

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591129

研究課題名(和文) アディポネクチンによる全身性疾患としてのCOPDの病態解明と治療応用

研究課題名(英文) Role of adiponectin in COPD

研究代表者

武田 吉人 (Takeda, Yoshito)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40452388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(以下COPD)は、喫煙が原因の閉塞性肺疾患で、心血管疾患や骨粗鬆症などが高率に合併することから全身性疾患とみなされているが詳細な機序は不明である。我々はアディポネクチン(Adiponectin: 以下APN)の持つ多様な機能に着目して、APN欠損マウスが、進行する肺気腫だけでなく、体重減少、骨粗鬆症などの肺外病変を併存する全身性疾患としての新規COPDモデルとなることを検証してきた。本マウスモデルを用いることで、従来法(組織解析+呼吸機能)に加えて、micro-CTと独自に開発した超偏極<sup>129</sup>XeMRIを融合させた新規COPD評価法(マルチモダリティ法)を構築した。

研究成果の概要(英文)：COPD is predicted to become the third commonest cause of death worldwide by 2020. It is important to clarify mechanisms involved in COPD and explore drugs to treat this systemic disease. Given that hypo adiponectinemia could be an underlying mechanism for COPD and the key link between COPD and various comorbidities, to further test the phenotype of APN KO mice, examined its underlying mechanism and its potential use of therapy is significant. Using mouse model, we evaluated the availability of hyperpolarized <sup>129</sup>Xe MRI and micro-CT compared with traditional methods, such as plethysmography and histology in murine model.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：アディポネクチン COPD CT 超偏極ガスXe-MRI

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

COPD は喫煙や大気汚染が原因となり、肺気腫や慢性気管支炎により引き起こされる**肺の生活習慣病**と考えられる。2020年には**世界における全死因の3位**になることが予想されている。最近 COPD は**心血管疾患や糖尿病などの併存症を高率に有することから全身性疾患**とみなされ、COPD 患者の予後を悪化させていることが注目されている。それにも関わらず COPD や全身性疾患をきたす機序の解明は不十分で、根本的な治療法も存在しない。**アディポネクチン(APN)** は、動脈硬化、糖尿病、心筋梗塞に重要な役割をするものと注目されているが、肺における APN の役割は不明であった。我々は APN の抗炎症作用、血管保護作用に着目し、APN KO マウスを解析した。驚いたことに無刺激で加齢とともに肺胞構造の破壊や全身炎症性変化などヒト COPD 類似の病態を呈することを見出した(多数の全国紙に報道)。さらに APN KO マウスは、高齢になると体重減少、筋肉萎縮や骨粗鬆症を呈することも見出した (AJRCCM 2011)。さらに、APN KO マウスに APN を投与することにより、肺気腫治療に成功した。加齢とともに進行性の肺気腫だけでなく、全身性炎症、骨粗鬆症、体重減少、筋肉萎縮を合併する APN KO マウスは全身性疾患としての COPD に合致する新たな COPD モデル動物となると考えられる。

現在の診断や治療効果は呼吸機能のみに依存しているため、多くの患者が未診断のまま放置されている。また心血管疾患、糖尿病や骨粗鬆症など COPD に合併する併存症が、COPD 患者の予後を悪化させているものの詳細な機序は不明である。つまりこれら多様な病態を呈する全身性疾患としての COPD を多角的、経時的に捉える方法の確立

が急務である

### 2. 研究の目的

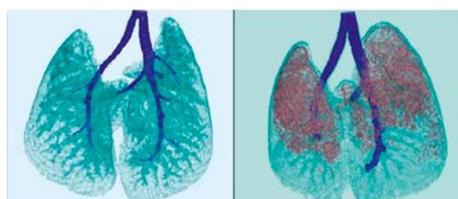
COPD の診断は、呼吸機能のみに依存しているものの、CT や MRI などの他の画像診断を用いることの重要性が高まっている。しかしこれらイメージング技術には一長一短があるが、各モダリティーの有用性についてはヒトにおいて検討されているが、それらの融合による評価は検討されていない。そこで当研究室が保有する最新鋭のイメージングシステム (Micro-CT、超偏極<sup>129</sup>Xe-MRI) を駆使して (マルチモダリティー法) 新しい COPD 評価法構築に挑戦する。

### 3. 研究の方法

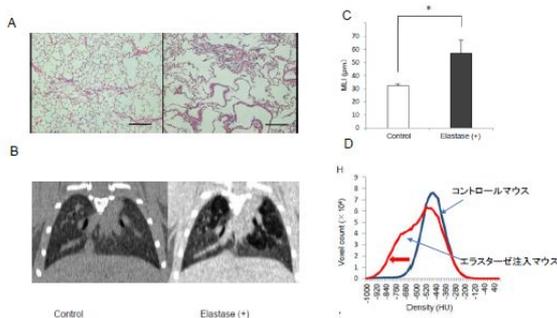
COPD の病態の一つである肺気腫 (マウスエラスターゼ誘発肺気腫モデル) を用いて各種検討を行った。マウス (C57BL6) にエラスターゼの経鼻投与後、micro-CT による肺病変の撮像、超偏極<sup>129</sup>XeMRI を用いた肺機能変化評価、また従来の肺機能測定後に、肺組織を採取した。肺組織は、肺組織標本作製後に、病理学的評価を行った。

### 4. 研究成果

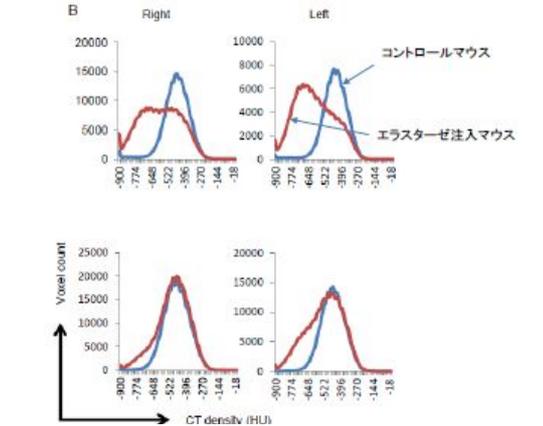
1. マウスにエラスターゼを気道内に注入し、肺気腫モデルを作成した。マウスの肺を実験動物用 micro-CT を用いて撮像し、三次元イメージを作成した (図 1)。右側の肺気腫マウスでは、低吸収領域 (黒く見える部分) が上肺野に広がっており、肺全体の中での病変部位をリアルタイムに描出することに成功した。



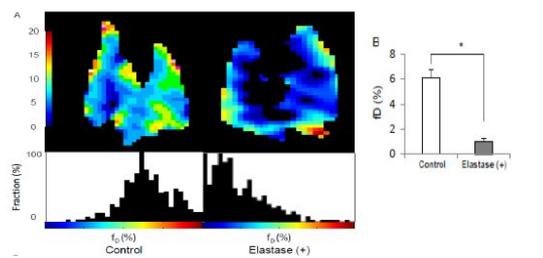
2. Micro-CT での撮像ののち、組織標本を取得して、CT 像における低吸収域と病理組織標本の mean linear intercept (MLI) 解析値の相関性を検討した。図 2A にコントロールマウスおよびエラストラーゼ注入マウス肺のヘマトキシリンエオジン染色組織像を、図 2B に CT 画像の一例を示した。図 2C に示したように、コントロールマウスに比べ、肺気腫マウスでは、MLI 値は有意に高値であり、肺泡拡大を確認できた。また、各 CT 画像のヒストグラムを描いたところ、コントロールマウスに比較して、肺気腫マウスでは、低吸収域側にシフトを示した(図 2D)。さらに低吸収域と病理解析には高い相関性を認めた(相関係数 0.98)。



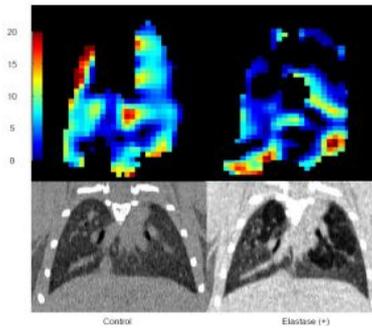
次に CT 像の低吸収領域の存在部位が病理組織による病変部位と一致して観察できるかどうかを検証した。CT 撮像データと病理組織標本のそれぞれについて、肺全体を上下左右に 4 分割して、CT における低吸収域のボクセル数および病理組織標本の MLI を計測した。上肺野の低吸収域が増大し、ヒストグラムが低吸収域側に大きくシフトした。比較的病態が軽微である下肺野の部分はヒストグラムのシフトも小さかった(図 3)。CT 画像解析数値は、4 分割のどの部分においても MLI と高い相関性を示した(データ未掲載)。



3. 次に肺機能について、従来法である挿管による全身プレスチモグラフによる呼吸機能パラメータの取得に先立ち、大阪大学にて開発された超偏極キセノン( $^{129}\text{Xe}$ )を用いる MRI によりガス交換能を解析した。MRI 解析ではマウスの呼吸リズムに同調して経時的なガス分布を測定し、ガス交換能を脱分極パラメータ  $fD$  として算出した。図 4A に示したガス交換能パラメータ  $fD$  値の分布図では、右側の肺気腫マウスでは、肺気腫病変部位である中央部分には分布が見られず、コントロールマウスに比較して、肺気腫病変部位において交換能が低い。また  $fD$  値の平均値はコントロールマウスに比べ、エラストラーゼ注入マウスでは大きく減少していた(図 4B)。



また図 4C に示すように、CT 画像の低吸収領域は MRI 画像の換気能パラメータ  $fD$  の低分布領域とよく合致しており、肺気腫病変における低吸収領域の換気能が低下していることが画像により明確に示された。



従来 MRI に関しては、空気による artifact や呼吸運動・心拍のため、技術的に撮影が困難と考えられてきた。しかし希ガス原子である  $^{129}\text{Xe}$  を光ポンピング法にて信号強度を向上させ気体原子を画像化し、肺の形態や機能を高感度で得る超偏極 MRI が開発された。超偏極 Xe MRI は従来のマウス解析では捉えることができなかった拡散能や血流などの新たな機能評価を可能とする。APN KO マウスは血管内皮の機能不全により肺気腫に至ったことから血流不全があることが強く示唆されたが、この手法により APN KO マウスでは換気には差を認めないが、ガス交換の有意な低下を確認した（データ未掲載）。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

### 【雑誌論文】(計 10 件)

1 Efficacy and Safety of Pirfenidone for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Takeda Y, Tsujino K, Kijima T, Kumanogoh A. *Patient Preference Adherence*. 2014 Mar 21;8:361-370 査読有

2 Jin Y, Tachibana I, Takeda Y, He P, Kang S, Suzuki M, Kuhara H, Tetsumoto S, Tsujino K, Minami T, Iwasaki T, Nakanishi K, Kida H, Kijima T, Ito M, Saya H, Kumanogoh A. Statins Decrease Lung Inflammation in Mice by Upregulating Tetraspanin CD9 in Macrophages. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e73706. 査読有

3 Minami T, Kijima T, Kohmo S, Arase H, Otani Y, Nagatomo I, Takahashi R, Miyake K, Higashiguchi M, Morimura O, Ihara S, Tsujino K, Hirata H, Inoue K, Takeda Y, Kida H, Tachibana I, Kumanogoh A. Overcoming chemoresistance of small-cell lung cancer through stepwise

HER2-targeted antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and VEGF-targeted antiangiogenesis. *Sci Rep*. 2013;3:2669 査読有

4 He P, Kuhara H, Tachibana I, Jin Y, Takeda Y, Tetsumoto S, Minami T, Kohmo S, Hirata H, Takahashi R, Inoue K, Nagatomo I, Kida H, Kijima T, Naka T, Morii E, Kawase I, Kumanogoh A. Calretinin mediates apoptosis in small cell lung cancer cells expressing tetraspanin CD9. *FEBS Open Bio*. 2013 May 10;3:225-30 査読有

5 Tetsumoto S, Takeda Y, Imai H, Kimura A, Jin Y, Nakanishi K, Maeda Y, Kuhara H, Tsujino K, Iwasaki T, Shigeta H, Kijima T, Tachibana I, Maeda N, Funahashi T, Shimomura I, Fujiwara H, Kumanogoh A. Validation of noninvasive morphological and diffusion imaging in mouse emphysema by micro-computed tomography and hyperpolarized ( $^{129}\text{Xe}$ ) magnetic resonance imaging. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Oct;49(4):592-600. 査読有

6 Iwasaki T, Takeda Y, Maruyama K, Yokosaki Y, Tsujino K, Tetsumoto S, Nagatomo I, Goya S, Kijima T, Kumagai T, Tachibana I, Kawase I, Kumanogoh A. Deletion of tetraspanin CD9 diminishes lymphangiogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 2013 Jan 25;288(4):2118-31. 査読有

7 Takeda Y, Nakanishi K, Tachibana I, Kumanogoh A. Adiponectin: A Novel Link Between Adipocytes and COPD. *Vitam Horm*. 2012;90:419-35 査読有

8 Suppression of metastases of small cell lung cancer cells in mice by a peptidic CXCR4 inhibitor TF14016. Otani Y, Kijima T, Kohmo S, Oishi S, Minami T, Nagatomo I, Takahashi R, Hirata H, Suzuki M, Inoue K, Takeda Y, Kida H, Tachibana I, Fujii N, Kumanogoh A. *FEBS Lett*. 2012 Oct 19;586(20):3639-44. 査読有

9 Tsujino K, Takeda Y, Arai T, Shintani Y, Inagaki R, Saiga H, Iwasaki T, Tetsumoto S, Jin Y, Ihara S, Kijima T, Ito M, Kitaichi M, Inoue Y, Tachibana I, Takeda K, Okumura M, Hemler ME, Kumanogoh A. Tetraspanin CD151 protects against pulmonary fibrosis by maintaining

epithelial integrity. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Jul 15;186(2):170-80. 査読有

10 Ihara S, Kida H, Arase H, Tripathi LP, Chen YA, Kimura T, Yoshida M, Kashiwa Y, Hirata H, Fukamizu R, Kohmo S, Inoue K, Nagatomo I, Takeda Y, Kijima T, Mizuguchi K, Tachibana I, Kumanogoh A. Inhibitory Roles of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Antitumor Immunity during Carcinogen-Induced Lung Tumorigenesis. Cancer Res. 2012 Jun 15;72(12):2990-9. 査読有

11 武田吉人. アディポネクチンと COPD . 分子呼吸器病 16:16-20, 2012.

12 中西香織, 武田吉人 アディポネクチンと COPD. Angiology Frontier 11(3):48-56, 2012.

#### 【学会発表】(計 7 件)

1 2013 年 4 月 19 日 日本呼吸器学会総会(東京) 超偏極 129 Xe MRI による新たなマウス気腫評価法確立 鉄本訓史, 武田吉人, 金 英姫, 中西香織, 長友 泉, 木田 博, 木島貴志, 立花 功, 熊ノ郷 淳

2 2013 年 4 月 19 日 日本呼吸器学会総会(東京) テトラスパニン CD9/CD81 は SIRT 1 の制御によりアンチエイジング作用を示す 武田吉人, 金 英姫, 井上幸治, 木田 博, 木島貴志, 伊藤真里, 立花 功, 熊ノ郷 淳

3 2013 年 4 月 21 日 日本呼吸器学会総会(東京) COPD(慢性全身性炎症症候群)におけるテトラスパニン CD9 の役割, 立花 功, 金 英姫, 周 博, 鈴木真優美, 和 平, 武田吉人, 熊ノ郷 淳

4 2014 年 4 月 25 日 日本呼吸器学会総会

(大阪) Double deletion of tetraspanins CD9 and CD81 in mice causes not only COPD-like phenotype, but also a syndrome resembling aging. 武田吉人, 金 英姫, 長友 泉, 井上幸治, 木田 博, 木島貴志, 立花 功, 熊ノ郷 淳

5 2014 年 4 月 27 日 日本呼吸器学会総会シンポジウム(大阪) COPD におけるエクソソーム:慢性炎症の視点から 武田吉人

6 2014 年 5 月 21 日 アメリカ胸部疾患学会(サンディエゴ)Tetraspanins CD9 and CD81 Double-Knockout mice spontaneously develop not only COPD-like phenotype, but also multiple aging phenotypes. 武田吉人, 近藤 康, 金 英姫, 立花 功, 木島貴志, 熊ノ郷 淳

7 2014 年 6 月 8 日 第 14 回日本抗加齢医学会総会シンポジウム(大阪) 肺の生活習慣病: COPD における慢性炎症 武田吉人

#### 【その他】

本成果は非侵襲的・リアルタイムに疾患把握が可能と AJRCMB から高い評価を受け editorial と表紙に掲載された(2012 AJRCMB)。

#### ホームページ等

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/lab\\_8/index.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/lab_8/index.html)

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

武田吉人 (TAKEDA YOSHITO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 40452388

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし