

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790795

研究課題名(和文) COPD肺における組織リモデリング病態の解明

研究課題名(英文) Investigation on the nature of tissue remodeling in COPD lungs

研究代表者

鈴木 雅 (Suzuki, Masaru)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10374290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)の肺では、肺気腫の程度には肺泡領域のB細胞とCD4陽性T細胞の増加が関連し、また細気管支壁の肥厚には炎症細胞浸潤よりも総コラーゲンの減少、I型コラーゲンの増加が有意に関連した。また、多光子励起顕微鏡を用いた第二次高調波発生(SHG)の前方・後方直進成分を定量することでコラーゲン亜型の定量的検出が可能となることを明らかにし、網羅的遺伝子解析により肥厚した細気管支壁ではTGF-β signaling pathwayに関わる遺伝子発現が低下していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the lungs of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), emphysema severity was associated with an increase in alveolar B cell and CD4 T cell infiltration whereas thickening of bronchiolar walls was associated with a decrease in total collagen and an increase in type I collagen rather than inflammatory cell infiltration. Furthermore, it was found that collagen subtypes could be quantitatively detected by quantification of forward and backward second harmonic generation (SHG) signals with multiphoton excitation microscopy, and microarray analysis showed that genes associated with TGF-beta signaling pathway were down-regulated in the thickened bronchiolar walls.

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：呼吸器内科 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) は本邦における死因の第9位 (2010年) であり、今後も人口の高齢化とともに患者数・死亡者数の増加が見込まれ、本邦における公衆衛生上の大きな問題である。しかしながらその発症・病態進行のメカニズムには不明な点が多く、根本的な治療法も存在しない。その理由の一つとして、COPD 肺の詳細な形態学的理解が不十分であることが挙げられる。

COPD は喫煙や有毒な粒子・ガスの吸入が明らかな発症の危険因子であり、それらにより惹起される持続的な炎症反応が組織障害を繰り返す、肺組織のリモデリングに至って気流閉塞をもたらすと考えられている。肺組織のリモデリングを考える上で、細胞外マトリックス蛋白の変化を捉えることは重要である。特に、コラーゲンとエラスチンは肺組織の構造ならびに弾性収縮力の維持に不可欠な蛋白であり、これらの蛋白の量的・質的变化は肺機能に強く影響すると考えられる。それゆえ、炎症反応と細胞外マトリックス蛋白の変化の関係を検討することで、COPD 肺における組織リモデリングの病態を詳細に明らかにすることができ、かつマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を組み合わせることで、その背景にあるメカニズムに迫ることが可能であると考えた。加えて重要な点は、これらの COPD 肺における組織リモデリングの病態を末梢気道と肺胞組織に分けて検討することが必要であるということである。

## 2. 研究の目的

(1) COPD 肺の細気管支と肺胞領域におけるコラーゲン・エラスチンの発現と炎症細胞浸潤を定量的組織学的手法および多光子励起顕微鏡を用いて定量・解析する。

(2) 細気管支と肺胞領域を laser capture microdissection (LCM) 法を用いて選択的に採取し、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、組織リモデリングの定量的計測結果と比較検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト肺サンプル

空気で膨張・凍結された肺移植目的に摘出された最重症 COPD 患者の摘出肺検体を用いた (共同研究先のカナダ・ブリティッシュコロンビア大学より提供)。コントロール肺として、移植対象者が得られなかった臓器提供者の摘出肺を用いた。肺検体は CT 断で 2cm 厚にスライスされた後に、直径 14~16mm 大の円柱状組織を 1 領域あたり 4 個採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

(2) コラーゲン・エラスチンの発現と炎症細胞浸潤の定量的組織学的分析

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 50% に希釈した Tissue-Tek O. C. T. (Sakura Finetek) で凍結肺を一旦解凍後に吸引包埋し、凍結組織ブロックを作成、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。凍結組織ブロックより厚さ  $6\mu\text{m}$  の連続凍結切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色および以下の免疫染色・化学染色を施行した。

炎症細胞：好中球 (NP57 免疫染色)、マクロファージ (CD68 免疫染色)、好酸球 (Hansel 染色)、CD4 陽性 T 細胞 (CD4 免疫染色)、CD8 陽性 T 細胞 (CD8 免疫染色)、B 細胞 (CD79 免疫染色)、NK 細胞 (NK-1 免疫染色)

細胞外マトリックス：総コラーゲン (picosirius red 染色)、I 型コラーゲン (免疫染色)、III 型コラーゲン (免疫染色)、エラスチン (免疫染色)

染色された標本はデジタルカメラを装備した顕微鏡で細気管支と肺胞領域を撮影し、画像解析ソフトウェアである Image-Pro Plus (Media Cybernetics) 上で、point-counting 法ならびに color segmentation 法を用いて、各領域における各染色の陽性率 (volume fraction) を求めた。また、H&E 染色標本を用いて細気管支壁厚を測定した。

(3) 多光子励起顕微鏡を用いたコラーゲンとエラスチンのリモデリングの検討

上記の凍結組織ブロックより厚さ  $20\mu\text{m}$  の凍結無染色標本を作成した。Ti:Sapphire Tsunami (Spectra-Physics) により発生されたフェムト秒レーザーを共焦点レーザー顕微鏡 Leica TCS SP2 AOBs (Leica) に入射させ、マウントした凍結無染色標本より発生されるコラーゲン由来の第二次高調波発生 (second harmonic generation, SHG) の前方直進成分 (forward SHG) と後方直進成分 (backward SHG) の両者を同時に検出し、Volocity (Improvision) を用いて解析した。

(4) 細気管支と肺胞領域における組織特異的網羅的遺伝子発現解析

上記の凍結組織ブロックより厚さ  $10\mu\text{m}$  の連続凍結切片を作成し、PixCell II system (Arcturus Engineering) を用い、laser capture microdissection (LCM) 法にて細気管支組織を選択的に採取した。また、LCM 後の組織も別に採取した。採取された各組織から、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出・精製した。RNA の品質を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で評価した上で、GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) にてマイクロアレイ解析を行った。得られたマイクロアレイデータは Gene

Set Enrichment Analysis (GSEA)を用いて遺伝子発現パターンのパスウェイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) コラーゲン・エラスチンの発現と炎症細胞浸潤の定量的組織学的分析

肺泡領域ならびに細気管支壁の両者で解析したところ、多変量分析では肺気腫の重症度（肺泡表面積の減少）には肺泡領域のB細胞とCD4陽性T細胞の増加が有意に関連し（表1）、また細気管支壁の肥厚には炎症細胞の浸潤よりもむしろ細気管支壁内の総コラーゲンの減少、I型コラーゲンの増加が有意に関連していた（表2）。

表1. 肺気腫の重症度（肺泡表面積の減少）と関連する因子

肺泡領域における体積率	単変量解析の補正p値	多変量解析のp値
B細胞	0.005	0.01
CD4陽性T細胞	0.004	0.048
マクロファージ	0.02	0.40
I型コラーゲン	0.07	0.48

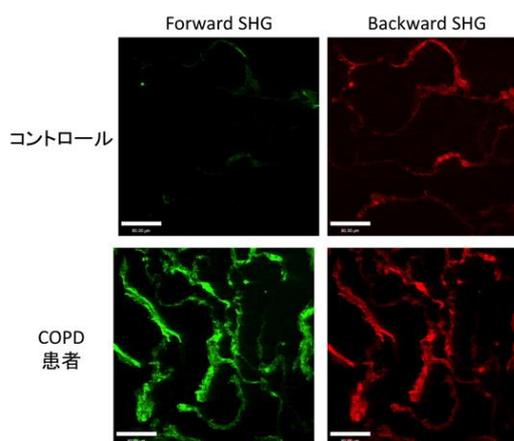
表2. 細気管支壁の肥厚と関連する因子

細気管支壁における体積率	単変量解析の補正p値	多変量解析のp値
総コラーゲン	0.02	0.01
I型コラーゲン	0.08	0.048
マクロファージ	0.02	0.15
III型コラーゲン	0.02	0.50
CD4陽性T細胞	0.05	0.88

##### (2) 多光子励起顕微鏡を用いたコラーゲンとエラスチンのリモデリングの検討

肺組織において、I型コラーゲンは主にSHGの前方直進成分のみで反映され、III型コラーゲンはSHGの前方直進成分ならびに後方直進成分の両者にて検出されることを明らかにした。このことは、SHGシグナルを定量することで両者のコラーゲン亜型の定量的検出が可能になることを意味する。そして、COPD肺ではコントロール肺と比較して前方直進成分が増強しており、コラーゲンのリモデリングの存在を示すものと考えられた（図1）。

図1. COPD肺とコントロール肺のSHGの前方直進成分(Forward SHG)ならびに後方直進成分(Backward SHG)



##### (3) 細気管支と肺泡領域における組織特異的網羅的遺伝子発現解析

細気管支とその他の肺泡組織をLCM法を用いて選択的に採取し、各組織における網羅的遺伝子発現解析を施行した結果、肥厚した細気管支壁ではTGF- $\beta$  signaling pathwayに関わる遺伝子発現の低下を認めた。一方でその他の肺泡組織ではアポトーシス関連遺伝子群の発現亢進が認められた。

#### 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2件）

- ① 鈴木雅、COPDにおける末梢気道閉塞と肺気腫の関係、International Review of Asthma & COPD、15巻、32-36、2013、査読無
- ② Hogg. J.C, McDonough. J.E, Suzuki. M、Small airway obstruction in COPD: New insights based on micro-CT imaging and MRI imaging、Chest、143巻、1436-1443、2013、査読有

〔学会発表〕（計4件）

- ① Suzuki. M、Makita. H、Konno. S、Nagai. K、Nishimura. M、Relationship between plasma amino acid levels and lung function decline in patients with COPD、The 23rd European Respiratory Society Annual Congress、2013.9.10、Fira Barcelona (Barcelona, Spain)
- ② Suzuki. M、Makita. H、Östling. J、Konno. S、Nagai. K、Shimizu. K、Maciewicz. R.A、Nishimura. M、Elevated plasma adiponectin associated with lung function decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease、The 108th American Thoracic Society International Conference、2013.5.20、Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)
- ③ Suzuki. M、Abraham. T、McDonough. J.E、

Elliott.WM、Hogg.JC、The examination of collagen remodeling in COPD using second harmonic generation microscopy、The 107th American Thoracic Society International Conference、2012.5.22、Moscone Center (San Francisco, USA)

- ④ Suzuki.M、McDonough.JE、Abraham.T、Walker.DC、Elliott.WM、Gosselink.JV、Campbell.JD、Sin.DD、Hayashi.S、Cooper.JD、Hogg.JC、Peripheral lung tissue remodeling in centrilobular emphysema、第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012.4.22、神戸コンベンションセンター (神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 雅 (SUZUKI MASARU)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：10374290

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし