

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590890

研究課題名（和文） 慢性喫煙と加齢が肺胞マクロファージのアポトーシス細胞貪食能に与える影響

研究課題名（英文） The effect of aging and smoking on the phagocytosis of apoptotic cells in alveolar macrophages

研究代表者

南須原 康行 (NASUHARA YASUYUKI)

北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号：30322811

研究成果の概要（和文）：マクロファージの細胞表面に発現するアポトーシス細胞の認識/貪食に関わる受容体が、喫煙や加齢の影響でどのように修飾を受けるのかを検討した。非喫煙者では加齢により、肺胞マクロファージ（AM）の phosphatidylserine receptor (PSR) や scavenger receptor A (SR-A) の発現は上昇したが、中高年では喫煙者の PSR, SR-A 発現は同年齢の非喫煙者と比較し低値であった。また、分化誘導したマクロファージ様の単球系細胞 U937 において、タバコ抽出液曝露にて PSR の発現が増強することを示した。この PSR 発現は Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor blocker である SU5416 により濃度依存性に抑制された。このことはマクロファージのアポトーシス細胞貪食能に VEGF が PSR 発現を介して間接的に関与していることを示唆する。

研究成果の概要（英文）： Our aims of this study are to examine expressions of various receptors for recognition and/or clearance of apoptotic cells on macrophages and assess the relationship with aging and/or smoking. The expression of phosphatidylserine receptor (PSR) and scavenger receptor A (SR-A) in alveolar macrophages was downregulated in smokers when compared to lifelong non-smokers only in the older subjects, but not in younger subjects. The expression of PSR is elevated on U937-derived macrophage like cells if these are incubated in CSE. The cigarette smoke extract-induced upregulation of PSR was inhibited by the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor blockade, SU5614, in U937-derived macrophage-like cells. These results showed that VEGF was indirectly associated with the ability to phagocytose apoptotic cells through the expression of PSR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：閉塞性肺疾患、マクロファージ、喫煙、アポトーシス、炎症

1. 研究開始当初の背景

慢性喫煙と加齢は肺気腫発症の主要な危険因子である。肺気腫においては、肺内に多くのアポトーシス細胞が認められ、このことが、病態形成に重要であることが報告されている。その機序のひとつとして、肺気腫患者の肺胞マクロファージは、アポトーシスに陥った細胞を処理する能力が低下している可能性が示唆されている (Hodge S, Immunol Cell Biol, 2003)。しかし、マクロファージの細胞表面に発現するアポトーシス細胞の認識/貪食に関わる様々な受容体が、喫煙や加齢の影響でどのように修飾を受けるのか、また、それぞれの相対的重要性など、詳細なメカニズムは不明な点が多い。われわれは、肺気腫の病態形成におけるマクロファージの役割について、気管支肺胞洗浄法 (bronchoalveolar lavage (BAL)) を用いて、これまで様々な視点から臨床的研究を積み重ねてきた (Betsuyaku, Am J Respir Cirt Care Med, 1995) (Betsuyaku, Am J Respir Cirt Care Med, 1999) (Betsuyaku, Eur Respir J, 2002) (Betsuyaku, Am J Respir Cirt Care Med, 2003) (Nagai, Eur Respir J, 2005)。また、長期の喫煙歴のある中高齢喫煙者の BAL 液上清では、同年代の非喫煙者と比較して、サーファクタント蛋白 (surfactant protein -A, -D) の濃度が低下すること (Betsuyaku, Eur Respir J, 2004)、酸化型グルタチオンやカルボニル蛋白の上昇が見られ慢性的酸化ストレス状態にある (Nagai, Thorax, 2006) ことを明らかにした。これらの検討から、加齢が肺の喫煙刺激に対する防御機構に影響していると考えられることができる。そこで、加齢が肺の防御機構におよぼす影響について、動物モデルを用いて併行して検討を進めてきた。急性肺障害マウスモデルでは、高齢マウスでは若年マウスに比べ、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現が低下していること (Ito, Exp Gerontol, 2005)、ケモカインの上昇と好中球炎症が遷延すること (Ito, Exp Lung Res, 2007) を報告した。

一方、われわれは、世界に先駆け laser capture microdissection (LCM) の技術を駆使した各種細胞特異的の遺伝子発現解析において実績をあげている。動物およびヒトの細気管支上皮の遺伝子発現 (Betsuyaku, Am J Respir Cell Mol Biol, 2001) (Betsuyaku, Micron, 2004) から、近年は、immuno-LCM の技術を応用し、肺のマクロファージの検討を可能にした (Fuks, Am J Respir Cell Mol Biol, 2004)。

以上のことより、マクロファージ上にあるアポトーシス細胞の認識/除去に関わる受容体の発現が、加齢や喫煙刺激により影響を受け

るために肺気腫患者の肺胞マクロファージのアポトーシス細胞貪食能が低下するのではないかと、さらに、それら受容体の発現は、加齢や喫煙刺激により影響を受ける様々な因子 (炎症性サイトカイン、ケモカイン、各種成長因子、抗酸化物質など) によって調節されているのではないかとという着想に至った

2. 研究の目的

(1) ヒトボランティアの肺胞マクロファージを用いて、アポトーシス細胞認識/貪食レセプターの発現が年齢、喫煙歴、気腫性変化の有無によってどのように修飾を受けるかを明らかにする。

(2) ヒトボランティア BAL 液を用いて、アポトーシス細胞認識/貪食レセプターとアポトーシス細胞を結ぶ bridging protein 量の年齢、喫煙歴、気腫性変化の有無による変化を明らかにする。

(3) マウス慢性喫煙暴露肺気腫モデルを用いて (1) (2) の検討結果をもとに、慢性喫煙、加齢、喫煙感受性の違いによる肺胞マクロファージのアポトーシス細胞貪食能への影響を検証する。

3. 研究の方法

ヒトボランティア (年齢、喫煙歴、気腫性変化の有無で分類) の肺胞マクロファージを用いた、アポトーシス細胞認識/貪食レセプターの発現の検討。RT-PCR 法を用いて肺胞マクロファージのアポトーシス細胞認識/貪食レセプターの遺伝子発現を若年非喫煙者および喫煙者、中高年者非喫煙者および喫煙者 (気腫性変化の有無) の 5 群で比較検討する。喫煙刺激によるアポトーシス関連遺伝子発現の検討のため、人末梢血単球と肺胞マクロファージを採取し、未刺激およびタバコ煙の曝露にての PSR 発現の変化を検討する。この発現亢進がマクロファージに内在する VEGF の依存性か否かを調べる目的で、VEGF receptor blocker を用いて、PSR の発現が抑制されるか否かを検討した。加齢によるアポトーシス関連遺伝子発現の検討のため C57BL6/J の adult マウス (39-45 週令) と old マウス (95-107 週令) 及び ICR の adult マウス (37-44 週令) と old マウス (81-89 週令) の肺胞マクロファージを分離し、タバコ抽出液を曝露した際の PSR 発現を比較した。

4. 研究成果

加齢により、AM の phosphatidylserine receptor (PSR), vitronectin receptor, calreticulin, scavenger receptor A (SR-A) 発現は上昇し、若年者の中では、喫煙者 AM では、calreticulin, SR-A, CD14 発現は非喫

煙者に比較し上昇するが、一方中高年では喫煙者の PSR, vitronectin receptor, SR-A 発現は低下した。単球系細胞 U937 において、PMA での分化誘導にて PSR 発現が誘導され、人末梢血単球に比べ肺胞マクロファージでは mRNA、蛋白レベルにおいて PSR の発現が高いことを示した。さらに、タバコ抽出液曝露にてさらに発現が増強することを示した。マクロファージにおけるタバコ抽出液曝露にて亢進する PSR 発現は SU5416 により濃度依存性に抑制された。C57BL6/J と ICR のどちらの strain も無刺激では週令の違いによる肺胞マクロファージ PSR の mRNA 発現に差を認めなかったが、タバコ抽出液の曝露にて adult マウスは PSR の mRNA 発現が亢進したのに対し old マウスでは adult マウスと比較し PSR の mRNA 発現が有意に低下していた。

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 24 件)

- ① Atkinson JJ, Lutey BA, Suzuki Y, Toennies HM, Kelley DG, Kobayashi DK, Ijem WG, Deslee G, Moore CH, Jacobs ME, Conradi SH, Gierada DS, Pierce RA, Betsuyaku T, Senior RM. The Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Cigarette Smoke-induced Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 183, 876-884, 2011. 査読有
- ② Odajima N, Betsuyaku T, Nagai K, Moriyama C, Wang DH, Takigawa T, Ogino K, Nishimura M. The role of catalase in pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*. 11, 183, 2011. 査読有
- ③ Odajima N, Betsuyaku T, Yoshida T, Hosokawa T, Nishimura M. High levels of extracellular matrix metalloproteinase inducer are expressed in lymphangioleiomyomatosis. *Hum Pathol*. 41. 935-943, 2010. 査読有
- ④ Deslee G, Adair-Kirk TL, Betsuyaku T, Woods JC, Moore CH, Gierada DS, Conradi SH, Atkinson JJ, Toennies HM, Battaile JT, Kobayashi DK, Patterson GA, Holtzman MJ, Pierce RA. Cigarette smoke induces nucleic-acid oxidation in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 43, 576-584, 2010. 査読有
- ⑤ Shimizu K, Hasegawa M, Makita H, Nasuhara Y, Konno S, Nishimura M. Airflow limitation and airway

dimensions assessed per bronchial generation in older asthmatics. *Respir Med*. 104, 1809-1816, 2010. 査読有

- ⑥ Shigemura M, Nasuhara Y, Konno S, Hattori T, Shimizu C, Matsuno K, Nishimura M. Levels of transferrin in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis. *Lung*. 2010, 188, 151-157. 査読有
- ⑦ Moriyama C, Betsuyaku T, Ito Y, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nasuhara Y, Nishimura M. Aging enhances susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation through bronchiolar chemokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010, 42, 304-311. 査読有
- ⑧ 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*. 2009, 296, L614-L623. 査読有
- ⑨ 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*. 2009, 10, 173-180. 査読有
- ⑩ Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M. Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM. *Respir Med*. 2009, 103, 124-129. 査読有
- ⑪ Hasegawa M, Makita H, Nasuhara Y, Odajima N, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M. Relationship between improved airflow limitation and changes in airway caliber induced by inhaled anticholinergic agents in COPD. *Thorax*. 2009, 64, 332-338. 査読有
- ⑫ Adair-Kirk TL, Atkinson JJ, Griffin GL, Watson MA, Kelley DG, DeMello D, Senior RM, Betsuyaku T. : "Distal airways in mice exposed to cigarette smoke: Nrf2-regulated genes are increased in Clara cells", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39, 400-411. 査読有

⑬Betsuyaku T, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Mitsushashi H, Adair-Kirk TL, Senior RM, Nishimura M. : “Bronchiolar chemokine expression is different after single versus repeated cigarette smoke exposure”, *Respir Res*, 9 : 7(2008). 査読有

⑭Hizawa N, Makita H, Nasuhara Y, Hasegawa M, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Konno S, Nishimura M; the Hokkaido COPD Cohort Study Group. : “Functional single nucleotide polymorphisms of the CCL5 gene and nonemphysematous phenotype in COPD patients”, *Eur Respir J*, 32(2) : 372-378(2008). 査読有

⑮Hosokawa T, Betsuyaku T, Odajima N, Suzuki M, Mochitate K, Nasuhara Y, Nishimura M. : “Role of basement membrane in EMM PRIN/CD147 induction in rat tracheal epithelial cells”, *Biochem Biophys Res Commun*, 368(2) : 426-432(2008). 査読有

⑯Nagai 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(4) : 705-714(2008). 査読有

⑰Nagai 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(11-12) : 921-929(2008). 査読有

⑱Suzuki 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(3) : 349-359(2008). 査読有

⑲Suzuki 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(6) : 673-682(2008). 査読有

〔学会発表〕 (計 32 件)

1. 清水薫子, 長谷川 大, 牧田比呂仁, 南須原康行, 今野 哲, 西村正治. 臨床安定期の中・高年気管支喘息患者における肺 CT3 次元気道解析でみた気道病変と気流閉塞との関係. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会. 2010 年 4 月 25 日. 国立京都国際会館(京都).

2. 守山千夏, 別役智子, 西村正治. 加齢、短期間喫煙曝露、その後の禁煙が細気管支上皮における micro RNA (miRNA) プロファイルに及ぼす影響. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会. 2010 年 4 月 25 日. 国立京都国際会館(京都).

3. 吉田貴之, 高 叢笑, 別役智子, 太田芙美, 松本明郎, 西村正治, 谷口直之. MMP 活性阻害能を有するグリコサミノグリカン (Glycan X) のエラスターゼ誘導マウス肺気腫モデルにおける抗炎症および気腫形成抑制効果の検討. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会. 2010 年 4 月 25 日. 国立京都国際会館(京都).

4. 南須原康行. 呼吸器疾患のリスクマネジメント. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会教育講演 10. 2010 年 4 月 24 日. 国立京都国際会館(京都).

5. Inomata T, Betsuyaku T, Odajima N, Nagai K, Yoshida T, Moriyama C, Maki K, Nishimura M. The role of catalase in cigarette smoke (CS) -induced pulmonary inflammation and emphysema in murine model. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会. 2010 年 4 月 23 日. 国立京都国際会館(京都).

6. Konno S, Makita H, Hasegawa M, Shimizu K, Taniguchi N, Nasuhara Y, Betsuyaku T, Nishimura M. Association of $\beta 2$ -adrenoreceptor genotype with bronchodilator responses (BDR) in COPD. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会. 2010 年 4 月 23 日. 国立京都国際会館(京都).

7. Yoshida T, Gao C, Betsuyaku T, Ota F, Matsumoto A, Nishimura M, Taniguchi N. Glycan X, a keratan sulfate oligosaccharide, attenuates elastase-induced lung inflammation and emphysema in mice. The 106th American Thoracic Society International Conference. 2010 May 17th New Orleans USA.

8. Nagai K, Betsuyaku T, Nishimura M. Aging affects the airway expression of Nrf2 in response to cigarette smoke. The 106th American Thoracic Society International Conference. 2010 May 15th. New Orleans, USA.

9. 牧田比呂仁, 長井 桂, 南須原康行, 長谷川 大, 守山千夏, 別役智子, 西村正治. 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の自然歴に関する研究—北海道 COPD コホート研究 4 年後の追跡調査—第 107 回日本内科学会総会. 2010 年 4 月 9 日. 東京国際フォーラム (東京) .

10. Inomata T, Betsuyaku T, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M. Catalase expression in pulmonary macrophages of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. The 105th American Thoracic Society International Conference. 2009 May 17th The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States.

11. Nagai K, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Kondo T, Nishimura M. Protein S-glutathionylation in the Epithelial Lining Fluid during Allergic Airway Inflammation. The 105th American Thoracic Society International Conference. 2009 May 17th The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States.

12. Odajima N, Betsuyaku T, Inomata T, Yoshida T, Moriyama C, Suzuki K, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M. Duration of cigarette smoke (CS) exposure affects the resolution of lung inflammation after cessation in mice. 2009 May 17th The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States.

13. Yoshida T, Betsuyaku T, Nagai K, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M. Kinetics of various oxidative stress markers in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in lipopolysaccharide (LPS) induced lung injury. 2009 May 17th The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States.

14. Yoshida T, Betsuyaku T, Nagai K, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M. Kinetics of various oxidative stress markers in

bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in lipopolysaccharide (LPS) induced lung injury. 第 49 回日本呼吸器学会. 2009 年 6 月 13 日. 東京: 東京国際フォーラム.

15. Inomata T, Betsuyaku T, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M. Catalase expression in pulmonary macrophages of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. 第 49 回日本呼吸器学会. 2009 年 6 月 13 日. 東京: 東京国際フォーラム.

16. 長井桂, 別役智子, 南須原康行, 近藤宇史, 西村正治. アレルギー性気道炎症モデルにおける気道被覆液中のグルタチオン化蛋白の検討. 第 49 回日本呼吸器学会. 2009 年 6 月 13 日. 東京: 東京国際フォーラム.

17. Hasegawa M, Nasuhara Y, akita H, Odajima N, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M. Relationship between improved airflow limitation and changes in airway caliber induced by inhaled anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. 第 49 回日本呼吸器学会 2009 年 6 月 14 日. 東京: 東京国際フォーラム.

18. 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 May 20th, Toronto Canada.

19. 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 May 20th, Toronto Canada.

20. 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 May 20th, Toronto Canada.

21. 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 May 20th, Toronto Canada.

22. 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 May 20th, Toronto Canada.

23. 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 May 20th, Toronto Canada

24. 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 May 20th, Toronto Canada

25. Suzuki M, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Adair-Kirk T, Nguyen MN, 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 May 20th, Toronto Canada.

26. Fuke S, Makita H, Hasegawa M, Nasuhara Y, Betsuyaku T, Nishimura M; Hokkaido COPD Cohort Study Group: Annual decline in

forced expiratory volume in 1 sec (FEV1) in patients with COPD before and after introduction of tiotropium, European Respiratory Society Annual Congress 2008, 2008 Oct 7th, Berlin Germany.

27. Nasuhara Y, Makita H, Nagai K, Betsuyaku T, Nishimura M, The Hokkaido COPD Cohort Study Group: Body mass index is an independent risk factor for exacerbation in patients with COPD, European Respiratory Society Annual Congress 2008, 2008 Oct 7th, Berlin Germany.

28. Hasegawa M, Nasuhara Y, Makita H, Odajima N, Ito Y, Nagai K, Betsuyaku T, Nishimura M: Bronchodilation response assessed by computed tomography in chronic obstructive pulmonary disease (COPD), European Respiratory Society Annual Congress 2008, 2008 Oct 5th, Berlin Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 洋子 (ITO YOKO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 90286451
(H18)

南須原 康行 (NASUHARA YASUYUKI)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号: 30323811
(H18~H22)

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし