

令和元年9月2日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05307

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患に対する新規炎症制御法の確立に関する研究

研究課題名(英文) New anti-inflammatory strategy for the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

一ノ瀬 正和 (Ichinose, Masakazu)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80223105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では1) 抗老化物質であるGrowth differentiation factor 11 (GDF11)がCOPD患者血液中および肺組織中で低下していることを明らかにした。外因性に投与したGDF11によってエラスターゼ曝露による細胞老化ならびに肺の気腫化を有意に抑制した。2) 酸化型コレステロールはCOPD患者の肺において発現が増強しておりニトロ化ストレスを介して肺線維芽細胞の老化に関与することが明らかになった。3) COPD患者由来マクロファージのエピゲノムの研究では、COPD患者の肺胞マクロファージでは細胞表面の細菌貪食受容体であるCD169の発現が低下していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDにおける抗炎症治療の確立にはCOPDの病態をさらに解明する必要がある。我々は全身及び肺における抗老化因子GDF11の発現がCOPD患者において低下していることを明らかにした。さらにCOPD患者の肺および気道では酸化型コレステロールの発現が増強しており細胞老化に関与すること、COPDの肺胞マクロファージでは細菌貪食受容体の発現が低下していることを明らかにした。これらの知見は呼吸器領域のトップジャーナルに掲載されており、新規創薬の基礎研究となりうる重要な知見と考える。

研究成果の概要(英文)：In the current project, we found that the amounts of plasma growth differentiation factor 11 (GDF11) in the COPD patients were decreased compared to those of the healthy subjects as well as in the lungs. The amounts of plasma GDF11 were significantly correlated with the data of lung function. GDF11 was mainly expressed in the bronchial epithelial cells and lung fibroblasts. The expression of GDF11 in the lungs of COPD was significantly less than in those of healthy subjects. Administration of GDF11 was attenuated the elastase-induced cellular senescence and enlargement of airspace. Oxysterol was highly expressed in the lungs of COPD compared to healthy subjects. Oxysterol accelerated cellular senescence of the lung fibroblasts through nitrosative stress. Further, we found that the expression of CD169 in the COPD alveolar macrophages, which was involved in phagocytosis of bacteria was significantly attenuated compared to that in the control subjects.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：細胞老化 酸化型コレステロール エピゲノム変化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) における肺の炎症は、喫煙による外因性酸化ストレスや、炎症細胞から産生される内因性炎症反応が関与し、肺構築細胞の細胞死や老化が惹起されるため生じると考えられている。COPD の持続する炎症を制御することは極めて重要な研究課題である。一方で、抗炎症治療のターゲットとなる分子については十分解明されておらず、新規の炎症関連分子の同定や抗炎症物質の発見が求められる。本研究では、新規の炎症関連分子として、1) Growth differentiation factor 11 (GDF11)、2) 酸化型コレステロール(オキシステロール)、3) マクロファージにおけるエピゲノム変化、に着目する。1) GDF11 は、TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する成長因子で、胚発生の際の体軸決定に関わる分子である。近年の研究で、老年マウスの血中の GDF11 が低下し、GDF11 を外的投与することで加齢による心筋肥大、脳の幹細胞減少、骨格筋力低下が改善したと報告され (Cell 2013, Science 2014, Science 2014)、抗老化物質として脚光を浴びている。COPD では、肺構築細胞の老化による組織修復能の低下が重要な病因の一つである。本研究で着目する GDF11 は、主として間葉系細胞から分泌される成長因子で、強力な抗老化作用を有する液性因子である。一方で COPD 患者における産生様式やその役割については、全く不明である。2) オキシステロールは、コレステロールから sterol hydroxylases により触媒され、産生される酸化型コレステロールである。我々は、これまでオキシステロールが COPD の患者肺において過剰に産生され、気流閉塞の程度と関連することを明らかにした。本研究では、オキシステロールの生物活性として細胞老化及び老化関連炎症の観点から COPD における肺の炎症との関わりを明らかにし、その制御が COPD の肺の炎症と気流閉塞の制御に寄与するかを明らかにする。3) マクロファージにおけるエピゲノム変化は、COPD におけるこれまでの検討で histone deacetylase (HDAC) の失活によるヒストンのアセチル化が、持続する肺の炎症に寄与すると考えられてきた。一方で、他のエピゲノム変化については、肺胞マクロファージを採取する困難さが故に、研究が進んでいない。また、従来の研究は、炎症性のマクロファージの分画を考慮せず行われてきた。本研究では、肺組織から独自の酵素処理法を駆使し、さらに MACS/FACS を用いる (AJRCMB 2012) ことで肺胞マクロファージを効率よく採取することが可能になった。さらに、M1/M2 分画に分類し、マクロファージのエピゲノム変化を、ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化、DNA メチル化/ヒドロキシメチル化の観点から解明する。

### 2. 研究の目的

本研究は、COPD の病態の進展 (発症および疾患進行) に関し、1) 抗老化物質である GDF11、2) オキシステロール、3) COPD 患者由来マクロファージのエピゲノム、の 3 点に着目し、炎症病態の詳細を解析・解明することを目的とする。具体的には、1) COPD 患者において GDF11 の産生が低下していることを証明し、GDF11 による細胞老化抑制効果を解明し、2) オキシステロールの過剰産生による COPD 病態における役割の解明とその制御法を確立し、3) COPD 肺胞マクロファージのエピゲノム変化を解明することで COPD の病態解明を推進することを目的とする。以上の知見を踏まえ、COPD の新規抗炎症治療法の開発を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

GDF11 の研究では血漿・肺組織検体を用いて、COPD における産生低下を検証する。GDF11 は間葉系細胞から産生されることから、COPD 患者の身体活動性や運動耐容能との関連を検討する。また、GDF11 の生物活性については、タバコ抽出液曝露モデルを用いて COPD 関連メディエーターの産生および細胞老化反応が改善するかを明らかにする。また、肺気腫動物モデルにおいて GDF11 が肺細胞の老化と気腫化を抑制するかについて検討する。オキシステロールの研究では 27-OHC 曝露モデルを用いて細胞老化と関連炎症について細胞内シグナルを解明する。前述した COPD モデルを用いて 27-OHC の制御が有用であるかを検討する。エピゲノム変化の研究では M1/M2 分画に分離した肺胞マクロファージのエピゲノムの変化について検討する。

### 4. 研究成果

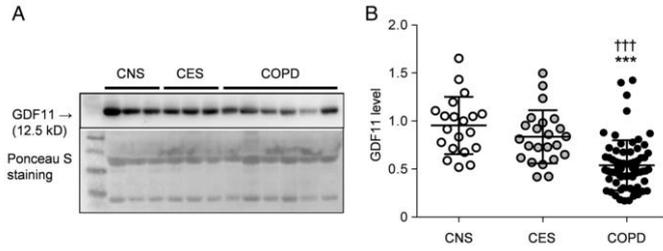
以下の 3 つの観点から研究期間内に明らかにした成果について記す。

#### 1) COPD における GDF11 の役割について

COPD 患者と健常対照者による二つのコホートを用いて血漿中の GDF11 の産生量をウエスタンブロット法を用いて検討した (図 1)。COPD 患者では対照群に比較して血漿中 GDF11 量は有意に低下しており、呼吸機能と負の相関関係を示した。この結果は、独立した検証コホートを用いて検討したところ同様の結果であった。次に、COPD 患者肺を用いて肺における GDF11 の発現について免疫組織学的に検討したところ、COPD 患者の気道上皮細胞、間葉系細胞において GDF11 の発現が低下していた (図 2)。患者肺から分離培養した肺構築細胞では、気道上皮細胞および肺線維芽細胞において蛋白レベルで GDF11 の発現量が低下していた。さらに肺線維芽細胞における GDF11 は premature senescence および replicative senescence によってその発現が有意に低下した。GDF11 を外因性に投与することでタバコ抽出液による premature senescence を有意に抑制した。さらに、エラスターゼ誘導肺気腫マウスモデルを作成し細胞老化および気腫化に対する GDF11 の効果について in vivo で検討した。GDF11 の投与によってエラスターゼによる細胞老化 (図 3) ならびに気腫化 (図 4) は有意に抑制された。本研究結果は、呼吸器領域のトップジャーナルの一つである Thorax 誌に掲載された (Onodera K et al, Thorax 2017; 72: 893-904.)。血漿

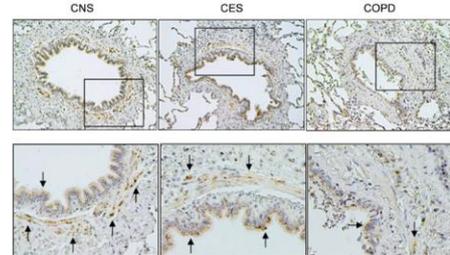
中の GDF11 は骨格筋で産生されるマイオカインの一種と考えられている。以上より、COPD 患者コホートを用いて COPD 患者における血漿中 GDF11 量と身体活動性ならびに全身性炎症との関連について検討した。その結果、COPD 患者の血漿中の GDF11 レベルと身体活動性の程度は有意に正の相関を示した(図 5)。さらに血漿中の GDF11 量と全身性炎症性サイトカインならびにケモカイン量、下肢筋力、運動耐容能は有意に相関した。本研究結果は COPD 関連の専門誌である Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 誌に掲載された(Tanaka R et al. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2018; 13: 1333-1342)。以上の結果から、抗老化因子 GDF11 が COPD の病態に関与することが示唆された。

図 1 血漿中 GDF11 の産生量



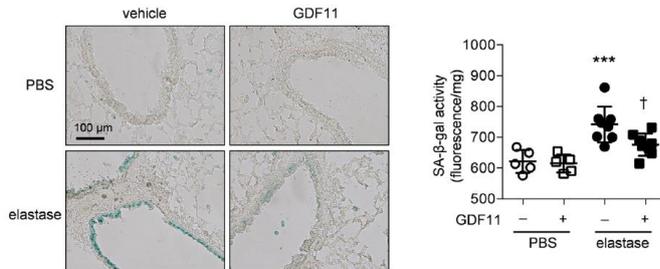
CNS = control never smoker, CES = control ex-smoker, COPD = COPD ex-smoker

図 2 肺における GDF11 の産生



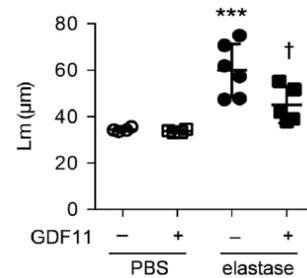
矢印は GDF11 陽性細胞を示す。COPD 患者では発現が低下している。

図 3 エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおける細胞老化に対する GDF11 の効果



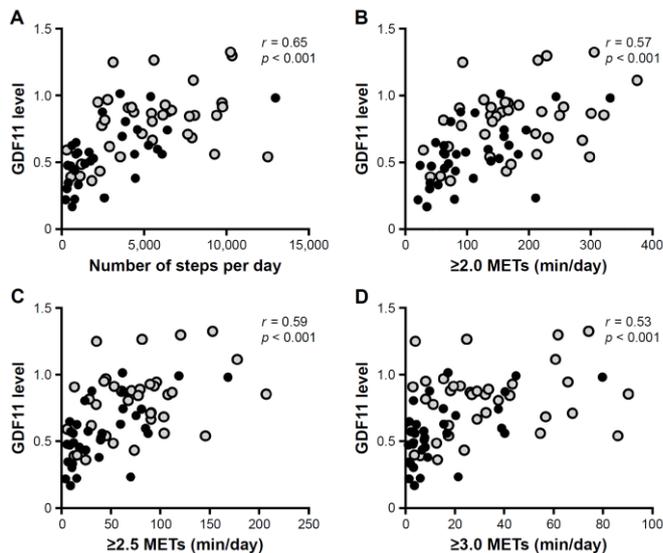
エラスターゼ投与によって肺細胞の細胞老化が生じる。青色の細胞が senescence associated β-galactosidase (SA-β-gal)陽性細胞で老化細胞を示す。GDF11 の投与によって陽性細胞が減少する。

図 4 エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおける肺の気腫化に対する GDF11 の効果



エラスターゼ投与によって肺の気腫化が生じる。肺胞間距離(Lm)が GDF11 の投与によって有意に減少する。

図 5 COPD 患者における血漿中 GDF11 と身体活動性の関連

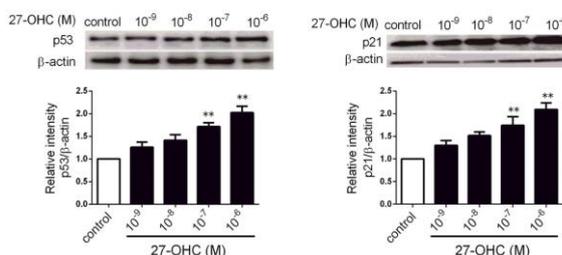


COPD 患者における血漿中 GDF11 量と一日歩数(A)および強度別身体活動性の程度は有意に正の相関をする(B-D)。METs = Metabolic equivalents.

## 2) COPDにおけるオキシステロールの役割について

我々は以前の報告で COPD 患者由来の気道検体では、喀痰中のオキシステロールの一種である 27-hydroxycholesterol (27-OHC) とその産生酵素である sterol 27-hydroxylase の発現が増加していることを明らかにした(Kikuchi T et al. Chest 2012; 142: 329-337)。本研究では、27-OHC が肺構築細胞に作用し、プロスタグランジンの産生を介して細胞老化を来すことを明らかにした(図 6)。さらに 27-OHC は酸化・ニトロ化ストレスを強力に誘導し、premature senescence を介して細胞老化を来すことを明らかにした。本研究内容は、Am J Physiol 誌に掲載されている (Hashimoto Y et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016; 310: L1028-1041.)。また、現在、さらに研究を進展させ、気管支喘息におけるオキシステロールの役割についても検討を進めている。

図 6 27-hydroxycholesterol(27-OHC)の細胞老化作用

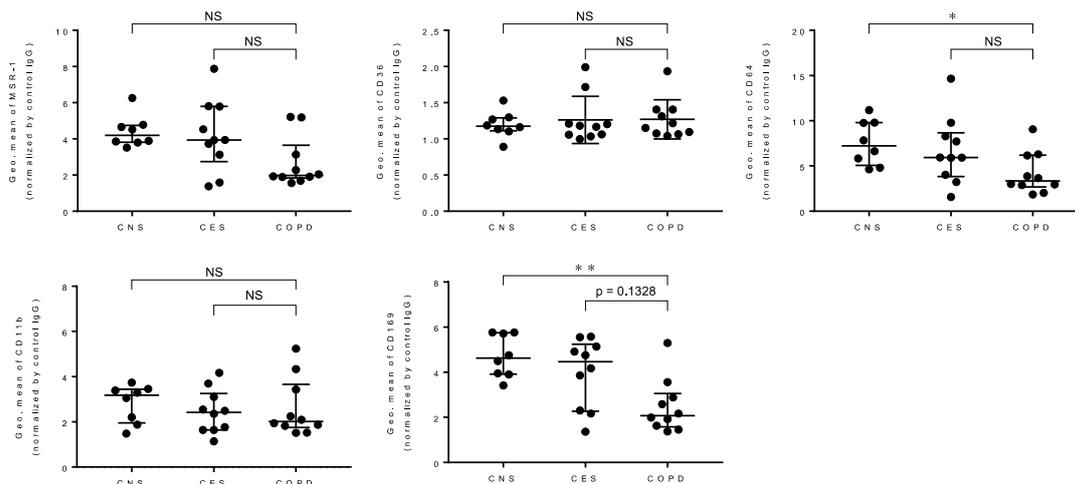


27-OHC をヒト肺線維芽細胞に投与すると老化関連因子 p53(左図)と p21(右図)の発現を濃度依存性に増強する。

## 3) COPD 肺細胞におけるエピゲノム変化

肺胞マクロファージに着目しエピゲノム変化を明らかにすることを目的に本研究を開始した。研究の過程で肺胞マクロファージでは細菌食食に関わる CD169 (Siglec-1) の発現が低下していることが明らかになった。肺胞マクロファージの表現型は COPD の研究分野でも現在最もホットな領域であり、エピゲノム変化に関する研究を継続しながら COPD 患者由来肺胞マクロファージにおける細菌食食受容体の発現と呼吸機能に及ぼす影響ならびにその機能解析を行った。COPD 患者由来の肺胞マクロファージでは CD169 の発現が健常対照者に比較して有意に低下しており(図 7)、細菌の食食能低下に関与している可能性が示唆された。本研究成果は呼吸器領域のトップジャーナルの一つである Eur Respir J 誌への投稿を目指して準備中である。

図 7 COPD 由来肺胞マクロファージの表面マーカーの発現



COPD 患者の肺胞マクロファージでは CD169 の発現が対照群に比較して有意に低下する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Ferguson GT, Rabe KF, Ichinose M (13 名中 6 番目) : Triple therapy with budesonide/glycopyrrrolate/formoterol fumarate with co-suspension delivery technology versus dual therapies in chronic obstructive pulmonary disease (KRONOS) : a double-blind, parallel-group, multicentre, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2018; 6(10):747-758. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30327-8. 査読有
2. Ichinose M, Minakata Y, Hirata K(9 名中 1 番目) : Efficacy of tiotropium/olodaterol on lung volume, exercise capacity, and physical activity. *Int J COPD* 2018 May 1; 13:1407-1419. doi: 10.2147/COPD.S166023. 査読有

3. Ichinose M, Nishimura M, Akimoto M, Kurotori Y, Zhao Y, de la Hoz A, Mishima M : Tiotropium/olodaterol versus tiotropium in Japanese patients with COPD: results from the DYNAGITO study. *Int J COPD*. 2018;13:2147-2156. doi: 10.2147/COPD.S169941. 査読有
4. Tanaka R, Sugiura H, Ichinose M (18名中18番目) : Physical inactivity is associated with decreased growth differentiation factor 11 in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J COPD*. 2018 Apr.13:1333-1342. doi: 10.2147/COPD.S157035. 査読有
5. Ichinose M, Fukuchi Y (7名中1番目) : Long-term safety and efficacy of combined tiotropium and olodaterol in Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Investig*. 2017;55(2):121-129. doi: 10.1016/j.resinv.2016.09.004. 査読有
6. Ichinose M, Sugiura H, Ohta K (11名中1番目) : Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for adult asthma 2017. *Allergol Int*. 2017 ;66(2):163-189. doi: 10.1016/j.alit.2016.12.005. 査読有
7. Ichinose M, Minakata Y, Hirata K (9名中1番目) : Study Design of VESUTO®: Efficacy of Tiotropium/Olodaterol on Lung Hyperinflation, Exercise Capacity, and Physical Activity in Japanese Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Adv Ther*. 2017 ;34(7):1622-1635. doi: 10.1007/s12325-017-0554-3. 査読有
8. Onodera K, Sugiura H, Yamada M, Ichinose M (21人中21番目) : Decrease in an anti-ageing factor, growth differentiation factor 11, in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2017Oct;72(10)893-904. doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-209352. 査読有
9. Sugiura H, Ichinose M : ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN AGGRAVATION OF ASTHMA. *Arerugi*. 2017;66(7):931-935. doi: 10.15036/arerugi.66.931. 査読有
10. Abe K, Sugiura H, Ichinose M (15人中15番目) : Possible role of Krüppel-like factor 5 in the remodeling of small airways and pulmonary vessels in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2016 ; 17 : 7-20. doi: 10.1186/s12931-016-0322-y. 査読有
11. Hashimoto Y, Sugiura H, Ichinose M (19人中19番目) : 27-Hydroxycholesterol accelerates cellular senescence in human lung resident cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(11):L1028-41. doi: 10.1152/ajplung.00351.2015. 査読有
12. Ichinose M: Assessment of the need for nitric oxide measurement in patients with respiratory diseases. *Respir Investig*. 2016 ; 54:137-138. doi: 10.1016/j.resinv.2016.03.005. 査読有

[学会発表] (計9件)

1. Ichinose M : Pathogenesis of COPD. 23<sup>rd</sup> Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory , Taipei, Taiwan (2018年12月2日)
2. Kyogoku Y, Sugiura H, Numakura T, Ichikawa T, Yamada M, Koarai A, Tanaka R, Akaike T, Ichinose M : Production of reactive nitrogen species in asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap. 23<sup>rd</sup> Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory , Taipei, Taiwan (2018年12月1日)

3. Kyogoku Y, Sugiura H, Numakura T, Ichikawa T, Yamada M, Koarai A, Tanaka R, Ito S, Akaike T, Ichinose M. : Enhanced Nitrosative Stress in the Airways of Patients with Asthma-Chronic Obstructive Pulmonary Disease Overlap. 2018 ATS International Conference, San Diego, USA 2018年5月23日
4. Numakura T, Sugiura H, Akaike T, Yamada M, Ichikawa T, Yanagisawa S, Koarai A, Ichinose M. : Production of Reactive Persulfide Species and Their Effects in the Lungs of Patients with COPD. 2018 ATS International Conference, San Diego, USA (2018年5月20日)
5. Ichinose M., Minakata Y, Motegi T, Ueki J, Gon Y, Seki T, Anzai T, Nakamura S, Hirata K. Efficacy of Tiotropium/Olodaterol on Lung Hyperinflation, Exercise Capacity, and Physical Activity in Japanese Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (VESUTO Study): A Randomized Crossover Trial. 2018 ATS International Conference, San Diego, USA (2018年5月18日)
6. Ichinose M., Minakata Y, Motegi T, Ueki J, Seki T, Anzai T, Takizawa A, Gronle L, Hirata K. Study design of vesuto; sutudy to evaluate the efficacy of tiotropium+olodaterol vs tiotropium on lung hyperinflation, exercise capacity, and physical activity in Japanese COPD patients. APSR2016, Bangkok. (2016年11月12日)
7. Numakura T, Sugiura H, Ida T, Kyougoku Y, Sato K, Tanaka R, Onodera K, Hashimoto Y, Hirano T, Yamada M, Koarai A, Fujii S, Akaike T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M.: Production of Reactive sulfur species in COPD lung. The 9<sup>th</sup> International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, The 16<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting Of the Nitric Oxide Society of Japan, Sendai (2016年5月22日)
8. Onodera K, Sugiura H, Yamada M, Koarai A, Togo S, Numakura T, Tanaka R, Sato K, Hashimoto Y, Abe K, Kyogoku Y, Ichinose M.: Role of Growth Differentiation Factor 11 in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. ATS2016 San Francisco. (2016年5月16日)
9. 小野寺克洋、杉浦久敏、山田充啓、田中里江、一ノ瀬正和 : COPD における老化抑制因子 Growth differentiation factor11(GDF11)の関与に関する研究. 第57回日本呼吸器学会学術講演会、東京、平成29年4月21日

[図書] (計2件)

1. 一ノ瀬正和 : 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の先制医療. 診断と治療 第106巻第1号、診断と治療社、p84-p89、2018
2. 一ノ瀬正和 : 喘息 第1章 概念・定義と疫学 疾患概念・定義. 最新医学別冊診断と治療のABC 135、最新医学社、p16-p24、2018

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名 : 杉浦 久敏

ローマ字氏名 : Sugiura, Hisatosi

研究協力者氏名 : 山田 充啓

ローマ字氏名 : Yamada, Mitsuhiro