

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591110

研究課題名(和文) 気管支喘息、COPDの病態における組織因子(TF)、第7因子(F7)の関与

研究課題名(英文) Associations of TF and F7 with pathogenesis of asthma and COPD

研究代表者

今野 哲 (Konno, Satoshi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：20399835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：2種類のマウス喘息モデルにおいて、気管支肺胞洗浄液(BALF)中、全肺組織において、組織因子(TF)、第7因子の発現が亢進していることを確認した。更には、同モデルにおいて、TF-第7因子阻害作用を有するF7 inhibitorを腹腔内投与したところ、BALF中の好酸球細胞数の減少、OVA特異的IgE抗体の低下、及び気道過敏性の改善を確認した。以上の結果は、F7 inhibitorの気管支喘息の新たな治療法の可能性を示唆するものと考えられた。遺伝子多型研究においては、症例(喘息)-対象研究において、凝固系カスケードに関連する種々の遺伝子(TF, F2R, CC16, CAT)に存在するのSNPsと気管支喘息との関連を見出した。

研究成果の概要(英文)：Levels of tissue factor(TF) and factor7 in BALF were significantly increased after OVA challenge in two murine models of asthma (acute and chronic models). Intraperitoneal administration of TF-factor7 inhibitor significantly decreased the number of eosinophils in BALF, OVA-IgE levels in serum and bronchial hyperresponsiveness in these models, suggesting the potential of TF-factor7 as a novel therapeutic target for asthma treatment. In genetic studies, we conducted case (asthma)-control studies for several genes related with coagulation cascade, including TF, F2R, CC16 and CAT and significant associations of several SNPs in these genes and asthma were identified.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患

## 1. 研究開始当初の背景

種々の慢性炎症性疾患の炎症局所では、凝固系カスケードが亢進していることが知られている。この凝固系の亢進は、単に炎症の結果のみならず、疾患の病態にも深く関与している事が報告されている。慢性気道炎症を特徴とする気管支喘息、COPD においては、気道局所における凝固系の亢進を示唆する報告があるが、病態に及ぼす意義については明らかではない。

本研究の着想に至った背景には、本研究代表者である今野が、凝固系関連遺伝子に存在する遺伝子多型(SNP)と気管支喘息との関連を報告したことに始まる。ひとつは、PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1)遺伝子のプロモータ領域に存在する機能的遺伝子多型が気管支喘息の発症に関与することを報告した(Clin Exp Allergy 2006)。また、凝固系活性の初期因子(initiator)である組織因子(Tissue Factor: TF)遺伝子のプロモータ領域に存在する多型(-603A/G)において、G allele は TF 遺伝子の転写活性が高く、気管支喘息の発症と関連することを報告した(J Hum Genet 2010)。この2つの機能的遺伝子多型と喘息発症との関連は、凝固系の亢進が気管支喘息の病態に関与している事を示唆する。

## 2. 研究の目的

以上の背景を基に、本研究では、慢性気道炎症を特徴とする気管支喘息、COPD に着目し、主に、マウスモデルを用いた抗凝固因子製剤の効果を中心に、凝固系カスケードの亢進が両疾患の病態に及ぼす影響について検討する事を目的とする。凝固系関連分子の中でも、特に、凝固系カスケード亢進の initiator である組織因子(Tissue Factor)、第 因子(F )及び、その受容体である Protease activated receptor(PAR)に注目し、気管支喘息、COPD との関連を検討し、最終的には、これらの分子をターゲットとした、両疾患の新たな治療薬の探索を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス喘息モデルにおける組織因子(Tissue Factor)、第 因子(F )の関与

卵白アルブミン(OVA)を用いて2つの喘息モデル(急性好酸球性気道炎症モデル、慢性気道リモデリングモデル)を作成する。両モデルにおいて、気管支肺胞洗浄液(BALF)

中、全肺組織における、組織因子(TF)、第 因子の発現を確認する。また、免疫染色により、TF、第 因子の発現細胞を確認し、更には、TF、第 因子発現の受容体である Protease activated receptor (PAR)の発現についても、Flow cytometry (FCM)、免疫染色にて確認する。更に、TF-第 因子が気管支喘息の病態に及ぼす意義を検討するために、TF-第 因子阻害作用を有する F ai を腹腔内投与し、急性好酸球性気道炎症モデルにおいては、BALF 中の好酸球数に与える影響、OVA 特異的 IgE 産生に与える影響、気道過敏性に与える影響を検討する。

慢性好酸球性気道炎症モデルにおいては、上記に加え、病理組織を用いた基底膜、気道平滑筋の増生に与える影響を検討する。当科では、マウスモデルを用いた喘息病態解明の研究に長年携わっており、特に、気道過敏性の測定においては、マウス気道過敏性測定装置(Buxco Electronics, Inc.)を有しており、同機器を用いた業績を報告しており、このノウハウを最大限に活用する。

### (2) マウス喫煙曝露モデルを用いた、肺気腫形成における組織因子(Tissue Factor)、第 因子(F )の関与

当科では、マウス喫煙曝露装置(SIS-C型、柴田科学社製)を有しており、既にマウス肺気腫モデルが確立されており、これまで多くの論文を発表している。本研究では、これらの経験を活かし、同機器を用いてマウスに喫煙曝露をおこない、急性期、慢性期における、BALF中、肺組織におけるTF、第 因子、PARの発現を検討する。更には、喘息モデル同様に、F ai を腹腔内投与し、F ai 投与が、喫煙による肺の急性炎症、肺気腫の形成に及ぼす影響について検討し、COPDの病態における凝固系亢進の意義について検討する。

### (3) 遺伝子多型研究

当科では、これまで長年にわたり、気管支喘息、COPDに関する遺伝子多型研究を遂行してきた。既に、健常者のDNA検体800、気管支喘息患者600、COPD患者300を既に有している。本研究に関連しては、過去にPAI-1(plasminogen activator inhibitor-1)遺伝子のプロモータ領域に存在する機能的遺伝子多型と気管支喘息の発症との関連、凝固系活性の初期因子(initiator)である組織因子(Tissue Factor: TF)遺伝子のプロモータ領域

に存在する多型(-603A/G)と気管支喘息発症と関連を報告した。

本研究では、TF、第 因子発現の受容体である Protease activated receptor (PAR)遺伝子、他の関連因子(CC16、CAT、PAR1-4、第 因子、第 因子など)に着目し、それぞれの遺伝子に存在する多型と疾患との関連についても検討する。更には、遺伝子多型の機能的意義を検討する為に、ルシフェラーゼを用いた転写活性の検討、EMSA による転写因子と DNA の結合能についても検討する。

#### 4. 研究成果

(1) マウス喘息モデルにおける組織因子(Tissue Factor)、第 因子(F )の関与

2 つのマウス喘息モデル(急性好酸球性気道炎症モデル、慢性気道リモデリングモデル)において、気管支肺胞洗浄液(BALF)中、全肺組織において、組織因子(TF)、第 因子の発現が亢進していることを確認した。更には、急性モデルにおいて、TF-第 因子阻害作用を有する F ai を腹腔内投与したところ、BALF 中の好酸球細胞数の減少、OVA 特異的 IgE 抗体の低下、更には気道過敏性の改善を確認した。また、BAL 中の好酸球数と TF 濃度との間に正の相関を認めた。

いっぽう、慢性モデルにおいては、現時点では、F ai の腹腔内投与によっても、明らかな気道線維化所見の改善効果は認めない。この原因として、同薬剤の投与量、薬剤投与の時間的タイミング等が考えられ、現在これらを調節の上、更なる研究を進めていく必要がある。

いずれにしても、急性モデルにおいて、同薬剤が好酸球性気道炎症を改善させる効果は明らかであり、気管支喘息の新規薬剤としての F ai の効果が期待される。今後は、同薬剤が好酸球性炎症を抑制するメカニズムを検討するために、in vitro の系での検討を進める予定である。具体的には、気道上皮細胞、気道平滑筋細胞を用い、IL-4 や TNF の刺激に対する eotaxin、RANTES の産生に対する F ai の効果、また好酸球の遊走能に対する F ai の効果を検討する予定である。

(2) マウス喫煙曝露モデルを用いた、肺気腫形成における組織因子(Tissue Factor)、第 因子(F )の関与

マウス肺気腫喘息モデルにおいては、喫煙曝露急性期(1週)、慢性期(4か月)におい

て、気管支肺胞洗浄液(BALF)中、全肺組織において、組織因子(TF)、第 因子の発現が亢進していることを確認した。今後は、喘息モデル同様に F ai を腹腔内投与し、同薬剤が、喫煙曝露における急性炎症、肺気腫の形成に与える影響を検討する予定である。

#### (3) 遺伝子多型研究

Protease activated receptor (PAR-1)遺伝子(F2R)

これまで、同遺伝子に存在する 3 つの SNP (rs32934, rs11267092, rs168753) と喘息との関連を見出した(0.005<P<0.05)。現在は、同遺伝子に存在するその他の Tag SNP を網羅的に検討する予定であり、更には、遺伝子多型の機能的意義を検討する為に、ルシフェラーゼを用いた転写活性の検討、EMSA による転写因子と DNA の結合能についても検討予定である。

#### PAR-2、第 因子遺伝子

HapMap にて公開されている、両遺伝子に存在するいくつかの多型に関し、気管支喘息、COPD との関連を検討した。しかしながら、両疾患の種々のフェノタイプを含めても、関連する多型は見出せていない。

Clara cell secretory protein(CC16)遺伝子

CC16 遺伝子のプロモータ領域に存在する -38C/G 多型と、若年健常者における気道過敏性、気管支喘息発症との関連を検討した。気道過敏性は、喘息を有さない 20 代の健常者において、Astograph<sup>R</sup>法を用いて評価した。その結果、同遺伝子多型における G アリルは、健常若年成人における気道過敏性(Dmin)と有意な関連を認め、G アリルを有すると気道過敏性が亢進していた。また、同アリルを有すると、血漿中の CC16 濃度が有意に低値であった。更に、同アリルは、気管支喘息との関連を認め、特に、40 歳以降で発症する中高年発症喘息の危険因子であった。

以上の結果より、同遺伝子は、血漿 CC16 濃度を規定し、気道過敏性の亢進を介し、中高年以降の喘息の発症に關与することが推測された。尚、本研究内容は右記論文として報告した。(Taniguchi N, et al. Ann Asthma Allergy Immunol 2013)

#### Catalase(CAT)遺伝子

同遺伝子プロモータ領域に存在する -262A/T 多型と気管支喘息の発症、及び

COPD の病態との関連性を検討した。同遺伝子多型において、T アリルを有した場合、気管支喘息全体に対しては、その関連性を見出せなかった。しかし、喫煙者においてのみ検討したところ、同アリルは、成人以降の喘息発症の危険因子であることを見出した。更に COPD においては、同アリルを有すると、有意に気腫 CT スコアが低値であり、つまり、非気腫型の COPD との関連性を認めた。

以上の結果により、喫煙者における成人発症喘息と非気腫型の COPD との間の共通病態の存在が推測され、その一部に CAT 遺伝子が関与していると考えられた。この研究内容は、右記論文として報告した。(Taniguchi N, et al. Ann Asthma Allergy Immunol 2014)

#### 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 2 件 )

- 1 Taniguchi N, Konno S, Isada A, Hattori T, Shimizu,K, Kimura H, Maeda Y, Makita H, Huang SK, Hizawa N, Nishimura M. CAT -262 C>T polymorphism is associated with asthma in smokers and with a nonemphysematous phenotype of chronic obstructive pulmonary disease. Ann Allergy Asthma Immunol. 2014 in press. (査読あり)
- 2 Taniguchi N, Konno S, Hattori T, Isada A, Shimizu K, Shimizu K, Shijubo N, Huang SK, Hizawa N, Nishimura M. The CC16 A38G polymorphism is associated with asymptomatic airway hyper-responsiveness and development of late-onset asthma. Ann Allergy Asthma Immunol. 2013;111:376-381. (査読あり)

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

- 1 谷口菜津子：カタラーゼ遺伝子(CAT)多型が気管支喘息発症に及ぼす影響  
日本アレルギー学会秋季学術集会  
2012 年 11 月 30 日  
グランキューブ大阪 ( 大阪市 )
- 2 谷口菜津子、今野哲、高橋大輔、服部健史、檜澤伸之、西村正治：Clara cell 10kDa protein(CC10)遺伝子多型が気道過敏性、

喘息発症に及ぼす影響

日本アレルギー学会秋季学術大会

2011 年 11 月 10 日

京王プラザホテル ( 東京 )

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

今野 哲 ( KONNO SATOSHI )

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：20399835

##### (2)研究分担者

伊佐田 朗 ( ISADA AKIRA )

北海道大学・北海道大学病院・特任助教

研究者番号：80374289

南須原 康行 ( NASUHARA YASUYUKI )

北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号：30322811

##### (3)連携研究者

なし