

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591183

研究課題名(和文)一酸化窒素合成酵素完全欠損マウスでの胞隔炎及び気腫性変化の機序的検討

研究課題名(英文)Evaluation of the mechanism of inflammatory and emphysematous change in n/i/e triply NOS knockout mice

研究代表者

矢寺 和博 (YATERA, Kazuhiro)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40341515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：各種呼吸器疾患における血清一酸化窒素(NO)の意義を解明するために、n/i/eの3種類すべての一酸化窒素合成酵素(NOS)を欠失させたトリプルNOSノックアウトマウスを用いて検討を行った。その結果、プレオマイシン投与による肺線維化モデルでは、NO/NOSシステムは保護的な役割を果たす可能性が示唆された。また、肺炎球菌による細菌感染モデルにおいても同様にNOは保護的な作用をきたす可能性が示唆された。これらの結果より、NOは肺の炎症に対して保護的な作用を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in several respiratory disorders, we performed bleomycin-induced pulmonary fibrosis and bacterial pneumonia induced by intratracheal administration of bacteria to evaluate the roles of nitric oxide (NO) in several respiratory disease using mice lacking all three isoforms of n/i/e (nitric oxide synthase; NOS). As a result, n/i/e (nitric oxide synthase; NOS) that all of NOS were deficient, showed protective effects of NO in bleomycin-induced pulmonary fibrosis model, and similar protective effect of NO in bacterial pneumonia model that NO has protective effect on bleomycin-induced pulmonary fibrosis and bacterial pneumonia in mice.

研究分野：呼吸器感染症、アレルギー

キーワード：一酸化窒素 肺線維化 肺高血圧 マウス 保護的作用

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 合成酵素 (NO synthase: NOS) は誘導型 (inducible NOS; iNOS)、神経型 (neuronal NOS; nNOS)、内皮型 (endothelial NOS; eNOS) の3種類のアイソフォームで構成されるシステムである。研究協力者の筒井らは、NOSシステムに由来するNOの役割の解明のため、これらの3つの個々のNOSアイソフォームのシングルノックアウトや2つの組み合わせのダブルノックアウトマウスに加え、すべてをノックアウトしたNOS完全欠損マウス (トリプルn/i/eNOS ノックアウトマウス) を2006年に世界に先駆けて創出し発表した。これまでの多くの報告により、NOは全身の生命現象に深く関与していることが明らかにされている。

一方で、iNOS、eNOS、nNOS シングルノックアウトやi/e、i/n、e/nNOS ダブルノックアウトマウスでは、それぞれのNOSの生体内での意義や働きを解明するモデルとはなるものの、残ったNOSがNOの産生を補填するため、本来のNOやNOSの生体内での意義が分かりづらい点もある。このトリプルn/i/eNOSノックアウトマウス (NOS完全欠損マウス) の最も大きな意義としては、生体内のNOが99%まで産生が抑制されることにより、NO自体の生体内での本来の働きが解明できる点である。

これまでに、このトリプルn/i/eNOSノックアウトマウスモデルは心筋梗塞、脂質代謝異常などの主に循環器系におけるNOの役割の解析を中心とした研究に用いられ、NOS完全欠損マウスでのみ高脂血症の増悪 (Yatera Y, et al. *Cardiovasc Res*: 87; 675-682, 2010)、動脈硬化の増悪 (Furuno Y, et al. *Nitric Oxide*: 25; 350-359, 2011) が招来されることが報告されている。このように、NOS阻害薬やこれらのノックアウトマウスモデルを用いた研究によりNO、NOSの研究が飛躍的に進歩している。

一方で、呼吸器系における変化として、トリ

プルn/i/eNOSノックアウトマウスでは、自然経過で胞隔炎や気腫性変化、気道上皮の肥厚や気道分泌物の異常が認められており、呼吸器系におけるNOやNOSが胞隔炎や気道病変、気腫性変化をきたす多くの呼吸器疾患の病態生理に深く関与している可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では、慢性呼吸器疾患 (間質性肺炎、肺気腫、気管支喘息、慢性下気感染症) におけるNOの役割を明らかにするため、合計7種類のi、e、nNOS シングルノックアウトやi/e、i/n、e/nNOS ダブルノックアウトおよびNOS完全欠損マウス (トリプルn/i/eNOS ノックアウトマウス) を用い、ブレオマイシン投与による間質性肺炎モデルの作成などを行い、各種呼吸器疾患の機序を明らかにする。また、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) で注目される上肺野に気腫性病変と下肺野に線維化病変が混在するCPFE (combined pulmonary fibrosis and emphysema) や、終末細気管支より末梢の気腔拡大の病態に線維化を合併したAEF (airspace enlargement with fibrosis) と呼ばれる病態の疾患モデルとしても、胞隔炎や線維化、気腫性変化、気道病変などの病態におけるNO、NOSの役割を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) ブレオマイシンによる胞隔炎や線維化の評価

野生型 (C57/BL6) マウス、iNOS、eNOS、nNOS シングル NOS ノックアウトマウス、トリプル NOS ノックアウトマウスにブレオマイシン8mg/kg 10日間連日腹腔内投与を行い、ブレオマイシン最終投与14日後に肺の炎症と線維化の病理学的評価を行う。また、n/i/eNOS<sup>-/-</sup>トリプルノックアウトマウスにNO補充を行うことによる効果を併せて評価する。

### (2) 細菌感染による肺および気道炎症の評価

野生型 (C57/BL6) マウス、iNOS、eNOS、nNOS シングル NOS ノックアウトマウス、トリプル NOS ノックアウトマウスに肺炎球菌  $10^7$ /CFU を経気管的に肺内に注入して感染させ、1、2、7 日目の肺の炎症の病理学的評価を行う。

(3) 気腫性病変 (COPD) の病態における評価

野生型 (C57/BL6) マウス、iNOS、eNOS、nNOS シングル NOS ノックアウトマウス、トリプル NOS ノックアウトマウスにブタの腭エラスターゼを経気管的に肺内に注入し、投与 21 日目に気腫性変化の評価を行う。

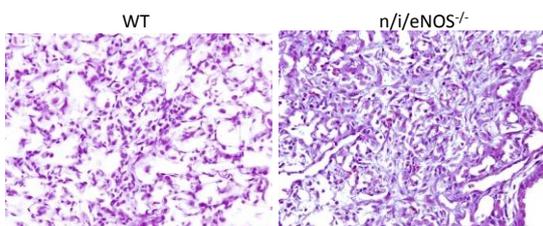
(4) 気管支喘息の病態における評価

野生型 (C57/BL6) マウス、iNOS、eNOS、nNOS シングル NOS ノックアウトマウス、トリプル NOS ノックアウトマウスに ovalbumin (OVA)  $20 \mu\text{g}$  を1日目及び14日目に腹腔内投与して感作させ、26、27、28 日目に1%OVA吸入を行い喘息モデルを作成し、30日目に肺や気道の病理学的な検討および各種サイトカイン、ケモカインの発現の検討を行う。

4. 研究成果

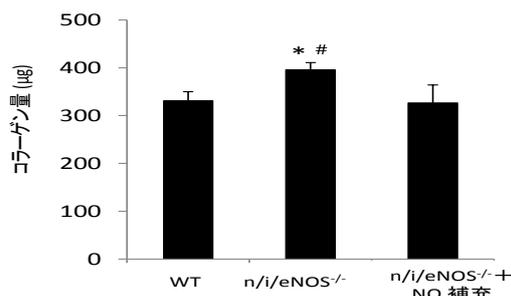
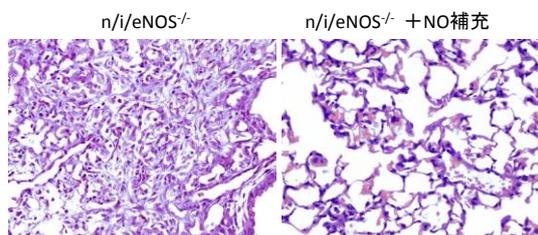
(1) 胞隔炎や線維化の評価

肺における NO の胞隔炎、線維化に対する役割を検討するために、ブレオマイシンの投与による検討を行った。その結果、トリプル NOS ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して図のように肺線維化の進行を認め肺線維化スコアや肺内コラーゲン量が増加した。



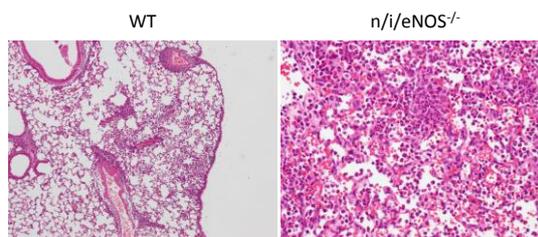
また、炎症性サイトカインや線維化促進因子 (TGF- $\beta$  など) も上昇した。さらに、これらの所見は NO の補充療法により抑制された。

シングル NOS ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して有意な差は認められず、各 NOS 間に代償的作用がある可能性が示唆された。



(2) 細菌感染による肺および気道の評価

細菌感染と NO との関係では、肺炎球菌を気管内投与し、肺の炎症の病理学的評価を行った。その結果、トリプル NOS ノックアウトマウスでは肺炎の所見の悪化やマウスの死亡率の悪化の可能性が示唆されている結果が得られているが現在も継続して検討中であり、今後さらなる検討を予定している。



(3) 気管支喘息における評価

一方で、気管支喘息と NO の関係では、トリプル NOS ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、気道上皮細胞、特に杯細胞における気道分泌の軽減や気道の好酸球を主体とした炎症細胞浸潤、気管支壁肥厚、気道リモデリングの軽減を認めた。この結果は、肺線維症モデルや細菌性肺炎モデルでみられた NO の炎症における保護的作用とは逆の結果であるが、肺炎症性疾患とアレルギー性病態における NO の作用の違いによること

も推測され、異なる条件における NO や NOS 働きの違いであることが示唆され、NO、NOS を中心とした詳細な病態生理を解明する研究を継続して行っている。

これらの結果より、これまで NO 自体の肺や気道の病態における役割については十分に解明されていなかったが、NOS 完全欠損マウスを用いることにより、各種肺疾患における NO 自体の本質的な役割について評価することが可能であった。

## 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 2 件)

- ① Noguchi S, Yatera K, et al. (13 人 2 番目) Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. *Respiratory research*; 5: 92, 2014. (査読有)
- ② 矢寺和博、迎 寛. 呼吸器疾患における一酸化窒素 (NO) と一酸化窒素合成酵素 (NOS) の役割. *アレルギーの臨床* 35(6):83-87, 2015 (査読無)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 生越貴明, 矢寺和博, 他. NO 合成酵素完全欠損マウスを用いた低酸素性肺高血圧症における NO の役割の検討. 第 55 回日本呼吸器学会学術集会 (2015. 4. 17-19, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区)
- ② 野口真吾, 矢寺和博, 他. NO 合成酵素完全欠損マウスを用いたブレオマイシン肺線維化モデルにおける NO の役割の検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術集会 (2014. 4. 25-27, 大阪国際会議場, 大阪府大阪市)

- ③ 野口真吾, 矢寺和博, 他. NO 合成酵素完全欠損マウスを用いたブレオマイシン肺線維化モデルにおける NO の役割の検討. 第 13 回日本 NO 学会総会 (2013. 6. 28, 沖縄県医師会館, 沖縄県南風原町)
- ④ 赤田憲太郎, 矢寺和博, 他. i/n/eNOS トリプルノックアウトマウスを用いた気管支喘息における NO および各 NOS 愛想フォームの役割の検討. 第 13 回日本 NO 学会総会 (2013. 6. 28, 沖縄県医師会館, 沖縄県南風原町)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢寺和博 (YATERA, Kazuhiro)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40341515