

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08660

研究課題名（和文）Keap1-Nrf2系制御による肺気腫形成機序解明とCOPD新規治療戦略への応用

研究課題名（英文）Mechanism of emphysema formation by controlling the Keap1-Nrf2 system and its application to COPD treatment strategies

研究代表者

浅井 一久（ASAI, KAZUHISA）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10382053

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）：バルドキシロンメチルはKeap1-Nrf2系に介入する薬剤であり、糖尿病性腎症患者を対象とした第2相臨床試験においてGFR（糸球体濾過量）の有意な改善と忍容性を示した。本研究では喫煙曝露COPDモデルマウスにおけるバルドキシロンメチルの気腫化抑制効果、治療効果検討を計画した。バルドキシロンメチルの忍容性確認を行い、喫煙曝露終了後4週間までは自発的な気腫化、肺胞破壊の改善を認めないことを見出して、気腫化治療効果の評価に適する実験プロトコルを策定した。本実験を開始したが、COVID19による大流行による動物実験施設のロックダウンにより、実験の完遂に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では喫煙曝露COPDモデルマウスにおけるバルドキシロンメチルの気腫化抑制効果、治療効果検討を計画した。本研究では、喫煙曝露終了後4週間までは自発的な気腫化、肺胞破壊の改善を認めないことを見出して、喫煙曝露COPDモデルマウスにおける気腫化治療効果の評価に適する実験プロトコルを策定した。今後、バルドキシロンメチルや他の治療候補物質での気腫化治療効果の検討を進める。

研究成果の概要（英文）：Bardoxolone methyl is a drug that intervenes in the Keap1-Nrf2 system and has shown significant improvement and tolerability in GFR in a phase 2 clinical trial in patients with diabetic nephropathy. In this study, we planned to investigate the emphysema-suppressing effect and emphysema treatment-effect of Bardoxolone methyl in smoking-exposed COPD model mice. We confirmed the tolerability of Bardoxolone methyl. We found that there was no spontaneous improvement in emphysema and alveolar destruction until 4 weeks after the end of smoking exposure, and we formulated an experimental protocol suitable for evaluating the therapeutic effect on emphysema. The experiment was started, but the experiment was not completed due to the lockdown of the animal experiment facility due to the outbreak caused by COVID19.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：COPD Nrf2 タバコ バルドキシロン

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、厚生労働省人口動態統計によると本邦の死亡原因として第 7 ~ 9 位を占め、また「健康日本 21 (第二次)」では、がん、循環器疾患、糖尿病に次いで発症予防と重症化予防の徹底が図られようとしている。しかしながら、COPD による死亡は増加しており、革新的治療法の開発が求められている。COPD はタバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じた肺疾患であり、呼吸機能検査で正常に復すことのない気流閉塞を示す。気流閉塞は末梢気道病変と気腫性病変がさまざまな割合で複合的に作用することにより起こるが、本邦では気腫型 COPD が優位であることが知られている。今日の COPD 治療は、長時間作用性抗コリン薬 (LAMA)、長時間作用性 2 刺激薬 (LABA) の単剤や合剤による対症療法に留まっており、気腫性病変などの組織破壊・リモデリングの予防治療や再生治療は確立されていない。

2012 年アイリシンは骨格筋に存在する転写補助活性因子である PPAR coactivator 1 (PGC-1) により調節される膜蛋白である FNDC5 の開裂により血中に分泌される運動ホルモンとして同定された (Boström P, et al. Nature. 481(7382):463-8. 2012)。アイリシンは筋運動により産生増強され、白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化を増強して体熱産生やエネルギー代謝に関与し、糖尿病、脂質異常症等の代謝疾患へ関与することが報告された。さらに、アイリシンに抗酸化能改善効果を介したアポトーシス抑制効果が認められることが報告され、COPD の病理学的変化である気腫化の病態仮説としての「オキシダント-アンチオキシダント不均衡仮説」への関与が想定される。本研究代表者らの先行研究では、5 週齢の C57BL/6 マウスにタバコ煙発生装置 (SG-300) およびマウス用トレッドミル (TMS-8B) を用いて、12 週間の運動による気腫化抑制実験を行い、末梢血アイリシン濃度の上昇とそれに伴った Nrf2 の発現増強を認め、さらに、気腫化の程度を定量化する Mean linear intercept (MLI) は、運動により有意に改善を示した (Kubo H, Asai K, et al. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2019 Nov 14;14:2507-2516.)。

「運動 - アイリシン - (keap1-Nrf2) 経路」により気腫化抑制効果が認められるが、気腫化への治療介入として運動は継続が容易ではなく、アイリシンは受容体が未同定であるためアゴニスト等での介入は困難である。Nrf2 ノックアウトマウスは喫煙誘発気腫化を起こしやすく (Iizuka T, et al. Genes Cells. 10(12):1113-25. 2005)、我々の COPD 患者における検討では、気道上皮の Nrf2 遺伝子発現が減少している (Yamada K, et al. BMC Pulm Med. 9;16:27. 2016)。また、我々の健常喫煙者における検討では、気腫化進行に Nrf2 遺伝子多型が関与しており、Nrf2 は治療介入標的として可能性を秘めている。

2. 研究の目的

細胞質中に存在する Nrf2 を keap1 より解離させて核内移行を促進させる働きを持つバルドキシロンメチルは Keap1-Nrf2 系に介入する薬剤であり、糖尿病性腎症患者を対象とした第 2 相臨床試験において GFR (糸球体濾過量) の有意な改善と忍容性を示した (Chin MP, et al. Am J Nephrol. 47(1):40-47. 2018)。本研究では、Nrf2 発現増強・活性化剤のバルドキシロンメチルの気腫化抑制効果ならびに気腫化治療効果の評価ならびに抑制機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、タバコ煙曝露 COPD モデルマウスを用いて、バルドキシロンメチルの keap1-Nrf2 系介入による気腫化抑制効果を検討し、Keap1-Nrf2 系制御による COPD 治療の臨床応用の基礎データを確立する。10 週齢の C57BL/6 マウスに喫煙曝露及び同時にバルドキシロンメチルの併用を行い (低用量、中用量、高用量)、末梢血マーカー、気管支肺胞洗浄 (BAL) 中の炎症細胞数、比率、病理組織での気腫化 (DIMLI) 等を評価する。

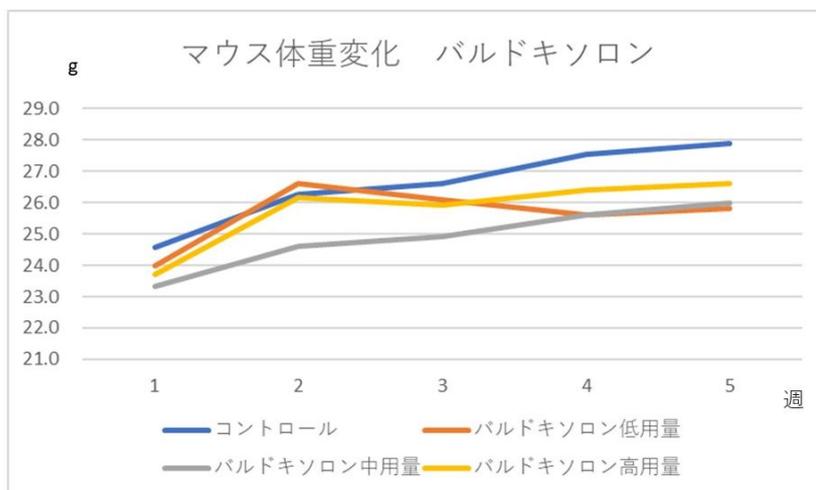
4. 研究成果

バルドキシロンメチル忍容性試験

COPD モデルマウスにおけるバルドキシロンメチル投与の忍容性を評価するために 10 週齢の C57BL/6 マウスにバルドキシロンメチル (低用量、中用量、高用量) を腹腔内投与し、体重の変化を確認した (各群 n=5) (図 1)。青線 (コントロール群) に比較して、バルドキシロン併用群

では5週間後の時点で、若干の体重の伸びの低下を認めたが、有意差は認めなかった。また、低用量、中用量、高用量での用量反応性は認めなかった。

図 1



このため、本実験に用いるバルドキシロンの用量決定のために A549 を用いた in vitro 実験でバルドキシロンの Keap1-Nrf2 系活性化能を評価したところ、低用量に相当するバルドキシロンで十分と考えられた。

喫煙曝露 COPD モデルマウスのモデルとしての経時変化の確認

我々の運動付加による先行研究 (Kubo H, Asai K, et al. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2019 Nov 14;14:2507-2516.) では、喫煙曝露とともに運動を行って、気腫化抑制効果を証明したが、本研究では気腫化抑制効果とともに、気腫化治療効果を検討する計画であった。ヒトにおける COPD と異なり、喫煙曝露 COPD モデルマウスでは喫煙曝露終了後にマウスの持つ治癒力による気腫化の改善が存在することが懸念されたため、喫煙曝露終了後の肺泡破壊の経過を検討した。12 週間の喫煙曝露直後、1 ヶ月、2 ヶ月後に犠牲死させ、肺泡破壊の程度を DI (destructive index) で評価した。図 2 に示すように喫煙曝露終了時は、DI=19.35%であり、1 ヶ月後も DI=20.875%と肺泡の破壊は維持されていた。しかしながら、2 ヶ月後には DI=11.875%と半減しており、気腫化治療モデルは、喫煙曝露終了から 1 ヶ月間のバルドキシロン投与と決定した。

図 2

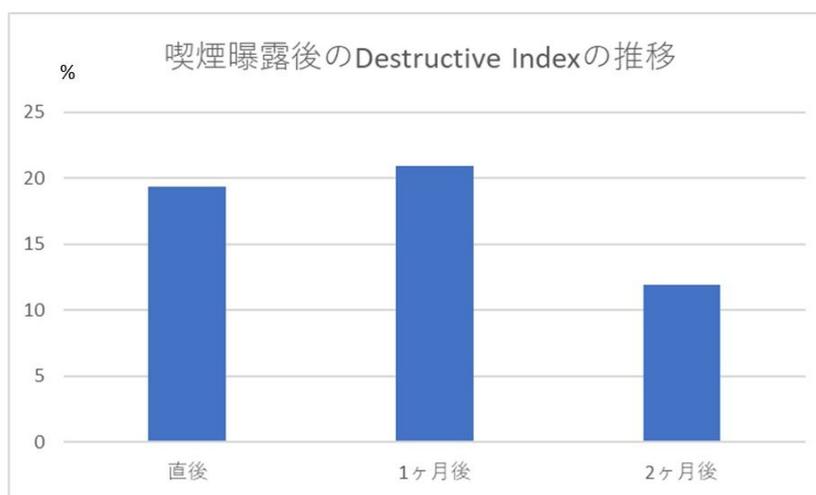
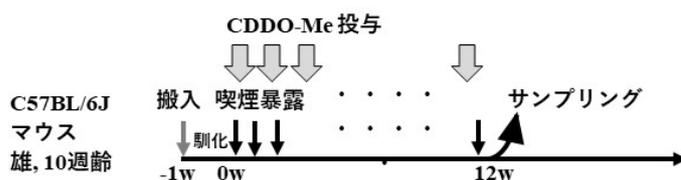


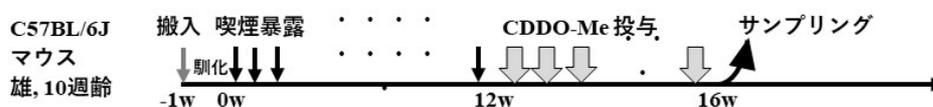
図3に表題に示した「バルドキシロンによる気腫化抑制モデルと気腫化治療モデル」の実験計画を示す。

図3

気腫化抑制モデル



気腫化治療モデル



気腫化抑制モデルでは、喫煙曝露と同時にバルドキシロンメチル (CDDO-Me) を併用し、12 週間の喫煙曝露終了と同時に気腫化を評価する。一方、気腫化治療モデルでは、12 週間の喫煙曝露終了後から 4 週間のバルドキシロン介入を行い、4 週間後 (合計 16 週間後) に評価して、バルドキシロンの効果を検討することとした。

上記モデルにて本実験を開始したが、全世界的な COVID19 の流行による本学動物実験施設の度重なるロックダウンにより、実験完遂前のマウスの犠牲死をやむなく選ばざるをえず、最終実験結果を得るに至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Miyamoto Atsushi, Asai Kazuhisa, Kadotani Hideaki, Maruyama Naomi, Kubo Hiroaki, Okamoto Atsuko, Sato Kanako, Yamada Kazuhiro, Ijiri Naoki, Watanabe Tetsuya, Kawaguchi Tomoya	4. 巻 15
2. 論文標題 Ninjin 'yoeito Ameliorates Skeletal Muscle Complications in COPD Model Mice by Upregulating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator-1 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease	6. 最初と最後の頁 3063 ~ 3077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/COPD.S280401	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 浅井一久	4. 巻 136
2. 論文標題 【COPD患者における栄養管理のポイント】COPDにおけるサルコペニア・フレイル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床栄養	6. 最初と最後の頁 990-996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sugitani A, Asai K, Watanabe T, Suzumura T, Kojima K, Kubo H, Sato K, Ijiri N, Yamada K, Kimura T, Fukumoto S, Hirata K, Kawaguchi T.	4. 巻 197
2. 論文標題 A Polymorphism rs6726395 in Nrf2 Contributes to the Development of Emphysema-Associated Age in Smokers Without COPD.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lung	6. 最初と最後の頁 559-564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00408-019-00251-2.	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 Kojima K, Asai K, Kubo H, Sugitani A, Kyomoto Y, Okamoto A, Yamada K, Ijiri N, Watanabe T, Hirata K, Kawaguchi T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Isoflavone Aglycones Attenuate Cigarette Smoke-Induced Emphysema via Suppression of Neutrophilic Inflammation in a COPD Murine Model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	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) 10.3390/nu11092023.	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 Kubo H, Asai K, Kojima K, Sugitani A, Kyomoto Y, Okamoto A, Yamada K, Ijiri N, Watanabe T, Hirata K, Kawaguchi T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Astaxanthin Suppresses Cigarette Smoke-Induced Emphysema through Nrf2 Activation in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Marine Drugs	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) 10.3390/md17120673.	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 Kubo H, Asai K, Kojima K, Sugitani A, Kyomoto Y, Okamoto A, Yamada K, Ijiri N, Watanabe T, Hirata K, Kawaguchi T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Exercise Ameliorates Emphysema Of Cigarette Smoke-Induced COPD In Mice Through The Exercise-Irisin-Nrf2 Axis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of COPD	6. 最初と最後の頁 2507-2516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/COPD.S226623.	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 久保 寛明, 浅井 一久, 小島 和也, 杉谷 新, 門谷 英昭, 宮本 篤志, 丸山 直美, 岡本 敦子, 渡辺 徹也, 金澤 博, 川口 知哉, 平田 一人
2. 発表標題 喫煙曝露COPDマウスにおけるアスタキサンチンのCOPD抑制効果の検討
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

1. 発表者名 井尻 尚樹, 浅井 一久, 佐藤 佳奈子, 山田 一宏, 山本 典雄, 渡辺 徹也, 金澤 博, 平田 一人, 川口 知哉
2. 発表標題 CSE刺激時にLong non coding RNA:NEAT1は炎症性サイトカインの放出を促す
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

1 . 発表者名 H. Kubo , K. Asai , K. Iwasaki , T. Kawai , M. Nishimura , N. Maruyama , H. Kadotani , A. Miyamoto , A. Okamoto , K. Sato , K. Yamada , N. Ijiri , T. Watanabe , K. Hirata , T. Kawaguchi
2 . 発表標題 Astaxanthin Suppresses Cigarette Smoke-Induced Emphysema Through Nrf2 Activation in Mice.
3 . 学会等名 ATS 2020 International Conference (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 A. Miyamoto, H. Kadotani, K. Asai, N. Maruyama, H. Kubo, A. Okamoto, N. Ijiri, K. Sato, T. Watanabe, K. Hirata, T. Kawaguchi
2 . 発表標題 Ninjin-yoeito ameliorates cigarette smoke-induced skeletal muscle complications in mice.
3 . 学会等名 ERS International Congress 2020 (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Hiroaki Kubo, Kazuhisa Asai, Atsushi Miyamoto, Hideaki Kadotani, Naomi Maruyama, Kazuya Kojima, Arata Sugitani, Yohkoh Kyomoto, Atsuko Okamoto, Kazuhiro Yamada, Tetsuya Watanabe, Tomoya Kawaguchi, Kazuto Hirata
2 . 発表標題 Irisin secreted from muscle by exercise ameliorates emphysema of cigarette smoke-induced COPD in mice
3 . 学会等名 European Respiratory Society international Congress 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kazuya Kojima, Kazuhisa Asai, Hiroaki Kubo, Arata Sugitani, Yohkoh Kyomoto, Atsuko Okamoto, Kazuhiro Yamada, Naoki Ijiri, Tetsuya Watanabe, Kazuto Hirata, Tomoya Kawaguchi
2 . 発表標題 ISOFLAVONE AGLYCONES ATTENUATE CIGARETTE SMOKE-INDUCED EMPHYSEMA VIA SUPPRESSION OF NEUTROPHILIC INFLAMMATION IN A COPD MURINE MODEL
3 . 学会等名 The 24 th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (国際学会)
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
---------	---------