

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860652

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患における27-hydroxycholesterolの役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of 27-hydroxycholesterol in chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

菊池 崇史(Kikuchi, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40649050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では27-hydroxycholesterol (27-OHC)が肺線維芽細胞においてMMP-2およびMMP-9の産生亢進作用を有しており、これは窒素化ストレスによるNF- κ Bの活性化とそれに引き続くTGF- β 1の産生亢進を介していること、COPD由来の肺線維芽細胞では27-OHCによるMMPs産生亢進作用がより亢進していることを示した。27-OHCによるプロテアーゼ産生亢進作用および窒素化ストレス増強作用を示したのは本研究が初めてであり、27-OHCが今後COPDの病勢を反映する新たなバイオマーカーおよび新たな治療ターゲットとなっていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We showed that 27-hydroxycholesterol (27-OHC) augmented the release of MMP-2 and MMP-9 in lung fibroblasts. 27-OHC-augmented MMPs release was promoted by nitrosative-stress-mediated NF- κ B activation and subsequent TGF- β 1 release. Diseased human lung fibroblasts from patients with COPD were significantly more susceptible for the 27-OHC-induced release of MMPs than normal adult human lung fibroblasts. This is the first report that showed 27-OHC augmented MMPs release and nitrosative stress. 27-OHC has the potential to be the original biomarker and therapeutical target of COPD.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

27-hydroxycholesterol (27-OHC)はコレステロールの酸化物であり、胆汁酸の合成過程における中間産物として産生される。27-OHCはこれまでに様々な細胞において種々の生物活性を有していることが報告されている。一方で慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) と27-OHCの関連について検討した報告はこれまでに無く、COPDの病態における27-OHCの役割は不明である。

2. 研究の目的

以前我々は27-OHCが、COPDの病態を形成する病理学的変化の一つである末梢気道の線維化を介してCOPDの病態に関与している可能性を示した。一方で、COPDの病態を形成する病理学的変化としては肺胞破壊も重要であるが、27-OHCが肺胞破壊に関与しているか否かについては未だ不明である。今回、我々は27-OHCの肺胞破壊への関与について肺の主要な構成細胞の一つである線維芽細胞を用いて明らかにすることを本研究の目的とした。

COPDの病態形成には窒素化ストレスの関与がよく知られている。一方で、27-OHCと窒素化ストレスの関連については今まで報告が無い。27-OHCがCOPDの病態形成に関与するに辺り、窒素化ストレスを介しているか否かについて検討することも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究にはヒト胎児肺線維芽細胞 (human fetal lung fibroblasts: HFL-1) の細胞株、および市販されている健常者由来の肺線維芽細胞 (Normal adult lung fibroblasts: NHLF) と COPD 患者由来の肺線維芽細胞 (Diseased human lung fibroblasts from patients with COPD: DHLF-COPD) を使用した。

27-OHC がプロテアーゼ・アンチプロテアーゼの不均衡に与える影響についての検討

HFL-1 を種々の濃度の27-OHCで刺激した際に、代表的なプロテアーゼである matrix metalloproteinases (MMPs) の産生が亢進するか否かについて検討するために、MMP-2 および MMP-9 の産生を gelatin zymography で測定した。また、アンチプロテアーゼの産生低下に与える影響も明らかにするために、細胞上清中の tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)濃度を ELISA で検討した。

27-OHC がプロテアーゼ・アンチプロテアーゼに与える影響のシグナル経路についての検討

以前我々は27-OHCが肺線維芽細胞におい

て NF- κ B p65 蛋白の核内移行を促進し、引き続き TGF- β 1 の産生が亢進することを示している。27-OHC が MMPs 産生に与える影響において、これらのシグナル経路が関与しているか否かについて検討を行った。NF- κ B の阻害剤、TGF- β 1 の中和抗体をそれぞれ前投与した際に、MMPs の産生がいかに変化するのか gelatin zymography で検討を行った。

27-OHC がプロテアーゼ・アンチプロテアーゼに与える影響と窒素化ストレスの関与についての検討

HFL-1 を種々の濃度の27-OHCで刺激した際に、窒素化ストレスが亢進するか否かについて検討を行った。Nitric oxide (NO) の産生を diaminofluorescein-2 (DAF-2) を用いて検討し、NO の合成酵素である nitrogen oxide synthase 2 (NOS2) の活性および NO の footprint である 3-nitrotyrosine の産生を western blot で測定した。

さらに、窒素化ストレスが上述のシグナル経路とどのように関与しているか検討するため、活性窒素種の scavenger である ebselen を前投与した際に NF- κ B の活性、TGF- β 1 の産生、MMPs の産生がどう変化するのかそれぞれ検討を行った。

健常肺および COPD 肺における 27-OHC 刺激に対する反応の差異についての検討

NHLF および DHLF-COPD を種々の濃度の27-OHCで刺激し、MMPs 産生について gelatin zymography で検討を行った。

4. 研究成果

27-OHC がプロテアーゼ・アンチプロテアーゼの不均衡に与える影響についての検討

HFL-1 を27-OHCで刺激したところ、濃度依存性に latent form (10^{-7} M で1.7倍、 $p < 0.01$ 、図1A, B), active form (10^{-7} M で3.5倍、 $p < 0.01$ 、図1A, C) の MMP-2 および latent form (10^{-7} M で3.7倍、 $p < 0.01$ 、図1A, D), active form (10^{-7} M で2.6倍、 $p < 0.01$ 、図1A, E) の MMP-9 の有意な上昇を認めた。TIMP-1 の活性には有意な変化を認めなかった (図1F)。

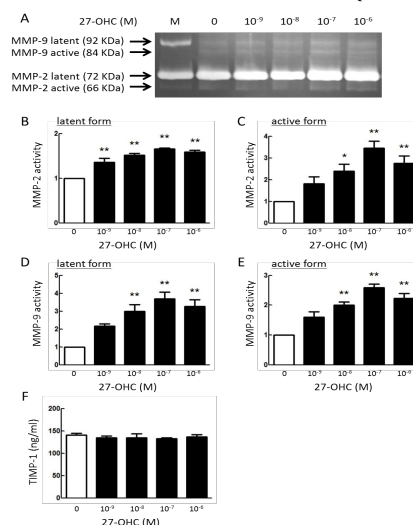


図1. 27-OHC が肺線維芽細胞における MMP-2、MMP-9 産生および TIMP-1 活性に与える影響

27-OHC がプロテアーゼ・アンチプロテアーゼに与える影響のシグナル経路についての検討

HFL-1 に抗 TGF- β 抗体の前投与を行い、27-OHC で刺激したところ、27-OHC 刺激による latent form ($p < 0.01$, 図 2A, B), active form ($p < 0.01$, 図 2A, C) の MMP-2 および latent form ($p < 0.01$, 図 2A, D), active form ($p < 0.01$, 図 2A, E) の MMP-9 の産生上昇が抑制された。我々の以前の検討で、27-OHC が NF- κ B の活性化に引き続き TGF- β 1 の産生を亢進させた結果も踏まえると、27-OHC は肺線維芽細胞において NF- κ B の活性化に引き続き TGF- β 1 の産生亢進を介して MMPs の産生を促している可能性が示唆された。

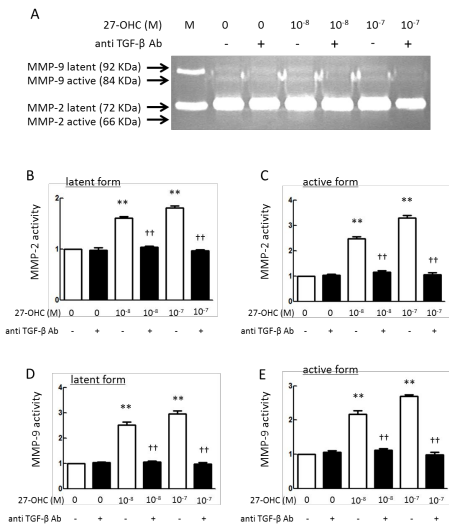


図2. 抗 TGF- β 抗体が肺線維芽細胞における 27-OHC による MMPs の産生亢進に与える影響

27-OHC がプロテアーゼ・アンチプロテアーゼに与える影響と窒素化ストレスの関与についての検討

HFL-1 を 27-OHC で刺激したところ、濃度依存性に NO の放出 (10⁻⁷ M, $p < 0.01$, 図 3A), NOS-2 の誘導 (10⁻⁷ M, $p < 0.01$, 図 3B), 3-nitrotyrosine の形成 (10⁻⁷ M, $p < 0.01$, 図 3C) がそれぞれ増強された。

活性窒素種の scavenger である ebselen を HFL-1 に前投与し、27-OHC で刺激したところ、27-OHC により増強されていた NF- κ B p65 蛋白の核内移行 ($p < 0.01$, 図 4A), TGF- β 1 の産生 ($p < 0.01$, 図 4B), MMPs の産生 ($p < 0.01$, 図 5) はいずれも抑制された。以上の結果から、27-OHC が肺線維芽細胞において窒素化ストレスを増強させることで NF- κ B の活性化とそれに引き続き TGF- β 1 の産生亢進を引き起こし、MMPs の産生亢進に関与している可能性が示唆された。

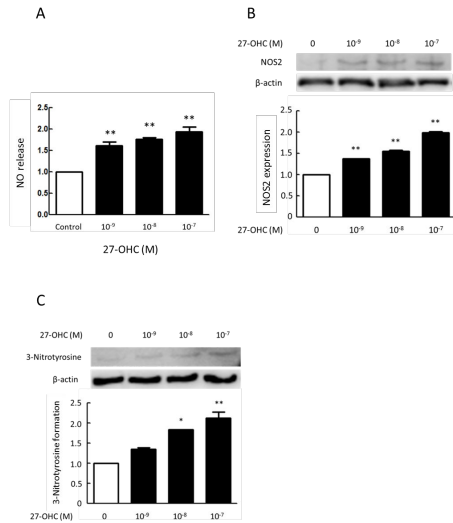


図3. 27-OHC が肺線維芽細胞における NO の放出、NOS-2 の誘導、3-nitrotyrosine の形成に与える影響

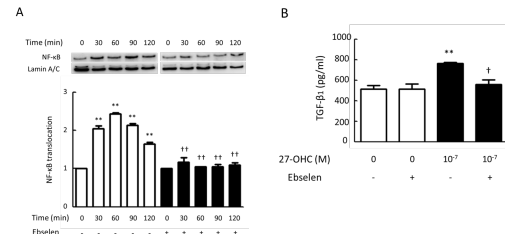


図4. Ebselen が肺線維芽細胞における 27-OHC による NF- κ B の活性化、TGF- β 1 の産生亢進に与える影響

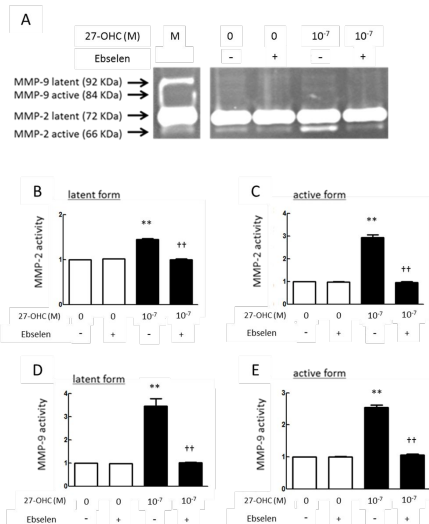


図5. Ebselen が肺線維芽細胞における 27-OHC による MMPs の産生亢進に与える影響

健康肺および COPD 肺における 27-OHC 刺激に対する反応の差異についての検討

NHLF を 27-OHC で刺激したところ、濃度依存性に latent form (10⁻⁷ M で 2 倍, $p < 0.01$,

図 6A, B), active form (10^{-7} M で 2.5 倍、 $p < 0.01$ 、図 6A, C) の MMP-2 および latent form (10^{-7} M で 2.2 倍、 $p < 0.01$ 、図 6A, D), active form (10^{-7} M で 2.5 倍、 $p < 0.01$ 、図 6A, E) の MMP-9 の有意な上昇を認めた。同様に DHLF-COPD においても 27-OHC 刺激により濃度依存性に latent form (10^{-7} M で 2.5 倍、 $p < 0.01$ 、図 6F, G), active form (10^{-7} M で 3 倍、 $p < 0.01$ 、図 6F, H) の MMP-2 および latent form (10^{-7} M で 2.8 倍、 $p < 0.01$ 、図 6F, I), active form (10^{-7} M で 3.2 倍、 $p < 0.01$ 、図 6F, J) の MMP-9 の有意な上昇を認めた。

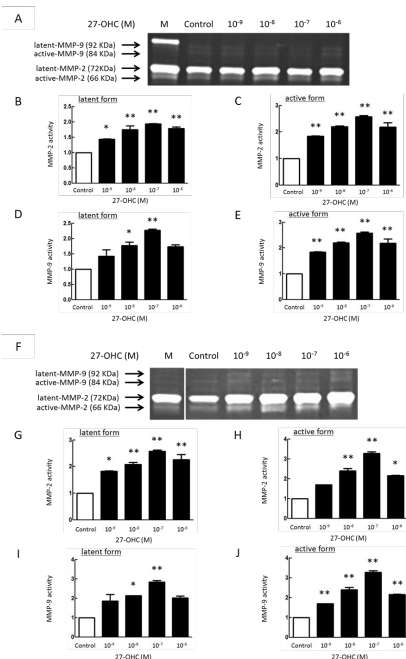


図 6 . 27-OHC が健常肺および COPD 肺の肺線維芽細胞における MMP-2、MMP-9 産生に与える影響

同一のコントロールを用いて、 10^{-7} M の 27-OHC 刺激による MMPs 産生亢進を NHLF と DHLF-COPD とで比較したところ、active form の MMP-2 では有意差を認めなかったが、latent form の MMP-2 (1.9 倍、 $p < 0.01$ 、図 7A, B) および latent form (1.4 倍、 $p < 0.01$ 、図 7A, D), active form (1.6 倍、 $p < 0.05$ 、図 7A, E) の MMP-9 では NHLF よりも DHLF-COPD の方が 27-OHC に対する感受性が高かった。

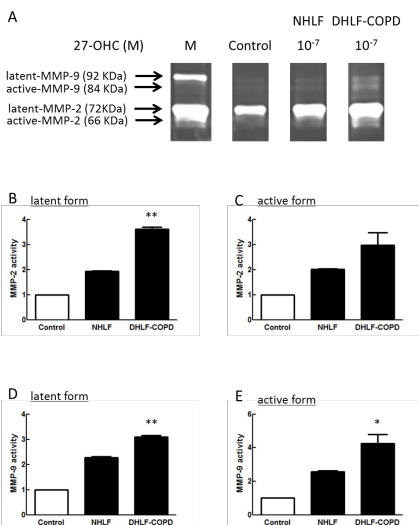


図 7 . NHLF および DHLF-COPD の 27-OHC 刺激による MMPs 産生亢進の差異

以上に示した結果から、本研究では 27-OHC が肺線維芽細胞に対して MMP-2 および MMP-9 の産生亢進作用を有しており、これは窒素化ストレスによる NF- κ B の活性化とそれに引き続く TGF- β 1 の産生亢進を介していること、COPD 由来の肺線維芽細胞では 27-OHC による MMPs 産生亢進作用がより亢進していることを証明した。27-OHC によるプロテアーゼ産生亢進作用および窒素化ストレス増強作用を示したのは本研究が初めてである。以前に我々が発表した 27-OHC の肺線維芽細胞における線維化増強作用と併せて考えると、27-OHC は COPD の病態形成において非常に重要な役割を演じていることが予想され、今後 COPD の病勢を反映する新たなバイオマーカーおよび新たな治療ターゲットとなっていくことが期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Takashi Kikuchi, Nitrosative-stress-mediated promotional effect of 27-hydroxycholesterol in the release of matrix metalloproteinases by lung fibroblasts, Congress of the Asian Pacific society of respirology, 2015 年 12 月 5 日、Kuala Lumpur (Malaysia)

菊池 崇史, 27-hydroxycholesterol が肺線維芽細胞における matrix metalloproteinase 産生に与える影響についての検討, 第 16 回 IREF, 2014 年 8 月 23 日、ロイヤルオークホテル (滋賀県大津市)

Takashi Kikuchi, Promotional effect of 27-hydroxycholesterol in the release of matrix metalloproteinases by lung fibroblasts, ERS ANNUAL CONGRESS 2013, 2013 年 9 月 10 日、Barcelona (Spain)

菊池 崇史, 27-hydroxycholesterol が肺線維芽細胞における matrix metalloproteinase 産生に与える影響についての検討, 第 53 回日本呼吸器学会学術集会, 2013 年 4 月 21 日、東京国際フォーラム (東京都)

[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：
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

菊池 崇史 (KIKUCHI, Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：40649050

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：