

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590905

研究課題名（和文） 慢性閉塞性肺疾患の組織傷害における線維芽細胞の役割の解明

研究課題名（英文） Role of lung fibroblasts on the pathogenesis of COPD

研究代表者

杉浦 久敏 (SUGIURA HISATOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20445092

研究成果の概要（和文）：慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease: COPD)の病因として、その病態が過剰な炎症によってもたらされる肺組織の破壊と考えた際、その病態は、創傷治癒機転の障害と捉えることができる。本研究では、COPD 患者の線維芽細胞は、健常者と比較して、創傷治癒能力が減弱しており、またタバコ抽出液に対するアポトーシスの閾値が低下している可能性が示された。さらに COPD の増悪時に重要であるウイルス感染のモデルでは、Toll-like receptor 3 のアゴニストの刺激により線維芽細胞は筋線維芽細胞に分化することによって気道の線維化に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We have proposed the possible pathogenesis of COPD due to loss of tissue repair by lung fibroblasts. The lung fibroblasts from COPD patients had less ability of tissue repair than those from control subjects. In addition, the fibroblasts from COPD patients were sensitive against cigarette smoke extract compared to those from healthy subjects. Toll-like receptor 3 agonist, double-stranded RNA, caused the differentiation of lung fibroblasts into myofibroblasts. These results suggest that lung fibroblasts could be a key cell in the pathogenesis of COPD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：慢性閉塞性肺疾患、線維芽細胞、創傷治癒、アポトーシス、Toll-like 受容体

1. 研究開始当初の背景

COPD の病態解明および治療法の開発は、その罹患率、死亡率の観点から急務である。

(1) COPD の病態を創傷の治癒不全と考えた際に、創傷治癒に中心的な役割を担うといわれている線維芽細胞の役割については全く不明である。

(2) また、COPD の自然歴で重要な急性増悪における線維芽細胞の役割も不明である。

2. 研究の目的

本研究は COPD における肺線維芽細胞の役割を実際の患者から採取した線維芽細胞を用いて (1) 創傷治癒能力の評価、(2) タ

バコ抽出液 (CSE) に対する線維芽細胞のアポトーシスの感受性、(3) 肺線維芽細胞を Toll-like receptor 3 (TLR3) のアゴニストで刺激した際の筋線維芽細胞への分化の3点について検討することで、COPD の病態形成に対する肺線維芽細胞の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象と検体採取

COPD 症例および健常人の肺癌症例より得られた切除肺より線維芽細胞を培養する。

(2) 創傷治癒能力の評価

創傷治癒能力の機能評価として、3次元コラーゲンマトリクス収縮法や fibronectin に対する走化能および増殖能を用いて評価する。

(3) CSE に対するアポトーシス感受性

アポトーシスの評価を TUNEL staining や MTT assay などを組み合わせて評価し、COPD 患者由来の線維芽細胞と健常人由来の線維芽細胞のアポトーシス感受性について評価する。

(4) TLR3 agonist による線維化の評価

TLR3 agonist として poly(I:C)を用いて、線維芽細胞を刺激し、筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin の発現について検討する。また線維化のマーカーである細胞外マトリクス蛋白の定量も併せて行う。

4. 研究成果

(1) 創傷治癒能力の評価

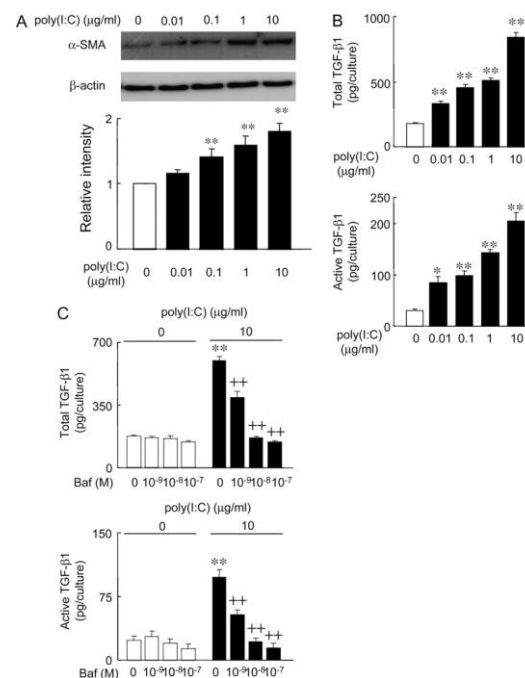
COPD 患者と健常人由来の線維芽細胞を培養し、検討を行った。3次元コラーゲンマトリクス収縮法を用いた検討では、健常人に比べて、COPD 由来の線維芽細胞で有意のコラーゲンゲルの収縮が減弱していた。またその収縮程度は気流制限の程度と良い相関を示した。Fibronectin に対する線維芽細胞の走化能も COPD 由来の線維芽細胞において減弱していた。同様にその走化能の程度は気流制限の程度と良い相関を示した。これらの線維芽細胞の創傷治癒機能の減弱は、PGE2 の過剰産生と関係があることが分かった。以上の結果より、COPD では、肺の炎症による組織損傷に対して、創傷治癒機能の中心をなすと考えられている線維芽細胞の機能が減弱しており、気流制限の程度とよく相関することから、COPD の病態形成に関与することが示唆された。これらの結果は、2008年に *Am J Respir Crit Care Med* 誌に発表した (S.Togo, H. Sugiura et al. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178: 248-60)

(2) CSE に対するアポトーシス感受性

本検討に関しては、検体の採取および培養において症例数が十分、集まっておらず、未だ研究中である。しかしながら COPD および健常人の線維芽細胞を用いた少数例(各群 n = 2-3)での検討では、COPD 患者の線維芽細胞において CSE に対する感受性が高く、より傷害を受けやすい可能性が示唆された。その細胞内シグナリングを含め、現在検討中である。

(3) TLR3 agonist による線維化の評価

本研究では、Toll-like receptor 3 のアゴニストである poly(I:C)を、線維芽細胞に投与して、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化について α -smooth muscle actin の発現を指標に検討した。アゴニストの投与によって図1に示すように α -smooth muscle actin の発現が濃度依存性に増強した。



また図1に示すように、その形質転換には、Transforming growth factor- β (TGF- β)が関与している可能性が示唆された。さらに、細胞外マトリクス蛋白の過剰産生も促し、これらの一連の作用は、nuclear factor- κ B (NF- κ B)を介していることが示唆された。

(4) その他の研究

今回の研究は、COPD の病態に線維芽細胞が関連することに焦点をあて、施行したが、その他の研究として、気管支喘息の中でも特に治療が困難である難治性喘息の病態に、活性窒素種(reactive nitrogen species)が関与することを我々は明らかにした。この結果は、2008年に *J Allergy Clin Immunol* 誌に発表

し、掲載された(H. Sugiura et al. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 355-360)。さらに我々は、活性窒素種の線維芽細胞に対する作用を明らかにするために、肺線維芽細胞を用いて検討したところ、線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換や細胞外マトリクス蛋白の過剰産生を刺激し、これらの作用は、NF- κ B-TGF- β の経路を介していることが明らかになった(T. Ichikawa, H. Sugiura et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: 800-808)。この知見は、我々が以前に初めて報告した COPD の気道において、活性窒素種が過剰産生されている(M. Ichinose, H. Sugiura et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 701-706)という結果と考え合わせると興味深い。即ち、COPD の患者の気道では、活性窒素種が過剰産生されることで、気道の線維芽細胞を刺激し、筋線維芽細胞に分化させることで、気道の線維化と狭窄に関与しているかもしれない。以上の結果については、*Antioxid Redox Signal* 誌に総説として発表した(H. Sugiura et al. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 785-798)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 23 件)

1. Koarai A, Sugiura H, Yanagisawa S, Ichikawa T, Minakata Y, Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, Ichinose M: Oxidative Stress Enhances Toll-like Receptor 3 Response to Double-stranded RNA in Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 651-660, 2010 査読有
2. Minakata Y, Ueda H, Akamatsu K, Kanda M, Yanagisawa S, Ichikawa T, Koarai A, Hirano T, Sugiura H, Matsunaga K, Ichinose M: High COPD prevalence in the patients with liver diseases. *Intern Med* 49: 2687-2691, 2010 査読有
3. Kamio K, Liu XD, Sugiura H, Togo S, Kawasaki S, Wang X, Ahn Y, Hogaboam C, Rennard SI: Statins inhibit MMP release from human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 35: 637-646, 2010 査読有
4. Togo S, Sugiura H, Nelson A, Kobayashi T, Wang X, Kamio K, Kawasaki S, Bitterman P, Rennard SI, Liu X: Hepatic growth factor (HGF) inhibits cigarette smoke extract induced apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res* 316: 3501-11, 2010 査読有
5. 市川朋宏, 杉浦久敏: 喘息と COPD をめぐって ～類似点と相違点～ I. 疫学. *アレルギー・免疫* 17 (12): 12-22, 2010 査読有
6. Sugiura H, Ichikawa T, Koarai A, Yanagisawa S, Minakata Y, Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, Ichinose M: Activation of Toll-Like Receptor 3 Augments Myofibroblast Differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 654-662, 2009 査読有
7. Sugiura H, Liu X, Ichikawa T, Ichinose M, Rennard SI: 3-Nitrotyrosine inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction and chemotaxis. *Eur Respir J* 34: 1452-1460, 2009 査読有
8. Sugiura H, Ichikawa T, Liu X, Kobayashi T, Wang XQ, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, Mao L, Ann Y, Ichinose M, Rennard SI: N-acetyl-L-cysteine inhibits TGF- β -induced profibrotic responses in fibroblasts. *Pulm Pharma Ther* 22: 487-491, 2009 査読有
9. Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T, Akamatsu K, Koarai A, Hirano T, Sugiura H, Minakata Y, Ichinose M: Molecular Mechanism of the Additive Effects of Leukotriene Modifier in Asthmatic Patients Receiving Steroid Therapy. *Allergol Int* 58: 89-96, 2009 査読有
10. Yanagisawa S, Sugiura H, Yokoyama T, Yamagata T, Ichikawa T, Akamatsu K, Koarai A, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M: The possible role of hematopoietic cell kinase in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 135: 94-101, 2009 査読有
11. Yanagisawa S, Koarai A, Sugiura H, Ichikawa T, Kanda M, Tanaka R, Akamatsu K, Hirano T, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M: Oxidative stress augments toll-like receptor 8 mediated neutrophilic responses in healthy subjects. *Respir Res* 10: 50, 2009 査読有
12. Togo S, Liu X, Wang X, Sugiura H,

- Kamio K, Kawasaki S, Kobayashi T, Ertl RF, Ahn Y, Holz O, Magnussen H, Fredriksson K, Skold CM, Rennard SI. The PDE4 inhibitors roflumilast and rolipram augment PGE2 inhibition of TGF- β 1 stimulated fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L959-69, 2009 査読有
13. Matsunaga K, Ichikawa T, Yanagisawa S, Akamatsu K, Koarai A, Hirano T, Sugiura H, Minakata Y, Ichinose M, Clinical Application of Exhaled Breath Condensate Analysis in Asthma: Prediction of FEV₁ Improvement by Steroid Therapy. *Respiration* 78: 393-398, 2009 査読有
 14. 杉浦久敏: 特集 COPD 大規模臨床研究から分かるもの テオフィリン薬, 呼吸と循環 57: 799-806, 2009 査読無
 15. 杉浦久敏: 気道炎症評価法の現状と今後の展望. 臨床免疫・アレルギー科. 52: 219-223, 2009 査読無
 16. Sugiura H, Komaki Y, Koarai A, Ichinose M: Nitrate stress in refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol* 121: 355-360, 2008 査読有
 17. Sugiura H, Ichinose M: Oxidative and nitrate stress in bronchial asthma. *Antioxid Redox Signal* 10: 785-798, 2008 査読有
 18. Ichikawa T, Sugiura H, Koarai A, Yanagisawa S, Kanda M, Hayata A, Furukawa K, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M: Peroxynitrite augments fibroblast-mediated tissue remodeling via myofibroblast differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: 800-808, 2008 査読有
 19. Togo S, Holz O, Liu X, Sugiura H, Kamio K, Wang X, Kawasaki S, Ahn Y, Fredriksson K, Skold CM, Mueller KC, Branscheid D, Welker L, Watz H, Magnussen H, Rennard SI: Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*.178:248-260, 2008 査読有
 20. Kamio K, Sato T, Liu X, Sugiura H, Togo S, Kobayashi T, Kawasaki S, Wang X, Mao L, Ahn Y, Holz O, Magnussen H, Rennard SI: Prostacyclin analogs stimulate VEGF production from human lung fibroblasts in culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.294: 1226-1232, 2008 査読有
 21. Matsunaga K, Kanda M, Hayata A, Yanagisawa S, Ichikawa T, Akamatsu K, Koarai A, Hirano T, Sugiura H, Minakata Y, Ichinose M: Peak Expiratory Flow Variability Adjusted by Forced Expiratory Volume in One Second is a Good Index for Airway Responsiveness in Asthmatics. *Intern Med* 47: 1107-1112, 2008 査読有
 22. Yamagata T, Hirano T, Sugiura H, Yanagisawa S, Ichikawa T, Ueshima K, Akamatsu K, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M: Comparison of bronchodilatory properties of transdermal and inhaled long-acting β_2 -agonists. *Pulm Pharmacol Ther* 21: 160-165, 2008 査読有
 23. Minakata Y, Sugiura H, Yamagata T, Yanagisawa S, Ichikawa T, Koarai A, Akamatsu K, Hirano H, Matsunaga K, Ichinose M: Prevalence of COPD in Primary Care Clinics: Correlation with Non-Respiratory Diseases. *Intern Med* 47: 77-82, 2008 査読有
- [学会発表] (計 23 件)
1. H. Sugiura, M. Ichinose. Nitrate Stress in inflammatory lung diseases. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010.06.15, Kyoto (シンポジウム)
 2. H. Sugiura, X. Liu, T. Ichikawa, M. Ichinose, S.I. Rennard. Thematic Poster Session: 3-Nitrotyrosine inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction and chemotaxis. 2010 ATS Annual Congress, 2010.05.16-19, New Orleans, USA.
 3. 杉浦久敏: 大規模臨床試験より見える

- もの COPD-UPLIFT study. 第 50 回日本呼吸器学会(シンポジウム), 京都, 2010.04.24
4. 杉浦久敏: 慢性閉塞性肺疾患の発症機序に関する研究 - 活性窒素種の役割と新たな発症機序の探究. 第 50 回日本呼吸器学会(熊谷賞受賞特別講演), 京都, 2010.04.25
 5. 杉浦久敏: ウイルス感染と増悪. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会(シンポジウム), 東京, 2010.11.26
 6. 杉浦久敏: 高齢者喘息と COPD 類似点・相違点「疫学」. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会(ワークショップ), 東京, 2010.11.27
 7. 杉浦久敏, 市川朋宏, 小荒井晃, 柳澤悟, 南方良章, 松永和人, 平野綱彦, 赤松啓一郎, 神田匡兄, 一ノ瀬正和: 3-ニトロチロシン(3-NT)の組織修復能に及ぼす効果. 第 50 回日本呼吸器学会総会, 京都, 2010.04.24
 8. H. Sugiura, A. Koarai, et al. Activation of TLR3 augments myofibroblasts differentiation and extracellular matrix production. 2009.09.16. ERS (Vienna). (Oral presentaion)
 9. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: 慢性抗原曝露モデルにおける繊維芽細胞の表現型に関する検討. 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009. 06.12
 10. 杉浦久敏, 市川朋宏, 小荒井晃, 柳澤悟, 南方良章, 松永和人, 平野綱彦, 赤松啓一郎, 田中里江, 神田匡兄, 一ノ瀬正和: Toll-like receptor (TLR3) の線維芽細胞の分化に及ぼす効果. 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009.06.13
 11. 杉浦久敏, 市川朋宏, 小荒井晃, 柳澤悟, 南方良章, 松永和人, 平野綱彦, 赤松啓一郎, 田中里江, 神田匡兄, 一ノ瀬正和: Toll-like receptor 3 (TLR3) の筋線維芽細胞の分化に及ぼす効果. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009.10.29
 12. 杉浦久敏: 慢性閉塞性肺疾患における活性窒素種の産生と末梢気道線維化病態への関与に関する検討. 第 18 回 Pneumo Forum, 東京, 2009.11.21(第 18 回 Pneumo Forum 賞受賞)
 13. H. Sugiura, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Koarai, M. Kanda, A. Hayata, K. Akamatsu, T. Hirano, K. Matsunaga, T. Yamagata, Y. Minakata, M. Ichinose: Peroxynitrite augments matrix metalloproteinases activity through NF-kB activation. ATS2008 International Conference, 2008.05.20, Toronto, Canada
 14. 杉浦久敏: 呼吸器病態評価の現状と展望-臨床マーカーの観点から. 第 4 回バイオマーカー研究会(シンポジウム), 東京, 2008.03.01
 15. 杉浦久敏: NO と炎症性呼吸器疾患. 第 8 回日本 NO 学会(シンポジウム), 仙台, 2008.05.10
 16. 杉浦久敏: 呼気ガス・呼気凝縮液. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会(シンポジウム), 東京, 2008.06.12
 17. 杉浦久敏: 気道炎症評価法の現状と今後の展望. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会(ワークショップ), 東京, 2008.11.28
 18. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: 活性窒素種(reactive nitrogen species: RNS)による組織リモデリングへの効果. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会(ポスター・ミニシンポジウム), 神戸, 2008.06.15
 19. 杉浦久敏, 柳澤悟, 市川朋宏, 小荒井晃, 神田匡兄, 早田敦志, 平野綱彦, 松永和人, 山縣俊之, 南方良章, 一ノ瀬正和: 活性窒素種(reactive nitrogen species: RNS)による MMP の活性化について. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会(ポスター・ミニシンポジウム), 神戸, 2008.06.17
 20. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: Prostaglandin(PG)E2 は cigarette smoke extract(CSE)による肺線維芽細胞のアポトーシスを抑制する. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会(ポスター・ミニシンポジウム), 神戸, 2008.06.17
 21. 杉浦久敏, 柳澤悟, 市川朋宏, 小荒井晃, 神田匡兄, 早田敦志, 平野綱彦, 松永和人, 南方良章, 一ノ瀬正和: 活性窒素種 活性窒素種(reactive nitrogen species: RNS)による MMP の活性化について. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008.11.27
 22. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: 活性窒素種(reactive nitrogen species: RNS)による組織リモデリングへの効果. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008.11.27
 23. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: 慢性抗原曝露モデルにおける肺腺芽細胞の phenotype に関する検討. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008.11.27

〔図書〕(計8件)

1. 杉浦久敏: 気管支拡張症, 原発性線毛機能不全. 山口徹, 北原光夫, 福井次夫編集 今日の治療指針 p248-249, 2010
2. 杉浦久敏: 酸化窒素化ストレス. 工藤翔二 監修, 永井厚志, 一ノ瀬正和 編集, 呼吸器 common disease の診療 COPD のすべて. 文光堂, p44-p45, 2008
3. 杉浦久敏: 喀痰検査. 工藤翔二 監修, 永井厚志, 一ノ瀬正和 編集, 呼吸器 common disease の診療 COPD のすべて. 文光堂, p146-p150, 2008
4. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: テオフィリン薬. 工藤翔二 監修, 永井厚志, 一ノ瀬正和 編集, 呼吸器 common disease の診療 COPD のすべて. 文光堂, p204-p205, 2008
5. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: テオフィリン薬の抗炎症作用. 工藤翔二 監修, 永井厚志, 一ノ瀬正和 編集, 呼吸器 common disease の診療 COPD のすべて. 文光堂, p208, 2008
6. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: COPD の新しい治療薬の展望. 工藤翔二 監修, 永井厚志, 一ノ瀬正和 編集, 呼吸器 common disease の診療 COPD のすべて. 文光堂, p209-p211, 2008
7. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: 活性窒素と炎症性呼吸器疾患. 工藤翔二, 土屋了介, 金澤実, 大田健 編集, Annual Review 呼吸器. 中外医学社, p17-p25, 2008
8. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: 最近話題の特殊検査. 工藤翔二 監修, 相澤久道, 大田健, 川崎一輝, 弦間昭彦, 酒井文和, 中田紘一郎, 永武毅, 貫和敏博 編集, 呼吸器疾患診療マニュアル. 日本医師会, p160-p161, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 久敏 (SUGIURA HISATOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20445092