

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670398

研究課題名(和文) マクロファージ由来アポトーシス阻止因子(AIM)の難治性肺疾患の病態における役割

研究課題名(英文) Role of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in the pathogenesis of intractable lung diseases

研究代表者

西村 正治 (NISHIMURA, Masaharu)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00208224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブレオマイシン肺線維症モデルにおいて、AIM欠損マウスでは野生型マウスに比べてブレオマイシン投与14日後の肺の線維化が有意に抑制されていた。また、喫煙誘導性肺気腫モデルにおいて、16週間曝露後の肺の気腫性変化がAIM欠損マウスにおいて野生型マウスに比べて軽減しており、短期間の喫煙曝露における炎症関連の遺伝子発現も抑制されていた。本研究の結果は炎症性肺疾患においてAIMが増悪因子として寄与する可能性を示すとともに、AIMの呼吸器病態における創薬ターゲットならびに病態のバイオマーカーとしての可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In the bleomycin-induced lung fibrosis model, AIM-KO mice had significantly less lung fibrosis than wild-type mice on day 14 after bleomycin administration. Furthermore, in the cigarette smoke-induced emphysema model, AIM-KO mice had significantly less emphysematous change than wild-type mice after 16 weeks of cigarette smoke exposure, and had lower inflammatory gene expression levels after short-term cigarette smoke exposure. These results suggest that AIM plays a role as an aggravating factor in the pathogenesis of inflammatory lung diseases, and that AIM may be one of the potential therapeutic targets or biomarkers for lung diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 慢性閉塞性肺疾患 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

昨今の高齢化社会における代表的呼吸器疾患である慢性閉塞性肺疾患(以下 COPD)は全世界での主要な死因の一つであり、また有病率や死亡率が現時点のみならず将来に渡っても上昇し続けると予測されている。また、特発性肺線維症を代表とする特発性間質性肺炎には未だ有効な治療法が存在しない。これらの難治性肺疾患は患者の QOL や生命予後に影響するのみに留まらず、医療経済の観点からも社会的な脅威となっているが、いずれも根本的な治療法は未だ存在しない。

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) は組織マクロファージから分泌され、自らのアポトーシスを抑制する因子として発見されたが、その後の研究で AIM は動脈硬化の進展や脂肪組織での炎症と関連することが示された。さらに非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) との関係において AIM 欠損マウスでは高脂肪食で肝に炎症は生じないものの発癌と線維化が認められ、また AIM と自己免疫疾患との関連も示唆されている。COPD の病態にはマクロファージを中心とする炎症が大きく関わっており、自己免疫反応の関与も報告され、また COPD 患者の発癌リスクは高く、前述の病態における AIM の関わりと一致するところが多い。特発性間質性肺炎もその病態に線維化が大きく関わる。そこで、難治性肺疾患の病態に AIM が関与するとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

プレオマイシン肺線維症モデルおよび喫煙曝露肺気腫モデルを用いた動物実験によって難治性肺疾患の病態における AIM の意義を検討し、AIM が新たな治療標的となり得るかという点について検討する。

3. 研究の方法

(1) プレオマイシン肺線維症モデル

C57BL/6 に戻し交配した 8~10 週齢の AIM 欠損メスマウスと同週齢の野生型 C57BL/6 メスマウスを用い、プレオマイシンを MicroSprayer (Penn-Century) を用いて気道内投与し、投与後 7 日後、14 日後、28 日後にマウスを安楽死させ、生理食塩水による気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い肺内の炎症を評価するとともに、一定圧の 10%ホルマリンにて伸展固定した肺組織を用いて肺障害の程度を組織学的に評価した。その他、血液や肺組織を採取し、分子生物学的解析に用いた。

(2) 喫煙曝露肺気腫モデル

C57BL/6 に戻し交配した 8~10 週齢の AIM 欠損オスマウスと同週齢の野生型 C57BL/6 オスマウスに SIS-CS System (柴田科学) を用いて市販タバコ (Marlboro; Philip Morris) の主流煙を 15 ml x 12 回/分で吸引し圧縮空気で 5%に希釈したタバコを経鼻的に投与した。短期間喫煙曝露モデルでは 5%タバコ煙

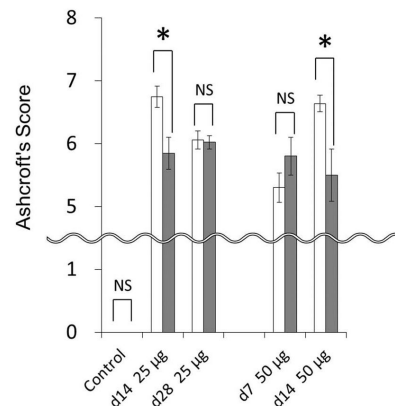
60 分曝露/日を 3 日間、1 週間、2 週間、4 週間施行した後にマウスを安楽死させ、生理食塩水による気管支肺胞洗浄を行い喫煙による肺内の炎症を評価した。また、長期間喫煙曝露モデルでは 5%タバコ煙 60 分曝露/日を週 5 日、16 週間まで継続した後にマウスを安楽死させ、一定圧の 10%ホルマリンにて肺を伸展固定し、肺気腫の程度を定量組織学的に検討した。その他、血液や肺組織を採取し、分子生物学的解析に用いた。

4. 研究成果

(1) プレオマイシン肺線維症モデル

プレオマイシン経気道投与後の肺組織の線維化の程度を Ashcroft 's Score により評価したところ、プレオマイシン 25 μ g 投与群とプレオマイシン 50 μ g 投与群でともに 14 日後において AIM 欠損マウスにて線維性変化の有意な抑制が認められた (図 1)。

図 1. Ashcroft 's Score による肺線維化評価



NS : 有意差なし、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 。
Error bar は標準誤差。

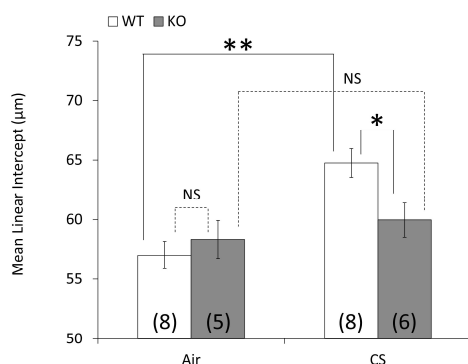
また、左肺を加水分解処理して hydroxyproline 含有量の定量を行ったところ、野生型マウスと AIM 欠損マウスの間に統計的有意差はつかなかったものの、各個体の hydroxyproline 含量と Ashcroft 's score の間には有意な相関が認められた ($R=0.58$ 、 $p < 0.001$)。一方で、野生型マウスと AIM 欠損マウスの間で BAL 液上清中の総蛋白濃度の差については明らかではなかった。また、BAL 液中の細胞分画では両群間に有意差は認められなかった。次に、肺組織ライセートから total RNA を抽出し、逆転写酵素反応の後でリアルタイム PCR により遺伝子発現定量を行ったが、評価対象とした炎症関連遺伝子 (IL-1、CXCL1、CXCL2、CXCL5) と線維化関連遺伝子 (Collagen1A1、Fibronectin1、TGF 1、CTGF) のうち、CXCL1 がプレオマイシン 50 μ g 投与後 day 7 において、また TGF

1 が 25 μg 投与後 day 28 においてそれぞれ AIM 欠損マウスで抑制されたこと以外には有意差は認められなかった。

(2) 喫煙曝露肺気腫モデル

16 週間のタバコ煙曝露後の肺組織における気腫性変化の評価では、空気曝露群では肺組織は正常であったが、タバコ煙曝露群のうち野生型マウスに肉眼的に明らかな気腫性変化が認められた。また平均肺胞間距離 (MLI) を算出することで気腫性変化を定量したところ、空気曝露群では野生型マウスと AIM 欠損マウスの間に有意差を認めず、また AIM 欠損マウスのタバコ煙曝露群では MLI の増加は有意でなかったが、野生型マウスのタバコ煙曝露群では空気曝露群よりも有意に MLI が増加、またタバコ煙曝露群の AIM 欠損マウスと比較して有意に MLI が高値であった (図 2)。

図 2. タバコ煙または空気曝露 16 週後の肺組織の MLI



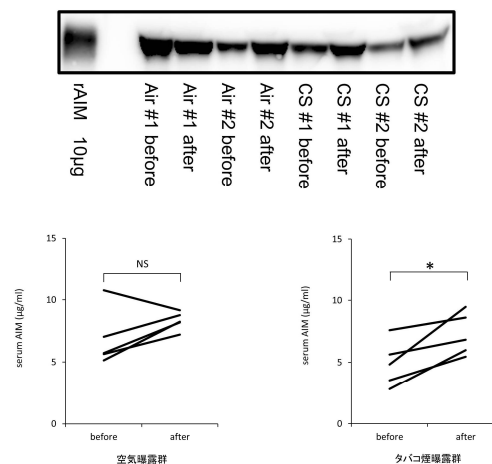
NS: 有意差なし、*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 。Error bar は標準誤差。グラフ中の () 内は各群の個体数。

また、4 週間以内の短期間のタバコ煙曝露を行い、それに対する応答を検討した。3 日間、1 週間、2 週間、4 週間のそれぞれの期間のタバコ煙曝露後の BAL 液中の細胞分画では、統計学的有意差はつかなかったものの好中球数の増加が野生型マウスにおいてのみ散見された。また、これらのマウスの肺の組織ライセートでの遺伝子発現の評価を定量 PCR で行ったところ、タバコ煙曝露 2 週間で IL-1 と CXCL1 の発現が AIM 欠損マウスで有意に抑制された。

さらに、タバコ煙曝露による血中 AIM 濃度の検討のため、タバコ煙 16 週間曝露の開始前と終了後それぞれのマウス血清中の AIM 濃度をウェスタンブロッティングにて評価した。空気曝露とタバコ煙曝露の両者で 16 週

の曝露後に血清 AIM 濃度の平均値の上昇を認めたが、paired-t 検定ではタバコ煙曝露群でのみ上昇が統計的に有意であった (空気曝露群 : $p = 0.15$ 、タバコ煙曝露群 : $p = 0.025$ 、図 3)。

図 3. 空気またはタバコ煙 16 週曝露の前後の血清 AIM 濃度の変化



空気またはタバコ煙に 16 週間曝露した前後での血清 AIM 濃度をウェスタンブロッティングのバンドのデンストメトリーにて評価。統計解析は paired-t 検定。NS: 有意差なし、*: $p < 0.05$ 。N = 5。タバコ煙曝露群では 16 週間曝露後に血清 AIM 濃度が統計学的有意に上昇した。

以上のように、本研究ではプレオマイシン経気道投与モデルおよびタバコ煙曝露モデルにおいて、AIM の存在が肺の炎症性疾患の増悪因子として寄与している可能性を示した。これまでに AIM の細胞特異的過剰発現マウスによる検討の報告はあるものの、AIM 欠損動物を用いて AIM の呼吸器病態における意義を検討した研究は本研究が初めてのものである。本研究の結果は AIM の呼吸器病態における創薬ターゲットならびに疾患感受性と病態のバイオマーカーとしての可能性を初めて示唆するものである。

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)

[学会発表] (計 3 件)

Hiroki Kimura, Masaru Suzuki, Katsura Nagai, Takahide Nagase, Toru Miyazaki, Masaharu Nishimura. Role of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in LPS-induced lung injury. The 109th American Thoracic Society International

Conference, 2014.5.21, San Diego Convention Center (San Diego, USA)
Hiroki Kimura, Masaru Suzuki, Katsura Nagai, Takahide Nagase, Toru Miyazaki, Masaharu Nishimura. Role of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in LPS-induced lung injury. 第54回日本呼吸器学会学術講演会、2014.4.26、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
Hiroki Kimura, Masaru Suzuki, Katsura Nagai, Takahide Nagase, Toru Miyazaki, Masaharu Nishimura. Role of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis in mice. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 2013.11.14、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 正治 (NISHIMURA MASA HARU)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00208224

(2) 研究分担者

鈴木 雅 (SUZUKI MASARU)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：10374290