

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20857

研究課題名（和文）ケモカイン受容体CCR4機能阻害によるCOPD進展抑制の研究

研究課題名（英文）Inhibition of COPD development by inhibiting chemokine receptor CCR4 function.

研究代表者

町田 浩祥（Machida, Hiroyoshi）

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00910382

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：ケモカイン受容体CCR4ノックアウトマウスに対し、2日間の短期間喫煙曝露を行った。気管支肺胞洗浄（BAL）を施行し、細胞数および分画の評価を行ったところ、対照マウスでは喫煙曝露後のBAL中総細胞数およびマクロファージ分画の増加を認め、遺伝子改変マウスではその増加が有意に抑制されていた。

さらに同マウスに対し、6か月間の長期間喫煙曝露を行い、組織学的な検討を行った。結果、肺気腫の定量的な評価指標である平均肺胞間距離（Mean linear intercept; MLI）は遺伝子改変マウス群で有意に低下しており、遺伝子改変マウスでは肺気腫形成が抑制されていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は世界の死因の上位を占め、呼吸機能低下による身体活動の低下は健康寿命を損なう大きな原因となる重要な疾患である。COPDは主に喫煙を原因として発症するが、喫煙者の一部にのみ発症するため何らかの喫煙感受性の存在が指摘されている。本研究により喫煙による肺組織の炎症や肺気腫形成にCCR4が関わっていることを示し、本因子がCOPD発症の病態形成に大きな役割を持つ可能性があることを示唆した。現在COPDの発症を予防したり根治したりする方法は存在しないため、本研究は将来COPDの治療や発症予防に対し、創薬を期待することができる大変意義深いものである。

研究成果の概要（英文）：Chemokine receptor CCR4 knockout mice were exposed to cigarette smoking for 2 days. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed and cell counts and fractions were assessed. Even though control mice showed an increase in total cell counts and macrophage fractions in the BAL after smoking exposure, this increase was significantly suppressed in the knockout mice. In addition, these mice were exposed to cigarette smoking to 6 months, and a histological examination was performed. The results showed that the mean linear intercept, a quantitative measure of pulmonary emphysema, was significantly reduced in knockout mice, indicating that emphysema formation in the lung was suppressed in the absence of CCR4 in mice.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 CC chemokine ligand 17 CC chemokine receptor 4

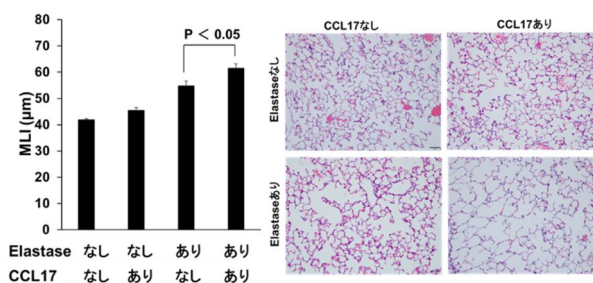
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は喫煙を主とする有毒ガス・粒子への長期間曝露により生じる。世界的に罹患率・死亡率が増加しており、死因の第3位を占める公衆衛生的に非常に重要な疾患である (WHO 2020)。本疾患は気道の慢性炎症と肺胞の破壊による肺気腫が混在し、呼吸機能が経年的に低下していく。結果呼吸困難により身体活動性が低下し死に至るが、COPD 呼吸機能の経年変化は個人差が極めて大きく、その相違を特定しうる有用なバイオマーカーの理解は病態解明に極めて重要である。

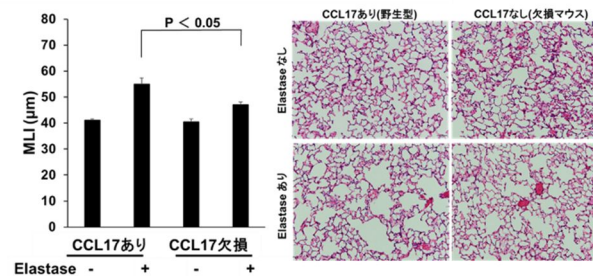
我々は安定期 COPD 患者を対象とした前向き研究により、CC chemokine ligand 17 (CCL17)/Thymus- and activation-regulated chemokine (TARC) が、COPD の呼吸機能評価に最も重要である一秒量の急速低下を予測する独立した因子であることを明らかとした。(Allerogology International, 2021;70:81-88)。CCL17 は CC chemokine receptor 4 (CCR4) に結合し、リンパ球などの細胞の遊走に関わるケモカインである。アトピー性皮膚炎・アレルギー性鼻炎など 2 型炎症との関連が多く報告されている。一方で 1 型炎症との関連やマクロファージの遊走への関与も指摘されている。また、気道上皮がサイトカイン刺激にตอบสนองして CCL17 産生を誘導することも報告されている。これらの知見を基に、気道上皮は喫煙にตอบสนองして CCL17 を産生し、産生された CCL17 はマクロファージ上の CCR4 に結合し、更にその集積を増加させ、肺気腫形成を増強させる、という仮説を立て、検討を行った。その結果、喫煙刺激にตอบสนองし肺組織中の CCL17 産生が増加し、気道上皮に特異的に発現していることを示した。マウスに CCL17 を経鼻投与することで、喫煙曝露により増加した肺胞マクロファージの増加を増強させ、エラスターゼ誘導肺気腫形成を増強することを示した (図 1)。

図1 CCL17はエラスターゼ誘導肺気腫形成を増強する



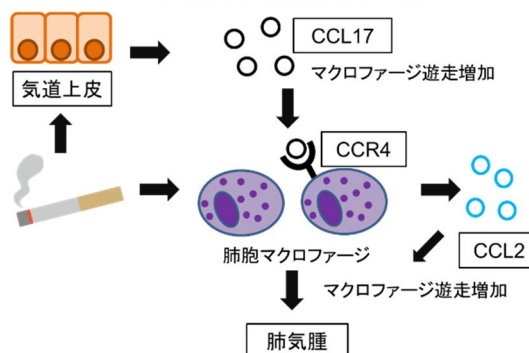
更に単球マクロファージ細胞株を CCL17 で刺激することで、マクロファージ遊走能を有する因子である CCL2 産生が増加し、CCR4 の欠損によりこの増加が抑制されることを示した。そして CCL17 欠損マウスでは、エラスターゼ誘導肺気腫が有意に抑制された (図 2) (Am J Respir Cell Mol Biol. 2022;66:428-438.)。

図2 CCL17/TARC抑制がエラスターゼ誘導肺気腫を減弱させる



これらの知見から、CCL17-CCR4 は COPD の病態形成に深く関与すると考えられた。すなわち喫煙刺激により気道上皮から産生される CCL17 はマクロファージ上の CCR4 に結合することでマクロファージを肺胞腔内に遊走させる。さらにマクロファージから産生される CCL2 がさらにマクロファージを集積させ、肺胞腔内の炎症が増悪し、肺気腫を形成すると考察した (図 3)。本研究では、CCR4 がどのような分子機序で COPD の病態に関与するか、CCR4 の抑制が肺気腫形成を抑制させるか、ということ学術的な問いとした。

図3 CCL17及びCCR4の肺気腫形成への関与



2. 研究の目的

本研究の目的は COPD の発症および進展における CCR4 の役割を検討することで、COPD の病態を解明し、CCR4 抑制による COPD の新規治療法を確立することである。CCL17、その受容体である CCR4 はこれまで 2 型炎症においてリンパ球を遊走する因子として認識されており、1 型炎症である COPD との関連については言及されていない。またマクロファージの遊走との関連も明らかでない点が多い。CCR4 阻害薬は一部の悪性腫瘍に対して我が国において臨床使用されており、CCR4 が COPD の病態に関与し、更にその抑制が肺気腫形成を抑制することが明らかとなれば、新たな治療選択肢となる可能性がある。

3. 研究の方法

1. 遺伝子改変マウスを用いた喫煙曝露誘導マクロファージ集積における CCR4 の役割の検討

近畿大学薬学部化学療法学研究室（教授 中山隆志先生）の協力で、CCR4 ノックアウトマウスを提供頂いており、この遺伝子改変マウスを用いて研究を進めた。短期間の喫煙曝露を行い、肺組織を摘出し、RNA を採取した上で全肺組織に発現するサイトカイン発現を検討した。さらに気管支肺胞洗浄を行い、総細胞数および細胞分画を検討した。

2. 遺伝子改変マウスを用いた実験的肺気腫モデルにおける CCR4 の影響の検討

CCR4 を抑制することでマクロファージ誘導が抑制できれば、肺の組織学的な変化も抑えられる可能性が高いと考えられた。CCR4 ノックアウトマウスに喫煙曝露を 6 ヶ月間行い肺気腫を誘導する実験を行った。肺組織標本において、平均肺胞間距離を測定し、肺気腫の程度を野生型と比較検討した。さらに組織標本を CCR4 で免疫染色し、肺組織内の CCR4 発現強度とその分布を検討した。

4. 研究成果

1. 遺伝子改変マウスを用いた喫煙曝露誘導マクロファージ集積における CCR4 の役割の検討

CC chemokine receptor 4 (CCR4) ノックアウトマウスは、近畿大学から凍結胚の状態を提供を頂いた。凍結胚からの立ち上げには問題なく、CCR4 遺伝子の欠損については DNA サンプルから genotyping を行い、ホモ欠損のマウスを選抜した。同腹の遺伝子非欠損マウスを選抜し、対照マウスとした。本遺伝子改変マウスの外観、および成長については対照群と比較して相違はなく、実験遂行において十分な個体数も確保できた。

まず野生型マウス（対照マウス）に対し、2 日間の喫煙曝露を行い、全肺組織を採取した。肺組織から RNA を抽出し、rt-PCR を行ったところ、非喫煙群と比較して、喫煙群においては CCL17 の発現が有意に上昇していた。この結果から喫煙曝露により肺組織中の CCL17 発現が亢進しており、その受容体である CCR4 が喫煙曝露により誘導される肺組織中の炎症反応に深く関わっていることが推定できた。

続いて CCR4 ノックアウトマウスおよび対照マウスに対し、2 日間の喫煙曝露を行い、気管支肺胞洗浄（BAL）を行った。洗浄液中の細胞数および分画を検討したところ、非喫煙群では対照マウスおよび CCR4 ノックアウトマウスにおいて総細胞数および細胞分画に有意差は認めなかった。7 日間の喫煙曝露を行ったところ、対照マウスにおいて総細胞数およびマクロファージ分画の有意な増加を認めた。しかし CCR4 ノックアウトマウスにおける喫煙曝露後の総細胞数およびマクロファージ数は、対照マウスの喫煙曝露群より有意に低値であり、短期間の喫煙曝露による炎症反応の誘導が有意に抑制されていることが示唆された（図 4）。

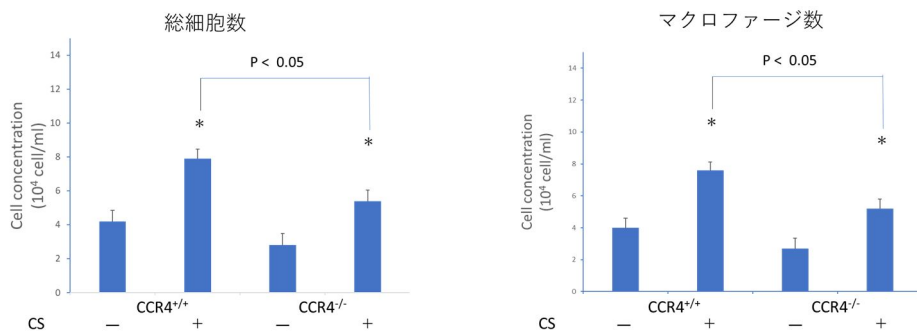


図 4 7 日間喫煙曝露後の BAL 中細胞の解析。 左；総細胞数、右；マクロファージ数

2. 遺伝子改変マウスを用いた実験的肺気腫モデルにおける CCR4 の影響の検討

CCR4 ノックアウトマウスに対し、喫煙曝露を 6 ヶ月間行った。当施設における先行研究で 6 か月間の喫煙曝露により野生型のマウスは肺気腫を形成することを示してきた。6 か月間の喫煙曝露後の肺組織標本を採取し、顕微鏡的観察および、平均肺胞間距離を測定し、肺気腫の程度を対照群と比較検討した。

その結果を図 5 に示すが、喫煙を曝露しなかったマウス (図 5 上段) では、対照群 (上段左) およびノックアウトマウス群 (上段右) のいずれも肺胞構造の変化は認めなかった。喫煙曝露を行ったマウス (下段) では、対照群 (下段左)、ノックアウトマウス群 (下段右) のいずれも肺胞腔の拡大を認めたが、その程度はノックアウトマウス群で軽度であった。

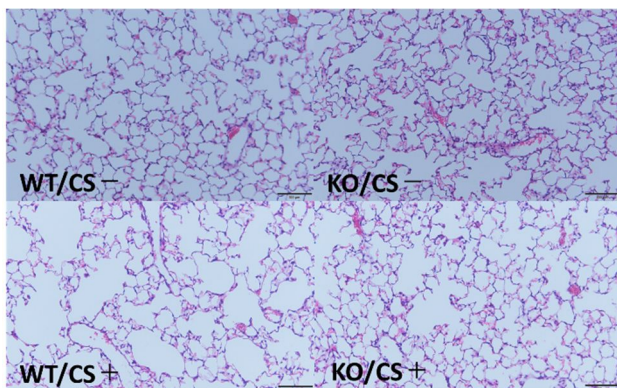


図 5 喫煙曝露前後の肺組織像
上段は非喫煙
下段は喫煙曝露 6 か月後
左は対照マウス、右は CCR4 ノックアウトマウス

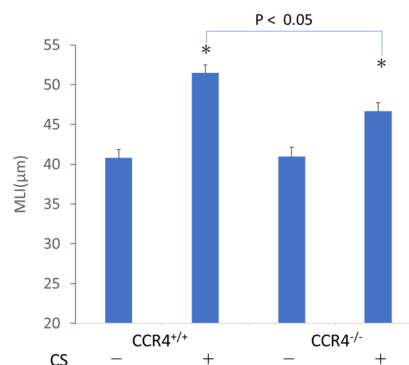


図 6 各群の平均肺胞間距離

組織所見から平均肺胞間距離を測定したところ、喫煙曝露により平均肺胞間距離は大きくなっていったが、喫煙後のノックアウトマウス群では対照群より有意に低値であることが示された (図 6)。

喫煙による肺気腫形成に CCR4 の有無が大きく関わっていることが明らかとなったため、喫煙曝露後の標本を CCR4 で免疫染色し、CCR4 の局在を検討したところ、非喫煙群では対照群においてマクロファージでの発現が軽度認められたが、喫煙曝露後にその強度が増強していることが示された (図 7)。

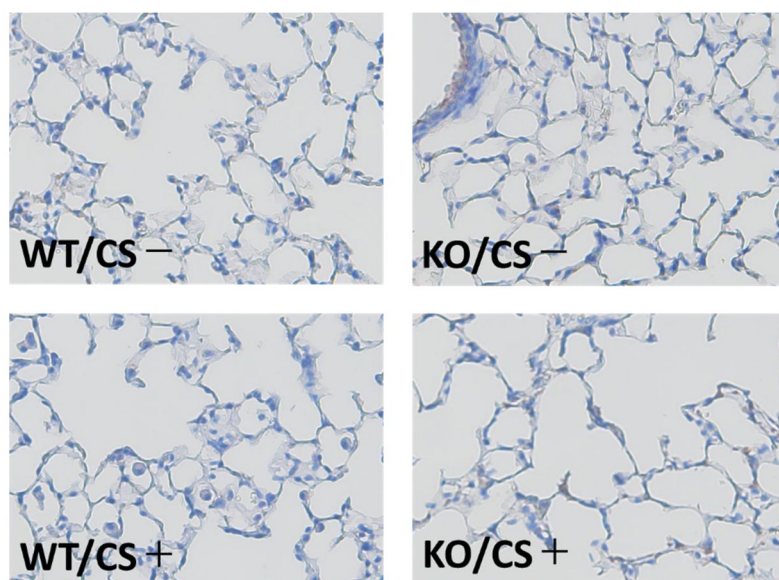


図 7
喫煙曝露前 (上段)
喫煙曝露後 (下段)
対照マウス (左)
CCR4 ノックアウトマウス (右)

喫煙曝露により対照マウスにおいてマクロファージの集積が観察され、マクロファージが CCR4 を発現していることが示された。

< 引用文献 >

Machida H, Inoue S, Shibata Y, Kimura T, Sato K, Abe K, Murano H, Yang S, Nakano H, Sato M, Nemoto T, Sato C, Nishiwaki M, Yamauchi K, Igarashi A, Tokairin Y, Watanabe M. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) predicts decline

of pulmonary function in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Allergol Int.* 2021;70:81-88. doi: 10.1016/j.alit.2020.04.004.

Machida H, Inoue S, Igarashi A, Saitoh S, Yamauchi K, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Nakano H, Yang S, Furuyama K, Murano H, Ishibashi Y, Ota T, Nakayama T, Shibata Y, Watanabe M. Role of CC Chemokine Ligand 17 in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2022;66:428-438. doi: 10.1165/rcmb.2021-00690C.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Machida H, Inoue S, Igarashi A, Saitoh S, Yamauchi K, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Nakano H, Yang S, Furuyama K, Murano H, Ishibashi Y, Ota T, Nakayama T, Shibata Y, Watanabe M	4. 巻 66
2. 論文標題 Role of CC Chemokine Ligand 17 in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 428-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2021-00690C.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Machida H, Inoue S, Shibata Y, Kimura T, Ota T, Ishibashi Y, Murano H, Furuyama K, Yang S, Nakano H, Sato K, Sato M, Nemoto T, Nishiwaki M, Yamauchi K, Igarashi A, Watanabe M.	4. 巻 16
2. 論文標題 The Incidence and Risk Analysis of Lung Cancer Development in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Possible Effectiveness of Annual CT-Screening.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.	6. 最初と最後の頁 739-749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/COPD.S287492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano H, Inoue S, Minegishi Y, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Machida H, Yang S, Murano H, Watanabe M, and Shibata Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hyperhomocysteinemia on a murine model of smoke-induced pulmonary emphysema.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 12968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16767-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 町田浩祥, 太田隆仁, 石橋 悠, 邨野浩義, 古山広大, 梁 秀鼎, 中野寛之, 佐藤建人, 根本貴子, 西脇道子, 山内啓子, 佐藤正道, 五十嵐朗, 井上純人, 渡辺昌文
2. 発表標題 Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) KOマウスを用いたCOPDの病態についての検討 Examination of the pathophysiology of COPD using Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) KO mouse
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 邨野浩義, 町田浩祥, 中野寛之, 佐藤建人, 佐藤正道, 五十嵐朗, 井上純人, 柴田陽光
2. 発表標題 肺気腫形成にホモシステインが及ぼす影響の検討 Effects of homocysteine on emphysema formation.
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関