

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591144

研究課題名(和文) 血管内皮前駆細胞に注目した肺気腫病変と肺気腫合併肺高血圧の病態解析

研究課題名(英文) Analysis of clinical state of pulmonary emphysema and pulmonary hypertension focused on the endothelial progenitor cells

研究代表者

水野 史朗 (MIZUMO, Shiro)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80397281

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)：金沢医科大学呼吸器内科または共同研究施設で10 pack year以上の喫煙者を対象に血中のDNA、RNAを抽出し、DNAよりPCR-RFLP法によりp53 codon 72変異、MDM2 SNP309変異を測定、血中RNAよりreal-time RT-PCRにて循環血中の血管内皮前駆細胞のマーカーとしてCD31、CD34、vWFのmRNAを測定した。いずれの多型も肺気腫病変に影響を与えており、CD31、CD34、vWF発現はいずれも喫煙コントロール群に比して中等症COPD群で低下し、喫煙患者群における血管内皮前駆細胞の発現低下がCOPD発生の機序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)：Patients, who have at least a 10 pack year history of tobacco exposure, were recruited from Department of Respiratory Medicine, Kanazawa Medical University and other institution. Genomic DNA were extracted from blood samples of the patients and gene polymorphisms of p53 codon 72 and MDM2 SNP309 were analyzed by PCR-RFLP. mRNA expressions of CD31, CD34 and vWF from blood, as a marker of circulating endothelial precursor cells, were measured by real-time RT-PCR. Both gene polymorphisms of p53 and MDM2 had influence on the development of emphysema. The mRNA expressions of CD31, CD34 and vWF were significantly decreased in the group of moderate COPD compared with the group of smoking control. These results indicate that decreased endothelial precursor cells in the blood from smoking patients had an impact on the pathogenesis of COPD.

研究分野：肺循環、慢性閉塞性肺疾患

キーワード：p53 血管内皮前駆細胞 喫煙

1. 研究開始当初の背景

COPD 患者において、血管内皮細胞は喫煙時における肺損傷部位の修復に関与していることが想定され、喫煙により誘導される炎症性サイトカインの一種である IL-6 などで誘導された骨髄より肺損傷部位への循環血管内皮前駆細胞(CEP)の移行がその修復に関与している()と考えられる。COPD 患者においては血管内皮の強力な増殖因子である VEGF の産生が肺組織中で低下しており、VEGF の機能、産生を抑制することにより実験動物において肺気腫性病変を形成し()、VEGF の強力な誘導遺伝子である HIF-1 が COPD 患者の肺組織で低下する()ことを我々は報告しており、COPD 患者の血管内皮細胞の機能低下には血管内皮細胞増殖に関連する遺伝子異常が関与していると考えられる。

一方、慢性閉塞性肺疾患や高地居住者の低酸素性肺高血圧症は末梢肺細動脈血管平滑筋の肥大、増殖に代表される肺血管リモデリングを伴う。この際、細胞レベルでは低酸素により誘導された HIF-1 により、VEGF、PDGF などの種々の増殖因子が誘導されることが知られており、申請者らは p53 遺伝子欠損マウスや培養肺動脈血管細胞の低酸素への暴露による実験により、これら HIF-1 由来の増殖因子と p53 の機能異常が低酸素性肺高血圧の成因の一つである可能性を報告している()。実験動物による研究においては、VEGF 受容体阻害剤である SU5416 投与ラットに低酸素暴露を行うと plexiform lesion と呼ばれる原発性肺高血圧症に類似した肺血管病変を形成し、高度の肺高血圧と右心不全を呈することが知られており()、同血管病変部位に c-kit などの血管内皮前駆細胞が出現する()。興味深いことには、SU5416 投与ラットは肺血管内皮細胞のアポトーシスを誘導し肺気腫様病変を形成することが知られている()ことから、血管内皮細胞の機能異常は肺気腫病変と肺高血圧病変の双方に重要な役割を果たしていることが示唆される。血管内皮細胞から産生される一酸化窒素やプロスタサイクリンなどの血管拡張因子が、肺血管のリモデリングに関与していることを細胞実験から申請者は報告している()が、低酸素血症を伴う重症 COPD 患者での CEP の発現、またその予後規定因子と遺伝子的素因に関しては今なお不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は喫煙により発症した慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者をヒト血管内皮前駆細胞として知られている循環血管内皮前駆細胞(CEP)の測定により、血管内皮機能異常が原因と考えられる疾患群を特定し、各群間で血管増殖に関与する遺伝子多型を解析することにより、気腫性病変と肺血管病変に関するバイオマーカーとなる遺伝子多型を

明らかにし、CEP と COPD 患者に見られる肺気腫性病変、COPD 重症度との関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

[患者選択] 金沢医科大学病院呼吸器内科、または共同研究施設(福井大学病院呼吸器内科)において、呼吸機能検査と胸部画像検査(胸部 HRCT:スライス厚 2mm 以下で全肺野を撮影したもの)を施行した患者で、研究協力に自由意志で参加に同意を得られた患者より、10 pack year 以上の喫煙患者を被験者として選択した。ただし 喘息合併患者、炎症反応高値の患者、塵肺患者、喫煙以外の原因によると考えられる COPD 患者、は除外項目として上記検討群より除いた。

[検体処理] Paxgene DNA 採血管、Paxgene RNA 採血管により患者より血液を採取、測定時まで -80 度で冷凍保存した。同採血管は採血後ただちに管内に存在する RNA/RNA 安定剤により DNA/RNA は安定化し、約 72 時間は常温で安定とされ、多施設でのサンプル採集に非常に有用であった。

[測定方法]

(1)遺伝子多型の検討:被験者より採取した DNA 採血管より DNA を抽出し、PCR 法にて SNP を含む DNA 断片を増幅し、制限酵素断片長多型性(PCR-RFLP)により SNP を判定した。得られた SNP から各遺伝子多型ごとに患者群を分類し、CEP 関連遺伝子の発現値、%LAA の値をプロットし SNPs の違いによる肺気腫性病変の重症度と CEP との関連を統計学的に検討した。

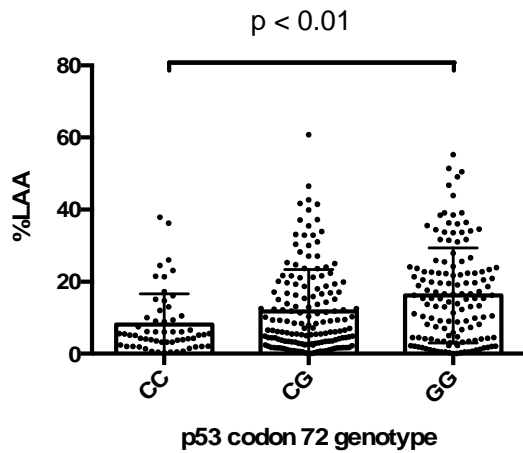
(2)肺の気腫化(%LAA)の評価:胸部 HRCT 画像の DICOM データよりコンピューターソフトウェア(LungVision Ver 2.1)を用いた画像処理により撮影された全肺野から %LAA を測定し、肺内の気腫化の程度により患者群の肺気腫の程度を評価した。

(3)CEP 関連遺伝子の発現:Paxgene RNA 採血管より RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成し、CEP の marker である CD31、CD34、vWF の mRNA の発現を real-time RT-PCR にて測定した。miR34a の発現に関しても、同様に抽出した RNA から同様にマイクロ RNA(miRNA)を標識した cDNA を作成し、RT-PCR にて半定量した。リファレンス遺伝子はそれぞれ 18s rRNA と miR103 を使用した。

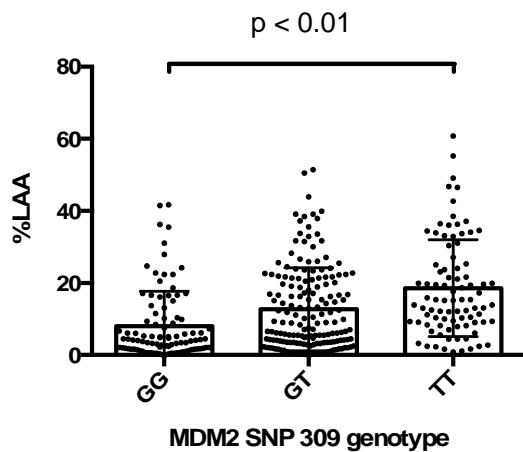
4. 研究成果

金沢医科大学呼吸器内科、福井大学呼吸器内科において呼吸機能検査と胸部 CT を施行した喫煙歴を有する約 375 名の研究協力に同意を得られた患者より得られた検体より抽出した DNA 遺伝子より、PCR-RFLP 法により HIF-1 (rs11549465, rs11549467)、VEGF (rs3025039)、p53 (rs1042522)、IL-6

(rs1800795)の検討を行った。同遺伝子群多型と胸部 CT から得られた気腫化(%LAA)を比較検討したところ、p53 codon 72 の C/G 変異において、G 変異で有意な気腫化病変を有する患者群の上昇を認めた。



そのため p53 関連遺伝子である MDM2 SNP309, p27, p21 遺伝子の追加検討を行ったところ、MDM2 SNP309 の G/T 変異の T 変異で有意に気腫化病変の亢進群を認めた。

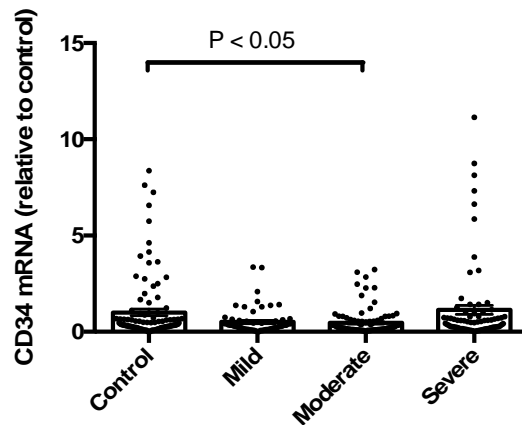
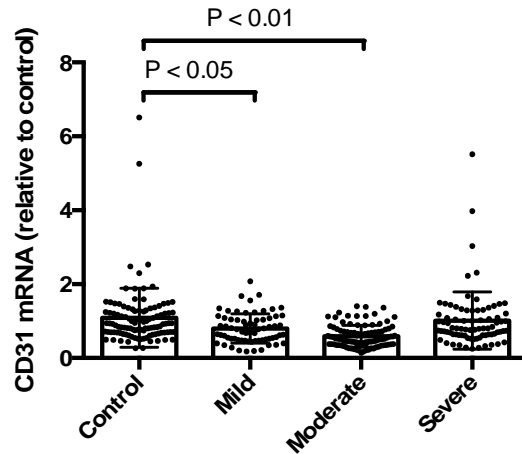


上記検討により、MDM2 SNP309 遺伝子多型により喫煙刺激での p53 蛋白産生が肺内で変化する可能性があり、また p53 codon 72 の C/G 変異により肺細胞のアポトーシスが亢進する可能性が示唆されたため、p53 また MDM2 遺伝子の多型を有するプラスミドを作成した。野生型 p53 を有する A549 細胞と p53 null 細胞である CR5803 細胞に同プラスミドを遺伝子導入し、p53 遺伝子強制発現時の CR5803 細胞における細胞増殖を MTS 法により検討したところ、p53 codon 72 G 変異において有意に細胞増殖抑制効果の増加が認められた。

また、A549 細胞におけるタバコ抽出物 (CSE) による MDM2 プロモーター活性の変化をルシフェラーゼにて測定したところ、MDM2 SNP309 G 変異で T 変異に比して有意にプロモーター活性が高く、MDM2 遺伝子多型により p53 発現が喫煙刺激により調節

されている可能性が示唆された。

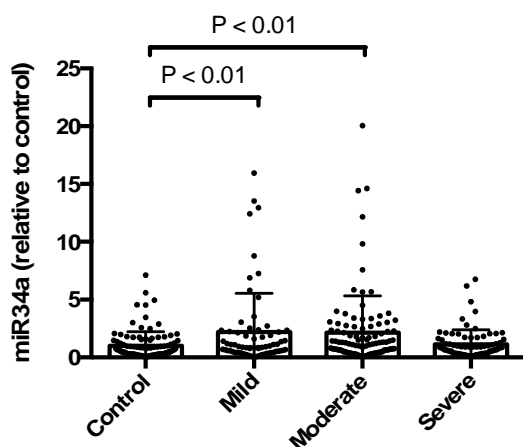
さらに、上記患者群で血液中 RNA を抽出し、良好な RNA 得られた 358 名から LightCycler™ を用いた RT-PCR 法により、血管内皮由来遺伝子である CD31、CD34、vWF 遺伝子を測定した。いずれの遺伝子群においても喫煙コントロール群に比して中等度 COPD 群 (GOLD III 群) で発現の低下を認めた。しかしながら、GOLD III ~ IV 群の重症 COPD 群では遺伝子群の高発現を認める群が散見され、喫煙コントロール群と比して有意な変化は認められなかった。



CD31、CD34、vWF 遺伝子発現にはいずれも遺伝子群間で優位な相関関係を認めていた。気腫化の指標である %LAA 値は閉塞性換気障害の指標である %一秒率と有意に相関していたが、各血管内皮由来遺伝子発現とは相関関係は認められず、血中の血管内皮遺伝子発現には気流制限による呼吸状態や全身状態の悪化や喫煙による全身血管障害の影響などの多因子が影響を与えている可能性が示唆された。

血管内皮遺伝子発現にアポトーシス誘導 miRNA 発現が関与している可能性を考慮し、同患者群で p53 により誘導される miR34a の発現を同様に RT-PCR で測定したところ、各血管内皮遺伝子群と逆相関を認め、中等症 COPD 群では喫煙コントロールに比して有

意に上昇していた。



COPDの進行にアポトーシス誘導 miRNA が関与していることが示唆されるが、重症 COPD では miR34a は喫煙コントロール群と有意な差は認められなかった。重症 COPD 群においては禁煙後の喫煙者の割合が高く、喫煙による血管内皮への障害が抑制されている可能性が想定されるが、重症 COPD 群における喫煙者と禁煙後患者群間での miR34a 遺伝子発現は統計学的に優位な差は認められなかった。重症 COPD 群のサンプル数不足により有意差が出なかった可能性もあり、さらなる症例の集積が必要と考えられた。

<引用文献>

- Takahashi T, Suzuki S, Kubo H, Yamaya M, Kurosawa S, Kato M. Impaired endothelial progenitor cell mobilization and colony-forming capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2011 May;16(4):680-7.
- Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, Chen Y, Lawton MT, Young WL, Yang GY. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Jan;28(1):90-8.
- Mizuno S, Yasuo M, Bogaard HJ, Kraskauskas D, Natarajan R, Voelkel NF. Inhibition of histone deacetylase causes emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Mar;300(3):L402-13.
- Yasuo M, Mizuno S, Kraskauskas D, Bogaard HJ, Natarajan R, Cool CD, Zamora M, Voelkel NF. Hypoxia inducible factor-1 in human emphysema lung tissue. *Eur Respir J*. 2011 Apr;37(4):775-83.
- Mizuno S, Bogaard HJ, Kraskauskas D, Alhussaini A, Gomez-Arroyo J, Voelkel NF, Ishizaki T. p53 Gene deficiency

- promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 May;300(5):L753-61.
- Mizuno S, Bogaard HJ, Voelkel NF, Umeda Y, Kadowaki M, Ameshima S, Miyamori I, Ishizaki T. Hypoxia regulates human lung fibroblast proliferation via p53-dependent and -independent pathways. *Respir Res*. 2009 Mar 6;10:17.
- Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, Abbate A, Chang PJ, Chau VQ, Hoke NN, Kraskauskas D, Kasper M, Salloum FN, Voelkel NF. Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 1;182(5):652-60.
- Mizuno S, Farkas L, Al Hussein A, Farkas D, Gomez-Arroyo J, Kraskauskas D, Nicolls MR, Cool CD, Bogaard HJ, Voelkel NF. Severe pulmonary arterial hypertension induced by SU5416 and ovalbumin immunization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Nov;47(5):679-87.
- Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(11):1311-9.
- Kadowaki M, Mizuno S, Demura Y, Ameshima S, Miyamori I, Ishizaki T. Effect of hypoxia and Beraprost sodium on human pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation: the role of p27kip1. *Respir Res*. 2007 Nov 1;8:77.
- Mizuno S, Kadowaki M, Demura Y, Ameshima S, Miyamori I, Ishizaki T. p42/44 Mitogen-activated protein kinase regulated by p53 and nitric oxide in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Aug;31(2):184-92.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mizuno S, Ishizaki T, Toga H. Role of p53 in lung tissue remodeling. *World Journal of Respiratory*, 28; 5(1): 40-46, 2015.

〔学会発表〕(計 6 件)

S. Mizuno, R. Kato, M. Kobayashi, T. Oikawa, K. Nakagawa, K. Osanai, M. Kadowaki, M. Anzai, T. Ishizaki, H.

Toga, Circulating vascular endothelial cell gene expressions in chronic obstructive lung disease. American Thoracic Society, International Conference 2015. Denver, USA. 4/18,2015.

S. Mizuno, M. Kobayashi, T. Oikawa, K. Nakagawa, K. Osanai, M. Kadowaki, M. Anzai, T. Ishizaki, H. Toga. Gene polymorphisms of p53 at codon 72 and MDM2 SNP309 are associated with lung cancer risk and emphysematous changes in smokers. European Respiratory Society Annual Conference 2014. Munich, Germany. 7/9,2014.

R. Kato, S. Mizuno, M. Kobayashi, T. Oikawa, K. Nakagawa, K. Osanai, M. Kadowaki, M. Anzai, T. Ishizaki, H. Toga Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease. European Respiratory Society Annual Conference 2014. Munich, Germany. 7/8,2014.

S. Mizuno, T. Ishizaki, M. Kadowaki, J.G. Gomez-Arroyo, D. Kraskauskas, N.F. Voelkel, K. Osanai, H. Toga. Gene Polymorphisms Of p53 At Codon 72 And MDM2 SNP309 regulates cigarette smoke induced lung cell apoptosis. American Thoracic Society, International Conference 2014. San-Diago, USA. 4/19,2014.

S. Mizuno, T. Ishizaki, M. Koyabashi, K. Osanai, H. Toga. Gene Polymorphisms Of p53 At Codon 72 And MDM2 SNP309 regulates lung cell proliferation during hypoxia. VIII Euro-Asian Respiratory Society International Symposium. Bishkek, Kyrgystan. 11/8, 2013.

S. Mizuno, T. Ishizaki, M. Kadowaki, J.G. Gomez-Arroyo, D. Kraskauskas, N.F. Voelkel, K. Osanai, H. Toga. Gene Polymorphisms Of p53 At Codon 72 And MDM2 SNP309 Are Associated With Emphysematous Changes In COPD Patients. American Thoracic Society, International Conference. Philadelphia, USA. 2013.4/22, 2013.

金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：80151364

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 史朗 (MIZUNO, Shiro)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80397281

(2)研究分担者

石崎 武志 (ISHIZAKI, Takeshi)