

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09236

研究課題名(和文) NOS完全欠損マウスを用いたCOPD・喘息の病態と増悪におけるNOの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of nitric oxide in the pathogenesis and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma using nitric oxide synthase deficient mice

研究代表者

矢寺 和博 (YATERA, Kazuhiro)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40341515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、NO合成酵素(NOS)完全欠失マウスを用いて検討を行った。まず、オovalbuminを用いて気管支喘息マウスモデルを作成した。その結果、NOS完全欠失マウスでは、好酸球性炎症や気管支壁肥厚、ムチン産生が減少すること、また、肺組織中のIL-4、IL-5、IL-13といったTh2サイトカインが減少することを明らかにした。次に、豚膵エラスターゼを用いて慢性閉塞性肺疾患マウスモデルを作成した。その結果、NOS完全欠失マウスでは、肺泡間隔壁距離の有意な増大、また、炎症細胞の増加が認められた。このように、NOは気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患の病態に深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied using nitric oxide synthase (NOS) completely deficient mice. First, bronchial asthma mouse model was prepared using ovalbumin. As a result, eosinophilic inflammation, bronchial wall thickening, mucin production decreased in NOS completely deficient mice, and Th2 cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13 in the lung tissue decreased. Next, chronic obstructive pulmonary disease mouse model was prepared using pig pancreatic elastase. As a result, a significant increase of alveolar bulkhead distance and an increase of inflammatory cells were observed in NOS completely deficient mice. Thus, we suggest that NO is deeply involved in the pathology of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

研究分野：呼吸器内科学、アレルギー、間質性肺炎

キーワード：一酸化窒素 一酸化窒素合成酵素 気管支喘息 慢性閉塞性疾患 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は全身の生命現象に深く関与していることがこれまでに明らかにされている。

NOは、3種類のアイソフォームで構成される一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 合成酵素 (NO synthase: NOS); 誘導型 (inducible NOS; iNOS)、神経型 (neuronal NOS; nNOS)、内皮型 (endothelial NOS; eNOS) によって誘導される物質である。これまでに、iNOS、eNOS、nNOS シングルノックアウトや i/e、i/n、e/nNOS ダブルノックアウトマウス、また、非選択的・選択的NOS阻害剤を用いたさまざまな検討がなされてきたが、ノックアウトマウスでは残ったNOSがNOの産生を補填することや、NOS阻害剤の不確実な作用により結果がばらつき、本来のNOやNOSの生体内での意義が分かりづらいことが問題であった。このため、研究協力者の筒井らは、NOSシステムに由来するNOの本質的な役割を解明するために、これらの3つの個々のNOSアイソフォームのシングルノックアウトや2つの組み合わせのダブルノックアウトマウスに加え、すべてのNOSをノックアウトしたNOS完全欠損マウス(トリプル n/i/eNOS ノックアウトマウス)を2005年に世界に先駆けて創出し発表した。

このNOS完全欠損マウスの最も大きな意義は、生体内のNO産生が99%まで抑制されることにより、NO自体の生体内での本来の働きが解明できる点である。

これまでに、このNOS完全欠損マウスは心筋梗塞、脂質代謝異常などの主に循環器系におけるNOの役割の解析を中心とした研究に用いられ、NOS完全欠損マウスでのみ高脂血症の増悪 (Yatera Y, et al. Cardiovasc Res: 87; 675-682, 2010)、動脈硬化の増悪 (Furuno Y, et al. Nitric Oxide: 25; 350-359, 2011) が招来されることが報告されている。また、呼吸器疾患においても、NOS完全欠損マウスでは肺の線維化の増悪がみられ、NO自体は保護

的に作用することを明らかにしている

(Noguchi S, et al. Respir Res, 2014)。

このように、NOS完全欠損マウスを用いた研究により、呼吸器領域においても、NOやNOSが呼吸器疾患の病態生理に深く関与している可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では、慢性呼吸器疾患である気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、近年注目されているACO (Asthma and COPD overlap)、気腫性病変と線維化病変が混在 (上肺野に気腫性病変と下肺野に線維化病変が混在) するCPFE (combined pulmonary fibrosis and emphysema)、終末細気管支より末梢の気腔拡大の病態に線維化を合併した AEF (airspace enlargement with fibrosis) などの疾患についてのNOの役割について明らかにする。NOの役割を明らかにするため、合計7種類の i、e、nNOS シングルノックアウトや i/e、i/n、e/nNOS ダブルノックアウトおよびNOS完全欠損マウスを用い、ovalbumin 投与による気管支喘息モデル、および、豚膀胱エラスターゼ投与によるCOPDモデルの作成などを行い、各種呼吸器疾患の機序におけるNOやNOSの役割を明らかにする。また、COPDで注目されるCPFEやAEFと呼ばれる病態の疾患モデルに対しても、胞隔炎や肺線維化、気腫性変化、気道病変などの病態におけるNOおよびNOSの役割を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) Ovalbumin 投与による気管支喘息モデルにおける肺および気道炎症の評価

野生型 (C57/BL6) マウス、iNOS、eNOS、nNOS シングル NOS ノックアウトマウス、トリプル NOS ノックアウトマウスに ovalbumin (OVA) 20 µg を 1 日目及び 14 日目に腹腔内投与して感作させ、26、27、28 日目に 1%OVA 吸入曝露を行い喘息モデ

ルを作成し、30 日目に肺や気道の病理学的な検討および各種サイトカイン、ケモカインの発現の検討を行う。

### (2) 豚膀胱エラストラーゼ投与による気腫性病变 (COPD) の病態における評価

野生型 (C57/BL6) マウス、iNOS、eNOS、nNOS シングル NOS ノックアウトマウス、NOS 完全欠損マウスに豚膀胱エラストラーゼを経気管的に肺内に注入し、投与 21 日目に気腫性変化の評価を行う。

### (3) NO 欠損に伴うマクロファージの評価

野生型 (C57/BL6) マウス、iNOS、eNOS、nNOS シングル NOS ノックアウトマウス、NOS 完全欠損マウスに対して、各種刺激をした後に、CD11c、CD206 をそれぞれ M1/M2 マクロファージのマーカーとし、摘出肺に対して各種免疫染色を行う。また、flow cytometry (Sony EC800) によりマクロファージのサブタイプの分離を行い、2 群間の差異の評価を行う。

## 4. 研究成果

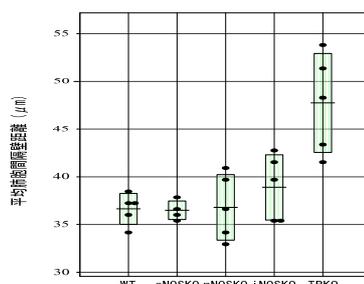
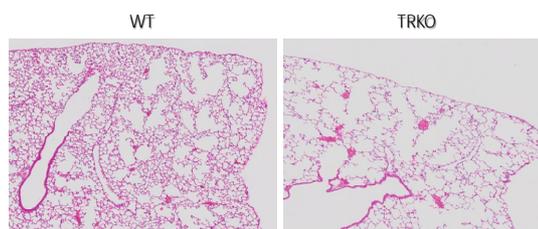
### 気管支喘息における評価

気管支喘息と NO の関係については、好酸球性気道炎症の指標として主に iNOS 由来の呼気 NO が測定可能となっている。喘息の形成において、野生型マウスと比較して、NOS 完全欠損マウスでは、気道上皮細胞、特に杯細胞における気道分泌の軽減や気道の好酸球を主体とした炎症細胞浸潤、気管支壁肥厚、気道リモデリングの軽減を認めた。これまでに、NO 自体の肺や気道の病態における役割については十分に解明されていなかったが、NOS 完全欠損マウスを用いることにより、NO 自体が気管支喘息の形成において重要な役割を果たすことが示唆された (Akata K, et al. Lung 194: 121-4, 2016)。

### 気腫性変化の病態における NO の評価

トリプル NOS ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、肺胞間隔壁距離の有

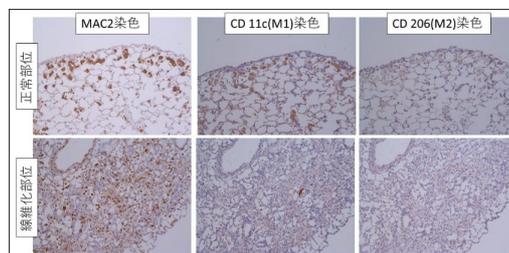
意な増大、および、炎症細胞の増加が認められた。また、各シングル NOS ノックアウトマウスとの比較においても、同様の所見が得られた。(下図およびグラフ参照)



また、NOS 完全欠損マウスにおける気腫性変化の悪化が NO 欠損による悪化であることを明らかにするために、無機 NO による NO 補充療法を行ったところ、無機 NO 補充により気腫性変化の改善傾向をきたすことが示唆された。現在、引き続き NO による気腫化の進展機序の解明を行っている。

### M1/M2 マクロファージの関係

予備実験として、プレオマイシン投与肺線維症モデル肺におけるマクロファージのサブタイプの評価を行った。肺線維化部位において、M2 マクロファージ (CD206 染色) が多く集簇していることが確認されており、肺線維化において、M2 マクロファージが関与していることが確認された。(下図参照)



この結果をもとに、気管支喘息、COPD モデルにおける、M1/M2 マクロファージの役割についても現在引き続き検討を行っている。

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Ogoshi T, Yatera K (16名中15番目), et al. Protective role of myelocytic nitric oxide synthases against hypoxic pulmonary hypertension in mice. Am J Respir Crit Care Med. 2018(Epub ahead of print) (査読あり)
2. 野口真吾, 矢寺和博. 肺の線維化における一酸化窒素合成酵素システムの意義. Bio Clinica 慢性炎症と疾患 呼吸器疾患と慢性炎症. 6(1): 38-42, 2017 (査読なし)
3. Akata K, Yatera K (12名中2番目), et al. Decreased bronchial eosinophilic inflammation and mucus hypersecretion in asthmatic mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. Lung. 194(1):121-4, 2016 (査読あり)
4. 筒井正人, 矢寺和博 (6名中3番目), 他. 一酸化窒素合成酵素の多様な役割. 血管. 39(3):81-91, 2016 (査読なし)

〔学会発表〕(計5件)

1. 生越貴明, 矢寺和博, 他. 次世代シーケンサーを用いた低酸素性肺高血圧症における骨髄由来一酸化窒素合成酵素の役割の検討. 第57回日本呼吸器学会学術集会(2017.4.21-23, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区)
2. 野口真吾, 矢寺和博, 他. NO合成酵素完全欠失マウスを用いたブレオマイシン肺線維化モデルにおけるNOの役割の検討. 第46回日本心臓血管作動物質学会(2017.2.10-11, 琉球大学医学部 臨床講義棟, 沖縄県)
3. 赤田憲太郎, 矢寺和博, 他. NOS完全欠損マウスを用いたマウス喘息モデルにおけるNOの気道好酸球性炎症における役割の検討. 第46回日本心臓血管作動物

質学会(2017.2.10-11, 琉球大学医学部 臨床講義棟, 沖縄県)

4. 城戸貴志, 矢寺和博, 他. 繊毛運動におけるNO/NOSsの役割の検討. 第46回日本心臓血管作動物質学会(2017.2.10-11, 琉球大学医学部 臨床講義棟, 沖縄県)
5. 生越貴明, 矢寺和博, 他. NO合成酵素完全欠損マウスを用いた低酸素性肺高血圧におけるNOの役割の検討. 第56回日本呼吸器学会学術集会(2016.4.8-10, 国立京都国際会館, 京都市左京区)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢寺 和博 (YATERA, Kazuhiro)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40341515