

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790818

研究課題名(和文) 気道上皮細胞特異的転写因子制御による気管支喘息治療の研究

研究課題名(英文) Regulation of transcription factor in airway epithelial cells for asthma treatment

研究代表者

浅井 一久 (ASAI, KAZUHISA)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・病院講師

研究者番号：10382053

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)：気管支喘息、COPDはともに慢性気道炎症性疾患であり、炎症の制御が求められる。炎症に関わる個々のメディエーターの制御はサイトカイン、ケモカイン等の重複性、冗長性から疾患の制御に至り難く、一連の炎症機序を制御する転写因子の制御がブレイクスルーとなる可能性がある。本研究では、炎症を惹起する酸化ストレスの制御に関与する転写因子NRF2(Nuclear factor erythrid-2-related factor 2)の気管支喘息、COPD気道上皮における発現を検討し、COPD患者の気道上皮におけるNRF2の発現低下と喫煙の影響を初めて証明した。引き続き、そのメカニズムの検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Bronchial asthma and COPD are characterized with chronic airway inflammation. To control airway inflammation intervention to individual cytokines or chemokines are now under trial. However, due to its Redundancy of cytokines or chemokines it is very hard to control airway inflammation. Mediators are under the control of transcription factor and intervention to transcription factors may be a breakthrough in disease control.

In this research supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI), we have found that expression of NRF2(Nuclear factor erythrid-2-related factor 2), a transcription factor for controlling antioxidant production, in bronchial epithelial cells in COPD patients is significantly decreased compared with that of healthy non-smoking healthy subjects for the first time. Also we showed that smoking decreased expression of NRF2 in bronchial epithelial cells.

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：閉塞性肺疾患 気道炎症 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息はアレルギー疾患の増加に伴って著しい増加を示している。気管支喘息は好酸球、CD4 陽性 T リンパ球を主体とする炎症細胞浸潤を伴う慢性気道炎症性疾患であり、喘息治療への吸入ステロイド薬の導入・普及により、コントロールの向上がはかられている。しかしながら、気管支喘息の難治化の要因として、基底膜網状層線維化、上皮剥離、杯細胞化生、平滑筋増生/肥大、血管新生等の「気道リモデリング」の進展が、喘息コントロールの不良化につながっている。重症喘息・難治性喘息は、高用量吸入ステロイド薬、合剤を含む長時間作用型 B2 刺激薬 (LABA)、ロイコトリエン受容体拮抗薬 (LTRA)、テオフィリン徐放製剤を使用しても、症状が持続し、経口ステロイド薬を用いても、時にコントロール不良である。病態的には、気道リモデリングに起因する可逆性に乏しい強い閉塞性気流障害や好中球性気道炎症の関与が知られており、これらがステロイド治療に抵抗を示すため、ステロイドとは異なった新たな治療法が求められている。

気管支喘息における気道炎症は、Th2 型炎症へ傾いた Th1/Th2 不均衡を呈しており、Th2 型サイトカイン産生能を有する CD4 陽性 T リンパ球 (Th2 細胞) が気道炎症を指揮する中心的細胞と考えられてきた。しかしながら、近年、気道の構成細胞である気道上皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞などにサイトカイン、ケモカイン等の液性因子分泌能があることが知られるようになり、特に気道上皮細胞の免疫調節作用が注目を浴びている。気道上皮細胞からは、TARC (thymus and activation-regulated chemokine)、eotaxin などの Th2 型ケモカインに加えて、TSLP (Thymic stromal lymphopoietin)、IL-25、IL-33 などの Th2 型サイトカインが分泌され、樹状細胞、マクロファージを介して Th2 型炎症を惹起・維持している。

NKX2-1 (TTF-1: Thyroid transcription factor-1) は、ホメオボックスを有するホメオドメインタンパクファミリーに属し、甲状腺、肺、間脳で特異的に発現している転写因子である。喘息モデルマウスの Genome-wide mRNA analysis にて NKX2-1 (TTF-1) が TARC、IL-13 の mRNA 産生を抑制し、NKX2-1 (TTF-1) トランスジェニックマウスの喘息モデルにおいては、気道リモデリングの要素である腺上皮化生が抑制されることが報告された。また、NKX2-1 (TTF-1) は、気道リモデリングに重要な役割を果たすと考えられる上皮間葉移行 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) に抑制的に働く可能性も示されており、NKX2-1 (TTF-1) が、気道炎症と気道リモデリングという気管支喘息難治化機序の重要な 2 つの側面に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、気道上皮に発現する転写因子の気管支喘息、COPD 病態への関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、すでに我々が確立している気管支鏡下気道上皮細胞採取法により採取された気道上皮細胞を用いて検討を行った。初期段階として、気道上皮の採取並びに臨床背景情報の収集を開始した。対象は軽微な血痰や末梢小結節精査目的で気管支鏡検査を受けた患者で、JGL 2009、GINA2009 に基づき気管支喘息と診断されている症例とした (気管支喘息群)。また、対照群として、COPD 群、気管支鏡目的以外の呼吸器疾患のない健常対照群も集積した。登録数は、各群 20 例、計 60 例として開始した。

(2) 気道上皮採取法としては、気管支鏡検査時に出血を起こさぬように留意しながら細胞診用ブラシにて気道上皮を採取した。気道上皮は速やかに 4 生理食塩水に懸濁して、細胞培養、cDNA 作成に供した。細胞培養は BEGM 培地にて行い、初代継代培養細胞の ALI culture (気液界面培養) は、Th2 型炎症の微小環境を模した Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13) 刺激、および、Th1 型サイトカイン (IFN γ)、TNF- α 、IL-18 刺激、タバコ煙抽出液 (Cigarette smoke extract; CSE) にて刺激を行った。また、採取直後の一部の気道上皮細胞よりトライゾールにて mRNA を抽出し、cDNA を作成して、Real-time PCR 法による NKX2-1 (TTF-1) 等転写因子の発現量定量化に供した。

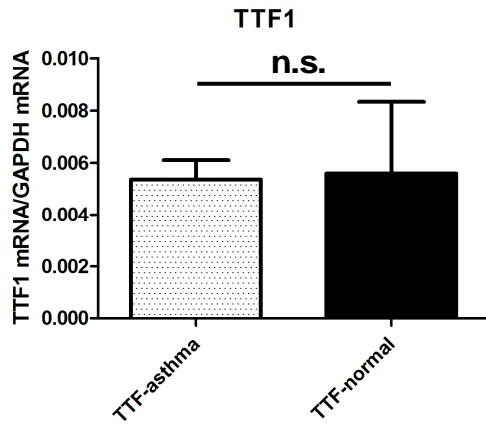
(3) 気道炎症プロフィールとして、肺機能検査、気道過敏性検査、呼気一酸化窒素濃度測定、インパルスオキシレーション法 (IOS)、誘発喀痰採取による喀痰中細胞分画検査を行った。

4. 研究成果

(1) 気管支喘息気道上皮における TTF-1 発現

研究開始後、速やかに症例集積に移った。しかしながら、本研究で採用した細胞採取法が、細胞採取法として優れた気管支鏡下気道上皮細胞採取法であるが、気管支鏡全般的な注意事項として気管支喘息患者に対する気管支鏡検査が慎重適応であることより、気管支喘息群の症例集積が捗らない状況があり、むしろ、対照群である COPD 群、健常対照群の集積が進んだ。図 1 に示すように、少数例に留まるものの気管支喘息群と健常対照群間で比較検討を行った。

図 1 : 気道上皮における TTF-1 発現

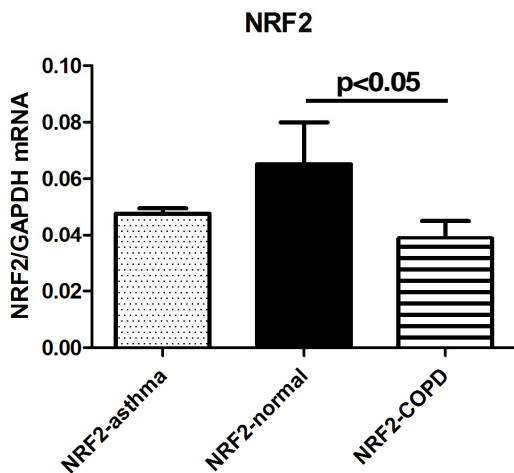


気管支喘息群において TTF-1 発現が少ない傾向ではあるが、有意差を認めず、また、健常対照群の症例の増加は可能であるものの、気管支喘息症例数の増加は困難が予想された。そのため、むしろ、集積が進んだ COPD 群、健常対照群での転写因子の差異について検討を進める方針とした。

(2) 気道上皮における NRF2 発現

酸化ストレスは炎症を惹起するため、酸化ストレス（オキシダント）と抗酸化物質（アンチオキシダント）のバランスが気道炎症に影響を与えている。NRF2(Nuclear factor erythrid-2-related factor 2)は、気道上皮や肺胞マクロファージで主に発現している転写因子であり、アンチオキシダントの産生に関与し、酸化ストレスから肺の保護に重要な働きを担っている。気管支喘息、COPD とともに主役を演じる炎症細胞は異なるものの、慢性気道炎症疾患であり、気管支喘息群、COPD 群、健常対照群の 3 群で NRF2 の発現を比較した（図 2）。

図 2 : 気道上皮における NRF2 発現



気道上皮における NRF2 の発現は、健常対照群に比較して COPD 群において有意に低下していることが見出された。

(3) COPD 患者気道上皮細胞における転写因子 NRF2 の発現解析

引き続き、COPD 患者気道上皮細胞における NRF2 の多寡について検討した。喫煙が COPD の主要な原因であり、喫煙の影響を考慮して表 1,2 のように 3 群に分類した。

表 1 : 患者背景

Characteristics				
	Never Smoker (n=7)	Non-COPD Smoker (n=8)	COPD (n=9)	p value
Age (year)	61 (53-76)	66 (52-75)	72 (56-84)	NS
Male/Female	2/5	6/2	8/1	p<0.05
BMI	22.5 (16.9-28.3)	22.5 (14.2-25.1)	20.1 (16.8-24.1)	NS
Smoking habits				
ex-smokers	0	3	4	
current-smokers	0	5	5	
Brinkmann Index	0	800 (420-1600)	1000 (225-1600)	

Median (range)

表 2 : 肺機能検査

Lung Function Test				
	Never Smoker (n=7)	Non-COPD Smoker (n=8)	COPD (n=9)	p value
FVC (L)	2.96 (1.9-3.77)	2.81 (2.16-3.93)	3.23 (1.54-4.15)	NS
FVC % predicted (%)	101.1 (98.7-117.5)	86.9 (69.9-120.6)	100.9 (65.9-121.1)	NS
FEV1 (L)	2.43 (1.35-3.04)	2.24 (1.61-3.05)	1.38 (0.78-2.44)	p=0.09
FEV1 % predicted (%)	88.1 (67.4-111.8)	80.2 (66.6-113.6)	55.6 (30.6-79.7)	p<0.05
FEV1/FVC (%)	74.7 (70-82.1)	79.7 (73.2-99.1)	55.1 (24.4-60.4)	p<0.01
FEF25-75 (L/s)	1.43 (0.75-2.65)	1.6 (0.93-3.79)	0.47 (0.28-1.01)	p<0.01
PEF (L/s)	6.39 (3.87-8.4)	5.81 (4.76-6.61)	4.62 (1.53-5.83)	p<0.05
DLco % predicted (%)	181.6 (87.6-257.5)	86.2 (64.1-118.4)	84.7 (38.2-132.4)	NS

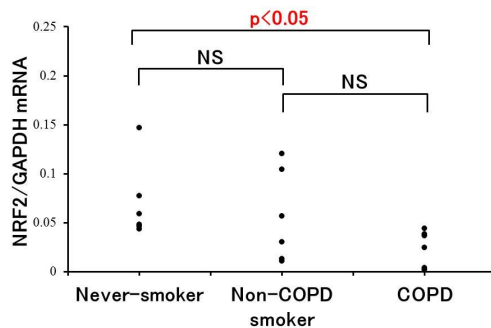
Median (range)

FVC: forced vital capacity, FEV1: forced expiratory volume in one second
 FEV1s: FEV1/FVC, FEF25-75: forced expiratory flow between 25% and 75% of FVC
 PEF: peak expiratory flow

非 COPD 喫煙健常群と COPD 群の喫煙歴に優位な差を認めなかった。

(4) 気道上皮における NRF2 の発現と喫煙

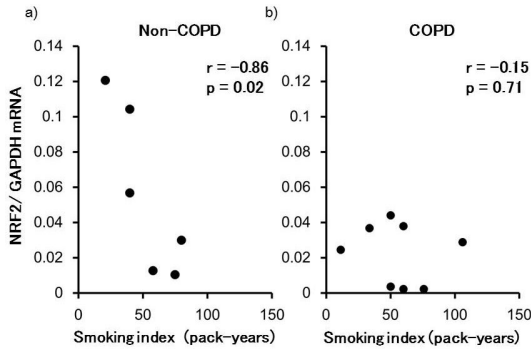
図 3 : COPD 群、喫煙健常群、非喫煙健常群における NRF2 発現



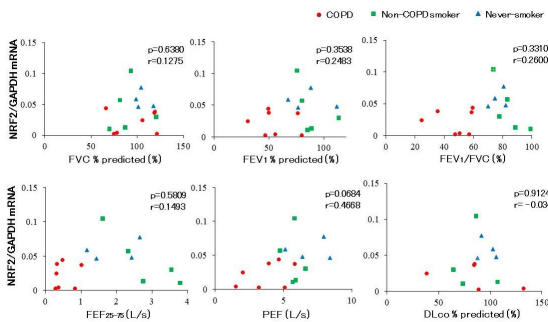
COPD 群において非喫煙健常群と比較して有意に NRF2 発現が低下しており、喫煙健常群はその中間に位置した。

(5) NRF2 と喫煙の影響

図 4 : 非 COPD 群と COPD 群における喫煙の NRF2 発現に対する影響



a)非 COPD 群では、喫煙歴と NRF2 発現に有意な負の相関を認めた。b)COPD 群では、非 COPD 群に認められた負の相関は認められず、喫煙量の少ない症例においても、NRF2



発現は低下していた。COPD 発症に関して内因的な抗酸化ストレス能の差異が関与している可能性が示唆された。

(6) NRF2 と肺機能検査の相関

図 5 : NRF2 と肺機能検査の相関

NRF2 発現量と諸肺機能検査値との間に有意な相関を認めなかった。NRF2 発現の変動が COPD の特徴である肺機能低下に至るには、中間段階として炎症の増強の介在が予想される。炎症の評価項目の追加が必要と考えられた。

(7)まとめ

本研究のコンセプトは、炎症などに関わる個々のメディエーターの制御はサイトカイン、ケモカイン等の重複性、冗長性から容易ではないため、一群のサイトカインを制御する転写因子の制御の有効性を追って検討す

るための、基礎的なデータの収集、解析であった。しかしながら、今回初期のターゲットとして挙げた TTF1 の解析においては、痛恨ながら症例の集積に手間取った。このため、抗酸化においてキーとなる転写因子 NRF2 をターゲットに再設定し、収集できた COPD を中心に解析し、COPD 患者の気道上皮における NRF2 の発現低下を証明した。

現在、引き続き ALI culture での CSE の NRF2 に対する影響等を検討中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Kanazawa H, Kyoh S, Tochino Y, Asai K, Hirata K. Potential role of pentosidine on susceptibility to small airway closure in elderly and smoking asthma. *Respir Med*. 査読有 108(5) 2014 pp.709-15

平田 一人, 浅井 一久 【COPD 治療の新時代 21 世紀の「社会的」生活習慣病】 知っておくべき日本の COPD 治療のエビデンス BAREC 研究 内科 査読無 113 巻 2 号 2014 pp.321-324

平田 一人, 棚野 吉弘, 浅井 一久 【段階に応じた COPD 薬物治療】 労作時の呼吸困難 日本医事新報 査読無 4681 号 2014 pp.29-34

平田 一人, 棚野 吉弘, 浅井 一久 【日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第 4 版をめぐって】 増悪期の管理・予後・病診連携 日本胸部臨床 査読無 72 巻 11 号 2013 pp.1228-1238

平田 一人, 棚野 吉弘, 浅井 一久 【新たな展開を見せる COPD 治療と新治療薬オキシスへの期待】 COPD 増悪治療戦略 吸入療法 査読無 5 巻 2 号 2013 pp.46-54

浅井 一久, 平田 一人 【喘息病態の修飾因子・難治化因子】 喫煙 呼吸と循環 査読無 61 巻 6 号 2013 pp.523-528

平田 一人, 棚野 吉弘, 浅井 一久 【呼吸器疾患の増悪を考える】 COPD 増悪時の治療と予後 THE LUNG perspectives 査読無 21 巻 3 号 2013 pp.262-266

棚野 吉弘, 浅井 一久, 平田 一人 【気管支喘息:診断と治療の進歩】 概念 COPD との鑑別と併存 日本内科学会雑誌 査読無 102 巻 6 号 2013 pp.1352-1358

平田 一人, 棚野 吉弘, 浅井 一久
【COPD-その病態と最新治療】日本のガイドラインと GOLD カレントセラピー 査読無 31 巻 5 号 2013 pp.473-479

平田 一人, 棚野 吉弘, 浅井 一久
【COPD 治療のキーポイント】治療 吸入ステロイド(配合薬を含む) Mebio 査読無 30 巻 5 号 2013 pp.58-69

〔学会発表〕(計 5 件)

今橋 由美子, 棚野 吉弘, 浅井 一久, 井尻尚樹, 吉井 直子, 玉垣 学也, 鴨井 博, 金澤博, 平田 一人 COPD 患者の気道上皮細胞における Nrf2 発現の検討 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 2013 年 4 月 19 日~21 日 東京

吉井 直子, 金澤 博, 井尻 尚樹, 武田 倫子, 玉垣 学也, 今橋 由美子, 一丸 之寿, 浅井 一久, 棚野 吉弘, 鴨井 博, 平田 一人 COPD 患者における運動耐容能と Impulse Oscillation System(IOS)のパラメータとの関係についての検討 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 2013 年 4 月 19 日~21 日 東京

中井 俊之, 香川 直美, 杉山 由香里, 井尻尚樹, 山本 典雄, 玉垣 学也, 吉井 直子, 梅川 加奈子, 今橋 由美子, 永田 光里, 松浦邦臣, 光岡 茂樹, 棚野 吉弘, 浅井 一久, 木村 達郎, 鴨井 博, 吉村 成央, 金澤 博, 工藤 新三, 平田 一人 当院にて施行された CT ガイド下肺生検 92 例の検討 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 2013 年 4 月 19 日~21 日 東京

松浦 邦臣, 光岡 茂樹, 浅井 一久, 棚野吉弘, 木村 達郎, 吉村 成央, 鴨井 博, 金澤博, 工藤 新三, 平田 一人 当院における肺非結核性抗酸菌症に対する現状ならびに今後の課題 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 2013 年 4 月 19 日~21 日 東京

井尻 尚樹, 棚野 吉弘, 吉井 直子, 玉垣学也, 今橋 由美子, 浅井 一久, 鴨井 博, 金澤 博, 平田 一人 当院 COPD 患者における GOLD 2011 の総合的評価方法のカテゴリ分類における検討 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 2013 年 4 月 19 日~21 日 東京

〔図書〕(計 1 件)

浅井 一久, 平田 一人 【呼吸器疾患-state of arts Ver.6】 (第 4 章)主要疾患 病態・診断・治療 アレルギー性肺疾患 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 医学のあゆみ別冊呼吸器疾患-state of arts Ver.6 医歯

薬出版 2013 520(pp.249-251)

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅井 一久 (ASAI Kazuhisa)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
研究者番号: 10382053

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし