

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670610

研究課題名(和文)急性肺障害に対する遺伝子修飾骨髄由来間葉系幹細胞の全身投与による治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment method by whole body administration of gene modification BM-MSK in acute lung injury

研究代表者

田中 良 (TANAKA, Makoto)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：00460361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患はタバコ煙等の有害物質を長期間吸入暴露することで生じる肺の慢性炎症性疾患で、進行性の不可逆的閉塞性換気障害で定義される。RAGEは、糖尿病性血管傷害における最終糖化産物の細胞膜受容体として発見され、炎症を惹起・増幅する。今回、ヒト肺組織におけるRAGE蛋白の発現解析により、COPDの発症と進展における関与の解明を目指し、I型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージにおける発現を半定量解析しI型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージにおいてRAGEの発現が亢進していることが判明した。また、一秒率とは負の相関を示し、喫煙指数との関連は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a smoking-induced chronic inflammatory disease characterized with irreversible airway obstruction. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) was found as a membranous receptor of advanced glycation end products in diabetic vascular damage, and has been revealed an important role in the initiation and amplification of chronic inflammation by binding multiple ligands. Expression of RAGE in the lung of COPD was analyzed semi-quantitatively in order to elucidate its role in the pathogenesis and progression of COPD. Results: Signal intensities of RAGE of type 1 alveolar cells and alveolar macrophage were significantly increased in COPD group compared with those in non-COPD group. Those signal intensities of RAGE correlated negatively with forced expiratory volume in one second. RAGE expression was not associated with smoking index.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：RAGE COPD HMGB-1 AGEs

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症、ショック、重症外傷では多臓器不全が合併し、急性肺傷害 acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS)が主な死因となる。ALI/ARDSの発症に関する血管内皮、肺胞上皮細胞や免疫系細胞の役割が近年明らかになってきた。治療に関して、これまでステロイドをはじめとする多くの薬剤が試みられてきた。しかし、現在、持続性陽圧呼吸で対処する以外に有効な手段がなく、ALI/ARDS発症の分子機構に基づいた新たな発症による治療法の確立が切望されている。

近年の幹細胞研究の進展により、ALI/ARDSに対する骨髄由来組織幹細胞 (ex vivo extended BM-MSC)の経静脈投与が動物実験レベルで行われ、有効性が示唆されている (Gotts JE et al, Crit Care Clin 2011)。BM-MSCはallogenic transplantationでも拒絶反応が無く、細胞治療の有用な候補となりうる (Mac Sweeney R et al, Thorax, 2012)。BM-MSCにALI/ARDS発症に関わる有望遺伝子の発現修飾を加えることで治療効率がさらに高められる可能性が予想される。

アクアポリン aquaporin (AQP)は水分子に対する特異的細胞膜チャネルであり、特にAQP1は血管内皮細胞の透過性調節と血管新生において主要な役割を演じている (Saadoun S, Nature 2005)。Receptor for advanced glycation end products (RAGE)も肺組織 (血管内皮、肺胞上皮細胞)で高発現する多機能分子で、RAGE自身はALI/ARDSでHMGB-IやNFκを介してproinflammatoryに働くが、可溶性亜型 (sRAGE)は抑制的作用を有す

ることが報告されている (Guo WA et al, Intensive Care Med 2012)。

## 2. 研究の目的

ALI/ARDSに対するBM-MSCの傷害血管保護・修復促進機能に着目した新規治療法の確立

## 3. 研究の方法

Lipopolysaccharide (LPS)経静脈投与によるラットALI/ARDSモデルを用い、AQP1遺伝子導入・sRAGE遺伝子導入・AQP1およびsRAGE遺伝子導入モデルラットを用い、BM-MSCのALI/ARDS制御に関わる分子機構の解明を行う予定であった。

BM-MSC細胞の分離・培養をウサギモデルで試みたが、十分な量の細胞の分離・培養ができず、AQP1およびsRAGE遺伝子導入モデルの確立に至らなかった。

そのため、RAGEおよびそのリガンドのヒト肺・COPD肺に及びす影響についての調査に切り替えることとした。

一秒率70%未満の患者をCOPD群、70%以上を対照群とした。COPD群37症例と対照群36症例の外科的切除肺組織を対象とした。抗RAGE抗体・抗AGEs抗体・抗HMGB-1抗体による免疫染色を施し、I型肺胞上皮細胞(ATI)、細気管支粘膜上皮細胞(BE)、肺胞マクロファージ(PM)における発現を画像解析ソフトImage Jを用いて半定量解析し、Signal Intensity (SI)と定義し、閉塞性換気障害の有無、一秒率、喫煙指数との関係を検討した。平均値の差の検定にはt検定を、相関の有無の評価にはスピアマン順位相関係数 (Spearman correlation coefficient; SpCC)を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) RAGE 発現について

###### 喫煙指数と SI of RAGE の関連性

喫煙指数と SI of RAGE の相関の有無を SpCC を用い検討した。 型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージにおける SpCC は、各々、-0.047、-0.056、0.156 といずれの細胞群においても喫煙指数と SI of RAGE 間には有意な相関を認めなかった (図 1、表 1 )

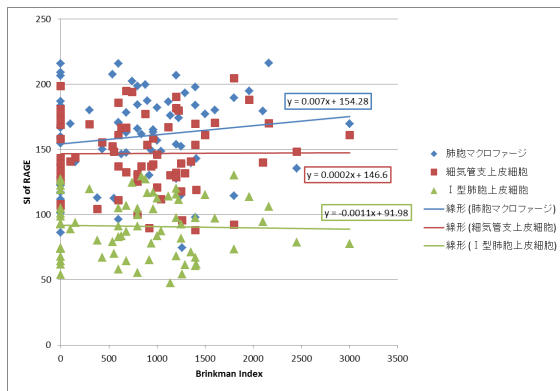


図 1 喫煙指数と SI of RAGE の関係

表 1 喫煙指数と SI of RAGE の SpCC

	SpCC	p value
BE	-0.026	p>0.1
ATI	-0.036	p>0.1
MP	0.138	p>0.1

###### 一秒率と SI of RAGE の関連性

一秒率と SI of RAGE の相関の有無を検討した。 型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージにおける SpCC は、各々、-0.2359、-0.0293、-0.270 であり、 型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおいて、一秒率と SI of RAGE の間に負の相関を認めた (図 2、表 2 )

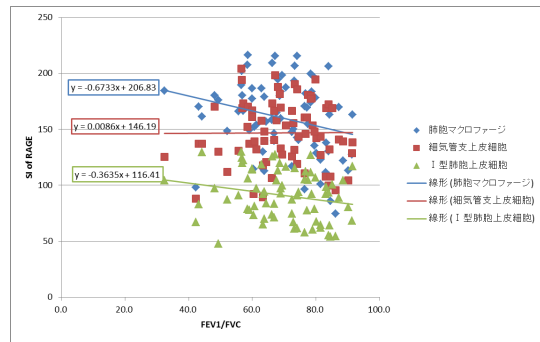


図 2 一秒率と SI of RAGE の関係

表 2 一秒率と SI of RAGE の SpCC

	SpCC	p value
BE	-0.029	p>0.1
ATI	-0.236	p<0.05
MP	-0.270	p<0.05

###### COPD の有無と SI of RAGE の関連性

COPD 群と対照群において SI of RAGE を比較した。細気管支上皮細胞において p=0.96 で差を認めなかったが、型肺胞上皮細胞において p=0.025、肺胞マクロファージにおいて p=0.043 であり、COPD 群において有意に SI of RAGE が高い結果となった (表 3 )

表 3 COPD の有無と SI of RAGE の関係

	COPD+	COPD-	p value
BE	147.0 ± 30.0	146.6 ± 27.2	0.960
ATI	96.8 ± 21.3	85.3 ± 21.6	0.025
MP	167.8 ± 29.3	151.9 ± 36.4	0.043

##### (2) AGEs および HMGB-1 発現について

###### 喫煙指数と SI of AGEs および SI of HMGB-1 の関連性

喫煙指数と SI of AGEs およびの SI of HMGB-1 相関の有無を SpCC を用い検討した。結果を図 3・図 4 および表 4・表 5 に示す。いずれの細胞群においても喫煙指数と SI of AGEs およびの SI of HMGB-1 間には有意な相関を認めなかった。

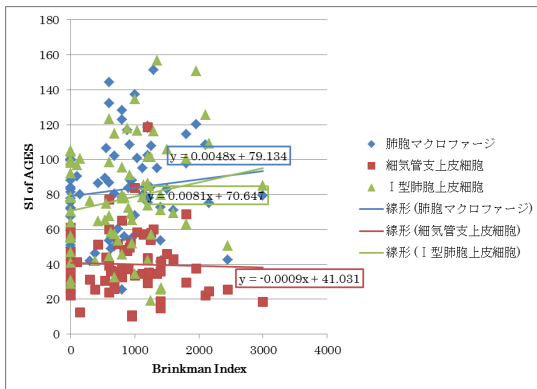


図3 喫煙指数と SI of AGEs の関係

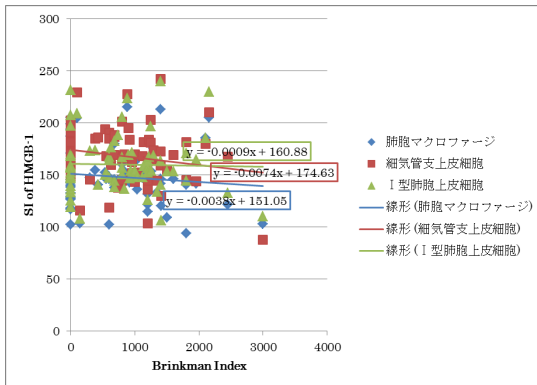


図4 喫煙指数と SI of HMGB-1 の関係

表4 喫煙指数と SI of AGEs の SpCC

	SpCC	p value
BE	-0.159	p>0.1
ATI	0.184	p>0.1
MP	0.108	p>0.1

表5 喫煙指数と SI of HMGB-1 の SpCC

	SpCC	p value
BE	-0.163	p>0.1
ATI	0.0142	p>0.1
MP	-0.028	p>0.1

一秒率と SI of AGEs および SI of HMGB-1 の関連性

一秒率と SI of AGEs および SI of HMGB-1 の相関の有無を検討した。結果を図5・図6および表6・表7に示す。いずれの細胞群においても一秒率と SI of AGEs およびの SI of HMGB-1 間には有意差を認めなかった。

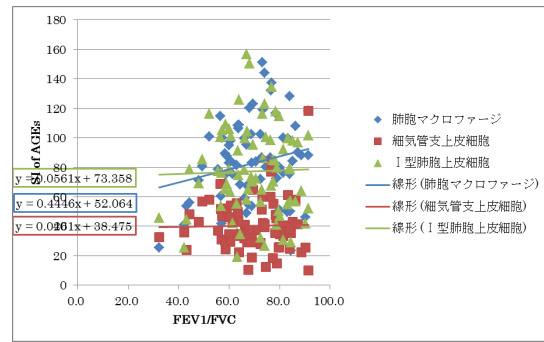


図5 一秒率と SI of AGEs の関係

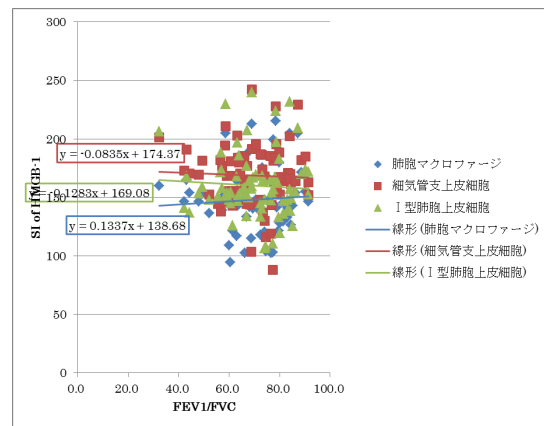


図6 一秒率と SI of HMGB-1 の関係

表6 一秒率と SI of AGEs の SpCC

	SpCC	p value
BE	0.00198	p>0.1
ATI	-0.207	0.1>p>0.05
MP	-0.0934	p>0.1

表7 一秒率と SI of HMGB-1 の SpCC

	SpCC	p value
BE	-0.034	p>0.1
ATI	-0.064	p>0.1
MP	0.021	p>0.1

COPDの有無と SI of AGEs および SI of HMGB-1 の関連性

COPD群と対照群において SI of AGEs および SI of HMGB-1 を比較した。結果を表8・表9に示す。いずれの細胞群においても COPDの有無と SI of AGEs およびの SI of HMGB-1 間には有意差を認めなかった。

表 8 COPD の有無と SI of AGEs の関係

	COPD+	COPD-	P value
BE	39.31 ± 12.97	41.30 ± 21.22	0.630
ATI	79.38 ± 30.86	75.08 ± 28.98	0.542
MP	79.07 ± 24.96	87.06 ± 30.50	0.224

表 9 COPD の有無と SI of HMGB-1 の関係

	COPD+	COPD-	P value
BE	167.42 ± 24.89	167.67 ± 28.33	0.780
ATI	164.43 ± 25.04	155.74 ± 28.76	0.172
MP	147.14 ± 24.38	148.86 ± 28.70	0.783

今回の研究により、COPD 肺での I 型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおける RAGE 発現の亢進が明らかとなり、それらの閉塞性換気障害の進行への寄与を支持する所見が得られた。

#### 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 1 件)

田中 良. 慢性閉塞性肺疾患における Receptor for advanced glycation end products 蛋白の発現. 金医大誌 39: 18-25, 2014. (査読有)

[学会発表](計 1 件)

ERS international congress 2014, Increased expression of receptor for advanced glycation end products in COPD 田中 良, 2014年9月6日~10日、ミュンヘン(ドイツ)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 良 (TANAKA, Makoto)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00460361