

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19209031

研究課題名(和文) 難治性呼吸器疾患発症分子機構の解明と新治療標的の探索

研究課題名(英文) The investigation of molecular mechanisms underlying refractory respiratory diseases and exploration of novel therapeutic targets

研究代表者

長瀬 隆英(NAGASE TAKAHIDE)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40208004

研究成果の概要(和文)：COPD、ARDS、肺線維症などの炎症性肺疾患の病態機序・治療標的は未だに不明であり、その解明が急務とされている。本研究では、脂質性メディエーターや転写コアクチベーターTAZに着目し、遺伝子改変マウスを駆使することにより、その病態解明および治療標的の同定を目指した。その結果、脂質性メディエーターやTAZが炎症性肺疾患の病態機序に関与することが示された。本知見は、炎症性肺疾患に対する新規の治療アプローチを提示するものである。

研究成果の概要(英文)：In respiratory diseases, there are several inflammatory disorders such as COPD, ARDS and pulmonary fibrosis, to which no pharmaceutical agents are currently effective. However, their mechanisms still remain to be elucidated. The purpose of this project is to investigate the roles of lipid mediators and TAZ in these disorders using genetically-engineered mice. We found that lipid mediators and TAZ were involved in the pathogenesis of inflammatory lung disorders. Our results suggest that these mediators might provide a novel therapeutic approach to these diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2008年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患癌・肺線維症・呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

21世紀を迎えた現在、呼吸器領域疾患の社会的な重要性は急増しつつある。気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患や肺癌などの患者数、死亡者数は年々増加しつつあり、増勢に歯止めがかからない状況にある。世界的にも、WHOによる予測では、2020年の死亡要因の第3位が慢性閉塞性肺疾患(COPD)、第4位が下部呼吸器感染症(肺炎など)、第5位が肺癌、さらに第7位が結核と予想されるなど、呼吸

器領域疾患による死亡者数の急増が予見されている。例えば米国においては、過去40年間で、虚血性心疾患や脳血管障害による死亡数が著明に減少しているのに対し、COPDによる死亡数は倍増の勢いにあり、今後も増加傾向が続くと予想されている。このように呼吸器領域疾患の社会的な重要性は国内・国外で十分に認識されつつあり、社会的な視点からも、その研究成果に対する社会的要請の高い領域である。

COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、難治性気管支喘息、新興呼吸器感染症(新型インフルエンザ等)などは、炎症関連機序を主体とする病態であり、その難治性・致死性や高い発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患の病態機序・治療標的は未だに不明であり、新治療法の開発が急務とされている。

2. 研究の目的

本研究では、近年、炎症・生体防御関連因子として注目されている(1)脂質性メディエーター、発生への関与が着目されている(2)転写コアクチベーターTAZに着目し、(3) siRNAなどの新技術を応用・駆使することにより、難治性肺疾患の病態解明および治療標的の同定を目指す。

呼吸不全を呈する炎症・免疫・感染症関連難病は、難治性・致死性・医療費の点において、臨床および社会医学的にも極めて重要な疾患群である。特に、ARDS、間質性肺炎は、難治性、致死性において他に類をみない程、重篤な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。COPD、肺炎や気管支喘息は、世界的にも発症頻度、死亡率が増大しつつあり、画期的な治療薬の開発が期待されている。これら炎症性免疫関連呼吸器疾患の発症分子機構は、極めて複雑であり、様々な視点からの研究アプローチが必要である。

PAF およびエイコサノイド(プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエン)は、多彩な生理活性作用を有するメディエーターであり、気管支喘息、ARDS、間質性肺炎など呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。

また、転写コアクチベーターTAZは、肺の発生と同様に、COPDや間質性肺炎などの発症機序に関与している可能性がある。TAZ ノックアウトマウスからの知見により、COPDや間質性肺炎などに対する全く新しい治療薬が実用化されることも期待される。

難治性呼吸器系疾患に対する治療薬剤の開発は目下、困難を極めている。その理由のひとつとして発症過程において種々の炎症関連物質が複雑に関与するネットワークを形成しており、個別の物質をたんぱく質レベルで制御しても、炎症促進機転をブロックすることが困難であることが指摘されている。この現状を打開するためには、基点となる遺伝子発現そのものを制御するという可能性が提起され、現在最も有望な手法のひとつが siRNA の応用である。本研究では、発生工学的手法に誘導性 siRNA という分子生物学上の最新の手法を組み合わせ、呼吸器疾患に関する形質観察を行う。このような最新のアプローチにより、難治性肺疾患や新興感染症の病態機序の解明が急速に進展することが予想

される。また、siRNA の全身・局所投与による標的遺伝子の発現抑制により、炎症性のみならず腫瘍性の難治性肺疾患への治療応用も期待される。

3. 研究の方法

(1)脂質性メディエーター

脂質性メディエーターであるPAFおよびエイコサノイドは、多彩な生理活性作用を示し、肺疾患発症に寄与している可能性が推察されている。本研究グループは、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などの肺疾患モデルを用いてエイコサノイドの意義を報告している (Uozumi, Kume, Nagase, Nature, 1997:390:618-22) (Nagase, Nature Immunol, 2000; Nature Medicine, 2002)。

本研究では、本研究者が独自に開発した遺伝子改変マウスを使用する。特に、LTC₄/D₄/E₄ など cysteinyl LT の受容体 (CysLT₁-R, CysLT₂-R) は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。なかでも CysLT₂-R は大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、この CysLT₂-R を標的とした K0 マウスを用いて、疾患モデルを作成する。

(2)転写コアクチベーターTAZ

転写コアクチベーターTAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) は、14-3-3 protein をはじめとする、PDZ domain を持つ転写因子と結合しその活性を制御する分子として同定・報告されたものである (EMBO J 19: 6778-91, 2000)。TAZ は、WW domain を有しており、PPXY モチーフと結合することにより、転写コアクチベーターとしての機能を発現する。また最新の研究により、転写コアクチベーターTAZ が、TTF-1 (thyroid transcription factor-1) や Pax3 と協調的に働くことにより、発生に大きく関与することが明らかにされつつある (J Biol Chem 279: 17384-90, 2004) (Biochem Biophys Res Commun 339: 533-9, 2006)。

例えば、本研究分担者(栗原)は、神経管、神経堤、骨格筋などの発生に重要な役割を持つ Pax3 と協調的に働く因子を探す目的で、酵母 Two hybrid 法により Pax3 に結合する分子をスクリーニングした結果、TAZ タンパクを同定した。in vitro アッセイの結果、Pax3-TAZ の結合には、Pax3 C 末端側の PPXY モチーフ及び TAZ N 末端側の WW domain が深く関わっていることが示された。TAZ の発現を in situ hybridization で調べると、胎生 10.5 日マウス胚において神経管内側、鰓丘の外胚葉性間葉、体節で発現が見られており、TAZ は Pax3 などの転写因子と相互作用して形態形成に関与している可能性が考えられる。本研究では、転写コアクチベーターTAZ の遺

伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を探索する。

(3) siRNA

近年、プラスミドベクターを用いた siRNA の応用により標的遺伝子の発現抑制が可能となりつつある。この手法を COPD などの病態解明に応用するため、気道の炎症・線維化に関与する TGF- β , その受容体及び SMAD ファミリーなどを標的とするベクターの構築を開始する。また気道のリモデリングに重要な意義を持つとされていることから、Fas リガンド・受容体をはじめとしたアポトーシスに関連する分子も研究の対象とする。マウス肺胞上皮細胞及び線維芽細胞を用いた系で、標的分子の発現抑制システムの確立を目指す。

4. 研究成果

(1) 脂質性メディエーター

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成> キメラマウスの中で、germ line にノックアウト DNA コンストラクトが移行したのを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体 CysLT2-R ノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めていない。

(2) 転写コアクチベーター-TAZ

<転写コアクチベーター-TAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーター-TAZ ノックアウトマウスの作成に着手した。キメラマウスの中で、germ line にノックアウト DNA コンストラクトが移行したのを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体 TAZ ノックアウトマウスが得られた。なお外表所見上では重大な奇形を生じていないが、9ヶ月令 TAZ ノックアウトマウス個体の肺の組織標本において、肺胞の異常が示された。

また呼吸生理学的にも、TAZ ノックアウトマウスでは、PV カーブにおいて典型的な「肺気腫」型の所見 (PV カーブの上方移動、コンプライアンス増加) を認めた。

次に、胎生期から成体までの、野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見を検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスの肺は、胎生期においては、ほぼ正常の発育であるが、生後5日以降には気腔の拡張が認められ、その後、気腔の拡張が増大していた。

<TAZ ノックアウトマウス肺における遺伝子発現の解析>

胎生期から成体までの、野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を real time RT-PCR を用いて検討し

た。その結果、肺の発達・成長に必須とされる TTF-1 の発現が、TAZ ノックアウトマウスにおいても野生型と変わらないことが示された。

一方、2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では、MMP 12 (macrophage elastase) が著明に発現していることが明らかになった。次に、胎生期の野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を microarray 解析を用いて検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスにおいて発現低下が認められた遺伝子を5つ選び、さらに real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では、Fbln5 と CTGF の発現が有意に低下していることが明らかになった。

(3) siRNA

マウス肺胞上皮細胞及び線維芽細胞を用いた系で、線維化にかかわるシグナル分子及びそのパスウェイとして TGF- β , その受容体及び SMAD ファミリーを標的として、ベクターの構築を行った。

本研究の成果により、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いと思われる。本研究は、1) 難治性疾患の病態解明、2) ゲノム創薬、を志向した独創的なものであり、発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供し、炎症性肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。また発生工学的技術を用いた研究は、薬剤開発のプロセスを短縮し、実用化に大きく寄与することが予想される。さらに本研究成果は、バイオテクノロジー分野における新技術の創製および知的資産の形成に発展することが期待される。

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)

[雑誌論文] (計 15 件)

- 1) Hirota N, Yasuda D, Hashidate T, Yamamoto T, Yamaguchi S, Nagamune T, Nagase T, Shimizu T, Nakamura M. Amino acid residues critical for endoplasmic reticulum export and trafficking of platelet-activating factor receptor. J Biol Chem 2010; 19: 285: 5931-5940. 査読有り
- 2) Kusakabe M, Kutomi T, Watanabe K, Emoto N, Aki N, Kage H, Hamano E, Kitagawa H, Nagase T, Sano A, Yoshida Y, Fukami T, Murakawa T, Nakajima J, Takamoto S, Ota S, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N,

- Takai D. Identification of GOS2 as a gene frequently methylated in squamous lung cancer by combination of in silico and experimental approaches. *Int J Cancer* 2010; 15: 126: 1895-1902. 査読有り
- 3) Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H, Kamitani S, Desaki M, Takami K, Kawasaki S, Kato J, Nagase T. Tumor necrosis factor- α enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1. *Exp Lung Res* 2010; 36: 12-24. 査読有り
 - 4) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2010; 337: 77-81. 査読有り
 - 5) Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, Aburatani H, Makita R, Kurihara H. Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 326-338. 査読有り
 - 6) Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2009; 69: 2783-2791. 査読有り
 - 7) Kusakabe M, Watanabe K, Emoto N, Aki N, Kage H, Nagase T, Nakajima J, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. Impact of DNA demethylation of the GOS2 gene on the transcription of GOS2 in squamous lung cancer cell lines with or without nuclear receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1283-1287. 査読有り
 - 8) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Desaki M, Kawasaki S, Nagase T. Procatenol inhibits lung fibroblast migration. *Inflammation* 2009; 32: 387-392. 査読有り
 - 9) Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Renal tubular dysmorphogenesis leading to multicystic formation and lung emphysema in mice lacking TAZ. *Am J Physiol* 2008; 294: F542-553. 査読有り
 - 10) Yamaguchi Y, Nagase T, Tomita T, Nakamura K, Fukuhara S, Amano T, Yamamoto H, Ide Y, Suzuki M, Teramoto S, Asano T, Kangawa K, Nakagata N, Ouchi Y, Kurihara H. Beta-defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C2141-2149. 査読有り
 - 11) Sano A, Kage H, Sugimoto K, Kitagawa H, Aki N, Goto A, Fukuyama M, Nakajima J, Takamoto S, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. A second-generation profiling system for quantitative methylation analysis of multiple gene promoters: application to lung cancer. *Oncogene* 2007; 26: 6518-6525. 査読有り
 - 12) Yamamoto H, Nagase T, Shindo T, Teramoto S, Aoki-Nagase T, Yamaguchi Y, Yokomizo T, Nagai R, Kurihara H, Ouchi Y. Impaired innate adrenomedullin function deteriorates airway hyperresponsiveness in mice: possible roles of allergen-induced airway wall remodeling. *J Appl Physiol* 2007; 102: 2361-8. 査読有り
 - 13) Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashi Y, Kurihara Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Nagata T, Kurihara H, Ouchi Y. Calcitonin gene-related peptide mediates acid-induced lung injury in mice. *Respirology* 2007; 12: 807-13. 査読有り
 - 14) Sugimoto K, Kage H, Aki N, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. The Induction of H3K9 Methylation by PIWIL4 at the p16Ink4a Locus. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 497-502. 査読有り
 - 15) Goto Y, Nagase T. 12-h pretreatment with methylprednisolone versus placebo for prevention of postextubation laryngeal oedema: a randomised double-blind trial (Correspondence letter). *Lancet* 2007; 370: 25. 査読有り
- [学会発表] (計 3 件)
- 1) Respiratory research using genetically-engineered mice. The 14th APSR Meeting Seoul. (発表者: 長瀬隆英、招待講演), 2009年11月18日、ソウル、

大韓民国.

- 2) 慢性閉塞性肺疾患：第 50 回日本老年医学会総会（発表者：長瀬隆英、教育企画），2008 年 6 月 19 日、幕張.
- 3) 肺炎症における脂質性メディエーターに関して：第 47 回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、特別講演），2007 年 5 月 12 日、東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長瀬 隆英 (NAGASE TAKAHIDE)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：40208004

(2) 研究分担者

清水 孝雄 (SHIMIZU TAKAO)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80127092
栗原 裕基 (KUHIHARA HIROKI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20221947
石井 聡 (ISHI SATOSHI)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10300815
高井 大哉 (TAKAI DAIYA)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90361493