

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14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 長瀬 隆英

平成17（2005）年 3月

目 次

I. 総合研究報告書	
1. 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 -----	1
主任研究者 長瀬 隆英	
2. 炎症性疾患におけるdefensin発現異常の関与に関する研究 -----	20
分担研究者 栗原 裕基	
3. Gタンパク質共役型受容体を介した生体制御機構の解析 -----	42
分担研究者 石井 聡	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	59
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	62

総合研究報告書

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および
新治療法開発の戦略的展開

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を示唆された。

3) 白血球遊走に関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、LTB₄ 受容体が気管支喘息モデルにおける気道過敏性、炎症細胞浸潤に関与することが示唆された。

4) マウス筋肉、およびヒト・マウス精巣上体に発現する新しい beta defensin を発見した。また新たに mBD6 トランスジェニックマウスを作成し検討したところ、mBD6 と筋ジストロフィーとの関連が示唆された。

5) 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。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。

6) CGRP 遺伝子欠損マウスを用いた検討により、内因性 CGRP の存在が気道過敏性発症に関与することが示された。

7) 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

研究協力者

山口泰弘・東京大学医学部附属病院

高井大哉・東京大学医学部附属病院

横溝岳彦・東京大学大学院医学系研究科
助教授

A. 研究目的

高齢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、高齢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。

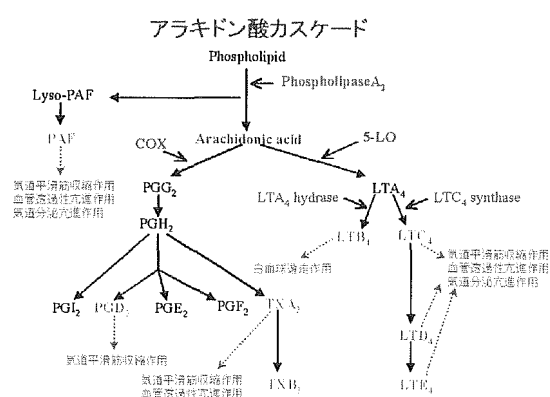


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

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、白血球遊走に関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関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関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、気道	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、気管、食道	constitutive	報告なし	<i>J.Biol.Chem.</i> 2000
mBD5	報告なし		報告なし	
mBD6	骨格筋、食道、舌、気管	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関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 sequences of human AM with human CGRP, CGRP-II, and amylin (CGRP family)

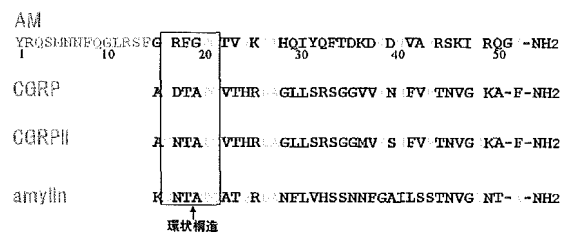
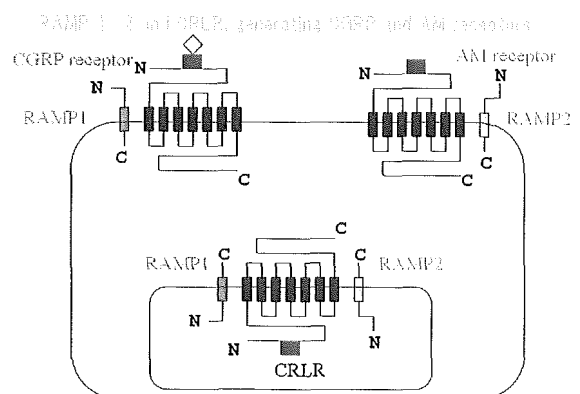


図3 CGRP ファミリーペプチド群の amino 酸配列



(McLatchie et al. *Nature* 393, 1998より改変)

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：

＜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)。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。

＜LTB₄ 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成＞

高齢者炎症性肺疾患において、白血球

遊走・賦活化は極めて重要な位置を占めると考えられる。本研究では、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、その機能解析を行う。

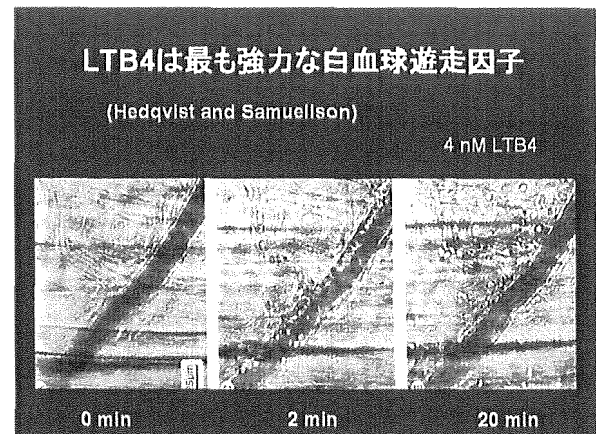


図5 ロイコトリエン B₄ (LTB₄) 投与により白血球遊走が生じる様子 (1982 年、Samuelsson が Nobel Lecture で提示)。

1997 年、東京大学の横溝らは、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)した。そこで本研究グループは、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、LTB₄ 受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索した。

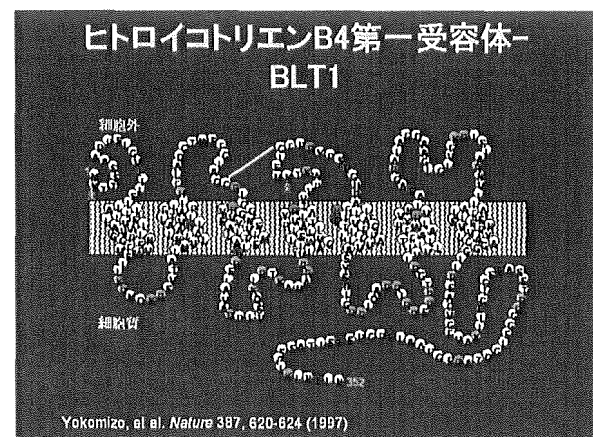


図6 ロイコトリエン B₄ (LTB₄) 第1受容体 (BLT1) の構造。

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。

<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 の気道過敏性発症機序への関与>

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。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。

<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。

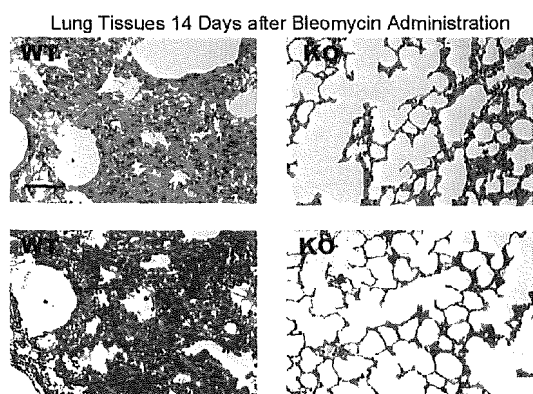


図7 ブレオマイシン気管内投与後の野生型マウス(WT) および cPLA₂-KO マウス(KO)の肺組織所見(染色は、上段が HE, 下段が Masson's trichrome, scale bar = 50 μ m). 野生型マウスでは、肺胞壁の肥厚、炎症性細胞浸潤、コラーゲン沈着が認められるが、cPLA₂-KO マウスでは肺線維症様所見が著しく軽減している。

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。

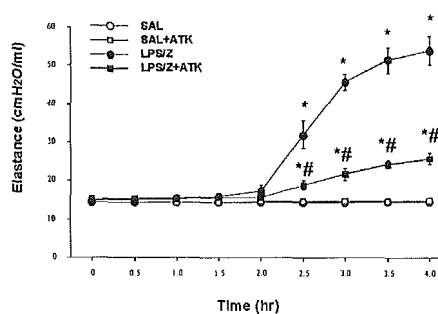


図8 LPS/zymosan 投与 (zymosan は LPS 投与後 2h に投与)における肺エラスタンスの経時的変化。ATK を投与された LPS/zymosan 群は、ATK 非投与群と比べて有意に肺エラスタンスが低下しており、生理学的変化が軽度であることが示唆される。

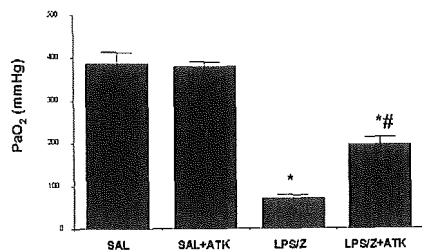


図9 LPS/zymosan 投与 ARDS モデルにおける動脈血酸素分圧 (PaO₂)。ATK を投与された LPS/zymosan 群は、ATK 非投与群と比べて有意に呼吸不全が軽度である。

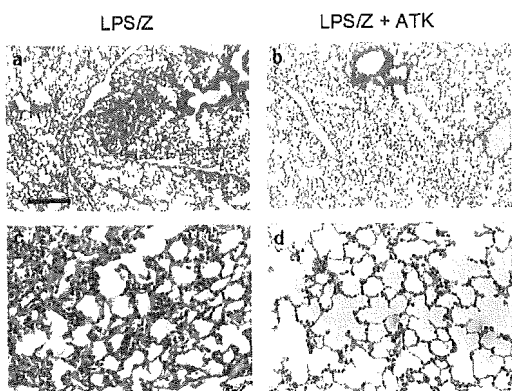


図10 LPS/zymosan 投与 ARDS モデルにおける肺組織所見。ATK を投与された LPS/zymosan 群は、ATK 非投与群と比べて有意に組織学的変化（炎症細胞浸潤や diffuse alveolar damage）が軽度である。HE 染色、scale bar = 200 μm (a,b), 50 μm (c,d)。

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のを選び、ヘテロ接合体を得た。この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た。ホモ接合体 LTB₄R ノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。

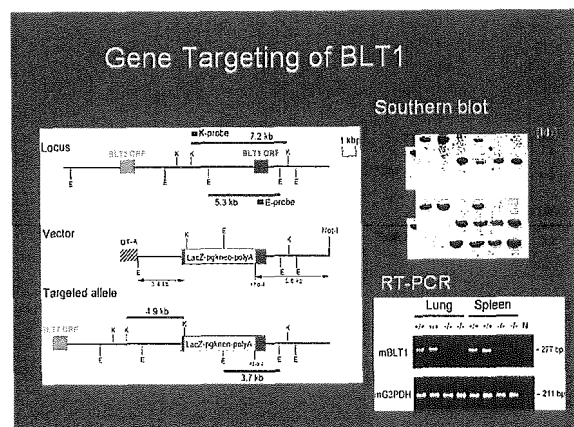


図11 LTB₄ 第1受容体 (BLT1) ノックアウトマウスの作成。

確立された BLT1 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て、気管支喘息モデルにおける検討を行った。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。その結果、LTB₄ ノックアウトマウスでは、感作されたノックアウトマウス群は、野生型群と比べて MCh 気道反応性が低下していることが示唆された。BALF 解析において、ノックアウト

マウス群では eosinophilia が著明に軽減していることが認められた。BALF 中の Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)もノックアウトマウス群では著明に軽減していた。

Reduced Methacholine Response in BLT1-null Mice

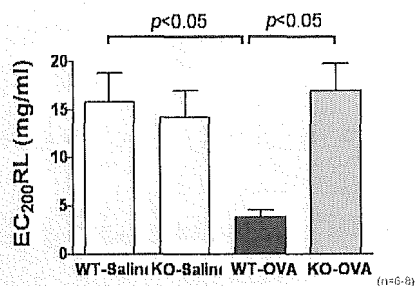


図 1 2 Methacholine (MCh) 気道反応性。OA 感作・野生型群で認められる気道過敏性が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では有意に抑制されている。

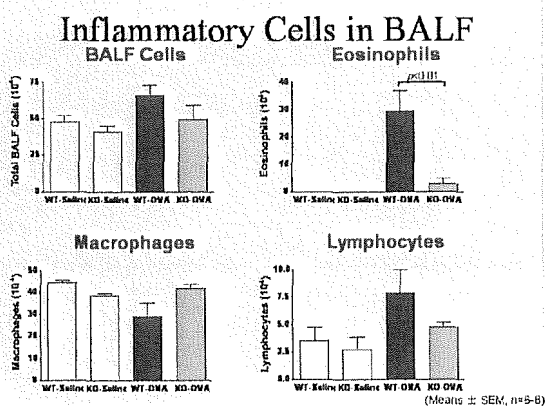


図 1 3 BALF 中の白血球細胞分画。OA 感作・野生型群で認められる好酸球浸潤が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では抑制されている。

Th2 Cytokines Are Reduced in BALF

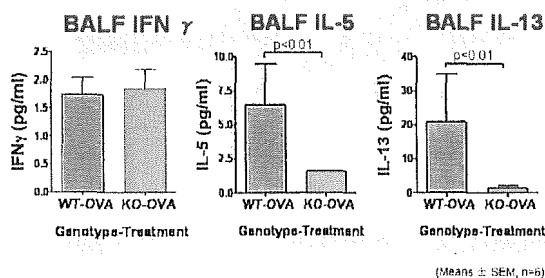


図 1 4 Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減。

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, NF κ -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。また新たに mBD6 トランスジェニックマウスを作成し検討したところ、mBD6 と筋ジ

ストロフィーとの関連が示唆された（分担研究者、栗原による分担研究報告書に詳細を記載）。

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。

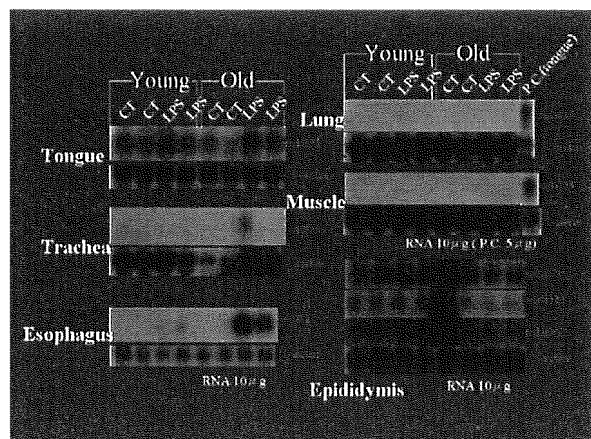


図 15 C57BL/6 若年群（4ヶ月令）および老年群（20ヶ月令）における LPS 誘導性 mBD 遺伝子発現。

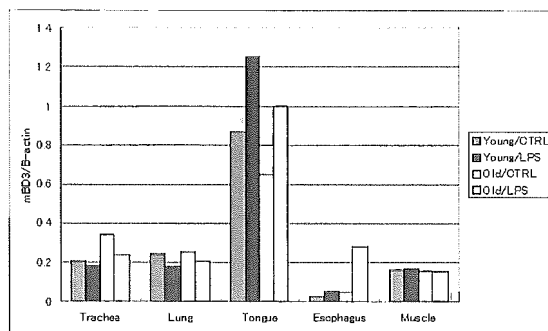


図 16 C57BL/6 若年群（4ヶ月令）および老年群（20ヶ月令）における LPS 誘導性 mBD 遺伝子発現。mBD-3 は、LPS 投与群において舌で強い発現が認められた。その発現は老年群にて減少傾向が認められた。

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・肺エラスタンスが増加していた。一方、感作された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・肺エラスタンスが低下しており、MCh 気道反応性が低下していることが示唆された。

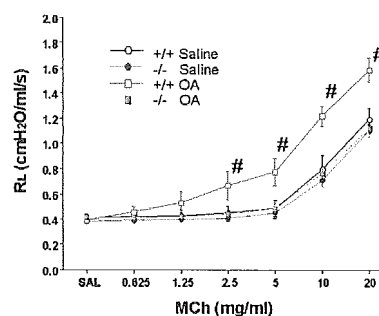


図 17 Methacholine (MCh) 投与における肺抵抗の反応

MCh 吸入投与において、ovalbumin (OA) 感作・野生型群は、肺抵抗 (R_L)が他群よりも有意に高い。OA 感作ノックアウトマウスは、saline (SAL) 群と同様の MCh 気道反応性を呈する。

$P < 0.05$ vs the other groups.

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おいて有意差は認めなかった。また両群間に BALF IgE 濃度の有意差は認めず、抗原感作レベルが同等であることが示唆された。BALF CysLTs ($LTC_4/D_4/E_4$)に関しては、感作された野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇しており、本研究に用いたアレルギー性気管支喘息実験モデルにおいて肺内 CysLTs ($LTC_4/D_4/E_4$)が増加することが示唆された。一方、感作されたノックアウトマウス群は、対照となる野生型群と比べて有意に CysLTs ($LTC_4/D_4/E_4$) が低下していた。

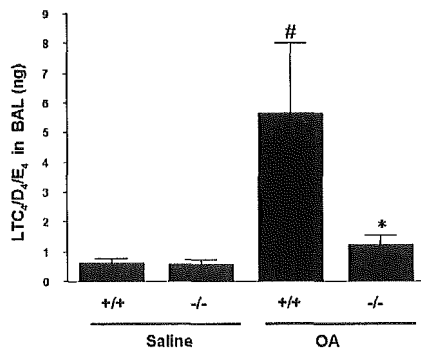


図 18 BALF CysLTs ($LTC_4/D_4/E_4$) 濃度の測定結果

BALF CysLTs ($LTC_4/D_4/E_4$)は、ovalbumin (OA) 感作・野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、感作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 CysLTs

($LTC_4/D_4/E_4$) が低下していた。

* $P < 0.05$ vs OA-sensitized wild type mice.
$P < 0.05$ vs the saline groups.

一方、 TXB_2 、ET-1 濃度においては、各群間に有意差を認めなかった。

中枢気道においては、野生型群で CGRP-immunoreactivity を認め、特に感作・野生型群において著明であった。一方、ノックアウトマウスでは、非感作・感作群のいずれにおいてもほとんど CGRP-immunoreactivity を認めなかった。

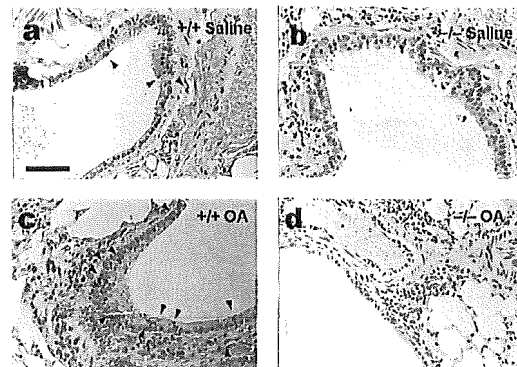


図 19 中枢気道における CGRP 免疫組織染色

野生型群で CGRP-immunoreactivity を認め、特に感作・野生型群において著明である。一方、ノックアウトマウスでは、非感作・感作群のいずれにおいてもほとんど CGRP-immunoreactivity を認めない。(scale bar = 50 μ m).

<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おいて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おいて有意差は認めなかった。

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.

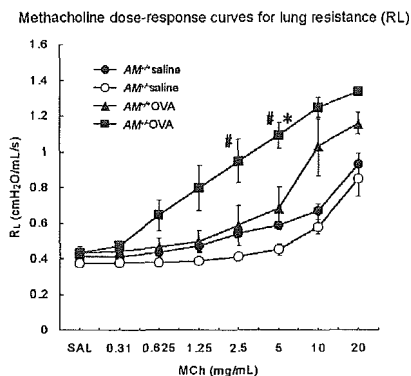
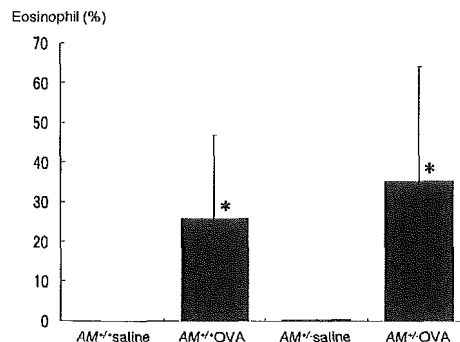


図 2 2 OA 感作による肺内好酸球浸潤。BALF 好酸球は、OA 感作群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に有意差は認められなかった。
*P<0.05 vs the saline groups.

図 2 0 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.

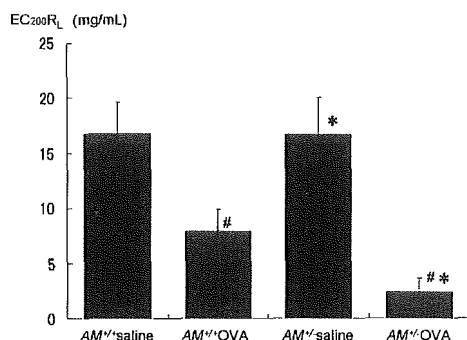


図 2 1 Methacholine (MCh) 気道反応性。

Histology-1(HE)

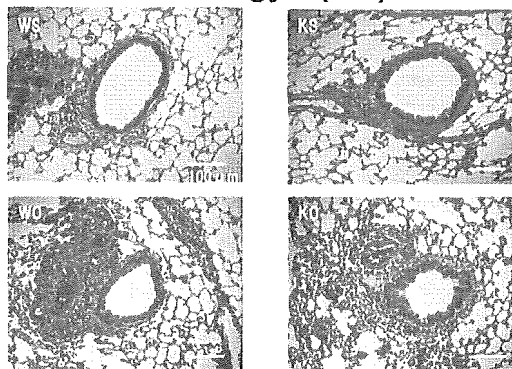


図 2 3 OA 感作による気管支周囲炎症細胞浸潤。OA 感作群で、気管支周囲炎症細胞浸潤を認めるが、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に差は認められなかった。

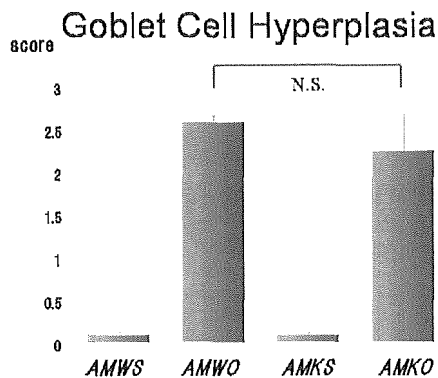


図 2 4 OA 感作による気道上皮杯細胞過形成。OA 感作群で、杯細胞過形成を認めるが、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に差は認められなかった。

D. 考察

1) 脂質性メディエーター：

<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。

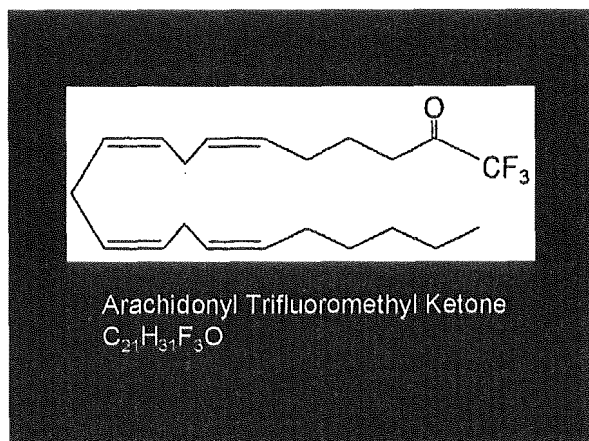


図25 arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK)の構造式。アラキドン酸誘導体であり、cPLA₂阻害薬として作用する。しかし、slow-reacting であり、治療薬には適さない。

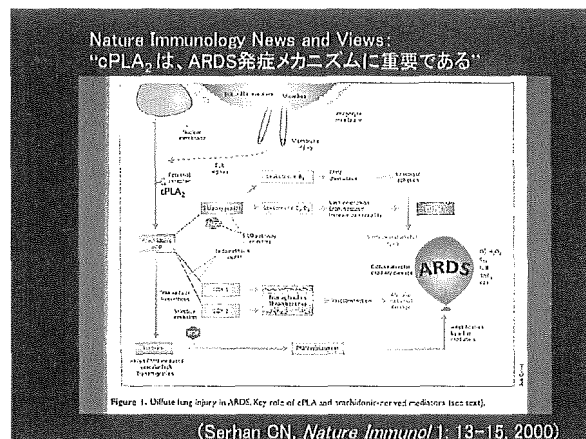


図26 ARDS発症メカニズムの模式図。(本研究者らの論文 "Nagase, *Nature Immunology* 1:42-46, 2000" に対する解説紹介)

<LTB₄受容体遺伝子ノックアウトマウス>

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、高齢者炎症性肺疾患において、白血球遊走・賦活化は極めて重要な位置を占めると考えられる。本研究では、白血球遊走に関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、その機能解析を目指した。

1997年、東京大学の横溝らは、世界ではじめてLTB₄受容体のクローニングに成功し(*Nature* 1997)した。LTB₄受容体は、G-protein coupled receptor (GPCR) 群のひとつであり、系統樹としてはPAF受容体やCysLT1受容体からはやや遠い位置にある。

Phylogenetic Tree of various GPCRs

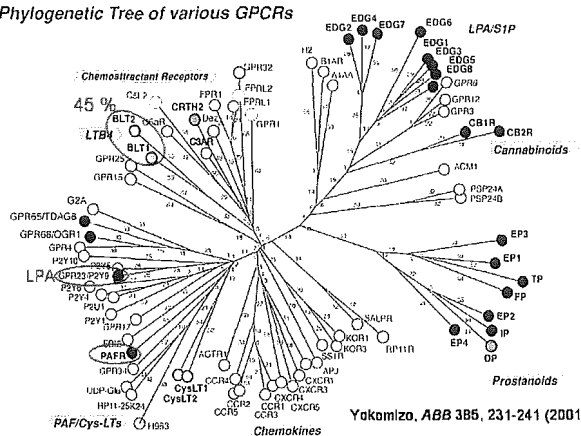


図 27 GPCR の系統樹。

本研究グループは、LTB₄ 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成に着手し、LTB₄ 受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索することを目指した。その結果、ホモ接合体 LTB₄R ノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。この知見は、LTB₄ が生殖・発達に大きく寄与しない可能性を提示するものである。

LTB₄R ノックアウトマウスが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という知見は、たとえば LTB₄ 拮抗薬治療薬の開発・実用化の見通しに寄与すると考えられる。

また、LTB₄R -KO マウスを用いて、気管支喘息モデルにおける検討を行った。その結果、LTB₄ ノックアウトマウスでは、感作された LTB₄R -KO マウス群は、野生型群と比べて MCh 気道反応性が低下していることが示唆された。また BALF 解析において、ノックアウトマウス群では eosinophilia が著明に軽減していることが認められた。BALF 中の Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減していた。

この実験結果より、LTB₄ 受容体が気管支喘息モデルにおいて、気道過敏性および好酸球浸潤の発現に決定的な意義を有していることが示唆された。

なお今後は、本研究により確立された LTB₄R -KO マウスを用いて ARDS モデル (Nagase, *Nature Immunol*, 2000)や肺線維症 (特発性間質性肺炎) モデル (Nagase, *Nature Medicine*, 2002)の検討を進める予定である。今後、LTB₄ を含めて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、高齢者の難治性呼吸器疾患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。

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。

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 の気道過敏性発症機序への関与>

CGRP は気道収縮物質あるいは気道拡張物質のどちらであるか、また、好酸球遊走能を持つかあるいは持たないか、ということに関してこれまで議論が行われてきたが、様々な報告が呈示され、結論

は出ていなかった。今回の研究結果により、少なくとも内因性 CGRP は気道過敏性に関与すること、また好酸球浸潤に関わる可能性が低いことが示された。気管支喘息における気道炎症の発症機序に、炎症メディエーターなどの生理活性物質が関与すると考えられている。本研究の結果、TXB₂ (TXA₂ の指標)、ET-1 では実験各群で有意差を認めず、本実験モデルにおいて気道過敏性・気道炎症への関与は証明されなかった。一方、感作・抗原負荷された CGRP 遺伝子欠損マウスは、対照となる感作・抗原負荷野生型マウスに比べて有意に BALF CysLTs (LTC₄/D₄/E₄) が低下していることが観察された。これは、本実験に用いたアレルギー性気管支喘息モデルにおいて、内因性 CGRP の存在が CysLTs (LTC₄/D₄/E₄) の産生・代謝に関与することを示唆している。免疫組織学的検討では、野生型マウスの中枢気道において、CGRP immunoreactivity が観察されたが、ノックアウトマウスではほとんど CGRP-immunoreactivity を認めなかった。

以上、本実験による知見により、内因性 CGRP の存在が気道過敏性発症に関与することが示された。従って今後、CGRP 本体や、その機能発現に関わる系などが、気管支喘息の研究対象として拡がることが推察される。また、本研究で用いた 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。一方、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おいて有意差は認めなかった。

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、そのメカニズムの解明を進行中である。

<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、難治性の高齢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、LTB₄、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。高齢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) 白血球遊走に関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、LTB₄ 受容体が気管支喘息モデルにおける気道過敏性、炎症細胞浸潤に関与することが示唆された。

4) マウス筋肉、およびヒト・マウス精巣上体に発現する新しい beta defensin を発見した。また新たに mBD6 トランスジェニックマウスを作成し検討したところ、mBD6 と筋ジストロフィーとの関連が示唆された。

5) 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。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。

6) CGRP 遺伝子欠損マウスを用いた検討により、内因性 CGRP の存在が気道過敏性発症に関与することが示された。

7) 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。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1.論文発表

1). Ishii S, Nagase T, Shindou H, Takizawa H, Ouchi Y, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor develops airway hyperresponsiveness independently of airway inflammation in a murine asthma model. **J Immunol** 2004; 172: 7095-7102.

2). Takai D, Nagase T, Shimizu T. New therapeutic key for cystic fibrosis: a role for lipoxins. **Nature Immunol** 2004; 5: 357-8. (News and Views)(論文解説)

3). Jo T, Nagata T, Iida H, Imuta H, Iwasawa K, Ma J, Hara K, Omata M, Nagai R, Takizawa H, Nagase T, Nakajima T. Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: Involvement of SCN9A. **FEBS Lett** 2004; 567: 339-43.

4). 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.

5). 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.