

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15453

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患におけるエピゲノム変化および活性硫黄分子種の役割の解明

研究課題名(英文) Role of epigenomic changes and reactive sulfur species in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

杉浦 久敏 (Sugiura, Hisatoshi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20445092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、COPDの肺細胞におけるエピゲノム変化がCOPDの病態に及ぼす作用を検討することを目的とした。COPD患者の肺胞マクロファージにおける細菌貪食受容体の発現が低下しており、COPDにおける易感染性に関係する可能性が示唆された。さらにCOPD患者のヒストン蛋白はエピゲノム変化の一種であるニトロ化が生じていることが明らかになった。また新規内因性還元分子である活性硫黄分子種がCOPDの肺細胞では低下しており、呼吸機能の低下と関与することが明らかになった。さらに活性硫黄分子種の産生酵素の役割について検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDにおけるエピゲノム変化が病態に及ぼす影響についてはヒストン蛋白のアセチル化の制御については解明されているが、それ以外の変化、とりわけニトロ化については全く不明である。さらに今回、明らかにした細菌貪食受容体の発現低下についてはCOPDの自然歴において重要な増悪病態と深く関連する可能性がある。活性硫黄分子種は全く新規の内因性抗酸化分子でありヒト肺に存在し、COPD患者肺においてその産生量が低下していることは世界初の知見である。本研究は呼吸器領域のトップジャーナルであるThorax誌に掲載された。

研究成果の概要(英文)：In the current project, we aimed to investigate the effects of epigenomic changes in lung resident cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We found that the expression of CD169 in the COPD alveolar macrophages, which is involved in phagocytosis of bacteria was significantly attenuated compared to that in the control subjects. Moreover, histone in the bronchial epithelial cells from COPD patients was more nitrated compared to that from healthy subjects. In the COPD lung cells such as bronchial epithelial cells and lung fibroblasts, intracellular levels of reactive sulfur species (RSS) were significantly decreased compared to the lung cells from healthy subjects. Now, we have been studying the role of RSS producing enzyme.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：エピゲノム変化 活性硫黄分子種

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

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) におけるエピゲノム変化は、マクロファージにおける histone deacetylase (HDAC) の失活によるヒストンのアセチル化を介して肺の炎症に関与することが知られている (NEJM 2005)。一方で、COPD の他の肺細胞におけるエピゲノム変化は、ほとんど解明されていない。これは、肺細胞を分離精製することが技術的に困難であることに起因する。さらに、TNF や IL-6 等の COPD 病態関連分子の発現に関するエピゲノム修飾の詳細も全く不明である。また最近、TET2 遺伝子変異が HDAC2 の機能低下をもたらす可能性についても明らかになった (Nature 2015)。近年、硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は、強力な抗酸化作用や抗炎症作用を有することから注目されているが、最近、我々の共同研究グループは、H<sub>2</sub>S の抗酸化作用の本態が活性硫黄分子種 (GSSH, CysSSH 等) であることを明らかにした (PNAS 2014)。さらに、エピゲノム解析をする上で問題となる細胞精製法について、独自の酵素処理法で処理し、種々の表面マーカーで識別することで、肺マクロファージ (M1/M2 分画)、気道上皮細胞、肺線維芽細胞、血管内皮細胞を高純度かつ十分量、精製することに成功した (AJRCMB 2012)。

### 2. 研究の目的

COPD の病態は未だ不明な点が多いが、とりわけ COPD の肺細胞におけるエピゲノム変化についてはほとんど解明されていない。また、COPD の炎症では、ニトロ化ストレスが重要な役割を果たすが、ヒストン蛋白の修飾を介して、COPD の病態関連分子の発現に影響を及ぼす可能性がある。近年、新規の還元分子として硫化水素 (H<sub>2</sub>S) が注目されているが、H<sub>2</sub>S の抗酸化作用の本態が、活性硫黄分子種であることを共同研究グループが解明した。本研究では、独自に開発した酵素処理により、COPD の肺細胞を分離精製し、マクロファージをはじめとした種々の肺細胞におけるエピゲノム変化の詳細、ニトロ化ストレスによるエピゲノム変化、さらに活性硫黄分子種を用いた新規炎症制御法について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

対象者から肺組織を入手しマクロファージや肺構築細胞を分離する。活性硫黄分子種の測定には、気道被覆液、喀痰上清、初代気道上皮細胞、肺線維芽細胞を用いる。エピゲノム変化の解析には、各種肺細胞を用いて、免疫沈降-イムノプロット (IP-IB)、クロマチン免疫沈降法 (ChIP-seq) を用いて解析する。ニトロ化ストレスの検討では、肺細胞のヒストン蛋白のニトロ化について、COPD と健常人で比較する。さらに活性窒素種を外的投与した際のヒストン蛋白のニトロ化、アセチル化、メチル化を評価する。活性硫黄分子種の検討では、対象群で産生様式を比較検討する。また活性硫黄分子種産生酵素の発現を免疫組織学的に検討する。COPD 類似 *in vitro*・*in vivo* モデルを用いて、活性硫黄分子種産生刺激薬 (Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) の効果を検証し、活性硫黄分子種の創薬に向けた基礎研究を目指す。

### 4. 研究成果

本研究の目標は、肺構築細胞の機能面から見た COPD の肺細胞におけるエピゲノム変化の解明と新規還元物質である活性硫黄分子種の役割の解明である。前者に関しては、肺マクロファージのエピゲノム解析を行う際に、細菌貪食に関わる受容体である CD169 (別名: Siglec-1) の発現が低下していることが偶然、明らかになった。COPD 患者のマクロファージでは細菌貪食能が低下していること、感染による増悪が COPD の予後を左右することは当該分野における最もホットなトピックスであることから、当初のマクロファージのエピゲノム変化を解明する研究を一部、変更して CD169 の発現と機能解析の研究を開始した。本研究では、コントロール非喫煙者、コントロール既喫煙者、COPD 既喫煙者の手術肺組織検体から肺マクロファージを分離し、肺マクロファージにおける貪食受容体の発現をフローサイトメトリーにより解析した (図 1, 2)。COPD 患者由来の肺マクロファージでは、コントロール非喫煙者、コントロール既喫煙者に比べ、細菌のシアル酸を認識する Siglec-1 の発現が有意に低下していた (図 3)。また重回帰分析により、肺気腫の重症度が Siglec-1 発現に関与する独立因子であることを発見した。本研究成果は、現在、呼吸器領域の英文誌 (Eur Respir J, IF 12.242) に投稿準備中である。

図1 FACSを用いた手術肺からの肺マクロファージの分離

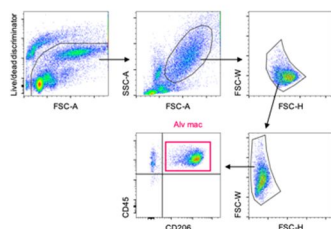


図2 肺マクロファージの表面マーカーの発現

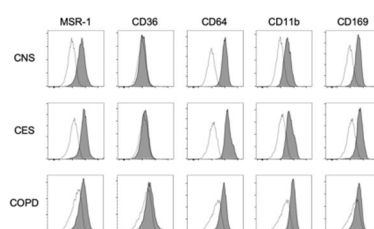
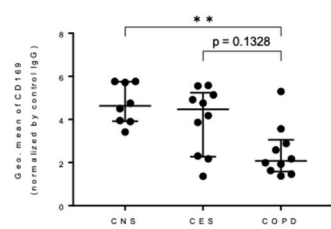


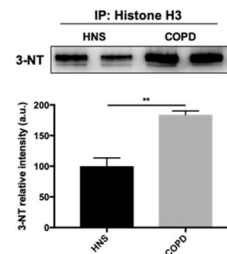
図3 COPD由来肺マクロファージにおけるSiglec-1発現の低下



一方で、肺構築細胞のエピゲノム変化に関しては、現在、肺線維芽細胞を分離培養しており、来年度より開始する予定である。COPD でニトロ化ストレスが亢進しているかを検討するため臨床検体を用いて 3-ニトロチロシン抗体を用いた免疫沈降プロットングを行った。COPD の肺構

築細胞でヒストン蛋白のニトロ化ストレスが亢進しているかを検討するため 3-ニトロチロシン抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、COPD 由来の肺細胞ではニトロ化が亢進していることが明らかになった(図4)。現在、ニトロ化された部位近傍の遺伝子部位の詳細を ChIP アッセイを行っているところである。さらに外因性に peroxynitrite などを投与して細胞にニトロ化ストレスを負荷した際に生じる変化と阻害剤を用いた際にこれらの変化が消失するかについて現在も検討している。

図4 ヒストンタンパクのニトロ化



活性硫黄分子種 (RSS) に関する研究は、予想以上に順調に推移している。COPD 患者の肺細胞及び気道被覆液中の活性硫黄分子種が存在することを世界で初めて報告し、COPD の産生量が健常人に比較して有意に低下しており、呼吸機能と負の相関を示すことを明らかにした(図5,6)。この成果は、肺における新規内因性還元分子の発見として注目され、Thorax 誌(IF 9.655)に掲載された。今現在、活性硫黄分子種産生酵素遺伝子欠損マウスを用いて、COPD の肺の炎症病態における役割を解明するために研究を継続中である。

図5 気道被覆液中の RSS 含有量

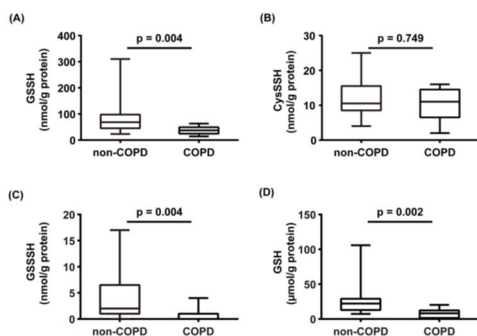


図6 気道上皮細胞中の RSS 含有量

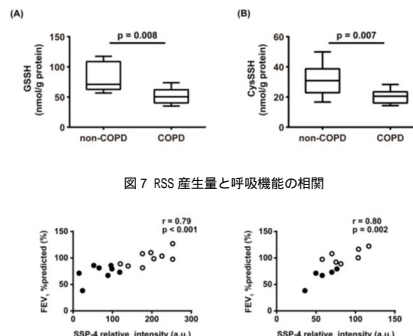
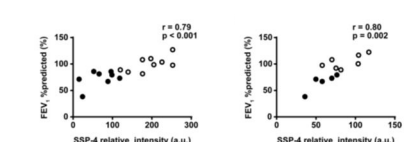


図7 RSS 産生量と呼吸機能の相関



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 34 件)

- Hirano T, Ohkouchi S, Tode N, Kobayashi M, Ono M, Satoh T, Mitsuishi Y, Watanabe A, Tabata M, Irokawa T, Ogawa H, **Sugiura H**, Kikuchi T, Akasaka K, Tazawa R, Inoue Y, Nakata K, Kurosawa H, Ichinose M. Peripheral alveolar nitric oxide concentration reflects alveolar inflammation in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *ERJ Open Res*. 2018; 4: pii: 00071-2017. doi: 10.1183/23120541.00071-2017. 査読あり
- Aizawa H, Koarai A, Shishikura Y, Yanagisawa S, Yamaya M, **Sugiura H**, Numakura T, Yamada M, Ichikawa T, Fujino N, Noda M, Okada Y, Ichinose M. Oxidative stress enhances the expression of IL-33 in human airway epithelial cells. *Respir Res*. 2018; 19: 52. doi: 10.1186/s12931-018-0817-9. 査読あり
- Tanaka R, **Sugiura H**, Yamada M, Ichikawa T, Koarai A, Fujino N, Yanagisawa S, Onodera K, Numakura T, Sato K, Kyogoku Y, Ito S, Sano H, Yamanaka S, Itakura K, Mitsune A, Okazaki T, Tamada T, Miura M., Takahashi T, Ichinose M. Decreased growth differentiation factor 11 is associated with physical inactivity in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018; 13: 1333-1342. doi: 10.2147/COPD.S157035. 査読あり
- Hirano T, Numakura T, Moriyama H, Saito R, Shishikura Y, Shiihara J, **Sugiura H**, Ichinose M. The first case of multiple pulmonary granulomas with amyloid deposition in a dental technician; a rare manifestation as an occupational lung disease. *BMC Pulm Med*. 2018; 18: 77. doi: 10.1186/s12890-018-0654-0. 査読あり
- Komatsu R, Okazaki T, Ebihara S, Kobayashi M, Tsukita Y, Nihei M, **Sugiura H**, Niu K, Ebihara T, Ichinose M. Aspiration pneumonia induces muscle atrophy in the respiratory, skeletal, and swallowing systems. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018; 9: 643-653. doi: 10.1002/jcsm.12297. 査読あり
- Kamata S, Fujino N, Yamada M, Grime K, Suzuki S, Ota C, Tando Y, Okada Y, Sakurada A, Noda M, Matsuda Y, **Sugiura H**, Ichinose M. Expression of cytochrome P450 mRNAs in Type II alveolar cells from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Res Perspect*. 2018; 6: e00405. doi: 10.1002/prp2.405. 査読あり
- Gamo S, Tamada T, Murakami K, Muramatsu S, Aritake H, Nara M, Kazama I, Okazaki T, **Sugiura H**, Ichinose M. TLR7 agonist attenuates acetylcholine-induced, Ca<sup>2+</sup>-dependent ionic currents in swine tracheal submucosal gland cells. *Exp Physiol*. 2018; 103: 1543-1559. doi: 10.1113/EP087221. 査読あり
- 藤野 直也, 杉浦 久敏. アンチテーゼとしての難治性呼吸器疾患の個別化医療. COPD に対する Precision Medicine の展望. *THE LUNG perspective* 2018; 26 (2): 138-141. 査読なし

し

9. 小野寺 克洋、**杉浦 久敏**、山田 充啓、一ノ瀬 正和. COPD における老化抑制因子 Growth differentiation factor 11(GDF11)の関与に関する研究. 分子呼吸器病 2018; 22: 70-72.
10. 市川 朋宏、**杉浦 久敏**. COPD の病態と治療の展望. 難病と在宅ケア 2018; 23: 37-41. 査読なし
11. **杉浦 久敏**. 呼吸困難の診断と治療. 宮城県医師会報 2018; 871: 566-571. 査読なし
12. 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; 54: 606-615. doi: 10.1080/02770903.2016.124716. 査読あり
13. 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; 108: 1263-1270. doi: 10.1111/cas.13233. 査読あり
14. Onodera K, **Sugiura H**, Yamada M, Koarai A, Fujino N, Yanagisawa S, Tanaka R, Numakura T, Togo S, Sato K, Kyogoku Y, Hashimoto Y, Okazaki T, Tamada T, Kobayashi S, Yanai M, Miura M, Hoshikawa Y, Okada Y, Suzuki S, Ichinose M. Decrease in an anti-ageing factor, growth differentiation factor 11, in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2017; 72: 893-904. doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-209352. 査読あり
15. Hirano T, Yamada M, Sato K, Murakami K, Tamai T, Mitsuhashi Y, Tamada T, **Sugiura H**, Sato N, Saito R, Tominaga J, Watanabe A, Ichinose M. Invasive pulmonary mucormycosis: rare presentation with pulmonary eosinophilia. *BMC Pulm Med*. 2017; 17: 76. doi: 10.1186/s12890-017-0419-1. 査読あり
16. Numakura N, **Sugiura H**, Akaike T, Ida T, Fujii S, Koarai A, Yamada M, Onodera K, Hashimoto Y, Tanaka R, Sato K, Shishikura Y, Hirano T, Yanagisawa S, Fujino N, Okazaki T, Tamada T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M. Production of reactive persulfide species in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2017; 72: 1074-1083. doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-209359. 査読あり
17. 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; 66: 163-189. doi: 10.1016/j.alit.2016.12.005. 査読あり
18. **杉浦久敏**. COPD のフェノタイプから見た増悪リスク 呼吸器内科 2017; 31: 554-561. 査読なし
19. 佐藤 慶、山田 充啓、平野 泰三、三橋 善哉、岡崎 達馬、玉田 勉、**杉浦 久敏**、一ノ瀬 正和. 両下肢麻痺を来した肺真菌症の 1 例 日本内科学会雑誌 2017; 106: 591-595. 査読なし
20. **杉浦久敏**. COPD の吸入治療 医学のあゆみ 2017; 261: 213-218. 査読なし
21. **杉浦久敏**. 酸化ストレスと気道炎症 アレルギー・免疫 2017; 24:450-458. 査読なし
22. **杉浦久敏**. 閉塞性肺疾患における気道炎症とバイオマーカー 別冊バイオクリニカ:慢性炎症と疾患 2017; 6: 22-26. 査読なし
23. 平野 泰三、山田 充啓、村上 康司、佐藤 慶、玉井 ときわ、高橋 秀徳、岡崎 達馬、玉田 勉、**杉浦 久敏**、一ノ瀬 正和: 好酸球性肺炎の像を呈した肺接合菌症の 1 例 日本内科学会雑誌 2017; 106: 1006-1011. 査読なし
24. **杉浦 久敏**、一ノ瀬 正和: 酸化ストレスと喘息の重症化 アレルギー 2017; 66: 931-935. 査読なし
25. **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. 査読なし
26. 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. doi: 10.1186/s12931-016-0322-y. 査読あり
27. 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. doi: 10.1152/ajplung.00351.2015. 査読あり
28. 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. doi:10.1186/s12931-016-0427-3. 査読あり

29. 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. doi: 10.1186/s12931-016-0438-0 査読あり
30. 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. doi:10.1016/j.resinv.2016.04.006. 査読あり
31. **杉浦久敏**. COPDと免疫異常 炎症と免疫 2016; 24: 325-330. 査読なし
32. 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. 査読なし
33. 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. 査読なし
34. 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Chlamydomyces pneumoniae感染症の1例 日本内科学会雑誌 2016; 105: 2426-2431. 査読なし

〔学会発表〕(計10件)

1. **杉浦久敏**. 喘息合併 COPD: 病態と治療 ACOのガイドラインにおける診断基準と治療. 第67回日本アレルギー学会学術大会, 千葉県幕張市, 2018年6月.
2. **Sugiura H**. Update on FeNO. APSR 2018 in Taipei. Taipei, Taiwan. 2018年11月.
3. **Sugiura H**. Role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. KI-ToMMo joint conference Young Investigator Session. Sendai, Miyagi, Japan. 2017年10月.
4. **杉浦久敏**. 新旧ガイドラインの比較 第38回日本呼吸器学会春期生涯教育講演会 東京都 2017年4月.
5. **杉浦久敏**. 免疫炎症細胞からみた重症呼吸器疾患の病態と治療の展望 COPD 第57回日本呼吸器学会学術講演会 東京都 2017年4月.
6. **杉浦久敏**. COPDに潜む喘息 第57回日本呼吸器学会学術講演会 東京都 2017年4月.
7. **杉浦久敏**. 新旧ガイドラインの比較 第38回日本呼吸器学会秋期生涯教育講演会 東京都 2017年10月.
8. **杉浦久敏**. 気管支喘息におけるFeNO測定の意義 第27回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会 宮城県仙台市 2017年11月.
9. **Sugiura H**. Oxidative stress and COPD. 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Sendai, Japan. 2016年5月.
10. **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 宮城県仙台市 2016年8月.

〔図書〕(計1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

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。