

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09185

研究課題名(和文) COPD治療における新規治療標的としてのPI3K-PTEN不均衡の検討

研究課題名(英文) PI3K-PTEN imbalance is a potential new therapeutic target in COPD

研究代表者

浅井 一久 (Asai, Kazuhisa)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10382053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PI3K(Phosphoinositide 3-kinase)-Aktシグナル経路は、血管新生、アポトーシス、細胞増殖、炎症性サイトカインの産生などに関わり、PTEN(Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)による拮抗機構が備わっている。非喫煙健常人22名、喫煙健常人31名、COPD患者49名から気道上皮細胞を採取し、PI3K、PTENの発現とCOPD病態への関与を検討した。COPD患者ではPTEN発現は有意に低下しており、喫煙歴と有意な逆相関を、肺機能と有意な相関を示し、COPD病態への関与が示された。

研究成果の概要(英文)：The PI3K(Phosphoinositide 3-kinase)-Akt signaling pathway is involved in angiogenesis, apoptosis, cell proliferation, production of inflammatory cytokines. And there is antagonistic mechanism by PTEN(Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10). Airway epithelial cells were collected from 22 healthy non-smokers, 31 healthy smokers, and 49 COPD patients. The expression of PI3K, PTEN in airway epithelial cells and its involvement in COPD pathogenesis were examined. In COPD patients, PTEN expression was significantly decreased, showing a significant inverse correlation with smoking history and significant correlation with pulmonary function testing. This suggested that PTEN was involved in COPD pathogenesis.

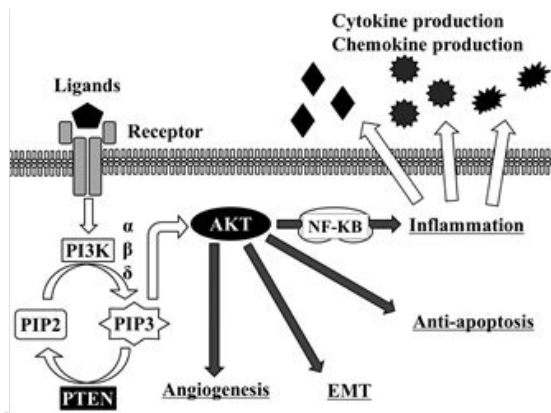
研究分野：閉塞性肺疾患

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 PI3K PTEN

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease : COPD)は、タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じる肺の炎症性疾患であり、正常に復すことのない気流閉塞を示す。

PI3K(Phosphoinositide 3-kinase)は、真核生物の細胞膜を構成するイノシトールリン脂質の3位のヒドロキシル基(-OH基)のリン酸化を行う酵素である。PI3Kは、PIP2(Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)を基質として、PIP3(Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate)を生成し、Protein kinase B(PKB)/Akt活性化を起こす。このPI3K-Aktシグナル伝達経路は、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現、抗アポトーシス作用、EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition : 上皮間葉移行)誘導、血管新生など様々な生理作用の発現に関与し、COPDの気道リモデリングへの関与が想定されている。



COPD 気道炎症では、誘導型 PI3K である PI3K の発現亢進が報告されているが、生体には PI3K による過度の炎症反応防止のために、拮抗する酵素である PTEN (Phosphatase and tensin homolog)による逆調節機構が備わっている。しかしながら、COPD 気道炎症における PTEN の発現や COPD 病態への寄与は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、COPD 気道における PI3K-PTEN 不均衡存在の確認と COPD 病態への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

すでに我々が確立している気管支鏡下気道上皮細胞採取法により気道上皮を採取して検討した。対象は、ボランティア、もしくは、軽微な血痰や末梢小結節精査目的で気管支鏡検査を受けた COPD 患者(日本呼吸器学

会 COPD ガイドライン第4版に基づき COPD と診断されている症例)及び、対照群として、気管支鏡目的以外の呼吸器疾患のない健常対照群も集積し、健常対照群は、喫煙の有無により喫煙健常群、非喫煙健常群とした。

気管支鏡検査時に、出血を起こさぬように留意しながら細胞診用ブラシにて気道上皮を採取し、検体は速やかに4生理食塩水に懸濁して、mRNA抽出・細胞培養に供した。COPD病態のプロフィールとして、肺機能検査、インパルスオキシレーション法(IOS)を評価した。

採取した気道上皮細胞の一部より、mRNAを抽出してcDNAを作成して、Real time PCR法にてPTEN発現量、さらに、PI3K、PI3Kの発現量を定量した。タンパク質レベルは、western blotting法にて、PTEN、PI3K、PI3Kの発現量を定量した。PTEN発現量やPI3K、PI3Kとの比を求め、COPD重症度、気道炎症プロフィールとの関連を検討した。

4. 研究成果

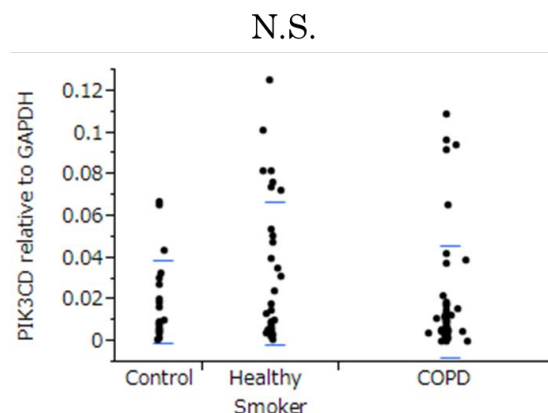
(1)患者背景

当院通院中の外来患者より、COPD患者群49例、非喫煙健常群(control)22例、喫煙健常群(healthy smoker)31例を集積した。

	Control	Healthy smoker	COPD	p-value
Subject No. (male/female)	22 (6/16)	31 (26/5)	49 (42/7)	
Age (year)*	67.1 (62.6-71.5)	67.6 (64.0-71.2)	69.4 (67.7-71.2)	N.S.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	22.1 (20.8-23.5)	21.5 (20.1-23.0)	20.9 (19.8-22.0)	N.S.
Pack-Year*	0	48.8 (38.5-59.1)	60.4(52.8-68.0)	p<0.001
FEV1.0 (L)*	2.21 (1.94-2.47)	2.50 (2.27-2.74)	1.70 (1.50-1.90)	P<0.001
%FEV1.0*	130.7 (120-142)	122 (112-132)	86 (76.3-96.3)	p<0.001

年齢、BMIに有意差は認めなかったが、喫煙歴(Pack-year)肺機能に有意差を認めた。

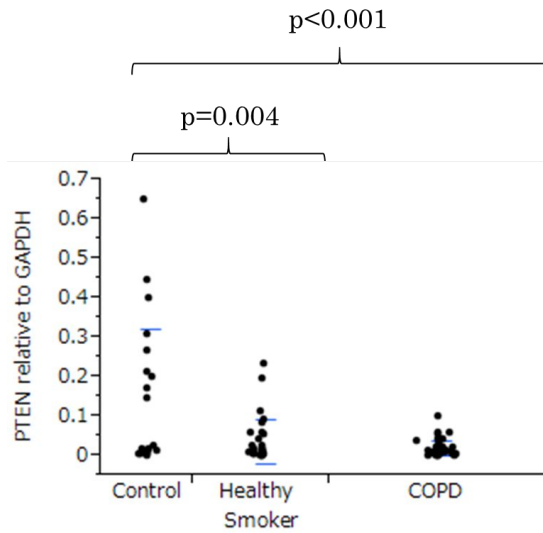
(2)PI3K mRNA 発現量



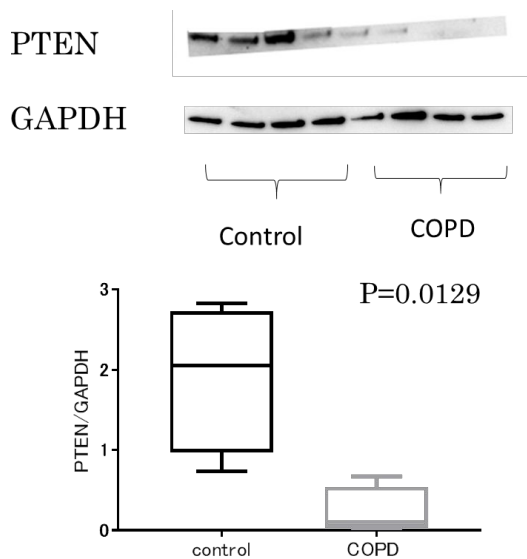
非喫煙健常群、喫煙健常群、COPD 患者群において、誘導型PI3KであるPI3K mRNA 発現量に有意差を認めなかった。

(3)PTENmRNA 発現量

一方、非喫煙健常群、喫煙健常群、COPD 患者群において、PTENmRNA 発現量を検討したところ、非喫煙健常群と喫煙健常群間、ならびに、非喫煙健常群と COPD 患者群において、PTENmRNA 発現量に有意差を認めた。

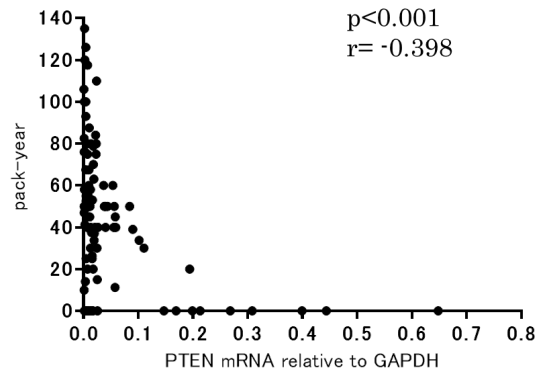


(4)PTEN タンパク発現量



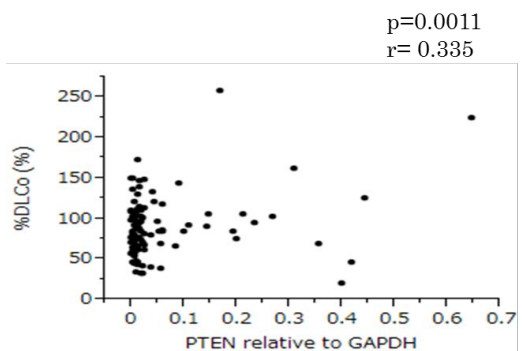
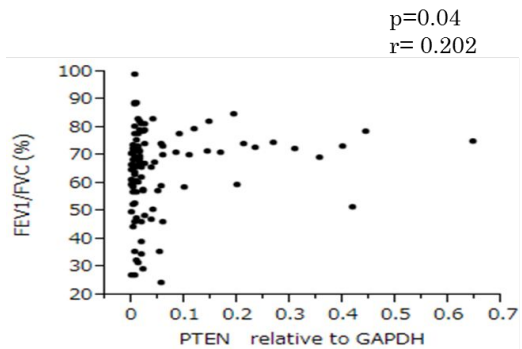
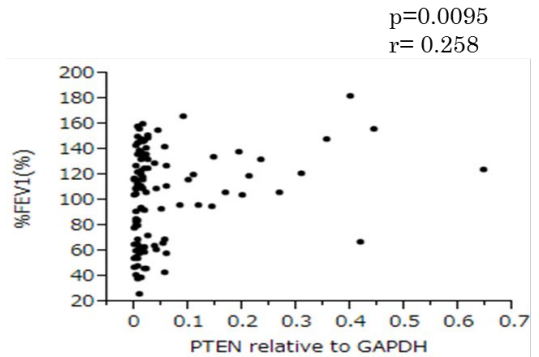
非喫煙健常群と COPD 患者群間で PTEN タンパク発現量を比較したところ、COPD 患者群において有意に PTEN タンパク発現量の低下を認めた。

(5)PTENmRNA 量と喫煙歴



PTENmRNA 発現量は喫煙歴 (Pack-year) に有意な逆相関を認めた。

(6)PTENmRNA 量と肺機能



PTEN mRNA 発現量は、% FEV1、FEV1/FVC、%Dlco と弱いながら、有意な正の相関を示した。一方、PI3K mRNA 発現

量は、これら%FEV1、FEV1/FVC、%Dlcoとは有意な相関を示さなかった (data not shown)。

#### (7)まとめ

本研究において、我々は COPD 気道炎症の主要となる気道上皮における PTEN の発現低下が COPD 病態(肺機能検査)と有意な相関を示すことを明らかにした。PI3K-Akt シグナル伝達経路が COPD 病態に関与することは知られているが、そのドライバーである PI3K 発現より、コントローラーである PTEN 発現が PI3K-Akt シグナル伝達経路へのシグナル伝達を制御している可能性がある。PTEN 発現制御が COPD 病態への新規の治療標的となる可能性がある。

#### 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7件)

Sugiyama Y, Asai K, Yamada K, Kureya Y, Ijiri N, Watanabe T, Kanazawa H, Hirata K. Decreased levels of irisin, a skeletal muscle cell-derived myokine, are related to emphysema associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017 Mar 2;12:765-772. 査読有

Okamoto A, Nojiri T, Konishi K, Tokudome T, Miura K, Hosoda H, Hino J, Miyazato M, Kyomoto Y, Asai K, Hirata K, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis via vascular endothelial cells in mice : ANP for pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2017 Jan 3;18(1):1. 査読有

Asai K, Hirata K, Hashimoto S, Fukuchi Y, Kitawaki T, Ikeda K, Fogel R, Banerji D. Efficacy and safety of indacaterol/glycopyrronium in Japanese patients with COPD: Pooled analysis of SHINE and ARISE. *Respir Investig*. 2016 Nov;54(6):428-435. 査読有

Kureya Y, Kanazawa H, Ijiri N, Tochino Y, Watanabe T, Asai K, Hirata K. Down-Regulation of

Soluble  $\alpha$ -Klotho is Associated with Reduction in Serum Irisin Levels in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lung*. 2016 Jun;194(3):345-51. 査読有

Yamada K, Asai K, Nagayasu F, Sato K, Ijiri N, Yoshii N, Imahashi Y, Watanabe T, Tochino Y, Kanazawa H, Hirata K. Impaired nuclear factor erythroid 2-related factor 2 expression increases apoptosis of airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease due to cigarette smoking. *BMC Pulm Med*. 2016 Feb 9;16:27. 査読有

Ijiri N, Kanazawa H, Asai K, Watanabe T, Hirata K. Irisin, a newly discovered myokine, is a novel biomarker associated with physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2015 May;20(4):612-7. 査読有

Asai K, Kobayashi A, Makihara Y, Johnson M. Anti-inflammatory effects of salmeterol/fluticasone propionate 50/250 mcg combination therapy in Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 Apr 17;10:803-11. 査読有

[学会発表](計15件)

Yamamoto N, Watanabe T, Kojima K, Sato K, Nakai T, Tanaka H, Asai K, Mitsuoka S, Hirata K. The efficacy and safety of ultrasound (US) guided percutaneous core-needle biopsy for peripheral lung or pleural lesions; comparison with computed tomography (CT) guided needle biopsy. 21st Congress of the Asian Pacific Society of Respirology 2017 (Sydney, Australia)

Kyomoto Y, Nojiri T, Tokudome T, Kumazoe M, Miura K, Hosoda H, Hino J, Miyazato M, Kojima K, Kubo H, Okamoto A, Yamada K, Watanabe T, Asai K, Hirata K, Kangawa K. Ghrelin protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *European*

Respiratory Society, 27th Annual Congress 2017 (Milan, Italy)

Sawa K, Kawaguchi T, Koh Y, Kambayashi S, Asai K, Mitsuoka S, Kimura T, Yoshimura N, Kubo A, Saka H, Matsumura A, Nishiyama N, Hirata K. PIK3CA mutations are distinctive genetic features in non-small cell lung cancer (NSCLC) with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A comprehensive mutational analysis from multi-institutional cohort. ASCO 2017 (Chicago, USA)

Sugiyama Y, Asai K, Kojima K, Sugitani A, Kubo H, Kyomoto Y, Yoshida S, Yamada K, Yoshi N, Watanabe T, Uji M, Tochino Y, Kanazawa H, Hirata K. Decreased Level of Irisin, a Skeletal Muscle Cell-Derived Myokine, Is Involved in Emphysema Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Through Epithelial Apoptosis. American Thoracic Society International Conference 2017 (Washington DC, USA)

Yoshida S, Asai K, Sugiyama Y, Kyomoto Y, Kawamoto T, Sato K, Kureya Y, Okamoto A, Yamada K, Yoshii N, Watanabe T, Uji M, Kanazawa H, Hirata K. RELATIONSHIP BETWEEN PERIPHERAL BLOOD IRISIN LEVELS AND MUSCLE MASS, SAROPENIA, AND PULMONARY FUNCTION MEASUREMENTS IN COPD SUBJECTS. 20th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology 2016 (Bangkok, Thailand)

Kureya Y, Kanazawa H, Ijiri N, Watanabe T, Tochino Y, Asai K, Hirata K. Role of soluble  $\alpha$ -klotho on lung and skeletal muscle function in chronic obstructive pulmonary disease. European Respiratory Society, 26th Annual Congress 2016 (London, England)

Sugiyama Y, Asai K, Yoshida S, Kyomoto Y, Kawamoto T, Sato K, Kureya Y, Okamoto A, Yamada K, Yoshii N, Watanabe T, Uji M, Hirata

K. Relationships between sarcopenia and pulmonary function, exercise capacity, and prognosis in patients with COPD. European Respiratory Society, 26th Annual Congress 2016 (London, England)

Yamada K, Asai K, Kubo Y, Kyomoto Y, Kawamoto T, Yoshida S, Sato K, Yamamoto N, Yoshii N, Watanabe T, Uji M, Hirata K. Decreased Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Expression Enhances Apoptosis of Airway Epithelial Cells in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. American Thoracic Society International Conference 2016 (San Francisco, USA)

K. Konishi Y, Kondoh H, Taniguchi A, Okamoto K, Lindell K, Asai Y, Zhang K, Gibson N, Kaminski D, Kim. Expression Levels of Developmental Genes Distinguish Non Specific Interstitial Pneumonia from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Highlight Potential Diagnostic Markers. American Thoracic Society International Conference 2016 (San Francisco, USA)

Okamoto A, Konishi K, Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Asai K, Hirata K, Kangawa K. Atrial Natriuretic Peptide Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. American Thoracic Society International Conference 2016 (San Francisco, USA)

Asai K, Sato K, Kubo Y, Okamoto A, Yamada K, Yoshii N, Watanabe T, Konishi K, Uji M, Hirata K. A case of rapidly progressed primary pleural synovial sarcoma. Chest 2015 (Montreal, Canada)

Kureya Y, Konishi K, Yamada K, Watanabe T, Uji M, Asai K, Kanazawa H, Hirata K. Global gene expression analyses highlight the role of plasma membrane remodeling as a molecular functions of airway epithelium in response to interleukin-13 treatment. European Respiratory Society, 25th Annual Congress 2015 (Amsterdam, Netherlands)

研究者番号：10382053

Uji M, Kureya Y, Yamada K, Watanabe T, Konishi K, Asai K, Nakamura T, Hirata K. Effect of intratracheal administration of adipose-derived stromal cells on bleomycin-induced lung injury in a rat model. European Respiratory Society, 25th Annual Congress 2015 (Amsterdam, Netherlands)

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし

Shirai A, Asai K, Sugiyama Y, Sato K, Yoshi N, Yamamoto N, Uji M, Watanabe T, Kanazawa H, Hirata K. Relationship Between Maximal Inspiratory Pressure and Six-Minute Walk Distance in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. American Thoracic Society International Conference 2015 (Denver, USA)

Nagayasu F, Konishi K, Ijiri N, Watanabe T, Yamada K, Kureya Y, Asai K, Kamoi H, Kanazawa H, Hirata K. High Morbidity Group Box 1 Signaling Pathway Enhancement Augments Phosphatase and Tensin Homolog Expression in Alveolar Epithelium. American Thoracic Society International Conference 2015 (Denver, USA)

〔図書〕(計2件)

Asai K, Hirata K. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systemic Inflammatory Disease Springer 総ページ数 352 頁 担当部分 p.3-16 2016

平田 一人, 浅井 一久 呼吸器疾患最近の治療 2016-2018 南江堂 総ページ数 468 頁 担当部分 p.88-95 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅井 一久 (ASAI Kazuhisa)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師