

令和元年9月13日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09547

研究課題名(和文) COPDの発症リスクと予後予測の新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel biomarkers for the risk of COPD and prognosis

研究代表者

金子 猛 (KANEKO, TAKESHI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：90275066

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)：ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)は、炎症、酸化ストレスなどによって発現が誘導されるタンパク質である。血清HO-1は非喫煙者より喫煙健常者で低い傾向にあり、COPD患者では喫煙健常者より有意に低値であることが明らかになった。また、HO-1発現を誘導する転写因子であるNrf2遺伝子のSNP(rs6721961)が存在すると、健常人において血清HO-1が低い傾向にあった。さらに、COPD患者では、Nrf2のSNPが高頻度で認められた。以上から、Nrf2のSNPの存在に喫煙習慣が加わることでHO-1発現の低下をきたし、肺の炎症に対する防御機構が破綻してCOPDの発症や進行に可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、COPDの発症リスクやその予後予測のためのバイオマーカーとして血清ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)が有用である可能性が示唆された。今後のCOPD症例での更なる検討によって、血清HO-1は治療効果の判定や増悪の予測、重症度分類などに応用できる可能性がある。また、Nrf2遺伝子の一塩基多型(rs6721961)の検出も、喫煙によるCOPD発症のリスク診断において有用であり、特に、喫煙歴が浅く血清HO-1の低下を認めない喫煙者に対する禁煙指導の際には、禁煙の重要性について説得力のある情報になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Heme oxygenase-1 (HO-1) is a protein that plays a role in cytoprotection against inflammation and oxidative stress. Here we demonstrated that serum HO-1 tends to be lower in healthy smokers than non-smokers, and is significantly lower in COPD (chronic obstructive pulmonary disease) patients than healthy smokers. In addition, in healthy adults with the SNP (rs6721961) of Nrf2 (nuclear factor E2 related factor 2), a transcription factor of HO-1, there was a tendency for serum HO-1 to decrease. Moreover, COPD patients carried the Nrf2 SNP heterozygous or homozygous allele more frequently. These findings suggest that the combination of the Nrf2 SNP and long-term smoking habits may reduce HO-1 expression and increase the risk of COPD.

研究分野：慢性閉塞性肺疾患

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ-1 Nrf2 一塩基多型 rs6721961 喫煙 酸化ストレス 炎症 COPD増悪

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 呼吸器疾患において、予後や重症度を評価するためのバイオマーカーとして理想的とされる条件は、簡便でかつ繰り返し測定できる、発症の予測が可能となる、COPD 患者において、重症度・予後予測・治療の選択や効果の指標になりうる、侵襲度が低い、ことと考えられており、近年これらの条件をすべて満たすバイオマーカーが検討されているが、広く臨床応用されているものはない。

(2) ヘムオキシゲナーゼ-1 (hemeoxygenase-1: HO-1) は 32kDa の heat shock protein で、細胞内の遊離ヘムを一酸化炭素 (carbon monoxide: CO)、2 価鉄、biliverdin IX α に分解する酵素とされ、アポトーシス、炎症、酸化ストレスに対して細胞保護的に作用する^{1), 2)}。HO-1 は、インターロイキン-10、低濃度酸素、高濃度酸素、外因性一酸化窒素、ディーゼル排気粒子などの各種ストレスにより、主に肺胞マクロファージ、気道上皮細胞、血管内皮細胞などで発現が亢進し、Suzuki らは喫煙刺激 2 時間後に肺胞マクロファージ内で HO-1 mRNA が高発現したことを報告している^{3), 4)}。また、疾患領域でも、COPD を始めとして、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) における肺細胞での発現の減弱、急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome: ARDS) における肺細胞での高発現が報告されている^{4), 5), 6)}。近年では、組織だけでなく、血清での HO-1 のバイオマーカーとしての有用性も散見されている。Kirino らは高フェリチン血症の診断や血球貪食症候群・成人発症型 Still 病での疾患活動性評価に血清 HO-1 が有用とし、また、私たちは珪肺患者の血清 HO-1 は control 群に比較して高値を示し、血清 HO-1 の測定が珪肺患者における呼吸機能低下の予測に寄与することを報告している^{7), 8), 9)}。

2. 研究の目的

血清 HO-1 は各種呼吸器疾患におけるバイオマーカーになり得ると考えられるが、その高感度な測定方法、基準値、各種呼吸器疾患における臨床的意義などは未だ検討されていない。本研究では、既報で使用されている血清 HO-1 測定法よりも良好な検出力を有する新たな血清 HO-1 測定法の検査妥当性を検証し、さらに、COPD における臨床的意義について検討した。

3. 研究の方法

(1) 血清 HO-1 の高感度測定法の妥当性の検証

従来の測定法 (Commercial ELISA) では、測定キットとして HO-1 (human), ELISA kit (Enzo, Farmingdale, NY) を、新規の測定法 (Modified ELISA) では、ImmunoSet™ HO-1 (human), ELISA development set (Enzo, Farmingdale, NY) を使用し (後者の測定法のシェーマを下記に示す) standard curve の作成、intra- and inter- assay test、および spike and recovery test を検討し、さらに、両測定法の検出感度の比較を行った。

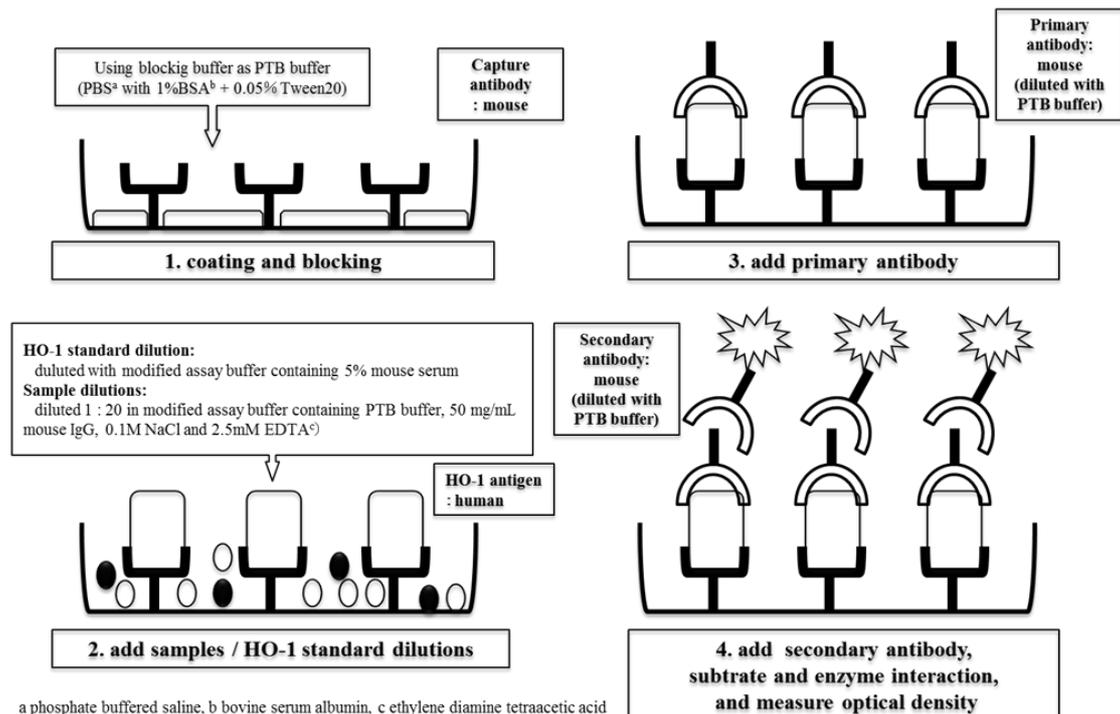


図1 Modified ELISA 法 (sandwich ELISA)

(2) 健診受検者における血清 HO-1 と *Nrf2* 一塩基多型 (SNP) の検証

健診受検者における血清 HO-1、*Nrf2* SNP の有無とその他の健診データとの関連性を検証した。

Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2): Nrf2 は、HO-1 等の酸化ストレス防御遺伝子群を誘導する転写因子であり、酸化ストレスに対する恒常性維持機構として働いている。この Nrf2-antioxidant pathway は、COPD、ARDS、肺がん、IPF、喘息等の様々な呼吸器疾患における肺細胞保護作用として重要な役割を果たすことが報告されており、Nrf2 遺伝子の SNP の存在が、疾患予後に関連することも指摘されている^{10), 11)}。なお、SNP の解析には、Smart Amp 法を用いた。

(3) 通院中 COPD 患者患者における血清 HO-1 とその他の臨床パラメータとの関連性を統計学的に解析した。

IRB 許可番号 : A181100007、B170900025、D1303019 (横浜市立大学倫理委員会)、簡 913 (防衛医科大学校倫理委員会)

4 . 研究成果

(1) 血清 HO-1 の高感度測定法の妥当性の検証

Modified ELISA における standard curve (図 2)、intra- and inter - assay test (表 1)、spike and recovery test (表 2) を示す。Four-parameter logistic regression algorithm を用いたところ、7 回の standard curve の相関係数は 0.998 ± 0.002 と良好な再現性を示し、検出限界値は 0.038 ng/mL であった。Intra-assay test は 6 サンプルを使用して、サンプル毎に同一プレート内 10 か所で測定し、inter-assay test は 6 サンプルに対して、サンプル毎 6 プレート、かつ、同一プレート内 2 か所で測定を、1 日 2 回行った。Intra-assay test と inter-assay test の coefficient variation は 7% と 10% で、いずれも許容範囲内であった。Spike and recovery test は、spike として 1 ng/mL 、 5 ng/mL 、 10 ng/mL の既知濃度 HO-1 を用いて行い、% Recovery はそれぞれ 98%、105%、104%、coefficient variation は 10% 以下であった。さらに、Modified ELISA と Commercial ELISA の比較 15 人の血清を用いて、血清 HO-1 の測定値を Commercial ELISA と Modified ELISA で比較した (図 3)、Modified ELISA では、血清 HO-1 値は $17.2 \pm 9.5 \text{ ng/mL}$ で 15 例全て測定可能であった。一方、Commercial ELISA では、血清 HO-1 値は $2.1 \pm 0.7 \text{ ng/mL}$ と 4 例で HO-1 は測定できなかった。

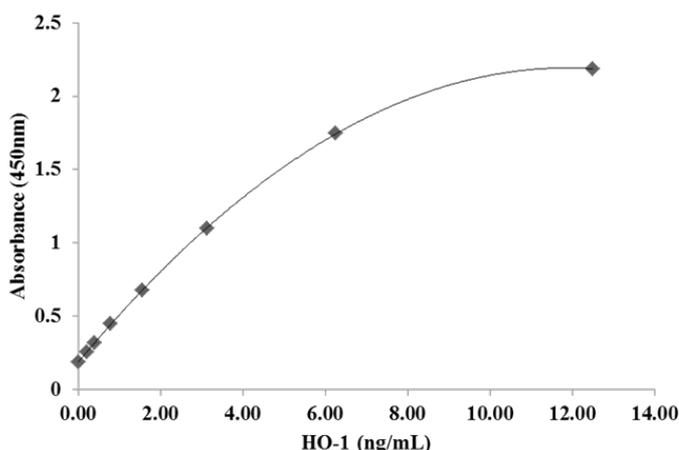


図 2 Standard curve

表 1 Intra- and Inter-assay test

N = 6	HO-1 (ng/mL)	%coefficient variation (%)
Intra-assay test	36.3 ± 1.6	7
Inter-assay test	32.5 ± 3.0	10

The acceptable range of coefficient variation is less than 10%.

表 2 Spike and recovery test

N = 13	% Recovery (%)	% Coefficient variation (%) ^b
Low (1 ng/mL) ^a	98	10
Middle (5 ng/mL) ^a	105	8
High (10 ng/mL) ^a	104	9

^a Low, middle and high mean known concentrations of purified HO-1.

^b The acceptable range of coefficient variation is $\leq 10\%$.

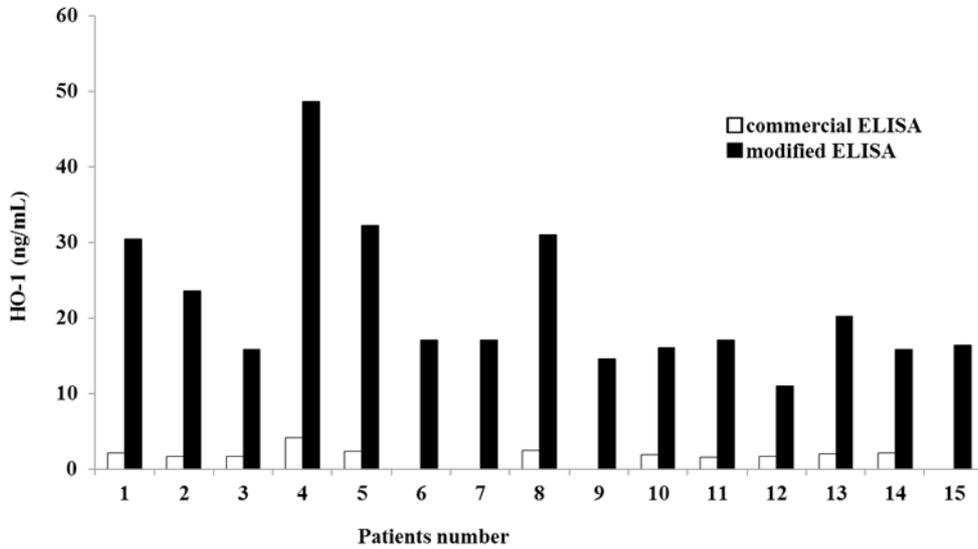


図3 Modified ELISA と Commercial ELISA の比較

(2) 健診受検者における血清 HO-1 と *Nrf2* SNP (rs6721961) の検証

・44 人の健康診断受検者を対象に、血清 HO-1 と *Nrf2* SNP (rs6721961) の有無について解析した。44 人の血清 HO-1 は 9.5 ± 3.3 ng/mL であり、WW : 32 名 (73%)、SS : 2 名 (4%)、WS : 10 名 (23%) だった。また、非喫煙者と喫煙経験歴を有する受検者では、前者が、なお、血清 HO-1 値は、55 歳以上と以下、喫煙経験有り無し、*Nrf2* SNP 有り無しで、それぞれ 9.9 ± 3.4 vs. 9.2 ± 3.3 ($P=0.690$)、 9.3 ± 3.3 vs. 9.6 ± 3.4 ($P=0.888$)、 8.3 ± 3.1 vs. 10.0 ± 3.3 ($P=0.133$) だった。

・一方で、異なる群での健診受検者 (27 名) を対象とした血清 HO-1 と喫煙歴との関連性の検討では、現喫煙者の血清 HO-1 は非喫煙者の血清 HO-1 より有意に低値を示した (38.8 ± 13.4 vs. 25.3 ± 13.0 ($P=0.005$))。

(3) 当院通院中 COPD 患者における血清 HO-1 と *Nrf2* (rs6721961) の検証

当院通院中 COPD 患者 33 例を対象に血清 HO-1 値を検討した。COPD 患者における血清 HO-1 は、非喫煙者あるいは現喫煙者に比較して低値だった (図 4 (左))。また、年齢を調整した現喫煙者と COPD 患者においても、同様の傾向だった (図 4 (右))。さらに、*Nrf2* SNP を解析し得た 23 例において、WW : 9 名 (39%)、SS : 1 名 (4%)、WS : 13 名 (57%) であり、(2) における健診受検者での、非喫煙者 (WW : 25 名 (81%)、SS : 1 名 (3%)、WS : 5 名 (16%)) と喫煙経験者 (WW : 7 名 (54%)、SS : 1 名 (8%)、WS : 5 名 (38%)) と比較して、COPD における WS、SS を有する頻度は有意に高率だった ($P=0.0311$)。

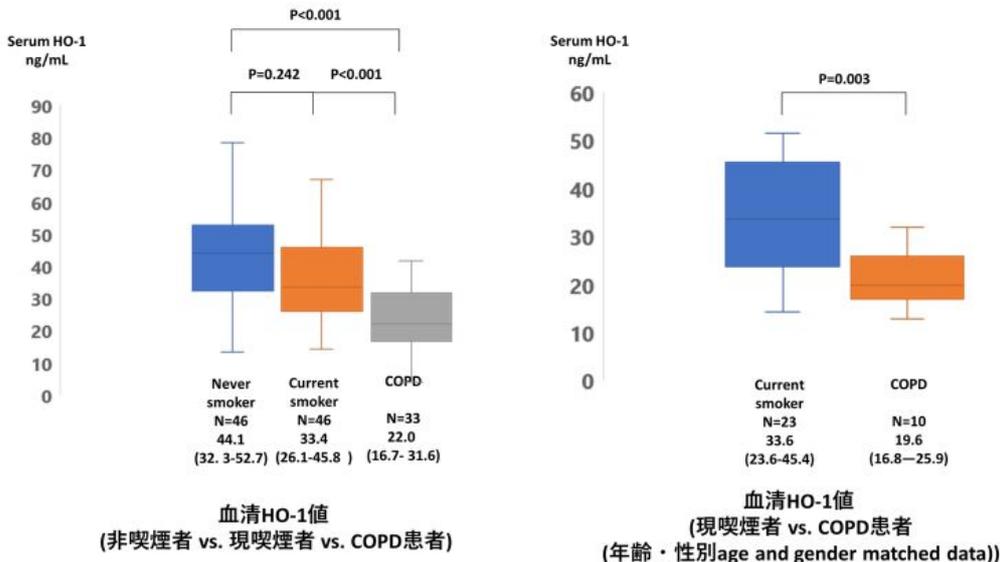


図4 喫煙歴と COPD 患者における血清 HO-1

引用文献

- 1) Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;15:9-19.
- 2) Ryter SW, Kim HP, Nakahira K, Zuckerbraun BS, Morse D, Choi AM. Protective functions of heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the respiratory system. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9:2157-73.
- 3) Li N, Venkatesan MI, Miguel A, Kaplan R, Gujuluva C, Alam J, et al. Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element. *J Immunol.* 2000;165:3393-401.
- 4) Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, et al. Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39:673-82.
- 5) Ye Q, Dalavanga Y, Poulakis N, Sixt SU, Guzman J, Costabel U. Decreased expression of haem oxygenase-1 by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2008;31:1030-6.
- 6) Mumby S, Upton RL, Chen Y, Stanford SJ, Quinlan GJ, Nicholson AG, et al. Lung heme oxygenase-1 is elevated in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2004;32:1130-5.
- 7) Kirino Y, Takeno M, Iwasaki M, Ueda A, Ohno S, Shirai A, et al. Increased serum HO-1 in hemophagocytic syndrome and adult-onset Still's disease: use in the differential diagnosis of hyperferritinemia. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:R616-24.
- 8) Sato T, Takeno M, Honma K, Yamauchi H, Saito Y, Sasaki T, et al. Heme oxygenase-1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:906-14.
- 9) Sato T, Saito Y, Inoue S, Shimosato T, Takagi S, Kaneko T, et al. Serum heme oxygenase-1 as a marker of lung function decline in patients with chronic silicosis. *J Occup Environ Med.* 2012;54:1461-6.
- 10) Zhao H, Eguchi S, Alam A, Ma D. The role of nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) in the protection against lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;312:L155-62.
- 11) Okano Y, Nezu U, Enokida Y, Lee MT, Kinoshita H, Lezhava A, et al. SNP (-617C>A) in ARE-like loci of the NRF2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women. *PLoS One.* 2013;8:e73794.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- 1) Hara Y, Shinkai M, Taguri M, Nagai K, Hashimoto S, Kaneko T. ELISA Development for Serum Hemeoxygenase-1 and Its Application to Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Can Respir J.* 2018;2018:9627420. [査読有]
- 2) Murohashi K, Hara Y, Shinada K, Nagai K, Shinkai M, Kawana A, et al. Clinical Significance of Serum Hemeoxygenase-1 as a New Biomarker for the Patients with Interstitial Pneumonia. *Can Respir J.* 2018;2018:7260178. [査読有]
- 3) Hara Y, Shinkai M, Kanoh S, Fujikura Y, K Rubin B, Kawana A, et al. Arterial Carboxyhemoglobin Measurement Is Useful for Evaluating Pulmonary Inflammation in Subjects with Interstitial Lung Disease. *Intern Med.* 2017;56:621-6. [査読有]
- 4) Hara Y, Shinkai M, Kanoh S, Kawana A, Rubin BK, Matsubara O, et al. Clinico-pathological analysis referring hemeoxygenase-1 in acute fibrinous and organizing pneumonia patients. *Respir Med Case Rep.* 2015;14:53-6. [査読有]
- 5) Hara Y, Shinkai M, Rubin BK. Biomarkers for staging and evaluating the therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Pulm Med.* 2015;22:165-71. [査読有]

[学会発表](計16件)

- 1) Hara Y, Shinkai M, Kanoh S, Goto H, Yoshikawa S, Yamaguchi N, Shinoda M, Watanabe K, Moriyama Y, Fujikura Y, Mikita K, Kawano S, Misawa K, Ishigatsubo Y, Kawana A, Matsubara O, Kaneko T : Expression Of Heme Oxygenase-1 In Acute Fibrinous And Organizing Pneumonia Patients. American Thoracic Society 2012, San Francisco, 2012,5. Poster presentation.
- 2) Hara Y, Shinkai M, Nagai K, Hashimoto Y, Shinoda M, Misawa K, Watanabe K, Kawano S, Fujikura Y, Yamaguchi N, Yoshikawa S, Kanoh S, Ishigatsubo Y, Kaneko T, Kawana A : Carboxyhemoglobin In Interstitial Lung Disease Patients. Philadelphia, 2013, 5. Poster discussion.
- 3) Hashimoto Y, Shinkai M, Nagai K, Hara Y, Shinoda M, Watanabe K, Yamaguchi N, Yoshikawa S, Nishio T, Inoue S, Kudo M, Sasaki M, Ishigatsubo Y, Kaneko T : An ELISA

Method For Measuring Serum Heme Oxygenase-1(HO-1). Philadelphia, 2013, 5. Poster presentation.

4) Sasaki H, Hara Y, Shinkai M, Nagai K, Watanabe H, Ikeda M, Nakashima K, Nagakura H, Horita N, Nagashima A, Ushio R, Tashiro K, Shibata Y, Toda M, Takagi K, Sato T, Yamamoto M, Kobayashi N, Kudo M, Rubin BK, Hashimoto S, Kaneko T. ELISA Development for Serum Hemeoxygenase1 and Its Application to Patients with ALI/ARDS. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2017;195:A4772. Poster discussion.

5) 原悠, 他 . Acute fibrinous and organizing pneumonia における Heme oxygenase - 1 の関与の検討 第 52 回 (2012 年) | 4 月 22 日 (日).

6) 原悠, 他 . びまん性肺疾患における動脈血カルボキシヘモグロビン値の検討 第 53 回 (2013 年) | 4 月 19 日 (金).

7) 原悠, 他 . 喫煙による血清ヘムオキシゲナーゼ 1 の変動に関する検討 第 53 回 (2013 年) | 4 月 21 日 (日).

8) 原悠, 他 . 間質性肺炎急性増悪における新規バイオマーカー (血清 Heme oxygenase-1) の検討 第 53 回 (2013 年) | 4 月 21 日 (日).

9) 原悠, 他 . 急性呼吸窮迫症候群における血清 heme oxygenase-1(HO-1)のバイオマーカーとしての有用性に関する検討第 54 回 (2014 年) | 4 月 27 日 (日).

10) 原悠, 他 . ARDS 患者における血清 HO-1 の予後予測因子としての可能性第 56 回 (2016 年) | 4 月 10 日 (日).

11) 原悠, 他 . 動脈血カルボキシヘモグロビン (CO-Hb) の間質性肺炎 (IP) 増悪例における予後予測因子としての可能性の検討第 57 回 (2017 年) | 4 月 23 日 (日).

12) 橋本佑輔, 他 . 血清における Heme oxygenase-I 測定法の改良第 53 回 (2013 年) | 4 月 21 日 (日).

13) 篠田雅宏, 他 . 正常ヒト気道上皮細胞における HO-1 による IL-13 誘導 MUC5AC 発現および杯細胞過形成の抑制作用について第 54 回 (2014 年) | 4 月 26 日 (土).

14) 長井賢次郎, 他 . 血清 heme oxygenase-1 は間質性肺炎急性増悪の新規バイオマーカーとして有用である第 55 回 (2015 年) | 4 月 19 日 (日).

15) 品田佳那子, 他 . 間質性肺炎 (IP) における予後予測マーカーとしての血清ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の有用性に関する検討第 58 回 (2018 年) | 4 月 27 日 (金).

16) 湯本健太郎, 他 . COPD における血清ヘムオキシゲナーゼ - 1 (HO - 1) 値に関する検討第 58 回 (2018 年) | 4 月 28 日 (土).

〔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)研究分担者

研究分担者氏名 : 新海 正晴

ローマ字氏名 : (SHINKAI, Masaharu)

所属研究機関名 : 横浜市立大学

部局名 : 医学研究科

職名 : 客員教授

研究者番号 (8 桁) : 10535214

研究分担者氏名 : 原 悠

ローマ字氏名 : (HARA, Yu)

所属研究機関名 : 横浜市立大学

部局名 : 医学部

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 70806299

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 臼井 健悟

ローマ字氏名 : (USUI, Kengo)

研究協力者氏名 : 高木 重人

ローマ字氏名 : (TAKAGI, Shigeto)

研究協力者氏名 : 松本 裕

ローマ字氏名 : (MATSUMOTO, Yutaka)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。