

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08624

研究課題名(和文)鉄代謝異常に起因する末梢気道上皮幹細胞群の機能低下とCOPDの末梢気道病変の関連

研究課題名(英文) Disruption of iron homeostasis and development of small airway disease and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

田辺 直也 (TANABE, NAOYA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30805817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性喫煙暴露実験により、ヘモペキシンと末梢気道上皮の菲薄化、肺気腫形成促進の関連が明らかになった。ヒト肺組織の免疫染色により、2型肺胞上皮細胞、マクロファージにおけるヘモペキシン発現が、健常肺に比べて肺気腫肺では低下していた。喫煙暴露後に単離したマウス2型肺胞上皮細胞において、ヘモペキシン遺伝子発現の低下と生体の恒常性維持に必要なprotein quality control に関わる tripartite motif-containing 5, 12, 30の遺伝子発現の低下の関連を認めた。胸部CTを用いた形態評価手法の向上のための検討を行い報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の500万人以上が罹患していると推定されているCOPDは、高齢者の予後、特に健康寿命を傷害する疾患としてその対策の必要性が言われている。禁煙は疾患進行を抑制しうる重要な手段であるが、一部の症例では禁煙後も末梢気道病変や肺気腫の進展が認められる。肺気腫に対する治療法の確立が求められており、今回の検討の結果、ヘモペキシンが末梢気道病変と肺気腫形成に関与することが示されたことは、新たな治療ターゲットの同定という点で意義のある結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Experiments of chronic cigarette smoke exposure in hemopexin knockout mice showed the associations of hemopexin with small airway disease and emphysema. In human tissue samples, the expression of hemopexin decreased in emphysema regions than in control regions. The decreased expression of hemopexin was associated with expressions of tripartite motif-containing 5, 12, 30. The imaging method for emphysema and small airway disease evaluations were also established.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺気腫 COPD 鉄代謝 ヘモペキシン 気道

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、気道と肺実質の構造変化が複合的に関与して生じる慢性不可逆性の気流閉塞により定義されるが、特に末梢気道が病理学的主座として注目されている。申請者は研究活動スタート支援 (17H06807) にて、C/EBP β ノックアウトマウスを用いた喫煙暴露実験により、末梢気道上皮におけるプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡が、COPD の末梢気道に特徴的な病理表現型を惹起することを示した。その解析過程に行ったマウス末梢気道局所における網羅的遺伝子発現解析にて、アンチプロテアーゼ遺伝子とヘモペキシン、トランスフェリンなどの鉄代謝関連遺伝子の発現に強い相関が認められ、末梢気道上皮幹細胞の機能不全と鉄代謝異常の関連が示唆された。鉄代謝の恒常性が破綻すると、活性酸素が産生され、細胞・組織の傷害をきたすことから、「喫煙や気道感染など生体侵襲時に、ヘモペキシン発現など鉄代謝恒常性維持に必要な応答が不良である個体では、鉄代謝異常に伴い酸化ストレス増強から末梢気道上皮幹細胞の機能不全に陥り、COPD の末梢気道の破壊、リモデリング、肺気腫の原因となる」という仮説を本研究において検証することとした。

2. 研究の目的

(1) 喫煙暴露ヘモペキシンノックアウトマウスにおける、ヘモペキシンの肺気腫や末梢気道の破壊・リモデリングへの関与とその関連因子の同定、(2) ヒト COPD 肺組織におけるヘモペキシン発現低下の有無と肺気腫の関連の検証、(3) 胸部画像を用いた肺組織構造評価法を確立し、同定された鉄代謝異常が COPD 患者の形態変化のバイオマーカーとなりうるか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、ヘモペキシンノックアウトマウスと野生型マウスに対して 3 か月と 6 か月の慢性喫煙暴露実験を行った。3 か月の慢性喫煙暴露実験では、2 型肺胞上皮細胞を単離し、遺伝子発現解析を行った。6 か月の慢性喫煙暴露実験では、肺気腫と末梢気道病変の関する病理学的評価を行った。

その後、採取済みのヒト COPD 組織検体と非 COPD 喫煙暴露肺組織にて、ヘモペキシンや炎症細胞浸潤 (好中球、マクロファージ、CD4 \cdot CD8 \cdot B リンパ球、好酸球) の評価を免疫組織化学にて行った。また、末梢気道病変評価として、末梢気道壁厚、肺胞アタッチメントの評価を病理組織標本上で行った。凍結肺組織での評価から開始し、一部染色不良であったものについては、ホルマリン固定パラフィン包埋肺組織を用いて評価した。

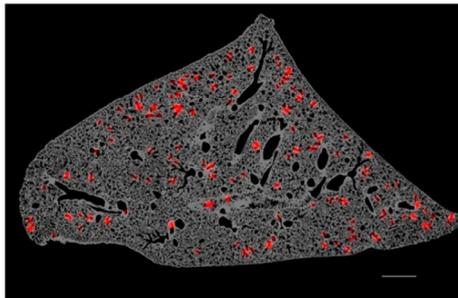
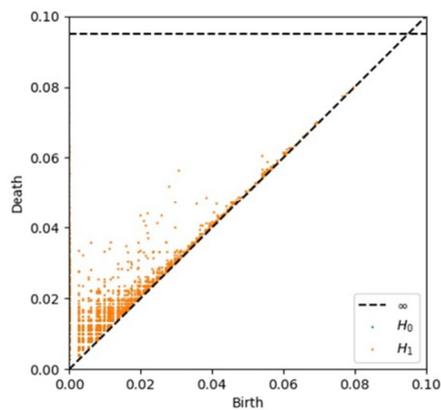
最後に、COPD 患者におけるヘモペキシンのバイオマーカーとしての可能性を探索するための臨床研究を開始した。京都大学医学部附属病院に通院中の COPD 患者さんの血清を臨床データとともに集積を行った。ヘモペキシンと臨床表現型の詳細な評価のために、肺気腫や気道病変の画像評価法、肺換気解析法などについて、胸部 CT 画像解析法の開発を行った。

4. 研究成果

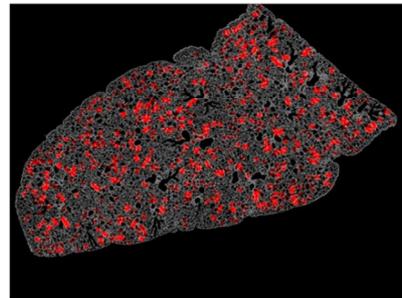
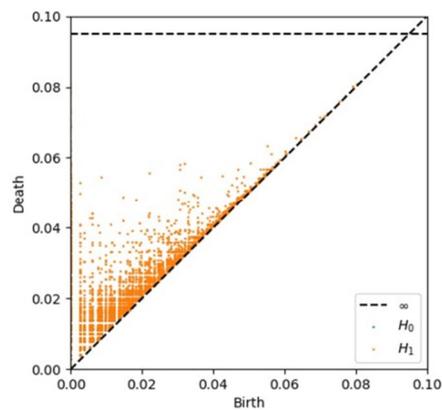
野生型マウスとヘモペキシンノックアウトマウスに 1 日 15 本の喫煙暴露を 24 週間行った後に、気管支肺胞洗浄 (BAL)、肺組織標本評価、血清、組織、BAL 中の鉄の定量を行った。結果、ヘモペキシンノックアウトマウスと野生型マウスに、喫煙暴露による肺気腫形成の程度や BAL 液中の炎症細胞数、蛋白漏出量、鉄量に差をみとめなかった。しかし、ヘモペキシンノックアウトマウスでは、末梢気道上皮の菲薄化が認められ、ヘモペキシンが喫煙暴露に対する末梢気道の再生、恒常性維持に関与している可能性が示唆された。喫煙暴露実験を追加で行い、サンプル数を増やしたうえで肺気腫のコンピューター自動解析を行ったところ、肺気腫の指標である平均肺胞間距離の増大を確認した。破壊部位の形態学的特徴を抽出するために、新たにパーシステントホモロジーを用いた形態解析法を確立し、ヘモペキシンノックアウトでは喫煙により肺気腫が比較的気道周囲に生じることが明らかにした (投稿準備中, 図 1)。また、ヘモペキシンノックアウトマウスでは、肺組織中のメタロプロテアーゼの発現増強を認め、プロテアーゼ活性増強に伴う肺気腫形成にヘモペキシンが関与していることが示唆された。

図1. パーシステントホモロジーを用いた肺気腫の定量評価

非喫煙ヘモペキシノックアウトマウス



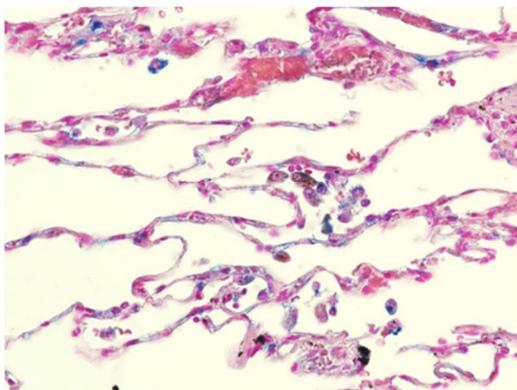
喫煙ヘモペキシノックアウトマウス



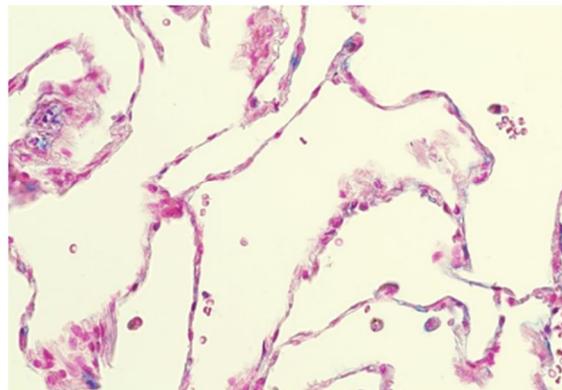
拡大した気腔の増加を喫煙暴露ヘモペキシノックアウトマウスで認めた。

さらに、ヒト肺組織におけるヘモペキシンの発現の検討を行った。凍結切片を用いた免疫染色では、ヘモペキシンを検出することができなかったが、ヒト肺のホルマリソン固定組織切片を肺組織ライブラリより作成し、再度免疫染色を行った。結果、ヒト2型肺胞上皮細胞、マクロファージなどにおいて、健常肺ではヘモペキシンの発現が確認された。肺切除前に施行した胸部CTを用いて肺気腫肺を同定し、肺組織の免疫染色の結果と組み合わせ、肺気腫肺では2型肺胞上皮細胞やマクロファージにおけるヘモペキシンの発現が低下していることを見出した(図2)。2型肺胞上皮細胞のヘモペキシンの発現低下がどのような機序で肺気腫発症に関連するのか検討するために、再度、野生型マウスとヘモペキシノックアウトマウスに慢性喫煙暴露を行った後に、単離した2型肺胞上皮細胞を用いて遺伝子発現解析を行った。網羅的解析の結果、喫煙暴露ヘモペキシノックアウトマウスでは、喫煙暴露野生型マウスに比べて、生体の恒常性維持に必要なprotein quality control に関わる tripartite motif-containing 5, 12, 30の発現低下を見出した(図3)。

図2. ヒトCOPD肺では、非COPD肺に比べて、肺胞上皮細胞やマクロファージにおけるヘモペキシンの発現の低下を認めた。

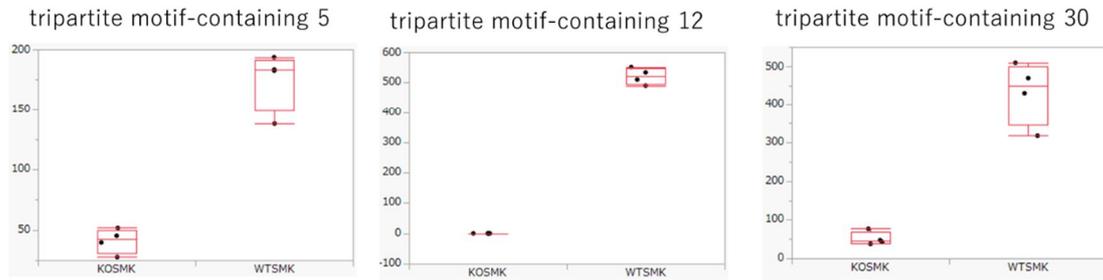


非COPD肺



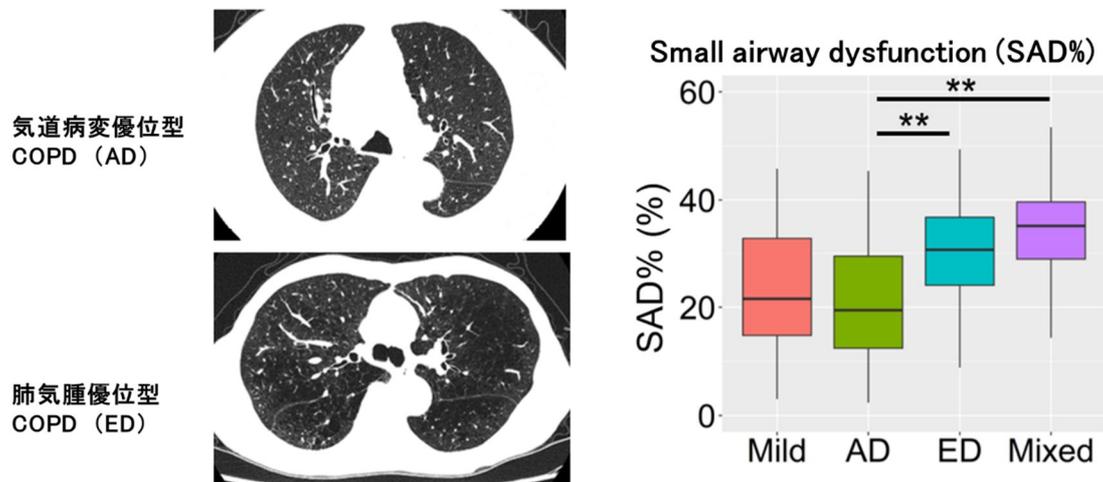
COPD肺

図3. 喫煙暴露した野生型マウスとヘモペキシンノックアウトマウスにおける遺伝子発現の比較



また、ヒト COPD 症例におけるバイオマーカーとしての有用性探索の準備として、胸部 CT を用いた形態評価手法の向上のための検討を行った。超高精細 CT を用いた末梢気道評価法を確立し報告した (Eur J Radiol. 2019 Nov;120:108687)。吸気呼気 CT を用いた解析を行い、肺気腫と気道病変の関連 (ERJ Open Res. 2021;7(1):00672-2020) や肺気腫領域の換気分布評価法の確立 (Thorax 2022, in press) を報告した (図 4)。

図4.ヒトCOPD症例における、胸部CTを用いた形態評価法の確立



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanabe Naoya, Shimizu Kaoruko, Terada Kunihiro, Sato Susumu, Suzuki Masaru, Shima Hiroshi, Oguma Akira, Oguma Tsuyoshi, Konno Satoshi, Nishimura Masaharu, Hirai Toyohiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Central airway and peripheral lung structures in airway disease-dominant COPD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ERJ Open Research	6. 最初と最後の頁 00672 ~ 2020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/23120541.00672-2020	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 Tanabe Naoya, Shima Hiroshi, Sato Susumu, Oguma Tsuyoshi, Kubo Takeshi, Kozawa Satoshi, Koizumi Koji, Sato Atsuyasu, Togashi Kaori, Hirai Toyohiro	4. 巻 120
2. 論文標題 Direct evaluation of peripheral airways using ultra-high-resolution CT in chronic obstructive pulmonary disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 108687 ~ 108687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejrad.2019.108687	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 該当する

1. 著者名 Shiraishi Yusuke, Shimada Takafumi, Tanabe Naoya, Terada Kunihiro, Sakamoto Ryo, Maetani Tomoki, Shima Hiroshi, Mochizuki Fumi, Oguma Tsuyoshi, Shimizu Kaoruko, Sato Susumu, Muro Shigeo, Hizawa Nobuyuki, Fukui Motonari, Iijima Hiroaki, Masuda Izuru, Hirai Toyohiro	4. 巻 8
2. 論文標題 The prevalence and physiological impacts of centrilobular and paraseptal emphysema on CT in smokers with Preserved Ratio Impaired Spirometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ERJ Open Research	6. 最初と最後の頁 00063 ~ 2022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/23120541.00063-2022	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------