

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790820

研究課題名(和文) タバコ煙の肺胞上皮障害に対するスタチンの効果と作用機序

研究課題名(英文) The effect on the alveolar epithelial cell proliferation suppressed by cigarette smoking of simvastatin

研究代表者

中鉢 正太郎 (Chubachi, Shotaro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90464867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)は多面的作用を有する薬剤であり、COPD の病態を改善する可能性が指摘されてきた。我々はエラスターゼ誘導マウス肺気腫モデルにおいてスタチンが肺胞上皮細胞の再生亢進を促し、気腫化を抑制すること、短期喫煙マウスでの肺胞上皮細胞の増殖促進効果を報告している。本研究では肺胞上皮細胞に対するCSEの増殖抑制、スタチンの回復効果を確認した。またVEGFシグナリングの関与をin vitro、in vivoで検討した。

研究成果の概要(英文)：Statins exert pleiotropic effects, such as anti-inflammatory activity and improvement of endothelial cell function. We have previously reported that simvastatin inhibited the development of elastase-induced pulmonary emphysema in mice and also promoted the proliferation of alveolar epithelial cells in the lungs following cigarette-smoke exposure for 5 days, although the underlying mechanisms remain to be clarified. In this research, we examined the proliferative effects of simvastatin. CSE exposure significantly decreased the rate of cell proliferation. Pretreatment of A549 cells with simvastatin restored the proliferation at various concentrations in the presence of CSE. Interestingly, the effect of simvastatin to restore the cell proliferation was abolished by VEGF receptor blockade with SU5614, implying the endogenous VEGF signaling is involved in the mechanism. We also examined in vivo.

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 喫煙 スタチン

1. 研究開始当初の背景

HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)は臨床的に用いられる血中コレステロール低下作用に加え、抗炎症、アポトーシス促進、アポトーシス細胞貪食促進、抗酸化ストレス、プロテアーゼ産生抑制、抗線維化など多岐にわたる多面的作用を有する薬剤であり、COPDの病態を改善する可能性が指摘されてきた。実際、臨床研究において慢性肺気腫患者へのスタチン長期投与は COPD 関連死亡率・急性増悪回数を減少することが報告されている¹。一方、動物実験においてもスタチン投与はラット喫煙モデルにおいて気腫化抑制作用が報告され²、我々はエラストラーゼ誘導マウス肺気腫モデルにおいてスタチンが肺胞上皮細胞の再生亢進を促し、気腫化を抑制することを報告している³。エラストラーゼ誘導マウス肺気腫モデルにおける成果をもとに、次の段階として短期タバコ煙曝露モデルを用いたスタチンの肺胞上皮増殖作用について検討を行ってきた。マウスへの短期タバコ煙曝露は気道上皮細胞の老化を促進し⁴、細胞外基質の分解を誘導する⁵など長期喫煙モデルで見られる病理学的変化が短期間に観察できるモデルである。このモデルでは COPD 患者に見られるプロテアーゼ過剰、オキシダント過剰、肺胞上皮細胞アポトーシスなども観察されることから、本モデルを利用することでスタチン効果が短期間に効率よく検証できる。Preliminary dataとして我々は1日2回、2本ずつの短期喫煙をマウスに行い、スタチンの効果の検討を行った。タバコ煙曝露(+)/(-)、シンバスタチン(SS)投与(+)/(-)で分けた4群間で比較検討を行った結果、短期タバコ煙曝露マウス(SM/Veh)の肺組織では、非曝露マウス(NS/Veh)と比べて、細胞増殖を示す proliferating cell nuclear antigen (PCNA)陽性細胞の数が増加すること、タバコ煙曝露マウス SS を投与することにより陽性細胞数がさらに増加することが示された。⁶ さらに同モデルにおいて惹起される炎症、細胞増殖をスタチンがどのように修飾しているかを検討するため、IL-4、-5、-6、-10、vascular endothelial growth factor(VEGF)などの液性因子の濃度を気管支洗浄液を用いて測定した。タバコ煙曝露(SM)群において気管支洗浄液中の VEGF 濃度は SS 投与により増加していた。⁷

参考文献

- 1) Janda S, Park K, FitzGerald JM, Etminan M, Swiston J. Statins in COPD: a systematic review. *Chest*. 2009;136(3):734-43.
- 2) Lee JH, Lee DS, Kim EK, Choe KH, Oh YM, Shim TS, Kim SE, Lee YS, Lee SD. Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(8):987-93.
- 3) Takahashi S, Nakamura H, Seki M,

Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, Nakajima T, Tsujimura S, Shirahata T, Nakamura M, Minematsu N, Yamasaki M, Tateno H, Ishizaka A. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(5):882-90.

4) Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(6):643-9.

5) Churg A, Zay K, Shay S, Xie C, Shapiro SD, Hendricks R, Wright JL. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(3):368-74.

6) S. Chubachi et al, Effect of simvastatin on alveolar epithelial cell proliferation in short-term cigarette smoke-exposed mice. The 106th Annual International Conference of American Thoracic Society. 2010年5月14日~19日、ニューオーリンズ.

7) 中鉢正太郎ら、スタチンは短期喫煙マウスにおいて2型肺胞上皮の再生を促進する。2011年呼吸器学会総会一般演題、東京2011年4月22日~23日

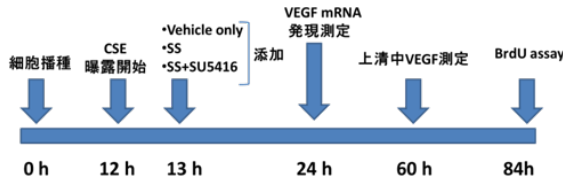
2. 研究の目的

本研究では、タバコ煙曝露マウスおよび培養肺胞上皮細胞を用い、スタチンの作用機序について検討する。スタチンがタバコ煙による肺胞上皮細胞の傷害と修復の過程に作用し、気腫化の進行を抑制するメカニズムを in vivo ならびに in vitro の実験により明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) in vitro での検討。肺胞上皮細胞に対してのタバコ抽出液(CSE)、シンバスタチン(SS)の投与の影響の検討を行った。肺胞上皮細胞(A549、MLE12)を用いてBrdU assayを施行し細胞増殖に及ぼすCSE、SSの影響を検討した。SS投与はCSE投与の1時間後に行い、48時間後に細胞増殖をMTT assay, BrdU assayを施行することで細胞増殖を評価した。VEGFの遺伝子発現はreal-time PCR法で24時間後に、培養上清中蛋白濃度はELISA法でCSE投与の48時間後に測定した。またCSE、SSに加えVEGFR阻害薬SU5416をSSと同時に投与し、SSの作用がVEGFの機能亢進を介するか否かについて検討した。また同プロトコルでVEGFの作用亢進に及ぼすSSの効果の機序の解明のため、細胞内シグナルをwestern blottingで検討を行った。SS、SU5416を投与後、1時間後に細胞から蛋白を回収しAktのリン酸化、total Akt、アクチンの検討を行った。

実験プロトコール



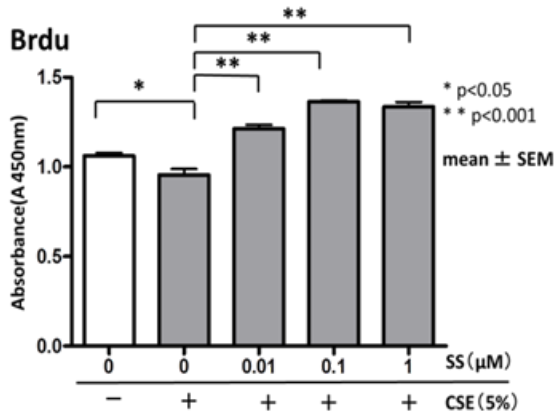
(2) in vivo での検討。C57BL/6 マウス (8 週齢、雌) にケンタッキー大学研究用タバコ (3R4F) をフィルターカットしたものを、1 日 2 回、2 本ずつワシントン大学製のマウス喫煙装置を用い、day1~5 まで曝露した。この喫煙方法は 6 ヶ月間継続投与すれば明らかな気腫性変化が得られる強度である⁸。喫煙群 (SM 群) および非喫煙コントロール (NS 群) に day-1~5 まで simvastatin 20 μg (SS) に加え SU5416 (Sigma) もしくは vehicle (veh) を SS 投与の 1 時間前に 20mg/kg を腹腔内投与した。Day6 に最終喫煙を行い 2 時間後に摘出したマウス肺をホルマリン固定し、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色を行った。また SS 投与による細胞増殖だけでなく、TUNEL 染色、active caspase 染色を行いアポトーシスに対する SS の効果の検討も併せて行った。

参考文献

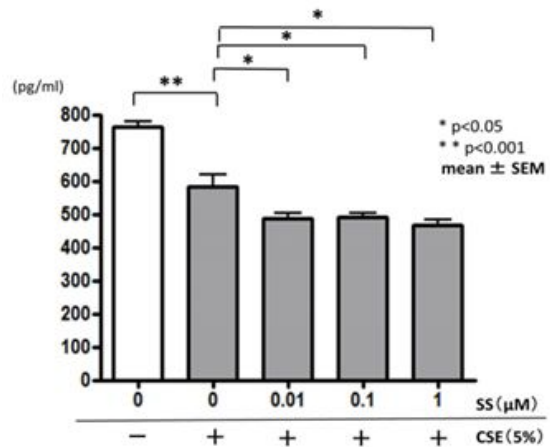
8) Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD. CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Immunol.* 2007;178(12):8090-6.

4. 研究成果

(1) in vitro での検討。CSE 投与は A549、MLE12 細胞共に濃度依存性に細胞増殖 (BrdU assay) が低下することが確認された。また SS の単独投与では両細胞の細胞増殖に有意差を認めなかった。次に CSE, SS 両者の投与での検討では 5% CSE により A549 細胞の増殖は著明に低下したが、SS 投与 (0.01, 0.1, 1 μM) で改善した。(下図)

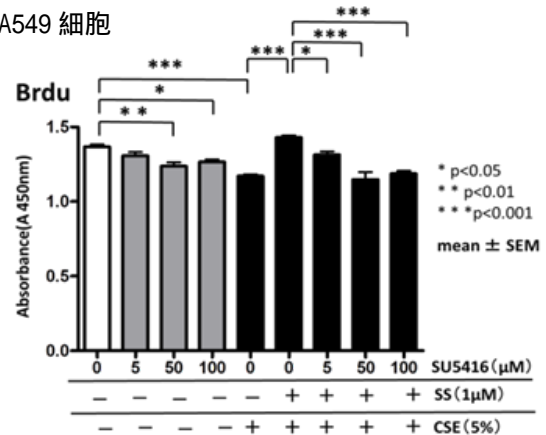


A549 細胞にて VEGF 蛋白濃度は CSE の単独投与で減少したが、SS 投与では遺伝子、蛋白レベル共に回復を認めなかった。(下図)

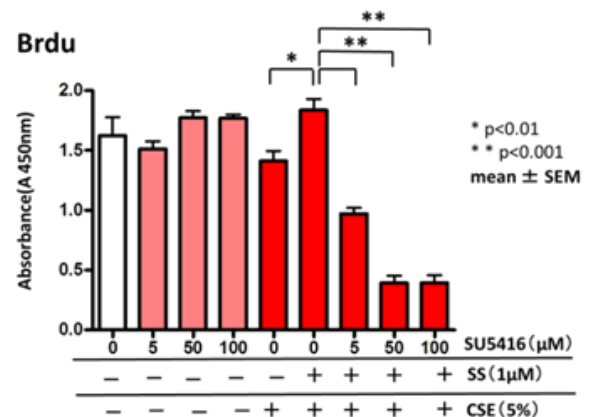


両細胞共 SU5416 の投与により、A549 細胞では 5%、MLE12 細胞では 2.5% CSE 投与後の SS による細胞増殖の改善効果は消失した。(下図)

A549 細胞

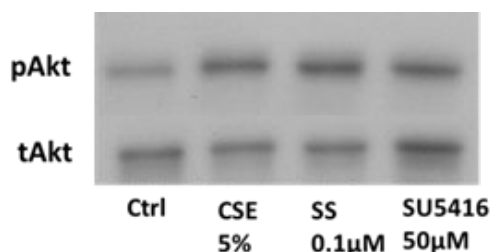


MLE12 細胞

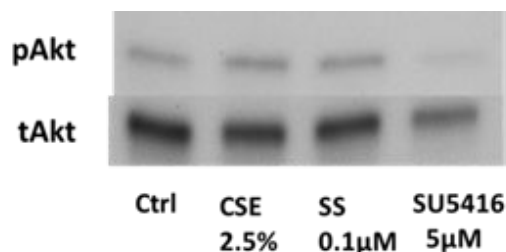


スタチンは CSE により抑制された A549 細胞の増殖能を回復した。その機序として VEGF の作用の機能改善が示唆された。Western blot では仮説としては SS で Akt のリン酸化が上昇し、SU5416 の投与で拮抗されることが予想されたが両細胞でその傾向は認めなかった。(下図)

A549 細胞

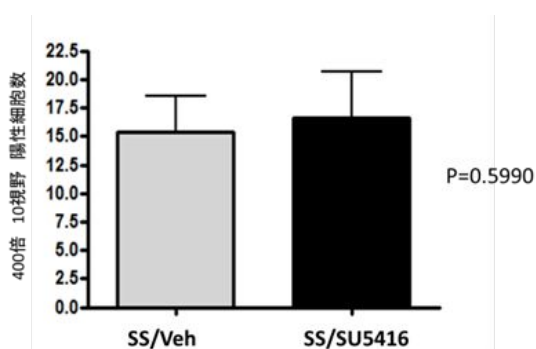


MLE12 細胞



(2)【結果】

SS 投与に加えて SU5416 投与により細胞増殖の抑制は仮説と異なり認めなかった。(下図)



またアポトーシスの評価の TUNEL 染色、active caspase 染色に関しては喫煙に加え SS 投与の有無で有意差を認めなかった。以上からシンバスタチンは短期喫煙マウスモデルにて喫煙で傷害された肺胞上皮細胞の増殖を促進し、その機序としてシンバスタチンの VEGF の作用の亢進が考えられた。長期喫煙モデルでの肺気腫の確認は当施設で平成 25 年にすでにできているため今後さらに長期のモデルでの検討が必要である。

る。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1)S.Chubachi et al.Simvastatin restores cigarette smoke-induced impairment of proliferation in alveolar epithelial cells. The 108th Annual International Conference of American Thoracic Society, サンフランシスコ、2012 年、5 月 20 日発表
 (2)中鉢正太郎ら、タバコ煙曝露により抑制された肺胞上皮細胞増殖に対するスタチンの効果。第 54 回日本呼吸器学会学術講演会、神戸、2012 年 4 月 20 日発表

〔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〕なし

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中鉢 正太郎 (Shotaro Chubachi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 90464867