

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20590896

研究課題名(和文) 慢性閉塞性肺疾患における末梢気道上皮間葉移行の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms in epithelial-mesenchymal transition in chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

伊藤 功朗 (ITO ISA0)

京都大学医学研究科・助教

研究者番号：40447975

研究成果の概要(和文)：培養 BEAS2B 細胞にて，TGF- β により上皮間葉移行の誘導を行った。この誘導はTLRligand添加下において増強した。上皮間葉移行の研究を遂行すべく，COPD患者からヒトiPS細胞を作成し，II型肺胞上皮細胞の誘導を試みている。

研究成果の概要(英文)：By adding appropriate concentration of TGF- β to cultured BEAS-2B cell, the cells exhibited epithelial-mesenchymal transition, which were enhanced by addint TLR-ligands. To perform further experiments on EMT, induced pluripotent stem cells were established from patients with COPD and inducing type II pneumocytes from iPS cells is being tried.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：呼吸器内科学

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：

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)の社会的重要性和気道リモデリングの意義

COPDは喫煙が主たる原因で、進行性かつ非可逆性の気道狭窄により呼吸不全を呈する疾患である。COPDは世界の死亡原因の第

4位であり(WHO, *World Health Report* 2000)、今後20年間是有病率、死亡率ともに上昇し、2020年には死亡数第3位になると予想されている(Murray CJ, *Science* 1996)。日本においても、近年の全国調査の結果では40歳以上の成人男性の13.1%、女性の8.5%で肺機能検査において一秒率が70%以下で

あり、530万人が本疾患に罹患していると推測されている(Fukuchi Y, *Respirology* 2004)。病理学的には細気管支領域の炎症と線維化、肺泡領域の気腫化が特徴であるが、病態には不明の点が多い。閉塞性肺疾患(COPDや気管支喘息)では、気道の収縮と狭小化が気流制限を生じる。軽症喘息では気道閉塞に可逆性がみられるが、難治性喘息やCOPDでは非可逆性が観察される。気道の病理学的変化は気道リモデリングと総称され、疾患の難治性に関与する事から、特に気管支喘息において世界的に注目されてきた。また、COPDにおいてもその存在意義が改めて注目されている(Hogg JC, *N Engl J Med* 2004)。

上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition, EMT)について

EMTとは、上皮細胞がその表現型に柔軟性をもった結果である。通常、上皮細胞は細胞極性を持ち、密な細胞間結合によって系統的に配列し、基底膜などの間質に固定されている。上皮細胞にEMTが起こると、細胞極性を失い、細胞間の結合や細胞と結合組織間の結合が失われ、細胞骨格に変化がみられる。細胞は線維芽細胞様の形態へと変化し、細胞外結合組織の産生と分解能を活発化させ、自身は結合組織間を浸潤・移動できるようになる。このEMTの概念は古くから胎生発生学の分野で提唱されており、EMTの誘導因子としてTGF- β が主要な役割を持つことが判明している。

線維化疾患におけるEMTの関与についての従来の研究

様々な疾患を難治化、重症化させる要因として病変部位の線維化がある。線維化疾患におけるEMTでは、成熟した上皮細胞の退化、線維芽細胞・筋線維芽細胞の浸潤および結合組織の異常な沈着がみられ、腎臓、肝臓、心臓、眼および肺などの線維化疾患でEMTが

起こっていることが示されている(Iwano M, *J Clin Invest* 2002; Saika S, *Am J Pathol* 2004)。病変局所の線維芽細胞は骨髄系細胞由来とEMT由来の両方が考えられているが、その実態はまだ不明な点が多い(Neilson MG, *Nat Med* 2005)。肺における気道上皮細胞の形質変化やTGF- β の関わりについては最近報告されたばかりである。閉塞性細気管支炎のリスクであるアログラフト肺移植レシピエントにおける気管支上皮でS100陽性細胞がみられ、EMTの徴候が観察された(Ward C, *Thorax* 2005)ほか、ブレオマイシン肺モデルで、気管支や終末細気管支の上皮細胞にEMTがみられた(Wu Z, *Respir Res* 2007)。

2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患(COPD)におけるEMTの関与についての仮説

COPDは進行性の気流制限により呼吸不全を呈する予後不良の疾患であり、病態については不明の点が多い。末梢気道の線維化に焦点をあてた研究自体が少なく、特にEMTとの関連を追及した報告は見られない。今回、末梢気道を被覆する上皮細胞においてEMTが起こり、筋線維芽細胞の重要な供給源となり、気道周囲の線維化が進行するという仮説を立てた。

研究目的と解明したい事項—*In vivo*の検討

COPDの外科的肺切除組織において、EMTが実際に*in vivo*で起こっていることを示すことを目的とする。

研究目的と解明したい事項—*In vitro*の検討

培養細胞レベルで肺泡上皮細胞にEMTが起こることを示し、次にEMTにおける転写抑制因子Snail/Slug発現に至る転写経路(Smad2/3, ERK pathway)を明らかにし、これらの経路がEMT後の細胞機能(migration/invasion)に及ぼす影響を調べることを目的とする。具体的には、Cell line

(BEAS-2B 細胞)と組織から分離した気道上皮細胞を材料として、TGF- β 慢性刺激下での上記のマーカーの発現変化を遺伝子レベル、蛋白レベルで検討する。

3. 研究の方法

ヒト気道上皮細胞 cell line (BEAS-2B 細胞) および, tissue bank 肺組織から分離したヒト気道上皮(NHBE)細胞を材料として、TGF- β 1慢性刺激下(3日間から2週間)でEMTによって増加または減少するマーカー分子の発現変化を遺伝子レベル、蛋白レベルで検討する。方法としては、遺伝子発現は real-time RT-PCR で経時的に検討する。蛋白発現は、構造蛋白については蛍光免疫染色で、転写因子の活性化は Western-blot 法または immunoblot 法で検討する。

2007年11月に、ヒト線維芽細胞に4つの遺伝子(Oct-3/4, c-Myc, Sox2, KLF4)を導入して初期化することによって多能性幹細胞を作製する手法が確立した(ヒト iPS 細胞)。また、この頃から、ES 細胞、次いで iPS 細胞において分化、形態変化に上皮間葉移行が関与するという報告が相次いだ。このため、患者皮膚もしくは肺細胞から採取した線維芽細胞を用いてヒト iPS 細胞を作成し、ここから肺の上皮もしくは間葉系細胞を作成し、上皮間葉移行の関与を検討する方向とした。

4. 研究成果

BEAS-2B 細胞を TGF- β にて刺激した。刺激時のコンフルエンス率や刺激濃度、刺激時間を種々設定して行った。ウェスタンブロットで検出した蛋白は、E-cadherin, Cytokeratin, Fibronectin などである。その結果、約70%コンフルエンス率にて、また濃度は5ng/mlにて良好なEMT効果がみられ、効果は刺激1, 2, 3, 7, 14日と日数を経るごとに強まった。この効果は、一部の Toll-like receptor リガンドと TGF- β 1の共刺激としてやることで、増

強した。

COPD を合併する肺癌患者の摘出肺から肺線維芽細胞を、また手術時の皮膚から皮膚線維芽細胞を分離し、ヒト iPS 細胞を4因子または3因子で作成した。同様のことを胸腔鏡下肺生検を施行した間質性肺疾患患者からも行った。

ヒト iPS 細胞から、まず II 型肺胞上皮細胞を誘導する実験を試みた。方法は、既報に則って肺胞上皮細胞で特異的に産生されるサーファクタントプロテイン C(SPC)のプロモータ遺伝子とレポーターを組み合わせたベクターを作成し、エレクトロポレーション法にて iPS 細胞に遺伝子導入し、これを分化させるものである。ベクターをコントロールの MLE12 細胞に導入した結果、ベクターが機能していることが判明したため、iPS 細胞に導入し、分化誘導を手掛けているところである。今後は、誘導 II 型肺胞上皮細胞の確立、そこから間葉系細胞の誘導、その過程での上皮間葉移行の役割を解明したい。

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) 全編査読あり。

1. Nakaji H, Matsumoto H, Niimi A, Handa T, Ito I, Kanai M, Tabata H, Sakai H, Kobashi Y, Mochizuki Y, Chin K, Mishima M. Eosinophils and macrophages are involved in nitrosative stress in chronic eosinophilic pneumonia. Nitric Oxide: Biology and Chemistry (2011 accepted)
2. Kiyokawa H, Matsumoto H, Niimi A, Ito I, et al. Centrilobular opacities in the asthmatic lung successfully treated with inhaled ciclesonide and tiotropium: With assessment of alveolar nitric oxide levels.

- Allergol International* 2010 [Epub ahead of print].
3. Imai S, Ito Y, Ishida T, Hirai T, Ito I, Yoshimura K, Maekawa K, Takakura S, Niimi A, Iinuma Y, Ichiyama S, Mishima M; the Kansai Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. Distribution and clonal relationship of cell surface virulence genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan. *Clin Microbiol Infect*. 2010 [Epub ahead of print]
 4. Matsumoto H, Niimi A, Jinnai M, Nakaji H, Takeda T, Oguma T, Otsuka K, Inoue H, Yamaguchi M, Matsuoka H, Ito I, Hirai T, Chin K, Mishima M. Association of alveolar nitric oxide levels with pulmonary function and its reversibility in stable asthma. *Respiration* 2010 Oct 13. [Epub ahead of print]
 5. Kanatani K, Ito I, Al-Delaimy WK, Adachi Y, Mathews WC, Ramsdell JW, Toyama Asian Desert Dust and Asthma Study Team. Desert-dust exposure is associated with increased risk of asthma hospitalization in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1475-81.
 6. Matsuoka H, Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Ueda T, Yamaguchi M, Jinnai M, Inoue H, Ito I, Chin K, Mishima M. Inflammatory subtypes in cough variant asthma: Association with maintenance doses of inhaled corticosteroids. *Chest* 2010, 138:1418-25.
 7. Ito I, Kadowaki S, Tanabe N, Haruna A, Kase M, Yasutomo Y, Tsukino M, Nakai A, Matsumoto H, Niimi A, Chin K, Ichiyama S, Mishima M. Tazobactam/piperacillin for moderate-to-severe pneumonia in patients with risk for aspiration: comparison with imipenem/cilastatin. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23:403-10.
 8. Nishioka M, Ogawa E, Kinose D, Haruna A, Ohara T, Ito I, Hoshino Y, Ito Y, Matsumoto H, Niimi A, Mio T, Chin K, Hirai T, Muro S, Mishima M. Lipopolysaccharide induced connective tissue growth factor gene expression in human bronchial epithelial cells. *Respirology* 2010; 15:669-76.
 9. Jinnai M, Niimi A, Ueda T, Matsuoka H, Takemura M, Yamaguchi M, Otsuka K, Oguma T, Takeda T, Ito I, Matsumoto H, Mishima M. Induced sputum concentrations of mucin in patients with asthma and chronic cough. *Chest* 2010; 137:1122-9.
 10. Osawa M, Ito Y, Ishida T, Imai S, Ichiyama S, Mishima M; Kansai Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. Molecular characterization of quinolone resistance-determining regions and their correlation with serotypes and genotypes among *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:245-8.
 11. Takeda T, Oga T, Niimi A, Matsumoto H,

- Ito I, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jinnai M, Otsuka K, Oguma T, Nakaji H, Chin K, Mishima M. Relationship between Small Airway Function and Health Status, Dyspnea and Disease Control in Asthma. *Respiration* 2010; 80:120-6.
12. Imai S, Ito Y, Ishida T, Hirai T, Ito I, Maekawa K, Takakura S, Iinuma Y, Ichiyama S, Mishima M; and the Kansai Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. High prevalence of multidrug-resistant Pneumococcal molecular epidemiology network clones among Streptococcus pneumoniae isolates from adult patients with community-acquired pneumonia in Japan. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1039-45.
 13. Ito I, Fixman ED, Asai K, Yoshida M, Gounni AS, Martin JG, Hamid Q. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta modulate the expression of matrix metalloproteinases and migratory function of human airway smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1370-80.
 14. Yamaguchi M, Niimi A, Ueda T, Takemura M, Matsuoka H, Jinnai M, Otsuka K, Oguma T, Takeda T, Ito I, Matsumoto H, Hirai T, Chin K, Mishima M. Effect of inhaled corticosteroids on small airways in asthma: investigation using impulse oscillometry. *Pulm Pharmacol Ther* 2009;26:326-32.
 15. Matsuoka H, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Yamaguchi M, Jinnai M, Otsuka K, Oguma T, Takeda T, Ito I, Chin K, Amitani R, Mishima M. Specific IgE response to *Trichophyton* and asthma severity. *Chest* 2009;135:898-903.
 16. Ito I, Ishida T, Togashi K, Niimi A, Koyama H, Ishimori T, Kobayashi H, Mishima M. Differentiation of bacterial and non-bacterial community-acquired pneumonia by thin-section computed tomography. *Eur J Radiol* 2009;72:388-95.
 17. Isozumi R, Ito Y, Ishida T, Hirai T, Ito I, Maniwa K, Hayashi M, Kagioka H, Hirabayashi M, Onaru K, Tomioka H, Tomii K, Gohma I, Osawa M, Imai S, Takakura S, Iinuma Y, Chin K, Ichiyama S, Mishima M; the Kansai Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. Molecular characteristics of serotype 3 Streptococcus pneumoniae isolates among community-acquired pneumonia patients in Japan. *J Infect Chemother* 2008;14:258-61.
 18. Yamaguchi M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Matsuoka H, Jinnai M, Otsuka K, Oguma T, Takeda T, Ito I, Chin K, Mishima M. Sputum levels of transforming growth factor-b1 in asthma: Relation to clinicoradiological findings. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008;18:202-6.
 19. Ishida T, Maniwa K, Kagioka H, Hirabayashi M, Onaru K, Tomioka H, Hayashi M, Tomii K, Gohma I, Ito Y, Hirai T, Ito I, Mishima M. Antimicrobial

susceptibilities of Streptococcus pneumoniae isolated from adult patients with community-acquired pneumonia in Japan. *Respirology* 2008;13:240-6.

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 2008 ATS International Conference, Toronto, May 16-21, 2008. Isao Ito et al. TNF-alpha Modulates Expressions of MMPs and Migratory Function of Human Airway Smooth Muscle Cells.
2. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2008 年 11 月 28-29 日, 東京. 伊藤功朗ら. TNF- α によるヒト気道平滑筋細胞 MMP 発現と細胞遊走への影響
3. 2009 年 6 月 12-14 日, 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京. 伊藤功朗. シンポジウム 7. 「呼吸器専門医の在り方と制度」大学病院における専門医のあり方（理想像）.
4. 2009 年 6 月 12-14 日, 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京. 伊藤功朗, 長井苑子, 半田知宏, 室繁郎, 平井豊博, 月野光博, 三嶋理晃. MMP-9 プロモータ遺伝子多型は上肺野優位の肺気腫病変と関連する.
5. 2009 年 6 月 12-14 日, 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京. 伊藤功朗, 石田直, 橋本徹, 有田真知子, 大澤真, 橘洋正, 新実彰男, 三嶋理晃. HRCT を用いた細菌性肺炎と非定型肺炎の鑑別に関する prospective study.

〔図書〕（計 1 件）

京都大学医学部附属病院市中肺炎・院内肺炎治療マニュアル. 伊藤功朗著, 三嶋理晃・一山智監修. ライフ・サイエンス 2010 年. 全 99 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤功朗 (ITO ISAO)

京都大学医学研究科呼吸器内科助教

研究者番号：40447975

(2) 研究分担者

三嶋理晃 (MISHIMA MICHIAKI)

京都大学医学研究科呼吸器内科教授

研究者番号：60190625

新実彰男 (NIIMI AKIO)

京都大学医学研究科呼吸器内科准教授

研究者番号：30252513

室 繁郎 (MURO SHIGEO)

京都大学医学研究科呼吸器内科助教

研究者番号：60344454

星野勇馬 (HOSHINO YUMA)

京都大学医学研究科呼吸器内科助教

研究者番号：00378746