

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19460

研究課題名(和文) ナトリウムリン酸共輸送体(Npt2b)欠損マウスを用いた肺胞微石症の病態解析

研究課題名(英文) Development of treatment strategies for Pulmonary Alveolar Microlithiasis using an animal model

研究代表者

齋藤 充史 (Saito, Atsushi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00768939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺胞微石症には有効な治療法がなく、本研究では動物モデルを用いて病態解析と治療法の検討をおこなった。容量効果・副作用解析では30-50%程度のリン低減食で有効であることを証明し、懸念された骨量低下も認めなかった。依然課題は多いものの、肺胞微石症治療として低リン食、リン酸吸着剤治療が有効であることが明らかとなった。

また同疾患の基礎的病態を理解するために、3D顕微鏡を用いて肺胞マクロファージ内に微石が存在し貪食していることを明らかにした。さらに同時に肺胞腔内に貯留する肺サーファクタント脂質の成分についても解析を追加した。今後は、肺胞マクロファージをターゲットとした新規治療法の開発も目指したい。

研究成果の概要(英文)：There was no effective treatment for alveolar microlithiasis. So we tried to developing the treatment strategies using our animal model in this research. LPD prevents progressive microlith accumulation in young Npt2b^{-/-} mice and reverses stone burden in Npt2b^{-/-} mice. On the other hands, there was a little side effect with this treatment. Additionally, Tomocube 3D microscope revealed that microlithes were present in alveolar macrophages from Npt2b^{-/-} mice. Alveolar macrophage seems to play an important role in the metabolism of calcium phosphate microlithes.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺胞微石症 動物モデル ナトリウムリン酸共輸送体 治療法開発 肺胞マクロファージ 肺サーファクタント

1. 研究開始当初の背景

肺胞微石症 (Pulmonary Alveolar Microlithiasis, PAM) は、1933 年 Puhr によって命名された希少疾患である。現在まで世界で 700 例、わが国では世界最多の 100 例以上が最近 50 年で報告されている。本症は b 型 (Npt2b) ナトリウムリン共輸送体遺伝子 (SLC34A2) の機能喪失による常染色体劣性遺伝疾患である。同胞発生が約半数で、男女差はない。臨床経過としては肺胞内に主としてリン酸カルシウムからなる微石が生じ、その後肺胞壁に炎症、線維化を伴い進行する。初期は無症状であるが、健診等の胸部 X 線写真で著明なびまん性陰影を発見される例が多い。呼吸機能は長期間保たれるが、中年以降徐々に呼吸不全となる。これまでビスフォスフォネート製剤であるエチドロネートが肺胞微石症を改善すると報告が散見されるが (Cakir E et al, Respiration, 2015 他)、申請者が作製したモデルマウスを用いた検討では、耐容量上限を使用しても改善は認められなかった (未発表)。また、肺胞洗浄法の効果も限定的であると報告されている。したがって、在宅酸素療法・肺移植の対症療法しかないのが現状である。

2. 研究の目的

申請者は新たな発想に基づく治療法を開発するため、PAM のモデルマウスを作製して病態解析を行なった。その結果、低リン食治療や EDTA を用いた肺胞洗浄治療が進行抑制・病勢の改善に寄与することを明らかにした (Saito A, Sci Trans Med, 2015)。モデルマウスを用いた生体内解析では、Ca キレート剤である EDTA を使用した肺胞洗浄術で微石が有意に減少することが確認できた。しかし、この治療法は高濃度の EDTA、もしくは大量の洗浄液が必要であり臨床応用するには課題が多い。そこで、本申請研究では低リン食治療法に着目して研究を進めた。低リン食治療法のような、副作用の少ない新たな治療法の開発は最重要課題であり、本研究案はその先駆けになると考える。

3. 研究の方法

(1) マウスモデルの輸入

研究者が 2013 年から 2015 年にかけて米国シンシナティ大学在籍時に作製したマウスモデルを輸入した。それに先立ち関係機関と MTA を締結し、輸入に関する手続きをおこなった。

(2) 治療法の開発

食餌リン量と治療効果の関係、治療期間と治療効果の関係、骨粗鬆症を含めた他の副作用の検討を詳細に行ない、PAM に対する低リン食治療の有効性を示す検討をおこなった。

(3) 肺サーファクタントと肺胞マクロファージの解析

肺胞マクロファージの機能とリン、微石との関連性を解析するために、3D 顕微鏡を用いて検討をおこなった。同時に肺胞腔内に貯留する肺サーファクタント脂質の成分についても解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) マウスモデルの輸入

近年、実験動物の国内外への輸送は厳しく制限されている。輸入に関しては、輸入先との MTA 締結、感染症の検査、輸入手続き書類作成と輸送業者の選定、という手順が必要であったため、本計画は 2015 年度より開始していたが、非常に時間を要し、2017 年度に入ってようやく輸入が完了した。

輸入先との MTA 締結

シンシナティ大学との MTA については問題なく締結できた。ただし、本実験に用いた Flox マウスの一部については Sanofi 社が特許を持っていたため、Sanofi 社との 3 者の MTA が必要となった。本研究から今後得られる特許の帰属などでなかなか折り合いがつかず締結まで時間を要したが、最終的には妥協案がまとまり MTA 締結となった。

2017 年夏より札幌医科大学動物実験施設内で繁殖作業を開始した。学内での繁殖については問題なく経過している。

感染症の検査

カタルヘナ法に準拠した感染症項目、当大学 SPF 搬入のための感染症項目についてシンシナティ大学で検査をいただいた。当初の検査でパスツレラ菌が陽性との報告があった。そのため胚まで戻してクリーニングする作業が必要と考えられた。シンシナティ大学でのクリーニング作業は難しいとのことであったため、輸入後に三協ラボサービスのつくば研究所にマウスを搬送して、再度検査を施行し陽性であればクリーニング作業をすることとした。結果、輸入されたマウスについてはすべての項目で陰性、問題ないとのことで、クリーニング作業はおこなわず、当大学の SPF に搬入となった。

輸出入手続き書類作成と輸送業者の選定

輸出入に関連した書類については、シンシナティ大学と共同して記載をおこなった。輸送業者としてはワールド・クウリアーに依頼し問題なく輸入代行いただいた。

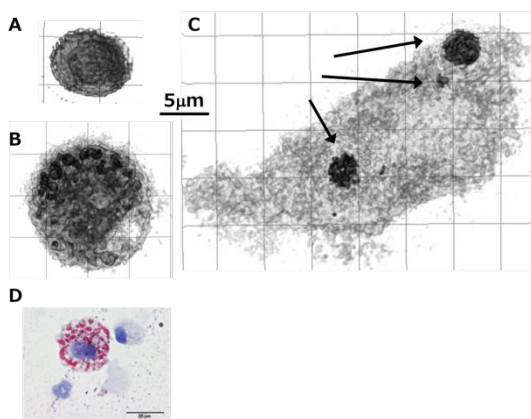
(2) 治療法の開発

リン摂取量がどの程度あれば副作用を生じず有効な効果を得られるかを確認することは今後臨床研究に応用するためには重要な情報であると考えられた。そのため以前に論文で報告したものと同様の方法にて容量効果とその際の副作用について解析した。マウスの餌において通常よりも 30-50%程度リン含有量を減らした低減食で一定の有効性が得られることがわかった。また懸念された骨量低下も認めなかった(未発表)。一方で、特に低齢マウスで体重減少などの所見が確認された。原因について文献的に検討すると、一般にリン摂取量はタンパク質摂取と相関することから栄養障害が原因ではないかと推測された。今後の臨床応用へ導くには食事に含まれるリン量を制限することだけに依存しない新たな視点の治療が求められることになる。解決策として、慢性腎不全時の高リン血症に適応のある炭酸ランタンなどのリン吸着剤の使用が、タンパク質を減らさずにリン摂取量を減らすことができる可能性があると考えて、さらに検討を進めている。

(3) 肺胞微石症における肺サーファクタント貯留と肺胞マクロファージの解析

肺胞マクロファージによる微石の貪食

肺胞マクロファージ内の微石を証明するために、これまでいくつかの方法で光学顕微鏡を用いて検討をおこなったが、マクロファージと微石が一致していても、それが重なって存在しているだけか、内部に存在するかの確認ができず、肺胞マクロファージが微石を貪食しているという証明はできていなかった。本研究では Tomocube 3D 顕微鏡を用い、3D で細胞を観察することで、肺胞微石症マウスの肺胞マクロファージ内に微石が存在することを明らかにした。

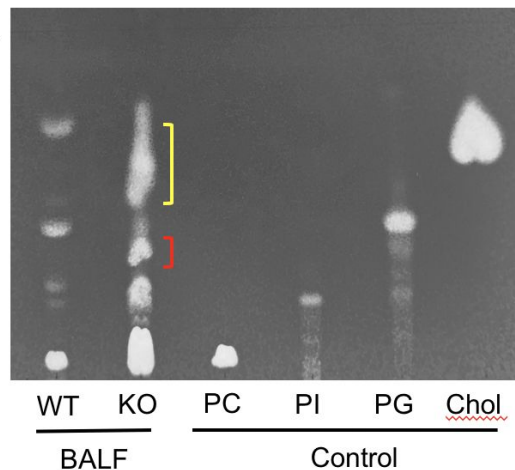


(A-C) 3D 顕微鏡(TomoCube®)を用いた肺胞マクロファージの 3D イメージ。(A) 微石、(B) 正常 および (C) Npt2b 欠損マウス由来の肺胞マクロファージ。3D にて微石がマクロファージ内に取り込まれていることが確認でき

る(矢印)。(C)では2倍ほどに巨大化し内部に特定の屈折率を示す構造物が貯留していたが、Oil red O 染色(D)にて赤色に染まり脂質の貯留と考えられた。微石の貪食により肺胞マクロファージが何らかの機能障害を呈し、巨大な泡沫化した細胞になったものと考えられる。

脂質解析

肺胞微石症では肺胞蛋白症類似の Phospholipidosis (肺サーファクタント脂質貯留)を肺胞腔内に認めることがわかっている。肺胞蛋白症は抗 GM-CSF 自己抗体による肺胞マクロファージの分化障害で肺胞腔内の肺サーファクタントが分解されずに貯留すると考えられている。前述の通り、肺胞微石症の病態では微細な微石を肺胞マクロファージが貪食している。別な検討で、微石は低 pH にて溶解する性質を持っていることから、マクロファージ内のファゴライソソームで分解されているのではないかと考えている。その際に何らかのマクロファージ機能異常を示すものと思われる。肺胞蛋白症では貯留脂質の解析も報告されているが、一部で脂質代謝にも異常があるとの文献も散見されるため、肺胞微石症モデルマウスでも検討することとした。



DPPC(Dipalmitoylphosphatidylcholine)、PI(Phosphatidylinositol)、PG(phosphatidylglycerol)などの肺サーファクタント貯留に加えて、より極性の低い Chol(Cholesterol)、TG(Triglyceride)などの脂質も蓄積していることがわかった。PGの極性変化(赤鉤括弧)や WT には認めないバンドを認めた(黄鉤括弧)。

今後は TOF-MS などの手法を用いて詳細な解析を検討している。これらの変化が肺胞マクロファージ異常に起因するのか、リン輸送障害に伴う肺における脂質メタボリズム異常なのかについてさらに解析を進めたい。

今後の展望

肺胞微石症の病態はこれまで症例数が非常に少ないことからほとんど理解されてこなかった。今回の検討で前回の論文にて課題になっていた部分についていくつかは明らかとなった。

今後は、さらに臨床応用にむけて「治療法の開発」と「肺胞微石症の基礎病態の解明」の2本立てで検討していく。臨床応用可能な低リン食・リン吸着剤治療を検討していくのに加え、微石という異物貪食を契機に肺胞マクロファージが機能障害を起こすメカニズムを解明したい。基礎的な病態を理解することで、肺胞微石症を詳細に明らかにできるだけでなく、肺胞マクロファージをターゲットとした新規治療法の開発という新しい研究シーズにつながることも期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Saito A, McCormack FX. Pulmonary Alveolar Microlithiasis. *Clinics in chest medicine* 2016; 37: 441-448

2. 齋藤 充史

形態・機能 肺胞微石症モデルマウス
分子呼吸器病 2017年3月号 (Vol.21 No.1)

3. Takahashi Y, Saito A, Chiba H, Kuronuma K, Ikeda K, Kobayashi T, Ariki S, Takahashi M, Sasaki Y, Takahashi H
Co-first, Corresponding Author
Impaired diversity of the lung microbiome predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis.
Respiratory Research 2018; 19(1):34

4. Gardner JC, Saito A et al. Keratinocyte growth factor supports pulmonary innate immune defense through maintenance of alveolar antimicrobial protein levels and macrophage function.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2016; 310(9): L868-79

5. Hashimoto J, Saito A et al. Surfactant Protein A Inhibits Growth and Adherence of Uropathogenic Escherichia coli to Protect the Bladder from Infection.
J Immunol 2017; 198: 2898-2905.

6. Nikolaidis NM, Saito A et al. Mitogenic stimulation accelerates influenza-induced mortality by increasing

susceptibility of alveolar type II cells to infection.

Proc Natl Acad Sci U S A 2017; 114: E6613-E6622.

7. Umeda Y, Saito A et al. Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR and affects clinical outcomes of patients.
Oncogene 2017; 1-14.

8. Ikeda K, Saito A et al. Serum surfactant protein D predicts the outcome of patients with idiopathic pulmonary fibrosis treated with pirfenidone.
Respiratory medicine 2017; 131: 184-191.

9. Uehara Y, Saito A et al. Surfactant protein A (SP-A) and SP-A-derived peptide attenuate chemotaxis of mast cells induced by human beta-defensin 3.
Biochem Biophys Res Commun 2017; 485(1): 107-112.

10. Takamiya R, Saito A et al. Disruption of the structural and functional features of surfactant protein A by acrolein in cigarette smoke.
Sci Rep 2017; 7: 8304.

11. Hasegawa Y, Saito A et al. Surfactant protein A downregulates epidermal growth factor receptor by mechanisms different from those of surfactant protein D.
J Biol Chem 2017; 292(45):18565-18576

12. 有木 茂, 齋藤 充史
肺サーファクタントタンパク質Aによるヒト-デフェンシン3の機能調節
札幌医科大学 医療人育成センター紀要 2017; 25-27

13. 長谷川 喜弘, 齋藤 充史 他
SP-Dによる変異型EGFR肺がんの制御機構
分子呼吸器病 2017; 21(1) 80-83

[学会発表](計 3 件)

1. 齋藤 充史
肺胞微石症の治療戦略
第53回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会 2017年10月 新潟

2. Uehara Y, Saito A et al. Preclinical Studies Reveal Low Phosphate Diet as a Potential Therapy for Pulmonary Alveolar Microlithiasis
米国胸部学会 2017 San Francisco, CA, USA

3. Uehara Y, Saito A et al.

Low Phosphate Diet Arrests and Reverses
Lung Injury in Mice with Pulmonary
Alveolar Microlithiasis
Rare Lung Diseases Research Conference
2016年9月 Cincinnati, OH, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 充史 (ATSUSHI SAITO)
札幌医科大学医学部・医化学講座・助教
研究者番号：00768939

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()