

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08657

研究課題名(和文)呼吸器疾患における一酸化窒素合成酵素系の役割の多様性の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of the nitric oxide synthase system in the pathogenesis of respiratory diseases

研究代表者

筒井 正人(Tsutsui, Masato)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70309962

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):肺気腫病変には3種類の一酸化窒素(NO)合成酵素(nNOS、iNOS、eNOS)が全て発現している。しかし、肺気腫の成因におけるNOSs系の役割は不明である。私達は、この点をNOSs系完全欠損マウス(triple n/i/eNOSs-/-マウス)を用いて検討した。私達は、当該マウスに自然発症の肺気腫が認められること、及び、当該マウスの肺ではWnt/-catenin経路関連遺伝子の発現レベルが低下していることを明らかにした。これらの結果から、NOSs系は肺気腫の発症予防に重要な役割を果たしていること、及び、その分子機序にはWnt/-catenin経路の発現低下が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前に肺気腫や慢性気管支炎と呼ばれていた病態は、現在では慢性閉塞性肺疾患(COPD)と総称されている。COPDは日本人の死因の第9位を占めている。高齢化のためにCOPD患者は増加し続けており、10年後には日本人の死因の第3位になると予想されている。しかし、COPDの成因に不明な点が多いため、COPDの根治的治療法はいまだ開発されていない。私達は、本研究において、肺気腫の成因にNOSs系が役割を果たしていること、および、その分子機序にはWnt/-catenin経路の発現低下が関与していることを明らかにした。本研究の知見は、肺気腫の全く新しい治療法の開発に繋がる成果である。

研究成果の概要(英文):Three isoforms of nitric oxide (NO) synthases (nNOS, iNOS, eNOS) are expressed in human pulmonary emphysematous lesions. However, the role of the NOSs system in the pathogenesis of pulmonary emphysema remains to be elucidated. We investigated this issue in mice lacking all three NOS isoforms (triple n/i/eNOSs-/- mice). We demonstrated that the triple NOSs-/- mice exhibited spontaneous development of pulmonary emphysema, and that mRNA expression levels of Wnt/-catenin pathway-related genes were reduced in the lung of the triple NOSs-/- mice. These results suggest that the NOSs system plays an important role in the prevention of pulmonary emphysema, and that down-regulation of the Wnt/-catenin pathway is involved in the pathogenesis of spontaneous pulmonary emphysema in the triple NOSs-/- mice.

研究分野：薬理学

キーワード：一酸化窒素 一酸化窒素合成酵素 肺気腫 マウス 呼吸器疾患 Wnt/-catenin経路

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素(NO)合成酵素(NOSs)系は、神経型(nNOS)、誘導型(iNOS)、内皮型(eNOS)の3種類のアイソフォームで構成されている。肺には生理的状态および病的状態の両方で3つのNOSアイソフォームがすべて発現している。しかし、呼吸器疾患におけるNOSs系の役割は十分に明らかにされていない。私達は最近、この点を、私達が開発したNOSs系完全欠損マウス(triple n/i/eNOSs<sup>-/-</sup>マウス)を用いて検討した。その結果、肺線維症や肺高血圧の病態ではNOSs系は有益な役割を果たしているが、気管支喘息の病態ではNOSs系は真逆の有害な役割を演じていることが示唆された。これらの結果から、同じ肺の病態であってもNOSs系の役割は病態が異なれば異なることが考えられた。この自身の研究成果を踏まえて、申請者は、呼吸器疾患におけるNOSs系の役割の多様性を包括的に解明することを着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺気腫、急性肺障害、および敗血症性ショックにおけるNOSs系の役割を triple n/i/eNOSs<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究課題の申請時には、マウスに豚膵エラスターゼ 0.05U を気管内に投与して肺気腫モデルを作製して研究を行う予定であった。しかし、申請者は、研究の過程で、トリプル n/i/eNOSs<sup>-/-</sup>マウスに自然発症の肺気腫が認められることを見出した。そこで、本研究課題申請時の研究方法を一部変更し、自然発症の肺気腫について解析を行った。

本研究では、雄の野生型(WT)、single nNOS<sup>-/-</sup>、iNOS<sup>-/-</sup>、eNOS<sup>-/-</sup>、double n/iNOSs<sup>-/-</sup>、n/eNOSs<sup>-/-</sup>、i/eNOSs<sup>-/-</sup>、および triple n/i/eNOSs<sup>-/-</sup>マウスの8系統のマウスを実験に使用した。これらのマウスにおいて、肺の病理組織学的解析、マイクロCT解析、気管支肺胞洗浄液(BALF)解析、血漿NOx値測定(Griess法)、CAGE sequencing解析、およびELISA解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

WTマウスと比較して triple n/i/eNOSs<sup>-/-</sup>マウスでは、肺胞壁の破壊と肺胞腔の拡大(次頁図1)、肺胞隔壁間距離の増大、肺胞破壊指数(destructive index)の増加、エラスチン線維量の減少、肺野CT値の低下(次頁図2)および呼期終末肺容量の増加を認めた。一方、他の single NOS<sup>-/-</sup>マウスおよび double NOSs<sup>-/-</sup>マウスには、これらの所見は見られなかった。 triple n/i/eNOSs<sup>-/-</sup>マウスの上記異常所見は、生後4週齢の早期から認められた。肺のmRNA発現レベルをCAGE sequencingによって網羅的・定量的に解析したところ、WTマウスに比して triple n/i/eNOSs<sup>-/-</sup>マウスにおいて、3つのWntリガンドおよび10のWnt/ $\beta$ -catenin経路関連遺伝子が有意にdown regulateしていた。また、肺のELISA解析においても、WTマウスに比して triple n/i/eNOSs<sup>-/-</sup>マウスにおいて、GSK-3とLEF1の発現レベルの低下が認められた。

本研究において、申請者は、NOSs遺伝子を完全に欠損させるとマウスに自然発症の肺気腫が引き起こされることを明らかにした。その分子機序の一部には、Wnt/ $\beta$ -catenin経路のdown regulationが関与していることが示唆された。

図1. トリプル*n/i/eNOSs*<sup>-/-</sup>マウスには肺胞壁の破壊 (矢印)と肺胞腔の拡大が認められた

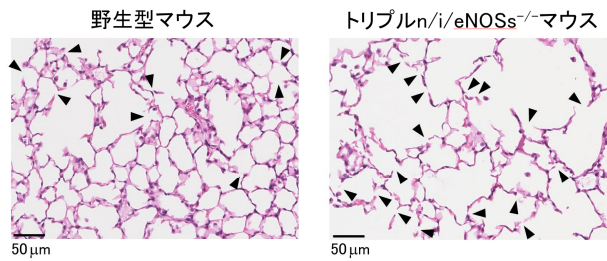


図2. トリプル*n/i/eNOSs*<sup>-/-</sup>マウスの肺野CT値は低下していた



※肺野が黒っぽく見えるのが肺野CT値の低下

## (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

過去に、肺気腫における NOSs 系の役割が、非選択的 NOSs 阻害薬を用いた薬理学的研究において検討されている。非選択的 NOSs 阻害薬 L-NAME の長期投与はマウスのタバコ煙誘発肺気腫モデルにおいて肺気腫の病態を軽減することが報告されているが、一方で、NO 産生を増加させる NO 前駆体 L-arginine の長期投与も同じマウスタバコ煙誘発肺気腫モデルにおける肺気腫の病態を同様に軽減することが報告されており、L-NAME 長期投与の作用は NOSs 阻害を介さない非特異的な作用であることが示唆されている。事実、L-NAME 長期投与により引き起こされる血管病変形成には NOSs 阻害を介さない機序が関与していること、L-NAME 長期投与は eNOS 活性を阻害しないこと、および L-NAME は NOSs 阻害と独立した多彩な非特異的作用を有すること(活性酸素種産生増加作用など)が報告されている。以上のように、非選択的 NOSs 阻害薬の非特異性のために、肺気腫における NOSs 系の真の役割は未だ十分に明らかにされていない。

申請者は、triple *n/i/eNOSs*<sup>-/-</sup>マウスを用いて、肺気腫の発症に NOSs 系が予防的役割を果たしていること、および、その分子機序の一部には Wnt/  $\beta$ -catenin 経路の down regulation が関与していることを世界で初めて明らかにした。この成果は新聞紙上および WEB 上で取り上げられ、社会的に大きなインパクトを与えた。

## (3) 今後の展望

肺気腫は、本来の肺構造が破壊されて肺に空気がたまってしまい(気腫)、うまく息を吐けなくなって息切れをきたす病態である。現在では肺気腫と慢性気管支炎の病態を総称した慢性閉塞性肺疾患(COPD)という診断名が広く使用されている。日本には約 530 万人の COPD 患者がいると推定されており、日本人の死亡原因の第 9 位を占めている。高齢化のために COPD 患者は増加し続けており、10 年後には死亡原因の第 3 位になると予想されている。COPD の最大の原因は喫煙であるが、COPD 発症の正確な分子機構が不明のため、当該疾患の治療は、禁煙、気管支拡張薬、酸素療法などの対症療法にとどまり、有効な根治的治療法の開発が喫緊の課題となっている。

私達は、本研究において、NO 産生障害が肺気腫を引き起こすことを明らかにすることができた。  
本研究の成果を踏まえて、肺気腫に対する全く新しい治療法が開発されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Liu J, Iwata K, Zhu K, Matsumoto M, Asaoka N, Zhang X, Ibi M, Katsuyama M, Tsutsui M, Kato S, and Yabe-Nishimura C	4. 巻 147
2. 論文標題 NOX1/NADPH oxidase in bone marrow-derived cells modulates intestinal barrier function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 90-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Li X, Yanagihara N, Horishita T, Toyohira Y, Satoh N, Tsutsui T, Kita T	4. 巻 16
2. 論文標題 Inhibitory effects of Sho-ju-sen and its component kumazasa leaves on catecholamine secretion induced by acetylcholine in cultured bovine adrenal medullary cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Topics in Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 105-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 生越貴明, 筒井正人, 矢寺和博, 迎寛	4. 巻 155
2. 論文標題 第 群肺高血圧症における骨髄一酸化窒素合成酵素系の病態意義	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 69-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.19111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato K, Tsutsui M, Noguchi S, Iha Y, Naito K, Ogoshi T, Nishida C, Tahara M, Yamashita H, Wang KY, Toyohira Y, Yanagihara N, Masuzaki H, Shimokawa H, Tanimoto A, Yatera K	4. 巻 11
2. 論文標題 Spontaneous Pulmonary Emphysema in Mice Lacking All Three Nitric Oxide Synthase Isoforms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01453-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kato K, Tsutsui M, Noguchi S, Naito K, Ogoshi T, Wang KY, Shimokawa H, Yatera K
2. 発表標題 Spontaneous development of pulmonary emphysema in mice lacking all three nitric oxide synthases
3. 学会等名 The American Thoracic Society 2020 International Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsutsui M, Kato K, Ogoshi T, Noguchi S, Yatera K
2. 発表標題 Diversity of roles of nitric oxide synthases in the pathogenesis of lung diseases
3. 学会等名 The 94th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 筒井正人、加藤香織、生越貴明、矢寺和博
2. 発表標題 呼吸器疾患の成因におけるNO合成酵素系の役割の多様性
3. 学会等名 第30回日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤香織、筒井正人、野口真吾、内藤圭佑、生越貴明、矢寺和博
2. 発表標題 一酸化窒素合成酵素完全欠損マウスは肺気腫を自然発症する
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kato K, Tsutsui M, Noguchi S, Naito K, Ogoshi T, Wang KY, Shimokawa H, Yatera K
2. 発表標題 Protective role of nitric oxide synthases in pulmonary emphysema in mice
3. 学会等名 29th International Congress of the European Respiratory Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 筒井正人
2. 発表標題 生体における一酸化窒素合成酵素系の意義
3. 学会等名 第49回日本心臓血管作動物質学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 筒井正人
2. 発表標題 肺気腫病変形成における一酸化窒素合成酵素系の保護的役割
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato K, Tsutsui M, Noguchi S, Naito K, Ogoshi T, Tahara M, Yatera K
2. 発表標題 Spontaneous pulmonary emphysema in mice lacking all three nitric oxide synthase isoforms
3. 学会等名 The 25th Annual Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

琉球大学大学院医学研究科薬理学ホームページ  
[http://w3.u-ryukyu.ac.jp/pharmaco/Pharmacology/youkoso\\_yao\\_lihe.html](http://w3.u-ryukyu.ac.jp/pharmaco/Pharmacology/youkoso_yao_lihe.html)

一酸化窒素（NO）産生障害が肺気腫を引き起こすことを発見 世界初  
<https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/29461/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松崎 俊博  (Matsuzaki Toshihiro)  (50244330)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------