

20030193

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明
および新治療法開発の戦略的展開に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長瀬 隆英

平成16 (2004) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明
および新治療法開発の戦略的展開に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長瀬 隆英

平成16 (2004) 年 3月

目 次

I. 統括研究報告書

高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明：

生理活性脂質およびペプチドを中心に	1
長瀬 隆英	

II. 分担研究報告

1. 炎症性疾患におけるdefensin発現異常の関与に関する研究	18
栗原裕基	

2. 新規リゾフォスファチジン酸 (LPA) 受容体のクローニング	37
石井 聡	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	50
-----------------------	----

総括研究報告書

高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明：
生理活性脂質およびペプチドを中心に

主任研究者 長瀬隆英 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

老年者における重症肺感染症（特に嚥下性肺炎）、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、炎症を主体とする病態であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患発症機序は未だに不明確であるため、有効な治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている 1) 脂質性メディエーター、2) 抗菌ペプチド、および 3) CGRP ファミリー（CGRP, adrenomedullin）などに着目し、老年者炎症性肺疾患発症との関連を探索した。その結果、以下の新知見が得られた。

1) 肺線維症の発症分子機構は不明であるが、炎症性メディエーターの関与が推察されている。本研究により、アラキドン酸カスケードの起点となる cPLA₂ が、肺線維症の発症機序に重要であることが明らかとなり、治療標的となる可能性が示唆された。

2) cPLA₂ 阻害作用のある arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK) の投与により、敗血症モデルの肺水腫・呼吸不全が改善し、cPLA₂ 阻害薬が ARDS の治療候補薬となりうることが示唆された。

3) LPS による hBD2 発現を検討したところ、転写因子 (AP-1, NFκ-B) が hBD2 誘導・発現に必須であること、および steroid が hBD2 誘導・発現を減弱することなどが明らかにされた。

4) 加齢による innate immunity への影響を検討するため、加齢マウスを用いて beta defensin の発現を検討した。その結果、マウス β-defensin は舌、精巣上体、食道、気管など広範に発現を認めた。特に、舌において最も強い発現を確認した。さらにその発現は加齢にて減少傾向がみられたことより、高齢者の肺炎発症における局所関連因子の可能性も考えられる。

5) CGRP 遺伝子欠損マウスを用いた検討により、内因性 CGRP の存在が ARDS 発症に関与する可能性が示された。

6) AM 遺伝子欠損マウスにおいて気道過敏性が亢進することが明らかとなった。このことより内因性 AM の減少が、気道過敏性の亢進に関与することが示唆される。

以上の知見は、難治性の老年者呼吸器系炎症性疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが期待される。

分担研究者

栗原裕基・東京大学大学院医学系研究科教授

石井 聡・東京大学大学院医学系研究科講師

A. 研究目的

老年者における重症肺感染症（特に嚥下性肺炎）、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、炎症を主体とする病態であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患発症に関しては、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられ、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8等のサイトカインなどが関与している可能性が報告されている。しかし、サイトカイン以外のメディエーターとの関連については、十分な検討がなされていない。また、治療の標的が不明確であるため、有効な治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている 1) 脂質性メディエーター、2) 抗菌ペプチド、および 3) CGRP ファミリーなどその他のメディエーターに着目し、老年者炎症性肺疾患発症との関連を探索する。

1) 脂質性メディエーター：

脂質性メディエーターであるプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどはエイコサノイドと総称され、アラキドン酸を起点とする代謝経路の代謝産物である。アラキドン酸は、炭素数 20 よりなる構造をもち、生体ではリン脂質から細胞質型ホスホリパーゼ

A₂(cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂)によって切り出される。この際に、同時にリゾPAF(lyso-PAF)が生成され、リゾPAFから血小板活性化因子(platelet-activating factor, PAF)が作られる。アラキドン酸は、図1に示すように、アラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て様々なエイコサノイドを生成する。その2つの大きな経路が、シクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase, COX)系および、5-リポキシゲナーゼ(5-lipoxygenase, 5-LO)系である。プロスタグランジン、トロンボキサンはシクロオキシゲナーゼ系の代謝物であり、ロイコトリエンは5-リポキシゲナーゼ系の代謝物である。

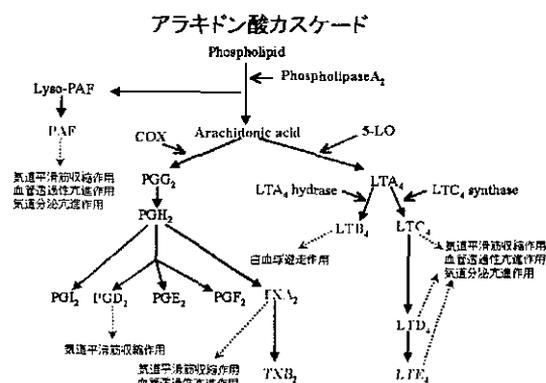


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

アラキドン酸カスケードの代謝産物であるエイコサノイドは、ごく微量で多彩な生理活性作用を呈するのが特徴である。呼吸器系においても、エイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが示唆されている。例えば気管支喘息は、気道平滑筋収縮、血管透過性亢進、血管拡張等による気管支収縮を主体とする病態であり、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられるが、近年、特にト

ロンボキサン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドが重要な発症因子とされ、有効な治療標的となりつつある。

PAF およびエイコサノイドは、その生理活性作用より、炎症性肺疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が推察されるが、未だに検証されていない。本研究では、発生工学的手法を応用し、脂質性メディエーターの炎症性肺疾患発症機序における重要性について検討する。特に、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などにおける、PAF およびエイコサノイド関連遺伝子の意義を明らかにする。さらに、白血球遊走に關与するロイコトリエン B₄ (LTB₄) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、解析・検討を行う。以上を総括して、治療の標的を明確にし、有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的とする。

2) 抗菌ペプチド：

近年、生体における感染防御機構の一環として、抗菌ペプチド defensin の存在が注目されている。ヒトでは、抗菌ペプチドとして alpha-defensin (6 種類) および beta-defensin (4 種類) が発見されており、その抗菌作用によって感染防御に關与していることが想定される。特に、最近発見された human beta-defensin-2 (hBD2) および hBD3 は、皮膚や呼吸器系に存在し、細菌・真菌感染や TNF α 等の炎症性サイトカイン刺激によって誘導・産生され、感染防御および炎症調節機序に重要な役割を果たしている可能性が考えられる (*Nature* 1997, *J Biol Chem* 2000)。さらに、この hBD2 は、ケモカイン CCR6 を介して T cell を遊走させ、免疫機序活性化にも關与することが報告され

ている。

2000 年以降、マウスなどにおいて新しい defensin が次々と発見され、GenBank のデータ上でも、新しい defensin が次々と報告されている。本研究者らが発見した mBD6 (*J Biol Chem* 2001)は、従来の報告と異なって、骨格筋に多量に存在することが報告された。さらに、ヒトおよびマウスの精巣上体において特異的に発現する defensin (hBD5,6 および mBD11,12) を発見し、やはり抗菌活性を有することを報告した。本知見より、defensin の多彩な生理学的機能が推測される。現在まで判明しているマウス beta defensin は以下の通りである。

mouse beta defensins

	発現している部位	誘導性	抗菌活性	参考文献
mBD1	様々な臓器の上皮細胞 (特に多いのは腎臓)	constitutive	グラム陰性菌 グラム陽性菌	<i>FEBS Lett.</i> 1997 <i>Infect Immun.</i> 1998
mBD2	腎臓、尿道	inducible	報告なし	<i>FEBS Lett.</i> 1999
mBD3	肺、小腸、肝臓など	inducible	グラム陰性菌 グラム陽性菌	<i>Infect Immun.</i> 1999
mBD4	舌、鼻、尿道	constitutive	報告なし	<i>J Biol Chem.</i> 2000
mBD5	報告なし		報告なし	
mBD6	骨格筋、尿道、舌、尿管	inducible	グラム陰性菌	<i>J Biol Chem.</i> 2001
mEP2e	精巣上体		グラム陰性菌	<i>J Immunol.</i> 2002
mBD11	精巣上体		グラム陰性菌	<i>J Immunol.</i> 2002
mBD12	精巣上体		グラム陰性菌	<i>J Immunol.</i> 2002

図 2 マウス beta defensin の一覧表

高齢者肺炎をはじめとする炎症性呼吸器疾患においては、感染症が重要な病態悪化因子となっており、defensin を含めた感染防御機構および炎症成立機序の解明が研究推進上、必須と考えられる。本研究では、主にマウスを用いて抗菌ペプチド defensin の炎症性呼吸器疾患発症分子機構への關与について検討を加える。さらに、加齢による defensin 発現の影響および生体調節への変化について探索する。

3) CGRP ファミリー :

近年、炎症を促進あるいは抑制する生理活性因子として、エンドセリン-1 (endothelin-1, ET-1)、アドレノメデュリン (adrenomedullin, AM)、calcitonin gene-related peptide (CGRP)などのペプチドが注目されている。ET-1は、炎症促進、血管・気管支平滑筋収縮、エイコサノイド産生、サイトカイン産生刺激能を有することが報告されている (T.Nagase. *Am. J. physiol.* 1995)。一方、CGRPは、炎症抑制、血管・気管支平滑筋の拡張・弛緩作用を有しており (T.Nagase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996)、アドレノメデュリンも同様の血管平滑筋拡張・弛緩作用が報告されている。CGRP およびアドレノメデュリンは、受容体を共有することが報告されており、CGRP ファミリーと呼ばれるペプチド群に属している。CGRP およびアドレノメデュリンは、気管支喘息やARDSの発症メカニズムに重要な役割を担っている可能性が考えられるが、国内・海外において未だ十分な検討がなされていないのが現状である。生理活性作用を有する循環ペプチドは、気管支喘息などの治療薬開発の標的としても画期的な系であると考えられる。

本研究では、このCGRP およびアドレノメデュリン遺伝子の気管支喘息発症機序への関与について探索する。CGRPは37アミノ酸残基より構成され、循環器・神経系を中心に多彩な作用を有することが知られている。肺・気管支にはCGRPを含む感覚神経C-fiberが豊富に存在し、またreceptorも豊富に存在することが報告されている。従って、気道過敏性発症機序に関与する可能性が想定さ

れるが、未だ十分に検討されていない。最近、CGRP遺伝子欠損マウスが作成され(Oh-hashii. *Circ. Res.* 2001; 89: 983-990)、CGRPが循環動態に重要であることが報告されている。本研究では、このCGRP遺伝子欠損マウスを用いて、CGRPの気道過敏性発症機序への関与について検討を加える。

Comparison of amino acid sequence of human AM with human CGRP, CGRP II, and amylin (CGRP family)

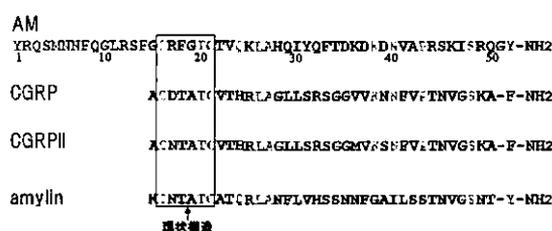


図3 CGRPファミリーペプチド群のアミノ酸配列

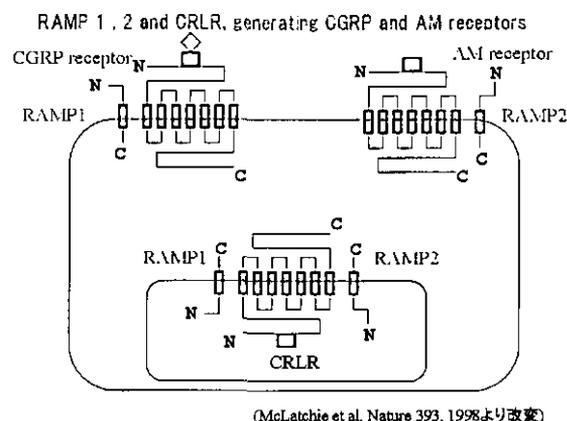


図4 CGRPファミリーの受容体。肺には豊富に存在するが、その機能は未だに不明である。

<本研究の意義> 脂質性メディエーター、抗菌ペプチド、CGRPなどの生理

活性ペプチドは、呼吸器系炎症の発症・制御に寄与している可能性が高く、治療薬開発の標的として有望であることが期待される。本研究成果は、難治性の老年者呼吸器炎症性疾患に対する新治療薬開発の実現化に寄与することが予想される。本研究は、1)難治性炎症性疾患の病態解明、2)ゲノム創薬、を志向した独創的なものであり、高齢者炎症性肺疾患治療の戦略的開発展開を目指している。社会的重要性の高い高齢者炎症性肺疾患に対する治療薬開発は、社会医学・医療福祉・医療経済的にも莫大な貢献をなすものであり、厚生行政に寄与することが期待される。

B. 研究方法

1) 脂質性メディエーター：

< transgenic/knockout mouse の作成 > 本研究では、発生工学的技術を用いて作成した遺伝子ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを使用する。PAF 受容体に関しては、本研究者らが、PAF 受容体遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス (PAF receptor overexpression transgenic mouse, 以下 PAFR-Tg マウス) の作成に成功した (S.Ishii, T.Nagase, *EMBO J.* 1997)。また、ジーンターゲットングの手法を用いて、PAF 受容体遺伝子ノックアウトマウス (PAF receptor knockout mouse, 以下 PAFR-KO マウス) も作成した (S.Ishii, K.Kume, T.Nagase, *J.Exp.Med.* 1998)。一方、エイコサノイド関連遺伝子として、細胞可溶性フォスホオリパーゼ A₂(cytosolic phospholipase A₂, 以下 cPLA₂) 遺伝子

に着目した。cPLA₂ はアラキドン酸産生に関わる酵素であるため、全てのエイコサノイド産生を規定している。本研究者らは、ジーンターゲットングにより、cPLA₂ 遺伝子ノックアウトマウス (以下 cPLA₂-KO マウス) を作成し、細胞レベルにおいて、エイコサノイドを産生しないことを確認した (N.Uozumi, K.Kume, T.Nagase, et al. *Nature* 1997)。さらに、本研究の共同研究者 (清水) らは、世界ではじめてロイコトリエン B₄ (LTB₄) 受容体のクローニングに成功し (*Nature* 1997)、現在、LTB₄ 受容体遺伝子ノックアウトマウス (以下 LTB₄R-KO マウス) の作成に着手している。

本研究では、PAFR-Tg、PAFR-KO、cPLA₂-KO マウスを用いて、PAF 受容体遺伝子発現および cPLA₂ 遺伝子発現と炎症性肺疾患との関連について評価・検討を加える。また、LTB₄ が、白血球を遊走・賦活化することにより炎症メカニズムに関与する可能性が考えられるため、LTB₄R-KO マウスを完成させ、LTB₄ 受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索する。< 炎症性肺疾患における PAFR, cPLA₂, LTB₄ 遺伝子発現の関与 > 炎症性肺疾患モデルとして、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息の動物モデルを用いる (T.Nagase, *J.Clin.Invest.* 1999; T.Nagase, *Nature Immunology* 2000)。老若マウス各群に、塩酸気管内投与 (ARDS)、ブレオマイシン気管内投与 (特発性間質性肺炎)、抗原感作 (気管支喘息) などの処置を行い、生理学的、生化学的、免疫組織化学的、分子生物学的検討により、PAFR, cPLA₂, LTB₄ 遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加える。PAF 受容体、LTB₄ 受容体および cPLA₂ 遺伝子

発現が、特異的もしくは相互的に発症機序に寄与することが明らかになった場合、アンタゴニストなどの治療的アプローチ研究を進展させる。

2) 抗菌ペプチド：

＜未知の defensin の探索＞ マウスを中心に、未発見の defensin を探索する。defensin 遺伝子は、クラスターを形成して存在することが推測されており、mBD1-6 遺伝子の近傍をスクリーニングし、未知の defensin 遺伝子を同定する。また、ヒトゲノム情報を参考に、マウス defensin に相同する未知のヒト defensin を探索し、発見された場合は、抗菌活性を含め生理学的意義を検討する。

＜炎症性呼吸器疾患発症への関与＞

炎症性肺疾患モデルとして、細菌感染、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息の動物モデルを用いる。老若マウス各群に、細菌気管内投与（肺炎）塩酸気管内投与（ARDS）、ブレオマイシン気管内投与（特発性間質性肺炎）、抗原感作（気管支喘息）などの処置を行い、defensin 遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加える。

＜加齢による mBD 発現の変化：LPS による誘導発現＞

高齢者における innate immunity の変化を検討するため、加齢マウスを用いて beta defensin の発現を検討した。C57BL/6 若年群（4 ヶ月令）および老年群（20 ヶ月令）の 2 群を用い、LPS 投与による mBD 発現を各臓器において比較検討した。

3) CGRP ファミリー：

＜CGRP の ARDS 発症機序への関与＞

Oh-hashii らによって確立された CGRP ノックアウトマウス（ホモ接合体）と、その littermate コントロールの野生型マウスを用いた。

CGRP ノックアウトマウス（ホモ接合体）と、その littermate コントロールの野生型マウスを用いた。胃液誤嚥性 ARDS モデルとして、塩酸の気管内投与を行い、2 時間後に、呼吸不全・肺障害の進展度を検討した (Nagase, *Nature Immunology* 1:42-46, 2000)。

＜AM の気道過敏性発症機序への関与＞

Shindo らによって確立された AM ノックアウトマウス（ヘテロ接合体）と、その littermate コントロールの野生型マウスを用いた。アレルギー性気管支喘息モデルとして、ovalbumin による抗原感作・吸入負荷を施行した。実験第 15 日に、気道反応性試験・気管支肺胞洗浄液サンプリング・肺組織サンプリングなどを施行した。

まず MCh 気道反応性を検討するため、MCh を aerosol 吸入投与し、反応性を検討した。別群において、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)を採取・遠心分離し、細胞成分・上清を得て解析した。肺組織については気道炎症を中心に評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、東京大学医学部動物実験施設内規に則して、動物愛護への配慮を最大限に行った。

C. 研究結果

1) 脂質性メディエーター：

＜肺線維症モデル＞

ブレオマイシンは、悪性腫瘍（特に精巣腫瘍など）に対する化学療法薬として臨床的に使用されているが、重大な副作用として薬剤性の肺線維症をきたすことが知られている。このことより肺線維症の動物実験モデルを作成する手法として、ブレオマイシン投与が頻用されている。今回われわれは、ブレオマイシン投与による肺線維症マウスモデルを確立し、cPLA₂-KO マウス（ホモ接合体）を用いて、肺線維症成立機序における cPLA₂ の役割を検討した。

野生型マウスに、ブレオマイシンを気管内投与したところ、生理学的な肺の硬化、肺線維症に合致する病理組織所見（肺胞壁の肥厚、炎症性細胞浸潤、コラーゲン沈着）が認められた。また、気管支肺胞洗浄液中のトロンボキサン、ロイコトリエンが増加していた。一方、同様にブレオマイシンを投与された cPLA₂-KO マウスでは、生理学的にも病理組織学的にも肺線維症様の諸症状が著しく軽減していた。気管支肺胞洗浄液中のトロンボキサン、ロイコトリエンは、ほとんど検出されなかった。以上の所見より、cPLA₂ が肺線維症の発症機序において決定的な役割を果たしている可能性が示唆された。

ちなみに、cPLA₂ の下流のメディエーターである PAF の関与についても、PAF 受容体ノックアウトマウス (PAF receptor knockout mouse, PAFR-KO マウス) を用いて検討した。その結果、PAFR-KO マウスでは、肺線維症様の諸症状が部分的に軽減していることが観察された。

<ARDS モデル>

敗血症性 ARDS モデルとして、C57BL/6 マウスに LPS/zymosan の投与を行い、4

時間後に、呼吸不全・肺障害の進展度を検討した (Nagase, *Nature Immunology* 1:42-46, 2000)。cPLA₂ 阻害薬としては、アラキドン酸誘導体である arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK) を投与し、その効果をコントロール群と比較検討した。

ATK 非投与群では、LPS/zymosan の投与により著明な呼吸不全・肺障害を認め、saline 群に比べ有意に肺エラスタンスが増加していた。一方、ATK を投与された LPS/zymosan 群は、ATK 非投与群と比べて有意に呼吸不全・肺障害・肺エラスタンスが低下しており、ATK が ARDS 進展阻止に関わる可能性が示唆された。

BALF 細胞分画解析において、LPS/zymosan 投与により著明な neutrophilia が認められたが、この neutrophilia は ATK 投与により有意に軽減していた。また、LPS/zymosan 投与群は、対照となる saline 群と比べて有意に TXB₂、LTB₄、CysLTs (LTC₄/D₄/E₄) が上昇していたが、ATK 投与群では、いずれも有意に低下していた。

<LTB₄R-KO マウスの作成>

LTB₄R-KO マウスの作成プロセスは順調に進展した。キメラマウスの中で、germ line にノックアウト DNA コンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た。現在、ヘテロ接合体からさらにホモ接合体 LTB₄R ノックアウトマウスが得られつつある。LTB₄R ノックアウトマウスについては、LTB₄ の生理的意義、治療応用において重要な知見が得られることが期待され、本研究グループと国外グループが激しく競合している状況にある。

2) 抗菌ペプチド:

<defensin の抗菌作用機序> hBD2 を

中心に、defensin の抗菌メカニズムを探索した。defensin は、Na⁺の存在によって濃度依存的に抗菌活性を消失することが知られており、イオン環境が抗菌作用発現に重要と考えられる。今回、新たにCa²⁺など陽イオンの存在が、hBD2 抗菌活性を減弱することを明らかにした。

< defensin の誘導・発現分子機構 >

hBD2 の誘導・発現分子機構を、ヒト気道培養細胞を用いて検討した。hBD2-mRNA 発現等を指標として、LPS による hBD2 発現を検討した。その結果、1) 転写因子 (AP-1, NFκ-B) が hBD2 誘導・発現に必須であること、2) steroid が hBD2 誘導・発現を減弱すること、3) COX inhibitor は hBD2 誘導・発現に影響を与えないことを明らかにした。

< マウス defensin の探索 >

新たに 6 番目のマウス beta defensin を発見し、mBD6 と命名、発表した。mBD6 は、筋肉に多く分布し抗菌活性を呈した。さらに、ヒトおよびマウスの精巣上体において特異的に発現する defensin (hBD5,6 および mBD11,12) を発見し、やはり抗菌活性を有することを報告した。本知見より、defensin の多彩な生理学的機能が推測される。

< 加齢による mBD 発現の変化 : LPS による誘導発現 >

C57BL/6 若年群 (4 ヶ月令) および老年群 (20 ヶ月令) における LPS 誘導性 mBD 発現を各臓器において比較検討した。

mBD-3 は、LPS 投与群において舌で強い発現が認められ、誘導型の β-defensin であることが確認された。その発現は高齢マウスにて減少傾向が認められた。

一方、mBD-11、mBD-12 および mEP2e

は、精巣上体に特異的に発現しており、その発現強度は LPS 投与の影響を受けなかった。

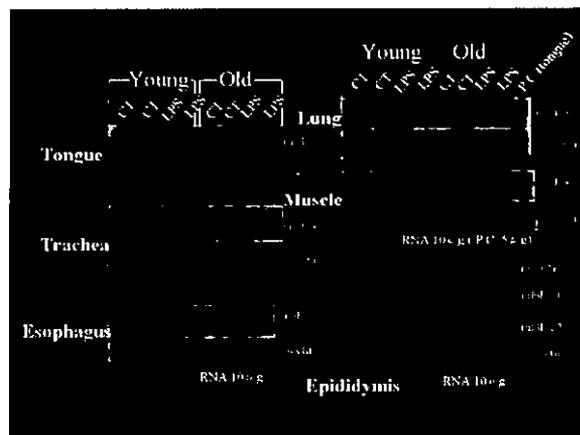


図5 C57BL/6 若年群 (4 ヶ月令) および老年群 (20 ヶ月令) における LPS 誘導性 mBD 遺伝子発現。

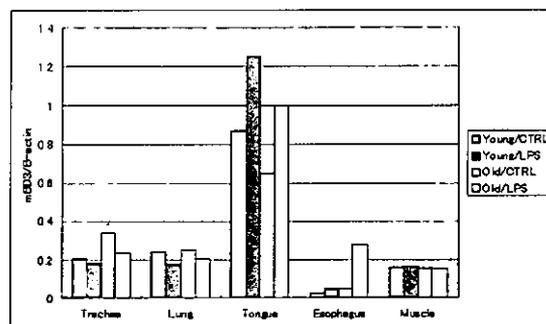


図6 C57BL/6 若年群 (4 ヶ月令) および老年群 (20 ヶ月令) における LPS 誘導性 mBD 遺伝子発現。mBD-3 は、LPS 投与群において舌で強い発現が認められた。その発現は老年群にて減少傾向が認められた。

3) CGRP ファミリー :

< CGRP の ARDS 発症機序への関与 >

野生型群では、塩酸の気管内投与により著明な呼吸不全・肺障害を認め、saline 群に比べ有意に肺エラスタンスが増加し

ていた。一方、塩酸を投与された CGRP ノックアウトマウス群は、野生型群と比べて有意に呼吸不全・肺障害・肺エラスタンスが低下しており、CGRP が ARDS 発症機序に関わる可能性が示唆された。

BALF 細胞分画解析において、塩酸の気管内投与により著明な neutrophilia が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間において有意差は認めなかった。

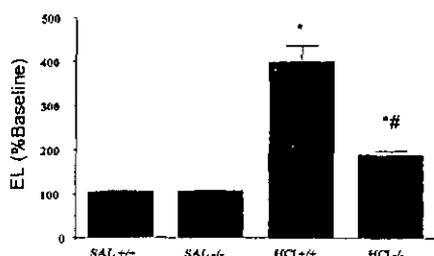


図7 塩酸気管内投与による肺メカニクスの反応。肺エラスタンスは、塩酸投与・野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に低下していた。

#P<0.05 vs HCl-treated wild type mice.
*P<0.05 vs the saline groups.

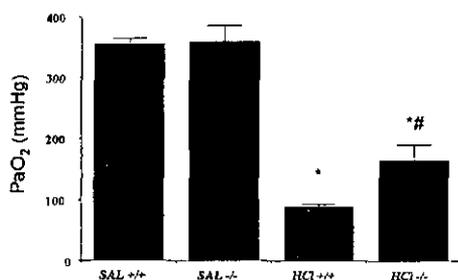


図8 塩酸気管内投与によるガス交換の反応。PaO₂ は、塩酸投与・野生型群で、saline 群に比べ有意に低下していた。一方、ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に上昇していた。

#P<0.05 vs HCl-treated wild type mice.
*P<0.05 vs the saline groups.

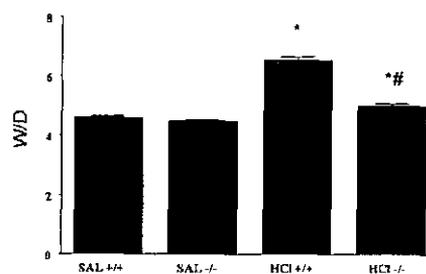


図9 塩酸気管内投与による肺内水分量の反応。湿乾重量比 (W/D) は、塩酸投与・野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に低下していた。

#P<0.05 vs HCl-treated wild type mice.
*P<0.05 vs the saline groups.

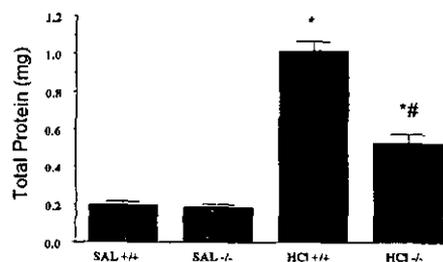


図10 塩酸気管内投与による肺内蛋白

漏出。BALF protein は、塩酸投与・野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に低下していた。

#P<0.05 vs HCl-treated wild type mice.
*P<0.05 vs the saline groups.

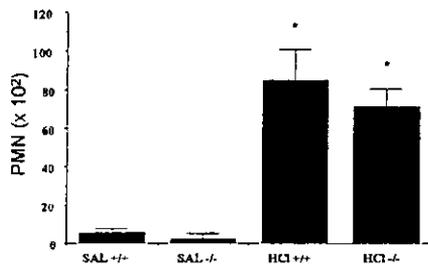


図 1 1 塩酸気管内投与による肺内好中球浸潤。BALF 好中球は、塩酸投与群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に有意差は認められなかった。

*P<0.05 vs the saline groups.

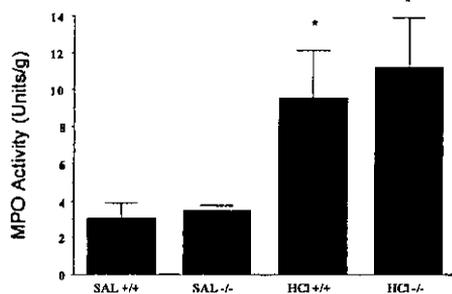


図 1 2 塩酸気管内投与による肺内白血球浸潤。Myeloperoxidase activity (MPO) は、塩酸投与群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に有意差は認め

られなかった。

*P<0.05 vs the saline groups.

<AM の気道過敏性発症機序への関与>

MCh 気道反応性において、感作された野生型群では、saline 群に比べ有意に肺抵抗が増加していた。一方、感作された AM ノックアウトマウス群は、野生型群と比べて有意に肺抵抗が上昇しており、MCh 気道反応性が亢進していることが示唆された。

BALF 細胞分画解析において、感作により著明な eosinophilia が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間に有意差は認めなかった。また両群間で BALF IgE 濃度の有意差は認めず、抗原感作レベルも同等であることが示唆された。

組織所見では、感作により著明な気道炎症が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間に有意差は認めなかった。

Methacholine dose-response curves for lung resistance (RL)

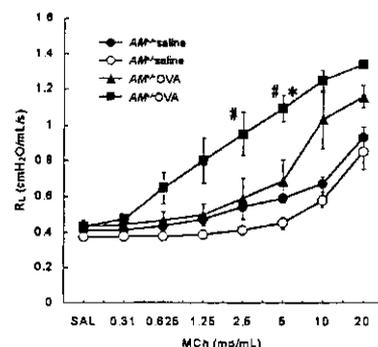


図 1 3 Methacholine (MCh) 投与における肺抵抗の反応

MCh 吸入投与において、ovalbumin (OA) 感作・AM ノックアウトマウス群は、肺抵抗 (R_L) が他群よりも有意に高い。

#P<0.05 vs the other groups.

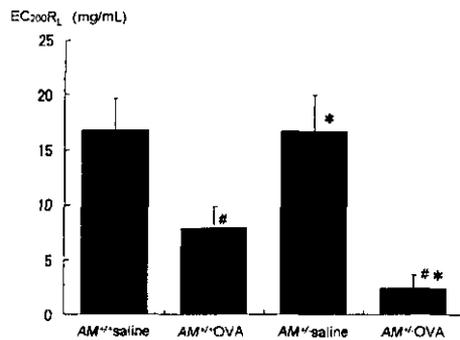


図 1 4 Methacholine (MCh) 気道反応性。OA 感作・AM ノックアウトマウス群は、気道反応性が他群よりも有意に高い。#P<0.05 vs saline groups.

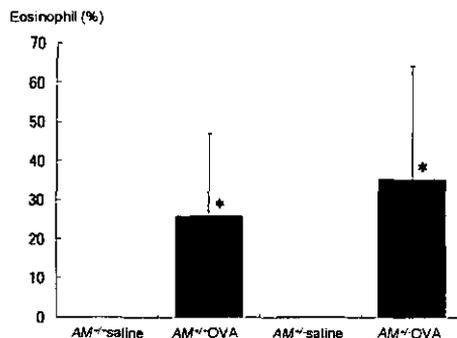


図 1 5 OA 感作による肺内好酸球浸潤。BALF 好酸球は、OA 感作群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に有意差は認められなかった。*P<0.05 vs the saline groups.

D. 考察

1) 脂質性メディエーター:

<cPLA₂ 遺伝子ノックアウトマウス>

上述のように、PAF、プロスタグラン

ジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどは、多彩な生理活性作用を有するメディエーターであり、呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。特に、cPLA₂は、治療薬開発のターゲットとして有望であることが期待される。このcPLA₂遺伝子を破壊したノックアウトマウス (cPLA₂-KOマウス) が、Uozumiらにより報告された。このcPLA₂-KOマウスは、エイコサノイドおよびPAFをほとんど産生せず、感作後の抗原暴露時に出現するべき気道過敏性が消失していることが示された。なお、雌cPLA₂-KOマウスにおいては分娩時に陣痛が出現しないことが観察された。一方、出生時形態的奇形を呈しておらず、発育・成長においてもコントロールの野生型マウスと比べ全く差を認めていない。すなわち、cPLA₂の遺伝子-酵素系を完全に抑制し、アラキドン酸カスケードの産生を阻害しても、生体の発生・発育に重大な支障をきたさない可能性を呈示する。この知見は、治療薬の開発・実用化の見通しに寄与すると考えられる。また、cPLA₂-KOマウスを用いて、敗血症(LPS投与)および胃液吸引(塩酸気管内投与)モデルを作成したところ、いずれのモデルにおいても、ノックアウトマウスでは肺水腫、呼吸不全、好中球浸潤が抑制され、生存率が改善することが観察された(Nagase, *Nature Immunology* 1:42-46, 2000)。従って、ARDS分子機序におけるcPLA₂の重要な関与が示され、新治療法への展望が期待されている。

<肺線維症モデル>

肺線維症(特発性間質性肺炎)は、特定疾患に指定されている難病である。病理学的には肺胞壁における炎症性細胞浸

潤、線維芽細胞増生、コラーゲン沈着を呈する。また病態生理学的には、肺胞気と肺毛細血管の間のガス交換障害により、進行性の呼吸不全をきたすのが特徴である。本邦における肺線維症の有病率は10万人中2-3人とされているが、米国での疫学的研究では10万人中20-30人程度(75歳以上では10万人中250人)という報告もある。平均生存年数は発症から約3年とされ、予後は極めて不良である。肺線維症に対して根本的に有効な治療薬剤は開発されておらず、治療としては保存的治療(酸素療法)が行なわれている。外科的には肺移植の選択肢もあるが、実施は極めて困難であるのが実情である。肺線維症の発症分子機構は不明であるが、肺胞壁における炎症促進機序が基盤に存在しており、炎症性メディエーターの関与が推察されている。

今回の実験結果より、cPLA₂が肺線維症の発症機序において決定的な役割を果たしている可能性が示唆された(Nagase, *Nature Medicine*, 2002)。

なお、cPLA₂の下流のメディエーターであるPAFの関与についてPAFR-KOマウスを用いて検討したところ、PAFR-KOマウスでは、肺線維症様の諸症状が部分的に軽減していることが観察された。一方、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなど個別のエイコサノイドの関与については、未だ詳細ではなく今後の検討課題である。

肺線維症は、社会的にも極めて重大な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。その疾患発症機序において、エイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが推察されている。今後、各々のエイコサノイドがもつ生理的意

義・重要性が解明されることにより、肺線維症に対する有効な治療法・治療薬の開発および実用化が期待される。

<ARDSモデル>

ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome、成人呼吸促迫症候群) は、1967年、Ashbaughらによって提唱された疾患概念であり、最近では急性肺損傷(acute lung injury)に包含される病態である。ARDSは、発症後短時間で肺水腫、低酸素血症を呈する急性呼吸不全であり、頻度の高い誘発原因として敗血症、胃液誤嚥(嚥下性肺炎)、外傷などが挙げられる。ARDSは、報告後30年以上を経た現在もなお死亡率が40-70%にも達する予後不良の疾患である。現在のところ、その治療は、人工呼吸管理、感染症対策といった対症療法が主体であり、有効性が実証された薬剤はない。ARDSの発症機序には、サイトカインなど種々の炎症関連物質が複雑に関与している可能性が報告されている。しかしながら、その分子機構は未だ明かではない。現在、ARDSの有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的として、様々な研究アプローチがなされており、研究面では、有望と思われる分子機序が報告されつつある。

例えば、エイコサノイドなどの脂質性メディエーターは、重要な炎症起因物質と想定され、ARDS発症の分子機構に寄与している可能性が推察される。

本研究では、敗血症(LPS投与)モデルを検討したが、cPLA₂阻害薬としてのATK投与により、肺障害・呼吸不全が抑制されることが観察された。この知見は、cPLA₂ノックアウトマウスと同等である。この本実験の観察結果より、ARDS分

子機序における cPLA₂ の重要な関与が示され、新治療法への展望が見込まれる。

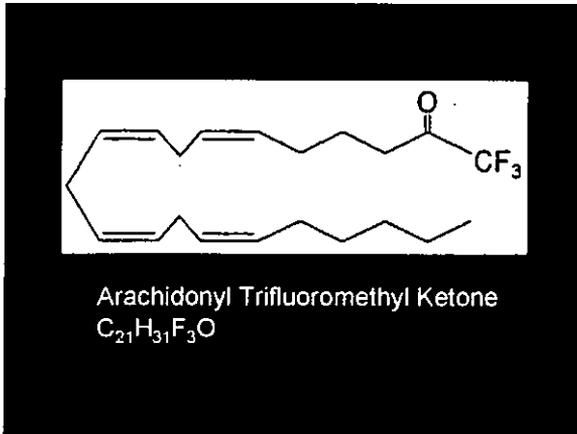


図 1 6 arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK) の構造式。アラキドン酸誘導体であり、cPLA₂ 阻害薬として作用する。しかし、slow-reacting であり、治療薬には適さない。

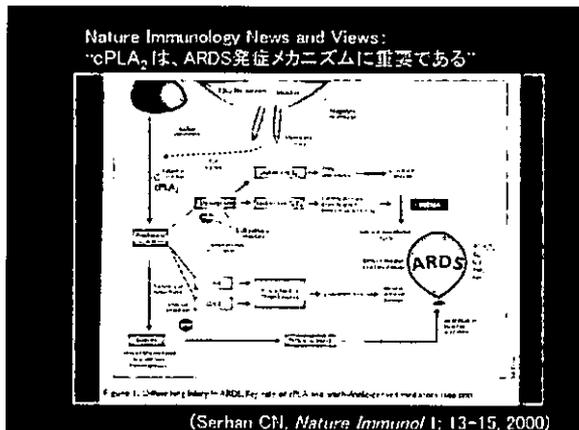


図 1 7 ARDS 発症メカニズムの模式図。
(本研究者らの論文 "Nagase, *Nature Immunology* 1:42-46, 2000" に対する解説紹介)

2) 抗菌ペプチド:

<defensin の抗菌作用発現機構> ヒトにおいて human beta defensin-2 (hBD2) が発見され、皮膚や呼吸器系において感

染防御および炎症調節機序に重要な役割を果たしている可能性が報告されてから (*Nature*, 1997)、defensin は、感染防御機構の重要な構成因子として急速に注目されつつある。さらに hBD2 が、ケモカイン CCR6 を介して T cell を遊走させ、免疫機序活性化にも関与することが報告され (*Science* 1999)、免疫学的にもその重要性が着目されている。しかしながら、defensin の抗菌メカニズムをはじめ、その発現機構は未だ解明されていない。たとえば、defensin は、Na⁺ の存在によって濃度依存的に抗菌活性を消失することが知られており、イオン環境が抗菌作用発現に重要と考えられるが、生体内における defensin の抗菌作用は全く未知であり、生体内イオン環境における抗菌活性の検討が必須である。また、TNF などの炎症誘起性サイトカインが defensin の誘導・産生に寄与することが報告されているが、その他の主要な炎症促進・制御メディエーター (エイコサノイド、PAF など) の defensin の誘導・産生への関与に関しては不明であり、現在、本研究グループが着手しつつある。

<加齢による mBD 発現の変化: LPS による誘導発現>

加齢による innate immunity への影響を検討するため、加齢マウスを用いて beta defensin の発現を検討した。その結果、複数のマウス β-defensin は舌、精巢上体、食道、気管など広範に発現を認め。特に、舌において最も強い発現を確認した。抗菌ペプチドである β-defensin の舌における発現は、口腔内常存菌の制御に関与している可能性が示唆される。さらにその発現は加齢にて減少傾向がみられたことより、高齢者の肺炎におけ

る局所関連因子の可能性も考えられる。

今後さらに症例を重ねた検討および組織発現分布などの検討が必要と思われる。また、PAFR-KO などを用いた加齢マウス実験の検討を行うことにより、加齢現象と innate immunity の関係および疾患発症メカニズムについて、さらに明らかになることが予想され、現在、マウスの加齢化を進行させつつある。

3) CGRP ファミリー:

<CGRP の ARDS 発症機序への関与>

現在、ARDS の有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的として、様々な研究アプローチがなされており、研究面では、有望と思われる分子機序が報告されつつある。例えば、CGRP などの生理活性ペプチドは、血管透過性に影響を与えることにより ARDS 発症に関わる可能性も考えられる。そこで、塩酸誤嚥による ARDS モデルを作成し CGRP 遺伝子欠損マウスを用いて解析・検討した。その結果、塩酸を投与された CGRP ノックアウトマウス群は、野生型群と比べて有意に呼吸不全・肺障害・肺エラスタンズが低下しており、CGRP が ARDS 発症機序に関わる可能性が示唆された。しかしながら CGRP ノックアウトマウスにおいて好中球浸潤に対する影響は認められなかった。この所見より、CGRP が炎症細胞浸潤よりも血管透過性に影響を与えることによって ARDS 発症機序に関わる可能性が推察されるが、今後さらなる検討が必要である。

CGRP 遺伝子欠損マウスは、CGRP が関与する呼吸器疾患の病態メカニズムの解明に寄与することが期待される。

<AM の気道過敏性発症機序への関与>

CGRP ファミリーの一員である adrenomedullin (AM) も循環器・呼吸器系に豊富に存在し、強力な生理活性作用を有することが報告されている。AM は、血管平滑筋を弛緩させることが報告されるが、多量に存在するにもかかわらず呼吸器系における病態生理学的意義は不明であった。近年、AM 遺伝子欠損マウスが作成され、AM が発生や循環動態に重要であることが報告されている。AM 遺伝子欠損マウスのホモ接合体は、胎内において死亡するため、生存個体を得ることが不可能である。このため本研究実験 3 では、ヘテロ接合体の AM 遺伝子欠損マウスを用いて、AM の気道過敏性発症機序への関与について検討した。その結果、AM 遺伝子欠損マウスにおいて気道過敏性が亢進することが明らかとなった。このことより内因性 AM の減少が、気道過敏性の亢進に関与することが示唆される。

<本研究成果の重要性>

高齢者における炎症性肺疾患は、社会的に極めて重大な疾患となっている。特に、ARDS、特発性間質性肺炎は、難治性、致死性において他に類をみない程、重篤な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。肺炎や気管支喘息は、世界的にも発症頻度、死亡率が増大しつつあり、画期的な治療薬の開発が期待されている。これら炎症性呼吸器疾患の発症分子機構は、極めて複雑であり、より一層の研究が必要である。また、感染症が重要な病態悪化因子となっており、defensin を含めた感染防御の視点も必須と考えられる。

PAF およびエイコサノイド（プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコト

リエン) は、多彩な生理活性作用を有するメディエーターであり、気管支喘息やARDSなど呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。特に、アラキドン酸カスケードの起点となる酵素である cPLA₂ は、治療薬開発のターゲットとして有望であることが期待される。また、LTB₄ ノックアウトマウスからの知見により、LTB₄ の阻害薬が実用化されることも期待される。

以上より本研究の成果は、難治性の老年者呼吸器系炎症性疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが予想される。

本研究の成果により、cPLA₂ や defensin、CGRP、AM などをはじめとして、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いと思われる。発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供する独創的なものであり、本研究の成果は炎症性肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。また発生工学的技術を用いた研究は、薬剤開発のプロセスを短縮し、実用化に大きく寄与することが予想される。老年者における重症肺炎、ARDS、特発性間質性肺炎、難治性気管支喘息に対する治療薬の開発は、社会医学的にも医療福祉・医療経済的にも莫大な貢献をなすことが期待される。

E. 結論

1) 肺線維症は、呼吸不全をきたす難病であり、現在有効な薬剤が開発されていない。その発症分子機構は不明であるが、

炎症性メディエーターの関与が推察されている。本研究により、アラキドン酸カスケードの起点となる cPLA₂ が、肺線維症の発症機序に重要であることが明らかとなり、治療標的となる可能性が示唆された。

2) cPLA₂ 阻害作用のある arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK) の投与により、敗血症モデルの肺水腫・呼吸不全が改善し、cPLA₂ 阻害薬がARDSの治療候補薬となりうることが示唆された。

3) LPS による hBD2 発現を検討したところ、転写因子 (AP-1, NFκ-B) が hBD2 誘導・発現に必須であること、および steroid が hBD2 誘導・発現を減弱すること、さらに COX inhibitor は hBD2 誘導・発現に影響を与えないことが明らかにされた。

4) 加齢による innate immunity への影響を検討するため、加齢マウスを用いて beta defensin の発現を検討した。その結果、複数のマウス β-defensin は舌、精巣上体、食道、気管など広範に発現を認めた。特に、舌において最も強い発現を確認した。抗菌ペプチドである β-defensin の舌における発現は、口腔内常存菌の制御に関与している可能性が示唆される。さらにその発現は加齢にて減少傾向がみられたことより、高齢者の肺炎における局所関連因子の可能性も考えられる。

5) CGRP 遺伝子欠損マウスを用いた検討により、内因性 CGRP の存在がARDS発症に関与する可能性が示された。

6) AM 遺伝子欠損マウスにおいて気道過敏性が亢進することが明らかとなった。このことより内因性 AM の減少が、気道過敏性の亢進に関与することが示唆される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Takai D, Nagase T, Shimizu T. New therapeutic key for cystic fibrosis: a role for lipoxins. **Nature Immunol** 2004; in press. (News and Views) (論文解説)
- 2). Nagase T, Uozumi N, Aoki-Nagase T, Terawaki K, Ishii S, Tomita T, Yamamoto H, Hashizume K, Ouchi Y, Shimizu T. A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A₂, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2003; 284: L720-L726.
- 3). Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. The effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8 and MCP-1. **J Appl Physiol** 2003; 94: 179-184.
- 4). Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Tomita T, Ohga E, Nagai R, Kurihara H, Ouchi Y. Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2002; 283: L963-L970.
- 5). Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in the humans and mice. **J Immunol** 2002; 169: 2516-2523.
- 6). Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi Y, Yoshizumi M, Ouchi Y. Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). **Respirology** 2002; 7: 305-310.
- 7). Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kita Y, Yamamoto H, Ohga E, Ouchi Y, Shimizu T. A pivotal role of cytosolic phospholipase A₂ in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Nature Medicine** 2002; 8: 480-484. (新聞各紙誌上にて紹介される)
- 8). Nagase T, Ishii S, Shindou H, Ouchi Y, Shimizu T. Airway hyperresponsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor is mediated by an atropine sensitive pathway. **Am J Respir Crit Care Med** 2002; 165: 200-205.

2. 学会発表

- 1). Roles of lipid mediators in respiratory diseases. 第42回日本呼吸器学会総会 (Leading Lecture), 2002.
- 2). 炎症性肺疾患発症分子機構の解明による新治療法開発の戦略的展開. 第42回日本呼吸器学会総会 (熊谷賞受賞講演), 2002.
- 3). 気道過敏性の構成要素: 遺伝子操作

マウスモデルから得られたアイデア.
第 52 回日本アレルギー学会総会 (シンポジウム), 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 番号： 特願 2003-034885

発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、
山口泰弘

発明の名称： 筋ジストロフィー症の病
態モデル哺乳動物、及びその製造方法

出願人：財団法人くまもとテクノ産業財
団

出願日： 平成 15 年 2 月 13 日