

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年～2008 年
 課題番号：19590877
 研究課題名（和文）マトリックスメタロプロテアーゼ誘導因子制御による難治性肺疾患への介入
 研究課題名（英文）Interventional approaches to chronic lung diseases by regulation of matrix metalloproteinases
 研究代表者
 別役 智子（BETSUYAKU TOMOKO）
 北海道大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：60333605

研究成果の概要：

本研究は Matrix metalloproteinases (MMPs) の発現を誘導する膜型糖蛋白 basigin/EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) という分子に注目し、肺における生理的役割、様々な病態における役割について明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：EMMPRIN, basigin, MMP, 上皮細胞, 再生

1. 研究開始当初の背景

Matrix metalloproteinases (MMPs) は肺における多くの炎症性疾患、特にリモデリングを伴う病態において重要な役割を果たしていることが知られ、近年注目を集めている。しかし、その活性調節は非常に複雑である。我々は、近年 MMP の発現を誘導する膜型糖蛋白 basigin/EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) という分子に注目し、肺における役割について研究を進めてきた。

2. 研究の目的

1) 気管支喘息と肺リンパ脈管筋腫症 (Lymphangiomyomatosis: LAM) という

二つの疾患に焦点をあて、臨床検体を用いて発現と臨床的指標との関連を明らかにし、basigin/EMMPRIN 遺伝子欠損マウスを用いてそれぞれの疾患モデルにおける MMPs の調節と、本分子抑制による治療介入の可能性を検討する。2) 基礎的研究として、増殖因子、ステロイド、また細胞外基質による basigin/EMMPRIN 発現の誘導、抑制、糖鎖修飾の機序の一旦を明らかにする。

3. 研究の方法

気管支喘息：当該施設外来通院中の安定期気管支喘息患者より喀痰を採取し、申請者が確立した ELISA 法を用いて喀痰中 basigin/EMMPRIN と各種の MMPs を定量し臨床

的パラメータと対比し検討を行う。basigin/EMMPRIN 遺伝子欠損マウスに OVA 誘発喘息モデルを作成し、肺 MMP の発現とその種類、炎症細胞浸潤、気道抵抗の変化、粘液産生細胞の頻度等の指標において、野生型とどのような差異があるかを検討する。

肺 リンパ 脈 管 筋 腫 症 (Lymphangiomyomatosis: LAM): 肺 LAM 結節性病変に basigin/EMMPRIN 蛋白、mRNA が存在し、気管支肺胞洗浄液中の basigin/EMMPRIN 濃度が高値であったという結果を踏まえ、LAM 患者の、血清中、尿中の basigin/EMMPRIN 濃度を測定し、病勢、治療法との関係を明らかにし、新たな疾患マーカーとしての可能性を検討する。また、海外研究協力者 J. M. Shipley が作成した TSC-1 遺伝子の平滑筋細胞特異的変異マウスの肺に LAM 様の病変があるか否かを検討し、basigin/EMMPRIN および、MMPs の発現の有無を検討する。

細胞外基質による上皮 basigin/EMMPRIN 発現、糖鎖修飾の調節: ラット気道上皮細胞を用いて基底膜構成成分の中の laminin を含む合成基底膜、変性した細胞外気質が上皮細胞の basigin/EMMPRIN の遺伝子発現、糖鎖修飾、MMPs 誘導能に及ぼす影響について検討する。

4. 研究成果

マウス喘息モデルでは、気道上皮、炎症細胞に basigin/EMMPRIN の誘導を認めたが、野生型と basigin/EMMPRIN 遺伝子欠損マウスの間には有意差を認めなかった。LAM における basigin/EMMPRIN の役割について、肺 LAM 結節性病変に basigin/EMMPRIN 蛋白、mRNA が存在することを確認し、LAM 患者の気管支肺胞洗浄液中、血清中、尿中の basigin/EMMPRIN 濃度が上昇していることを明らかにした。さらに腎血管筋脂肪腫細胞を培養し、EMMPRIN の siRNA を導入し、MMPs の発現が低下するか否かを検討した。細胞外基質による上皮 basigin/EMMPRIN 発現、糖鎖修飾の調節について、基底膜構成成分の中の laminin 1、laminin 1 を含む合成基底膜が basigin/EMMPRIN 発現を誘導することを、ラット気道上皮細胞を用いて明らかにした。さらに basigin/EMMPRIN の糖鎖修飾、MMPs 誘導能に及ぼす caveolin 蛋白が、ヒトの線維化肺、マウスブレオマイシン誘導性肺線維症において有意に低下していることを明らかにした。

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 15 件)

- 1) Manicone AM, Birkland TP, Lin M, Betsuyaku T, van Rooijen N, Lohi J, Keski-Oja J, Wang Y, Skerrett SJ, Parks WC.: "Epilysin (MMP-28) restrains early macrophage recruitment in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia", *J Immunol*, 182: 3866-3876 (2009), 査読: 有
- 2) Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Odajima N, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M.: "Curcumin attenuates elastase- and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice", *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296: 614-623 (2009), 査読: 有
- 3) Onodera J, Onodera S, Kondo E, Betsuyaku T, Yasuda K.: "A soluble factor (EMMPRIN) in exudate influences knee motion after total arthroplasty", *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 17: 298-304 (2009), 査読: 有
- 4) Hasegawa M, Makita H, Nasuhara Y, Nagai K, Ito Y, Odajima N, Betsuyaku T, Nishimura M.: "Relationship between improved airflow limitation and changes in airway caliber induced by inhaled anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease", *Thorax*, 64: 332-338 (2009), 査読: 有
- 5) Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M.: "Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM", *Respir Med*, 103: 124-129 (2009), 査読: 有
- 6) Ito Y, Betsuyaku T, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M.: "Aging affects lipopolysaccharide-induced upregulation of heme oxygenase-1 in the lungs and alveolar macrophages", *Biogerontology*, 10: 173-180 (2009), 査読: 有
- 7) Nagai K, Betsuyaku T, Konno S, Ito Y, Nasuhara Y, Hizawa N, Kondo T, Nishimura M.: "Diversity of protein carbonylation in allergic airway inflammation", *Free Radic Res*, 42: 921-929 (2008), 査読: 有
- 8) Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Nishimura M.: "Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39: 673-682 (2008),

- 査読:有
- 9) Adair-Kirk TL, Atkinson JJ, Griffin GL, Watson MA, Kelley DG, DeMello D, Senior RM, Betsuyaku T. :” Distal airways in mice exposed to cigarette smoke: Nrf2-regulated genes are increased in Clara cells” , Am J Respir Cell Mol Biol, 39:400-411 (2008), 査読:有
 - 10) Hizawa N, Makita H, Nasuhara Y, Hasegawa M, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Konno S, Nishimura M; Hokkaido COPD Cohort Study Group. :” Functional single nucleotide polymorphisms of the CCL5 gene and nonemphysematous phenotype in COPD patients” , Eur Respir J, 32:372-378 (2008) , 査読:有
 - 11) Hosokawa T, Betsuyaku T, Odajima N, Suzuki M, Mochitate K, Nasuhara Y, Nishimura M. :” Role of basement membrane in EMMPRIN/CD147 induction in rat tracheal epithelial cells” , Biochem Biophys Res Commun, 368: 426-432 (2008) , 査読:有
 - 12) Hakuma N, Betsuyaku T, Kinoshita I, Itoh T, Kaga K, Kondo S, Nishimura M, Dosaka-Akita H. :” High incidence of extracellular matrix metalloproteinase inducer expression in non-small cell lung cancers. Association with clinicopathological Parameters” , Oncology, 72: 197- 204 (2007) , 査読:有
 - 13) Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M. :” Loss of caveolin-1 in bronchiolization in lung fibrosis” , J Histochem Cytochem, 55:899-909 (2007) , 査読:有
 - 14) Hosokawa T, Betsuyaku T, Nishimura M, Furuyama A, Katagiri K, Mochitate K. :” Differentiation of tracheal basal cells to ciliated cells and tissue reconstruction on the synthesized basement membrane substratum in vitro” , Connect Tissue Res, 48:9-18 (2007) , 査読:有
 - 15) Reynolds SD, Shen H, Reynolds PR, Betsuyaku T, Pilewski JM, Gambelli F, Di Giuseppe M, Ortiz LA, Stripp BR. :” Molecular and functional properties of lung SP cells” , Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 292:L972-L983 (2007) , 査読:有

[学会発表] (計 32 件)

- 1) Suzuki M, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I,

- Adair-Kirk TL, Nguyet M. Nguyen, Senior RM, Nishimura M. : EMS10 - 2 Laminins $\alpha 5$ and $\gamma 2$ and VEGF are Down-regulated in Lung in Cigarette Smoke-exposed Mice and Emphysema Subjects, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008. 6. 16, 神戸:神戸コンベンションセンター
- 2) 長井 桂, 別役智子, 今野 哲, 伊藤洋子, 南須原康行, 檜澤伸之, 西村正治: アレルギー性気道炎症モデル及び喘息患者における気道被覆液中のカルボニル化蛋白の検討, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008. 6. 16, 神戸:神戸コンベンションセンター
- 3) 小田島奈央, 別役智子, 南須原康行, 西村正治: PP772 線維化肺における catalase 発現の検討, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008. 6. 16, 神戸:神戸コンベンションセンター
- 4) 長谷川 大, 南須原康行, 牧田比呂仁, 別役智子, 西村正治: COPD の気流制限に及ぼす 3 次元 CT 画像で評価した気腫病変と気道病変の関与, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008. 6. 16, 神戸:神戸コンベンションセンター
- 5) 守山千夏, 別役智子, 伊藤洋子, 南須原康行, 西村正治: MS255・PP695 単回喫煙暴露マウスモデルでの好中球性炎症および細気管支上皮のケモカイン産生におよぼす加齢の影響, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008. 6. 16, 神戸:神戸コンベンションセンター
- 6) 清水薫子, 南須原康行, 長谷川 大, 牧田比呂仁, 今野 哲, 別役智子, 西村正治: 臨床安定期の中・高年気管支喘息患者における気流制限と肺 CT3 次元気道解析でみた気道病変との関係, 第 48 回日本呼吸器学会, 2008. 6. 16, 神戸:神戸コンベンションセンター
- 7) Betsuyaku T, Moriyama C, Ito Y, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nasuhara Y, Nishimura M. : Progressive Infiltration of Lymphocytes and Upregulation of MIP-3 α /CCL20 after Cessation of Cigarette Smoke (CS) Exposure in Aged Mice, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008. 5. 20, Toronto Canada : METRO TORONTO CONVENTION CENTRE
- 8) Ito Y, Betsuyaku T, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M. : Aging Affects Lipopolysaccharide (LPS) - Induced Upregulation of Heme Oxygenase-1 (HO-1) in the Lungs and Alveolar Macrophages (AMs), The 104th

- American Thoracic Society
International Conference, 2008. 5. 20,
Toronto Canada : METRO TORONTO
CONVENTION CENTRE
- 9) Nagai K, Betsuyaku T, Konno S, Ito Y, Nasuhara Y, Hizawa N, Kondo T, Nishimura M. : Eosinophils Mediate Albumin Carbonylation in the Epithelial Lining Fluid during Allergic Airway Inflammation, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008. 5. 20, Toronto Canada : METRO TORONTO
 - 10) Hasegawa M, Nasuhara Y, Makita H, Betsuyaku T, Nishimura M. : Contribution of Airway Disease and Emphysema to Airflow Limitation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Assessed by Three-dimensional Computed Tomography, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008. 5. 20, Toronto Canada : METRO TORONTO
 - 11) Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M. : Decreased Catalase Expression in Bronchiolization and Squamous Metaplasia in Lung Fibrosis, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008. 5. 20, Toronto Canada : METRO TORONTO
 - 12) Suzuki M, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Adair-Kirk T, Nguyen NM, Senior RM, Nishimura M. : Laminins alpha5 and gamma2 and VEGF Are Down-Regulated in Lung in Cigarette Smoke (CS)-Exposed Mice and Emphysema Subjects, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008. 5. 20, Toronto Canada : METRO TORONTO
 - 13) Moriyama C, Betsuyaku T, Ito Y, Hamamura I, J. Hata J, Takahashi H, Nasuhara Y, Nishimura M. : Aged Mice Exhibit Enhanced Expression of Chemokines in Bronchiolar Epithelium and Rapid Neutrophil Accumulation in Response to Single Cigarette Smoke (CS) Exposure, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008. 5. 20, Toronto Canada : METRO TORONTO
 - 14) Shimizu K, Nasuhara Y, Hasegawa M, Makita H, Konno S, Betsuyaku T, Nishimura M. : Relationship between airflow limitation and wall area, airway luminal area measured by three-dimensional computed tomography in bronchial asthma, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008. 5. 20, Toronto Canada : METRO TORONTO
 - 15) Hayashi M, Yamagata A, Oofusa K, Takada T, Betsuyaku T, Nishimura M, Nakata K. : Proteomic Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) from Subjects with Pulmonary Emphysema, The 104th American Thoracic Society International Conference, 2008. 5. 20, Toronto Canada : METRO TORONTO
 - 16) Hasegawa M, Nasuhara Y, Makita H, Onodera Y, Betsuyaku T, Nishimura M. : Relationship of Emphysema with Airway Dimensions in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 21, San Francisco USA: Moscone Center
 - 17) Moriyama C, Betsuyaku T, Ito Y, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Mitsuhashi H, Nasuhara Y, Nishimura M. : Aged mice exhibit enhanced neutrophilic inflammation after short-term cigarette smoke (CS) exposure, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 21, San Francisco USA: Moscone Center
 - 18) Odajima N, Betsuyaku T, Suzuki M, Hosokawa T, Nasuhara Y, Nishimura M. : Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) is Highly Expressed in Lymphangiomyomatosis (LAM), The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 21, San Francisco USA: Moscone Center
 - 19) Betsuyaku T, Hamamura I, Hata J, Mitsuhashi H, Adair-Kirk TL, Griffin GL, Senior RM, Nishimura M. : Catalase mRNA expression in bronchiolar epithelium in mice is up-regulated by acute cigarette smoke (CS) exposure and down-regulated by chronic CS exposure, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 20, San Francisco USA: Moscone Center
 - 20) Ito Y, Betsuyaku T, Nagai K, Suzuki M, Nasuhara Y, Nishimura M. : Impaired Cigarette Smoke Extract (CSE)-induced Upregulation of Heme Oxygenase-1 (HO-1) in Alveolar Macrophages (AMs) but not in Peritoneal Macrophages (PMs) in Aged Mice, The 103th American

- Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 20, San Francisco USA: Moscone Center
- 21) Ito Y, Betsuyaku T, Nagai K, Suzuki M, Nasuhara Y, Nishimura M.: Diverse Expression of Phosphatidylserine Receptor (PSR) and Vitronectin Receptor (VnR) in Monocytic Cell Lineage and Alveolar Macrophages (AMs) in Smokers, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 20, San Francisco USA: Moscone Center
- 22) Nagai K, Betsuyaku T, Suzuki M, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M.: Dual function NADPH oxidase/heme peroxidase (Duox) 1 and 2 Expression in Airway Epithelium in Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 20, San Francisco USA: Moscone Center
- 23) Nagai K, Betsuyaku T, Konno S, Ito Y, Nasuhara Y, Hizawa N, Nishimura M.: Increase of Sputum Protein Carbonyls as an Oxidative Stress Marker in Asthma, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 20, San Francisco USA: Moscone Center
- 24) Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Nishimura M.: NF-E2-related factor 2 (Nrf2) expression in pulmonary macrophages of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, The 103th American Thoracic Society International Conference, 2007. 5. 20, San Francisco USA: Moscone Center
- 25) 別役智子: シンポジウム1 気管支喘息・COPDの分子病態の解明と治療への挑戦「COPDにおける抗酸化遺伝子発現とその調節機構」, 第47回呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 11, 東京:東京国際フォーラム
- 26) 別役智子: シンポジウム7 呼吸器疾患と慢性炎症「慢性喫煙暴露とCOPDの病態における炎症性サイトカインの役割」, 第47回呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 11, 東京:東京国際フォーラム
- 27) 伊藤洋子, 別役智子, 長井 桂, 鈴木 雅, 南須原康行, 西村正治: Impaired Cigarette Smoke Extract-induced Upregulation of Heme Oxygenase-1 (HO-1) in Alveolar Macrophages but not in Peritoneal Macrophages in Aged Mice, 第47回呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 11, 東京:東京国際フォーラム
- 28) 鈴木 雅, 別役智子, 伊藤洋子, 長井 桂, 南須原康行, 加賀基地三, 近藤 哲, 西村正治: NF-E2-related factor 2 (Nrf2) expression in pulmonary macrophages of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, 第47回呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 11, 東京:東京国際フォーラム
- 29) 長井 桂, 別役智子, 鈴木 雅, 伊藤洋子, 南須原康行, 西村正治: Dual function NADPH oxidase/heme peroxidase (Duox) 1 and 2 Expression in Airway Epithelium in Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), 第47回呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 11, 東京:東京国際フォーラム
- 30) 長谷川 大, 南須原康行, 牧田比呂仁, 小野寺祐也, 別役智子, 西村正治: Relationship of Emphysema with Airway Dimensions in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), 第47回呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 11, 東京:東京国際フォーラム
- 31) 守山千夏, 別役智子, 伊藤洋子, 南須原康行, 西村正治: 短期喫煙暴露モデルにおける好中球性炎症に対する加齢の影響, 第47回呼吸器学会学術講演会, 2007. 5. 11, 東京:東京国際フォーラム
- 32) 小田島奈央, 別役智子, 鈴木 雅, 細川剛, 南須原康行, 西村正治.: Lymphangiomyomatosis (LAM)におけるExtracellular Matrix Metalloproteinase (EMMPRIN)発現の検討, 第104回日本内科学会, 2007. 4. 4, 大阪:大阪国際会議場
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
別役 智子 (BETSUYAKU TOMOKO)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60333605
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし