

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23249045

研究課題名(和文) 代表的肺難治性疾患の発症関連遺伝子解明と創薬への応用

研究課題名(英文) The investigation of genes related to refractory respiratory diseases and development of novel therapeutics

研究代表者

長瀬 隆英 (NAGASE, TAKAHIDE)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40208004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円

研究成果の概要(和文)：COPD、ARDS、肺線維症などの難治性肺疾患の病態機序・治療標的は未だに不明であり、その解明が急務とされている。本研究では、脂質性メディエーターや転写コアクチベーターTAZに着目し、遺伝子改変マウスを駆使することにより、その病態解明および治療標的の同定を目指した。その結果、脂質性メディエーターやTAZが難治性肺疾患の病態機序に關与することが示された。

研究成果の概要(英文)：In respiratory diseases, there are several refractory disorders such as COPD, ARDS and pulmonary fibrosis, to which no pharmaceutical agents are currently available or effective. However, their mechanisms still remain to be elucidated. The purpose of this project is to investigate the roles of lipid mediators and TAZ in these disorders using genetically-engineered mice. We found that lipid mediators and TAZ were involved in the pathogenesis of these lung disorders. Our results suggest that these mediators might provide a novel therapeutic approach to these diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 肺線維症 ARDS

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)、ARDS、特発性間質性肺炎、難治性気管支喘息、新興呼吸器感染症(新型インフルエンザ等)などは、炎症関連機序を主体とする病態であり、その難治性・致死性や高い発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患の病態機序・治療標的は未だに不明であり、新治療法の開発が急務とされている。本研究では、炎症・生体制御関連因子として注目されている各種メディエーター・転写因子に着目し、siRNAなどの新技术を応用・駆使することにより、代表的難治性肺疾患の病態解明および治療標的の同定を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、(1)炎症・生体防御関連因子としての脂質性メディエーター、(2)発生関連因子である転写コアクチベーターTAZに着目し、(3) siRNAなどの新技术を応用・駆使することにより、難治性肺疾患の病態解明および治療標的の同定を目指す。さらに、(4)「炎症と肺腫瘍の関連」について研究モデルを構築し、炎症・腫瘍関連遺伝子の探索を行う。以上を総括して、主要な呼吸器疾患であるCOPD、肺線維症、ARDS、肺腫瘍などの発症関連遺伝子・蛋白質の機能解明および創薬への応用・開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)脂質性メディエーター

脂質性メディエーターであるPAFおよびエイコサノイドは、多彩な生理活性作用を示し、肺疾患発症に寄与している可能性が推察されている。本研究では、本研究者らが独自に開発した遺伝子改変マウスを使用する。特に、LTC4/D4/E4などcysteinyl LTの受容体(CysLT1-R, CysLT2-R)は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。なかでもCysLT2-Rは大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、このCysLT2-Rを標的としたKOマウスを用いて、疾患モデルを作成する。

(2)転写コアクチベーターTAZ

転写コアクチベーターTAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) は、14-3-3 proteinをはじめとする、PDZ domainを持つ転写因子と結合しその活性を制御する分子として同定・報告されたものである。TAZは、WW domainを有しており、PPXYモチーフと結合することにより、転写コアクチベーターとしての機能を発現する。また最新の研究により、転写コアクチベーターTAZが、TTF-1(thyroid transcription factor-1)やPax3と協調的に働くことにより、発生に大きく関与することが明らかにされつつある。

本研究では、転写コアクチベーターTAZの遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への

関与の可能性を探索する。

(3) siRNA

近年、プラスミドベクターを用いたsiRNAの応用により標的遺伝子の発現抑制が可能となりつつある。この手法をCOPDなどの病態解明に応用するため、気道の炎症・線維化に関与するTGF- β 、その受容体及びSMADファミリーなどを標的とするベクターの構築を開始する。また気道のリモデリングに重要な意義を持つとされていることから、Fasリガンド・受容体をはじめとしたアポトーシスに関連する分子も研究の対象とする。マウス肺胞上皮細胞及び線維芽細胞を用いた系で、標的分子の発現抑制システムの確立を目指す。

4. 研究成果

(1)脂質性メディエーター

<CysLT2受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成> キメラマウスの中で、germ lineにノックアウトDNAコンストラクトが移行したのを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体CysLT2-Rノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めていない。

(2)転写コアクチベーターTAZ

<転写コアクチベーターTAZノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZノックアウトマウスの作成に着手した。キメラマウスの中で、germ lineにノックアウトDNAコンストラクトが移行したのを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体TAZノックアウトマウスが得られた。なお外表所見上では重大な奇形を生じていないが、9ヶ月令TAZノックアウトマウス個体の肺の組織標本において、肺胞の異常が示された。また呼吸生理学的にも、TAZノックアウトマウスでは、PVカーブにおいて典型的な「肺気腫」型の所見(PVカーブの上方移動、コンプライアンス増加)を認めた。次に、胎生期から成体までの、野生型マウスとTAZノックアウトマウスの肺組織所見を検討した。その結果、TAZノックアウトマウスの肺は、胎生期においては、ほぼ正常の発育であるが、生後5日以降には気腔の拡張が認められ、その後、気腔の拡張が増大していた。

<TAZノックアウトマウス肺における遺伝子発現の解析>

胎生期から成体までの、野生型マウスとTAZノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現をreal time RT-PCRを用いて検討した。その結果、肺の発達・成長に必須とされるTTF-1の発現が、TAZノックアウトマウスにおいても野生型と変わらないことが示された。一方、2ヶ月令のTAZノックアウトマウスの肺では、MMP12 (macrophage elastase)が著明に発現していることが明らかになった。次に、胎生期の野生型マウスとTAZノック

クアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を microarray 解析を用いて検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスにおいて発現低下が認められた遺伝子を5つ選び、さらに real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では、Fbn5 と CTGF の発現が有意に低下していることが明らかになった。

(3) siRNA

マウス肺胞上皮細胞及び線維芽細胞を用いた系で、線維化にかかわるシグナル分子及びそのパスウェイとして TGF- β 、その受容体及び SMAD ファミリーを標的として、ベクターの構築を行った。

本研究の成果により、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いと思われる。本研究は、1)難治性疾患の病態解明、2)ゲノム創薬、を志向した独創的なものであり、発生日工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供し、炎症性肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。また発生日工学的技術を用いた研究は、薬剤開発のプロセスを短縮し、実用化に大きく寄与することが予想される。さらに本研究成果は、バイオテクノロジー分野における新技術の創製および知的資産の形成に発展することが期待される。

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 36件)

1. Saito A, Nagase T. Hippo and TGF- β interplay in the lung field. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 309(8):L756-67. 査読有り
2. Watanabe K, Amano Y, Ishikawa R, Sunohara M, Kage H, Ichinose J, Sano A, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Histone methylation-mediated silencing of miR-139 enhances invasion of non-small-cell lung cancer. *Cancer Med* 2015; 4(10):1573-82. 査読有り
3. Yamato A, Soda M, Ueno T, Kojima S, Sonehara K, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Nagase T, Mano H. Oncogenic activity of BIRC2 and BIRC3 mutants independent of nuclear factor- κ B-activating potential. *Cancer Sci* 2015; 106(9):1137-42. 査読有り
4. Urushiyama H, Terasaki Y, Nagasaka S, Terasaki M, Kunugi S, Nagase T, Fukuda Y, Shimizu A. Role of α 1 and α 2 chains of type IV collagen in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts. *Lab Invest* 2015;95:872-85. 査読有り
5. Niikura Y, Ishii T, Hosoki K, Nagase T, Yamashita N. Ovary-dependent emphysema augmentation and osteopontin induction in adult female mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;461:642-7. 査読有り
6. Amano Y, Ishikawa R, Sakatani T, Ichinose J, Sunohara M, Watanabe K, Kage H, Nakajima J, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Oncogenic TPM3-ALK activation requires dimerization through the coiled-coil structure of TPM3. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;457:457-60. 査読有り
7. Yamauchi Y, Yasunaga H, Matsui H, Hasegawa W, Jo T, Takami K, Fushimi K, Nagase T. Comparison of clinical characteristics and outcomes between aspiration pneumonia and community-acquired pneumonia in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med* 2015;15:69. 査読有り
8. Yamauchi Y, Yasunaga H, Matsui H, Hasegawa W, Jo T, Takami K, Fushimi K, Nagase T. Comparison of in-hospital mortality in patients with COPD, asthma and asthma-COPD overlap exacerbations. *Respirology* 2015;

- 20:940-6. 査読有り
9. Hasegawa W, Yamauchi Y, Yasunaga H, Sunohara M, Jo T, Matsui H, Fushimi K, Takami K, Nagase T. Factors that predict in-hospital mortality in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *Allergy* 2015;70:585-90. 査読有り
 10. Hasegawa W, Yamauchi Y, Yasunaga H, Sunohara M, Jo T, Matsui H, Fushimi K, Takami K, Nagase T. Clinical features of 280 hospitalized patients with lymphangiomyomatosis in Japan. *Respirology* 2015;20:160-5. 査読有り
 11. Horie M, Saito A, Yamaguchi Y, Ohshima M, Nagase T. Three-dimensional Co-culture model for tumor-stromal interaction. *J Vis Exp*. 2015;Feb 2;(96). doi: 10.3791/52469. 査読有り
 12. Yamauchi Y, Hasegawa W, Yasunaga H, Sunohara M, Jo T, Takami K, Matsui H, Fushimi K, Nagase T. Paradoxical association between body mass index and in-hospital mortality in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease in Japan. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2014;9:1337-46. 査読有り
 13. Hasegawa W, Yamauchi Y, Yasunaga H, Sunohara M, Jo T, Matsui H, Fushimi K, Takami K, Nagase T. Factors affecting mortality following emergency admission for chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med* 2014;14:151. 査読有り
 14. Mikami Y, Matsuzaki H, Horie M, Noguchi S, Jo T, Narumoto O, Kohyama T, Takizawa H, Nagase T, Yamauchi Y. Lymphotoxin receptor signaling induces IL-8 production in human bronchial epithelial cells. *PLoS One* 2014; 9:e114791. 査読有り
 15. Ichinose J, Watanabe K, Sano A, Nagase T, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. Alternative polyadenylation is associated with lower expression of PABPN1 and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2014 ; 105:1135-41. 査読有り
 16. Okazaki H, Ishikawa O, Iijima T, Kohira T, Teranishi M, Kawasaki S, Saito A, Mikami Y, Sugiura A, Hashimoto S, Shimada E, Uchikawa M, Matsushashi M, Tsuno NH, Tanaka M, Kiyokawa N, Fujimoto J, Nagase T, Tadokoro K, Takahashi K. Novel swine model of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 2014 ; 54:3097-107. 査読有り
 17. Noguchi S, Saito A, Horie M, Mikami Y, Suzuki HI, Morishita Y, Ohshima M, Abiko Y, Mattsson JS, König H, Lohr M, Edlund K, Botling J, Micke P, Nagase T. An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20:4660-72. 査読有り
 18. Tarui M, Shindou H, Kumagai K, Morimoto R, Harayama T, Hashidate T, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Nagase T, Shimizu T. Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. *J Lipid Res* 2014;55:1386-96. 査読有り
 19. Horie M, Saito A, Yamauchi Y, Mikami Y, Sakamoto M, Jo T, Nakajima J,

- Takizawa H, Nagase T, Kohyama T. Histamine induces human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction via histamine H1 receptor. *Exp Lung Res* 2014; 40:222-36. 査読有り
20. Horie M, Saito A, Noguchi S, Yamaguchi Y, Ohshima M, Morishita Y, Suzuki HI, Kohyama T, Nagase T. Differential knockdown of TGF-ligands in a three-dimensional co-culture tumor- stromal interaction model of lung cancer. *BMC Cancer* 2014 ;14:580. 査読有り
21. Saito A, Suzuki HI, Horie M, Ohshima M, Morishita Y, Abiko Y, Nagase T. An integrated expression profiling reveals target genes of TGF- and TNF- possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PLoS One* 2013; 8: e56587. 査読有り
22. Noguchi S, Hijikata M, Hamano E, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Nagase T, Keicho N. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics* 2013; 65: 107-114. 査読有り
23. Noguchi S, Hamano E, Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Nagase T, Keicho N. Differential effects of a common splice site polymorphism on the generation of OAS1 variants in human bronchial epithelial cells. *Hum Immunol* 2013; 74: 395-401. 査読有り
24. Narumoto O, Niikura Y, Ishii S, Morihara H, Okashiro S, Nakahari T, Nakano T, Matsumura H, Shimamoto C, Moriwaki Y, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N. Effect of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1) on airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 ; 438: 175-179. 査読有り
25. Kawakami M, Morita S, Sunohara M, Amano Y, Ishikawa R, Watanabe K, Hamano E, Ohishi N, Nakajima J, Yatomi Y, Nagase T, Fukayama M, Takai D. FER overexpression is associated with poor postoperative prognosis and cancer-cell survival in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6: 598-612. 査読有り
26. Kawakami M, Ishikawa R, Amano Y, Sunohara M, Watanabe K, Ohishi N, Yatomi Y, Nakajima J, Fukayama M, Nagase T, Takai D. Detection of novel paraja ring finger 2-fer tyrosine kinase mRNA chimeras is associated with poor postoperative prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2013; 104:1447-54. 査読有り
27. Mikami Y, Yamauchi Y, Horie M, Kase M, Jo T, Takizawa H, Kohyama T, Nagase T. Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces epithelial–mesenchymal transition in A549 human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 ; 428: 451-457. 査読有り
28. Yamauchi Y, Kohyama T, Jo T, Nagase T. Dynamic change in respiratory resistance during inspiratory and expiratory phases of tidal breathing in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron*

- Obstruct Pulmon Dis 2012; 7: 259-269.
査読有り
29. Horie M, Saito A, Mikami Y, Ohshima M, Morishita Y, Nakajima J, Kohyama T, Nagase T. Characterization of human lung cancer-associated fibroblasts in three-dimensional in vitro co-culture model. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423: 158-163. 査読有り
30. Narumoto O, Matsuo Y, Sakaguchi M, Shoji S, Yamashita N, Schubert D, Abe K, Horiguchi K, Nagase T, Yamashita N. Suppressive effects of a pyrazole derivative of curcumin on airway inflammation and remodeling. *Exp Mol Pathol* 2012; 93: 18-25. 査読有り
31. Kawakami M, Narumoto O, Matsuo Y, Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, Sakaguchi M, Lipp M, Nagase T, Yamashita N. The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure. *Cell Immunol* 2012; 275: 24-32. 査読有り
32. Watanabe K, Emoto N, Hamano E, Sunohara M, Kawasaki M, Kage H, Kitano K, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2012; 130: 2580-2590. 査読有り
33. Kitano K, Watanabe K, Emoto N, Kage H, Hamano E, Nagase T, Sano A, Murakawa T, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci* 2011; 102: 2126-2131. 査読有り
34. Sunohara M, Kawasaki M, Kage H, Watanabe K, Emoto N, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Polymerase reaction without primers throughout for the reconstruction of full-length cDNA from products of rapid amplification of cDNA ends (RACE). *Biotechnol Lett* 2011 ; 33: 1301-1307. 査読有り
35. Kage H, Sugimoto K, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Suppression of transforming growth factor β 1 in lung alveolar epithelium-decells using adeno-associated virus type 2/5 vectors to carry short hairpin RNA. *Exp Lung Res* 2011; 37: 175-185. 査読有り
36. Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T. Simultaneous stimulation with TGF- β 1 and TNF- α induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155: 119-128. 査読有り
- [学会発表](計 1 件)
- 1) Recent progress of cellular and molecular biology in respiratory diseases. The APSR Meeting 2015. (発表者：長瀬隆英、招待講演), 2015年12月5日、クアラルンプール、マレーシア
6. 研究組織
- (1)研究代表者
長瀬 隆英 (NAGASE TAKAHIDE)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：40208004
- (2)連携研究者
清水 孝雄 (SHIMIZU TAKAO)
東京大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号：80127092