

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08647

研究課題名(和文) SAA/LXA4バランスにより制御される慢性閉塞性肺疾患のエストロゲンによる変容

研究課題名(英文) Estrogen-induced alteration of chronic obstructive pulmonary disease regulated by SAA/LXA4 balance

研究代表者

富永 宏治 (Koji, Tominaga)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10509623

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)：本研究は、炎症性肺疾患である慢性閉塞性肺疾患(COPD)において加齢に伴うエストロゲンの変動と慢性炎症のマーカーとして注目される血清アミロイドA(SAA)およびリポキサンA4(LXA4)の関連性に着目した。

閉経モデルである卵巣摘出によりエラスターゼ(PPE)誘発COPDモデルマウスでは、肺胞径の拡大が増悪された。この時のSAAの関与は不明であった。一方、LXA4はエストロゲンの有無と時間経過により増減し、LXA4受容体の肺での分布も遅れて変化した。以上のことから、エストロゲンとLXA4の間には経時的で複雑な連関がある事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDにおいて、女性更年期でのエストロゲン減少がCOPD増悪に関与しており、LXA4とその受容体を制御していることが明らかとなった。LXA4は、アラキドン酸から合成される脂質メディエータであり、喘息と関係の深いロイコトリエンとの関係が深い。本研究により女性のCOPDにおいてはLXA4をターゲットとする治療が有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： This study focused on the association between estrogen variation with aging in chronic obstructive pulmonary disease (COPD), an inflammatory lung disease, and serum amyloid A (SAA) and lipoxan A4 (LXA4), which are notable markers of chronic inflammation.

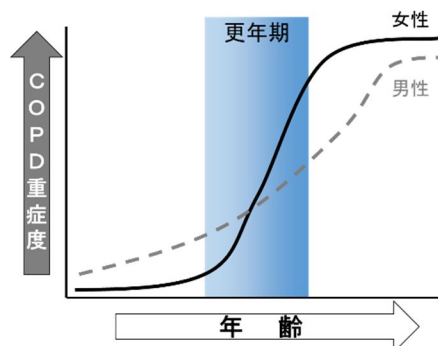
Ovariectomy, a model of menopause, exacerbated the expansion of alveolar diameter in elastase (PPE)-induced COPD model mice. The involvement of SAA in this phenomenon On the other hand, LXA4 increased or decreased in the presence and absence of estrogen and time course, and the distribution of LXA4 receptors in the lung also changed with a delay. This study showed that there is a complex linkage between estrogen and LXA4 over a time course.

研究分野：医療薬学

キーワード：エストロゲン COPD LXA4

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、長期間の有毒粒子・ガス (タバコ、大気汚染など) の吸入に起因する進行性の気流制限を呈する炎症性疾患である。欧米での有病率は 6% 前後とされ、3 大死因に匹敵する死亡率となる可能性が指摘されている。日本での有病率は 8.5% で、40 歳以降に多く、加齢に伴い増加する。一方、加齢に伴いエストロゲンの減少を示す女性 COPD 患者では、症状進行の加速化と死亡率の増加が認められることが知られている (Respiratory Medicine 2006, BMC Women's Health 2011)。COPD では肺組織以外の循環血中の炎症性刺激因子 (TNF- α 、IL-8、IL-6) や血清アミロイド A (SAA) が上昇する。このため、COPD は肺に限局した疾患ではなく、全身性の慢性炎症性疾患と考えられている。



血清アミロイド A およびリポキシン A4 血清アミロイド A (Serum Amyloid A : SAA) は、慢性炎症性疾患に続発する AA アミロイドーシスで組織に沈着するアミロイド A 蛋白質の血中前駆体である。血中では高比重リポ蛋白 (HDL) の構成アポ蛋白として存在している。SAA は炎症ストレスなどの刺激により急激な上昇が認められる。SAA は主に肝臓で産生されるが、その他末梢血単球や血管内皮細胞でも産生される。COPD においても血中 SAA の上昇が認められることから、バイオマーカーとして用いられるが、SAA の経鼻投与により肺胞洗浄液で炎症性細胞が増加することが報告され (PNAS 2012) SAA は COPD の悪化因子として捉えることができる。リポキシン A4 (Lipoxin A4 : LXA4) は上皮細胞やマクロファージ、血管内皮細胞に存在する 15-lipoxygenase によって産生される。また好中球中の 5-lipoxygenase と血小板中の 12-lipoxygenase の 2 種の酵素を介しても産生される。この産生経路では同時にロイコトリエン B4 (LTB4) が産生されるが、炎症を誘発する LTB4 と異なり LXA4 は好中球浸潤抑制、マクロファージ遊走抑制、サイトカイン産生抑制などを介して、抗炎症作用を示す (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2005, Curr Top Med Chem 2011)。LXA4 は G 蛋白結合型受容体である ALX/FPR2 に結合するが、この ALX/FPR2 には SAA も結合することが知られている (Pharmacol Rev 2006)。従って、SAA による COPD の進行は、LXA4 によって制御される可能性が考えられる。また LXA4 は子宮内膜症においてエストロゲン受容体のモジュレーターであることが報告されている (FASEB J 2011)。従って SAA, LXA4 がエストロゲン受容体の発現・機能に影響を与える可能性が考えられる。さらに加齢に伴うエストロゲンの変動は SAA, LXA4 の生理的機能に変動を与えることも考えられるが、エストロゲンと SAA, LXA4 の関係についての研究は殆どない。しかし、COPD は、女性更年期に特有のインスリン抵抗性の誘発や脂質異常症の発症などの女性ホルモン変動が危険因子となる代謝性疾患の形成・進展に影響を与えることが報告されており (Eur Respir J 2008, Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2012) これらの代謝性疾患と SAA との関連性については多くの報告がある。

これらの報告と中年期以降の COPD 発症増加を示す疫学的知見とを総合すれば、更年期の性ホルモン低下が COPD 発症と関連する可能性が考えられる。すなわち、COPD 病態の形成・進行に「性差」や「更年期」の要因が関与するという新たな視点が導入できる可能性がある。「性差」については、男性の COPD 有病率は女性の 3 倍以上であるが (本邦 NICE study : 男性 16.4%、女性 5.0%) 旧来の喫煙人口の性差を考慮すれば、COPD 発症の性差については疑問な点が多く、今後の課題である。一方女性「更年期」の関与についても不明な点が多く実験証拠は殆ど希薄である。さらに COPD 形成と進行に対する女性「更年期」を考慮した治療法の研究は少ない。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに「女性更年期によるエストロゲン産生の減少が、SAA / LXA4 不均衡を増悪化し、COPD 進行を加速させる。」と考えた。

以上の仮説を検証するため、以下の項目について検討を行った。

- (1) 女性更年期モデル動物のエステラーゼ誘発 COPD 亜急性期及び慢性期病態における肺機能および形態学的変化
- (2) 更年期 COPD モデルマウスにおける ALX/FPR2 関連物質の変動
- (3) 更年期 COPD モデルマウスにおける ALX/FPR2 の変化
- (4) 更年期 COPD モデルマウスに対する SAA の影

3. 研究の方法

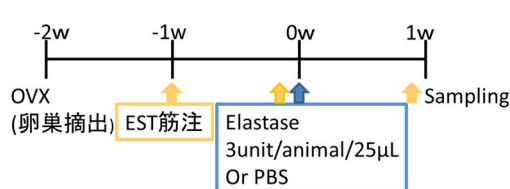
(1) 更年期 COPD モデルマウスの作製

更年期モデル動物とするため卵巣摘出 (OVX) を行った雌性 C57BL/6N マウスに気管内液体噴霧器 (PENN CENTURY 社製) を用いてブタ由来脛エラスターゼ (PPE 3 unit/animal/25 μ L) を気管内に投与し作成した。対照群として Phosphate buffer saline (PBS) を同様に気管内へ投与した。また、OVX の対照として OVX の 1 週間後よりエストラジオール吉草酸エステル (Est) を週 1 回筋肉内投与 (CNT 群) した。病態の進行による変化を検討するため、PPE 投与 1 週後のマウスを亜急性期モデル、PPE 投与 3 週後を慢性期モデルとした。

慢性期 (3 週) モデル



亜急性期 (1 週) モデル



(2) COPD モデルマウスの評価

PPE の気管内投与後、モデル作成の成否の指標を検討するため、マウスの子宮重量、マウス用パルスオキシメーター (PowerOxy900[®]) による SpO₂ を経時的に測定した。また、肺組織切片を作成して平均肺胞間距離を測定し、それらの関連性について検討した。

(3) 更年期 COPD モデルマウスにおける ALX/FPR2 関連物質の変動

肺胞洗浄液 (BALF) 中および血液中の内因性 SAA および LXA4 の変動を ELISA 法を用いて測定した。

(4) 更年期 COPD モデルマウスにおける ALX/FPR2 の変化

SAA および LXA4 の受容体である ALX/FPR2 の肺での発現と変動について局在の変化を免疫組織化学的に、タンパク量について westernblot 法を用いて検討した。

4. 研究成果

本研究では以下の知見が得られた。

(1) 女性更年期モデル動物のエステラーゼ誘発 COPD 亜急性期及び慢性期病態における肺機能および形態学的変化

平均肺胞径は拡大し、PPE による肺胞径の拡大は悪化する傾向が認められた。また、平均肺胞径に相関して OVX 処置により SpO₂ の値は低下し、PPE 投与でさらに低下した。子宮重量は CNT 群の亜急性期モデルにおいて有意に低下した。これらのことから COPD 亜急性期では生殖機能の低下が加速し COPD 増悪が加速される可能性が示唆された。

(2) 更年期 COPD モデルマウスにおける ALX/FPR2 関連物質の変動

SAA は 1 週、3 週後の BALF 中、血中いずれにおいても検出されなかった。

PPE 投与後 1 週後の卵巣摘出マウスの肺胞洗浄液 (BALF) 中血、中の LXA4 量は、エストロゲン存在下の状態で増加していた。この増加はエストロゲン非存在下では認められなかった。

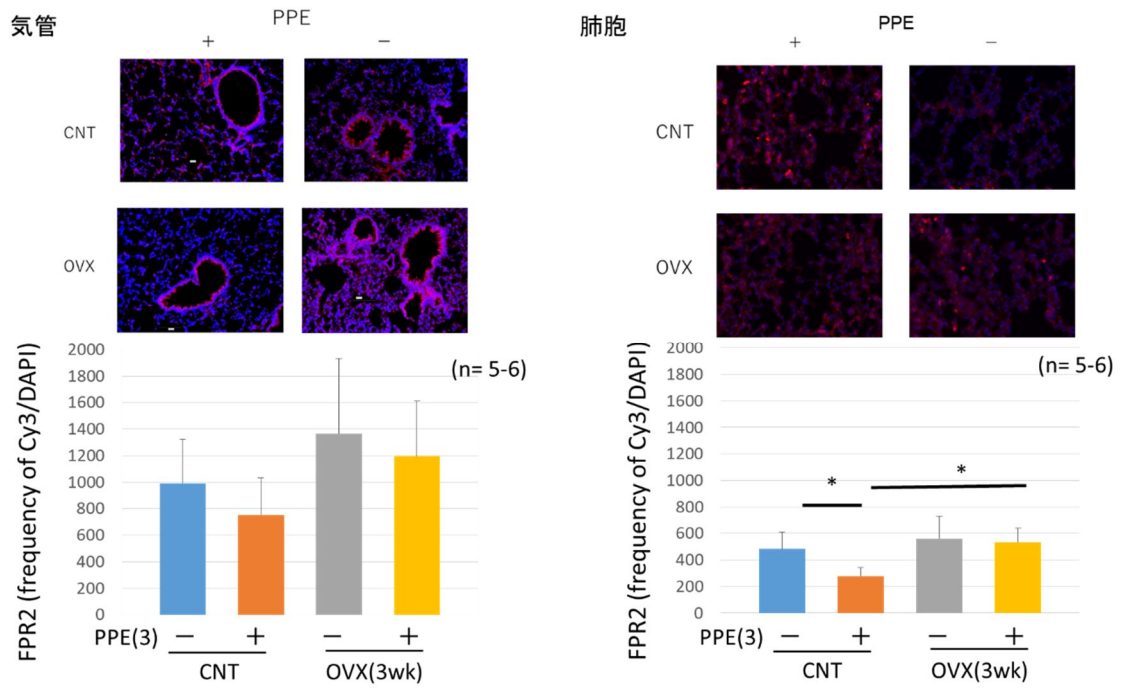
一方、PPE 投与 3 週目では LXA4 量の変化はいずれの群でも認められなかったことから LXA4 は亜急性期の炎症を抑制するために増加した事が示唆された。また、1 週後での LXA4 の増加傾向は control 群で顕著であり、CNT 群と比較すると OVX 群では LXA4 は少ないことから、エストロゲンが LXA4 の産生に寄与していることが示唆された。

(3) ALX/FPR2 受容体の変化

肺組織における LXA4 受容体である ALX/FPR2 受容体の発現量を気管部、肺胞部に分けて検討を行った。エラスターゼ投与後 1 週後では肺胞気道いずれにおいても変化は認められなかった。エラスターゼ投与後 3 週後では肺胞において CNT 群で PPE により受容体減少が認められた。一方 PPE 処置による受容体発現量は、OVX 処置により有意に増加した。

気道での受容体発現量の変化は認められなかった。しかし、ALX/FPR2 受容体は肺胞より気道に多く発現していることが明らかになった。臨床において女性の COPD は気道炎症が進んでいる事が知られており、これを支持する結果が得られた。

westernblot 法で ALX/FPR2 の発現量を解析した。ALX は二量体化する事が知られているため、一量体、二量体についてそれぞれ解析を行ったが、変化は認められなかった。



以上のことから、以上のことから、エストロゲンと LXA4 との間には経時的で複雑な連関がある事が明らかとなった。なお、これらの結果は、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永 宏治, 青野 健太郎, 松本 純一, 古賀 允久, 山内 淳史, 江川 孝, 片岡 泰文
2. 発表標題 COPDモデルマウスにおけるリボキシンA4に対するエストロゲンの影響
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古賀 允久 (Mitsuhisa Koga) (60570801)	福岡大学・薬学部・准教授 (37111)	
研究分担者	山内 淳史 (Atsushi Yamauchi) (90341453)	福岡大学・薬学部・教授 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------