

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590917

研究課題名 (和文) 新規仮説に基づいた COPD の発症機序の解明

研究課題名 (英文) Research of the onset mechanism of COPD

研究代表者

青柴 和徹 (AOSHIBA KAZUTETSU)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60231776

研究成果の概要： COPD の発症機序を解明するために、「細胞死と老化仮説」に基づいて COPD 患者の肺組織、培養細胞、マウスを用いた検討を用いた検討を行った。その結果、COPD 患者ではクララ細胞の老化のために末梢気道の傷害の修復が抑制されているとともに、老化細胞から産生されたメディエータを増強する機序が示唆された。したがって COPD 患者においては気道上皮の老化が気道の修復障害や慢性炎症の一因である可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：COPD、老化、細胞死、細胞増殖、炎症、肺気腫、気道上皮、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

COPD は加齢を背景に発症する喫煙関連疾患である。日本においては 500 万人以上の患者が存在しているが、人口の高齢化とともに一層の患者数の増加が懸念されている。さらに WHO の疾病動向予測によれば世界的にも COPD の患者数は増加し、2020 年には全世界の死因の第 3 位になるものと予測されている。

このように COPD の増加は社会的脅威になりつつあるが、未だ COPD の発症機序は不明で根本的な治療薬もない。例えば現在使用されている気管支拡張薬や吸入ステロイド薬には COPD に対する進行防止効果は認められていない。このように COPD に対する治療薬の開発が進まない理由には、従来の考え方にに基づい

た COPD の発症機序に基づいた研究のみでは理解が不充分であることがあげられる。したがって従来とは異なる新しい観点から COPD の発症機序を研究しなければならない学術的意義が考えられる。40 年前から論じられてきた COPD (肺気腫) の発症仮説は、喫煙により活性化された炎症細胞からのプロテアーゼが肺の細胞外基質であるエラスチンやコラーゲンを破壊するという考え方 (プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説) に拠っている。しかしながらこの古典的仮説に基づいて試みられたアンチプロテアーゼ補充療法では COPD に対して十分な治療効果が得られないこと、肺炎のように高度の炎症細胞浸潤とプロテアーゼ活性の増加がみられる病態において COPD が生じないこと、そして COPD における肺胞細胞の消失機序を十分に説明できないことがこの仮説の問題点として残されてきた。そこで私どもの提唱した「細胞死と老化仮説」に基づき COPD の発症機序を解明することにした。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究成果を継続・発展させ、気道における細胞老化が COPD の気道リモデリングと炎症に関与しているかについて多面的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養クララ細胞を用いた研究

ヒトクララ様細胞 (NCI-H441) 細胞に BrdU (50 または 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加して 3 週間培養し、細胞老化を誘導した。

(2) クララ細胞老化マウスを用いた研究

8 週齢の雄 C57/BL6J マウスに週 1 回、3 週間連続してナフタレン (200mg/kg) または溶媒 (cotton oil) を腹腔内注射した。ナフタレン注射の翌日から 3 日間、細胞老化を誘導するために BrdU (200mg/kg) または 0.3% CMC を腹腔内注射し、1 週間後 (最初のナフタレン注射か

ら 1 ヶ月後) に肺を摘出し、左肺から凍結切片を作製した。右肺は 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン切片を作成した。

(3) ヒト肺組織を用いた研究

肺容量減量術または肺癌切除術の際に患者の組織採取への同意が得られ、すでに当研究室に保存してある肺組織のパラフィン切片 (COPD 患者 8 名、対照喫煙癌患者 9 名、対照非喫煙癌患者 7 名) を用いて、抗 CC10 抗体、抗リン酸化 p38-MAPK 抗体、抗 p16 抗体による蛍光免疫染色を行った。二次抗体には Alexa Fluor 抗体を用いた。

4. 研究成果

(1) 培養クララ細胞を用いた実験

BrdU を添加して 3 週間添加培養したヒトクララ様 (NCI-H441) 細胞では、細胞増殖率 (population doubling) が低下し、senescence-associated β -galactosidase の高度発現がみられ、細胞老化が誘導されたことが確認された。さらに ELISA 法で培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を測定したところ、老化細胞では非老化細胞に比べて IL-6、IL-8、TNF α の産生量が有意に増加していた。さらに細胞抽出液中の NF- κ B と p38-MAPK のリン酸化をウエスタンブロッティング法により測定したところ、老化細胞では非老化細胞に比べて有意に増加していた。またテロメラーゼ阻害剤を添加して老化させた NCI-H441 細胞からも非老化細胞に比べて多量の TNF- α や sICAM-1 が産生されていた。すなわち老化したヒトクララ様 (NCI-H441) 細胞では NF- κ B や p38-MAPK が活性化し、複数の炎症性サイトカインが産生されることが知られた。

(2) クララ細胞老化マウスを用いた研究

ナフタレンと BrdU を 3 週間投与してクララ細胞を老化させたマウスでは、クララ細胞が増殖しないために、末梢気道の再生が抑制

されていた。さらにナフタレンと BrdU を投与したマウスでは、末梢気道周囲に CD45 陽性白血球と CD90.2 陽性 T リンパ球が浸潤していた (図 1)。また老化したクララ細胞では p38-MAPK のリン酸化が亢進し、TNF α の発現が増強していた。すなわちクララ細胞を老化させたマウスでは、末梢気道上皮の再生が抑制されるとともに、p38-MAPK の活性化を伴う気道炎症がみられた。

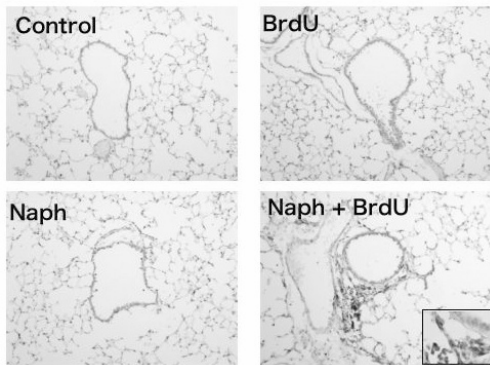


図 1. クララ細胞老化マウスにおける気道周囲の T リンパ球浸潤

(3) ヒト肺組織を用いた研究

ヒト肺組織の蛍光免疫染色では、COPD 患者では対照非喫煙者に比べて CC10 陽性の気道上皮クララ細胞における p16 発現率とリン酸化 p38MAPK 発現率が有意に増加していた (図 2)。すなわち COPD 患者ではクララ細胞が老化し、p38MAPK が活性化していることが知られた。

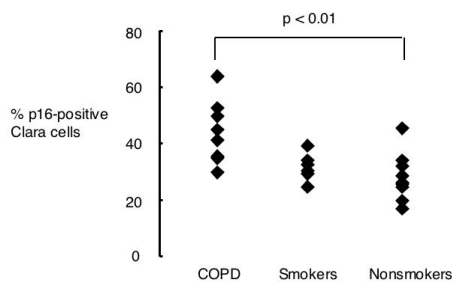


図 2. COPD 患者における末梢気道のクララ細胞の老化

以上の成績から COPD 患者においてはクララ細胞の老化のために末梢気道傷害の修復が抑制されているとともに、クララ細胞の老化が炎症性サイトカインを産生して気道炎症やリモデリングを促進する可能性が考えられた。過去の私どもの成績では COPD 患者の II 型肺胞上皮細胞や血管内皮細胞においてもクララ細胞と同様に細胞老化が進行し、肺胞の修復が抑制されるとともに肺胞の炎症が持続することが明らかにされている。したがって COPD 患者の肺においては肺胞と気道の両領域において細胞老化が生じ、組織修復の障害と慢性炎症の原因となることが示唆された (図 3)。

私どもの細胞死と老化仮説によれば従来の仮説と比較して 3 つの点が説明可能と思われる。すなわち 1) なぜ加齢により COPD が増加するのか (細胞が老化する)、2) なぜ進行が緩徐なのか (細胞老化には時間がかかる)、3) 禁煙してもなぜ COPD は進行するのか (老化の影響は禁煙後も残る) ということである。このように COPD の発症機序に老化という時間軸を加えることで、これらの現象がよりよく説明できると考えられる。従来、COPD の発症機序としてプロテアーゼ、活性酸素、炎症が肺気腫の発症機序を構成していた。そこにわれわれが提唱する細胞死、増殖、老化を導入することによって「炎症」と「老化」の間に因果関係が見出される (図 4)。

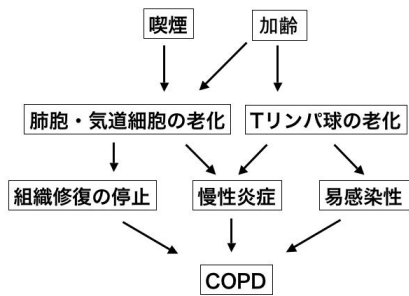


図 3. 細胞老化と COPD

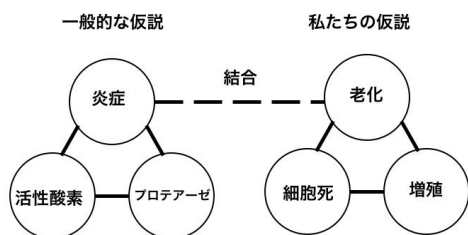


図 4. 従来の仮説よ新しい COPD 仮説の統合

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 19 件)

1. Aoshiba K, Nagai A. An evolutionary perspective on COPD. Am J Respir Cell Mol Biol (in press). 査読有
2. Aoshiba K, Onizawa S, Tsuji T, Nagai A. Therapeutic effects of erythropoietin in murine models of endotoxin shock. Crit Care Med 37: 889-898, 2009. 査読有
3. 青柴和徹 老化と COPD Progress in Medicine 29:556-565, 2009.
4. Onizawa S, Aoshiba K, Nagai A. Platinum nanoparticle antioxidants inhibit pulmonary inflammation in mice exposed to cigarettes smoke. Pulm Pharamacol Therapeutcs 2008 (Epub ahead of print). 査読有
5. 青柴和徹 高齢者の COPD と細胞老化 Geriatric Medicine 47: 201-203, 2008. 査読無
6. 青柴和徹 COPD 全身性疾患としての観点を中心に 呼と循 57: 313-316, 2008. 査読無
7. 青柴和徹 COPD と細胞老化 呼吸 27: 1117-1122, 2008. 査読無

8. 青柴和徹 COPD の病因と病態 Pharma Medica 26:23-26, 2008. 査読無
9. 青柴和徹 粒子状物質の呼吸器系への影響 呼吸器科 2008; 14: 177-184. 査読無
10. 青柴和徹 COPD におけるリモデリングに関する最近の知見 COPD Frontier 9: 42-44. 2008. 査読無
11. 青柴和徹 大気汚染と呼吸器 呼吸 27(6): 545-546, 2008. 査読無
12. 青柴和徹 COPD の近未来治療 診断と治療 6: 1145-1149, 2008. 査読無
13. 青柴和徹 肺の老化と気腫病変 呼吸 27:143-147, 2008. 査読無
14. 永井厚志、青柴和徹 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 診断と治療の進歩 病因と病態 病因論 日内会誌 97:1171-1183, 2008. 査読無
15. 鬼澤重光、青柴和徹 COPD における酸化ストレス 喫煙と疾患感受性遺伝子 Current Therapy 26:236-239, 2008. 査読無
16. 青柴和徹 COPD と気管支喘息の接点 動物モデルにおける考察 The LUNG perspectives 15:292-295, 2007. 査読無
17. 青柴和徹 COPD の発症メカニズム 呼吸器疾患 state of arts ver.5 医学のあゆみ 別冊:18-19, 2007. 査読無
18. 青柴和徹 肺胞細胞のアポトーシスの病因論的意義 COPD の発症メカニズム 日本臨床 65:629-632, 2007. 査読無
19. 横堀直子、青柴和徹 COPD up to date COPD の病因論 成人病と生活習慣病 37:978-981, 2007. 査読無

[学会発表](計 6 件)

1. Onizawa K, Aoshiba K, Nagai A. Clara cell senescence in patients with chronic obstructive pulmonary disease. 2008 American Thoracic Society International Conference. 2008. 5. 20. Tronto
2. 鬼澤重光、青柴和徹、永井厚志. COPD 患者におけるクララ細胞の老化 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会、2008. 5. 20. 神戸
3. 周方、青柴和徹、永井厚志. クララ細胞老化マウスにおける気道炎症の誘導 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会、2008. 5. 20. 神戸
4. 周方、青柴和徹、永井厚志. 喫煙による細胞老化と炎症の誘導機序における Polynucleotide phosphorylase の役割 第 46 回日本呼吸器学会学術講演会、2007. 5. 10. 東京
5. 鬼澤重光、青柴和徹、永井厚志. COPD 患者におけるクララ細胞の老化 第 46 回日本呼吸器学会学術講演会、2007. 5. 10. 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青柴 和徹 (AOSHIBA KAZUTETSU)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60231776

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし