

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390221
 研究課題名 (和文) 難治性気道疾患への新たな挑戦—病態、診断、治療へのアプローチ—
 研究課題名 (英文) New challenges to chronic airway diseases - pathogenesis, diagnosis and treatment-
 研究代表者
 西村 正治 (NISHIMURA MASAHARU)
 北海道大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：00208224

研究成果の概要：

難治性の気道疾患という観点から慢性閉塞性肺疾患 (Chronic obstructive pulmonary disease: COPD) と気管支喘息をとらえ、その克服をめざしたものである。近年、酸化ストレスが、COPD、気管支喘息の病態に様々な形で関与すると考えられており、具体的には 1) 治療標的の特定を目指す病態の解明、2) 低侵襲的気道病態の評価法の開発 (新規酸化ストレスバイオマーカー・3 次元的気道画像解析)、3) 抗酸化剤治療介入へ向けての基礎的研究、4) 北海道 COPD コホート研究という 4 つのプロジェクトからなる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：酸化ストレス、気道炎症、気管支喘息、動物モデル、喫煙

1. 研究開始当初の背景

COPD は、長年の喫煙歴を持つ中高年者に発症し、慢性呼吸不全に至る疾患である。一方、喘息は慢性の炎症性気道疾患であり、一部の患者では徐々に気道リモデリングが進行し閉塞性障害が非可逆的になる。この両者は基本的には別の疾患であるが、オーバーラップした病態、あるいは両者が合併した病態が存在する。このような背景から難治性の気道疾患という観点から両疾患をとらえ、慢性的酸化ストレスという病態の側面から両疾患の治療的介入をめざす。

2. 研究の目的

治療標的の特定を目指す病態の解明：
 本研究では catalase と Nrf2 の二つの分子に注目し、気道の酸化ストレスに直接関与する役割を動物実験と臨床研究の双方から検証する。① catalase 欠損マウスを用いて catalase が気腫化、気管支喘息の病態形成に直接関与するか否かを評価する、② COPD、気管支喘息患者の細気管支上皮を検体として、転写因子 Nrf2 の発現を定量し、catalase 遺伝子発現低下との関連を検討する。
 2) 低侵襲的気道病態の評価法の開発・新規

酸化ストレスバイオマーカー

不可逆的に安定した酸化ストレスマーカーであるカルボニル蛋白とと比較的不安定で一過性の酸化ストレスを反映するグルタチオン化蛋白に注目し、種々の気道炎症に伴う酸化ストレスを評価する。

3) Polyphenols のもつ Nrf2 活性増強効果の in vitro, in vivo の検討

in vitro において Nrf2 に対する siRNA を導入し、下流の抗酸化遺伝子の発現を上昇させることが可能か否かを検討する。LCM を用い、喘息・喫煙曝露モデルにおける curcumin と CAPE 投与効果を細気管支上皮における抗酸化遺伝子群の発現増強という定量的指標を用いて評価する。

4) 北海道 COPD コホート研究の継続

種々の病型分類に基づいた COPD の自然歴をみる。毎月の急性増悪のチェック、半年毎の可逆性検査を含む呼吸機能検査、毎年の肺 CT 検査を行う。

3. 研究の方法

・気道上皮細胞株を用いた curcumin, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) 有効性の検討
BEAS-2B 細胞を用い過酸化水素または、タバコ煙抽出液曝露後、Nrf2 蛋白の核内移行、Nrf2 関連遺伝子の発現変化の検討を行う。Nrf2 に対する siRNA を導入し酸化ストレス応答遺伝子発現に対する影響を確認する。

・短期、長期喫煙曝露、OVA 誘発喘息モデルにおける curcumin, CAPE 有効性の検討
喘息・喫煙曝露モデルにおいて、細気管支上皮特異的に抗酸化遺伝子の発現増強の有無を in vivo で比較する。特に、喫煙マウスについては、喫煙曝露後細気管支上皮において低下する抗酸化遺伝子群に注目し、これらの発現が上昇しうるか否かを指標とする。

・北海道 COPD コホート研究の継続
1 秒量の経年変化、急性増悪の頻度、QOL の経年変化、生命予後などを計測項目として、種々の病態、病型に基づいた解析を行う。

4. 研究成果

・COPD、気管支喘息患者の気道上皮における酸化還元関連物質、関連遺伝子の発現：
COPD 患者の細気管支上皮、マクロファージを検体として、転写因子 Nrf2 の発現を定量し、その標的抗酸化遺伝子発現低下との関連を検討し論文として報告した。

・COPD、気管支喘息患者の喀痰中酸化ストレスマーカーの測定：

当院通院中の喘息患者、健常ボランティアから喀痰を採取し、分子量別にカルボニル化蛋白を半定量化した。臨床的データ、喀痰中の炎症細胞、他の酸化ストレスマーカーとの比較検討を行った。

・OVA 誘発気管支喘息モデルにおける炎症と

経時的酸化ストレス変化の評価

C57/BL6 マウスに OVA 誘発気管支喘息モデルの気管支肺胞洗浄液中カルボニル化蛋白を定量し、気道炎症細胞出現との関連を評価し論文報告した。

・気管支喘息の 3 次元的气道画像解析の方法
気管支喘息患者対象に、3D-CT を施行した。画像上の変化と臨床症状、呼吸機能検査、喀痰中のバイオマーカーとの関連を分析した。

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 14 件)

- 1) Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Odajima N, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M. :” Curcumin attenuates elastase- and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice”, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296: 614-623 (2009) , 査読:有
- 2) Hasegawa M, Makita H, Nasuhara Y, Nagai K, Ito Y, Odajima N, Betsuyaku T, Nishimura M. :” Relationship between improved airflow limitation and changes in airway caliber induced by inhaled anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease”, *Thorax*, 64:332-338 (2009) , 査読:有
- 3) Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M. :” Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM”, *Respir Med*, 103: 124-129 (2009) 査読:有
- 4) Ito Y, Betsuyaku T, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M. :” Aging affects lipopolysaccharide-induced upregulation of heme oxygenase-1 in the lungs and alveolar macrophages”, *Biogerontology*, 10(2) : 173-180 (2009) 査読:有
- 5) Nagai K, Betsuyaku T, Konno S, Ito Y, Nasuhara Y, Hizawa N, Kondo T, Nishimura M. :” Diversity of protein carbonylation in allergic airway inflammation”, *Free Radic Res*, 42: 921-929 (2008) 査読:有
- 6) Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Nishimura M. :” Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease”, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39:673-682 (2008) 査読:有

- 7) Hizawa N, Makita H, Nasuhara Y, Hasegawa M, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Konno S, Nishimura M; Hokkaido COPD Cohort Study Group.:” Functional single nucleotide polymorphisms of the CCL5 gene and nonemphysematous phenotype in COPD patients”, *Eur Respir J*, 32:372-378 (2008) 査読:有
- 8) Hizawa N, Makita H, Nasuhara Y, Hasegawa M, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Konno S, Nishimura M; the Hokkaido COPD Cohort Study Group.:” Functional SNPs of the CCL5 gene and non-emphysematous phenotype in patients with COPD”, *Eur Respir J*, 32:372-378 (2008) 査読:有
- 9) Hizawa N, Betsuyaku T, Itoh Y, Nagai K, Hasegawa M, Nasuhara Y, Nishimura M. : ” Beta2-adrenergic receptor genetic polymorphisms and short-term bronchodilator responses in patients with COPD”, *Chest*, 132: 1485- 1492 (2007) 査読:有
- 10) Ito Y, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M.:” Lipopolysaccharide - induced neutrophilic inflammation in the lungs differs with age”, *Exp Lung Res*, 33:375-384 (2007) 査読:有
- 11) Makita H, Nasuhara Y, Nagai K, Ito Y, Hasegawa M, Betsuyaku T, Onodera Y, Hizawa N, Nishimura M; Hokkaido COPD Cohort Study Group.:” Characterisation of phenotypes based on severity of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease”, *Thorax*, 62:932-937 (2007) 査読:有
- 12) Nagai K, Betsuyaku T, Suzuki M, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Nishimura M.:” Dual oxidase 1 and 2 expression in airway epithelium of smokers and patients with mild/moderate chronic obstructive pulmonary disease”, *Antioxid Redox Signal*, 10: 705-714 (2007) 査読:有
- 13) Betsuyaku T, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Mitsuhashi H, Adair-Kirk TL, Senior RM, Nishimura M.:” Bronchiolar chemokine expression is different after single versus repeated cigarette smoke exposure”, *Respir Res*, 9:7 (2007) 査読:有
- 14) Suzuki M, Betsuyaku T, Nagai K, Fuke S, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nishimura M.:” Decreased airway expression of vascular endothelial growth factor in cigarette

smoke-induced emphysema in mice and COPD patients”, *Inhal Toxicol*, 20: 349-359 (2007) 査読:有

[学会発表] (計 30 件)

- 1) Suzuki M, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Adair-Kirk TL, Nguyet M, Nguyen, Senior RM, Nishimura M: Proteomic Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) from Subjects with Pulmonary Emphysema, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008.6.16, 神戸: 神戸コンベンションセンター
- 2) 長井 桂, 別役智子, 今野 哲, 伊藤洋子, 南須原康行, 檜澤伸之, 西村正治: アレルギー性気道炎症モデル及び喘息患者における気道被覆液中のカルボニル化蛋白の検討, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008.6.16, 神戸: 神戸コンベンションセンター
- 3) 小田島奈央, 別役智子, 南須原康行, 西村正治: 線維化肺における catalase 発現の検討, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008.6.16, 神戸: 神戸コンベンションセンター
- 4) 長谷川大, 南須原康行, 牧田比呂仁, 別役智子, 西村正治: COPDの気流制限に及ぼす3次元CT画像で評価した気腫病変と気道病変の関与, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008.6.16, 神戸: 神戸コンベンションセンター
- 5) 守山千夏, 別役智子, 伊藤洋子, 南須原康行, 西村正治: 単回喫煙暴露マウスモデルでの好中球性炎症および細気管支上皮のケモカイン産生におよぼす加齢の影響, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008.6.16, 神戸: 神戸コンベンションセンター
- 6) 清水薫子, 南須原康行, 長谷川 大, 牧田比呂仁, 今野 哲, 別役智子, 西村正治: 臨床安定期の中・高年気管支喘息患者における気流制限と肺CT3次元気道解析でみた気道病変との関係, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008.6.16, 神戸: 神戸コンベンションセンター
- 7) Betsuyaku T, Moriyama C, Ito Y, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nasuhara Y, Nishimura M: Progressive Infiltration of Lymphocytes and Upregulation of MIP-3alpha/CCL20 after Cessation of Cigarette Smoke (CS) Exposure in Aged Mice, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE

- 8) Ito Y, Betsuyaku T, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M: Aging Affects Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Upregulation of Heme Oxygenase-1 (HO-1) in the Lungs and Alveolar Macrophages (AMs), The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 9) Nagai K, Betsuyaku T, Konno S, Ito Y, Nasuhara Y, Hizawa N, Kondo T, Nishimura M: Eosinophils Mediate Albumin Carbonylation in the Epithelial Lining Fluid during Allergic Airway Inflammation, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 10) Hasegawa M, Nasuhara Y, Makita H, Betsuyaku T, Nishimura M: Contribution of Airway Disease and Emphysema to Airflow Limitation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Assessed by Three-dimensional Computed Tomography, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 11) Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M: Decreased Catalase Expression in Bronchiolization and Squamous Metaplasia in Lung Fibrosis, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 12) Suzuki M, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Adair-Kirk T, Nguyen NM, Senior RM, Nishimura M: Laminins alpha5 and gamma2 and VEGF Are Down-Regulated in Lung in Cigarette Smoke (CS)-Exposed Mice and Emphysema Subjects, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 13) Moriyama C, Betsuyaku T, Ito Y, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nasuhara Y, Nishimura M: Aged Mice Exhibit Enhanced Expression of Chemokines in Bronchiolar Epithelium and Rapid Neutrophil Accumulation in Response to Single Cigarette Smoke (CS) Exposure, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 14) Shimizu K, Nasuhara Y, Hasegawa M, Makita H, Konno S, Betsuyaku T, Nishimura M: Relationship between airflow limitation and wall area, airway luminal area measured by three-dimensional computed tomography in bronchial asthma, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 15) Hayashi M, Yamagata A, Oofusa K, Takada T, Betsuyaku T, Nishimura M, Nakata K: Proteomic Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) from Subjects with Pulmonary Emphysema, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008.5.20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 16) Betsuyaku T, Hamamura I, Hata J, Mitsuhashi H, Adair-Kirk TL, Griffin GL, Senior RM, Nishimura M: Catalase mRNA expression in bronchiolar epithelium in mice is up-regulated by acute cigarette smoke (CS) exposure and down-regulated by chronic CS exposure, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007.5.18, San Francisco USA: Moscone Center
- 17) Hasegawa M, Nasuhara Y, Makita H, Onodera Y, Betsuyaku T, Nishimura M: Relationship of Emphysema with Airway Dimensions in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007.5.18, San Francisco USA: Moscone Center
- 18) Ito Y, Betsuyaku T, Nagai K, Suzuki M, Nasuhara Y, Nishimura M: Impaired Cigarette Smoke Extract (CSE)-induced Upregulation of Heme Oxygenase-1 (HO-1) in Alveolar Macrophages (AMs) but not in Peritoneal Macrophages (PMs) in Aged Mice, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007.5.18, San Francisco USA: Moscone Center
- 19) Ito Y, Betsuyaku T, Nagai K, Suzuki M, Nasuhara Y, Nishimura M: Diverse

- Expression of Phosphatidylserine Receptor (PSR) and Vitronectin Receptor (VnR) in Monocytic Cell Lineage and Alveolar Macrophages (AMs) in Smokers, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 18, San Francisco USA: Moscone Center
- 20) Moriyama C, Betsuyaku T, Ito Y, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Mitsuhashi H, Nasuhara Y, Nishimura M: Aged mice exhibit enhanced neutrophilic inflammation after short-term cigarette smoke (CS) exposure, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 18, San Francisco USA: Moscone Center
- 21) Nagai K, Betsuyaku T, Suzuki M, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M: Dual function NADPH oxidase/heme peroxidase (Duox) 1 and 2 Expression in Airway Epithelium in Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 18, San Francisco USA: Moscone Center
- 22) Nagai K, Betsuyaku T, Konno S, Ito Y, Nasuhara Y, Hizawa N, Nishimura M: Increase of Sputum Protein Carbonyls as an Oxidative Stress Marker in Asthma, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 18, San Francisco USA: Moscone Center
- 23) Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Nishimura M: NF-E2-related factor 2 (Nrf2) expression in pulmonary macrophages of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 18, San Francisco USA: Moscone Center
- 24) Odajima N, Bestuyaku T, Suzuki M, Hosokawa T, Nasuhara Y, Nishimura M: Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) is Highly Expressed in Lymphangiomyomatosis (LAM), The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 18, San Francisco USA: Moscone Center
- 25) 伊藤洋子, 別役智子, 長井 桂, 鈴木 雅, 南須原康行, 西村正治: Impaired Cigarette Smoke Extract-induced Upregulation of Heme Oxygenase-1 (HO-1) in Alveolar Macrophages but not in Peritoneal Macrophages in Aged Mice, 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 10, 東京: 東京国際フォーラム
- 26) 鈴木 雅, 別役智子, 伊藤洋子, 長井 桂, 南須原康行, 加賀基地三, 近藤 哲, 西村正治: NF-E2-related factor 2 (Nrf2) expression in pulmonary macrophages of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 10, 東京: 東京国際フォーラム
- 27) 長井 桂, 別役智子, 鈴木 雅, 伊藤洋子, 南須原康行, 西村正治: Dual function NADPH oxidase/heme peroxidase (Duox) 1 and 2 Expression in Airway Epithelium in Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 10, 東京: 東京国際フォーラム
- 28) 長谷川 大, 南須原康行, 牧田比呂仁, 小野寺祐也, 別役智子, 西村正治: Relationship of Emphysema with Airway Dimensions in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 10, 東京: 東京国際フォーラム
- 29) 守山千夏, 別役智子, 伊藤洋子, 南須原康行, 西村正治: 短期喫煙暴露モデルにおける好中球性炎症に対する加齢の影響, 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 10, 東京: 東京国際フォーラム
- 30) 小田島奈央, 別役智子, 鈴木 雅, 細川剛, 南須原康行, 西村正治: Lymphangiomyomatosis (LAM)における Extracellular Matrix Metalloproteinase (EMMPRIN) 発現の検討, 第 104 回日本内科学会, 2007. 4. 3, 大阪: 大阪国際会議場
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
西村 正治 (NISHIMURA MASAHARU)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 00208224
- (2) 研究分担者
檜澤 伸之 (HIZAWA NOBUYUKI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号: 00301896
別役 智子 (BETSUYAKU TOMOKO)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60333605
南須原 康行 (NASUHARA YASUYUKI)
北海道大学病院・准教授
研究者番号: 30322811

(3)連携研究者
なし