

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008 ～ 2009
課題番号：19790556
研究課題名(和文) 肺線維症、肺気腫の発症・進展機序におけるアドレノメデュリンの役割
研究課題名(英文) A Role of Adrenomedullin on the development and progression of pulmonary fibrosis and pulmonary emphysema
研究代表者
山本 寛 (YAMAMOTO HIROSHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 10361487

研究成果の概要：

高齢マウスとして22ヶ月齢のAM遺伝子改変マウス(Old AM-KO)およびその同腹子、コントロールとして12週齢のAM遺伝子改変マウス(Young AM-KO)およびその同腹子を準備し、それぞれにおける肺機能、組織学的変化を検討した。まず肺機能については、Old miceにおける残気量(RV)、残気率(RV/TLC)の有意な増加が認められた。一方、組織学的な検討の結果、平均肺胞間距離(Lm)がOld miceにおいて有意に長く、肺胞面積や破壊指数(DI)については有意な差を認めなかった。いずれもAM遺伝子改変の有無とは関連を見出せなかった。この高齢マウスに対する慢性喫煙負荷を行うことで老人肺ではなく肺気腫が形成されること、さらにその肺気腫形成にadrenomedullinが抑制的に働くとすればきわめて画期的であり、「老いても肺気腫にはなりにくい」治療法の開発につながる独創的、萌芽的な研究結果を提示しうるものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,700,000	0	1,700,000
20年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：呼吸器病学

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は肺の間質の線維化を来たす疾患で、その多くは原因不明（特発性肺線維症）である。特発性肺線維症は進行性に胞隔炎と線維芽細胞の浸潤、コラーゲン沈着を来たし、ガス交換障害による呼吸不全を進行せしめるが、現在のところその詳細な発症機序は明らかにされておらず、有効な薬剤の開発が求められている。COPDは喫煙や大気汚染物質などが原因となり、非可逆性の気道閉塞を来たす疾患で世界の死亡原因の第4位を占めている。COPDの病態にはさまざまな炎症細胞（主に好中球、マクロファージ、CD8陽性T細胞）、炎症性メディエーターが関与しており、これらにより惹起される気道炎症が気道閉塞の原因と考えられている。近年、酸化ストレスがCOPDの病態に重要な役割を演じていることがわかっている。ARDSは急性循環不全、敗血症、肺炎、急性膵炎、薬剤などに起因して生ずる全身性炎症反応に合併する急性肺障害である。血管透過性の亢進による非心原性肺水腫がその本態とされている。その病態としてNF- κ Bのシグナル伝達経路を活性化しさまざまな炎症性サイトカイン、接着分子、蛋白分解酵素が放出されるものと考えられているが、今日その正確な分子病態は解明されていない。

このように、呼吸器疾患の病態には多くの炎症機転が関与している。したがって、炎症反応カスケードを寸断することが大きな治療標的となりうる。一方、酸化ストレスは活性化された炎症細胞が過剰な防御反応の結果産生する活性酸素種(Reactive Oxygen species: ROS)が原因となり、その産生にはマクロファージや好中球の細胞内にあるNADPH oxidase、myeloperoxidaseが重要

である。ROSはNF- κ BやAP-1を活性化し、種々の炎症性サイトカインを放出させる。また酸化ストレスが気道上皮細胞、血管内皮細胞をアポトーシスに誘導することも実験的に示されており、COPD、肺線維症などの呼吸器疾患の病態に中心的な関与を果たしている可能性がある。したがって、酸化ストレスの抑制もまた重要な治療標的になると考えられる。

近年、炎症を促進あるいは抑制する生理活性因子として、エンドセリン-1(endothelin-1, ET-1)、アドレノメデュリン(adrenomedullin, AM)、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin-gene-related-peptide, CGRP)などのペプチドが注目されている。ET-1は、炎症促進、血管・気管支平滑筋収縮、エイコサノイド産生、サイトカイン産生刺激能を有することが報告されている(T. Nagase. *AM. J. physiol.* 1995)。一方、CGRPは、炎症抑制、血管・気管支平滑筋の拡張・弛緩作用を有しており(T. Nagase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 1551-1556, 1996)、また気道過敏性への関与も指摘されている(Tomoko Aoki-Nagase, T. Nagase, H. Yamamoto. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283: L963-970, 2002)。AMはCGRP同様の血管拡張物質であるが(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30; 192: 553-560, 1993)、そのmRNAは肺に多く発現しており、肺において何らかの生理的作用を果たしているものと推測される。AMは、遺伝子欠損によって胎生死を生じ発生に不可避の遺伝子あることが示されている。死亡胚では、肺出血が確認されており、肺の形態、機能維持にも不可避である可能性が推測される。しかし、動脈硬化や腎障害に関する検討はすすんでいるが、呼吸器領

域では喘息の病態に関する研究がわずかにあるのみで肺血管機能、呼吸器疾患における病態は不明である。

最近、AMの心血管、腎に対する保護効果がさかんに報告されており、抗アポトーシス効果 (*Hypertens. Res.* 26; Suppl:S99-104, 2003) や酸化ストレスの軽減 (*Circulation* 105; 106-111, 2002) が報告されている。したがって、AMは酸化ストレスが関与する種々の呼吸器疾患の病態においても重要な役割を果たしているものと推測される。今日、根本的な治療手段のない肺線維症や肺気腫、ARDS に対して、AM のペプチドの補充 (経口または経静脈的投与)、遺伝子導入が治療薬開発の標的となりうるとすれば、きわめて画期的である。本研究では、このAM 遺伝子の呼吸器疾患発症機序への関与について明らかにし、治療法開発への基礎をつくる。

2. 研究の目的

本研究では、本研究グループが自ら作成したAM遺伝子ノックアウトマウス (AM-KO) (T. Shindo, *Circulation* 101: 2309-2316, 2000) を使用する。本研究ではこのAMKO マウスを用いて AM 遺伝子発現と各呼吸器疾患発症との関連について評価、検討を加える。肺線維症モデルマウス、肺気腫モデルマウス、ARDS モデルマウスを使用して、生理学的、生化学的、組織学的、分子生物学的検討を加える。マウスも本研究施設のオリジナルであり、世界に類をみない。また、マウスの生理学的検討では我々のグループが世界をリードしており、喘息モデルマウ

ス、肺線維症モデルマウスを用いた研究を、*Nat. Med.*, *J. Exp. Med.*, *J. Exp. Med.*, *J. Clin. Invest.* など世界のトップジャーナルに発表してきた。

本研究により AM が呼吸器疾患発症分子機序に寄与することを明らかにし、AM とその誘導体による治療的アプローチの進展の基盤をつくることを目的とする。

3. 研究の方法

<AMKOマウスの作成>

AM-KOマウスの作成過程において、AMKOマウスのホモ接合体は生存個体を得られないことが判明した (T. Shindo, *Circulation*, 2001)。このため、実験にはヘテロ接合体ノックアウトマウスを用いる。遺伝的背景を均一にするため、C57/BL6マウスへのバッククロスを5代まですすめる (97%に純化)。

<肺気腫形成における加齢、およびADM遺伝子発現の関与に関する検討>

肺気腫は、VEGF ノックアウトマウスにおいてタバコ負荷で発症することが示されて以来、気道系の病変というだけでなく、血管系の消失、リモデリングも重要な病態形成のプロセスとして注目されている。

そこで、生理的老化、およびAMの多寡が肺の気腫化に与える影響を検討するため、AM-KO マウス、およびその同腹子 (野生型) において慢性喫煙負荷を行い、肺気腫発症の有無を形態的、機能的に解析する。4~24 週間の慢性喫煙負荷による肺気腫モデルの作製を行って検討した。

22 ヶ月齢の高齢 AM-KO マウスとその同腹子各 7 匹、および 3 ヶ月齢の AM-KO マウスとその同腹子に対各 7 匹に対して、その肺機能と組織変化について検討した。具体的な検討方法は以下のとおり。

●ketamine 100mg/kg 体重、および xylazine 100mg/kg 体重の腹注によりマウスを全身麻酔した。呼吸状態に注意しつつ気管切開、気管内挿管し、小動物用呼吸機能解析装置 (Buxco 社)による人工呼吸管理下においた。規定の方法で機能的残気量を測定した後、全肺気量位まで拡張させた肺からごく少量ずつ呼出させて準静的肺圧量曲線を求めた。これにより、閉胸下における肺気量分画、静的呼吸器系コンプライアンスを算出した。つぎに全肺気量位から急速に呼出させ、最大呼出流速流量曲線(MEFV curve)を作図し、0.1 秒量を算出した。さらに経腹アプローチにより横隔膜を切開、胸腔を外気と交通させた。

●気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞分画、細胞数を検討した。

●組織計測は、25cmH₂O 定圧灌流固定した肺組織を切り出して切片を作成し、平均肺胞間距離 (mean linear intercept, Lm)、破壊係数 (destructive index, DI)、平均肺胞面積 (SA) を算出した。

22 ヶ月齢の高齢 AM-KO マウスとその同腹子各 36 匹に対して、慢性喫煙負荷を以下の方法で行った。マウス喫煙装置 TE-10 (Teague Enterprises, CA) を用いて、1 日 3 時間を週 5 日、1 日あたり 100 本前後の規格されたタバコ (The Reference Cigarette 3R4F, University of Kentucky, KY) を同時喫煙させた。対照群として、12 週齢の若齢 AM-KO マウスとその同腹子各 36 匹に対しても同様の負荷を行った。

喫煙する期間によって、以下のようにわけ

- A) 4 週間喫煙負荷し、検討
- B) 4 週間喫煙負荷、その後経過観察のみ 8 週間行い、検討
- C) 4 週間喫煙負荷、その後経過観察のみ

12 週間行い、検討

D) 12 週間喫煙負荷し、検討

E) 12 週間喫煙負荷、その後経過観察のみ 12 週間、検討

F) 24 週間喫煙負荷し、検討

具体的な検討方法は以下のとおり

●ketamine 100mg/kg 体重、および xylazine 100mg/kg 体重の腹注によりマウスを全身麻酔する。呼吸状態に注意しつつ気管切開、気管内挿管し、小動物用呼吸機能解析装置 (Buxco 社)による人工呼吸管理下においた。規定の方法で機能的残気量を測定した後、全肺気量位まで拡張させた肺からごく少量ずつ呼出させて準静的肺圧量曲線を求めた。これにより、閉胸下における肺気量分画、静的呼吸器系コンプライアンスを算出した。つぎに全肺気量位から急速に、最大呼出流速流量曲線(MEFV curve)を作図し、0.1 秒量を算出した。さらに経腹アプローチにより横隔膜を切開、胸腔を外気と交通させた。

●気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、細胞分画を検討した。Elastase activity、glutathione content、oxidized glutathione (GSSG) も測定し、また、BAL 液中の遊離細胞 10⁵ 個に対する活性酸素産生量を測定した。

●組織計測は、25cmH₂O 定圧灌流固定した肺組織を切り出して切片を作成し、平均肺胞間距離 (mean linear intercept, Lm)、破壊係数 (destructive index, DI)、平均肺胞面積 (SA) を算出した。

4. 研究成果

高齢マウスとして22ヶ月齢のAM遺伝子改変マウス (Old AM-KO) およびその同腹子、コントロールとして12週齢のAM遺伝子改変マウス (Young AM-KO) およびその同腹子を準備し、それぞれにおける肺機能、組織学的変化を検討した。まず肺機能については、Old miceにおける残気量(RV), 残気率(RV/TLC)の有意な増加が認められた(図1、図2)。

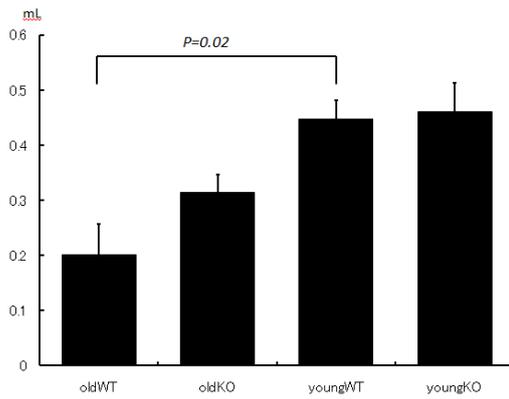


図1: RV

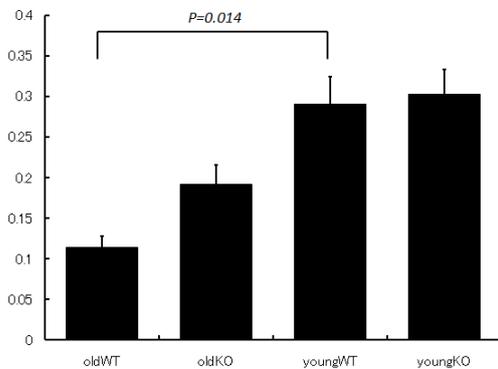


図2: RV/TLC

一方、組織学的な検討の結果、平均肺胞間距離(Lm)がOld miceにおいて有意に長く(図3)、肺胞面積や破壊指数(DI)については有意な差を認めなかった。いずれもAM遺伝子改変の有無とは関連を見出せなかった。

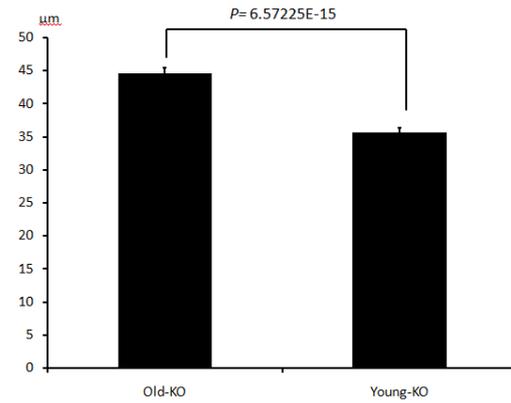


図3: Lm

以上の結果から、高齢化により、肺の弾性収縮力が低下してエアートラッピングを生じさせる結果、残気量の増加やLmの増加を来しているが、肺胞の破壊という点では高齢化の影響は少ないものと判断された。つまり、高齢化のみでは肺は形態学的に肺気腫の形態を示さず、むしろ末梢の気腔のみが拡大した「老人肺」の所見を示すことが示された。同様のことはKlothマウスを用いたわれわれの検討においてもすでに裏付けられている(Ishii M., H. Yamamoto, et al. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;63:1289-1298)。以上から、この高齢マウスに対する慢性喫煙負荷を行うことで老人肺ではなく肺気腫が形成されること、さらにその肺気腫形成にadrenomedullinが抑制的に働くとすればきわめて画期的であり、「老いても肺気腫にはなりにくい」治療法の開発につながる独創的、萌芽的な研究結果を提示するものと考えられた。現在、上記の方法で検討中である。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 寛 (YAMAMOTO HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教)

研究者番号 10361487

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし