

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09175

研究課題名(和文) SP-D欠損マウスを用いた喘息COPDオーバーラップ症候群の病態解析と治療法探索

研究課題名(英文) The mechanism and treatment for Asthma-COPD overlap

研究代表者

福山 聡 (FUKUYAMA, Satoru)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50380530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：喘息とCOPDが合併する喘息-COPDオーバーラップ(ACO)が注目されており、その病態解析を肺気腫を自然発症するSP-D欠損マウスを用いて検討した。野性型マウスと比べてSP-D欠損マウスでは気腔拡大および静肺コンプライアンスの上昇を認めた。ACOモデルとして、SP-D欠損マウスに抗原感作曝露すると、野性型マウスと比べて、SP-D欠損マウスでは肺胞洗浄液中好酸球数増加やTh2サイトカイン上昇は低値だっにもかかわらず気道過敏性は亢進していた。換気回数を現象させるとこの気道過敏性亢進は消失したため、喘息病態によるアレルギー炎症と気腫化による周波数依存性の気道過敏性亢進が関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Asthma-COPD Overlap (ACO) has recently been used for patients with mixed asthma and COPD. The pathophysiological mechanisms of ACO have not been clearly understood due to the lack of an appropriate murine model. To investigate its pathophysiology, we examined a murine model by allergen challenge in surfactant protein-D (SP-D)-deficient mice that spontaneously developed pulmonary emphysema. SP-D-deficient mice were sensitized and challenged by ovalbumin (OVA). Lungs and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected for analysis, and static lung compliance and airway hyperresponsiveness (AHR) were measured 48 h after the last OVA challenge. In SP-D-deficient, naive, or OVA-challenged mice, the mean linear intercept and static lung compliance were increased compared with wild-type (WT) mice.

研究分野：Respiratory medicine

キーワード：ACO SP-D COPD asthma

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの閉塞性肺疾患の有病率は、我が国の中高年人口の1割を占める。近年では、喘息とCOPDを合併した喘息-COPD オーバーラップ (Asthma-COPD overlap; ACO) という疾患概念が提唱され注目されている。ACO の患者は通常の COPD 患者よりも進行が速く予後不良といわれているが、喘息や COPD の治療に関する大規模介入研究においては除外対象となりやすいため、エビデンスが決定的に不足している。さらにその特有の病態を解明するための疾患モデルが確立していない。喘息的な気道炎症と COPD 的な末梢肺の気腔拡大・破壊が混在した場合の炎症の様式や機能的変化は不明である。そこで遺伝子改変マウスを用いて、ACO の疾患モデルを確立し、病態の解明とこれまでとは作用機序の異なる新規治療法を探索する。

2. 研究の目的

ACO についての大きな課題は、その病態を解明するための適切な疾患モデルが確立していないことである。COPD はマウスの慢性喫煙曝露モデルやエラストラーゼ肺気腫モデル、遺伝子改変マウス肺気腫モデルなどがあり、喘息では卵白アルブミンや、塵ダニ、真菌抗原などに対するアレルギー性喘息モデルが確立している。ACO は COPD、喘息両者の要素が含まれるため、炎症の成り立ちや進展様式、治療薬の効果発現の機序などについて特有の形質を示すことが想定される。喘息的な気道炎症と COPD 的な末梢肺の気腔拡大・破壊が混在した場合の炎症の様式や機能的変化は不明である。疾患モデルが作製できれば、どのような薬剤の組み合わせが最良の治療効果を発揮するかを検証する前臨床モデルとしても活用できると考えられる。

サーファクタントプロテイン-D (SP-D) 欠損マウス肺では、気腫性変化が起こり、肺気腫モデルとなり得ることがすでに報告されている。本マウスが本当に肺気腫の表現系を示すのかどうかを確認の上、卵白アルブミン (Ovalbumin; OVA) 感作曝露によるアレルギー性気道炎症モデルを用いて野生型マウスと SP-D 欠損マウスで気道炎症、気道過敏性などを比較検討する。この方法でマウス ACO モデルを作成確立し、さらには新規治療法の探索と確立を目指す。

3. 研究の方法

SP-D 欠損マウスによる疾患モデル作成とその解析

COPD や喘息ではタバコ煙やアレルギー、あるいは病原体由来分子 (LPS やウイルス由来 RNA など) によって気道上皮が最も傷害を受けるため、その病態解析は重要である。我々は、SP-D 欠損マウスの作成に成功しており、本マウスを用いて以下の検討をおこなう予定

とした。

(1) SP-D 欠損マウス肺の経時的変化を形態解析する。一般的に行われているように、PC ソフトウェア (WinROOF V6.1) を用いて、平均肺胞間距離や平均肺胞面積などの計測をおこなう。

(2) 生理機能解析としては、肺気腫の指標となる静肺コンプライアンスや呼吸抵抗を経時的に測定し、野生型マウスと比較検討する。

(3) 気管支肺胞洗浄液中の細胞成分やサイトカイン (Th2 サイトカインとして、IL-4, IL-5, IL-13 濃度、炎症性サイトカインとして KC, MIP-2, TNF- α , IL-6) 濃度を測定する。

(4) ACO モデルとして、SP-D 欠損マウスを用いて、抗原となる卵白アルブミン (OVA) で感作後、抗原を吸入曝露し喘息反応 (吸入アセチルコリンに対する気道過敏性、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞とサイトカイン・ケモカイン濃度、AB/PAS 組織染色による杯細胞化生) を比較解析する。

4. 研究成果

(1) SP-D 欠損マウス肺の経時的変化を形態解析した。一般的に行われているように、PC ソフトウェア (WinROOF V6.1) を用いて、平均肺胞間距離や平均肺胞面積の計測をおこない、野生型マウスと比べて SP-D 欠損マウスでの気腔拡大 (平均肺胞間距離および平均肺胞面積の拡大) を確認した (図 1 左)。

SP-D欠損による肺組織、平均肺胞間距離、静肺コンプライアンスの変化

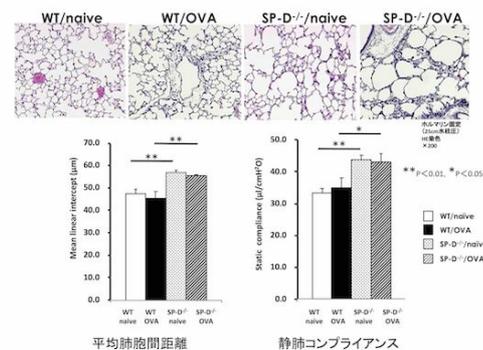


図 1

(2) 生理機能解析として、肺気腫の指標となる静肺コンプライアンスや呼吸抵抗を経時的に測定し、野生型マウスと比べて SP-D 欠損マウスでの静肺コンプライアンスの上昇を確認した (図 1 右)。

(3) 気管支肺胞洗浄液中の細胞成分やサイトカインを測定した。Th2 サイトカインとして、IL-5, IL-13 濃度、炎症性サイトカインとして KC, MIP-2 濃度を測定した。定常状態では、野生型マウスと比べ、SP-D 欠損マウスでも、BAL 液中好酸球数各およびサイトカインの濃度に変化は見られなかった。

(4) ACO モデルとして、SP-D 欠損マウスを用いて、抗原となる卵白アルブミン (OVA) で感作後、吸入曝露し喘息反応 (吸入アセチルコリンに対する気道過敏性、気管支肺胞洗浄液

中の炎症細胞とサイトカイン・ケモカイン濃度、PAS/AB 組織染色による杯細胞化生を比較解析した(プロトコル、図 2)。

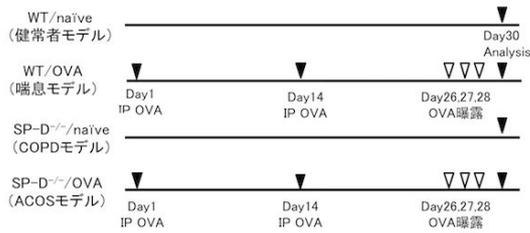


図 2 プロトコル

抗原感作曝露すると、BAL 液中の好酸球増多および Th2 サイトカイン濃度の上昇が認められ、野生型マウスに感作曝露した場合と比べて、SP-D 欠損マウスに感作曝露すると BAL 液中好酸球数増加や Th2 サイトカイン(IL-5, IL-13)や Eotaxin の上昇は低値だった(図 3)。

SP-D欠損によるBAL液サイトカイン、ケモカイン濃度の変化

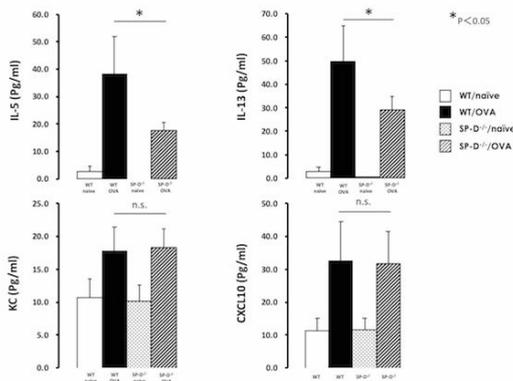


図 3 BAL 液中サイトカイン濃度

杯細胞化生に関しては、AB/PAS 染色による杯細胞化生の半定量測定、RT-PCR 法および real-time PCR 法による定量化をおこなった。抗原感作曝露すると杯細胞化生の増加、MUC5ac 発現亢進が認められたが、いずれの検討方法でも野生型と SP-D 欠損マウス群間に差は認めなかった(図 4)。

SP-D欠損による、杯細胞化生、Muc5ac遺伝子発現の変化

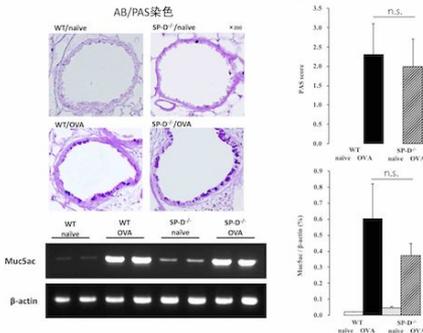


図 4

しかしながら、抗原感作曝露後の吸入 ACh に対する気道過敏性は、野生型マウス群に比べ SP-D 欠損マウス群でより亢進していた(図 5)。

SP-D欠損による吸入AChに対する気道過敏性(換気回数120回/分)

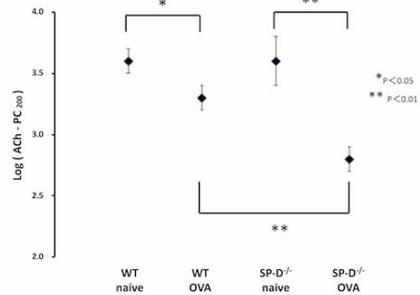


図 5

さらに、人工呼吸の換気回数を通常検討に用いている 120 回/分から 100 回/分に減少させると野生型マウスと SP-D 欠損マウス両群間での気道過敏性亢進の差は消失した(図 6)。

換気回数100回/分における、吸入AChに対する気道反応性

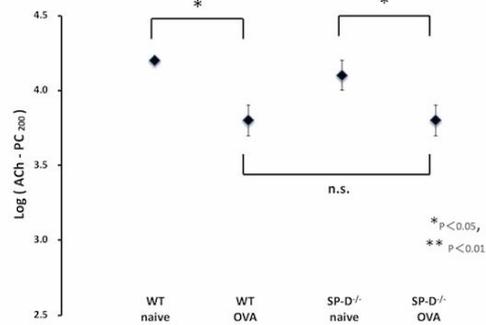


図 6

したがって、本マウスモデルでは喘息病態によるアレルギー炎症と気腫化両者による周波数依存性の気道過敏性亢進が関与していると考えられた。

上記結果からは、喘息および COPD 単独ではみられない、ACO 特異的な病態が気道過敏性に関与していることが考えられ、病態解明に貢献できたと考えられる。今後は、さらに本研究を進展させ、新たな治療法の開発を目指す。

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1件)

Kentaro Tamura, Koichiro Matsumoto, Satoru Fukuyama, Keiko Kan-o, Yumiko Ishii, Ken Tonai, Miyoko Tatsuta, Aimi Enokizu, Hiromasa Inoue, Yoichi Nakanishi.
Frequency-dependent airway hyperresponsiveness in a mouse model of emphysema and allergic inflammation. Physiological Reports, 査読有, 2018 Jan;6(2).
doi:10.14814/phy2.13568.

[学会発表](計2件)

福山 聡、田村健太郎、榎津愛実、龍田実代子、藤田明孝、石井由美子、松元幸一郎、中西洋一 SP-D欠損マウスを用いた喘息-COPDオーバーラップ症候群モデル
第66回日本アレルギー学会学術大会
2017年6月

田村健太郎、松元幸一郎、福山 聡、中西洋一 SP-D欠損マウスを用いた喘息-COPDオーバーラップ症候群モデル作成の試み
第65回日本アレルギー学会学術大会
2016年06月

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
九州大学大学院医学研究院 胸部疾患研究施設
九州大学病院 呼吸器科
http://www.kokyu.med.kyushu-u.ac.jp

6. 研究組織

(1)研究代表者
福山 聡(FUKUYAMA, Satoru)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：50380530
(2)研究分担者
松元 幸一郎(MATSUMOTO, Koichiro)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：60325462

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
田村 健太郎(TAMURA, Kentaro)
榎津 愛実(Enokizu, Aimi)
龍田 実代子(TATSUTA, Miyoko)