

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590529

研究課題名（和文） 炎症性肺疾患の発症分子機構の解明

研究課題名（英文） The study of molecular mechanism for inflammatory pulmonary disease

研究代表者

粕谷 善俊（KASUYA YOSHITOSHI）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70221877

研究成果の概要： mitogen-activated protein kinase (MAPK)の1つ、p38 は炎症反応の中心的役割を演じている。我々は、肺胞特異的に p38 の活性をコントロールしうる 2 系統の組織特異的トランスジェニック (TG) マウスを作出し、これらが、肺気腫や間質性肺炎といった炎症性肺疾患の発症分子機構の解明に有用であることを突き止めている。本研究では、(1) 肺胞特異的 p38 活性低下マウスで認められた、間質性肺炎誘導への抵抗性に関して、さらに検討を加えた。また、(2) 新たに、肺胞特異的に、かつ時期依存的に p38 の活性を上昇させ得る誘導型 TG マウスを作出することを試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：炎症性肺疾患、p38MAPK、肺胞 II 型上皮細胞、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

我々は、細胞外からの刺激を核内の転写機構制御にまで変換・伝達するリン酸化酵素群である mitogen-activated protein kinase (MAPK) の 1 つ、p38 が様々な病態に関与することを、p38 ノックアウトマウスを用いて証明してきた。p38 の持つ 1 つの大きな機能として、免疫・炎症作用を司る蛋白分子群ネットワークの産生制御の中心に位置することが明らかになってきている。この事実は、

p38 を標的組織特異的に常時活性化させる特殊な状況を作り出すことにより、炎症性疾患モデルマウスの作出が可能であることを想起させる。そして、モデルマウスを用いた疾患発症の分子基盤情報を、新たな治療法の確立にフィードバックすることが可能となる。

この戦略のもと、肺胞特異的に p38 を常時活性化させた、もしくは低下させたトランスジェニックマウスを作出した。p38 を常時活性化させたマウスに関しては、導入トラン

スジーンのコピー数が高い個体で、生後8ヶ月で慢性閉塞性肺疾患(COPD)である肺気腫様症状を呈することを突き止めた。しかしながら、第4世代に至るまでに、出産頻度の低下と、出産してもWtマウスのみが誕生する現象に陥り、結果として淘汰された。この現象の正確な科学的理由はつかめていないが、導入トランスジーンのコピー数が低い個体においては、12ヶ月を経過しても、肺気腫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)の負荷をかけた際に、Wtマウスに比べて、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の活性化が、少なくとも炎症誘導に対する感受性の増加を促すことを示唆した。

2. 研究の目的

上述の淘汰の問題点を解決すべく、肺胞特異的なp38の活性亢進を出生後の希望するタイミングでコントロール出来る誘導型トランスジェニック(TG)マウスの樹立を目指す。一方、すでに作出した肺胞特異的p38活性低下マウスでは、化学物質誘導性の間質性肺炎への抵抗性が認められたので、その分子機序を詳細に検討していく。

3. 研究の方法

(1) テトラサイクリン誘導性肺胞特異的p38活性亢進TGマウスの作出

(A) 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:N末にHA-Tagを付加している)遺伝子を、Tet受容体応答遺伝子(TRE)/CMVプロモーターのfuse遺伝子の下流に配したトランスジーンを導入したTGマウス(TRE-MKK6-c.a./TG)(B) Tet受容体遺伝子(TetR)とVP16のキメラ遺伝子を、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導入したTGマウス(SP-C-rtTA/TG)の作出を行う。誕生した両者をかけ合わせたダブルTGマウスにTet(実際に用いるのは、ドキシサイクリン:Dox)を溶解した飲水を与えることにより、肺胞特異的に、Dox濃度依存的にMKK6-c.a.トランスジーン発現量のコントロールが可能となるTet-ONシステム導入マウスの樹立を目指した。

(2) 間質性肺炎発症におけるp38の病態的機能の解析

ヒトSP-Cプロモーターの下流にp38-d.n.(p38の活性低下を促す変異体遺伝子:p38を点変異により常時不活性型としたもの:N末にM2-Tagを付加している)遺伝子を配し

たトランスジーンを導入したTGマウスを5ライン作出している(SP-C-p38d.n./TG)。このマウスにブレオマイシンを6mg/kg経気管支的に投与し、病理的所見、key moleculeの発現変化等、検討を加えた。

4. 研究成果

(1) テトラサイクリン誘導性肺胞特異的p38活性亢進TGマウスの作出

すでに5ラインのSP-C-rtTA/TGを得たが、200受精卵への遺伝子導入にも関わらずTRE-MKK6-c.a./TGは作出に至らなかった。その原因として、MKK6-c.a.遺伝子のleakageが発生段階に影響し胎生致死を促すことが想定された。そこで、この問題点を解決すべく、TRE-MKK6-c.a.遺伝子の受精卵への導入時にTREサイレンサー(tTS)遺伝子を共導入し、TREの自発的なバックグランド活性を抑制しMKK6-c.a.のleakageを阻害することを試みた(TRE-MKK6-c.a./tTS/TGの作出)。これにより、TRE-MKK6-c.a./tTS/TGを1ライン作出できた。しかし、このTGマウスとWtマウスをかけ合わせたところ、Wtマウスのみしか生まれてこなかった。この事実は、TRE-MKK6-c.a.とtTSのそれぞれのトランスジーンが対立遺伝子に導入された可能性を示唆した。そこでさらに、TRE-MKK6-c.a./tTS/TGの繁殖用にtTS/TGマウスを作出し、かけ合わせたところ、TGマウスの継代が可能となった。

以上の結果から、当初期待していた、ダブルTGマウスにDoxを与える系では不十分で、そこに、TREサイレンサーも導入したトリプルTGマウスがテトラサイクリン誘導性肺胞特異的p38活性亢進TGマウスの作成には必要であることが示された。今後、このTGマウスを用いて、肺気腫の成立メカニズムに迫っていきたい。ただし、確率的には低いもののトランスジーンintegration領域に依存してマウスの表現系に影響する可能性があるため、TRE-MKK6c.a./tTS/TGマウスのライン数を増やす必要がある。また、継代のためのかげ合わせが煩雑かつ維持マウス数も膨れ上がる現状は研究遂行上の律速段階となるため、TRE-MKK6-c.a.とtTSのそれぞれのトランスジーンが同ストランドに導入されたTRE-MKK6c.a./tTS/TGマウスのライン数を増やすべく、引き続き、マイクロインジェクションを行っている。

(2) 間質性肺炎発症におけるp38の病態的機能の解析

SP-C-p38d.n./TGにブレオマイシン(Bleo)を投与し、以下の項目の所見をWtマウスのそれと比較検討した。

体重変化と生存率

Wtマウスにおいては、PBS投与群でなんら変化は見られなかったが、Bleo投与群は投

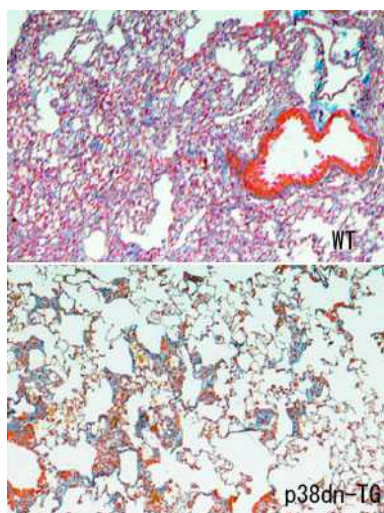
与2週後、55%の生存率を示し、生存個体の体重は40%低下していた。一方、Bleo投与後2週でのSP-C-p38d.n./TGの生存率および生存個体の体重低下は、それぞれ83%および33%であった。また、PBS投与群ではWtマウスと同じく変化は見られなかった。

Bleo投与後1週間の肺病理所見

Bleo投与後1週の肺所見は、Wtマウスでおびただしい血球浸潤が認められたものの、SP-C-p38d.n./TGでの浸潤はWtマウスに比べてmoderateであった。浸潤が顕著であった好中球の肺切片単位面積(0.08mm²)辺りの平均浸潤数を比較したところ、Wtマウスで9.3、SP-C-p38d.n./TGで2.9であった。

Bleo投与後2週間の肺病理所見

Bleo投与後2週の肺所見は、以下に示すように、Wtマウスでおびただしい線維化が認められ、進行した間質性肺炎症状を呈したが、SP-C-p38d.n./TGでは線維化は顕著でなく、肺胞構造も維持されていた。



Bleo投与後のサイトカインの経時的発現変化

Bleo投与後、3日、1,2週後の肺よりtotal RNAを抽出し、RT-PCRによりIL-1、TNF-、IL-17等の発現を観察した。血球細胞の浸潤が典型的に確認されるBleo投与後1週の肺で、サイトカインの発現上昇が認められ、Wtマウスに比べてSP-C-p38d.n./TGではその上昇が抑えられていた。特に、WtマウスとSP-C-p38d.n./TG間でのIL-17の発現上昇度の差が激しく、Th17細胞の積極的な関与が示唆された。現在、Bleo投与後3日の肺胞内洗浄液中のサイトカイン・ケモカイン類の炎症誘導介在因子の発現変化をウェスタンブロットアレイ解析によって網羅的に解析しており、間質性肺炎の新たな治療法につながる因子の同定も含めて検討している。

以上の結果から、間質性肺炎発症においてp38が積極的に関与することが明らかとなり、今後、p38に機能制御される関連分子を絞り込み、効率的かつ原因療法につながる創

薬の可能性を探っていきたい。

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 6件)

Miyamoto N, Namiki K, Tokuhara N, Uesugi M, Takahashi E, Kuromitsu J, Kasuya Y: The utilization of gene targeting models during in preclinical study of drug discovery process? -Example of phenotypic and functional analysis of Cacna1b gene product- *Curr Pharmaceut Biotech.*, 10, 261-267, 2009.

Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, Mukai H, Kasuya Y, Fukamizu A.: Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol. Cell*, 32, 221-231, 2008.

Asada S, Ikeda A, Nagao R, Hama H, Sudo T, Fukamizu A, Kasuya Y, Kishi T. Oxidative stress-induced ubiquitination of RCAN1 mediated by SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Int. J. Mol. Med.*, 22, 95-104, 2008.

Furuya M, Ishida J, Inaba S, Kasuya Y, Kimura S, Nemori R, Fukamizu A: Impaired Placental Neovascularization in Mice with Pregnancy-Associated Hypertension. *Laboratory Invest.*, 88, 416-429, 2008.

Hasegawa M, Furuya M, Kasuya Y, Nishiyama M, Sugiura T, Nikaido T, Momota Y, Ichinose M, Kimura S: The dynamics of CD151 might be crucial in carcinoma-stroma interaction by controlling integrins expression, adhesion strength and proteolytic activities. *Laboratory Invest.*, 87, 882-892, 2007.

Namiki K, Nakamura A, Furuya M, Mizuhashi S, Matsuo Y, Tokuhara N, Sudo T, Hama H, Kuwaki T, Yano S, Kimura S, Kasuya Y: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in kainate-induced seizure and neuronal cell damage. *J Recept. Signal Transduct.*, 27, 99-111, 2007.

[学会発表](計 6件)

並木香奈、徳原直紀、上杉麻依、須藤龍彦、高橋裕美、黒光淳郎、木村定雄、宮本憲優、粕谷善俊: EAEにおけるp38の役割、第82回日本薬理学会年会、2009年3月18日、横浜

高橋裕美、田中芳夫、木村定雄、小池勝夫、
粕谷善俊：未知のモルモット 1-adrenergic
receptor 遺伝子のクローニングとその機能
解析、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3
月 17 日、横浜

通川裕美、吉垣純子、粕谷善俊、田中芳夫、
小池勝夫：膀胱の進展に伴う上皮組織におけ
るクローニン-4 の局在変化、第 118 回薬理
学会関東部会、2008 年 6 月 7 日、東京

高橋裕美、田中芳夫、木村定雄、小池勝夫、
粕谷善俊：未知のモルモット 1-adrenergic
receptor 遺伝子のクローニングとその機能
解析、第 118 回薬理学会関東部会、2008 年 6
月 7 日、東京

通川裕美、吉垣純子、粕谷善俊、田中芳夫、
小池勝夫：膀胱上皮における ATP によるク
ローニン-4 の局在調節、第 82 回日本薬理学
会年会、2008 年 3 月 18 日、横浜

並木香奈、上杉麻依、高橋英機、徳原直紀、
黒光淳郎、木村定雄、宮本憲優、粕谷善俊：
神経細胞死における N 型-電位依存性カルシ
ウムチャンネルの役割：病態的関与、第 81 回
日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

研究代表者

粕谷 善俊 (KASUYA YOSHITOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70221877

連携研究者

木村 定雄 (KIMURA SADA O)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40134225

須藤 龍彦 (SUDO TATSUHIKO)

理化学研究所・抗生物質研究室・前任研究員

研究者番号：30260227

研究協力者

杉山 文博 (SUGIYAMA FUMIHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教
授

研究者番号：90226481