

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目:若手研究(B)
 研究期間:2007~2008
 課題番号:19790572
 研究課題名(和文) 間質性肺炎におけるレドックス蛋白チオレドキシンの臨床応用について
 研究課題名(英文) Clinical application of redox-active protein thioredoxin for interstitial pneumonia

研究代表者
 北里 裕彦(KITASATO YASUHIKO)
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号:80309757

研究成果の概要:

恒常的発現肺特異的発現 IL-18 トランスジェニック(TG)マウスとテトラサイクリンで誘導される肺特異的発現 IL-18 TG マウスを報告した。前者は肺気腫が出来るにもかかわらず後者の TG マウスは間質性肺炎が誘導された。これらの結果より IL-18 の発現のタイミングや発現量で間質性肺炎と肺気腫が誘導されることが判明した。また間質性肺炎患者の肺病変部では大量にチオレドキシンを産生していた(投稿準備中)。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 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・呼吸器病学

キーワード:間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

我々のグループはこれまで炎症性サイトカイン IL-18 の間質性肺炎における役割について研究し、IL-18 がマウスやヒトに間質性肺炎を惹起させる可能性を報告した。レドックス活性蛋白である Thioredoxin(以下 TRX)が IL-18/IL-2, およびブレオマイシンが誘導する2つのマウス間質性肺炎・肺障害モデルを抑制することを報告した。パイロットスタディーでは IPF 患者における血清 TRX 値が HRCT のスリガラス様陰影値(GGA スコア)と正の相関をとる。この結果は血清 TRX 値が IPF の治療反応の予測や予後因子の指標

となりうる可能性が示されている。従って、血清や BAL 中の TRX 値が高いものほど、予後良好かつ治療反応性が良好で病変の可逆性が高いという結果が期待される。これらの研究成果からヒト間質性肺疾患において TRX が肺線維化の抑制因子として作用しているものと考えている。またヒト特発性間質性肺炎において、IPF は NSIP(Nonspecific interstitial pneumonia)に比し治療反応性に乏しく予後不良であることが知られている。更に NSIP の中でも fibrotic type(Group II, III)は IPF との鑑別に苦慮する症例がある。血清や BAL 中の TRX 値の測定により、

IPF と NSIP の鑑別や病態の差異の解明につながる事が期待できるかもしれない。TRX 欠損マウスは致死のため生体における TRX の役割は不明な点が多い。本研究で TRX ノックダウンマウスが樹立できれば本研究だけでなくレドックス関連研究のさらなる展開が期待できる。

グルタチオンは細胞外投与に有効性に問題があり汎用されなかったが、共同研究者の淀井らが同定したチオレドキシシン(TRX)は分子量約 12000 のレドックス制御蛋白で、細胞内で過剰発現させたときのみならず、細胞外から投与したときにもヒドロキシルラジカルや過酸化水素を消去する抗酸化作用を示すほか、白血球の遊走を阻止する作用をもち、新規の抗酸化・抗炎症剤となる可能性を秘めている。我々はすでに Thioredoxin(以下 TRX)が IL-18/IL-2, およびブレオマイシンが誘導する2つのマウス間質肺炎・肺障害モデルとマウス喘息モデルを抑制することを報告した。以上の結果から TRX がヒト間質性肺炎の新治療薬となる可能性が非常に高い。

2. 研究の目的

そこで本研究では

- (1)ヒト間質性肺疾患における TRX の生体内での役割や臨床的意義について明らかにする。
- (2) TRX による探索医療の推進を行う。
- (3) ヒト間質性肺疾患における IL-18 の生体内での役割や臨床的意義について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各種ヒト間質性肺疾患検体収集と血清及び BALF 中 TRX 測定

当科ならびに関連病院にて診断された各種ヒト間質性肺疾患の、患者本人への十分な Informed consent のもとで採取・凍結保存された血清および気管支肺胞洗浄液(BAL)中の TRX 値を ELISA 法にて測定し、同様の方法でストックされたコントロール検体のデータと比較検討するとともに、患者の各種臨床所見(肺機能検査所見, PaO₂, 血清 KL-6, LDH, ESR, CRP, IL-18 値, BALF 中のリンパ球, 好中球, 好酸球比率, IL-18 等のサイトカイン)との相関関係について検定を行い、血清や BAL 中の TRX 値が患者の重症度や予後の新規のマーカーとなりうるかを評価する。

(2) 患者肺組織の免疫染色・病理学的検討

我々はすでに自前でリコンビナントヒト TRX を大量に作製した。そしてこのリコンビナントヒト TRX を免疫原にして免疫組織染色が可能な抗体を作製した。胸腔鏡下肺生検や開胸肺生検によって採取された患者肺組織を、作製した抗 TRX 抗体を用いた免疫組織染色にて検討し、肺における TRX の局在について検討を行う。

(3) 患者の CT 所見検討

Kazerooni らが報告した HRCT visual scoring (AJR 1997; 169:977-983)を行い、肺機能検査、血清 TRX 値、IL-18 値などと Spearman correlation rank test を用いて相関を見る。CT 上の間質性陰影(GGA)、線維化像とこれら TRX,IL-18 が相関するか検討する。

(4) 肺特異的 IL-18トランスジェニックマウスの作製

マウス Ig κ -チェーンの、V-J2-C 領域から取り出したシグナルペプチドと、マウスのプロ IL-18c DNA を用い、シグナルペプチドを持つ成熟 IL-18cDNA を、PCR 法によって取得した。この成熟 IL-18 DNA をヒトサーファクタント蛋白のプロモーター-SPC, SV40 small T intron と牛由来ポリ A を含む 3.7SPC/SV40 ベクターで、サブクローニングした。(SPC-IL-18SP とする)。この TG をマウスの受精卵に上注入し TG マウスを作製した。またテトラサイクリン誘導体 doxycycline(dox)で誘導させる SPC-Cre マウスを用いて肺特異的に dox で IL-18 を誘導する triple TG マウスを樹立し dox を 4 週間飲ませた。

4. 研究成果

(1) 各種ヒト間質性肺疾患検体収集と血清及び BALF 中 TRX

血清 TRX1 は IPF では 47.6ng/ml(29.1-79.3)、NSIP で 61.2ng/ml(23.6-68.2)、健常 control では 21.3ng/ml (16.3-29)で IIPs と control では有意差はあったが IPF と NSIP において有意差はなかった。また、病勢の marker とは相関はなかった。

(2) 患者肺組織の TRX 免疫染色の検討

免疫染色においては炎症細胞や再生上皮(細気管支上皮や II 型肺胞上皮)には強く発現が認められたが fibroblastic foci や古い線維化巣にはほとんど染色されなかった。(論文投稿準備中)

(4) 肺特異的 IL-18トランスジェニックマウスの作製

IL-18TG マウス(SPC-IL-18TG)の肺には CD8 陽性 T 細胞や大型の肺胞マクロファージを伴った炎症細胞浸潤と肺胞構造の破壊による肺気腫状の変化が病理学的に見られた。この TG マウスは肺の容量と静肺コンプライアンスの増加、心臓は著明な右心不全と肺高血圧が確認された。また、この TG マウスの肺及び血清中には著明な IL-18 の発現とともに IFN- γ と IL-5,IL-13 が TG(-)マウスに比べ著明に上昇していた。血清中の IgE,IgG1 はコントロール TG(-)マウスに比べ著明に上昇していた。しかしながら、肺には著明な好酸球浸潤や繊維化を認めない。

一方、tet-on システムを用いて 4 週間マウス肺に IL-18 を発現させると間質性肺炎が誘導できた。

考察

(1) TRX1 は IPF おいて活動病変である fibroblastic foc や線維化には発現がなかったことより血清 TRX1 は炎症の marker となりうるが、IPF の病勢や線維化の指標とは考えにくい。また、IPF の新規治療薬としての可能性が示唆された。

(2) 肺における IL-18 の発現が間質性肺炎や COPD の病因に関与していることが示唆された。また IL-18 や IL-18 受容体の阻害薬が新規の間質性肺炎や COPD の治療薬になる可能性がある。

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 9 件)

1. 梶山智子, 北里裕彦, 池田二郎, 阿部一朗, 末友仁, 佐藤留美, 松永和子, 合原るみ, 大久保洋, 末安禎子, et al. 80 歳以上の高齢者非小細胞肺癌へのゲフィチニブ(イレッサ)投与に関する臨床的検討. 呼吸と循環 2008;56(5):527-532. 査読有り

2. 立花恒輔, 北里裕彦, 田尾義昭, 猪島尚子, 吉田誠, 高田昇平, 川崎雅之. 当院において検出された non-mac ntm 症例の臨床的検討. 日本呼吸器学会雑誌 2008;46(増刊):316. 査読なし

3. 岩田安弘, 岡元昌樹, 星野友昭, 北里裕彦, 岩永知秋, 相澤久道. 特発性肺線維症と非特異性間質性肺炎におけるレドックス活性蛋白 thioredoxin 1 の発現の検討. 日本呼吸器学会雑誌 2008;46(増刊):274. 査読なし

4. 永田忍彦, 北里裕彦, 川畑政治, 福島一雄, 岩永知秋, 加治木章, 北原義也, 相澤久道. 特発性肺線維症(uiip)の組織学的予後因子に関する検討. 日本呼吸器学会雑誌 2008;46(増刊):194. 査読なし

5. Hoshino T, Kato S, Oka N, Imaoka H, Kinoshita T, Takei S, Kitasato Y, Kawayama T, Imaizumi T, Yamada K, et al. Pulmonary inflammation and emphysema: Role of the cytokines il-18 and il-13. Am J Respir Crit Care Med 2007;176(1):49-62. 査読有り

6. 北里裕彦, 成田優子, 時任高章, 岡元昌樹, 合原るみ, 星野友昭, 古賀丈晴, 岩永知秋, 相澤久道. キノコ包装作業者に発症した職業性過敏性肺臓炎の 2 例. 日本職業・環境アレルギー

一学会雑誌 2007;14(2):52-59. 査読有り

7. 大下祐一, 北里裕彦, 矢野敬文, 岡元昌樹, 星野友昭, 木下正治, 藤本公則, 永田忍彦, 加藤誠也, 古賀丈晴, et al. Discordant uip(usual interstitial pneumonia)と考えられた 1 例. 臨牀と研究 2007;84(8):1122-1125. 査読有り

8. 松井大作, 北里裕彦, 本多靖洋, 上野敬子, 田中篤利, 枝國信貴, 向野達也, 西村宗胤, 川山智隆, 星野友昭, et al. 器質化肺炎様の多発斑状影を呈した streptococcus dysgalactiae subsp.Equisimilis による細菌性肺炎の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌 2007;45(1):36-42. 査読有り

9. 永田忍彦, 北里裕彦, 川畑政治, 福島一雄, 相澤久道, 岩永知秋, 加治木章, 北原義也. 間質性肺炎における sp-a の発現と病型、予後. 日本呼吸器学会雑誌 2007;45(増刊):257. 査読なし

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/imed1/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北里裕彦(KITASATO YASUHIKO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号:**80309757**

(2)研究分担者

なし()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし()

研究者番号: