

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22790758  
 研究課題名（和文）気管支喘息・間質性肺炎モデルマウスにおける亜鉛キレート剤の効果の検討  
 研究課題名（英文）Effects of zinc chelator in asthma and interstitial pneumonia model mouse  
 研究代表者  
 岩本 博志 (IWAMOTO HIROSHI)  
 広島大学・病院・病院助教  
 研究者番号：60457398

研究成果の概要（和文）：生体内に存在する遊離亜鉛は免疫細胞における細胞内情報伝達物質として機能しており、免疫細胞が関与する呼吸器疾患の病態に関与している可能性がある。今回我々は亜鉛キレート剤の喘息および間質性肺炎モデルマウスに対する効果を検討した。亜鉛キレート剤は卵白アルブミンによる喘息モデルマウスの好酸球性気道炎症を抑制したがヒト喘息により近いダニ抗原による喘息モデルマウスでは十分な効果が得られなかった。また間質性肺炎モデルマウスに対して亜鉛キレート剤は治療効果を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：Free zinc acts as an intracellular messenger in immune cells and thus zinc might be involved in the pathogenesis of respiratory diseases caused by abnormality of immune cells. We tested the effect of zinc chelate agent on asthma and interstitial pneumonia model mouse. Zinc chelate agent could attenuate eosinophilic airway inflammation in ovalbumin induced asthma model mouse, but it was not effective in mite antigen induced asthma model, which might be more similar to human asthma. Additionally, zinc chelate agent was not effective for the treatment of interstitial pneumonia model mouse.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

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：気管支喘息、亜鉛、間質性肺炎

## 1. 研究開始当初の背景

生体内でフリーで存在している遊離亜鉛 (labile zinc) は免疫細胞における細胞内情報伝達物質として機能していることが明らかとなってきた。この亜鉛を制御することによりこれまでの薬剤と異なった経路で免疫応答が制御できる可能性が考えられる。

気管支喘息の治療は特に吸入ステロイド薬によって飛躍的に進歩したが、依然ステロイド治療抵抗性の難治性の気管支喘息が存在する。この難治性喘息の治療については抗 IgE 抗体療法など様々なアプローチが試みられているが、未だ解決策が得られていない。また間質性肺炎は極めて難治性の呼吸器疾患であり、特にその中で最も頻度の多い特発性肺線維症については未だ標準的治療が存在しないのが現状である。

気管支喘息のモデルマウスに対する亜鉛キレート剤 N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) の効果の予備検討を行ったところ、亜鉛キレート剤治療喘息マウスでは気管支肺胞洗浄液中の好酸球数の低下を認めた。

亜鉛キレート剤投与は喘息モデルマウスの好酸球炎症を抑制することが示唆された。また今回の結果から亜鉛キレート剤によって、気道 Th2 炎症の抑制を認めることが示唆されており、Th2 優位の難治性疾患である、間質性肺炎についてもその効果の検証を行う必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

① 喘息モデルマウスに対する亜鉛キレート剤の効果の機序の解明の為、気管支肺胞洗浄液のサイトカイン測定を追加する必要がある。本研究を開始してまもなく卵白アルブミンを用いた喘息モデルマウスに対する亜鉛キレート剤の効果に関する論文が他大学グループより発表された。そのため亜鉛キレート剤の治療応用の可能性について検討する目的で、ヒト喘息により近いと考えられるダニ抗原を用いた喘息モデルマウスを用いて亜鉛キレート剤の効果を検証した。また亜鉛キレート剤の全身的な影響を検討する目的で継続的な体重測定もあわせて行った。

② 間質性肺炎は難治性の呼吸器疾患であり、現在まで有効な治療法が解明されていない。今回の喘息モデルマウスの予備実験の結果から、亜鉛キレート剤は肺の Th2 炎症を制御できる可能性が示唆され、間質性肺炎における線維化の制御にも応用できる可能性がある。よって間質性肺炎モデルマウスについても亜鉛キレート剤の効果を検証した。

## 3. 研究の方法

① 卵白アルブミンによる気管支喘息モデルマウスを以下の方法にて作成した。6 週齢雌の BALB/c マウスを用い、0 日目、14 日目に卵白アルブミン 10  $\mu$ g + 水酸化アルミニウム 20mg 腹腔内投与による感作をおこす。28 日目より 3 日間 1%卵白アルブミン溶液をジェットネブライザーを用いて 1 日 20 分間の吸入曝露した。

治療群では 28 日目より 3 日間、朝晩 2 回 TPEN 5mg/kg 腹腔内投与。対照群では 28 日目より 3 日間、溶媒のみを腹腔内投与した。31 日目に尾静脈より採血の後、sacrifice し PBS 500  $\mu$ l を 3 回にて気管支肺胞洗浄施行し、その後肺組織を生理食塩水を用いて還流後、肺組織を採取。ホルマリン固定組織・凍結保存組織の両方を保存した。

② ダニ抗原による気管支喘息モデルマウスを以下の方法にて作成した。6 週齢雌の BALB/c マウスにダニ抗原 30  $\mu$ g を週 3 回 3 週間点鼻して作成した。

ダニ抗原投与日に TPEN または溶媒のみを腹腔内投与を行い、day17 に気管支肺胞洗浄液、気道過敏性、肺組織を評価した。上記モデルで十分に効果が得られなかったため、day0 と day14 にダニ抗原 100  $\mu$ g と Alum を腹腔内投与し、day21, 22, 23 にダニ抗原 30  $\mu$ g 点鼻する喘息モデルマウスを作製し、ダニ抗原投与と同日に TPEN もしくは溶媒のみを腹腔内投与を行い、再度効果の検証を行った。

③ 間質性肺炎モデルマウスを C57BL/6 マウスに 1.5mg/kg のブレオマイシンを気管内投与して作成した。1 日おきに計 6 回、7.5mg/kg の TPEN または溶媒のみを腹腔内投与し day14 に BAL および肺の線維化を評価した。

## 4. 研究成果

① 卵白アルブミンによる気管支喘息モデルマウスに対する TPEN 投与では、コントロール喘息マウスと比較して BALF 中の好酸球数減少を認めた (図 1)。BALF 中の IL-5 濃度の有意な低下、組織中の杯細胞過形成の抑制作用を認めた。血中の卵白アルブミン特異的 IgE については有意差を認めなかったが低下傾向であった (図 2)。

図1 BALF 中炎症細胞数：卵白アルブミンによる喘息モデルマウスにおける TPEN の効果

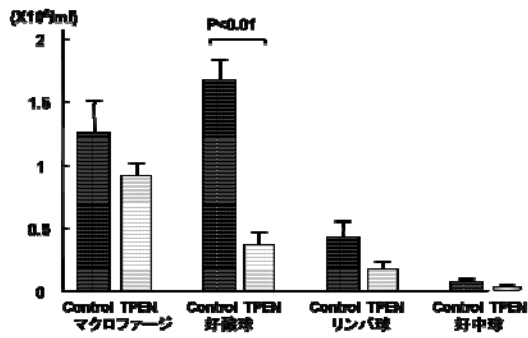
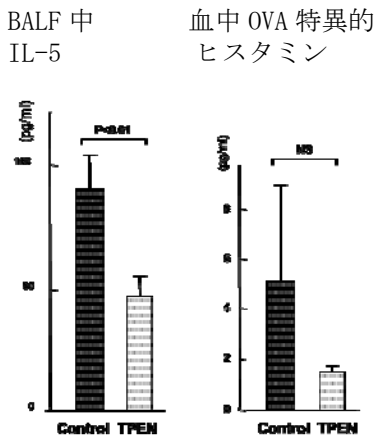
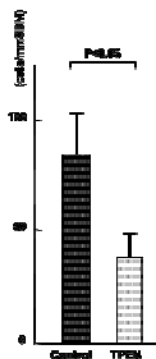


図2 BALF 中 IL-5、血中 OVA 特異的ヒスタミン、組織での杯細胞過形成に対する TPEN の効果



組織での杯細胞



②ダニ抗原による喘息モデルマウスでは有意な気管支肺胞洗浄液中の好酸球増多、気道過敏性の亢進を認めた。TPEN 治療による効果について1回投与量を2.5、5、7.5、10mg/kg まで段階的に検討を行ったが気管支肺胞洗浄液中の好酸球数に有意な減少効果は得られなかった(図3)。TPEN 投与による全身的影響を検討するため、投与群と非投与群で体重の推移を測定した。有意差はないもののTPEN 投与群では体重減少傾向であった(図4)。

図3 点鼻によるダニ抗原喘息モデルマウスに対する TPEN の効果

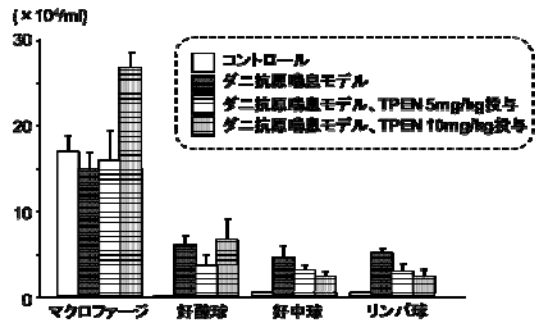
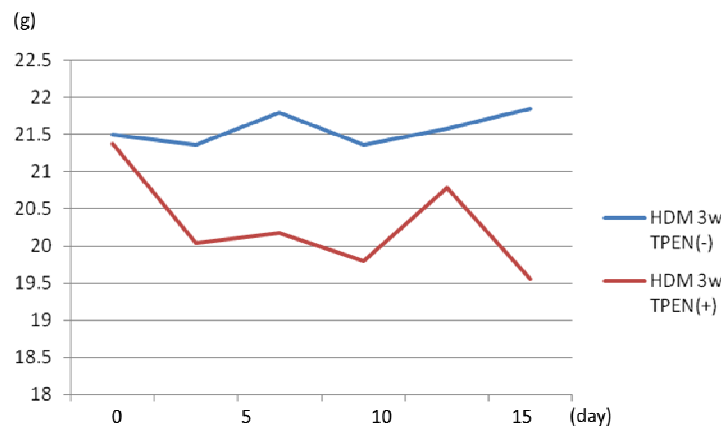
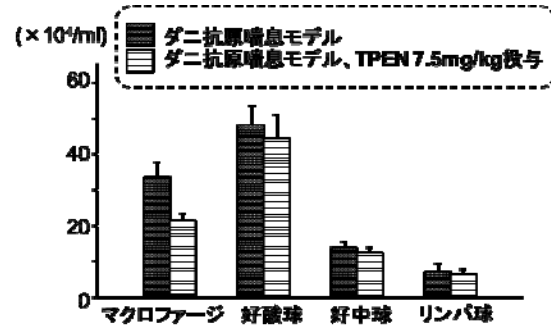


図4 TPEN 投与と非投与の喘息モデルマウスの体重の推移



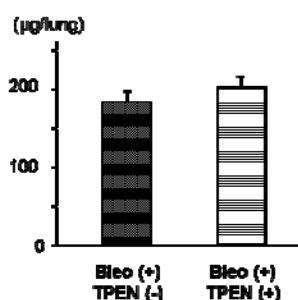
次にダニ抗原を Day0, 14 に腹腔内投与し Day21, 22, 23 に点鼻する喘息モデルマウスでも同様に TPEN の効果を見たが、有意な好酸球減少効果認めなかった(図5)。

図5 腹腔内感作によるダニ抗原喘息モデルマウスに対する TPEN の効果



③間質性肺炎モデルマウスにおける TPEN 投与では溶媒のみ投与のコントロールマウスと比較して気管支肺胞液中の細胞数、細胞成分には有意な差を認めなかった。肺の線維化の指標であるヒドロキシプロリン量は TPEN 投与群で有意差を認めないもののやや高値であった (図 6)。

図 6 ブレオマイシン間質性肺炎モデルマウスに対する TPEN の効果



【結果のまとめ】

気管支喘息モデルマウスに対する TPEN 投与では OVA を用いた急性喘息モデルマウスでは効果を認めたものの、ヒト喘息により近いとされるダニ抗原モデルマウスでは効果を認めず、生体内亜鉛制御による気管支喘息治療応用のためには更なる分子機構の解明が必要であると考えられた。

また間質性肺炎モデルマウスでは TPEN の効果は認められなかった。有意差を認めないものの TPEN 投与群では肺でのヒドロキシプロリン量が増加している可能性が示唆された。

TPEN 投与マウスでは体重減少を認める傾向があり、この作用が遊離亜鉛の低下に起因するか TPEN 固有の作用かは不明だが、治療応用を検討する場合には問題となる可能性がある。

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 5 件)

① Iwamoto H, Jing G, 他 5 名, Differences in plasma and sputum biomarkers between COPD and COPD-asthma overlap, *Eur Respir J*, 査読有り 2013, in press.

② Sugiyama A, Hattori N, Haruta Y, Nakamura I, Nakagawa M, Miyamoto S, Onari Y, Iwamoto H, 他 4 名. Characteristics of inspiratory and expiratory reactance in interstitial lung disease. *Respir Med*. 査読有り 2013 in press

③ Miyamoto S, Hattori N, Senoo T, Onari Y, Iwamoto H, 他 7 名. Intra-airway Administration of Small Interfering RNA Targeting Plasminogen Activator Inhibitor-1 Attenuates Allergic Asthma in Mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 査読有り 2011 ;301(6):L908-16.

④ Masuda T, Hattori N, Hamada A, Iwamoto H, 他 7 名. Erlotinib efficacy and cerebrospinal fluid concentration in patients with lung adenocarcinoma developing leptomeningeal metastases during gefitinib therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読有り 2011 ;67(6):1465-9.

⑤ Nagao S, Hattori N, Fujitaka K, Iwamoto H, 他 6 名. Regression of a primary pulmonary adenocarcinoma after zoledronic acid monotherapy. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 査読有り 2011; 60(1):7-9.

[学会発表] (計 2 件)

① Iwamoto H, Hattori N, 他 10 名. Characteristics of inspiratory and expiratory reactance in interstitial lung disease, European respiratory society annual congress, 2012 年 9 月 4 日 ウィーン、オーストリア.

② 岩本博志 COPD と心血管疾患 第 51 回日本呼吸器学会総会 シンポジウム COPD の臨床的諸問題 2010 年 4 月 23 日, 東京.

[図書] (計 1 件)

① 岩本博志、河野修興、合併症 (全身併存症) 心循環器疾患 (特集 COPD : 診断と治療の進歩) 日本内科学会雑誌 2012;101(6):1571-7.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 博志 (IWAMOTO HIROSHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号 : 60457398

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：