

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17678

研究課題名（和文）COPDにおけるステムセルエイジングの改善を目的とした粘液線毛輸送活性療法の開発

研究課題名（英文）Development of mucociliary transport activity therapy for improvement of stem cell ageing in COPD

研究代表者

田宮 暢代（Tamiya, Nobuyo）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・研修員

研究者番号：30569041

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）：慢性閉塞性肺疾患（COPD）は喫煙に伴う肺の老化が促進された疾患である一方、マネージメントは感染制御も鍵である。線毛機能と細胞分化・エイジングマーカーの評価を行い、健康寿命を延ばす革新的個別化治療の構築を目標とした。気管支内視鏡検査時擦過で採取した患者由来の気管支細胞から前駆細胞を精製、Air Liquid Interface（ALI）培養し評価した。従来薬剤である長時間作用性 $\beta_2$ 刺激薬LABAの線毛機能改善と一部の肺癌治療薬での線毛機能低下とLABAでの改善効果を見出した。重症気管支拡張症例で細胞老化マーカーのp16INK4aが基底細胞に高発現しており、疾患概念を超えたエイジングがみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞老化、ステムセルエイジングの概念が様々な疾患の解明の研究に使用されてきている。COPDについてはSenescence associated secretory phenotype（SASP）による慢性炎症による病態についてが注目されてきているが実際のヒト気管支細胞ならびに前駆細胞における研究は稀少であり、臨床から気管支細胞培養における粘液線毛クリアランス、細胞エイジングマーカーまで網羅したトランスレーショナルな研究は国内には非常に少ない。本研究の成果に基づき、COPDのみならず、疾患概念を超えた、エイジングマーカーを標的とした治療へと結びつく学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Chronic obstructive pulmonary disease（COPD）is smoking-related lung aging accelerated disease, infection control is also key to management. We evaluated ciliary function, cell differentiation and aging markers, with the goal of constructing an innovative personalized treatment.

Progenitor cells were purified from patient-derived bronchial cells collected by brushing with bronchoscopy, cultured with Air Liquid Interface. We evaluated ciliary beat frequency（CBF）and ciliary bend amplitude（CBA）and cell differentiation and aging markers. We found that the long-acting  $\beta_2$ -agonist（LABA）improved ciliary function, some lung cancer drugs reduced ciliary function. LABA improved the adverse effect.

In a case of severe bronchiectasis, cell senescence marker p16INK4a was highly expressed in basal cells. It is an abnormality related to aging markers that goes beyond the concept of disease, suggesting that it may lead to treatment of target molecules rather than disease-specific treatment.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 線毛細胞 前駆細胞 ステムセルエイジング 健康寿命

## 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease :COPD) は、主に長期間にわたり喫煙することで、末梢気道や肺胞に慢性的な炎症が惹起され、炎症による気道傷害により、中高年に多く発症する気流閉塞を特徴とする気道疾患である。また、COPD は肺の老化が促進された (accelerated ageing) 疾患であることが提唱されて久しい。

また、COPD は世界的に患者数が増加し、社会経済への影響も増大しつづけており、2030 年までに主要な死因第 3 位、疾病負荷第 7 位になると予想されており、健康寿命についても短縮する。COPD 患者の呼吸機能低下の進行原因として、COPD の急性増悪が何度も起こることが一因となっている。急性増悪を繰り返すことで気腫化や気道のリモデリングなどが進行し病状が悪化し死亡率が高まる。そのため、COPD のマネージメントに対して、気道感染症予防が鍵となる。気道においての宿主防御機能として重要である粘液線毛クリアランスが低下すると、肺炎などの気道感染症発症リスクとなる。それゆえ、粘液線毛クリアランスの評価を行うことが感染防御において重要である。粘液線毛クリアランスは、線毛運動そのものの低下や、前駆細胞のエイジングにより線毛細胞への分化が低下し杯細胞への分化が増加すること(リモデリング)によっても起こると考えられる。

本研究者はすでに線毛機能評価に関する研究をすでに確立しており、近年は検体採取の侵襲度を下げる方法として、気管支内視鏡時に擦過のみで採取した少量の検体より前駆細胞を精製し、ALI (Air liquid interface) 培養を用いた気道上皮の 3D 培養を確立してきており、その気道細胞を用いた各種研究を行うことが可能となっている環境である。粘液線毛クリアランス評価として線毛運動周波数 Cilia Beat Frequency (CBF) ならびに線毛運動振幅角 Cilia Bend Amplitude (CBA) の測定、電子顕微鏡による線毛形態評価、細胞内 pH、細胞内カルシウム濃度、細胞内クロライド濃度、cAMP 測定、さらに気道細胞分化評価 (線毛細胞/杯細胞比)、前駆細胞の各種エイジングマーカーについても評価可能である。また、気道上皮の 3 次元培養については 1 か月以上の長期培養も安定に行えることから、長期薬物負荷時の機能・分化能評価も行うことが可能である。

今回用いる細胞が患者の気管支前駆細胞を用いているのは、患者そのものの前駆細胞のエイジングの評価、ならびに、その前駆細胞を用いた分化を評価することで個別化していくことが可能であることに意義がある。本研究により、COPD をはじめとした様々な呼吸器疾患における粘液線毛クリアランス機能の向上を目的とした、機能評価、薬剤投与時の効果を検証し、分化や前駆細胞のステムセルエイジング評価・改善も網羅した COPD 治療を開発することのみならず、個別の患者細胞の評価を行うことにより、phenotyping した治療へと、健康寿命を延ばす治療へと発展できうる。

## 2. 研究の目的

気管支内視鏡検査時に擦過のみで採取したヒト気管支細胞から前駆細胞を精製し、Air Liquid Interface 培養し、線毛運動の評価 (線毛運動周波数 Cilia Beat Frequency CBF ならびに線毛運動振幅角 Cilia Bend Amplitude CBA を測定)・電子顕微鏡による線毛形態変化・気道細胞分化評価・エイジングマーカー評価を COPD 群・非 COPD 群間で行うことを目的とした。また、採取患者の喀痰咳嗽症状スコア (CASA-Q) との相関があるかについても評価することとした。

## 3. 研究の方法

気管支内視鏡検査時に採取したヒト気管支細胞から前駆細胞を精製し、Air Liquid Interface (ALI) 培養する。精製した前駆細胞を保存する。 気管支内視鏡検査の適応がある患者に対し、同意の得られた患者から、非腫瘍気道部位を気管支擦過し、得た検体から前駆細胞を精製した。前駆細胞 (一部) から ALI 培養をおこなった。また、精製した前駆細胞については、凍結保存した。

2019 年度は順調に採取が捗ったが、2020 年計画当初には存在しなかった COVID-19 パンデミックが起きた。採取自体に中断や滞りを生じたりしたが SARS-CoV2 PCR が病院院内で出来うようになってから再開した。元の計画では、結核発症あるいは結核発症を疑う患者は除外する、としていたが、COVID-19 についても除外することとした。流行中は、気管支内視鏡検査前にスクリーニングで事前 SARS-CoV2 PCR 検査 (唾液) 陰性を確認した者に採取をした。

これまで本教室でおこなっている線毛運動の評価 (線毛運動周波数 Cilia Beat Frequency CBF ならびに線毛運動振幅角 Cilia Bend Amplitude CBA を測定)・電子顕微鏡による線毛形態変化を行う。 ALI 培養気道上皮細胞を、本教室でおこなっている線毛運動の評価 (CBF ならびに CBA を測定)・電子顕微鏡による線毛形態変化を行うこととした。

ALI 培養時の細胞内 pH、細胞内カルシウムイオン濃度、細胞内クロライドイオン濃度、cAMP 測定、気道細胞分化評価・前駆細胞のエイジングマーカー評価を COPD 群・非 COPD 群間で行う。 線毛運動制御因子 (cAMP、細胞内 pH、細胞内カルシウムイオン、細胞内クロライドイオン濃度) を共焦点顕微鏡下タイムラプスイメージングを用いて測定する。また、分化誘導時の線毛細胞/

杯細胞比（免疫染色：Foxj1 または Ac-Tub 発現 線毛細胞分化、MUC5AC 発現 杯細胞分化）電子顕微鏡による線毛構造タンパク（ODF2）の発現が、COPD・非 COPD 間で差異があるかを評価することとした。

また、前駆細胞のステムセルエイジングマーカー（p16<sup>INK4a</sup>、p21）について PCR 法、Western Blotting または免疫染色にて評価することとした。

**患者の症状評価としては、喀痰咳嗽スコアとして用いられている CASA-Q を用い、相関があるかどうかを検証する。**CASA-Q と CBF、CBA、線毛細胞/杯細胞比との相関があるかを評価する。student T 検定あるいは多変量解析により相関関係を評価する。

**COPD 患者からの ALI 培養細胞を用い、COPD 治療薬（LABA、LAMA、ICS、テオフィリン製剤）の単回および長期投与における線毛運動評価（CBF、CBA）、気道細胞分化能、エイジングマーカー発現量を評価する。**ALI 培養細胞において LAMA、LABA、ICS、Theophylline について、LAMA の種類の違いによる効果の違い（Umeclidinium、Tiotropium、Glycopyrronium）、LABA の種類による効果の違い（Vilanterol、Olodaterol、Formoterol）かつ、ICS 併用とすることでどのような現象が起こるか（Fluticasone、Budesonide、Ciclesonide）を線毛運動機能（CBF、CBA）、線毛運動制御因子（cAMP、pH、細胞内カルシウムイオンや、細胞内クロライドイオン濃度）を評価し、さらに一ヶ月の長期投与による線毛細胞/杯細胞比、エイジングマーカーを検証する。ICS については喘息疾患モデルにおいては杯細胞分化が抑制されるという budesonide の過去の報告もあり、種類によって異なるのかも検証する。

それぞれの薬剤への反応性・効果に関しては個体差がある場合、phenotyping する。また、粘液線毛クリアランス機能の改善のみならず、前駆細胞からの杯細胞分化への誘導因子の同定とその抑制、前駆細胞のエイジングを促進する因子の検証（各種阻害剤、siRNA によるノックダウン、CRISPR/Cas9 法によるノックアウト）や、抑制する効果のある薬剤を確立する。

#### 4. 研究成果

計画当初全く想定にはなかった COVID-19 パンデミック・世界的流行により、体制がかなりかわり、採取困難時期を経たが、38 症例で同意を得て、採取した。採取した気管支内視鏡擦過検体のみから、前駆細胞精製、ALI 培養可能であった。

CASA-Q 評価は基礎疾患が多種にわたりすぎたこと、全例に確認できなかったこともあり（認知機能低下で質問に対する返答が厳しい患者や、全身状態の悪い患者）症例が想定よりも少なく、統計学的な有意な所見が得られなかったが、次採択課題へと引き継ぎ、症例数を重ねての発表とする。

なお、COVID-19 流行中は、これまでに採取した気管支前駆細胞からの ALI 培養気管支細胞での各種評価をおこなった。

まず、COPD 薬として多くもちいられている、長時間作用性<sub>2</sub>刺激薬である Formoterol の気道線毛への効果につき検討した。これまで、研究者含め、procaterol などの短時間作用性<sub>2</sub>刺激薬の線毛運動への効果があること（CBA、CBF が上昇すること）は報告されてきているが、長時間作用性<sub>2</sub>刺激薬が灌流曝露後も線毛運動効果が持続するかの評価を行った。気管支 Formoterol 1nM の 20 分灌流により CBF は 32.9%増加し、CBA も 16.3%の増加を認め、灌流終了 20 分後、24 時間後も同様に両者の増加を維持した。

COPD 患者には肺癌合併率が高いことが既報告で知られていることから、ALI 培養気管支細胞を各種肺癌薬療法薬に曝露させたところ、タキサン系であるドセタキセル、パクリタキセルでの CBF、CBA 低下がみられた。とくにドセタキセルについては、単剤での肺癌治療も行われることも多いことから、さらに詳細に評価を行うこととした。

ALI 培養気管支細胞にドセタキセル 10 μM を灌流投与をすることにより、CBF は 20 分で 15.6 ± 2.9%低下し、CBA も 48.4 ± 5.2%の低下が認められた。投与終了 30 分後も同様に 18.8 ± 2.7%の低下、48.3 ± 6.8%の低下であった。培養継続し、投与 1 日後も同様に CBF は 21.95 ± 5.6%の低下、CBA は 53.3 ± 5.9%の低下であった。培養 1 週間後は、CBF 20.8 ± 4.4%の低下、CBA 44.5 ± 3.8%の低下であった。また、一部は線毛の脱落、変形、運動異常を認めた

3.次に、ドセタキセル負荷時の線毛運動低下に対する効果があるかどうか検討した。ドセタキセル 10 μM を投与後に Formoterol 1nM を 30 分投与した。CBA、CBF が増加し、継続培養 24 時間後も維持した。Formoterol は短時間曝露で線毛運動が上昇し 24 時間維持し、タキサン系抗癌剤負荷時の線毛運動機能低下も改善し、気道感染予防の薬剤の一つであることを示唆した。ただし、線毛の脱落と変形については改善しなかったため、残存した線毛細胞への効果ということとなることは、今後の課題である。

引き続き、COVID-19 パンデミック中に ALI 培養での各種評価をおこなった。協力機関である京都薬科大学にて、網羅的に生薬の効果を評価する機会があり、アーティチョークからの化合物について、ALI 培養細胞で線毛機能の活性がみられたことから評価をおこなった。アーティチョーク化合物 100 μM を 60 分間灌流し、CBF 測定と細胞内 cAMP ([cAMP]i) とカルシウムイオン ([Ca<sup>2+</sup>]i) のレベルを共焦点レーザー走査型顕微鏡で測定した。CBF は増加し、カルシウムイメージングにより、小胞体における Ca<sup>2+</sup>の蛍光が枯渇し、続いて細胞質における Ca<sup>2+</sup>の蛍光が増加した。SERCA を阻害すると、ER で Ca<sup>2+</sup>が枯渇し、それが活性化されたカルシウムチャネルによって Ca<sup>2+</sup>の流入を引き起こしていることが判明した。[Ca<sup>2+</sup>]i の上昇は [cAMP]i を増加させ、CBF の増加をもたらした。線毛細胞の SERCA の阻害による [Ca<sup>2+</sup>]i の上昇によって誘発される [cAMP]i の

増加を介して CBF を増加させていることを示した。

エイジングマーカーについての評価については、COPD 患者ではないが、著しい気管支拡張をきたし Mounier-Kuhn 症候群と診断した患者の細胞を用い、評価をおこなった際に、興味深い成果が得られた。

気管支内視鏡検査で採取した気管支細胞から前駆細胞精製の後に ALI 培養を行い、線毛機能ならびに分化異常・細胞老化マーカーについて評価をおこなった。

通常の正常分化している細胞では、ALI 培養にしたときに 4 週で線毛細胞まで分化するが、この症例では ALI 培養開始してから 6 週間程度を必要とする分化の遅れがみられた。

線毛の運動 Ciliary Beat Pattern (CBP) は、正常分化細胞は一定方向にそろって波打つが、本症例ではランダムにうごいていた。これまでの正常分化細胞では CBF は 9Hz 程度であったが、7 Hz に低下し CBA も低下していた。ALI 培養気道上皮の基底細胞のマーカーである Kr-5 染色ならびに、細胞核染色 DAPI、細胞老化のマーカーである p16<sup>INK4a</sup> 免疫染色を行い、正常よりも基底細胞が少なく、基底細胞での p16<sup>INK4a</sup> 発現が増加していたことから、基底細胞での細胞老化が判明した。胚細胞を MUC 5 で、線毛を Actubulin で蛍光染色したところ、ALI 培養でも胚細胞の増生、過形成がみられ、基底細胞の残存がみられ、分化異常：線毛細胞への分化率が低下していた。細胞老化マーカーでは p16<sup>INK4a</sup> の発現が増加していた。

p16<sup>INK4a</sup> は、サイクリン依存性キナーゼ 4 (CDK4) と相互作用する分子で、細胞周期の G1 期を制御する分子であり、細胞老化の重要なエフェクターである。加齢とともに p16<sup>INK4a</sup> の発現レベルが上昇する。肺の ageing であるとされる COPD は、Senescence associated secretory phenotype (SASP) による慢性炎症が関連するとされ、p16<sup>INK4a</sup> が高発現することによる経路が報告されている。この研究においてこの症例を評価することにより、エイジングマーカーである p16<sup>INK4a</sup> が気管支細胞・気道上皮の分化細胞老化や、分化異常、気管支拡張に関連し、気管支拡張症の原因の一つとなりうることを示唆した。これは、COPD や気管支拡張症といった疾患別治療概念ではなく、SASP による慢性炎症そのものへの標的治療・エイジングマーカーへの標的個別化医療につながる結果であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名	Nobuhisa Todo, Kouta Noriyama, Nobuyo Tamiya, Masaki Shigeta, Seikou Nakamura, Koichi Takayama, Eishi Ashihara, Shigekuni Hosogi.
2. 発表標題	An artichoke-derived compound increase [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> by inhibiting Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase (SERCA) and activates airway ciliary beating in humans.
3. 学会等名	European Respiratory Society Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Nobuhisa Todo, Kouta Noriyama, Masaki Shigeta, Seikou Nakamura, Nobuyo Tamiya, Koichi Takayama, Eishi Ashihara, Shigekuni Hosogi
2. 発表標題	An artichoke-derived compound increase [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> via inhibiting Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase (SERCA) activated airway ciliary beating in humans.
3. 学会等名	The 63rd Annual Meeting of The Japan Respiratory Society (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	田宮 暢代、法山 康太、藤堂 暢久、柴原 一毅、古室 太誠、榎本 昌光、畑 妙、田中 友樹、土谷 美知子、高山 浩一、長坂 行雄、芦原 英司、細木 誠之
2. 発表標題	気管支細胞培養で分化異常と細胞老化マーカー異常が認められたMounier-Kuhn症候群の一例
3. 学会等名	第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	10.田宮 暢代、細木 誠之、榎本 昌光、鈴木 潤、石田 真樹、畑 妙、田中 友樹、坂口 才、土谷 美知子、高山 浩一、芦原 英司、長坂 行雄.
2. 発表標題	COPD患者の気管支培養細胞における電子タバコ(Vapor)による線毛運動評価.
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

1. 発表者名 N. Tamiya, S. Hosogi, J. Suzumoto, M. Ishida, C.Sakaguchi, M. Tsuchiya, Y. Nagasaka, E. Ashihara, K. Takayama
2. 発表標題 The effect of Taxane anticancer drugs on bronchiolar ciliary activity in human airway cultured cells
3. 学会等名 European Respiratory Society Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Hosogi, N. Tamiya, L. Puppulin, H. Tanaka, K.Takayama, E. Ashihara
2. 発表標題 Epithelial anion secretion of human bronchial ciliary epithelium.
3. 学会等名 European Respiratory Society Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田宮 暢代, 瀬古 友利恵, 吉村 彰紘, 西岡 直哉, 山本 千恵, 張田 幸, 今林 達哉, 千原 佑介, 金子 美子, 山田 忠明, 内野 順治, 細木 誠之, 高山 浩一
2. 発表標題 ヒト気道培養細胞におけるFormoterolの線毛運動機能評価
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細木 誠之, 田宮 暢代, 瀬古 友利恵, 千原 佑介, 今林 達哉, 芦原 英司, 高山 浩一
2. 発表標題 ヒト初代培養気道線毛細胞の線毛運動とイオン輸送解析
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田宮 暢代, 瀬古 友利恵, 吉村 彰紘, 西岡 直哉, 山本 千恵, 張田 幸, 今林 達哉, 千原 佑介, 金子 美子, 山田 忠明, 内野 順治, 細木 誠之, 高山 浩一
2. 発表標題 ヒト気道培養細胞における抗がん剤負荷時の線毛運動評価
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田宮暢代、細木誠之、鈴木潤、石田真樹、坂口才、土谷美知子、長坂行雄、 芦原英司、高山浩一
2. 発表標題 ヒト気道培養細胞におけるタキサン系抗癌剤投与時の線毛運動評価
3. 学会等名 第 28 回バイオフィジオロジー研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------