

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者呼吸器疾患の発症
・制御に関する遺伝子・蛋白系の解明と治療応用

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長瀬 隆英

平成19 (2007) 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

高齢者呼吸器疾患の発症
・制御に關与する遺伝子・蛋白系の解明と治療応用

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長瀬 隆英

平成19 (2007) 年 3月

目 次

I. 統括研究報告書

- 高齢者呼吸器疾患の発症・制御に関する遺伝子・蛋白系の解明と治療応用：
慢性閉塞性肺疾患（COPD）を中心に ----- 1
長瀬 隆英

II. 分担研究報告

1. COPD の疾患感受性遺伝子の同定に関する研究：
ホモ接合ハプロタイプ法の開発 ----- 18
萩原 弘一
2. 炎症性疾患の病態における抗菌ペプチドの関与に関する研究 ----- 35
栗原 裕基
3. 脂質メディエーターによる生体制御機構の解析
—LPA₄受容体を介したLPAの生物作用— ----- 54
石井 聡

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 70

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 72

総括研究報告書

高齢者呼吸器疾患の発症・制御に関与する遺伝子・蛋白系の解明と治療応用：
慢性閉塞性肺疾患（COPD）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

21世紀を迎えた現在、呼吸器疾患の社会的重要性は急増しつつある。高齢者における COPD、ARDS、特発性間質性肺炎などは、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。特に COPD は高齢者での罹患率が高く、急速に高齢化社会が進む今日、病態の究明と治療法の開発が緊急の課題とされている。本研究では、1) 発生工学的的手法による遺伝子改変マウスの解析、2) ホモ接合指紋法を用いた COPD 遺伝子多型解析、など最新手法の開発・応用により、高齢者肺疾患の病態解明を進めた。その結果、以下の新知見が得られた。

- 1) 脂質性メディエーター、CGRP ファミリー、さらに発生への関与が示唆されている転写コアクチベーターTAZ に着目し、高齢者炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的的手法を駆使して探索した。その結果、各々のメディエーターが、高齢者肺疾患の病態に重要な役割を呈していることが示された。また、高齢者炎症性肺疾患研究の新たなアプローチとして、人工的肺・気管支モデルの開発を試み、モデルを確立した。
- 2) ホモ接合指紋法という画期的な遺伝子多型解析手法が確立された（分担研究者：萩原弘一）。
- 3) マウス β -defensin の遺伝子改変マウスが開発された（分担研究者：栗原裕基）。

以上の知見は、難治性的高齢者炎症性肺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。高齢者肺疾患に対する治療薬開発は医療福祉・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。

分担研究者

萩原弘一・埼玉医科大学教授

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
助教授

研究協力者

大石展也・東京大学大学院医学系研究科
講師

高井大哉・東京大学医学部附属病院講師
幸山 正・東京大学医学部附属病院特任

講師

A. 研究目的

21世紀を迎えた現在、呼吸器領域疾患の社会的重要性は急増しつつある。気管支喘息、COPDなどの患者数、死亡者数は年々増加しつつあり、増勢に歯止めがかからない状況にある。世界的にも、WHOによる予測では、2020年の死亡要因の第3位が慢性閉塞性肺疾患、第4位が下部呼吸器感染症（肺炎など）、第5位が肺癌、さらに第7位が結核と予想されるなど、呼吸器領域疾患による死亡者数の急増が予想されている。例えば米国においては、過去40年間で、虚血性心疾患や脳血管障害による死亡数が著明に減少しているのに対し、COPDによる死亡数は倍増の勢いにあり、今後も増加傾向が続くと予想されている。また、米国ではCOPD治療に要する医療費は莫大であり（約3-4兆円）、大きな社会問題となっている。死亡要因、医療コストの面で、今後、本邦も米国型となることが予想され、COPDを筆頭とする呼吸器領域疾患への対応はまさに急務である。

高齢化社会が急速に進行する今日、高齢者の7人に一人がCOPDに罹患していることが指摘されている。本研究の目的はCOPDなど高齢者呼吸器疾患の病態を解明し、治療への端緒を与え、これら的高齢罹患者の生活の質を改善することである。

また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脂質性メディエーター、CGRPファミリー、さらに発生への関与が示唆されている転写コアクチベーターTAZに着目し、高齢者炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索する。また、高齢者炎症性肺疾患研究の新たなアプローチとして、人工的肺・気管支モデルの開発を試みる。

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。

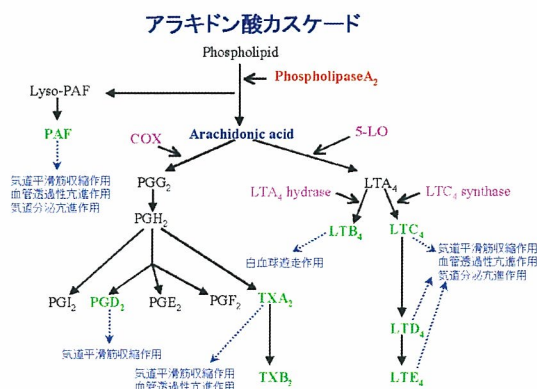


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

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、COPD、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。特にロイコトリエン(LT)系は、好中球遊走因子としての LTB_4 受容体(BLT1, BLT2 の2種類)や、炎症・免疫関連疾患に関わることが想定されている CysLT 受容体(CysLT1-R、CysLT2-R、の2種類)が発見され(*Nature*, 1997, 1999)、現在、本グループが遺伝子改変マウスを作成中である。

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高齢者肺疾患発症機序における意義を明らかにし、治療薬の開発および実用化を目指す。

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 遺伝子の高齢者呼吸器疾患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、気道疾患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 ARDS 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2 CGRP ファミリーペプチド群のアミノ酸配列

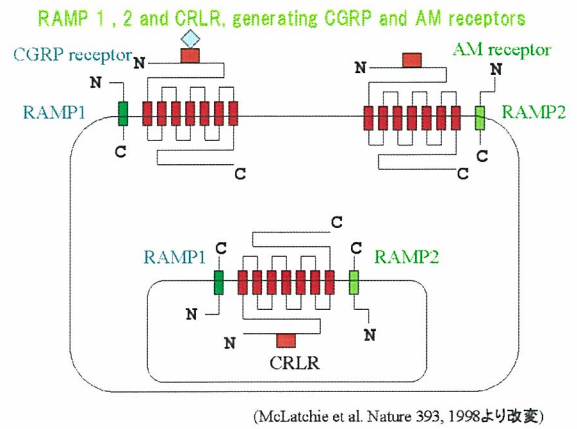
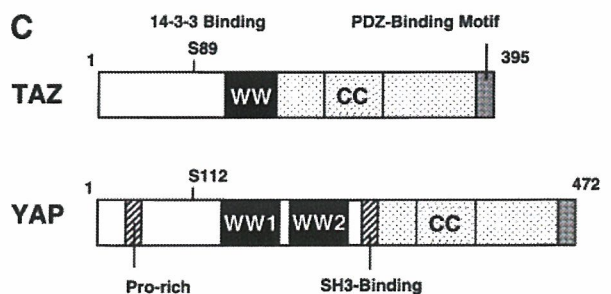


図3 CGRP ファミリーの受容体。肺には豊富に存在するが、その機能は未だに不明である。

転写コアクチベーター-TAZ :

転写コアクチベーター TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) は、14-3-3 proteinをはじめとする、PDZ domainを持つ転写因子と結合しその活性を制御する分子として同定・報告されたものである(*EMBO J* 19: 6778-91, 2000)。TAZは、WW domainを有しており、PPXYモチーフと結合することにより、転写コアクチベーターとしての機能を発現する。また最新の研究により、転写コアクチベーター-TAZが、TTF-1(thyroid transcription factor-1)やPax3と協調的に働くことにより、発生に大きく関与することが明らかにされつつある(*J Biol Chem* 279: 17384-90, 2004) (*Biochem Biophys Res Commun* 339: 533-9, 2006)。



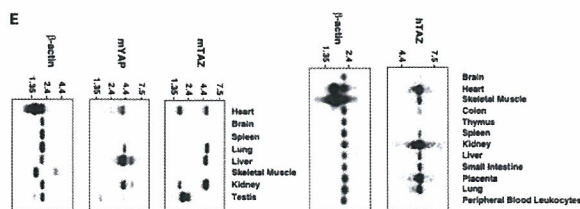


図4 転写コアクチベーターTAZ は、Yes-associated protein (YAP)とホモロジーを有する。また、肺にも強く発現している (*EMBO J* 19: 6778-91, 2000)。

例えば、本研究分担者（栗原）は、神経管、神経堤、骨格筋などの発生に重要な役割を持つ Pax3 と協調的に働く因子を探す目的で、酵母 Two hybrid 法により Pax3 に結合する分子をスクリーニングした結果、TAZ タンパクを同定した。in vitro アッセイの結果、Pax3-TAZ の結合には、Pax3 C 末端側の PPTY モチーフ及び TAZ N 末端側の WW domain が深く関わっていることが示された。TAZ の発現を in situ hybridization で調べると、胎生 10.5 日マウス胚において神経管内側、鰓丘の外胚葉性間葉、体節で発現が見られており、TAZ は Pax3 などの転写因子と相互作用して形態形成に関わっている可能性が考えられる。さて、転写コアクチベーターTAZ は、発見当初より、腎臓および肺において強く発現していることが報告されている。本研究では、転写コアクチベーターTAZ の遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を検討する。

In vitro 気道リモデリング：

COPD の病変は、末梢気道および間質における炎症が主因と想定されている。その炎症進展の機序は、喫煙など外

的刺激物質の関与により炎症細胞と生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられる。しかしながら COPD 発症の分子機構については未だ解明されていない。今回我々は、COPD の病変を、「異常な線維化による臓器障害」という視点からアプローチすることを試みる。COPD は、肺胞壁・間質における弾性組織の不可逆的な変性・減少を特徴とするが、これは末梢気道および間質における炎症・線維化異常が極まった状態である可能性がある。一方、逆方向の線維化異常の場合は、肺線維症へと向かうものである。

炎症・異常線維化と呼吸器疾患



図5 COPD 病変を、「異常な線維化による臓器障害」として捉える

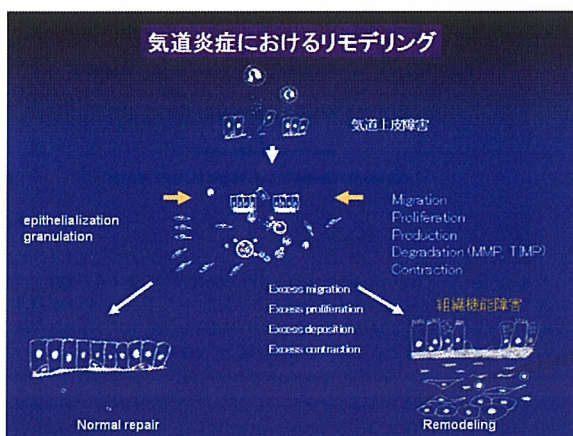


図6 想定される気道リモデリングの機序

近年、COPD、間質性肺炎、気管支喘息などは、いずれも免疫・炎症を主体とする病態であると想定されている。これらの免疫・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る。今回、我々は、その機序を解明する手法の一端として、*In vitro* 気道リモデリング解析法を開発・応用した。これは、1種類の蛋白質と1種類の細胞系よりなる、究極に単純化された人工的肺・気管支モデルであり、Gel contraction法と呼ばれる。

＜本研究の意義＞ 脂質性メディエーター、CGRPなどの生理活性物質、あるいは発生への関与が示唆されている転写コアクチベーターTAZなどは、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、COPDをはじめとする難治性の高齢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

脂質性メディエーター：

＜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、その機能解析を行う。

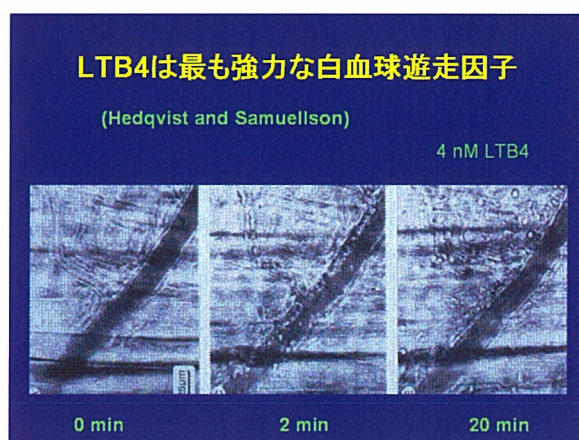


図7 ロイコトリエン B₄ (LTB₄) 投与により白血球遊走が生じる様子 (1982年、SamuelssonがNobel Lectureで提示)。

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)の作成に着手した。本年度は発生工学的技術を用いて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ことを目指した。

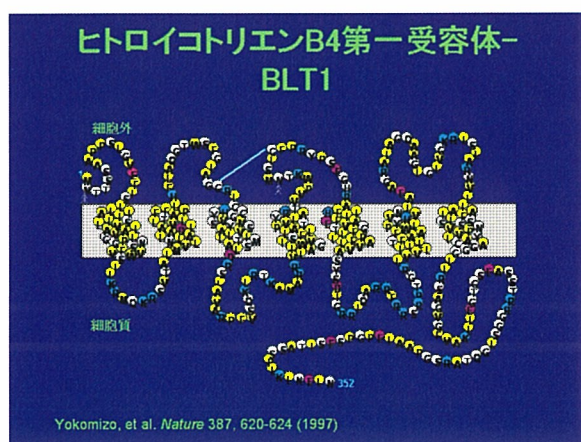


図8 ロイコトリエン B₄ (LTB₄) 第1受容体 (BLT1) の構造。

<炎症性肺疾患における 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 (Nagase, *J.Clin.Invest.* 1999; Nagase, *Nature Immunol* 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、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。

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

LTC₄/D₄/E₄ など cysteinyl LT の受容体 (CysLT1-R, CysLT2-R) は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。特に、CysLT2-R は大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、この CysLT2-R を標的とした KO、Tg マウスの新規作成にも着手する。これらのマウスを用いて、脂質性メディエーターと炎症性肺疾患との関連について評

価・検討を加える。

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 Immunol* 1:42-46, 2000)。

転写コアクチベーターTAZ:

<転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZ の遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を探索する。まず始めに、TAZ ノックアウトマウスの作成と解析に着手する。

In vitro 気道リモデリング:

<Gel contraction 法>

Type I collagen 作成: Rat の Tail から腱を摘出し腱鞘、その他の結合組織を注意深く取り除いた後、0.9% NaCl 10 mM Tris pH 7.5、50%Ethanol、75%Ethanol、95%Ethanol で洗浄する。6 mM HCl 300~400 ml 4°Cで一昼夜 Staring することにより Type I collagen を抽出する。Sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE で type I collagen 以外の蛋白が混入していないことを確認する。collagen 濃度はそれぞれ

の lot から乾燥重量を測定して求めた。

< 3 次元培養 : >

抽出した Type I collagen を 4 倍濃度の DMEM と蒸留水とで生理的浸透圧に調整する。最終 collagen 濃度を 0.75 mg/ml に調節後 3×10^5 cells/ml 細胞濃度でゲル内に線維芽細胞を加える。24 well プレートで 0.5ml/well になるようゲルを入れ 20 分でゲル化させる。固まったゲルの周囲を plate 壁から切り離し、各種試薬が添加された 6 cm dish (5 ml DMEM) 内に浮遊させる。

< 収縮能測定 : >

上記方法により線維芽細胞は Type I collagen 内で 3 次元的に培養される。そして線維芽細胞はこのゲルのなかでその収縮能によりゲルを引っ張る。その収縮能はゲルのサイズを計測することにより求めることができる。変化するゲルのサイズは CD カメラでコンピューターに取り込み計測する。

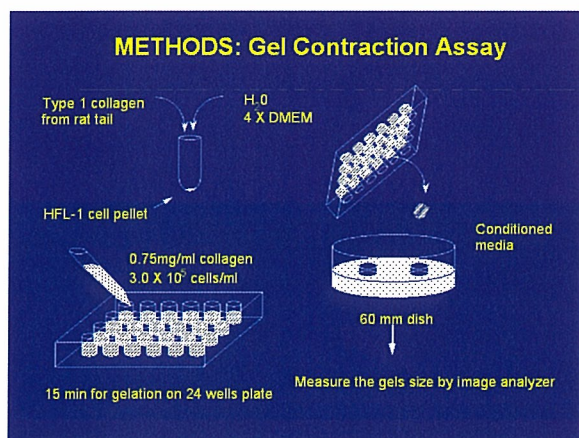


図9 Gel contraction 法。
線維芽細胞は Type I collagen 内で 3 次元的に培養される。



図10 Gel contraction 法を用いた計測。変化するゲルのサイズを CD カメラでコンピューターに取り込み計測。

(倫理面への配慮)

本研究で行う予定の遺伝子組換え実験は、平成16年9月10日の東京大学医学部組換えDNA実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエーター受容体、合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」、および呼吸器内科学講座「テトラサイクリン誘導性 siRNA ベクターを用いた DNA メチルトランスフェラーゼの抑制及びメチル化の変化に関する解析」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられる。

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

脂質性メディエーター：

<LTB₄R-KO マウスの作成>

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。

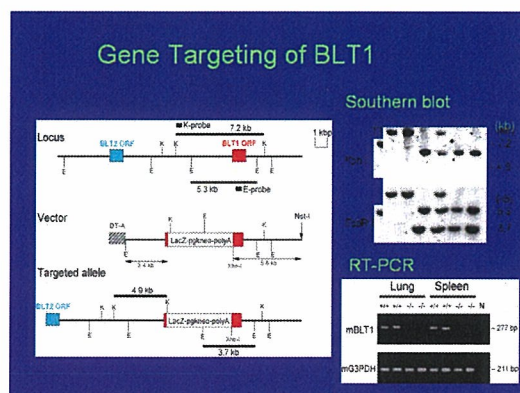


図11 ロイコトリエン B₄ (LTB₄) 第1受容体 (BLT1) ノックアウトマウスの作成。

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。

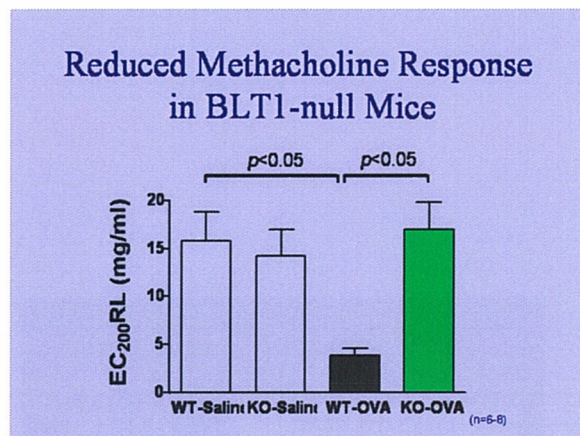


図 1 2 Methacholine (MCh) 気道反応性。OA 感作・野生型群で認められる気道過敏性が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では有意に抑制されている。

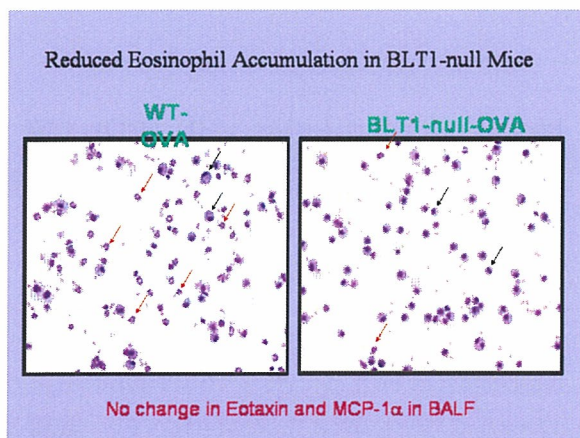


図 1 3 BALF 中の細胞。OA 感作・野生型群では好酸球が著明。OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では好酸球を認めるが少ない。

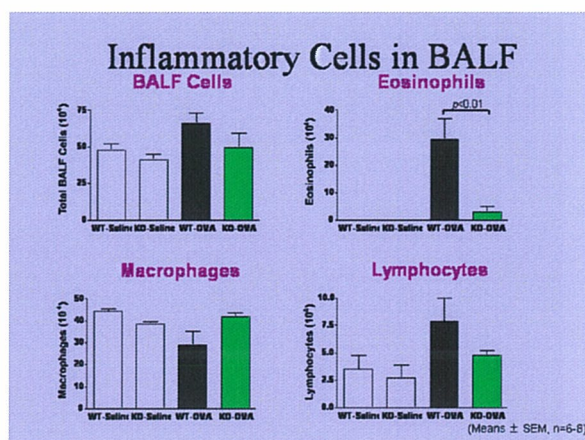


図 1 4 BALF 中の白血球細胞分画。OA 感作・野生型群で認められる好酸球浸潤が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では抑制されている。

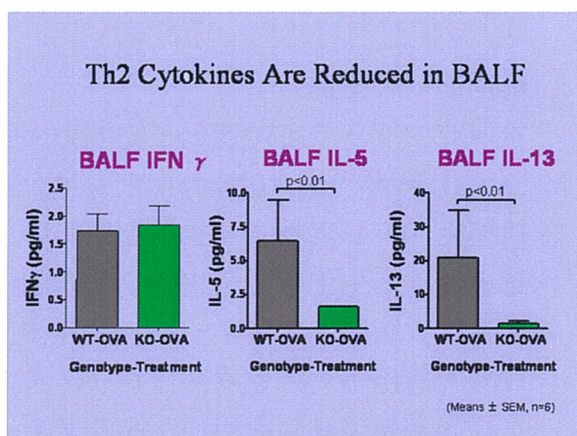


図 1 5 Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減。

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

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。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ていない。

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。

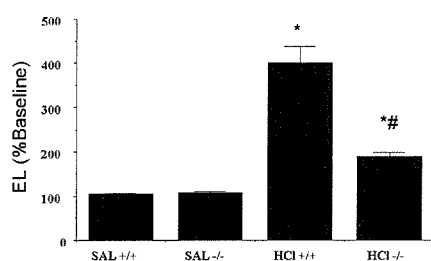


図 1 6 塩酸気管内投与による肺メカニクスの反応。肺エラスタンスは、塩酸投与・野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に低下していた。

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

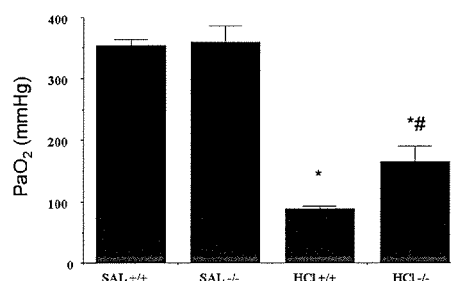


図 1 7 塩酸気管内投与によるガス交換の反応。PaO₂ は、塩酸投与・野生型群で、saline 群に比べ有意に低下していた。一方、ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に上昇していた。

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

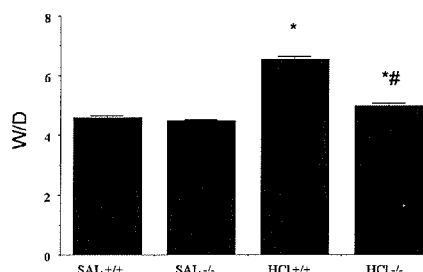


図 1 8 塩酸気管内投与による肺内水分量の反応。湿乾重量比 (W/D) は、塩酸投与・野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に低下していた。

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

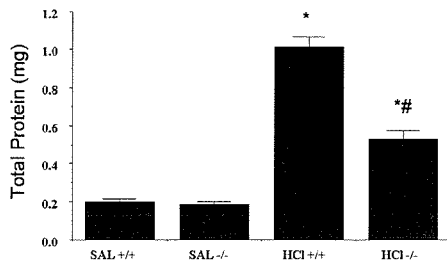


図 19 塩酸気管内投与による肺内蛋白漏出。BALF protein は、塩酸投与・野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に低下していた。

#P<0.05 vs HCl-treated wild type mice.

*P<0.05 vs the saline groups.

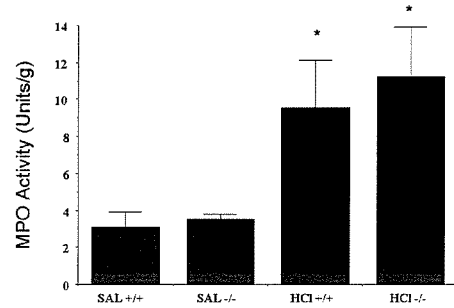


図 21 塩酸気管内投与による肺内白血球浸潤。Myeloperoxidase activity (MPO) は、塩酸投与群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に有意差は認められなかった。

*P<0.05 vs the saline groups.

転写コアクチベーターTAZ :

<転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成に着手した。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 TAZ ノックアウトマウスが得られた。TAZ ノックアウトマウスは、これまで全く未知の遺伝子改変マウスであるが、生存個体が得られつつある。

なお外表所見上では重大な奇形を生じていないが、9ヶ月令 TAZ ノックアウトマウス個体の肺の組織標本において、肺胞の異常が示唆されつつある。

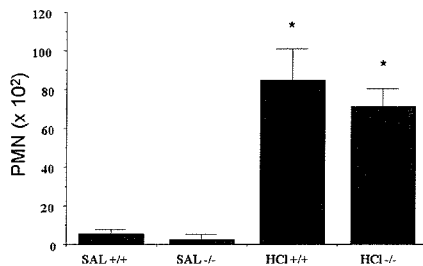


図 20 塩酸気管内投与による肺内好中球浸潤。BALF 好中球は、塩酸投与群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に有意差は認められなかった。

*P<0.05 vs the saline groups.

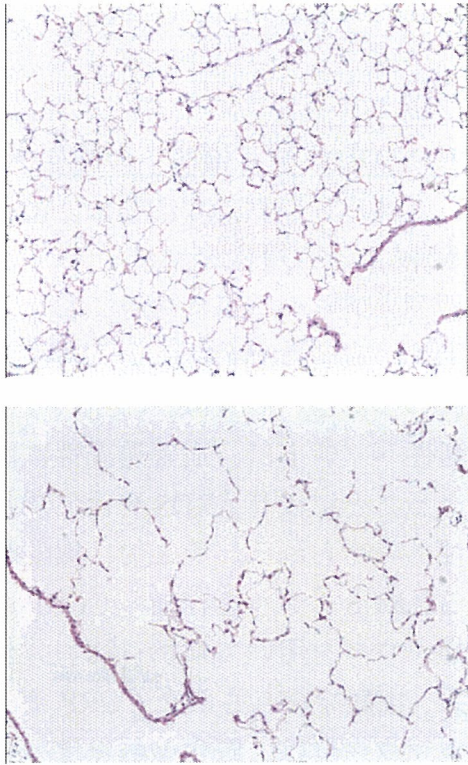


図 2 2 9ヶ月令野生型マウス(上図)と、TAZ ノックアウトマウス(下図)の肺

In vitro 気道リモデリング:

Gel contraction 法の開発がなされ、再現性の確認がなされた。

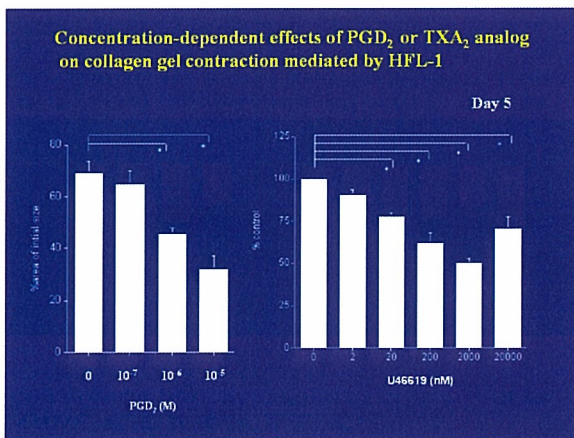


図 2 3 Gel contraction 法を用いた実験例。Agonist により、Gel モデルが収縮している。

D. 考察

脂質性メディエーター:

<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、白血球遊走に参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、CysLT2 受容体からはやや遠い位置にある。

Phylogenetic Tree of various GPCRs

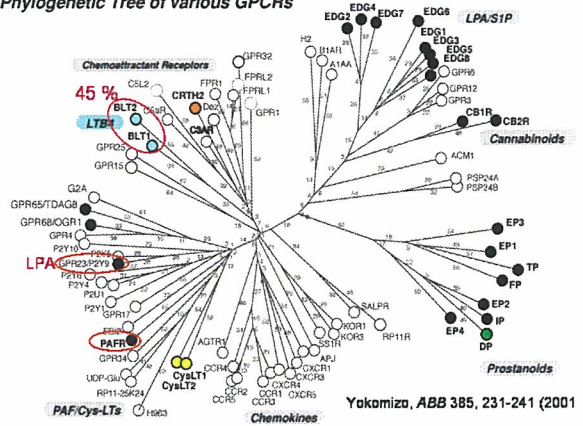


図 2 4 GPCR の系統樹。

本研究グループは、LTB₄ 受容体遺伝子および CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成に着手し、疾患への寄与

度を検索することを目指した。その結果、ホモ接合体の LTB₄R ノックアウトマウスおよび CysLT₂ 受容体遺伝子ノックアウトマウスは、ともに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。

これらの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 ノックアウトマウスおよび CysLT₂ 受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いて 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。

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。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。

転写コアクチベーターTAZ:

TAZ ノックアウトマウスを用いることにより、転写コアクチベーターTAZ の呼吸器系における病態生理学的意義の検討が可能となった。転写コアクチベーターTAZ は、肺の発生・成長に重要な役割を担う可能性が高い。また、TAZ ノックアウトマウスが画期的な新規 COPD 動

物モデルとなる可能性があり、生理学的、生化学的、分子生物学的検討を進めることが必要であろう。転写コアクチベーターTAZは、特に COPDをはじめとした呼吸器系炎症性疾患発症に対して、防御的な役割を担うことが推察される。そのため、エラスターゼ気管内投与あるいは喫煙負荷（COPDモデル）、ブレオマイシン気管内投与（間質性肺炎）などの動物モデルに投与し、TAZ遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加えることが今後の課題である。

TAZノックアウトマウスからの知見により、COPDや間質性肺炎などに対する全く新しい治療薬が実用化されることも期待される。

In vitro 気道リモデリング：

呼吸器系において、正常の肺・気管支では、線維芽細胞は炎症後の創部へと遊走し、コラーゲンなどの細胞外器質を産生し欠損部をうめる。さらに創傷治癒の終盤には創部を収縮させて創傷治癒を完成させる。しかし、この過程に異常が生じた場合は組織修復はうまくいかず、機能障害を引き起こす。とくに末梢気道周囲で過度の収縮が生じた場合は気流制限を引き起こしCOPDや気管支喘息の増悪に関与する。この系は、末梢気道周囲において増加した線維芽細胞とコラーゲンが作り出す収縮について検討できる *in vitro* モデルであると考えられる。

<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、COPD、ARDS、特発性間質性肺炎は、難治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。

COPDは、高齢者における重要な炎症性呼吸器疾患であり、その発症には喫煙など外的刺激物質の関与が想定されている。しかしながら、COPDの発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。一方、近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。

今日まで、COPDの病態を理解するためには呼吸生理学のアプローチが必須であり、その成果はGOLDガイドラインの作成という形で結実している。一方、まさしくGOLDガイドラインにあるように、COPD発症分子機構の解明のためには、多様な学問領域を結集・統合したアプローチを必要とするであろう。例えば米国では、2005年よりCOPDがNIH特別研究推進テーマに採択されたが、まず当面の目標としてCOPD動物モデルの作成・解析が主研究テーマと位置付けられているのが現状である。

本研究では、COPDモデルの構築・解析およびCOPD発症分子機構の解明を目指し、呼吸器内科学と分子生物学の世界最先端の技術を融合した研究アプローチを提示する。

本研究の成果により、脂質性メディエーター、CGRPファミリー、転写コアクチベーターTAZ、defensin、などをはじめ

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 COPD、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

脂質性メディエーター、CGRP ファミリー、さらに発生への関与が示唆されている転写コアクチベーターTAZに着目し、高齢者炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索した。その結果、各々のメディエーターが、高齢者肺疾患の病態に重要な役割を呈していることが示された。

また、高齢者炎症性肺疾患研究の新たなアプローチとして、人工的肺・気管支モデルの開発を試み、モデルを確立した。

以上の知見は、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期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1). Yamaguchi Y, Nagase T, Tomita T, Nakamura K, Fukuhara S, Amano T, Yamamoto H, Ide Y, Suzuki M, Teramoto S, Asano T, Kangawa K, Nakagata N, Ouchi Y, Kurihara H. Beta-defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. **Am J Physiol Cell Physiol** (in press).

2). Yamamoto H, Nagase T, Shindo T, Aoki-Nagase T, Nakamura K, Yamaguchi Y, Hanaoka Y, Kurihara H, Ouchi Y. Adrenomedullin insufficiency increases allergen induced airway hyperresponsiveness in mice. **J Appl Physiol** (in press).

3). Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashii Y, Kurihara Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Nagata T, Kurihara H, Ouchi Y. Calcitonin gene-related peptide mediates acid-induced lung injury in mice. **Respirology** (in press).

総説など

1) 長瀬隆英： COPD ガイドラインを高齢者診療にどう生かすか. 日本老年医学会誌 2006; 43: 602-3.

2) 長瀬隆英：明らかにになったわが国の COPD 患者数. Medical Practice 2006; 23: 955-7.

3) 長瀬隆英： COPD の薬物療法. 医学のあゆみ 2006; 218: 1011-3.

4) 長瀬隆英： COPD に対する新薬の可能性. 総合臨床 2006; 55: 2439-40.

5) 長瀬隆英： 22世紀へ向けた呼吸器学研究フロンティア 呼吸と循環 2006;

54: 1277.

2.学会発表

- 1). 炎症性呼吸器疾患とアラキドン酸カスケード： 第46回日本呼吸器学会総会 (発表者：長瀬隆英、教育講演), 2006.
- 2). 脂質性メディエーター関連分子： 第46回日本呼吸器学会総会 (発表者：長瀬隆英、ワークショップ), 2006.
- 3). COPDガイドラインを高齢者診療にどう生かすか： 第48回日本老年医学会総会 (発表者：長瀬隆英、ミニレビュー), 2006.

- 4). 末梢気道炎症の評価法： 第56回日本アレルギー学会総会 (発表者：長瀬隆英、教育セミナー), 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(出願準備中 1件)

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