

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16104

研究課題名（和文）慢性閉塞性肺疾患における活性イオウ分子種産生酵素の解析と新規抗酸化治療薬の創出

研究課題名（英文）Analysis of the enzyme producing reactive sulfur species in chronic obstructive pulmonary disease and development of novel antioxidant therapeutics

研究代表者

佐野 寛仁（Sano, Hirohito）

東北大学・大学病院・非常勤講師

研究者番号：20895916

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：この研究は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の肺において、活性イオウ分子種の主な産生酵素であるCARS2の発現が低下していることを明らかにした。さらに、CARS2欠損マウスを用いてエラスターゼ誘導性肺気腫モデルを作製したところ、野生型マウスに比べ肺の炎症と気腫化が増悪することが分かった。活性イオウ供与体を投与することで、これらの病態が改善されたことから、CARS2の低下による活性イオウ分子種の減少がCOPDの病態形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、COPD患者の肺ではCARS2酵素の発現が低下し、活性イオウ分子種が減少していることを初めて明らかにした。さらに、動物実験でCARS2欠損が肺の炎症と気腫化を増悪させ、活性イオウ供与体の投与でこれを改善できることを示した。これらの知見は、COPDの新しい病態メカニズムを提示するものである。また、活性イオウ分子種を補う新規治療薬の開発につながる可能性がある。現在の対症療法に加え、COPDの進行を抑制する根本的治療法の実現が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that in the lungs of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, the expression of CARS2, the primary enzyme responsible for producing reactive sulfur species, is decreased. Furthermore, employing CARS2-deficient mice in an elastase-induced emphysema model, it was observed that lung inflammation and emphysema were exacerbated compared to wild-type mice. The administration of reactive sulfur species donors ameliorated these pathological conditions, suggesting that the reduction of reactive sulfur species due to CARS2 deficiency may contribute to the pathogenesis of COPD.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：COPD 閉塞性肺疾患 酸化ストレス 活性硫黄分子種 CARS2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease : 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進行性の気流閉塞を示す [*Eur Respir J.* 2019;531:900164.]。治療としては、現在気管支拡張薬を主とした対症療法が中心であり、COPD の肺における持続する慢性炎症や気腫化の進行を抑制する有効な薬剤の開発が急務である [*Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:543-59.]。

COPD の発症と病態進行における分子メカニズムについてはいまだ解明されてはいない。しかしながら、近年の研究の発展や技術開発により新たな知見が数多く報告されている。特に、酸化ストレス (オキシダント・アンチオキシダント不均衡)、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡、アポトーシスという側面が COPD の病態では注目されている。COPD 患者の血液中や気道中には過酸化水素 (hydrogen peroxide : H_2O_2) や過酸化脂質など増加していると報告され、増悪時にはさらに増加すると考えられている [*Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1055-60.]。一方で生体の防御機構としては、これらの酸化ストレスに対して内因性のアンチオキシダントが存在している。COPD 患者では、このアンチオキシダントが減少していることでレドックスバランスの不均衡が生じ、炎症の増強を介してプロテアーゼ活性化/アンチプロテアーゼ不活性化を誘導し、肺の構造破壊に大きく寄与していることが示唆されている。2017 年になり、ヒト肺の細胞内外においてシステイン (cystein : CysSH) や GSH などのチオール (SH) 基に複数の硫黄 (S) 原子が付加した構造をとった活性イオウ分子種 (reactive sulfur species : RSS) の存在が明らかになった。COPD 患者由来の肺構築細胞では健康者や健康既喫煙者に比べて RSS の含有量が有意に減少していることが明らかになっている [*Thorax.* 2017;72:1074-83.]。しかしながら、その機序や意義は不明であった。近年、この RSS の主要な産生酵素がミトコンドリアに局在するシステイニル tRNA 合成酵素 2 (cysteinyI-tRNA synthetase 2 : CARS2) であるということが明らかにされたが [*Nat Commun.* 2017;8:1177.]、COPD の病態形成における CARS2 の役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、RSS の主要な産生酵素である CARS2 に着目して以下の事項を明らかにすることを目的とした。1) COPD 患者の肺構築細胞における CARS2 の発現レベルを明らかにし、臨床パラメータとの関係性を検討する。2) *Cars2*^{+/-}マウスに対して肺気腫モデルを作成し、RSS の含有量低下が肺の炎症や気腫形成に及ぼす影響を個体レベルで明らかにする。3) 活性イオウ供与体による肺の炎症および気腫化抑制効果について動物モデルを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

I 手術肺検体による検討

COPD 患者の手術肺検体を用いて、ウェスタンブロッティングによるヒト気道上皮細胞及び肺線維芽細胞における CARS2 蛋白発現量の検討を行った。さらに CARS2 の蛋白発現量と臨床パラメータとの関連を検索した。

II 動物実験での検討

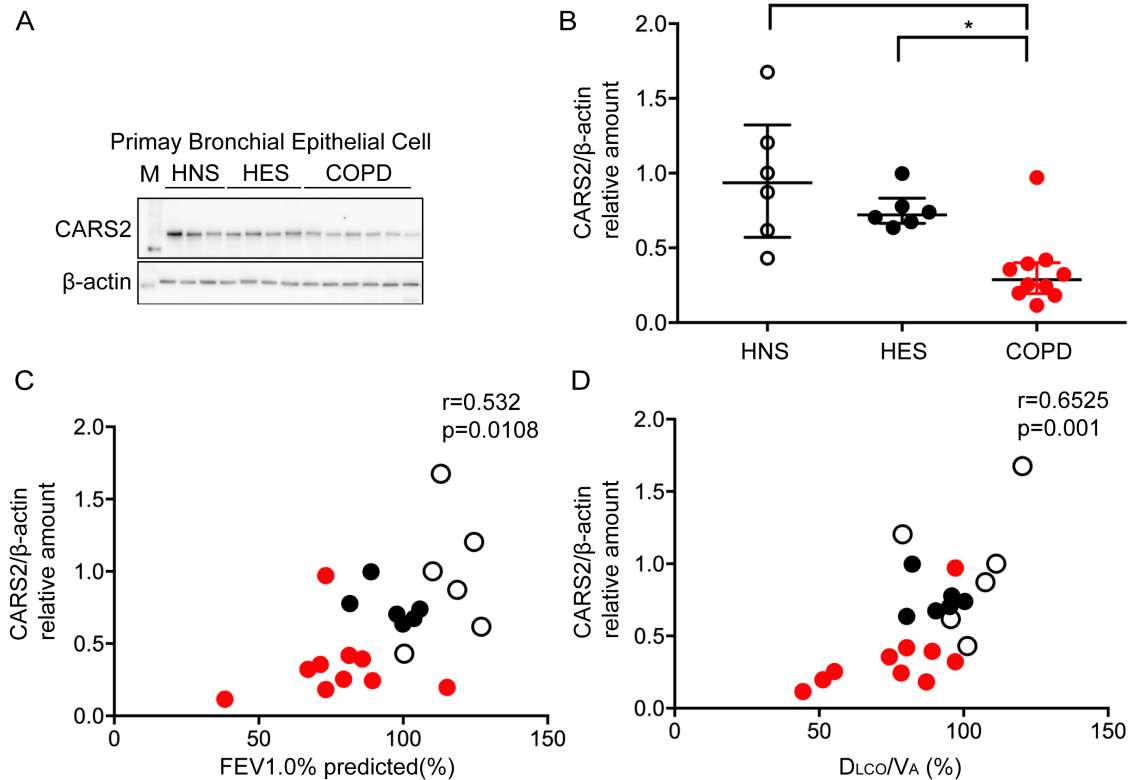
8~9 週齢の雄の *Cars2*^{+/+}マウス及び *Cars2*^{+/-}マウスを用いて実験を行なった。肺気腫モデルを作成し、microCT を用いた肺気腫体積の定量、呼吸機能の測定、肺組織切片で肺胞間距離の定量を行った。得られた組織検体において免疫組織化学による 8-OHdG、Cleaved-Caspase3 の検討を行った。また、活性硫黄供与体 GSSSG によるエラストラーゼ誘導肺気腫形成抑制の検討を行った。

4. 研究成果

I 手術肺検体による検討

(1) ウェスタンブロッティングによる CARS2 の蛋白発現量の検討

手術肺由来の肺構築細胞 (気道上皮細胞および肺線維芽細胞) における CARS2 の蛋白発現量をウェスタンブロッティングにより確認した。気道上皮細胞での検討では、COPD 群で非 COPD 群と比べて有意に CARS2 の蛋白発現量が低下していた (下図)。肺線維芽細胞での検討でも同様の結果が得られた。

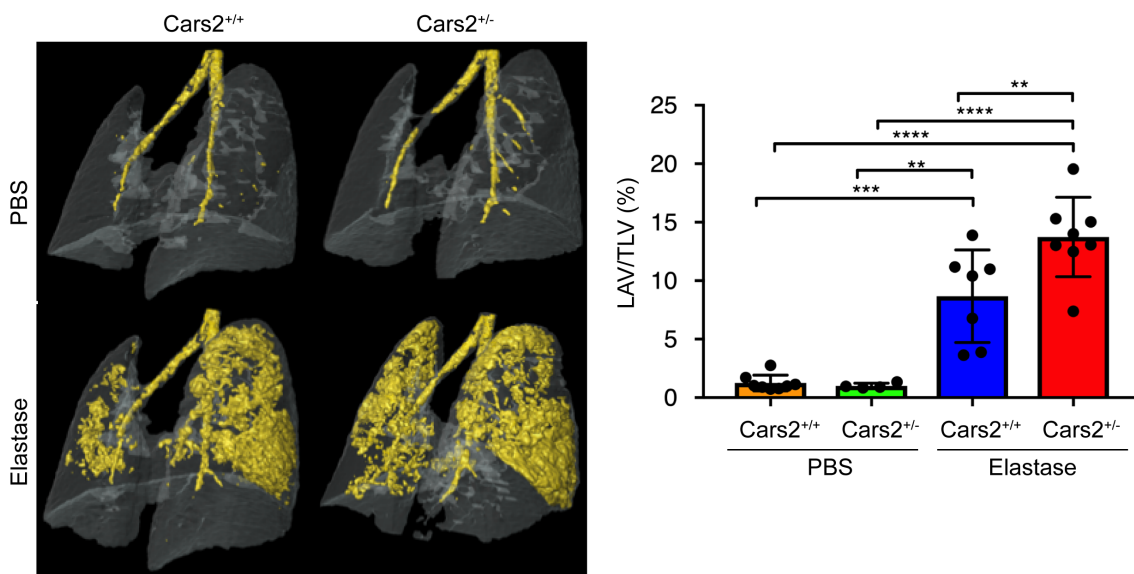


白丸はHNS、黒丸はHES、赤丸はCOPDを示す。

略語：HNS = 健康非喫煙者 (healthy never-smoker)、HES = 健康既喫煙者 (healthy ex-smoker)、COPD = 慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease)、FEV1 = forced expiratory volume in 1 second、 D_{Lco}/V_A = diffusing capacity of the lung for carbon monoxide/alveolar volume.

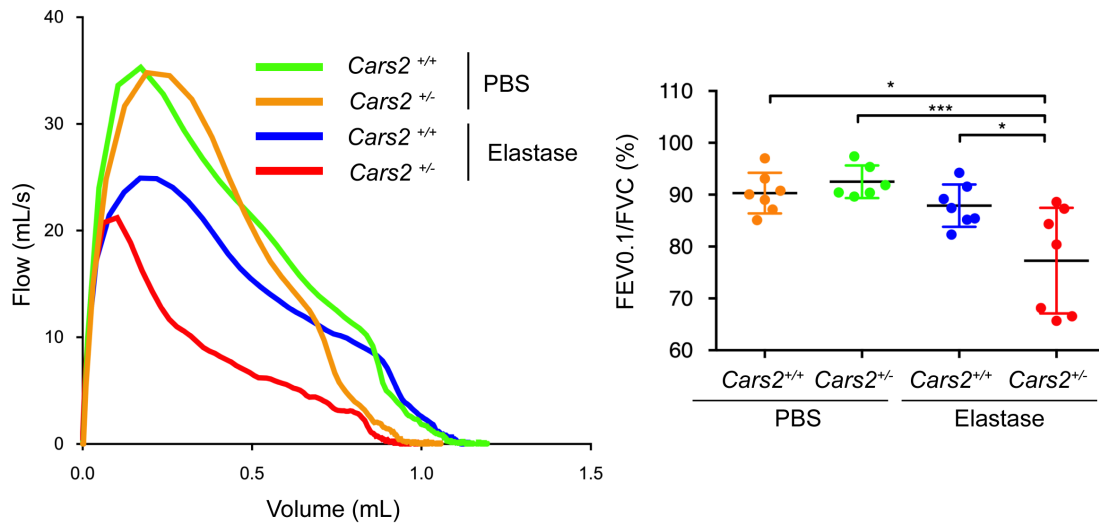
II 動物実験での検討

(1) *Cars2*^{+/-}マウスにおけるエラストラーゼ誘導肺気腫モデルマウスの形態学的検討
Cars2^{+/+}マウス及び*Cars2*^{+/-}マウスを用いて実験を行った。microCTを撮像し、total lung volume (TLV)を透明で示し、肺気腫領域をlow attenuation volume (LAV)として黄色で表示した。エラストラーゼ投与後の肺気腫の体積 (LAV/TLV) は、*Cars2*^{+/+}マウスに比べて*Cars2*^{+/-}マウスで有意に増大を認めた。

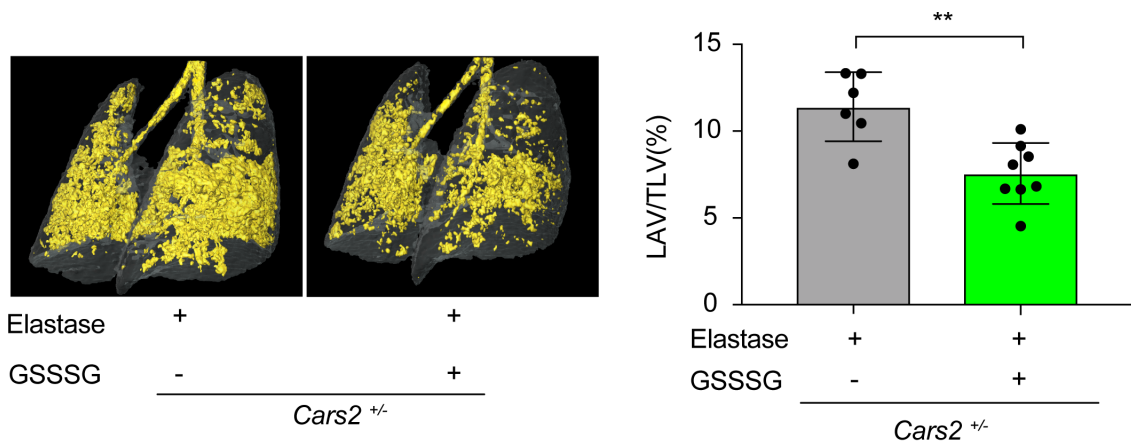


(2) *Cars2*^{+/-}マウスにおけるエラストラーゼ誘導肺気腫モデルマウスの生理学的評価
Cars2^{+/+}マウス及び*Cars2*^{+/-}マウスを用いて呼吸機能検査を行った。気流閉塞の評価としてフローボリュームカーブの評価およびFEV_{0.1}/FVCを測定した (図)。エラストラーゼ群のフ

ローボリュームカーブは PBS に比べて下に凸であり、*Cars2*^{+/-}マウスのエラスターゼ投与群では *Cars2*^{+/+}マウスのエラスターゼ投与群に比べてより強い気流閉塞が確認できた。定量するために FEV_{0.1}/FVC を算出したところ、*Cars2*^{+/-}マウスのエラスターゼ群では *Cars2*^{+/+}マウスのエラスターゼ群に比べて有意に低下していた。



(3) 活性硫黄供与体 GSSSG によるエラスターゼ誘導肺気腫形成抑制の検討
Cars2^{+/-}マウスを用いて実験を行った。エラスターゼ投与後の肺気腫の体積 (LAV/TLV) は、活性硫黄供与体 GSSSG を投与したマウスで有意に低値であった。



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tetsuro Matsunaga Hirohito Sano Katsuya Takita Masanobu Morita, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Supersulphides provide airway protection in viral and chronic lung diseases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 4476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-40182-4	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 該当する

〔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
---------	---------