

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19172

研究課題名(和文)LT Rシグナルに着目したCOPD病態解明

研究課題名(英文)Contribution of LTBR signaling for development of COPD

研究代表者

三上 優(Mikami, Yu)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50732806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：COPD(慢性閉塞性肺疾患)は近年、全身性の炎症性疾患と考えられており、様々な炎症の機序が提唱されているが、炎症性疾患としてのCOPDへの診断・治療の根本的なアプローチは充分でない。本研究は、COPDにおけるLIGHTおよびLT Rシグナルに着目し、細胞実験並びに肺気腫モデルマウスの樹立を通じて同分子の役割を解明することで、新たな病期進展予測マーカー・予後マーカーとしての可能性、さらに治療ターゲットとしての可能性を探ることを目的とした。その結果、モデルマウスにおいてLT Rの発現が上昇しており、COPDにおける新規マーカーの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, Chronic Obstructive disease(COPD) is recognized as a systemic inflammatory disease. A variety of mechanisms of the inflammation in COPD are reported; however, the therapeutic approach for the inflammation is not sufficient. The purpose of this project is to investigate the roles of Tumor necrosis factor superfamily member 14 (LIGHT) and Lymphotoxin beta receptor (LT R) signaling in COPD through both basic cell researches and development of a COPD animal model. We developed the COPD mice model, and LT R was induced in the lung of COPD model mice. Our findings suggested that LT R might be a disease marker and therapeutic target of COPD.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：COPD 肺気腫 マウスモデル LTBR マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease; 慢性閉塞性肺疾患)はタバコの煙などの有害物質に長期間吸入暴露されることで生じる肺の炎症性疾患である。喫煙歴のある中高年に好発し、世界での有病率は約10%で、WHOの調査では2004年における世界の死因の第4位であり、厚生労働省の統計では2012年の死亡順位の第9位となっており、今後高齢社会の進行と、喫煙率が未だに高い本邦において、死亡者数、治療関連費用の増加が懸念されている。

以前より COPD の疾患概念は末梢気道病変に伴う物理的な気流閉塞に主眼が置かれており、受容体刺激薬、抗コリン薬といった気管支拡張薬が治療の主体であった。しかし近年、COPD は全身性の炎症性疾患と考えられるようになっており、治療においても抗炎症作用を示す吸入ステロイド薬を使用することで急性増悪の頻度を下げるなどの一定の効果は認められたが、実際には様々な機序によるステロイド抵抗性の炎症が残存し、根本的な治療としては十分でない。

肺の炎症性疾患の一つである気管支喘息は、COPD とは異なり吸入ステロイド薬が著効する。しかし、一部の患者はステロイドに抵抗性を示し、気道リモデリングを生じた重症喘息に移行し、COPD と似た病態を生じる。COPD、重症喘息とも様々なサイトカイン・ケモカインが病態の形成に関与することが知られている。近年、腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーである TNFSF14(LIGHT)は潰瘍性大腸炎、関節リウマチといった様々な炎症性疾患との関連が示唆されているサイトカインであり、マウスの喘息モデルにおいて気道炎症と気道リモデリングを促進することが報告され、最近注目されている(Doherty TA, et al. Nat Med. 2011.)。報告者らはこれまでに LIGHT による気道上皮細胞の上皮間葉転換を介した気道リモデリングへの関与を示した。さらに、LIGHT による気道炎症のメカニズムとして、気道上皮細胞に発現している Lymphotoxin receptor (LT R)を介したシグナルが、気道上皮細胞からのサイトカイン産生を生じ、気道における好中球性の炎症を惹起することでステロイド抵抗性を生じる可能性を示した。

重症喘息と COPD の病態は類似する部分も多く、上記 LIGHT が病態形成に関与している可能性が示唆されるものの、LIGHT-LT R シグナルが COPD の病因、病態の進行に関わる可能性については今までに報告されていない。報告者は本研究に於いて、COPD が全身性炎症性疾患という立場から、LIGHT-LT R シグナルを介した気道・肺の炎症が COPD 形成に及ぼす影響について検討することとした。

2. 研究の目的

LIGHT-LT RシグナルがCOPD形成におけるサイトカイン産生を始めとした気道炎症への関与や、その病態の一つである肺の気腫性変化形成への関与を検討することを目的とする。本研究では喫煙刺激による気道上皮細胞の LIGHT-LT Rシグナルへの関与、マウス喫煙モデルにおける LIGHT-LT Rシグナルへの関与を検討し、COPDにおける LIGHT および LT Rシグナルの役割を解明することで、新たな病期進展予測マーカー・予後マーカーとしての可能性、さらに治療ターゲットとしての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 公開データを用いたヒト検体での検討
*In silico*での検討として、公開されているデータベースである GEO (Gene Expression Omnibus ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)よりヒト気道上皮のマイクロアレイデータを入力し、網羅的な発現解析を行い健常人と COPD 患者での LT R、LIGHT の発現について比較した。

(2) タバコ抽出液 (Cigarette smoke extract; CSE)を用いた気道上皮細胞へのサイトカイン産生の評価

COPD病態形成における LT Rシグナルの及ぼす影響について検討するために、タバコ抽出液(Cigarette smoke extract; CSE)を作成し、ヒト気道上皮細胞へでのサイトカイン・ケモカイン産生について検討を行った。

(3) マウスモデルの作成

In vivo 実験系の樹立のため、CSE を経気道的に吸入させ、気管支肺胞洗浄液中の細胞数、病理学的、肺メカニクスの検討を行い、実験的肺気腫マウスモデルの作成を行った。

(4) モデルマウスにおける LIGHT-LT R シグナルの検討

上記で作成したモデルマウスを使い、肺内における LT R 発現の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 公開データの解析

健常者および COPD 患者ヒト肺組織を用いたマイクロアレイのデータを GEO より入手した(GSE38974, GSE37147)。図1に示すように COPD 患者肺検体において有意に LT R 遺伝子および LIGHT 遺伝子発現上昇を認めた。さらに、COPD の病期分類である Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)分類と上記遺伝子発現を比較すると、有意に病期と正の相関を認めた。このことは、肺組織において LTBR および LIGHT が疾患の伸展と深く関与していることを示唆するものと考えられた。

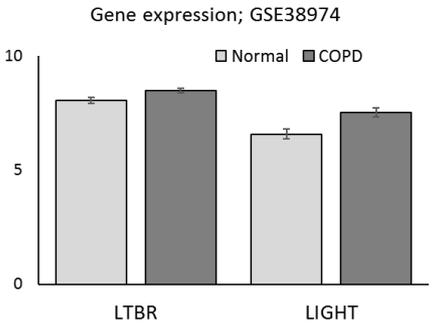
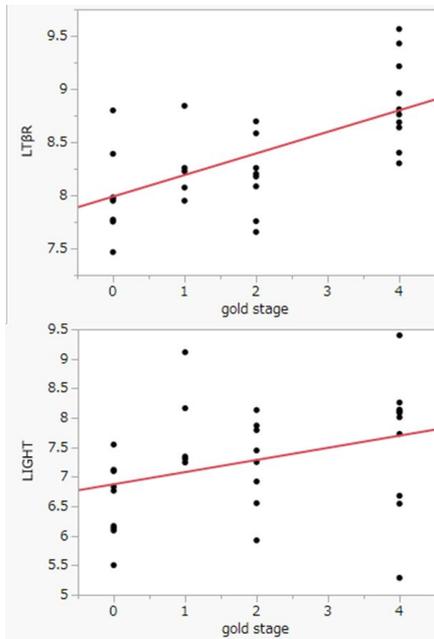


図 1)LTBR および LIGHT 遺伝子発現

(2)CSE による気道上皮細胞からのサイトカイン産生と LTBR 発現

上記結果から、COPD の形成が喫煙刺激によって気道上皮細胞での LT R 発現の上昇を来していると考え、購入した正常ヒト気道上皮 (NHBE) 細胞と小気道上皮 (SAEC) 細胞を専用培地で培養し、CSE 濃度を変えて刺激を行った。図 2 に示すように NHBE 細胞、SAEC 細胞ともに CSE の刺激で濃度依存的に IL-8、IL-6 といった炎症性サイトカインの発現上昇を認めた。しかしながら、期待された LT R 発現は濃度・時間によらず有意な変化を示さなかった。

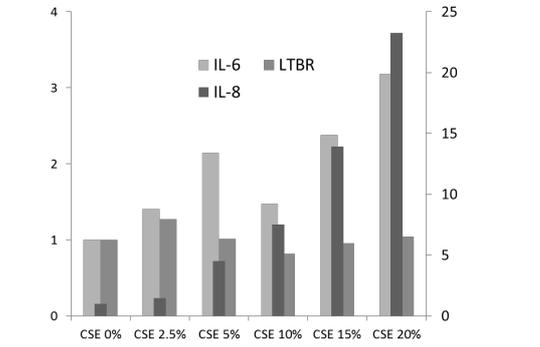


図 2)CSE 刺激と遺伝子発現

(3)肺気腫マウスモデルの樹立

15-17 週令 C57BL/6 のマウスを用いて実験的肺気腫マウスモデルの樹立を行った。(2)で作成を行った CSE をスプレイヤーを用いて経気管的にマウス肺に投与した。図 3 に示すように、組織学的にマウス肺の肺胞腔の増大を認め、肺気腫形成を認めた。また、マウス肺の気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞数変化を検討したところ、CSE 投与群で細胞数の上昇を認めた。BALF 中の細胞数カウントは従来個人差が大きかったが、この際に本研究で購入したセルカウンターを用いることで、再現性の高いデータを得ることができ、信頼性の高い実験系を立ち上げることができた。さらに、肺機能を FlexiVent システムで評価したところ、CSE 投与マウスの肺コンプライアンスは有意に上昇を認めた。

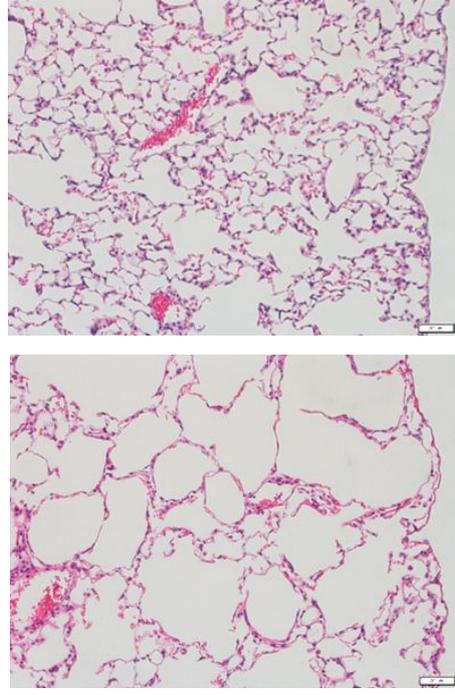


図 3) マウス肺組織 (上が対照群マウス肺、下が CSE 投与マウス肺)

(4)肺気腫モデルマウスにおける LT R 発現の検討

上述のように樹立したモデルマウスを用い、CSE を経気管投与し肺気腫を形成したマウスと対照群として PBS を経気管投与したマウス肺から mRNA を抽出し LTBR 発現を qPCR で解析した。図 4 に示すように、CSE 投与マウスにおいて LTBR mRNA 発現が上昇している傾向が認められた。以上の *in vitro*, *in vivo* 実験結果から、結果 1 で得られた COPD 患者肺における LT R 発現の上昇は、喫煙刺激によって気道上皮細胞に発現が誘導される結果ではなく、肺を構成する血球細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などの他の細胞で発現が誘導されている可能性が示唆された。

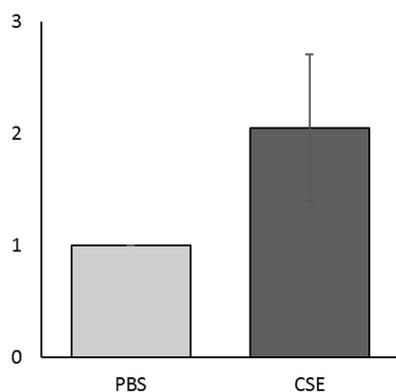


図 4) マウス肺における LTBR mRNA 発現
今後マウス肺を詳細に分析し、LTBR 発現が上昇している細胞を同定することにより LT R 発現が COPD の新たなマーカーとなる可能性が期待できる。

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 6 件)

1) Noguchi S, Saito A, Mikami Y, Urushiyama H, Horie M, Matsuzaki H, Takeshima H, Makita K, Miyashita N, Mitani A, Jo T, Yamauchi Y, Terasaki Y, Nagase T.

TAZ contributes to pulmonary fibrosis by activating profibrotic functions of lung fibroblasts.

Sci Rep. 2017 Feb 14; 7:42595. 査読有り

2) Mikami Y, Matsuzaki H, Takeshima H, Makita K, Yamauchi Y, Nagase T.

Development of an In Vitro Assay to Evaluate Contractile Function of Mesenchymal Cells that Underwent Epithelial-Mesenchymal Transition.

J Vis Exp. 2016 Jun 10;(112). 査読有り

3) Noguchi S, Saito A, Horie M, Mikami Y, Suzuki HI, Morishita Y, Ohshima M, Abiko Y, Mattsson JS, König H, Lohr M, Edlund K, Botling J, Micke P, Nagase T.

An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer.

Clin Cancer Res. 2014 Sep 1;20(17):4660-72. 査読有り

4) Nakamoto K, Watanabe M, Sada M, Inui T, Nakamura M, Honda K, Wada H, Mikami Y, Matsuzaki H, Horie M, Noguchi S, Yamauchi Y, Koyama H, Kogane T, Kohyama T, Takizawa H.

Serum Reactive Oxygen Metabolite Levels Predict Severe Exacerbations of Asthma. PLoS One. 2016 Oct 24;11(10):e0164948.

査読有り

5) Matsuzaki H, Mikami Y, Makita K, Takeshima H, Horie M, Noguchi S, Jo T, Narumoto O, Kohyama T, Takizawa H, Nagase T, Yamauchi Y.

Interleukin-17A and Toll-Like Receptor 3 Ligand Poly(I:C) Synergistically Induced Neutrophil Chemoattractant Production by Bronchial Epithelial Cells.

PLoS One. 2015 Oct 27;10(10):e0141746.

査読有り

6) Mikami Y, Matsuzaki H, Horie M, Noguchi S, Jo T, Narumoto O, Kohyama T, Takizawa H, Nagase T, Yamauchi Y.

Lymphotoxin receptor signaling induces IL-8 production in human bronchial epithelial cells.

PLoS One. 2014 Dec 11;9(12):e114791.

査読有り

[学会発表](計 2 件)

1) Naoya Miyashita, Yu Mikami, Hidenori Kage, Kosuke Makita, Hideyuki Takeshima, Hirotaka Matsuzaki, Yasuhiro Yamauchi, Goh Tanaka, Daiya Takai, Yutaka Yatomi, and Takahide Nagase

Evaluation of incidental lung cancer in hospitalized patients with nonrespiratory diseases. European Respiratory Society 2016. London (UK)

2) Yu Mikami, Kosuke Makita, Osamu Narumoto, Hideyuki Takeshima, Yasuhiro Yamauchi, Masafumi Horie, Satoshi Noguchi, Goh Tanaka, Daiya Takai, and Takahide Nagase

Respiratory manifestations in hospitalized patients with hematological malignancies

European Respiratory Society 2015. Amsterdam (Netherlands)

[図書](計 1 件)

Yu Mikami. Adverse Fetal Effects of Diesel Exhaust -Induced Oxidative Stress.

PM2.5: Role of Oxidative Stress in Health Effects and Prevention Strategy 133-140

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 優 (MIKAMI YU)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50732806