

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08631

研究課題名（和文）肺気腫及び肺気腫合併肺癌の新規予防薬の探索

研究課題名（英文）Development of chemoprevention drug for cigarette-induced emphysema and carcinoma

研究代表者

中鉢 正太郎（Chubachi, Shotaro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：90464867

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：主に申請者が確立した喫煙曝露肺気腫・肺癌マウスモデルを用い喫煙に伴う肺気腫及び肺癌の形成にかかわる共通の機序として炎症の関与を明らかにし、抗炎症薬であるRoflumilastの肺気腫形成の抑制、抗炎症やMMP12発現、アポトーシスの抑制といった機序の解明、肺腫瘍及び肺癌の発症の抑制効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は慢性閉塞性肺疾患（COPD）の重要な併存症であり、合併した肺癌の予後は不良である。またCOPDの主病態である肺気腫は不可逆的であり、生命予後を改善する薬物治療の根拠は乏しい。そこで肺気腫・肺癌のChemopreventionが注目されているが、確立された予防薬がないのが現状である。本研究の成果により抗炎症薬、特にRoflumilastが肺気腫の進行抑制、肺癌の発症予防効果を持つ可能性が明らかにされた。さらなる研究の発展によりCOPD患者や喫煙者の予後改善に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Using a mouse model of smoking-exposed emphysema and lung cancer established by the applicant, we clarified the involvement of inflammation as a common mechanism of emphysema and lung cancer formation associated with smoking. Also, we elucidated the mechanisms by which the anti-inflammatory drug Roflumilast suppresses emphysema formation, anti-inflammation, MMP12 expression, and apoptosis, and its effect on lung tumor and lung cancer development.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 肺気腫 肺癌 予防 喫煙

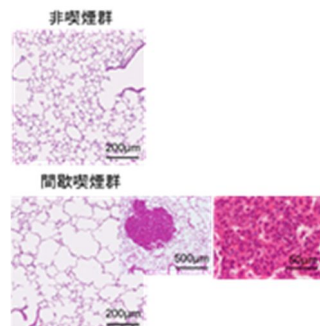
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の重要な併存症であり、合併した肺癌の予後は不良である。また COPD の主病態である肺気腫は不可逆的であり、生命予後を改善する薬物治療の根拠は乏しい。そこで肺気腫・肺癌の Chemoprevention が注目されているが、確立された予防薬がないのが現状である。本研究の目的は肺気腫の進行及び、肺癌の発症の新規予防薬を探索することである。本研究の成果により肺気腫の進行抑制、肺癌の発症予防により COPD 患者や喫煙者の予後改善に貢献できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

申請者らの研究室では同様の喫煙曝露を間歇的に繰り返すことで、肺内の慢性炎症亢進、気腫病変の増悪、さらに肺腺癌が高率に発生するマウスモデルを世界で初めて確立した。(右図; Kameyama N, Am J Respir Cell Mol Biol. 2018) **本研究では確立したマウスモデル検体を用いて基礎研究を行い、将来の肺気腫及び肺癌の Chemoprevention 薬の臨床使用につなげることを目的とした。また候補薬剤を同定した際には細胞実験を行い分子学的な機序も検討することを併せて目的とした。**



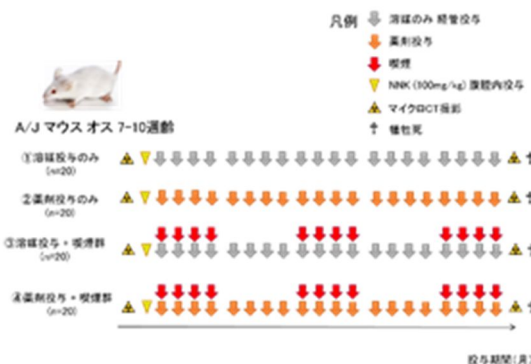
### 3. 研究の方法

#### A; 病態解明 (マウスモデルを用いた検討)

肺気腫と肺癌の共通した病態解明のため、間歇喫煙肺気腫・肺癌モデルマウスの気管支肺胞洗浄液 (BALF) 検体、全肺組織の非喫煙マウスとの比較、モデルマウスの肺気腫部位・肺腫瘍部位の肺組織の比較を PCR、免疫染色にて検討する。

#### B; マウスモデルを用いた Chemoprevention 薬の肺気腫・肺癌抑制に対する効果の検討

A の検討で予測される肺気腫と肺癌に共通する病態に作用する薬剤を、間歇喫煙肺気腫・肺癌モデルマウスに投与を行う。溶媒投与群、薬剤投与群、溶媒投与間歇喫煙曝露群、薬剤投与間歇喫煙曝露群のすべての個体について(右図)、肺気腫・肺腫瘍の組織学的な評価、マイクロ CT の比較検討を行う。当該施設の有利な点として、呼吸と心拍が同時に同期可能な最新鋭の動物用マイクロ CT が導入されていることである。申請者らは、喫煙曝露による肺の気腫化の進行を定量的に観察可能であることなどを報告してきた



(Sasaki, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015)。また薬剤の腫瘍の増殖能に対する評価を肺組織免疫染色の PCNA、Ki67 で、アポトーシスに対する効果を TUNEL 染色により病理学的に評価する。さらに以下の方法などにより、推測された薬剤効果の機序の確認を行う。

薬剤の肺の炎症、MMPs に対する効果の評価; COPD における肺癌発現の機序として両疾患に共通の遺伝的背景、慢性炎症、酸化ストレス等が関与すると考えられている。(Durham AL, Lung cancer, 2015) 薬剤の抗炎症効果の検討を ELISA を用いて BALF 中の細胞数、細胞分画 (好中球やリンパ球の増加) 炎症性サイトカイン (TNF、IL6、CCL2 など) や Matrix metalloproteinase Matrix metalloproteinase (MMPs) の測定、肺組織の炎症細胞の局在と種類の評価を行う。また肺凍結標本の RT-PCR を行い、炎症性サイトカイン等を測定する。MMPs に関しては BALF の ELISA を行い、評価を行う。

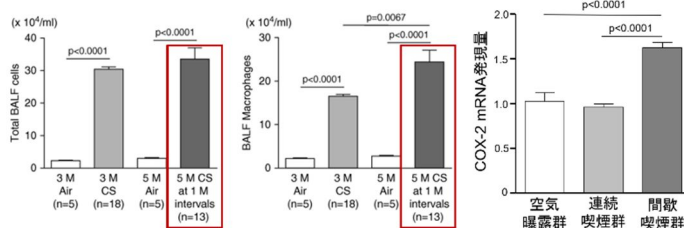
#### C; 細胞株を用いた候補薬剤の作用機序の解明

A、B の検討で明らかにした候補薬剤の作用機序を、気道上皮細胞 BEAS2B や炎症細胞 LAW/cel1 を用いて、たばこ抽出液と薬剤を添加することで検討する。

### 4. 研究成果

#### A; 病態解明 (マウスモデルを用いた検討)

間歇喫煙曝露肺気腫・肺癌マウスモデルにおいて肺気腫・肺癌の高度に発症した間歇喫煙群は特にマクロファージを主とする炎症が高度であった。また肺炎症に関与する COX2 発現が全肺組織において亢進していた。

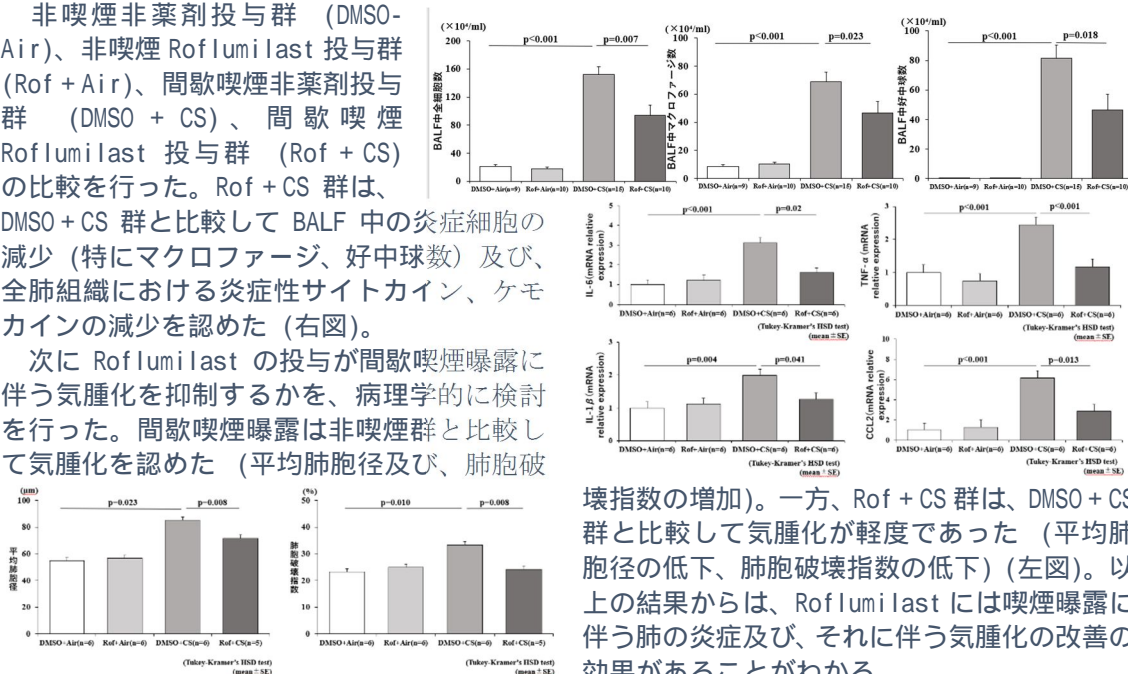


以上の結果から以下の検討では、喫煙に伴う気腫化及び、肺癌の発症の共通する機序として特に炎症に注目して検討することとした。抗炎症薬としてはPDE4 阻害薬である Roflumilast を選択した。Roflumilast は欧米では COPD の治療に認可された薬剤であり、COPD 患者の喀痰炎症所見の改善、肺機能の改善、増悪頻度の減少が報告されている薬剤である。

## B ; マウスモデルを用いた Chemoprevention 薬の肺気腫・肺癌抑制に対する効果の検討

非喫煙非薬剤投与群 (DMSO-Air)、非喫煙 Roflumilast 投与群 (Rof + Air)、間歇喫煙非薬剤投与群 (DMSO + CS)、間歇喫煙 Roflumilast 投与群 (Rof + CS) の比較を行った。Rof + CS 群は、DMSO + CS 群と比較して BALF 中の炎症細胞の減少 (特にマクロファージ、好中球数) 及び、全肺組織における炎症性サイトカイン、ケモカインの減少を認めた (右図)。

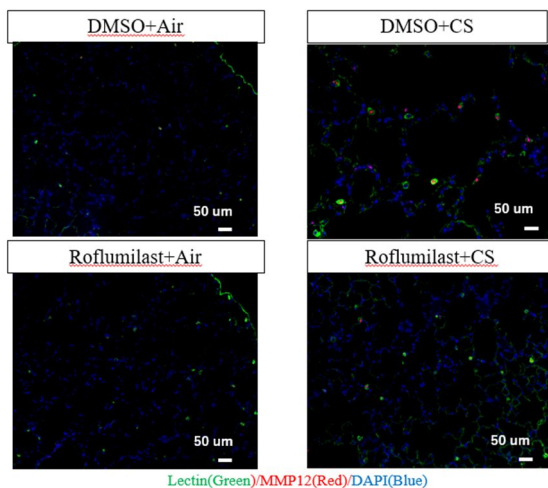
次に Roflumilast の投与が間歇喫煙曝露に伴う気腫化を抑制するかを、病理学的に検討を行った。間歇喫煙曝露は非喫煙群と比較して気腫化を認めた (平均肺胞径及び、肺胞破



壊指数の増加)。一方、Rof + CS 群は、DMSO + CS 群と比較して気腫化が軽度であった (平均肺胞径の低下、肺胞破壊指数の低下) (左図)。以上の結果からは、Roflumilast には喫煙曝露に伴う肺の炎症及び、それに伴う気腫化の改善の効果があることがわかる。

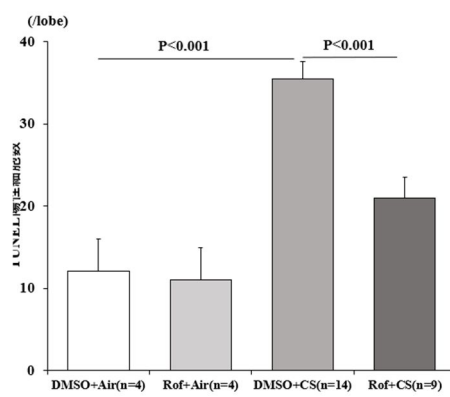
次に Roflumilast 投与による抗炎症効果が気腫化の病態として重要である、MMP12 及びアポトーシスの抑制効果を持つかを検討した。肺組織の免疫染色にて、間歇喫煙曝露は非喫煙群と比較して MMP12 の増加、アポトーシスの亢進を認めた (MMP12 陽性細胞数及び、TUNEL 陽性細胞数の増加)。Rof + CS 群は、DMSO + CS 群と比較して MMP12 及びアポトーシスの程度が軽度であった。一方 BALF 中の MMP12 を ELISA にて検討したところ間歇喫煙曝露群は、非喫煙群よりも MMP12 の増加を認めたが間歇喫煙曝露群の、Roflumilast の投与有無において差を認めなかった。Roflumilast は特に肺内のアポトーシス、MMP12 発現を抑制する効果を持つことが確認された。

### MMP12 陽性細胞

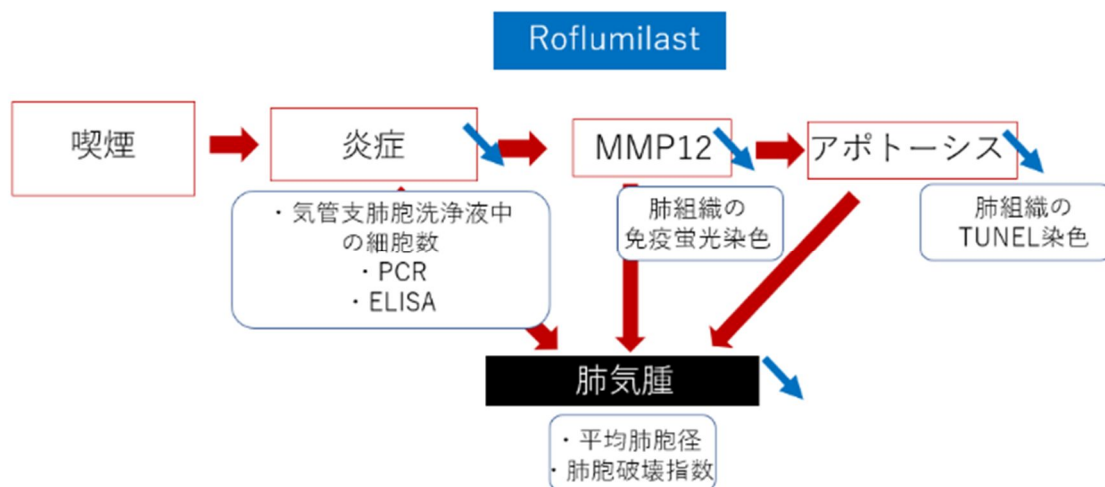


Lectin(Green)/MMP12(Red)/DAPI(Blue)

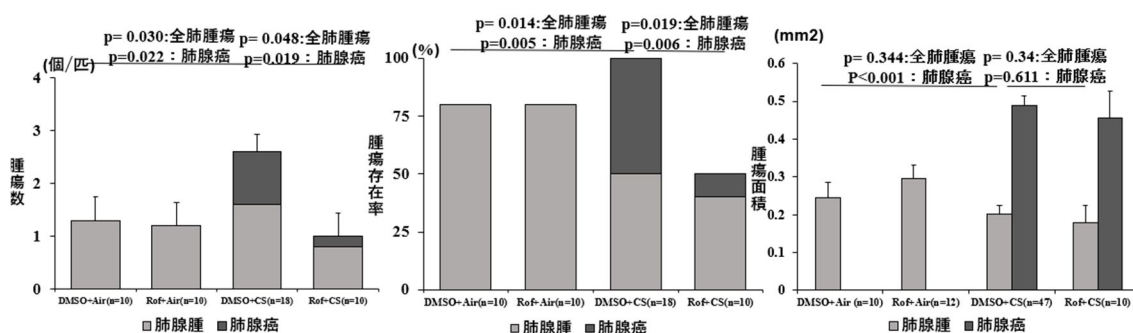
### TUNEL 陽性細胞数



以上の結果からは、右図のように世界で初めて喫煙誘導肺気腫・肺癌マウスモデルを用いて Roflumilast の抗炎症・肺気腫予防効果及び機序を明らかにすることができた。



次に Roflumilast の投与が間歇喫煙曝露に伴う肺癌の発症を抑制するかの検討を行った。間歇喫煙曝露は非喫煙群と比較して肺腫瘍数の増加・肺腺癌数の増加を認めた。一方、Rof + CS 群は、DMSO + CS 群と比較して肺腫瘍・肺腺癌数が少なかった。しかし、肺腫瘍径に有意差はなかった (右上図)。以上の結果からは、Roflumilast には喫煙曝露に伴う肺腫瘍・肺癌の発生の抑制効果があることがわかる。



腫瘍細胞の PCNA 染色、TUNEL 染色を施行したが陽性細胞数は Roflumilast 投与有無で有意差を認めなかった。この事象は Roflumilast 投与有無で腫瘍の大きさに有意差がなかったことと矛盾しない結果であった。以上の結果からは、世界で初めて喫煙誘導肺気腫・肺癌マウスモデルを用いて Roflumilast の肺腫瘍・肺癌発症予防効果を明らかにすることができた。

### C ; 細胞株を用いた候補薬剤の作用機序の解明

気道上皮細胞及び、Roflumilast が BALF 中の喫煙曝露で亢進を抑制した炎症細胞であるマクロファージの cell line である Beas2B 細胞、LAW cell にタバコ抽出液である CSE を添加したところ、MTT assay で増殖を抑制しない低濃度状況下においては炎症性サイトカイン・ケモカインの亢進を確認できた。今後 Roflumilast を添加し、これらのサイトカイン・ケモカインを抑制するかを確認することで特に Roflumilast がどの細胞に作用して抗炎症効果を発現しているかを検討していく予定である。

### 本研究の成果のまとめ

本研究では喫煙曝露に伴う肺癌発症の機序として、喫煙に伴う炎症の関与を明らかにしたうえで今後 COPD 治療に期待されている薬剤である Roflumilast の気腫予防効果・その機序・肺癌発症の予防効果をマウスモデルにて世界で初めて明らかにした。さらに今後細胞実験での分子学的な機序の確認、ヒト検体での分子機序の確認につなげることができれば、将来の COPD 患者の肺癌発症予防薬剤としての効果を確かめるための検討につながりうる。

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 中山真吾、中鉢正太郎、櫻井香、入江秀大、堤昭宏、大竹史郎、和田祥佳、加川志津子、下田将之、金井弥栄、Ahamed E. Hegab、福永興吉
2. 発表標題 喫煙マウスモデルを用いたロフルミラストの気腫・肺癌発症予防効果の検討
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021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
---------	---------