

平成30年6月1日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461199

研究課題名(和文)喫煙によるマウス肺組織傷害および肺胞再生に関わるmicroRNAの同定と治療応用

研究課題名(英文) MicroRNAs associated with smoking-induced pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice

研究代表者

佐藤 匡 (Sato, Tadashi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10596993

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)：COPD急性増悪時の炎症へのmiR-146aの関与を明らかにするため、ヒト気道上皮細胞 BEAS-2Bに対してタバコ煙抽出液(CSE)を6日間曝露させた後、リポ多糖(LPS)刺激を2日間行ったところ、CSE前処置なしと比較して培養上清中のIL-8が有意に増幅した(70.2 118.1 pg/mL, $P<0.01$)。また、LPS刺激後のmiR-146a発現量も、CSE前処置により、有意な増幅が認められた(相対定量値44.0 70.1, $P<0.01$)。気道上皮細胞においてLPSによる炎症がCSE曝露により増幅されることが明らかとなり、これにmiR-146aが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cigarette smoking is the most important cause of COPD, but the mechanisms of pathogenesis are incompletely defined. We have reported that a specific microRNA, miR-146a, plays a pathogenetic role in the abnormal inflammatory response in COPD. In the current study, we investigated the role of miR-146a in acute phase of inflammatory response towards cigarette smoking. Interleukin-8 was significantly increased in BEAS-2B cells, normal human bronchial epithelial cells, following 6 days of cigarette smoke extract (CSE) and 2 days of lipopolysaccharide (LPS) compared with non-CSE treatment cells (70.2 118.1 pg/mL, $P<0.01$). Additionally, LPS-induced miR-146a expression was also increased significantly by pretreatment of CSE (relative expression: 44.0 70.1, $P<0.01$). Together, LPS-induced inflammatory response was clearly enhanced by CSE pretreatment in human bronchial epithelial cells. Moreover, miR-146a may associate with the acute inflammatory response during the exacerbation of COPD.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：microRNA 慢性閉塞性肺疾患(COPD) miR-146a 喫煙 炎症 COX-2 IL-8

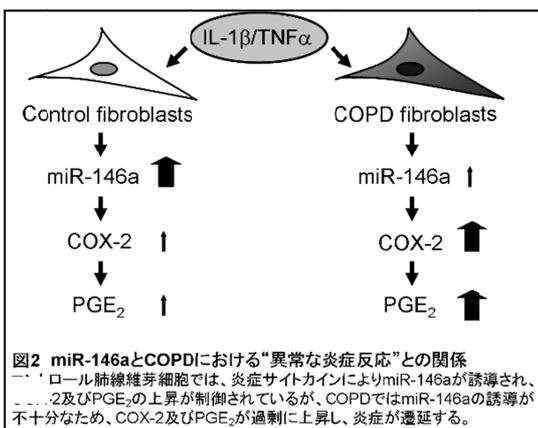
1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: 以下 COPD) は、タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じる肺の炎症性疾患である。2020 年までには全世界の死亡原因の第 3 位になると推測されており、Fukuchi らの大規模疫学研究では、日本全国の患者数は約 530 万人と推定されている (Fukuchi Y, et al., *Respirology* 2004)。しかし、本疾患は国民に十分認知されているとはいえず、治療を受けている患者数は約 17 万 3 千人に過ぎない。そこで、2013 年度より国民の健康づくり運動として展開されている「健康日本 21」の対象疾患に追加され、国をあげての啓発活動が展開されている。COPD の中心的な発症メカニズムは、喫煙、大気汚染物質の吸入、あるいは職業性曝露による、気道や肺の慢性的な炎症反応と考えられている。さらに、この「異常な炎症反応」は、禁煙後も持続する。したがって、COPD 患者では、気道や肺における炎症の制御機構に何らかの異常が生じていることが推測されるが、その全貌は未だ明らかになっておらず、進行を抑制し、予後を改善する治療法も確立していないのが現状である。

これまでに研究代表者は、老化促進マウスとして Senescence Marker Protein (加齢指標タンパク質) 30 ノックアウトマウス SMP30-KO を確立した (Ishigami A, et al., *Am J Pathol* 2002)。SMP30 は性ホルモンによる制御を受けず、雌雄ともに加齢に伴い肝臓や腎臓、肺で減少するタンパク質である (Fujita T, et al., *Biochim Biophys Acta* 1992)。研究代表者は、SMP30-KO マウスが、加齢に伴う気腔の拡大が対照マウスと比較して早期に出現する老人肺モデルとなること、また、8 週間という比較的短期間のタバコ煙曝露により、COPD の主要な病理変化である肺気腫、すなわち肺胞径の拡大と肺胞壁の破壊を生じることを見出し、このマウスが老化因子を有するユニークな COPD モデル動物になることを報告した (Sato T, et al., *Am J Respir Crit Care Med* 2006)。さらに、SMP30-KO におけるタバコ煙感受性の変化の原因として、ビタミン C 合成能の欠損が深く関わり、タバコ煙曝露を行った後にビタミン C を補充する介入実験の結果、ビタミン C により破壊された肺胞が再生されることを明らかにした (Koike K, et al., *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013)。

また研究代表者は、COPD の病態を検討・解明する上で、気道上皮細胞のみならず肺線維芽細胞がその発症に深く関わり、COPD 肺における、増幅し遷延する「異常な炎症」が特定の microRNA、miR-146a により制御されうることを *in vitro* 解析により明らかにした (Sato T, et al., *Am J Respir Crit Care Med* 2010)。すなわち、COPD における炎症サイトカインによる miR-146a の不十分な上

昇が、COPD の中心病態である、異常に亢進しかつ遷延する炎症反応の原因となっている可能性が考えられた (下図)。microRNA は 20-25 塩基の非常に小さな non-coding RNA の一種で、遺伝子発現調節機構に関わる重要な因子であり、発生や細胞死、細胞増殖といった多くの生物学的プロセスに関与することが明らかになってきている。近年 COPD に関しても、ヒト全ゲノムを対象とした相関研究により責任遺伝子の探索が試みられているが、単一の遺伝子の発現変化では、COPD の臨床的多様性は説明できず、それゆえエピジェネティックな遺伝子発現調節機構としての microRNA が、COPD 発症において重要な役割を担っている可能性が推察



され、次世代の治療ターゲットとしても非常に有望であるとわれわれは考えた。

2. 研究の目的

本研究では、肺線維芽細胞を用いた解析の結果見出された miR-146a が、COPD の主病態である「異常な炎症反応」に与える影響について、細胞実験および動物実験による多面的な検討を行った。最終的な目的は、miR-146a の新規 COPD 治療薬としての可能性を追究することである。

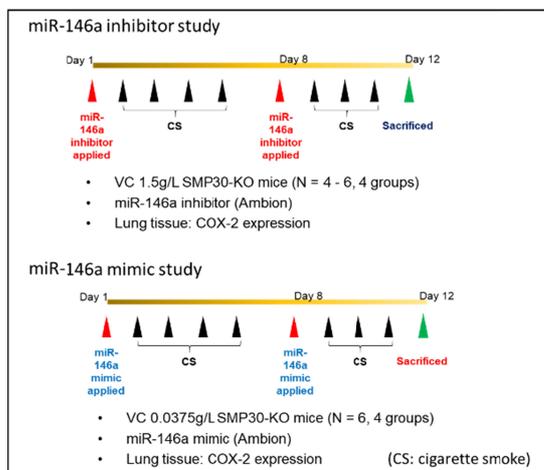
3. 研究の方法

(1) miR-146a による COPD 治療介入 *in vivo* 実験

東京都健康長寿医療センター研究所動物施設 SPF において飼育された雄 SMP30-KO マウスを使用した。本動物実験は東京都老人総合研究所及び順天堂大学医学部実験動物委員会にて承認を受けたものである。

miR-146a の mimic および inhibitor の投与下に、2 週間のタバコ煙曝露実験 (3.5% タバコ煙又は新鮮大気曝露) を行った。実験装置としては、柴田科学社製タバコ煙発生・曝露装置 SG-300 を用いた。miR-146a mimic 及び inhibitor は、Ambion 社の *in vivo* ready のものを経鼻的に、Day1 および Day8 に投与した。導入試薬は Mirus 社の TransIT-TKO Reagent を用いた (Bitko V, et al., *Nat Med* 2005)。タバコ煙曝露後の摘出肺は、経気道的に定常圧 (25 cmH₂O) を与えて 10% ホルモン液中で 48 時間固定した。曝露実験後の

気管支肺胞洗浄液(BALF)およびマウス肺組織を用いて、BALF 細胞数・細胞分画、PGE₂ および COX-2 の発現を定量 PCR 法、ELISA



法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法により解析した。

しかし、この実験系では、慢性的なタバコ煙曝露実験は困難であったため、miR-146a のノックアウトマウスである B6(FVB)-*Mir146^{tm1.1Bal}/J* マウスの繁殖を行い、これに対して、30 分/日、5 日間/週の 3.5% 希釈タバコ煙曝露を 8 週間行った。BALF 中の細胞数・細胞分画、肺組織学的変化、および FlexiVent システム (SCIREQ) を用いたマウス呼吸機能測定を行った。さらにマウス肺組織を用いて COX-2 発現を解析した。

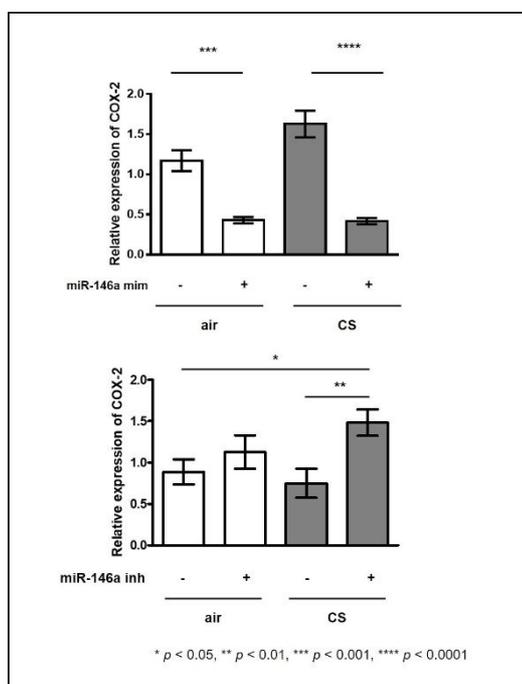
(2) *In vitro* COPD 増悪モデルの作製および miR-146a 発現解析

ヒト気道上皮細胞 BEAS-2B に対して、タバコ煙抽出液 (Cigarette Smoke Extract; CSE) と細菌感染を模した Lipopolysaccharide (LPS) を刺激することで、COPD 増悪モデルの作製を行った。まず、CSE と LPS それぞれの至適濃度を決めた後、CSE を 3 日間および 6 日間刺激し、継代して細胞濃度を揃えて再播種したのち LPS、これに加えて、以前に研究代表者が肺線維芽細胞刺激で用いた IL-1 β /TNF α で 3 日間まで刺激を行い、IL-8、miR-146a 発現、さらに NF- κ B リン酸化について時系列での検討を行った。

4. 研究成果

(1) miR-146a による COPD 治療介入 *in vivo* 実験

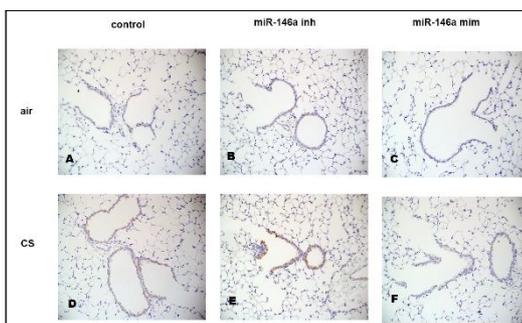
miR-146a inhibitor を投与しタバコ煙を曝露したマウスでは、対照群と比較して、BALF 総細胞数及びリンパ球比率の増加がみられた。また、BALF 中の PGE₂ および肺組織での COX-2 の増加が確認された (右上図)。一方、miR-146a mimic を投与し、タバコ煙曝露を行ったマウスでは、肺組織での COX-2 発現は mimic 投与により減少する傾向が見られた (右上図)。しかし、BALF 中の PGE₂ は mimic 投与で上昇する結果で乖離してい



た。なお、これらの実験系は短期間のタバコ煙曝露であり、マウス肺組織に有意な変化は観察されなかった。

次に、miR-146a のノックアウトマウスである B6(FVB)-*Mir146^{tm1.1Bal}/J* マウスに対して、8 週間のタバコ煙曝露実験を行った結果、BALF においては総細胞数および分画としてはマクロファージ数の上昇がみられたものの、マウス肺病理組織および呼吸機能において、タバコ煙曝露の影響は明らかでなかった。また、マウス肺組織での COX-2 発現もタバコ煙曝露の有無によって有意差を認めなかった。

今回の結果から、miR-146a がタバコ煙曝露により誘導される炎症反応の比較的早期の時相に参与する可能性が示唆された。しかし、慢性タバコ煙曝露に伴う肺組織傷害にお



ける miR-146a の関与は明らかとはならなかった。より長期間のタバコ煙曝露あるいは、タバコ煙曝露後に LPS などを投与する、いわゆる急性増悪モデルでの検討が必要と考えられたため、気道上皮細胞を用いた COPD 増悪モデル実験を行うこととした。

(2) *In vitro* COPD 増悪モデルの作製および miR-146a 発現解析

まず、BEAS-2B に CSE を添加し、細胞毒性が発現しない CSE 濃度を検討した。その

結果、添加 24 時間後において 5% の CSE 濃度までは細胞数の変化が少なかったことから、これ以降の実験では、5% 以下の濃度の CSE を用いることとした。

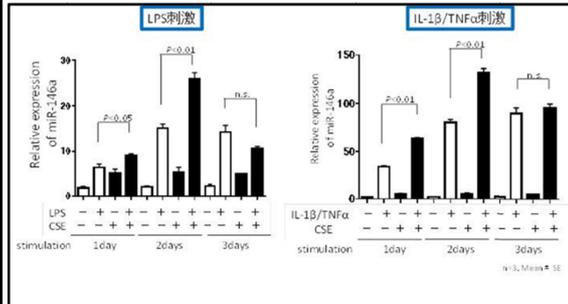
増悪時の COPD 患者において喀痰中の IL-8 が増加するという報告があることから、炎症の指標として IL-8 を選択することとした。CSE と同時に LPS を 0.1, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加して 48 時間インキュベートし、培養上清中の IL-8 を測定したところ、LPS の濃度依存的に上清中の IL-8 量の増加が見られ、CSE を同時添加していない群に比べ、同時添加している群で、IL-8 量がさらに増加していることが分かった。また、この時の miR-146a の発現量を確認したところ、IL-8 の結果と同様に、CSE 添加なしに比べて CSE 添加ありの条件下で、miR-146a の発現増加が認められた。以上の結果から、CSE が LPS の感受性を増強させている可能性が考えられ、miR-146a がその炎症の増強を抑えるために発現している可能性を考えた。さらに、細胞の刺激条件として、2.5% CSE および 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS が最も適していると判断した。

一方、ヒトの COPD 増悪の状態というのは、タバコ煙等の刺激を長期に受け続けて COPD を発症した後に、感染などの原因によって起こるものである。そのため、*in vitro* の実験系としても、これまで進めてきた CSE および LPS の同時投与の系ではなく、CSE による前処置を行った後に LPS で刺激を行う方が、よりヒトの病態に近い実験系になると考えた。そこで、CSE を前処置した後、一度細胞を継代し、細胞数を揃えて新たに播種し直し、その後 LPS の刺激を施すという方法を検討した。CSE の処置期間は 3 日と 6 日とを試し、LPS は 2 日間刺激した。その結果、いずれの CSE 処置期間においても、CSE なしに比べて有意な IL-8 産生量の増加が認められた。この時の miR-146a の発現量も IL-8 の結果と同傾向であり、3 日より 6 日の処置の方が CSE 処理の有無による差が大きかったことから、6 日間 CSE による前処置を行った後に、2 日間の LPS 刺激を行うというプロトコルを本研究における *in vitro* COPD 増悪モデルとした。

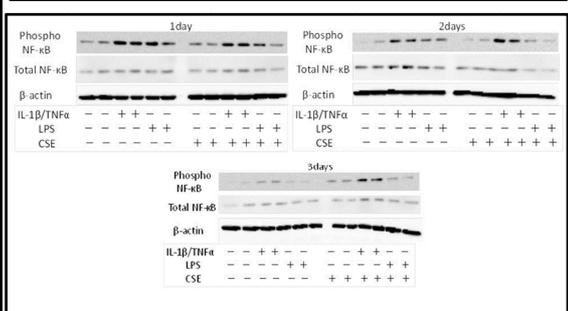
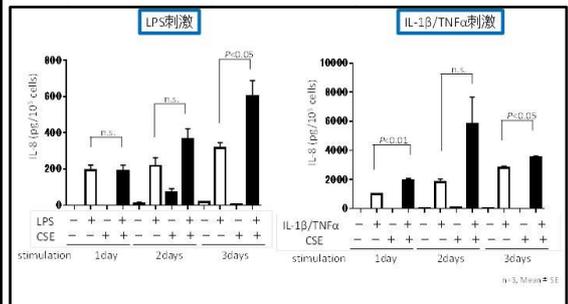
これまで、刺激としては LPS を用いてきたが、細菌感染だけでなくウイルス感染も COPD 増悪の原因のひとつであること、感染の際、患者の気道内では種々のサイトカインが分泌されていると考えられることから、ウイルスを模した合成 dsRNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) ならびに炎症性サイトカインである IL-1/TNF の刺激についても実験を行った。先に決定したプロトコルを用いた結果、miR-146a の発現量は、poly(I:C) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激では LPS と同程度であったが、IL-1/TNF (2 ng/mL) 刺激では、LPS や poly(I:C) の刺激の数倍高値であった。また、IL-1/TNF 刺激による IL-8 産生量も LPS 刺激よ

り高値であった。

そこでさらに、LPS および IL-1/TNF 刺激を施した際のタイムコース (1, 2, 3 日) について検討することとした。その結果、いずれの刺激においても、miR-146a は 2 日目に最も CSE 処理の有無による発現量の差が大きくなり、3 日目になると差がなくなることが分かった (下図)。



一方、IL-8 産生量に関しては、LPS 刺激では 3 日目にかけて CSE 処理の有無による差が大きくなり、IL-1/TNF 刺激では 1~3 日目いずれの刺激日数でも CSE なしに比べて CSE ありで高くなる傾向が認められるという結果となった (下図)。また、IL-8 の上流に存在する NF- κ B の活性化 (リン酸化) に関しては、いずれの刺激でも 3 日目に CSE 処理の有無による差が大きくなるという結果であった (下図)。



これらの結果から、miR-146a は COPD 増悪時に生じる炎症反応の、比較的早期の段階に対して抑制的に働くことが示唆された。3 日目以降は、miR-146a の発現が減少し、それによって抑制できなくなった炎症反応が増幅していくという COPD 増悪における病態が推察される。miR-146a は、COPD 増悪時の急性炎症への関与が想定されることから COPD 増悪に対する治療標的となる可能性がある。

miR-146a は、NF- κ B により発現が誘導され、その上流に存在する炎症性サイトカイン

の細胞内シグナル伝達因子である TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)および interleukin-1 receptor associated kinase 1(IRAK1)をターゲットとするネガティブフィードバックにより炎症反応に対して抑制的に働く microRNA と考えられている。また、研究代表者らにより、COPD 肺の線維芽細胞ではコントロール細胞と比べて、miR-146a の発現誘導が軽度であり、miR-146a が COX-2 の mRNA に直接結合し、mRNA の安定性を低下させることで、COX-2、さらには PGE₂ の発現に対して抑制的に働くことが見出されている(Sato T, et al., **Am J Respir Crit Care Med** 2010)。すなわち、miR-146a は、COPD の重要な病態である過剰な炎症反応を制御しうると考えられる。さらに最近、呼吸器系細胞から分泌される細胞外小胞顆粒であるエクソソームを介した細胞間クロストークが、新たな病態制御因子として注目されている。エクソソームは microRNA などの核酸を内包し、受け手細胞に情報伝達することにより気道微細環境を制御していると想定されている(Fujita Y, et al., **J Extracell Vesicles** 2015)。また、エクソソームに内包される microRNA のプロファイルは、たばこ煙曝露などの外的因子により変化すると想定されるが、詳細は明らかではない。われわれは、COPD の病態に関わる可能性のある miR-146a の生体内での運び手として、エクソソームが重要な役割を担っている可能性を考えている。COPD の増悪時に炎症反応は増幅されるが、その際、気道上皮細胞から miR-146a を多く含んだエクソソームが分泌されることで、周囲への炎症の波及を抑制している可能性が考えられる。今後、エクソソームを介した miR-146a の異なる細胞間でのクロストークとこれによる炎症制御機構について *in vitro*, *in vivo* 両面からの多角的な検討を行っていく予定である。

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 10 件)

Suzuki Y, Sato T, Ishigami A, Seyama K, et al. Hydrogen-rich pure water prevents cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in SMP30 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 492: 74-81 (2017) 10.1016/j.bbrc.2017.08.035

Hashimoto M, Sato T, Maruyama M, Sugimoto M, et al. Elimination of p19ARF-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI Insight* 査読有 1: e87732 (2016) 10.1172/jci.insight.87732

Sato T, Baskoro H, Rennard SI, Seyama K, et al. MicroRNAs as therapeutic targets in lung disease: Prospects and challenges. *Chronic Obstr Pulm Dis* (Miami) 査読有 3(1): 382-388. (2016) 10.15326/jcopdf.3.1.2015.0160

Kodama Y, Sato T, Seyama K, Ishigami A, et al. Antioxidant nutrients in plasma of Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma-COPD overlap syndrome, and bronchial asthma. *Clin Respir J* 査読有 Dec 14 (2015) 10.1111/crj.12436

Li YJ, Kanaji N, Sato T, Rennard SI, et al. Prostaglandin E2 switches from a stimulator to an inhibitor of cell migration after epithelial-to-mesenchymal transition. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 査読有 116-117:1-9 (2015) 10.1016/j.prostaglandins.2014.10.003

[学会発表](計 12 件)

佐藤 匡ら, Hydrogen-rich pure water prevents cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in SMP30 knockout mice, 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会, 2018

佐藤 匡ら, Hydrogen-rich pure water prevents cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in SMP30 knockout mice, American Thoracic Society International Conference, 2017

佐藤 匡ら, Regional heterogeneity of airway epithelial cells in response to cigarette smoke extract, 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会, 2017

佐藤 匡ら, COPD モデルマウスを用いたビタミン C 治療による肺修復メカニズムの遺伝子学的解析, 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会, 2017

佐藤 匡ら, COPD 急性増悪における microRNA-146a の役割の解明, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016

[図書](計 1 件)

Sato T, Seyama K. Springer, Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systemic Inflammatory Disease, 2017, 73-93

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 匡 (SATO Tadashi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10596993

(2)研究分担者

瀬山 邦明 (SEYAMA Kuniaki)

順天堂大学・医学部・前任准教授

研究者番号：10226681

高橋 史行 (TAKAHASHI Fumiyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70327823

(3)連携研究者

石神 昭人 (ISHIGAMI Akihito)

東京都健康長寿医療センター研究所・老化

制御研究チーム・研究部長

研究者番号：50270658

(4)研究協力者

Stephen I. RENNARD

ネブラスカ大学・医療センター・教授

鈴木 洋平 (SUZUKI Yohei)

順天堂大学・医学部・助教

三井 亜樹 (MITSUI Aki)

順天堂大学・医学部・実験助手