

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591126

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患におけるオキシステロールの役割の解明

研究課題名(英文)Role of oxysterols on pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

杉浦 久敏(SUGIURA, HISATOSHI)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：20445092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease: COPD)の肺および気道では酸化型コレステロールであるオキシステロールが過剰に産生されており、呼吸機能と相関することからCOPDの病態に関連することを本研究で明らかにした。肺において過剰に産生されたオキシステロールの生物活性は不明であったが、気道の線維化や好中球性炎症、ウイルス感染時の気道炎症の増幅など、COPDの病態に深く関連する生物活性を有することを解明した。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that much oxysterols are produced in the lungs and airways of the patients with COPD and the levels are correlated with their pulmonary function in the current study. We have also shown that oxysterols have potent profibrotic effects of lung tissues, neutrophilic inflammation, and amplification of Toll-like receptor signaling which are pivotal roles on the pathogenesis of COPD. These findings suggest that oxysterols could be involved in the development and/or progression of COPD.

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：オキシステロール 慢性閉塞性肺疾患 肺線維芽細胞 組織変化 炎症性メディエーター 酸化ストレス 活性酸素種

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease: COPD)の有病率及び死亡率は、増加の一途を辿っており、COPDの病態解明および治療法の開発は急務である。COPDの病態に関連するメディエーターの詳細は不明である。COPDの病態を解明し、新規治療薬の創薬という観点から新たなCOPD病態関連メディエーターの探索は極めて重要と考えられる。

### 2. 研究の目的

COPDの新規の病態関連分子として酸化型コレステロール(オキシステロール)の産生について患者肺、気道検体で検討し、呼吸機能との関連を検討する。また、オキシステロールの生物活性について明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) COPDと健常人におけるオキシステロール産生酵素の発現程度と部位および呼吸機能の関連を明らかにする。ヒト手術肺より得た肺組織を用いて免疫組織学的検討を行う。
- (2) COPDと健常人におけるオキシステロールの産生程度と呼吸機能の関連を明らかにする。対象者に誘発喀痰を施行し、喀痰上清中のオキシステロールの濃度をHPLCを用いて定量する。
- (3) 肺構築細胞におけるオキシステロールの生物活性を明らかにする。肺線維芽細胞や気道上皮細胞を用いて、外因性にオキシステロールを投与した際の線維化能やサイトカイン・ケモカインの産生について定量し、その細胞内シグナリングを明らかにする。
- (4) 酸化/窒素化ストレスとオキシステロールとの相互作用を明らかにする。酸化ストレスおよび窒素化ストレス下におけるオキシステロールの作用について(3)のモデルを用いて検討する。さらに(3)で示した細胞内シグナリングに活性酸素種・活性窒素種が関係するかどうかを明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) COPDと健常人におけるオキシステロール産生酵素の発現程度と部位および呼吸機能の関連

COPD患者では、健常人と比較してオキシステロールの一種である25-hydroxycholesterol(25-OHC)の産生酵素のcholesterol 25-hydroxylaseの産生が主として肺胞マクロファージおよび肺胞上皮細胞に強く発現していた(図1)。その発現量は呼吸機能とも有意な相関を示した(H. Sugiura et al. Respiriology 2012)。さらにオキシステロールの一種である27-hydroxycholesterol(27-OHC)の産生酵素のsterol 27-hydroxylaseの発現が主として肺胞マクロファージにおいて増強している

ことを、患者肺および喀痰上清において確認した(図2)(T. Kikuchi, H. Sugiura et al. Chest 2013)。

図1

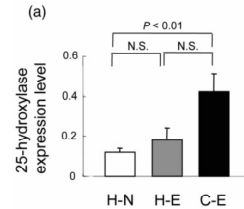
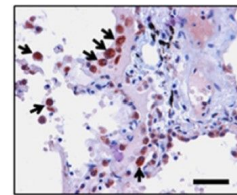


図2



- (2) COPDと健常人におけるオキシステロールの産生程度と呼吸機能の関連

COPD患者の喀痰上清中では健常人に比較して20-30倍の25-OHCが存在し、COPDにおける気流閉塞の程度や好中球性炎症の程度と有意に相関していた(図3)(H. Sugiura et al. Respiriology 2012)。また同様に、COPD患者の喀痰上清中では健常人に比較して30倍以上の27-OHCが存在し、COPDにおける気流閉塞の程度と強く相関した。27-OHCの産生量は25-OHCと比較して数10倍程度多量に産生されていた(図4)(T. Kikuchi, H. Sugiura et al. Chest 2013)。

図3

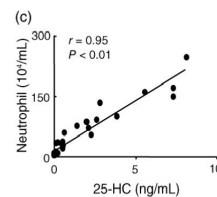
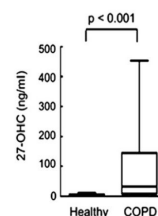


図4



- (3) 肺構築細胞におけるオキシステロールの生物活性

25-OHCをヒト肺線維芽細胞に投与すると線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進し、細胞外マトリクス蛋白の産生を増強した。これらの反応には、転写因子NF-κBを介してTransforming growth factor(TGF)を過剰産生される機序が関与していた(図5)(T. Ichikawa, H. Sugiura et al. Exp Cell Res

2013)。また 27-OHC は、25-OHC 同様に、ヒト肺線維芽細胞に投与すると線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進し、細胞外マトリクス蛋白の産生を増強した。これらの反応には、NF- $\kappa$ B TGF の経路が関与していた。さらに 27-OHC は 25-OHC に比較して約数 10 倍の組織線維化能を有していた(T. Kikuchi, H. Sugiura et al. Chest 2013)。さらに 25-OHC はウイルス感染のモデルとして用いた気道上皮細胞の Toll-like 受容体 3 の細胞内シグナリングを相加的に増幅し、IL-8 や IL-6 の産生を増加させたが(図 6)、この増幅機序には NF- $\kappa$ B の増強効果が関与していた。このことから 25-OHC の存在下ではウイルス感染による好中球性炎症が増幅される可能性が示唆された(A. Koarai, H. Sugiura et al. Respir Res 2012)。

図 5

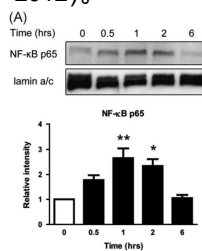
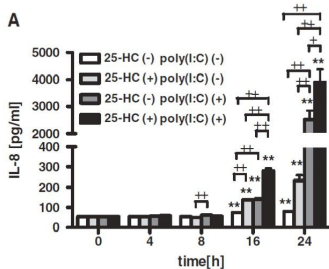


図 6



#### (4) 酸化/窒素化ストレスとオキシステロールとの相互作用

研究期間内に投稿することはできなかったが、27-OHC がヒト肺線維芽細胞の細胞老化に関与することを我々は確かめている。ヒト肺線維芽細胞の老化が惹起されると肺における創傷治癒能力が減弱し、気腫化の進展に寄与する可能性がある(S. Togo, H. Sugiura et al. Am J Respir Crit Care Med 2018)。これらの肺線維芽細胞の細胞老化は COPD 患者由来の肺組織で生じており、その細胞内シグナリングに活性窒素種が関与していることが我々の研究で明らかになっている(未発表データ)。今後は、さらにその細胞内シグナリングの解明を進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 31 件)

1. Ichikawa T, Sugiura H, Koarai A, Kikuchi T, Hiramoto M, Kawabata H, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. 25-Hydroxycholesterol Promotes Fibroblast-Mediated Tissue Remodeling Through NF- $\kappa$ B Dependent Pathway. *Exp Cell Res.* 2013;319:1176-1186. 査読有
2. Matsunaga K, Kawabata H, Hirano T, Sugiura H, Minakata Y, Ichinose M. Difference in time-course of improvement in asthma control measures between budesonide and budesonide/formoterol. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013; 26:189-194. 査読有
3. Ichikawa T, Sugiura H. A review of the long-term safety, efficacy and patient acceptability of the tulobuterol patch. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery.* 2013;2: 9-18. 査読有、<https://www.dovepress.com/research-and-reports-in-transdermal-drug-delivery-i820-j142>
4. Hirano T, Matsunaga K, Sugiura H, Minakata Y, Koarai A, Akamatsu K, Ichikawa T, Furukawa K, Ichinose M. Persistent elevation of exhaled nitric oxide and modification of corticosteroid therapy in asthma. *Respir Investig.* 2013;51: 84-91. 査読有
5. Hirano T, Matsunaga K, Sugiura H, Minakata Y, Koarai A, Akamatsu K, Ichikawa T, Furukawa K, Ichinose M. Relationship between alveolar nitric oxide concentration in exhaled air and small airway function in COPD. *J Breath Res.* 2013;7:046002. 査読有、10.1088/1752-7155/7/4/046002.
6. 杉浦久敏、一ノ瀬正和:【気管支喘息の研究 アップデート】気管支喘息のバイオマーカーをめぐって *アレルギー・免疫* 2013; 20: 972-982. 査読無
7. 赤松 啓一郎、松永 和人、杉浦久敏、小荒井 晃、平野 綱彦、南方 良章、一ノ瀬 正和: 気管支喘息と COPD の合併 気管支喘息と COPD 合併の診断 *呼吸* 2013; 32: 753-755. 査読無
8. 杉浦久敏:【変貌する肺の生活習慣病 COPD-早期診断で併存症にも好影響】疾患理解の変遷 炎症と COPD *Modern Physician* 2013; 33: 1335-1340. 査読無
9. 杉浦久敏、一ノ瀬正和:【活性酸素-基礎から病態解明・制御まで】疾患病態・

- 臨床編 慢性閉塞性肺疾患と酸化・ニトロ化ストレス *医学のあゆみ* 2013; 247: 863-869. 査読無
10. Sugiura H, Koarai A, Ichikawa T, Minakata Y, Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, Yanagisawa S, Furusawa M, Uno Y, Yamasaki M, Satomi Y, Ichinose M. Increased 25-hydroxycholesterol concentrations in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2012; 17:533-540. 査読有
  11. Sugiura H, Kawabata H, Ichikawa T, Koarai A, Yanagisawa S, Kikuchi T, Minakata Y, Matsunaga K, Nakanishi M, Hirano T, Akamatsu K, Furukawa K, Ichinose M. Inhibitory effects of theophylline on the peroxynitrite-augmented release of matrix metalloproteinases by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012; 302:L764-774. 査読有
  12. Matsunaga K, Yanagisawa S, Hirano T, Ichikawa T, Koarai A, Akamatsu K, Sugiura H, Minakata Y, Matsunaga K, Kawayama T, Ichinose M. Associated demographics of persistent exhaled nitric oxide elevation in treated asthmatics. *Clin Exp Allergy*. 2012; 42:775-781. 査読有
  13. Koarai A, Yanagisawa S, Sugiura H, Ichikawa T, Kikuchi T, Furukawa K, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. 25-hydroxycholesterol enhances cytokine release and toll-like receptor 3 response in airway epithelial cells. *Respir Res*. 2012 ;13:63. 査読有、doi: 10.1186/1465-9921-13-63
  14. Koarai A, Yanagisawa S, Sugiura H, Ichikawa T, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. Cigarette smoke augments the expression and responses of toll-like receptor 3 in human macrophages. *Respirology*. 2012; 17: 1018-1025. 査読有
  15. Kikuchi T, Sugiura H, Koarai A, Ichikawa T, Minakata Y, Matsunaga K, Nakanishi M, Hirano T, Akamatsu K, Yanagisawa S, Furukawa K, Kawabata H, Ichinose M. Increase of 27-hydroxycholesterol in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease: possible role of 27-hydroxycholesterol in tissue fibrosis. *Chest*. 2012; 142: 329-337. 査読有
  16. Kanda M, Minakata Y, Matsunaga K, Sugiura H, Hirano T, Koarai A, Akamatsu K, Ichikawa T, Ichinose M. Validation of the triaxial accelerometer for the evaluation of physical activity in Japanese patients with COPD. *Intern Med*. 2012; 51:369-75. 査読有
  17. 杉浦久敏:【呼吸器疾患バイオマーカーの新展開】COPD 呼吸 2012; 11: 1019-1027. 査読無
  18. 杉浦久敏, 一ノ瀬正和:【COPD:診断と治療の進歩】治療 抗コリン薬 *日本内科学会雑誌* 2012; 101: 1594-1600. 査読無
  19. 杉浦久敏:【最近 10 年間で最も進歩した研究分野を検証する】呼気分析 呼吸 2012; 9: 822-826. 査読無
  20. 杉浦久敏:【COPD 薬物療法の新展開】薬物の特徴と使用法 気管支拡張薬 *Medicinal* 2012; 2: 72-82. 査読無
  21. 杉浦久敏:【呼吸器病学 TOPICS 2012】閉塞性肺疾患 気管支喘息と COPD のバイオマーカー *分子呼吸器病* 2012; 16: 42-46. 査読無
  22. Sugiura H, Ichinose M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide*. 2011; 25:138-144. 査読有
  23. Sato T, Liu X, Basma H, Togo S, Sugiura H, Nelson A, Nakanishi M, Kanaji N, Wang X, Kim M, Li Y, Michalski J, Farid M, Sharp JG, Rennard SI. IL-4 induces differentiation of human embryonic stem cells into fibrogenic fibroblast-like cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127:1595-1603. 査読有
  24. Togo S, Sato T, Sugiura H, Wang X, Basma H, Nelson A, Liu X, Barger TW, Sharp JP, Rennard SI. Differentiation of embryonic stem cells into fibroblast-like cells in three-dimensional type I collagen gel cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011; 47:114-124. 査読有
  25. Furukawa K, Sugiura H, Matsunaga K, Ichikawa T, Koarai A, Hirano T, Yanagisawa S, Minakata Y, Akamatsu K, Kanda M, Nishigai M, Ichinose M. Increase of nitrosative stress in patients with eosinophilic pneumonia. *Respir Res*. 2011;12:81. 査読有、doi: 10.1186/1465-9921-12-81.
  26. Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, Koarai A, Sugiura H, Minakata Y,

- Ichinose M. Exhaled Nitric Oxide Cutoff Values for Asthma Diagnosis According to Rhinitis and Smoking Status in Japanese Subjects. *Allergol Int.* 2011; 60:331-337. 査読有
27. Akamatsu K, Matsunaga K, **Sugiura H**, Koarai A, Hirano T, Minakata Y, Ichinose M. Improvement of Airflow Limitation by Fluticasone Propionate/Salmeterol in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: What is the Specific Marker? *Front Pharmacol.* 2011; 2:36. 査読有、doi: 10.3389/fphar.2011.00036.
28. Sugino A, Minakata Y, Kanda M, Akamatsu K, Koarai A, Hirano T, **Sugiura H**, Matsunaga K, Ichinose M. Validation of a Compact Motion Sensor for the Measurement of Physical Activity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiration.* 2011; 83:300-307. 査読有
29. 平野綱彦、**杉浦久敏**: 気管支喘息のバイオマーカー *救急医学* 2011; 35: 572-575. 査読無
30. **杉浦久敏**: 線維芽細胞分化と呼吸器疾患 *呼吸* 2011; 30: 684-691. 査読無
31. **杉浦久敏**: COPD の自然歴をめぐって 海外で行われた多施設共同研究の成果から *呼吸* 2011; 30: 827-828. 査読無

〔学会発表〕(計 13 件)

1. **杉浦久敏**. 閉塞性肺疾患の多様性とフェノタイプ バイオマーカー 第 53 回日本呼吸器学会総会(シンポジウム), 東京, 2013 年 4 月 20 日
2. **H. Sugiura**, H. Kawabata, et al. Theophylline inhibits peroxynitrite-augmented release of matrix metalloproteinases by lung fibroblasts. 107<sup>th</sup> American Thoracic Society International Conference, San Francisco, USA. 2012.5.21
3. **杉浦久敏**. 高齢者喘息と COPD の類似点・相違点 疫学(ワークショップ) 第 24 回日本アレルギー学会総会春季臨床大会, 大阪, 2012 年 5 月 13 日
4. **杉浦久敏**, 川端宏樹, 市川朋宏, 小荒井晃, 菊池崇史, 南方良章, 松永和人, 中西正典, 平野綱彦, 赤松啓一郎, 一ノ瀬正和. Theophylline による matrix metalloproteinase(MMP)の抑制作用について(一般演題) 第 52 回日本呼吸器学会総会, 神戸, 2012 年 4 月 21 日
5. **杉浦久敏**. 加齢と呼吸器疾患、機能と構造から 加齢と COPD・喘息 Overlapping 症候群(シンポジウム) 第 52 回日本呼吸器学

- 会総会, 神戸, 2012 年 4 月 20 日
6. **杉浦久敏**, 市川朋宏, 小荒井晃, 一ノ瀬正和. 活性窒素種によるリモデリングに対するテオフィリンの効果について(一般演題) 第 61 回日本アレルギー学会総会秋季学術大会, 東京, 2011 年 11 月 10 日
7. **杉浦久敏**. 喘息コントロールの向上のための課題と対策 気道炎症をどうモニタリングするか(シンポジウム) 第 61 回日本アレルギー学会総会秋季学術大会, 東京, 2011 年 11 月 10 日
8. **H. Sugiura**, A. Koarai, M. Ichinose. Nitrate stress in refractory asthma. 2011 AAAS and AP Airway Disease Summit, Taipei, Taiwan. 2011.10.15
9. **H. Sugiura**, A. Koarai, et al. Possible role of 25-hydroxycholesterol in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. 2011 The 22<sup>th</sup> European Respiratory Society Annual Congress, Amsterdam, Netherlands. 2011.9.26
10. **H. Sugiura**, A. Koarai, et al. Increase of 25-hydroxycholesterol in the lungs of chronic obstructive pulmonary disease. 106<sup>th</sup> American Thoracic Society International Conference, Denver, USA. 2011.5.16
11. **杉浦久敏**, 市川朋宏, 小荒井晃, 一ノ瀬正和. COPD 患者における 25-OH cholesterol の産生について(一般演題) 第 51 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2011 年 4 月 23 日
12. **杉浦久敏**. 難治性喘息の病態 バイオマーカー(シンポジウム) 第 51 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2011 年 4 月 22 日
13. **杉浦久敏**, 一ノ瀬正和. 慢性閉塞性肺疾患における窒素化ストレスの役割の研究(シンポジウム) 第 1 回分子水素状シンポジウム, 名古屋, 2011 年 2 月 18 日

〔図書〕(計 1 件)

1. **H. Sugiura**, M. Ichinose. Nitric oxide in health and disease. *Respiratory System. In Nitric Oxide Synthase Inhibitors: From Animal Studies to Clinical Implications.* B. Tunctan, S. Cuzzocrea, M. Yokoyama Edit. Transworld Research Network Inc. 2012. P137-150. (総ページ数 286 ページ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉浦 久敏 (SUGIURA, HISATOSHI)  
 東北大学・大学病院・講師  
 研究者番号: 20445092