycin suppresses interleukin-12 p40 expression in lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated macrophages. Int J Biol Sci. 23, 2009, 667-78. 査読有

Inoue S, Nakamura H, Shibata Y et.al. Effect of antibiotic therapy on the inflammatory responses during streptococcal pneumonia in emphysematous mice. EXCLI Journal 8, 2009, 50-7. 査読有

Igarashi A, Shibata Y, Yamauchi K, Osaka D, Takabatake N, Abe S, Inoue S, et.al. Gly80Ser Polymorphism of Phospholipase A2-IIID Is Associated with Cytokine Inducibility in A549 Cells. Respiration. 78, 2009, 312-21. 査読有

Takabatake N, Toriyama S, Igarashi A, Tokairin Y, Takeishi Y, Konta T, Inoue

S, et. al. A novel polymorphism in CDC6 is associated with the decline in lung function of ex-smokers in COPD. Biochem Biophys Res Commun. 17;381(4):554-9. 2009. 査読有

井上純人、柴田陽光、阿部修一

COPD と遺伝子多型

呼吸 vol. 28, 2009, 361-365.

査読無

Shibata Y, Abe S, Inoue S, et. al. Altered expression of antimicrobial molecules in cigarette smoke-exposed emphysematous mice lungs. Respirology. 13(7):1061-5. 2008. 査読有

[学会発表](計3件)

Hiroyuki Kishi, Sumito Inoue, et. al. Exercise tolerance in patients with chronic obstructive pulmonary disease is independent of resting pulmonary or cardiac functions. American Thoracic Society 2010, May 2010, New Orleans, USA

Daisuke Osaka, Yoko Shibata, Shuichi Abe, Sumito Inoue, et. al. Cigarette smoking causes airflow limitation in Japanese healthy individuals: Takahata Study. American Thoracic Society 2010, May 2010, New Orleans, USA

Michiko Sato, Yoko Shibata, Tomomi Kimura, Shuichi Abe, Sumito Inoue, et. al. Decrease in the numbers of

alveolar macrophage in dominant negative MafB transgenic mice. American Thoracic Society 2010, May 2010, New Orleans, USA

[図書](計0件)

[産業財産権](計0件)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 純人 (INOUE SUMITO)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70466621

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし