

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390172

研究課題名（和文） 炎症性肺疾患の発症分子機構の解明と新たな治療法の探索

研究課題名（英文） The study of molecular mechanism and new therapeutic strategy for the pathogenesis of inflammatory pulmonary disease

研究代表者

粕谷 善俊 (KASUYA YOSHITOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70221877

研究成果の概要（和文）：炎症性肺疾患の分子発症メカニズムを明らかにし、新たな治療法に生かすべく、以下の研究を遂行した。(1) mitogen-activated protein kinase (MAPK) の 1 つであり、炎症反応の中心的役割を演じている p38 に着目し、テトラサイクリン依存的に肺胞 II 型上皮細胞 (AECII) 内で p38 を活性化する遺伝子改変マウスの作出を試みた。(2) 間質性肺炎/肺線維症の発症が AECII 内の p38 活性化に依存すること、そのトリガーが AECII からの IL-6 の放出によることを証明した。(3) マウスに慢性閉塞性肺疾患を誘導し、介在分子を網羅的に解析した。

研究成果の概要（英文）：To put the molecular mechanism for pathogenesis of inflammatory pulmonary diseases to practical use, the following studies were performed. (1) Focusing on p38 which plays a central role in various inflammatory responses, one of mitogen-activated protein kinase (MAPK), we tried to produce transgenic mice exhibiting p38 activation in tetracycline-dependent and site (type II alveolar epithelial cell: AECII)-specific manners. (2) We confirmed that severity of bleomycin-induced interstitial pneumonia/pulmonary fibrosis is clearly dependent on the degree of p38 activation in AECII and that IL-6 produced from AECII plays a crucial role in the pathogenesis as a trigger. (3) We induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in mice and comprehensively estimated plausible candidate molecules in COPD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：炎症性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、間質性肺炎、p38、肺胞 II 型上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの我々の研究を含めた国内外の解析から、細胞内リン酸化酵素：p38 の持

つ一つの大きな機能として、免疫・炎症作用を司る蛋白分子群ネットワークの産生制御の中心に位置することが明らかになって

きている。この事実は、p38 を標的組織特異的に常時活性化させる特殊な状況を作り出すことにより、炎症性疾患モデルマウスの作出が可能であることを想起させる。一方、p38 を標的組織特異的に常時不活性化させることで、炎症性疾患誘導に抵抗性を示すことも想像された。そして、これらのモデルマウスを用いた疾患発症の分子基盤情報を、新たな治療法の確立にフィードバックすることが可能となる。この戦略のもと、本研究の企画に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、未だ有効な治療法のない炎症性肺疾患の発症分子機構を解明し、新たな治療法の探索を目的とする。以下の項目について検討して行く。

(1) p38の病態的機能に着目し、誘導型炎症性肺疾患発症モデルマウスの樹立

(2) すでに作出している肺胞II型上皮細胞(AECII)特異的な常時p38活性低下マウスが、ブレオマイシン(Bleo)誘導性間質性肺炎/肺線維症の発症に抵抗性を示すメカニズムを詳細に検討する。

(3) タバコ煙溶液(CSS)とリポポリサッカライド(LPS)の交互投与で肺気腫を誘導し、介在因子を網羅的に探る。

## 3. 研究の方法

(1) 炎症性肺疾患モデルマウスの作出  
慢性閉塞性肺疾患(COPD)の病態進展系譜に則したモデルマウスの樹立を目指し、テトラサイクリン(Tet)誘導性の肺胞特異的に p38 活性を上昇しうるトランスジェニック(TG)マウス: TRE-MKK6-c. a. /tTS/SP-C-rtTA を作出する。

(2) 間質性肺炎成立における p38 活性を介した AECII の関与様式

恒常的に AECII の p38 の活性を低下させたマウス: SP-C-p38d. n. /TG、p38 の活性を上昇させたマウス: SP-C-MKK6c. a. /TG および野生型マウス(WT)に対し、経気管支的に Bleo 60 mg/Kg を与え、2 週間後に肺線維症の成立度合いを 3 系統間で病理学的に確認する。また、Bleo 負荷の初期(3 日目)に気管肺胞洗浄液(BALF)を回収し、液内サイトカインをウェスタンブロット(WB)アレイで網羅的に解析し、Bleo 誘導性間質性肺炎の引き金となる因子を同定する。

(3) 肺気腫成立介在分子の網羅的解析

20 $\mu$ l CSS(4倍希釈)を経気管支的に1日1回、4日連続で投与し、5日目は50 $\mu$ lのLPS(200 $\mu$ g/ml)を投与する。この操作を1 cycleとして3 cycle繰り返す、さらに20 $\mu$ l CSS(4倍希釈)の4日連続投与を加え、トータル19日

間の処置を行う。処置後、病理所見を確認するとともに、処置過程: 9、14日目および処置後の19日目にBALFを回収しWBアレイに供し、サイトカインを中心とした300超の炎症関連分子に関して、その発現変化を追う。

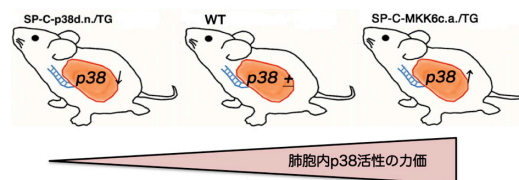
## 4. 研究成果

### (1) 炎症性肺疾患モデルマウスの作出

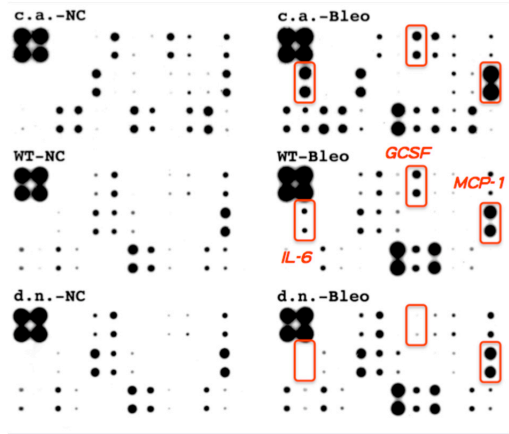
作出した TRE-MKK6-c. a. /tTS/SP-C-rtTA triple TG マウスに、Tet 誘導体であるドキシサイクリン(Dox)を1ヶ月間飲水させたが、リポーター遺伝子の発現は確認できるものの、肺気腫化の確認には至らなかった。原因として、triple TG マウスを作出するための、SP-C-rtTA TG マウスおよび TRE-MKK6-c. a. /tTS TG マウスのそれぞれの導入遺伝子コピー数の低さに起因すると考えた。そこで、それぞれの TG マウスを新たに作出し、コピー数の高い個体を得ることが出来たため、high copy TRE-MKK6-c. a. /tTS/SP-C-rtTA triple TG マウスを作出すべく、繁殖段階に入った。

### (2) 間質性肺炎成立における p38 活性を介した AECII の関与様式

Bleo 負荷に準じた肺胞への血球浸潤亢進、線維化亢進、生存率悪化、肺コンプライアンスの低下が、WT マウスに比べて、恒常的に AECII の p38 の活性を低下させたマウス: SP-C-p38d. n. /TG では、緩和していることをすでに確認していた。一方、恒常的に AECII の p38 の活性を上昇させたマウス: SP-C-MKK6c. a. /TG では、Bleo 負荷による肺線維化が WT のそれに比べて、より顕在化していた。すなわち、AECII 内の p38 活性の力価が高くなるに従って Bleo による間質性肺炎発症が亢進することが明らかとなった。そこで、この現象を司る因子を明らかにするため、以下のストラテジーで Bleo 負荷初期の BALF 内のサイトカイン/ケモカインを WB アレイで網羅的に解析し、発症原因分子を絞り込んだ。



AECII 内の p38 の力価が 3 段階に異なる TG マウスを Bleo 負荷に供し、BALF 内で Bleo 応答性に発現変動し、且つ、その変動度合いが p38 の力価に準じて上昇もしくは低下する分子を同定した。この 2 つの条件を満たす分子を確定することによって、より明確に間質性肺炎発症に関わる分子を絞り込むことが可能となる。

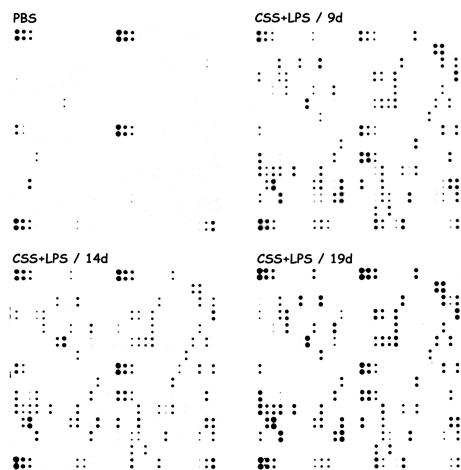


解析の結果、IL-6、G-CSF、MCP-1を同定するに至った。また、これらのサイトカイン/ケモカインの組織内発現は、免疫蛍光染色の結果よりAECIIに集約されていることも見いだした。そこで、初代培養AECIIにBleo負荷をかけ、その際に、IL-6中和抗体を共存させた際の培養液中のG-CSF、MCP-1の産生量を検討したところ、Bleoで発現誘導されたG-CSF、MCP-1は、IL-6中和抗体の投与でその発現が抑制されることを確認した。さらに、WTマウスにBleo負荷をかけた際の肺組織ホモジネートをリン酸化WBアレイに供したところ、stat3、Akt、Ribosomal S6 proteinのリン酸化が認められ、いずれもIL-6受容体の下流に位置するシグナル分子でることが判明した。

以上のことから、間質性肺炎の成立にAECIIにおけるp38の活性が密接に関与し、その活性に関連したIL-6の産生が発症のトリガーとして機能することが示唆された。

#### (3) 肺気腫成立介在分子の網羅的解析

モルモットにおいて、短期間でCOPDを発症する系が樹立されていた(Biol. Pharm. Bull. 32: 1559-1564, 2009)。そこで、この手法を参考にして、マウスにおいても短期間でCOPDを成立させる条件を検討した。また、COPD成立の際に肺胞内で変動する炎症関連分子について、308WBアレイにて検討した。



その結果、PBS投与群に比べ、CSS+LPS投与群では、様々な分子の発現誘導が確認された。ヒトにおいてCOPD発症の際に発現上昇が報告されているIL-8のマウスhomologueであるLIX(CXCL-5)、MIP-2(CXCL-2)はもとより、肺胞の気腫化と密接に関わると考えられているMMP-9の顕著な経時的発現上昇も認められた。また、CSS+LPS投与終了後に肺病理所見を確認したところ、肺胞の気腫化と細気管支上皮細胞の過形成を認めた。以上のことから、本法でマウスにCOPDを惹起し、その介在分子を探ることは治療法開発に向けたストラテジーとして有用であると考えられた。そこで、今後、(1)で作出したTGマウスを用いた疾患誘導の際の分子基盤情報と、本実験結果を照らし合わせながら、COPD発症分子機構の解明と治療法の探索を進めて行く。

#### (4) 研究成果の追記事項

本研究目的とは異なるものの、以下の成果報告論文について、本課題番号とともに科研費交付を謝辞に記載した。

○リンパ球マーカーとして認知されているCD69が、近年、炎症性疾患において病態制御機能を果たすことが報告されている。そこで、CD69ノックアウト(KO)マウスを用いて、間質性肺炎および急性肺障害モデルを作成し、CD69が炎症性肺疾患の発症に密接に関わることを証明した。

○N型電位依存性カルシウムチャンネル(N-VDCC)-KOマウスを用いて、多発性硬化症モデルであるEAEの発症に、N-VDCCが脊髄組織内のケモカイン産生を介して寄与することを証明した。

○モルモットアドレナリンβ受容体遺伝子を世界で最初にクローニングし、その機能をヒトおよびラット由来のそれらと比較検討した。

#### 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)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Ishizaki S, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Yamauchi K, Matsunaga F, Iwamura C, Nakayama T and Tatsumi K. Role of CD69 in acute lung injury. *Life Sci.* 査読有、Vol. 90、2012、657-665、  
DOI: [10.1016/j.lfs.2012.03.018](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.018)
- ② Tsuyusaki J, Kuroda F, Kasuya Y, Ishizaki S, Yamauchi K, Sugimoto H, Kono T, Iwamura C, Nakayama T and Tatsumi K:

Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is attenuated in CD69-deficient mice. *J. Recept. Signal Transduct.* 査読有、vol. 31、2011、434-439、

DOI: [10.3109/10799893.2011.631929](https://doi.org/10.3109/10799893.2011.631929)

- ③ Yamauchi K, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Ishizaki S, Matsunaga H, Iwamura C, Nakayama T and Tatsumi K: Attenuation of lung inflammation and fibrosis in CD69-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Respir. Res.* 査読有、vol. 12、2011、131-140、

DOI: [10.1186/1465-9921-12-131](https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-131)

- ④ Tanaka Y, Takahashi H, Shibata S, Namiki K, Kimura S, Koike K and Kasuya Y: Functional analysis of guinea pig  $\beta$  1-adrenoceptor. *J. Recept. Signal Transduct.* 査読有、vol. 31、2011、395-401、

DOI: [10.3109/10799893.2011.610109](https://doi.org/10.3109/10799893.2011.610109)

- ⑤ Tokuhara N, Namiki K, Uesugi M, Miyamoto C, Ohgoh M, Ido K, Yoshinaga T, Yamauchi T, Kuromitsu J, Kimura S, Miyamoto N and Kasuya Y: N-type calcium channel in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Biol. Chem.* 査読有、vol. 285、2010、33294-33306、

DOI: [10.1074/jbc.M109.089805](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.089805)

- ⑥ 粕谷善俊、萩原昌彦、須藤龍彦 『p38 阻害剤』 日本薬理学会誌、査読有、133 巻、2009、357-359、  
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cf4yakur/2009/013306/011&name=0359-0361j&UserID=133.82.251.161>

[学会発表] (計 11 件)

- ① 吉岡健人、田中健介、須藤龍彦、小林健、

天野寛之、木村定雄、粕谷善俊 : p38 MAP kinase ノックアウトマウスを用いた CLP 誘導敗血症モデルにおける介在分子の網羅的解析、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都

- ② 並木香奈、松永博文、吉岡健人、田中健介、石田純治、須藤龍彦、深水昭吉、木村定雄、粕谷善俊 : EAE 発症における p38 による IL-17 発現の調節、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都

- ③ 小林健、田中健介、天野寛之、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊 : 肺線維症の病態進展における肺胞 II 型上皮細胞における蛋白質リン酸化シグナルとサイトカイン産生、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都

- ④ 田中健介、天野寛之、小林健、萩原昌彦、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊 : 肺由来幹/前駆細胞 (PSPC) の簡便な採取方法の検討、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都

- ⑤ 粕谷善俊 (招待講演) : p38 阻害薬-p38 遺伝子改変マウス解析のフィードバック、第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 / 第 20 回国際リウマチシンポジウム: Next Decade Symposium 『新しい病因・病態・治療法を探る-あらたな関節リウマチ治療標的分子』、2011 年 7 月 19 日、神戸

- ⑥ 田中健介、松永博文、天野寛之、小林健、石田純治、深水昭吉、萩原昌彦、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊 : COPD 発症における介在分子の網羅的解析、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月、横浜 (震災により中止)

- ⑦ 小林健、田中健介、天野寛之、松永博文、萩原昌彦、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊 : 肺線維症の病態における蛋白質リン酸化のシグナル経路、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月、横浜 (震災により中止)

- ⑧ 並木香奈、松永博文、石田純治、徳原直紀、上杉麻衣、須藤龍彦、萩原昌彦、深水昭吉、木村定雄、粕谷善俊 : EAE における p38 の関与様式、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月、横浜 (震災により中止)

- ⑨ 徳原直紀、並木香奈、上杉麻衣、宮本憲優、大郷真、山内敏彦、黒光淳郎、木村定雄、宮本憲優、粕谷善俊 : 実験的自己免疫性脳脊髄炎の病態進展における N 型カルシウムチャンネルの関与、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月、横浜 (震災により中止)

- ⑩ 粕谷善俊、杉山文博、松尾祐志、並木香奈、石田純治、桑木共之、須藤龍彦、柴田さゆり、萩原昌彦、巽浩一郎、深水昭吉、木村定雄 : プレオマイシン誘導性間質性肺炎成立における p38MAPK の役割、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 17 日、大阪

- ⑪ 柴田さゆり、田中芳夫、高橋裕美、木村定

雄、粕谷善俊：モルモットβ1 アドレナリン受容体の細胞内情報特性、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 16 日、大阪

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：神経性疾患の治療又は予防のための医薬組成物

発明者：萩原昌彦、松永博文、並木香奈、粕谷善俊

権利者：宇部興産株式会社、千葉大学 (50/50)

種類：特許

番号：特願 2011-071464 号

(PCT/JP2012/058067)

出願年月日：2011 年 3 月 29 日（基礎出願）

／2012 年 3 月 28 日（PCT 出願）

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/bunsiseitai/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

粕谷 善俊 (KASUYA YOSHITOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70221877

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

須藤 龍彦 (SUDO TATSUHIKO)

理化学研究所・化合物ライブラリー評価

研究チーム・専任研究員

研究者番号：30260227

杉山 文博 (SUGIYMA FUMIHIRO)

筑波大学・人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：90226481