

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461191

研究課題名(和文) ヒトMUC1発現マウスを用いた肺障害モデルにおけるバイオマーカーの動態解析

研究課題名(英文) Analysis of lung injury models by using human MUC1 transgenic 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) 3,900,000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上の糖蛋白である。KL-6は間質性肺炎の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ため、動物モデルでは測定できなかった。我々は、ヒトMUC1を発現しているhMUC1-Tgマウスに着目した。我々は本マウスがKL-6を発現していることを見出し、本マウスを用いて様々な肺障害モデルを作成しKL-6が本動物モデルにおいてもバイオマーカーとして働くか詳細に検討した。KL-6は肺障害の種類や程度に応じ変動しバイオマーカーとして働き、他のバイオマーカーの変動と差があることが明らかになった。今後の肺障害研究への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：KL-6, an epitope of MUC1 expressed mainly on type II pneumocytes in humans, is a sensitive marker for interstitial pneumonia. However, an in vivo model for KL-6 has not been established because no KL-6 epitope is expressed in animals other than humans and apes. To investigate whether KL-6 is detectable in human MUC1 transgenic mice and whether KL-6 level reflects the degree of lung injury, we examined levels of KL-6 and other biomarkers in a variety of lung injury models. KL-6 was expressed on type II pneumocytes and bronchiolar epithelial cells in naive hMUC1-Tg mice. Serum KL-6 levels in these mice were comparable to those in humans, and KL-6 levels in BALF were significantly higher than those in sera. 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. This hMUC1-Tg mouse can be used for assessment of KL-6 in vivo during lung injury.

研究分野：呼吸器内科学

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

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、ヒトの型肺胞上皮細胞や細気管支上皮細胞に発現している。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。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) マウスに着目した。本マウスはヒトMUC1をヒトと同様の臓器に同様のレベルで発現しており、ヒトMUC1に対して免疫寛容が成立しているため、腫瘍免疫療法の研究に用いられてきた。我々は予備実験で本マウスの血清やBALFを用いてKL-6を測定したところ、ヒトの正常値レベルの発現があることを見出したため、本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検討した。

2. 研究の目的

本研究課題では、hMUC1-Tg マウスがどの程度KL-6を発現しているのか、本hMUC1-Tg マウスを用いて様々な肺障害モデルを作成した際にKL-6がバイオマーカーとなりうるのか、他のバイオマーカーと変動に差があるのか、そしてhMUC1-Tg マウスを用いた肺障害モデルが新たなモデルになりうるのかを検討することを主な目的として実施した。

3. 研究の方法

(1). naïve な hMUC1-Tg マウスにおける KL-6 発現

本研究に用いた hMUC1-Tg マウスは自家繁殖させ genotyping を行い確認したのち使用した。naïve な hMUC1-Tg マウスと野生型 (Wt) マウスを用いて、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。また、マウス線維芽細胞を培養し KL-6 蛋白を添加し増殖能・遊走能を検討した。hMUC1-Tg マウスと Wt マウスの肺組織を用いてマイクロアレイ解析を行い本マウスにおいて KL-6 発現に関連していると思われる遺伝子の同定を試みた。

(2). プレオマイシン (BLM) 肺障害モデル

hMUC1-Tg マウスと Wt マウスを用いて従来の方法 (単回経気管投与) で BLM 肺障害モデルを作成し、炎症期 (day 8)、線維化期 (day 22) に形態変化やコラーゲン量の測定を検討するとともに KL-6 発現の変動を ELISA、免疫組織化学、Western blot で検討した。他のバイオマーカーとして SP-D を ELISA で測定し比較検討した。

(3). リポポリサッカライド (LPS) 肺障害モデル

hMUC1-Tg マウスと Wt マウスを用いて従来の方法 (単回経気管内投与) で LPS 肺障害モデルを作成し、経時的な形態変化、SP-D の変化を検討するとともに、KL-6 の発現を ELISA、免疫組織化学、Western blot 法で検討した。

(4). シリカ肺障害モデル

hMUC1-Tg マウスと Wt マウスを用いて、シリカを単回気管内投与し、1, 2, 4, 8, 14, 16 週に sacrifice し、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。SP-D や periostin も測定し比較検討した。

(5). 型コラーゲン誘発モデル

ウシ型コラーゲンを hMUC1-Tg マウス背部に皮内投与し 2 週後に incomplete adjuvant とともに尾根部に追加投与することで、関節リウマチモデルを作成し肺障害を形態、血清 KL-6、BALF 中 KL-6、肺組織の免疫染色で KL-6 の変化を解析することを試みた。

(6). プリスタン肺障害モデル

hMUC1-Tg マウスと Wt マウスを用いて 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。SP-D や periostin も測定し比較検討した。

(7). エラスターゼ肺障害モデル

hMUC1-Tg マウスと Wt マウスを用いてエラスターゼ (porcine pancreas elastase) を単回気管内投与を行い、3 週後に sacrifice し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 中 KL-6 値、SP-D 値を測定し、肺組織の KL-6 発現を免疫組織化学、Western blot で検討した。

4. 研究成果

(1). naïve な hMUC1-Tg マウスにおける KL-6 発現

本マウスはヒト MUC1 遺伝子全体とその上流・下流領域を含んだ 10.6kb の断片が組み込まれており MUC1 を強制発現させるような工夫はされていない。そのため、本マウスでの MUC1 発現は臓器特異的に比較的生理的な発現パターンを再現している。免疫組織化学を用いた KL-6 の発現は主に型肺胞上皮細胞と細気管支上皮細胞ならびに肺胞被覆液 (ELF) 中に多くみられ、ヒト肺での局在と一致していた (図 1)。主として型肺胞上皮細胞から KL-6 が産生されていることが示された。naïve な hMUC1-Tg マウスの血清 KL-6

値は 221 ± 18 (U/mL)、BALF 中 KL-6 値は 2121 ± 129 (U/mL) であり、野生型は検出限界以下であった。

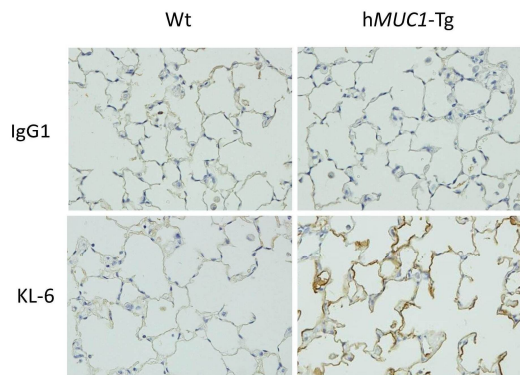


図1 肺組織の免疫染色
IgG₁: ネガティブコントロール

in vitro で本マウスおよび野生型マウスの線維芽細胞に KL-6 を添加し培養した結果、増殖能や遊走能の変化は認められず KL-6 蛋白にはマウスの線維芽細胞刺激作用はないと考えられた。高齢 hMUC1-Tg マウスの肺も検討したが、Wt マウスと比較し線維化を来しやすいとは言えず、産生される KL-6 はマウスの線維芽細胞刺激作用はないと考えられた。また、マイクロアレイ解析の結果発現差のあった遺伝子群の中で糖転移酵素の *B4gal t6* が絞り込まれ、リアルタイム PCR でも発現の差が示された。今後機能解析を行う予定である。

(2). BLM 肺障害モデル

hMUC1-Tg も Wt マウスと同様に day 8 に炎症、day 22 に線維化をきたし形態的にもコラーゲンの産生も両者に差はなかった。SP-D の変動も hMUC1-Tg と Wt の間に差はなかった。hMUC1-Tg マウスの血清 KL-6 値は炎症期に約 10 倍 ($p < 0.001$) に上昇したが、BALF は 0.77 倍 ($p = 0.009$) に減少した。線維化期には血清 KL-6 は炎症期よりは減少したものの day 1 よりは高値であった ($p = 0.006$)。線維化期の BALF 中 KL-6 は day 1 の約 1.8 倍 ($p = 0.006$) に増加した (図 2)。

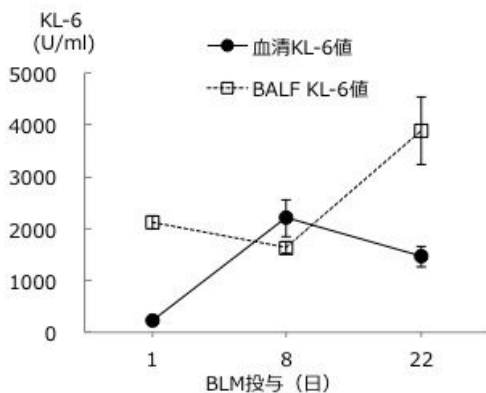


図2 BLM モデルにおける KL-6 値

BALF 中のアルブミン値は BALF 中の KL-6 と反対の変化を示し血清 KL-6 と BALF 中のアルブミン値の間には正の相関がみられた ($r = 0.767$, $p < 0.001$) (図 3)。

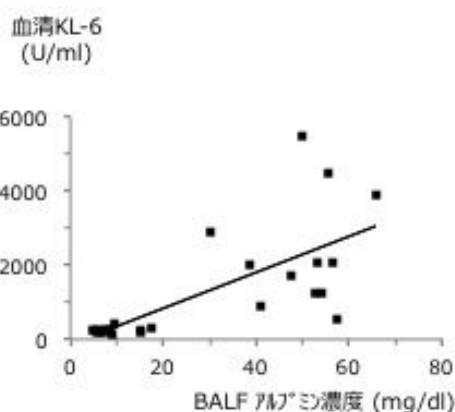
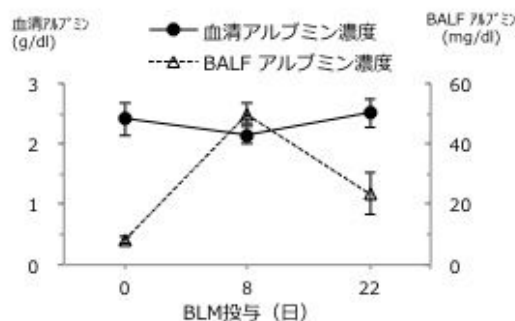


図3 血清 KL-6 と BALF アルブミンの相関

BALF 中の KL-6 と SP-D の変動には乖離がみられた。肺組織の Western blot 解析では線維化期の KL-6 の増加傾向ならびに MUC1 の有意な増加 ($p < 0.01$) を認めた。血中への KL-6 の移行は肺胞上皮障害によるバリア障害ならびに型肺胞上皮細胞における産生の亢進が考えられ、従来ヒトで言われていた機序を裏付ける興味深い結果が得られた。加えて、分子量の小さい SP-D と大きな KL-6 は変動に乖離がみられるなど間質性肺炎の臨床例で時に認められる所見を再現するような結果が得られた。

(3). LPS 肺障害モデル

hMUC1-Tg マウスも Wt マウスもともに 6~72 時間にかけて上昇する好中球性炎症を認め、形態的にも BALF 中の細胞にも両者に差は認められなかった。KL-6 値は血清で徐々に約 1.8 倍に増加し 72 時間後にピークを認めた ($p = 0.008$)。BALF でも同様に約 1.6 倍に増加し 72 時間後にピークを認めた ($p < 0.001$)。Western blot では KL-6 と MUC1 発現には有意な差は認められなかった。SP-D も徐々に増加し血清では 72 時間に BALF では 48 時間にピークを示した。

(4). シリカ肺障害モデル

本モデルは塵肺モデル、慢性炎症モデルとされている。経時的に血管周囲に炎症が生じ肉芽腫形成が観察された。hMUC1-Tg マウスと Wt マウスとの間に差はなかった。KL-6 発現は血清、BALF とともに二峰性の増加を示し、14 週に血清で 2.3 倍、BALF で 2.1 倍に増加した。SP-D も同様の変動を示したがピークに差があった(血清 1 週 3.6 倍、BALF 14 週 5.9 倍)。periostin は逆に血清で 1 週、14 週に低下傾向を示し、BALF 中にはほとんど検出できなかった。Western blot でも発現は同様であった。

(5). 型コラーゲン誘発モデル

本モデルでは形態的にも KL-6 値も有意な変化を認めなかった。本マウスが C57BL/6 背景であることが大きく関与していると考えられた。C57BL/6 背景は膠原病モデルになりにくいと考えられた。今後、本マウスと他系統マウスとのバッククロスを行い膠原病モデルを作成し再検討する予定である。

(6). プリスタン肺障害モデル

本モデルは膠原病特に 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泡出血を来し、4 週での生存率は 62.2% であった。C57BL/6 背景の本マウスは肺泡出血のモデルに適していることが明らかになった。hMUC1-Tg マウスと Wt マウスとの間に差はなかった。hMUC1-Tg マウスでは KL-6 は血清 (4.3 倍)、BALF (2.6 倍) とともに 4 週にピークがあり、SP-D も同様であったがピークに差があった (血清 4 週 10.4 倍、BALF 2 週 6.5 倍)。血清 periostin は 2 週に低下 (0.58 倍) したが BALF では微量の検出にとどまった。Western blot でも KL-6 発現は同様であった。

(7). エラストラーゼ肺障害モデル

エラストラーゼモデルは肺気腫モデルの一つである。病理学的に肺泡が破壊され気腫が形成された。hMUC1-Tg マウスと Wt マウスとの間に形態の差はなかった。hMUC1-Tg マウスの KL-6 値は血清で 0.79 倍、BALF で 0.8 倍に減少した。これらのことから肺が KL-6 の主な供給源であることが示唆された。

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、naïve な状態での血清 KL-6 はヒト血清の濃度と同程度であった。hMUC1-Tg マウスは Wt マウスと同様に様々な肺障害を呈するが、Wt と異なり 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本研究により明らかになった。hMUC1-Tg マウスを用いた肺障害モデルは新たな肺障害モデルになりうるということがわかった。他のバイオマーカーとは変動が異なる部分があった。実際の臨床における KL-6 の有用性を考慮すると、KL-6 を測定できる新しい

肺障害モデルの意義は大きく、今後様々な応用研究が考えられる。

<引用文献>

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.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Kubota T, Sakai M, Akita S, Kawase S, Ohnishi H, Yokoyama A. Analysis of lung injury models by using human MUC1 transgenic mice. *Am J Respir Crit Care Med* 査読有 193 巻 2016 年 pp.A4162.
http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/ajrccm-conference.2016.193.1_MeetingAbstracts.A4162

Kubota T, Okano Y, Sakai M, Kawase S, Ohnishi H, Yokoyama A, et al. (計15名) Carboplatin plus weekly paclitaxel with bevacizumab for first-line treatment of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 査読有 36 巻 2016 年 pp.307-312.
<http://ar.iiarjournals.org/content/36/1/307.abstract>

Ohnishi H, Miyamoto S, Kawase S, Kubota T, Yokoyama A. Seasonal variation of serum KL-6 concentrations is greater in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Bio Med Central Pulmonary Med* 査読有 14 巻 2014 年 pp.129-137.
doi: 10.1186/1471-2466-14-129.

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* 査読有 432 巻 2013 年 pp.460-465.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.123.

[学会発表](計5件)

Kubota T, Sakai M, Akita S, Kawase S, Ohnishi H, Yokoyama A. Analysis of lung injury models by using human MUC1 transgenic mice. American Thoracic Society (ATS) 2016年5月13日～18日 San Francisco, アメリカ合衆国.

酒井 瑞、窪田 哲也、秋田 慎、河瀬 成穂、大西 広志、横山 彰仁 ヒト MUC1 トランスジェニックマウスを用いた肺障害モデルの検討 第56回日本呼吸器学会学術講演会 2016年4月8日～10日 京都市 国立京都国際会館.

Ohnishi H, Takaoka M, Tsukuda T, Arakawa Y, Sakai M, Kawase S, Miyamoto S, Kubota T, Yokoyama A. Retrospective analysis of treatment strategy for drug-induced pneumonitis reflecting serum KL-6 level at diagnosis. American Thoracic Society (ATS) 2015年5月15日～20日 Denver, アメリカ合衆国.

Ohnishi H, Miyamoto S, Kawase S, Kubota T, Yokoyama A. Seasonal variation of serum KL-6 levels in patients with interstitial lung diseases. European Respiratory Society (ERS) 2014年9月6日～10日, Munich, Germany.

大西 広志、宮本 真太郎、河瀬 成穂、窪田 哲也、横山 彰仁 間質性肺炎における血清KL-6の季節変動 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014年5月9日～11日 京都市 国立京都国際会館.

〔図書〕(計1件)

窪田 哲也、横山 彰仁 KL-6 発現マウスモデル メディカルレビュー社 THE LUNG perspectives 査読無 22巻 2014年, 108(77-81)

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕 該当なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

横山 彰仁 (YOKOYAMA, Akihito)
高知大学教育研究部医療学系
臨床医学部門・教授
研究者番号：30191513

大西 広志 (OHNISHI, Hiroshi)
高知大学教育研究部医療学系
臨床医学部門・助教
研究者番号：90553876

(3) 連携研究者

酒井 瑞 (SAKAI, Mizu)
高知大学教育研究部医療学系
臨床医学部門・助教
研究者番号：40403886

河瀬 成穂 (KAWASE, Shigeo)
高知大学教育研究部医療学系
臨床医学部門・助教
研究者番号：80642058

宮本 真太郎 (MIYAMOTO, Shintaro)
高知大学教育研究部医療学系
臨床医学部門・助教
研究者番号：30633995
(H25-H26)