

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461177

研究課題名(和文)鉄過剰・欠乏状態が実験肺気腫形成に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文)Effect of iron deficiency on animal model of pulmonary emphysema

研究代表者

柴田 陽光 (SHIBATA, Yoko)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：60333978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙耐性に血清鉄が関連していることが報告されている。血清鉄低値は喫煙による急速呼吸機能減衰と関連することも知られている。本研究においては、何故、血清鉄低値が呼吸機能の低下をもたらすのかを、喫煙曝露マウス肺気腫モデルにて検討した。マウスに鉄欠乏食を投与した後、マウスに喫煙曝露装置にて2週間喫煙曝露を行ったところ、鉄欠乏食摂取群では通常食摂取群に比して肺胞マクロファージの有意な集積が観察された。また、両群のマウスに8週間喫煙曝露を行い、呼吸機能検査ならびに肺摘出/病理標本作成を行い、肺気腫形成を評価したところ、鉄欠乏食群で通常食群よりも肺気腫形成が進展していることが理解された。

研究成果の概要(英文)：Serum iron is reportedly related to smoking tolerance. It is also known that low serum iron levels are associated with rapid decline in respiratory function due to smoking. In this study, we investigated the mechanism why low level of serum iron leads to a decline in respiratory function in the smoke-exposed mouse emphysema model. After administering an iron deficient diet to mice, smoking exposure was carried out on the mice for two weeks using a smoking exposure apparatus. In bronchoalveolar lavage analysis, significant accumulation of alveolar macrophages was observed in the iron deficient food intake group as compared with the normal food ingestion group. Next, after the mice in both groups were exposed to smoking for 8 weeks, respiratory function tests and pathological examinations were performed to evaluate emphysema formation. Emphysema formation progressed in the iron deficient diet group compared to the normal diet group.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 肺気腫 鉄 たばこ

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、長期間のたばこ煙吸入によって惹起される。本邦には約 500 万人の患者が潜在すると見積もられており、その予防の重要性が叫ばれている。しかし、多くの患者は疾患を認知しておらず、病期が進行するまで喫煙をつづけ、最終的には重症化してから長時間作動型気管支拡張剤を用いた治療が開始されることが多い。これまで COPD の病因を探究するために、genome wide association study (GWAS) が行われた。その結果いくつかの疾患原因候補遺伝子が発見されている (FAM13A, HHIP, AGER, CYP2A6 など)。しかし、COPD は喫煙習慣を主な原因とする多因子生活習慣病であり、それらの候補遺伝子の保持は単独では疾患発症リスクを僅かしか増加させないことが知られている。COPD 患者の中には、禁煙後も呼吸機能低下が進行する症例も認めるため、疾患の早期にどのような患者が将来的に呼吸機能減少が進行してゆくのかを見極めるバイオマーカーの開発が急務である。さらにはそのバイオマーカーの疾患における病的意義の確立も必須である。しかし、GWAS から同定された遺伝子型の検査が疾患のバイオマーカーになり得るかは、費用対効果の面から厳しいと言わざるを得ない。異なったアプローチによるバイオマーカーの確立が必要である。

山形大学では 21 世紀 COE とグローバル COE プログラムの一環として、山形県高島町の一般住民を対象に、2004 年から 2006 年までの住民健康診断の際に約 3000 名の地域住民に対して呼吸機能検査を行った。病院を基盤として行われる研究と異なり、一般住民検診というフィールドで行われる疫学研究は多くの利点を有している。そのひとつは病院には通常訪れないような、健康な対象や疾患のごく早期の患者が多数登録されることである。そしてこれまでに高島研究から一般住民喫煙継続者において、いくつかの呼吸機能急速悪化予測因子を見出したが、その中でも通常の病院を基盤にした研究では行えない手法で、“血清鉄”というバイオマーカーに辿りついた。従来疾患関連因子を模索する際には、通常は疾患が進行している症例群からそれを探しだしてゆく。高島研究では長期間喫煙吸入 (30 pack-years 以上、喫煙年数 30 年以上) を続けてきた 70 歳以上の高齢者のうち、呼吸機能が障害されている“喫煙感受性群” (FEV1/FVC < 0.7 あるいは FEV1% 予測値 < 80%) と保持されている“喫煙耐性群” (FEV1/FVC ≥ 0.7 かつ FEV1% 予測値 ≥ 80%) を抽出することが可能であった。この 2 群を比較したところ、**血清鉄のみが 2 群間で有意差があり、喫煙耐性群で高値であるこ**

とを見出した (耐性群 121.6 ± 38.7 vs. 感受性群 107.8 ± 47.7 P = 0.016、Shibata Y PLOS One 2013)。血清鉄は高島研究男性全症例の解析において呼吸機能検査値 (FEV1% 予測値、FEV1/FVC) と有意な正相関を示し、喫煙継続男性では FEV1 急速低下群を予測する因子であることが示され、総喫煙曝露量などの交絡因子から独立していた。

すなわち、これまでの我々の報告から、血清鉄が高い男性喫煙者は、喫煙を続けても呼吸機能が保持される傾向があり、逆に血清鉄が低い男性喫煙者ほど、呼吸機能低下が急速に進行してゆくということが疫学的に示された。よって、血清鉄濃度測定を喫煙者に行うことで、将来的な呼吸機能の急速悪化者を判別することが可能になるかも知れず、安価で有用なバイオマーカーになることが期待できる。しかし、これまでに喫煙と体内の鉄代謝・動態に関する報告は極めて少なく、重点的な研究が必要である。

2. 研究の目的

以上の背景から「鉄は喫煙関連肺疾患の病態にどのような影響を与えているのか。」「鉄過剰状態もしくは欠乏状態は喫煙関連疾患の進行に影響をあたえるのか。」という疑問が生じてくる。そこで、喫煙肺疾患の代表的な動物モデルであるマウスへの長期喫煙曝露を鉄欠乏状態で施行し、その肺組織的・機能的変化を解析することで、この疑問に対する答えを模索することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

鉄欠乏状態による肺の鉄代謝因子の影響
4~6 週齢の雄の C57BL/6J マウスに鉄欠乏食 (ID) とコントロール食 (CO) を 2 週間投与し、臓器摘出を行い、total RNA を抽出し、RT-PCR を施行した。

鉄欠乏状態がリポポリサッカライド (LPS) 誘発急性肺障害に及ぼす影響

4~6 週齢の雄の C57BL/6J マウスに鉄欠乏食 (ID) とコントロール食 (CO) を 2 週間投与した後、LPS を経鼻的に投与し、24 時間後に気管支肺胞洗浄 (BAL) ならびに臓器摘出・病理標本作成を行った。

鉄欠乏状態下での喫煙曝露の影響

4~6 週齢の雄の C57BL/6J マウスに鉄欠乏食 (ID) とコントロール食 (CO) を 3 週間投与した。その後喫煙曝露 (CS) を 2 週間行い、血液採取および気管支肺胞洗浄を行った。また、両群に 8 週間喫煙曝露を行い、BAL、呼吸機能検査ならびに臓器摘出・病理標本作成を行い肺気腫形成の差異を比較した。

4. 研究成果

鉄欠乏状態による肺の鉄代謝因子の影響
 肝臓において、鉄欠乏食によって TIR 発現が
 増加し、hepcidin 発現が減少していたのに対
 して、肺ではこれらの遺伝子発現に変化は認
 めなかった。

すなわち、鉄欠乏状態における生体の反応は、
 臓器ごとに異なっている可能性が示唆され
 た。

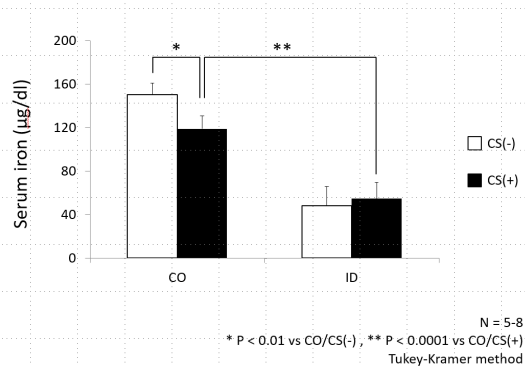
鉄欠乏状態がリポポリサッカライド(LPS)
 誘発急性肺障害に及ぼす影響

鉄欠乏食投与マウスとコントロールマウス
 では LPS 投与後の BAL 細胞の集積に変化は
 認めず、BAL 液中の総蛋白質濃度ならびに
 TNF-alpha 濃度に変化を認めなかった。肺組
 織による、急性肺障害を Lung injury score で
 評価しても、両群で差を認めなかった。しか
 し、LPS を腹腔内投与したところ、鉄欠乏食
 群で、生存の改善が認められた。

鉄欠乏状態下での喫煙曝露の影響

ID 群は CO 群と比べ、血清鉄が低下してい
 た(図1)

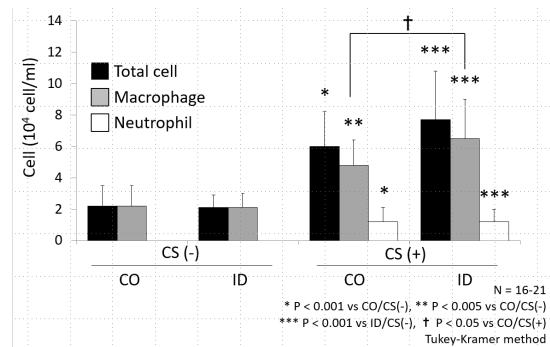
図1



同様にヘモグロビン濃度も ID 群で低下し
 ていた(CO 無刺激: 12.3 ± 0.6 g/dL vs ID 無刺
 激: 10.2 ± 1.0 g/dL, P < 0.01)。また CO 群では
 喫煙曝露により有意なヘモグロビン濃度増
 加 (13.3 ± 0.4 g/dL, P < 0.05) と血清鉄低下
 (118.9 ± 12.0 µg/dL, P < 0.01)を認めたが、ID
 群では有意差を認めなかった(ヘモグロビ
 ン: 10.2 ± 1.3 g/dL, 血清鉄: 54.5 ± 15.1 µg/dL)。
 気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞は喫煙曝
 露により増加し(総細胞 CO 無刺激: 2.23 ±
 1.27 × 10⁴/mL vs 総細胞 CO 喫煙: 6.02 ± 2.18
 × 10⁴/mL, P < 0.05, 総細胞 ID 無刺激: 2.12 ±
 0.85 × 10⁴/mL vs 総細胞 ID 喫煙: 7.74 ± 3.08
 × 10⁴/mL, P < 0.001) マクロファージ (CO 無
 刺激: 2.22 ± 1.25 × 10⁴/mL vs CO 喫煙: 4.78 ±
 1.59 × 10⁴/mL, P < 0.01, ID 無刺激: 2.11 ± 0.85
 × 10⁴/mL vs ID 喫煙: 6.47 ± 2.55 × 10⁴/mL, P <
 0.001) 好中球 (CO 無刺激: 0.02 ± 0.04
 × 10⁴/mL vs CO 喫煙: 1.19 ± 0.94 × 10⁴/mL, P <
 0.05, ID 無刺激: 0.00 ± 0.01 × 10⁴/mL vs ID 喫
 煙: 1.15 ± 0.78 × 10⁴/mL, P < 0.001)とも有意に
 増加していた(図2)。特に ID 群では CO 群
 と比べ、マクロファージの上昇が有意であっ

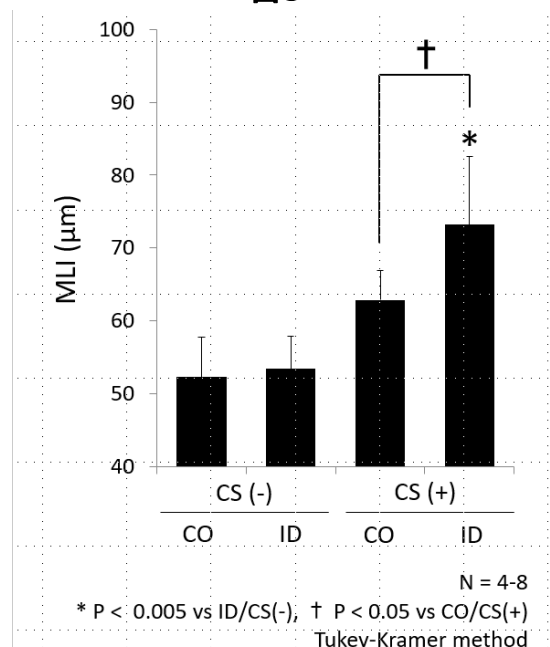
た(CO 喫煙: 4.78 ± 1.59 × 10⁴/mL vs ID 喫煙:
 6.47 ± 2.55 × 10⁴/mL, P < 0.05) (図2)。また
 BALF 中の interleukin-6 (CO 無刺激: 72.1 ±
 39.5 pg/mL, ID 無刺激: 52.9 ± 29.8 pg/mL, CO
 喫煙: 82.3 ± 56.2 pg/mL, ID 喫煙: 113.3 ± 94.8
 pg/mL) と、monocyte chemoattractant protein-1
 (CO 無刺激: 21.5 ± 12.8 pg/mL, ID 無刺激:
 15.3 ± 10.7 pg/mL, CO 喫煙: 32.8 ± 16.6 pg/mL,
 ID 喫煙: 40.6 ± 29.7 pg/mL) は ID 群のみで、
 有意な喫煙曝露による増加が認められた。

図2



以上より、マウスにおいて血清鉄低値は、
 喫煙曝露時のマクロファージの肺への集積
 を亢進することが示された。マクロファージ
 から分泌されるマトリックスメタロプロテ
 アーゼなどはCOPD発症に重要な役割を演じ
 ていることが知られており、血清鉄低値による
 マクロファージ有意の気道炎症が亢進する
 ことは、喫煙者における FEV1 低下に血清
 鉄動態が関連している可能性を強く示唆す
 るものと考えられた。

図3



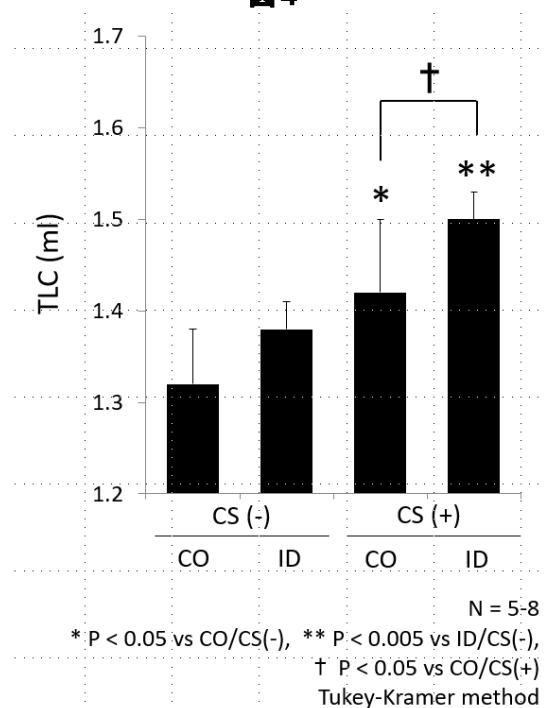
さらに、鉄欠乏食およびコントロール食を
 与えながら、喫煙曝露を8週間施行した。鉄
 欠乏食喫煙曝露マウスとコントロール食喫
 煙曝露マウスで、肺組織における mean linear

intercept を比較したところ鉄欠乏食喫煙曝露群で有意に増大していた(図3)。さらに、マウス呼吸機能検査装置を用いて総肺気量を測定したところ、鉄欠乏食喫煙曝露群にてこれらの有意な増大が観察された(図4)。

鉄欠乏食喫煙曝露マウスにおいては、気道上皮における hypoxia inducible factor-alpha (HIF1alpha)の発現が亢進していることが、免疫染色にて確認された。

すなわち、鉄欠乏状態がマウスの気腫化肺形成を促進していることが証明され、その機序として低酸素ストレス応答が鉄欠乏状態では亢進していることが、何らかの役割を果たしていることが示唆された。

図4



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 13 件)

1) Honda Y, Watanabe T, Shibata Y et al., Impact of restrictive lung disorder on cardiovascular mortality in a general population: The Yamagata (Takahata) Study, **International Journal of Cardiology**, 2017

doi: 10.1016/j.ijcard.2017.04.049. 査読有

2) Inoue S, Shibata Y et al., Decreased left ventricular stroke volume is associated with low-grade exercise tolerance in patients with chronic obstructive pulmonary disease, **BMJ Open Respiratory Research**, 4, e000158, 2017. doi: 10.1136/bmjresp-2016-000158. 査読有

3) Nemoto T, Shibata Y et al., MafB enhances the phagocytic activity of RAW264.7 macrophages by promoting Fcgr3 expression, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 482, 375-381, 2017.

doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.070. 査読有

4) Kishi H, Sato M, Shibata Y et al., Role of chemokine C-C motif ligand-1 in acute and chronic pulmonary inflammations, **Springerplus**, 5, 1241, 2016. doi: 10.1186/s40064-016-2904-z. 査読有

5) Hasegawa H, Watanabe T, Shibata Y et al., The role of macrophage transcription factor MafB in atherosclerotic plaque stability, **Atherosclerosis**, 250, 133-143, 2016.

doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.021. 査読有

6) Kobayashi M, Shibata Y et al., Predictors for mortality from respiratory failure in a general population, **Scientific Reports**, 6, 26053, 2016. doi: 10.1038/srep26053. 査読有

7) Abe Y, Shibata Y et al., Reference values of MostGraph measures for middle-aged and elderly Japanese individuals who participated in annual health checkups, **Respiratory Investigation**, 54:148-155. 2016.

doi: 10.1016/j.resinv.2015.12.004. 査読有

8) Kurotani R, Shima R, Miyano Y, Sakahara S, Matsumoto Y, Shibata Y et al., SCGB3A2 inhibits acrolein-induced apoptosis through decreased p53 phosphorylation, **Acta Histochemica et Cytochemica**, 48, 61-68, 2015. doi: 10.1267/ahc.14065. 査読有

9) Inoue S, Shibata Y et al., Low arterial blood oxygenation is associated with calcification of coronary arteries in patients with chronic obstructive pulmonary disease, **Respiratory Investigation**, 53, 111-116, 2015.

doi: 10.1016/j.resinv.2015.01.002. 査読有

10) Aida Y, Shibata Y et al., Inhibition of elastase-pulmonary emphysema in dominant-negative MafB transgenic mice, **International Journal of Biological Sciences**, 10, 882-894, 2014. doi: 10.7150/ijbs.8737. 査読有

11) Sato K, Shibata Y et al., Association between plasma adiponectin levels and decline in forced expiratory volume in 1 s in a general Japanese population: the Takahata study, **International Journal of Medical Sciences**, 11, 758-764, 2014. doi: 10.7150/ijms.8919. 査読有

12) Nunomiya K, Shibata Y et al., Relationship between serum level of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 and prognosis in patients with lung cancer, **Journal of Cancer**, 5, 242-247, 2014. doi: 10.7150/jca.8486. 査読有

13) Netsu S, Honda Y, Watanabe T, Shibata Y et al., Comorbidity of airflow limitation in patients with cardiovascular disease, **Experimental and Clinical Cardiology**, 20, 3788-3800, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

1) 佐藤建人等, 鉄欠乏状態下での喫煙曝露の影響についての検討, 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会、東京国際フォーラム(東京都千代田区), 2017/4/21~23

2) Sato M et al., E-selectin as a prognostic factor of patients who hospitalized for respiratory inflammation diseases; a single institutional study, ERS International Congress 2016, London, (United Kingdom), 2016/9/3-7.

3) Sato K et al., Serum hepcidin and iron are associated with non-small cell lung cancer stage, ERS International Congress 2016, London (United Kingdom), 2016/9/3-7.

4) Sato K et al., Effect of Iron Deficiency on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury, American Thoracic Society International Conference 2016, San Francisco (America), 2016/5/13-18.

5) Sato M, et al., Prognostic Factors of Patients Who Hospitalized for COPD Exacerbation; a Single Institutional Study, American Thoracic Society International Conference 2016, San Francisco (America), 2016/5/13-18

6) Sato M et al., Localization and Expression of Fam13a and Ireb2 in Mouse Lung Tissue, American Thoracic Society International Conference 2016, San Francisco (America), 2016/5/13-18.

7) 佐藤建人等, 低欠乏状態が lipopolysaccharide 誘発急性肺障害に及ぼす影響についての検討, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、国立京都国際会館(京都府京都市), 2016/4/8~10

8) 佐藤建人等, 高齢者肺炎における血清鉄と予後の関係, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、国立京都国際会館(京都府京都市), 2016/4/8~10

9) 佐藤正道等, マウス組織肺における Ireb2 の局在と発現の検討, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、国立京都国際会館(京都府京都市), 2016/4/8~10

10) Sato K et al., Effect of iron deficiency on pulmonary iron concentration, American Thoracic Society International Conference 2015, Denver, 2015. Denver (America), 2015/5/15-20.

11) Sato M et al., Pulmonary functions of air-exposed and cigarette smoke-exposed dominant-negative MafB transgenic mice, American Thoracic Society International

Conference 2015, Denver (America), 2015/5/15-20.

12) 佐藤建人等, 鉄欠乏状態における肺の鉄代謝の解析, 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、東京国際フォーラム(東京都千代田区), 2015/4/17~19

13) Sato K et al., Association of plasma adiponectin level with pulmonary function in a general Japanese population, ERS International Congress 2014, Munich (Germany), 2014/9/6-10.

14) Sato K et al., Low grade oxygenation in arterial blood gas is associated with calcification of coronary artery in patients with chronic obstructive pulmonary disease, American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (America), 2014/5/16-21.

15) Sato M et al., The difference in the expression of Ern1 and the formation of granulomas in Spc-Ccl1 Tg mice, American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (America), 2014/5/16-21.

16) Aida Y et al., Dominant-negative MafB suppresses elastase-induced pulmonary emphysema in mouse, American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (America), 2014/5/16-21.

〔図書〕(計 1 件)

Yoko Shibata, Chapter 2 Epidemiology of COPD: Why Is the Disease So Poorly Recognized? Respiratory Disease Series: Diagnostic Tools and Disease Managements, Editor: Hiroyuki Nakamura, Kazutetsu Aoshiba, **Chronic Obstructive Pulmonary Disease A Systemic Inflammatory Disease**, p17-28, Singapore, Springer, 2017.

〔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

柴田 陽光 (SHIBATA, Yoko)

山形大学・医学部・講師

研究者番号: 60333978

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

黒谷 玲子 (KUROTANI, Reiko)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号： 00453043

阿部 修一 (ABE, Shuichi)
山形大学・医学部・非常勤講師
研究者番号： 40400543

井上 純人 (INOUE, Sumito)
山形大学・医学部・助教
研究者番号： 70466621

(4)研究協力者

佐藤 正道 (SATO, Masamichi)

佐藤 建人 (SATO, Kento)