

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790922

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患の病態におけるマイクロRNAの役割の解明と治療への応用

研究課題名(英文)MicroRNAs associated with smoking-induced pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice

研究代表者

佐藤 匡 (Sato, Tadashi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10596993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)の中心的な発症メカニズムは慢性的な炎症である。我々は、肺線維芽細胞を用いた解析で、COPDの主病態と考えられる「異常な炎症」の制御因子としてmiR-146aを見出した。我々が確立したCOPDモデルマウスを用いて、miR-146aがCOPDの異常な炎症に与える影響について検討した。

miR-146aを阻害しタバコ煙を曝露したマウスでは、BALF中のPGE2、肺組織でのCOX-2、IL-6の増加が確認された。miR-146aを阻害すると、タバコ煙曝露により誘導される炎症反応が増幅されることが確認され、in vivoにおいてもmiR-146aが炎症を制御すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cigarette smoking is the most important cause of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), but the mechanisms of pathogenesis are incompletely defined. We have previously reported that senescence marker protein-30 knockout (SMP30-KO) mice can be useful for investigating cigarette smoke-induced pulmonary emphysema. Moreover, we have already shown that miR-146a plays a pathogenetic role in the abnormal inflammatory response in COPD.

Vitamin C-controlled SMP30-KO were given miR-146a inhibitor on day 1 and 8 intranasally during exposure to either diluted cigarette smoke or fresh air for 2 weeks. Total cell and lymphocyte numbers were increased in the BALF of both miR-146a inhibitor and smoke exposed mice. PGE2 production and COX-2 expression were also increased significantly higher by exposure both miR-146a inhibitor and cigarette smoke.

In conclusion, miR-146a appears to play a pathogenetic role in the abnormal inflammatory response in a cigarette smoke-exposed murine model 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：慢性閉塞性肺疾患(COPD) microRNA miR-146a inflammation smoking SMP30

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は代表的な老年呼吸器疾患であり、本邦においては45歳以上の約8.5%、人口にして約530万人が罹患しているとされ、死亡原因として今後も増加することが予想されている(GOLD 2008, www.goldcopd.com)。しかしながら、現存の薬物治療では、病気の進行を予防し、予後を改善する効果は乏しいのが現状である。COPDの中心的な発症メカニズムは、気道や肺の慢性炎症による障害であると考えられ、リスク因子として最も重要なのは喫煙であることは論を待たない(MacNee W, et al. Proc Am Thorac Soc 2009)。COPD患者では健康喫煙者に比較して、喫煙による気道や肺の炎症が異常に亢進している。

これまでに研究代表者らは、老化促進マウスとして SMP30 (Senescence Marker Protein 30: 加齢指標タンパク質 30) ノックアウトマウス SMP30-KO を確立した(Ishigami A, et al. Am J Pathol 2002)。SMP30 は性ホルモンによる制御を受けず、雌雄ともに加齢に伴い肝臓や腎臓、肺で減少するタンパク質である(Fujita T, et al. Biochim Biophys Acta 1992)。研究代表者らは、SMP30-KO マウスが、加齢に伴う気道の拡大が、対照マウスと比較して早期に出現する老人肺モデルとなること、また、8週間という比較的短期間のタバコ煙曝露により、COPDの主要な病理変化である肺気腫、すなわち肺胞径の拡大と肺胞壁の破壊を生じることを見出し、老化因子を有するユニークな COPD モデルマウスであることを報告した(図1: Sato T, et al. Am J Respir Crit Care Med 2006)。さらにこれに続く研究で、

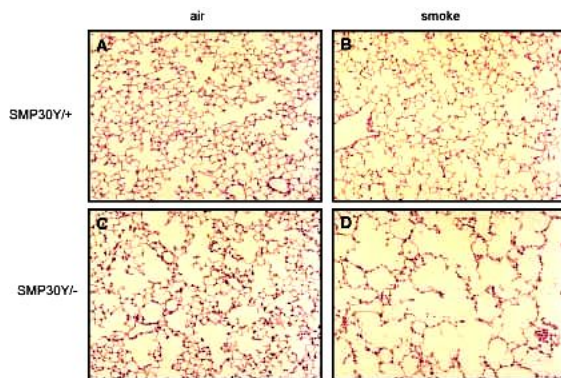


図1 慢性タバコ煙曝露後の肺組織標本 (ヘマトキシリン・エオジン染色、50倍)
A: SMP30Y+/+マウス、新鮮大気曝露 B: SMP30Y+/+マウス、タバコ煙曝露
C: SMP30Y+/+マウス、新鮮大気曝露 D: SMP30Y-/-マウス、タバコ煙曝露

SMP30-KO におけるタバコ煙感受性の変化の原因として、ビタミンC合成能の欠損が深く関わり、ビタミンCを補充する治療介入実験の結果、ビタミンCは喫煙に伴う肺気腫を改善することを明らかにした(Koike K, et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2014)。

また研究代表者は、COPDの病態を検討・解明する上で、気道上皮細胞のみならず肺線

維芽細胞が深く関わっており、さらに線維芽細胞が関与すると考えられる COPD 肺における、増幅し遷延する“異常な炎症”が特定のマイクロRNA、miR-146aにより制御されることを *in vitro* 解析により明らかにし、報告した(Sato T, et al. Am J Respir Crit Care Med 2010)。すなわち、COPDにおける炎症サイトカインによるmiR-146aの不十分な上昇が、COPDの中心病態である、異常に亢進しかつ遷延する炎症反応の原因となっている可能性が考えられた(図2)。マイクロRNAは非常に小さな non-coding RNA の一種で、遺伝子発現調節機構に関わる重要な因子であり、発生や細胞死、細胞増殖といった多くの生物学的プロセスに関与することが分かってきており、近年様々な疾患との関連についての報告が増え続けている。

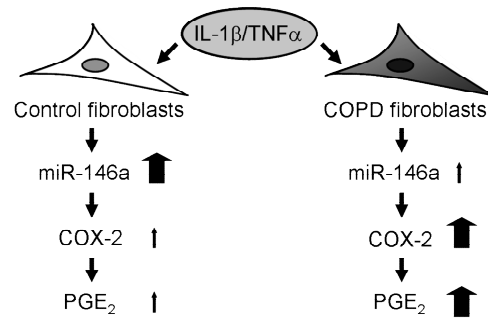


図2 miR-146aとCOPDにおける“異常な炎症反応”との関係
コントロール肺線維芽細胞では、炎症サイトカインによりmiR-146aが誘導され、COX-2及びPGE₂の上昇が制御されているが、COPDではmiR-146aの誘導が不十分なため、COX-2及びPGE₂が過剰に上昇し、炎症が遷延する。

2. 研究の目的

本研究では、我々が確立した COPD モデルである SMP30-KO(senescence marker protein-30 knockout)マウスに慢性タバコ煙曝露を行い、COPD 発症に関わる microRNA について網羅的に検討した。

さらに、肺線維芽細胞を用いた *in vitro* 解析の結果見出された miR-146a が、COPDの主病態である「異常な炎症反応」に与える影響について上記モデルを用いた *in vivo* の解析を行った。

3. 研究の方法

東京都健康長寿医療センター研究所動物施設 SPF において飼育された雄 SMP30-KO マウスを使用した。本動物実験は東京都老人総合研究所及び順天堂大学医学部実験動物委員会にて承認を受けたものである。

はじめに、3ヶ月齢 SMP30-KO 及び C57BL/6 (野生型) マウスを対象として、ノンフィルターピース(日本たばこ)を用いて2.5%希釈タバコ煙として30分間、週5日、8週間の曝露実験を行った。タバコ煙曝露装置 SG-200 (柴田科学)にて経鼻的に曝露させた。なお、両マウスそれぞれに同期新鮮大気を曝露したものを対照とした。

次いで、3ヶ月齢まで十分量のビタミンCを摂取させた(1.5g/L VC 水) SMP30-KO、マウスを、引き続きビタミンC充足条件

(1.5g/L VC 水)あるいは欠乏条件(壊血病予防量の0.0375g/L VC 水)に群別して飼育し、4ヶ月齢から2.5%タバコ煙あるいは新鮮大気への曝露実験を行った。実験タバコとしてノンフィルターピース(日本たばこ)を用い、タバコ煙曝露装置 SG-200(柴田科学)により経鼻的曝露を行った。

曝露実験後のマウス肺組織から *mirVana* miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて Total RNA を抽出し、マイクロアレイ法 (TORAY Mouse miRNA Oligo chip ver.16 使用) および TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を用いた real-time PCR 法にて、microRNA の発現プロファイルを検討した。また、Cyclooxygenase (COX)-2, Interleukin (IL)-6 の発現にも real-time PCR 法を用いた。

さらに、ビタミン C 充足条件下で飼育した4ヶ月齢 SMP30-KO マウスに対して、Day 1 および8に *in vivo* ready miR-146a inhibitor (Ambion: 5 mg/kg/ml) を経鼻投与した上で、タバコ煙曝露実験を2週間行った。タバコ煙曝露後の摘出肺は、経気道的に定常圧(25 cmH₂O)を与えて10%ホルマリン液中で24時間固定し、病理組織学的検討に供出した。また解剖時、気管支肺胞洗浄液(BALF)の採取を行い、総細胞数、細胞分画の解析および EIA kit (Cayman) を用いた Prostaglandin E₂ (PGE₂) の測定を施行した。さらに、肺組織中の COX-2 および IL-6 の発現を解析した。

群間の統計解析は Mann Whitney U test を行った。統計解析ソフトは GraphPad Prism 5 (GraphPad) を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 慢性喫煙曝露後の肺組織中 microRNA 発現プロファイル

8週間のタバコ煙曝露あるいは新鮮大気曝露を行った、SMP30-KO および野生型マウスの4群間での肺組織中 microRNA 発現を網羅的に解析した結果、非喫煙群では、SMP30-KO と野生型マウスを比較すると、肺組織において1.5倍以上の発現の相違がみられた microRNA 数は86であった (SMP30-KO > 野生型 = 19、SMP30-KO < 野生型 = 67)。タバコ煙曝露群では、40の microRNA が SMP30-KO マウス肺で発現

Table 1 Top 10 UP-regulated miRNAs in the lungs of SMP30-KO mice compared with wild type mice after cigarette smoke exposure

miRNA	Log2 ratio (KO smoke/ WT smoke †)
mmu-miR-30c-1*	1.22 (22.7 / 9.7)
mmu-miR-155	0.96 (227.8 / 116.8)
mmu-miR-135b	0.88 (28.4 / 15.5)
mmu-miR-146b	0.84 (1285.9 / 718.8)
mmu-miR-672	0.73 (65.7 / 39.7)
mmu-miR-200b*	0.73 (35.2 / 21.3)
mmu-miR-223	0.70 (2018.3 / 1243.8)
mmu-miR-34a*	0.67 (27.8 / 17.5)
mmu-miR-3096-3p	0.65 (123.5 / 79.0)
mmu-miR-652	0.63 (682.3 / 440.2)

(† Values of expression after global normalization)

が有意に亢進しており、miR-155 及び miR-223 などが含まれていた (Table 1)。一方、喫煙後の SMP30-KO マウス肺で発現が有意に低下している microRNA は 59 であり、miR-1, 133, 206 といった microRNA が含まれていた (Table 2)。

Table 2 Top 10 DOWN-regulated miRNAs in the lungs of SMP30-KO mice compared with wild type mice after cigarette smoke exposure

miRNA	Log2 ratio (KO smoke/ WT smoke †)
mmu-miR-206	-4.75 (7.1 / 191.0)
mmu-miR-615-5p	-2.08 (8.3 / 35.3)
mmu-miR-219-3p	-1.99 (6.6 / 26.1)
mmu-miR-133a	-1.89 (173.6 / 643.1)
mmu-miR-679-5p	-1.85 (10.0 / 36.1)
mmu-miR-205	-1.81 (70.5 / 246.6)
mmu-miR-133b	-1.61 (333.0 / 1014.6)
mmu-miR-1	-1.53 (693.9 / 1998.7)
mmu-miR-142-5p	-1.43 (186.3 / 502.2)
mmu-miR-133a*	-1.42 (28.5 / 76.4)

(† Values of expression after global normalization)

タバコ煙曝露群において、発現変化が認められた microRNA について、real-time PCR 法による発現定量解析を追加した。マイクロアレイの結果より1.5倍以上の発現変化があり、また、一定以上 (global normalization を行った後の value が 100 以上) の発現量が認められる microRNA を選択した。その結果、miR-155 は野生型マウスで、タバコ煙曝露により有意に発現が低下し、SMP30-KO マウス肺ではその傾向がみられないことがわかった。また、miR-223 についてはタバコ煙曝露後の SMP30-KO マウス肺で発現が亢進する傾向はみられたが統計学的有意差はなかった。一方、miR-1, 133a, 133b, 206 の各 microRNA は、野生型マウスにおいてタバコ煙曝露により発現が亢進することが明らかとなり、miR-206 と miR-133b については統計学有意差を認めた。しかしながら、SMP30 遺伝子の有無あるいは肺組織中ビタミン C の多寡が、マウス肺組織中の microRNA 発現プロファイルに交絡している可能性を考え、ビタミン C 投与量をコントロールした上で、同様の実験を追加施行した。しかし、その結果得られた肺組織中の microRNA 発現は、先に示した発現プロファイルとは異なっていた。

(2) SMP30-KO マウスに対するタバコ煙曝露が、肺組織中 miR-146a および COX-2, IL-6 発現に与える影響

そこで、miR-146a にターゲットを絞って、8週間の慢性タバコ煙曝露実験を行った肺組織を用いて、miR-146a の発現解析を行ったが、各群で miR-146a の発現に有意差は見られなかった。ただ、miR-146a は炎症刺激により誘導される性質を有する microRNA であることから、タバコ煙曝露期間による変動を検討する必要があると考え、ビタミン C コントロール下の SMP30-KO マウスを用いてタイムコース実験を行った。その結果、miR-146a はビタミン C 欠乏条件下で、ビタ

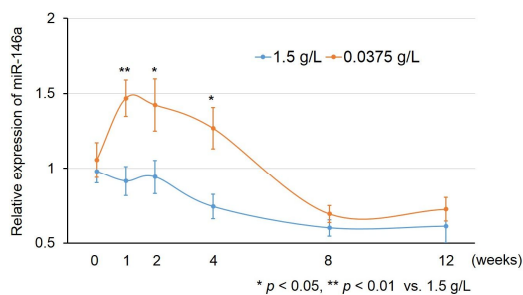


Fig. 1 タバコ煙曝露期間とmiR-146a発現との関連

ミン C 充足条件下と比較して、比較的早期の時相（4 週まで）において発現が亢進することが分かった。一方、それ以降においてはビタミン C 投与条件に関わらず、発現の抑制がみられた(Fig. 1)。また、肺組織中の COX-2 および IL-6 も、ビタミン C 欠乏条件下の早期の時相で、発現の亢進が観察された(Fig. 2A, B)。

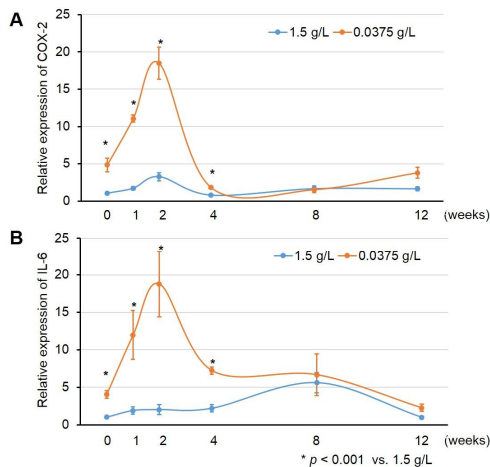


Fig. 2 タバコ煙曝露期間とCOX-2, IL-6発現との関連

(3) miR-146a inhibitor がタバコ曝露により誘導される炎症反応に与える影響

次いで、本モデルにおける、タバコ煙曝露により誘導される炎症反応の早期の時相に miR-146a が与える影響をみるために、既述の miR-146a inhibitor 投与実験を行った。対象動物をビタミン C 充足条件下で飼育した SMP30-KO マウスとし、タバコ煙曝露期間を 2 週間と短期間に設定したことから、マウス肺病理組織所見には群間で違いは観察されなかった。しかし、BALF においては miR-146a inhibitor 投与により、総細胞数およびリンパ球分画の増加がみられた(Fig. 3)。また、BALF 中の PGE₂ (Fig. 4)および肺組織中の COX-2 (Fig. 5A)は、miR-146a inhibitor 投与下でのタバコ煙曝露により、有意に増加することが確認された。なお、肺組織中 IL-6 については増加する傾向を示したが有意差はなかった(Fig. 5B)。

今回の結果から、miR-146a がタバコ煙曝露により誘導される炎症反応の比較的早期の時相に關与する可能性が示唆されることは興味深いと考えている。miR-146a の変動は、本モデルにおける COPD 発症において、

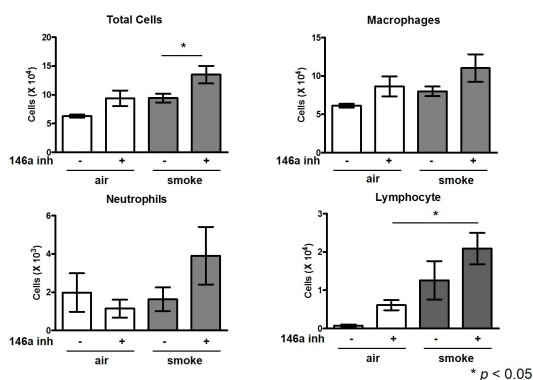


Fig. 3 miR-146a inhibitorがBALF総細胞数、細胞分画に与える影響

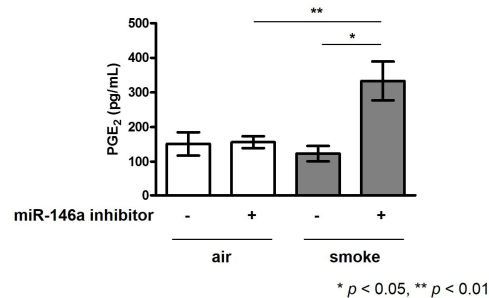


Fig. 4 miR-146a inhibitorがBALF中PGE₂濃度に与える影響

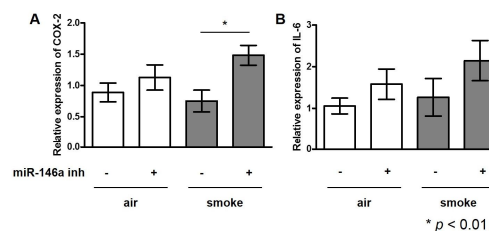


Fig. 5 miR-146a inhibitorが肺組織中COX-2, IL-6発現に与える影響

結果ではなく原因となりうると思われるためである。今後、miR-146a を投与することで、タバコ煙曝露による COPD 発症が予防されるかを検討することが必要と考えられる。

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 8 件)

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 . Interleukin-4 induces differentiation of human embryonic stem cells into "fibrogenic" fibroblast-like cells .J Allergy Clin Immun , 査読有 , 127:2011,1595-1603, 10.1016/j.jaci.2011.01.049.

Kanaji N, Sato T, Nelson A, Wang X, Li Y, Kim M, Nakanishi M, Basma H, Michalski J, Farid M, Chandler M, Pease W, Patil A, Rennard SI, Liu X . Inflammatory Cytokines Regulate Endothelial Cell Survival and Tissue Repair Functions via

NF-kB Signaling .J Inflamm Res ,査読有 ,
4:2011,127-38, 10.2147/JIR.S19461.

Nakanishi M, Sato T, Li Y, Nelson A, Farid M, Michalski J, Kanaji N, Wang X, Basma H, Patil A, Goraya J, Liu X, Togo S, Toews ML, Holz O, Muller K, Magnussen H, Rennard SI . Prostaglandin E2 Stimulates the Production of Vasculaer Endothelial Growth Factor through the E-Prostanoid-2 Receptor in Cultured Human Lung Fibroblasts . Am J Respir Cell Mol Biol , 査読有 , 46:2012,217-23, 10.1165/rcmb.2010-0115OC.

Kanaji N, Nelson A, Allen-Gipson DS, Sato T, Nakanishi M, Wang X, Li Y, Basma H, Michalski J, Farid M, Rennard SI, Liu X. The p38 mitogen-activated protein kinases modulate endothelial cell survival and tissue repair. Inflamm Res, 査読有 , 61:2012,233-44, 10.1007/s00011-011-0405-7.

Michalski J, Kanaji N, Liu X, Nogel S, Wang X, Basma H, Nakanishi M, Sato T, Gunji Y, Farid M, Nelson A, Muller KC, Holz O, Magnussen H, Rabe KF, Toews ML, Rennard SI. Attenuation of Inhibitory PGE2 Signaling in Human Lung Fibroblasts is Mediated by PDE4. Am J Respir Cell Mol Biol, 査読有 , 47:2012,729-37, 10.1165/rcmb.2012-0057OC.

Kanaji N, Nelson A, Wang X, Sato T, Nakanishi M, Gunji Y, Basma H, Michalski J, Farid M, Rennard SI, Liu X. Differential Roles of JNK, ERK1/2, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases on Endothelial Cell Tissue Repair Functions in Response to Tumor Necrosis Factor- α . J Vasc Res, 査読有 , 50:2013,145-56, 10.1159/000345525.

Wang X, Nelson A, Weiler ZM, Patil A, Sato T, Kanaji N, Nakanishi M, Michalski J, Farid M, Basma H, LeVan TD, Miller-Lasson A, Wieslander E, Muller KC, Holz O, Magnussen H, Rabe KF, Liu X, Rennard SI. Anti-inflammatory effects of budesonide in human lung fibroblasts are independent of histone deacetylase 2. J Inflamm Res, 査読有 , 6:2013,109-19, 10.2147/JIR.S43736.

Koike K, Ishigami A, Sato Y, Hirai T, Yuan Y, Kobayashi E, Tobino K, Sato T, Sekiya M, Takahashi K, Fukuchi Y, Maruyama N, Seyama K. Vitamin C

Prevents Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Emphysema in Mice and Provides Pulmonary Restoration. Am J Respir Cell Mol Biol, 査読有 , 50:2014,347-57, 10.1165/rcmb.2013-0121OC.

〔学会発表〕(計3件)

佐藤 匡、MicroRNAs associated with smoking-induced pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice、第52回日本呼吸器学会総会、2012年4月20日、神戸

佐藤 匡、MicroRNAs associated with smoking-induced pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice、American Thoracic Society International Conference 2012、2012年5月22日、サンフランシスコ

佐藤 匡、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)の発症と病態に關与する microRNA - SMP30 ノックアウトマウスを用いた解析 -、呼吸不全に關する調査研究班 平成25年度第2回総会、2013年12月20日、京都

〔図書〕(計2件)

佐藤 匡 他、中外医学社、Annual Review 呼吸器 2011、pp. 7-13

佐藤 匡 他、最新医学社、新しい診断と治療の ABC(1) 慢性閉塞性肺疾患、pp. 56-64

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 匡 (SATO Tadashi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10596993

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：