

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591656

研究課題名 (和文) JNK抑制による肺気腫薬物治療法の開発

研究課題名 (英文) Pharmacologic therapy for pulmonary emphysema by inhibiting JNK

研究代表者

松岡 隆久 (MATSUOKA TAKAHISA)

独立行政法人国立病院機構・山陽病院臨床研究部・研究員

研究者番号：80446822

研究成果の概要：肺気腫は、慢性炎症による肺胞構造の破壊を特徴とする閉塞性換気障害である。有効な治療は気管支拡張薬、酸素吸入療法や理学療法に限られ、重症例にのみ肺容量減少術や肺移植が行われているのが現状である。今後の超高齢化社会では患者数の増加が予想されるため、肺気腫の進行防止あるいは修復治療を目指した画期的薬物療法の開発が急務である。本研究では、肺気腫の中心病態である慢性炎症ならびに細胞外基質破壊とストレス応答性シグナル分子 JNK の関連を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
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

科研究費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺気腫, JNK, MMP

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺気腫は、慢性炎症による肺胞構造の破壊を特徴とする閉塞性換気障害である。肺気腫に代表される慢性閉塞性肺疾患の患者総数は、本邦で530万人と推定され、その医療費は年間8055億円と試算されている (Nishimura, Respiriology, 2004)。診断時には既に中等度から高度の換気障害があり、患者は多大な活動制限を強いられる。現在有効な治療は気管支拡張薬、酸素吸入療法や理学療法に限られ、重症例にのみ肺容量減少術や肺移植が行われている。在宅酸素症例の5年生存率は約50%と不良で、現状の治療法では

患者予後の改善に限界があり、肺気腫は基本的に不可逆性疾患と考えられている。今後の超高齢化社会では患者数の増加が予想されるため、その進行防止あるいは修復治療を目指した画期的薬物治療の開発が急務である。

(2) 研究代表者の松岡は、研究分担者の杉とともに、本邦において先駆的に肺気腫の外科的治療に取組み、肺容量減少術の有用性を報告してきた (K Sugii, T Matsuoka et al: Ann Thorac Cardiovasc Surg, 1998)。しかしながら、この効果は遠隔期の患者予後を改善するには至らなかった。そのため研究代表

者らは、肺気腫の病態機序の解明とそれに基づく合理的かつ有効な治療法開発の必要性を痛感した。

(3) 肺気腫は、喫煙等の刺激によって誘発される慢性炎症と細胞外マトリクス分解酵素 (MMP-9、MMP-12 および好中球エラスターゼ等) による肺胞壁組織構築の破壊に特徴づけられる (Barnes, Pharmacol Rev, 2004)。この肺胞壁破壊は不可逆的と考えられていたが、近年肺胞壁にも治癒力があり、組織修復が起こる可能性が報告された (Shizawa, FEBS Letters, 2004)。

(4) 喫煙刺激は肺胞壁細胞内のストレス応答性シグナル伝達分子 (JNK, p38, NFκB 等) を活性化することが報告されている (Hoshino S, Biochem Biophys Res Commun, 2005)。研究分担者の吉村と青木は、様々な組織で炎症シグナルを仲介し細胞外マトリクス分解を促進する JNK (c-Jun N-terminal kinase) に着目し、大動脈増殖細胞の JNK 活性化が組織破壊を亢進させると同時に修復を抑制することを発見した。さらに、これまで不可逆性信じられていた大動脈瘤に対して JNK 阻害療法を開発し、大動脈瘤の退縮と壁構造の修復治療に世界で初めて成功した (Yoshimura K, Aoki H et al: Nature Medicine, 2005)。研究代表者らは、組織破壊性病態における JNK の中心的役割が、大動脈瘤のみならず、慢性関節炎 (Han, J Clin Invest, 2001) でも証明されている事に着目し、肺気腫の病態でも JNK が有力な治療標的候補であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺気腫において JNK が細胞外基質破壊を含む慢性炎症性病変進展に果たす役割を解明し、JNK 抑制による薬物療法を開発することである。より具体的には、ヒト肺気腫組織における JNK 活性化を検証し、ヒト肺気腫病態における JNK の役割を解明する。さらに、マウス肺気腫モデルを確立し、マウス肺気腫モデルにおいて JNK 阻害療法の効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺気腫組織における JNK 活性の検出：手術時に得られたヒト肺気腫組織を用いて、活性化型 JNK (P-JNK) を免疫組織染色法により検出した。

(2) ヒト肺気腫組織における JNK 依存性炎症シグナルの同定：手術時に摘出されたヒト肺組織を細切して、器官培養を行った (Placke, Toxicol Appl Pharmacol, 1987)。この培養肺気腫肺組織から分泌される炎症

性サイトカインおよび細胞外マトリクス分解酵素マトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) -9 を抗体アレイ (RayBiotech 社) ならびにザイモグラフィー法で解析した。さらに特異的 JNK 阻害剤 (SP600125, Bennett, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, Toocris 社) を培養液中に添加し、サイトカイン・分解酵素の分泌が、JNK 活性に依存するか否かを検討した。

(3) マウス肺気腫モデルの確立：マウス気管内にエラストアーゼ (エラストアーゼ 3 unit/50 μ l/body) を投与し、肺気腫モデルの作製を試みた (Fujita, Thorax, 2004)。肺胞腔拡大の指標として、alveolar duct area と mean linear intercept (Hautamaki, Science 1997) を計測し、肺気腫病変が確立する時期の特定を試みた。

(4) マウス肺気腫における JNK 阻害療法の効果検証：マウス肺気腫モデルにおいて、エラストアーゼ投与直後から JNK 阻害薬 SP600125 の徐放剤を投与し肺気腫形成予防効果があるか否かを検討した。3週間後に、JNK 阻害治療マウスと対照マウスを犠牲死させ、肺胞構造組織破壊を HE 染色ならびに EVG 染色により観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト肺気腫組織における JNK 活性の検出：肺気腫患者の肺組織において JNK の活性化が認められることを確認した。肺気腫組織では、細胞外マトリクス分解酵素を分泌する炎症細胞のみならず細胞外マトリクスを産生・修復するべき肺胞上皮細胞で JNK の強い活性化が認められた。

(2) ヒト肺気腫組織における JNK 依存性炎症シグナルの同定：肺切除術を施行され、術前 CT で肺気腫が存在すると診断された肺組織を用いて器官培養を行った。これら培養肺気腫組織は、無刺激状態でも MMP-9 を顕著に分泌し、この MMP-9 分泌は JNK 阻害剤添加により有意に抑制された。炎症性サイトカインである TNF- α 刺激に反応して MMP-9 分泌が著明に増加したが、この MMP-9 増加を JNK 阻害剤はほぼ完璧に抑制した。これらによりヒト肺気腫組織における JNK 活性は MMP-9 分泌に必須であること、JNK は肺気腫の組織破壊に関わっている可能性があり、治療標的となり得ることが示唆された。

(3) マウス肺気腫モデルの作成：最初に、エラストアーゼの毒性試験一至適容量・濃度試験を行った。その結果、エラストアーゼは 20 μ g/50 μ l/body が至適容量・濃度であることが分かった。その後、実際にマウス気管内に

エラスターゼを投与し、肺気腫モデルを作成した。エラスターゼ処理後パルスオキシメーターで肺機能を評価しつつ、2 週後、4 週後、8 週後の経時的にマウスを犠牲死させマウス肺標本を採取した。生理食塩水のみを投与したものをコントロールとして、HE 染色ならびに EVG 染色により肺胞構造組織破壊を観察し肺気腫病変が確立する時期を特定した結果、エラスターゼ投与後 3 週目が肺気腫モデルとして妥当であることが分かった。

(4) マウス肺気腫における JNK 阻害療法の効果検証：マウス肺気腫モデルにおいて、エラスターゼ投与直後から JNK 阻害薬 SP600125 の徐放剤を投与（皮下植込み）した。対照としてアラセボの徐放剤を投与（皮下植込み）した。3 週間後に、JNK 阻害治療マウスと対照マウスを犠牲死させ、染色ならびに EVG 染色により観察したところ、アラセボ群では、肺胞構造の組織破壊が著明で肺気腫の発症が確認された。一方、JNK 阻害剤投与群の肺組織では肺胞破壊の組織変化が比較的軽微であった。特異的 JNK 阻害剤の投与により肺気腫の発症が防止されることが示唆された。

(5) 本研究から、肺気腫の病態において肺胞組織の細胞外基質分解酵素 MMP-9 の分泌が JNK により制御されていることが示唆された。さらに肺気腫のモデルマウスにおいて JNK 阻害剤による薬物療法が肺気腫の発症を予防しうることを示された。以上の結果から、JNK 阻害療法による肺気腫治療の可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Sugi K, Kobayashi S, Yagi R, Matsuoka T. Usefulness of sentinel lymph node biopsy for the detection of lymph node micrometastasis in early lung cancer. *Interact CardioVascular Thorac Surg* 2008;7:913-915. 査読有
2. 杉和郎. 悪性胸膜中皮腫に対する胸膜外肺全摘術の視野展開の—法. *胸部外科* 2008; 61 (4) 310. 査読有
3. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Regression of Abdominal Aortic Aneurysms by Pharmacological Inhibition of c-Jun N-terminal Kinase. *Bull Yamaguchi Med School*. 2007; 54(3-4): 29-31. 査読有
4. Katayama H, Hiraki A, Aoe K, Fujiwara K, Matsuo K, Maeda T, Murakami T, Toyooka S, Sugi K, Ueoka H, Tanimoto

M. Abberant promotor methylation in pleural fluid DNA for diagnosis of malignant pleural effusion. *Int J Cancer*: 120, 2191-2195. 査読有

Oda H, Suzuki H, Sakai K, Kitahara S, Patrick MS, Azuma Y, Sugi K, Kitamura T, Kaye J, Shirai M. Rac1 mediated Bcl-2 induction is critical in antigen-induced CD4 Single positive differentiation of a CD4+CD8+ immature thymocyte line. *J Leukoc Biol*. 2007;81(2):500-8. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 八木隆治、松岡隆久、杉和郎、上岡博、ヒト 肺気腫組織における JNK の活性と役割. 第 48 回日本呼吸器学会. 2008 年 6 月 17 日神戸
2. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Pharmacological therapy of AAA in animal. International Meeting on Aortic Aneurysms -New insights into an old problem-. Sep 19-20, 2008. Liege, Belgium.
3. 吉村耕一、青木浩樹、池田安宏、濱野公一、松崎益徳. 大動脈瘤の病態解明と薬物療法開発の試み. 第 56 回日本心臓病学会. 2008 年 9 月 8-10 日, 東京.
4. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Morikage N, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Critical Role of JNK2 for Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice. 日本循環器学会. 2008 年 3 月 28-30 日, 博多.
5. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Aoyama H, Morikage N, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. c-Jun N-terminal Kinase 2 is Required for Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice. American Heart Association Scientific Sessions 2007. Nov 4-7, 2007, Orlando, Florida, U.S.A.

[図書] (計 1 件)

1. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Development of pharmacological therapy for abdominal aortic aneurysms based on animal studies. In the Text Book “Aortic Aneurysms, New insights into an old problem” (ed. by Sakalihan N.), Edition de l’ Université de Liège, Liège, p453-476, 2008. 査読無

[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

松岡 隆久 (MATSUOKA TAKAHISA)
独立行政法人国立病院機構・山陽病院臨床
研究部・研究員
研究者番号：80446822

(2) 研究分担者

吉村 耕一 (YOSHIMURA KOICHI)
山口大学・医学部・講師
研究者番号：00322248

青木 浩樹 (AOKI HIROKI)
山口大学・医学部・特命准教授
研究者番号：60322244

杉 和郎 (SUGI KAZURO)
独立行政法人国立病院機構・山陽病院臨
床研究部・副院長
研究者番号：70241271

八木 隆治 (YAGU TAKAHARU)
独立行政法人国立病院機構・山陽病院臨床
研究部・医師
研究者番号：40448296

(3) 連携研究者
()
研究者番号：