

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293195

研究課題名(和文)肺構築細胞に着目した慢性閉塞性肺疾患の病態の解明

研究課題名(英文)Clarification of pathogenesis in chronic obstructive pulmonary disease focusing on lung resident cells.

研究代表者

杉浦 久敏(Sugiura, Hisatoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20445092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：COPD患者の気道で27-OHCが過剰に産生され肺構築細胞の細胞老化を来すことを明らかにした。また27-OHCを長期曝露した細胞では組織修復能が著明に減弱した。また、COPD患者から分離した気道線維芽細胞は、健常人由来の肺線維芽細胞と比較して、強い線維化能を有することが明らかになった。この線維化能は、KLF5によって制御されていることが明らかになった。COPDの末梢気道周囲では、KLF5が極めて強く発現していた。COPDの患者の肺では新規の抗酸化物質である活性硫黄分子種の産生が低下していることを明らかにした。さらにCOPD患者の血漿では、抗老化液性因子GDF11の産生量が有意に低下していた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the followings. Production of 27-OHC was enhanced in the patients with COPD. Treatment with 27-OHC accelerated cellular senescence of lung resident cells and chronic exposure of 27-OHC impaired fibroblast-mediated tissue repair function. Bronchial fibroblasts from COPD patients showed marked pro-fibrotic feature compared to those from control subjects. KLF-5 regulated the profibrotic effects in the cells and expression of KLF-5 was enhanced in the peribronchial lesion of small airways of COPD patients. We demonstrated that production of newly identified anti-oxidants, reactive persulfides species was reduced in the lungs of COPD patients compared with healthy controls. We found that the plasma levels of GDF11, which is an anti-senescent factor, were decreased in COPD patients compared with healthy subjects.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：酸化型コレステロール 細胞老化 転写因子 KLF5 活性硫黄分子種 成長因子

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) の有病率及び死亡率は年々増加し、2020 年には死因の第 3 位になると予想されており、COPD の病態解明および治療法の開発は、全世界的に急務である。COPD の病因としては、1) 肺の炎症、2) プロテアーゼ/アンチプロテアーゼの不均衡、3) 酸化ストレスの増加、の関与が示唆されている。また COPD の肺では、肺実質の気腫化と末梢気道の線維性狭窄、という一見すると相反する病理学的変化が混在する。これらの病理学的変化には肺構築細胞である気道・肺胞上皮細胞、気管支・肺胞線維芽細胞、血管内皮細胞が関与していると考えられる。一方で、COPD の病態及び相反する病理学的変化に対して肺構築細胞の endotype に焦点を当て、同一患者より得られた肺構築細胞を用いて COPD の病態及び病理学的変化について検討した報告は無い。

2. 研究の目的

COPD および健常対照者の肺組織から気道上皮細胞や肺線維芽細胞などの肺構築細胞を分離培養し、genotype、phenotype および発症関連分子に対する反応性を明らかにすることで COPD の病態と病理学的変化を招来する責任分子を肺構築細胞レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、研究 1 として肺実質の気腫化の形成機序の解明に関する研究、研究 2 として末梢気道線維性狭窄の形成機序の解明することを目的とする。COPD 患者由来の各種の肺構築細胞を用いることで、COPD の肺で生じる肺実質の気腫化と末梢気道の線維化の形成機序と病理学的変化をもたらす責任分子の解明を目指す。具体的には、気道上皮細胞や肺線維芽細胞を対象者から分離し、肺気腫や気道の線維性狭窄を来す病態関連分子を明らかにし、その生物活性を検証する。過去の研究成果から、酸化型コレステロールの一種である 27-hydroxycholesterol (27-OHC) と Kruppel-like factor 5 (KLF5) に着目した。27-OHC に関する研究では、COPD における発現や細胞老化に関連した生物活性と細胞内シグナルを明らかにし、KLF5 に関する研究では、COPD の末梢気道における発現と気道リモデリングに関与する生物活性を解明した。さらに得られた検体を用いて、新規の内因性抗酸化分子である活性硫黄分子種と抗老化液性因子である growth differentiation factor 11 (GDF11) についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) 27-OHC の肺構築細胞における細胞老化作用

COPD 由来の肺線維芽細胞では、気腫化の機序として、細胞老化が進行していることを老化関連蛋白質 (p16, p53) の発現を免疫組織学的に検討することで明らかにした。さらに、COPD 患者の気道で産生が増加している

27-OHC の細胞老化に対する役割について検討を行った。COPD 患者気道で検出される濃度の 27-OHC をヒト肺線維芽細胞に投与すると、老化関連蛋白質の発現増強、老化関連酵素の蓄積、細胞増殖速度の低下を誘導し、細胞老化に至ることを明らかにした (図 1)。また 27-OHC を長期曝露した細胞では組織修復能が著明に減弱した (図 2)。27-OHC に対する細胞老化感受性は、健常人よりも COPD の肺線維芽細胞で鋭敏であり、27-OHC は、COPD の肺構築細胞を老化させることで、COPD の病態に関連することが明らかになった。本研究の結果は、英文誌に報告された (Hashimoto Y, Sugiura H et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016)。

図 1.

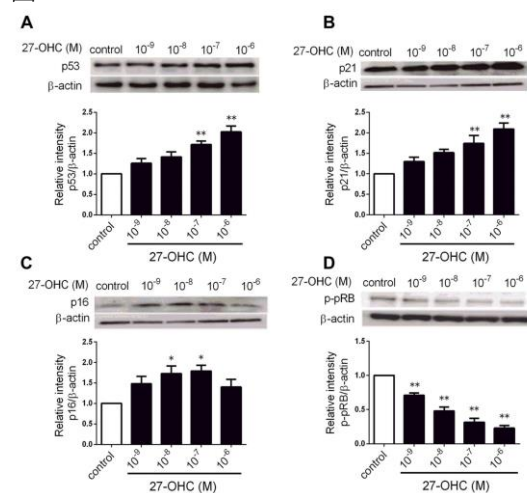
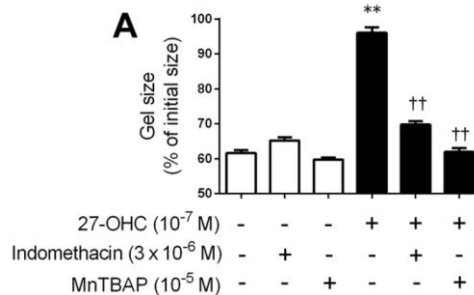


図 2.



(2) COPD の末梢気道線維性狭窄に対する転写因子 KLF5 の役割の検討

本研究の結果、COPD 患者から分離培養した気道線維芽細胞は、健常人由来の肺線維芽細胞と比較して、強い線維化能を有することが明らかになった。この線維化能は、KLF5 をノックダウンすることで減弱することから KLF5 によって制御されていることが明らかになった。COPD の末梢気道周囲では、KLF5 が極めて強く発現しており (図 3)、COPD の末梢気道の線維化と関連している可能性が示唆された。同時に KLF5 は、筋線維芽細胞への形質転換および蛋白分解酵素の発現を調節していた (図 4)。本研究の結果は、英文誌に報告された。

図 3.

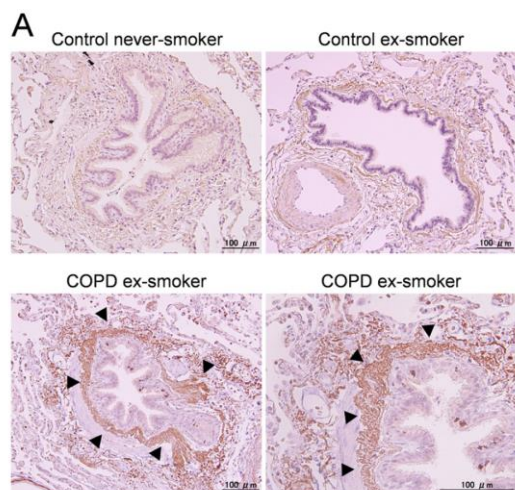
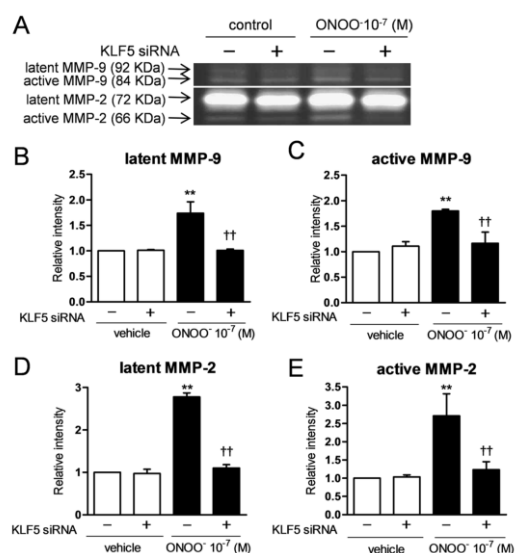


図 4.



(3) 内因性抗酸化物質-活性硫黄分子種の役割の解明

COPD の患者由来検体を用いた検討で、新規の内因性抗酸化物質である活性硫黄分子種の産生が低下していることを明らかにした。活性硫黄分子種は、極めて強い還元能を有する分子として、本研究で初めて検出された分子で、ヒト肺細胞や気道被覆液中に存在し、COPD 患者の検体では有意に低下し、その産生程度は気流閉塞と関連することを明らかにした。現在、研究結果を英文誌に投稿中である。

(4) 抗老化液性因子 GDF11 の役割の解明  
健康人の血漿中には抗老化液性因子である GDF11 が存在するが COPD 患者由来の血漿では、その産生量が有意に低下していた。その産生量は、呼吸機能を始めとする種々の臨床的指標と関連した。GDF11 は、肺細胞でも stress-induced cellular senescence を有意に抑制することが明らかになった。現在、研究結果を英文誌に投稿中である。

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 32 件)

1. Ichinose M, Sugiura H, Nagase H, Yamaguchi M, Inoue H, Sagara H, Tamaoki J, Tohda Y, Munakata M, Yamauchi K, Ohta K; Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for adult asthma 2017. *Allergol Int.* 2017 in press. 査読有
2. Tode N, Kikuchi T, Sakakibara T, Hirano T, Inoue A, Ohkouchi S, Tamada T, Okazaki T, Koarai A, Sugiura H, Niihori T, Aoki Y, Nakayama K, Matsumoto K, Matsubara Y, Yamamoto M, Watanabe A, Nukiwa T, Ichinose M. Exome sequencing deciphers a germline MET mutation in familial epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer. *Cancer Sci* 2017 in press. 査読有
3. Tamada T, Sugiura H, Takahashi T, Matsunaga K, Kimura K, Katsumata U, Ohta K, Ichinose M. Coexisting COPD in elderly asthma with fixed airflow limitation: assessment by DLco %predicted and HRCT. *J Asthma.* 2017; in press. 査読有
4. Abe K, Sugiura H, Hashimoto Y, Ichikawa T, Koarai A, Yamada M, Numakura T, Onodera K, Tanaka R, Sato K, Yanagisawa S, Okazaki T, Tamada T, Kikuchi T, Ichinose M. Possible role of Krüppel-like factor 5 in the remodeling of small airways and pulmonary vessels in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2016; 17:7. 査読有
5. Hashimoto Y, Sugiura H, Togo S, Koarai A, Abe K, Yamada M, Ichikawa T, Kikuchi T, Numakura T, Onodera K, Tanaka R, Sato K, Yanagisawa S, Okazaki T, Tamada T, Kikuchi T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M. 27-hydroxycholesterol accelerates cellular senescence in human lung resident cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016; 310: L1028-1041. 査読有
6. Makiguchi T, Yamada M, Yoshioka Y, Sugiura H, Koarai A, Chiba S, Fujino N, Tojo Y, Ota C, Kubo H, Kobayashi S, Yanai M, Shimura S, Ochiya T, Ichinose M. Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2016; 17:10. 査読有
7. Shishikura Y, Koarai A, Aizawa H, Yamaya M, Sugiura H, Watanabe M,

- Hashimoto Y, Numakura T, Makiguti T, Abe K, Yamada M, Kikuchi T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M. Extracellular ATP is involved in dsRNA-induced MUC5AC production via P2Y2R in human airway epithelium. *Respir Res.* 2016; 17:121. 査読有
8. Hirano T, Miyauchi E, Inoue A, Igusa R, Chiba S, Sakamoto K, Sugiura H, Kikuchi T, Ichinose M. Two cases of pseudo-achalasia with lung cancer: Case report and short literature review. *Respir Invest.* 2016; 54: 494-499. 査読有
9. 杉浦久敏. COPD と免疫異常 *炎症と免疫* 2016; 24: 325-330. 査読無
10. 小野寺克洋、玉田勉、村松聡士、村上康司、奈良正之、小松理世、小林誠、山田充啓、杉浦久敏、一ノ瀬正和. 発熱、多関節痛を伴った急性サルコイドーシスの 1 例 *日本内科学会雑誌* 2016; 105: 540-546. 査読無
11. 山田充啓、平野泰三、佐藤慶、高橋秀徳、村上康司、玉井ときわ、玉田勉、杉浦久敏、佐藤直実、齋藤涼子、一ノ瀬正和. 日常臨床から学ぶ この症例の新しい意義は？ 好酸球性肺炎の像を呈し全身播種に至った肺接合菌症の 1 例 *THE LUNG-perspectives* 2016; 24: 338-345. 査読無
12. 突田容子、山田充啓、大江崇、伊藤俊輔、小林誠、玉井ときわ、小荒井晃、玉田勉、杉浦久敏、一ノ瀬正和. ARDS を合併した *Chlamydia pneumoniae* 感染症の 1 例 *日本内科学会雑誌* 2016; 105: 2426-2431. 査読無
13. 杉浦久敏. 呼吸器疾患と慢性炎症 閉塞性肺疾患における気道炎症とバイオマーカー. *別冊 BIO Clinica 炎症と疾患* 2017; 6: 22-26. 査読無
14. Kanai K, Koarai A, Shishikura Y, Sugiura H, Ichikawa T, Kikuchi T, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells. *Respir Investig.* 2015; 53:137-148. 査読有
15. Tamada T, Sugiura H, Takahashi T, Matsunaga K, Kimura K, Katsumata U, Takekoshi D, Kikuchi T, Ohta K, Ichinose M. Biomarker-based detection of asthma-COPD overlap syndrome in COPD populations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015; 10:2169-76. 査読有
16. 杉浦久敏. 創薬を視野に入れた呼吸器疾患の病態解明 活性酸素抑制と創薬 *呼吸と循環* 2015; 63: 547-554. 査読無
17. 杉浦久敏、一ノ瀬 正和: 主要な疾患と先制医療 遺伝素因、環境因子、発症前診断の可能性、予防法 呼吸器疾患 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) *実験医学* 2015; 33: 1098-1105. 査読無
18. 杉浦久敏. COPD と喘息の合併 Overlap 症候群について *Modern Physician* 2015; 35: 906. 査読無
19. 杉浦久敏、一ノ瀬 正和. COPD のフェノタイプ *呼吸と循環* 2015; 63: 1118-1123. 査読無
20. 杉浦久敏、一ノ瀬 正和. COPD のサブタイプ分類の現状と課題 *呼吸器内科* 2015; 28: 332-336. 査読無
21. Minakata Y, Sugino A, Kanda M, Ichikawa T, Akamatsu K, Koarai A, Hirano T, Nakanishi M, Sugiura H, Matsunaga K, Ichinose M. Reduced level of physical activity in Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Investig.* 2014; 52:41-8. 査読有
22. Wang XQ, Mao LJ, Fang QH, Kobayashi T, Kim HJ, Sugiura H, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, Liu X, Rennard SI. Sphingosylphosphorylcholine Induces  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression in Human Lung Fibroblasts and Fibroblasts Mediated Gel Contraction Via S1P2 receptor and Rho/Rho-Kinase Pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2014; 108: 23-30. 査読有
23. Kobayashi T, Kim H, Liu X, Sugiura H, Kohyama T, Fang Q, Wen FQ, Abe S, Wang X, Atkinson JJ, Shipley JM, Senior RM, Rennard SI. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- $\beta$  and stimulates fibroblast contraction of collagen gels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014; 306: L1006-1015. 査読有
24. Ichikawa T, Sugiura H, Koarai A, Minakata Y, Kikuchi T, Morishita Y, Oka A, Kanai K, Kawabata H, Hiramatsu M, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Yamamoto N, Ichinose M. TLR3 activation augments matrix metalloproteinase production through reactive nitrogen species generation in human lung fibroblasts. *J Immunol.* 2014; 192: 4977-88. 査読有
25. Kanehira M, Kikuchi T, Santoso A, Tode N, Hirano T, Ohkouchi S, Tamada T, Sugiura H, Harigae H, Ichinose M. Human Marrow Stromal Cells Downsize the Stem Cell Fraction of Lung Cancers by Fibroblast Growth Factor 10. *Mol Cell Biol.* 2014; 34: 2848-56. 査読有
26. 杉浦久敏. Bedside Teaching FeNO 測定 の意義と臨床 *呼吸と循環* 2014; 62: 67-74. 査読無
27. 杉浦久敏、一ノ瀬正和. 【COPD 著しく

進歩したこれからの実地診療の実際】  
COPD とはどんな病気か? 新しい COPD  
ガイドライン(2013)より 実地医家の  
具体的な治療と管理実践指針 *Medical  
Practice* 2014; 31: 536-544. 査読無

28. **杉浦久敏**, 一ノ瀬正和, 【そこが知りた  
かった!-生理機能検査 最新の動向-】  
呼吸器 NO 測定 *臨床病理レビュー*  
2014; 151: P68-76. 査読無

29. **杉浦久敏**, 私は思う 高齢者喘息と  
COPDの類似点・相違点 疫学の観点から  
*アレルギーの臨床* 2014; 34: 902-903.  
査読無

30. **杉浦久敏**, 私の処方 COPD における気  
管支拡張薬の選択 *Modern Physician*  
2014; 34: 976. 査読無

31. **杉浦久敏**, 成人喘息領域の最先端のト  
レンド 喘息のバイオマーカー  
*Airway* 2014; 3: 2-3. 査読無

32. **杉浦久敏**, 一ノ瀬正和, 臨床試験へのチ  
ャレンジ-呼吸器領域における臨床試験  
の立案から報告まで- COPD *日本胸部臨  
床* 2014; 73: 1165-1176. 査読無

[学会発表] (計 12 件)

1. **Sugiura H.** Oxidative stress and COPD.  
2016. 9th International Conference on  
the Biology, Chemistry, and  
Therapeutic Applications of Nitric  
Oxide, Sendai (Sendai International  
Center), Japan. 2016. 05. 22 (シンポジ  
ウム).
2. **杉浦久敏**. COPD の病態の最新知見 第  
102 回呼吸器学会東北地方会 八戸市  
(ユートリー) 2016. 3. 12 (特別講演)
3. **杉浦久敏**. 呼吸器領域における呼気一  
酸化窒素(NO)測定の意義-原理と実際  
日本酸化ストレス学会, 仙台市(仙台国  
際センター), 2016. 8. 31 (ランチョンセ  
ミナー)
4. **Sugiura H, Abe K, Hashimoto Y, Koarai  
A, Yamada M, Numakura T, Onodera K,  
Ichinose M.** A possible role of Kruppel  
like factor 5 in small airway fibrosi  
of chronic obstructive pulmonary  
disease. 2015 The 26th European  
Respiratory Society Annual Congress,  
Amsterdam, Netherlands. 2015. 09. 27  
(一般演題)
5. **杉浦久敏**. 個別化治療に向けた呼吸器  
疾患バイオマーカーの現状と未来 呼  
気ガス分析の現状と未来 第 55 回日本  
呼吸器学会総会, 東京 (東京国際フォー  
ラム), 2015. 4. 17 (シンポジウム)
6. **杉浦久敏**. 喘息・COPD における気道系・  
血管系のリモデリングの相違点と類似  
点 病態的な立場から 第 55 回日本呼  
吸器学会総会, 東京 (東京国際フォー  
ラム), 2015. 4. 17 (シンポジウム)
7. **杉浦久敏**. Cutting edge of COPD

Oxidative stress and COPD  
pathophysiology 第 55 回日本呼吸器学  
会総会, 東京 (東京国際フォーラム),  
2015. 4. 18 (International Symposium)

8. **杉浦久敏**. 喘息におけるバイオマーカ  
ー Asthma COPD Overlap Syndrome  
(ACOS)におけるバイオマーカーの可能  
性 第 64 回日本アレルギー学会総会,  
東京 (グランドプリンスホテル高輪),  
2015. 5. 26 (シンポジウム)
9. **杉浦久敏**. 喘息の気道リモデリングに  
おける Toll 様受容体 3 の役割 第 64 回  
日本アレルギー学会総会, 東京 (グラ  
ンドプリンスホテル高輪), 2015. 5. 26  
(一般演題)
10. **杉浦久敏**. 慢性安定期の COPD 治療、今  
後の展開 LABA 第 54 回日本呼吸器学  
会総会, 大阪 (大阪国際会議場),  
2014. 4. 25 (シンポジウム)
11. **杉浦久敏**. 活性酸素と呼吸器疾患  
COPD・気管支喘息と活性酸素 第 54 回日  
本呼吸器学会総会, 大阪 (大阪国際会  
議場), 2014. 4. 26 (シンポジウム)
12. **杉浦久敏**. 気道炎症の評価方法 気道の  
酸化ストレス評価 第 25 回日本アレルギ  
ー学会総会春季臨床大会, 京都 (国立  
京都国際会館), 2014. 5. 9 (シンポジウ  
ム)

[図書] (計 19 件)

1. 山田充啓, **杉浦久敏**. COPD 急性増悪時  
の治療. 川名明彦, 江口研二 編集, 呼  
吸器疾患最新の薬物療法, 克誠堂出版,  
p142-148, 2017
2. **杉浦久敏**. 呼気ガス分析. 日本呼吸器学  
会 編集, 新呼吸器専門医テキスト.  
南江堂, p139-p140, 2015
3. **杉浦久敏**. 重症喘息. 杉山幸比古, 近藤  
丘, 中西洋一, 奥村明之進 編集, 呼  
吸器疾患診療の最先端. 先端医療技術研  
究所, p179-p183, 2015
4. **杉浦久敏**. 解剖. 一ノ瀬正和 編集, イ  
ラストでわかる呼吸器内科学. 文光  
堂, p2-p3, 2014
5. **杉浦久敏**. 咳と痰. 一ノ瀬正和 編集,  
イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂,  
p10-p11, 2014
6. **杉浦久敏**. 慢性閉塞性肺疾患(COPD). 一  
ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼  
吸器内科学. 文光堂, p72-p75, 2014
7. **杉浦久敏**. びまん性汎細気管支炎(DPB).  
一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼  
吸器内科学. 文光堂, p78-p79, 2014
8. **杉浦久敏**. 肺高血圧症. 一ノ瀬正和 編  
集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文  
光堂, p96-p97, 2014
9. **杉浦久敏**. 肺性心. 一ノ瀬正和 編集,  
イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂,  
p98-p99, 2014
10. **杉浦久敏**. 肺動静脈奇形. 一ノ瀬正和  
編集, イラストでわかる呼吸器内科学.



- 文光堂, p100-p101, 2014
11. **杉浦久敏**. 過換気症候群. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p106-p107, 2014
  12. **杉浦久敏**. ウェゲナー肉芽腫症/多発血管炎を伴う肉芽腫症. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p128-p129, 2014
  13. **杉浦久敏**. グッドパスチャー症候群. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p130-p131, 2014
  14. **杉浦久敏**. ランゲルハンス細胞組織球症. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p132-p133, 2014
  15. **杉浦久敏**. 気胸. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p146-p147, 2014
  16. **杉浦久敏**. 胸膜中皮腫. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p148-p149, 2014
  17. **杉浦久敏**. 縦隔疾患. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p150-p151, 2014
  18. **杉浦久敏**. 横隔膜疾患. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p152, 2014
  19. **杉浦久敏**. 胸郭疾患. 一ノ瀬正和 編集, イラストでわかる呼吸器内科学. 文光堂, p153-p154, 2014

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉浦 久敏 (SUGIURA, HISATOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20445092