

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591142

研究課題名(和文)オートファジーによる慢性閉塞性肺疾患の増悪メカニズムの検討

研究課題名(英文)Investigation on pathogenesis of COPD exacerbations through autophagy

研究代表者

石井 健男(Ishii, Takeo)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90445750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)増悪の主原因は感染だが、メカニズムは不明である。NOD1,2の機能にて菌を認識するも、オートファジーを介した免疫機構が不全、増悪を引き起こすという仮説をたて、検証した。ATG16L1の増悪関連遺伝子型を有するCOPD患者単球ではインフルエンザ桿菌死菌刺激でのIL10発現量が多かった。NOD1の一塩基多型rs2075820は呼吸機能での閉塞性障害と関連、in vitroではNOD1刺激によりP38経路が活性化、菌の気道へのcolonizationがp38経路活性化を介してCOPDの病状進行に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Infections mainly caused exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, the mechanisms in which COPD exacerbations occur remain to be elucidated. We hypothesized that the capacities to recognize bacteria including pseudomonas and streptococcus pneumonia by NODs1 and 2, some of pattern recognition molecules, are intact and still the downstream pathway of NODs for innate immunity including autophagy pathway (ATG16L1 and other autophagy proteins are involved) fail to function in frequent-exacerbators. The expression level of the cytokine IL10 was higher in the monocytes derived from COPD subjects with ATG16L1 300Ala genotype, which was related to frequent exacerbators. A single nucleotide polymorphism rs2075820 in NOD1 was associated with airflow limitation in COPD and NOD1 stimulant was related to the activation of p38 pathway in vitro. Thus, bacterial colonization is thought to promote airflow limitation by NOD1 stimulation and the activation of p38 pathway.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 増悪 オートファジー NODs 遺伝子多型 自然免疫 病態関連遺伝子 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) 増悪の主要原因は細菌・ウイルス感染だが、増悪を引き起こす免疫機構は解明されていない。

オートファジーは、細胞の自己成分分解、再利用システムである。近年、肺炎原因菌として重要な肺炎球菌、緑膿菌を認識するパターン認識分子 NOD1, NOD2 が、大腸において、オートファジーを介して自然免疫、獲得免疫系の双方を制御する分子でもあることが明らかになった

(Travassos LH, et al. Nat Immunol, 2010; Cooney R, et al. Nat Med. 2010)。

そこで、NOD1,2 の機能より、免疫系が肺炎球菌、緑膿菌を認識するにも関わらず、オートファジーを介した免疫機構がうまく働かず、組織障害を引き起こすという COPD 増悪機構についての仮説をたてた。予備実験として、135 例の COPD 患者で ATG16L1 の 300 番目のアミノ酸をスレオニンからアラニンに置換する遺伝子多型と増悪頻度の関連を検討したところ、免疫系の機能を低下させるアラニン型で増悪頻度が有意に増加していた。

ビタミン D は NOD2 の発現増、抗菌ペプチドの発現増加を介してオートファジーを増強する (Jo EK, et al. Cellular Microbiology, 2010) によって、ビタミン D が NODs, オートファジーを介する増悪予防作用を持つ可能性がある。

2. 研究の目的

オートファジーを介した免疫機構がうまく働かず、組織障害を引き起こすという COPD 増悪機構が示唆されるため、同機構が実際に働いているか否かを、以下の点より検証することを目的とした。

- (1) NODs, オートファジー関連蛋白 ATG16L1 の遺伝子多型 (各遺伝子 5 箇所程度の SNP を検索) と COPD 増悪頻度の関連を検証
- (2) 肺由来細胞及び患者由来のマクロファージを用いた実験系により、細菌への免疫応答に対するオートファジーの関与を検証。
- (3) さらに本研究結果を臨床応用するため、NOD2 の発現誘導やオートファジー増強作用の報告のあるビタミン D に、COPD 増悪の予防効果があるか検討する。

3. 研究の方法

本研究計画では、

- (1) NODs, オートファジー関連蛋白 ATG16L1 の遺伝子多型と COPD 増悪頻度の関連
- (2) オートファジーが細菌への免疫応答に関与することを肺由来細胞及び患者由来のマクロファージを用いた実験系にて検証。以上により、NOD1, 2, ATG16L1 を介したオートファジー経路による免疫制御メカニズムが、COPD の増悪に関わるか検証する。さらに
- (3) 本研究結果を臨床応用するため、NOD2 の発現誘導やオートファジー増強作用の報告のあるビタミン D に、COPD 増悪の予防効果があるか検討する。

以上を研究の主な内容 (及び方法の概要) としていた。

具体的には、

NODs, オートファジー関連蛋白 ATG16L1 の遺伝子多型と COPD 増悪頻度の関連

NOD1, 2, ATG16L1 の遺伝子多型が COPD 増悪頻度に関連していることを、検証する。日本医科大学呼吸ケアクリニックで収集した、遺伝子解析同意取得済みで、さらに増悪頻度データのある COPD150 症例において、NOD1, NOD2, 及び ATG16L1 のプロモーターの SNP (Hapmap で報告のもの) と cSNP (dbSNP に登録、アミノ酸置換と関連する、日本人のマイナーアレル頻度 0.10 以上のもの)、さらに遺伝子全体の多型と増悪の関連を検討するため Tag SNP を選択すると、以下のようになる。

(i) NOD1: Glu266Lys (rs2075820)、及び 6 つの Tag SNPs

(ii) NOD2: プロモーター-SNP, cSNP の該当なし 5 つの Tag SNPs

(iii) ATG16L1: Thr300Ala (rs2241880) は検討済、rs10210302 (プロモーター)、9 つの Tag SNPs

これらの計 21 SNPs の遺伝子型を決定、遺伝子型と増悪頻度との関連を検証する予定であった。

以上より、NODs, ATG16L1 の遺伝子型が、COPD の易増悪性の背景にあるか否かを検討する。

また、COPD 350 例、at risk 250 例について、呼吸機能検査のデータと結合、上記 SNPs と閉塞性障害や COPD の病態進行 (閉塞性障害の悪化の経年的な速度) の関連も検討する。

疾患関連遺伝子の in vitro での機能解析 (NODs について): 単球系細胞 THP-1 について、NOD-1 stimulant を用いて刺激した細胞、刺激しない細胞の mRNA 発現をゲノムワイドに網羅的に比較、pathway 解析により、NOD-1 の刺激により活性化される細胞内信号伝達経路の検索を行った。

疾患関連 SNP の機能解析(ATG16L1): COPD 患者由来の末梢血単球を Monocyte Isolation kit (Miltenyi Biotec 社)を用いて分離、インフルエンザ桿菌の死菌を用いて刺激し、複数のサイトカイン(IL10 を含む)の発現量を測定。同単球を有していた患者の ATG16L1 の遺伝子型との関連を検討。

4. 研究成果

- (1) NODs, オートファジー関連蛋白 ATG16L1 の遺伝子多型と COPD 増悪頻度の関連: 増悪頻度データのある COPD 150 症例において、NOD1, NOD2, ATG16L1 の SNP の遺伝子型と増悪頻度との関連を検証した。NOD1 の cSNP の一つである Rs2075820 は、増悪頻度との有意な関連を認めなかった。ただ、本 SNP の C アレルの頻度は COPD の閉塞性障害の程度(FEV1%pred) と有意に関連していた($p = 0.0128$, 年齢、性別、pack-years で補正)。同 SNP は、増悪を介さず COPD の閉塞性障害そのものとの関連があると考えている。COPD 135 例で、COPD と関連既報告のある NOD2 promoter SNP rs1077861 と増悪頻度の関連も検討、有意な関連は見られなかった。COPD stage II-IV では、ATG16L1 にて増悪頻度と関連の見られた SNP(rs2241880) は FEV1%pred と関連のある傾向があった($p = 0.06$)。
- (2) NOD1 経路の COPD の病態への関与メカニズムの検討: NOD1 の刺激で COPD の気道病変の形成が進むと推測したため、好中球系細胞にて NOD1 の刺激により有意に変化する遺伝子に COPD の病態関連遺伝子があると仮定。そこで、好中球のモデル細胞の一つである HL-60 を NOD1 stimulant (M-TriDAP) で刺激、有意に mRNA 発現の変動する遺伝子をマイクロアレイで検討。発現が 2 倍以上増加した遺伝子が 29 遺伝子、2 倍以上発現が減少していた遺伝子が 111 遺伝子見られた。mRNA 発現のマイクロアレイデータからパスウェイ解析を行った。NOD1 が p38 pathway の活性化に寄与することが判明。rs2075820 の SNP の変化が、NOD1 stimulant による p38 pathway の刺激の程度を変え、ひいては COPD の慢性気道炎症、COPD progression の変化を引き起こすと考えた。本仮説検証のため、NOD1 の同 SNP の野生型、変異型の stable transfectant を単球系および好中球系 cell line にて作成中。また、p38 経路の活性化を検討するための ELISA kit を購入し、実験系の最適化を行っていた。
- (3) ATG16L1 蛋白及びオートファジーの細菌への免疫応答への関与の in vitro での検

証: ATG16L1 において、増悪頻度と関連の見られた SNP(rs2241880) の変化により細胞の LPS などへの反応の変化があると仮定。検証のために ATG16L1 の同 SNP の野生型、変異型の stable transfectant を単球系および好中球系 cell line にて作成するも難航。一方、ATG16L1 において、増悪頻度と関連の見られた SNP(rs2241880) の変化により細胞のインフルエンザ桿菌死菌への反応の変化があるか検証することとした。COPD 患者の rs2241880 の遺伝子型を決定、また同患者の末梢血単球を抽出しインフルエンザ桿菌死菌を加えて IL1b, TNF, IL10, IL8 などのサイトカインの発現パターンを検討したところ、同 SNP は IL10 の発現パターンと有意に関連していた($p = 0.04$)。オートファゴソームの追跡のため、オートファゴソームに局在する蛋白 LC3 と緑色蛍光蛋白 RFP の fusion protein LC3-GFP の stable transfectant をヒト肺由来細胞 BEAS-2B、骨髄由来細胞 THP-1 について作成していたが難航。末梢血白血球からの単球の分離培養はフィコール法などを用いて分離ののち macrophage serum-free medium (Gibco/LifeTechnologies)を用いて培養、系が不安定で、安定した系を模索中であつた。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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:
出願年月日:
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

石井 健男 (ISHII, Takeo)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90445750

(2)研究分担者

萩原 弘一 (HAGIWARA, Koichi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00240705

(3)連携研究者

()

研究者番号：