

外部環境因子により発症する慢性閉塞性肺疾患の分子解析
The molecular analysis for environmental
factors-induced chronic obstructive pulmonary disease.

研究代表者

千葉大学 大学院医学研究院 助教授 粕谷善俊

Chiba University, Graduate School of Medicine
Associate Professor Yoshitoshi Kasuya

研究協力者 筑波大学 動物資源センター 助教授 杉山文博
理化学研究所 研究員 須藤龍彦
千葉大学 大学院医学研究院 教授 桑木共之
千葉大学 大学院医学研究院 助手 古屋充子

要旨： 肺気腫および慢性気管支炎の総称である慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、喫煙・大気汚染・職業的な塵埃や化学物質が発症原因として考えられ、気管支・細気管支と肺胞に炎症性の病変が生じ、慢性的な呼吸困難を起こす病気である。最近の WHO の統計では世界の死亡原因の第 4 位にランクされ、日本においても約 530 万人の患者がいると推定されている。その発症機構は不明な点が多く、現時点では有効な治療法も存在せず、COPD の発症機構の分子レベルでの解明および治療法の開発は、社会的な急務と位置づけられている。

本研究は、遺伝子改変により COPD の症状を呈するモデルマウスを樹立し、その発症機構を分子レベルで解明するとともに有効な治療法を開発することを目的とする。

Abstract: COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) is lung disease associated with airflow obstruction, including emphysema, chronic bronchitis and chronic asthma either alone or in combinations. The main cause of COPD is cigarette smoke, but air pollution by diesel particle matter is also one of reason for causing COPD. Worldwide, WHO reports that COPD is the fourth leading cause of death. It is estimated that there are currently over 5 million people in Japan diagnosed with COPD. The precise mechanism of COPD is still poorly understood. However, tissue inflammation is noted throughout the bronchial tree and in the parenchyma of lungs from patients with COPD, suggesting that inflammation is at least critical in progression of COPD. This notion was supported by the fact that the overexpression of proinflammatory cytokine in lung causes a mouse phenotype with emphysema.

We and other investigators have demonstrated that p38 mitogen-activated protein kinase (p38) plays a central role in process of tissue inflammation by regulating proinflammatory cytokines

production. We hypothesized that p38 constitutively activated in lung leads COPD secondary to inflammation. To address this hypothesis, we used a site-specific overexpression transgenic modeling system to target p38 to the murine lung. Our preliminary data clearly demonstrated that activated p38 causes alveolar enlargement, one of characteristic features of COPD. By using this mice model, we elucidate the molecular mechanism of COPD and develop the effective treatment for COPD.

1. 研究目的

第一の達成目標：肺胞特異的に p38 の常時活性上昇を促したトランスジェニックマウス (TG) を作出し、COPD の所見を呈するか否か？ また、肺胞特異的に p38 の常時活性低下を促した TG も同時に作出し、両者をかけ合わせることで COPD が抑えられるかを検討し、これまで全く示されていない COPD 発症への p38 の関与を直接証明することである。

第二の達成目標：この COPD モデルマウスを用いて、分子基盤に根ざしたアプローチで COPD の有効な治療法に切り込んでいく。具体的には、COPD を発症するに至る過程で、免疫・炎症作用を司る蛋白分子群の遺伝子発現変化および蛋白発現変化を網羅的に解析し、COPD 発症関与因子を絞り込んでいく。その情報をもとに、COPD の治療法・予防法の確立を目指す。

2. 研究経過

(1) 2系統の TG の作出

① MKK6-c. a. (p38 の活性亢進を促す変異体遺伝子：p38 を特異的に活性化するリン酸化酵素である MKK6 を点変異により常時活性型としたもの) の N 末に HA-tag を配したコンストラクトを作製した。② p38-d. n. (p38 の活性阻害を促す変異体遺伝子：p38 自身を点変

異により常時不活性型としたもの) の N 末に M2-tag を配したコンストラクトを作製した。これら 2 つの遺伝子をそれぞれヒト・サーファクタント蛋白 (SP)-C プロモーターの下流に配したトランスジーンを作製し Black6J マウス由来の受精卵に導入した。SP-C プロモーターは、それぞれの遺伝子の肺胞 (肺胞 II 型上皮細胞) 特異的発現を可能にする。

誕生したマウスの遺伝子解析から、MKK6-c. a. /TG は 1 2 ライン、p38-d. n. /TG は 2 ラインの Founder マウスを得た。Mating により F1 マウスを得て、解析に用いた。Mating を経て、MKK6-c. a. /TG は 5 ラインに減じ、p38-d. n. /TG は 2 ラインを維持した。

抗 Tag 抗体および肺胞 II 型上皮細胞のマーカー蛋白：サーファクタント蛋白 (SP-B) に対する抗体を用いて、トランスジーン of 肺胞特異的な発現を確認した (図 1)。

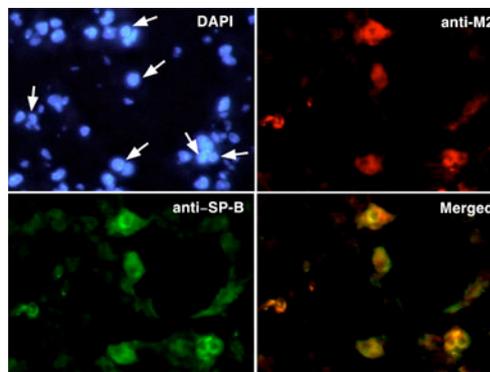


図 1 : p38-d. n. /TG の結果を例として示す

(MKK6-c. a. /TG においても同様の結果を得た)

(2) MKK6-c. a. /TG の解析

得られた 5 ラインの MKK6-c. a. /TG のうち、サザンブロットにより、導入トランスジーン の頻度により、低コピー数：1 ライン、中等度コピー数：3 ラインおよび高コピー数：1 ラインと群分けし、高コピー数 (line -4) を病理解析に用いた。

生後 3 ヶ月後の肺所見を示す (図 2)。

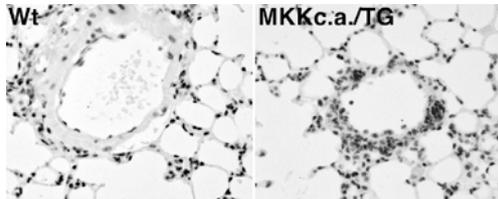


図 2 : MKK6-c. a. /TG において、血管周囲への白血球の浸潤という炎症所見が見られた

生後 8 ヶ月後の肺所見を示す (図 3)。

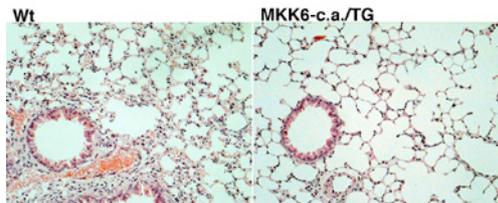


図 3 : MKK6-c. a. /TG において、肺胞の破壊消失と気腔の拡大が認められた

以上の結果により、MKK6-c. a. /TG (line -4) の肺において、炎症反応に続く COPD の典型的な病態的指標である肺胞の破壊消失と気腔の拡大が認められた。したがって、肺胞特異的な p38 の活性化は COPD 発症に密接に関わることが示唆された。

そこで、COPD の発症頻度、重症度、発症までの時間とトランスジーンコピー数の相関関係を検討すべく、系統維持を行っていたが、低コピー数 (line-3) を除き、中等度コピー数 (line-1, -2 & -5) および line-4 は F4 に至るまでに淘汰され、Wt のみが誕生する現象

に陥った。

この現象の正確な理由はつかめていないが、これと、並行して受精卵への MKK6-c. a. トランスジーン導入を、1 クール 150 個前後の受精卵を用い 3 クール行なったが、新たに、MKK6-c. a. /TG を得ることは出来なかった。

また、低コピー数 MKK6-c. a. /TG (line-3) においては、1 2 ヶ月を経過しても、肺に COPD 様の所見は認められなかった。ただし、LPS (リポポリサッカライド) およびブレオマイシンの負荷をかけた際に、Wt に比べて、血管周囲での急峻かつ激しい白血球の浸潤が認められた。このことは、肺胞特異的な p38 の活性化は、炎症誘導に対する感受性の増加を促すことを示唆した。

MKK6-c. a. を常時高頻度に発現させた TG では、系統維持の問題点を有することが明らかになったので、現在、新たに Tet-ON システムを用いた誘導型 TG マウスの作出をすべく、すでに必要となる 2 つのコンストラクトの作製を終え、細胞発現実験でその機能連関を確認中である。

(3) p38-d. n. /TG の解析

p38-d. n. /TG に関しては、当初得られた 2 ラインに加え、引き続き行なった受精卵への p38-d. n. トランスジーン導入で、新たな 3 ラインを得、5 ラインの系統維持をしている。各々のラインのコピー数は 2-4 であった。

p38-d. n. /TG は MKK6-c. a. /TG の COPD 発症へのカウンターエフェクトを 1 つの目的として作出したが、それ自身、炎症性肺疾患の解析に有用であると考え、p38-d. n. /TG を用いて、抗癌剤であるブレオマイシンの主要な副

作用である間質性肺炎／肺線維症への p38 の関与を検討した。また、我々が系統維持している p38 α KO マウスも解析に供した。

経気管的にブレオマイシンを Wt、p38-d. n. TG、p38 α KO マウスに投与し、対照群には生理食塩水を投与した。2週間後、静止時肺コンプライアンスを測定したところ、図4の結果となった。図中の dn は p38-d. n. TG を、KO は p38 α KO を、また、-s および -b はそれぞれ、生理食塩水投与群とブレオマイシン投与群を示している。Wt のブレオマイシン投与群のみに、コンプライアンスの有意な低下が見られ、p38 α KO、p38-d. n. TG では、ブレオマイシン投与群においてもコンプライアンスの低下は見られなかった。

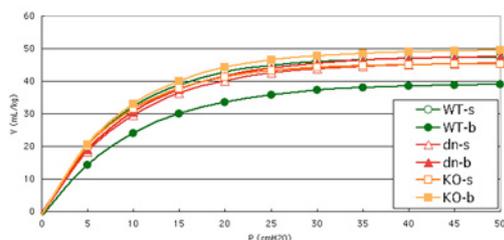


図4：マウス肺の静的コンプライアンス

以上の結果から、ブレオマイシン誘発性の間質性肺炎の発症に、p38 が関与することが示唆された。特に、TG マウスを用いた結果から、肺胞 II 型上皮細胞の p38 活性が間質性肺炎の発症に関与することが明らかとなった。また、現在解析中の組織所見において、Wt のブレオマイシン投与群で見られた肺線維化が、p38 α KO、p38-d. n. TG では抑えられていることを確認している。また、コラーゲン蓄積の指標となるヒドロキシプロリンの肺含有量も、Wt のブレオマイシン投与群では上昇していたものの、p38 α KO、p38-d. n. TG ではその上昇

が抑えられていた。したがって、間質性肺炎／肺線維症の発症に p38 は深く関与するとともに、p38 をターゲットとした治療ストラテジー開発の有用性を示唆した。

3. 研究成果

本研究から、肺胞内における p38 の活性化が COPD や間質性肺炎などの深刻な肺疾患と密接に関わることを、個体レベルで証明することができた。

4. 今後の課題と発展

当初、想定した申請者の仮説は正しいことが明らかとなり、第一の達成目標の一部はクリア出来た。しかし、研究の社会還元という見地に立つと、第二の達成目標がより重要であると考えられる。現在、作出に向けて準備している誘導型の MKK6-c. a. /TG の開発により、その目標に迫れると期待している。

5. 発表論文リスト

The involvement of p38 α mitogen-activated protein kinase in lung metastasis of tumor cells. Yuji Matsuo, Shinya Amano, Mitsuko Furuya, Kanako Sakurai, Mariko Nishiyama, Kana Namiki, Tatsuhiko Sudo, Koichiro Tatsumi, Takayuki Kuriyama, Sadao Kimura, and Yoshitoshi Kasuya. Submitted

(本研究とは直接関係しないが、謝辞に助成を記載)