

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、根本的治療法、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、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、慢性好酸球性肺炎をふくめた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。

#### 脂質性メディエーター：

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。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。

特にロイコトリエン(LT)系は、好中球遊走因子としてのLTB<sub>4</sub>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・解析中である。

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。

#### 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、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タンパクが同定されている。さらにin vitroアッセイの結果、Pax3-TAZの結合には、Pax3 C末端側のPPXY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。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。

## 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>

LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> 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。

#### <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した。まず、TAZ ノックアウトマウスの作成を行い、次にその解析に着手した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究における危険の排除、説明と理解 (インフォームドコンセント) について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に基づき、研究を進める。

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」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられる。

## 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ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体 CysLT2-R 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。

#### Targeted Disruption of Mouse CysLT<sub>2</sub> Gene in C57BL/6 ES Cells

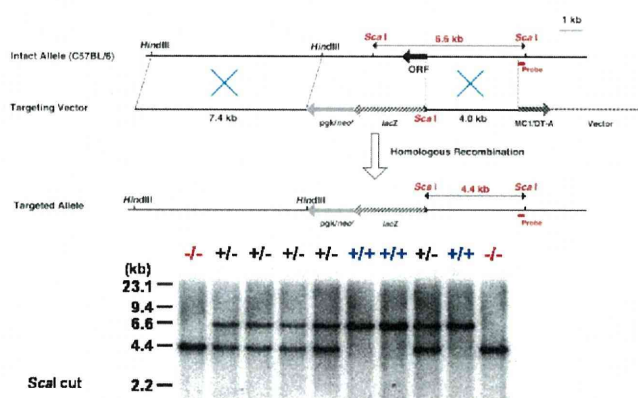


図 1 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

## <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。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た。

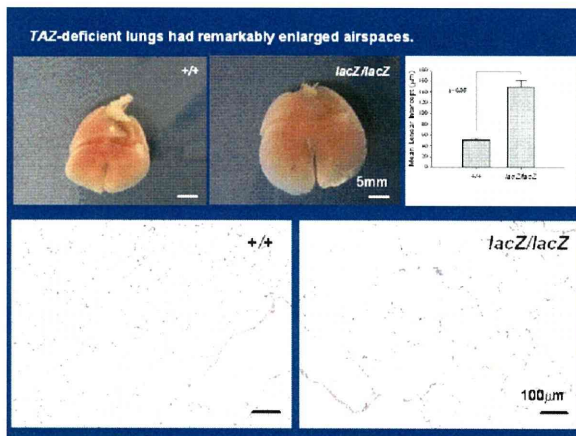


図2 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見

次に、胎生期から成体までの、野生型マウスとTAZ ノックアウトマウスの肺組織所見を検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスの肺は、胎生期においては、ほぼ正常の発育であるが、生後5日以降には気腔の拡張が認められ、その後、気腔の拡張が増大していた。

### D. 考察

慢性好酸球性肺炎は、呼吸不全を呈する呼吸器疾患であり、根治治療の困難さや発症頻度から、社会的にも重大な疾患である。本疾患の病

態機序・治療標的は未だに不明であるため、画期的な新治療法の開発が急務とされている。

慢性好酸球性肺炎は、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、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。

本研究の成果により、脂質性メディエーター、転写コアクチベーターTAZ 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。

### E. 結論

発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性肺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。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kage H, Sugimoto K, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Ohishi N, Takai D.

Suppression of transforming growth factor  $\beta$ 1 in lung alveolar epithelium-decells using adeno-associated virus type 2/5 vectors to carry short hairpin RNA.

Exp Lung Res 2011; 37: 175-185.

2) Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T,

Kohyama T.

Simultaneous stimulation with TGF- $\beta$ 1-and TNF- $\alpha$ induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells.

Int Arch Allergy Immunol 2011; 155: 119-128.

3) Yanagida K, Ishii S.

Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research. (Invited Review)

J Biochem 2011; 150, 223-232..

### 2. 学会発表

1) Molecular mechanisms underlying respiratory diseases.

The 16th APSR Meeting, Shanghai. (発表者: 長瀬隆英、招待講演), 2011.

2) 高齢者の呼吸器疾患: 第 53 回日本老年医学会総会 (発表者: 長瀬隆英、教育講演), 2011..

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

(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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
谷口正実, 谷本英則, 関谷潔史	好酸球性肺炎.	滝澤始	間質性肺炎を 究める.	メディカル レビュー社	東京	2012	印刷中 10-21
森 晶夫	難治性喘息の今日的 な定義および診断・ 治療の課題を検討 する	大田健	～抗体治療時代 の～気管支喘息 治療の新たなス トラテジー	先端医学社	東京	2011	22-29
森 晶夫	アトピー型喘息と 非アトピー型喘息の 病態機序	森川昭廣、 足立満、 秋山一男、 大田健、 東田有智	第30回 六甲カンファ レンス 2010年 における気管支 喘息のすべて	ライフ サイエンス 出版	東京	2011	33-42

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ono E, Taniguchi M, Higashi N, Mita H, Yamaguchi H, Tatsuno S, Fukutomi Y, Tanimoto H, Sekiya K, Oshikata C, Tsuburai T, Tsurikisawa N, Otomo M, Maeda Y, Hasegawa M, Miyazaki E, Kumamoto T, Akiyama K	Increase in salivary cysteinyl- leukotriene concentration in patients with aspirin-intolerant asthma.	Allergol Int.	60(1)	37-43	2011
Yamaguchi H, Higashi N, Mita H, Ono E, Komase Y, Nakagawa T, Miyazawa T, Akiyama K and Taniguchi M	Urinary concentrations of 15- epimer of lipoxin A4 are lower in patients with aspirin-intolerant compared with aspirin-tolerant asthma.	Clinical & Experimental Allergy		1-8	2011
Taniguchi M, Ono E, Tsuburai T, Higashi N, Mita H, Akiyama K	Current research for exhaled breath condensate in relation to asthma and chronic obstructive pulmonary disease.	Proceeding of Airway Secretion Researchi.	Vol.XIII	29-40	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
谷口正実, 東憲孝, 小野恵美子, 山口裕礼, 三井千尋, 梶原景一, 三田晴久, 秋山一男	<アレルギー疾患の病態> 脂質メディエーターの新展開 －炎症性メディエーターと 抗炎症性メディエーター－.	小児内科	43(11)	1834-1838	2011
谷口正実	Churg Strauss 症候群.	呼吸と循環			2011
Kage H, Sugimoto K, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Ohishi N, Takai D.	Suppression of transforming growth factor $\beta$ 1 in lung alveolar epithelium-decells using adeno-associated virus type 2/5 vectors to carry short hairpin RNA.	Exp Lung Res	37	175-185	2011
Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T.	Simultaneous stimulation with TCF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$ induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells.	Int Arch Allergy Immunol	155	119-128	2011
Yanagida K, Ishii S.	Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research.(Invited Review)	J Biochem	150	223-232	2011
Kitamura N, Mori A, Tatsumi H, Nemoto S, Hiroi T, Kaminuma O.	Zinc finger protein, Multitype 1, Suppresses Human Th2 development via downregulation of IL-4	International Archives of Allergy and Immunology	155(Suppl 1)	53-56	2011
Abe A, Ohtomo T, Koyama S, Kitamura N, Kaminuma O, Mori A.	Comparative Analysis of Steroid sensitivity of T helper cells in vitro and in vivo	International Archives of Allergy and Immunology	155(Suppl 1)	110-116	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Katoh, S., Kaminuma, O., Hiroi, T., Mori, A., Ohtomo, T., Maeda, S., Shimizu, H., Obase, Y., and Oka, M.	CD44 is critical for A crucial role of airway accumulation of antigen-specific Th2 cells, but not Th1 cells, induced by antigen challenge in mice.	Eur. J. Immunol	41	3198-3207	2011
Suzuki, K., Kaminuma, O., Yang, L., Takai, T., Mori, A., Umezū-Goto, M., Ohtomo, T., Ohmachi, Y., Noda, Y., Hirose, S., Okumura, K., Ogawa, H., Takada, K., Hirasawa, M., Hiroi, T., and Takaiwa, F.	Prevention of allergic asthma by vaccination with transgenic rice seed expressing mite allergen: induction of allergen-specific oral tolerance without bystander suppression.	Plant Biotech. J.	9	982-990	2011
Kaminuma, O., Ohtomo, T., Mori, A., Nagakubo, D., Hieshima, K., Yoshie, O., Ohmachi, Y., Noda, Y., Kitamura, F., Katayama, K., Suzuki, K., Motoi, Y., and Hiroi, T.	Selective down-regulation of Th2-mediated airway inflammation in mice by pharmacological intervention of CCR4.	Clin. Exp. Allergy	42	315-325	2012
Fukutomi, Y., Taniguchi, M., Tsuburai, T., Tanimoto, H., Oshikata, C., Ono, E., Sekiya, K., Higashi, N., Mori, A., Hasegawa, M., Nakamura, H., and Akiyama, K.	Obesity and aspirin intolerance are risk factors for difficult-to-treat asthma in Japanese nonatopic women.	Clin. Exp. Allergy	(in press)		2012



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
森 晶夫	高 IgE 症候群	呼吸	30(2)		2011
森 晶夫	国際アレルギー学会(WAO) 国際科学会議報告	日本アレルギー 協会関東支部 だより	9		2011
森 晶夫	アレルギーをめぐるトレンド 抗 IgE 抗体療法	皮膚アレルギー フロンティア	9(2)		2011
森 晶夫	アレルギー病因論の新しい展開と 重症アレルギーを特徴付ける ステロイド抵抗性について	日本アレルギー 協会アレルギー 研修会 主題：アレルギー 診療 Update ～病態に基づいた 合理的な治療～		1-10	2011
森 晶夫	重症喘息の病態と真菌抗原による 非 IgE 依存性喘息反応	臨床免疫・ アレルギー科	56(1)	44-50	2011

---

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金  
難 治 性 疾 患 克 服 研 究 事 業  
「原因不明の慢性好酸球性肺炎の病態解明、新規治療法、およびガイドライン作成に関する研究」  
研 究 報 告 書

2012 年 3 月 31 日発行

発行者 独立行政法人国立病院機構相模原病院 谷口正実

〒252-0392 神奈川県相模原市南区桜台 18-1

---

