

平成21年6月12日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19590906
研究課題名：(和文) チロシンキナーゼ PYK2 に対する分子標的療法による ARDS の新たな治療法の開発
研究課題名：(英文) Novel therapeutic strategy of ARDS by the development of Tyrosine kinase PYK2
研究代表者：永田 一洋(NAGATA KAZUHIRO)
京都府立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：60298429

研究成果の概要：

高酸素投与によるマウスARDSモデルをPYK2欠損マウスに作成したところ、野生型と比べ肺障害の著しい抑制があった。そのメカニズムとして、PYK2欠損により、NADPH-Oxidase由来の活性酸素の発現の抑制、サイトカイン産生の抑制による炎症反応の軽減が見られた。さらにアデノウイルスベクターを利用してPYK2-SiRNAを作成し野生型マウスに経気道的に投与したところ、肺障害の抑制が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：ARDS、PYK2、チロシンキナーゼ、活性酸素

1. 研究開始当初の背景

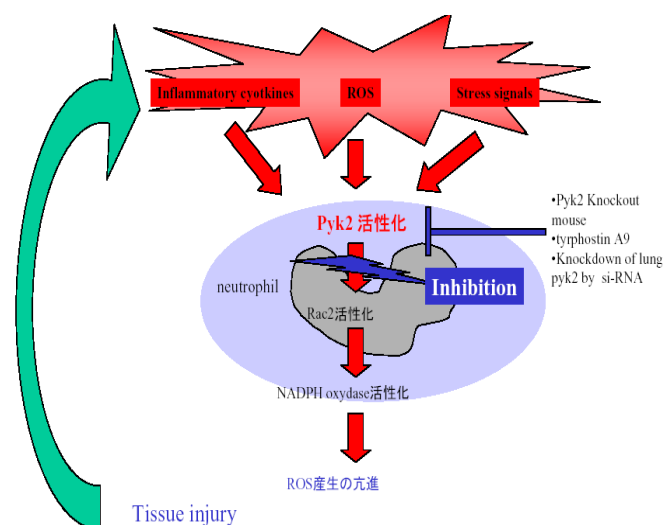
ARDS/ALI は重症感染症などを契機に急性の経過で発症し、活性酸素がかかわる肺の炎症

と透過性亢進が原因である。その致死率は40～70%と高いが、いまだ本質的な治療は開発されていない。私達は今

までに高濃度酸素肺損傷モデルによる ARDS モデルで、1) 高酸素暴露が肺胞マクロファージを活性化し活性酸素の産生をもたらす、その酸化ストレスがサイトカイン・ケモカインの産生を誘導し ARDS 発症につながること、2) 抗酸化剤、N-acetylcystein、特異的 iNOS 阻害剤 ONO1714、あるいは thiredoxin transgenic マウスを用いた実験で、抗酸化システムの賦活化が肺傷害を改善することを示してきた

一方、非受容体チロシンキナーゼである PYK2 は、酸化ストレスで強い活性化をうけることが知られてきた (J. Biol. Chem 277 48152-48157 2002)。すなわち PYK2 は、インテグリンや各種成長・遊走因子の刺激で活性化を受けるほか、活性酸素を始めとする様々な物理的、化学的ストレスで活性化を受け、ストレス環境下での細胞遊走や細胞生存に重要な役割を果たす。また逆に、サイトカインやアンジオテンシン刺激により PYK2 活性は上昇し、その PYK2 の作用により活性酸素の産生が誘導され、PYK2 選択的阻害剤 tyrphostin A9 の投与や Dominant Negative PYK2 の過剰発現で PYK2 作用を抑制すると活性酸素の産生がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。さらに共同研究者の沖垣は PYK2 ノックアウトマウスを作成し、同マウスではマクロファージなどの炎症細胞のケモカインに対する遊走機能が低下しており、カラギナン皮下投与による炎症モデルにおいて、炎症所見が有意に軽度であったことを報告している。肺は PYK2 が高発現している臓器であり、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞のほか、障害肺では浸潤炎症細胞でその発現が顕著である。肺は血中の好中球の marginated pool として正常でも大量の好中球を毛細血管網に保持しており、また ARDS の発症には肺マクロファージや好中球の働

きが極めて重要である。このことより私達は PYK2 に着目し、PYK2 が酸化ストレス刺激で活性化され、サイトカイン・ケモカイン発現誘導を介し ARDS 発症に重要な役割を果たすことを予想し、PYK2 作用の抑制は、活性酸素が障害の発端である高濃度酸素誘発 ARDS を軽減するという仮説にいたった。



2. 研究の目的

P Y K 2 が A R D S の炎症反応に中心的役割を果たすことを証明し、さらに P Y K 2 の制御による A R D S の新たな治療法を開発する。

3. 研究の方法

P Y K 2 の遺伝子欠損マウスに高酸素暴露による A R D S モデルを作成し、A R D S の病理像が抑制されることを確認し、さらにその分子メカニズムを追求した

次Adenovirusを利用して、PYK2のsrRNAを系気道的に導入するシステムを開発しARDS病変の抑制を目指した。

詳細には下記の実験を行った。

72時間高濃度酸素曝露による死亡率と、組織学的に単位肺胞隔壁面積あたりの炎症細胞浸潤および肺損傷を調べ、TUNEL染色による検討で肺胞上皮、血管内皮細胞のアポトーシスを行った。

またPYK2欠損マウスでの酸素曝露48時間目における肺の炎症性サイトカイン・ケモカインであるIL-1 β 、MIP2の発現を、RT-PCR法による検討を行った。

高濃度酸素曝露肺で、PYK2の活性化を調べた

野生型マウスでの、高濃度酸素曝露肺で肺胞マクロファージでのRac/NOXの活性化、活性酸素の産生の誘導と引き続く酸化ストレス感受性転写因子NF κ B活性化、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生、JNK/Caspase3系活性化による細胞死の誘導などを調べた。

高酸素曝露によりPYK2と同様の作用を行う酸化ストレス感受性チロシンキナーゼSrcの活性化をしらべる

選択的PYK2阻害薬であるTyrphostin A9、とPYK2の下流でPYK2と同様の作用機序を持つ酸化ストレス感受性チロシンキナーゼSrcの阻害薬であるPP1の投与で、それぞれ肺障害の抑制を確認する。

small interfering PYK2 Duplex RNAを開発し、アデノウイルスを使用して経気道的に投与することで高濃度酸素肺損傷が軽減される。

4. 研究成果

PYK2は活性酸素で活性化を受け、かつ活性酸素の産生も促進することを高酸素モデル肺において確認した。さらにPYK2欠損マウスにおいて高濃度酸素負荷によるARDSの発症が抑制されるかどうか検証を試みた。

研究により高濃度酸素曝露によるARDSの発症にはPYK2が必須であることを、PYK2の遺伝子欠損マウスではARDSがほぼ完全に抑制されることで証明した。すなわち、高濃度酸素曝露による死亡率が、野生型では100%死亡するのに対し、PYK2欠損マウスでは0% (各グループn=12)と、高酸素曝露に顕著な抵抗性をしめした。組織学的にも単位肺胞隔壁面積あたりの炎症細胞浸潤は軽く (p<0.005, n=10)肺損傷は軽微であり、TUNEL染色による検討で肺胞上皮、血管内皮細胞のアポトーシスがほぼ完全に抑制されていた。

またPYK2欠損マウスでの酸素曝露48時間目における肺の炎症性サイトカイン・ケモカインであるIL-1 β 、MIP2の発現が、RT-PCR法による検討ではほぼ完全に抑制されていた。

PYK2欠損マウスでは、高濃度酸素曝露肺で肺胞マクロファージでのRac/NOXの活性化、活性酸素の産生の誘導と引き続く酸化ストレス感受性転写因子NF κ B活性化、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生、JNK/Caspase3系活性化による細胞死の誘導が起こるが、PYK2ノックアウトマウスでは、Rac/NADPHoxidase活性化、活性酸

素の産生、転写因子の活性化、サイトカインの産生、及び Caspase3 活性がいずれも極めて減弱していた。

野生型マウスでは高酸素暴露により PYK2 と同様の作用を行う酸化ストレス感受性チロシンキナーゼ Src の活性化も起こるが、PYK2 ノックアウトマウスでは、Src の活性化が抑制されていた

選択的 PYK2 阻害薬である Tyrphostin A9、と PYK2 の下流で PYK2 と同様の作用機序を持つ酸化ストレス感受性チロシンキナーゼ Src の阻害薬である PP1 の投与で、それぞれ肺障害が抑制された。

small interfering PYK2 Duplex RNAを開発し、アデノウイルスを使用して経気道的に投与した。まず293細胞を利用し、組み替えウイルスを10⁻⁷乗個まで増幅させたあと、経気道的投与に投与し感染させ、PYK2の発現への影響をウエスタンブロットで確認を行った。ついで、高濃度酸素肺損傷が軽減されることを病理組織学的解析にて確認した。さらに野生型に比べ肺障害後の生存時間が延長した。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 一洋(NAGATA KAZUHIRO)

京都府立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60298429

(2) 研究分担者

沖垣 光彦(OKIGAKI MITUHIKO)