

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590973

研究課題名（和文）慢性閉塞性肺疾患の病態形成機序についての研究

研究課題名（英文）Research of the pathoetiology of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

青柴 和徹（AOSHIBA KAZUTETSU）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60231776

研究成果の概要（和文）：慢性閉塞性肺疾患（COPD）の病態形成機序を明らかにする目的で一連の研究を行った。その結果、1）COPD 患者の気道・肺胞細胞では炎症性サイトカインの産生、アポトーシス、老化、酸化ストレスによる DNA 障害が生じていること；2）気道上皮に慢性的な DNA 障害を起こしたマウスでは細胞老化と気道炎症が生じること；3）DNA 障害を生じた培養気道上皮・肺胞上皮細胞からは炎症性サイトカインが産生されることが明らかになった。以上の成績から、COPD では酸化ストレスによる DNA 障害が気道・肺胞炎症、アポトーシス、細胞老化の原因になっていることが知られた。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to elucidate the pathoetiologic mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We found that 1) chronic inflammation, apoptosis, cell senescence, and DNA damage occur in the lungs of COPD patients; 2) DNA damage to airway epithelial cells in mice caused cell senescence and chronic airway inflammation; and 3) DNA-damaged airway and alveolar epithelial cells produced a large amount of proinflammatory cytokines. These findings suggest that DNA damage plays an important role in inflammation, apoptosis, cell senescence in the lungs of COPD patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：COPD、炎症、アポトーシス、細胞老化、DNA 障害、クララ細胞、肺胞上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患（COPD）日本においては 500 万人以上存在しているが、人口の高齢化とともに世界的にも一層の増加が予測され

ている。しかしながら COPD の発症機序は不明で根本的な治療薬はない。従来から信じられてきた COPD（肺気腫）の発症仮説は、喫煙により活性化された炎症細胞からのプロテ

アーゼが肺の細胞外基質であるエラスチンやコラーゲンを破壊するという考え方（プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説）である。しかしながらこの古典的仮説に基づいて試みられたアンチプロテアーゼ補充療法では COPD に対して十分な治療効果が得られないこと、肺炎のように高度の炎症細胞浸潤とプロテアーゼ活性の増加がみられる病態においては COPD が生じないこと、COPD における肺胞細胞の消失機序を十分に説明できないこと、さらに COPD の病態を特徴づける炎症慢性化の機序が不明なことなどの問題があり、新しい観点からの COPD の発症機序の研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、私たちの「細胞死と老化仮説」に基づき、COPD の病態形成機序を解明することである。特にこれまでの研究を進展させて、老化と炎症の関係と DNA 障害の関与について研究を進めることとした。

3. 研究の方法

培養細胞、マウスを用いた動物実験、ヒト肺組織を用いた研究を行った（東京女子医科大学倫理委員会承認番号 1783）。

（1）培養細胞を用いた研究

ヒト II 型肺胞上皮様 A549 細胞とクララ細胞様 NCI-H441 細胞に bromodeoxyuridine (BrdU、25 μ m) またはテロメラーゼ阻害薬 (2,6-bis[3-(N-piperidino)propionamido]-9,10-dione、1 μ m) を曝露して細胞老化を誘導した。その後上清を回収し、ELISA 法によりサイトカイン濃度を測定した。細胞成分については SA β -galactosidase 染色を行うとともに、ウエスタンブロッッキング法を用いて NF- κ B と p38-MAPK の活性化を測定した。

（2）動物を用いた研究

DNA 障害によるクララ細胞の老化を誘導するために雄 C57/BL6J マウスに 3 週間連続して、週 1 回クララ細胞を傷害するナフタレン (200 mg/kg) または溶媒を腹腔内に注射し、薬剤投与の翌日から 3 日間 BrdU (200 mg/kg) または溶媒を腹腔内投与した。薬剤の最終投与から 1 週間後（実験開始から 4 週間後）に肺を摘出した。凍結およびパラフィン固定の肺組織切片を作製して senescence-associated (SA)

β -galactosidase 活性および免疫組織染色 (抗 CC10、抗 CD45、抗 CD90.2、抗 phospho-p38MAPK 抗体) を行い、末梢気道のクララ細胞の老化と気道炎症の関係について検討した。一部のマウスについては BrdU を投与する直前に毎回 p38-MAPK 阻害薬 (SB202190、1 mg/kg) を腹腔内に注射した。

（3）ヒト肺組織を用いた研究

肺容量減少術時に採取された COPD 患者（全員過去喫煙者）の肺組織および末梢性肺癌の切除時に採取された非喫煙者および喫煙者の残余肺組織から 3 μ m のパラフィン包埋切片を作製し、蛍光免疫染色を行った。用いた一次抗体は、抗 phospho(Ser139)-histone H2AX (γ -H2AX)、抗 phospho(Ser25)-p53-binding protein 1 (phospho53BP1)、抗 phospho(Ser/Thr)-ataxia teleangiectasia mutated kinase (ATM)/ataxia teleangiectasia and Rad3-related kinase (ATR) substrate、抗 p16^{INK4a}、抗 cleaved(Asp175)-caspase-3 (active caspase-3)、抗 phospho(Ser536)-nuclear factor (NF)- κ B、抗 IL-6、抗 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)、抗 surfactant protein-C (SP-C)、ヤギ抗 aquaporin-5 (AQP5) およびマウス抗 CD31 で

あった。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた研究

BrdUによるDNA障害やテロメラーゼ阻害薬により老化したA549細胞やNCI-H441細胞ではNF- κ Bやp38-MAPKが活性化し、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α 、GM-CSFなどの炎症性サイトカインが産生されていた。

(2) 動物を用いた研究

ナフタレンとBrdUを3週間反復して腹腔内に注射したマウスでは、ナフタレンのみを腹腔内注射したマウスに比べて、末梢気道のクララ細胞が老化し(SA β -galactosidaseが陽性)、クララ細胞(CC10陽性細胞)の再生が抑制されていた。さらにクララ細胞が老化した気道周囲には白血球(CD45陽性細胞)やTリンパ球(CD90.2陽性細胞)の浸潤が観察された。またナフタレンとBrdUを腹腔内注射したマウスではクララ細胞のp38-MAPKのリン酸化が観察された。そこでp38-MAPK阻害薬を腹腔内注射したところ、クララ細胞の再生は改善しなかったが、ナフタレンとBrdUの腹腔内注射により誘導された白血球の浸潤が抑制されていた。

(3) ヒト肺組織を用いた研究

対照喫煙者や対照非喫煙者と比べてCOPD患者のI型肺胞上皮細胞、II型肺胞上皮細胞、血管内皮細胞では、2本鎖DNA障害

(double-strand DNA breaks)の指標である γ -H2AX foci、リン酸化53BP1 foci、リン酸化ATM/ATR substrates fociの数が有意に増加していた。対照喫煙者では対照非喫煙者に比べて γ -H2AX foci、リン酸化53BP1 foci、リン酸化ATM/ATR substrates fociの数が増加する傾向にあったが有意差は認められなかった。またCOPD患者の肺組織では非喫煙者や喫煙者に比べてII型細胞のアポトーシス(active caspase-3陽性率)、細胞老化(p16

陽性率)、炎症活性化(リン酸化NF κ B陽性率およびIL-6陽性率)の程度も増加していたが、これらの増加は肺組織のII型肺胞上皮細胞のDNA障害の程度(γ -H2AX fociの平均数)との間に正の相関がみられた。

個々のII型肺胞上皮細胞について検討すると、 γ -H2AX fociの数が多細胞ほどactive caspase-3、p16、リン酸化NF κ BおよびIL-6の陽性率が増加していた。さらに8-OHdG(酸化DNA)陽性のII型肺胞上皮細胞では、8-OHdG陰性のII型肺胞上皮細胞に比べて γ -H2AX fociの数が有意に増加していた。さらにp16陽性の老化したII型肺胞上皮細胞ではNF κ Bがリン酸化していた。

以上の結果から、1) COPD患者の気道・肺胞細胞では炎症性サイトカインの産生、アポトーシス、老化、および酸化ストレスによるDNA障害(2本鎖切断)が生じていること；2) 気道上皮に慢性的なDNA障害を起こしたマウスでは細胞老化と気道炎症が生じること；3) DNA障害を生じた気道上皮・肺胞上皮細胞は老化とともに炎症性サイトカインを産生する形質(senescence-associated secretory phenotype: SASP)に変化することが明らかになった。すなわちCOPDでは酸化ストレスによるDNA障害が気道・肺胞炎症、アポトーシス、細胞老化の原因になっていることが知られた。

本研究の結果から、COPDでは炎症とDNA障害の間に悪循環が形成している可能性が考えられた。すなわちCOPD患者ではタバコ煙曝露により活性化された炎症細胞からの活性酸素/活性窒素とタバコ煙中の活性酸素が気道や肺胞細胞のDNAに2本鎖切断を引き起こす。その結果、気道や肺胞細胞にアポトーシスや細胞老化が誘導されるとともに、NF κ Bやp38MAPKが活性化されて(SASP)が炎症性サイトカインが産生される。炎症性サ

イトカインは炎症細胞をさらに活性化することにより、活性酸素/活性窒素による DNA 障害を増強する。COPD 患者ではこのようなポジティブフィードバック経路により炎症と DNA 障害の間の悪循環が生じるため、炎症が慢性化する可能性が考えられた。

本研究で示されたように、COPD の病態形成機序に DNA 障害が関与しているならば、COPD が高齢者に多い理由 (DNA 障害の蓄積性)、COPD の炎症が進行性に悪化する理由 (炎症と DNA 障害の悪循環)、COPD の炎症が禁煙後も持続する理由 (DNA 障害の残存性)、肺癌が合併しやすい理由 (COPD と肺癌の原因における DNA 障害の共通性) を説明することが可能と思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Aoshiha K, Zhou F, Tsuji T, (他 1 名, 1 番目), DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. *Eur Respir J* (in press), 査読有
- ② Zhou F, Onizawa S, Nagai A, Aoshiha K (4 番目), Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury, *Respir Res*, 12 巻 78, 2011, 査読有
- ③ 青柴和徹 (1 番目), COPD 発症・進展にかかわるアポトーシス, 細胞老化, DNA 障害の関与, *日本臨床*, 69 巻 1754-1757, 2011, 査読無
- ④ 青柴和徹 (1 番目), 呼吸器疾患とエイジング エイジングと形態変化, 呼と循, 59 巻 553-558, 2011, 査読無
- ⑤ Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A, (2 番目) Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in COPD patients, *Respiration*, 80 巻 59-70, 2010, 査読有
- ⑥ 青柴和徹 (1 番目), COPD における細胞老化, *呼吸*, 29 巻 76-88, 2010, 査読無
- ⑦ 青柴和徹 (1 番目), 分子病態からみた COPD の進行予防と治療への道, *分子呼吸器病* 14 巻 26-27, 2010, 査読無
- ⑧ 辻隆夫, 青柴和徹 (2 番目), 呼吸器疾患感受性 遺伝的背景: COPD, *日本胸部臨床* 69 巻 695-700, 2010, 査読無
- ⑨ Aoshiha K, Onizawa S, Tsuji T, (他 1 名, 1 番目). Therapeutic effects of erythropoietin in murine models of endotoxin shock, *Crit Care Med*, 37 巻 889-898, 2009, 査読有
- ⑩ Aoshiha K, Nagai A (1 番目), Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease, *Proc Am Thorac Soc*, 6 巻 596-601, 2009, 査読有
- ⑪ Aoshiha K, Nagai A (1 番目), An evolutionary perspective on COPD, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41 巻 507-508, 2009, 査読有
- ⑫ Tsuji T, Aoshiha K, Yokohori N, Nagai A (2 番目), A systemically administered EP2 receptor agonist stimulates pulmonary angiogenesis in a murine model of emphysema, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 90 巻 85-88, 2009, 査読有
- ⑬ Onizawa S, Aoshiha K, Nagai A (2 番

目), Platinum nanoparticle antioxidants inhibit pulmonary inflammation in mice exposed to cigarettes smoke, *Pulm Pharmacol Therapeutics*, 22巻340-349, 2009, 査読有

- ⑭ 青柴和徹 (1 番目), 肺の再生医学-歴史的展開-, *The Lung perspectives*, 17 巻 357-360, 2009, 査読無
- ⑮ 青柴和徹 (1 番目), COPD に対する肺の再生治療, *治療学*, 43 巻 86-88, 2009, 査読無
- ⑯ 青柴和徹 (1 番目), 気腫化を合併した間質性肺炎, *医学のあゆみ*, 229 巻 603-606, 2009, 査読無
- ⑰ 青柴和徹 (1 番目), 老化と COPD *Progress in Medicine*, 29 巻 556-565, 2009, 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ① 辻隆夫、青柴和徹、永井厚志, COPD の発症機序における DNA 障害、第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 2011. 4. 23、東京 (東北大震災のため誌上発表)
- ② 辻隆夫、青柴和徹、永井厚志, エラスターゼ肺気腫マウスの体脂肪量減少に対する EP2 受容体作動薬の効果, 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 2011. 4. 23、東京 (東北大震災のため誌上発表)
- ③ Aoshiha K, Etiology and pathophysiology of COPD, The 3rd meeting of the Japanese Society of Pulmonary Function Imaging and 5th International Workshop for Pulmonary Function Imaging, 2011. 1. 29, Awaji-shima, Hyogo.
- ④ Aoshiha K, Lung senescence and COPD, 15th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2010. 11. 25,

Manila, Philippine.

- ⑤ 周方、青柴和徹、鬼澤重光、永井厚志, COPD における気道炎症と再生障害における老化の役割, 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会, 2010. 4. 23、京都
- ⑥ Aoshiha K, Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of COPD, *Airway Vista* 2010, 2010. 4. 17, Seoul, Korea.
- ⑦ 周方、青柴和徹、鬼澤重光、永井厚志, クララ細胞の老化による気道炎症の誘導, 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会, 2009. 6. 12, 東京
- ⑧ 青柴和徹, COPD における細胞老化, 第 37 回箱根呼吸討論会, 2009. 6. 26, 札幌.
- ⑨ 青柴和徹, COPD における細胞死と老化 COPD と間質性肺炎の共通点, 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム, 2009. 6. 13, 東京.
- ⑩ Aoshiha K, Senescence and relationship to COPD, 9th COPD Lund symposium. 2009. 4. 22. Lund, Sweden

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青柴 和徹 (AOSHIBA KAZUTETSU)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 60231776

(2) 連携研究者

八木 理充 (YAGI OSAMITSU)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 30439806