

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08658

研究課題名(和文) ホモシステイン誘導小胞体ストレスは慢性閉塞性肺疾患の病態に関与しているか？

研究課題名(英文) Does homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress contribute to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)?

研究代表者

柴田 陽光 (Shibata, Yoko)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60333978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：A549細胞(ヒト肺胞上皮細胞株)をホモシステインとともに培養し、タバコの煙抽出物(CSE)に曝露した。処置によりアポトーシスが生じ、さらにCSEで増強した。小胞体(ER)ストレスマーカーのタンパク質発現レベルも有意に増加した。ビタミンB12と葉酸の補給にてホモシステインを減少させるとERストレスマーカーの改善が観察された。動物実験ではマウスに高ホモシステイン血症を生じさせて状態でタバコ煙曝露を施すと、肺気腫化が増強した。以上から喫煙による肺気腫形成には、高ホモシステイン血症を介するERストレス増強が関連していることが示された。doi: 10.1038/s41598-022-16767-2

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって喫煙曝露によるCOPD(肺気腫)の形成には、高ホモシステイン血症に起因する小胞体ストレスが重要であることが示された。葉酸やビタミンB12はホモシステイン血症を改善させることが知られており、これらはCOPDの進展を抑制する効果も期待される。また、さらに強力な小胞体ストレス阻害剤の開発はCOPDに対する新たな創薬に発展する可能性がある。本研究の成果は、その足掛かりになるものと言えるだろう。

研究成果の概要(英文)：A549 cells (human alveolar epithelial cell line) were cultured with homocysteine and exposed to cigarette smoke extract (CSE). The treatment induced apoptosis, which was further enhanced by CSE. The expression levels of endoplasmic reticulum (ER) stress markers also significantly increased. Supplementation of vitamin B12 and folic acid to reduce homocysteine levels resulted in an improvement of ER stress markers. In animal experiments, exposing mice with high homocysteine levels to cigarette smoke exacerbates pulmonary emphysema. These findings suggest that enhanced ER stress mediated by high homocysteine levels is implicated in the development of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema. doi: 10.1038/s41598-022-16767-2

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 喫煙 ホモシステイン 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

重喫煙者の約 20%に慢性閉塞性肺疾患 (COPD) が発症するとされているが、その背景には喫煙感受性と関連する遺伝的傾向があるとされている。しかし喫煙感受性に寄与する危険因子はまだ完全に解明されていない。COPD の組織病理学的特徴には肺気腫が含まれており、これは肺胞細胞のアポトーシスによって引き起こされる。肺気腫による肺組織の破壊は、肺弾性収縮力を減少させ、最大呼気流量を低下させる。また、肺の気腫病変と 1 秒間の最大呼気量 (FEV1) との間には負の相関が報告されている。我々は以前、地域住民男性喫煙者において、血液中のホモシステインレベルが FEV1 の急速な低下と関連していることを報告した。COPD 患者では、血漿中のホモシステイン値は非 COPD 患者よりも有意に高く、血漿中のホモシステイン値は COPD の重症度と関連することも報告されている。ホモシステインは、必須アミノ酸であるメチオニン代謝中に形成される硫黄を含むアミノ酸である。さらに近年のメタ解析からも、血清中のホモシステインは COPD の発症の有用な予測因子となる可能性が示唆されている。

高濃度のホモシステイン刺激は、ヒト臍帯静脈内皮細胞や神経細胞などの細胞で小胞体 (ER) ストレスを誘発し、アポトーシスを引き起こす。ER は、多くの可溶性タンパク質や膜タンパク質の生合成、折りたたみ、組み立て、修飾など、さまざまな役割を果たしている。タンパク質の折りたたみに必要な生理的状態や、タンパク質の折りたたみ反応を妨げる刺激によって、タンパク質の折りたたみ負荷と ER 容量とのバランスが崩れ、誤った折りたたみや展開したタンパク質が ER 腔内に蓄積する、いわゆる ER ストレスが引き起こされる。

ER は細胞内シグナル伝達 (unfolded protein response) を活性化し、細胞のホメオスタシスを回復させるか、ER ストレスが解消されない場合はアポトーシスが誘導される。慢性的な ER ストレスによる細胞損傷は、糖尿病、脳卒中、心臓病、がんなど幅広い人間の疾患の病態生理に寄与すると報告されている。最近では、ER ストレスが肺疾患、特に COPD の分野で注目されている。喫煙には 7,000 以上の潜在的に有害な成分が含まれており、喫煙は ER ストレスを誘発する可能性が示唆されている。これらの研究結果は、ホモシステインが喫煙感受性および COPD の発症に関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、高ホモシステイン血症が、ER ストレスおよびその後の肺胞細胞のアポトーシスを介して、喫煙による肺気腫変化を悪化させるかどうかを評価するために行われた

3. 研究の方法

食事誘発性の高ホモシステイン血症マウスモデル

7 週から 9 週のオスの C57BL/6 マウスは、温度管理された部屋の標準的なケージ (1 つのケージに 2~5 匹) に収容され、12 時間の明暗サイクルで飼育され、通常の食事 (オリエンタルイースト株式会社、東京、日本) を与えられました。報告によれば、水中の 1% のメチオニン補給は C57BL/6 雄マウスで高ホモシステイン血症を誘発することが示されている。マウスには通常の水または飲料水中の 1% 濃度の L-メチオニン (Met) を投与し、非濾過のタバコ (ピース、日本たばこ産業株式会社、日本) 5 本の煙または空気に 30 分間、1 日 2 回、週 5 日、全身喫煙曝露装置 (INH03-CIGR01A; MIPS、大阪、日本) を使用して喫煙曝露を行った。薬物投与または喫煙曝露を完了したすべてのマウスを分析に含めました。

細胞実験

ヒト肺胞上皮細胞である A549 細胞は、東北大学発生・老化・がん研究所細胞資源センターから購入され、DMEM 培地に 10% の胎児性牛血清、L-グルタミン、抗生物質アンチマイコチック溶液 (ペニシリン 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml、アンホテリシン B 0.025 µg/ml) を添加し、37 °C、5% CO₂ の湿度調整された培養器内で培養された。ホモシステインおよびタバコ煙抽出物 (CSE) の細胞毒性効果を調べるために、A549 細胞はホモシステインの濃度 (0-10 mM) および/または 20% CSE で刺激された。当該研究で使用されたホモシステインの濃度は、過去の研究で使用された濃度に基づいて調整されました。

4. 研究成果

6 か月間の喫煙曝露後、高ホモシステイン血症条件下のマウスでは、肺気腫が対照群よりもより重度に形成された (図 1)。細胞実験では、ホモシステイン濃度が上昇すると A549 細胞のアポトーシスが増加し、CSE 添加によってさらに増強された (図 2)。ホモシステインと CSE 同時刺激後に ER ストレスマーカーのタンパク質発現レベルは有意に増加した (図 3)。特に、ビタミン B12 および葉酸の添加は、A549 細胞の同時刺激後の ER ストレスを改善した (図 4)。

以上より高ホモシステイン血症がマウスの喫煙曝露による肺気腫を悪化させ、高ホモシステイン血症と喫煙刺激が肺胞上皮細胞で ER ストレスを増強し、それに続くアポトーシスを引き起こ

すことが示された。

図1 マウス肺気腫病変の組織学的評価。ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色。(A) 200 倍の倍率で撮影。スケールバーは 100 μm (B) 400 倍の倍率で撮影。スケールバーは 40 μm

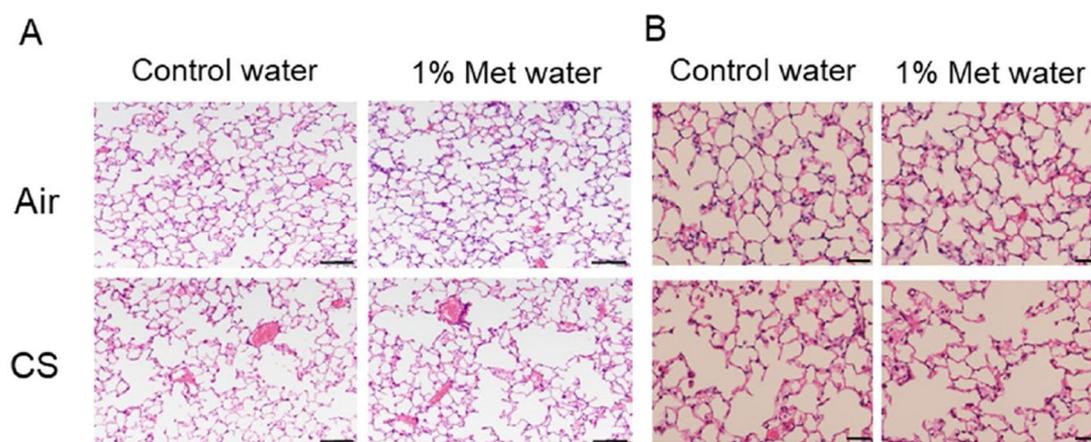


図2 ホモシステイン (Hcy) とタバコ煙抽出物 (CSE) が A549 細胞のアポトーシス誘導に与える影響

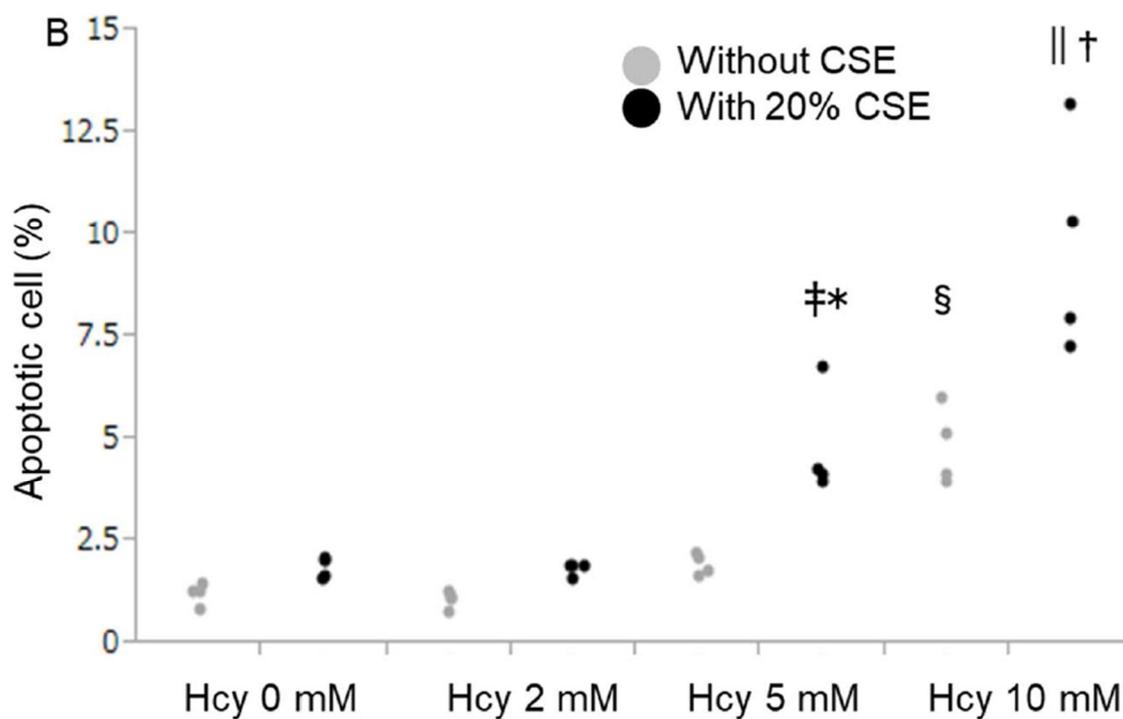


図3 A549細胞におけるホモシステインとタバコ煙抽出物(CSE)によるERストレスの相乗的誘導(ERストレスマーカーのタンパク質発現レベルの検討)

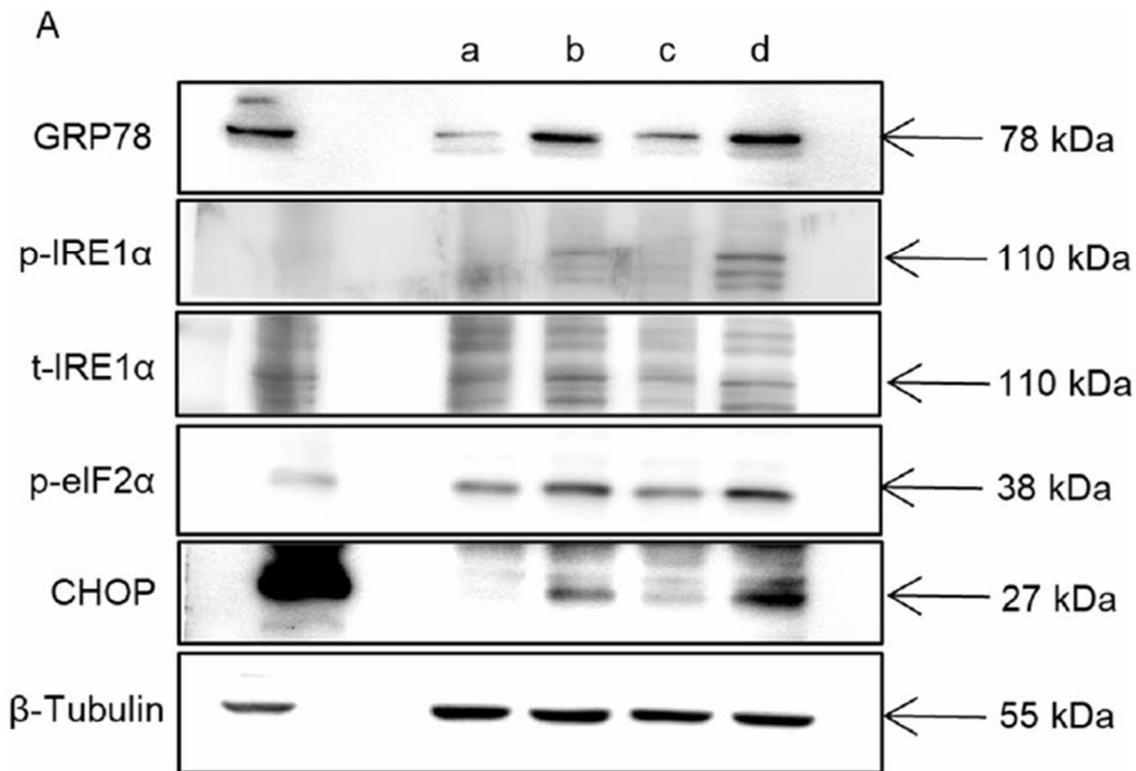
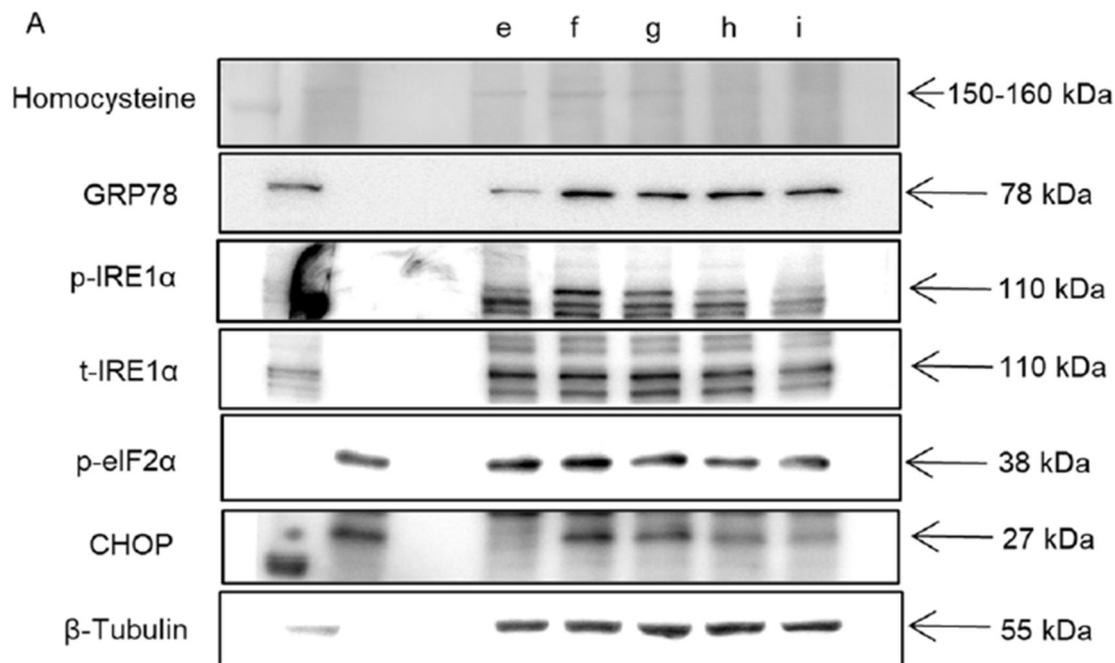


図4 ビタミン B12 (VB) と葉酸 (Fo) 処置による、A549 細胞においてホモシステイン+タバコ煙抽出物 (CSE) 誘発 ER ストレスの改善



e; 20% CSE, f; 20% CSE+ homocysteine 5 mM, g; 20% CSE+ homocysteine 5 mM+ vitamin B12 and folate 5 μM, h; 20% CSE+ homocysteine 5 mM+ vitamin B12 and folate 25 μM, i; 20% CSE+ homocysteine 5 mM+ vitamin B12 and folate 50 μM

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Machida Hiroyoshi, Inoue Sumito, Igarashi Akira, Saitoh Shinichi, Yamauchi Keiko, Nishiwaki Michiko, Nemoto Takako, Otaki Yoichiro, Sato Masamichi, Sato Kento, Nakano Hiroshi, Yang Sujeong, Furuyama Kodai, Murano Hiroaki, Ishibashi Yu, Ota Takahito, Nakayama Takashi, Shibata Yoko, Watanabe Masafumi	4. 巻 66
2. 論文標題 Role of CC Chemokine Ligand 17 in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 428 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2021-00690C	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 Machida Hiroyoshi, Inoue Sumito, Shibata Yoko, Kimura Tomomi, Sato Kento, Abe Koya, Murano Hiroaki, Yang Sujeong, Nakano Hiroshi, Sato Masamichi, Nemoto Takako, Sato Chisa, Nishiwaki Michiko, Yamauchi Keiko, Igarashi Akira, Tokairin Yoshikane, Watanabe Masafumi	4. 巻 70
2. 論文標題 Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) predicts decline of pulmonary function in patients with chronic obstructive pulmonary disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 81 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.04.004	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 Sato Kento, Inoue Sumito, Igarashi Akira, Tokairin Yoshikane, Yamauchi Keiko, Kimura Tomomi, Nishiwaki Michiko, Nemoto Takako, Nakano Hiroshi, Sato Masamichi, Machida Hiroyoshi, Yang Sujeong, Minegishi Yukihiro, Furuyama Kodai, Watanabe Masafumi, Shibata Yoko	4. 巻 62
2. 論文標題 Effect of Iron Deficiency on a Murine Model of Smoke-induced Emphysema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 588 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2018-02390C	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 Nakano Hiroshi, Inoue Sumito, Minegishi Yukihiro, Igarashi Akira, Tokairin Yoshikane, Yamauchi Keiko, Kimura Tomomi, Nishiwaki Michiko, Nemoto Takako, Otaki Yoichiro, Sato Masamichi, Sato Kento, Machida Hiroyoshi, Yang Sujeong, Murano Hiroaki, Watanabe Masafumi, Shibata Yoko	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hyperhomocysteinemia on a murine model of smoke-induced pulmonary emphysema	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16767-2	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 Kurotani Reiko, Ono Sotaro, Miyano Yuki, Nakayama Shun, Liu Huaitian, Aibara Daisuke, Sakahara Satoshi, Sato Masamichi, Sato Kento, Inoue Sumito, Shibata Yoko, Lee Maxwell P., Abe Hiroyuki, Kimura Shioko	4. 巻 157
2. 論文標題 Secretoglobin 3A2 protects lung from developing cigarette smoke-induced pulmonary emphysema	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The International Journal of Biochemistry & Cell Biology	6. 最初と最後の頁 106390 ~ 106390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biocel.2023.106390	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

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中野寛之 ¹⁾ , 邨野浩義, 町田浩祥, 佐藤建人, 佐藤正道, 東海林佳兼, 五十嵐朗, 井上純人, 渡辺昌文, 柴田陽光
2. 発表標題 高ホモシステイン血症における喫煙曝露は小胞体ストレスを介して肺胞上皮細胞のアポトーシスを増加し, 肺の気腫性変化を増強する
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020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
研究分担者	黒谷 玲子 (Kurotani Reiko) (00453043)	山形大学・大学院理工学研究科・准教授 (11501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	井上 純人 (Inoue Sumito) (70466621)	山形大学・医学部・講師 (11501)	

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