

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08521

研究課題名（和文）複合的オミクス解析を用いて探る、肺胞微石症の分子病態と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Exploring the Molecular Pathogenesis of Pulmonary Alveolar Microlithiasis and Developing Novel Therapeutic Approaches Using Integrated Omics Analysis

研究代表者

齋藤 充史（SAITO, ATSUSHI）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00768939

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肺胞微石症モデルマウスを用いたリポドミクス解析において、アラキドン酸などエイコサノイドとCOX-2が著明に上昇しており、下流シグナルであるPGE2、LXA4などの抗炎症性メディエーターの増加を有意に認め、微石形成に伴う肺内の炎症を抑制していることが確認された。またCOX-2発現は以前報告したリン吸着剤による治療で有意に低下し同治療法の有効性も再確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺胞微石症のような超希少疾患は対象患者が少ないこともあり、研究者も少なく病態解明がなかなか進まないことが多い。本研究ではマウスモデルを用いることで新たに病態解明を進めることができた。本研究の結果は今後臨床応用されることで本疾患に苦しむ患者に対する希望となると考える。

研究成果の概要（英文）：PAM is a rare autosomal recessive lung disorder caused by genetic abnormalities in the Npt2b, leading to the formation of calcium phosphate stones within the alveolar spaces. Through pathogenesis analysis using a PAM mouse model, it was observed that intrapulmonary administration of clodronate liposomes increased microlith accumulation, suggesting the involvement of alveolar macrophages in microlith removal from the alveoli. Furthermore, lipidomics analysis revealed significant elevation of arachidonic acid and other eicosanoids, as well as COX-2. It was found that downstream signaling molecules such as PGE2 and LXA4, which are anti-inflammatory mediators, were significantly increased, indicating their role in suppressing inflammation in the lungs associated with microlith formation. Additionally, COX-2 expression was significantly decreased with the previously reported therapy involving phosphate-binding agents, reaffirming the effectiveness of this treatment approach.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：肺胞微石症 リン酸トランスポーター 希少肺疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は希少難治性呼吸器疾患に興味を持ち研究を進めてきた。その一環として肺胞微石症に対するマウスモデルを作製し新治療法の開発に取り組み (*Sci Trans Med*, 2015)、また特発性肺線維症に対する新たな視点として肺マイクロバイオームに着目した (*Resp Res*, 2018)。近年、こうした生体分子を網羅的に解析するオミクス解析の技術が急速に進展し、糖尿病、癌などの領域で有用な分子標的が数多く見つかっている。しかし希少疾患においては対象が限られることや予算の関係からオミクス解析の報告は極めて限定される。そのため、本研究では、申請者らが経験豊富なオミクス解析技術と肺胞微石症マウスモデルを用い、病態の分子基盤の解明・確立と臨床に直結するトランスレーショナルな成果を創出する。本研究の結果、当該技術が他の希少肺疾患の病態の分子基盤に関する研究の現状を打破する先駆技術と位置づけられ、希少難治性呼吸器疾患克服研究の推進に貢献することを目指す。

2. 研究の目的

臨床応用可能な治療法開発という最終目的に向けて以下の項目を達成することにある。

#1 臨床試験へ向けたレジストリの構築

超希少疾患のため本症の臨床試験は非常にハードルが高いが申請者の留学先であったシンシナティ大学と協力し低リン食・リン吸着剤を使用した臨床試験への準備を進める。

#2 オミクス解析を用いた分子病態の解明～線維化肺との比較を含めて～

・肺胞微石症モデルマウスにおけるタンパク質・脂質を網羅的に解析し、病態に関連した分子変化の洗い出しを主目的とする。同定された分子は新たな臨床マーカーとしての利用や当該分子を足がかりに新たな治療戦略を模索することが可能になる。

・同解析法を用い、プレオマイシン誘導肺線維化モデルマウスと比較することで、線維化を呈する両疾患で共通する分子機構/異なる分子機構を明らかとする。肺の線維化を含めた病態の理解の深化が期待できる。

#3 分子・細胞レベルでの病態解析；肺サーファクタントと肺胞マクロファージの解析

肺胞微石症における肺胞マクロファージの役割をさらに明瞭化して、分子・細胞レベルでの新治療開発の基盤とすることが目的である。

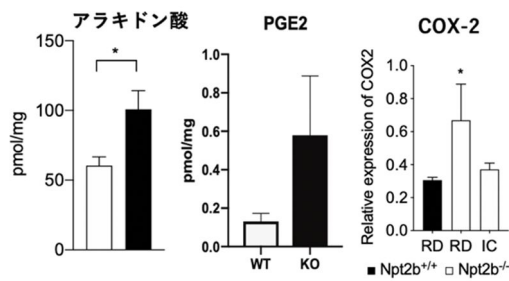
3. 研究の方法

#1 臨床試験へ向けたレジストリの構築

臨床応用への準備として全国調査で発見された国内の肺胞微石症患者様に対する情報提供を継続する。また来年度以降、国内の患者会の設立を目指す。RLDC (Rare Lung Disease Consortium, Cincinnati, USA)と共同で症例集積も継続する。

#2 オミクス解析を用いた肺胞微石症分子病態の解明

申請者はこれまで血清 MCP-1 や SP-D が病勢マーカーになりうるとの報告をしてきた。最近の検討で MCP-1 などの分子変化はごく一部であり、肺胞微石症の肺内では COX-2 や PGE3、オステオポエチンなどの多くの脂質やタンパク質分子に変化があることわかってきた(右図)。本項目においては、申請者と研究協力者の藤谷博士・高宮博士が間質性肺炎研究で確立したオミクス解析にて網羅的にタンパク質や脂質を解析し、正常と疾患マウスを比較す



肺胞微石症の肺内ではアラキドン酸、PGE2などが上昇。COX-2発現も増加している。COX-2はリン吸着剤治療で改善を認めた。

ることで、肺胞微石症における分子変化を確実に洗い出すことを主目標とする。さらに前述のリン酸吸着剤治療の有無での比較も追加し、それにより分子の変化がより明瞭となり重要な病態分子を洗い出せることが期待される。同定された分子は、新たな臨床マーカーとしての利用が考えられ、また疾患特異的な分子標的が特定されることは、#3 における分子・細胞レベルでの新治療法開発への足がかりとなる。

また申請者らのプレオマイシン誘導肺線維化モデルマウスを用いた間質性肺炎の実験で肺胞微石症類似の COX-2、PLA2 などの変化が観察された。肺胞微石症では線維化も伴うことから両難治性呼吸器疾患間で原因は違うもののフェノタイプは一部類似し、比較することで両疾患の病態の理解の深化が期待できる。難治性呼吸器疾患の病因について疾患間の違いという視点から検討した例は少なく新たな知見が得られる可能性は高い。

#3 新治療戦略を見据えた肺胞マクロファージの解析

#3 では病態に関与する肺胞マクロファージの役割を解明することを主目的とする。その際、特に#2 で同定された肺胞マクロファージに関連したタンパク質、リン脂質やその代謝産物の分子についても注目して解析を進める。前回申請研究では、肺胞マクロファージの微石貪食とクロドロン酸リポソームを用いた肺胞マクロファージ除去で肺内微石量が増加することが確認されたことから、肺胞マクロファージの病態への関与は強く疑われる。

本研究では特に M1/M2 分極化に着目して研究を進める。炎症性の M1 マクロファージと抗炎症性の M2 マクロファージでは異物に対する反応性も異なり、尿路結石では M2 優位で病態の改善が得られるとの報告がある (*Sci Rep* 6:35167, 2016)。肺胞微石症でも同様の結果が期待され、肺胞マクロファージの M1/M2 分極化についてフローサイトメトリーを用いて解析する。またサイトカイン投与で M1/M2 各マクロファージへ分化誘導し肺内微石量の増減について Vitro, Vivo 両面で検討する。将来的には、#2, 3 で得られた分子・細胞レベルの情報を基に肺胞蛋白症治療で検討されている肺胞マクロファージ活性化作用のある GM-CSF の吸入治療や M2 分化させたマクロファージの肺内移植など、新たな治療戦略の提唱を視野に研究を進めたい。

4. 研究成果

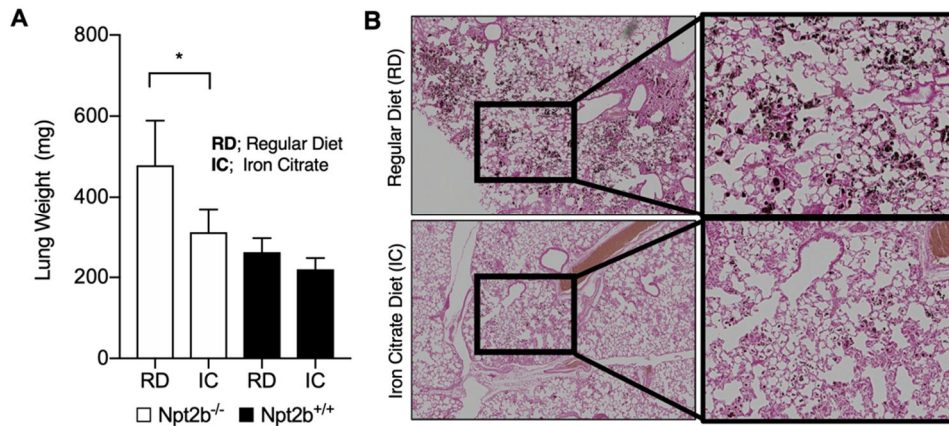
#1 臨床試験へ向けたレジストリの構築

京都大学 iPS 細胞研究所と共同で、全国調査で発見された国内の肺胞微石症患者の協力を得て、血液から肺胞微石症の iPS 細胞を作製するプロジェクトを推進した。現在、その研究が遂行中である。

#2 オミクス解析を用いた肺胞微石症分子病態の解明

#3 新治療戦略を見据えた肺胞マクロファージの解析

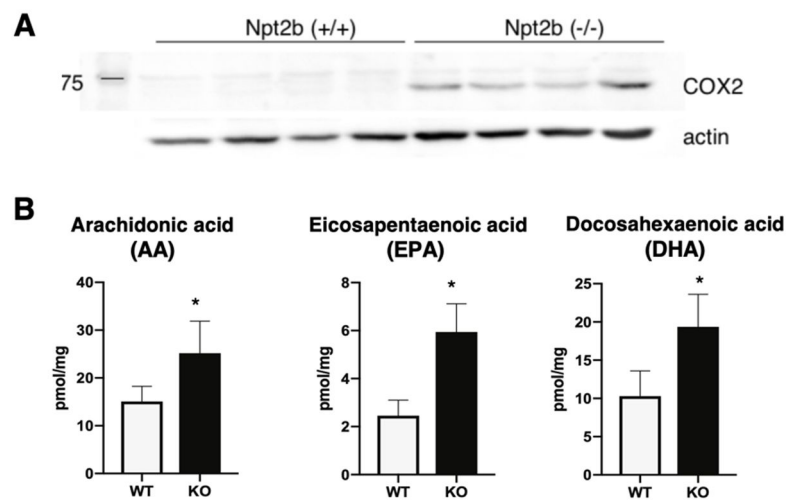
本研究では上記のモデルマウスにリン吸着作用のあるクエン酸第二鉄を投与し、肺内の微石の量を病理・肺重量を用いて検討した。結果、図 2A, B に示すように、リン吸着剤の内服はこれまでに報告した低リン食療法と同様に十分に病態を改善する効果が得られた。一般に、リン摂取量とタンパク質摂取量は相関することから、タンパク質摂取量を減らさずにリン摂取量を減らすことができる点が今後のヒトへ応用により有効であると考えられた。



また、肺胞微石症における基礎的病態解明では、肺破碎液中の Saturated Phosphatidylcholine の濃度上昇や泡沫状マクロファージが BALF 中に多数みられることから、肺における脂質代謝異常が示唆される。そこで次世代シーケンサーを用いたリポドミクス手法で本疾患における肺の脂質代謝についても解析をおこなった。

15 週齢の Npt2b 欠損マウスの肺では、炎症により誘導される Cyclooxygenase (COX)-2 の発現が亢進していた(図 3A)。またリポドミクス解析の結果、Npt2b 欠損マウスでは COX-2 の上流にある高度不飽和脂肪酸(Arachidonic acid (AA), Eicosapentaenoic acid (EPA), Docosahexaenoic acid (DHA))の産生量がいずれも亢進していた(図 3B)。これらの現象はクエン酸第二鉄を投与した場合、肺内の微石の蓄積

が顕著に低下とともに COX-2 の発現の低下や高度不飽和脂肪酸の低下も認められた。以上の結果から、Npt2b の欠損は肺内に微石の蓄積と COX-2 の発現上昇に伴う炎症性脂質メディエーターの産生亢進をもたらすが、これらはリン吸着剤の投与により抑制できることがわかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 黒沼幸治, 齋藤充史, 千葉弘文.	4. 巻 5(4)
2. 論文標題 特発性肺線維症における肺マイクロバイーム研究の展開.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 呼吸臨床	6. 最初と最後の頁 e00119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 齋藤充史, 黒沼幸治, 千葉弘文.	4. 巻 (40)6
2. 論文標題 肺疾患とマイクロバイーム.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 呼吸器内科	6. 最初と最後の頁 551-556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitou Atsushi, Hasegawa Yoshihiro, Fujitani Naoki, Ariki Shigeru, Uehara Yasuaki, Hashimoto Ukichiro, Saito Atsushi, Kuronuma Koji, Matsumoto Kunio, Chiba Hirofumi, Takahashi Motoko	4. 巻 113
2. 論文標題 <i>glycosylation regulates MET processing and signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1292 ~ 1304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 齋藤 充史, 千葉 弘文, 服部 健史, 黒沼 幸治, 中久保 祥, 鎌田 啓佑, 田代 典夫, 田中 裕士, 福家 聡, 今野 哲.	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 新型コロナウイルス感染症が北海道内の病院・診療所の診療に与えた影響に関するアンケート調査.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本呼吸器学会誌	6. 最初と最後の頁 245-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujitani Naoki, Ariki Shigeru, Hasegawa Yoshihiro, Uehara Yasuaki, Saito Atsushi, Takahashi Motoko	4. 巻 60
2. 論文標題 Integrated Structural Analysis of <i>N</i> -Glycans and Free Oligosaccharides Allows for a Quantitative Evaluation of ER Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1708 ~ 1721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yuki, Saito Atsushi, Sakuma Yuji, Tada Makoto, Maki Ryunosuke, Takahashi Motoko, Watanabe Atsushi	4. 巻 なし
2. 論文標題 Treatment of air leakage using the VIO soft coagulation system: a mouse pulmonary air leak model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-021-02251-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐々原正幸, 斎藤充史, 宮坂友紀, 林智宏, 小玉賢太郎, 堀哲也	4. 巻 95
2. 論文標題 MALDI-TOF MSを用いてNocardia otitidiscaviarumを同定した肺ノカルジア症の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 感染症学雑誌	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Takeshi, Saito Atsushi, Chiba Hirofumi, Kuronuma Koji, Amishima Masaru, Morinaga Daisuke, Shichinohe Yasuo, Nasuhara Yasuyuki, Konno Satoshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Characteristics of COVID-19 patients admitted into two hospitals in sapporo, Japan: Analyses and insights from two outbreak waves	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 180 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2020.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murao Koutaro, Saito Atsushi, Kuronuma Koji, Fujiya Yoshihiro, Takahashi Satoshi, Chiba Hirofumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Acute eosinophilic pneumonia accompanied with COVID 19: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respirology Case Reports	6. 最初と最後の頁 e00683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcr2.683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugawara Hiroyuki, Saito Atsushi, Yokoyama Saori, Tsunematsu Kazunori, Chiba Hirofumi, Takahashi Hiroki	4. 巻 21
2. 論文標題 A retrospective analysis of usefulness of impulse oscillometry system in the treatment of asthma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-020-01494-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 齋藤充史
2. 発表標題 肺胞微石症の病態と今後の治療戦略について.
3. 学会等名 日本肺サーファクタント界面医学会 第57回学術研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Saito A, Takamiya R, Fujitani N, Ariki S, Kuronuma K, Chiba H.
2. 発表標題 The phosphate binder attenuates microlith formation and cox-2 induction in pulmonary alveolar microlithiasis.
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤充史, 黒沼幸治, 小玉賢太郎, 茂庭慶悟, 高橋聡, 高橋弘毅, 千葉弘文.
2. 発表標題 COVID-19肺炎重症度予測マーカーとしての血清SP-A, D値の検討.
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 109.高橋有毅, 多田周, 槇龍之輔, 宮島正博, 渡辺敦, 佐久間裕司, 齋藤充史.
2. 発表標題 VIO soft-coagulation systemによる肺癆修復メカニズムについての検討.
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤充史
2. 発表標題 間質性肺疾患における肺マイクロバイオームの意義 人と動物モデルにおける解析からわかってきたこと
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤充史, 高宮里奈, 有木茂, 黒沼幸治, 千葉弘文, 高橋素子, 高橋弘毅
2. 発表標題 本邦における肺胞微石症の一症例とモデルマウスを用いた病態解析
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤谷 直樹 (FUJITANI NAOKI) (10374191)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究 分担者	高宮 里奈 (TAKAMIYA RINA) (70365419)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------