

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591111

研究課題名(和文)新規遺伝子改変マウスによるCCL1の呼吸器細菌感染症における機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of CCL1 during respiratory tract infection in C-C motif ligand-1 transgenic 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性ケモカインであるChemokine (C-C motif) ligand 1(CCL1) (NCBI: rs2282691) を肺組織特異的に高発現させる遺伝子改変マウスを作成し、Bacille de Calmette et Guérin (BCG)の気管内投与を行ったところ、遺伝子改変マウス群で肺組織内での肉芽形成が促進されているという結果が得られた。RNAを抽出しマイクロアレイを行ったところ、遺伝子改変マウスにおいて、小胞体ストレスや肉芽腫の形成に関与すると考えられているErn1という遺伝子の発現が対照群と比較して亢進していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We generated the CCL1 (NCBI: rs2282691) transgenic mice using surfactant protein C promoter (SPC-CCL1 Tg), which overexpressed CCL1 gene in the lungs. We developed the Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin (BCG) infection models in SPC-CCL1 Tg mice. Microscopic observation revealed that the numbers of granulomas in the lungs were significantly increased in SPC-CCL1 Tg mice. In DNA microarray analyses, 4,569 genes had 3 times and higher or one third and lower expression in the lung of Tg mice compare to that of WT mouse. Hierarchical cluster analysis of those genes revealed that Ern1, that plays important roles in endoplasmic reticulum stress and in granuloma formation, was more upregulated in the lung of BCG-treated SPC-CCL1 Tg mice compared to that of wild type mice. CCL1 overexpression increased the formation of granulomas upon BCG infection in the lungs. SPC-CCL1 Tg mice showed significant gene expression of Ern1 in comparison with wild type mice.

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：呼吸器 感染症 慢性閉塞性肺疾患 遺伝子改変マウス

## 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。当教室による疫学研究 Takahata Study では喫煙者の 20% が呼吸機能検査にて気流閉塞を生じており (Osaka et al. Intern Med 2010)、わが国では約 500 万人の COPD 患者が潜在していると考えられている。統計学的な予測においても今後患者数は増加の一途を辿るとされており、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 患者の経過において、咳嗽や喀痰の増加、呼吸困難の増悪を呈する急性増悪という病態は臨床上最も重要な問題である。その原因の大半は呼吸器感染症によるものであることが知られているが、現在までに COPD 患者の感染防御機構に関するメカニズムは十分に解明されていなかった。

当教室のこれまでの研究では、肺気腫動物モデルに細菌性気道感染を誘発したところ、肺気腫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事を見出した (Inoue et.al. Am J Respir Crit Care Med. 2003, Inoue et.al. EXCLI J. 2009)。

また臨床的な知見としては、COPD 患者の疫学的調査により、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) 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を証明した。また本遺伝子多型の中で 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た。この遺伝子多型は転写因子の親和性に差をもたらすことが示され、当 SNP A-allele では CCL1 の発現量が減弱しているものと推定された。(Takabatake et.al. Am J Respir Crit Care Med. 2006)。

これら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た。特に CCL1 は宿主の気道感染に対する抵抗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た。

これまでに CCL1 の機能については気管支喘息等のアレルギー疾患における報告が主体である (Mutalithas et.al. Clin Exp Allergy. 2010)。CCL1 はリンパ球や単球等から分泌され、細胞性免疫を司る Regulatory T

cell (Treg) の機能を制御していることが報告されている (Hoelzinger et.al. J Immunol. 2010)。感染症領域における報告はわずかであり、特に結核などの慢性感染における機能が検討されているにすぎない (Thuong et.al. PLoS Pathog. 2008)。

CCL1 の細菌性呼吸器感染症における機能解析は殆どなく、我々の研究による新知見である。また CCL1 遺伝子改変マウスは我々が世界で最初に作成したものである。これらの点から本遺伝子改変マウスを用いた研究は非常に独創性が高いと考えられた (研究の独創性)。

更に本遺伝子改変マウスへ細菌性呼吸器感染症を誘発するモデルは、COPD 患者における急性増悪の最も主要な原因である呼吸器感染症の病態を検討する意味では、最も有効な動物モデルと考えられた (学術的な特性)。本研究により CCL1 の機能を詳細に検討することにより、COPD 患者における最も重要な予後因子である急性増悪だけでなく、広く呼吸器感染症における病態解明並びに治療法を飛躍的に進歩させる可能性があると考えた (新規治療法開発の可能性)。

## 2. 研究の目的

当研究の目的は、細菌性呼吸器感染症に対する免疫反応において CCL1 がどのような役割を演じているのかを明らかにすることである。

我々は既に CCL1 を肺特異的に強発現させる遺伝子改変マウスを作成することに成功した。本遺伝子改変マウスに対し気道感染を誘発することで、肺における CCL1 蛋白の発現量の差が免疫学的反応にどのような影響を及ぼすかを検討した。本研究により、呼吸器感染症における CCL1 の免疫学的機序が明らかにされることが期待できると考えた。

## 3. 研究の方法

我々は既に肺特異的に CCL1 を強発現させる遺伝子改変マウスの作成に成功している。平成 23 年度には負荷をかけない状態で本遺伝子改変マウスの肺及び各臓器表現型を検討した。更に本遺伝子改変マウスとバックグラウンドコントロールマウス (以下コントロールマウス) に気道感染を誘発し、肺局所での免疫反応を検討した。

本研究によって、COPD における呼吸器感染症による肺局所における CCL1 の役割が解明に近づくと思定される。

< 肺特異的 CCL1 発現マウスの表現型の検討 >

肺特異的 CCL1 発現マウスの作成のため、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作成し、マイクロインジェクションにより導入した。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した。野生株のマウスと交配して得られた子孫から Genotyping により遺伝子改変マウスを選抜することに成功した。

作成された遺伝子改変マウスの表現型を確認するため、肺をはじめとした全身組織において、コントロールマウスとの比較を行い、形態学的な変化を観察した。血清及び気管支肺胞洗浄液を採取し、CCL1 を ELISA 法で発現量を測定した。

CCL1 が肺組織特異的に発現していることを証明するために、遺伝子改変マウスの肺、心臓、肝臓、および腎臓の各組織を採取し、RNA を抽出した。RT-PCR により CCL1 の発現を観察した。

気管支肺胞洗浄液中の肺胞マクロファージを採取し、フローサイトメトリーにより表面抗原の発現を観察した。

< 遺伝子改変マウスにおける急性炎症モデルの病態の検討 >

個体数が確保された遺伝子改変マウスとコントロールマウスに対して、2mg/kg のリポポリサッカライドを気管内投与し、急性肺炎症モデルを作成し、投与 6 時間、24 時間、72 時間後に以下の項目を検討した。

- (1) 組織所見を比較検討した。
- (2) 気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の肺胞マクロファージ、好中球、リンパ球の動態を検討した。

< 遺伝子改変マウスにおける慢性炎症モデルの病態の検討 >

COPD の急性増悪においては、気道への細菌の定着 (Bacterial colonization) がその病態に深く関与していると考えられている (Wang et.al. Pulm Pharmacol Ther. 2010)。これまでの CCL1 における検討では急性感染症に対する報告がないため、上記のような急性感染症による検討では、CCL1 の機能が明らかにされない可能性もある。そこで遺伝子改変マウスとコントロールマウスへ対して、慢性的気道感染を誘発するため、T リンパ球などの細胞性免疫が関与していると考えられている BCG (Bacille de Calmette et Guérin) をマウスの気管内に投与し、投与 28 日後に肺内での免疫反応を観察するため、以下の項目を検討する

- (1) 気道感染後の肺組織の変化を観察した。
- (2) 肺組織より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行い、遺伝子発現の差異を検討した。
- (3) (2) で得られた結果から発現の差異が認められた因子につき免疫染色を行い、組織学的な検討を行った。

#### 4. 研究成果

遺伝子改変マウスの表現型を感染などの負荷をかけない状態で検討したところ、遺伝子改変マウスの外観や肺組織所見は、野生型マウスと比較して有意な差を認めなかった。血清及び気管支肺胞洗浄液を採取して検討を行ったところ、遺伝子改変マウスにおいては気管支肺胞洗浄液中の CCL1 濃度が野生型マウスと比較して有意に高値であることが示された。また気管支肺胞洗浄液中の肺胞マクロファージ表面抗原を解析したところ、F4/80 陽性細胞は、遺伝子改変マウスで少なかった。これらの結果から、生体内において肺組織における CCL1 過剰状態は、肺胞マクロファージの表面抗原の発現に影響を与えている可能性が示唆された。

急性炎症モデルの病態を検討するため、遺伝子改変マウスとコントロールマウスに対して 2mg/kg のリポポリサッカライドを気管内投与し、継続的に検討を行ったところ、BAL 液中の細胞数、細胞分画や組織学的な所見に両群の有意な差異は認められなかった。

BCG をマウスの気管内に投与し肺内での免疫反応を観察した。結果コントロール群と比較して、遺伝子改変マウス群では肺組織内での肉芽形成が促進されているという結果を得た (図 1)。

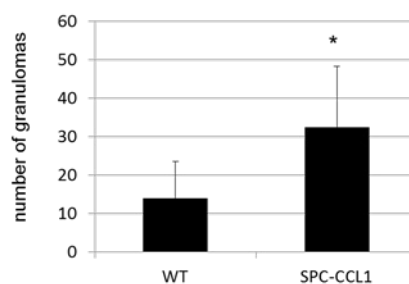
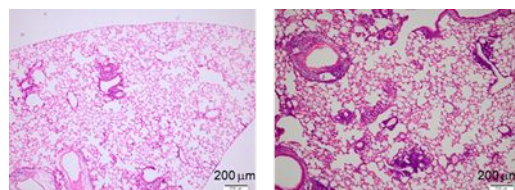


図 1 上段:BCG 投与後の肺組織所見。左; コントロールマウス、右; 遺伝子改変マウス。

下段: 組織内の肉芽腫を定量化したところ、遺伝子改変マウス群 (SPC-CCL1) ではコントロールマウス群 (WT) と比較して有意に肉芽腫の形成が多く認められた。 (\* p<0.05)

DNA マイクロアレイによる解析では遺伝子改変マウスにおいて 4569 種類の遺伝子が野生型マウスと比較して 3 倍以上の遺伝子発現の差を示していた。それらの遺伝子の中では biological process に関連する遺伝子の変動が最も多く認められた。また response to the biotic stress に関連する遺伝子 100 種類の

内、47種類に発現の変化を認めた。遺伝子改変マウスにおいて、小胞体ストレスや肉芽腫の形成に関与すると考えられている *Ern1* という遺伝子の発現が野生型マウスと比較して亢進していることが示された。

肺組織を免疫染色したところ、肺胞マクロファージや肉芽腫内の細胞の核に *Ern1* 陽性所見が観察された(図2)。

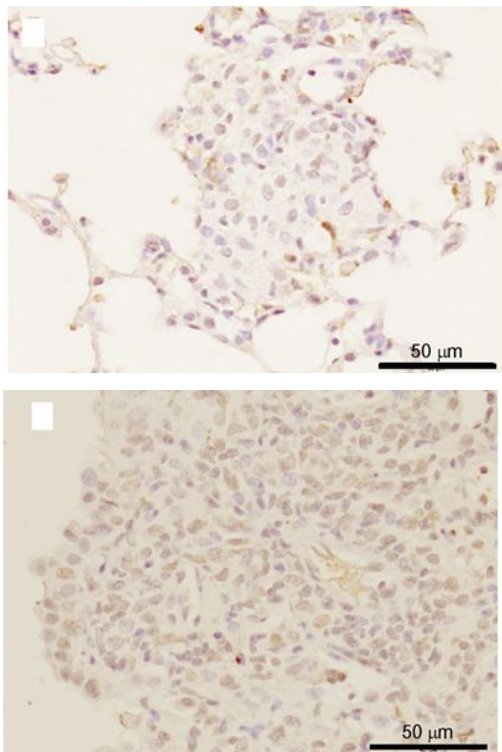


図2 免疫組織学所見：上段；コントロールマウス、下段；遺伝子改変マウス。遺伝子改変マウスの組織において肉芽腫の細胞核に *Ern1* 陽性所見を多く認めた。

結論として CCL1 を肺において過剰発現させることにより、BCG の感染によって肺における肉芽腫の形成は増加した。また野生型マウスと比較して *Ern1* 遺伝子の発現が亢進していた。これらの結果から CCL1 が呼吸器感染症において肺組織内での免疫反応において重要な役割を演じていることが示された。

## 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13件)

Relationship between Serum Level of Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor-1 and Prognosis in Patients with Lung Cancer. Nunomiya K, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Kimura T, Aida Y, Nemoto T, Sato M, Kishi H, Nakano H, Sato K, Kubota I. *J Cancer*. 2014;5(3):242-247. 査読有

A lower level of forced expiratory volume in 1 second is a risk factor for all-cause and cardiovascular mortality in a Japanese population: the Takahata study. Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Abe S, Aida Y, Nunomiya K, Sato M, Nakano H, Sato K, Nemoto T, Kimura T, Watanabe T, Konta T, Daimon M, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. *PLoS One*. 2013;8(12):e83725. 査読有

Relationships between values of antibodies to several connective tissue disease autoantigens and pulmonary function in a Japanese general population: the Takahata study. Nakano H, Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Abe S, Sato M, Aida Y, Nunomiya K, Kimura T, Nemoto T, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. *PLoS One*. 2013;8(12):e81678. 査読有

Relationship between Plasma Fibrinogen Levels and Pulmonary Function in the Japanese Population: The Takahata Study. Shibata Y, Abe S, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Aida Y, Kishi H, Nunomiya K, Nakano H, Sato M, Sato K, Kimura T, Nemoto T, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. *Int J Med Sci*. 2013;10(11):1530-1536. 査読有

Elevated Serum Iron Is a Potent Biomarker for Spirometric Resistance to Cigarette Smoke among Japanese Males: The Takahata Study. Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Abe S, Aida Y, Nunomiya K, Sato M, Nakano H, Sato K, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. *PLoS One*. 2013;8(9):e74020. 査読有

Reduced Number and Morphofunctional Change of Alveolar Macrophages in *MafB* Gene-Targeted Mice. Sato-Nishiwaki M, Aida Y, Abe S, Shibata Y, Kimura T, Yamauchi K, Kishi H, Igarashi A, Inoue

S, Sato M, Nakajima O, Kubota I. PLoS One. 2013;8(9):e73963. 査読有  
Influence of corticosteroid therapy on the serum antibody response to influenza vaccine in elderly patients with chronic pulmonary diseases. Inoue S, Shibata Y, Takabatake N, Igarashi A, Abe S, Kubota I. EXCLI Journal 2013;12:760-765. 査読有  
Retrospective Analysis of the Relationship between Decline in FEV(1) and Abdominal Circumference in Male Smokers: the Takahata Study. Sato M, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Aida Y, Kishi H, Nunomiya K, Nakano H, Sato K, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. Int J Med Sci. 2013;10(1):1-7. 査読有  
Hyperhomocysteinaemia predicts the decline in pulmonary function in healthy male smokers. Nunomiya K, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Aida Y, Kishi H, Sato M, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Yamashita H, Kayama T, Kubota I. Eur Respir J. 2013;42(1):18-27. 査読有  
Oxidized Phospholipid, 1-Palmitoyl-2-(9'-Oxo-Nonanoyl)-Glycerophosphocholine (PON-GPC), Produced in the Lung Due to Cigarette Smoking, Impairs Immune Function in Macrophages. Kimura T, Shibata Y, Yamauchi K, Igarashi A, Inoue S, Abe S, Fujita K, Uosaki Y, Kubota I. Lung. 2012;190(2):169-182 査読有  
Impact of cigarette smoking on maximal expiratory flows in a general population: the Takahata study. Nemoto T, Shibata Y, Osaka D, Abe S, Inoue S, Tokairin Y, Igarashi A, Yamauchi K, Kimura T, Kishi H, Nishiwaki M, Aida Y, Nunomiya K, Sato M, Watanabe T, Konta T, Kawata S, Kato T, Kayama T, Kubota I. Intern Med. 2011;50(21):2547-2555. 査読有  
Impairment of Pulmonary Function is an Independent Risk Factor for Atrial Fibrillation: The Takahata Study. Shibata Y, Watanabe T, Osaka D, Abe S, Inoue S, Tokairin Y, Igarashi A, Yamauchi K, Kimura T, Kishi H, Aida Y, Nunomiya K, Nemoto T, Sato M, Konta T, Kawata S, Kato T, Kayama T, Kubota I. Int J Med Sci. 2011;8(7):514-522. 査読有  
The Relationship between Serum Uric Acid and Spirometric Values in Participants in a Health Check: The Takahata Study. Aida Y, Shibata Y,

Osaka D, Abe S, Inoue S, Fukuzaki K, Tokairin Y, Igarashi A, Yamauchi K, Nemoto T, Nunomiya K, Kishi H, Sato M, Watanabe T, Konta T, Kawata S, Kato T, Kubota I. Int J Med Sci. 2011;8(6):470-478. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

The difference in the expression of Ern1 and the formation of granulomas in SPC-CCL1 Tg mice. Sato M, Shibata Y, Kishi H, Abe S, Igarashi A, Yamauchi K, Aida Y, Nakano H, Sato K, Kimura T, Nunomiya K, Nemoto T, Inoue S, Kubota I. American Thoracic Society 2014 International Conference, May 16-21, 2014 San Diego USA, (San Diego Convention Center).

Lung-Specific CCL1 Overexpression Decreases Alveolar Macrophages In Murine BAL. Kishi H, Igarashi A, Abe S, Yamauchi K, Sato M, Nemoto T, Nunomiya K, Aida Y, Inoue S, Kubota I, Shibata Y. American Thoracic Society 2012 International Conference, May 18-23, 2012 San Francisco USA, (Moscone Convention Center)

肺特異的 CCL1 高発現マウスにおける生体内細胞分画の検討. 岸 宏幸, 阿部修一, 柴田陽光, 五十嵐朗, 山内啓子, 佐藤正道, 根本貴子, 布宮慶子, 會田康子, 井上純人, 久保田功. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2012.4.20-22 神戸 (神戸コンベンションセンター)

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