

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 10 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591140

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患の発症機序の解明

研究課題名(英文)Studies on pathoetiology of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

青柴 和徹 (AOSHIBA, KAZUTETSU)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：60231776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症機序についての研究を行い、以下の成果を得た。第1に、COPDでは肺のDNA障害のために細胞老化、アポトーシス、慢性炎症、そして発癌が生じていること；第2に、喫煙マウスでは心臓や脂肪組織にも酸化障害が生じていること；第3に、プロモデオキシウリジン長期曝露により肺のDNA障害を誘導したマウスでは慢性炎症が生じていること；第4に、ナフタレン長期曝露により気道上皮を障害したマウスでは気道の線維化が生じること；第5に、ブレオマイシ肺線維症マウスでは、肺のDNA障害のために慢性炎症が誘導されていること；第6に、COPDが発症する進化的理由を考察にした。

研究成果の概要(英文)：We studied the pathoetiology of COPD and obtained the following results: 1) In the lungs of COPD patients, chronic DNA damage contributes to cell senescence, apoptosis, chronic inflammation and tumorigenesis; 2) In mice exposed to cigarette smoke, oxidative damage occurs in the heart and adipose tissue as well as the lungs; 3) In mice repeatedly exposed to bromodeoxyuridine, chronic DNA damage causes persistent lung inflammation; 4) In mice repeatedly exposed to naphthalene, airway fibrosis occurs due to chronic airway epithelial injury; 5) In mice exposed to bleomycin, DNA damage in the lungs causes chronic lung inflammation; 6) Based on the above results, we proposed an evolutionary medicine approach to understand factors that contribute to the development of COPD.

研究分野：COPD

キーワード：COPD DNA障害 細胞老化 肺気腫 慢性炎症 肺癌 進化医学

1. 研究開始当初の背景

COPD は喫煙習慣を背景として高齢者に好発する慢性疾患である。現在日本では 500 万人以上、世界では 2 億人の患者数が見積もられているが、人口の高齢化や喫煙習慣の蔓延を背景に世界的に患者数が増加している。いまだ根本的な治療薬は開発されていないが、その理由のひとつは、COPD の病態機序が十分に理解されていないためである。したがって COPD の発症機序についてさらに研究を続ける必要がある。

2. 研究の目的

COPD の病因論には従来からの「炎症発症仮説」や私たちの「アポトーシスと老化仮説」などが提唱されているが、本研究では「DNA 障害」をキーワードとしてこの 2 つの仮説を統合することを目的とした。すなわち COPD のアポトーシス、細胞老化と炎症に共通した分子生物学的機序として肺胞細胞の DNA 障害を想定した研究を行った。すでに喫煙は肺胞細胞に 2 本鎖切断などの DNA 障害をもたらすことが知られているが、一方では、DNA 障害がアポトーシス、細胞老化、発癌以外に NF κ B を活性化して炎症を引き起こすことが明らかにされている。そこで本研究では肺組織における DNA 障害が、COPD や慢性肺疾患の炎症、アポトーシス、老化の原因ではないかとの仮説をたてて研究を行った。

3. 研究の方法

以下の 6 件の研究を行った。

(1) COPD の肺組織を用いた研究

倫理委員会の承認を得て、COPD 患者の肺組織における DNA 障害とアポトーシス、細胞老化、炎症との相関関係を組織レベルおよび細胞レベルで検索した。すなわち肺癌切除時に採取された COPD 肺組織(全例喫煙者)と肺癌切除術時に採取された非 COPD 肺組織(喫煙者および非喫煙者)を用いて DNA 障害マーカー [phospho(Ser139)-histone H2AX (γ H2AX)、p-ATM、p-53BP1]、細胞老化マーカー (p16)、アポトーシスマーカー (active caspase-3)、炎症マーカー [p-NF- κ B、抗 IL-6] に対する免疫染色を行った。蛍光顕微鏡観察下に細胞の DNA 障害の程度 (細胞あたりの γ H2AX foci、p-53BP1 foci の数) を定量化し、肺胞細胞における細胞老化、NF- κ B 活性化、IL-6 との関係を検討した。

(2) 喫煙曝露マウスを用いた研究

実験動物倫理委員会の承認を得て、8 週齢の雌 C57BL/6J マウスに対して 24 本/日のタバコ (Peace[®]) 煙を週 5 日、2 週間曝露して肺と肺外臓器 (心臓、肝臓、腎臓、膵臓、骨格筋、皮下脂肪、内臓脂肪) を摘出し、DNA 障害 (γ H2AX)、酸化ストレス [thymidine glycol、4-hydroxy hexenal (HNE)]、炎症 (CD45、Mac-3、F4/80) マーカーを免疫染色により検討した。また組織中の酸化蛋白 (protein

carbonyl level) および抗活性酸素 (SOD、GPx、CAT) 濃度を測定した。

(3) 慢性 DNA 障害マウスを用いた検討
8 週齢の雌 C57BL/6J マウスに対してプロモデオキシウリジン (BrdU: 100 mg/kg) を週 3 回、14 週間腹腔内注射した。その後肺を摘出して免疫染色 (CC-10、 β -tubulin IV、S100A4、CD-3、Mac-3、p-21、Ki67、IL-6、BrdU) を行った。

(4) 慢性気道障害マウスを用いた検討
8 週齢の雌 C57BL/6J マウスに対してナフタレン 200 mg/kg を週 1 回、14 週間腹腔内注射した。その後肺を摘出して免疫染色 (CC10、 β -tubulin IV、pancytokeratin、S100A4、vimentin、Mac-3、CD3、p21、Ki67、p-H3、 β -catenin、TGF β 、CTGF) を行った。

(5) プレオマイシン肺線維症マウスを用いた検討
6 週齢の雌 C57BL/6J マウスに対してプレオマイシン 2.5 mg/kg を気管内に投与し、7、14、21 日目に肺を摘出して免疫染色を行った (γ H2AX、p-53BP1、p-ATM/ATR、p21、Ki67、pancytokeratin、E-cadherin、CC10 pro-SPC、aquaporin、CD44v、 β 4 integrin、vimentin、S100A4、CD31、Mac-3、p-IKK- α/β 、p-p38 MAPK、IL-6、TNF α 、MMP-2、MMP-9)。

(6) COPD がヒトに発症する進化医学的考察

上記の実験結果や文献的考察から、ヒトが COPD に罹患する理由について進化医学の観点から考察した。

4. 研究成果

(1) COPD の肺組織を用いた研究

COPD 患者の I 型、II 型肺胞上皮細胞、血管内皮細胞では DNA 障害 (γ H2AX)、p-ATM、p-53BP1) のマーカーが増加していた。DNA 障害マーカーを発現した II 型肺胞上皮細胞では、細胞老化 (p16)、アポトーシス (active caspase-3)、炎症 (p-NF- κ B、IL-6) のマーカーを高率に発現していた。以上の結果から COPD では肺胞細胞の DNA 障害が、細胞老化、アポトーシス、炎症の原因となっていると考えられた。これらの結果から COPD では DNA 障害のために炎症性サイトカインが産生され (senescence-associated secretory phenotype: SASP)、炎症による酸化ストレスが DNA 障害をさらに悪化させる悪循環が生じているという仮説 (Danger signal plus DNA damage two-hit hypothesis for chronic inflammation in COPD) を公表した [1]。

(2) 喫煙曝露マウスを用いた研究

10日間の喫煙曝露を行ったマウスでは、肺組織の炎症（Mac-3、CD45）、酸化ストレス（thymidine glycol、HNE）、DNA障害（ γ H2AX）が増加していた。肺外組織においては、心筋と鼠径皮下組織において酸化ストレスが増加していた[2]。

（3）慢性DNA障害マウスを用いた検討
BrdUを週3日、14週間投与されたマウスでは、気道と肺胞にマクロファージの浸潤がみられ、気道上皮細胞と肺胞細胞のIL-6の発現が上昇していた。さらに気道上皮細胞と肺胞細胞の増殖能（Ki67）の低下が観察された。以上の結果から、慢性的なDNA障害が肺の慢性炎症と再生能力の低下の原因となることが示された[3]。

（4）慢性気道障害マウスを用いた検討
ナフタレンを14週間腹腔内注射してクララ細胞を慢性的に障害したマウスでは、気道壁の線維芽細胞の増殖、TGF β とCTGFの発現および気道線維化が認められた。この結果から慢性的な気道上皮の障害が気道の線維化の原因になることが明らかになった[4]。

（5）プレオマイシン肺線維症マウスを用いた検討
プレオマイシンを気管内に投与したマウスでは肺胞上皮細胞のDNA障害（ γ H2AX、p-ATM/ATR、p21）が生じていた。DNA障害マーカー（ γ H2AX）を発現した肺胞上皮細胞の一部はIL-6、TNF α 、MMP-2、MMP-9を発現し、IKK- α/β とp-p38 MAPKが活性化していた。以上の結果から、プレオマイシン肺線維症マウスではDNA障害によるsenescence-associated secretory phenotype（SASP）が生じていることが知られた[5]。

（6）COPDがヒトに発症する進化医学的考察
ヒトがCOPDに罹患する理由について、1）ヒトの肺の進化的制約、2）喫煙習慣と進化のミスマッチ、3）微生物と免疫システムとの共進化、4）繁殖と長寿のトレードオフ、5）炎症のコスト、6）生殖に関わるコストの観点から考察した[6]。

<引用文献>

Aoshiha K, Tsuji T, Yamaguchi K, Itoh M, Nakamura H. The danger signal plus DNA damage 2-hit hypothesis for chronic inflammation in COPD. *Eur Respir J* 42:1689-1695, 2013.

Itoh M, Tsuji T, Nakamura H, Yamaguchi K, Fuchikami J, Takahashi M, Morozumi Y, Aoshiha K. Systemic effects of acute cigarette smoke exposure in mice. *Inhal Toxicol* 26:464-473, 2014.

Tsuji T, Itoh M, Kikuchi R, Uruma T, Watanabe H, Yamaguchi K, Nakamura H, Aoshiha K. Repeated exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine causes decreased proliferation and low-grade inflammation in the lungs of mice. *Exp Toxicol Pathol* (印刷中)

Aoshiha K, Tsuji T, Itoh M, Semba S, Yamaguchi K, Nakamura H, Watanabe H. A murine model of airway fibrosis induced by repeated naphthalene exposure. *Exp Toxicol Pathol* 66:169-177, 2014.

Aoshiha K, Tsuji T, Kameyama S, Itoh M, Yamaguchi K, Nakamura H. Senescence-associated secretory phenotype in a mouse model of bleomycin-induced lung injury. *Exp Toxicol Pathol* 65:1053-1062, 2013.

Aoshiha K, Tsuji T, Itoh M, Yamaguchi K, Nakamura H. An evolutionary medicine approach to understanding factors that contribute chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 89:243-252, 2015.

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 12 件)

Yoneyama R, Aoshiha K, Furukawa K, Saito M, Kataba H, Nakamura H, Ikeda N. Nicotine enhances hepatocyte growth factor-mediated lung cancer cell migration by activating the $\alpha 7$ nicotine acetylcholine receptor and phosphoinositide kinase-3-dependent pathway. *Oncol Lett* (査読有) (印刷中)

Tsuji T, Itoh M, Kikuchi R, Uruma T, Watanabe H, Yamaguchi K, Nakamura H, Aoshiha K. Repeated exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine causes decreased proliferation and low-grade inflammation in the lungs of mice. *Exp Toxicol Pathol* (査読有) (印刷中)
DOI: 10.1016/j.etp.2015.04.003.

Aoshiha K, Tsuji T, Itoh M, Yamaguchi K, Nakamura H. An evolutionary medicine approach to understanding factors that contribute

chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* (査読有) 89:243-252, 2015.
DOI: 10.1159/000369861.

青柴和徹 COPD の病因、病態の解明 診断と治療 (査読無) 103:443-446, 2015.

Itoh M, Tsuji T, Nakamura H, Yamaguchi K, Fuchikami J, Takahashi M, Morozumi Y, Aoshiba K. Systemic effects of acute cigarette smoke exposure in mice. *Inhal Toxicol* (査読有) 26:464-473, 2014.
DOI: 10.3109/08958378.2014.917346.

Aoshiba K, Tsuji T, Itoh M, Semba S, Yamaguchi K, Nakamura H, Watanabe H. A murine model of airway fibrosis induced by repeated naphthalene exposure. *Exp Toxicol Pathol* (査読有) 66:169-177, 2014.
DOI: 10.1016/j.etp.2014.01.001.

Tsuji T, Yamaguchi K, Kikuchi R, Itoh M, Nakamura H, Nagai A, Aoshiba K. Promotion of adipogenesis by a systemically administered EP2 receptor agonist via stimulation of angiogenesis in a murine model of pulmonary emphysema. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (査読有) 112C:9-15, 2014.
DOI:10.1016/j.prostaglandins.2014.05.003.

青柴和徹 COPD と喘息のオーバーラップ症候群 *東医大誌* (査読有) 72:208-212, 2014.

青柴和徹、辻隆夫 COPD を改めて問う 疾患形成における肺の成長と老化の関わり *The Lung perspectives* (査読無) 22:24-27, 2014.

青柴和徹 Editorial : COPD の過去、現在、未来 *日本呼吸器学会誌* (査読無) 3:312-315, 2014.

辻隆夫、青柴和徹 COPD 慢性炎症における細胞老化 呼と循 (査読無) 62:135-140, 2014.

青柴和徹 肺の老化と慢性閉塞性肺疾患の発症機序 *Credentials* (査読無) 57:9-11, 2013.

青柴和徹 慢性気管支炎の臨床的意義 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会教育講演 2015.4.18.東京

伊藤昌之、辻隆夫、菊池亮太、宇留間友宣、渡邊秀裕、中村博幸、青柴和徹 プロモデオキシウリジンの慢性的 DNA 障害による気道おとび肺の炎症 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 2015.4.18.東京

Tsuji T, Itoh M, Senba S, Adachi H, Nakamura H, Aoshiba K. A murine model of airway remodeling induced by repeated naphthalene exposure. *American Thoracic Society International Conference 2014* 2014.5.18. San Diego (USA)

伊藤昌之、辻隆夫、足立秀喜、仙波征太郎、高橋真樹、淵上淳一、中村博幸、青柴和徹 マウスの喫煙曝露による全身性影響についての検討 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014.4.27 大阪

辻隆夫、伊藤昌之、仙波征太郎、足立秀喜、岸厚次、中村博幸、青柴和徹 ナフタレンの反復腹腔内投与による気道線維化マウスモデル 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014. 4.27. 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 : なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青柴 和徹 (AOSHIBA, Kazutetsu)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 60231776

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

〔学会発表〕(計 5 件)