

令和元年6月16日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09536

研究課題名(和文) ヒトとマウスの気腔形態評価指標の比較から推察するCOPDエンドタイプ

研究課題名(英文) COPD endotype investigated through the comparison between mice and human study.

研究代表者

室 繁郎 (Muro, Shigeo)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60344454

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)：ヒトCOPD症例の肺気腫の分布様式を、2次元CT画像解析によって、ある一定の法則(フラクタル性)に乗っ取って進展していくことをこれまで報告してきた。今回、3次元CT画像解析によって、気腫性病変を立体的に解析することにより、ある程度気腫性病変が進行すると、突然フラクタル性から逸脱した、大きな気腫性病変が出現することが判明した。マウスで蛋白分解酵素過剰により肺胞破壊が進行するモデルを解析中であり、ヒト肺で生じている変化の詳細な機序を解明できるか、今後も解析を続けていく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化が進み、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の罹患率は高く、死亡数は膨大である。日本人COPDの多くは肺気腫型であるが、肺気腫を修復する治療は存在せず、治療開発のために、肺胞破壊の機序を解明することが必要である。しかしヒトでは定期的に肺の組織を取り出して観察することは不可能であるため、胸部CTなどの非侵襲的検査から、肺胞破壊の機序を推定し、薬剤治療の標的を決定する必要がある。本研究では、ヒト胸部CT画像の経年的変化から、肺胞破壊の様式が軽症と重症で異なる可能性を見いだした。同時に、マウス実験から肺胞細胞を分解する蛋白分解酵素過剰モデルを作成し、ヒト肺との形態学的類似性の検討を今後の課題とした。

研究成果の概要(英文)：We have been developed two-dimensional CT image analysis human COPD cases and reported that the distribution pattern of emphysematous changes has a certain rule (fractal nature). In this study, three-dimensional CT image analysis revealed that when the emphysematous change in the whole lung progressed to some extent, a large emphysematous lesion that deviated from fractality property suddenly appeared, suggesting that mechanisms during lung parenchymal destruction may be different between early emphysema and progressed diseases. To elucidate molecular mechanisms in the process of lung parenchymal destruction, we developed a model mouse in which alveolar destruction progresses by proteolytic enzyme excess. We need to continue analyze whether it is possible to elucidate the detailed mechanism of the change occurring in human lung through the comparison of the morphological change in the mice pathology.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 肺気腫 フラクタル 形態学 動物モデル プロテアーゼ 画像解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化が進む日本で、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の罹患率は高く、死亡数は膨大であり、社会的に大きな問題である。COPD の主要な病理学的変化は肺気腫 肺胞破壊であるが、肺胞破壊を修復する治療は存在しないため、その開発が急務である。

ヒト肺胞再生治療を開発するためには、その分子病理学的機序の把握が必要であるが、ヒト肺で経時的に組織検体を採取することは不可能である。これまで研究者らは、ヒト肺気腫の進展は一様ではなく、気腫の形態変化が病理学的な変化の機序推定に有用であることを示してきた (PLoS One. 2012;7(9):e44993, Respir Res. 2012 Apr 18;13(1):31, Am J Respir Crit Care Med. 2011 Jun 15;183(12):1653-9, Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 13;104(7):2361-5.)。そこで、分子病理学的機序の明確なマウス肺気腫モデルにおける肺胞破壊形態と、ヒト肺気腫画像における画像変化を比較することによって、形態学的な解析からヒト肺気腫進行の分子病理学的機序を類推できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

1. ヒト CT 画像所見における肺気腫の経時的変化を解析することにより、肺胞破壊の様式を推定する。
2. 野生型マウスおよび内因性セリンプロテアーゼ過剰モデルマウス (上皮特異的 C/EBP K0 マウス) に長期喫煙暴露を行い、気腫肺に至るまでの病態を解析し、マウス病理組織標本の形態変化からヒト肺気腫 CT 画像の形態的特徴との相同性を検証する。

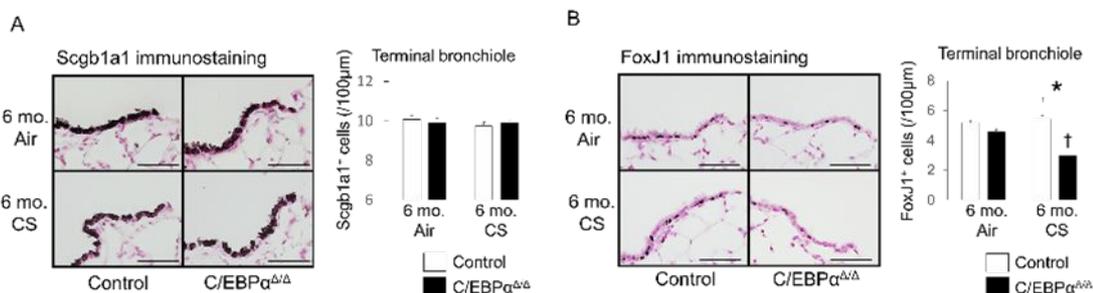
3. 研究の方法

1. ヒト COPD の前向き観察研究において、定型化されたエントリークライテリアと情報収集手順によりシステムチックに症例を集積した。エントリー時点での画像・末梢血における炎症像・臨床症状などの特徴を解析し、気腫進行のリスクが高い COPD 増悪感受性因子を検索した。また、3D 画像解析の手法を確立し、気腫性病変の進展様式を全肺 3D 画像解析により検討した。
2. 既存の COPD 合併肺癌の切除標本にて、局所のプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ活性評価を行った。
3. 野生型マウスおよび内因性セリンプロテアーゼ過剰モデルマウス (上皮特異的 C/EBP K0 マウス) に 6 ヶ月間喫煙暴露を施行し、気道上皮細胞の傷害と再生様式を観察した。

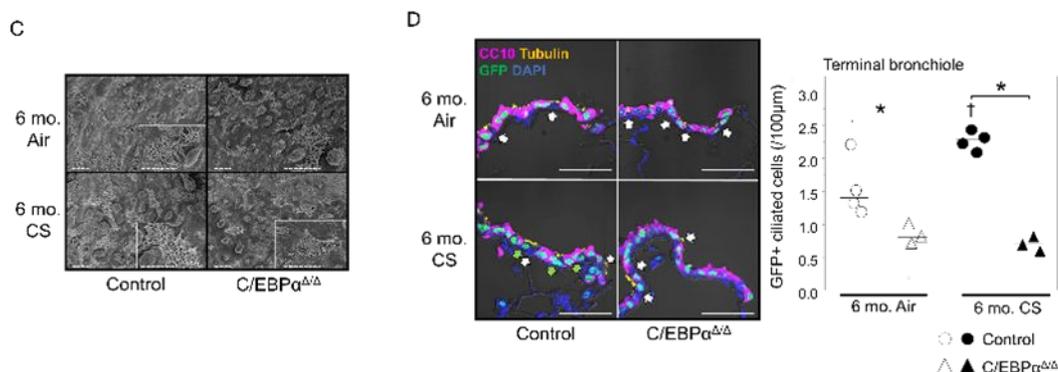
4. 研究成果

1. ヒト前向き研究における画像解析では、3 次元再構成により、肺胞破壊の形態変化を立体的に検討した。前回の基盤 C 25461156 で解析した 2 次元での結果と同様に、3 次元解析においても、気腫性変化はある程度まではフラクタル性を保ちつつ進行していくことが再確認できた。しかしながら、肺全体の気腫性変化が進行してくると、フラクタル性から外れる巨大な気腫領域 (super cluster) が出現することが判明した。この super cluster は、気腫の進行に応じて徐々に出現するのではなく、肺全体の気腫の程度がある一定の閾値を越えたときに突然出現する。このことは、気腫進行の機序がある時点で異なってくる、あるいは附加的な因子が加わってくることを示唆すると考えられた。また、健常人の肺移植ドナー症例の検討から、成人においても肺が再増殖する可能性がある知見を報告した。
2. ヒト前向き研究において、液性免疫が増悪頻度と関連するという結果が得られ、2018 年 4 月の日本呼吸器学会で発表した。
3. COPD 合併肺癌治療切除症例の後方視的検討においては、既存のヒト肺検体で、中枢気道領域・細気道領域・肺胞領域の蛋白分解酵素の局所発現評価の手法の予備検討が終了し、手法を決定した。現在の予備検討では、COPD 肺では健常肺に比してプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡が組織レベルで生じていることが示唆された。

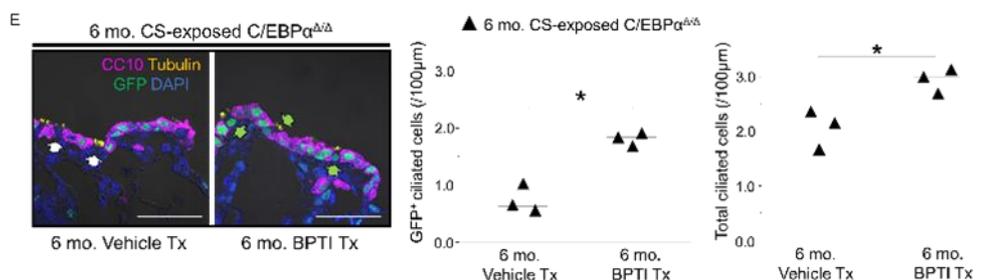
- 4 マウス実験では、内因性セリンプロテアーゼ過剰モデルをに喫煙負荷をかけることによって、早期に肺胞破壊が生じることを見出した。約半年間の長期喫煙曝露によるマウス気道上皮細胞の傷害と再生様式を観察したところ、クラブ細胞と線毛上皮細胞の総数に変化はなかったが(図 A,B)、アンチプロテアーゼが欠損する上皮特異的 C/EBP K0 マウスでは線



毛上皮細胞の減少を認めた。形態的には線毛上皮細胞の短縮、扁平化、連続性の減少(図 C)を呈し、ヒト COPD の気道上皮との類似性を示した。肺上皮特異的に遺伝子を改変した



Scgba1a-rtTACre-TdTomato マウスにおいておよそ半数以上の線毛上皮細胞が GFP 陽性を示し、これより喫煙による肺傷害後にクラブ細胞からの線毛上皮細胞への分化・再生が繰り返されていることを示した。この現象は C/EBP K0 マウスでは有意に乏しく(図 D)、プロテアーゼによる影響が考えられた。喫煙の半年間にセリンプロテアーゼ阻害剤である BPTI を気管内投与することにより線毛上皮細胞の分化は C/EBP K0 マウスにおいてレスキューされた(図 E)、引き続き病理学的気腫性変化の形態計測を行う予定である。



- 5 肺胞再生治療の手法として、II 型肺胞上皮の移入が有力候補である。マウス肺細胞において、MHCII と EpCAM を細胞表面マーカーとしてソートすることにより、高純度の II 型塵埃上皮を単離することができることを報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

- Shikuma K, Chen-Yoshikawa TF, Oguma T, Kubo T, Ohata K, Hamaji M, Kawaguchi A, Motoyama H, Hijiyama K, Aoyama A, Matsumoto H, Muro S, Date H. Radiologic and Functional Analysis of Compensatory Lung Growth After Living-Donor Lobectomy. *Ann Thorac Surg*. 2018;105(3):909-914
- Muro S. Diabetes mellitus and metabolic syndrome in patients with airflow limitation in Japan. *Respiratory Investigation*. 2018;56(3):203-204
- Fuseya Y, Muro S, Sato S, Tanabe N, Sato A, Tanimura K, Hasegawa K, Uemasu K, Kubo T, Kido A, Fujimoto K, Fushimi Y, Kusahara H, Sakashita N, Ohno Y, Togashi K, Mishima M, Hirai T. Complementary regional heterogeneity information from COPD patients obtained using oxygen-enhanced MRI and chest CT. *PLoS One*. 2018;13(8):e0203273

4. Tanizawa K, Handa T, Kubo T, Chen-Yoshikawa TF, Aoyama A, Motoyama H, Hijiya K, Yoshizawa A, Oshima Y, Ikezoe K, Tokuda S, Nakatsuka Y, Murase Y, Nagai S, Muro S, Oga T, Chin K, Hirai T, Date H. Clinical significance of radiological pleuroparenchymal fibroelastosis pattern in interstitial lung disease patients registered for lung transplantation: a retrospective cohort study. *Respiratory Research*. 2018;19(1):162
5. Mondoñedo JR, Sato S, Oguma T, Muro S, Sonnenberg AH, Zeldich D, Parameswaran H, Hirai T, Suki B. CT-Based Low-Attenuation Super Clusters in 3D and the Progression of Emphysema. *Chest*. 2018;pii:S0012-3692(18):32496-6
6. Tanabe N, Oguma T, Sato S, Kubo T, Kozawa S, Shima H, Koizumi K, Sato A, Muro S, Togashi K, Hirai T. Quantitative measurement of airway dimensions using ultra-high resolution computed tomography. *Respiratory Investigation*. 2018;56(6):489-496
7. Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, Seki M, Konishi S, Ikeo S, Sone N, Nagasaki T, Matsumoto H, Muro S, Ito I, Hirai T, Kohno T, Suzuki Y, Mishima M. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods*. 2017;14(11):1097-1106
8. Hasegawa K, Sato A, Tanimura K, Uemasu K, Hamakawa Y, Fuseya Y, Sato S, Muro S, Hirai T. Fraction of MHCII and EpCAM expression characterizes distal lung epithelial cells for alveolar type 2 cell isolation. *Respir Res*. 2017 Aug 7;18(1):150. doi: 10.1186/s12931-017-0635-5.
9. Shikuma K, Menju T, Chen F, Kubo T, Muro S, Sumiyoshi S, Ohata K, Sowa T, Nakanishi T, Cho H, Neri S, Aoyama A, Sato T, Sonobe M, Date H. Is volumetric 3-dimensional computed tomography useful to predict histological tumour invasiveness? Analysis of 211 lesions of cT1N0M0 lung adenocarcinoma. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016 Jun;22(6):831-8.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 室 繁郎 COPD CTによる呼吸機能予測 2019年1月26日 第11回呼吸機能イメージング研究会学術集会 コアセッション3 『画像による呼吸機能の予測、どこまでできる。』
2. 藤田幸男、吉川雅則、山口千影、小林真理、中野美芳、早味 司、中野奈央、檜原 柊、荒木迪子、岩田 琢、山本佳史、室 繁郎 . MNA-SFによる COPD 患者の栄養評価と骨密度および骨代謝マーカーとの関連 . 第34回日本静脈経腸栄養学会学術集会 . 2018.
3. Sunadome H, Matsumoto H, Izuhara Y, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Ishiyama Y, Morimoto C, Oguma T, Ito I, Muro S, Tabara Y, Matsuda F, Chin K, Hirai T. mpacts of Smoking and Serum IgE Level on Blood Eosinophil Counts in the General Population: The Nagahama Study . American Thoracic Society International Conference . 2018 .
4. Sato A, Tanabe N, Tanimura K, Hasegawa K, Hamakawa Y, Mizutani T, Sato S, Muro S, Hirai T. Deletion of CCAAT/Enhancer Binding Protein-a (C/EBPa) Exacerbates Protease/Antiprotease Imbalance and Emphysema Development in Cigarette Smoke Exposed Murine Lung . American Thoracic Society International Conference . 2018 .
5. Mochizuki F, Iijima H, Keiji F, Shimada T, Watanabe A, Shi igai M, Ishikawa H, Kanazawa K, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Oguma T, Sato S, Muro S, Hizawa N. Abnormality in Flow Volume Loop of Obstructive Index Reflects the Extent of Emphysema and Disease Severity in Obstructive Lung Diseases . American Thoracic Society International Conference . 2018 .
6. Hamakawa Y, Sato A, Tanabe N, Uemasu K, Hasegawa K, Mizutani T, Sato S, Muro S, Hirai T. Muscarinic Receptor Stimulation Enhances Pathophysiological Phenotypes in Murine Model of COPD . American Thoracic Society International Conference . 2018.
7. 室繁郎 . COPD ガイドライン改訂と今後の行方 -診断、検査- . 第58回日本呼吸器学会学術講演会 . 2018.
8. 室繁郎 . 海外のエビデンスを基にしたガイドラインは、日本の臨床に適用可能か? -COPD- . 第58回日本呼吸器学会学術講演会 . 2018.
9. 室 繁郎 閉塞性肺疾患の呼吸機能と形態学、CT 画像解析 2018年2月2日 第10回呼吸機能イメージング研究会学術集会 コアセッション 4 . 他領域の先生に知っておいてほしい技術・知識
10. 堀 創馬、佐藤 晋、田辺直也、長谷川浩一、上榎 潔、濱川瑤子、佐藤篤靖、小熊

毅、室 繁郎、平井 豊博 Tiotropium による COPD 患者における気管支拡張効果 2018 年 2 月 第 10 回呼吸機能イメージング研究会学術集会ポスターセッション

11. 田辺直也、室 繁郎、小熊 毅、佐藤 晋、佐藤篤靖、平井豊博 COPD 肺における相対的低吸収領域クラスターを用いた新たな CT 指標の確立 2018 年 2 月 第 10 回呼吸機能イメージング研究会学術集会ポスターセッション

12. 室 繁郎 シンポジウム COPD の治療 Up date 併存症への対応 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017.04 東京

13. 伏屋芳紀、佐藤篤靖、佐藤 晋、谷村和哉、長谷川浩一、上榎 潔、濱川瑤子、酒井直樹、室 繁郎、平井豊博 小動物用 CT 画像を用いた微小肺気腫病変のクラスター解析 2017 年 1 月 20 日 第 9 回呼吸機能イメージング研究会学術集会ポスターセッション

14. 伏屋芳紀、佐藤篤靖、佐藤 晋、谷村和哉、長谷川浩一、上榎 潔、濱川瑤子、酒井直樹、室 繁郎、平井豊博 小動物用 CT を用いた微小肺気腫病変の検出法の検討 2017 年 1 月 20 日 第 9 回呼吸機能イメージング研究会学術集会ポスターセッション

15. 佐藤 晋、佐藤篤靖、伏屋芳紀、谷村和哉、長谷川浩一、上榎 潔、濱川瑤子、酒井直樹、室 繁郎、平井豊博 エラストーゼ傷害肺気腫マウスにおける呼吸インピーダンス測定と定量的胸部 CT による機能的・構造的不均一性の関連性 2017 年 1 月 20 日 第 9 回呼吸機能イメージング研究会学術集会ポスターセッション

16. 佐藤 晋、谷村和哉、佐藤篤靖、長谷川浩一、上榎 潔、濱川瑤子、小熊 毅、平井豊博、加藤元一、室 繁郎 胸部 CT 画像から得られる COPD の予後因子の比較 気腫病変と併存病態 2017 年 1 月 20 日 第 9 回呼吸機能イメージング研究会学術集会ポスターセッション

17. 谷村和哉、佐藤 晋、佐藤篤靖、長谷川浩一、上榎 潔、濱川瑤子、小熊 毅、平井豊博、加藤元一、室 繁郎 頻回増悪と全身炎症は抗重力筋萎縮に寄与する 胸部 CT を用いた定量的縦断解析 2017 年 1 月 20 日 第 9 回呼吸機能イメージング研究会学術集会ポスターセッション

18. S. Sato, S. Muro, K. Tanimura, T. Oguma, A. Sato, K. Hasegawa, K. Uemasu, Y. Hamakawa, T. Hirai, M. Mishima, Kyoto, Japan, Three-Dimensional Lobar Evaluation of Pharmacological Volume Reduction Induced by Tiotropium in COPD Patients. American Thoracic Society International Conference May 13-May 18, 2016 San Francisco, California [図書](計 8 件)

1. 室 繁郎 . 5 . 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) . 今日の処方今日の処方 改訂第 6 版 . 東京 : 南江堂 . 2019:173-177

2. 藤田幸男, 室 繁郎 . ガイドラインに基づく COPD の診断と治療 . 呼吸器ジャーナル . 2019:67(2)254-261

3. 春成加奈子, 藤田幸男, 吉川雅則, 室 繁郎 . 日本人対象エビデンスの重要性 . 吸入療法 . 2019:11(1):25-32

4. 山本佳史, 室繁郎 . 薬剤の選択 . 慢性閉塞性疾患 (COPD) . 2018:140(4):124-132

5. 室 繁郎 高橋 珠紀 【気管支喘息・COPD 診療に強くなる】気管支喘息・COPD の増悪への対応 COPD 増悪への対応 Medicina (0025-7699)55 巻 1 号 Page116-118(2018.01)

6. Hiroyuki Nakamura (編集), Kazutetsu Aoshiba (編集): Kazuya Asai, Kazuto Hirata, Yoko Shibata, Takeo Ishii, Aakane, Kato, Masayuki Hanaoka, Tadashi Sato, Kuniaki Seyama, Kazuyoshi Kuwano, Jun Araya, Hiromichi Hara, Shunsuke Minagawa, Naoki Takesaka, Saburo Ito, Katsutoshi Nakayama, Yuko Morishima, Nobuyuki Hizawa, Nobuyuki Horita, Takeshi Kaneko, Takeshi Motegi, Takeo Tsuji, Keisaku Fujimoto, Masayuki Ito, Yasuhiro Yamauchi, Takahide Nagase, Masamichi Mineshita, Hidehiro Watanabe, Nariaki Kokuho, Shigeo Muro, Arata Azuma, Shinsaku Togo, Yukio Manba, Kazuhisa Takahashi Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systemic Inflammatory Disease (Respiratory Disease Series: Diagnostic Tools and Disease Managements) 出版社: Springer; 1st ed. 2017 版 352 ページ (2016/11/11)

7. 小熊 毅, 松本 久子, 室 繁郎, 平井 豊博. 【喘息-COPD オーバーラップ症候群 (ACOS) の病態と臨床】 画像・機能からみた ACOS (解説/特集). 喘息・アレルギー (2424-1121) 29 巻 2 号 Page159-164 (2016. 10)

8. 室 繁郎 【呼吸器疾患診療の最新情報】 COPD 併存症を含めた疾患管理 (解説/特集) 日本内科学会雑誌 (0021-5384) 105 巻 6 号 Page957-962 (2016. 06)

[産業財産権・その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 晋

ローマ字氏名：Susumu Sato

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：40378691

研究分担者氏名：佐藤 篤靖

ローマ字氏名：Atsuyasu Sato

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：30706677

研究分担者氏名：田辺 直也

ローマ字氏名：Naoya Tanabe

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：特定助教

研究者番号（8桁）：308505817

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。