

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K17181
研究課題名（和文）COPDにおけるエンドセリンの役割の解明

研究課題名（英文）The role of endothelin in COPD

研究代表者

梅澤 佳乃子 (Umezawa, Kanoko)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：40824181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺高血圧症は慢性閉塞性肺疾患（COPD）の主要な合併症の一つであり、肺高血圧症、右心不全は予後不良因子であることが知られている。

今回、COPD患者において吸入薬の開始（変更）前後の血漿中のエンドセリン（ET-1）の変化につき検討したところ、血漿中のET-1は吸入開始後に低下していることが判明した。エラスターゼ誘導性COPDマウスモデルを作成したところ、血漿中のET-1濃度はエラスターゼ投与群で有意な上昇がみられた（ $p<0.01$ ）。このCOPDモデルに対してブデゾニド/ホルモテロール/グリコピロニウムなどで治療効果を見たが、全ての治療群で有意なET-1濃度の減少が見られた（ $p<0.05$ ）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、既存の吸入薬の肺高血圧への進展抑制効果を明らかにすること、肺高血圧の進展に重要な役割を果たしているエンドセリンがCOPDの肺高血圧症への進展に果たす役割を明らかにしていくこと、さらにCOPD患者の呼気凝集液検体を用いてエンドセリンの定量を行うことで、COPDに対するこれらの治療がエンドセリンに与える効果を調べることを主な目的としている。本研究によって現在有効な薬物治療がない肺疾患を原因とする肺高血圧症への治療法が確立し、有病率の高いCOPDの生命予後改善に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Pulmonary hypertension is one of the major complications of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and pulmonary hypertension and right heart failure are known to be poor prognostic factors.

At first we examined changes in plasma endothelin (ET-1) before and after the start (change) of inhaled drugs in COPD patients, we found that ET-1 in plasma decreased after the start of inhalation. In an elastase-induced COPD mouse model, plasma ET-1 levels were significantly elevated in the elastase-treated group ($p<0.01$). Treatment effects of budesonide/formoterol/glycopyrronium, etc. were observed in this COPD model, and significant reductions in ET-1 concentration were observed in all treatment groups ($p<0.05$).

研究分野：呼吸器内科

キーワード：COPD エンドセリン

1. 研究開始当初の背景

(1) COPD の病態生理と肺高血圧の位置付け

GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) によると COPD 患者は世界で 3 億 8 千万人にも及び、COPD によって年間 3 百万人が死亡し、世界の死因の第 3 位にあたりと報告されている重要な疾患である。世界的に甚大な健康被害をもたらしており、その対策が望まれている。COPD では肺胞破壊に伴う肺血管床の減少、一酸化窒素などの内皮依存性血管拡張因子の減少、血管収縮因子や低酸素による血管攣縮、肺血管のリモデリングなどの機序が肺高血圧症の原因となる。また、肺高血圧に誘導される右心不全の併発は、COPD 患者の QOL や予後にとって重要な予測因子である (Hurdman J, et al. *Eur Respir J.* 2013)。そこで、肺高血圧への進展を抑制すること、さらに肺高血圧そのものを治療することは COPD 治療において極めて重要と考えられる。また、血管収縮物質であるエンドセリンは様々な疾患における肺高血圧症の成立に関与すると考えられており (Giaid A, et al. *N Engl J Med.* 1993.)、COPD においてもエンドセリンが肺高血圧症の成立に関与することが報告されている (図 1. Carratu P, et al. *BMC pulm Med.* 2008)。

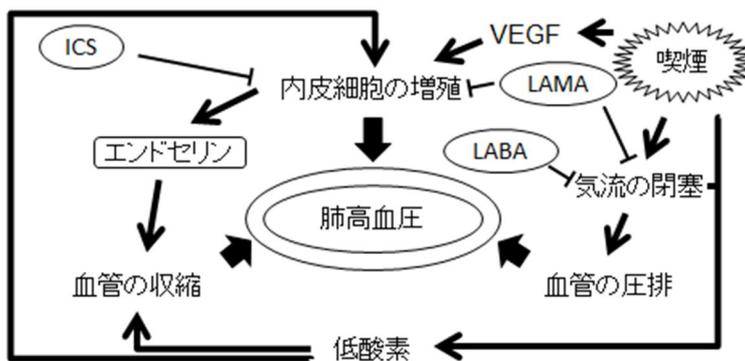


図1. 肺高血圧の病態とエンドセリン

近年、COPD 由来の肺高血圧症に対する、肺高血圧治療薬の効果に関する報告はなされてきているが (Wright JL, et al. *Thorax.* 2005) その有効性は依然確立していない。

(2) 肺高血圧治療の可能性

従来の COPD 治療のターゲットは気道狭窄、気道炎症に対するものが主体で、長時間作用型 2 刺激薬 (LABA)、長時間作用性抗コリン薬 (LAMA)、気管支拡張薬や吸入ステロイド薬 (ICS) などがガイドラインでも推奨されている。しかしながら、LABA/LAMA 吸入治療で COPD による肺高血圧症の肺血流と肺機能が改善したという報告 (Claussen JV, et al. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019) を認めるのみで、既存の吸入薬が COPD 由来の肺高血圧症に対する有効性は未だに明らかになっていない。COPD 患者において ICS が血管内皮増殖因子を抑制することで血管リモデリングを抑えること (Zanini A, et al. *Thorax.* 2009)、LAMA が、血管内皮細胞の増殖を抑制すること (Legeay S, et al. *Sci Rep.* 2016)、LABA には血管拡張作用があること (Leblaris V, et al. *Cardiovasc Res.* 2007) が報告されている (図 1)。以上から、『既存の COPD に対する吸入療法がエンドセリン系を介した肺高血圧への移行を抑制するのではないか』という仮説を立て、この仮説を明らかにするために本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エラスターゼ誘発性 COPD マウスモデルを用いて既存の吸入薬の肺高血圧の進展への作用点と作用機序を明らかにすること、COPD 肺高血圧進展へのエンドセリンの役割を *in vitro*、*in vivo* の実験で明らかにすること、ヒト由来の呼気凝集液中のエクソソームやエンドセリンの定量法を確立すること、COPD 患者由来の呼気凝集液中のエンドセリンを定量することにより、その治療効果予測因子としての有用性や、患者選択指標としての有用性を明らかにすることを目的としている。

2013 年のニース分類により肺高血圧は第 1 群：肺動脈性肺高血圧症 (PAH)、第 2 群：左心性心疾患に伴う肺高血圧症、第 3 群：肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症、第 4 群：慢性血栓性肺高血圧症 (CTEPH)、第 5 群：詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症に分類される。COPD を代表とする第 3 群の肺高血圧症は詳細な成因も明らかではなく、確立された薬物療法もない。以上より本研究は学術的独自性が高く、エンドセリンの発現に最も影響を与える因子がわかると、エンドセリン拮抗薬に効果がある患者の選別ができる可能性があり、新規治療法の開発にもつながる創造性を有する。

3. 研究の方法

アールチューブを用いて呼気凝縮液を回収し、遠沈後 -80 で保存しておく。細胞外小胞の単離のための、RNA の単離は miRvana small RNA extraction kit (Ambion) を用いて行う (Pinkerton M, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2013, Sinha A, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2013)。

また、Enzyme immunoassay (EIA) kit (Cayman Chemical)を用いてエンドセリンを定量する (Carratu P, et al. BMC pulm Med. 2008)。

神戸大学医学部附属病院で患者由来の呼気凝縮液を回収する。並行して COPD マウスモデルを作成する。COPD マウスモデルの血中エンドセリンを経時的に定量するとともに研究協力者の江本憲昭教授が所有している小動物用の心エコーを用いて肺高血圧の程度を経時的に評価して、両者の関係を調べる。また、治療実験として、既存の LAMA、LABA、ICS あるいはそれらの合剤を COPD マウスモデルに経鼻投与して、エンドセリンと肺高血圧の進展へ与える影響を評価する。

治療薬の作用点について解析を行う。具体的には、COPD マウスモデルの気管支肺泡洗浄液 (BALF) と肺組織を経時的に採取し、炎症性サイトカインや増殖因子の発現を real time PCR、ELISA など定量し、治療群と対照群で比較する。また、内皮細胞や上皮細胞の細胞株を用いて、TNF や TGF で刺激した際の細胞応答をウェスタンブロッティングや real time PCR で解析し、治療群と対照群で比較する。

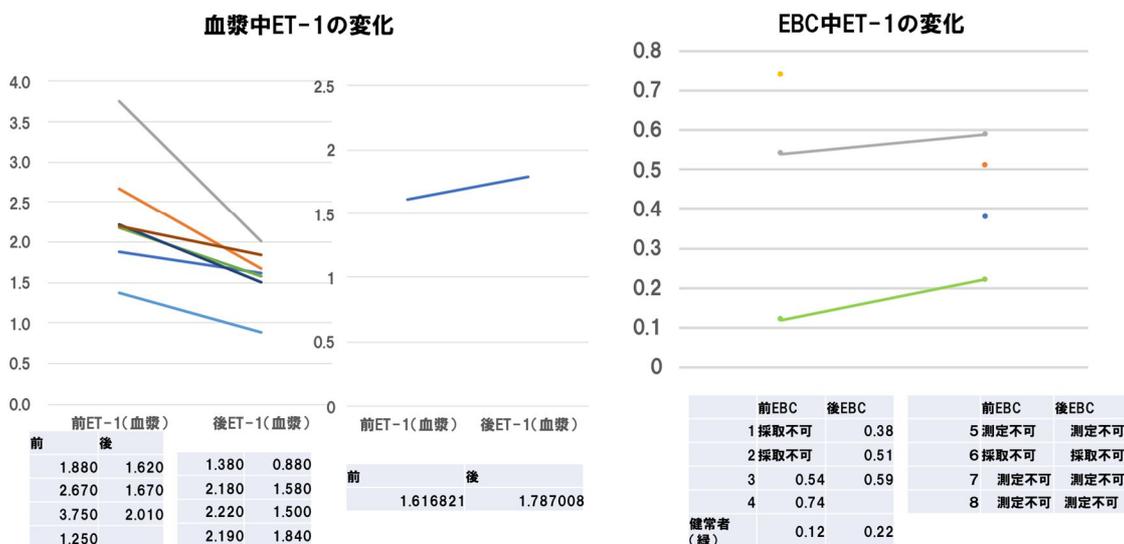
4. 研究成果

COPD 患者における ET-1 の変化の検討

COPD 患者において吸入薬の開始 (変更) 前後の血漿中のエンドセリン (ET-1) の変化につき検討した。被検者は Rtube を使用して鼻にクリップをした状態で 10 分間呼吸を行い呼気凝縮液 (EBC) を回収しそののち、血漿を採取した。検査は実施後 4-12 週間後に同様の方法で繰り返して行った。それぞれのサンプルは、Endothelin-1 Quantikine ELISA Kit (R & D Systems) によって測定した。

血漿中の ET-1 は吸入開始後に低下していることが判明した (n=8) が健常人では変化は見られなかった (n=1)。一方で、EBC のエンドセリンは 6/9 人が検出感度以下となり測定が困難であった。

COPD患者におけるET-1の変化



た。

エラスターゼによる COPD マウス疾患モデルの作成

8-12 週齢のメスの BALB/c マウスに対してメドトミジン (0.3 mg/kg) + ミダゾラム (4 mg/kg) + ベトルファール (5 mg/kg) の三種混合麻酔で麻酔をかけ、気管切開を行って、ブタ腺由来エラスターゼ 3 U をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶かして 50 μ l としたものを気道内に投与した。コントロール群には PBS 50 μ l のみを同様に気道内に投与した (Day 0)。

エンドセリン濃度の測定

Day 21 にメドトミジン (0.3 mg/kg) + ミダゾラム (4 mg/kg) + ベトルファール (5 mg/kg) の三種混合麻酔で麻酔をかけ、開胸して、心腔穿刺にて採血して脱血死させる。引き続き、マウスの心腔から PBS を 3 ml 投与し、肺を灌流して肺から血を抜く。最後に肺を摘出し心臓と肺を一塊として RNAlater に浸し -80 保存した。血漿は Endothelin-1 Quantikine ELISA Kit (R & D Systems) を使用して ET-1 の濃度を測定した。

結果:

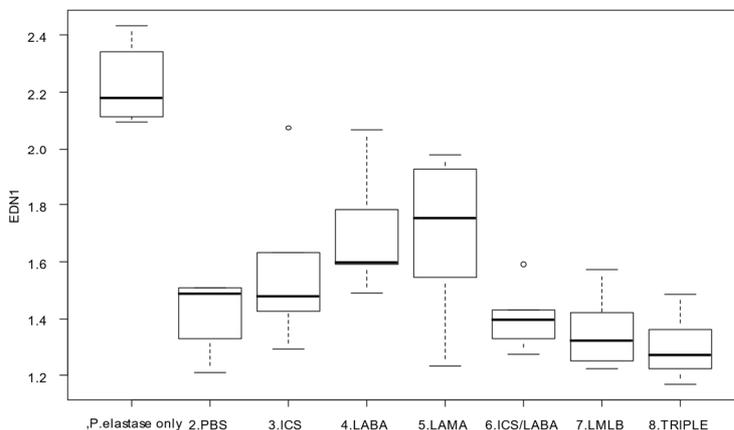
Day 21 ではエラスターゼ投与群が 2.03 pg/ml, PBS 投与群が 1.29 pg/ml でありエラスターゼ投与群で有意な ET-1 濃度の上昇がみられた (n=6 p<0.01)。

エンドセリンに対する治療効果の確認

前記と同様の方法で COPD マウスモデルを作成する (Day0)。COPD マウスモデルに対して、エラスターゼまたはコントロール投与 21 日後、2 週間週 3 日間治療薬 (PT010 [ブデソニド 250 ng、ホルモテロール 11.52 ng、グリコピロニウム 7.68 ng+PBS+1%カルボキシメチルセルロースで total150 μ l]、ビベスピ[ホルモテロール 11.52 ng、グリコピロニウム 7.68 ng+PBS+1%カルボキシメチルセルロースで total150 μ l]、シムビコート[ブデソニド 250 ng、ホルモテロール 11.52 ng +PBS+1%カルボキシメチルセルロースで total150 μ l]、ブデソニド 250 ng +PBS+1%カルボキシメチルセルロースで total150 μ l、ホルモテロール 11.52 ng +PBS+1%カルボキシメチルセルロースで total150 μ l、グリコピロニウム 7.68 ng+PBS+1%カルボキシメチルセルロースで total150 μ l、PBS+1%カルボキシメチルセルロースで total150 μ l) を腹腔内投与し Day 35 に前述のようにサンプル採取を行った。

結果：以下の図に示す。各群 n=6 で実施し、エラスターゼ 2.17 pg/ml、PBS 1.49 pg/ml、ブデソニド 1.48 pg/ml、ホルモテロール 1.60 pg/ml、グリコピロニウム 1.75 pg/ml、ブデソニド/ホルモテロール 1.40 pg/ml、ホルモテロール/グリコピロニウム 1.31 pg/ml、ブデソニド/ホルモテロール/グリコピロニウム 1.27 pg/ml でありそれぞれがエラスターゼ投与群に対して有意に低かった。(p<0.05)

35dのマウスのET-1濃度



3w 時点でのサイトカイン上昇についての検討

前述の 3w で採取した肺組織を使用してセパゾールを使用し RNA の抽出を行った。その際、PrimeScript™ RT Master Mix (Takara) を使用し cDNA の合成を行った。qRT-PCR は TB Green® Premix Ex Taq™ II (Takara) を利用した。同検体において、炎症性サイトカインの発現の亢進を検討した。

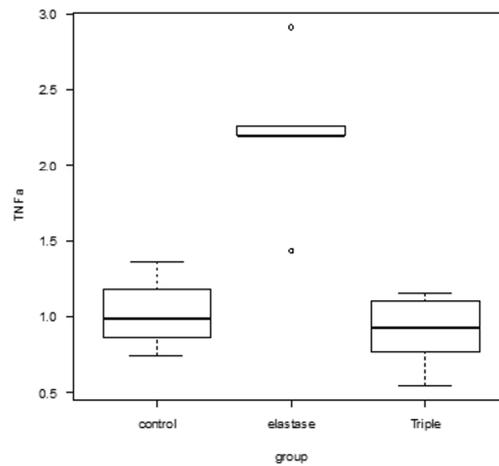
結果：PBS 群に対して 2 倍以上の発現を認めたのが、CXCL1、IL-6、TNFa であった。(n=3)

5w 時点でのマウスサイトカインの評価

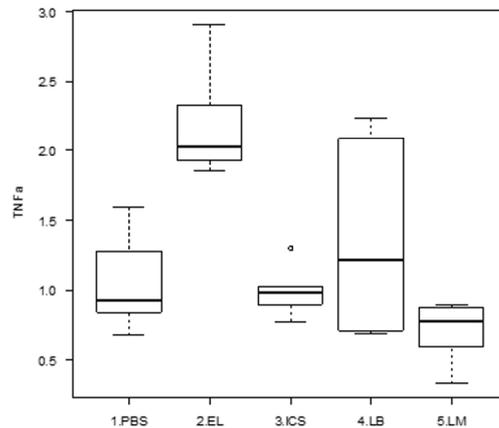
同様に 5w 時点のマウス肺 (PBS 群、エラスターゼ群、triple 群) にて qRT-PCR 実施し 5w 時点での上記 (IL-6、CXCL1、TNFa) の発現と triple の治療効果を検討した。その後、ブデソニド、ホルモテロール、グリコピロニウム単剤での治療効果も検討した。

結果：IL-6、CXCL1 エラスターゼ投与群で発現が上昇する傾向があったものの、triple との比較では有意な低下を認めなかった。TNFa ではエラスターゼ群で有意な上昇 (n=6 p<0.01) と triple での低下を認めた (n=6, p<0.05)。単剤の投与群ではブデソニドとグリコピロニウムでは低下がみられた。(n=6 p<0.05)

5w Triple TNFa 23年4月



5wマウス 単剤治療

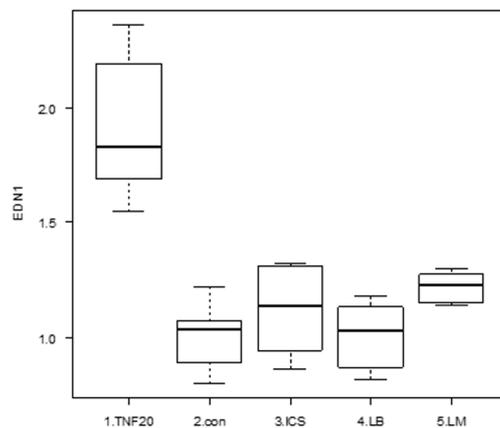


TNFaによる血管内皮細胞の刺激

HULEC-5a細胞に対して、TNFa (R & D Systems) 20ng/mlの濃度で培地に添加し6時間培養することでET-1の発現が亢進することと、ブデゾニド、ホルモテロール、グリコピロニウムを投与し6時間培養することで(10nM/ml)の治療効果を検討した。

結果: HULEC-5a細胞においてTNFa刺激はET-1の発現を亢進し、ブデゾニド、ホルモテロール、グリコピロニウムいずれもその亢進を抑制した(n=6, p<0.05)。

HULEC5aへのTNFa刺激と治療薬の効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suraya Ratoe, Nagano Tatsuya, Ryanto Gusty Rizky Teguh, Effendi Wiwin Is, Hazama Daisuke, Katsurada Naoko, Yamamoto Masatsugu, Tachihara Motoko, Emoto Noriaki, Nishimura Yoshihiro, Kobayashi Kazuyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Budesonide/glycopyrronium/formoterol fumarate triple therapy prevents pulmonary hypertension in a COPD mouse model via NF- κ B inactivation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-022-02081-y	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
---------	---------