

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08882

研究課題名(和文) KL-6発現マウスを用いた膠原病肺モデルにおける新規バイオマーカーの動態解析

研究課題名(英文) Analysis of novel biomarkers in collagen disease lung model using KL-6 expressing mice

研究代表者

窪田 哲也 (KUBOTA, TETSUYA)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：30274377

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)：KL-6はヒトのII型肺胞上皮細胞などに発現しているMUC1上の糖蛋白であり、間質性肺炎診療に極めて有用であるが、主にヒト以外では認められない。ヒトMUC1トランスジェニックマウスはKL-6を発現しており、本マウスを用いた肺障害モデルでKL-6はバイオマーカーとして働く。今回膠原病肺モデルおよび比較検討のため他の肺障害モデルを作成し検討したところKL-6はこれらのモデルでも有用なバイオマーカーであり、他のマーカーと動態が異なることが明らかとなった。炎症系新規バイオマーカーであるLRGに注目し検討したところLRGも肺障害のマーカーとして有用であった。本マウスを用いた今後の応用研究が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hMUC1-Tgマウスは腫瘍免疫の研究に世界中で用いられているが、本マウスを用いた肺障害の研究は我々が初めてである。本マウスのKL-6は様々な肺障害のマーカーとして有用であり、本マウスの新たな利用価値が明らかになった。海外で「マウスKL-6 ELISAキット」が発売されているが、マウスにKL-6発現はないため何を測定しているのか不明である。一方、本マウスを用いた場合、日常臨床のヒトKL-6測定アッセイ系がそのまま利用でき、肺障害研究に応用可能である。新規炎症系バイオマーカーであるLRGも肺障害のマーカーとして働くことがわかり、KL-6と組み合わせることで今後の臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：KL-6, a glycoprotein epitope on MUC1 expressed mainly on type II pneumocytes in humans, is an extremely useful biomarker for interstitial pneumonia, however no KL-6 epitope is expressed in animals other than humans and apes. Human MUC1-Tg mice express KL-6 at measurable levels, and KL-6 acts as a biomarker in the lung injury models using these mice. We made connective tissue disease-associated interstitial lung disease models using these mice, and other lung injury models for comparison, and we examined levels of KL-6 and other biomarkers of lung injury models. Levels of KL-6 dramatically changed depending on the variety and severity of lung injuries, suggesting its function as a biomarker in hMUC1-Tg mice. KL-6 behaved differently from other biomarkers. Next, we focused on Leucin-Rich 2-Glycoprotein(LRG), which is a novel inflammatory biomarker, we found that LRG also acts as a biomarker for lung injury, and we can expect future clinical application by combining it with KL-6.

研究分野：間質性肺炎

キーワード：KL-6 MUC1 LRG バイオマーカー 間質性肺炎 肺障害 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Krebs von den Lungen-6 (KL-6)は MUC1 ムチン上の糖蛋白であり、ヒトの II 型肺胞上皮細胞や細気管支上皮細胞に発現している(文献1)。KL-6 は間質性肺炎の診断や病型鑑別、治療効果判定、予後予測に極めて有用なバイオマーカーである(文献2)ため、臨床現場で広く測定されている。しかし、KL-6 エピトープはヒトや高等霊長類以外では認められないため、これまで動物モデルを利用することができなかった。(海外から発売されているマウス KL-6 ELISA キットは本物の KL-6 を測定しているのではなく何を測定しているのか不明である。)我々は KL-6 のコア蛋白であるヒト MUC1 を発現しているヒト MUC1 トランスジェニック(hMUC1-Tg)マウス(文献3)に着目し、hMUC1-Tg マウスの血清や BALF で KL-6 を測定可能であることを見出した(文献4)。また、hMUC1-Tg マウスを用いて肺障害モデルを作成すると KL-6 がバイオマーカーとして働くことを示した(文献4)が、膠原病肺モデルではどうなのか、他のバイオマーカーとどう違うのか明らかではない。近年、Leucin-Rich 2-Glycoprotein (LRG)が新しい炎症性マーカーとして同定された。ロイシンリッチリピートと呼ばれるドメインを8つ含む約 50kDa の糖蛋白質で炎症性疾患に有用なバイオマーカーであるが、肺障害マーカーとしての評価はなされていない。そこで、hMUC1-Tg マウスの新たな応用モデルとして肺障害モデルを作成し LRG を含めて検討した。

2. 研究の目的

本研究課題では、hMUC1-Tg マウスが KL-6 を測定可能な膠原病肺モデルになりうるのかを検討し、KL-6 が LRG や他のバイオマーカーと変動にどのような差があるのか、肺障害における LRG のバイオマーカーとしての意義を明らかにすることを目的として検討した。

3. 研究の方法

膠原病肺モデルとして、ここではまず II 型コラーゲン誘発関節炎モデルとプリスタン肺障害モデルを作成し検討した。マウスは CLEIA Japan から購入した wild type と hMUC1-Tg マウスを自家繁殖させヘテロに維持し、PCR 法で hMUC1 陽性を確認した 7-8 週齢のものを用いた。各群 3 匹以上用い、実験自体を 3 回以上繰り返し検体を採取した。KL-6 はシスメックス社製 HISCL KL-6 キットを用い CLEIA 法で測定した。LRG は IBL 製マウス LRG キットを用いて ELISA 法で測定した。SP-D はヤマサ ラット/マウス SP-D キットを用いて ELISA 法で測定した。periostin は R&D Systems 社の Quantikine ELISA キットを用いた。学内の遺伝子組替実験承認済(31-011)、動物実験計画承認済(L-00016)で、学内の規程、動物実験ガイドラインを順守して実施した。

(1). II 型コラーゲン誘発関節炎モデル

以前の予備実験で C57BL/6 背景の hMUC1-Tg マウスを用いた場合、ほとんど変化が起きないことがわかっている。そこで、DBA/1 背景の市販のマウスと C57BL/6 背景の hMUC1-Tg マウスとを 8 世代以上バッククロスを行い、1 年以上かけて DBA/1 背景の hMUC1-Tg マウスを作製した。(最終的に 18 世代まで作製した。)DBA/1 背景の hMUC1-Tg マウスは C57BL/6 背景の hMUC1-Tg マウスと同様に血清および BALF で同程度の KL-6 を測定可能であることがわかっている。

ウシ II 型コラーゲンを DBA/1 背景の hMUC1-Tg マウス背部に皮内投与し、2 週間後に incomplete adjuvant とともにウシ II 型コラーゲンを尾根部に追加投与した。10 週および 25 週に sacrifice し、血清 KL-6、BALF 中 KL-6 や LRG、SP-D を測定するとともに、肺組織の形態的变化や免疫染色の変化を解析した。

(2). プリスタン肺障害モデル

C57BL/6 背景の hMUC1-Tg マウスを用い、2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane)を単回腹腔内投与し、1, 2, 4, 7, 14 週に sacrifice した。形態変化やコラーゲン量変化を検討するとともに、血清、BALF、肺組織における KL-6 の発現を ELISA 法、免疫組織化学、Western blot 法で検討した。LRG、SP-D や periostin を測定し比較検討した。

次に、他の肺障害モデルでの KL-6 と LRG との違いを比較検討するためにブレオマイシン(BLM)肺障害モデル、リポポリサッカライド(LPS)肺障害モデル、シリカ肺障害モデル、エラストーゼ肺障害モデルを作成し検討した。

(3). ブレオマイシン(BLM)肺障害モデル

C57BL/6 背景の hMUC1-Tg マウスに BLM を単回経気管投与法で投与し肺障害モデルを作成した。炎症期(day 8)、線維化期(day 22)に sacrifice し形態変化を観察するとともに、血清、BALF 中の KL-6、LRG、SP-D の変動を検討した。

(4). リポポリサッカライド (LPS)肺障害モデル

C57BL/6 背景の *hMUC1*-Tg マウスに LPS を単回経気管投与法で投与し肺障害モデルを作成した。6 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後、96 時間後に sacrifice し形態変化を観察するとともに、血清や BALF 中の KL-6、LRG、SP-D の経時的な変化を解析した。

(5). シリカ肺障害モデル

C57BL/6 背景の *hMUC1*-Tg マウスにシリカを単回経気管投与法で投与し肺障害モデルを作成した。1 週後、2 週後、4 週後、8 週後、14 週後、16 週後に sacrifice し形態変化を観察するとともに、血清や BALF 中の KL-6、LRG、SP-D、periostin の経時的な変化を解析した。

(6). エラスターゼ肺障害モデル

C57BL/6 背景の *hMUC1*-Tg マウスにエラスターゼ (porcine pancreas elastase) を単回経気管投与法で投与し肺障害モデルを作成した。3 週後に sacrifice し形態変化を観察するとともに、血清や BALF 中の KL-6、LRG、SP-D の経時的な変化を解析した。

4. 研究成果

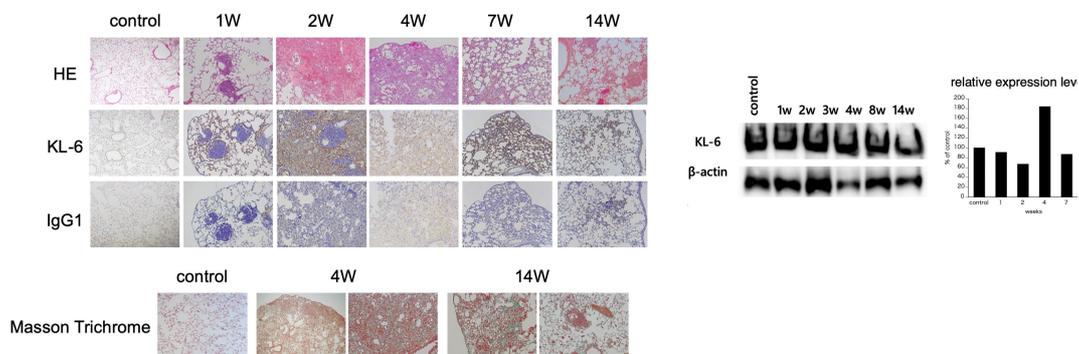
(1). II 型コラーゲン誘発関節炎モデル

C57BL/6 背景の *hMUC1*-Tg マウスと DBA/1 系マウスを 8 世代以上バッククロスし DBA/1 背景の *hMUC1*-Tg マウスを作成した。DBA/1 背景の *hMUC1*-Tg マウスは報告がなく初めてである。各世代とも血清、BALF で KL-6 が測定可能で世代間に KL-6 値に有意な差はなく、DBA/1 背景に変わっても KL-6 産生能は受け継がれることがわかった。DBA/1 背景の *hMUC1*-Tg マウスを用い II 型コラーゲンモデルを作成したところ、10 週で下肢の関節炎がみられた。25 週では肺に明らかな間質性肺炎像はみられなかったが、マッソントリクロム染色で肺に膠原線維の増加がみられた。

血清 KL-6 は 240 ± 48 (U/mL) から 10 週で 486.7 ± 144.7 (2.02 倍) に上昇し、25 週で 503 ± 85 (2.1 倍) に緩徐に上昇し 10 週と同程度の 2.1 倍であるものの、BALF では 2157 ± 395 から 10 週で 2240 ± 289 (1.04 倍) に上昇後、25 週では 1961 ± 45 (0.91 倍) に低下した。血清 LRG は 11.6 ± 9.1 (ng/mL) から 10 週で 26.4 ± 13.4 (2.28 倍) に増加し、25 週でも 35.2 ± 10.8 (3.03 倍) に上昇した。BALF でも 23.7 ± 9.3 から 10 週で 26.9 ± 10.6 (1.01 倍)、25 週で 31.2 ± 10.4 (1.32 倍) に上昇し、血清・BALF とともに上昇しつづける点が KL-6 とはパターンが異なっていた。血清 SP-D は 10 週で 2.71 倍に増加し 25 週では 2.91 倍に増加を示し LRG 同様の变化であった。BALF SP-D も 10 週で 1.18 倍、25 週で 1.29 倍に増加し LRG と同様であった。血清ペリオスチンは 10 週で 0.75 倍に低下し 25 週で 0.77 倍に回復傾向を示し、KL-6 や SP-D と動向が異なっていた。BALF ペリオスチンはそもそも検出限界程度に少ないが血清同様に 10 週で低下し 25 週で上昇した。

(2). プリストン肺障害モデル

本モデルは SLE のモデルと言われている。*hMUC1*-Tg マウスは関節炎などの症状を呈さなかったが、2-4 週にかけて高度の肺胞出血を来した (下図左)。膠原病関連肺胞出血モデルになると思われる。血清 KL-6 は 1 週から上昇しはじめ、4 週で 6.3 倍に上昇しその後下降した。BALF KL-6 も 4 週にピークがあり 2.2 倍に増加した。Western Blot でも KL-6 は 4 週に発現のピークがあった (下図右)。LRG は血清、BALF とともに KL-6 に類似し 4 週にピークを示し、それぞれ 20.3 倍、13.1 倍に増加した。SP-D も KL-6、LRG と同様の変動を示したが、血清は 4 週に 18.2 倍、BALF は 2 週に 4.8 倍のピークがある点が異なっていた。ペリオスチンは KL-6、LRG、SP-D と異なる変動を示し、血清では 2 週に 0.64 倍に減少するものの、BALF では 2 週に 197 倍増加した。DBA/1 背景の *hMUC1*-Tg マウスでも肺胞出血を呈するが、C57BL/6 背景よりも程度が軽く KL-6 や LRG の変動幅が少なかった。血清 KL-6 は 4 週に 3.6 倍、BALF KL-6 は 2.8 倍、血清 LRG は 4 週で 3.6 倍、BALF LRG は 4 週で 2.6 倍であった。



他の肺障害における LRG のバイオマーカーとしての役割を見るためにプレオマイシンモデルなどの肺障害モデルを作成した。血清 KL-6 は Day 8 (炎症期) に 10 倍に増加し、Day 22 (線維化期) には下がるものの control の 3 倍と高値であった。一方 BALF KL-6 は Day 8 に 0.77 倍に減少し Day 22 には 1.8 倍に増加した。血清 SP-D は Day 8 に 88.9 倍に増加するものの Day 22 には 18.0 倍まで低下した。BALF SP-D は Day 8 に 1.3 倍に増加し、Day 22 には 2.0 倍まで増加した。血清 LRG は Day 8 に 7.3 倍に増加し、Day 22 にはさらに 7.6 倍まで増加した。BALF LRG は Day 8 に 7.4 倍に増加し、Day 22 にはさらに 11.6 倍まで増加した。Day 8、Day 22 と増加し続ける点が KL-6、SP-D と異なっていた。

(4). リポポリサッカライド (LPS) 肺障害モデル

LPS モデルは LPS によって惹起される急性好中球炎症性肺障害モデルである。血清および BALF KL-6 は緩やかに上昇し 72 時間後にピークを認め、それぞれ control の 1.8 倍、1.6 倍の増加を示した後減少した。SP-D は KL-6 とピークが異なり血清は KL-6 同様 72 時間後 (7.9 倍) であったが、BALF は 48 時間後 (3.9 倍) であった。LRG は KL-6 や SP-D と同様にピークが異なり血清、BALF とともに 48 時間後であった。血清は 22.8 倍、BALF は 14.4 倍に増加した。LRG が他のマーカーよりも 24 時間早くピークが来る点が興味深い。

(5). シリカ肺障害モデル

シリカモデルは塵肺モデル、慢性炎症性肺障害モデルとされている。HE 標本では経時的に血管周囲に炎症が生じ肉芽腫が形成された。KL-6 は血清・BALF とともに緩やかな上昇を示し、ともに 14 週に単峰性ピークがあった。血清は control の 1.5 倍、BALF では 2.1 倍に増加した。SP-D はピークが異なり 1 週と 14-16 週に二峰性のピークがあった。血清 SP-D は 1 週で 5.0 倍、16 週で 5.3 倍であった。BALF は 1 週で 2.5 倍、14 週で 4.4 倍であった。LRG のピークは KL-6 と SP-D の間のようなピークであり、血清では単峰性で 14 週にピーク (3.6 倍) があり、BALF は 1 週 (4.0 倍) と 14 週 (3.6 倍) の二峰性ピークであった。ペリオスチンは独特の変動を示し、血清では 4 週 (1.4 倍) に単峰性ピークがあるのに対し、BALF ではもともとが検出限界レベルではあるが 1 週に単峰性ピークがあり 74.7 倍の増加であった。

(6). エラスターゼ肺障害モデル

エラスターゼモデルはエラスターゼによって肺胞が破壊され気腫が形成される肺気腫のモデルである。KL-6 は血清で 0.72 倍、BALF で 0.68 倍に減少した。これは KL-6 産生細胞である II 型肺胞細胞が減少することを反映していると思われるが、一方 SP-D は血清で 2.7 倍、BALF で 1.36 倍増加しており、II 型肺胞上皮細胞数の減少だけでは説明できない。II 型肺胞上皮細胞の再生と関連するかもしれない。LRG は血清で 2 倍、BALF で 1.2 倍増加し、SP-D と同様であった。

hMUC1-Tg マウスは、血清・BALF で KL-6 を測定することが可能であり、測定にはヒトのアクセイ系がそのまま使用できる。hMUC1-Tg マウスを用いた様々な肺障害モデルで KL-6 を測定することが可能で、かつその KL-6 がバイオマーカーとして病態を反映していることが明らかになった。肺障害の種類により SP-D と変動が異なるため併用することでより病態の理解に役立つと思われる。炎症性マーカーである LRG は肺障害でも血清、BALF で変動することが明らかになり肺障害の新たなバイオマーカーとして働くことがわかった。本マウスは KL-6 測定可能な肺障害モデルマウスとして、今後様々な応用研究が考えられる。

<参考文献>

Kohno N, Kyoizumi S, Tanabe M et al. Detection of a circulating tumor-associated antigen with a murine monoclonal antibody, LISA 101, selected by reversed indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer Res.* 1989;49:3412-3419.

Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, et al. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig* 2012;50:3-13.

Rowse GJ, Tempero RM, VanLith ML, et al. Tolerance and immunity to MUC1 in a human MUC1 transgenic murine model. *Cancer Res* 1998;58:315-321.

Sakai M, Kubota T, Ohnishi H, Yokoyama A. A novel lung injury animal model using KL-6-measurable human MUC1-expressing mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432:460-465.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kubota T and Yokoyama A	4. 巻 203
2. 論文標題 Biomarker analysis of collagen vascular disease-associated lung injury models by using human MUC1 transgenic mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Respir Crit Care Med	6. 最初と最後の頁 A4376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1164/ajrccm-conference.2021.203.1_MeetingAbstracts.A4376	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 窪田 哲也	4. 巻 36
2. 論文標題 KL-6発現マウスモデルと用いたバイオマーカー解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 1120-1122
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 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 穴吹 和貴、高松 和史、大西 広志、植村 夏実、水田 順也、荻野 慶隆、山根 真由香、酒井 瑞、向田 賢市、窪田 哲也、横山 彰仁
2. 発表標題 薬剤性間質性肺炎の急性期治療とKL-6の経時的変化
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kubota T and Yokoyama A
2. 発表標題 Biomarker Analysis of Collagen Vascular Disease-Associated Lung Injury Models by Using Human MUC1 Transgenic Mice
3. 学会等名 American Thoracic Society 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高松 和史、大西 広志、中谷 優、大山 洸右、水田 順也、山根 真由香、穴吹 和貴、渡部 雅子、酒井 瑞、窪田 哲也、横山 彰仁
2. 発表標題 び慢性肺疾患におけるLeucin rich 2 glycoprotein (LRG)のバイオマーカーとしての有効性の検討
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	横山 彰仁 (YOKOYAMA AKIHITO) (30191513)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授 (16401)	

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
---------	---------