

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 4 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590133

研究課題名（和文）遺伝子改変マウスを用いた慢性閉塞性肺疾患発症機序の解明と新治療法の開発

研究課題名（英文）EVALUATING THE PATHOGENESIS AND DEVELOPMENT OF NOVEL THERAPIES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE USING GENE-ENGINEERED MICE

研究代表者

田口 修（TAGUCHI OSAMU）

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90197244

研究成果の概要（和文）：

本研究では閉塞性肺疾患（COPD）の病態形成に関わる樹状細胞や上皮細胞や炎症性細胞由来のサイトカイン、プロテアーゼの産生に対する活性化プロテイン C(APC)とトロンボモジュリン(TM)の抑制効果が認められた。また、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2 及びトランスフォーミング増殖因子(TGF) β 1 トランスジェニック(TG)マウスを作成し、COPD に TGF β 1 と MMP-2 の関与が認められた。In vivo 実験では TGF β 1 と MMP-2 による肺病変に対する APC と TM の抑制効果の検討は現在進行中である。

研究成果の概要（英文）：

In the present investigation, activated protein C (APC) and thrombomodulin (TM) showed significant suppressive activity on the expression of cytokines and proteases from dendritic cells, alveolar epithelial cells and inflammatory cells. In addition, we succeeded in the design and development of human transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) and human metalloproteinase-2 (MMP-2) transgenic mice, and demonstrated the involvement of both TGF β 1 and MMP-2 in the pathogenesis of COPD. Further, we are currently carrying out several *in vivo* studies to demonstrate the effect of APC and TM on the pulmonary lesions induced in both TGF β 1 and MMP-2 transgenic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：呼吸器内科

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：閉塞性肺疾患、煙草、高齢者、炎症性サイトカイン、プロテアーゼ、肺胞破壊、炎症性細胞。

1. 研究開始当初の背景

COPD の予後は極めて悪く、現在の治療は対症治療が中心であり、根本的な治療法は確立さ

ていない。COPD の病態には T 細胞や好中球やマクロファージの活性化、炎症性サイトカインやプロテアーゼの過剰分泌、ガス交換の主

体となる細胞のアポトーシスの増加、結合組織マトリックスの破壊、さらに血液凝固と免疫異常などが関与している。我々は、以前から炎症性疾患における血液凝固因子の役割に注目し、特に気管支喘息や特発性間質性肺炎などの呼吸器領域での炎症性疾患において、組織因子やトロンビンなどがその病態形成に重要な役割を果たしていることを報告してきた。さらに抗凝固因子であるトロンボモジュリン (TM) 及び活性化プロテイン C (APC) が免疫制御作用と抗炎症作用を有することを見だし、気管支喘息、特発性間質性肺炎などの慢性炎症性肺疾患における TM と APC の臨床的意義とマウスモデルの治療効果を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、COPD の治療薬としての凝固制御因子・抗炎症因子である TM 及び APC の有用性を検討するため、肺動脈内皮細胞、肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、単球、リンパ球、樹状細胞などを用いた *in vitro* 実験でタバコ喫煙の刺激による細胞の活性化、炎症性サイトカインの産生に対する効果を検討した。さらに thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)、TGF β 1、MMP-2 などの遺伝子組み換えマウスも利用した COPD モデルマウスでの *in vivo* 実験によって、COPD における凝固性因子の炎症・アポトーシス・免疫応答・肺組織傷害などに対する抑制的効果を検討した。

3. 研究の方法

① 炎症性サイトカインの発現に及ぼす煙草抽出物と APC の影響：人由来の肺胞上皮細胞 (A549)・単球 (THP-1) の細胞株も実験に用いた。各々の細胞は煙草抽出物と APC 及び TM で培養し、TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1、IL-6 などの炎症性サイトカインと MMP-2 の産生を ELISA 法と PCR 法で検討した。

② 樹状細胞の分化・活性化に対する煙草抽出物と APC の影響：野生型マウス由来樹状細胞は骨髄から分離する。細胞は APC、リポポリサッカライド (LPS) 又は煙草抽出物で培養し、MHCII、CD86 などの発現を検討した。

③ TGF β 1 及び MMP-2 トランスジェニックマウスの作成：マイクロインジェクション法により TGF β 1 及び MMP-2 発現コンストラクトを導入した C57BL/6J マウスの受精卵から、トランスジェニックマウスのファウンダー候補となる産子を得て、サザン解析によるジェノタイピングを行い、トランスジェニック (TGF β 1 及び MMP-2 TG) マウス、ファウンダー個体を同定した。

④ 喫煙誘発 COPD マウスの作製と解析：C57BL/6 野生型マウスに毎日 30 分、一日 6 回、

3 ヶ月間喫煙を暴露させ、肺気腫モデルを作製する。Whole body plethysmography (Buxco 社製) を用いて呼吸機能を測定し、血液、気管支肺胞洗浄液、肺組織を採取する。血液、気管支肺胞洗浄液中の TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 などの炎症性サイトカイン量、好中球、肺胞マクロファージの数、組織学的変化で急性肺傷害の程度を評価する。

4. 研究成果

① タバコ煙水抽出物の刺激により肺胞上皮細胞、血管内皮細胞からの炎症性サイトカインと凝固系活性化因子の産生が亢進されることが明らかになった。また、TM と APC は煙草抽出物の刺激による A549 細胞、THP-1 細胞からの炎症性サイトカイン、MMP2 の産生を抑制した。

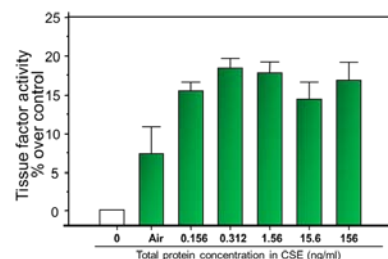


図 1. 肺動脈内皮細胞膜上の組織因子活性

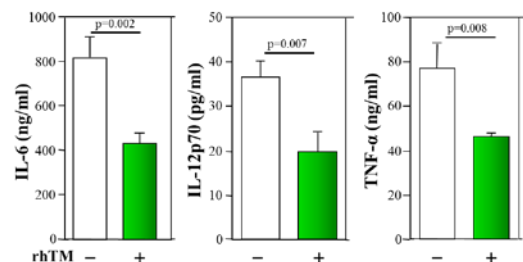


図 3. TM1 による抑制効果

② *In vivo* 実験ではタバコ煙水抽出物の吸入により気管支肺胞洗浄液中の組織因子と炎症性サイトカインの濃度が高値であった。

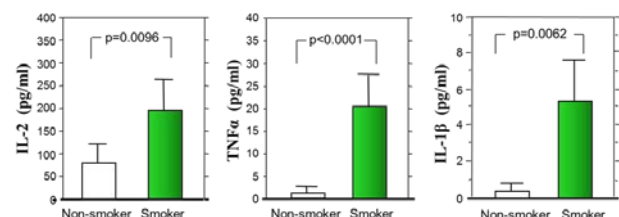


図 2. 炎症性サイトカイン量の変化

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 11 件)

1. Fujiwara A, Kobayashi H, Masuya M, Maruyama M, Nakamura S, Ibata H,

- Fujimoto H, Ohnishi M, Urawa M, Naito M, Takagi T, Kobayashi T, Gabazza EC, Takei Y, Taguchi O. Correlation between circulating fibrocytes and activity and progression of interstitial lung diseases. *Respirology*. 2012, in press, 掲載決定 査読有
2. Fujiwara A, Taguchi O, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Boveda-Ruiz D, Toda M, Yasukawa A, Matsushima Y, Miyake Y, Kobayashi H, Kobayashi T, Gil-Bernabe P, Naito M, Yoshida M, Morser J, Takei Y, Gabazza EC. Role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in allergic bronchial asthma. *Lung*. 190:189-198, 2012 査読有
 3. D'Alessandro-Gabazza CN, Kobayashi T, Boveda-Ruiz D, Takagi T, Toda M, Gil-Bernabe P, Miyake Y, Yasukawa A, Matsuda Y, Suzuki N, Saito H, Yano Y, Fukuda A, Hasegawa T, Toyobuku H, Rennard SI, Wagner PD, Morser J, Takei Y, Taguchi O, Gabazza EC. Development and preclinical efficacy of novel transforming growth factor- β 1 short interfering RNAs for pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 46:397-406, 2012 査読有
 4. Naito M, Kobayashi T, Yoshida M, Fujiwara K, Onishi M, Fujiwara A, Takagi T, Kobayashi H, Gabazza EC, Takei Y, Taguchi O. Solitary pulmonary nodule of benign metastasizing leiomyoma associated with primary lung cancer: a case report. *J Med Case Reports*. 5:500, 2011 査読有
 5. Takagi T, Taguchi O, Toda M, Ruiz DB, Bernabe PG, D'Alessandro-Gabazza CN, Miyake Y, Kobayashi T, Aoki S, Chiba F, Yano Y, Conway EM, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Suzuki K, Takei Y, Morser J, Gabazza EC. Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 183:31-42, 2011 査読有
 6. Maruyama T, Taguchi O, Niederman MS, Morser J, Kobayashi H, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Nakayama S, Nishikubo K, Noguchi T, Takei Y, Gabazza EC. Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents: double blind, randomised and placebo controlled trial. *BMJ*. 340:c1004, 2010 査読有
 7. Qin L, D'Alessandro-Gabazza CN, Aoki S, Gil-Bernabe P, Yano Y, Takagi T, Boveda-Ruiz D, Ramirez Marmol AY, San Martin Montenegro VT, Toda M, Miyake Y, Taguchi O, Takei Y, Morser J, Gabazza EC. Pulmonary hypertension is ameliorated in mice deficient in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost*. 8:808-816, 2010 査読有
 8. Maruyama T, Gabazza EC, Morser J, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza C, Hirohata S, Nakayama S, Ramirez AY, Fujiwara A, Naito M, Nishikubo K, Yuda H, Yoshida M, Takei Y, Taguchi O. Community-acquired pneumonia and nursing home-acquired pneumonia in the very elderly patients. *Respir Med*. 104:584-92, 2010 査読有
 9. Takagi T, Taguchi O, Aoki S, Toda M, Yamaguchi A, Fujimoto H, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Ramirez AY, Naito M, Yano Y, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujiwara A, Takei Y, Morser J, Gabazza EC. Direct effects of protein S in ameliorating acute lung injury. *J Thromb Haemost*. 7:2053-2063, 2009 査読有
 10. Takagi T, Morser J, Gabazza EC, Qin L,

Fujiwara A, Naito M, Yamaguchi A, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Boveda Ruiz D, Gil Bernabe P, Iwasaki Y, Takei Y, Taguchi O. The coagulation and protein C pathways in patients with sleep apnea. *Lung*. 187:209-213, 2009
査読有

- Ikeda A, Gabazza EC, Morser J, Imoto I, Kuroda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Hara K, Ruiz DB, Bernabe PG, Katsurahara M, Toda M, Kobayashi Y, Yano Y, Sumida Y, Suzuki K, Taguchi O, Takei Y. Presence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in *Helicobacter pylori*-associated gastro-duodenal disease. *Helicobacter*. 14:147-155, 2009 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- 気管支喘息患者における thrombomodulin 陽性樹状細胞の役割について /Inverse correlation of thrombomodulin-positive dendritic cells with airflow limitation in patients with allergic bronchial asthma. 高木 健裕, 田口修, 内藤雅大, 戸田雅昭, 小林哲, 三宅泰士, Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza, Morser J, Gabazza EC. 第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉幕張メッセ 2011 年 11 月 27 日～29 日
- Role of the complement system in exacerbation of acute lung injury in Thrombin-Activatable fibrinolysis inhibitor-deficient mice. 内藤雅大, 田口修, 高木健裕, 戸田雅昭, 小林哲, 三宅泰士, Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza, C, Gabazza EC. 第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉幕張メッセ 2011 年 11 月 27 日～29 日
- Naito M, Taguchi O, Takagi T, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza

EC. Role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. European Respiratory Society International Congress, September 24-28, 2011, Amsterdam, Netherlands.

- Takagi T, Onishi M, Naito M, Fujiwara A, Kobayashi T, Kobayashi H, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Taguchi O. Effect of thrombin inhalation in a murine model of bronchial asthma. European Respiratory Society International Congress, September 24-28, 2011, Amsterdam, Netherlands.
- Fujiwara A, Urawa M, Naito M, Takagi T, Ebihara A, Kobayashi T, Kobayashi H, D'Alessandro-Gabazza CN, Takei Y, Gabazza EC, Taguchi O. Protective effect of thrombomodulin-positive dendritic cells against murine asthma. European Respiratory Society International Congress, September 18 - 23, 2010, Barcelona, Spain.
- Naito M, Takagi T, Taguchi O, Toda M, Kobayashi H, Kobayashi T, Fujiwara A, D'Alessandro-Gabazza CN, Boveda-Ruiz D, Morser J and Gabazza EC. Protective effect of thrombomodulin-positive dendritic cells against murine asthma. The 14th International Congress of Immunology August 22-27, 2010, Kobe, Japan
- Miyake Y, Toda M, Yasukawa A, D'Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Naito M, Boveda-Ruiz D, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. Thrombin regulates the immune response. The 14th International Congress of Immunology August 22 - 27, 2010, Kobe, Japan
- Boveda-Ruiz D, Toda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Gil-Bernabe P, Miyake Y, Yasukawa A, Naito M,

- Takagi T, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. The role of regulatory T cells in lung fibrosis. The 14th International Congress of Immunology August 22 - 27, 2010, Kobe, Japan
9. Gil-Bernabe P, Yano Y, D' Alessandro-Gabazza CN, Boveda-Ruiz D, Toda M, Miyake Y, Yasukawa A, Takagi T, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. Exogenous activated protein C ameliorates diabetic nephropathy. The 14th International Congress of Immunology August 22 - 27, 2010, Kobe, Japan
 10. Takagi T, Taguchi O, Toda M, Kobayashi H, Kobayashi T, Fujiwara A, Naito M, D' Alessandro-Gabazza CN, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Morser J, Gabazza EC. Protective effect of thrombomodulin in a murine model of allergen-induced asthma. The 14th International Congress of Immunology August 22 - 27, 2010, Kobe, Japan
 11. Yasukawa A, Toda M, Miyake Y, D' Alessandro-Gabazza CN, Boveda-Ruiz D, Takagi T, Naito M, Taguchi O, Morser J, Gabazza EC. Allergen-induced bronchial asthma in the factor V Leiden mouse. The 14th International Congress of Immunology August 22 - 27, 2010, Kobe, Japan
 12. Naito M, Taguchi O, Takagi T, Toda M, Kobayashi T, Miyake Y, Boveda-Ruiz D, D' Alessandro-Gabazza CN, Morser J, Takei Y, Gabazza EC. Role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23 - 28, 2010, Kyoto, Japan.
 13. Moroka R, Gil-Bernabe P, D' Alessandro-Gabazza CN, Boveda-Ruiz D, Toda M, Miyake Y, Yasukawa A, Naito M, Takagi T, Iwasa M, Taguchi O, Morser J, Takei Y, Gabazza EC. Protective role of protein S in liver fibrosis. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23 - 28, 2010, Kyoto, Japan.
 14. Takagi T, Taguchi O, Naito M, Toda M, Kobayashi T, Miyake Y, Boveda-Ruiz D, D' Alessandro-Gabazza CN, Morser J, Gabazza EC. Protective effect of thrombomodulin in a murine model of allergen-induced asthma. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23 - 28, 2010, Kyoto, Japan.
 15. Toda M, Takagi T, Taguchi O, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, D' Alessandro-Gabazza CN, Miyake Y, Yasukawa A, Morser J, Gabazza EC. Thrombomodulin modulates maturation and antigen presentation of murine dendritic cells in vitro. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23 - 28, 2010, Kyoto, Japan.
 16. Yasukawa A, Takagi T, Taguchi O, Toda M, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, D' Alessandro-Gabazza CN, Miyake Y, Morser J, Gabazza EC. Allergen-induced bronchial asthma in the factor V Leiden mouse. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23 - 28, 2010, Kyoto, Japan.
 17. Miyake Y, Matsushima Y, D' Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Naito M, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. The role of thrombin in allergic

- bronchial asthma is mediated by dendritic cells. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23 - 28, 2010, Kyoto, Japan.
18. Boveda-Ruiz D, D' Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Gil-Bernabe P, Miyake Y, Yasukawa A, Matsushima Y, Naito M, Takagi T, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. Protective role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in allergic bronchial asthma. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23 - 28, 2010, Kyoto, Japan.
19. Matsushima Y, Corina N. D' Alessandro-Gabazza, Takagi T, Naito M, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Taguchi O, Morser J, Gabazza EC. Protein S alters differentiation, maturation and antigen presentation of murine dendritic cells in vitro. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23 - 28, 2010, Kyoto, Japan.
20. Takagi T, Naito M, Fujiwara A, Fujimoto H, Ebihara A, Yasui H, Kobayashi T, Kobayashi H, D' Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Takei Y, Taguchi O. Role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in bronchial asthma. European Respiratory Society

International Congress, September 12 - 15, 2009, Vienna, Austria.

21. Fujiwara A, Naito M, Takagi T, Ebihara A, Kobayashi T, Kobayashi H, D' Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Takei Y, Taguchi O. Effect of a thrombin inhibitor on murine bronchial asthma. European Respiratory Society International Congress, September 12 - 15, 2009, Vienna, Austria.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ヒト TGFβ1 を発現するトランスジェニックマウス

発明者: 小林哲、Gabazza Esteban

権利者: 小林哲、Gabazza Esteban

種類: 特許

番号: 特願 2011-237166

出願年月日: 2011年10月28日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 修 (TAGUCHI OSAMU)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90197244

(2) 研究分担者

小林 哲 (KOBAYASHI TETSU)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20437114

(3) 連携研究者

Gabazza Esteban (GABAZZA ESTEBAN)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00293770