

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08176

研究課題名(和文) 肺上皮細胞における転写因子の加齢性機能低下とCOPDの発症様式との検討

研究課題名(英文) Age associated dysfunction of transcription factor in lung epithelial cells and COPD pathogenesis

研究代表者

佐藤 篤靖 (SATO, ATSUYASU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30706677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子C/EBPは肺の傷害時に様々な刺激から生体を守るために活性化する。しかしながら老化した個体ではその活性を発揮する事ができず、本来の恒常性を保てない事を証明してきた。慢性閉塞性肺疾患は長期にわたる喫煙の結果、比較的高齢者で発症する不可逆的な肺破壊と気流閉塞を呈する疾患であり、老化と疾患発症メカニズムの関連が強く示唆される。本研究においてC/EBPノックアウトマウスを用いてCOPDモデルにおける細胞特異的な個体の変容を明らかにし、ヒト肺病変との相似性と類似性を検討し、成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDは日本人にとって多くの人口を占める疾患であり、身体活動性の低下や寝たきりなど社会問題として重要な課題を多く含む。根治的な治療方法はなく、対症療法に限定され新規の治療方法が期待される。老化により欠落した因子の検討により新たな治療ターゲットが期待される。

研究成果の概要(英文)：C/EBP, a transcription factor, is activated to protect the lung during lung injury. In senescence model, the dysfunction of C/EBP might lead the loss of homeostasis in lung. COPD is a representative disease that chronic smoke exposure develops lung destruction and irreversible obstructive disorder in old, suggesting the strong association between senescence and COPD pathogenesis. We hypothesized that C/EBP dysfunction associates to COPD. Those transcription factor analysis might contribute to explain the disease pathogenesis.

研究分野：呼吸器

キーワード：COPD C/EBP 老化

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は酸化ストレス、アポトーシス、プロテアーゼ活性亢進を伴い、気道リモデリングと肺泡破壊による不可逆性換気障害を呈し対症療法以外の治療はない。上皮細胞の胎児性転写因子は肺の発生に必須であると共に、生後の肺傷害時に恒常性維持に必要である事が明らかになってきた。申請者はその一つである C/EBP α が末梢気道クラブ細胞、II 型肺泡上皮細胞のプロテアーゼ活性を調節し、微小環境の恒常性維持に必要である事を先行研究にて証明した。また、加齢と共に C/EBP α の機能が低下する事が明らかとなり、細胞や個体の老化に関与する機能変容の原因と推察され、転写因子複合体のパターン変化の研究を企画した。本研究申請では C/EBP α 複合体形成時の表現型を in vivo で検討すると共に、遺伝子発現パターンの変化、さらに上流シグナルとの関連を検討する。これより COPD の疾患感受性因子を抽出し、病態の理解、治療戦略への発展を期待する。

2. 研究の目的

(1) 刺激応答に対する C/EBP α の役割の検証と加齢による機能変容を示す
 セリンプロテアーゼ活性を中心に COPD 肺の病理表現型の由来を構成細胞の機能変容からアプローチする。C/EBP α 肺上皮特異的な特徴を老化を推定した遺伝子改変マウスの実験結果から抽出し、ヒト肺での減少と比較する

(2) C/EBP α の転写因子複合体形成による機能変容と病態予測
 マウスモデルより得られた C/EBP α の有無による転写因子活性の知見から、喫煙者の肺組織における知見の類似性と病態との相関を検討する。

3. 研究の方法

(1) 刺激応答に対する C/EBP α の役割の検証と加齢による機能変容を示す
 C/EBP ノックアウトマウスを用いて半年間の慢性喫煙モデルを作成する。肺気腫の程度、気道上皮の傷害と再生、末梢気道における上皮細胞の発現様式を網羅的に解析し、野生型と比較する。さらに特定された原因に対して介入実験を長期に行い表現型の克服を目的とする。

(2) C/EBP α の転写因子複合体形成による機能変容と病態予測
 手術肺により得られた喫煙者肺組織における蛋白発現様式、CT で解析する肺気腫表現型、遺伝子発現量、臨床情報を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 慢性喫煙による C/EBP α ノックアウトマウスの変化
 CCSP-rtTACre-C/EBP α ^{fl/fl} マウスに対し、5 週齢より 7 週齢までドキシサイクリン餌を与え 9 週齢より慢性喫煙曝露 (10 本・日、週 5 日) を半年間行った。また気道上皮の再生を可視化するためにマウスに H2B-RFP-LSL-eGFP を組み込み、クラブ細胞核に eGFP が誘導されるモデルに発展させた。慢性喫煙曝露によりノックアウトマウスにおける線毛上皮細胞数は有意に減少し、その原因としてクラブ細胞よりの分化が不十分であることが分かった。さらに細胞間接着因子の低下を認めた(図 1)。また、気管支肺泡洗浄液中のセリンプロテアーゼ活性、キモトリプシン活性の上昇を認めた。病理所見では肺気腫の相対的な悪化を野生型に比し認めた。気管支周囲の肺泡アタッチメントはノックアウトマウスで有意に異

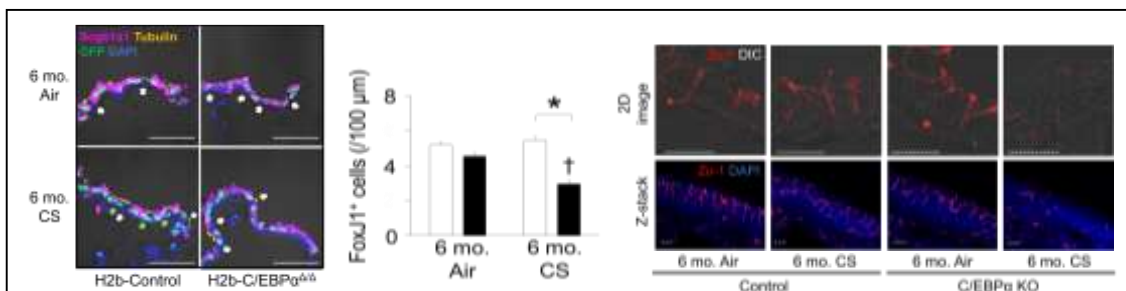
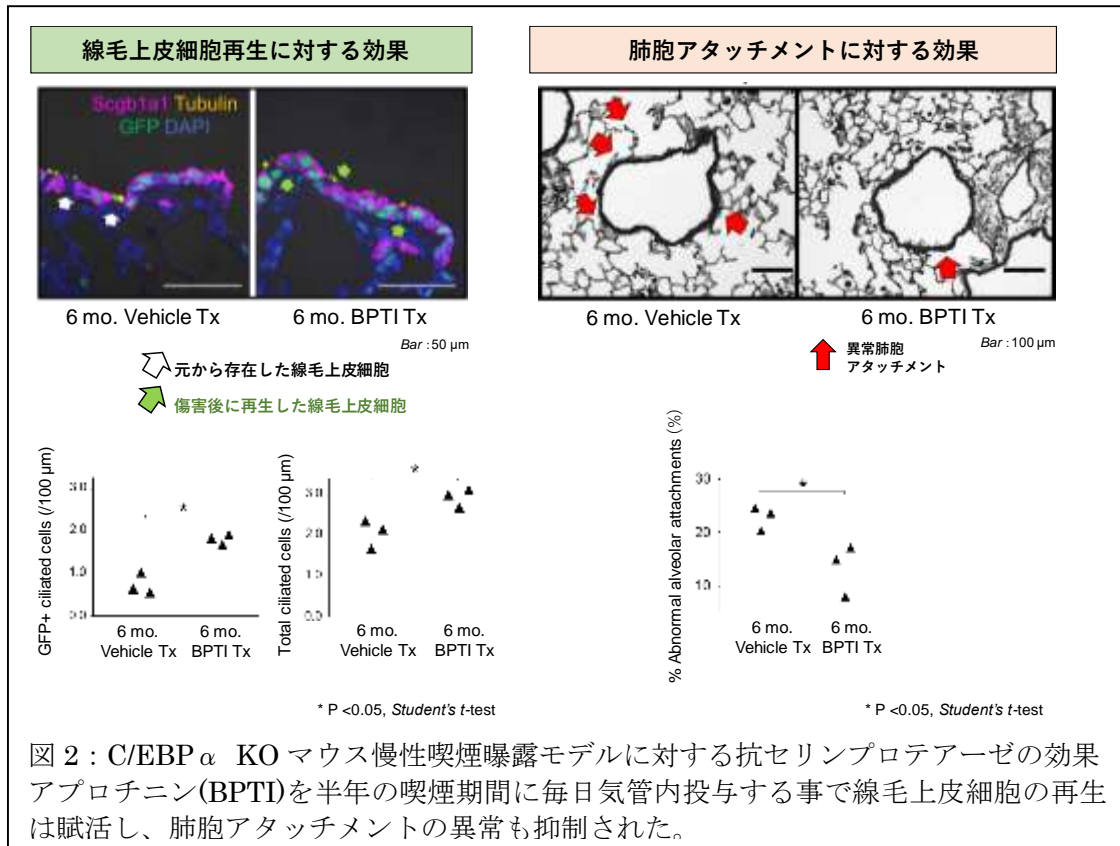


図 1: 半年喫煙後の気道上皮細胞の分化状況と総数
 クラブ細胞は GFP 陽性であり、これより分化した GFP 陽性細胞(左)がノックアウトマウスは総数(右)も融資に少ない。Zo-1 に見られる細胞間接着因子の低下を認めた。
 クラブ細胞: Scgb1a1(赤)、線毛上皮細胞: Tubulin (黄色)、クラブ細胞各由来 GFP (緑)
 FoxJ1: 線毛上皮細胞に特異的遺伝子

常を示した。以上の有意な所見から、C/EBP α は慢性喫煙曝露下において末梢気管支領域の恒常性維持に非常に重要であり、老化に伴う機能の欠落は個体にとり影響を及ぼす可能性を示唆した。

次に末梢気道の遺伝子発現様式を解析するためにLMDを用いて100 μ m幅の気道上皮を凍結細胞から抽出し遺伝子網羅的解析を行った。その結果、抗セリンプロテアーゼ群の遺伝子発現に有意差を認めた。



これより C/EBP α の欠落に伴う異常なプロテアーゼ活性の上昇を原因と推察し、半年間に及ぶ抗セリンプロテアーゼ気管内投与を慢性喫煙曝露ノックアウトマウスに対して行い、図 2 に示されるように表現型の抑制に成功した。

(2) ヒト肺を用いた解析

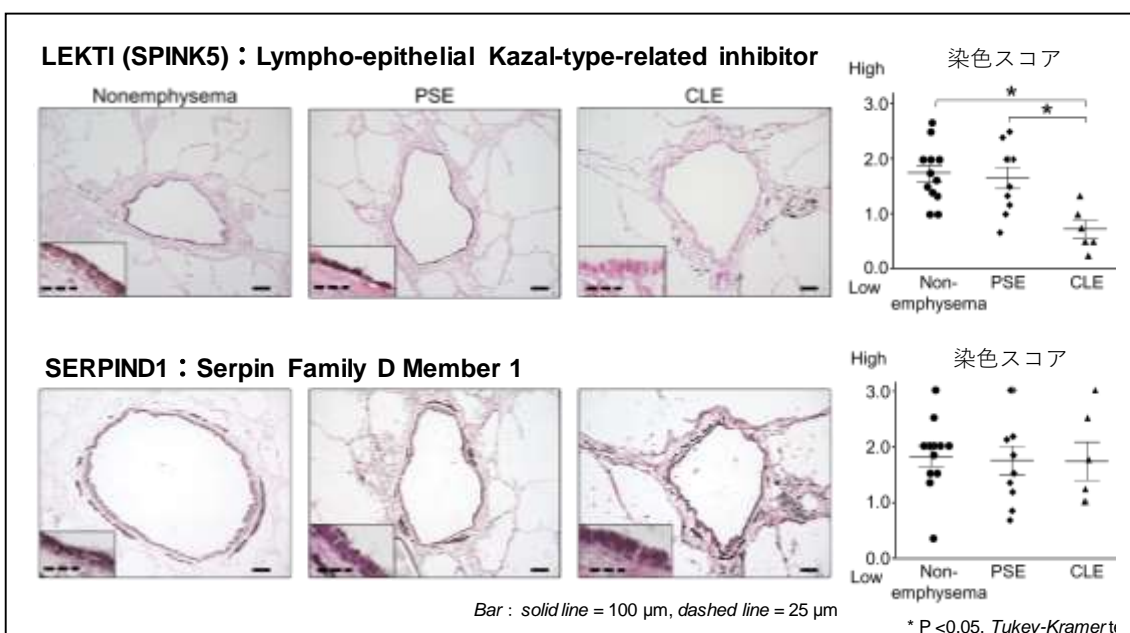


図 3 : 非肺気腫、傍隔壁型、小葉中心型の肺気腫における蛋白発現

LEKTI 蛋白発現は CLE 患者で有意に低下した。一方 SERPIND1 に変化を認めず。

術前 CT 画像において患者群 28 例は非気腫 12 症例、傍隔壁型肺気腫 10 症例、小葉中心性肺気腫 6 症例に分類された。肺組織中 CEBPA mRNA の発現は肺気腫症例で有意な低下を認め、小葉中心性肺気腫の末梢気道では、SPINK5 が制御する Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor; LEKTI の免疫染色スコアが非気腫症例と比較し有意に低下した。以上①より末梢気道における Spink5/LEKTI の低下はマウスとヒトで共通する肺気腫進展因子と推察された。特にヒト肺においては小葉中心性肺気腫に特異的であり、LEKTI は末梢気道傷害と肺気腫の進展を同時に説明し得る重要な因子であると考察された。

<引用文献>

① Uemasu K, Tanabe N, Tanimura K, Hasegawa K, Mizutani T, Hamakawa Y, Sato S, Ogawa E, Thomas MJ, Ikegami M, Muro S, Hirai T, Sato A. Serine Protease Imbalance in the Small Airways and Development of Centrilobular Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020 Jul;63(1):67-78.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 4. Uemasu K, Tanabe N, Tanimura K, Hasegawa K, Mizutani T, Hamakawa Y, Sato S, Ogawa E, Thomas MJ, Ikegami M, Muro S, Hirai T, Sato A.	4. 巻 63
2. 論文標題 Serine Protease Imbalance in the Small Airways and Development of Centrilobular Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 67-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上樹潔, 佐藤篤靖, 田辺直也, 長谷川浩一, 谷村和哉, 濱川瑠子, 水谷達志, 佐藤晋, 平井豊博
2. 発表標題 慢性喫煙による末梢気道線毛上皮細胞傷害からの再生に及ぼすプロテアーゼ活性についての検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyoshi Uemasu, Naoya Tanabe, Kazuya Tanimura, Koichi Hasegawa, Tatsushi Mizutani, Yoko Hamakawa, Susumu Sato, Emiko Ogawa, Matthew J Thomas, Machiko Ikegami, Shigeo Muro, Toyohiro Hirai, Atsuyasu Sato
2. 発表標題 Regulation of Protease Activity in Distal Airway Is Critical for Ciliated Cell Regeneration during Chronic Cigarette Smoke Exposure
3. 学会等名 American Thoracic Society 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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			
ドイツ	Boehringer Ingelheim GmbH			