

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15946

研究課題名(和文) Papainを用いた喘息・COPDオーバーラップ(ACO)マウスモデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of an Asthma-COPD Overlap (ACO) Mouse Model Using Papain

研究代表者

平石 尚久(Hiraishi, Yoshihisa)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：90783514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は簡便にACOの臨床的特徴を再現する動物モデルとして、植物パパイヤ由来システインプロテアーゼであるパパインに着目した。ブタ膵臓エラスターゼ(PPE)によるCOPDモデル、およびPBS投与群を対象として、パパインを反復投与したモデルと比較した。各群の肺病理においては、PPE群とパパイン群では気腫形成が認められた。またパパインを反復投与したマウスでは、気管支肺胞洗浄液の好酸球が他群と比較して有意に増加し、またメサコリン吸入に対する気道過敏性試験で、パパイン群は有意に気道過敏性の亢進を示し、喘息の特徴も示された。パパイン反復投与マウスはヒトACOを模したモデルとして妥当であると示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息・COPDオーバーラップ(ACO)については、重要な呼吸器疾患である一方、背景病態の理解はまだまだ未解明である。本モデルは、小動物を用いて簡便に作成できる一方、COPDおよびヒト気管支喘息に相当する特徴も有することが示された。前述の通りヒトCOPDとしての特徴を持つことも合わせ、本研究におけるパパイン反復投与マウスはヒトACOを模したモデルとして妥当であると示された。

研究成果の概要(英文)：We focused on papain, a cysteine protease from the plant papaya, as an animal model that conveniently reproduces the clinical features of ACO. We compared a pig pancreatic elastase (PPE)-induced COPD model and a PBS-treated group with a model in which papain was repeatedly administered. In the lung pathology of each group, emphysema formation was observed in the PPE and papain groups. Eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid were significantly increased in the repeated papain-treated mice compared to the other groups, and in the airway hyperresponsiveness test to methacholine inhalation, the papain group showed significantly increased airway hyperresponsiveness and asthmatic features. Repeated papain-treated mice were shown to be a reasonable model for human ACO.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：ACO 喘息 COPD

1 . 研究開始当初の背景

・ Asthma-COPD Overlap (ACO)の臨床的・疫学的特徴

近年、喘息治療は吸入療法の普及により成績が大きく進歩したが、いまだ喘息患者の 5-10%程度は症状のコントロール不良な重症喘息に該当するとされ[Eur Respir J 2014; 43: 343-73]、本邦においても数百万人以上の重症喘息患者が存在する。重症喘息は患者の日常生活に大きく影響し、また近年の分子標的治療薬の普及もあり軽症～中等症喘息と比較し医療コストの点でも圧倒的に負担が大きく、呼吸器・アレルギー領域の重要な課題となっている。また、主に長期の喫煙によって生じる慢性呼吸器疾患である COPD(chronic obstructive pulmonary disease)は、本邦においても主要な死亡原因の一つで、毎年 1 万 6 千人を超える死亡者が生じている[日内会誌 2015; 104: 1059-66]。喘息、COPD とともに国内に 500 万人以上の患者数が存在するが、その両者の特徴をもつ疾患群として Asthma-COPD Overlap (ACO)が注目されている。ACO は COPD の 20-50%程度に合併するとされ[Thorax 2009; 64: 728-35]、本邦での疫学研究では高齢者では COPD の 48%、喘息の 24%が ACO に該当すると考えられている[日内会誌 2015; 104: 1083-8]。ACO は COPD もしくは喘息単独と比べて、予後が悪いとする報告があり[Int J Chron Obstruct Dis 2015; 10: 1443-54]、臨床的な課題となっている。また、ACO については喘息が 40 歳以前に診断されているもの (early onset) と 40 歳以降に診断されているもの (late onset) で疾患群としては異なるという報告[Eur Respir J 2016; 48: 664-73]がある。特に early onset ACO については、持続性喘息の小児が非喘息の小児と比べて呼吸機能の発達が悪い事[N Engl J Med 2016; 375: 871]、また逆に 50 歳の COPD 患者での肺機能低下の多くが小児喘息と関連する事[Thorax 2014; 69: 805-10] が知られており、喘息既往との関連が疑われている。成人してからの喫煙等への暴露によりさらなる呼吸機能悪化がもたらされていると考えられている。

・ ACO 病態の実験モデル構築

例えば喫煙喘息患者は非喫煙喘息患者と比べ、より重症で、呼吸機能の経年的低下も大きく、キードラックである吸入ステロイド薬の効果が乏しい(ステロイド耐性がある) [Thorax 2002; 57: 226-230]。これら喫煙がもたらす喘息重症化の機序の一つとして、炎症性サイトカインの存在が挙げられる。タバコ煙中には細菌のリポ多糖類が存在し、NF- κ B 等の転写因子を介して炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor (TNF)- α や interleukin(IL)-8 を誘導し、気道への好中球集積が促されるとされる[J Immunol 2003; 170: 795-804]。好中球はステロイド応答についてのドミナントネガティブであるグルココルチコイド受容体 (Glucocorticoid Receptor; GR- β)が多く、機能性受容体である GR- α の作用を阻害しステロイド耐性をもたらす[Endocrinology 2010; 151: 3204-13]。一方で、自然免疫系の炎症性サイトカインである IL-33 と Thymic stromal lymphoprotein (TSLP)は共に Innate lymphoid cells (ILC)-2等の自然リンパ球に作用することで喘息病態のステロイド耐性に関与することが示唆されているが[Nat Commun 2013; 4: 2675]、その喫煙との関連性については不明な点が多い。疾患群としての ACO は多様な病因を背景に持つことが推察されるが、特に若年に発症し長年にわたり重症喘息に罹患する early onset ACO については、気道炎症および呼吸機能障害の分子生物学的解明や、喫煙がもたらす修飾の影響の解明が必要であるが、その理解は十分といえない。実際の臨床病型をモデルとする ACO マウスモデルの構築は、病態の理解に大きく寄与することが期待されるが、その確立されたモデルは未だ存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究は未だ確立されていない ACO マウスモデルの作成を以下の手法により試み、その生理学・病理学・分子生物学的な特徴を解析することを目的とした。

・システインプロテアーゼ Papain を用いた肺気腫モデルの作成

食品加工目的に用いられるパパイヤ由来の物質である Papain はシステインプロテアーゼであり、ダニ主要グループ 1 アレルゲンである Derp1 および Derf1 と相同性を有する。また、papain は 3 日間連続でマウスに経鼻投与することで、非常に短期間に急性の好酸球性気道炎症を惹起できる。この炎症モデルは獲得免疫系を欠く Rag2 欠損マウスでも同様に誘導される一方、IL-33 および ILC2 を介する自然免疫系が炎症の惹起に必須であることが知られている [Allergol Int 2012; 61: 265-73]。一方で、週 1 回の継続的な投与で肺に気腫性変化およびコンプライアンスの上昇をもたらすことも知られており [Respir Physiol Neurobiol 2014; 200: 90-6]、長期投与では papain 特異的な IgG1/IgE も誘導される [J Immunol 2013; 190: 4489-99]。

マウス肺気腫モデルとして知られるエラスターゼの気道内投与では、好酸球性気道炎症はほとんど惹起されず [Respir Res 2013; 14: 5]、ACO モデルとしての適用は難しい。これらの知見からは、papain は継続的な長期投与で ACO のマウスモデルを作成しうる有望な候補薬剤であることが示唆される。また、長期投与で認められる気腫性変化を含む肺の構造変化に対する、IL-33 や TSLP、ILC2 といった自然免疫系の関与については不明な点が多い。

3. 研究の方法

本研究では、ACO について、1)病理学的に肺の気腫性変化があること、2)好酸球性気道炎症が存在する事、3)気道過敏性が亢進する事、を満たすことを実験モデルの定義とする。Papain は高容量 (50-100 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ /回) の投与で気腫性変化をもたらしやすいことが知られている。Papain をマウスに経気管的にエアロゾルで反復投与することで簡便に ACO マウスモデルを作成できるかどうか検討した。

4. 研究結果

ブタ膵臓エラスターゼ(PPE)による COPD モデル、および PBS 投与群を対象として、Day 0, 7, 14, 21 に Papain50 μg を反復投与したモデルとの比較検討を行った。

図 1 a ACO マウスモデル

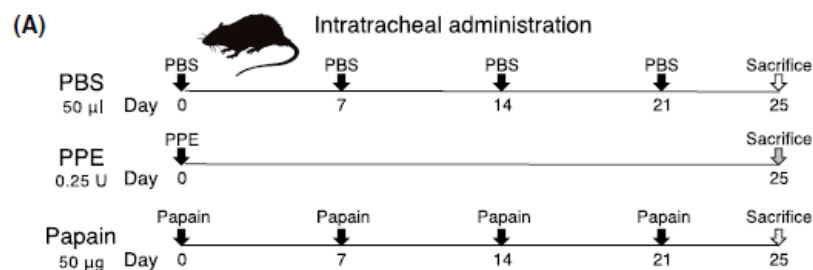
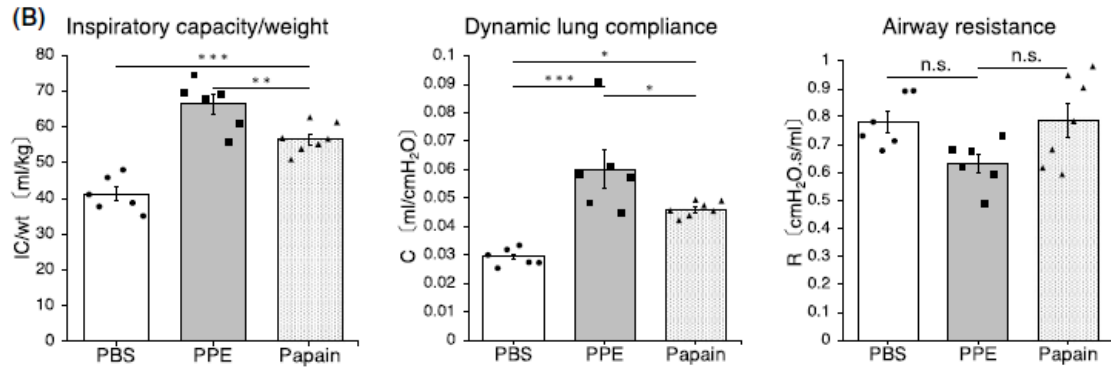
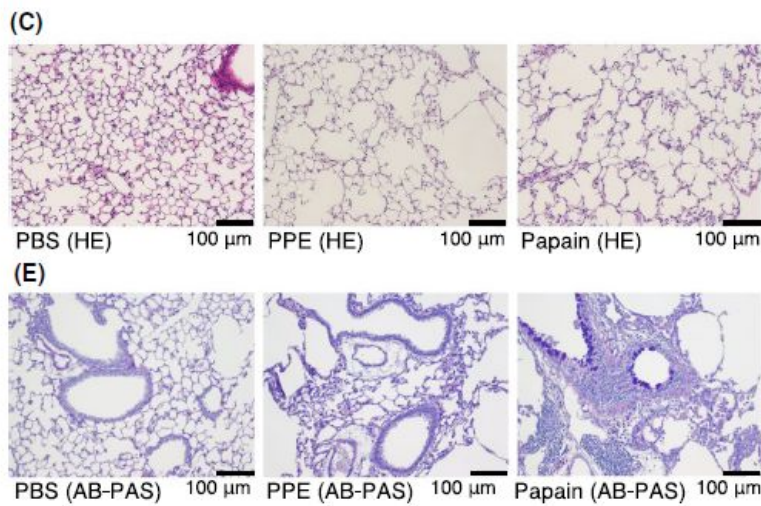


図 1 b 気道コンプライアンスの変化



Papain 投与群において、有意に気道コンプライアンスの上昇を認めた

図 1c 気腫性変化



また、Papain 投与群において摘出肺の肺気腫形成を認めた。

図 1G 気管支肺胞洗浄液(BALF)での白血球細胞分画を測定すると、Papain 群における好酸球分画の有意な上昇を認めた。

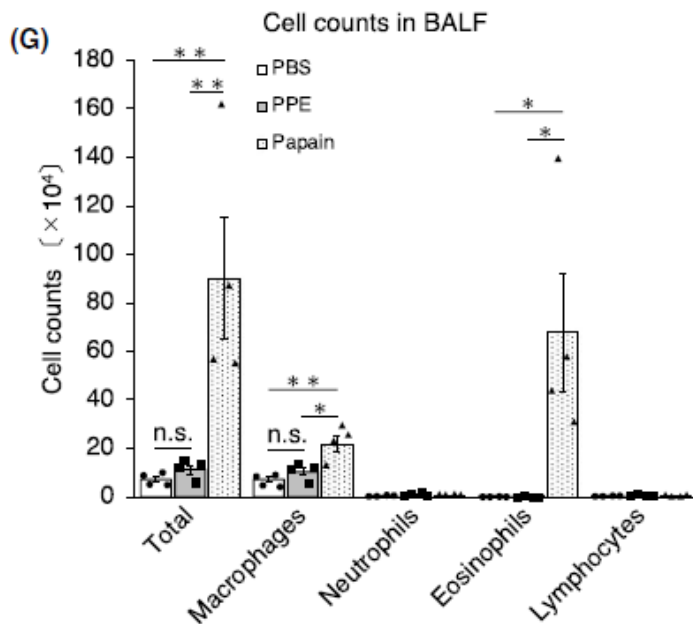
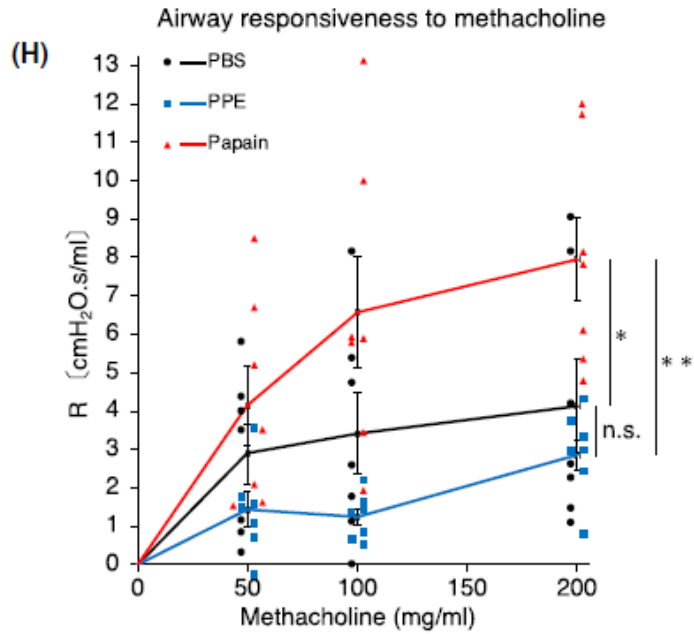


図 1H 気道過敏性の亢進



メサコリンにより気道過敏を更新させマウス気道過敏性を測定した。Papain 群での有意な気道過敏性の亢進が確認された。

・ 結語

以上の結果から、週 1 回の継続的な Papain により簡便に ACO 病態を反映するマウスモデルができることが示された。今後の ACO 病態のさらなる分子学的検討に有用なモデルであると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishiwata T, Hiraishi Y, Bernard N, Sata Y, Gregor A, Aragaki M, Yasufuku K.	4. 巻 S0022-5223
2. 論文標題 Transbronchial real-time lung tumor localization with folate receptor-targeted near-infrared molecular imaging: A proof of concept study in animal models.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 01034-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2022.09.042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lou J, Aragaki M, Bernard N, Chee T, Gregor A, Hiraishi Y, Ishiwata T, Leung C, Ding L, Kitazawa S, Koga T, Sata Y, Ogawa H, Chen J, Kato T, Yasufuku K, Zheng G.	4. 巻 292
2. 論文標題 Repeated photodynamic therapy mediates the abscopal effect through multiple innate and adaptive immune responses with and without immune checkpoint therapy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomaterials.	6. 最初と最後の頁 121918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2022.121918.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gregor A, Sata Y, Hiraishi Y, Ishiwata T, Aragaki M, Kitazawa S, Koga T, Ogawa H, Bernard N, Yasufuku K.	4. 巻 165
2. 論文標題 Preclinical feasibility of bronchoscopic fluorescence-guided lung sentinel lymph node mapping.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 337-350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2022.08.031.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Kensuke, Matsuzaki Hirotaka, Mikami Yu, Makita Kosuke, Miyakawa Kazuko, Miyashita Naoya, Hosoki Keisuke, Ishii Takashi, Noguchi Satoshi, Urushiyama Hirokazu, Horie Masafumi, Mitani Akihisa, Yamauchi Yasuhiro, Shimura Eri, Nakae Susumu, Saito Akira, Nagase Takahide, Hiraishi Yoshihisa	4. 巻 76
2. 論文標題 A mouse model of asthma chronic obstructive pulmonary disease overlap induced by intratracheal papain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 390 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jo Taisuke, Yasunaga Hideo, Yamauchi Yasuhiro, Mitani Akihisa, Hiraishi Yoshihisa, Hasegawa Wakae, Sakamoto Yukiyo, Matsui Hiroki, Fushimi Kiyohide, Nagase Takahide	4. 巻 6
2. 論文標題 Inhaled corticosteroid withdrawal may improve outcomes in elderly patients with COPD exacerbation: a nationwide database study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ERJ Open Research	6. 最初と最後の頁 00246 ~ 2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/23120541.00246-2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jo Taisuke, Yasunaga Hideo, Yamauchi Yasuhiro, Mitani Akihisa, Hiraishi Yoshihisa, Hasegawa Wakae, Sakamoto Yukiyo, Matsui Hiroki, Fushimi Kiyohide, Nagase Takahide	4. 巻 6
2. 論文標題 Inhaled corticosteroid withdrawal may improve outcomes in elderly patients with COPD exacerbation: a nationwide database study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ERJ Open Research	6. 最初と最後の頁 00246 ~ 2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/23120541.00246-2019	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kage Hidenori, Kohsaka Shinji, Shinozaki Ushiku Aya, Hiraishi Yoshihisa, Sato Jiro, Nagayama Kazuhiro, Ushiku Tetsuo, Takai Daiya, Nakajima Jun, Miyagawa Kiyoshi, Aburatani Hiroyuki, Mano Hiroyuki, Nagase Takahide	4. 巻 110
2. 論文標題 Small lung tumor biopsy samples are feasible for high quality targeted next generation sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2652-2657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14112	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urushiyama Hirokazu, Terasaki Yasuhiro, Hiraishi Yoshihisa, Nagase Takahide, et. al	4. 巻 23
2. 論文標題 Naftopidil reduced the proliferation of lung fibroblasts and bleomycin induced lung fibrosis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 3563 ~ 3571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.14255	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraishi Yoshihisa, Yamaguchi Sachiko, Yoshizaki Takamichi, Nambu Aya, Shimura Eri, Takamori Ayako, Narushima Seiko, Nakanishi Wakako, Asada Yosuke, Numata Takafumi, Nagase Takahide, Nakae Susumu, et al	4. 巻 8
2. 論文標題 IL-33, IL-25 and TSLP contribute to development of fungal-associated protease-induced innate-type airway inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36440-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Sachiko, Nambu Aya, Numata Takafumi, Yoshizaki Takamichi, Narushima Seiko, Shimura Eri, Hiraishi Yoshihisa, Arae Ken, Morita Hideaki, Matsumoto Kenji, Hisatome Ichiro, Sudo Katsuko, Nakae Susumu	4. 巻 8
2. 論文標題 The roles of IL-17C in T cell-dependent and -independent inflammatory diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34054-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeshima Hideyuki, Horie Masafumi, Mikami Yu, Makita Kosuke, Miyashita Naoya, Matsuzaki Hirota, Noguchi Satoshi, Urushiyama Hirokazu, Hiraishi Yoshihisa, Mitani Akihisa, Borok Zea, Nagase Takahide, Yamauchi Yasuhiro	4. 巻 68
2. 論文標題 CISH is a negative regulator of IL-13-induced CCL26 production in lung fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 101 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Urushiyama Hirokazu, Terasaki Yasuhiro, Hiraishi Yoshihisa, Yamauchi Yasuhiro, Shimizu Akira, Nagase Takahide, et al	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Naftopidil reduced the proliferation of lung fibroblasts and bleomycin induced lung fibrosis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 *
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.14255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshihisa Hiraishi
2. 発表標題 Characterizat on of allergic airway inflammation induced by fungal-associated proteinases
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshihisa Hiraishi
2. 発表標題 Characterizat on of allergic airway inflammation induced by fungal-associated proteinases
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------