

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461156

研究課題名(和文)肺気腫進展様式から類推する肺胞破壊の原因

研究課題名(英文)Possible mechanism of parenchymal destruction on the analogy of image analysis

研究代表者

室 繁郎 (Shigeo, Muro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60344454

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)：COPD臨床検討では、82名を前向き観察研究に登録し、観察期間終了である2016年6月末日以降に最終解析予定である。血清中の抵抗力を司る物質が多いと、COPDの増悪が少なくなる傾向を見出し、観察期間終了後に解析予定である。タンパク分解酵素を気道内に投与することにより、肺気腫のモデルマウスを作成し、弾性線維合成関連蛋白によって、肺気腫の発症・進行が抑制できるか検討した。現時点では、劇的な肺気腫形成の抑制は確立出来なかったが、肺の一部に傷害が修復しているように見られる箇所があり、修復・再生過程をさらに詳しく解析し、治療方法確立を目指す予定である。

研究成果の概要(英文)：In our COPD prospective observational clinical study, we recruited 82 COPD subjects. Preliminary analysis showed that humoral immunity influence the frequency of COPD exacerbations. The observation period will complete at the end of June 2016, and we will finalize the data and analyze the final data. At the same time, we established the model mouse of the pulmonary emphysema by giving a small amount of proteolytic enzyme in the respiratory tract. We tried to prevent emphysema development by adding elastic fiber synthetic related protein in the lung, however, we could not find strong evidence that our method could prevent emphysema in the whole lung. However, the pathology showed that some destroyed lung field were repaired by new lung cells. We will continue to study this repair process and try to establish new regenerative method in COPD treatment.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：呼吸器内科 肺気腫 細胞外マトリクス 炎症 画像解析

1. 研究開始当初の背景

肺気腫は COPD における重要な病理学的変化である。現時点では COPD の病態の進展を遅らせる確実な手段は禁煙以外に十分に立証されておらず、また、禁煙後も病態が進行することについてはその機序も進展抑制に関して未解明な部分が多い。研究者らは、ヒト肺気腫の進展は必ずしも一様ではなく、空間的分布・喫煙継続の有無・増悪経験の有無によって、形態的に様々な特徴を有することを示し (PLoS One. 2012;7(9):e44993、Respir Res. 2012 Apr 18;13(1):31、Am J Respir Crit Care Med. 2011 Jun 15;183(12):1653-9)、気腫の形態変化が病理学的な変化の機序推定に有用であることを示してきた (Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 13;104(7):2361-5)。そこで、これらのヒト COPD 観察研究の結果からえられた、気腫の進展パターンの差異は、気腫発症機序の差異(炎症、酸化ストレス、タンパク分解酵素、アポトーシス、メカニカルストレスなど)による病理学的変化をある程度反映しているのではないかと考えるようになった。

また、肺気腫という非可逆的な病理学的変化に対して、再生医療が精力的に検討されているが、ガス交換領域である肺実質は肺胞細胞と血管内皮細胞などが 3 次元的に複雑な構造をしており、構造と機能の維持のためには、弾性線維・膠原線維などの細胞外基質の適正な構成が必須である。細胞外マトリックスの断片は COPD における炎症の産物として生成されるが、“マトリカイン”として炎症細胞遊走に関与しており、慢性炎症を持続させる原因物質としても作用する (Curr Opin Pharmacol. 2008 Jun;8(3):242-8。)ことが知られており、マトリックス分解産物の制御が炎症抑制に重要であることが示唆される。さらに、喫煙刺激によって修飾されたエラスチンが Th1 リンパ球感作を始めとする自己免疫学的機序によって、肺気腫の成因となることが示されている (Nat Med. 2007 May;13(5):567-9)。共同研究者の既報においても、A: 喫煙刺激により、繰り返し炎症反応が引き起こされ、気道のリモデリングや肺胞構造の破壊が積み重ねられていく機序と、B: 喫煙が免疫反応の trigger となり、惹起されたリンパ球性免疫反応で気道のリモデリングや肺胞構造の破壊が進む機序の 2 つが示唆されている (Am J Respir Crit Care Med 2004;170(9):974-80)。これらのことから、マトリックスの制御は抗炎症・肺の再生に極めて重要と考えられる。

連携研究者らは、新規のインテグリンリガンドとして DANCE(FIBLIN-5)という分泌タンパク質が弾性線維形成に必須なタンパク質であり、DANCE 欠損マウスは全身の弾性線維形成不全を起こし、肺の気腫化を来し、またヒトの線維芽細胞が DANCE タンパク刺激により、弾性線維産生を強力に誘導する

ことを報告している (Nature. 2002 Jan 10;415(6868):171-5)。

以上のことから、DANCE(FIBLIN-5)の発現状況がヒトおよびマウス肺気腫進展に関与し、その機序として、弾性線維の修復調節や、マトリカインの産生調整などを通じて炎症増幅・抑制に関与しているという仮説を検証することとした。また、マウスを用いてさまざまな機序による肺気腫モデルを作成し、その病理形態変化との相同性を比較検討すること、さらに弾性線維とその分解産物、および弾性線維重合たんぱくはヒト肺気腫に及ぼす機序を解明することは、病態解明と治療開発に大きく寄与すると期待される。

2. 研究の目的

1 ヒト CT 画像所見における肺気腫の形態評価により、肺気腫進行パターンを分類する。
2 自験マウスモデルで慢性喫煙・増悪モデル・弾性線維破断モデルを作成し、ヒト肺気腫の形態的特徴との相同性とモデル毎の差異を検証する。

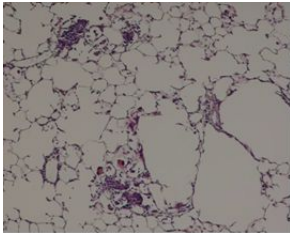
3 また、先行研究および予備検討から、「弾性線維形成に必須であるインテグリンリガンド: DANCE(FIBLIN-5)が弾性線維の統合性を維持・強化し、弾性線維断片形成を抑制することで、抗炎症作用ないしは自己抗原発現を抑制し、肺胞の再生に寄与するという仮説」の検証を試み、ヒト CT 画像上の気腫進行パターンのいずれに相似するか検証する。

3. 研究の方法

外来通院中の COPD 患者を対象に、安定期に呼吸機能検査・画像診断・各種生理学的検査・誘発喀痰および末梢血中の炎症マーカー、Toll-like receptor ligands や酸化ストレス刺激による末梢血リンパ球活性化を測定し、臨床経過との関係を前向きに観察する。観察期間は、呼吸機能の低下の評価が可能となる 3 年間とするが、2006 年以降の収集済みデータも参照する。エントリー時に臨床像との横断的検討と前向き観察により自然経過との関連を検討する。

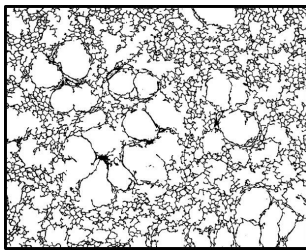
4. 研究成果

予備検討において i) DANCE 遺伝子を 50% 欠損したマウス (DANCE ヘテロマウス Ht) では正常状態では肺組織において弾性線維量は正常であり、気腫は認められないが、煙草長期暴露・エラストラーゼ投与により、野生型マウスと比較して肺胞径の拡大、肺胞壁の破壊が顕著であり、それは外来性の DANCE 蛋白投与にて改善した。そこで、外来性 DANCE/Fibulin5 蛋白補充が肺気腫形成に抑制的に働くことを検証するために、8-9 週齢の雄マウスに Elastase (porcine pancreas elastase, WAKO) 7.5 µg/body 径気道的に投与して肺気腫を作成し、同時に mDANCE 蛋白 10 µg/body, を day 0,3,5 に、2 µg/body, を day 7,10,12,14,17,19 経気道的に投与する治療実験を行った。



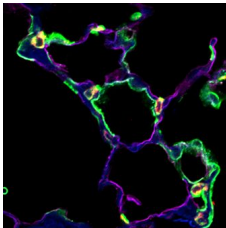
その結果、左図に示す通り、予想した気腫の改善は再現性に乏しく、予想に反して気腔内にリンパ球の集簇を認めた。このリンパ球浸潤はヒト

重症 COPD で見られるリンパ濾胞と相同性があるのか、あるいは、本モデルは、肺気腫以外の病態が関与しているのか、さらなる検討が必要であると考えられた。また、エラストラーゼの投与量が多く、気腔拡大が著明であると、組織量低下から解析が困難であり、各種検討の結果、エラストラーゼの量をオリジナルの4分の1まで減量することによって、安定した気腫モデルを作成することができるようになった。本モデルに長期喫煙すると、微



細なエラストラーゼ傷害部位が著しく顕在化した。(左図)さらに、lineage trace modelでII型肺胞上皮にGFPを発現させたマウス

で同様の検討を行うと、GFP陽性の扁平上皮が見られ(下図)このことは、II型からI型肺胞上皮への分化による修復機転や、あるいはII型肺胞上皮細胞の分化障害が肺気腫



病変の形成に関与している可能性を示唆するものと考えられた。また、p38MAPKの阻害や(BMC PulmMed.2014;14:79)、Thioredoxin-1が気腫形成を抑制することを報告した(PLoSOne.2013

Nov;8(11):e79016.)。種々の機序が気腫形成に関与しており、それらに対する介入が気腫抑制に寄与することを示した。これらの手法を用いれば、気腫形成における様々な機序(酸化ストレス、タンパク分解過剰、修復傷害など)をマウス生体内で測定可能と考えられ、それらと気腫形態との関係を引き続き探索していく意義があると考えられた。

COPD臨床検討では、82名が前向き観察研究に参加され、対照として、健常者3名からの検体も収集済みである。外来にて前向きの観察を継続しており、呼吸機能の推移などの臨床データを収集中で、採集観察期間終了である2016年6月末日以降に最終解析予定である。予備検討にて、健常若年者と比して、COPD患者ではToll-like receptor ligandsによる刺激後にリンパ球内IFN-陽性細胞の増加と抑制性サイトカイン陽性細胞の減少が示唆されたが、症例数を増加させるにつれ、ばらつきが多く、一定の傾向が得られなくなった。一方で血清中の液性因子が増悪予測因子となる傾向を見出ししており、観察期間

終了後に論文作成予定である。引き続き、収集されたヒト気腫画像のフラクタル次元など形態的指標と臨床経過との関連も解析を継続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 17件)

Muro S, Tabara Y, Matsumoto H, Setoh K, Kawaguchi T, Takahashi M, Ito I, Ito Y, Murase K, Terao C, Kosugi S, Yamada R, Sekine A, Nakayama T, Chin K, Mishima M, Matsuda F; Nagahama Study Group. Relationship Among Chlamydia and Mycoplasma Pneumoniae Seropositivity, IKZF1 Genotype and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in A General Japanese Population: The Nagahama Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Apr;95(15) doi: 10.1097/MD.0000000000003371

Tanimura K, Sato S, Fuseya Y, Hasegawa K, Uemasu K, Sato A, Oguma T, Hirai T, Mishima M, Muro S. Quantitative assessment of erector spinae muscles in patients with COPD: Novel chest CT-derived index for prognosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Mar;13(3):334-341. doi: 10.1513/AnnalsATS.201507-446OC

Konishi S, Gotoh S, Tateishi K, Yamamoto Y, Korogi Y, Nagasaki T, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Ito I, Tsukita S, Mishima M. Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2016 Jan 12;6(1):18-25. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.010

Hasegawa K, Sato S, Tanimura K, Fuseya Y, Uemasu K, Sato A, Hirai T, Mishima M, Muro S. Emphysema and airway disease affect within-breath changes in respiratory resistance in COPD patients. *Respirology*. 2015;20(5):775-81. doi: 10.1111/resp.12535

Gotoh S, Ito I, Nagasaki T, Yamamoto Y, Konishi S, Korogi Y, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Funato M, Mae S, Toyoda T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Osafune K, Mishima M. Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014;3(3):394-403. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.07.005

Tanimura K, Hirai T, Sato S, Hasegawa K, Muro S, Kurosawa H, Mishima M. Comparison of two devices for respiratory impedance measurement using a forced oscillation technique: basic study using phantom models. *J Physiol Sci*. 2014;64(5):377-82. doi: 10.1007/s12576-014-0329-4

Marumo S, Hoshino Y, Kiyokawa H, Tanabe N, Sato A, Ogawa E, Muro S, Hirai T, Mishima M. p38 mitogen-activated protein kinase determines the susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *BMC Pulm Med*. 2014;14:79. doi: 10.1186/1471-2466-14-79

Tanabe N, Hoshino Y, Marumo S, Kiyokawa H, Sato S, Kinose D, Uno K, Muro S, Hirai T, Yodoi J, Mishima M. Thioredoxin-1 protects against neutrophilic inflammation and emphysema progression in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *PLoS One*. 2013 Nov;8(11):e79016. doi:10.1371/journal.pone.0079016

室 繁郎, 佐藤 晋 ピットフォール 若年性肺気腫 呼吸(0286-9314)34 巻 7 号 Page702-712(2015.07)

室 繁郎 【緊急処置を必要とする呼吸器病態・疾患】慢性閉塞性肺疾患の増悪 呼吸器内科(1884-2887)27 巻 5 号 Page354-359(2015.05)

室 繁郎 呼吸器疾患診療を支える臨床検査 COPD 診療における呼吸機能と CT 画像の役割 臨床病理(0047-1860)62 巻 12 号 Page1212-1217(2014.12)

室 繁郎 【COPD の最新情報】(Topics 5) 併存症・合併症のインパクトとその対策 日本呼吸器学会誌(2186-5876)3 巻 3 号 Page344-351(2014.05)

室 繁郎 【喘息・COPD 患者への吸入指導】COPD の診断と治療 ガイドラインをふまえて 薬事(0016-5980)56 巻 3 号 Page327-332(2014.03)

室 繁郎 【COPD 治療の新時代 21 世紀の「社会的」生活習慣病】COPD の早期診断,治療の枠組み,急性増悪の対応 新薬乱立の前に知っておくべきこと 内科(0022-1961)113 巻 2 号 Page217-225(2014.02)

室 繁郎 慢性閉塞性肺疾患(COPD)と全身疾患 最新医学(0370-8241)68 巻 12 号 Page2711-2716(2013.12)

室 繁郎 息切れを自覚しない COPD 患者への対応 日本医事新報(0385-9215)4676 号 Page60-61(2013.12)

室 繁郎, 谷村 和哉 【COPD-その病態と最新治療】治療総論 カレントセラピー(0287-8445)31 巻 5 号 Page494-498(2013.05)その他

〔学会発表〕(計 7 件)

Muro S. Invited Lecture, Core Session 3 COPD, asthma and Airway disease. "COPD phenotype and treatment". 1st Asia Oceania Workshop of Pulmonary Functional Imaging and 8th Japanese Society of Pulmonary Function Imaging. Jan 30, 2016, Awaji, Hyogo, Japan.

Tanimura K, Sato S, Sato A, Fuseya Y, Hasegawa K, Uemasu K, Hirai T, Mishima M, Muro S Quantitative Assessment of Skeletal Muscles Mass in COPD Patients Using Chest CT Images American Thoracic Society. 2015.5. Denver, Colorado, USA

Hasegawa K, Muro S, Sato S, Fuseya Y, Tanimura K, Sato A, Nishioka M, Hirai T, Mishima M Quantitative Assessment of Chronic Bronchitis Symptoms and Impact of Extrapulmonary Causes in COPD. American Thoracic Society 2014 International Conference, May 16-21, 2014 - San Diego

Yoshinori Fuseya, Shigeo Muro, Aki Kido, Susumu Sato, Atsuyasu Sato, Michiyoshi Nishioka, Kazuya Tanimura, Koichi Hasegawa, Toyohiro Hirai, Takeshi Kubo, Koji Fujimoto, Kyoko Takakura, Hiroshi Kusahara, Naotaka Sakashita, Yoshiharu Ohno, Kaori Togashi, Michiaki Mishima: Functional Assessment Of Emphysematous Lung Of COPD Patients Using Oxygen-Enhanced. MRI. American Thoracic Society 2014 International Conference, May 16-21, 2014 - San Diego

Muro S: Emphysema progression assessed by quantitative CT analysis in Japanese COPD patients. 16th Annual Meakins-Christie - McGill University. International Workshop in collaboration with the American Thoracic Society and the Gulf Thoracic Society in Dubai 2014/03/16

Muro S: International Symposium Clinical topics in COPD. What we know from the prospective observational study in Kyoto University

COPD clinic. 第 54 回日本呼吸器学会学術

講演会. 2014 年 4 月

T. Takahashi, E. Ogawa, A. Haruna, H. Kiyokawa, A. Sato, Y. Hoshino, S. Muro, T. Hirai, H. Sakai, Y. Nakano, M. Mishima: The expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 in peripheral airway epithelial cells and vessels in early chronic obstructive pulmonary diseases. American Thoracic Society International Conference, Philadelphia, USA, 2013.5.21

6 . 研究組織

(1)研究代表者

室 繁郎 (MURO, SHIGEO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：60344454

(2)研究分担者

佐藤 篤靖 (SATO ATSUYASU)
京都大学・医学研究科・特定病院助教
研究者番号：30706677

(3)連携研究者

中邨智之 (NAKAMURA, TOMOYUKI)
関西医科大学・医学研究科・教授
研究者番号:20362527