

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09193

研究課題名(和文) COPDの発症機序：SASPからみた肺線維症との相違点

研究課題名(英文) Pathogenesis of COPD: comparison of SASP in COPD and pulmonary fibrosis

研究代表者

青柴 和徹 (Kazutetsu, Aoshiba)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：60231776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：COPDと肺線維症における細胞老化とsenescence-associated secretory phenotype (SASP)の違いを明らかにするために、COPD(肺気腫)、肺線維症(特発性肺線維症、膠原病関連間質性肺炎、気腫合併肺線維症)および対照患者の肺組織を用いて免疫組織染色を行った。その結果、1)肺線維症とCOPDにおいて上皮細胞の細胞老化が生じているが、その程度は肺線維症のほうがCOPDよりも高度なこと、2)特発性肺線維症は膠原病関連間質性肺炎よりも細胞老化が高度に生じていること、3)老化細胞あたりのSASP発現率は肺線維症とCOPDにおいて同等であることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：To compare the degree of cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype (SASP) in COPD and pulmonary fibrosis, lung tissues samples were subjected to immunostaining for P16 and P21. Double-staining for P16 and phosphorylated NF- κ B was also performed to verify SASP. A greater degree of enhancement of P16 and P21 expression was evident in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and connective tissue disease-associated interstitial lung disease (CTD-ILD), as compared to COPD and normal lungs. Immunostaining for P16 also revealed enhanced expression of this protein marker in COPD as compared to normal lungs. There were no significant differences in the phosphorylated NF- κ B expression rate of P16-positive cells among IPF, CTD-ILD and COPD. These results suggest that cellular senescence is more pronounced, and SASP expression more conspicuous, in interstitial lung diseases, such as IPF, than in COPD.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 肺線維症 細胞老化 SASP

1. 研究開始当初の背景

肺線維症と COPD (肺気腫) は病理学的には対照的な病変であるが、ともに肺の老化を基盤として発症する疾患である。興味深いことに、肺線維症と COPD では、同様に炎症、アポトーシス、細胞老化、DNA 障害が生じている。例えば研究代表者らの COPD や実験的肺線維症モデルにおいても、肺胞上皮細胞の老化、DNA 障害と senescence-secretory phenotype (SASP) の出現が認められた。しかしながらヒトの肺気腫と肺線維症組織を直接対比させた研究は過去に行われておらず、両者の相違点については明らかではない。

2. 研究の目的

近年、SASP は慢性炎症や組織破壊および修復への関与が指摘されている。そこで COPD (肺気腫) と肺線維症における細胞老化の役割を明らかにするために、肺胞上皮細胞の SASP に焦点をあて、COPD と肺線維症における細胞老化の相違点について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

2010 年 1 月 ~ 2014 年 12 月までに特発性肺線維症 (IPF)、膠原病関連間質性肺炎 (CTD-IP)、気腫合併肺線維症 (CPFE)、COPD と診断された患者を対象とし、外科的肺生検ないし肺癌を合併し葉切除された非癌肺組織を用いた (表 1)。切除肺組織は 10%ホルマリンの中で 4 時間浸漬固定後にパラフィン包埋された。細胞老化を評価するために P16 と P21 の免疫組織化学染色を行った。各症例につき 500 個の肺胞上皮細胞や気腔上皮細胞を調査し、陽性率を算出した。また、細胞老化と SASP を評価するために P16 と NF- κ B の 2 重染色も行った。

免疫組織化学染色は、肺組織を 3 μ m 厚に薄切後に全自動免疫染色装置 (Ventana BenchMark GX, Ultra View DAB: Roche Diagnostics International Ltd., Tokyo) を

用いて行われた。抗原賦活化には EDTA 緩衝液中 (pH8.5) で 60 分間熱処理 (95-100 $^{\circ}$ C) を行った。Horseradish peroxidase 反応の発色基質には 3,3'-Diaminobenzidine を用い、ヘマトキシリン液による対比核染色を施行した。2 重染色は熱湯処理 (100 $^{\circ}$ C, 10 分間) にて 1 回目の 1 次抗体を剥離し Horseradish peroxidase 反応の発色基質には Histo Green を用いた。2 重染色時はヘマトキシリン液による対比核染色は施行しなかった。

IPF の診断は 2011 年の ATS/ERS IPF statement に準拠した。CTD-IP は膠原病専門医 2 名と呼吸器内科専門医 2 名が相談し診断した。CPFE は CT で上葉に気腫と下葉にびまん性間質影がある症例とし、線維化部の組織を使用した。

【患者背景】

	【IPF】	【CTD-IP】	【CPFE】	【COPD】	【Control】
症例数	6	3	4	6	6
男性/女性	6/0	0/3*	4/0	6/0	2/4
年齢	68.3	50.0*	71.5	73.5	70.7
Smoker / Never	6/0	0/3*	4/0	6/0	0/6
KL-6	666.7	1193	411.7	N.A.	N.A.
FVC	3.42	2.72	3.36	3.04	3.15
%FVC	104.8	102.9	103.4	94.0	118.9
FEV ₁ /FVC	80.0	85.6	77.1	59.7	77.0
FEV ₁	2.71	2.34	2.56	1.81	2.41
%DLco	86.4	82.3	68.9	93.1	105.4

versus stable IPF

表 1. 対象患者の背景

4. 研究成果

(1) 正常肺と比較して、COPD と IPF では肺胞上皮細胞の P16 および P21 蛋白発現率が高度で、細胞老化が促進されていた (図 1)。疾患群のなかの検討では、COPD に比べて IPF の方が細胞老化の程度が高度であった。一方、IPF と比べて、CTD-IP は細胞老化の程度が軽度であった (図 1)。以上の結果から気腫と線維化の成因に細胞老化の程度差が関係している可能性が考えられた。さらに通常、CTD-IPCTD の方が IPF に比べて予後が良好であることから細胞老化の程度と線維化の進行や予後が関連している可能性が考えられた。

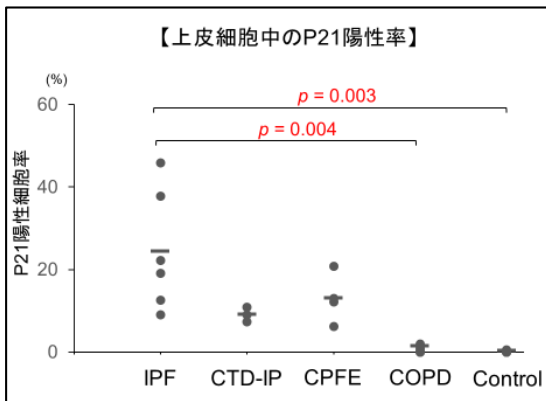
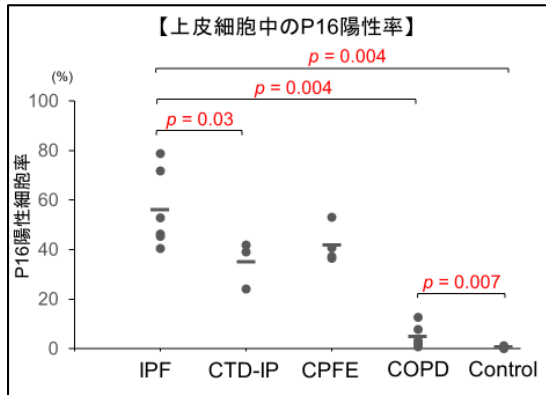


図 1. 肺胞上皮細胞における P16、P21 陽性率

(2) NF- κ B は SASP の誘導に中心的な役割を果たしていることが知られていることから、抗 P16 抗体と抗 phospho-NF- κ B 抗体を用いた 2 重染色を行った。その結果、一部の気管支上皮細胞や肺胞上皮細胞で P16 と phospho-NF- κ B の共陽性所見が認められた (図 2)。そこで P16 陽性細胞中の phospho-NF- κ B 陽性率を測定したところ、COPD、IPF、CTD-IP、CPFE の間には P16 陽性細胞中の phospho-NF- κ B 陽性率 (老化細胞の SASP 陽性率) には有意差が認められなかった (図 3)。一方、P16 陰性細胞中の phospho-NF- κ B 陽性率を検討したところ、いずれの疾患群においても非老化細胞における phospho-NF- κ B 陽性細胞はほとんど認められなかった (図 4)。

以上の結果から、COPD と肺線維症では老化細胞あたりの SASP は同等に生じていることが示唆された。さらに非老化細胞には

phospho-NF- κ B 陽性細胞はほとんど認められなかったことから、COPD と肺線維症における NF- κ B を介した炎症には細胞老化が強く関与していることが知られた。

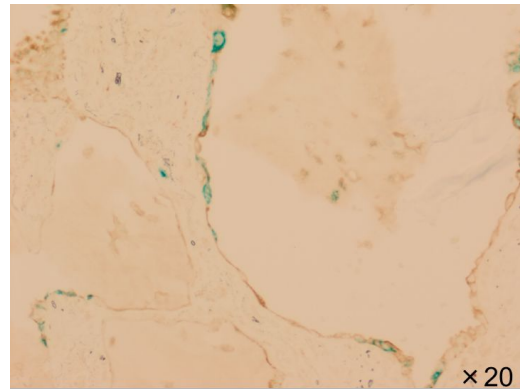


図 2 IPF 患者の P16 (緑) と phospho-NF- κ B (茶色) 2 重染色

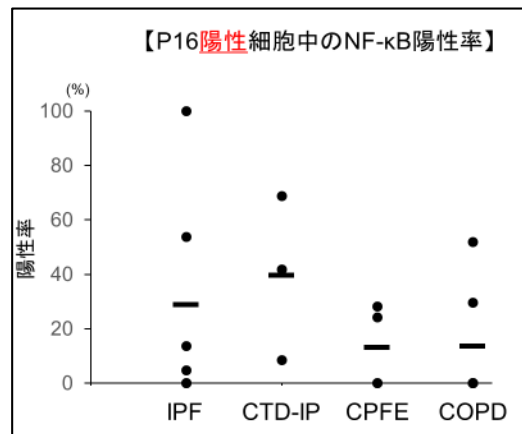


図 3 老化細胞における SASP 陽性率

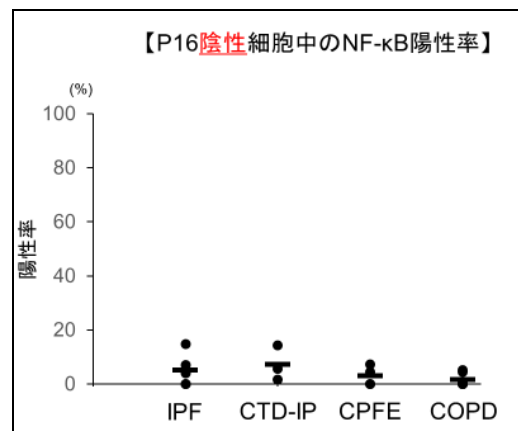


図 4 非老化細胞における phospho-NF- κ B 陽

性率

以上の結果から、細胞老化は COPD と肺線維症の両方に生じているが、その程度は肺線維症の方が高度なことが知られた。さらに肺線維症のなかでの検討では、IPF は CTD-IP に比べて細胞老化が高度であることが知られた。しかし老化細胞における SASP 発現率は COPD と肺線維症の間には差が認められなかった。また COPD と肺線維症における NF- B を介した炎症には細胞老化が関与し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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

奥田 良, 布川 寛樹, 藤原 尚子, 大場 智広, 川辺 梨恵, 本多 紘二郎, 佐藤 新太郎, 天野 雅子, 松島 秀和, 中村 博幸, 青柴 和徹 間質性肺炎と COPD における細胞老化の比較検討 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青柴 和徹 (AOSHIBA, Kazutetsu)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 60231776

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()