

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591138

研究課題名(和文) COPD患者における肺気腫の進行抑制のための分子基盤の研究

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of emphysema in COPD: For the prevention of the progression of emphysema

研究代表者

党 雅子 (To, Masako)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90595597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に、低酸素下でのHypoxia inducible factor-1 (HIF-1)とヒストン脱アセチル化酵素7(HDAC7)の核内移行が、COPD患者で低下している事を発見した。同所見と肺気腫の進行の関連を検討した。

HDAC7ノックダウン細胞では、低酸素下でのHIF-1の核内移行が低下し、VEGF産生増加が抑制されていた。低酸素暴露によるサイトカインや蛋白分解酵素の産生増加は、HIF-1非依存性、NF- $\kappa$ B p65依存性で、HDAC7ノックダウン細胞でも保たれていた。COPD患者で見られている低酸素応答の異常は、肺気腫の進行の要因のひとつとなっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that HIF-1 and HDAC7 levels in nuclei under hypoxia condition were lower in COPD compared to control subjects. In this project, we investigated the association between this findings and the progression of emphysema in COPD patients.

In HDAC7 knockdown cells, HIF-1 nuclear translocation and subsequent VEGF expression were suppressed compared to control cells. Hypoxia induced- cytokine and protease expressions were HIF-1 independent and NF- $\kappa$ B p65 dependent. Hypoxia induced- cytokine and protease expressions were not suppressed in HDAC7 knockdown cells. The abnormal response to hypoxia in COPD patients seems to be a one of the factors for the progression of emphysema due to the depression of VEGF and the increase of inflammatory cytokines and proteases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HIF-1 肺気腫 慢性閉塞性肺疾患

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、罹患率と死亡率が漸増している疾患である。本疾患ではしばしば急性増悪がみられ、急性増悪後には、肺の破壊が進行し肺気腫の程度が進行していることが多い。急性増悪による肺の破壊を抑制することができれば、患者の予後を大きく改善することができる。

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) は、低酸素に対する細胞レベルでの適応のために重要な蛋白質である。HIF-1 は、恒常的に産生されているが、通常の酸素レベルでは、常にユビキチン化を受けプロテオソームで分解されている。HIF-1 のユビキチン化は、酸素感受性の酵素である Prolyl hydroxylase (PHD) によるプロリン残基の水酸化を介して行われている。低酸素下では、PHD が不活性化され、HIF-1 が分解を受けなくなり核内へ移行する。核内では、HIF-1 は VEGF などの低酸素応答性遺伝子のプロモーターに結合し、これらの遺伝子の転写を活性化する。一方で、低酸素による PHD の不活性化は、上記の経路とは別経路で、NF- $\kappa$ B の活性化を引き起こすことも報告されている。一般に NF- $\kappa$ B の活性化は CXCL8 などの炎症性サイトカインや matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) などの蛋白分解酵素の産生を促進する。

COPD 患者は、日常生活で安静時および労作時に低酸素血症を来している。しかし興味深いことに、COPD の患者の喀痰中の VEGF は COPD の重症度が上がるにつれて低下することが報告されており、VEGF の低下と肺気腫との関連性が報告されている。我々は、COPD 患者の peripheral blood mononuclear cell において、低酸素に対する Histone deacetylase7 (HDAC7) と HIF-1 の核内移行をおよび VEGF 産生が、対照群と比較して低下していることを発見した。加えて、低酸素下での CXCL8 の誘導は、COPD と対照群との間で差がないことを確認している。このことから我々は、COPD では低酸素への適応および肺微小血管系の増殖を図る経路 (hypoxia-HIF-1 経路) は抑制されているが、低酸素による炎症蛋白分解促進の経路 (hypoxia-NF- $\kappa$ B 経路) は保たれており、このバランスの崩れが、肺気腫の進行に関与しているのではないかと考えた。この仮説を証明するために、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

肺気腫の病態成立には、肺内の VEGF の低下と MMP-9 の上昇が関与しているといわれている。この VEGF の低下と MMP-9 の上昇は、我々が研究を進めてきた COPD 患者の低酸素応答の異常で説明できると考えた。本研究では、COPD 患者の低酸素応答の異常についてさらに詳細に解明していき、ひいては肺気腫の病態解明につなげていく方針である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

A549 細胞 (肺胞上皮様細胞) を 10% Fetal bovine serum、2 mM L-glutamine、10% FCS を含むダルベッコ変法イーグル培地で継代培養した。

#### (2) 低酸素暴露実験

培養細胞を培養用のプレートに接着させ必要な処置をした後に、密閉チャンバーの中に静置した。低酸素ガス(1% 酸素, 5% 二酸化炭素, 94% 窒素)を、付属の管を通して、20 L/分の速度で 5 分間、密閉チャンバーの中にフラッシュした(この条件で、チャンバー内の空気は 1% 酸素に置換されること確認済)。その後、チャンバーを 37 度のインキュベータ内に静置し、培養を継続した。

#### (3) RNA 干渉

A549 細胞に、HDAC7 の siRNA の導入を行い、48 時間培養した後に実験に供した。この時点で、HDAC7 の蛋白量はコントロール細胞と比較して 67% 減少していることが確認されている。

#### (4) ウェスタンブロット法による HDAC7 および HIF-1 蛋白の定量

細胞内蛋白分画または、核内細胞分画を抽出後、SDS/PAGE 電気泳動を行い、蛋白を PVDF 膜に転写した。この膜上の蛋白を抗ヒト HDAC7 抗体および抗ヒト HIF-1 抗体を用いて化学発光法で検出、蛋白バンドの密度を計測した。内因性コントロールとしては、 $\alpha$ -アクトニン(細胞内蛋白分画)およびラミン A/C (核内細胞分画)を用いた。

#### (5) 定量的 RT-PCR

総 RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を作成した。リアルタイム PCR を行い、目的とする遺伝子の発現量を定量した。内因性コントロールとして guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1) を用い、絶対的定量法にて定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) 低酸素暴露時の HIF-1 の核内移行に対する HDAC7 ノックダウンの影響

我々は、COPD 患者の細胞において、低酸素下で、HDAC7 と HIF-1 の核内移行が対照群と比較して低下していることを以前に発表した。これらの関連を調べるために、A549 細胞で HDAC7 のノックダウンを行い、低酸素暴露下の HIF-1 の核内移行について検討した。その結果、HDAC7 をノックダウンした細胞においては、核内の HIF-1 蛋白は有意な減少がみられた(図 1)。さらには、HIF-1 の DNA 結合活性も HDAC7 をノックダウンした細胞において有意な低下がみられた。なお、HIF-1 の mRNA の発現量は HDAC7 ノックダウ

の影響を受けなかった。

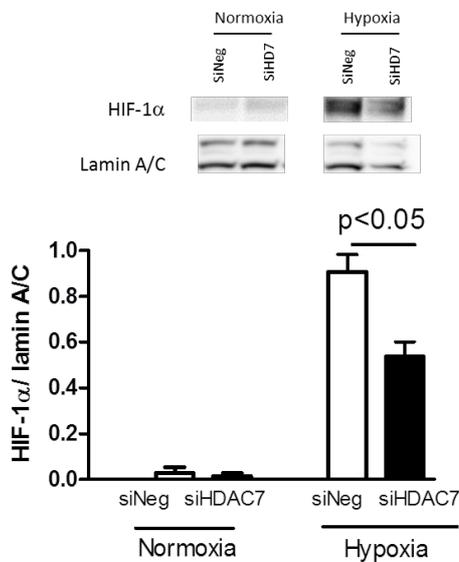


図1 低酸素暴露下でのHIF-1αの核内移行に対するHDAC7のノックダウンの影響

(2)低酸素暴露時の HDAC7 の核内移行

A549細胞を低酸素下で培養し、HDAC 7 の mRNA および蛋白量の変化を調べた。HDAC 7 の mRNA の発現量は、低酸素暴露の影響を受けなかった。これに対し、核内の HDAC7 蛋白は低酸素暴露で増加し、胞体内の HDAC7 蛋白は低酸素暴露で減少した。

(3)低酸素暴露時のサイトカイン産生に対する HDAC7 ノックダウンの影響

低酸素暴露によるサイトカイン等の誘導に対する HDAC7 ノックダウンの影響を検索する目的で、A549細胞で HDAC7 のノックダウンを行い、細胞内の mRNA を抽出し、定量的 PCR で各遺伝子の発現を定量した。低酸素暴露により、VEGF、MMP-9、CXCL8 の発現は有意に増加した。NF- k B p65 の DNA 結合活性も、低酸素暴露後に有意に増加した。HDAC7 ノックダウン細胞においては、低酸素による VEGF の発現増加が有意に抑制されていた(図2)。一

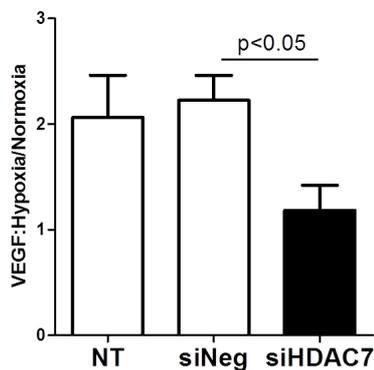


図2 低酸素暴露下でのVEGF産生に対するHDAC7のノックダウンの影響

方、低酸素による NF- k B p65 活性増加および MMP-9、CXCL8 の発現増加は HDAC7 ノック

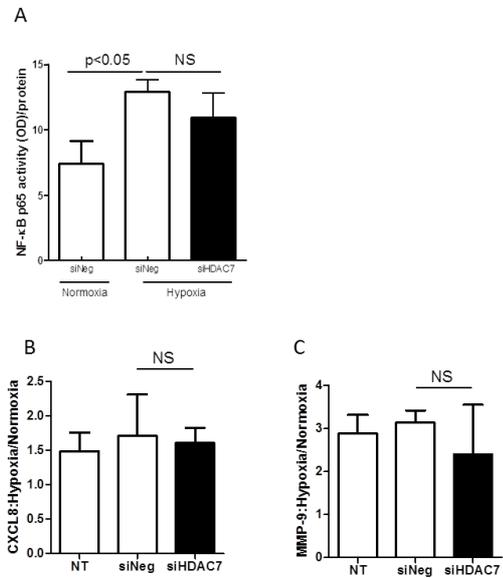


図3 低酸素暴露下でのNF-kBp65活性(A)、CXCL8 産生(B)、MMP-9産生(C)に対するHDAC7のノックダウンの影響

ダウンの影響を受けなかった(図3)。なお、低酸素暴露による CXCL8 の発現増加は、inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKK2)阻害剤で抑制された。

(4)考察とまとめ (図4)

以上の結果を総合し、以下のように考察した。正常の状態においては、低酸素暴露により、NF- k B p65 の活性化を通じた炎症性サイトカインや蛋白分解酵素の発現増加と、HIF-1 を通じた VEGF 等(低酸素に適応するための蛋白)の発現が見られる。しかし、COPD 患者のように HDAC7 が低下した状況では、低酸素暴露により、NF- k B p65 の活性化を通して炎症性サイトカインや蛋白分解酵素の発現誘導は起こるものの、HIF-1 を通じた VEGF 等の低酸素に適応するための蛋白の発現増加が抑制されてしまっていると考えられる。このバランスのくずれが、肺気腫の進行に関与している可能性がある。

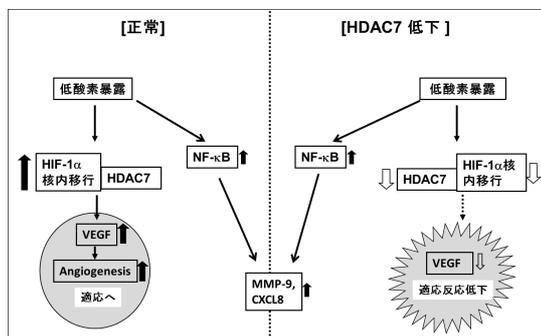


図4 HDAC7低下状態での低酸素暴露に対する生体反応

(5)今後の展望

現在上記の結果を臨床検体で確認するための COPD 患者と対象者の臨床検体の収集を行っている。

さらには、本研究の進行中に、HDAC7に加えて、ある老化関連蛋白がHIF-1の核内移行に重要な役割を果たしている可能性を発見した。この蛋白がどのようにHIF-1の核内移行に関与するのか、またHDAC7との関連はどうかなども調べ、COPD患者の低酸素応答の異常と肺気腫の進行の関連を総合的に探索していく予定である。

#### 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10件)すべて査読あり

Kono Y, Soeda S, Okada Y, Hara H, Araki K, To M, To Y. A surrogate marker of airway hyperresponsiveness in patients with bronchial asthma. *Allergology international* 2014, 63:487-8. doi:10.2332/allergolint.13-LE-0656

Nakajima A, Yazawa J, Sugiki D, Mizuguchi M, Sagara H, Fujisiro M, Shibazaki M, Hitani A, To M, Haruki K. Clinical utility of procalcitonin as a marker of sepsis: a potential predictor of causative pathogens. *Internal medicine* 2014, 53:1497-503. doi.org/10.2169/internalmedicine.53.1785

Araki K, Okada Y, Kono Y, To M, To Y. Pneumothorax Recurrence Related to High-speed Lift. *The American journal of medicine* 2014, 127:e11-2. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.02.015

水口真理、落合亜貴子、党雅子、日谷明裕、相良博典、春木宏介。医療ケア関連肺炎に関する前向き疫学調査。Dokkyo Journal of Medical Sciences 2013, 40:79-85。

党雅子、矢沢淳子、日谷明裕、相良博典、叶一乃、春木宏介。当院において肺非結核性抗酸菌症と診断された患者の臨床的・細菌学的特徴。臨床病理 2013, 61:671-8。

To M, Takagi D, Akashi K, Kano I, Haruki K, Barnes PJ, Ito K. Sputum Plasminogen Activator Inhibitor-1 Elevation by Oxidative Stress-Dependent Nuclear Factor-kappaB Activation in COPD. *Chest* 2013, 144:515-21. doi: 10.1378/chest.12-2381

Kono Y, Tsushima K, Yamaguchi K, Kurita N, Soeda S, Fujiwara A, Sugiyama S, Togashi Y, Kasagi S, To M, To Y, Setoguchi Y. The utility of galactomannan antigen in the bronchial washing and serum for diagnosing pulmonary aspergillosis. *Respir Med* 2013, 107:1094-100. doi: 10.1016/j.rmed.2013.04.007

Yomota M, Amano I, Horita N, Takezawa T,

Arai T, To M, To Y. Serum immunoglobulin G is a marker for the risk of opportunistic infection in steroid-dependent severe asthmatic patients. *Internal medicine* 2012, 51:2715-9. URL

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/51/19/51\\_51.7775/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/51/19/51_51.7775/_pdf)

To M, Yamamura S, Akashi K, Charron CE, Haruki K, Barnes PJ, Ito K. Defect of adaptation to hypoxia in patients with COPD due to reduction of histone deacetylase 7. *Chest* 2012, 141:1233-42. doi: 10.1378/chest.11-1536

Horita N, To M, Araki K, Haruki K, To Y. Risk factors of local oropharyngeal and laryngeal adverse effects from use of single inhaled corticosteroids and long-acting beta-agonists. *Allergology international* 2012, 61:583-8. doi: 10.2332/allergolint.11-0A-0396

[学会発表](計7件)

To M, Honda N, Hitani A, Kano I, Ito K, Haruki K. A potential mechanism of oxidative stress induced-increase of Nontypable Haemophilus influenzae (NTHi) invasion into airway epithelial cells. 13th Lung Science Conference "Lung infection and immunity", 2015年3月13-15日, Estoril, Portugal.

To M, Soeda S, Hara H, Araki K, Haruki K, Teshima S, Kono Y, To Y. A case of IgG4-related bronchial disease successfully treated with inhaled corticosteroids. American Thoracic Society, International Conference, 2014年5月16-21日, San Diego, USA.

To M, Hitani A, Kano I, Ito K, Haruki K. Impaired VEGF Induction in Response to Hypoxia Due to Impaired HIF-1 Nuclear Translocation in COPD. 第54回日本呼吸器学会学術講演会 (English Poster Discussion). 2014年4月25日-27日, 大阪府大阪市。

To M, Hitani A, Kano I, Ito K, Haruki K. Defect of HDAC7 causes impaired VEGF expression in response to hypoxia in COPD. European Respiratory society annual congress, 2013年9月7-11日, Barcelona, Spain.

To M, Barnes PJ, Ito K, Haruki K. Molecular mechanisms of plasminogen activator inhibitor-1 elevation in COPD sputum. European Respiratory society annual congress, 2012年9月1-5日, Vienna, Austria.

To M, Charron CE, Haruki K, Barnes PJ, Ito K. Molecular mechanism of poor

hypoxia inducible factor-1 response to hypoxia in chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society International Conference, 2012年5月18日 - 23日, San Francisco, USA. To M, Yamamura S, Akashi K, Charron C, Haruki K, Barnes PJ, Ito K. Defect of hypoxia inducible factor -1 induction by hypoxia in peripheral blood mononuclear cells obtained from COPD patients. 第52回日本呼吸器学会学術講演会 (English Mini-Symposium) 兵庫県神戸市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

党 雅子 (MASAKO TO)

獨協医科大学 医学部 准教授

研究者番号：90595597

### (3) 連携研究者

春木 宏介 (KOSUKE HARUKI)

獨協医科大学 医学部 教授

研究者番号：30286421