

機関番号：37104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790790

研究課題名 (和文) 新規動物モデルを用いた COPD と併存症の研究

研究課題名 (英文) Study for COPD and its comorbidity using new COPD animal model

研究代表者 松永 和子 (MATSUNAGA KAZUKO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60333233

研究成果の概要 (和文)：

COPD 動物モデルマウスの肺組織の転写プロファイル解析を行った。TG マウスにおける IL-18 の発現レベルは、野生型マウスの 5～7 倍に上昇していた。また、多くの遺伝子に発現変動が見られ、週齢を重ねるごとにその数は増大し、変動幅も大きくなった。5, 9, 13 週齢のいずれかで野生型マウスと比較して 1.5 倍以上のシグナル値変動があったスポットは約 14%に達した。変動遺伝子の中でもっとも興味深かった遺伝子は chitinase 3-like 1 (Chi311)/ヒト cartilage glycoprotein 39(gp39) と Chi313 の 2 つの chitinase 関連遺伝子であった (論文投稿中)。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we analyzed the lung mRNA expression profiles of a murine model of COPD developed using a lung-specific IL-18-transgenic mouse. In this transgenic mouse, the expression of 608 genes was found to vary more than 2-fold in comparison with control WT mice, and was clustered into 4 groups. The expression of 140 genes was constitutively increased at all ages, 215 genes increased gradually with aging, 171 genes decreased gradually with aging, and 82 genes decreased temporarily at 9 weeks of age. Interestingly, the levels of mRNA for the chitinase-related genes chitinase 3-like 1 (Chi311), Chi313, and acidic mammalian chitinase (AMCase) were significantly higher in the lungs of transgenic mice than in control mice. The level of Chi311 protein increased significantly with aging in the lungs of IL-18 transgenic, but not WT mice. Thus our results suggest that chitinase-related genes may play an important role in establishing pulmonary inflammation and emphysematous changes in smokers and COPD patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 22 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：呼吸器疾患

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：COPD、動物モデル、  
chitinase

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト肺サーファクタントプロモーター(SPC)を用いて恒常的に肺特異的発現する炎症性サイトカインIL-18トランスジェニック(TG)マウスを樹立した。このマウスの肺には大型の泡状肺胞マクロファージとCD8陽性T細胞が中心の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。心臓は著明な右心不全と肺高血圧が確認された。興味深いことにこのTGマウスの肺には著明なIL-18の発現とともにTh1サイトカインIFN- $\gamma$ と同時にTh2サイトカインのIL-5,IL-13の発現を認めた。

#### Gene array 法について

数万から数十万に区切られたスライドガラス、またはシリコン基盤上にDNAの部分配列を高密度に配置し固定したものである。この分析器具を用いれば、数万から数十万の遺伝子発現を一度に調べることが可能である。例えば、ヒトの遺伝子数は3万-4万といわれているが、これらのすべての遺伝子断片が1枚のガラス基板上に固定されており、このプローブと呼ばれる遺伝子断片と、ターゲットと呼ばれるヒトの細胞から抽出したmRNAを逆転写酵素で相補的DNA(cDNA)に変換したものとをハイブリダイゼーションすることによって、ヒト細胞内で発現している遺伝子情報を網羅的に検出することが可能である。

#### Chitinase とは

キチン質は、寄生虫や昆虫の表面を覆っている構成成分であり、キチナーゼは、これらの生物によって感染した際に、生体内にて誘発される。キチン質自体人間の生体内に存在しないにもかかわらず、キチナーゼは人間の遺伝子レベルには存在する。Acidic Mammalian Chitinase (AMCase)は、マウスの喘息モデルにおいてTh2細胞を活性化し喘息を悪化させることがScience(304,1678,2004)で報告されている。IL-13の肺での過剰発現はChi3l3とAMCaseで誘導することが報告された(J Exp Med 2009;206:1149)。

### 2. 研究の目的

これらの研究結果はCOPDの発症や重症化にIL-18の関与を示唆するだけでなく、樹立したTGマウスはヒトのCOPDの病態に似ていることが示唆された。そこで本COPD動物モデルにおける病態を網羅的な遺伝子発現情報から考察するためGene array法を用いた。

### 3. 研究の方法

本研究ではA Whole Mouse Genome Oligo Microarray Kit®を用いた。数十万個のオリゴヌクレオチドプローブをフォトリソグラフィ技術と固相反応化学技術を使用して、基板上で20-25merのオリゴヌクレオチドを人工的に合成することにより作成される。このオリゴヌクレオチドは、あらかじめ遺伝子の特異的な塩基配列を特定するためにコンピュータを用いて位置や長さなどがデザインされている。特に、特定遺伝子と完全に相補的になるようデザインされたプローブパーフェクトマッチ(PM)だけでなく、ミスマッチ(MM)と呼ばれる非特異的な塩基配列もプローブとして配置することによって、非特異的なクロスハイブリダイゼーションの定量値をシグナル値から減算できるのも大きな特徴である。

本ヒト肺サーファクタントプロモーター(SPC)を用いて恒常的に肺特異的発現する炎症性サイトカインIL-18TGマウスの肺組織からmRNAを抽出し、gene array法を用いての転写プロファイル解析を行った

#### 検出方法

2種類の異なるサンプルからmRNAを抽出し、逆転写によって合成したcDNAを、それぞれ異なる蛍光色素で標識することによってターゲットを調製する。蛍光色素は通常、Cy3(緑)、Cy5(赤)が利用されており、この2つの試料をガラス基板上で競合的にプローブとハイブリダイゼーションすることで、スキャナーで検出する。本実験では5W, 9W, 13WのTG(+)+3匹(Cy3)、同腹のTG(-)3匹(Cy5)を用いたCy3/Cy5 ratioを検討

RT-PCR法は二本鎖DNAに特異的に挿入(インターカレート)して蛍光を発する色素(SYBR green)を用いる方法と、増幅するDNA配列に特異的なオリゴヌクレオチドに蛍光色素を結合させたプローブを用いる方法である(これをTaqMan RT-PCR)。前者はあらゆる配列に対して同じ試薬を用いることができ汎用性が高いが、プライマー二量体のような非特異的な二本鎖DNAも計測してしまう欠点がある。後者は特異的な配列をもつ蛍光プローブを作成する必要があるが、任意の配列を特異的に定量できる利点がある。確認はRT-PCR法を用いた。

#### 4. 研究成果

IL-18TG mice の肺組織の  
転写のプロファイリングの解析

TG マウスにおける IL-18 の発現レベルは、野生型マウスの 5~7 倍に上昇していた。また、多くの遺伝子に発現変動が見られ、週齢を重ねるごとにその数は増大し、変動幅も大きくなった。5, 9, 13 週齢のいずれかで野生型マウスと比較して 1.5 倍以上のシグナル値変動があったスポットは約 14% に達した。

Group 1: 発現亢進 (140 genes)

IL-18, イムノグロブリン分子, Ig レセプター、small inducible cytokines, 補体、組織適合性抗原、アミロイド、chitinase 関連遺伝子 [chitinase 3-like 1 (Chi311/gp39)、Chi313] Acidic Mammalian Chitinase (AMCase)、チャンネル遺伝子

Group 2: 週齢とともに発現亢進 (215 genes)

アルギナーゼなどの炎症関連遺伝子、カテプシンなどのリゾチーム酵素、カスパーゼなどのアポトーシス関連遺伝子

Group 3: 週齢とともに発現減少 (171 genes)

P450 GST, Peroxiredoxin などの抗酸化酵素 GPCR、チャンネル、アクアポリン、ミオシンなど

Group 4: 9W で発現亢進 (82 genes)

GPCR (olfactory receptor-like) や P450 (26A2) など

変動遺伝子の中でもっとも興味深かった遺伝子は chitinase 3-like 1 (Chi311)/ヒト cartilage glycoprotein 39(gp39) と Chi313 の 2 つの chitinase 関連遺伝子であった。論文投稿中なので子細は書けないことを了承してください。

#### 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. Takei S, Hoshino T, Matsunaga K, Sakazaki Y, Sawada M, Oda H, Takenaka SI, Imaoka H, Kinoshita T, Honda S, Ida H, Fukuda TA, Aizawa H. Soluble interleukin-18 receptor complex is a novel biomarker in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R52. (査読有)

2. Iwata Y, Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Tajiri M, Matsunaga K, Azuma K, Kawayama T,

Kinoshita T, Imaoka H, Fujimoto K, Kato S, Yano H, Aizawa H. Elevated levels of thioredoxin 1 in the lungs and sera of idiopathic pulmonary fibrosis, non-specific interstitial pneumonia and cryptogenic organizing pneumonia. *Intern Med* 2010;49:2393-2400. (査読有)

3. 松永和子, 永田忍彦, 若松謙太郎, 岩田安弘, 熊副洋幸, 古森雅志, 赤崎卓, 加治木章, 北原義也, 原田実根, 相澤久道. *Streptomyces pneumonia* の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌 2009;47:569-574. (査読有)

4. 若松謙太郎, 永田忍彦, 古森雅志, 麻生達磨, 小野聡子, 田口和仁, 松永和子, 赤崎卓, 熊副洋幸, 加治木章, 北原義也, 原田実根. 自家蛍光電子気管支内視鏡検査が高度扁平上皮異形成の経過観察に有用であった 1 例. 日本胸部臨床 2009;68:985-990. (査読有)

5. 熊副洋幸, 加治木章, 永田忍彦, 麻生達磨, 小野聡子, 赤崎卓, 田口和仁, 松永和子, 古森雅志, 若松謙太郎, 北原義也, 原田実根, 中園貴彦, 工藤祥. 右傍気管嚢胞の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌 2009;47:180-183. (査読有)

6. 永田忍彦, 松永和子, 若松謙太郎, 加治木章, 北原義也. 結核患者の入院時の栄養状態と退院時の転帰の関係に関する研究. 結核 2009;84:611-616. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 和子 (MATSUNAGA KAZUKO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60333233

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：