

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度

課題番号：19591154

研究課題名（和文） メタロプロテアーゼ 13 の喘息発症に及ぼす影響

研究課題名（英文） Pathophysiological roles of matrix metalloproteinase 13 in asthma

研究代表者

氏名（ローマ字）：鈴木 洋一（SUZUKI YOICHI）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：80216457

研究成果の概要：ヒト気道上皮細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ 13 (MMP13)の発現、分泌は PAMPs (pathogen associated molecular patterns)やインターフェロン(IFN)によって増加した。

MMP13 siRNA は、MCP-1 と RANTES など複数のサイトカインの分泌を抑制した。以上の結果から、MMP13 は、気道上皮への微生物の侵襲や感染による気道上皮の炎症性サイトカイン分泌の制御に関係していることが示唆された。MMP13 遺伝子の発現量は喘息における急性感染症時の気道炎症増悪の程度に関連する可能性があると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,340,000	540,000	2,880,000
20 年度	2,210,000	510,000	2,720,000
年度			
年度			
年度			
総計	4,550,000	1,050,000	5,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：マトリックスメタロプロテアーゼ 13、気管支喘息、気道上皮、感受性遺伝子、遺伝子多型、インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

気道上皮は、ウイルス等の感染やたばこ等の化学物質に対する防御機構としての働きを担っており、これらの侵襲への免疫系や炎症の制御のために、各種サイトカイン等を分泌する。サイトカイン以外にも、RNA ウイルスの感染のモデルである二重鎖 RNA 分子 (poly(I:C)) 刺激によって、複数のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の分泌が増強することが、実験的に示されており、特に MMP13 の増加は、これまで喘息の炎症に関連するとして注目されてきた MMP9 よりも著明であることが示唆されていた。MMP13 遺伝子の遺伝子多型が、小児喘息、成人喘息と相関を示すかどうか検討したところ、両喘息との相関、特に小児喘息との相関が有意となる一塩基多型(SNP)を見いだした。

2. 研究の目的

- (1) MMP13 遺伝子内の遺伝子多型を詳細に調べ、真に喘息の疾患感受性に影響を与える SNP を同定する。
- (2)喘息の病態における MMP13 の役割を実験的に解明すること。特に、気道上皮での MMP13 の分泌の刺激を促すメカニズムと、MMP13 の免疫、気道炎症発症への関与を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) MMP13 遺伝子内の遺伝子多型の探索
MMP13 遺伝子の大きさは約 13kb あり、現在の dbSNP データベースには 20 個以下の SNP が登録されている。日本人における本遺伝子多型の検索のため、遺伝子 13kb とプロモーター領域 2kb にわたって DNA 配列を 8 名の正常人、8 名の喘息患者を用いて決定する。見つけた多型間の連鎖不平衡の状態を調べ、本遺伝子の多型と疾患との相関を検討するために必要最低限の多型 (タグ SNP) を決定する。
- (2)日本人成人喘息、小児喘息との相関解析
明らかになったタグ SNP について、小児喘

息患者 (340 名)、成人喘息患者 (514 名)、成人対照者 (637 名)、小児対照者 (340 名) から得た DNA について、遺伝型を調べる。単独 SNP レベル、ハプロタイプレベルでの疾患との相関を検討する。遺伝子型の決定は、Applied Biosystems (ABI)社の TaqMan 法の变法 (アレル特異的 PCR 法) を基本とし、ABI 社の SNaPshot 法による複数 SNP の同時検出も利用する。

(3)MMP13 遺伝子プロモーターアッセイ

MMP13 遺伝子のプロモーター領域の SNP のサーベイを行い。喘息と相関が認められた SNP と連鎖不平衡(LD)にある未知の SNP があるかどうか検索する。その SNP を含む DNA 断片を Promega 社の Dual Luciferase Reporter Assay System の pGL4 ベクターに組み込み、SNP の発現への影響を検討する。発現に用いる培養細胞としては SAEC 細胞を用いた。

(4)ヒト気道上皮細胞における MMP13 の mRNA 発現と分泌量の検討

ヒトの気道上皮細胞株 NHBE、BEAS-2B、SAEC を用いて、培養液に感染を模倣する分子を添加し、MMP13 を中心とするマトロプロテアーゼ分子の mRNA レベルでの発現の変化、培養液中に分泌された蛋白濃度を検討し、気道上皮の感染における MMP13 分子の発現の変化が確実に起こっているか確認する。mRNA の定量には ABI 社の TaqMan 法を用いる。

気道上皮からの MMP13 の分泌がどのような刺激で上昇するのかを検討するため、poly(I:C)に加え、リポポリサッカライド (LPS)、ペプチドグリカン (PGN)、zymosan、FSL-1、Flagellin などの微生物の構成成分やインターフェロン (IFN)、腫瘍壊死因子 (TNF) などの影響も検討する。

(5)気道上皮からのサイトカイン分泌における MMP13 の影響の検討

MMP3 はプロテアーゼ活性以外に転写因子としての働きも持っている。MMP13 は MMP3 に

みられた核内移行シグナルの配列を持っており、遺伝子の発現に影響する可能性が考えられた。そこで、気道上皮を刺激する実験系に MMP13 の発現を抑制するための RNA 干渉実験を行なう。

(6) 気道上皮特異的 MMP13 過剰発現トランスジェニックマウスの作成

気道上皮における MMP13 発現の気管支、肺発生に対する影響と、MMP13 の喘息モデル実験における気道炎症への影響をみるため、気道特異的発現をするトランスジーンベクターを作成し、マウス受精卵に打ち込み、気道上皮特異的 MMP13 過剰発現マウスの作成を試みる。ラットの clara cell secretory protein (CC10) のプロモーターを持ったベクターは千葉大学医学研究院遺伝子制御学の中島教授より供与された。

4. 研究成果

(1) MMP13 遺伝子の遺伝子多型

MMP13 遺伝子のプロモーター領域 2.5 kb と 3 の領域 3.0 kb までの全長 18 kb の範囲の SNP を検索したところ、38 個の SNP が同定できた。48 名の対照日本人サンプルについて全ての SNP についてタイピングを行い、LD マップを作成した。Solid spine の定義での LD ブロックは二つとなった。

(2) 日本人成人喘息、小児喘息との相関解析

MMP13 遺伝子のタグとなる 8 つの SNP については、小児喘息、小児対照、成人喘息、成人対照の全てのサンプルについてタイピングを行った。その結果、プロモーター部の SNP2、SNP5、SNP8 が小児のアトピー性喘息と相関を示した。アレル頻度の比較の P 値は SNP2=0.0040、SNP5=0.0036、SNP8=0.0023 で、ボンフェローニ修正 (8 倍) しても有意と考えられた。成人喘息に関しては、傾向は小児と同様であるが、有意と考えられる P 値には達しなかった。成人 + 小児のアトピー性喘息と小児・成人の全対照を比較した場合の SNP2、SNP5、SNP8 の P 値はそれぞれ 0.00082、0.00024、0.00071 となり有意と考えられた。これらの SNP は互いに LD にあるため、疾患の感受性に影響がある遺伝子多型があると

すれば、これらの SNP そのものか、LD にある多型であると考えられた。

(3) MMP13 遺伝子プロモーターアッセイ

疾患との相関が示唆された SNP2 はプロモーター部に存在するため、MMP13 の発現への影響がある可能性が考えられた。そこで、エクソン 1 の上流 2.5 kb までのシーケンスを行い、SNP を検索した。その結果、この領域には 11 個の多型の存在を確認した。これら SNP から形成される SNP のプロモーター活性への影響をみるため、8 種類のハプロタイプの配列を pGL4 ベクターに組み込んで SAEC と NHBE においてプロモーター活性を検討した。その結果、機知の多型であり、今回の検討では、疾患との相関を示さなかった -77A/G の影響が大きいが、疾患との相関を示した、SNP2 と LD のある -290A/T 多型もプロモーター活性に影響を示していることが示された。

(4) ヒト気道上皮細胞における MMP13 の mRNA 発現と分泌量の検討

SAEC の培地に LPS、PGN、zymosan、FSL-1、poly(I:C)、flagellin を添加し、24 時間後の MMP13 の mRNA の発現量の変化を見たところ、刺激無しに比べてそれぞれ、1.0、4.1、0.57、16.5、12000、1.7 倍に変化した。特に poly(I:C) による発現増加が著明であった。同様に、TNF、IL-1、IL-4、IL-13、INF、INF、INF、TGF による変化は、それぞれ、2.0、4.3、3.9、3.2、543、1.9、147、1.8 倍であり、INF と INF による影響が最も強かった。これらの結果から、MMP13 の発現は poly(I:C) と TLR3 の結合による直接の影響とそれによって分泌される IFN の刺激によるもの 2 つのパスウェイのいずれかまたは両方の関与が示唆された。

(5) 気道上皮からのサイトカイン分泌における MMP13 の影響の検討

SAEC への LPS、PGN、zymosan、FSL-1、poly(I:C)、flagellin の刺激で、どのようなサイトカインの分泌が増加するかスクリーニングするため、BioPlex を利用し、34 種類のサイトカインを定量した。これらの刺激の中では poly(I:C) が最も多くのサイトカイン

の分泌に影響を与えていた。MMP13 の siRNA をあらかじめトランスフェクトした後に poly(I:C) 刺激を行い、siRNA によって影響されるサイトカインをスクリーニングしたところ、IL-1、IL-1RA、IL-6、IL-8、G-CSF、IP-10、MCP-1、MIP-1、RANTES、TNF が影響を受けている事がわかった。この影響は IFN によるサイトカイン分泌でも同様であった。MMP13 cDNA を pCDNA3.1 ベクターに組み込み、SACE にトランスフェクトした際のこれらのサイトカインの分泌量をみると、IL-8 と IP-10 の分泌量が増えることがわかった。さらに、MMP13 inhibitor を培地に加えておくと、IP-10、MIP-1、RANTES の分泌量が低下することがわかった。以上のことから、すくなくとも IP-10 の分泌に、MMP13 の発現量ないし、活性が影響を及ぼしていることが考えられた。MMP13 が MMP3 と同様に核内に移行し、IP-10 のプロモーター領域に結合するかどうか、現在さらに検討を行っている。

(6) 気道上皮特異的 MMP13 過剰発現トランスジェニックマウスの作成

マウスの骨髄細胞由来の cDNA を鋳型に MMP13 mRNA の配列を増幅した。これを pBluescript をバックボーンとしラット CC10 のプロモーターを持つベクターに挿入した。このベクターはユニテック社に依頼し、マウス受精卵への導入が行われた。4 月末に、トランスジーンを持つ可能性のあるマウスが出生したところである。

(7) 考察

我々は、MMP13 遺伝子の遺伝子多型が小児喘息の発症のリスクと統計学的に有意に相關することを示した。MMP13 は気道上皮から、ウイルス感染、細菌感染の際に大量に分泌されることを示した。気道上皮からの MMP13 の分泌は IFN・などの 1 型インターフェロンによって促進された。MMP13 遺伝子の発現を抑制すると、いくつかのサイトカインの発現が影響を受け、その中でも IP-10 に関しては、MMP13 cDNA の強制発現では分泌が増加し、MMP13 の低分子阻害薬によって IFN による分泌刺激が抑制された。これらのことから、MMP13 は感染やストレスが気道上皮に起こっ

た際の炎症のトリガーのコントロールに關与することを通じ、喘息の気道炎症、感染症の際の症状悪化と関わっていると思われる。現在、MMP13 が MMP3 と同様に核内に移行して、直接遺伝子の転写に影響しているのか、分泌され細胞外で活性化したプロテアーゼ活性が他のサイトカインの分泌プロセスに重要なのかは不明である。MMP13 の細胞内分布や、マウスにおける MMP13 の過剰発現における気道組織の変化、感染・喘息モデルにおける、気道炎症の強度と経過への影響をみることで、MMP13 の働きをさらに明らかにしていきたい。

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 12 件)

1. Suzuki Y, Hattori S, Mashimo Y, Funamizu M, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Shimojo N *CD14* and *IL4R* gene polymorphisms modify the effect of day care attendance on serum IgE levels J Allergy Clin Immunol 2009 in press (査読有)
2. 鈴木洋一 アレルギー感作における Gene-Environmental Interaction について 小児アレルギー学会誌 2009/23(1)/62-68 (査読無)
3. Imada Y, Fujimoto M, Hirata K, Hirota T, Suzuki Y, Saito H, Matsumoto K, Akazawa A, Katsunuma T, Yoshihara S, Ebisawa M, Shibasaki M, Arinami T, Tamari M, Noguchi E Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population BMC Res Notes 2009/2(1)/54 (査読有)
4. 鈴木洋一 小児気管支喘息 アレルギー・免疫 2008/15(7)/893-899 (査読無)
5. Suzuki Y, Mashita Y, Inoue H, Funamizu M, Haneda A, Shimojo N, Kawano Y, Okamoto Y [Relationship between allergy and fermented milk intake in school children] Arerugi 2008/57(1) /

- 7-45 (査読有)
6. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Shimojo N, Hasegawa K, Hirota T, Doi S, Kameda M, Miyatake A, Kohno Y, Okamoto Y, Tamari M, Hata A, Suzuki Y Association study of the C3 gene with adult and childhood asthma J Hum Genet 2008/53(8)/728-38 (査読有)
 7. Alberto EJ, Shimojo N, Suzuki Y, Mashimo Y, Arima T, Matsuura T, Inoue Y, Yamaide A, Tomiita M, Fujii K, Hata A, Kohno Y IL-10 gene polymorphism, but not TGF-beta1 gene polymorphisms, is associated with food allergy in a Japanese population Pediatr Allergy Immunol 2008/19(8)/716-21 (査読有)
 8. Kamada F, Mashimo Y, Inoue H, Shao C, Hirota T, Doi S, Kameda M, Fujiwara H, Fujita K, Enomoto T, Sasaki S, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y, Hata A, Tamari M, Suzuki Y The GSTP1 gene is a susceptibility gene for childhood asthma and the GSTM1 gene is a modifier of the GSTP1 gene Int Arch Allergy Immunol 2007/144(4)/275-86 (査読有)
 9. Inoue Y, Shimojo N, Suzuki Y, Campos Alberto EJ, Yamaide A, Suzuki S, Arima T, Matsuura T, Tomiita M, Aoyagi M, Hoshioka A, Honda A, Hata A, Kohno Y CD14 -550 C/T, which is related to the serum level of soluble CD14, is associated with the development of respiratory syncytial virus bronchiolitis in the Japanese population J Infect Dis 2007/195(11)/1618-24 (査読有)
 10. Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M Functional Polymorphism in the Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene Associated

- with Adult Asthma Am J Respir Cell Mol Biol 2007/36(4)/491-496 (査読有)
11. Enomoto H, Noguchi E, Iijima S, Takahashi T, Hayakawa K, Ito M, Kano T, Aoki T, Suzuki Y, Koga M, Tamari M, Shiohara T, Otsuka F, Arinami T Single nucleotide polymorphism-based genome-wide linkage analysis in Japanese atopic dermatitis families BMC Dermatol 2007/7(1)/5 (査読有)
 12. Campos E, Shimojo N, Inoue Y, Arima T, Suzuki S, Tomiita M, Matsuura T, Hata A, Suzuki Y, Aoyagi M, Kohno Y No Association of Polymorphisms in the 5' Region of the CD14 Gene and Food Allergy in a Japanese Population Allergol Int 2007/56(1)/23-7 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 鈴木洋一、服部 聡、真下陽一、船水真紀子、下条直樹、岡本美孝、河野陽一、羽田 明 小児の血清 IgE 値への保育所通園の影響は CD14 と IL4R 遺伝子型により変化する 日本疫学会 平成 21 年 1 月 23-24 日 金沢
2. 鈴木洋一 アレルギー感作における Gene-Environmental Interaction について(シンポジウム)日本小児アレルギー学会平成 20 年 12 月 13-14 日 横浜
3. 服部 聡、真下陽一、船水真紀子、下条直樹、岡本美孝、河野陽一、羽田 明、鈴木洋一 保育所通園歴の有無による血清 IgE 値の変化は CD14 遺伝子-550C/T の遺伝型に影響される日本アレルギー学会平成 20 年 10 月 27-29 日 東京
4. Satoshi Hattori, Yoichi Mashimo, Makiko Funamizu, Naoki Shimojo, Yoshitaka Okamoto, Yoichi Kohono, Akira Hata, Yoichi Suzuki CD14 -550C/T polymorphism modifies the effect of daycare attendance on total and specific IgE levels in children アメリカ人類遺伝学会 平成 20 年 10 月 12 15 日 フィラデルフィア 米国
5. 服部聡、真下陽一、井上寛規、下条直樹、

岡本美孝、河野陽一、羽田 明 鈴木洋一
保育所通園のアレルギー感作への影響は、
CD14 遺伝子-550C/T の遺伝型によって異
なる日本人類遺伝学会 平成 20 年 9 月
27-30 日 横浜

6. 鈴木洋一、真下陽一、井上寛規、下条直
樹、岡本美孝、河野陽一、羽田 明
血清 IgE 値に影響を与える環境要因と遺
伝要因とその相互作用の検討 第 18 回日
本疫学会学術総会 2008 年 1 月 25 日 東
京
7. 鈴木洋一、真下陽一、井上寛規、下条直
樹、岡本美孝、河野陽一、羽田 明 血
清 IgE 値に影響を与える環境要因と遺伝
要因とその相互作用の検討 第 44 回日本
小児アレルギー学会 2007 年 12 月 9 日
名古屋
8. 鈴木洋一、真下陽一、井上寛規、下条直
樹、岡本美孝、河野陽一、羽田 明 血
清 IgE 値に影響を与える環境要因と遺伝
要因とその相互作用の検討 第 57 回日本
アレルギー学会秋季学術大会 2007 年 10
月 31 日 横浜
9. Suzuki Y, Mashimo Y, Inoue H, Shimojo
N, Okamoto Y, Kohon Y, Hata A
Gene-environmental interactions that
affect serum IgE levels of urban school
children Annual meeting of American
society of human genetics 2007 年 10
月 25 日サンディエゴ 米国
10. 鈴木洋一、真下陽一、井上寛規、下条直
樹、岡本美孝、河野陽一、羽田 明 血
清 IgE 値に影響を与える環境要因と遺伝
要因とその相互作用の検討 第 52 回日本
人類遺伝学会 2007 年 9 月 13 日 東京

〔図書〕(計 1 件)

鈴木洋一, 中外医学社, 「図説分子病態学」,
2008, 472 (392-397)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

[www.m.chiba-u.ac.jp/class/pubheal/
allergy_genetics/](http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/pubheal/allergy_genetics/)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木洋一(SUZUKI YOICHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 80216457

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し