

## 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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590862

研究課題名（和文）難治性肺疾患におけるmDiaの役割の解析

研究課題名（英文）Analysis of the roles of mDia in refractory pulmonary diseases

研究代表者

小賀 徹（OGA TORU）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90378670

研究成果の概要（和文）：本研究は、難治性呼吸器疾患における Rho エフェクター分子 mDia の役割を解析し、病態解明や将来の治療法開発に応用することを目標とする。急性喘息動物モデルにおいて、mDia1 欠損マウスでは、有意に野生型マウスより気管支肺胞洗浄液中の細胞数・好酸球数とも少なく、Th2 サイトカインも低値であった。気道過敏性に関しても mDia1 欠損マウスでは、野生型より抑制傾向がみられた。mDia1 は、アレルギー気道炎症に寄与し、治療標的となりうる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to analyze the roles of mDia known as Rho effectors in refractory pulmonary diseases and to elucidate their pathogenesis and develop novel therapies. In an acute asthma model, mice deficient in mDia1 showed less numbers of total cells and eosinophils and lower concentrations of Th2 cytokines in bronchoalveolar lavage fluid than wild-type mice. Airway hyperresponsiveness in asthmatic mice deficient in mDia1 was also reduced as compared to asthmatic wild-type mice. Thus, mDia1 contributes to allergic airway inflammation and can be a therapeutic target.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

キーワード：mDia, 難治性肺疾患、炎症、線維化

## 1. 研究開始当初の背景

呼吸器領域では、重症喘息や肺線維症のように、気道や肺の炎症、線維化、リモデリングを特徴とする難治性疾患がある。

気管支喘息では、吸入ステロイド薬の普及により、多くの患者の呼吸機能や症状が改善し、喘息死も抑制され、治療の第一選択薬となったが、長期経過で見ると、非喘息患者より呼吸機能の低下が著しく、研究代表者らの喘息患者での 3-5 年間の長期経過の検討にお

いても、気流制限の指標である一秒量は経時的に低下を続けており、長期的に喘息がコントロールできていないとは言えない(Oga T, et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; *J Clin Epidemiol* 2005)。吸入ステロイド薬の、短期的な抗炎症薬としての気道炎症への効果は強力であるが、長期的なリモデリング、線維化に対する効果が乏しいことが問題である。また、ステロイド薬の長期的な使用の体内への影響もまだ十分に解明されたとはいえない。従って、新しい病態に基づいた治療法の解明は不可欠であり、喘息治療の方向性として、抗炎症療法と同時に抗リモデリング、抗線維化も考慮することが必要である。

肺線維症は、組織の炎症、傷害に続く修復過程において、間質の細胞数の増加と細胞外基質蛋白の増加を特徴する。中でも原因不明な特発性肺線維症(IPF)は、いまだ著効する薬剤が存在しない厚生労働省の特定疾患に認定される難病であり、平均3-5年の臨床経過で進行し、高度な肺の線維化による呼吸不全、急性悪化、肺癌、感染症などの合併により、予後不良の経過をとる。治療には、これまで抗炎症効果を期待してステロイド薬や免疫抑制薬を中心に用いられてきたが、概して反応は不良であり、特に直接線維化を標的とした治療が望まれ、早急な対策が求められている。

Rho エフェクター分子 mDia には、mDia1, mDia2, mDia3 の3つのアイソフォームが存在する。研究分担者は、mDia1 の生理的意義を調べるために mDia1 欠損マウスを作成し、mDia1 が T 細胞の遊走に重要な働きをしていることを報告した(Sakata D, et al. *J Exp Med* 2007)。喘息や肺線維症には、T 細胞が重要な役割を果たすことがあり、mDia1 が、これらの病態に関与している可能性を考え、mDia1 欠損マウスをこれらの動物モデルに適用しその役割を検討することを考えた。

## 2. 研究の目的

気管支喘息や肺線維症といった難治性肺疾患において、診断や治療に有用な指標やシグナルを発見し、提唱する。特に、mDia1 欠損マウスを用いて、呼吸器疾患動物モデルに適用して、その機能解析を行い、生理的役割を解明する。

## 3. 研究の方法

mDia1 欠損マウスと野生型マウスに、急性～慢性喘息動物モデルに適用して、炎症、線維化への評価をする。その方法としては、マウスに卵白アルブミン(OVA)をアラムとともに

に第0日と第12日に2回感作後、第22日から1週間(急性期)、2週間(急性～慢性期)、3週間(慢性期)続けてOVAを連日吸入させて発症させ、評価する。評価項目としては、気管支肺胞洗浄(BAL)による、洗浄液(BALF)中の細胞数(総細胞数、好酸球を中心とした細胞分画)や炎症性サイトカインの測定、気道過敏性の測定、血清中のIgEの測定、肺組織、組織リモデリングの指標となるコラーゲン量、などである(図1)。

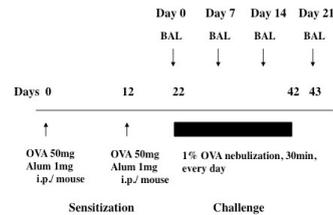


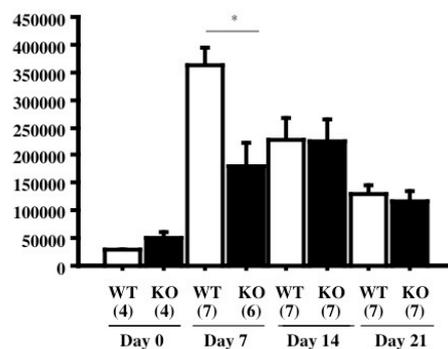
図1. 喘息モデルプロトコール

## 4. 研究成果

(1) 吸入チャレンジ開始にて喘息を発症させた後、チャレンジ後、第0、3、7、14、21日後にBALを行った。野生型マウス(WT)では、第0、3、7とBALF中の総細胞数が増加し、第7日(急性期)のピーク後、14日、21日(慢性期)とそれは減少していった(図2A)。特に、喘息に特徴的な好酸球数とその数に反映されていた(図2B)。

一方、mDia1 欠損マウス(KO)では、同じように、BALF中の総細胞数は第0、3、7と増加していたが、第7日では明らかに有意に野生型より総細胞数、好酸球数とも少なかった(図2A、B)。しかし、その傾向は継続されるものではなく、第14、21と炎症の消退に促って、野生型喘息マウスとの差はみられなくなった。

(A)



(B)

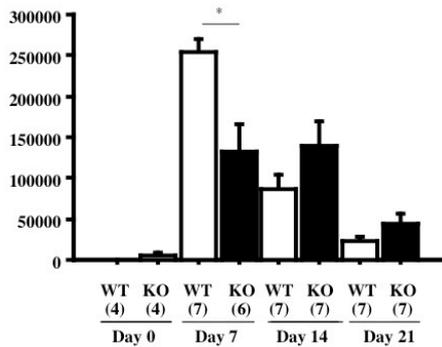


図1 野生型(WT、白棒)と mDial1 欠損 (KO、黒棒) 急性～慢性喘息発症マウスの BALF 中の総細胞数 (A) と好酸球数 (B) の比較 ( ) 内は匹数、\*  $p < 0.05$ )

また、その他の細胞分画について検討してみると、第7日にて、mDial1 欠損喘息マウスでは、好中球は第7日にて、リンパ球は第7, 14日にて、ともに有意に野生型喘息マウスより減少していた。FACSによりさらに詳細に解析すると、mDial1 欠損喘息発症マウスでは、野生型喘息発症マウスより、T細胞、B細胞、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞のいずれも第7日目で、さらに一部は第14日でも有意に減少していた。

さらに、吸入第7日にて、血清 OVA 特異的 IgE を測定すると、非発症群では有意差は認めず、発症群では、野生型、mDial1 欠損の両群とも有意に上昇していたが、mDial1 欠損マウスの方が、野生型マウスより有意に低値であった (図3)。

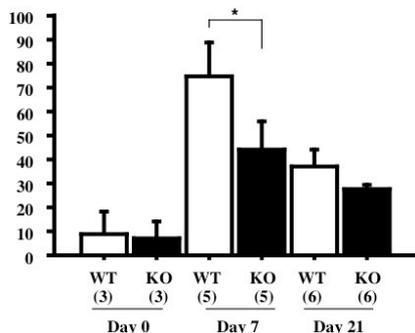


図3 野生型(WT、白棒)と mDial1 欠損 (KO、黒棒) 急性～慢性喘息発症マウスの血清 OVA 特異的 IgE ( ) 内は匹数、\*  $p < 0.05$ )

加えて、BALF 中で IL4, IL13 (Th2 サイトカイン)、IFN- $\gamma$  (Th1 サイトカイン) を測定すると、喘息発症群では、Th2 サイトカインである IL4, IL13 に関して、野生型は急性炎症のピークである吸入第7日にて、急な上昇、また、炎症の消退した吸入第21日ではベースラインにもどっていたが、mDial1 欠損マウスでは、吸入第7日にて、有意にその上昇度が乏しく、ここでも、逆に、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  に関してそのような傾向はみられず、喘息に特徴的な Th2 炎症反応が mDial1 欠損マウスでは、抑制されていることが示された。

また、気道炎症のみならず、気道過敏性に関して検討すると、吸入後第7日において、野生型喘息発症マウスでは、非発症マウスより有意に亢進していたが、mDial1 欠損マウスでは、発症マウスと非発症マウスでは有意差はみられなかった (methacholine 0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5 mg/mL)。このことから、mDial1 欠損マウスは気道過敏性の発症が抑制されていることが示唆され、mDial1 が何らかの役割を果たしていると考えられる。

このように、mDial1 欠損マウスを用いた研究により、mDial1 は、喘息発症において、気道炎症や気道過敏性を促進性に作用することが示された。これまでの報告では、mDial1 欠損マウスでは、T細胞の増殖や遊走能の低下することが示されている。これを基盤に機序を推定すると、喘息モデルの検討において、抗原 OVA に対して抗原提示細胞が作動し、Tリンパ球が活性化するが、この時点で、mDial1 欠損マウスでは、十分な Tリンパ球が遊走できていないため、喘息反応の発症が遅延される。そのため、引き続いて起こる Bリンパ球の活性化も弱くなり、その結果として、mDial1 欠損マウスでは、IgE の産生も少なく、気道過敏性も減弱するという、仮説をたてた。また、最近では、mDia が筋線維芽細胞の分化に関与しているという報告もあり、炎症とは別に、線維芽細胞や気道平滑筋においてリモデリングに関与している可能性がある。

このように、mDial1 は、アレルギー性気道炎症に寄与し、将来の喘息をはじめとしたアレルギー疾患の治療標的となりうることを示唆されたが、まだ現象論的な状態であるので、今回の3年間の検討では機序までつめることができなかつたが、T細胞に着目しながら機序を *in vitro*, *in vivo* レベルでつめていくことによって、発信していきたいと考えている。

(2) 研究背景にも論述した難治性肺疾患である肺線維症に関して、エイコサノイドの役割について陳述した。特に、プロスタグランジン(PG)F<sub>2</sub> $\alpha$ が、その受容体FPを介して、肺線維芽細胞において細胞増殖とコラーゲン産生を促進することによって、線維化を進行する作用があり、それは従来線維化に最重要であると考えられてきた transforming growth factor(TGF)- $\beta$ のシグナルと独立したものであり独特のものであり、FPの受容体拮抗薬が新規治療薬の候補になりうることをまとめた。

mDia と PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -FP シグナルの関係にもどって考えてみると、ヒト肺線維芽細胞セルライン IMR90 において、PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -FP シグナルのコラーゲン産生は、Y-27632 (ROCK/Rho kinase 阻害薬)により抑制されることが示された。Rho の本質的な機能は時空間特異的にアクチン細胞骨格を形成して、他の分子が働く舞台を提供することであるが、その Rho の作用は、Rho エフェクター分子の活性化により遂行され、その中の最も知られているものの1つが ROCK であり、もう1つが mDia である。従って、アクチン細胞骨格が線維芽細胞のコラーゲン産生に重要であり、特に、アクチン重合を促進し線維化アクチンの増成をおこす mDia は、組織の線維化やリモデリングに重要な働きをしている可能性があり、mDia 欠損マウスにおけるアレルギー炎症後の気道リモデリング抑制にも関わっている可能性がある。

また、さらに、その臨床応用として、PGF<sub>2</sub> $\alpha$ の代謝物の血清濃度が IPF 患者で上昇しており、IPF で用いられてきた KL-6 や SP-D といったバイオマーカーより、優れた指標であることを示唆する内容を追記した。これら一連の内容は下記発表英文論文 (a) に該当し、論文の acknowledgement に、本科研費の関与を記載した。

(3) また、気道炎症に関して研究を続けるうち、その関連疾患として、睡眠時無呼吸がある。これは、近年全身性炎症を基盤として心血管障害と関連することが明らかとなり、CPAP (持続気道陽圧) 療法が第一選択治療として確立している疾患であるが、完治の乏しい難治性の疾患であるといえる。ところが最近、睡眠時無呼吸は、咳などの呼吸器症状や、気道過敏性やリモデリング、といった、気道炎症に関連した病態も同時に存在することが明らかとなった。そこで我々は、閉塞型睡眠時無呼吸の患者において、全身性炎症と気道炎症の関連を調査した。全身性炎症は採血にて、気道炎症は誘発痰、にて検体を採取し、TNF- $\alpha$ 、IL6、IL8、CRP、VEGF といった炎症性

マーカーを同時に測定し、これら同士だけではなく、睡眠関連指標、肥満、気道抵抗といった指標との関連を調査し、全身性炎症には肥満、特に内臓肥満との関連が強く、気道炎症には、睡眠関連指標 (無呼吸低呼吸指数や低酸素) との関連が強いことを発見した。この内容は下記発表英文論文 (b) に該当し、論文の acknowledgement に、本科研費の関与を記載した。また、こういったことが、患者差の症状、特に息切れにどう影響しているかを調査し、同じく、英文論文下記 (c) にまとめて、論文の acknowledgement に、本科研費の関与を記載した。

## 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 7 件)

本科研費に関連あるもののみを記載した。英文論文は、すべての論文の acknowledgement に、本科研費の関与を明示し、全て査読あり。和文論文は、全て査読なし。

### 英文論文

(a) Oga T, Handa T, Mishima M, Chin K, Narumiya S: Roles of eicosanoids in pulmonary fibrosis. *Inflamm Regen* 2013, 33(2), 109-113

(b) Aihara K, Oga T, Chihara Y, Harada Y, Tanizawa K, Handa T, Hitomi T, Uno K, Mishima M, Chin K: Analysis of systemic and airway inflammation in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2013, 17(2), 597-604 doi: 10.1007/s11325-012-0726-y

(c) Aihara K, Oga T, Yoshimura C, Hitomi T, Chihara Y, Harada Y, Murase K, Toyama Y, Tanizawa K, Handa T, Tsuboi T, Mishima M, Chin K: Measurement of dyspnea in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2013, 17(2), 753-761 doi:10.1007/s11325-012-0759-2.

### 和文論文

(d) 小賀徹: COPD と肺線維症における慢性炎症 実験医学 2011, 29, 1572-1579

(e) 小賀徹: 新薬を生み出す診療と研究を目指して 最新医学 2011, 66, 1680-1684

(f) 小賀徹: 肺線維症におけるプロスタノイドの役割 呼吸 2010, 29, 789-794

(g) 小賀徹: プロスタノイド受容体と肺線維症 呼吸と循環 2010, 58, 1241-1248

[学会発表] (計 4 件)

関連ある招待講演、シンポジウム、海外発表のみ記載。

Oga T: Roles of prostanoids in pulmonary fibrosis. 1st Meeting of Asian-Pacific Federation of Inflammation and Regeneration: APFIR2011 (Symposium) 2011.6 (Kyoto)

小賀徹: 肺線維症におけるプロスタノイドの役割 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 (ワークショップ) 2010.12 (神戸)

Oga T: Roles of prostanoids in pulmonary fibrosis. International Symposium for the 50<sup>th</sup> Anniversary of Taipei Medical University. (invited lecture) 2010.5 (Taipei, Taiwan)

Oga T, et al: Prostaglandin F2 $\alpha$ -FP signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. American Thoracic Society International Conference. 2010. 5 (New Orleans, USA)

[図書] (計 0 件)

該当せず。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当せず。

○取得状況 (計 0 件)

該当せず。

[その他]

ホームページ等 該当せず。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小賀 徹 (OGA TORU)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 90378670

### (2) 研究分担者

坂田 大治 (SAKATA DAIJI)  
京都大学・医学研究科・研究員  
研究者番号: 70456870

H22 度のみ

(3) 連携研究者

該当せず。