

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09197

研究課題名(和文) COPD増悪における肺とgap junctionの役割と肺由来新規バイオマーカー

研究課題名(英文) Pathogenesis of COPD exacerbation and the proteins related to gap junction

研究代表者

石井 健男 (Ishii, Takeo)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：90445750

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)：COPD増悪は、感染を引き金とし、肺気腫による肺構造変化も関与しうる。肺気腫形成にてgap junctionによる肺内の細胞間の情報伝達障害が起こり、感染に対する炎症性サイトカインの分泌の過剰にて増悪惹起との仮説を検証。gap junction蛋白の一つCx43のSNP rs9320841と増悪頻度が関連。COPD患者血液由来単核球を死菌で刺激、前述のSNPは、IL-1betaなどのサイトカインの発現パターンと有意相関、TLRとCX43との単球細胞上での関連と炎症惹起を示唆。増悪モデルマウスを用いgap junction機能促進薬による全身への治療効果検討、ヒト病理標本にて病態生理検索中。

研究成果の概要(英文)：Though COPD exacerbation is triggered by infection, structural change of the lung in the progression of emphysema formation could also affect susceptibility of exacerbation. Thus, we investigated the association between genetic variations of Cx43, a gap-junction protein, and susceptibility of COPD exacerbation, and also assess the mechanism of COPD exacerbation through gap-junction protein including Cx43. A SNP in Cx 43, namely rs9320841, was significantly related to the frequency of COPD exacerbations in a Japanese population. This SNP was also related to the expression of cytokines including IL1beta in the mononuclear cells of COPD patients when stimulated with some bacteria which have LPS. Thus, we suspect that TLR and CX43 has relationship on the cell surface of these cells via intracellular or intercellular manner to induce inflammation due to COPD exacerbations. We now further analyze the mechanism through in-vivo exacerbation murine model and pathological point of view.

研究分野：COPD

キーワード：COPD 増悪(exacerbation) gap junction 遺伝子多型 (SNP) 病態関連遺伝子 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) において増悪は、入院や死亡率増加に直結し (GOLD 2011)、その病態解明と新規治療法の開発は喫緊の課題である。増悪は、ウイルスや細菌の感染を引き金とし、病態において白血球の果たす役割が大きく、我々も白血球に発現するレクチンである SIGLEC14 の遺伝子型が増悪に関与すること (Ishii T, et al. Cell Mol Life Sci 2012), T cell の分化に関わる IL 27 の血清濃度が増悪のバイオマーカーとなり、同病態と深く関わることを報告している (Ishii T, et al. Physiol Rep. 2014)。

しかしながら、増悪は COPD 特有の現象であり、免疫系の中心である白血球だけでなく、肺気腫形成などによる肺自体の構造変化が病態に深く関与しているはずである。肺胞上皮細胞は相互に、また肺胞マクロファージとも、gap junction を介して Ca<sup>2+</sup>イオンや抗原ペプチドを用いた情報伝達を行い、炎症性サイトカインやサーファクタントの分泌を調節していることが知られる (Westphalen K. Nature. 2014)。肺気腫の進行とともに、肺胞上皮の alignment の破壊から gap junction による情報伝達に障害が起こり、感染に対する炎症性サイトカインの分泌の過剰、サーファクタント分泌の不全、および抗原提示能の低下に伴う獲得免疫能の障害により、増悪が起こるとの仮説を立て検証、肺由来の増悪特異的バイオマーカーの探索も行うこととした。

申請者は、COPD の原因遺伝子検索を他者に先がけ検討、サーファクタント蛋白 SFTPD と COPD との関連などを報告した (Thorax. 1999, Eur Respir J. 2001, Eur J Hum Genet 2011)。本学には、COPD 450 症例のゲノム DNA および血清があり、200 症例については増悪頻度データもある。申請者は、白血球表面に発現するシアル酸認識蛋白シグレック 14 非発現症例において増悪頻度が有意に低く、同タンパク発現が増悪リスク予測に有効であること (Ishii T. Cell Mol Life Sci 2012)、新規増悪マーカーとして IL27 を見出した (Ishii T. Physiol Rep. 2014) (特許申請中)。増悪との関連を既報告された遺伝子は我々のシグレック 14 を含め主に白血球由来蛋白であり、肺胞や気道上皮由来蛋白や肺の構造と増悪感受性の関連は検討されていない。

## 2. 研究の目的

肺気腫の進行により gap junction による肺胞上皮間および肺胞マクロファージと肺胞上皮の間の情報伝達障害が起こり、増悪感受性が強まることを検証するため、以下を明らかにすることを目的とした。

(1) Gap junction 蛋白 Cx 43 の遺伝子型および末梢血白血球表面での発現量と増悪頻

度との関連の検討。骨髓球系細胞と肺胞由来および気道由来細胞の共培養にて、Cx43 などのブロックにより LPS 刺激による炎症性サイトカインの分泌の過剰、サーファクタント分泌の不全の検討。Gap junction 機能促進薬の投与による、増悪モデルマウスにおける増悪治療効果の検討。

(2) Cx43 等の Gap junction 蛋白の COPD 肺における発現の減少や不均等分布の病理学的検証。

(3) Cx43 を梃にした肺細胞由来の新規増悪バイオマーカーの探索。

上記の研究の結果、COPD における肺の構造破壊そのものも増悪の原因になっていると結論でき、新規の肺由来の増悪バイオマーカーを見出すことができると考えた。

## 3. 研究の方法

1. Gap junction 蛋白 Cx 43 の遺伝子型および末梢血白血球表面での発現量と増悪頻度との関連、invitro・invivo の系による Cx43 の増悪への関与の検討。

Gap junction 蛋白 Cx43 の遺伝子型と増悪との関連の検討：Cx43 の遺伝子多型の COPD 増悪、気流閉塞 (呼吸機能検査で FEV1%pred)、および肺気腫の程度 (LAA% [胸部 CT での定量的肺気腫評価]) との関連を検証する。プロモーターの一塩基多型 (SNP) と coding SNP (マイナーアレル頻度 0.10 以上) の SNP は

・プロモーター SNP : rs7740324, rs3763174, rs2071165, rs2071166 ・cSNP : なし  
COPD 135 例の母集団の遺伝子型を決定し COPD 増悪頻度、FEV1%pred, LAA% との関連を検討。可能ならさらに、関連の rs9320841 を含む、別母集団で validation。

Gap junction 蛋白 Cx 43 の末梢血白血球表面での発現量の決定：COPD 患者の末梢血白血球を採取、細胞表面の Cx43 の発現量をフローサイトメトリーで決定する。

(i) 末梢血白血球表面の Cx43 の発現の測定系の確立：単球系細胞株 THP-1 を用いて、刺激無、および LPS 刺激下 (Cx43 発現を誘導) での Cx43 の発現量をフローサイトメトリー (BD FACSVerser™、現有) で測定、測定系を確立する。

(ii) Cx 43 の末梢血白血球表面での発現量の決定：COPD 患者より、末梢血白血球を採取する。白血球から単球を磁気ビーズにて収集。LPS にて 2 4 時間刺激、および無刺激で培養後、フローサイトメトリーで表面の Cx43 発現量を測定。Cx43 発現量と COPD 増悪頻度、FEV1%pred, LAA% との関連を検討。

骨髓球系細胞と肺由来細胞の共培養にて、Cx43 などのブロックにより LPS 刺激による炎症性サイトカインの分泌の過剰、サーファクタント分泌の不全の検討。骨髓球系細胞 THP-1 と、肺胞由来細胞 A549 または気道由来細胞 BEAS-2B を、共培養する系を確立 (Am

J Physiol Lung Cell Mol Physiol 299: L263 などに準拠)。それぞれの cell line について、Cx43 の siRNA を組み込んだベクターの stable transfectant を作成。さらに、骨髓球系、肺由来細胞、又はその双方の Cx43 を knock-down した細胞、及び正常細胞にて、上記の共培養を行う。LPS にて刺激、培養上清および各培養細胞における炎症性サイトカイン (IL-8, TNF-alpha)、サーファクタント (SFTPD, pro-SFTPB) の蛋白発現量を測定。

増悪モデルマウスにおける Gap junction 機能促進薬の増悪治療効果の検討 (担当: 辻): エラスターゼによる肺気腫形成ののち LPS により増悪を mimic するマウスモデル (Ishii T. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013. に準拠) の系を導入。具体的には豚膵エラスターゼ (2.5U/匹) を経気道的に注入し 4 週間後に肺気腫を作成した C57BL/6J マウス (肺気腫モデル) に対し、1mg/kg の LPS を気道内注入することで増悪モデルマウスを作成。マウスに、可能ならば経鼻的に、困難な場合は静脈あるいは腹腔内投与にて Cx43 のヘミチャネルを開く効果のある AAP, AAP10, または ZP123 を投与する濃度決定などの予備実験。同投与濃度で、肺において Cx43 の 368 番目のセリン残基がリン酸化され活性化されているかをウエスタンブロット。上記の増悪モデルマウスにて、Cx43 の機能促進薬を前投与、その後 LPS 刺激により増悪が抑制できたか否かを、気管支肺泡洗浄液中の白血球総数及び CD8+ T 細胞増多の抑制、炎症性サイトカインなど (IL-8, IL-27, MMP-9) の抑制によって評価する。

2. Gap junction 蛋白の COPD 肺での発現の減少や不均等分布の病理学的検証。(担当: 新井): 東京都健康長寿医療センターの連続剖検例の肺気腫症例について、Cx43 などの gap junction 蛋白を免疫染色し (抗 Cx43 抗体などは Sigma 社より購入予定) 肺気腫のない症例と比較し gap junction 蛋白の発現が減少し分布が不均等であることを、病理学的に検討する。肺気腫の重症度はすでに半定量的にスコア化されデータベース化 (肉眼所見により重症化をスコア。病理学的所見により山中らの方法に従い小葉中心性、汎小葉性、葉状肺気腫に分類) されているため、同スコアと gap junction 蛋白の発現量及び分布との間の相関を検討する。さらに、上記剖検例のゲノムを用いて Cx43 などの gap junction 蛋白の遺伝子型を決定、遺伝子型と肺気腫の程度、gap junction 蛋白の発現量及び分布との間の相関を検討する。

3. Cx43 を梃にした肺細胞由来の新規増悪バイオマーカーの探索。(担当: 石井):

in vitro の系を用いた増悪マーカー候補の抽出。Cx43 の野生型及び knockout 型の細胞 (THP-1, A549, 及び BEAS-2B) を用いた共培養の系を LPS で刺激、肺由来細胞内に

において LPS により発現が誘導され且つ Cx43 knockout にて発現がより強まる遺伝子を mRNA について、次世代シーケンサー (HiSeq (illumina 社)、本学にて現有) 網羅的に検討、増悪マーカー候補を抽出。特に、発現が LPS, Cx43(-) にて誘導されている可溶性の分泌型蛋白を、有力な候補と考え、抽出。

実際の増悪及び非増悪サンプルによる、増悪マーカー候補の機能の検証: 前年度に選択した肺由来の増悪マーカー候補蛋白について、実際の増悪及び非増悪時のペア血清サンプル 40 セット (1st population) で計測し、増悪時に濃度の上昇が見られるか ELISA にて検討する (ELISA が販売されていない場合は、まずは ELISA の構築を行う)。有意に増悪時に増加を認めた蛋白について、新規の 32 セットの増悪及び非増悪時の血清ペア (2nd population) を用いて検討、増悪マーカーとしての検証を行う。

#### 4. 研究成果

- (1) Gap junction 蛋白 Cx43 の遺伝子型と増悪との関連の検討: Cx43 の遺伝子多型の COPD 増悪、気流閉塞、および肺気腫の程度との関連を検証。Cx43 近傍のほか 1SNP について全症例について遺伝子型決定を完了。また、promoter SNP についても同様に検討予定であったが、1000genome.org のデータベース情報などから連鎖不平衡が強い SNP が大半を占めるなど遺伝子型決定が意味をなさない可能性が高まったため、2SNP のみの遺伝子型決定となった。Rs9320841 は増悪と関連、一方、rs2892767 は増悪との関連を認めなかった。よって、rs9320841 と連鎖不平衡にある SNP の分布する遺伝子領域が増悪に関連すると目され、機能を検討すべき遺伝子領域は Cx43 配列の比較的狭い領域に限定されると推測した。
- (2) Gap junction 蛋白 Cx43 の末梢血白血球表面での発現量の決定: COPD 患者の末梢血白血球細胞表面の Cx43 発現量を決定するため、当初 現有している THP1 細胞 (cell line) を用いて測定系を確立すべく条件検討を行うも難渋、現状に至るまで確立できていない状態である。よって、遺伝子型と炎症反応との関連性を見る実験に口述のように切り替えた。
- (3) 骨髓球系細胞と肺由来細胞の共培養にて、Cx43 などのブロックにより LPS 刺激による炎症性サイトカインの分泌の過剰、サーファクタント分泌の不全の検討: THP-1 と A549, BEAS-2B の共培養する系を確立すべく予備実験。しかしながら、stable transfectant を siRNA に関して作る技術がうまく確立できず、transient tranfection にての検討も考慮したが、

細胞への遺伝子導入効率が安定しない、各細胞での導入効率の大きな差、さらに導入後の細胞の再度巻き直しの際に共培養にて用いる適切な血清の選択も現実には難しく、頓挫。Cx43 と炎症との関連の検討は別の後述の実験系に切り替えた。

- (4) COPD 患者白血球における Cx43 SNP と炎症との関連の検討：COPD 患者の血液から採取した monocyte (flowcytometry にてソーティング) を用い、インフルエンザ桿菌の死菌を用いて刺激、TNF- など 4 種類のサイトカインについて刺激時の発現量と同 SNP の遺伝子型との関連を検討。増悪に関連する SNP rs9320841 は、IL1beta などのサイトカインの発現パターンと有意に相関していた。現在、血清中における増悪、非増悪の時の 10 種類以上のサイトカインの発現パターン (データ現有) と本遺伝子型との関係を TIBCO Spotfire を用いて検討中。Cx43 とインフルエンザ桿菌との関係から示唆される分子シグナル経路を、LPS により刺激の培養系での分子経路解析結果と照らし合わせ、また過去文献における検討を、パスウェイ解析ツール IPA を用いて行った。既報 (Scientific Reports, 2018; 8: 166) から、LPS の刺激により TLR と Cx43 との単球細胞上での直接の関連と炎症惹起が示唆され、同分子経路上における蛋白を新規増悪関連蛋白として現在も検討中。

- (5) 増悪モデルマウスにおける Gap junction 機能促進薬の増悪治療効果の検討：エラストラーゼによる肺気腫形成ののち、LPS により増悪を mimic するマウスモデルの系を導入。豚膵エラストラーゼ (2.5U/匹) を経気道的に注入し肺気腫を作成した C57BL/6J マウス (肺気腫モデル) はエラストラーゼ投与後早期に体重減少や腓腹筋減少を伴い、増悪時の臨床経過に類似していることから、増悪 mimic するマウスモデルの系は確立と考えた。Gap junction 蛋白は骨格形成に必要であり、同マウスの腓腹筋の遺伝子解析による Gap junction 機能促進薬の漸新世、特に筋肉への増悪治療効果を検討中。

- (6) Gap junction 蛋白の COPD 肺での発現や不均等分布の病理学的検証：東京都健康長寿医療センターの連続剖検例の肺気腫症例について、Cx43 などの gap junction 蛋白を免疫染色し、肺気腫のない症例と比較し gap junction 蛋白の発現減少や分布不均等を病理学的に検討中。

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 0 件)

[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

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 健男 (ISHII, Takeo)  
学振 太郎 (GAKUSHIN, Taro)  
日本医科大学・大学院医学系研究科・研究生  
研究者番号：90445750

### (2) 研究分担者

新井 富生 (ARAI, Tomio )  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療  
センター (東京都健康長寿医療センター研  
究所)・研究員  
研究者番号：20232019

辻 隆夫 (TSUJI, Takao )  
東京医科大学医学部・講師  
研究者番号：30459664

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )

以上。