

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：82307

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860597

研究課題名(和文)肺気腫におけるテロメラーゼ解析と新規治療への応用

研究課題名(英文)Analysis of telomerase in pulmonary emphysema and application to new treatment

研究代表者

上野 学 (Manabu, Ueno)

独立行政法人国立病院機構高崎総合医療センター(臨床研究部)・臨床研究部・呼吸器内科医長

研究者番号：70599563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、喫煙などの有害物質による肺胞マクロファージを中心とした持続炎症が特徴である。我々はCOPDにおける肺胞細胞のtelomerase解析を行い、慢性炎症との関与を検証した。

喫煙肺気腫マウスにおいて、肺胞マクロファージではtelomerase活性が上昇しtelomere短縮が抑制されて、Ⅱ型上皮細胞ではtelomerase活性の低下が確認された。また、肺胞マクロファージにおけるTERT発現が上昇していた。喫煙により、肺胞マクロファージではtelomerase活性の上昇により細胞寿命の延長が確認され、COPDにおける慢性持続炎症の一因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic Obstructive Pulmonary Disease(COPD) is characterized as persistent inflammation centering on the alveolar macrophages caused by the cigarette smoking. In this study, we analysed the telomerase of alveolar cells in COPD and examined the involvement of chronic inflammation.

In smoking-induced emphysema mice, the telomerase activity was increased in alveolar macrophages and telomere shortening was suppressed. Whereas, the telomerase of alveolar type II cells was suppressed. Moreover, TERT expression was increased in alveolar macrophages. By smoking, the telomerase activity of alveolar macrophages was confirmed to prolong the cell life and was considered to be a contributing factor for chronic persistent inflammation in COPD.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 肺気腫 マクロファージ テロメラーゼ テロメア

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) はタバコなどの有毒な粒子やガスの吸入によって生じた、肺の炎症反応に基づく進行性の気流制限を呈する疾患である。現在、世界の死亡原因の第4位となっており、本疾患は世界的に重大な問題である。日本においても40歳以上の男性の16.4%、女性の5.0%、全体の8.6%という高い有病率(530万人)であることが明らかになってきた<sup>1</sup>。したがってCOPDの治療法を進展させることが急務である。

(2) COPDの病態は気道・肺実質・肺血管構造における炎症反応であり、マクロファージ、CD8+リンパ球、好中球が増加する複雑な炎症反応である<sup>2</sup>。これらの炎症細胞は、サイトカインやケモカインなどの炎症性メディエーターを産生して、炎症反応を増強させる<sup>3</sup>。特に、肺胞マクロファージはCOPDの中でも中心的な役割を果たす炎症細胞であり、喫煙により活性化されTNF- $\alpha$ などのサイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ(MMP-9, MMP12)などを放出し、肺胞の破壊・持続的な炎症反応をもたらす。COPD患者では気道や喀痰・肺胞洗浄液中のマクロファージが増えており、サイトカインやプロテアーゼの産生が亢進している<sup>4</sup>。またCOPDの肺胞マクロファージは寿命が長くアポトーシスに抵抗性を示すことが報告されている<sup>5</sup>。

(3) 喫煙の持続により、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞ではテロメラーゼの活性が抑制され、テロメアが短縮し、細胞老化に至る<sup>6</sup>。老化した細胞自体は炎症を惹起し、COPDにおける炎症の原因と考えられている。一方で、肺胞マクロファージに関しては、寿命が延長しており、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞とは異なる現象が起きていると考えられる。同じ肺胞内の細胞で喫煙により寿命に差が出ることを示唆される。

(4) 近年、動脈硬化領域において、マクロファージのテロメラーゼ活性が動脈硬化を進行させ、telomerase reverse transcriptase(TERT)の誘導がマクロファ-

ジの老化を抑制すると報告されている<sup>7</sup>。また、TERT遺伝子の誘導はNF- $\kappa$ Bシグナル活性を促進し、炎症につながる。このように、マクロファージは炎症の場において、寿命を延長させることで慢性炎症を持続させることが示唆される。しかし、COPDにおける慢性炎症の中心的役割を果たす肺胞マクロファージについては詳細な検討はなされていない。

(5) 現在、COPDの病態は、肺胞マクロファージを主体とした慢性炎症と肺胞上皮細胞の傷害及び修復の異常であるが、両者が異なる機序で炎症に関わることで慢性炎症が成立する。この機序を細胞の寿命という観点で解析することにより、病態に応じた検査法、新規治療薬の開発を行うことが可能と考えられる。これらのことより、本研究では肺気腫モデルマウス及びCOPD患者の肺胞マクロファージでのテロメラーゼ活性を解析することで、COPDの発症及び持続する慢性炎症のメカニズムを検証する。具体的には喫煙誘導肺気腫モデルマウスの肺胞マクロファージにおけるテロメラーゼ活性の測定・テロメア長の延長を確認し、同時に寿命に関わる遺伝子の変化を解析することで、マクロファージを中心とした持続炎症の機序が解明でき、さらにはテロメラーゼ活性阻害剤を用いた新たな治療法の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患(COPD)の病態は、気道と肺実質の持続的な炎症であり、不可逆的な病態である。今後さらにCOPDの病態を解明し、COPDの病態の多様性に応じた検査法・治療法の確立が求められている。本研究では、肺気腫モデルマウス及びCOPD患者における肺胞マクロファージでのテロメラーゼ活性に着目して、COPDにおける慢性炎症のメカニズムを検証する。肺胞マクロファージは寿命が延長し、炎症性サイトカインの持続的放出、プロテアーゼの過剰産生、肺胞マクロファージの誘導・増加及びアポトーシスの抑制などに至り、選択的な慢性炎症が確立されると考える。

### 3. 研究の方法

#### 肺気腫モデルマウスにおける解析

肺気腫モデルマウスの標準的なプロトコールである，1日4本・週6日の6ヶ月間の喫煙曝露をC57BL/6マウス（メス）に行い，肺気腫モデルマウスを作成する．肺気腫モデルマウスより，肺胞細胞（肺胞マクロファージ，型肺胞上皮細胞，血管内皮細胞，線維芽細胞）を抽出する（primary cell）．

A 群：肺気腫マウス（6ヶ月喫煙曝露）

B 群：コントロールマウス（6ヶ月空気曝露）

< 細胞の寿命に関する検討 >

#### 肺胞細胞におけるテロメラーゼ活性

(TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA)

肺胞細胞のテロメア長（FISH法：Telomere PNA Kit）

TERT遺伝子発現（Real-time PCR，蛍光免疫染色）

を測定し，肺胞マクロファージと他の細胞とのテロメラーゼ活性・テロメア長・TERT遺伝子発現の比較を行うことで，寿命の比較を行う．

< アポトーシスに関する検討 >

アポトーシスアッセイ（caspase3/7 assay）

< 老化に関する検討 >

senescenceアッセイ（senescence assay，real-time PCR(p21, p16)）

< 炎症に関する検討 >

肺気腫モデルマウスより抽出した肺胞マクロファージにおけるTERT遺伝子発現が増加していることを確認の上，TERT遺伝子につながるNF-kBシグナルの活性を測定する．また，その下流の炎症性サイトカイン産生についても確認する．

NF-kBシグナル活性（NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B Western Blot Analysis）

< 炎症に関する検討 >

炎症性サイトカイン産生（TNF- $\alpha$ ，IL-1 Real-time PCR, ELISA）

#### 肺胞マクロファージにおける解析

C57BL/6マウスから肺胞細胞（肺胞マクロファージ，型肺胞上皮細胞）を抽出して，タバコ抽出液（cigarette smoke extract(CSE)）で24時間刺激を行う．

#### 肺胞細胞におけるテロメラーゼ活性

(TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA)

#### COPD患者における解析

COPD患者における評価として，COPDを有する患者における肺胞マクロファージのTERT遺伝子発現の測定を行い，寿命を解析する．

TERT遺伝子発現（蛍光免疫染色）

### 4. 研究成果

肺気腫マウス群（A群）において，肺胞マクロファージではテロメラーゼ活性が上昇しており，型肺胞上皮細胞では低下していた（図1）．

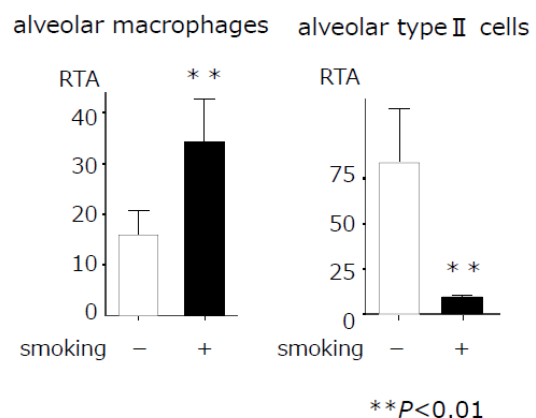


図1 肺胞細胞におけるテロメラーゼ活性

また，テロメラーゼを構成する TERT 遺伝子の発現を確認したところ，肺気腫マウスの肺胞マクロファージにおいて PCR で TERT mRNA の発現上昇を確認した．蛍光免疫組織染色では，肺気腫マウスにおいて，肺胞マクロファージにおける TERT 発現が上昇していた（図2）．

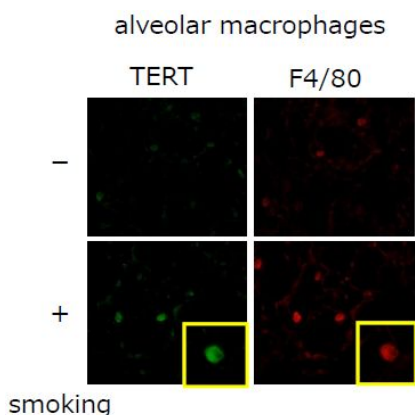


図2 肺泡マクロファージにおける TERT 発現

アポトーシスに関しては喫煙群で肺泡マクロファージではアポトーシスが抑制されていたが、これに関しては既知の報告の通りと考えられた。肺泡マクロファージの寿命を確認するため、テロメア長を FISH 法を用いて計測したところ、肺気腫マウスにおける肺泡マクロファージでテロメア長の短縮抑制を確認した(図3)。

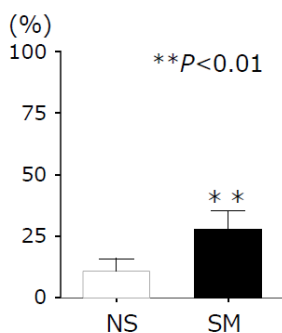


図3 肺泡マクロファージにおけるテロメア長解析

(NS: 非喫煙, SM: 喫煙)

老化に関しては senescence assay では有意な差は認められず、p16、p21 の明確な発現変化は認められないことから、老化との関連は認められなかった。炎症に関しては肺泡マクロファージにおける NF- $\kappa$ B シグナルの活性は認められたが、TNF- $\alpha$ 、IL-1 などの炎症性サイトカイン発現には差が認められなかった。慢性炎症に関してはさらなる解

析が必要であると判断した。

C57BL/6 マウスから抽出した肺泡細胞(肺泡マクロファージ, Ⅱ型肺泡上皮細胞)に対するタバコ抽出液(cigarette smoke extract(CSE))刺激では、肺泡マクロファージではCSEの濃度依存性にテロメラーゼ活性が上昇したが、Ⅱ型肺泡上皮細胞では変化が認められなかった(図4)。

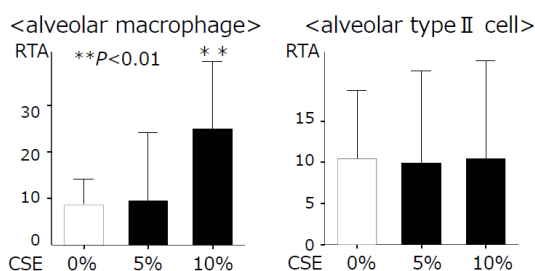


図4 肺泡細胞に対する喫煙刺激におけるテロメラーゼ活性

#### COPD 患者における解析

COPD 患者のテロメラーゼ活性の測定に関しては倫理面から直接測定はできないため、COPD を有する患者の肺標本において蛍光免疫染色で TERT 発現をスクリーニングしたところ、肺泡マクロファージにおいて TERT 発現の上昇が認められたが、検体数がごくわずかであるため、検体数を増やして解析する必要があると判断した。

上記の結果により、喫煙誘導肺気腫モデルマウスでは肺泡マクロファージにおける TERT 活性が上昇し、テロメラーゼ活性が亢進し、テロメア長の短縮を抑制することが確認された。その結果、肺泡マクロファージの寿命が延長し、炎症が持続することが示唆された。COPD における慢性炎症の一因と考えられ、肺泡マクロファージにおけるテロメラーゼ活性を抑制する新規治療が期待される。

<引用文献>

1. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, et al. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*. 2004;9(4):458-65.
2. Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest*. 2002;121(5):151-55.
3. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*. 2004;56(4):515-48.
4. Lim S, Roche N, Oliver BG, et al. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(4):1355-60.
5. Tomita K, Caramori G, Lim S, et al. Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-X(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(5):724-31.
6. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar Cell Senescence in Patients with Pulmonary Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:886-893.
7. Gizard F, Heywood EB, Findeisen HM, et al. Telomerase activation in atherosclerosis and induction of telomerase reverse transcriptase expression by inflammatory stimuli in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:245-252.

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 1 件)

上野 学, 前野 敏孝, 倉林 正彦、肺気腫におけるテロメラーゼ解析と新規治療への応用, 別冊 BIO Clinica VOL.6, 2017, 106-110

〔学会発表〕(計 1 件)

上野 学, 他, COPDにおけるテロメラーゼ解析と病態意義, 第 56 回日本呼吸器学会学術

講演会, 2017(京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 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

上野 学 (MANABU, Ueno)

独立行政法人国立病院機構高崎総合医療  
 センター臨床研究部・呼吸器内科医長

研究者番号: 70599563

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号:

(4)研究協力者

なし ( )