

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16114

研究課題名(和文) 動脈硬化マウスを用いたCOPDモデルの作成とCOPDの新規治療戦略の確立に向けて

研究課題名(英文) Toward the creation of a model of chronic obstructive pulmonary disease using mice with atherosclerosis and the establishment of novel therapeutic strategies

研究代表者

安井 秀樹 (YASUI, Hideki)

浜松医科大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：60804937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)において動脈硬化性疾患は重要な併存症であり、動脈硬化の存在がCOPDの病態形成に及ぼす影響、両者を結ぶ候補蛋白としてplasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)に着目して研究を行った。マウスにタバコ煙抽出液(CSE)を投与することにより血漿中PAI-1活性の上昇を伴うCOPDモデルを確立した。次にヒトの脂質異常症の特徴を再現した動脈硬化マウス(LDLr-/-/Apobec1-/-)を用いて、CSE投与によるCOPDモデルの実験を行い、野生型マウスと比較し、動脈硬化マウスでは、肺組織における肺気腫形成が促進することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDにおいて動脈硬化性疾患は、重要な併存症であり、動脈硬化の存在がCOPDの病態形成に及ぼす影響を解明すること、および両者を結ぶメカニズムを解明することは極めて重要な課題である。我々は、CSE投与により、血漿中のPAI-1活性上昇を伴うCOPDモデルを確立した。ヒトの脂質異常症を再現した動脈硬化マウスでCOPDモデルを作成した際に、野生型と比較しCOPDの肺組織の特徴である肺気腫形成が助長されることを確認し、動脈硬化の存在がCOPDの病態形成を促進する可能性を示した。高齢患者が多いCOPDでは、動脈硬化に着目したCOPDの新規治療戦略の開発は社会的意義が高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerotic disease is an important comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We focused on the influence of atherosclerosis on the pathogenesis of COPD and the potential role of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) as a link between the two. We established a model of COPD in which mice were treated with cigarette smoke extract, which was characterized by high plasma PAI-1 activity. Next, we established this model of COPD in a mouse model of atherosclerosis (LDLr-/-/Apobec1-/-) that reproduces the characteristics of human dyslipidemia. The arteriosclerotic mice showed more rapid development of emphysema in their lungs than wild-type mice.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、たばこ煙などの大気汚染物質を原因とした慢性呼吸器疾患であり、罹患率、死亡率ともに高い疾患である。近年 COPD は全身性疾患として捉えられており、ガイドラインでは、全身併存症の予防・診断・治療は COPD の管理目標の大きな柱の 1 つである (COPD 診断と治療のためのガイドライン第 5 版 2018)。中でも動脈硬化に起因する心血管疾患は COPD 患者に高率に合併し、生命予後に影響を及ぼす重大な併存症である。実際に、COPD 患者において心血管疾患を合併する頻度は、各種リスクファクターによる補正後も高値であり (Sin DD, Circulation 2003)、COPD 患者の死因のうち、27%が心血管系疾患であったと報告されている (Calverley PMA, N Engl J Med 2007)。近年 COPD は全身の血管内皮障害の肺合併症と捉えられており (Polverino F, Pulm Circ 2018)、COPD と動脈硬化に起因する心血管疾患との関係性の重要性は注目度を増している。

上記のように COPD 患者において心血管疾患は重大な併存症であるが、COPD と動脈硬化に起因する心血管疾患との関連は不明点が多い (Figure 1)。両者をつなぐメカニズムの解明には病態を忠実に再現したモデルマウスの確立が必須であり、動脈硬化モデルマウスを使用した COPD モデルの作成が急務である。ヒトの脂質異常症を再現した動脈硬化モデルマウスの作成はこれまで困難であったが、近年遺伝子工学の飛躍的な発展に伴い、LDL 受容体 (LDLr) とともに Apobec1 という肝臓においてアポ B のメッセンジャー RNA にストップコドンを導入する酵素を同時に欠損させることにより、血中 LDL 上昇を特徴としたヒトの脂質異常症を再現した動脈硬化モデルマウス ($LDLr^{-/-}/Apobec1^{-/-}$ マウス) が開発された (Iwaki T, Blood 2006)。

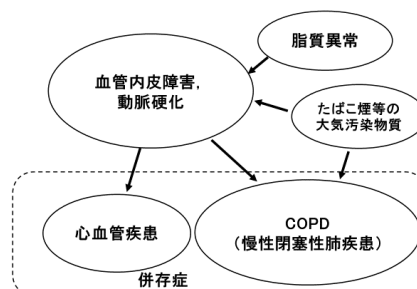


Figure 1. 動脈硬化、心血管疾患とCOPDとの関連 (仮説)

動脈硬化と COPD をつなぐ候補物質として線溶系の主要な抑制因子である plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) が挙げられる。PAI-1 は脂質異常症、インスリン抵抗性といった COPD に比較的多くみられる併存症との関連性が証明されており、動脈硬化とも密接に関わる物質である (Ha H, Nat Rev Nephrol 2009)。申請者は先行研究において、PAI-1 を直接阻害することにより、血管内皮細胞上での線溶活性を増強し、内皮細胞上のフィブリン網を効率的に溶解することを証明し、PAI-1 を阻害することで心血管疾患の原因の 1 つである血栓形成を抑制できる可能性を報告した (Thromb Res 2013)。また老化マウス ($Klotho$ マウス) において PAI-1 を阻害することにより動脈硬化と肺気腫形成を同時に抑制したことが報告され (Eren M, Proc Natl Acad Sci U S A, 2014)、PAI-1 は動脈硬化だけでなく COPD の病態形成にも強く関与していることが示唆されている。実際に、COPD 患者では血中ならびに喀痰中の PAI-1 濃度は高値であり、PAI-1 は COPD 患者での呼吸機能の低下や全身性炎症と強く関与することが報告されている (Wang H, Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2016)。これらの結果より、PAI-1 は COPD と動脈硬化をつなぐ重要な物質と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、野生型マウスと血中 LDL 上昇を特徴としたヒトの脂質異常症を再現した動脈硬化モデルマウス ($LDLr^{-/-}/Apobec1^{-/-}$ マウス) を用いて COPD モデルを作成し、動脈硬化が COPD の病態形成の増悪因子となりうるか検討する。さらには、両者をつなぐメカニズムとして、動脈硬化と肺や気道の線維化にも強く関与する線溶系の主要な抑制因子である plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) に着目し、研究を進めていく。

3. 研究の方法

(1) COPD モデルマウスの作成

野生型と動脈硬化マウス ($Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}$) に対して、静脈麻酔下でマウスに週 1 回 3 週連続でタバコ煙抽出液 (CSE) の投与 (腹腔内、または気管内投与) を行う。モデル作成後に静脈麻酔下にプレチスモグラフ (Buxco Fine Point) を用いた呼吸機能検査を実施し、その後血液、気管支肺胞洗浄液及び組織 (肺、心臓、腎臓及び大動脈) を採取する。採取した肺組織は、HE 染色を行い顕微鏡下に気腫の程度、気道病変等の肺の形態学的な評価を行う。

(2) 気管支肺胞洗浄液の評価

気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数や細胞分画を検討する。

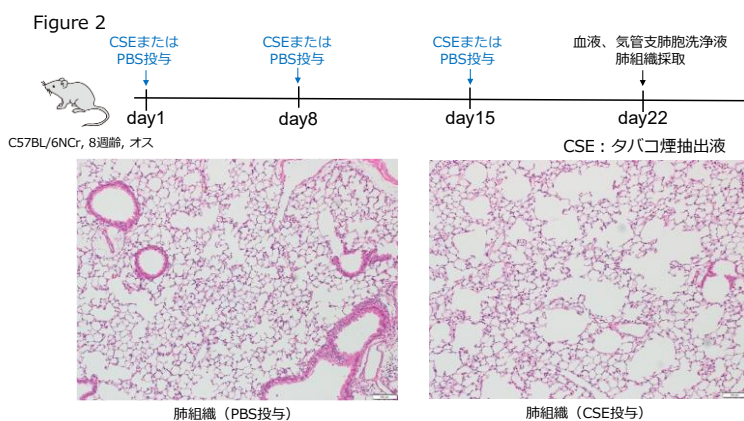
(3) 血漿中 PAI 活性の評価

マウスより採取したクエン酸ナトリウム血漿を用いて、血漿中の PAI-1 活性を ELISA キットにて測定する。COPD モデルにおいて PAI-1 活性が上昇しているか評価し、野生型と動脈硬化マウスで COPD モデルを作成した際に、血漿中の PAI-1 活性の違いがあるか比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) COPD モデルマウスの作成

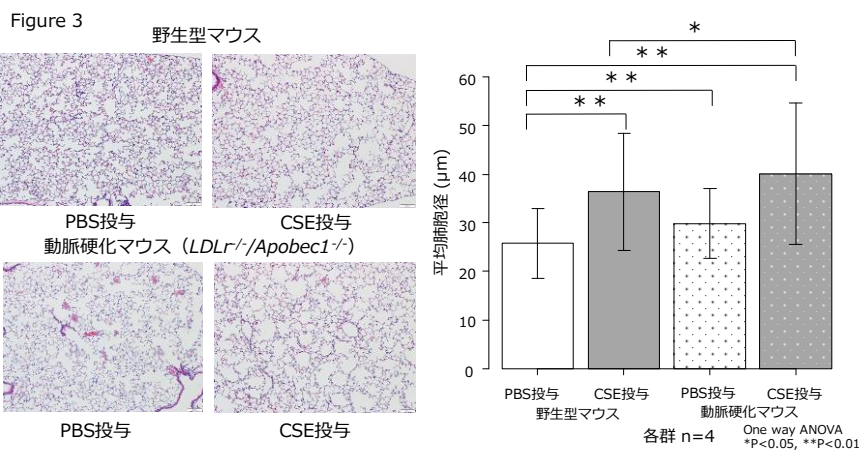
マウスに週1回3週連続でCSEを投与することで、肺組織において、気腫形成（組織上の平均肺胞径の拡大）が確認された（Figure2）。また、プレチスモグラフを用いた呼吸機能検査において、気道抵抗の上昇と動肺コンプライアンスの低下が確認され、本モデルは病理学的にも生理学的にも COPD モデルに合致するものであると判断した。動脈硬化マウス



ス (*Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}*) を用いて COPD モデルを作成した際には、野生型マウスと比較し、平均肺胞径が拡大しており、肺気腫形成が促進されることが確認された（Figure3）。

(2) 気管支肺胞洗浄液の解析

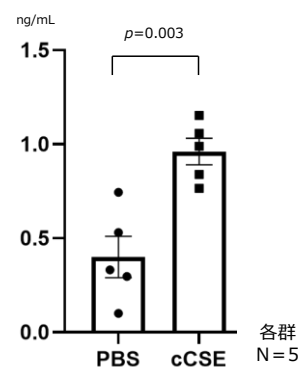
(1) で作成した COPD モデルにおいて、気管支肺胞洗浄液の評価を行った。PBS 投与と比較し、CSE を投与した COPD モデルでは細胞数の有意な増加が確認され ($9.3 \times 10^4/\text{mL}$ vs $21.1 \times 10^4/\text{mL}$, $p < 0.001$)、細胞分画としてはマクロファージ、好中球、リンパ球の有意な増加が確認された。



(3) 血漿中の PAI-1 活性の評価

(1) で作成した COPD モデルにおいて、マウスより採取した血漿を用いて ELISA キットにて PAI-1 活性を測定した。PBS と比較し、CSE 投与では PAI-1 活性は有意に上昇しており（Figure4）、本モデルでは COPD の病態形成とともに全身性の PAI-1 活性の上昇が確認され、PAI-1 が COPD の病態形成に関与している可能性が示唆された。現在動脈硬化マウスでの血漿中 PAI-1 活性の評価を行っているところである。今後は、PAI-1 を薬理的に阻害した際に、COPD の病態形成を抑制できるか検討し、PAI-1 を治療標的とした COPD の新規治療戦略の確立を目指していく予定である。

Figure 4 血漿中 PAI-1 活性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nihashi F, Furuhashi K, Horiguchi R, Kitahara Y, Inoue Y, Yasui H, Karayama M, Suzuki Y, Hozumi H, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T.	4. 巻 S1323
2. 論文標題 CLEC10A expression defines functionally distinct subsets of conventional type 2 dendritic cells (cDC2) in the mouse lung	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Allergol Int .	6. 最初と最後の頁 8930(24)00012-1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2024.01.011.	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 Sakurai S, Furuhashi K, Horiguchi R, Nihashi F, Yasui H, Karayama M, Suzuki Y, Hozumi H, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T.	4. 巻 70(3)
2. 論文標題 Conventional type 2 lung dendritic cells are potent inducers of follicular helper T cells in the asthmatic lung	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergol Int .	6. 最初と最後の頁 351-359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2021.01.008.	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 Murakami Y, Yasui H, Sato J, Uto T, Inui N, Suda T, Imokawa S.	4. 巻 17
2. 論文標題 Predictors of poor clinical outcomes including in-hospital death and low ability to perform activities of daily living at discharge in hospitalized patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ther Adv Respir Dis.	6. 最初と最後の頁 5.34666E+14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/17534666231172924.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安井秀樹
2. 発表標題 COPD患者における動脈硬化指標のバイオマーカーとしての検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 安井秀樹
2. 発表標題 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の疾患進行に及ぼす動脈硬化の影響
3. 学会等名 日本血栓止血学会
4. 発表年 2024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