慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	間質性肺炎急性増悪と抗酸化作用を有する含硫アミノ酸代謝物の生体防御の研究
Sub Title	Study of metabolism of sulfur-containing amino acids as anti-oxidant against the acute exacerbation of interstitial pneumonia
Author	杉浦, 八十生(Sugiura, Yasoo)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究の目的は間質性肺炎急性増悪と抗酸化作用を有すると考えられる含硫アミノ酸代謝物の生体内での動態変化を解析することである。急性肺障害・線維症のマウスによるモデルを確立しtransulfuration pathwayの関連酵素・代謝物の解析を試みた。各細胞の検体量が少なく, 目的とした代謝物, 関連蛋白, 酵素発現を検討するに至らなかった。含硫アミノ酸代謝物のイメージングおよび定量的測定, 同一個体における生存下での経時的・定量的測定に関しては変性のため生理的状態を反映させるデータを得ることが技術的に困難であった。変性を来さないような適切な実験系を確立する工夫, 技術的障害の克服が必要である。 Lung cancer involved with interstitial pneumonia is still intractable. The purpose of this study is to analyze dynamic change the amino acids containing sulfur, which is considered as anti-oxidant such as glutathione, in acute lung injury and fibrosis lung. At first, we established the model mouse of acute lung injury by administration of bleomycin. Second, 4 weeks after acute lung injury, we recognized the chronic pulmonary fibrosis. Using with this established model mouse, we tried to evaluate the expression of each metabolism, protein and enzyme. In result, the sample from the mouse is not enough to analyze the little sulfur containing amino acids. Especially, in imaging of the purine degradation pathway, method of "in situ freezing" resulted in failure. To prevent the degeneration and evaluate the real-physiological status, we should establish and apply the technique and experiment in the interstitial pneumonia in mouse lung.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2017 課題番号：16K19984 研究分野：肺癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19984seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１９９８４

研究課題名（和文）間質性肺炎急性増悪と抗酸化作用を有する含硫アミノ酸代謝物の生体防御の研究

研究課題名（英文）Study of metabolism of sulfur-containing amino acids as anti-oxidant against the acute exacerbation of interstitial pneumonia

研究代表者
杉浦　八十生（Sugiura, Yasoo）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：２０４６４９５１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は間質性肺炎急性増悪と抗酸化作用を有すると考えられる含硫アミノ酸代謝物の生体内での動態変化を解析することである。急性肺障害・線維症のマウスによるモデルを確立しtranssulfuration pathwayの関連酵素・代謝物の解析を試みた。各細胞の検体量が少なく、目的とした代謝物、関連蛋白、酵素発現を検討するに至らなかった。含硫アミノ酸代謝物のイメージングおよび定量的測定、同一個体における生存下での経時的・定量的測定に関しては変性のため生理的状態を反映させるデータを得ることが技術的に困難であった。変性を来さないような適切な実験系を確立する工夫、技術的障害の克服が必要である。

研究成果の概要（英文）：Lung cancer involved with interstitial pneumonia is still intractable. The purpose of this study is to analyze dynamic change the amino acids containing sulfur, which is considered as anti-oxidant such as glutathione, in acute lung injury and fibrosis lung. At first, we established the model mouse of acute lung injury by administration of bleomycin. Second, 4 weeks after acute lung injury, we recognized the chronic pulmonary fibrosis. Using with this established model mouse, we tried to evaluate the expression of each metabolism, protein and enzyme. In result, the sample from the mouse is not enough to analyze the little sulfur containing amino acids. Especially, in imaging of the purine degradation pathway, method of “in situ freezing” resulted in failure. To prevent the degeneration and evaluate the real-physiological status, we should establish and apply the technique and experiment in the interstitial pneumonia in mouse lung.

研究分野：肺癌

キーワード：含硫アミノ酸　急性肺障害

１．研究開始当初の背景

間質性肺炎を合併する肺癌では治療に著しい制限を生じ、治療に難渋する群である。本邦の癌による死亡者数は肺癌が１位である。その中でも間質性肺炎合併肺癌は手術、抗癌剤治療、放射線治療、手術のいずれにおいても急性増悪を招き、その際の救命は困難である場合が多い。具体的には 2008 年呼吸器外科手術統計によると原発性肺癌手術 症例（27881 例）のうち間質性肺炎を併発していたのは 3.7%（1036 例）で、 15.1%（157 例）で術後急性増悪を起こし、その中の 40.2%（63 例）が死亡していた。我々は、救命できた症例においても重度の神経障害が遺残した症例を報告した(Sugiura et. al. Jpn J Chest Surg, 2015)。2009 年度の「特発性間質性肺炎合併肺癌に対する化学療法の現況と治療関連急性増悪に関する実態調査」において 13.1%（396 例中 52 例)で初回化学療法と関連のある間質性肺炎の急性増悪を認めた。放射線治療では正常部分の肺でも、症状を呈さないものを含めると放射性肺臓炎は必発であり、原則、間質性肺炎合併肺癌に対して禁忌とされている。したがって、間質性肺炎合併肺癌はいずれの治療法においても難渋する。

間質性肺炎や急性肺障害には活性酸素が深く関与している。我々が注目する Cystathionine beta-synthase (CBS)は、ホモシステインとシステインを基質とする含硫アミノ酸代謝物と関連のある Transsulfuration Pathway の代謝律速酵素であるが、タウリンやグルタチオンなどの含硫アミノ酸代謝物には抗酸化作用があり、臓器保護の働きを有している（図 1)。

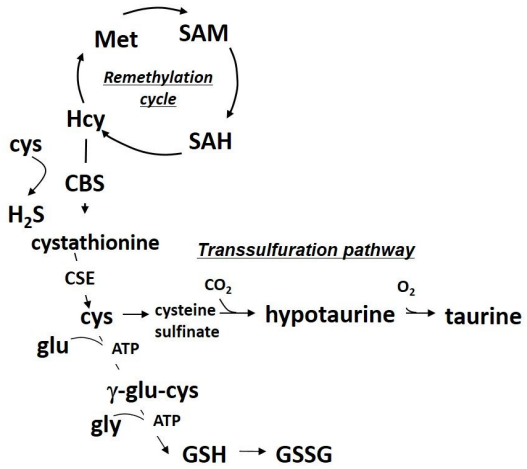

図 1 Cystathionine beta- Synthase (CBS) と Transsulfuration Pathway

hemeoxygenase により産生される一酸化炭素(CO)を介して局所の CBS の阻害が解除され、H2S が増加することによってさまざまな細胞機能調節が行われることを我々は報告してきた(図 2) (Morikawa et. al. PNAS, 2012、Kajimura et al. ARS, 2010)。これらの、含

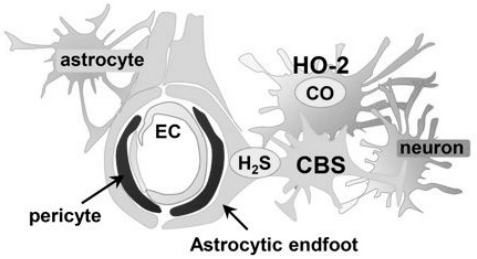

図 2 CO による Astrocyte の CBS の阻害が解除されることにより細胞機能調節が行われる一例

硫アミノ酸代謝物による臓器保護作用、および血管透過性を抑制することによる抗炎症作用が、間質性肺炎合併肺癌に対する治療法の Breakthrough になりうるという仮説をもとに基礎研究を進める。

間質性肺炎や急性肺障害には活性酸素が深く関与していることはよく知られている。好中球エラスターゼ阻害剤やステロイドは急性肺障害に対して実際に臨床で用いられている。しかし本研究が着目する Transsulfuration Pathway に関連のある含硫アミノ酸代謝物、CBS に関する研究はほとんどなされていない。このような背景から、グルタチオンやタウリンといった抗酸化物質の上流にある律速代謝酵素の CBS や Transsulfuration Pathway について着目し未解明の領域である間質性肺炎合併肺癌の治療に先鞭をつける可能性がある。本研究は間質性肺肺炎や急性肺障害という臨床における頻度の高い病態を扱いながら、急激に患者数の増加する肺癌治療と密接に関連している。

２．研究の目的

間質性肺炎を合併した肺癌では手術・抗癌剤・放射線治療のいずれもが急性増悪を惹起させる可能性が高く、その際の死亡率は極めて高い。間質性肺炎急性増悪因子の一つとして様々な細胞から産生される活性酸素の関与が示唆されている。我々はメチオニンからシステインが生成される Transsulfuration Pathway の代謝律速酵素である cystethionine-beta synthase(CBS)を介して産生されるグルタチオンなどの含硫アミノ酸代謝物が細胞障害性の活性酸素の抑制に寄与していることを示唆する報告をしてきた。本研究の目的は、Transsulfuration Pathway が急性肺障害における抗炎症作用・臓器保護作用にどのように関与しているか明らかにすることである。

３．研究の方法

(1)急性肺傷害・線維症のマウスモデルの確立

ブレオマイシンを用いて間質性肺炎を惹起させ、急性肺障害・線維症のマウスによるモデルを確立する（Kakizaki, Kohno et al.

Surg Research, 2009)。マウスに対してブレオマイシン(3.0mg/g body weight)を経気管投与すると急性期には肺損傷を生じ、亜急性期から慢性期(3～4 週間)には傷害肺の修復過程で線維化が生じる。間質性肺炎の動物モデルとして使用されている。

(2)形態学的、免疫組織学的変化の検討

ブレオマイシン投与によって急性肺損傷とその後の線維化を生じたマウス肺を用いて、メチオニンからシステインへの代謝律速酵素であるCBS、その下流にあるCystathionine gamma lyase（CSE）について形態学的および免疫組織学的観察を行う。肺を構成する、TypeI、TypeII 肺胞上皮細胞、クララ細胞、杯細胞、マクロファージ、線維芽細胞、血管平滑筋、胸膜の局所の発現について解析する。急性期から慢性期まで(ブレオマイシン投与後、6 時間、12 時間、1 日、3 日、7 日、14 日、21 日 28 日)、経時的変化も観察する。

肝臓および脳において、CBSはHemeoxygenase（HO）から産生される一酸化炭素 CO により制御されている（Shintani,et. al. Hepatology, 2009、Morikawa et. al. PNAS, 2012)。そのことから、HO の 2 つのアイソザイム HO1, HO2 についても発現を解析する。

(3)タンパク量の定量的測定

免疫組織学的観察で、正常肺と傷害肺との間に発現量に変化のあった酵素について Western Blot を用いて定量的測定を行う。

４．研究成果

(1) 急性肺障害・線維症のマウスモデルの確立

マウスを用いて急性肺障害・慢性期の肺線維症のマウスモデルを確立することを試みた。形態学的に、急性期には線維芽細胞の増生および硝子膜形成、肺胞壁の浮腫、上皮の剥離・変性を認めるモデルを作成できた。一方、4 週後では正常肺胞構造は破壊消失、改築され、膠原繊維の増勢が主体となり平滑筋の増生や蜂巣肺や県陰性の気道拡張が高頻度に見える肺線維症のモデルを作成できた。

(2) 形態学的、免疫組織学的変化の検討

肺を構成する、TypeI、TypeII 肺胞上皮細胞、クララ細胞、杯細胞、マクロファージ、線維芽細胞、血管平滑筋、胸膜の局所の発現について検討を行った。しかし、マウス肺における対象となる CBS、HO タンパクの発現量が少なかった。そのため、目的とした代謝物、関連蛋白、酵素発現を検討するに至らなかった。そのため、ラットについて同様に試みた。マウスで用いた抗体はラットでは不適格であったため難渋した。

(3) 蛋白量の定量的測定

マウス肺における各細胞の検体量が少なく、目的とした代謝物、関連蛋白、酵素発現を検討するに至らなかった。今後、本モデルでどのように評価するか更なる検討が必要である。含硫アミノ酸代謝物の Purine Degradation Pathway 代謝物のイメージングおよび定量的測定系の確立、同一個体における生存下での気道上皮被覆液中代謝産物の経時的・定量的測定に関しては、in situ freezingの手法やmicrowaveの手法を試みた。しかし、死後変性をきたすものが多いため、生理的状態を反映させるデータを得ることが技術的に困難であった。そのため、肺のモデルにおいて、死後変性を来さないような適切な実験系を確立する工夫、技術的障害の克服が必要である。

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　5 件）

(1) Yasoo Sugiura (筆頭著者、その他４名) et al. An entire clinical course of mediastinal myxofibrosarcoma treated by surgery and radiation. General Thoracic and Cardiovascular Surgery. 査読：有り 'Online First', DOI: 10.1007/s11748-018-0935-9, 2018, in press.

(2) Yasoo Sugiura (筆頭著者、その他 3 名) Hydropneumothorax Was an Initial Finding of Malignant Pleural Mesothelioma Diagnosed by Thoracoscopic Surgery, Two Cases. The Journal of the Japan Society for Respiratory Endoscopy. 査読：有り. 40;2018,154-157, https://doi.org/10.18907/jjsre.40.2_154

(3) Yasoo Sugiura (筆頭著者、その他 3 名) A giant mediastinal liposarcoma weighing 3500g resected with clam shell approach, a case. report with review of literature. International Journal of Surgical Case Reports. 査読：有り. 41;2017,292-295. 10.1016/j.ijscr.2017.10.055.

(4) Sugiura Y (筆頭著者、その他 3 名) Psoriasis and Psoriatic Arthritis Induced by Nivolumab in a Patient with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. Gan To Kagaku Ryoho. 査読：有り. 44;2017,787-789

(5) 杉浦八十生 (筆頭著者、その他４名) ニボルマブ投与後中枢神経脱髄疾患を認めた肺癌術後再発の 1 例. 日本呼吸器外科学会雑誌. 査読：有り 31；2017,717-721. https://doi.org/10.2995/jacsurg.31.717

〔学会発表〕（計　10　件）

(1) 杉浦八十生 他.非小細胞肺癌に対するニボルマブ投与例における免疫関連有害事象の検討. 第 55 回日本癌治療学会学術集会. 2017

(2) 杉浦八十生 他. 肺全摘後症候群の術前予測因子の検討. 第 58 回日本肺癌学会学術集会. 2017

(3) 河合治、大久保泰之、杉浦八十生 藤本

博行、橋詰寿律、根本悦夫．間質性肺炎合併進行非小細胞肺癌化学療法後に nintedanib を投与した 3 例．第 58 回日本肺癌学会学術集会．2017
(4) 鳥海真也、石船重之、河合治、杉浦八十生、荒木規仁、藤本博行、橋詰寿律、根本悦夫、庄司優．肺癌化学療法時における血清 Na 値の推移に関する検討．第 58 回日本肺癌学会学術集会．2017
(5) 杉浦八十生 他．ピオクタニンを用いた MRSA 膿胸 6 症例の検討．第 34 回日本呼吸器外科学会．2017
(6) 成毛聖夫、杉浦八十生、藤本博行、橋詰寿律、根本悦夫、加勢田靜．比較的長期間経過観察し得た多発 GGO 肺癌の 1 切除例．第 34 回日本呼吸器外科学会．2017
(7) 杉浦八十生 他．両側胸腔に進展した巨大縦隔脂肪肉腫を clamshell approach で摘出した 1 例．第 34 回日本呼吸器外科学会．2017
(8) 杉浦八十生　他．1 秒量 410mL の低肺機能の喀血を来す気管支拡張症に対して肺葉切除を施行した 1 例．第 40 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会．2017
(9) 杉浦八十生 他．水気胸を契機に胸腔鏡において悪性中皮腫と診断した 2 例．第 40 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会．2017
(10) 橋詰寿律、杉浦八十生、藤本博行、荒木規仁、河合治、布施川久恵、大久保泰之、根本悦夫．慢性肺アスペルギルス症(CPA)の臨床 肺アスペルギルス症に対する外科療法の適応と有効性．第 92 回日本結核病学会総会．2017

６．研究組織
(1)研究代表者
杉浦　八十生（SUGIURA, Yasoo）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員
研究者番号：20464951