

200707028A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業【ヒトゲノムテーラーメイド研究】

糖鎖シグナルの異常による肺気腫の発生機構の解明と治療戦略

平成19年度 研究報告書

主任研究者 谷口 直之

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
糖鎖シグナルの異常による肺気腫の発生機構の解明と治療戦略 谷口直之	1
II. 分担研究報告	
1. フコシル化の変化から肺気腫へのシグナル解析と制御法開発の試み 松本明郎	6
2. フコシル化のメカニズム解析について 三善英知	9
3. コアフコース欠損に伴う肺気腫の病態変化とその分子メカニズム 顧 建国	12
4. エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおけるFUT8+/-マウスの検討 ヒト手術摘出肺凍結標本におけるFut8活性の測定 別役智子	15
5. マウスにおける環境因子曝露とFut8活性の肺気腫変化に及ぼす影響の解析 前野敏孝	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	27

総括研究報告書

糖鎖シグナルの異常による肺気腫の発生機構の解明と治療戦略

主任研究者 谷口直之 大阪大学微生物病研究所 寄附研究部門教授

研究要旨

本研究事業は肺気腫の病態とその成因を糖鎖異常によるシグナル伝達経路の変化を通して解析することにより、肺気腫に対する治療戦略を提供することを目的として開始した。Fut8ノックアウトマウスから得られた知見をもとに、糖鎖異常を背景とする肺気腫の解明を目的とした。平成19年度では、喫煙誘発性肺気腫モデル動物の開発、疾患関連遺伝子の解明、肺気腫治療薬の開発、肺気腫における糖鎖異常の重要性などを明らかにするとともに、糖鎖異常に基づく新たな肺気腫発症メカニズムの発見やフコシル化制御機構の解明など基礎的な解析でも成果を上げた。

分担研究者

松本明郎 大阪大学微生物病研究所 准教授
三善英知 大阪大学大学院医学系研究科 教授
顧 建国 東北薬科大学薬学部 教授
別役智子 北海道大学病院 講師
前野敏孝 群馬大学医学部附属病院 助教

A. 研究目的

肺気腫を主要な病態とするCOPD(慢性閉塞性肺疾患)は、WHOの統計によると、全世界で2億1000万人が罹患しており、2005年だけで300万人が死亡している。2030年までには死因の第4位になると予想されている主要な疾患である。COPDの社会的影響は、患者に対する医療費のみならず労働力人口の減少ならびに労働生産性の減弱にもつながる。またCOPDを引き起こす主要な原因の一つである喫煙がもたらす社会的な損失は、年間5兆6千億円と試算されている。しかし、いまだ有効な治療法が開発されておらず、現在の治療方針は対症療法に限られている。そのため、肺気腫の治癒をめざすのみならず、病態の進行を遅らせ社会活動能力を保つことのできる治療法の開発が急務となっている。我々は、糖鎖の機能解析の研究において、N-型糖タンパク質にコアフコースが付加(α 1,6フコシル化)されると、そのターゲットタンパク質の機能が変化すること、コアフコシル化を触媒するFut8(α 1,6 fucosyltransferase)の遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス)

ス)は、著明な成長障害と肺気腫様病変を示すことを明らかにしてきた。この肺気腫様病変は、TGF- β 受容体に対するコアフコースの付加がなされないため、TGF- β 受容体の下流のシグナルが減弱し、抑制系に働くSmadのリン酸化が十分に起こらなくなることから細胞外マトリックスの分解を主につかさどるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の遺伝子発現が高まり、肺胞壁の合成と分解のバランスが崩れることにより肺気腫様の病態進行することを明らかにした。この研究により、糖鎖異常が肺気腫の原因になる可能性を示したことから、このFut8ノックアウトマウスを肺気腫モデルマウスとして用いることにより、肺気腫の病因ならびに病態の解明に糖鎖生物学・グライコームをもちいることを本研究の目的とした。

これまで肺気腫に対する特異的な治療方法の開発には多くの試みがなされてきたが、依然として有効な治療手段の提供には結びついてはいない。病因・病態に関する有効な知見を今後得るためには、これまでとは異なった分野・方向性による解析とそこから得られた知見をもとにした研究開発体制が必要になろうと考えられる。

喫煙を代表とした多因子が複合して肺気腫の形成に関与することから、本研究課題ではコアフコース異常(糖鎖異常)を背景とした肺気腫の形成に焦点を当てた検討を行った。糖鎖異常を背景として肺気腫病態の解明を行なうことにより、これまで見いだすことのできなかつた疾患原因の

解明、さらには特異的な治療戦略の提供を行なうことを目的とした。

B. 研究方法

糖鎖修飾の異常であるコアフコースの欠損(FUT8活性の低下または欠損)が受容体シグナルを減弱させ、結果として肺気腫を発症させることを明らかにしてきたことから、糖鎖異常を肺気腫病態の解明に用いることとした。そこで、以下の4点について検討を行なうこととした。

1. 肺気腫の最重要因子である喫煙とFUT8活性の関連性の検討、2. 肺気腫の治療薬開発を目指したMMP活性阻害薬の探索、3. 肺気腫の進展に対するFUT8活性の影響、4. フコシル化異常と肺気腫化のメカニズム。

1. 喫煙とFUT8活性の関連性: 肺気腫の代表的な成因とされている喫煙と糖鎖異常の関連を検討するため、Fut8ヘテロノックアウトマウスに喫煙暴露を行ない、肺の気腫化程度ならびにFUT8活性を検討した。Fut8のホモ接合型ノックアウトマウスは生後間もなく死亡してしまうため、安定して喫煙実験に使用することができないが、ヘテロ型のノックアウトマウスは、野生型とほぼ同じ生存を示し、さらにFut8活性が野生型に比較して約半分に減弱していることが知られている。このヘテロ型ノックアウトマウスを用いて喫煙実験を行なう。ヘテロ型ノックアウトマウスは、同世代にて繁殖を行なう必要があるが、自然交配では安定した妊娠・出生数を得ることができなかつたため、ヘテロノックアウトマウスから得られた精子を用いた体外受精により繁殖を行なう必要があった。出生後、体細胞より得た染色体DNAをPCRにて解析し、ヘテロノックアウト・野生型を識別し、実験に供した。一般にマウスに対する喫煙実験は雌マウスに対して行なうことが常法となっているため、本実験系でも雌マウスに対する喫煙実験を行なう。喫煙実験には、世界的な実験用標準タバコとなっているアメリカケンタッキー大学タバコ

コ健康研究所製の研究用タバコを用い、世界的な標準化基準に適合する様にした。

2. Fut8ノックアウトマウスにおけるMMPの産生亢進は細胞外基質の合成と分解のバランスを破綻させることにより肺胞壁を破壊し、気腫化に関わっていることを示した。MMPの活性化がヒト肺気腫においても認められることが知られている。そのため、MMP活性を阻害することは肺気腫の進展を阻害する効果があるものと考えられている。MMPは主にマクロファージより放出され、肺胞壁を分解する。そこで、肺胞壁構成成分と同様の物質より、MMPの基質と競合し阻害活性を示すものをin vitroの系で検索した。活性測定に用いるMMP酵素は、RAW264.7細胞より培養上清中に産生されたものを用いた。活性測定用基質としては、[DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂] [Cha = β -cyclohexylalanyl; Abz = 2-aminobenzoyl (anthraniloyl)]を主に用いた。さらに、既存のMMP阻害薬の代表として、GM-6001と比較し、同等の阻害活性を有するものを見いだすことを目標とした。

3. 糖鎖異常が肺気腫に関係していることを示すために、喫煙暴露以外にエラスターゼ誘発型肺気腫モデルについて検討を行なった。エラスターゼ誘発型モデルには、週齢10~11週のFut8ヘテロノックアウトマウスならびに野生型の雄マウスを用いた。ヒト膵エラスターゼを気管内噴霧投与する。一定期間経過後、屠殺し、気管支肺胞洗浄と凍結肺標本作成を行い、細胞分画、Myeloperoxidase (MPO)活性の測定、Real-time RT-PCR法にて各種遺伝子の発現レベルについて検討した。エラスターゼ投与後21日目で病理学的に肺気腫形成の程度を定量的に比較した。

4. フコシル化反応には、主役となるフコシルトランスフェラーゼに加え、ドナー基質であるGDP-fucose合成酵素 GDP-4-keto-6-deoxymannose-3, 5-epimerase-4-reductase (F

X)、GDP-mannose-4, 6-dehydratase (GMD)、そしてGDP-fucoseをゴルジ装置に運ぶGDP-fucoseトランスポーター(GDP-Fuc Tr)が関与する。これらの分子のフコシル化反応における役割を検討した。

肺気腫の患者においては、VEGFRの発現が抑制され、その結果としてアポトーシスが誘導されることが報告されている。Fut8ノックアウトマウスの肺組織におけるVEGFRの遺伝子・タンパク質発現を検討した。さらに、Fut8とVEGFRとの直接的関係を確認するため、培養細胞を用いRNA干渉を用いたFut8のノックダウンを行い検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトの肺組織を用いた実験については、「喫煙者、非喫煙者における肺の加齢現象の差異に関する比較検討」として北海道大学「医の倫理委員会」に審査を申請し、既に平成13年4月20日付けで承認されている。

また、動物実験に関しては「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」ならびに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守して作成された実験計画により実施中である。

C. 研究結果

1. 通常の喫煙暴露による肺気腫モデルマウスには、6ヶ月間程度の連続した喫煙暴露が必要であるため、1・2・3ヶ月の喫煙暴露実験をそれぞれ行なった。Fut8ヘテロノックアウトマウスは、2ヶ月以上の暴露によりFUT8活性の低下が認められ、3ヶ月暴露により肺胞腔の拡大(気腫化)が生じた。これらの成果は、喫煙によりFUT8活性の低下が起きること、それに続いて気腫化が生じることの2点について新たな知見を与えることとなった。また、Fut8ヘテロノックアウトマウスを用いた喫煙暴露モデルは、これまで用いられてきたモデル動物(6ヶ月暴露が必要)と比較して、喫煙

暴露期間が半分以下で統計学的に有為な肺の気腫化を示すことより、今後の薬物開発を効率的に進めるために有効なモデル動物を開発できたと考えられる。

さらに、糖鎖異常に基づく喫煙の影響を遺伝子発現レベルで検討することを目的として、DNAマイクロアレイをもちいて、のべ45,101遺伝子の発現レベルを解析した。解析は、(野生型・Fut8ヘテロノックアウト) x (喫煙・非喫煙)の4系統を相互比較した。これらの解析より、「FUT8活性の低下に喫煙暴露が重なった場合に特徴的に変化する遺伝子群」をのべ92遺伝子見いだした。野生型の喫煙・非喫煙群間での比較では、500遺伝子程度の発現量が増加したのに対して、550以上の遺伝子が発現レベルの減少を示した。これら多くの遺伝子候補から肺気腫の原因遺伝子を探ることは難しいと考えられるが、FUT8活性の変化を基盤として喫煙の影響を考慮することにより、より特徴的な遺伝子変化を見いだすことができた。

2. MMP阻害薬はこれまで多種合成されてきたが、その多くは Musculoskeletal Syndromelによる強い副作用を伴い、臨床適用されてはいない。これらは、低分子化合物による全身作用によるものであり、局所においてのみ作用させることができれば、肺気腫の治療薬ともなり得るであろう。そこで、生体内高分子物質をターゲットとしてMMP阻害活性を有するものを見いだすことを目標とした。今回検討した物質は、分子量が大きく血管壁の透過性は低いと考えられる。そのため、経気道的な投与により局所にのみ作用させ、全身的な副作用を回避することも可能と予想される。生体内物質は糖鎖に関連したものを優先的に検討し、既知の合成MMP阻害薬(GM6001)と同程度の阻害活性を有する物質を4種見いだすことができた。これらの物質の、MMP阻害機序や生体内での作用を今回開発したモデル動物を用いてさらに検討することを予定している。経気管支的に投与することにより肺胞腔局所における作用を目指してい

る。

3. 糖鎖異常と肺気腫の関連性について、さらに理解を深めるため、喫煙暴露以外にエラスターゼ誘発型肺気腫モデルに対するFUT8活性の影響を検討した。エラスターゼモデルにおいてもFUT8活性の低下は、気腫化の進展を促進することがわかり、肺気腫における糖鎖異常の関与を明らかにすることとなった。

4. フコシル化異常と肺気腫の関連をより高度に理解することを目的とした研究から、FUT8活性の低下にともないVEGF受容体発現が低下し気腫化を引き起こす経路も存在していること、細胞内でのフコシル化はFUT8活性のみではなく、トランスポーターなど他の複数の因子の複合的な影響を受けていることなどを明らかとし、基礎的な理解を深めることとなった。

D. 考察

本研究課題は、社会的にも重要な肺気腫に対して、糖鎖異常という新たな観点を用いて病態の理解をすすめ、新たな治療戦略を提供することにある。糖鎖修飾(コアフコース)の欠損が肺気腫を引き起こすことはFut8ノックアウトマウスにより示されたが、FUT8活性の低下が喫煙などの因子と複合的に作用し肺気腫へとつながることについて、これまで検討されたことはなかった。

Fut8ヘテロノックアウトマウスに喫煙暴露を行ない、喫煙によりFUT8活性が低下した後、肺胞径の拡大が認められることを示した。さらに、背景となる特異的な遺伝子発現の変化も見いだされた。これまで、ヒト肺気腫患者や喫煙暴露動物から得られた肺組織を用いた遺伝子発現解析が行なわれては来たものの、疾患特異的な遺伝子を見いだすまでには至ってはいなかった。

本年度の研究により、喫煙暴露における糖鎖異常(コアフコース異常)が背景因子として作用している可能性が示

された。これは喫煙が発症に関与する単一素因ではなく、複数の因子が相互に作用することにより病態が形成されていることを示唆するものであろう。

肺気腫の病態を解明するために、これまで考慮されたことのなかった糖鎖修飾を背景因子として取り入れることの必要性が示されたと考えられる。肺気腫の病態が単一ではないことは明らかであろうが、糖鎖異常という新たな因子を勘案し肺気腫の成因を明らかにすることは、あらたな病態解明への戦略を提案が出来たものと考えられる。

E. 結論

1. 喫煙暴露により効率的に肺気腫を発症するモデル動物を確立した。さらに、糖鎖異常と喫煙暴露により制御されている遺伝子群を見いだした。
2. 肺気腫治療薬を目指したMMP阻害剤を発見した。これまでの阻害剤とは異なった作用が期待され、今後モデル動物等での検討が必要とされる。
3. エラスターゼ暴露による肺気腫モデルに置いてもFUT8活性が肺気腫の進展に関与していることが示され、糖鎖異常の肺気腫における重要性を示唆することとなった。今後、ヒト肺組織をもちいたFUT8活性の測定など、ヒト病態における糖鎖異常の有無を検索していくことを予定している。
4. 肺気腫形成に関わる新たな糖鎖異常のメカニズムやフコシル化制御因子の検討など、将来的な発展につながる基礎的な理解も深めた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J., and **Taniguchi, N.** Branche

- d *N*-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins (2008) FEBS J.
2. Sasamura T, Ishikawa HO, Sasaki N, Higashi S, Kanai M, Nakao S, Ayukawa T, Aigaki T, Noda K, Miyoshi E, Taniguchi N, Matsuno K. The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in *Drosophila*. *Development* 134(7) 1347-1356, 2007.
 3. Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Yamamoto K, Shigeta M, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Gu J, and Taniguchi N. Carbohydrate-binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*: A novel probe for core fucose. *J Biol Chem* 282(21), 15700-15708, 2007.
 4. Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, Asahi M, Yoshihara H, Taniguchi N, Hayashi N, Miyoshi E. A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation. *Glycobiology* 17(12), 1311-1320, 2007.
 5. Li W, Ishihara K, Yokota T, Nakagawa T, Koyama N, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Taniguchi N, Kondo A. Reduced VLA-4/VCAM-1 interactions lead to impaired pre-B cell repopulation in alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice. *Glycobiology* 18(1), 114-24, 2008, 2007.
 6. Nakano M, Nakagawa T, Ito T, Kitada T, Hijioka T, Kasahara A, Tajiri M, Wada Y, Taniguchi N, Miyoshi E. (2008) Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: A novel approach for the development of tumor markers. *Int J Cancer*, in press.
 7. Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, Miyoshi E, Tsukihara T, Honke K, Matsumoto A, Nakagawa A, Taniguchi N. Crystal structure of mammalian alpha1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology* 17: 455-66, 2007.
 8. Li W, Takahashi M, Shibukawa Y, Yokoe S, Gu J, Miyoshi E, Honke K, Ikeda Y, Taniguchi N. Introduction of bisecting GlcNAc in N-glycans of adenyl cyclase III enhances its activity. *Glycobiology* 17:655-62, 2007.
 9. Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Yamamoto K, Shigeta M, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N. Carbohydrate binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*: a novel probe for core fucose. *J Biol Chem*. 282:15700-8, 2007.
 10. Taniguchi N. A sugar-coated switch for cellular growth and arrest. *Nat Chem Biol*. 3(6):307-9, 2007.
 11. Zhao, Y., Takahashi, M., Gu, J., Miyoshi, E., Matsumoto, A., Kitazume, S., and Taniguchi, N. Functional roles of *N*-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Can Sci* (2008) in press.
 12. Kotani, N., Gu, J., Isaji, T., Udaka, K., Taniguchi, N, and Honke, K. Biochemical Visualization of Cell Surface Molecular Clustering in Living Cells. *PNAS* (2008) in press.

フコシル化の変化から肺気腫へのシグナル解析と制御法開発の試み

分担研究者 松本 明郎 大阪大学微生物病研究所 寄附研究部門准教授

研究要旨 糖転移酵素Fut8ノックアウトマウスにおいて、肺気腫様の変化が見られた。その分子機構としては、主として膜表面に存在する様々な糖タンパク質のフコース欠損が、細胞内シグナル伝達を変化させ、細胞外マトリクスの破壊を亢進させるものと考えられる。私達は、フコシル化の変化に伴う肺の気腫化が起こるメカニズムを遺伝子レベルで改めて網羅的に解析するとともに、糖鎖関連物質を用いた気腫化の抑制方法の開発を目指して研究をおこなった。

平成19年度は、喫煙暴露を行なったマウスの肺組織における遺伝子解析をおこない、フコシル化の低下と喫煙の相乗効果により発現変化する遺伝子群を見いだした。また、肺気腫の進展を抑制することを目的として、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)阻害活性を有する糖鎖関連物質を見いだした。これらは、これまで試みられたことのない新たな肺気腫の治療薬となる可能性を持つと考えられる。

A. 研究目的

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)活性の欠損が肺気腫様の病理変化を来すことから、これまで試みられたことのない糖鎖異常を背景とした肺気腫の病態解明と治療戦略の提供を目的として研究を行った。

1. 喫煙とFUT8活性の相関性の検討

肺気腫の主要な発症原因とされている喫煙と糖鎖異常の関連性を見いだすことを目的とした。

FUT8活性の低下が膜受容体を經由した細胞内シグナルを変化させることにより、肺気腫様変化を生じさせることを明らかとしたが、肺気腫の主要な環境要因であることが明らかにされている喫煙とFUT8活性の変化が如何に相関し

ているのかについては、全く明らかにはされてはいない。

そこで、FUT8活性の低下に特異的な喫煙の影響を明らかにすることを目的とした。

2. MMP活性阻害物質の検討

FUT8活性の低下は、TGF- β 受容体のフコシル化を減弱し、TGF- β 受容体下流のシグナルを減弱させる。結果としてMMP-9, 12, 13などの発現・活性が亢進することが、Fut8ノックアウトマウスにおける肺気腫の成因と考えられる。ヒト肺気腫においても、MMPの活性化が原因であるとの報告も数多い。そこで、肺気腫へ対する治療戦略を提供することを目的として、MMP阻害活性をもつ物質の検索を開始した。これまで、MMP阻害薬は多数合成され治療薬としての可能性が

検討されてきたが、いずれも臨床応用されるところまでは至ってはいない。そこで、これまで試みられたことのない物質を対象としたスクリーニングを行なった。

B. 研究方法

1. 喫煙とFUT8活性の相関性の検討

群馬大学 前野敏孝博士らのグループが行なった喫煙暴露マウスより摘出した肺組織における遺伝子発現レベルをDNAチップを用いて解析した。

喫煙暴露マウスは遺伝子背景が均一で同週令のB6系マウスを作製することを目的として、Fut8ヘテロノックアウトマウスより得た精子を用い、体外受精により同世代のマウスを出生させた(1世代あたり約150匹)。得られたマウスよりFut8ヘテロノックアウトマウスをGenomic DNAをもちいたPCRにより選別し、雌マウスを喫煙暴露試験に供した。雄マウスは、北海道大学 別役智子博士らのグループへ提供し、エラストーゼ誘導肺気腫モデルとして用いられた。

喫煙暴露をおこない、FUT8活性測定に用いたのと同臓器よりTotal RNAを抽出し、Affymetrix社DNAマイクロアレイ Mouse 430 Ver 2.0を用いた遺伝子発現レベルの解析を行った。解析は(喫煙の有無)X(Fut8遺伝子)の4系統を相互比較し、FUT8活性の低下が喫煙に対して与える相乗的な影響を検討した。

2. MMP活性阻害物質の検討

MMPは主にマクロファージより放出され、肺胞壁を分解する。そこで、肺胞壁構成成分と同様の物質より、MMPの基質と競合し阻害活性を示すものをin vitroの系で検索した。

活性測定に用いるMMP酵素は、RAW264.7細胞より培養上清中に産生されたものをもちいた。活性測定用基質としては、{DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂ [Cha = β -cyclohexylalanyl; Abz = 2-amino benzoyl (anthraniloyl)]}を主に用いた。さらに、既存の

MMP阻害薬の代表として、GM-6001と比較し、同等の阻害活性を有するものを見いだすことを目標とした。

C. 研究結果

1. 喫煙とFUT8活性の相関性の検討

DNAマイクロアレイにより、のべ45,101遺伝子の発現レベルに対して検討を行なった。これらのデータは複数の内部標準化遺伝子を用いて標準化し、サンプル間相互での比較検討が行なえる様にした。

解析は、(野生型・Fut8ヘテロノックアウト) x (喫煙・非喫煙)の4系統を相互比較した。これらの解析より、「FUT8活性の低下に喫煙暴露が重なった場合に特徴的に変化する遺伝子群」を以下の条件をあてはめることにより見いだした。

まず、各遺伝子発現レベルのCut-off値を150に設定し、微弱な発現を示す遺伝子については、判定から除外した。さらに、野生型・ヘテロノックアウトのそれぞれにおいて喫煙・非喫煙群間の比較を行ない、3倍以上の発現変化を示したもののみを抽出した。

この結果、92遺伝子がこの条件を見たすことが明らかとなった。野生型の喫煙・非喫煙群間での比較では、500遺伝子程度の発現量が増加したのに対して、550以上の遺伝子が発現レベルの減少を示した。これら多くの遺伝子候補から肺気腫の原因遺伝子を探ることは難しいと考えられるが、FUT8活性の変化を基盤として喫煙の影響を考慮することにより、より特徴的な遺伝子変化を見いだすことができた。なお、知的財産権取得のための準備との関係から、これらの遺伝子の詳細については、割愛する。

2. MMP活性阻害物質の検討

細胞外基質に含まれる糖鎖関連物質に着目した。マクロファージ培養上清より得られたMMPの活性値を100%とし、各種物質を添加したことによる活性測定値の変化を指標と

した。既知の阻害剤としてはGM-6001 (C₂₀H₂₈N₄O₄, Ki MMP-1: 400 pM; MMP-2: 500 pM; MMP-3: 27 nM; MMP-8: 100 pM; MMP-9: 200 pM)を用いた。

33種類の代表的な糖鎖関連物質を検索したところ、4種がGM6001によるものと同程度の阻害活性を示すことがわかった。これらの物質の作用機序については不明であるが、基質との競合阻害または拮抗阻害によるものであろうと考えられる。

今後、これらの物質とMMP各種アイソザイムとの阻害効果の検討や、作用機序の解明ならびに、生体内での効果について検討していく予定である。

D. 考察

これまで、喫煙が肺気腫の代表的な成因として考えられてきたが、その発症原因ならびに関連因子については明らかではなかった。本年度の研究により、喫煙暴露における糖鎖異常(コアフコース異常)が背景因子として作用している可能性が示された。すなわち、ヒト肺気腫患者や喫煙暴露動物から得られた肺組織を用いた遺伝子発現解析が行なわれては来たものの、疾患特異的な遺伝子を見いだすまでには至ってはいなかった。これは喫煙が発症に関与する単一素因ではなく、複数の因子が相互に作用することにより病態が形成されていることを示唆するものであろう。

肺気腫の病態を解明するために、これまで考慮されたことのなかった糖鎖修飾を背景因子として取り入れることの必要性が示されたと考えられる。肺気腫の病態が単一ではないことは明らかであろうが、糖鎖異常という新たな因子を勘案し肺気腫の成因を明らかにすることは、あらたな病態解明への戦略を提案が出来たものと考えられる。

治療戦略の提案としては、MMP活性の阻害を目的とした薬剤へとつながる物質の発見を行なった。これまで、MMP阻害薬は多種検討されてきたが、その多くは Musculoskeletal Syndromeによる強い副作用を伴い、臨床適用されて

はいない。これらは、低分子化合物による全身作用によるものであり、局所においてのみ作用させることができれば、肺気腫の治療薬ともなり得るであろう。今回検討した物質は、分子量が大きく血管壁の透過性は低いと考えられる。そのため、経気道的な投与により局所にのみ作用させ、全身的な副作用を回避することも可能と予想される。

E. 結論

本年度の研究より見いだされた、遺伝子群並びにMMP阻害活性を持つ物質は、糖鎖異常を背景とした喫煙に起因した肺気腫に対する治療戦略を提供する手段となりうると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J., and Taniguchi, N. Branched *N*-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins (2008) FEBS J.

2. 学会発表

第81回日本薬理学会年会 横浜 3/17-3/19 シンポジウム: 生体内ラジカル/活性酸素種による生理応答機構と病態形成: *S*-nitrosylationを介した受容体シグナル制御
松本明郎

研究協力者

高 叢笑(ヒューマンサイエンス振興財団)
是金 宏昭(大阪大学微生物病研究所)
太田 芙美(大阪大学微生物病研究所)
朴 鐘二(大阪大学微生物病研究所)
船山 奨(生化学工業株式会社 中央研究所)

フコシル化のメカニズム解析について

分担研究者 三善 英知 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 糖転移酵素Fut8ノックアウトマウスにおいて、肺気腫様の変化が見られた。その分子機構としては、主として膜表面に存在する様々な糖タンパク質のフコース欠損が、細胞内シグナル伝達を変化させ、細胞外マトリクスの破壊を亢進させるものと考えられる。私達のグループでは、フコースによる糖鎖付加(フコシル化)反応に関わる分子群の糖鎖修飾への関わりについて検討している。平成19年度は、ヒト肝癌細胞、肝癌組織における、フコシル化反応関連分子であるFX、GMD、GDP-fucose transporterの発現機構を解析し、肝癌におけるそれぞれの分子の意義を明らかにした。実際にヒト肺気腫において低フコシル化が病態に関与することが明らかになった場合、これらの解析ツールは、非常に有用性が高いものと考えられる。

A. 研究目的

フコースによる糖鎖付加(フコシル化)反応には、主役となるフコシルトランスフェラーゼに加え、ドナー基質であるGDP-fucose合成酵素 GDP-4-keto-6-deoxymannose-3, 5-epimerase-4-reductase (FX)、GDP-mannose-4, 6-dehydratase (GMD)、そしてGDP-fucoseをゴルジ装置に運ぶGDP-fucoseトランスポーター(GDP-Fuc Tr)が関与する。本研究では、これらの分子のフコシル化反応における役割を、肝癌細胞、肝癌組織を用いて検討した。さらに、フコシル化関連分子を解析するための、新しい技術開発に取り組んだ。

B. 研究方法

ヒト肝癌組織を用いて α 1-6フコース転移酵素(FUT8)、FX、GMD、GDP-Fuc Trのタンパクレベル(Western blot法)、遺伝子レベル(Northern blot法)での発現を検討した。

培養肝癌細胞において、これらの分子とフコシル化の検討を行った。また、免疫組織科学的な手法を用いて、GDP-Fuc Trの発現とフコシル化との関係を明らかにした。これまでフコースを認識するレクチンとしては、AALとLCAが頻用されて来たが、月桂冠研究所との共同開発により、新たなレクチン検索を行なった。マススペクトロメトリー法を用いて、フコシル化糖鎖構造の新しい解析法の開発を目指した。

C. 研究結果

13例のヒト肝癌組織をReal-time PCRで検討したところ、Fut8、FX、GMD、GDP-Fuc TrいずれのmRNAも正常肝に較べて発現の上昇を認めた。しかし、慢性肝炎や肝硬変と比較した場合は、FXとGDP-Fuc-Trのみ肝癌組織で有意に発現が増加していた。FXに関しては2003年にCancer Resに報告したノーザンブロットの結果に一致している。またGMDに関しては、mRNAレベルでの発現に大きな差は認めないが、

Western blotでみたタンパク発現には癌部で劇的に増加していた。肝癌細胞にこれらの遺伝子を強制発現させるとGDP-Fuc-Trが最も効果的に細胞のフコシル化を亢進させた。組織アレイを用いたAALレクチン染色とFUT8、GDP-Fuc-Trの免疫染色の比較検討では、GDP-Fuc-Trの方がよくAAL染色と相関した。またGMDのハエにおける欠損は、O-fucoseの働きを検討するのに役立った(東京理科大、松野Drとの共同研究)。

このほか、月桂冠研究所との共同研究によって、酒を保存する時に用いるカビの一種から、コアフコースを強く認識するAOLレクチンを発見した。AOLと従来から知られるフコースを認識するAAL、LCAの性質をBia-coreやFut8 KOマウスを使った免疫組織染色によって、証明した。

フコシル化ハプトグロビンは膀胱癌の新しい腫瘍マーカーであることを見だし、2006年にInt. J. Cancerに報告したが、ハプトグロビンに結合する4本のN型糖鎖の部位特異的な構造解析をマスペクトロメトリーで解析した。

D. 考察

Fut8、FX、GMD、GDP-Fuc Trの中で、GDP-Fuc Tの発現が肝癌のフコシル化に最も重要であることがわかった。もちろん、これらの分子を完全に欠損させるとフコシル化は消失すると考えられる(FUT8の場合は、コアフコースのみだが)。しかし、実際の生体組織では、非常に稀であると考えられ、各分子群のバランスが重要となる。ヒト肺気腫に本当にフコシル化が関与するとすれば、FUT8のみ解析しても難しいであろう。先天的な欠損は、KOマウスの表現型から生存しない可能性があり(生後3日で70%死亡し、1月で90%死亡)、ヘテロでは肺気腫を発症しない。従って、まずフコシル化の程度をレクチンなどによって、スクリーニング的に調べ、その後4つの分子の発現レベルを検討する必要がある。またコアフコースがより重要であれば、AOLレクチンによる検索は、有効な戦略となり得る。今後、分子レベルで肺気腫とフコシル化の関係が明らかになれば、部位特異的なフコシル化の糖鎖解析が必要になると思われる。しかし、私達のグループでは、ヒト肺気腫の組織が手に入りにくい

ため、共同研究者との連携が重要と思う。そのための情報提供や解析ツールの供給は、積極的に行なう予定である。

E. 結論

肝癌組織、肝癌細胞とフコシル化について、4つのフコシル化関連分子Fut8、FX、GMD、GDP-Fuc Trを検討したところ、GDP-Fuc Tの発現が最もフコシル化に関与することがわかった。今後、この基礎データをもとに、ヒト肺気腫とフコシル化に関する解析を行ないたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasamura T, Ishikawa HO, Sasaki N, Higashi S, Kanai M, Nakao S, Ayukawa T, Aigaki T, Noda K, Miyoshi E, Taniguchi N, Matsuno K. The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in Drosophila (2007) Development 134(7), 1347-1356
2. Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Yamamoto K, Shigeta M, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Gu J, and Taniguchi N. Carbohydrate-binding specificity of a fucose-specific lectin from aspergillus oryzae: A novel probe for core fucose (2007) J Biol Chem 282(21), 15700-15708
3. Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, Asahi M, Yoshihara H, Taniguchi N, Hayashi N, Miyoshi E. A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation (2007) Glycobiology 17(12), 1311-1320
4. Li W, Ishihara K, Yokota T, Nakagawa T, Koyama N, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Taniguchi N, Kondo A. Reduced VLA-4/VCAM-1 interactions lead to impaired pre-B cell repopulation in alpha

1,6-fucosyltransferase deficient mice (2008)
Glycobiology 18(1), 114-24

5. Nakano M, Nakagawa T, Ito T, Kitada T, Hijioka T, Kasahara A, Tajiri M, Wada Y, Taniguchi N, Miyoshi E. Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: A novel approach for the development of tumor markers (2008) Int J Cancer, in press.

2. 学会発表

(国際学会)

(Invited) The 27th Sapporo Cancer Seminar International Symposium, Glycomics July 11~13, Sapporo, Japan

Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. Eiji Miyoshi

GLYCO19, July 15-20, 2007 Kearns, Australia Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer; a novel approach for the development of tumor markers Nakano M, Nakagawa T, Tajiri M, Wada Y, Taniguchi N, Miyoshi E.

(国内学会)

第43回 日本肝臓学会総会 東京 cDNA microarray を用いた肝細胞癌の網羅的フコシル化糖蛋白関連遺伝子の解析野田勝久、三善英知、森脇健太、村田真衣子、森川公美子、名和誉敏、佐藤雅子、明田寛史、後藤靖和、山田幸則、吉原治正、鎌田武信、林 紀夫

第66回日本癌学会 横浜 Molecular basis for production of fucosylated haptoglobin in cancer Miyoshi E., Nakano M, Moriwaki K, Nakagawa T, Hayashi N, Taniguchi N.

Fucosylation levels in serum and bile during hep

atocarcinogenesis. Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Taniguchi N, Miyoshi E.

A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation. Moriwaki K, Noda K, Taniguchi N, Hayashi N, Miyoshi E.

第79回日本生化学会 横浜 12/11~12/15

Core-fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in WiDr cells and suppresses tumor metastasis. Osumi D, Takahashi M, Yokoe S, Noda K, Miyoshi E., Gu J, Ikeda Y, Taniguchi N.

Abnormality of glutathione metabolism in Fut8 null-mice. Mizuno Y, Asahi M, Misumi Y, Yamauchi M, Sano M, Wang WC, Gu J, Taniguchi N, Miyoshi E.

(シンポジウム)招待講演

日本ヒトプロテオーム機構第5回大会 東京 7/31 グライコミクスの手法を用いた膀胱癌の新しい腫瘍マーカーの開発 三善英知

第27回日本分子腫瘍マーカー研究会 東京大学 10/2 コアコースと腫瘍マーカー 三善英知

第5回糖質科学コンソーシアム 品川 11/26-11/27 医療糖鎖バイオマーカーの開発と糖鎖機能の解明 「コアコースを標的にした腫瘍マーカーの開発とその分子機構の解明」 三善英知

文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」の研究成果公開発表シンポジウム 東京 1/25~1/26 「糖鎖で肝臓の病気を治す」 三善英知

コアフコース欠損に伴う肺気腫の病態変化とその分子メカニズム

分担研究者 顧 建国 東北薬科大学 薬学部 教授

研究要旨 Fut8欠損マウスにおいて、TGF- β 受容体II型のコアフコースの欠失がTGF- β への結合能を低下させることによって、Smad2へのシグナル伝達が障害され、ECM合成系の低下・分解系の亢進が肺気腫を引き起こす要因であることを明らかにしてきた。さらに、最近Fut8欠損マウスの肺気腫の原因はTGF- β 受容体の機能低下だけではなく、VEGF受容体の発現低下とその結果生じるセラミドの生合成亢進により肺胞アポトーシスが誘導されるためであるという、新たな肺気腫発症メカニズムを明らかにした。

A. 研究目的

Fut8欠損マウスにおいて認められる肺気腫発症の分子メカニズムの一つとして、細胞増殖抑制作用を有すTGF- β 受容体を介するシグナル伝達が、受容体のコアフコース欠損により抑制されるためであることを明らかにしている。しかし、生体内でコアフコースの修飾を受けるタンパク質は他にも数多く存在する。さらに、ヒトでは、タバコや大気汚染など有害な粒子やガスを吸い込み続けることによって、肺に炎症が持続的に起こった状態になることが肺気腫の原因と考えられているが、その発症メカニズムについては未解明である。このため本研究では、詳細なヒトの肺気腫発症のメカニズムを明らかにするため、コアフコース欠損に起因する新たな発症メカニズムの存在を証明することを目的として、最近、肺形成に重要と言われているVEGFR (vascular endothelial growth factor receptor; 血管内皮細胞増殖因子)を介するシグナル伝達系について解析を行った。

B. 研究方法

最近、肺気腫の患者においては、VEGFRの発現が

抑制され、その結果、セラミドの生合成が亢進し、アポトーシスが誘導されることが報告された。そこで、VEGFRとFUT8欠損による肺気腫発症との関係を調べるため、まずFut8欠損マウスの肺組織におけるVEGFRの発現をRT-PCRおよびウエスタンブロットによって調べた。さらに免疫組織染色によって確認した。

また、FUT8とVEGFRとの直接的関係を確認するため、小細胞肺癌細胞A549にRNAi(RNA干渉)手法を用いて、Fut8をターゲットにしたノックダウンを行った。Fut8に対するsiRNA発現プラスミドの導入はウイルスベクターを用いた。薬剤による恒常的発現株を選択したのち、FUT8の発現低下をRT-PCRおよび活性測定を用いて確認した。対照には、野生型の細胞とベクターのみを導入したものを用いた。それぞれの細胞におけるVEGFRの発現量はReal-time PCRおよびウエスタンブロットにより確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「東北薬科大学動物実験指針」に基づいて行った。

C. 研究結果

VEGFR の発現量は、7、18 日齢および 2 ヶ月齢の Fut8 ノックアウトマウスの肺組織を用いてウエスタンブロットにて調べた。野生型に比べ、ノックアウトマウスでの VEGFR の発現量の低下が認められた。一方、EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor; 上皮成長因子受容体) や TGF- β 1 受容体 II 型など他の受容体の発現に変化は認められなかった。その発現低下は免疫組織染色によって確認された。

さらに、A549 細胞の Fut8 遺伝子発現をノックダウンすることにより、VEGFR の発現量が mRNA およびタンパク質レベルにおいて減少することが認められた。

以上のことから、FUT8 は VEGFR の発現に必須であることが強く示唆された。

次に、肺気腫の患者の肺組織に見られるセラミドの生合成の亢進およびアポトーシスの増加について、Fut8 欠損マウスの肺組織を用いて免疫組織染色によって調べた。その結果、野生型マウスに比べ、18 日齢および 4 ヶ月齢の Fut8 欠損マウスの肺組織において、アポトーシスを誘導するセラミドの発現亢進が見られた。実際、アポトーシス病理像の増加が観察された。一方、肝臓、脾臓、心臓および腎臓においては、野生型とノックアウトマウスと間に顕著な差が認められなかった。

以上の結果は、FUT8 は VEGFR の発現に重要であり、肺組織の正常な形成に必須であることを強く示している。

D. 結論および考察

本研究により、Fut8 欠損マウスにおいて VEGFR を介した新たな肺気腫発症の分子メカニズムを明らかにした。細胞レベルでの Fut8 のノックダウンによるアプローチにより、VEGFR の発現量が著しく減少したことから、Fut8 欠損マウスに見られる肺気腫は、従来報告してきた TGF- β 1 受容体 II 型とリガンドの結合が弱くなることで、下流のシグナルが阻害され、MMP の発現が誘導さ

れることに加え、VEGF のシグナルが低下することで、セラミドが増加し、その結果アポトーシスが誘導されることによるものが推測される。

いずれにせよ、コアフコースの欠失がヒトの肺気腫の一因になっている可能性は高いと考えられる。今後は FUT8 がどのように VEGFR の発現を調節するか解析する。また、肺気腫に関わる要因のすべてのスペクトルを明らかにすると同時に、糖鎖による予防および治療薬の開発を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, Miyoshi E, Tsukihara T, Honke K, Matsumoto A, Nakagawa A, Taniguchi N. Crystal structure of mammalian α 1,6-fucosyltransferase, FUT8 (2007) *Glycobiology* 17(5), 455-66
2. Li W, Takahashi M, Shibukawa Y, Yokoe S, Gu J, Miyoshi E, Honke K, Ikeda Y, Taniguchi N. Introduction of bisecting GlcNAc in N-glycans of adenylyl cyclase III enhances its activity (2007) *Glycobiology* 17(6), 655-62
3. Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Yamamoto K, Shigeta M, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N. Carbohydrate binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*: a novel probe for core fucose (2007) *J Biol Chem* . 282(21), 15700-8
4. Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J., Taniguchi, N. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins (2008) *The FEBS J* in press

2. 学会発表

1. 糖鎖によるインテグリンの機能調節. 伊左治知弥、佐藤裕也、福田友彦、顧建国; 日本生化学会東北支部第73回例会・シンポジウム; 東北大学医学部良陵会館; 2007年5月12日
2. N-結合型糖鎖によるインテグリンとその複合体形成の機能制御. 顧建国; 第30回年日本分子生物学会・第80回生化学会合同会議; 横浜; 2007年12月11-15日
3. N分岐型糖鎖修飾の意義について. 顧建国; 第一回東北糖鎖研究会; 東北薬科大学; 2007年12月22-23日
4. Fut8の機能解析:疾患とコアフコース. 顧建国; 高知システム糖鎖生物学教育研究センター第一回公開シンポジウム『糖鎖と医学の関わり』、高知大学医学部; 2008年3月21日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

1. エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおけるFut8+/-マウスの検討
2. ヒト手術摘出肺凍結標本におけるFUT8活性の測定

分担研究者 別役 智子 北海道大学病院第一内科 講師

研究要旨

1. Fut8 mRNAの発現が低下しているFut8ヘテロマウスを用いて、エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおいて、野生型との差を検討した。エラスターゼ気管内投与直後の炎症性変化には野生型との差を認めなかったが、21日目には、Fut8ヘテロマウスでは、野生型と比較して有意に肺気腫の程度が強かった。
2. ヒト手術摘出肺凍結標本におけるFUT8活性の測定を行う。中高年の非喫煙者、健常喫煙者、軽度の肺気腫患者を対象に設定し、検体の収集を行っている。これまで得られたプレリミナリー結果としては、Fut8のmRNA発現に3群間での差は認められなかった。ヒト肺組織中FUT8の測定系を現在確立中である。

A. 研究目的

1. エラスターゼ誘導肺気腫モデルとは、ヒト豚エラスターゼを気道に注入することで、直接的にエラスチン分解と炎症を惹起し、マウスでは約21日後にヒトの肺気腫病変に類似した病理像が得られることが確立している。野生型とFut8ヘテロマウスを用いて、本モデルを作成し、初期炎症細胞浸潤の程度、21日後の肺気腫病変の程度に差があるか否かを検討する。
2. マウスで認められたFUT8活性低下による肺気腫様病変の形成機序がヒトの早期肺気腫病態においても認められるか否かを検討する。ヒト手術摘出肺凍結標本におけるFUT8活性測定の方法を確立し、比較検討の対象としては、中高年の非喫煙者、健常喫煙者、軽度の肺気腫患者各20名を目標として収集する。肺組織中FUT8の活性が喫煙によりどのような影響を受けるか、肺気腫発症の有無、またその臨床的重症度とどのような関係があるかを検討する。

B. 研究方法

1. 週齢10~11週のオスFut8+/-マウスと、対照として週齢と性別を合わせた野生型C57/B6マウスを用いる。MicroSprayer® (Penn-Century Inc.)を用いて、ヒト豚エラスターゼ(pancreatic porcine elastase, EC134, Elastin Products)を3U、または生理的食塩水を気管内噴霧投与する。投与前、投与3時間、24時間、7日、14日、21日後に屠殺する。各群6匹ずつとし、気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage: BAL)と凍結肺標本作成を行う。BAL液中の総細胞数、炎症細胞分画の定量、Myeloperoxidase (MPO)活性の定量を行う。凍結肺標本よりRNAを抽出し逆転写反応によりcDNAを作製する。Real-time RT-PCR法にて、Fut8、各種の炎症性サイトカイン、matrix metalloproteinase (MMP)-12、vascular endothelial growth factor (VEGF)等の発現について、野生型、およびFut8ヘテロマウス

空間の比較を行う。21日目については、定圧ホルマリン固定標本作製し、病理学的に肺気腫形成の程度を定量的に比較する。動物実験については、北海道大学実験動物取り扱い委員会にて承認されており、かつ本学の実験動物指針に従う。実験の実施にあたっては、実験動物に適切な鎮痛、麻酔、保定を施し、無用の苦痛を与えないよう細心の留意を行う。

2. ヒト手術摘出肺凍結標本を用いる研究については、北海道大学病院第二外科において末梢肺腫瘍切除目的に肺葉切除術を施行された非喫煙者、肺気腫を有さない喫煙者、肺気腫を有する喫煙者の肺の一部を採取・凍結保存する。採取された組織を粉碎し、蛋白抽出を行い、FUT8活性を測定する。また同サンプルの一部からRNAを抽出し逆転写反応によりcDNAを作製する。real-time RT-PCR法にてFut8および関連因子のmRNA発現の定量的解析を行い、臨床的背景、呼吸機能などとの関係を解析する。研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による不利益、危険性の排除や説明を行い、理解と同意(インフォームド Consent)を取得している。「喫煙者、非喫煙者における肺の加齢現象の差異に関する比較検討」として北海道大学「医の倫理委員会」に審査を申請し、既に平成13年4月20日付けで承認されている。

C. 結果

1-1: エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおいて、初期においても、21日後の肺気腫が完成された時期においても、マウス肺のFut8 mRNA量については変化がなかった。

1-2: Fut8ヘテロマウスについては肺のFut8 mRNA量は、野生型のほぼ2分の1であり、野生型と同様に、本モデルにおいてはFut8 mRNA量の増減は認められなかった。

1-3: エラスターゼ気管内投与群では、生食投与群と比較し、3時間後にBAL液中好中球の有意な上昇が認められ、24時間後、7日後にはマクロファージの有意な上昇が認めら

れたが、野生型、Fut8ヘテロマウス間に有意な差は認められなかった。24時間後のBAL液中MPO活性についても、生食投与群と比較して、野生型、Fut8ヘテロマウス両群において同程度に上昇を認めた。

1-4: 代表的な炎症性サイトカインとしてTNF- α 、IL- β 、KC、MIP-2の定量を行った。急性炎症が惹起されるエラスターゼ気管内投与3時間後の検討では、これらの発現増加について野生型、Fut8ヘテロマウス間に有意差を認めなかった。

1-5: エラスターゼ気管内投与21日後の肺気腫の程度は、Fut8ヘテロマウスで野生型に比して有意に強かった。

1-6: 野生型とFut8ヘテロマウスにおける肺気腫形成の程度の差を生じる要因を検討した。21日後の肺におけるMMP-12とVEGFの遺伝子発現には差を認めなかった。

2-1: ヒト手術摘出肺凍結標本のサンプルについて、手術時の肺の一部を採取・凍結保存し蓄積している。対象の喫煙習慣、呼吸機能、肺気腫の重症度評価等のデータをすでに回収している。

2-2: 非喫煙者14名、肺気腫を有さない喫煙者15名、肺気腫を有する喫煙者18名に対して、肺組織中のRNAを抽出し、定量的RT-PCR法にてFut8のmRNA量を定量した。内因性コントロールGAPDHの発現で補正した、FUT8の発現量は、非喫煙者、肺気腫を有さない喫煙者、肺気腫を有する喫煙者でそれぞれ、非喫煙者: median 0.497, range 0.331-0.894、肺気腫を有さない喫煙者: median 0.527, range 0.273-1.026、肺気腫を有する喫煙者: median 0.539, range 0.163-1.257であり3群間に差はなかった。

2-3: ヒト手術摘出肺凍結標本から、FUT8の活性を失わない特殊な方法で蛋白抽出を行い、FUT8活性のアッセイ系を確立中である。

D. 考案

Fut8欠損マウスは、著しい成長障害と肺気腫様の病

理変化を示すが、その分子メカニズムとして、TGF- β 受容体に $\alpha 1, 6$ フコース糖鎖が付加されないと、受容体とリガンドであるTGF- β との結合性が低下し、TGF- β 受容体を介してマトリックスメタロプロテアーゼの発現抑制が解除される。それによって、肺組織の細胞外マトリックス生合成と分解の均衡が破れ、分解酵素が多量に作られ、肺組織が壊れて肺気腫になるという機序が明らかになった。今回の研究に用いたFut8ヘテロマウスは、肺におけるFut8mRNAの発現量が野生型の約半分であり、Fut8の完全欠損ではなく量的な低下が、疾患発症に対してどのようなインパクトを有するのかという疑問を解決する上で非常に重要なモデルである。今回のわれわれが用いたエラストーゼ誘導性肺気腫モデルは、エラストーゼによる直接肺破壊を起こし、その後の初期炎症を経て3週間後に肺気腫が形成されるとして確立されているが、その詳細な機序については不明な点が多い。我々の結果から、FUT8の量的低下は初期炎症には影響を及ぼさないが、肺気腫の程度を増悪させるというものである。これは、Fut8の欠損マウスが自然発症の肺気腫を生じるという従来の結果と矛盾しない結果である。今後は、Fut8ヘテロマウスにおいて気腫化が促進されるメカニズムの探究を目指す。

マウスにおいて明らかにされた気腫形成のメカニズムにおけるFUT8の役割が、ヒトの肺気腫の病態においてはどのように関与しているのかを明かにすることは、治療的介入を前提とした本プロジェクトの最も重要な課題である。われわれは、臨床研究として、背景データを厳密に合わせた群での比較検討を行うべく、対象の選択と検体の収集には細心の注意を払っている。統計学的評価に必要な人数の収集と、生化学的に、ヒト肺組織FUT8の活性測定系確立を同時に進行している。

E. 結論

1. Fut8ヘテロマウスを用い、エラストーゼ誘導肺気腫モデ

ルにおいて、野生型との差を検討した。エラストーゼ気管内投与直後の炎症性変化には野生型との差を認めなかったが、21日目には、Fut8ヘテロマウスでは、野生型と比較して有意に肺気腫の程度が強かった。

2. ヒト手術摘出肺凍結標本におけるFUT8活性の測定を行うべく、中高年の非喫煙者、健常喫煙者、軽度の肺気腫患者を対象に検体の収集を行っている。これまで得られたプレリミナリー結果としては、Fut8のmRNA発現に3群間での差は認められなかった。ヒト肺組織中FUT8の測定系を現在確立中である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Adair-Kirk TL, Atkinson JJ, Griffin GL, Watson MA, Kelley DG, DeMello D, Senior RM, Betsuyaku T. Distal airways in mice exposed to cigarette smoke: Nrf2-regulated genes are increased in Clara cells (2008) Am J Respir Cell Mol Biol. in press
2. Suzuki M, Betsuyaku T, Nagai K, Fuke S, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nishimura M. Decreased airway expression of vascular endothelial growth factor in cigarette smoke-induced emphysema in mice and COPD patients (2008) Inhal Toxicol 20, 349-59
3. Hosokawa T, Betsuyaku T, Odajima N, Suzuki M, Mochitate K, Nasuhara Y, Nishimura M. Role of basement membrane in EMMPRIN/CD147 induction in rat tracheal epithelial cells (2008) Biochem Biophys Res Commun 368, 426-32
4. Betsuyaku T, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Mitsuhashi H, Adair-Kirk TL, Senior RM, Nishimura M.

ra M. Bronchiolar chemokine expression is different after single versus repeated cigarette smoke exposure (2008) *Respir Res* 9, 7

5. Nagai K, Betsuyaku T, Suzuki M, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Nishimura M. Dual oxidase 1 and 2 expression in airway epithelium of smokers and patients with mild/moderate chronic obstructive pulmonary disease (2008) *Antioxid Redox Signal* 10, 705-14

6. Hakuma N, Betsuyaku T, Kinoshita I, Itoh T, Kaga K, Kondo S, Nishimura M, Dosaka-Akita H. High incidence of extracellular matrix metalloproteinase inducer expression in non-small cell lung cancers. Association with clinicopathological parameters (2007) *Oncology* 72, 197-204

7. Ito Y, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M. Lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in the lungs differs with age (2007) *Exp Lung Res* 33, 375-84

8. Makita H, Nasuhara Y, Nagai K, Ito Y, Hasegawa M, Betsuyaku T, Onodera Y, Hizawa N, Nishimura M; Hokkaido COPD Cohort Study Group. Characterization of phenotypes based on severity of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease (2007) *Thorax* 62, 932-7

9. Hizawa N, Makita H, Nasuhara Y, Betsuyaku T, Itoh Y, Nagai K, Hasegawa M, Nishimura M. Beta2-adrenergic receptor genetic polymorphisms and short-term bronchodilator responses in patients with COPD (2007) *Chest* 132, 1485-92

10. Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M. Loss of caveolin-1 in bronchiolization in lung fibrosis (2007) *J Histochem Cytochem* 55

(9), : 899-909

11. Hosokawa T, Betsuyaku T, Nishimura M, Furuyama A, Katagiri K, Mochitate K. Differentiation of tracheal basal cells to ciliated cells and tissue reconstruction on the synthesized basement membrane substratum in vitro (2007) *Connect Tissue Res* 48, 9-18

12. Reynolds SD, Shen H, Reynolds PR, Betsuyaku T, Pilewski JM, Gambelli F, Di Giuseppe M, Ortiz LA, Stripp BR. Molecular and functional properties of lung SP cells (2007) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292, L972-83

2. 学会発表

1. 別役智子: シンポジウム1 気管支喘息・COPDの分子病態の解明と治療への挑戦「COPDにおける抗酸化遺伝子発現とその調節機構」

第47回呼吸器学会学術講演会、2007年5月、東京

2. 別役智子: シンポジウム7 呼吸器疾患と慢性炎症「慢性喫煙暴露とCOPDの病態における炎症性サイトカインの役割」

第47回呼吸器学会学術講演会、2007年5月、東京

3. T. Betsuyaku, I. Hamamura, J. Hata, H. Mitsuhashi, T.L. Adair-Kirk, G.L. Griffin, R.M. Senior, M. Nishimura. "Catalase mRNA expression in bronchiolar epithelium in mice is up-regulated by acute cigarette smoke (CS) exposure and down-regulated by chronic CS exposure" American Thoracic Society 2007 International Conference, San Francisco, California, May, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)