

平成22年4月16日現在

研究種目： 若手研究 (B)
研究期間： 2008～2009
課題番号： 20790579
研究課題名 (和文) 炎症性サイトカインおよび酸化ストレス制御による
COPD 治療法に関する研究
研究課題名 (英文) Study of new therapy for COPD by regulation of inflammatory cytokines
and oxidant stress
研究代表者
木下 隆 (KINOSHITA TAKASHI)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号： 90454917

研究成果の概要 (和文)：

大部分の Caspase (例 Caspase-3) は Apoptosis の誘導に関与している。一方 Caspase-1 は炎症性サイトカイン IL-1 β , IL-18 の成熟化に必須であることが知られている。我々は以前に抗酸化薬チオレドキシン (TRX1) が COPD のマウスモデルを抑制することを報告した (Kinoshita, BBRC 2007)。また COPD 患者で IL-18 と重症度の関連を示した (Imaoka, ERJ 2009)。これらの結果は COPD の病態に炎症性サイトカインだけでなく酸化ストレスの関与が示唆された。そこで本研究では豚膵エラスターゼをマイクロスプレーにて気道内に噴霧し COPD マウスモデル作製した。そして C57BL/6 バックグラウンドの Caspase-1 欠損 (KO) マウスを用いて気腫化における Caspase-1 の役割を検討した。Caspase-1 KO マウスでは野生型マウスに比べ有意に平均肺胞壁間距離 (Mean alveolar chord length) を抑制した。これらの結果は Caspase-1 の活性化が COPD の発症に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

[Background]

Caspase-1 is essential to maturity of IL-1 family cytokines IL-1 β , IL-18 and IL-33. We have recently reported that a significant correlation exists between serum levels of IL-18 and pulmonary function (%FEV₁) in COPD patients (Imaoka, ERJ 2009). Constitutive overproduction of mature IL-18 in the lungs of transgenic C57BL/6 mice resulted in severe emphysema lesions (Hoshino, AJRCCM 2007). We reported that redox-active protein thioredoxin 1 (TRX1) prevented the development and progression of elastase-induced emphysema in wild type C57BL/6 mice (Kinoshita, BBRC 2007). Both inflammatory cytokines and oxidative stress may be involved in the pathology of COPD. In this study, we investigated the roles of caspase-1 in elastase-induced COPD mouse model.

[Material and methods]

On day 0, C57BL/6 caspase-1 deficient (KO) mice and control wild type C57BL/6 mice and was anesthetized by intraperitoneal administration of thiopental (2.5 to 5 mg/mouse), and a microsyringe (MicroSprayer, Penn-Century, Inc., Philadelphia, PA) was inserted through its trachea. Fifty microliters of 0.9% physiological saline (vehicle) or 50 μ L of purified porcine pancreatic elastase (PPE, 0.25 U) dissolved in saline was sprayed into the trachea. Mice were sacrificed on day 21. Lung tissues and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were histopathologically analyzed.

[Result]

A computerized color image analysis revealed that the mean alveolar chord length (30 \pm 2.0 μ m, n = 5 for each group) was significantly reduced in elastase-treated caspase-1 KO mice, when compared with control wild type mice (39.9 \pm 1.5 μ m). In addition, inflammatory cells in BALF of

(n = 10 for each group) was significantly prevented in elastase-treated caspase-1 KO mice.

[Conclusion]

Our results suggest that activation of caspase-1 may contribute to the pathogenesis of emphysematous changes and pulmonary inflammations in COPD patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

タバコ煙は多量のオキシダント(reactive oxygen species; ROS)の産生源である。また酸化ストレス自身がIL-18の産生誘導することが判明した(10)。そこで我々は“タバコ煙→肺の過剰な酸化ストレス→肺へのIL-18の産生誘導→肺へのTh1,Th2 サイトカインの誘導→COPD発症”という作業仮説を立てた。肺特異的なIL-18を恒常的に発現するトランスジェニックマウスが肺の炎症細胞を伴う肺気腫を誘導することが判明した。これらの研究結果はCOPD患者の肺病変部ではタバコ煙による持続する過剰な酸化ストレスがIL-18の産生が増加させる。その結果、肺病変部に大量の炎症細胞のリクルートメントを誘導し慢性の強い炎症が持続する。その結果、肺胞機構が破綻されCOPDが発症することが示唆された。

2. 研究の目的

最近の我々の研究で恒常的発現肺特異的発現IL-18 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マウスを樹立した。前者のTGマウスは肺気腫が出来る。Tet on systemを用いてテトラサイクリンで肺特異的に成熟マウスにIL-18を発現させると間質性肺炎が誘導された(11)。このように炎症性サイトカインIL-18の発現のタイミングで肺気腫や間質性肺炎が誘導されることが判明した。これらの事実はIL-18がCOPDだけでなく炎症性肺疾患の発症に関

与している事を強く示唆する。また、我々が樹立したCOPDマウスモデルCOPD患者と比較検討することでCOPDの病態の解明に役立つと考えられる。

これまでに我々はTRXがIL-18による肺の炎症を抑制することを見出している。肺気腫病変がTRXによる抑制の分子学的解析を行う。COPDとくに重症のCOPD患者に効果のある治療薬は抗コリン剤や長期作用β作動薬(LABA)ぐらいしかなく、かつ効果も限られている。我々の研究結果はRedox蛋白による酸化ストレスの制御がCOPD発症を抑制する可能性を示すだけでなく、redox蛋白がCOPDの新規治療法への大きな可能性がある。同時にIL-18のシグナルを制御することがこの疾患の治療への応用が期待できると考えられた。

3. 研究の方法

A. COPD患者の病変部、血清、呼気中及びBALFのIL-18, TRXに関する解析

1. 抗ヒトIL-18, TRX1抗体及びELISAの樹立

我々はすでにRT-PCR法を用いてヒトIL-18, TRX1のcDNAを作製した。これを発現ベクターpQE30(キアゲン製)に組み込みリコンビナントヒトIL-18, TRX1を大量に作製した。このリコンビナント蛋白を免疫原にして免疫組織染色が可能なウサギ抗IL-18, TRX1ポリクローナルナル抗体を作製した

(Kinoshita BBRC 2007)。本研究では、このリコンビナント蛋白を免疫原にして抗ヒト IL-18 モノクローナル抗体を作製する。樹立した抗ヒト IL-18, TRX1 抗体を用いてサンドイッチ ELISA 法で IL-18, TRX1 の ELISA を樹立する。現時点で申請者らは 5 つの抗ヒト IL-18 モノクローナル抗体を作製し現在解析中である。

2. COPD 患者肺組織の炎症性サイトカインの肺病変部での発現検討

我々は、手術による摘出肺を用いて、COPD 患者の肺の炎症変化を検討する。福岡大学 2 外科の白日教授・呼吸器内科の渡辺教授のグループで Lung volume reduction surgery(LVRS)を行った COPD 患者 20-40 名(目標)のホルマリン固定摘出肺組織もしくはパラフィン切片を用いる。コントロールとして肺癌等の手術による摘出肺の正常部位を用いる。

方法：

COPD 患者の摘出肺組織の各パラフィンブロックから HE 染色スライドを 2 枚ずつ作製。HE 染色スライドを鏡検後、研究に用いるパラフィンブロックを選択。各パラフィン切片から組織染色用に未染スライドを 7 から 10 枚ずつ作製。これを用いて炎症性サイトカイン IL-18, IL-32 の発現を我々のグループが自前で作製した抗 IL-18(clone 8), IL-18R α (H44)、IL-32, TRX 抗体で免疫化学染色を行う。同時にレドックス関連物質(チオレドキシン)、プロテアーゼ(例：MMP-12)等を免疫化学染色法で COPD 病変部における発現を検討する。

3. COPD 患者肺組織のレドックス蛋白 TRX1 の肺病変部での発現検討

採取された患者肺組織を、作製した抗 TRX1 抗体を用いた免疫組織染色にて検討し、肺における TRX1 やストレス関連蛋白の局在について検討を行う。

B. COPD、喘息治療への応用

TRX1 による治療の試み

上記したように恒常的発現肺特異的発現 IL-18 TG マウスは肺気腫を伴った肺炎が誘導された。この IL-18 TG マウスは生後約 6 週間から肺気腫が出現し、約生後 10 週で症状が完成する。そこでこの IL-18TG マウスに対する TRX1 前投与の効果を検討する。リコンビナントヒト TRX1(40 ug)を隔日に TG マウス生後 6 週から 10 週まで(計 4 週間)投与し、抑制効果を評価する。生後 10 週後に、マウス肺を摘出し還流固定し HE 染色を行ない、平均肺胞壁間距離(mean alveolar chord length)を測定し、肺の気腫化の程度を

病理学的に比較する。肺の圧・量曲線と静肺コンプライアンス(Cst)を測定し TRX1 の治療効果を検討する。

4. 研究成果

Caspase-1K0 マウスを用いた研究成果は投稿準備中である。また研究成果一部はすでに学会誌に報告した。Copy を添付し研究の報告とする。

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 3 件)

1. Okamoto M, Azuma K, Hoshino T, Imaoka H, Ikeda J, Kinoshita T, Takamori S, Ohshima K, Edakuni N, Kato S, Iwanaga T, Aizawa H. Correlation of decreased survival and IL-18 in bone metastasis. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 2009; 48(10): 763-773.

2. Imaoka H, Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, Sawada M, Takei S, Kinoshita T, Kawayama T, Kato S, Aizawa H. Endogenous and exogenous thioredoxin 1 prevents goblet cell hyperplasia in a chronic antigen exposure asthma model. *Allergol Int* 2009; 58(3): 403-410.

3. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kato S, Iwasaki H, Watanabe K, Aizawa H. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31(2): 287-297.

[学会発表] (計 1 件)

Takashi Kinoshita, Koichi Azuma, Nobutaka Edakuni, Hideo Nakao, Masaki Okamoto, Jiro Ikeda, Tomoaki Hoshino, Tomoaki Iwanaga, Hisamichi Aizawa. Clinical Characteristic of Lung Cancer Patients with Interstitial Pneumonia Treated with Chemotherapy or Radiotherapy. Express IL-18 in Asthma Death Cases. European Respiratory Society Annual Congress 2008, Berlin, Germany, October 4 - 8, 2008

[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

木下 隆 (KINOSHITA TAKASHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号： 90454917

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：