

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590835

研究課題名（和文） 高齢マウス肺の生理的老化と肺気腫形成にアドレノメデュリンが与える効果に関する検討

研究課題名（英文） Investigation about the effect of Adrenomedullin on pulmonary function and development of emphysema of old mice

研究代表者

山本 寛 (YAMAMOTO HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10361487

研究成果の概要（和文）：22ヶ月齢の高齢 AM 遺伝子改変マウス(Old AM-KO)およびその同腹子、コントロールとして 12 週齢の AM 遺伝子改変マウス(Young AM-KO)およびその同腹子を準備し、それぞれにおける肺機能、組織学的変化を検討した。まず肺機能については、Old mice における残気量(RV)，残気率(RV/TLC)の有意な増加が認められた。一方、組織学的な検討の結果、平均肺胞間距離(Lm)が Old mice において有意に長く、肺胞面積や破壊指数(DI)については有意な差を認めなかった。いずれも AM 遺伝子改変の有無とは関連を見出せなかった。以上の結果から、高齢化により、肺の弾性収縮力が低下してエアートラッピングを生じさせる結果、残気量の増加や Lm の増加を来しているが、肺胞の破壊という点では高齢化の影響は少ないものと判断された。

研究成果の概要（英文）：We investigated pulmonary function and histological changes of old or young AM-KO mice correspondent with its littermate control. RV and RV/TLC of old mice were significantly increased compared with that of young mice. Mean linear intercept (Lm) of old mice was significantly increased than that of young mice. Mean alveolar area and destructive index (DI) were not significantly increased. AM gene modification did not have any effect on these indexes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：

キーワード：閉塞性肺疾患、アドレノメデュリン

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は喫煙や大気汚染物質などが原因となり、非可逆性の気道閉塞を来す疾患で世界の死亡原因の第4位を占めている。本邦における COPD の病理は殆どの場合肺気腫であり、肺胞壁の破壊と呼吸

細気管支以遠の気腔の拡大を特徴とする。COPD の症状を改善させるための薬剤(抗コリン薬)が広く臨床利用されているが、気腫病変の再生を促す、あるいは気腫の進行を抑制しうる薬剤はなく、根本治療のための有効な薬剤の開発が求められている。COPD の病

態にはさまざまな炎症細胞（主に好中球、マクロファージ、CD8陽性T細胞）、炎症性メディエーターが関与しており、これらにより惹起される気道炎症が気道閉塞の原因と考えられている。近年、酸化ストレスがCOPDの病態に重要な役割を演じていることがわかっている。

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は急性循環不全、敗血症、肺炎、急性膵炎、薬剤などに起因して生ずる全身性炎症反応に合併する急性肺障害である。血管透過性の亢進による非心原性肺水腫がその本態とされている。その病態としてNF- κ Bのシグナル伝達経路を活性化しさまざまな炎症性サイトカイン、接着分子、蛋白分配酵素が放出されるものと考えられているが、今日その正確な分子病態は解明されていない。

一方、近年、炎症を促進あるいは抑制する生理活性因子として、エンドセリン-1(endothelin-1, ET-1)、アドレノメデュリン(adrenomedullin, ADM)、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin-gene-related-peptide, CGRP)などのペプチドが注目されている。ET-1は、炎症促進、血管・気管支平滑筋収縮、エイコサノイド産生、サイトカイン産生刺激能を有することが報告されている(T. Nagase. *Am. J. physiol.* 1995)。一方、CGRPは、炎症抑制、血管・気管支平滑筋の拡張・弛緩作用を有しており(T. Nagase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 1551-1556, 1996)、また気道過敏性への関与も指摘されている(Tomoko Aoki-Nagase, T. Nagase, H. Yamamoto. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283: L963-970, 2002)。ADMはCGRP同様の血管拡張物質であるが(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30; 192: 553-560, 1993)、そのmRNAは肺に多く発現しており、肺において何らかの生理的作用を果たしているものと推測される。ADMは、遺伝子欠損によって胎生死を生じ発生に不可避の遺伝子であることが示されている。死亡胚では、肺出血が確認されており、肺の形態、機能維持にも不可避である可能性が推測される。しかし、動脈硬化や腎障害に関する検討はすすんでいるが、呼吸器領域では喘息の病態に関する研究がわずかにあるのみで肺血管機能、呼吸器疾患における病態は不明である。

そこで私は先般、代表的な気道炎症疾患である気管支喘息におけるADMの関与を検討するため、ADMヘテロ接合体遺伝子欠損マウス(ADM-KOマウス)とその同腹子を用いて卵白アルブミン感作気管支喘息モデルマウスを作製し、気管支喘息の発症分子機序におけるADMの役割を検討し、その画期的な成果を学術誌に報告した(H. Yamamoto. *J Appl Physiol* 102; 2361-2368, 2007)。

このマウスにおけるメサコリン気道反応性を調べたところ、ADM-KOマウスの気道過敏性が有意に亢進していることが確認された。古典的な気管支喘息の発症機序にかかわる好酸球浸潤の程度や杯細胞の過形成と粘液過分泌の程度、血清IgE抗体や各種サイトカイン、メディエーターの濃度にはいずれも有意な差を認めないにもかかわらず、気道周囲の平滑筋細胞層の面積と同層の有核細胞数は明らかにADM-KOマウスで増加していた。以上の実験結果から、ADM遺伝子発現の低下が喘息性気道炎症と関連する平滑筋細胞の増生、リモデリングを招来する因子となりうると考えられ、また逆にADMが喘息における気道リモデリングを抑え、正常な気道修復機転を維持させているものと推測した。

研究目的(つづき)

この研究成果から、呼吸器系におけるADMの作用は気管支拡張作用という、単なる生理学的な作用にとどまらず、気道平滑筋の増生を抑えて気道のリモデリングを防ぐ、気道の保護作用があることが推測される。このことは最近さかんに報告されている心血管、腎に対する保護効果、抗アポトーシス効果(*Hypertens. Res.* 26; Suppl:S99-104, 2003)、酸化ストレスの軽減(*Circulation* 105; 106-111, 2002)といったはたらきとも相同性がある。そこでわれわれは好中球やマクロファージ、CD4陽性T細胞を中心とした気道炎症の進展過程に対するADMの役割を示すため、まずこれらの病態を示すことが多いとされる高齢者におけるADMの役割を高年齢マウスを用いて検討した。

まず、高齢マウスとして22ヶ月齢のADM遺伝子改変マウス(Old ADM-KO)およびその同腹子、コントロールとして12週齢のADM遺伝子改変マウス(Young ADM-KO)およびその同腹子を準備し、それぞれにおける肺機能、組織学的変化を検討した。まず肺機能については、Old miceにおける残気量(RV)、残気率(RV/TLC)の有意な増加が認められた。一方、組織学的な検討の結果、平均肺胞間距離(Lm)がOld miceにおいて有意に長く、肺胞面積や破壊指数(DI)については有意な差を認めなかった。いずれもADM遺伝子改変の有無とは関連を見出せなかった。以上の結果から、高齢化により、肺の弾性収縮力が低下してエアートラッピングを生じさせる結果、残気量の増加やLmの増加を来しているが、肺胞の破壊という点では高齢化の影響は少ないものと判断された。つまり、高齢化のみでは肺は形態学的に肺気腫の形態を示さず、むしろ末梢の気腔のみが拡大した「老人肺」の所見を示すことが示された。COPDは喫煙などの曝露が原因で加齢とともに発症する疾患であり、私の仮説を臨床に即して評価す

るためには比較的中高齢のマウスに対して喫煙曝露やエラストアーゼ負荷を行って肺気腫の発生を評価することが合理的と判断した。

とくに肺気腫、ARDSのような炎症反応、酸化ストレスが病態に寄与する疾患において、ADMが疾患の発症、進展を防ぎ、再生を促すことができるのであれば、きわめて画期的である。本研究では、このADM遺伝子の呼吸器疾患発症機序への関与について明らかにし、治療法開発への基礎をつくる。

2. 研究の目的

肺の生理的老化と慢性喫煙負荷による肺気腫形成に対する、アドレノメデュリンの生理的意義を検討する。慢性喫煙負荷による肺気腫形成がアドレノメデュリンの投与で抑制されるかどうかを検討し、その治療薬としての可能性を探索する。

3. 研究の方法

<アドレノメデュリン遺伝子改変マウスの作製>実験にはヘテロ接合体ノックアウトマウスを用いた。遺伝的背景を均一にするため、C57BL6/Jマウスへのバッククロスを5代まですすめた(97%に純化)。

<肺気腫形成における加齢、およびADM遺伝子発現の関与に関する検討>AM-KOマウス、およびその同腹子(野生型)において慢性喫煙負荷を行った。

① 22ヵ月齢の高齢AM-KOマウスとその同腹子各36匹に対して、以下の方法で検討する。マウス喫煙装置TE-10(Teague Enterprises, CA)を用いて、1日3時間を週5日、1日あたり100本前後の規格されたタバコ(The Reference Cigarette 3R4F, University of Kentucky, KY)を同時喫煙させた。② 対照群として、12週齢の若齢AM-KOマウスとその同腹子各36匹に対しても同様の負荷を行った。喫煙する期間によって、以下のように各群にわけ検討した。A) 4週間喫煙負荷し、検討、B) 4週間喫煙負荷、その後経過観察のみ8週間行い、検討、C) 4週間喫煙負荷、その後経過観察のみ12週間行い、検討、D) 12週間喫煙負荷し、検討、E) 12週間喫煙負荷、その後経過観察のみ12週間、検討、F) 24週間喫煙負荷し、検討。

<具体的な方法>ketamine 100mg/kg体重、およびxylazine 100mg/kg体重の腹注によりマウスを全身麻酔した。呼吸状態に注意しつつ気管切開、気管内挿管し、小動物用呼吸機能解析装置(Buxco社)による人工呼吸管理下においた。規定の方法で機能的残気量を測定した後、全肺気量位まで拡張させた肺からごく少量ずつ呼出させて準静的肺圧量曲線を求めた。これにより、閉胸下における肺気量分画、静的呼吸器系コンプライアンスを算出

した。つぎに全肺気量位から急速に呼出させ、最大呼出流速流量曲線(MEFV curve)を作図し、0.1秒量を算出した。さらに経腹アプローチにより横隔膜を切開、胸腔を外気と交通させた。この際、すぐに再び人工呼吸管理下におき、改めて準静的肺圧量曲線を求め、閉胸下における肺気量分画、静的肺コンプライアンスを求めた。得られた肺機能データは統計ソフト(Dr. SPSS II)上で解析し、比較検討した。人工呼吸器からマウスを外し、気管内チューブを介してPBS 1mL×5回の気管支肺胞洗浄を行った。肺胞洗浄液は氷上におき、同日中に有核細胞数、細胞分画の算定を行って比較検討した。腹部大動脈からの全血採血により脱血し、採血検体は血清分離を行った上で測定に供するまで-80℃に保存した。肺を摘除し、25cmH₂Oで定圧灌流固定を行った。固定灌流液はリン酸緩衝ホルマリン液を用いた。48時間程度固定後の肺は切り出して切片を作成し、HE染色標本、およびマッソントリクローム染色標本を作製した。平均肺胞間距離(mean linear intercept, Lm)、破壊係数(destructive index, DI)、平均肺胞面積(SA)を算出し、得られた各指標について、比較検討した。一部の肺については凍結検体とし、さまざまな遺伝子の発現や蛋白の発現を検討するために、免疫染色に供した。

4. 研究成果

高齢マウスとして22ヶ月齢のAM遺伝子改変マウス(Old AM-KO)およびその同腹子、コントロールとして12週齢のAM遺伝子改変マウス(Young AM-KO)およびその同腹子を準備し、それぞれにおける肺機能、組織学的変化を検討した。まず肺機能については、Old miceにおける残気量(RV)、残気率(RV/TLC)の有意な増加が認められた。一方、組織学的な検討の結果、平均肺胞間距離(Lm)がOld miceにおいて有意に長く、肺胞面積や破壊指数(DI)については有意な差を認めなかった。いずれもAM遺伝子改変の有無とは関連を見出せなかった。以上の結果から、高齢化により、肺の弾性収縮力が低下してエアートラッピングを生じさせる結果、残気量の増加やLmの増加を来しているが、肺胞の破壊という点では高齢化の影響は少ないものと判断された。つまり、高齢化のみでは肺は形態学的に肺気腫の形態を示さず、むしろ末梢の気腔のみが拡大した「老人肺」の所見を示すことが示された。この機序について、肺胞上皮細胞のapoptosisがOld miceにおける気腔の拡大に関与している可能性を考え、TUNEL染色による免疫組織化学的検討を行った。しかし、Old miceとYoung miceの間で有意な差は得られなかった。したがって、今回のマウスモデルにおいてはapoptosis以外の機序で「老人肺」気腔の拡大が生じることが間接的に示

された。肺胞の破壊を伴わない気腔拡大の原因としては、何らかの原因による auto PEEP の存在などが想定されるが、詳細については今後の研究課題となった。

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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

山本 寛 (YAMAMOTO HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10361487

(2) 研究分担者

長瀬 隆英 (NAGASE TAKAHIDE)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 40208004

山口 泰弘 (YAMAGUCHI YASUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 40208004

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: