

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15956

研究課題名(和文) 肺胞微石症に対する分子機構の解明と臨床応用可能な治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment strategy of pulmonary alveolar microlithiasis

研究代表者

齋藤 充史 (Saito, Atsushi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00768939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺胞微石症には有効な治療法がなく、これまで我々は動物モデルを用いて治療法の検討を進めており、今回、低リン食治療に加えてリン酸吸着剤を用いた治療も同様に有効であることがわかった。またリポミクス手法を用いてモデルマウスを解析したところ、アラキドン酸などエイコサノイドとCOX-2が著明に上昇しており、下流シグナルであるPGE2、LXA4などの抗炎症性メディエーターの増加を有意に認め、微石形成に伴う肺内の炎症を抑制している可能性が示唆された。これらの結果は肺胞微石症の病態をさらに解明し、病勢を反映する臨床マーカーとしても活用できる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺胞微石症は非常にまれな遺伝性の呼吸器疾患です。これまでに治療法がなく健康な人と比較して短命であることもわかっています。私達はこれまでにマウスモデルを作成して治療法についての検討をおこなってきましたが、今回の研究でさらに一歩前進してすでに他の疾患で臨床応用されている薬剤であるリン酸吸着剤を用いて検討しマウスにおける病態を改善することができました。さらに先進的な解析技術を用いることで患者さんの病勢を把握するマーカーとなる物質もいくつか発見することができました。今後はさらにこれらの結果を臨床応用できるように研究を推進したいと思っています。

研究成果の概要(英文)：Alveolar pulmonary microlithiasis (PAM) is an autosomal recessive rare lung disease that causes microliths in the alveolar space due to the deficiency of sodium phosphate cotransporter 2b(Npt2b). We have already reported that a low-phosphate diet prevented and/or diminished microlith formation in PAM mouse model. However, although phosphate dietary restriction is easily accomplished in mice, phosphate is ubiquitous in the human diet and attempts to limit intake are often unsuccessful. Phosphate binders are widely used in hyperphosphatemic patients with CKD. We found that oral administration of phosphate binders to PAM mice attenuated the microlith burden in the lung without appreciable adverse effects. Also, lipidomics analysis revealed a marked increase in eicosanoids such as arachidonic acid and COX-2. These results help to elucidate the molecular mechanism and may be used as a marker that reflects the pathological condition of PAM.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺胞微石症 動物モデル ナトリウムリン酸共輸送体 治療法開発 肺胞マクロファージ 肺サーファクタント

1. 研究開始当初の背景

肺胞微石症 (Pulmonary Alveolar Microlithiasis, PAM) は、1933 年 Pühr によって命名された希少疾患である。現在まで世界で 700 例、わが国では世界最多の 100 例以上が最近 50 年で報告されている。本症は IIb 型 (Npt2b) ナトリウムリン共輸送体遺伝子 (SLC34A2) の機能喪失による常染色体劣性遺伝疾患である。同胞発生が約半数で、男女差はない。臨床経過としては肺胞内に主としてリン酸カルシウムからなる微石が生じ、その後肺胞壁に炎症、線維化を伴い進行する。初期は無症状であるが、健診等の胸部 X 線写真で著明なびまん性陰影を発見される例が多い。呼吸機能は長期間保たれるが、中年以降徐々に呼吸不全となる。これまでビスフォスフォネート製剤であるエチドロネートが肺胞微石症を改善すると報告が散見されるが (Cakir E et al, Respiration, 2015 他)、申請者が作製したモデルマウスを用いた検討では、耐容量上限を使用しても改善は認められなかった (未発表)。また、肺胞洗浄法の効果も限定的であると報告されている。したがって、在宅酸素療法・肺移植の対症療法しかないのが現状である。

2. 研究の目的

我々は以前同疾患モデルマウスを作製して病態解析を行ない、低リン食治療が進行抑制・病勢の改善に寄与することを明らかにした。一方で、低リン食治療は軽微ながら栄養障害が原因と考えられる体重減少の副作用を認めたことから、臨床応用へはさらなる改善が望まれる。また肺胞マクロファージが微石除去に関与することが明らかになりつつあるが、その役割についてはまだ不明な点が多い。そのため本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、低リン食治療とリン吸着剤の併用法の治療効果と副作用について検討し、さらに先端技術であるプロテオーム解析やリポミクス解析を用いて病態を分子レベルで解析した。

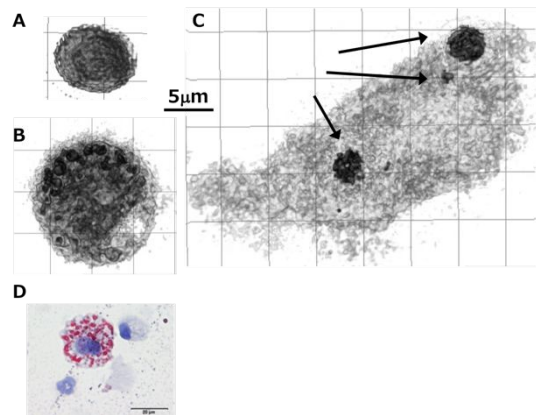
3. 研究の方法

(1) 臨床応用に向けた治療法開発～低リン食治療とリン吸着剤治療～

一般に、リン摂取量とタンパク質摂取量は相関すると考えられている。すなわち、過度のリン制限食がタンパク質不足をまねき、低齢マウスでの体重減少を引き起こしている可能性が高い。このことからリン摂取制限のみではなく、慢性腎臓病に適応がある炭酸ランタンやリン酸結合性ポリマーなどのリン吸着剤を用いた併用療法が現実的であると考へた。そこで、リン吸着剤投与量と治療効果の関係、副作用の検討を詳細に行ない、肺胞微石症に対する低リン食・リン吸着剤併用治療の基礎を確立する目的で研究をおこなった。

(2) 分子・細胞レベルでの病態解析

我々は以前の研究で Tomocube 3D 顕微鏡を用い、肺胞微石症マウスの肺胞マクロファージ内に微石が存在することを明らかにした (右図 A-C)。さらに、肺胞マクロファージは巨大化し、Oil red O 染色にて赤色に染まることから脂質が貯留していると考えられる (右図 D)。肺胞蛋白症類似の肺胞腔内への肺サーファクタントの蓄積を考え合わせると、微石の貪食により肺胞マクロファージが何らかの機能障害を呈し、泡沫化したものと考えられる。ここでは、主に肺胞に蓄積したサーファクタント脂質の解析とタンパク質発現の変化についてオミクス解析の手法を用いて分子マーカーの探索と病態解明を模索した。

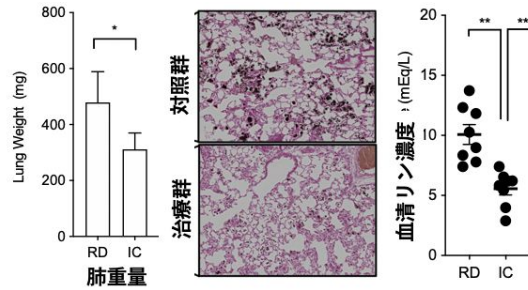


4. 研究成果

(1) 臨床応用に向けた治療法開発～低リン食治療とリン吸着剤治療～

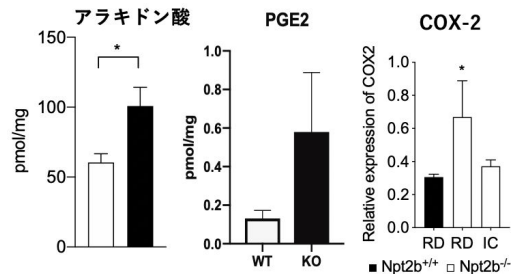
リン摂取量がどの程度あれば副作用を生じず有効な効果を得られるかを確認することは今後臨床研究に応用するためには重要な情報であると考えられた。そのため以前に論文で報告したものと同様の方法にて容量効果とその際の副作用について解析した。マウスの餌において通常よりも 30-50% 程度リン含有量を減らした低減食で一定の有効性が得られることがわかった。また懸念された骨量低下も認めなかった (未発表)。一方で、特に低齢マウスで体重減少などの所見が確認された。原因について文献的に検討すると、一般にリン摂取量はタンパク質摂取と相関することから栄養障害が原因ではないかと推測された。今後の臨床応用へ導くには食事に含まれるリン量を制限することだけに依存しない新たな視点の治療が求められることになる。解決策として、慢性腎不全時の高リン血症に適応のある

炭酸ランタンなどのリン吸着剤の使用が、タンパク質を減らさずにリン摂取量を減らすことができる可能性があると考えて、さらに検討を進めた。リン酸吸着剤をマウスに経口投与すると右図のように肺重量低下と病理組織における微石量の著明な減少を認められた。また血清リン濃度は低リン食時と同様に低下を示した。これらの結果からリン吸着剤治療は低リン食と同様に肺胞微石症の病態を改善する効果が得られることが示された。



リン吸着剤の内服で肺内の微石量は減少。肺重量、血清リン濃度の低下も確認された。

(2) 分子・細胞レベルでの病態解析 (肺サーファクタントと肺胞マクロファージの解析)
 以前の研究で、DPPC(Dipalmitoylphosphatidylcholine)、PI(Phosphatidylinositol)、PG(phosphatidylglycerol)などの肺サーファクタント貯留に加えて、より極性の低いChol(Cholesterol)、TG(Triglyceride)などの脂質も蓄積していることが明らかになっていた。そこでリポミクス解析とプロテオミクス解析を用いて肺胞微石症における新規の分子標的やバイオマーカーを解析した。その結果、上記の脂質や MCP-1 などの分子変化はごく一部であり、肺胞微石症の肺内では COX-2 や PGE₃、オステオポエチンなどの多くの脂質やタンパク質分子に変化があることが明らかになった(右図、投稿準備中)。これまで血清 MCP-1 や SP-D が病勢マーカーになりうるとの報告をしてきたが正常と疾患マウスを比較することで、肺胞微石症における分子変化を確実に洗い出すことができてきた。今後はさらに前述のリン酸吸着剤治療の有無での比較も追加し、それにより分子の変化がより明瞭となり重要な病態分子が明らかとなることが期待される。



肺胞微石症の肺内ではアラキドン酸、PGE₂などが上昇。COX-2発現も増加している。COX-2はリン吸着剤治療で改善を認めた。

今後の展望

肺胞微石症の病態はこれまで症例数が非常に少ないことからほとんど理解されてこなかった。これまでも我々はいくつかの研究報告をおこなってきたが今回の検討で臨床応用にむけての「治療法の開発」と「肺胞微石症の基礎病態の解明」がさらに明らかになってきた。今後はさらに臨床応用可能な低リン食・リン吸着剤治療を検討していくのに加え、微石という異物食を契機に肺胞マクロファージが機能障害を起こすメカニズムの解析を中心に研究を進める。特に炎症性の M1 マクロファージと抗炎症性の M2 マクロファージでは異物に対する反応性も異なり、尿路結石では M2 優位で病態の改善が得られるとの報告がある(Sci Rep 6:35167, 2016)。肺胞微石症でも同様の結果が期待され、肺胞マクロファージの M1/M2 分極化についてフローサイトメトリーを用い検討したい。将来的には得られた分子・細胞レベルの情報を基に肺胞蛋白症治療で検討されている肺胞マクロファージ活性化作用のある GM-CSF の吸入治療や M2 分化させたマクロファージの肺内移植など、新たな治療戦略の提唱を視野に研究を進める予定である。基礎的な病態を理解することで、肺胞微石症を詳細に明らかにできるだけでなく、肺胞マクロファージをターゲットとした新規治療法の開発という新しい研究シーズにつながることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugawara Hiroyuki, Saito Atsushi (Corresponding Author), Yokoyama Saori, Tsunematsu Kazunori, Takahashi Hiroki	4. 巻 20
2. 論文標題 Comparison of therapeutic effects of inhaled corticosteroids on three subtypes of cough variant asthma as classified by the impulse oscillometry system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 41-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1186/s12931-019-1005-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 2. Tanaka Y, Yamaguchi M, Hirai S, Sumi T, Tada M, Saito A, Chiba H, Kojima T, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y.	4. 巻 372
2. 論文標題 Characterization of distal airway stem-like cells expressing N-terminally truncated p63 and thyroid transcription factor-1 in the human lung.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental cell research	6. 最初と最後の頁 141-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.09.020	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 -
1. 著者名 Kuronuma Koji, Honda Hiroyuki, Mikami Tessei, Saito Atsushi, Ikeda Kimiyuki, Otsuka Mitsuo, Chiba Hirofumi, Yamada Gen, Sato Toyotaka, Yokota Shin-ichi, Takahashi Hiroki	4. 巻 36
2. 論文標題 Response to pneumococcal vaccine in interstitial lung disease patients: Influence of systemic immunosuppressive treatment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 4968 ~ 4972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.062	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 -
1. 著者名 Kobayashi Tomofumi, Kuronuma Koji, Saito Atsushi, Ikeda Kimiyuki, Ariki Shigeru, Saitou Atsushi, Otsuka Mitsuo, Chiba Hirofumi, Takahashi Satoshi, Takahashi Motoko, Takahashi Hiroki	4. 巻 20
2. 論文標題 Insufficient serum L-ficolin is associated with disease presence and extent of pulmonary Mycobacterium avium complex disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 224-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-019-1185-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 齋藤充史	4. 巻 73
2. 論文標題 肺胞微石症モデルマウスを用いた病態解析から見た今後の治療戦略	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 106-109
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 無
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Atsushi Saito, Yusuke Tanaka, Shigeru Ariki, Motoko Takahashi, Hiroki Takahashi
2. 発表標題 Pulmonary Alveolar Microlithiasis ~ Epidemiology in Japan and Developing treatment strategies in a novel mouse model
3. 学会等名 Rare lung Disease Consortium 2018, Cincinnati, OH, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤充史
2. 発表標題 臨床応用に向けた肺胞微石症の病態解析
3. 学会等名 日本呼吸器学会年次学術集会 2018年4月
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤充史、齋藤淳、藤谷直樹、有木茂、高橋素子、高橋弘毅
2. 発表標題 臨床応用を目指した肺胞微石症の基礎および治療法の検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会年次学術集会 2019年4月
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Saito, R. Takamiya, N. Fujitani, S. Ariki, K. Kuronuma, H. Chiba, M. Takahashi, H. Takahashi
2. 発表標題 Pulmonary Alveolar Microlithiasis ~ Epidemiology in Japan and Developing treatment strategies in a novel mouse model ~
3. 学会等名 ERS2019, Madrid, Spain (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤充史、高宮里奈、藤谷直樹、有木茂、黒沼幸治、千葉弘文、高橋素子、高橋弘毅
2. 発表標題 臨床応用を目指した肺胞微石症の基礎および治療法の検討
3. 学会等名 日本肺サーファクタント界面医学会 第55回学術研究会
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