

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16133

研究課題名（和文）COPDにおける鉄代謝に着目した新たな治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new therapeutic approach focusing on iron metabolism in COPD

研究代表者

佐藤 正道（Sato, Masamichi）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90613050

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）：鉄欠乏状態は喫煙による肺組織の炎症を増強し、慢性閉塞性肺疾患の主病態である呼吸機能や肺気腫を増悪させるという背景を基に、鉄代謝に関わるヘム蛋白合成経路に着目した。ヘム蛋白合成経路のアミノレブリン酸合成酵素（Aminolevulinic acid synthase; ALAS）遺伝子改変マウスを用いて喫煙曝露を行ったところ、肺気腫の程度は対照群と差異がなかった。肺胞上皮細胞株をALAS-1阻害薬により処理した後にJC-1染色を行ったところ、ミトコンドリア膜電位が上昇し、ミトコンドリア内のヘム合成阻害が起こっていることが示されたが、タバコ抽出液によるアポトーシスの程度には差異が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々のこれまでの研究では、鉄欠乏状態が肺内の炎症に関わっていることを示してきたが、貧血はそのリスクとはなっていないことから、本研究では、鉄欠乏が貧血とは別のメカニズムで肺の炎症と関連している可能性を検討した。結果ヘム蛋白合成経路は喫煙刺激による肺細胞のアポトーシスや肺組織の破壊による肺気腫の形成に関与していない可能性が示唆された。本研究結果よりヘム蛋白の代謝系ではなく、純粹に鉄欠乏状態が喫煙刺激による肺組織の炎症や破壊に関連していることが推察された。慢性閉塞性肺疾患の全身併存症の一つに挙げられる貧血は本疾患の病態の理解、疾患管理に重要な役割を持つことが再認識された。

研究成果の概要（英文）：Based on the background that iron deficiency enhanced smoking-induced inflammation in lung tissue and exacerbated pulmonary function and emphysema, the main pathology of chronic obstructive pulmonary disease, we focused on the heme protein synthesis pathway involved in iron metabolism.

Mice heterozygous null for aminolevulinic acid synthase (ALAS)-1 (A1+/-s), a heme protein synthesis pathway enzyme, were exposed to smoking. After 6 month with smoking exposure, the degree of emphysema was not different from that in the control group. JC-1 staining of alveolar epithelial cell lines after treatment with an ALAS-1 inhibitor showed an increase in mitochondrial membrane potential, indicating inhibition of heme synthesis in mitochondria, but no difference in the degree of apoptosis induced by tobacco extract.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 鉄代謝 アミノレブリン酸合成酵素 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、日本における患者数が 500 万人を超えるとされている。2017 年の日本人男性死因の第 7 位で、2016 年の世界全体での死因の第 3 位となっている。(厚生労働省. 人口動態調査、WHO. Global Health Observatory data)。COPD に対する根本的な治療法は存在せず、新たな疾患進行のための治療法確立は急務の課題である。COPD 発症の原因は殆どが喫煙曝露によるが、喫煙者の 15~20%が発症をするのみである。個体における何らかの喫煙感受性があると推定されているが詳細は不明である。

我々は地域一般住民を対象にした疫学研究で健診結果から、安定期の男性喫煙者において血清鉄の低下群で呼吸機能が急速に悪化することを示した(PLoS One 2013; 8: e74020.)。本結果を基に動物実験を行い、鉄欠乏食を与えたマウスに喫煙曝露すると、通常食群と比較して肺組織における炎症反応が強力に誘導され、2ヶ月という短期間(通常は6ヶ月必要)で肺気腫(COPDの組織学的病態)が高度に誘導されることを示した。しかしこれまでに細胞内の鉄動態が喫煙曝露による炎症をどのように誘導するのかという詳細な機序は明らかではなかった。

体内で鉄は、70%がヘモグロビン鉄として利用されているが、他にも、電子伝達系のシトクロム、薬物代謝酵素 P450、一酸化窒素合成酵素、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどのヘムタンパク質の補欠分子族として生体に重要な役割を果たす。前述のコホート研究では、貧血は COPD の増悪因子ではなかったため、血清鉄の低値が、貧血を介して COPD を増悪させる可能性は低く、他のヘムタンパク質の合成低下を引き起こして、COPD を増悪させている可能性が考えられた。ヘム蛋白の合成経路では、まず、グリシンとスクシニル CoA が Aminolevulinic acid synthase (ALAS) で縮合して、 δ -アミノレブリン酸となる。その後、数段階をへて、プロトポルフィリンとなり、鉄イオンを配位することで、ヘム蛋白となる。この経路において、ALAS は律速酵素である。ALAS には、全身の細胞内で非特異的に発現する ALAS-1、血球細胞でヘモグロビン合成に寄与する ALAS-2 の 2 つのアイソザイムが存在し、蛋白、鉄により負のフィードバックを受けている(JACC 2013;61:1884-1893)。当施設の中島らは ALAS-1 の heterozygous null; A1(+/-) (※ homozygous null は胎生致死)マウスを確立した (PLoS ONE 2018;13:e0189593.)。ALAS-1 の代謝は赤血球中のヘム蛋白に影響を及ぼさないため、ヘモグロビンの生合成に影響せずに、他のヘム蛋白の合成低下を起こすことが期待された。

2. 研究の目的

我々は「細胞内ヘム蛋白合成低下が、喫煙曝露への炎症応答を増悪させるのか、COPD の増悪因子となるのか」という学術的「問い」に対して、このマウスを用いた研究を計画した。本研究は、COPD 発症や疾患進行における細胞内ヘム蛋白合成低下の役割を検証することで、COPD の発症機序を解明すること、そして疾患進行抑制の観点から鉄代謝に着目した新たな治療法を確立することを目標とした。

細胞内ヘム蛋白代謝に着目し、COPD の病態に鉄がどのように関わっているかということを検証することは、過去に報告がない。そして COPD の安定期薬物療法としては、長時間作用性抗コリン薬 (LAMA) や、長時間作用性 β 2 刺激薬が主流であるがこれらによって COPD を治癒させることは不可能である。しかし、本研究によって、『細胞内ヘム蛋白代謝の異常が喫煙曝露への炎症応答を増悪させる』ことが COPD の進行における新たなメカニズムの一つであることが明らかになれば、新規の治療法を確立させる可能性がある、意義深い研究であると考えられた。

3. 研究の方法

1. 肺におけるヘム蛋白合成低下と喫煙曝露への炎症応答の関係

ヘム減少が II 型肺胞上皮細胞のバイアビリティーに影響があるかを検証するため、ヘム蛋白合成経路の第 2 反応触媒酵素(Porphobilinogen synthase)の不可逆的阻害剤である Succinylacetone (SA)を用いてヘム蛋白合成を阻害し、タバコ抽出液(CSE)を添加する。ALAS-1 は既報では気道上皮およびマクロファージに発現しているため、ALAS-1 阻害薬である SA で前処置した II 型肺胞上皮細胞株培地上清にタバコ抽出液を添加してアポトーシスを誘導する。併行して、サクシニルアセトンおよび喫煙曝露による細胞中のヘム濃度を評価する。

2. ヘム蛋白合成低下と肺気腫形成との関連性の検討

ALAS-1 遺伝子改変マウスおよび対照マウスに対し、喫煙負荷装置(MIPS 社)を用いて、2本/日×6か月間(週5日間)にわたり全身曝露喫煙負荷をかける。曝露終了後マウス肺を摘出し、ホルマリン固定の後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色により組織所見を観察する。平均肺胞間距離 (Mean linear intercept; MLI) を測定し肺気腫の程度を定量化する。

3. ミトコンドリア膜電位の検出

肺胞上皮細胞株、気道上皮細胞株へ ALAS-1 阻害薬を投与し、JC-1 染色を行うことでミトコ

ンドリア膜電位の変化を検証する。ALAS-1 の発現の相違によって、貧血や鉄欠乏状態にはなっていないが、細胞内のヘム代謝に変動を来しているかを検証する。

4. ヘム蛋白発現亢進による生体反応の検証

マウスに対しヘム蛋白の前駆物質であるアミノレブリン酸を投与することで、マウスに強制的にヘム蛋白発現を亢進させる。その結果として生体に起こる変化を観察する。

4. 研究成果

ヘム減少がII型肺胞上皮細胞のバイアビリティーに影響があるかを検証するため、ALAS-1 阻害薬である Succinylacetone (SA) で前処置したII型肺胞上皮細胞株培地上清にタバコ抽出液を添加してアポトーシスアッセイ (Annexin Vおよび PI 染色後のフローサイトメトリー法により検出) を行った。結果、タバコ抽出液投与によりアポトーシス細胞は増加することが分かったが、ヘム合成阻害によるアポトーシスの増加は認められなかった。同実験において、培地に添加されているウシ胎児血清中のヘムタンパクが細胞に供給されている可能性を考慮し、半透膜を用いて、血清を透析した後に同様の実験を行ったが、結果は同様であった (図1)。

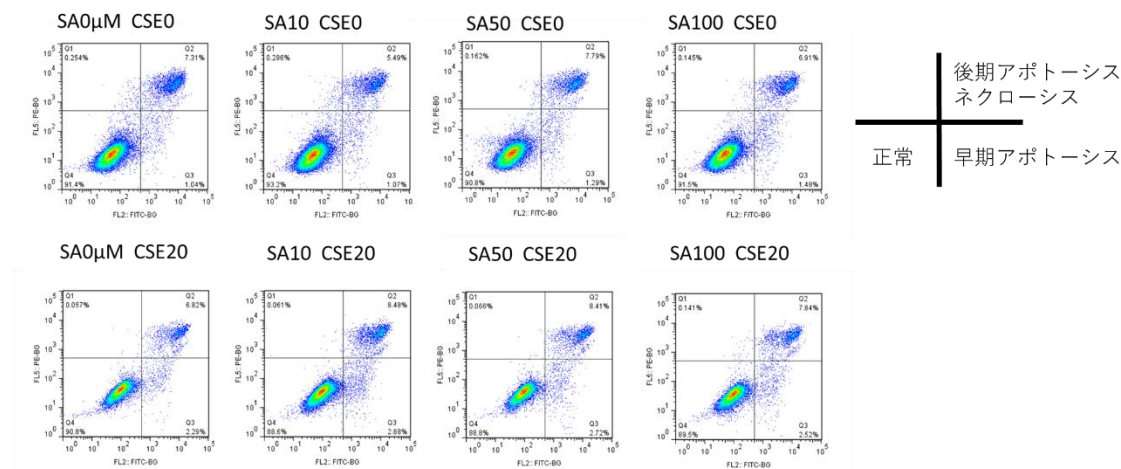


図1 フローサイトメトリーの結果、喫煙曝露によるアポトーシスの増加を認めるが、ヘム合成阻害による変化は認めなかった。

また培養細胞を SA で前処置し、タバコ抽出液で刺激した際の細胞中ヘム濃度を測定したが、対照群と比較してヘム濃度に差異を認めなかった (図2)。

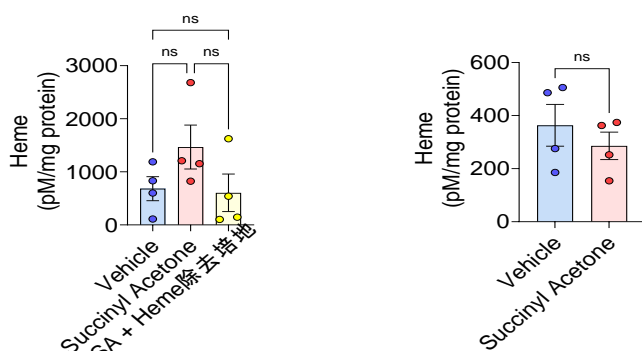


図2 左: A549細胞、右: BEADS2B細胞。ヘム合成阻害薬である SA を添加してヘム濃度を測定したが、ヘム合成の阻害を認めなかった。

ヘム合成蛋白 (Aminolevulinic acid synthase (ALAS) -1) ヘテロノックアウトマウス (BDF1 マウス) に対して全身喫煙暴露装置 (M.I.P.S 社) を用いて 10 本×5 日/週の喫煙曝露を 24 週間施行し、喫煙曝露誘導肺気腫モデルを作成した。摘出肺標本をヘマトキシリン&エオジン染色し観察したところ、肺気腫の程度の指標である平均肺胞間距離については対照マウスと比較して有意差を認めなかった (図3)。

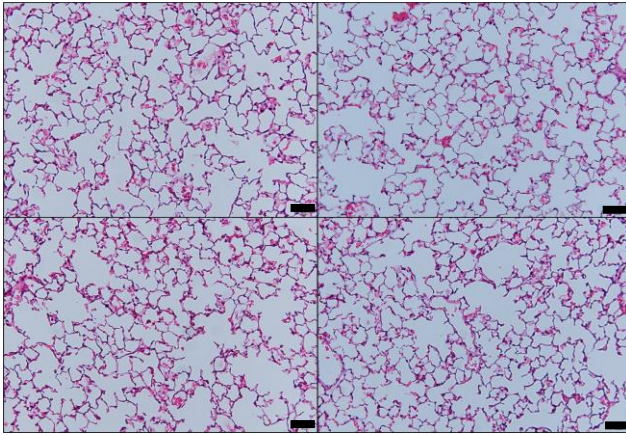


図3 上段左：コントロールマウス、室内気曝露、上段右：ALAS-1 ヘテロノックアウトマウス、室内気曝露、下段左：コントロールマウス、6 か月間喫煙曝露、下段右：ALAS-1 ヘテロノックアウトマウス、6 か月間喫煙曝露。両群で喫煙曝露による肺気腫の程度は軽度で、差異を認めなかった。

ALAS-1 の発現の相違によって、貧血や鉄欠乏状態にはなっていないが、細胞内のヘム代謝に変動を来しているかを検証した。培養細胞系を用いて、細胞内ヘム濃度の変化により細胞内ミトコンドリア膜電位の変動が生じることで細胞内ヘム蛋白の変動を間接的に証明した。肺胞上皮細胞株、気道上皮細胞株へ ALAS-1 阻害薬を投与し、JC-1 染色を行うことでミトコンドリア膜電位の変化を検証した。その結果ミトコンドリア膜電位がコントロール群に比べて上昇しており、ミトコンドリア内のヘム合成阻害が誘導されていることが示唆された (図4)。

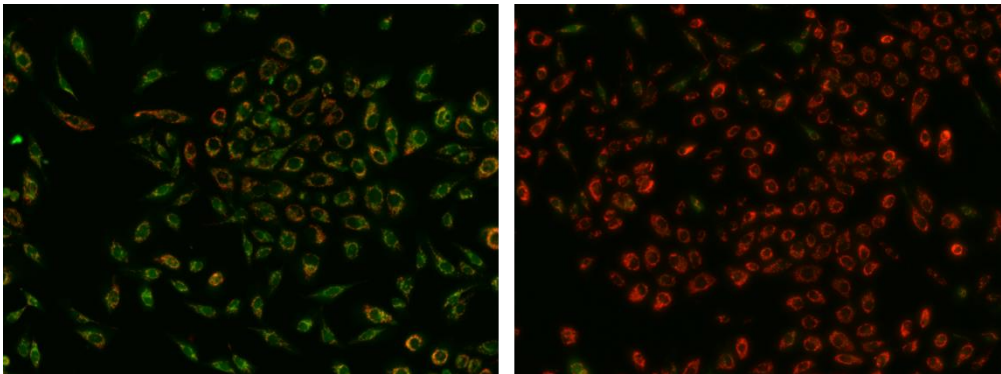


図4 BEADS2B 細胞を SA で 24 時間刺激後、JC-1 染色を行った。左：コントロール、右：SA 添加。SA の添加によりミトコンドリアの膜電位増強が観察された。

マウスに対しヘム蛋白の前駆物質であるアミノレブリン酸を投与し、マウスに強制的にヘム蛋白発現を亢進させる。肺組織中の肺組織中の Heme Oxygenase 1 (HO-1) やミトコンドリア分裂を促進する GTP 結合タンパク質 Dynamin-related protein 1 (Drp1) はタンパクレベルで増加していることが明らかにされた (図5)。

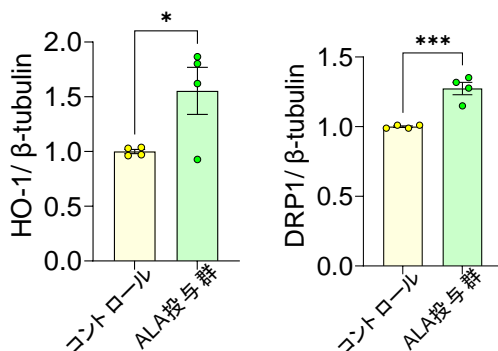


図5 マウスへアミノレブリン酸を投与し、肺組織中の蛋白を定量化した。左：Heme Oxygenase

1 (HO-1)、右 : Dynamin-related protein 1 (Drp1)。いずれもアミノレブリン酸投与により有意な増加を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurotani R, Ono S, Miyano Y, Nakayama S, Liu H, Aibara D, Sakahara S, Sato M, Sato K, Inoue S, Shibata Y, Lee MP, Abe H, Kimura S.	4. 巻 157
2. 論文標題 Secretoglobin 3A2 suppresses cigarette smoke-induced pulmonary emphysema.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Int J Biochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 106390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biocel.2023.106390.	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 Nakano H, Inoue S, Minegishi Y, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Machida H, Yang S, Murano H, Watanabe M, and Shibata Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hyperhomocysteinemia on a murine model of smoke-induced pulmonary emphysema.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16767-2.	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 -
1. 著者名 Machida H, Inoue S, Igarashi A, Saitoh S, Yamauchi K, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Nakano H, Yang S, Furuyama K, Murano H, Ishibashi Y, Ota T, Nakayama T, Shibata Y, Watanabe M.	4. 巻 66
2. 論文標題 Role of CC Chemokine Ligand 17 in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 428-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2021-00690C.	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 Machida H, Inoue S, Igarashi A, Saitoh S, Yamauchi K, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Nakano H, Yang S, Furuyama K, Murano H, Ishibashi Y, Ota T, Nakayama T, Shibata Y, Watanabe M.	4. 巻 66
2. 論文標題 Role of CC Chemokine Ligand 17 in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 428-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2021-00690C.	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 Machida H, Inoue S, Shibata Y, Kimura T, Ota T, Ishibashi Y, Murano H, Furuyama K, Yang S, Nakano H, Sato K, Sato M, Nemoto T, Nishiwaki M, Yamauchi K, Igarashi A, Watanabe M.	4. 巻 16
2. 論文標題 The Incidence and Risk Analysis of Lung Cancer Development in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Possible Effectiveness of Annual CT-Screening.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.	6. 最初と最後の頁 739-749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/COPD.S287492.	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 -

1. 著者名 Sato K, Inoue S, Ishibashi Y, Ota T, Murano H, Furuyama K, Yang S, Machida H, Nakano H, Sato M, Nemoto T, Nishiwaki M, Yamauchi K, Igarashi A, Watanabe M.	4. 巻 59
2. 論文標題 Association between low mean corpuscular hemoglobin and prognosis in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respir Investig.	6. 最初と最後の頁 498-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2021.01.006.	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮崎収, 佐藤正道, 花輪翁有, 石橋悠, 邨野浩義, 峯岸幸博, 佐藤建人, 根本貴子, 西脇道子, 山内啓子, 五十嵐朗, 井上純人, 渡辺昌文
2. 発表標題 血清CCL17/TARCが肺癌薬物治療後の薬剤性肺障害発症の予測因子となりうるか? Can serum CCL17/TARC be a predictor of the development of drug-induced lung injury after drug treatment for lung cancer?
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花輪翁有, 五十嵐朗, 宮崎収, 石橋悠, 邨野浩義, 峯岸幸博, 佐藤建人, 佐藤正道, 根本貴子, 西脇道子, 山内啓子, 井上純人, 渡辺昌文
2. 発表標題 気管支鏡検査の硫酸アトロピンによる前処置と心拍数, 血圧の関連 Relationship between pretreatment of bronchoscopy with atropine sulfate and heart rate and blood pressure
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 町田浩祥, 太田隆仁, 石橋 悠, 邨野浩義, 古山広大, 梁 秀鼎, 中野寛之, 佐藤建人, 根本貴子, 西脇道子, 山内啓子, 佐藤正道, 五十嵐朗, 井上純人, 渡辺昌文
2. 発表標題 Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) KOマウスを用いたCOPDの病態についての検討 Examination of the pathophysiology of COPD using Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) KO mouse
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 邨野浩義, 町田浩祥, 中野寛之, 佐藤建人, 佐藤正道, 五十嵐朗, 井上純人, 柴田陽光
2. 発表標題 肺気腫形成にホモシステインが及ぼす影響の検討 Effects of homocysteine on emphysema formation.
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021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
---------	---------