

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 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790072

研究課題名（和文） 消化管・呼吸器疾患におけるストレスタンパク質の役割

研究課題名（英文） The role of stress proteins in gastrointestinal and respiratory diseases

研究代表者 田中 健一郎（TANAKA KENICHIRO）

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：30555777

研究成果の概要（和文）：私は多くの疾患の原因が活性酸素による組織傷害であることに着目し、活性酸素を消去するストレスタンパク質、SOD に注目した。私は、SOD にリン脂質を結合させたその組織親和性と血中安定性を向上させた DDS 製剤・PC-SOD を開発し、この薬が炎症性腸疾患、肺線維症、COPD の動物モデルで予防・治療効果を発揮することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is thought to involve inflammatory infiltration of leukocytes, lung injury induced by reactive oxygen species (ROS), in particular superoxide anion, and fibrosis (collagen deposition). Intravenous administration of PC-SOD suppressed the bleomycin-induced increase in the number of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid. Bleomycin-induced collagen deposition and increased hydroxyproline levels in the lung were also suppressed in animals treated with PC-SOD, suggesting that PC-SOD suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：消化管・呼吸器疾患・ストレス

1. 研究開始当初の背景

食道、胃、腸などからなる消化管は、アルコール、酸、活性酸素、細菌、毒性物質（経口投与される薬物など）など様々なストレスに常に曝されている。これらのストレスは粘膜傷害（粘膜細胞死）を誘導し炎症反応を惹起することにより、胃潰瘍、小腸潰瘍、炎症性腸疾患など様々な消化管疾患を引き起こしていると考えられている。我々は、様々なストレスに曝されている消

化管粘膜では、定常的にある程度の炎症反応が起きており、この炎症が粘膜保護に貢献していること（自然炎症）、及びこの炎症反応が異常に亢進するとこれら消化管疾患が発症すると考えている。ストレスによって誘導されるストレスタンパク質は、消化管においては定常的にある程度発現しており、疾患時にはそれが過剰に発現することが知られている。そこでストレスタンパク質は消化管の自然炎症（定常的な炎症）、

及び病態（病的な炎症）に重要な役割を果たしていると考えられるが、その実態は不明である。そこで本研究において我々は、定常的な消化管生理、及びこれら消化管疾患における種々のストレスタンパク質の役割を網羅的に検証する。またその成果を活かした創薬研究も行う。

細胞はストレスに曝されると、ストレスタンパク質を誘導して自らをストレスに耐性化することにより、ストレス環境下での生存を可能にしている。代表的なストレスタンパク質は、熱ショックタンパク質（HSPs）である。HSPsは様々なストレスによって誘導され、その誘導は転写因子、HSF1によって制御されている。HSPs、特にHSP70は、細胞質内で生じた変性タンパク質を基に戻すことにより、ストレスによる細胞死から細胞を保護している。また最近我々は、HSP70が細胞内でNF- κ B（炎症誘導性転写因子）の活性を阻害することにより炎症性サイトカインの産生を抑制することを見出した。従って細胞内のHSP70は様々な消化管疾患に対して保護（抑制）的に働いていると考えられる。そこで本研究で我々は、他のHSPsの炎症性サイトカイン・ケモカイン、細胞接着因子の発現、及び炎症関連転写因子活性に対する効果を網羅的に検討し、効果が見られた場合はその分子機構を解明する。

一方、細胞外に放出されたHSP70がToll-like受容体に結合し、炎症性サイトカインや細胞接着因子などを誘導することにより炎症反応を促進していることが示唆されている。即ち、細胞外のHSP70が自然炎症の内因性のリガンドになっているという考えであり、消化管で定常的に産生されている細胞外のHSP70が消化管粘膜の恒常性の維持に、疾患時に過剰に産生される細胞外のHSP70が疾患の増悪に関与している可能性は十分にある。そこで本研究で我々は、他のHSPsについてもToll-like受容体のリガンドになっているのかを網羅的に検討する。またHSPsを精製しマウスに投与することにより、炎症反応が惹起されるかを検討する。

このように炎症性疾患におけるHSPsの役割に関しては、相反する二つの作用がある。従って、ストレスタンパク質が種々の消化管疾患に対して保護（抑制）的に働いているのか、増悪（促進）的に働いているのかは意見が分かれていた。我々は遺伝子改変によりストレスタンパク質の発現を変化させたとき、これら消化管疾患の症状がどのような変化するかを調べることにより、ストレスタンパク質がこれら疾患に対して保護的に働いているのか、増悪的に働いているのかを明らかにしようと考えた。

我々はHSPを誘導できないマウス（HSF1

ノックアウトマウス）は胃潰瘍・小腸潰瘍・潰瘍性大腸炎を発症しやすいこと、逆にHSP70過剰発現マウスはこれらの疾患を発症しにくいことを発見し、ストレスによるHSP70誘導がこれら消化管疾患の発症を抑制していることを初めて示した。（Aburaya Tanaka *et al. J. Biol. Chem.* 2006; Tanaka *et al. Mol. Pharmacol.* 2007; Suemasu Tanaka *et al. J. Biol. Chem.* 2009; Tanaka *et al. J. Biol. Chem.* 2007; Asano Tanaka *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* highlighted paperに採択）。またHSP70の発現により、消化管粘膜における炎症反応が抑制されていることを見出した。この結果は、HSP70は全体としては炎症反応を抑制していることを示唆している。そこで本研究で我々は、他のHSPsの過剰発現マウスを用いて種々の消化管疾患の発症を野生型マウスと比較し、これらHSPsの発現が全体として消化管疾患（炎症）に対して、保護的なのか増悪的なのかを調べる。またこれらHSPsの過剰発現マウスの消化管での定常的な炎症反応を野生型マウスと比較し、これらHSPsが消化管の生理（自然炎症）にどのような役割を果たしているかを明らかにする。

一方我々はストレスタンパク質誘導剤に関しても先駆的な研究を行ってきた。ゲラニルゲラニルアセトン（GGA）（商品名：セルベックス）は日本で最もよく使われている胃薬であるが、その作用機構はよく分かっていなかった。我々は徳島大学との共同研究において、GGAがHSP誘導作用を持つことを発見し、GGAはHSPを誘導し胃粘膜細胞をストレスに耐性化することにより胃潰瘍を抑制しているという新しい仮説を提唱しその証明に成功した。具体的には、HSPを誘導できないマウスではGGAが抗潰瘍効果を示さないことを発見した（Tanaka *et al. Mol. Pharmacol.* 2007; Suemasu *et al. J. Biol. Chem.* 2009）。さらにGGAが小腸潰瘍や炎症性腸疾患の発症を抑制することを発見し（Asano *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009）、現在これらの疾患に対するGGAの臨床試験が行われている。以上の結果から、HSP誘導剤は、種々の消化管疾患に有効であることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究で我々は、GGAよりも強力なHSP誘導剤を、共同研究している企業から得た漢方薬ライブラリー（約600種）や既存薬ライブラリー（研究計画・方法参照）からスクリーニングする。得られた誘導剤を疾患動物モデルで評価し、治療薬開発に繋げたいと考えている。

HSPsが細胞質内で生じた変性タンパク質に対応するために誘導されるのに対し、小

胞体内で変性タンパク質が蓄積した場合に誘導されるのが小胞体ストレスタンパク質であり、変性タンパク質を基に戻す小胞体シャペロン（GRP78やORP150など）やアポトーシスなどを制御する転写因子（CHOPやATF6など）が代表的な小胞体ストレスタンパク質である。我々は、「これまでに受けた研究費とその成果等」で述べるように、非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）が小胞体ストレスタンパク質を誘導することを発見し、NSAIDsの様々な薬理作用にこの小胞体ストレスタンパク質が関与していることを見いだした。具体的には、ORP150やCHOPのノックアウトマウスを用いて、小胞体ストレスタンパク質が胃潰瘍や炎症性腸疾患などに関与していることを発見しその分子機構を明らかにした（Namba Tanaka *et al. Am. J. Pathol.* 2009など）。しかしORP150とCHOPのノックアウトマウスで逆の効果が見られるなど、小胞体ストレスタンパク質と消化管疾患との関係は単純ではない。そこで本研究で我々は、新たに導入するGRP78、カルネキシン、カルレティキュリン、ATF6に関する遺伝子改変マウスを用いて、種々の消化管疾患における小胞体ストレスタンパク質の役割の全体像を解明したいと考えている。またこれらの小胞体ストレスタンパク質をマウスに投与し、炎症反応を惹起するかを検討する。これらの検討から種々の消化管疾患に対して保護（抑制）的に働く小胞体ストレスタンパク質を同定し、その誘導剤を上述のライブラリーからスクリーニングし、その疾患治療薬としての評価も行う。

また本研究で我々は、呼吸器疾患に研究の範囲を広げたいと考えている。肺も毒性物質（空気中の粉塵など）、活性酸素、細菌など様々なストレスに常に曝されており、これらストレスによる炎症反応が様々な疾患の原因になっている。消化管疾患に比べ呼吸器疾患は治療法の確立が遅れている。例えば、傷害に対する異常修復が原因である間質性肺炎（肺線維症）は、現在有効な治療薬がなく予後は肺癌より悪い。またその急性増悪の死亡率は80%を超えている。一方、COPD（慢性閉塞性肺炎）は患者数が急増しているにもかかわらず病気の進行を抑える方法がなく、近い将来、癌と並ぶ死亡者数になると予想されている。そこで本研究で我々は、これら呼吸器疾患における種々のストレスタンパク質の役割を遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。またGGA、及び本研究で得られるストレスタンパク質誘導剤を間質性肺炎やCOPDのモデルマウスで評価し、その治療薬としての開発に繋げたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 既存薬ライブラリー、漢方薬ライブラリーの構築

最近の新薬の臨床試験において、予想外の副作用が発生したり、ヒトで十分な体内動態（吸収性、血中安定性など）が得られなかったりするために、開発を中止しなくてはならないケースが増えている。そこで私が注目しているのは、ヒトでの安全性と体内動態が十分に確認されている既存薬（既に臨床で使われている医薬品）の新しい作用を発見し、その既存薬を別の疾患治療薬として開発する研究である。そこで本研究提案において既存薬ライブラリーを構築し、各種ストレスタンパク質の誘導剤をスクリーニングする出発材料にしたい。大学から支給される研究費などを用いて過去2-3年に渡って少しずつ既存薬を購入した結果、既に500種ほど揃えている。そこで本研究の初年度の予算を使用することにより、目標の800種（我が国で認可されている医薬品の総数）にかなり近づけると考えている。

長年中国で使用されてきた漢方薬も同じく、副作用の少ない新薬を発見するために有用な出発材料になる。我々は既に共同研究している企業から得た漢方薬ライブラリー（約600種）を保有している。そこでこのライブラリーの溶解法や動物・細胞への投与法を確立し、漢方薬ライブラリーを用いたスクリーニングの準備を行う。

(2) 遺伝子改変マウスの導入

本研究で使用する遺伝子改変マウスの内、HSF1ノックアウトマウス、HSP70過剰発現マウス、CHOPノックアウトマウス、ORP150過剰発現マウスは既に我々の研究室で構築・導入している。本研究において新たに導入する遺伝子改変マウスは、HSP47過剰発現マウス、HSP60過剰発現マウス、HSP90過剰発現マウス、HSP104過剰発現マウス、カルネキシン過剰発現マウス、カルレティキュリン過剰発現マウス、GRP78過剰発現マウス、ATF6ノックアウトマウスである。これらの導入に関しては、他大学からの導入、企業からの購入により目処は立っている。

(3) 疾患動物モデルの導入

本研究で使用する疾患動物モデルの内、胃潰瘍、小腸潰瘍、炎症性腸疾患（DSS腸炎モデル、TNBS腸炎モデル、IL-10ノックアウトマウスでの自然発症腸炎モデル）は既に確立・導入している。そこで本研究において、間質性肺炎（ブレオマイシン誘発性肺傷害モデル）、COPD（タバコ吸引誘導モデル、エラストラーゼ誘導モデル）に関する動物モデルを導入・確立する。これらのモデルに精通した研究者からご指導頂けることになっているので、初年度中に導入出来ると考えている。

(4) 各種疾患に対して保護的に働いているストレスタンパク質の同定

(2)、(3)で構築した遺伝子改変マウスと各種疾患動物モデルを組み合わせて、各種疾患に対して保護的に働いているストレスタンパク質を同定する。疾患動物モデルの内、遺伝子改変マウスを用いるモデル(IL-10 ノックアウトマウス(炎症性腸疾患))に関しては、各ストレスタンパク質の遺伝子改変マウスと掛け合わせる必要がある。以下に各種疾患におけるストレスタンパク質の関与について予想を述べる。

胃潰瘍・小腸潰瘍に関しては既に、HSP70、及びORP150が保護的に働いていることを見出しているため、各種ストレスタンパク質の過剰発現マウスも胃潰瘍を起こしにくい(これらのストレスタンパク質が胃潰瘍に対して保護的に働いている)ことを予想している。

炎症性腸疾患に関しては、HSPsの過剰発現マウスは疾患を発症しにくいと考えている。小胞体ストレスタンパク質に関しては、ORP150 ノックアウトマウスとCHOP ノックアウトマウスが逆の結果(抑制と促進)を示しているため予想が難しい。GRP78 過剰発現マウス、カルネキシン過剰発現マウス、カルレティキュリン過剰発現マウス、ATF6 ノックアウトマウスの結果から、小胞体ストレスタンパク質と炎症性腸疾患の関係の全体像を明らかにしたい。

間質性肺炎・COPDに関しては、活性酸素による組織傷害や炎症反応が原因であると考えられているため、各種ストレスタンパク質の過剰発現マウスはこれらの疾患を発症しにくいことを予想している。しかし間質性肺炎において重要な役割を果たしている繊維化に関しては、HSP47がコラーゲンの産生を促進していることを知られているため、HSP47 過剰発現マウスは間質性肺炎を起こしやすいことも考えられる。

次に、疾患時、及び定常時の炎症関連因子を、各ストレスタンパク質の過剰発現マウスと野生型マウスで比較する。注目する因子は、NF-kB や AP-1 などの炎症関連転写因子、炎症誘導性(及び抑制性)サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子などである。またカップルしている細胞内情報伝達経路を調べることで、各 Toll-like 受容体が活性化されているかを検証する。さらに精製したストレスタンパク質を野生型マウスに静脈内投与し、定常時、疾患時の炎症反応がどのような影響を受けるかを調べる。

(5) 各種ストレスタンパク質による炎症反応抑制機構の解明

(4)の研究において、あるストレスタンパク質がある疾患モデルにおいて保護的に

働いていることが示された場合、その分子機構を明らかにする。

具体的には炎症性細胞に各ストレスタンパク質を過剰発現させ、NF-kB や AP-1 などの炎症関連転写因子の活性、炎症誘導性(及び抑制性)サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子の発現・量、並びに各 Toll-like 受容体の活性に対する効果を調べる。また、各 Toll-like 受容体を発現している細胞に精製したストレスタンパク質を添加し、受容体を活性化するもの、逆に LPS などによる活性化を抑制するものを検索する。

(6) 各種ストレスタンパク質誘導剤のスクリーニングとその疾患治療薬としての評価

(1)~(5)の研究で各種疾患に有効であることが示唆されたストレスタンパク質に関して、その誘導剤の検索を行う。特にその過剰発現マウスが疾患に耐性を示し、かつ精製したそのストレスタンパク質を投与した場合、炎症反応を増悪しないストレスタンパク質に注目する。スクリーニングは、上述の既存薬ライブラリー、及び漢方薬ライブラリーから行う。個々のストレスタンパク質遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを作成し、それを保持した細胞を用いた系で一次スクリーニングを行い、イムノブロット法で二次スクリーニングを行う。毒性の少ない誘導剤を得たいので、三次スクリーニングではその既存薬・漢方薬の細胞毒性を調べ、細胞毒性を示さない濃度でストレスタンパク質を誘導するものを選択する。四次スクリーニングではその既存薬・漢方薬をマウスに投与し、目的のストレスタンパク質を誘導するかを検討する。

次にそれぞれの既存薬・漢方薬の効果を(5)の研究で用いたシステムを用いて、試験管内で評価する。効果が見られた場合、その効果が目的のストレスタンパク質誘導を介しているかを、siRNAによりそのストレスタンパク質の発現を抑制した場合、その効果が見られなくなるかで判断する。

最終的には、それぞれの既存薬・漢方薬を(5)の研究で用いた疾患動物モデルを用いて評価する。治療効果が見られた場合、その効果が目的のストレスタンパク質誘導を介しているかを、そのストレスタンパク質を誘導出来ないマウスでは、その治療効果が見られなくなるかで判断する。例えば HSPs の場合、HSF1 ノックアウトマウスを用いることになる。有用な薬理効果が見られた場合には、他の臓器の状態を精査し、副作用が表れていないかを調べる。尚、HSP 誘導薬の場合は GGA と比較する。結果を総合的に判断し、それぞれの疾患治療薬として有望なストレス

タンパク質誘導剤を決定する。

4. 研究成果

遺伝子改変マウスの導入

本研究で使用する遺伝子改変マウスの内、HSF1 ノックアウトマウス、HSP70 過剰発現マウス、CHOP ノックアウトマウス、ORP150 過剰発現マウスは既に我々の研究室で構築・導入している。そこで本年度我々は、HSP47 過剰発現マウス、HSP60 過剰発現マウス、HSP90 過剰発現マウス、HSP104 過剰発現マウス、カルネキシン過剰発現マウス、カルレティキュリン過剰発現マウス、GRP78 過剰発現マウス、ATF6 ノックアウトマウスを導入した。

疾患動物モデルの導入

本研究で使用する疾患動物モデルの内、胃潰瘍、小腸潰瘍、炎症性腸疾患（DSS 腸炎モデル、TNBS 腸炎モデル、IL-10 ノックアウトマウスでの自然発症腸炎モデル）は既に確立・導入している。そこで本年度我々は、間質性肺炎（ブレオマイシン誘発性肺傷害モデル）、COPD（タバコ吸引誘導モデル、エラストアーゼ誘導モデル）に関する動物モデルを導入した。

各種疾患に対して保護的に働いているストレスタンパク質の同定

(2)、(3) で構築した遺伝子改変マウスと各種疾患動物モデルを組み合わせて、各種疾患に対して保護的に働いているストレスタンパク質の同定を試みるために、各ストレスタンパク質の遺伝子改変マウスと掛け合わせを行った。

SOD に関する研究成果

ストレスタンパク質の中でも、特に SOD に関する研究が進んだので、報告する。最も傷害性の強い活性酸素であるスーパーオキシドアニオンを消去する SOD は古くから注目されてきたが、SOD の血中安定性、及び組織親和性は低く、臨床試験は全て失敗に終わった。そこで我々は、SOD に生体膜成分であるリン脂質を結合させた PC-SOD を開発し、血中安定性が 80 倍、組織親和性が 50-100 倍上昇していることを見出した。我々は IPF 患者を用いた第二相臨床試験を行い、PC-SOD の静注により、SP-A や LDH などの血液マーカーが有意に改善することを見いだした。しかし IPF は慢性疾患であり、その治療は長期に亘る。またこの臨床試験では一ヶ月の投与後、マーカー値が元に戻る傾向があった。そこで我々は、患者 QOL を維持しながら毎日の投与が可能な吸入投与に着目し、PC-SOD の吸入製剤を考案した。そして IPF のマウスモデルとして汎用されているブレオマイシン依存の肺線維症モデルで検討し、PC-SOD の吸入投与により、静注投与に比べてより顕著な肺線維化

抑制効果を見いだした。また最近、PC-SOD の吸入投与により、ブレオマイシン依存の活性酸素、及び TGF- β 1（線維化を促進するサイトカイン）の上昇が抑制されることを見だし、これらの作用を介して PC-SOD が肺線維化を抑制していることを示唆した。PC-SOD の吸入投与により、ブレオマイシン依存の肺線維化が抑制されるだけでなく、肺メカニクスの変化（肺エラスタンス（肺の固さの指標）の上昇）や呼吸機能の低下（FVC の低下）も抑制されることを見いだした。ブレオマイシンにより線維化を誘導した後に PC-SOD を吸入投与した場合でも有効性（治療効果）を確認した。これらの結果は、PC-SOD 吸入製剤の長期投与による IPF 治療の可能性を示す重要なものである。

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 6 件）

- ① Ishihara, T., Suemasu, S., Asano, T., Tanaka, K. and Mizushima, T., Stimulation of gastric ulcer healing by heat shock protein 70. *Biochem. Pharmacol.* 82, 728-736. (2011) 査読有
- ② Tanaka, K., Tanaka, Y., Miyazaki, Y., Namba, T., Sato, K., Aoshiba, K., Azuma, A. and Mizushima, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on pulmonary emphysema. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 810-818. (2011) 査読有
- ③ Tanaka, K., Tanaka, Y., Suzuki, T. and Mizushima, T., Protective Effect of β -(1,3-1,6)-D-glucan against irritant-induced gastric lesions. *Br. J. Nutr.* 106, 475-485. (2011) 査読有
- ④ Tanaka, K., Ishihara, T., Azuma, A., Kudoh, S., Ebina, M., Nukiwa, T., Sugiyama, Y., Tasaka, Y., Namba, T., Ishihara, T., Sato, K., Mizushima, Y. and Mizushima, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 298, L348-L360. (2010) 査読有
- ⑤ Tanaka, K., Tanaka, Y., Namba, T., Azuma, A. and Mizushima, T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 80, 920-931. (2010) 査読有
- ⑥ Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Prevention of ultraviolet B radiation-induced epidermal damage

by expression of heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 285, 5848-5858. (2010) 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 健一郎 (TANAKA KENICHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：30555777