厚生労働科学研究費補助金
（難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野））
分担研究報告書

発生工学を用いたアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明

研究分担者　長　瀬　隆　英　東京大学大学院医学系研究科呼吸器内科学　教授
研究協力者　石　井　　　聡　秋田大学大学院医学系研究科　教授

研究要旨：
NSAIDs 不耐症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息、特にアスピリン喘息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。また、アスピリン喘息については、国内外において動物モデルが報告されていない。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が、気管支喘息の発症分子機序の解明についても実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、喘息モデルを用いてアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指した。今後、遺伝子改変マウスを活用することにより、さらに各々の遺伝子・蛋白系の病態生理学的意義・重要性が解明され、NSAIDs 不耐症・気管支喘息・アスピリン喘息治療への貢献が期待される。

A．研究目的

NSAIDs 不耐症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息の病態的・生理学的特徴として、慢性的な気道炎症・気道過敏性・可逆的な気流制限が挙げられる。気道過敏性の機序はこれまで不明の部分が多かったが、喘息特有の気道炎症に起因していることが明らかになってきた。気道炎症の機序は、炎症細胞と気道構成細胞が放出する炎症メディエーター・サイトカインなどの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ている。しかしながら、気管支喘息、特にアスピリン喘息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。また、アスピリン喘息については、世界的にも動物モデルが報告されていない。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。気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、アスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指す。

B．研究方法

本研究では、本研究者らが独自に開発した遺伝子改変マウスを使用する。$LTC_4/D_4/E_4$ など cysteinyl LT は、気管支喘息における主要な炎症メディエーターであり、アスピリン喘息発症に大きく関わることが想定される。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 を標的としたノックアウトマウスの新規作成に着手する。このような遺伝子改変マウスを用いて、脂質性メディエータ

ーと気管支喘息（特にアスピリン喘息）との関連について評価・検討を加える。

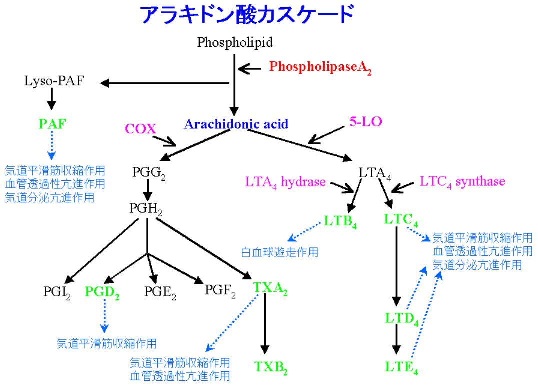

図１　アラキドン酸カスケードの模式図

（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

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。

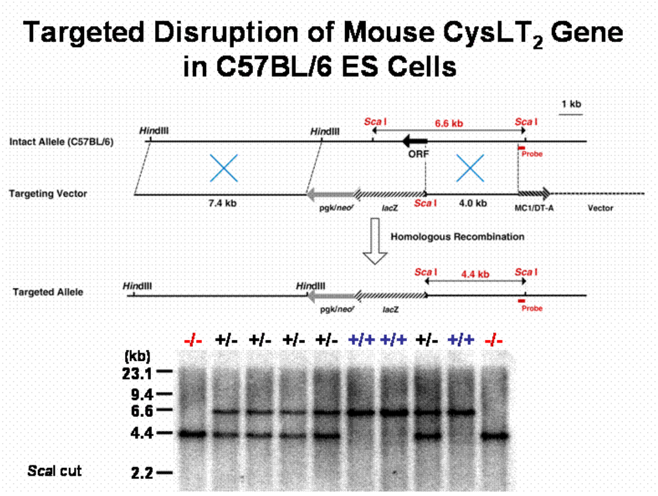

図２　CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。CysLT2-R ノックアウトマウスでは胎生致死が認められず、ホモ接合体の生存個体が得られた。また、外表所見上の著明な異常は認められず、発育・成長・生殖も正常と考えられた。また、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析により、LTB4 受容体と cysteinyl LT 受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

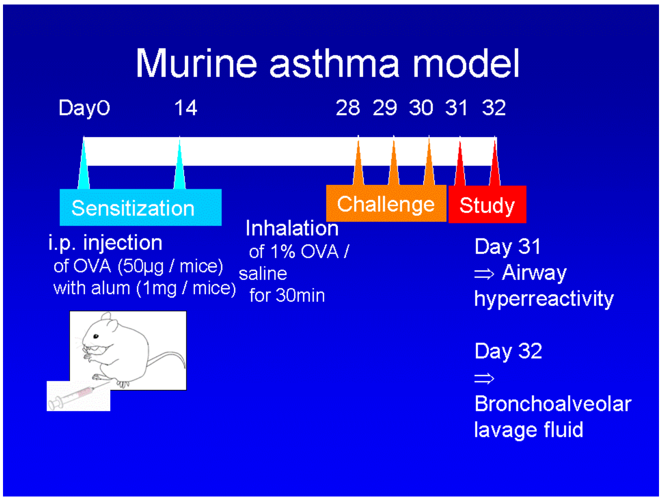

図３　アレルギー性気管支喘息モデルの作成

D．考察

気管支喘息、特にアスピリン喘息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。気管支喘息は、気道炎症を病態の特徴としており、その発症には多数の生理活性物質の関与が想定される。特に CysLT2 受容体は、肺・気管支に多量に存在することが示唆されているが、その機能はほとんど解明がなされていない。今回 CysLT2-R ノックアウトマウスのホモ接合体が得られたことにより、気管支喘息（特にアスピリン喘息）における気道過敏性・末梢気道炎症への関与を検証することが可能となった。気管支喘息・アスピリン喘息に関わる候補物質・遺伝子を評価する手段として、分子生物学・発生工学を駆使したトランスレーショナル・リサーチによる研究アプローチが有用と思われる。今後、さらに各々の遺伝子・蛋白系の生理的意義・重要性が解明されることにより、気管支喘息・アスピリン喘息に対する有効な治療法・管理法の開発および実用化が期待される。

E．結論

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成され、CysLT2 とアスピリン喘息との関連について評価・検討を行うことが可能となった。また、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析により、LTB_4 受容体と cysteinyl LT 受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

1) Saito A, Suzuki HI, Horie M, Ohshima M, Morishita Y, Abiko Y, Nagase T. An integrated expression profiling reveals target genes of TGF-β and TNF-α possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. PLoS One 2013; 8: e56587.

2) Noguchi S, Hijikata M, Hamano E, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Nagase T, Keicho N. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. Immunogenetics 2013; 65: 107-114

3) Noguchi S, Hamano E, Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Nagase T, Keicho N. Differential effects of a common splice site polymorphism on the generation of OAS1 variants in human bronchial epithelial cells. Hum Immunol 2013; 74: 395-401.

4) Narumoto O, Niikura Y, Ishii S, Morihara H, Okashiro S, Nakahari T, Nakano T, Matsumura H, Shimamoto C, Moriwaki Y, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N. Effect of secreted lymphocyte antigen - 6 / urokinase - type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1) on airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2013 ; 438: 175-179.

5) Mikami Y, Yamauchi Y, Horie M, Kase M, Jo T, Takizawa H, Kohyama T, Nagase T. Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces epithelial–mesenchymal transition in A549 human alveolar epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2012; 428: 451-457.

6) Yamauchi Y, Kohyama T, Jo T, Nagase T.

Dynamic change in respiratory resistance during inspiratory and expiratory phases of tidal breathing in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2012; 7: 259-269.

7) Narumoto O, Matsuo Y, Sakaguchi M, Shoji S, Yamashita N, Schubert D, Abe K, Horiguchi K, Nagase T, Yamashita N. Suppressive effects of a pyrazole derivative of curcumin on airway inflammation and remodeling. Exp Mol Pathol 2012; 93: 18-25.

8) Kawakami M, Narumoto O, Matsuo Y, Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, Sakaguchi M, Lipp M, Nagase T, Yamashita N. The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure. Cell Immunol 2012; 275: 24-32.

9) Kage H, Sugimoto K, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Suppression of transforming growth factor β1 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.

10)Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T. Simultaneous stimulation with TGF-β1-and TNF-αinduces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. Int Arch Allergy Imminol 2011; 155: 119-128.

２．学会発表

1) Cellular and molecular mechanisms of epithelial mesenchymal transition in airway epithelial cells under airway inflammation. The 18th APSR Meeting, Yokohama. (**発表者：山内康宏、招待講演**), 2013.

2) Cellular and molecular models of lung diseases. The 17th APSR Meeting, Hongkong. (**発表者：長瀬隆英、招待講演**), 2012.

3) Molecular mechanisms underlying respiratory diseases. The 16th APSR Meeting, Shanghai. (**発表者：長瀬隆英、招待講演**), 2011.

4) **モデルマウスを用いた呼吸器疾患の病態解明：第 53 回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、教育講演**), 2013.

5) **高齢者の慢性閉塞性肺疾患の管理：第 54 回日本老年医学会総会（発表者：長瀬隆英、教育講演**), 2012.

6) **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）

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

なし