

Title	アポトーシス細胞貪食の肺気腫病因への関与の検討
Sub Title	Effect of apoptotic cell phagocytosis on pulmonary emphysema
Author	峰松, 直人(Minematsu, Naoto)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	肺泡マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食が肺気腫化の病態に及ぼす影響につきエラストラーゼ誘導マウスモデルを用いて検討した。アネキシンV 経鼻投与による貪食抑制により肺の気腫化は有意に悪化した。アネキシンV投与マウスにおいて、肺泡マクロファージ数の増加、BALF中VEGF濃度の低下、また肺泡マクロファージのMMPs mRNA発現亢進がみられた。貪食抑制は修復不全と破壊亢進を介して気腫化進展に関与する可能性が示された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2010 課題番号：21790787 研究分野：呼吸器 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21790787seika

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.

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790787

研究課題名(和文)

アポトーシス細胞貪食の肺気腫病因への関与の検討

研究課題名(英文)

Effect of apoptotic cell phagocytosis on pulmonary emphysema

研究代表者

峰松 直人 (MINEMATSU NAOTO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20296578

研究成果の概要(和文)：

肺泡マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食が肺気腫化の病態に及ぼす影響につきエラストラーゼ誘導マウスモデルを用いて検討した。アネキシンV経鼻投与による貪食抑制により肺の気腫化は有意に悪化した。アネキシンV投与マウスにおいて、肺泡マクロファージ数の増加、BALF中VEGF濃度の低下、また肺泡マクロファージのMMPs mRNA発現亢進がみられた。貪食抑制は修復不全と破壊亢進を介して気腫化進展に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

We applied elastase-induced mouse model to test the effect of impaired macrophage phagocytosis of apoptotic cells on pulmonary emphysema. Intra-nasal instillation of Annexin V, potent inhibitor of macrophage phagocytosis, worsened the pulmonary emphysema. Annexin V-treated mice had an increased number of alveolar macrophages, lower level of VEGF in BALF, and increased transcriptional activity of MMP genes. Collectively, impaired macrophage phagocytosis could deteriorate the pulmonary emphysema via fewer repairs and more destruction in this model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：呼吸器

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：肺気腫、貪食、アポトーシス、マウス

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は本邦を含む先進国において死亡原因の上位ランクに上がりつつある深刻な疾患である。しかし、治療は対症療法が主なるものであり、病態悪化を抑制する新たな治療戦略の開発が早急に望まれている。

慢性閉塞性肺疾患(COPD)の患者肺においてはアポトーシス細胞が増加している一方、アポトーシス細胞を貪食除去するマクロファージ機能が低下していることが近年、報告されている。

アポトーシス細胞を貪食した貪食細胞はフェノタイプを変え、抗炎症性サイトカイン、抗プロテアーゼ、組織成長因子の分泌促進を

して、炎症を終焉するべく寄与することが報告されている。COPDにおけるアポトーシス細胞の増加と食食能の低下による不均衡は食食細胞が抗炎症性フェノタイプを獲得することを妨げるのみならず、アポトーシス細胞の二次性壊死を惹起して細胞内サイトカイン、プロテアーゼなど組織障害因子を微小環境中に放出する危険をもつ。しかし、実際にアポトーシス細胞の食食が COPD の病態に如何に関わるかを直接評価した研究はこれまでにない。本研究では食食能低下が肺気腫化の進展に及ぼす影響についてマウスモデルを用いて検討する。

2. 研究の目的

マクロファージ食食能の低下が気腫化の進展に及ぼす影響を検討するため、エラスターゼ誘導マウス肺気腫モデルを用いる。アネキシンV経鼻投与によりマクロファージ食食能を抑制して、肺気腫化が悪化するかどうか、するならばその機序についての考察を加えることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) プロトコルの確立

C57BL6 マウスに豚膵エラスターゼを経気管的に投与して肺気腫を誘導する (day1)。この方法はマウス肺気腫モデルとして確立しており、肺気腫化は少なくとも day21 まで経時的に進行することが知られている。豚膵エラスターゼ投与後は数日以内に肺への急性の好中球浸潤が見られ、この好中球の増加は day8 にはベースライン近くまで回復する。本研究の主眼は好中球性炎症ではなく、その後のマクロファージなどを中心とした慢性炎症であるため食食抑制は day8 より開始した。食食抑制のため合成人アネキシンV(Ann)または vehicle(Veh)を連日経鼻投与する方法を用いた。アネキシンVはアポトーシス細胞表面に表出してくる phosphatidylserine (PS) に特異的に結合して、アポトーシス細胞が食食細胞に認識、捕捉されることを抑制することで食食を部分的に抑制する。

(2) 肺気腫化の評価

C57BL6 マウスに豚膵エラスターゼを経気管的に投与して肺気腫を誘導する (day1)。Day8 から 14 日間連続して食食抑制剤 (アネキシンV) を経鼻投与する。Day21 に摘出肺を定圧ホルマリン固定して、作製した病理標本における平均肺胞径を測定する。平均肺胞径の測定は当初、①病理組織をとりこみ画像処理したものを Scion software を用いて自動計測する方法と、②顕微鏡観察下で一定直

線が交差する肺胞隔壁数をカウントする方法の双方を行い、その一致性を確認した。その結果、双方の方法による結果は緊密に相関したため以後の検討では簡便な②の方法を採択した。

(3) 機序の検討

上記と同様に day1 に豚膵エラスターゼを気管内投与したのち、day8 からアネキシンVを7日間投与する。気腫化が進展する day8 から day21 の間に生じている病態を検討するためその中央である day15 に犠牲死させる。気管支肺胞洗浄液を回収して、細胞分画と上清に分離して後者を保存する。回収した細胞は細胞数と分画を顕鏡によりカウントして、また別実験では細胞ペレットを作製した後、RNA を抽出する。気管支肺胞洗浄液中細胞 RNA は RT-PCR 法によりプロテアーゼの遺伝子発現を検討するために用いた。Bioplex あるいは ELISA 法を用いて肺胞洗浄液中のサイトカイン、組織成長因子などを測定した。

4. 研究成果

(1) 肺気腫化の評価

Day21 に定圧固定したマウス摘出肺の平均肺胞径を表1に示した。豚膵エラスターゼ投与 (PPE) 群ではコントロール (Ctrl) 群と比べて平均肺胞径は有意に増大した (表1. $P<0.05$ PPE Veh vs Ctrl Veh, $P<0.001$ PPE Ann vs Ctrl Ann)。Ctrl 群において、Ann 投与は肺胞径に影響を及ぼさなかったが、PPE 群においては PPE Ann 群における平均肺胞径が PPE Veh 群と比べて有意に増大した (表1. $P<0.05$)。

表1. マウス肺の平均肺胞径

	n	平均 (μm)	標準誤差 (μm)
Ctrl Veh	8	39.3	1.9
Ctrl Ann	7	39.6	1.6
PPE Veh	8	57.5 *	1.8
PPE Ann	9	76.1 #	7.2

*: $P<0.05$ vs Ctrl Veh

#: $P<0.001$ vs Ctrl Ann

\$: $P<0.05$ vs PPE Veh

(2) 細胞数、分画

Ann 群において Day21 肺胞径が有意に増大したことからその機序につき検討を加えた。Day15 における気管支肺胞洗浄液中の総細胞数は PPE Ann 群で PPE Veh 群と比べて有意に増加していた (表2, $P<0.05$)。細胞分画についてはマクロファージが増加した細胞のほとんどであり、PPE Ann 群で PPE Veh 群と比べて有意に増加していた (表2, $P<0.05$)。

リンパ球、好中球数については各群で有意な差を認めなかった。
このことからマクロファージ数の増加が平均肺胞径の増大に寄与している可能性が示唆され、マクロファージ遊走因子、並びに増加したマクロファージが及ぼす影響についてさらに検討した。

表2. 肺胞洗浄液中細胞数と分画

	n	総細胞数 (x10 ⁻⁴ /ml)	Mφ (x10 ⁻⁴ /ml)
Ctrl Veh	5	2.1	2.0
Ctrl Ann	5	2.0	1.9
PPE Veh	5	3.3	3.2
PPE Ann	5	5.6 #	5.4 #

#: P<0.01 vs Ctrl Ann

\$: P<0.05 vs PPE Veh

(3) 気管支肺胞洗浄液中の液性因子
Day15において回収した気管支肺胞洗浄液を用いてマクロファージ遊走因子を測定した。MCP-1ならびにMIP-1αの濃度は各群で有意差はなく(表3)、マクロファージ数の増加を説明しうる傾向を示さなかった。このことより、本モデルにおけるマクロファージ数の増加はエラスチン分解産物など他のマクロファージ遊走因子の関与、あるいは集積したマクロファージの肺からの離脱(emigrate)の低下が関与している可能性があり、今後、更なる検討を要する。

表3 マクロファージ遊走因子(Bioplex)

	n	MCP-1 (pg/ml)	MIP-1α (pg/ml)
Ctrl Veh	5	32.5	5.68
Ctrl Ann	5	24.8	5.06
PPE Veh	5	25.3	4.14
PPE Ann	5	19.7	4.60

(4) 気管支肺胞洗浄液中 VEGF 濃度
食食抑制による肺気腫化悪化の誘因として組織修復の低下について検討するため気管支肺胞洗浄液中の VEGF 濃度を検討した。Ann 投与により Ctrl 群、PPE 群ともに肺胞洗浄液中 VEGF 濃度は低下する傾向を認め、PPE 群における低下は統計学的有意差に達した(表4, P<0.05 PPE Veh vs PPE Ann)。このことからアポトーシス細胞の食食抑制は VEGF 産生低下を介して肺の再生、ホメオスタシス維持に抑制的に寄与した可能性がある。

表4 BALF 中 VEGF 濃度 (Bioplex)

	n	VEGF (pg/ml)
Ctrl Veh	5	263.7
Ctrl Ann	5	187.8
PPE Veh	5	200.2
PPE Ann	5	104.0*

*: P<0.05 vs PPE Veh

(5) マクロファージにおける MMP 発現
肺に増加したマクロファージが気腫化の悪化に寄与する機序としてプロテアーゼ産生の過剰が考えられるため、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の mRNA 発現につき検討した。

現在、MMP2, -9, -12 について検討中で、preliminary であるが MMP2, -12 については PPE Ann 群で PPE Veh 群と比して発現亢進がみられており、再現性を含めて継続検討中である。

本研究において、豚豚エラスターゼ誘導マウス肺気腫モデルにアネキシン V を用いた食食抑制を誘導して気腫化の悪化が観察された。食食抑制によりマクロファージ数が有意に増加したことから悪化の機序に関与していることが示唆され、VEGF 低下を介した修復能の低下、マトリックスメタロプロテアーゼの発現亢進を介した破壊の亢進が関与している可能性がある。今後、更なる検討が必要であるが、これまでの報告では示されていないアポトーシス細胞食食能の低下が肺気腫進展に寄与する可能性が示された。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

①吉田秀一、アポトーシス細胞の食食が気腫化に及ぼす影響の検討、第2回新宿閉塞性肺疾患研究会、2010.10.17、東京

②S Yoshida, N Minematsu, H Nakamura, S Chubachi, K Tsuzuki, H Tateno, M Mouded, S D Shapiro, K Asano, and A Ishizaka, Impaired phagocytosis deteriorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice, American Thoracic Society International Conference, 2010.5.17, New Orleans, USA

- ③吉田秀一、峰松直人、仲村秀俊、
中鉢正太郎、続敬之、館野博喜、
浅野浩一郎、石坂彰敏、マウス肺気腫モデルにおけるマクロファージ貪食能低下が
気腫化に及ぼす影響の検討、第 50 回日本
呼吸器学会学術講演会、2010.4.23、京都

〔図書〕（計 0 件）

〔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

峰松 直人 (MINEMATSU NAOTO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20296578

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし