

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590838

研究課題名（和文） 気腫性病変と骨粗鬆症の関連—レプチン受容体の関与について—

研究課題名（英文） Does Leptin Receptor Affect Emphysematous Lesion and Osteoporosis？

研究代表者

小川 恵美子（OGAWA EMIKO）

滋賀医科大学・保健管理センター・講師

研究者番号：00378671

研究成果の概要（和文）：

レプチン受容体はヒト肺組織に広範に発現しており、COPD 肺ではその mRNA 発現は低下するが、気道上皮細胞や小血管局所の発現と疾患には明らかな関連は認められなかった。気道上皮細胞や血管が疾患群では相対的に減少している可能性示唆されたが、CT 画像解析を用いた肺内の血管体積とは明らかな関係は認められなかった。一方、レプチン受容体の遺伝多型が拡散能に関与する可能性が示唆されたため、症例を蓄積中である。

研究成果の概要（英文）：Leptin receptor was ubiquitously expressed in human lung. Although Leptin receptor mRNA expression was decreased in COPD lung, there was no relationship between the expression with human airway epithelial cells or small vessels in lung. In COPD lung tissues, the volume of airway epithelial cells and small vessels might be decreased, however the volume of vessels in lung field measured using CT data did not correlate with the expression of leptin receptor mRNA. On the other hand, there was a significant relationship between the polymorphisms of leptin receptor gene and diffusion capacity. More cases are continuously collecting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：COPD 気腫性病変 レプチン受容体

1. 研究開始当初の背景

（1）COPD の病態は、気腔の拡大や肺泡破壊に代表される肺胞病変と慢性炎症に伴う気道リモデリングの両者から成る。COPD は

全身性の炎症を惹起し、合併症・併存症も COPD 患者の QOL と予後に大きく関与している。

（2）これまでに CT 画像解析法を用いて、

Body mass index (BMI)の低下が気腫性病変の割合 (LAA%) と関連する事やLAA%は皮下脂肪の低下や、骨量の低下とも相関することを示し、気腫性病変と痩せを結び付ける機序があることがと考えられた。

(3) 摂食調節に関与することで知られるレプチン-レプチン受容体系は、自然免疫や獲得免疫の調節、炎症機序にも広く関与し、アポトーシスに対しては抑制的に働くことが知られている。COPDにおいては、レプチンが重症患者の気道粘膜下に多く発現していることや、非喫煙者との比較において気道上皮細胞や肺胞マクロファージで発現が増強していることが示されている。一方、レプチン受容体は肺や血球系細胞に広く存在していることが知られており、近年レプチン受容体の遺伝子多型とCOPDの関連や喫煙曝露におけるマウス肺組織でのレプチン受容体発現低下などが報告された。しかしながら、ヒト肺組織における検討や病態との関連は明らかではない。

(4) 私共の予備研究においては、COPD 患者の肺組織において、レプチン受容体の発現が低下し、その発現はCT画像で評価した気腫性病変と負の相関が認められた。レプチン受容体の遺伝子多型は、COPD の併存症としても注目されている骨粗鬆症とも関連が報告されており、全身性疾患としてのCOPDの病態を解明する手掛かりとなる可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、気腫性病変と痩せ及び骨粗鬆症について、レプチン-レプチン受容体シグナルの役割に注目し、その機序の解明と治療介入としての可能性を明らかにする。

- ① 肺組織におけるレプチン受容体の遺伝子発現について、その局在とCOPD

患者における発現の変化を明らかにする。さらにはCT画像解析の結果と比較検討する。

- ② レプチン-レプチン受容体系のシグナルの低下が、アポトーシスを促進し、肺胞破壊や気道上皮の破壊につながるかについて細胞培養系を用いて検討する。
- ③ レプチン受容体遺伝子多型と気腫性病変や骨粗鬆症の関連について検討を行う。さらには、CTを用いた気腫性変化と骨密度を長期フォローする。

3. 研究の方法

(1) ヒト臨床検体を用いた臨床研究—ヒト切除肺組織におけるレプチン受容体や関連遺伝子やタンパクの局在および発現を検討する。さらには、レプチン受容体の遺伝子多型を調べる。CT画像解析を行い、気腫性病変や血管の定量、骨密度の定量化を行う。患者背景と合わせて、これらのCT画像関係について臨床データ解析する。遺伝子多型との関連については、CT画像を中心に前向き研究を行う。

(2) 培養細胞を用いた研究—切除肺より得た気道上皮細胞や市販されているヒト肺胞上皮細胞を用いて、喫煙曝露刺激を行い、アポトーシス誘導に関するレプチン受容体の関与について検討を行う。

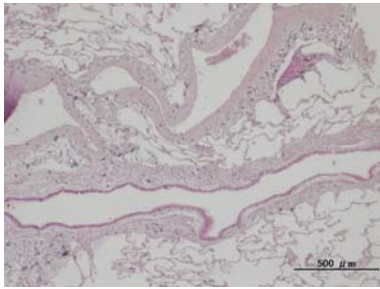
(3) 動物モデルを用いた研究—レプチン受容体の喫煙による気腫性変化や骨への影響について、マウスモデルを用いて検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト臨床検体を用いた臨床研究

- ① 肺組織を用いて免疫染色法にて、レプチン受容の局在と発現を検討した結果、レプチン受容体は、肺胞上皮細胞、

血管内皮細胞、気道上皮細胞と肺組織に広範に発現していることが確認された。



(ヒト非COPD肺組織におけるレプチン受容体の免疫染色)

- ② 肺組織のレプチン受容体のmRNA発現は、CT画解析による気腫性病変の定量結果 (%LAV (% of low attenuation volume)) が負の相関関係を持つことは予備研究で明らかであったが、近年気腫との関連が指摘されている肺や全体の血管の体積とは明らかな関連を認めなかった。肺組織提供者は主に軽症COPD患者であったことから、血管の体積変化を伴う以前の変化と関連がある可能性があると考えられた。そこで、血管病変との関連を検討するため、endothelial nitric oxide synthase (eNOS)やvascular endothelial growth factor (VEGF) やVEGF受容体の発現についても検討を行った。VEGF受容体-2については、拡散能(DL_{co}/V_A)と正の相関関係を認めた。また、気腫性病変(%LAV)が増加するとVEGF受容体-2は減少する傾向を認めた。これらの結果を受け、さらに局所の発現との関連を検討するために、レーザーマイクロダイセクション法を用いて小血管周囲組織および気道上皮細胞のmRNAを収集し、比較検討したが、特に有意な関連を認めなかった。COPD患者の肺組織から抽

出したmRNAにおいては、小血管や気道上皮細胞由来のmRNAが相対的に少ないことが肺全体のレプチン受容体発現の低下につながった可能性があるが、引き続き症例の蓄積と肺組織の中でもその大部分を占める肺胞上皮細胞からのmRNAの収集を継続している。

- ③ 35名の非COPD喫煙者と135名のCOPD患者を対象にこれまで報告されているレプチン受容体遺伝多型の中に、拡散能(DL_{co}/V_A)とは有意な相関を認めるが、気腫性病変とは有意な差を認めない多型の存在が示唆された。症例数が少なく事から、現在も症例の蓄積を継続し、海外の施設(ベトナム)とも研究協力も行き、異なる集団での解析も進行中である。
- ④ 骨粗鬆症との関連については胸部CTを用いた骨密度の解析方法が確立したため、今後は測定と解析を行う予定である。
- ⑤ ヒト肺組織を用いたこれらの結果は、レプチン受容体が気腫性病変に関連している可能性が高い事を示しているが、今後も症例の蓄積が必要であると考えられる。また、拡散能とは有意な相関関係を認めるが、気腫性病変とは傾向のみ得られたという結果は、近年注目されている血管病変の気腫性病変への関与を示唆すると考え、レプチンシグナルのみならず、血管に関連するサイトカインと合わせて、検討を行う予定である。

(2) 培養細胞を用いた研究

- ① 切除肺組織より得た気道上皮細胞に喫煙曝露を行い、MTTアッセイにて細胞死を確認したが、レプチン刺激の

有無で明らかな差は認められなかった。そこで、市販されているA549細胞を用いて、レプチン受容体をノックダウンするためにレプチン受容体遺伝子のSiRNAを細胞内に導入し、レプチン刺激下の喫煙曝露の影響について検討を行った。アポトーシスに関連するcaspase3, BAX, Bcl-2, Bcl-xlの発現に有意な差を認めなかった。しかしながら、A549は肺胞上皮細胞由来ではあるが、癌細胞由来である事が影響している可能性は否定できず、今後は、正常肺胞上皮細胞や肺内血管内皮細胞を用いた検討が課題である。

(3) 摂食調節に関連するレプチンシグナルが、痩せにという表現型を伴い、気腫性病変や血管病変に関連している可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 3件)

- ① 高橋 珠紀、小川 恵美子 他
(The Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 In Peripheral Airway Epithelial Cells And Vessels In Early Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
2013年アメリカ呼吸器学会
2013年5月21日 アメリカ
- ② 高橋 珠紀、小川 恵美子 他
(Correlation of vascular endothelial growth factor receptor 2 with pulmonary function and emphysematous change in early Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
2012年アメリカ呼吸器学会
2012年5月22日 アメリカ
- ③ 小川 恵美子
(Body weight and Emphysema)
第15回アジア太平洋呼吸器学会
2010年11月23日 フィリピン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 恵美子 (OGAWA EMKO)
滋賀医科大学・保健管理センター・講師
研究者番号： 00378671

(2) 研究分担者

黄瀬 大輔 (KISE DAISUKE)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号： 50572418

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高橋 珠紀 (TAMAKI TAKAHASHI)
京都大学・大学院医学研究科・大学院生