

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461185

研究課題名(和文) タバコ抽出液によるラット肺気腫モデルにおける薬剤の抑制効果の検討

研究課題名(英文) The inhibitory effect of pharmaceuticals on rat model of emphysema induced by cigarette smoke extract

研究代表者

花岡 正幸 (HANAOKA, Masayuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20334899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺気腫の発症機序と治療法の確立を目的として、動物モデルの作製に取り組んだ。まず、タバコ抽出液(CSE)によるラット肺気腫モデルの作製を行った。CSEを6週齢オスSDラットの腹腔内へ週1回投与し、3週後に肺組織を摘出した。対照群との比較では、気腔の拡大は有意であるが肺胞の破壊は明らかでなく、確実に肺気腫モデルを作製することはできなかった。そこで、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)によるラット肺気腫モデルの作製に切り替えた。HUVECを6週齢オスSDラットの腹腔内へ単回投与し、3週後および6週後の肺気腫形成を調べたが、対照群と比べ明らかな気腔の破壊、拡大は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the mechanisms of pulmonary emphysema and approach to the therapy, we tried to build a rat model of emphysema caused by cigarette smoke extract (CSE). Six-week-old male SD rats were intraperitoneally injected CSE once a week, and the lung tissues were sampled and examined after 3 weeks of the injection. In comparison with those of control group, there were no significant destruction of the alveoli of rats with injection of CSE, although the enlargement of airspace was observed. Then, we tried to build the rat emphysema model by human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC). A single dose of HUVEC was injected into the peritoneal cavity of 6-week-old male SD rats. The lung tissues were sampled and examined for emphysema formation after 3 weeks and 6 weeks, respectively. However, in comparisons with those of control group, there were no significant enlargement of the airspace and no destruction of the alveoli in the rats with injection of HUVEC.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺気腫 タバコ抽出液 ヒト臍帯静脈内皮細胞 自己免疫 ラット 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) は慢性の気道炎症 (慢性気管支炎) と肺泡破壊 (肺気腫) を特徴とする進行性疾患で、日本人の高い喫煙率と高齢化により、患者の増加が見込まれている。COPD がタバコ煙に起因にすることは事実であるが、その発症機序はいまだ不明である。長らくプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説あるいはオキシダント・アンチオキシダント不均衡説が唱えられてきたが、諸家の精力的な研究にも拘わらず決定的なものはない。近年ではアポトーシスや細胞老化といった新たな概念も提唱されている。

COPD の病因を解明するために様々な動物実験が行われてきたが、多くはタバコ煙を長期間に亘り曝露させるモデルであり、時間と労力を要した。我々は、米国コロラド大学医学部と共同で、タバコ抽出液 (cigarette smoke extract: CSE) によるラット肺気腫モデルを作製した。CSE はタバコ煙を 1 本当たり 1 mL のリン酸緩衝液へ溶解させることにより得られる。この CSE を第 1、8、15 日にラットの腹腔内へ投与することにより、第 21 日に気腔の拡大と肺泡の破壊が認められ、肺気腫が完成した。この肺気腫形成に、アポトーシスの亢進、matrix metalloproteinase (MMP) の増加、炎症性サイトカイン (TNF- α と IL-18) の上昇および生物学的酸化能の低下が関与することも見出した。さらに、このラット肺気腫モデルにプロスタサイクリン類似薬 (Chen Y, Hanaoka M, et al. Protective effect of beraprost sodium, a stable prostacyclin analog, in the development of cigarette smoke extract-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009; 296: L648-56) エンドセリン受容体拮抗薬 (Chen Y, Hanaoka M, et al. Endothelin-1 receptor antagonists prevent the development of pulmonary emphysema in rats. *Eur Respir J.* 2010; 35: 904-12) あるいはカルボシステイン (Hanaoka M, et al. Carbocysteine protects against emphysema induced by cigarette smoke extract in rats. *Chest.* 2011; 139: 1101-8) を同時投与すると、肺気腫が抑制されることを報告した。

一方、有効性の高い気管支拡張薬の登場により、COPD の増悪や死亡率の減少が報告されているが、気管支拡張による効果は限定的である。COPD はタバコ煙など有害物質による慢性気道炎症を背景とした疾患であるが、その根本的治療 (すなわち、COPD の慢性炎症を抑制し、病態を改善する治療) の開発はほとんど進んでいない。COPD の炎症制御の問題点として、(1) ステロイドによる炎症抑制が有効でないこと、(2) 禁煙しても長期にわたって肺の炎症が持続すること、などがあり、この原因として自己免疫機序による血清

中の抗血管内皮細胞抗体の存在が指摘されている。

我々は、米国コロラド大学医学部と共同で、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical cord vein endothelial cell: HUVEC) をラット腹腔内に投与することにより、気腫性病変を形成することを示してきた (Hanaoka M, et al. Immunomodulatory strategies prevent the development of autoimmune emphysema. *Respir Res.* 2010; 11: 179)。本報告は単に HUVEC をラット腹腔内に投与して肺気腫を作成したのみならず、あらかじめラット胸腺に HUVEC を注入しておいた免疫寛容ラットにおいては、HUVEC の腹腔内投与による肺気腫を抑制することも示しており、自己免疫機序によって肺に気腫性病変が惹起されることを明らかにした。すなわち、タバコ煙吸入のような炎症惹起による肺気腫形成とは異なる、新たな発症機序と考えられている。ほぼ同時期に、国内研究施設から COPD 患者血清中に、血管内皮細胞と反応する抗体が存在することが報告された (Karayama M, et al. Antiendothelial cell antibodies in patients with COPD. *Chest.* 2010; 138: 1303-8)。COPD において、免疫機序によって慢性炎症が遷延している可能性が示唆されるが、これまでにこの抗体に対応する抗原は特定されていない。

2. 研究の目的

まず、CSE によるラット肺気腫モデルにおいて、以下を明らかにする。

- 1) CSE によるラット肺気腫モデルの確立。
- 2) このモデルにおける、テオフィリン (気管支拡張薬)、シルデナフィル (選択的 PDE-5 阻害薬) およびピオグリタゾン (PPAR γ アゴニスト) による肺気腫抑制効果の検討。

次に、HUVEC によるラット肺気腫モデルにおいて、以下を明らかにする。

- 1) HUVEC によるラット自己免疫性肺気腫モデルの確立。
- 2) このモデルにおける血清中の抗血管内皮細胞抗体の確認。
- 3) 抗血管内皮細胞抗体の対応抗原の同定。

3. 研究の方法

- CSE 肺気腫モデル -

- 1) 6週齢のオス SD ラットに CSE を腹腔内投与し、肺気腫の発症を確認する。
- 2) このラット CSE モデルに、(1) テオフィリン、(2) シルデナフィル、(3) ピオグリタゾンをそれぞれ投与し、肺気腫の抑制効果を検討する。
- 3) 肺気腫抑制機序として、アポトーシス、蛋白分解酵素、炎症性サイトカイン、酸化ストレスなどの関与につき検討する。

- 自己免疫性肺気腫モデル -
- 1) HUVEC を培養し継体する。
- 2) 6週齢のオス SD ラットに HUVEC を腹腔内投与し、肺気腫の発症を確認する。
- 3) HUVEC 投与ラットの血清により、HUVEC の増殖が抑制されるか確認する。
- 4) COPD 患者および健常者、HUVEC 投与ラットおよび対照ラットの血清を用いて、共通抗原の存在を確認する。
- 5) HUVEC 投与ラットの血清において、ウェスタンブロット法および Biacore 3000 を用いて、抗血管内皮細胞抗体を同定する。

4. 研究成果

- CSE 肺気腫モデル -

既報に従い、ケンタッキー大学のリファレンスシガレット 1 本分の煙をリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline : PBS) 1 mL に溶解させ、独自のシステムを用いて CSE を作製した。CSE 1 mL を週 1 回、第 1、8、15 日にオス SD ラット (6 週齢、体重 200-250 g) の腹腔内へ投与し (n = 12)、第 21 日に麻酔下に肺組織を摘出した。Hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い、肺気腫の指標として、mean linear intercept (MLI ; 肺胞の平均径) および destructive index (DI : 肺胞の破壊度) を計測した。その結果、対照群 (PBS を腹腔内投与、n = 6) との比較では、MLI に有意差を認められたものの、DI はばらつきが大きく有意な差は得られなかった。すなわち、気腔の拡大は有意であるが肺胞の破壊は明らかでなく、確実に肺気腫モデルを作製することはできなかった。

- 自己免疫性肺気腫モデル -

6 週齢オス SD ラットに HUVEC を投与し、3 週後の肺気腫形成を調べた。Passage 1 (P1) の HUVEC を培養、継代し、実験に用いた。対照群 (Freund ' s Complete Adjuvant 250 μ l 皮下注 2 匹) および HUVEC 群 (Titer Max Gold[®] (以下 TM) TM 125 μ l + P4 HUVEC 100 万個腹腔内投与 2 匹、 TM 125 μ l + P4 HUVEC 100 万個皮下注 2 匹、 Freund ' s Complete Adjuvant 250 μ l + P4 HUVEC 100 万個腹腔内投与 2 匹) において肺気腫の形成を検討した。

、 に対しては、booster 効果の目的で、day 8、day 15 にそれぞれ Freund ' s Incomplete Adjuvant 250 μ l + P4 HUVEC 100 万個を追加投与した。9 週齢となったラットを解剖し、肺標本の HE 染色を行い、MLI を計測した。MLI はそれぞれ 93.5 μ m、 79.9 μ m、 80.8 μ m、 71.1 μ m であった。MLI で有意な気腔の拡大はみられず、肺気腫の発症には至っていないと考えられた。

既報のような肺気腫形成に至らない原因として、抗体産生にさらに時間を要する可能性が考えられた。このため標準である A : 6

週齢 HUVEC 投与・9 週齢解剖群に加え、B : 6 週齢 HUVEC 投与・12 週齢解剖群を作製した。各群を A) 対照群 : 6 週齢ラット、TM 125 μ l 腹腔内投与、9 週齢解剖、4 匹 ; A) HUVEC 群 : 6 週齢ラット、TM 125 μ l + P4 HUVEC 100 万個腹腔内投与、9 週齢解剖、5 匹 ; B) 対照群 : 6 週齢ラット、TM 125 μ l 腹腔内投与、12 週齢解剖、4 匹 ; B) HUVEC 群 : 6 週齢ラット、TM 125 μ l + P4 HUVEC 100 万個腹腔内投与、12 週齢解剖、5 匹に分けた。前回と同様に MLI を計測したが、結果はそれぞれ A) 61.2 μ m、A) 63.4 μ m、B) 62.7 μ m、B) 67.4 μ m であった。HUVEC 群は両群において、対照群に比べ MLI の増大傾向を認めたが、有意差はなかった。

CSE、あるいは HUVEC を用いたラット肺気腫モデルの確立のために検討を重ねたが、残念ながら有意な気腔の拡大、肺胞の破壊は認めなかった。

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 12 件)

Wada Y, Koyama S, Kuraishi H, Miyahara T, Yoshiike F, Agatsuma T, Yamamoto R, Ono Y, Suzuki T, Hachiya T, Gomi D, Tateishi K, Hanaoka M, Koizumi T. Clinical analysis of patients treated with afatinib for advanced non-small cell lung cancer: A Nagano Lung Cancer Research Group observational study. Respiratory Investigation, 査読有, Vol. 54 No. 6 pp. 462-467, 2016.

Tokoro Y, Yasuo M, Kobayashi T, Hama M, Ichiyama T, Horiuchi T, Ushiki A, Kawakami S, Honda T, Hanaoka M. Computed tomography-guided bronchoscopy in the diagnosis of small peripheral pulmonary lesions: A retrospective study of 240 examinations in a single academic center. Respiratory Investigation, 査読有, Vol. 54 No. 5 pp. 347-354, 2016.

Yasuo M, Kobayashi T, Hama M, Ichiyama T, Horiuchi T, Yamamoto H, Kawakami S, Hamanaka K, Honda T, Hanaoka M. Combination of virtual bronchoscopic navigation with conventional transbronchial needle aspiration in the diagnosis of peribronchial pulmonary lesions located in the middle third of the lungs. Respiratory Investigation, 査読有, Vol. 54 No. 5 pp. 355-363, 2016.

Hama M, Ushiki A, Kosaka M, Yamazaki

Y, Yasuo M, Yamamoto H, Hanaoka M. Health-related quality of life in patients with pulmonary no-tuberculous mycobacteria infection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 査読有, Vol. 20 No. 6 pp. 747-752, 2016.

Hayashida M, Yasuo M, Hanaoka M, Seyama K, Inoue Y, Tatsumi K, Mishima M; Respiratory Failure Research Group of the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan. Reductions in pulmonary function detected in patients with lymphangiomyomatosis: An analysis of the Japanese National Research Project on Intractable Diseases database. *Respiratory Investigation*, 査読有, Vol. 54 No. 3 pp. 193-200, 2016.

Kitaguchi Y, Yasuo M, Hanaoka M. Comparison of pulmonary function in patients with COPD, asthma-COPD overlap syndrome, and asthma with airflow limitation. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 査読有, Vol. 11 pp. 991-997, 2016.

Yamamoto H, Yasuo M, Ichiyama T, Ushiki A, Hanaoka M, Hamano H, Uehara T, Kawakami S, Matsui S, Kubo K. Cytokine profiles in the BAL fluid of IgG4-related respiratory disease compared with sarcoidosis. *ERJ Open Research*, 査読有, Vol. 1 No. 2, 2015.

Fukushima T, Tateishi K, Hanaoka M, Koizumi T. Clinical outcomes in patients with small cell lung cancer in a single institute: Comparative analysis of radiographic screening with symptom-prompted patients. *Lung Cancer*, 査読有, Vol. 88 No. 1 pp. 48-51, 2015.

Kitaguchi Y, Fujimoto K, Hanaoka M, Honda T, Hotta J, Hirayama J. Pulmonary function impairment in patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema with and without airflow obstruction. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 査読有, Vol. 9 pp. 805-811, 2014.

Ushiki A, Yamazaki Y, Hama M, Yasuo M, Hanaoka M, Kubo K. Viral infections in patients with an acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia. *Respiratory Investigation*, 査読有, Vol. 52 No. 1 pp. 65-70, 2014.

Kitaguchi Y, Fujimoto K, Hayashi R, Hanaoka M, Honda T, Kubo K. Annual

changes in pulmonary function in combined pulmonary fibrosis and emphysema: Over a 5-year follow-up. *Respiratory Medicine*, 査読有, Vol. 107 No. 12 pp. 1986-1992, 2013.

Kobayashi N, Hanaoka M, Droma Y, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K, Ota M. Polymorphisms of the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene are associated with resistance to high-altitude pulmonary edema (HAPE) in a Japanese population: a case control study using polymorphic microsatellite markers. *PLoS One*, 査読有, Vol. 8 No. 8 p. e71993, 2013.

〔学会発表〕(計 9 件)

Hanaoka M. Symposium: What is CTEPH?; is it the sequel of acute pulmonary embolism? The 21st Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Bangkok, Thailand, November 2016.

花岡正幸. 特別講演: 高地肺水腫. 第 26 回日本病態生理学会大会、金沢、平成 28 年 8 月.

花岡正幸. 教育講演: 薬剤性肺障害. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、京都、平成 28 年 4 月.

Hanaoka M. Symposium: Treatment update on PAH. The 20th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Kuala Lumpur, Malaysia, December 2015.

花岡正幸. 特別講演: 山岳診療の標準化を目指して - 日本登山医学会高山病診療ガイドライン -. 第 35 回日本登山医学会学術集会、高松、平成 27 年 5 月.

Hanaoka M. Presidential Symposium; How should we manage pulmonary hypertension associated with pulmonary disease and hypoxia? 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、平成 27 年 4 月.

Hanaoka M. Symposium: What 's new in pulmonary hypertension; Pulmonary hypertension associated with COPD. The 19th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Bali, Indonesia, November 2014.

Hanaoka M. Symposium: The early diagnosis and treatment for pulmonary hypertension due to COPD. 第 2 回日本肺高血圧学会/第 3 回日本肺循環学会合同学術集会、東京、平成 26 年 10 月.

花岡正幸. シンポジウム: 慢性化における獲得免疫の役割. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、平成 25 年 4 月.

〔図書〕(計 1 件)

Kato A, Hanaoka M. Springer.

Pathogenesis of COPD (Persistence of Airway Inflammation): Why Does Airway Inflammation Persist After Cessation of Smoking? In: Chronic Obstructive Pulmonary Disease; A Systemic Inflammatory Disease. pp. 57-72, 2017.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

花岡 正幸 (HANAOKA, Masayuki)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号： 2 0 3 3 4 8 9 9

(2)研究分担者

安尾 将法 (YASUO, Masanori)
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属
病院)・講師
研究者番号： 2 0 4 0 2 1 1 7