

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860645

研究課題名(和文) 型肺胞上皮由来の新規特発性肺線維症バイオマーカーRAGEの開発と創薬の試み

研究課題名(英文) RAGE as a novel type 1 pneumocyte-derived biomarker and therapeutic target for IPF

研究代表者

岩本 博志 (Iwamoto, Hiroshi)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：60457398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症(IPF)患者87例、健常者303例のAGER遺伝子のtagSNPの検討ではrs2070600のminor alleleを有する人はIPFにおいて健常者と比較して有意に高率であった。rs2070600のminor alleleは健常者およびIPF患者の両方において血中soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE)低値と関連していた。IPF患者およびNSIP患者において健常者と比較して血中sRAGEは有意に低下しており、さらにIPF患者においてsRAGE低値は予後不良および急性増悪と有意に関連していた。

研究成果の概要(英文)：Seven tag polymorphisms of AGER were examined in 87 Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and 303 healthy controls. The frequencies of AGER rs2070600 genotypes with minor allele (T) were significantly higher in the patients with IPF. Additionally, the carriage of rs2070600 minor allele (T) and the presence of IPF were independently associated with reduced serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE), which were measured by ELISA. Serum sRAGE levels were significantly lower in IPF and in NSIP when compared with control subjects. Moreover, reduced sRAGE was related to the occurrence of acute exacerbation of IPF and was an independent predictor for the 5-year survival in the patients with IPF.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：間質性肺炎 バイオマーカー 肺胞上皮

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症は早期発見が未だ困難であり、満足すべき治療法が不十分なために、新たな治療法と診断法の開発は急務である。申請者が共同研究をおこなっている Helsinki 大学の呼吸器疾患研究室では特発性肺線維症患者の肺組織のプロテオーム解析により新規の疾患関連物質の探索を行った。その結果、特発性肺線維症の肺組織中の RAGE の発現が健常肺と比較して有意に低下していることを明らかにした。一方、過去の動物実験の報告では RAGE ノックアウトマウスは加齢により肺に軽度の線維化を生じることが報告され、逆に RAGE ノックアウトマウスはプレオマイシン投与による急性肺傷害に対しては防御的であるという相反する報告がなされている。したがって RAGE が肺の線維化、あるいは間質性肺炎の病態に関連していることは想定されているが、RAGE と間質性肺炎の病態生理との関連については不明点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 多数の症例を用いた国際的臨床疫学研究によって RAGE を標的とした肺線維症の新規バイオマーカーの開発をすること

(2) RAGE を標的とした創薬の試みをすること

3. 研究の方法

(1) 血清・気管支肺胞洗浄液 (BALF) を用いた sRAGE, esRAGE, HMGB1 濃度の測定

当院に受診歴のある間質性肺炎患者、細菌性肺炎患者から informed consent を取得したうえで血清検体 (IPF: 79 例、非特異の間質性肺炎 (NSIP): 27 例、急性過敏性肺炎: 11 例、細菌性肺炎: 24 例) を採取し、-80 で保存した。また一部の患者からは BALF 検体も採取した。コントロールとして健診目的に受診した健常者の血清検体 81 例も用いた。これらの保存検体を使用し、ELISA kit で sRAGE (Human RAGE Quantikine ELISA Kit, R&D systems)、esRAGE (Human esRAGE ELISA Kit, B-Bridge International, Inc)、HMGB1 (Human HMGB1 ELISA Kit, シノテスト) を測定した。

(2) AGER tag SNP と HMGB1 tag SNP の同定とタイピング

-80 で保存していた患者群・健常群の全血を用いてフェノール・クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿法を用いて DNA を抽出し、4 で保存した。2 µg/ml に調整した DNA と TaqMan SNP Genotyping Assay、TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) を混和し、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies Corp.) を用いて Real-time PCR 法でタイピングを行った。遺伝子多型の検討は HAPMAP database と Haploview を用いて同定した tagSNP について行った。

(3) IPF 群における血清 sRAGE、esRAGE、HMGB1 のバイオマーカーとしての有用性の検討

IPF 群において血清 sRAGE、esRAGE、HMGB1 が有用なバイオマーカーになり得るかを検討するため、肺機能との相関や急性増悪・予後との相関について統計学的に解析した。また予後解析については 5 年生存率を検討するため ROC カーブを用いて最適なカットオフ値を設定し、カプランマイヤー法で検討した。急性増悪率の解析についても同じ値をカットオフとして用いた。さらにコックスハザードモデルを用いて独立した予後予測因子の同定を行った。

(4) IPF 患者の胸部 CT 画像所見の評価

IPF 患者を対象に血清や BALF の検体を採取した日時から前後 3 ヶ月以内に撮影した HRCT を用いて、呼吸器専門医 2 人が独立して読影した。すりガラス陰影、網状陰影、蜂窩肺、気腫について数値化をおこない、その平均値を用いて血清・BALF の sRAGE、esRAGE、HMGB1 との相関をスピアマンの順位相関係数で解析した。

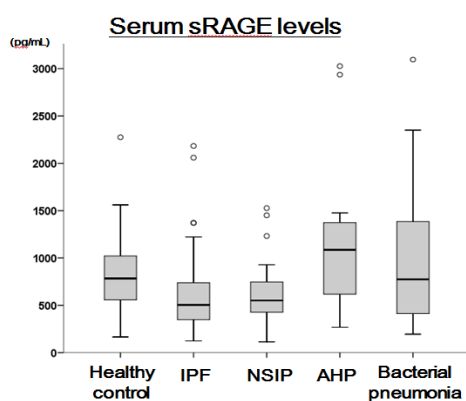
(5) 間質性肺炎患者の肺組織を用いた RAGE・HMGB1 の免疫組織染色

間質性肺炎患者の肺組織における RAGE・HMGB1 の発現プロファイルを検討するため、一次抗体として RAGE (Anti-RAGE antibody ab54741, abcam)・HMGB1 (Affinity Purified Rabbit Anti-HMGB1 Polyclonal Antibody, シノテスト) を選択し、DAKO EnVision kit (DAKO ChemMate) を用いて免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

(1) 間質性肺炎患者における血清・BALF の sRAGE、esRAGE、HMGB1 濃度の検討

血清 sRAGE は健常群と比較し、IPF 群・NSIP 群において有意な低下を認めたが BP 群では有意な差を認めなかった。AHP 群においては IPF 群と比較して有意に sRAGE の上昇を認めた。esRAGE については IPF 群で健常群よりも有意に低下しており、HMGB-1 は IPF 群・NSIP 群・AHP 群・BP 群の全ての群で有意な上昇を認めただでも IPF 群と健常群は sRAGE (610.7 ± 378.6 pg/ml and 838.0 ± 332.1 pg/ml, $p < 0.0001$), esRAGE (160.9 ± 104.5 pg/ml and 207.8 ± 114.0 pg/ml, $p = 0.0062$), HMGB1 (6.04 ± 5.23 ng/ml and 3.74 ± 4.57 ng/ml, $p < 0.0001$) といずれの検討においても顕著な差を認めていた。



BALF 中の sRAGE、esRAGE は AHP 群において IPF 群・NSIP 群と比較して有意に高値であった。また HMGB1 については間質性肺炎の間で有意な差を認めなかった。

(2) IPF・CTD-ILD 患者における AGER・HMGB1 polymorphisms と疾患感受性の関連

AGER に関しては rs3131300 A/G、rs2070600 C/T、rs2269422 T/C、rs1035798 G/A、rs184003 C/A、rs2853807 G/A、rs2071288 C/T の 7 つ、HMGB1 については rs2249825 G/C の計 8 つの tagSNP の検討をおこなった。

それぞれの polymorphism について IPF 87 例、健常者 303 例をタイピングし、疾患感受性との相関をカイニ乗検定で解析したところ、AGER rs2070600 genotype が IPF の疾患感受性と有意な相関を持つことが示された ($p = 0.031$)。過去に血清 sRAGE と AGER rs2070600 polymorphism が相関を持つことが報告されているが、本例においても AGER rs2070600 minor allele (T) を持つ群は持たない群と比較し、IPF 群においても健常群においても有意に低下していた。

Associations of AGER genotype frequencies with the risk of IPF

AGER polymorphism	Genotype	IPF		Controls		p-value	OR (95% CI)
		n	(%)	n	(%)		
rs3131300	A/A	73	83.9	265	84.2	1.000	0.98 (0.50 - 2.04)
	A/G & G/G	14	16.1	48	15.8		
rs2070600	C/C	51	58.6	219	72.3	0.021*	1.84 (1.08 - 3.10)
	C/T & T/T	36	41.4	84	27.7		
rs2269422	T/T	80	92.0	271	89.4	0.627	0.74 (0.27 - 1.80)
	T/C & C/C	7	8.0	32	10.6		
rs1035798	G/G	53	60.9	167	55.1	0.401	0.79 (0.47 - 1.32)
	G/A & A/A	34	39.1	136	44.9		
rs184003	C/C	70	80.5	233	76.9	0.578	0.81 (0.42 - 1.50)
	C/A & A/A	17	19.5	70	23.1		
rs2853807	G/G	71	81.6	247	81.5	1.000	0.99 (0.50 - 1.89)
	G/A & A/A	16	18.4	56	18.5		
rs2071288	C/C	82	94.3	291	96.0	0.673	1.48 (0.40 - 4.67)
	C/T & T/T	5	5.7	12	4.0		

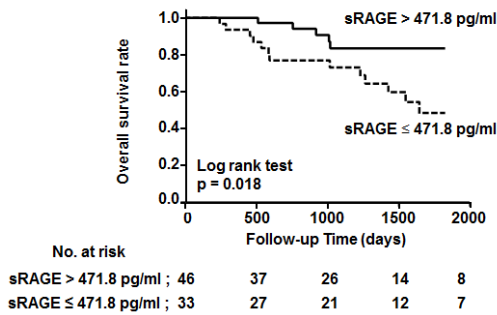
*: $p < 0.05$ Pearson's Chi-squared test

CI: confidence interval; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; OR: odds ratio

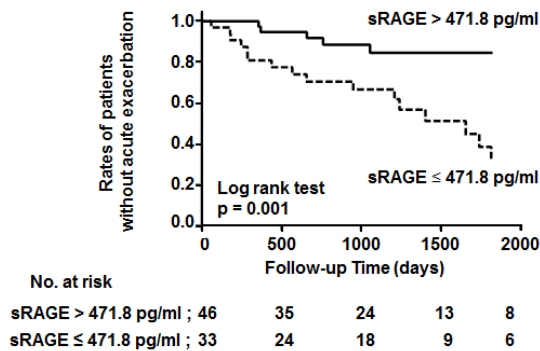
(3) IPF 患者における sRAGE、esRAGE、HMGB1 のバイオマーカーとしての有効性の検討

IPF 患者において sRAGE、esRAGE、HMGB1 がそれぞれ肺機能や急性増悪、予後と相関を持つか検討を加えた。まず肺機能との相関については唯一、血清 sRAGE と %DLco が有意な正の相関を持っていた ($r = 0.2414$, $p = 0.0396$)。

次に 5 年生存率との関連を検討するためそれぞれについて ROC カーブで最適なカットオフを算出したところ、sRAGE: 471.8 pg/ml (感度 68.9%、特異度 72.2%)、esRAGE: 127.5 pg/ml (感度 72.7%、特異度 67.3%)、HMGB1: 4.78 ng/ml (感度 45.7%、特異度 91.8%) であった。カプランマイヤー曲線を用いて高値群・低値群に分けて解析したところ、血清 sRAGE 低値群は高値群と比較して有意に低い 5 年生存率を示した (\log -rank $p = 0.018$)。しかし、esRAGE・HMGB1 では有意な差を認めなかった。



また同じカットオフ値を用いて急性増悪発症との関連を解析したところ、血清 sRAGE 低値群は高値群と比較して有意に高い急性増悪率を示した (log-rank $p = 0.001$)。



さらにコックスハザードモデルを用いて5年生存率と血清 sRAGE の間に独立した相関関係があるか解析したところ、単変量解析において血清 sRAGE 低値 (≤ 471.8 pg/ml) は有意な相関を持ち (HR = 3.254, $p = 0.017$)、多変量解析で年齢・性別・BMI・喫煙歴・VC (% predicted) で補正したところ、血清 sRAGE 低値 (≤ 471.8 pg/ml) は独立した予後予測因子として同定された (HR = 4.712, $p = 0.031$)。

Predicting Value for 5-year mortality in the patients with IPF assessed by cox proportional hazards model

Variables	HR	95% CI	p-value
Univariate analysis			
Age, years	0.992	0.955 - 1.036	0.701
Sex, female / male	1.220	0.282 - 3.704	0.759
BMI, kg/m ²	0.880	0.755 - 1.023	0.097
Smoking history, pack years	0.994	0.975 - 1.011	0.481
VC, % predicted	0.953	0.922 - 0.983	0.002 [§]
DLco, % predicted	0.962	0.923 - 0.998	0.041 [§]
Use of pirfenidone	1.530	0.597 - 3.922	0.369
sRAGE (continuous)	0.999	0.996 - 1.000	0.118
sRAGE ≤ 471.8 pg/ml	3.254	1.226 - 10.15	0.017 [§]
rs2070600 minor allele (T), +/-	0.760	0.278 - 1.944	0.570
Multivariate analysis*			
sRAGE ≤ 471.8 pg/ml	4.712	1.147 - 23.66	0.031 [§]

[§]: $p < 0.05$; cox hazard analysis

*: adjusted for age, sex, BMI, pack year, and VC.

BMI: body mass index; CI: confidence interval;

DLco: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide;

HR: hazard ratio; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; VC: vital capacity

なお、AGER rs2070600 polymorphism についても予後や肺機能との相関を検討したが、有意な相関は認めなかった。

(4) IPF 患者における胸部 CT 画像所見と血清バイオマーカーの相関

今回対象となった IPF 患者の胸部 CT 所見はすりガラス陰影 (7.33 ± 7.25%)、網状陰影 (15.32 ± 7.56%)、蜂窩肺 (13.14 ± 12.00%)、気腫 (3.51 ± 11.10%) であった。これらの所見と血清・BALF の sRAGE、esRAGE、HMGB1 の間に相関がないか検討したところ、血清 HMGB1 とすりガラス陰影・網状陰影に有意な正の相関が見られた ($r = 0.277$, $p = 0.032$ and $r = 0.294$, $p = 0.023$)。

(5) 間質性肺炎患者の肺組織を用いた RAGE・HMGB1 の免疫組織染色

NSIP の肺組織と肺癌患者の非腫瘍部の肺組織を用いて条件検討を行ったところ、RAGE は線維化組織では染まらず、肺胞上皮細胞が染色された。しかし、コントロールとして用いた肺癌患者の非腫瘍部と比較すると NSIP の肺組織では染色濃度が低下している印象であった。また HMGB1 については今後条件検討を予定している。現在データの定量化の方法を検討している段階であり、今後の課題である。

以上の結果から、血清 sRAGE、esRAGE は複数の間質性肺炎において低下する傾向にあり、HMGB1 は上昇する傾向にあることが示された。更に IPF 患者においては血清 sRAGE 低値の患者は急性増悪のリスクを有し予後が不良であることを示した。さらに RAGE 受容体の親和性を増強する SNP が IPF の疾患感受性と関連しており、RAGE/ligand 経路を介した炎症反応、増殖因子の発現が IPF の発症に関与することを示唆している。この結果から血中 sRAGE は IPF の予後マーカーとして有用である可能性が示唆され、RAGE/ligand 経路を標的とした IPF の治療応用の可能性も考えられ、今後さらなる検討が必要であることが示唆された。

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 5 件)

Nishimura Y, Iwamoto H, Ishikawa N, Hattori N, Horimasu Y, Ohshimo S, Fujitaka K, Kondo K, Hamada H, Awai K, Kohno N. Long-term pulmonary complications of chemical weapons exposure in former poison gas factory workers. *Inhal Toxicol.* 2016 Apr 25:1-6. 査読有

Omori K, Hattori N, Senoo T, Takayama Y, Masuda T, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Hamada H, Kohno N. Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Attenuates Transforming Growth Factor- β -Dependent Epithelial Mesenchymal Transition and Differentiation of Fibroblasts to Myofibroblasts. *PLoS One.* 2016 Feb 9;11(2):e0148969. 査読有

Akita S, Hattori N, Masuda T, Horimasu Y, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyake M, Kohno N, MT95-4, a fully humanized antibody raised against aminopeptidase N, reduces tumor progression in a mouse model *Cancer Sci.* 2015;106(7):921-8. 査読有

Nakagawa, M., Hattori N, Haruta Y, Sugiyama A, Iwamoto H, Ishikawa N, Fujitaka K, Murai H, Tanaka J, Kohno N. Effect of increasing respiratory rate on airway resistance and reactance in COPD patients. *Respirology* 2015 Jan;20(1):87-94. 査読有

Iwamoto H, Gao J, Pulkkinen V, Toljamo T, Nieminen P, Mazur W. Soluble receptor for advanced glycation end-products and progression of airway disease. *BMC Pulm Med.* 2014, 14:68. PubMed PMID: 24758342. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Kakuhiro Yamaguchi, Hiroshi Iwamoto, Yasushi

Horimasu, Takeshi Masuda, Taku Nakashima, Shintaro Miyamoto, Shinichiro Ohshimo, Kazunori Fujitaka, Noboru Hattori, Witold Mazur, Nobuoki Kohno. Decreased circulatory receptor for advanced glycation end-products is associated with poorer survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 2016 年 4 月 8 日 京都

Iwamoto H, Horimasu Y, Nakashima T, Senoo T, Ohshimo S, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Mazur W, Kohno N, Decreased circulatory receptor for advanced glycation end-products is associated with poorer survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. European respiratory society 6-10 Sep 2014 Munich Germany.

Iwamoto H, Gao J, Pulkkinen V, Toljamo T, Nieminen P, Mazur W. Soluble receptor for advanced glycation end-products and progression of airway disease. American thoracic society 16-21 May 2014 San Diego USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩本 博志 (Iwamoto Hiroshi)

広島大学病院 講師

研究者番号 : 60457398