

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461514

研究課題名(和文) 環境曝露による気道炎症の解明：感染と喫煙

研究課題名(英文) Airway inflammation in response to environmental exposure: infection and cigarette smoking

研究代表者

和田 裕雄 (Wada, Hiroo)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50407053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙の短期曝露では好中球性炎症を誘導するが、同条件での長期曝露では気腔の開大を誘導することが明らかとなった。さらに、IL-17遺伝子欠損マウスを用いて喫煙曝露の影響を検討したところ、いずれの作用も抑制することが明らかとなった。以上より、喫煙が誘導する好中球性炎症および気腔の開大でIL-17が重要な役割を担うと考えられた。

本研究より、IL-17がCOPDをはじめとする喫煙が誘導する気道炎症治療における重要な分子標的となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The role of IL-17 in an inflammatory reaction to cigarette smoke exposure was investigated, using IL-17 deficient mice. IL-17 deficient mice showed that neutrophilic inflammation was restored in short-term exposure, and subsequently that the emphysematous change was restored after long-term exposure, in comparison with the wild-type mice. This suggested that IL-17 plays a crucial role in an inflammatory reaction to cigarette smoke exposure, and thus a possible molecular target in the therapeutic strategies to cigarette-smoke associated airway disorder, such as COPD.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：COPD 環境曝露 呼吸器病学

1. 研究開始当初の背景

肺炎マイコプラズマ(Mp)肺炎は臨床的には遷延性の咳嗽を特徴とする肺炎である。重症化には免疫状態が関与すると考えられており、第一選択薬のマクロライド系抗菌薬の有する抗菌作用だけでなく、免疫調整作用も有効である、と考えられている。

一方、慢性閉塞性肺疾患 chronic obstructive pulmonary disease (COPD)の炎症に対する治療では、同じ気道炎症性疾患である喘息と比較し、ステロイドに抵抗性であり、マクロライド系抗菌薬の免疫調整作用が有効であると考えられている。

以上の知見に加えて、マイコプラズマ肺炎は COPD 増悪の一因となることから、「肺炎マイコプラズマ肺炎と COPD とは共通の炎症メカニズムを有する」との仮説を立てて本研究を立案・遂行した。

2. 研究の目的

<これまでの成果と未解決問題点>

上記の仮説に検証を加えるため、申請者は喫煙曝露マウスモデル およびマイコプラズマ肺炎マウスモデルを確立し、解析を加えることにより、共通した炎症メカニズムを明らかにする研究を行ってきた。

(1) マイコプラズマ肺炎モデルより明らかになってきたこと

マイコプラズマ肺炎マウスモデルでは、マイコプラズマ肺炎の菌体成分を抽出し、経鼻的に頻回投与を行い肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) が誘導する肺炎の炎症病態を表す動物モデルを作出した。生菌の使用を避けたことにより、感染とは異なる病態と考えられた。本マウスの解析より、好中球の肺への遊走には IL-17 の関与が示唆

された。

IL-17 はファミリーを形成しており、IL-17A と IL-17F は、アミノ酸配列、発現部位等が似ており、さらに redundancy も報告されていた。IL-17 の役割を精確に検討するには IL-17A/F 両遺伝子について検討する必要があると考えられた。

尚、IL-17A と IL-17F は配列も似ていることから、遺伝子を別々に定量することも困難であった。実際、申請者が複数の既報のデータで施行された定量的 RT-PCR を再現しようと試みたが、いずれも失敗した。

さらに、IL-10 遺伝子欠損マウスモデルの検討では、IL-10 遺伝子欠損マウスでの好中球性炎症が増悪し、好中球の遊走を活性化する炎症性メディエーターが増加していた。COPD 患者のサンプルの解析から、IL-10 の低下と IL-17 の増加が関連していることが報告されており、本件研究の知見からも、喫煙が誘導する好中球炎症に IL-17 が関与していることが予想された。

(2) 短期喫煙曝露モデルの問題点

これまでの成果として、短期喫煙曝露モデルを作出し肺での遺伝子発現を検討したところ、TNF- α 、GM-CSF、IL-6、KC(Keratinocyte-derived chemokine, ヒトの CXCL-8/IL-8 に相当)、MIP-2 などの炎症性メディエーターの発現が高値であった。また、MMP-9 の増加を認め、気腫性変化の原因となることが予想された。気管支肺胞洗浄液では好中球分画が増加しており、好中球の肺への遊走が観察された。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC-2)や Sirt-1 の発現および活性の低下を認めた。以上の所見は、COPD

D患者から得られたサンプルの解析結果と合致していたため、この喫煙短期曝露モデルを COPD の分子病態を表す動物モデルとして使用した。しかしながら、上記の所見が長期曝露により気腫性の変化に至るか(動物モデルの場合は気腔径の開大)は確認されていなかった。

<本研究での目的>

喫煙曝露マウスモデル およびマイコプラズマ肺炎マウスモデルを確立し、解析を加えることにより、共通した炎症メカニズムを明らかにすることを目的とした。その際、これまでに問題となった、IL-17A と IL-17F の redundancy の問題、および、短期喫煙曝露モデルが本当に COPD のモデルであるかどうか、について検討を加えた。

IL-17A と IL-17F の redundancy があること、IL-17A と IL-17F を特異的に定量化することが困難であることが予想されたため、IL-17A/F 両遺伝子欠損マウスを用いることとした。また、曝露期間を延長することにより、長期曝露モデルを作出し、実際に気腔の開大が認められるかどうか、さらに、IL-17A/F 両遺伝子欠損マウスではどのような結果が得られるかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作出

用いた動物

IL-17A/F 両遺伝子欠損マウスモデルと野生型マウスモデル、いずれも C57BL/6J の遺伝背景を有するマウスを用いた。同マウスは、共同研究者の岩倉洋一郎博士より供与を受けた。

喫煙曝露マウスモデル

喫煙曝露は、マウス喫煙曝露装置(MIPS社、大阪)を用いて行った。

上記マウスに対し、喫煙曝露を連日4週まで行った(短期曝露モデル)群と24週行った(長期曝露モデル)群とを作成し解析した。

(2) 解析手法

1. 喫煙短期曝露モデルの解析

気管支肺胞洗浄

各動物モデルの炎症状態を検討するため、気管支肺胞洗浄を施行し、得られた細胞数と分画を調べた。また、気管支肺胞洗浄液中の炎症性メディエーターのタンパク量を検討した。気管支肺胞洗浄後は、肺を採材した。

分子生物学的解析

マウスを所定の日数(5日、9日、14日、28日)喫煙曝露を行い sacrifice を行った。気管支肺胞洗浄を施行した。気管支肺胞洗浄液の細胞数を計数し、さらに、その分画を検討した。洗浄液中のタンパク量については、enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 方にて定量した。また、同時に肺を採材した。採材サンプルより mRNA を抽出し、TNF- α 、MMP-9、GM-CSF、KC 等遺伝子発現を定量的 RT-PCR にて定量化した。また、

また、組織標本を作成し、抗 MMP-9 抗体にて免疫染色を行い、MMP-9 発現陽性細胞をカウントした。

2. 喫煙長期曝露モデルの解析

24週の喫煙曝露終了後のマウスに対し、25cmH₂O 圧をかけて固定した。本固定サンプルより 3 μ m 厚の組織標本を作製し HE 染色を

施行後、肺胞腔の開大につき解析を加えた。肺胞径の定量化は、Image J でプログラムを作成し、mean linear intervals (MLI)および肺胞の平均面積、単位面積あたりの肺胞の数、を用いて定量的に評価を行った。

4. 研究成果

(1) 短期曝露モデルの解析

これまでのマイコプラズマ肺炎マウスモデルおよび喫煙曝露マウスモデルの解析の結果、IL-17 の関与が示唆されたため、IL-17A/F 両遺伝子欠損マウスを用いて、IL-17A/F 遺伝子欠損が喫煙短期曝露への反応に及ぼす影響を検討したところ、肺胞洗浄液中の好中球数が減少し、MMP-9 が発現する細胞の数が減少していることが明らかとなった。

また、本研究と平行して行われた、短期曝露マウスモデルにクラリスロマイシンを投与する研究では、好中球性炎症が抑制が観察された。興味深いことに IL-17 の発現も抑制されていることが観察された。

(2) 長期曝露モデルの解析

24 週にわたる長期曝露へ与える影響を、画像解析により mean linear interval (MLI) や肺胞の平均面積、および単位面積あたりの肺胞数を求めることにより検討した。その結果、野生型では、MLI や肺胞の平均面積が増加し、単位面積あたりの肺胞数が減少したことから、気腔が開大したと考えられた。本知見は、ヒトの肺気腫症に相当する変化と考えられた。

一方、IL-17A/F 遺伝子欠損マウスでは、喫煙曝露群と環境気曝露群（対照群）とで差がなく、気腔の開大が抑制されていることが示唆された。

さて、本実験系では、肺の気腔の状態を評価するため、マウスを sacrifice する必要があり実験には数多くのマウスを要すること

となった。ヒト COPD 患者では、シワが増加することが示されており、肺の生理学的変化と皮膚の弾力性的変化とが関連することが示されていることから、喫煙曝露マウスの皮膚の変化（弾力性）を検討することにより、同マウスの肺の生理学的変化を sacrifice することなく予想できるのではないかと考えられた。本検討については、継続的な研究が必要であると考えられた。

(3) まとめと考察

上記の結果、野生型マウスでは、長期曝露により気腔の開大が認められ、ヒト COPD に相当する変化と考えられた。さらに、IL-17A/F 遺伝子欠損マウスでは、短期曝露による好中球の肺への遊走が抑制され、MMP-9 陽性細胞が減少した。

以上より IL-17A/F は、喫煙が肺に与える影響、すなわち好中球性炎症を誘導し、さらに、気腔の開大を誘導するメカニズムで重要な役割を有することが示唆された。IL-17A/F は COPD をはじめとする喫煙が誘導する好中球性炎症を治療する上で、重要な分子標的となり得ると考えられた。

また、本研究結果から、短期曝露モデルの意義も明らかになったと考えられた。

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 3 件)

1. Higaki M, Wada H, Mikura S, Yasutake T, Nakamura M, Niikura M, Kobayashi F, Kamma H, Kamiya S, Goto H, Ito K, Barnes PJ, Takizawa H. Interleukin-10 modulates pulmonary neutrophilic inflammation induced by cigarette smoke exposure. *Exp Lung Res* 2015; 41: 525-534. (査読あり)

2. Nakamura M, Wada H, Honda K, Nakamoto K, Inui T, Sada M, Watanabe M, Takata S, Yokoyama T, Saraya T, Kurai D, Ishii H, Goto H, Kamma H, Takizawa H. Clarithromycin ameliorates pulmonary inflammation induced by short term cigarette smoke exposure in mice. *Pulm Pharmacol Ther* 2015; 35: 60-66. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Nakamura M, Wada H, Sata M, Inui T, Honda K, Nakamoto K, Higaki M, Takata S, Yokoyama T, Kudo A, Inoue S, Hanawa T, Kobayashi F, Kamma H, Takizawa H, Goto H. Interleukin-17A/F regulates MMP-9 expression in the lung of mice after inhalation of cigarette smoke. *Eur Respir J* 44; Suppl 58: P3902. [Abstract presented in ERS 2014 in Munich. 8 September 2014, Munich, Germany.]
2. 中村益夫、和田裕雄、佐田充、乾俊哉、中本啓太郎、檜垣学、宮東昭彦、井上信一、花輪智子、小林富美恵、菅間博、滝澤始。IL-17A/F 遺伝子欠損マウスは長期喫煙曝露により気腔開大が抑制される。 [abstract presented in BMB 2015 (第 38 回分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同学会), 3 Dec 2015, Kobe, Japan.]

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/aboutus/outline/model/respir-med/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

和田 裕雄 (WADA, Hiroo)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50407053

(2)連携研究者

後藤 元 (GOTO, Hajime)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号 : 80134617