

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08154

研究課題名（和文）KIAA1462/JCADを標的としたARDSの革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Novel ARDS Therapy Targeting KIAA1462/JCAD

研究代表者

小林 和幸（Kobayashi, Kazuyuki）

神戸大学・医学部附属病院・特命教授

研究者番号：50403275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：LPS誘導性肺障害マウスモデルを作成したところ、KIAA1462のノックアウト（KO）マウスでは血管細胞間接着が低下し、血管透過性が亢進することで肺障害が増悪することを確認した。また、LPS投与24時間後のマウスの肺を取り出し、qRT-PCRを施行したところ、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CXCL-2、MCP-1などのイトカインがKIAA1462のKOマウスで発現が亢進していることも確認した。さらに、KIAA1462のKOマウスでは、VEcadherin、VCAM-1、ICAM-1の発現も低下していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARDSにおけるJCAD/KIAA1462の関与、作用機序を示す論文はなく、本研究はJCAD/KIAA1462とARDSの直接的な関与を作用機序も含めて解析する世界で初めての研究となる。また、血管新生因子とARDSの病態を明らかにする極めて重要な研究課題であり、肺血管と肺胞壁構造を標的とした新規治療薬の開発につながる世界で初めての研究として位置づけられるとともに、重症COVID-19患者の救命につながる重要な研究であるといえる。

研究成果の概要（英文）：Novel therapeutic agents and elucidation of the pathogenesis of ARDS, which still has a high mortality rate, are desired. In this study, we approached ARDS treatment from the perspective of both alveolar epithelial cells and vascular endothelial cells, focusing on inflammation and vascular permeability in pulmonary vascular endothelial cells, which are considered as important as alveolar and airway inflammation in the pathogenesis of ARDS. A mouse model of LPS-induced lung injury was created, and it was confirmed that in KIAA1462 knockout (KO) mice, vascular intercellular adhesion was decreased and vascular permeability was increased, which exacerbated lung injury. In addition, qRT-PCR of lungs of mice after 24 hours of LPS administration showed that cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL-2, and MCP-1 were upregulated in KIAA1462 KO mice. Furthermore, we confirmed that the expression of VEcadherin, VCAM-1, and ICAM-1 was also decreased in KIAA1462 KO mice.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：ARDS KIAA1462 JCAD

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は、肺炎や誤嚥などの肺局所での直接傷害や、敗血症、手術、外傷などの全身性疾患を原因とする間接傷害を原因に生じる致死的な急性呼吸不全の状態である。ARDS では、高度に炎症性サイトカインが分泌される SIRS(全身性炎症反応症候群)の状態から、血管内皮細胞の傷害、血管内皮バリア機構の破綻が生じ、肺胞壁の浮腫性変化や血管内から肺胞内への浸出液貯留をきたす。また、同時に肺胞上皮細胞も傷害され、肺サーファクタントの減少、肺胞腔への肺胞マクロファージや好中球の浸潤、集簇が生じ、炎症性メディエーターをより活性化させ、炎症が持続することが主たる病態であると考えられている(Thompson BT, et al, N Engl J Med, 2017)。すなわち、ARDS は、好中球性の炎症、高サイトカイン状態を主体とし、それに伴う血管透過性亢進型の肺水腫と言える。新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の重篤化の原因としても高サイトカイン血症が着目されているが、重症 COVID-19 患者の肺の病態としては ARDS と同様の病態像と考えられ、ARDS への治療法の確立は、重症 COVID-19 患者の救命率向上につながると期待される。

我々の研究室では、ARDS の病態解析に古くから取り組んできた(図)。すなわち、活性酸素として一酸化窒素(NO)とその化合物に着目し、NO 合成酵素の役割を報告してきた(Circulation. 2000;101:931-937, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2006;290(6):L1078-86.)。また、人工呼吸器肺障害モデルを作成し、低換気療法の有効性や好中球エラスターゼ阻害薬である sivelestat の有効性について報告してきた(Eur J Pharmacol. 2007;571(1):62-71)。実臨床においても、ALI/ARDS の治療ガイドラインに、低容量換気(1回換気量は10ml/kg以下(6~8ml/kg程度)、吸気終末プラトー圧は30cmH<sub>2</sub>O以下)、低容量ステロイド、sivelestat の使用が推奨されるに至っている。また、当研究科の片岡徹教授の研究室で発見された PLC (ホスホリパーゼ C)分子に着目し、肺胞上皮細胞において CXCL5 型ケモカインの産生に関与し、好中球の活性制御に関与していることを報告(Respir Res. 2019 20(1):9-21 2017年度科研費基盤研究C課題申請者が代表)し、PLC 分子を治療標的とする治療薬を創薬中である。

現状の実臨床においては、ARDS の治療として、呼吸管理や水分管理、ステロイドや好中球エラスターゼ阻害薬などに代表される薬物治療が推奨され、一定の治療効果は得られているものの、生命予後の改善が証明された治療法はなく、その死亡率は35-40%と依然として高く、治療法の確立は臨床上的大きな課題である。

ARDS の主病態は肺・気道の好中球性炎症(肺胞上皮障害)と血管透過性亢進(血管内皮障害)による肺水腫の二つと考え、我々の今までの研究は前者に主体を置くものであった。今回、本研究では血管内皮細胞に焦点を当て、ARDS 状態における血管透過性制御を試みる。肺血管のバリア機構は血管内皮細胞間結合によるところが大きく、低酸素、炎症性サイトカインや lipopolysaccharide (LPS) などの刺激によって内皮細胞が活性化されると内皮細胞間結合に傷害をきたし、また好中球遊走因子の発現が増加することが報告されている(FR Millar, et al, Thorax, 2016)。また、ARDS の浸出期~亜急性期には、組織損傷をきたした臓器修復を目的に血管新生が活性化することも知られている。血管新生には血管新生因子である VEGF(血管内皮増殖因子)や FGF(線維芽細胞増殖因子)などが必要と考えられており、VEGF が ARDS 患者の血中で上昇しているという報告もある(DR Thickett, et al, Am J Respir Crit Care Med, 2002)。VEGF は血管新生を引き起こす一方で、同時に病変組織では血管の障壁機能を破壊する。従って、VEGF は、内皮の細胞間結合を解離させることによって血管に透過性を持たせ、浮腫を引き起こす原因

にもなり、肺水腫を増悪させる方向にも働く。すなわち、VEGF は組織修復に必要な血管新生を進める作用を持つ一方で、肺水腫を増悪させる負の作用も有することから治療標的分子として臨床応用するには、ARDS の時相も考慮しながら、各時相での VEGF の機能評価をさらに進める必要がある。

KIAA1462 は、冠動脈疾患に関連する遺伝子の一つとしてヒトゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって同定された(Coronary Artery Disease (CAD) Genetics Consortium, Nat Genet, 2011、Erdmann J. et al, Eur Heart J, 2011)。当研究科では、これらの報告とは独立して、新規の細胞間結合タンパク質として junctional protein associated with coronary artery disease (JCAD) を KIAA1462 の遺伝子産物として同定することに成功した(Biochem Biophys Res Commun, 2011)。さらに、最近、JCAD/KIAA1462 が血管新生に関与することを世界で初めて報告した (Arterioscler Throm Vasc Biol, 2017)。

以上の経緯から「この新発見された JCAD/KIAA1462 系分子群も、内皮細胞間制御因子として ARDS 治療の候補分子となるのではないか」という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は ARDS の新規治療法として血管内皮に着目して、その血管新生制御分子である VEGF、並びに当研究科で発見した JCAD/KIAA1462 系分子群が治療候補分子となり得るかを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### 実験 1. LPS 誘導性 ARDS マウスモデルを作成し、VEGF と JCAD/KIAA1462 の発現を調べる

マウスに LPS0.5 mg/kg を経気道的に投与することで LPS 誘導性 ARDS マウスを作成する。LPS 誘導性 ARDS マウスにおける血管新生分子の発現量の変化を、ARDS の各時相に合わせ、肺組織の Western blotting、肺胞洗浄液 (BALF) の qRT-PCR で測定する。

### 実験 2. LPS 誘導性 ARDS の表現型における血管新生分子の影響を調べる

KIAA1462 遺伝子欠損型 (KO) などの血管新生遺伝子欠損マウスを使用して LPS 誘導性 ARDS マウスモデルを前述のように作成する。試薬投与後 24 時間後に各種実験を行う。

BALF 中の白血球数とその分画を測定する。

肺組織標本における細胞浸潤や肺胞壁肥厚を HE 染色で病理学的に評価する。

肺血管透過性亢進を BALF 中の蛋白量を測定 (BCA 法)、もしくは肺湿乾重量比を測定する。

BALF 中の myeloperoxidase 活性、TNF- $\alpha$ 、IL-6、CXC ケモカインや GM-CSF、ICAM-1 や VCAM-1 など細胞間接着因子、VEGF・Ang-2 を qRT-PCR で測定する。

### 実験 3. 血管内皮細胞の透過性に与える血管新生分子の影響を評価する

肺組織の内皮細胞接着因子 (VE-Cadherin や Occludin) の発現量の変化を確認する。

肺組織の免疫染色を行い、VE-cadherin と actin を染色し内皮細胞の構造変化を調べる。

## 4. 研究成果

### 結果 1. BALF の表現型

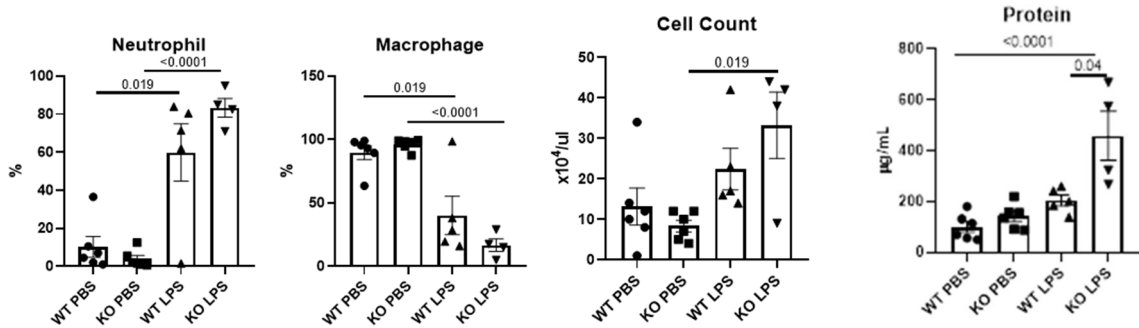
以下の数のマウスに LPS または PBS を投与した：

野生型：野生型：PBS 6 匹、LPS 5 匹

ノックアウト PBS6 匹、LPS4 匹

BAL 液の表現型を以下に示すが、BAL の細胞分析では、好中球の割合と全体的な細胞数の増加傾向は見られるものの、WT と KO の間に有意差は認められなかった。一方、LPS 投与 24 時間後の

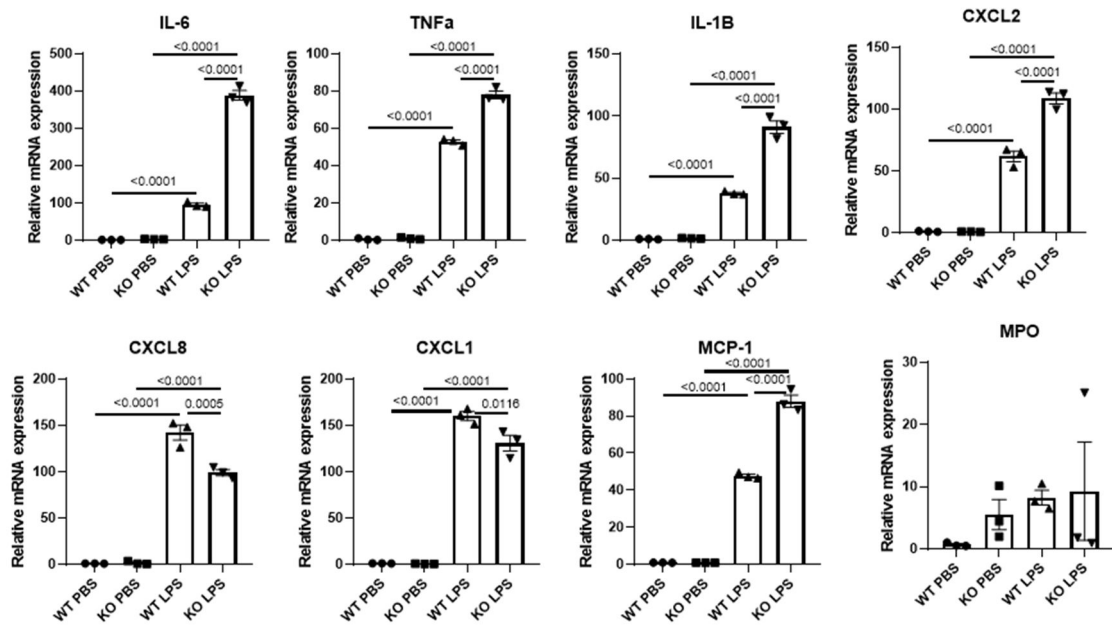
BAL 液中のタンパク質濃度は、WT マウスに比べて KO マウスで有意に増加していた。



具体的に何が肺で産生されてタンパク質の滲出液が増加するのかを調べるのは興味深いと考え、肺全体の qPCR を解析した。

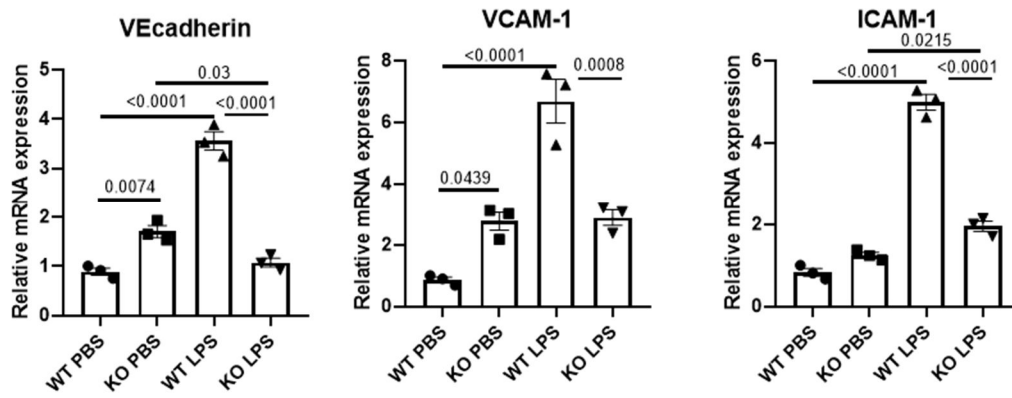
## 2. 肺全体のリアルタイム qPCR 結果

急性炎症期に産生されるタンパク質のほとんどはサイトカインなので、肺での発現量を解析することにした。



MPO を除いて、サイトカイン産生において KO と WT の間に有意差がある。最も顕著な差は IL-6 で、LPS 後に WT と KO の間でほぼ 4 倍の差があった。CXCL-8 と CXCL-1 は KO マウスで実際に減少した。

また、肺の JCAD の欠損が他の接合タンパク質の発現レベルに影響を与えるかどうか調べてみたところ、WT マウスでは LPS を投与すると PBS を投与したマウスに比べて増加するにもかかわらず、KO マウスでは LPS を投与しても変化が観察されなかった。KO マウスでは、LPS を投与しても、他の接合タンパク質の発現量に変化は見られなかった。



結論として、JCAD をノックアウトすると、内皮接合タンパク質の発現が低下し、肺における炎症性サイトカインの過剰産生を引き起こす可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	西村 善博  (Nishimura Yoshihiro)  (20291453)	神戸大学・医学部附属病院・名誉教授    (14501)	
研究分担者	山本 正嗣  (Yamamoto Masatsugu)  (40542139)	神戸大学・医学部附属病院・助教    (14501)	
研究分担者	永野 達也  (Nagano Tatsuya)  (80624684)	神戸大学・医学研究科・講師    (14501)	

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