

200821001B

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に関する研究

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 長瀬 隆英

平成21(2009)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・制御に関与する遺伝子
・蛋白系の解明と治療応用に関する研究

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 長瀬 隆英

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
1. 高齢者呼吸器疾患の発症・制御に関与する遺伝子・蛋白質の解明と治療応用: 慢性閉塞性肺疾患(COPD)を中心に	1
研究代表者 長瀬 隆英	
2. 疾患遺伝子解析のための新規手法、ホモ接合指紋法、ホモ接合ハプロタイプ法の開発と それを用いた疾患遺伝子解析	18
研究分担者 萩原 弘一	
3. 炎症性疾患の病態における生理活性ペプチドの関与に関する研究	36
研究分担者 栗原 裕基	
4. G タンパク質共役型受容体による生体制御機構の解明	55
研究分担者 石井 聡	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	98
III. 研究成果の刊行物・別刷	103

総合研究報告書

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

研究代表者 長瀬隆英 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

高齢化が急速に進行しつつある現在、呼吸器疾患の社会的重要性が強く指摘されている。高齢者における COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、嚥下性肺炎などは、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り、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、発生工学的手法による遺伝子改変マウスの作成と解析、siRNA の応用、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、さらに肺の発生・機能への関与が示唆されている新規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。特に、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提示された。
- 2) 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、老化肺細胞モデルを検討した。
- 3) 肺線維症などの炎症性肺疾患において重要と考えられる TGF β 1 をマウス肺において抑制することを目指した。マウス Tgf β 1 に対する shRNA を AAV に搭載し、マウス線維芽細胞において Tgf β 1 の発現を抑制することに成功した。
- 4) ホモ接合指紋法という画期的な遺伝子多型解析手法が開発され、COPD 遺伝子多型解析の技術基盤が確立された（分担研究者：萩原弘一）。
- 5) 抗菌ペプチド β -defensin の遺伝子改変マウスの解析がなされた（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准教授

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

山口泰弘・東京大学医学部附属病院助教

山本 寛・東京大学医学部附属病院助教

鹿毛秀宣・東京大学大学院医学系研究科

三谷明久・東京大学大学院医学系研究科

A. 研究目的

高齢化が急速に進行しつつある現在、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、老化細胞モデルで検討を行う。

近年、炎症を促進あるいは抑制する生理活性因子として、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。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 (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)

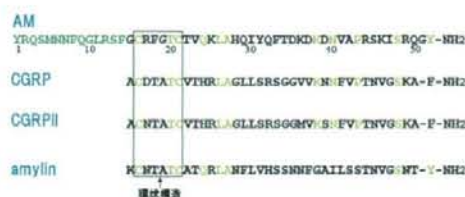


図2 CGRPファミリーペプチド群のアミノ酸配列

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。

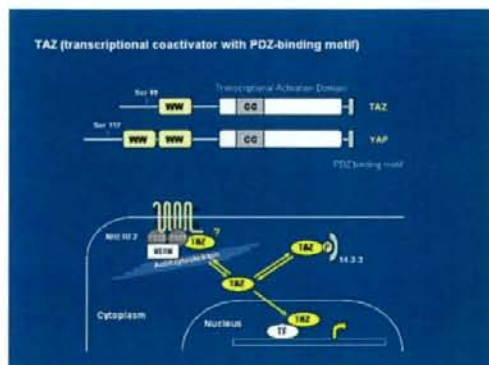


図3 転写コアクチベーターTAZは、WW domainを有し、PPXYモチーフと結合して機能を発現する。

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、発生に大きく関わる事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)。

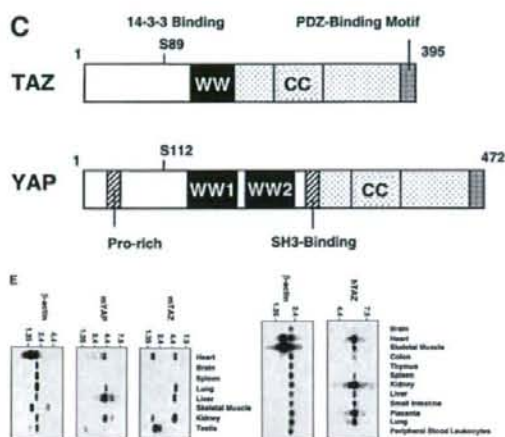


図4 転写コアクチベーターTAZは、Yes-associated protein (YAP)とホモロジーを有する。また、肺にも強く発現している (*EMBO J* 19: 6778-91, 2000)。

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 PXY 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。

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。

siRNA の応用

近年、RNA 干渉を用いた研究手法が開発され、大きく発展してきた。RNA 干渉とは 20-30 塩基程度の短い RNA が遺伝子の mRNA と相補的に結合をすることによりその遺伝子を抑制する機能のことを呼ぶ。RNA 干渉に関わる短い RNA には siRNA, miRNA, piRNA/rasiRNA などがある。生理的な siRNA はウイルスやレトロトランスポゾン由来の RNA から合成され、細胞の防御機能に関わる。miRNA はゲノムの非翻訳領域より転写され、修飾を受けて産生され、自己の遺伝子の発現抑制に関わる。piRNA/rasiRNA の合成経路および機能はいまだ解明されていないが、生殖細胞の分化に関わると考えられている。

今回、我々は肺線維症や悪性腫瘍において重要な TGFβ1 をマウスの肺において抑制することを念頭に置き、マウス Tgfβ1 に対する shRNA を AAV に搭載してマウス線維芽細胞において Tgfβ1 の発現抑制を目指した。

<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：

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

CysLT 受容体(CysLT1-R, CysLT2-R、の2種類)は、炎症・免疫関連疾患に関わることが想定されている。特に、CysLT2-R は肺に多量に存在しており、高齢者炎症性肺疾患において重要な位置を占める可能性がある。しかしながら、その機能は未だに未解明のままである。本研究では、CysLT2 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。

CGRP ファミリー：

<CGRP の ARDS 発症機序への関与>

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)。

<AMの気道過敏性発症機序への関与>

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・気管支肺泡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。肺組織については気道炎症を中心に評価した。

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。

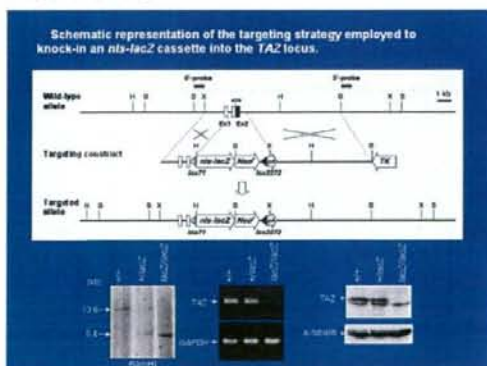


図5 TAZ ノックアウトマウスの作成

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次元的培養:>

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

<老化細胞での検討>

今回、我々は、培養細胞において、若い世代の培養細胞と、世代の進んだ「老化」細胞を用い、比較検討を行った。

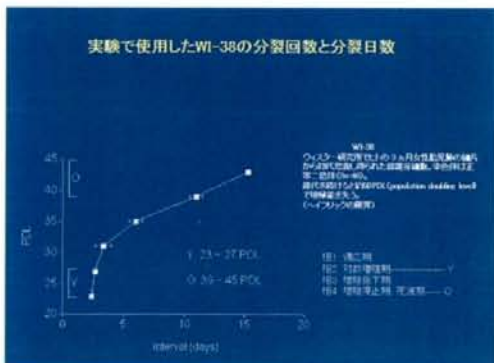


図7 老若細胞と分裂回数・分裂日数

siRNA の応用

TGFβ1 は細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、細胞外基質の産生などの機能を持ち、線維化や悪性腫瘍に関わる重要な分子として知られる。従来、遺伝子を抑制する手法として用いられてきたノックアウトマウスは TGFβ1 では周産期致死であり、抗体、小分子阻害剤、アンチセ

ンスなどはいずれも効果、特異性、安全性などに問題がある。今回、我々は siRNA 実験の標的遺伝子として TGFβ1 を選択した。

(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：

<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。目下、バッククロスによる遺伝的純化が完了し、疾患モデルを用いた解析が進行中である。

Targeted Disruption of Mouse CysLT₂ Gene in C57BL/6 ES Cells

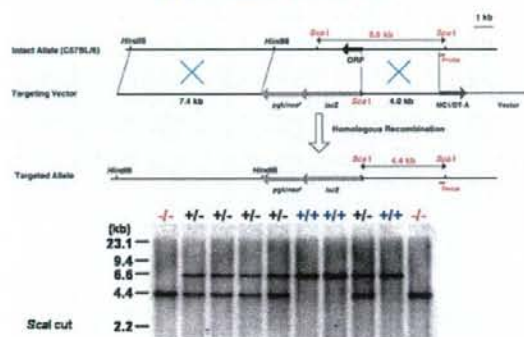


図8 CysLT₂ 受容体ノックアウトマウスの作成

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。

<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。

一方、肺組織標本をモルフォメトリーにより解析したところ、AM ノックアウトマウス感作群では野生型群と比べて有意に気管支平滑筋層が増大していることが認められた。

Summary of histological patterns of each arms

	AMP/S	AMP/S	AMP/O	AMP/O
気管支上皮剥離	-	-	+	+
好酸球浸潤	-	-	+	+
杯細胞の増生	-	+	++	++
気管支平滑筋の増生、肥厚 基底膜の肥厚	-	-	+	++

Yamamoto H, J Appl Physiol 2007

図9 アレルギー性気管支喘息モデルにおける AM ノックアウトマウス肺組織解析のまとめ

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 TAZ ノックアウトマウスが得られた。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、肺胞の異常が示されつつある。

また呼吸生理学的にも、TAZ ノックアウトマウスでは、PV カーブにおいて典型的な「肺気腫」型の所見（PV カーブの上方移動、コンプライアンス増加）を認めている。

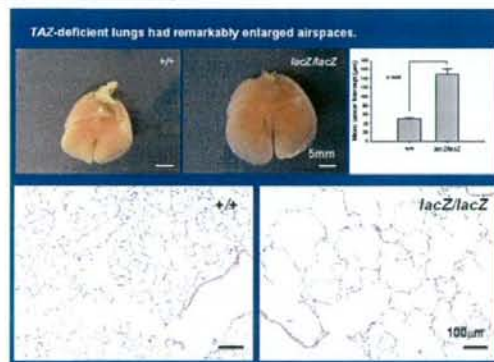


図 10 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見

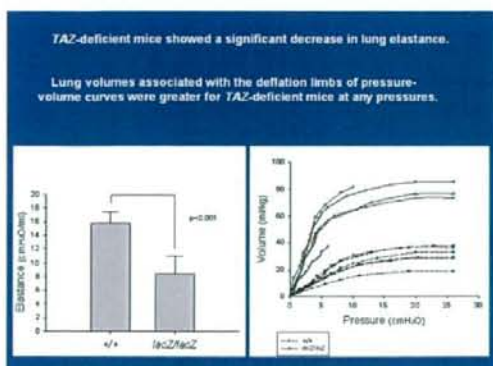


図 11 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺生理学的解析

In vitro 気道リモデリング：

老若細胞を比較検討した結果、老化細胞では若い細胞に比して、遊走能が著明に低下していることが示された。一方、収縮能では、老化細胞が若細胞に比して有意に低下しているものの、その差は著明なものではなかった。

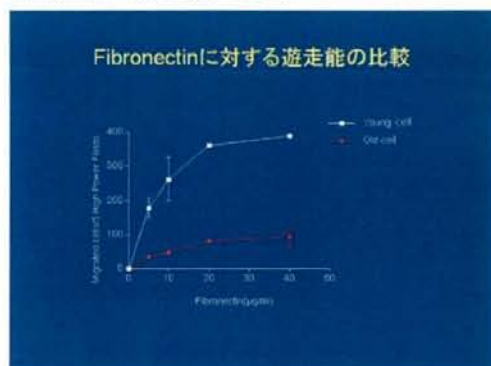


図 1 2 老化細胞では若い細胞に比して、遊走能が著明に低下している。

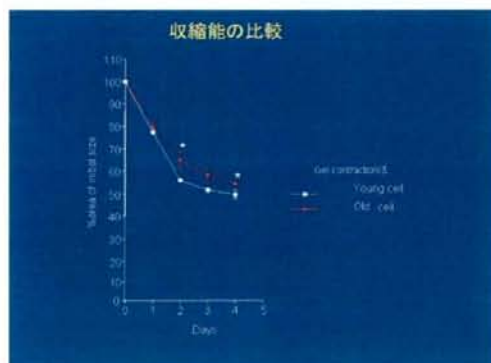


図 1 3 Gel contraction 法を用いた実験結果。

siRNA の応用

まず、我々は Tgfβ1 を抑制する最適な siRNA 配列を検討した。はじめに公開されているウェブサイトを利用して 4 配列を比較し、十分な効果を認めたのは 1 つだけであった。そのため、文献に基づくアルゴリズムを用いてさらに 6 配列追加

し、最適な配列をさらに一つ、選択した。

2つの異なる方法で合計10種類のshRNA配列を実験的に検証し、50%のノックダウン効果が得られたのは2配列のみであった

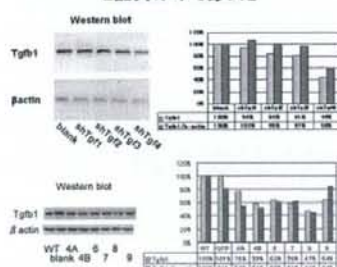


図 1 4 Tgfb1 を抑制する最適な siRNA 配列の検討

AAV を産生する際に用いるプラスミドにこの shRNA の配列を組み込み、マウス胚由来線維芽細胞 3T12-3 への transfection により Tgfb1 タンパクが約 50%抑制されることを Western blot で確認した。次に、プラスミドより shRNA を発現させる際に、RNA polymerase III (PolIII) プロモーターと通常の stem-loop 型の shRNA を用いるよりも、PolII プロモーター下に primary miRNA 由来の配列と目的の shRNA を組み込んだ方が高い効果が得られる、とする報告に基づき、我々も同様の手法を試みた。その結果、PolII プロモーターと primary miRNA に基づく配列はプラスミドの transfection ではノックダウン効果を認めず、核内に確実に導入する必要があることが判明した。また、AAV を用いても PolIII プロモーターと stem-loop 型の shRNA のノックダウン効果が高かった。

Pol III promoterの方がPolII promoterよりもshRNAのノックダウン効果が高く、また、AAVを用いて核内に導入すると効果の向上が見られた

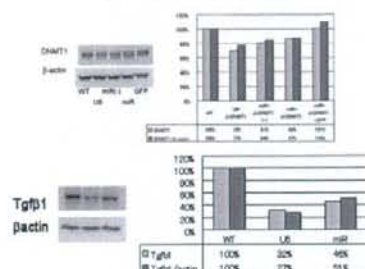


図 1 5 shRNA ノックダウン効果の検討

最適な siRNA 配列が決定したため、次に AAV の作成に移った。AAV の組織親和性は Cap タンパクに規定される血清型に依存し、気道上皮細胞への親和性は AAV5 由来の Cap が最も高いことが知られている。そのため、我々は市販されている AAV2 の配列に Cap タンパクのみ AAV5 由来のものに置き換えた AAV2/5 ハイブリッドウイルスベクターを作成した。すなわち、AAV2 由来の inverted terminal repeat (ITR) 配列の間に PolIII プロモーターと shRNA を含むプラスミド、AAV2 由来の Rep タンパクと AAV5 由来の Cap タンパクをコードするプラスミド、および増殖に必要なアデノウイルスの遺伝子をコードするプラスミドをリン酸カルシウム法で 293 細胞に triple transfection し、細胞を破碎してウイルスを得た。

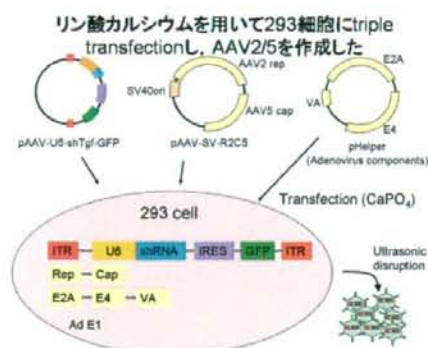


図 1 6 AAV2/5 の作成

精製後、real time PCR で力価を測定し、十分な力価のウイルスを得ていることを確認した。この際、細胞破碎や精製の条件検討を行い、細胞破碎は凍結融解と超音波破碎で大きな違いがなく、精製は市販されているカラム型のキットよりも塩化セシウムを用いた超遠心と透析の方が優れていた。

最後に、Tgfβ1 に対する shRNA を搭載した AAV2/5 を 3T12-3 に transduction したところ、Tgfβ1 タンパクが約 40%に抑制された。Real time PCR で mRNA の発現を確認したところ、mRNA の発現レベルの低下は認められず、我々の系では siRNA の配列が mRNA と完全に相補的であったにも関わらず、mRNA が切断されているのではなく、翻訳が抑制されていることが判明した。

AAV2/5を用い、Tgfβ1タンパクはノックダウンされたが、mRNAは不変であった

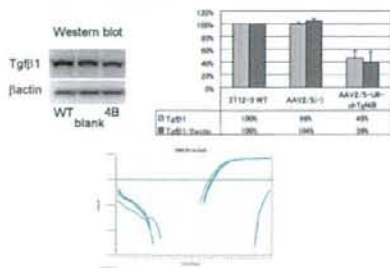


図 1 7 AAV2/5 による Tgfβ1 タンパクの抑制

D. 考察

脂質性メディエーター：

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、炎症細胞の遊走・賦活化は極めて重要な位置を占めると考えられる。本研究グループは、今回、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 CysLT2 受容体遺伝子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性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 CysLT2 受容体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。

今後は、本研究により確立された 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、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、CGRP が ARDS 発症機序に関わる可能性が示唆された。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た。

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。実際に、我々は、TAZ と CTGF 発現に密接な関係があることを明らかにしつつある。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)、プ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。今回は、老若培養細胞において比較検討を行ったが、今後はさらにメディエーターへの反応などをふくめて研究を進展させる予定である。

siRNA の応用

近年、生理的な RNA 干渉の経路を利用した siRNA や short hairpin RNA (shRNA) により *in vitro* で遺伝子を抑制できるようになった。しかし、*in vivo* ではいまだ siRNA の導入に問題点が多く、これを克服するため、様々な工夫がなされている。その手法は大きくウイルスベクターと化学修飾に大別される。

siRNA にリガンドやリボソームなどを付加した化学修飾は多くの手法が報告されているが、遺伝子の導入効率と毒性を両立させることが困難である。これに対し、ウイルスベクターは遺伝子の導入効率も毒性も既に確立しており、魅力的な手段である。現在利用されているウイルスベクターのうち、アデノウイルスは毒性が高い上に遺伝子の発現期間が短く、レトロウイルスは非分裂細胞への遺伝子導入が不可能であり、いずれも利用頻度が減少している。レンチウイルスは非分裂細胞への遺伝子導入が可能で遺伝子の

発現期間も長く、手技も簡便なため *in vitro* では頻用されるようになってきている。しかし、導入する遺伝子は染色体に組み込まれるため、*in vivo* では発癌性を含め、挿入部位での遺伝子の欠損が問題となる。

その点、アデノ随伴ウイルス (AAV) は手技が煩雑であるが、毒性が極めて低く、安全性も高いため、*in vivo* では第一選択と考える。一方、これまで AAV を含め、ウイルスベクターに shRNA を搭載して呼吸器系の遺伝子を抑制した報告はない。

今回、我々は肺線維症や悪性腫瘍において重要な TGF β 1 をマウスの肺において抑制することを念頭に置き、マウス Tgf β 1 に対する shRNA を AAV に搭載してマウス線維芽細胞において Tgf β 1 の発現抑制に成功した。今回の検討より、我々はマウス Tgf β 1 に対する shRNA を AAV2/5 に搭載し、3T12-3 細胞において Tgf β 1 タンパクを抑制することに成功した。AAV を利用して線維芽細胞に遺伝子を導入したことと、shRNA を AAV2/5 に搭載して遺伝子を抑制したのはこれが初めてである。我々の系では今後、マウスの気道において任意の遺伝子をノックダウンすることが可能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的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。発生工学的手法や siRNA 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た。さらに、siRNA を応用することにより、マウス線維芽細胞において Tgf β 1 の発現抑制に成功した。

以上の知見は、難治性的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) Nakajima T, Jo T, Meguro K, Oonuma H,

- Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T. Effect of dexamethasone on voltage-gated Na⁺ channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci*. 82:1210-1215, 2008.
- 2) Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull* 31: 1434-1438, 2008.
- 3) Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Multiple renal cysts with concentration defects and pulmonary emphysema in mice lacking TAZ. *Am J Physiol* 294: F542-53, 2008.
- 4) Kage H, Kohyama T, Kitagawa H, Takai D, Kanda Y, Ohishi N, Nagase T. Non-Infectious Bronchiolitis as an Early Pulmonary Complication of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Internal Medicine* 47: 61-64, 2008.
- 5) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Kato J, Nagase T. Clarithromycin inhibits fibroblast migration. *Respir Med*. 2008 ; in press
- 6) Kihara Y, Yanagida K, Masago K, Kita Y, Hishikawa D, Shindou H, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. *J Immunol* 181; 5008-5014, 2008.
- 7) Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Prog Lipid Res* 47; 107-126, 2008.
- 8) Kikuchi K, Kohyama T, Yamauchi Y, Kato J, Takami K, Desaki M, Okazaki H, Nagase T, Rennard SI, Takizawa H C reactive protein modulates human lung fibroblast migration. *Experimental Lung Research* 35; 48-58, 2009.
- 9) Nakajima T, Kubota N, Tsutsumi T, Oguri A, Imuta H, Jo T, Oonuma H, Soma M, Meguro K, Takano H, Nagase T, Nagata T. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol* 2009 in press
- 10) Kikuchi Y, Tateda K, Fuse ET, Matsumoto T, Gotoh N, Fukushima J, Takizawa H, Nagase T, Standiford TJ, Yamaguchi K. Hyperoxia exaggerates bacterial dissemination and lethality in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Pulm Pharmacol Ther* 2009 in press
- 11) 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* 2007; 292: C2141-9.
- 12) Yamamoto H, Nagase T, Shindo T, Teramoto S, Aoki-Nagase T, Yamaguchi Y, Yokomizo T, Nagai R,

- Kurihara H, Ouchi Y. Impaired innate adrenomedullin function deteriorates airway hyperresponsiveness in mice: possible roles of allergen-induced airway wall remodeling. *J Appl Physiol* 2007; 102: 2361-8.
- 13) 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* 2007; 12: 807-13.
- 14) Sugimoto K, Kage H, Aki N, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. The Induction of H3K9 Methylation by PIWIL4 at the p16Ink4a Locus. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 497-502.
- 15) Sano A, Kage H, Sugimoto K, Kitagawa H, Aki N, Goto A, Fukuyama M, Nakajima J, Takamoto S, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. A second-generation profiling system for quantitative methylation analysis of multiple gene promoters: application to lung cancer. *Oncogene* 2007; 26: 6518-25.
- 16) Goto Y, Nagase T. 12-h pretreatment with methylprednisolone versus placebo for prevention of postextubation laryngeal oedema: a randomised double-blind trial (Correspondence letter). *Lancet* 2007; 370: 25.
- 2.学会発表
- 1). 肺炎症における脂質性メディエーターに関して：第47回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、特別講演），2007.
- 2). 高齢者COPDの臨床：第49回日本老年医学会総会（発表者：長瀬隆英、教育企画），2007.
- 3). 慢性閉塞性肺疾患：第50回日本老年医学会総会（発表者：長瀬隆英、教育企画），2008.
- 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