

論文の内容の要旨

論文題目 閉塞性肺疾患における自然免疫系活性化の役割についての解析

氏名 石井 崇史

【背景・目的】

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)/肺気腫は不可逆的な気流制限を特徴的とし、臨床症状としては慢性的な咳、痰、呼吸困難を特徴とする慢性進行性肺疾患で、世界規模で患者数は増大している。その発症、進行には主に喫煙が関与しており、マクロファージ、好中球、リンパ球が肺胞腔に動員され炎症、アポトーシスを惹起され、肺胞隔壁の破壊が進行し気腫形成が起こる。一方、COPDではその経過中にしばしば急性増悪を起こす事が知られている、急性増悪は主にウイルスや細菌感染を契機として発症し、COPDの主要死因の一つとなり回復してもその後のQOLの低下をもたらす為、その予防、治療はCOPDの管理に重要である。以上のCOPDの発症や急性増悪には自然免疫系が関わっていると考えられ、その病態解明が新規治療薬に結びつく可能性がある。

Interferon regulatory factor 3 (IRF3)はウイルス感染における Type1 interferon 産生に関わる転写因子で、ウイルスや細胞内寄生菌由来の二本鎖 RNA,DNA やグラム陰性桿菌の内毒素として知られる Lipopolysaccharides (LPS)の、RIG-1 like receptor や Toll-like receptors (TLR)3,4 による自然免疫受容体の認識で活性化される。TLR4 活性化後のシグナル伝達経路には、IRF3 を介する経路とともに NF- κ B を介する経路の二つ存在する。前者は TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF)を経由して転写因子 IRF3 を活性化する経路であり、後者は受容体アダプタータンパク質 Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)を経由し、主に転写因子 NF- κ B を最終的に活性化する経路である。LPS はいずれの経路も活性化する。NF- κ B を介する経路についてはその存在が COPD 形成必須であることが報告されているが、IRF3 についてはその役割が不明である。今回、肺気腫モデルとして良く用いられる elastase を LPS に併用したモデルを用いて、我々は今回の研究目的として COPD 急性増悪の病態における IRF3 の役割を解明する事を設定した。

【方法】

マウスは野生型/IRF3KO 雄マウスを用いた。PPE+LPS 群には麻酔後、Pancreatic porcine elastase 0.5 U を経鼻投与した(day 1)。その後 day 8,11,15 に LPS を 25 μ g 経鼻投与した。PPE 群に

関しては、day8,11,15はPBSを投与した。評価法としては0週、1週、2週、4週、6週にmicro-CTによる胸部CT撮影と6週後の肺組織病理像とした。CT撮影後、CT値を基に肺気腫部体積、全肺体積を求め、気管体積を除いたLAA% (low attenuation area %)を全肺体積に占める肺気腫部体積の割合として算出した。次に、急性期炎症モデルとしてPPE (day 1), LPS (day 8)最終投与後翌日に気管支肺胞洗浄液(BALF)、肺を回収しBALF細胞解析、肺mRNA発現量を比較した。また、細胞機能比較の為にPPE+LPS投与後の肺を用いて好中球、マクロファージをセルソーターを用いてソーティングし、肺組織全体・好中球のミエロペルオキシダーゼ活性を調べた。また好中球、マクロファージの蛍光ラテックスビーズ貪食能を各細胞とラテックスビーズを一定時間培養後フローサイトメトリーにて細胞の蛍光度を測定する事で調べた。最後に免疫細胞染色により、オートファジー関連タンパク質であるLC3の発現としてオートファジー活性を調べた。

【結果】

IRF3KO群ではWT群と比して、CT上の経時的気腫拡大の抑制を認め、また、WT群では4週以降でLPSによる気腫形成拡大効果を認めたが、IRF3KO群では同様の効果は認められなかった。病理においても肺胞腔拡大の抑制が認められた。

急性期炎症像としてはIRF3KOマウスでの気管支肺胞洗浄液の総細胞数、好中球数の増多を認めたが、肺組織KC、MIP-1 α 、MCP-1、CXCL10、TNF- α の遺伝子発現量の低下を認めた。一方、好中球遊走に関わるMIP-2は有意差無く、IL-17AはIRF3KOでの上昇を認めた。

機能比較では肺組織・単離好中球のミエロペルオキシダーゼ活性は有意差を認めなかったが、ラテックスビーズの好中球貪食能はIRF3KOマウスでの低下を認めた。マクロファージでは両群ほぼ同等であった。LC3の免疫細胞染色においてもIRF3KOマウスでの発現低下が観察された。

【考察】

本研究ではCOPD急性増悪の病態と自然免疫との関わりを調べる為に自然免疫受容体活性化経路の下流にある転写因子IRF3の機能を、マウス病態モデルを用いて解析した。その結果転写因子IRF3が、COPD急性増悪病態に中心的役割を果たす好中球機能制御能を有する事を解明した。

micro-CTおよび病理像の解析で、IRF3KO群ではWT群と比して気腫性病変が抑制されることを示した。PPE後のLPS投与による気腫性病変の増悪効果は単回のLPS投与によりPPE投与後12週で認められる事が示されているが、今回LPSを反復投与する事で、4週というより短期間で気腫性病変の増悪効果が得られる事を初めて示した。LPSはTLR4により認識されるが、TLR4

はマクロファージ、樹状細胞のような免疫細胞と、上皮細胞や線維芽細胞、内皮細胞のような構造細胞にも発現する。PPEにより肺胞構造の破壊、上皮/内皮障害や細胞外基質の分解、炎症性サイトカイン産生や酸化ストレスの増大が起こり、肺気腫が形成されるが、その後にLPSにて経気道的に感作する事により前述の免疫細胞や構造細胞がTLR4を介して刺激され、炎症性サイトカインの産生やアポトーシス、酸化ストレスの増大等が再度惹起されるため肺気腫腔の増大がもたらされ、これらにIRF3が関与する事が考えられた。NF- κ Bに関してはその活性化と共にIL-1 β やIL-6、TNF- α 等が上昇する事がCOPD急性増悪の患者において認められているが、IRF3に関しては今回初めてその関与が認められた。

次に、病態形成に関わる急性期炎症時を解析すると、MCP-1、MIP-1 α 、TNF- α 、CXCL10の産生低下が認められ、肺気腫形成抑制の所見と合致する結果だった。これらの液性因子のうちCXCL10はMyD88非依存的にIRF3を介する転写調節が行われるが、MCP-1やMIP-1 α 、TNF- α は主にMyD88を介しNF- κ Bにより調節されている因子に分類されている。最近の報告で、NF- κ Bのサブユニットであるp65とIRF3が結合し、協調してプロモーター上のNF- κ BもしくはIRF3結合部位に作用して転写調節を行い、二つのシグナル経路が最終的に交絡している事が報告されている。今回のCOPD急性増悪モデル動物の結果は、IRF3欠損が、両経路の活性が阻害されていることを示し、文献上の報告と合致する結果であった。

一方、KCやMIP-2,IL-17Aは主に好中球の遊走に関わるサイトカインであるが、その発現はPPE+LPS投与によりWT群、IRF3KO群いずれも上昇していた。特にIL-17AはIRF3KO群で高値を示し、PPE+LPS投与時のBALF総細胞数と好中球数はIRF3KO群において増加の原因と考えられた。このIRF3KO群におけるBALF好中球数の増加は、PPE+LPS投与による肺気腫形成がWT群より抑制される結果と相反するものであったので、次に好中球機能の解析に検討を進めた。ソーティングした好中球、マクロファージを用いたラテックスビーズ貪食能はIRF3KO群好中球においてWT群好中球と比して低下を認めた。最後にオートファジー活性と関連するLC3発現を検討した。免疫細胞染色で検討し、PPE+LPS投与後肺由来の好中球は、IRF3KO群でLC3発現が低下していた。LPSによるオートファジー活性化は文献的にも報告があり、TLR4-TRIF経路依存性かつTLR4-MyD88経路とは非依存性、RIP1やp38MAPKが関与している事が示されている。好中球におけるオートファジー活性化と機能に関しては、オートファジー関連タンパク質のAtg4が欠損したマウス好中球ではNADPHオキシダーゼによる活性酸素種の産生低下が見られ、脱顆粒低下との関連が示唆されている。今回の好中球におけるオートファジー活性化が直接TLR4活性化を介するか、液性因子を介した間接的事象かは更なる検討が必要である。

これまでIRF3はin vivoの実験においてウイルス、細胞内寄生菌感染や敗血症のモデル、アルコール性肝障害や肝・脳における虚血再還流性障害における役割等が他疾患で報告されてい

る。今回新しく COPD の急性増悪の病態において IRF3 が促進的に関与し、その機序として COPD 増悪に関わる種々の液性因子低下を背景とした特に好中球における貪食能、オートファジー活性の変化が関与する可能性を *in vivo* モデルで示した。COPD のような多数の細胞、サイトカインやケモカインが複雑に絡む疾患では単一分子を抑制する治療での病態改善は困難と考えられ、IRF3 のような複数の液性因子の発現を調節する転写因子のレベルで治療介入を行う事がより効果的であると考えられる。