

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591118

研究課題名(和文) Fut8 遺伝子変異マウスにおける慢性閉塞性肺疾患早期発症の分子機構の解明

研究課題名(英文) The role of FUT8 in the development of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

高 叢笑 (GAO, CONGXIAO)

大阪大学・産業科学研究所・招へい教員

研究者番号：50379260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：Fut8ヘテロ欠損マウスを用いて、COPD病態とコアフコース糖鎖修飾の関連性の解析を試みた。喫煙暴露の早期からFUT8の活性低下やMMP-9の発現上昇が見られた。ヘテロ欠損マウスの肺気腫変化は野生型より早く呈すことを見出した。糖鎖修飾の異常がTGF- β 1-Smad2シグナル伝達経路に損傷を来した事がわかった。ヒトの症例においてFUT8活性は低い程、呼吸機能を示す一秒率の年間減少率が大きくなり、増悪の頻度も高くなる事がわかった。FUT8は肺気腫発症の感受性因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The physiological relevance of core fucosylation in the pathogenesis of COPD was investigated using cigarette smoke exposed Fut8 heterozygous knockout mice. A marked decrease in FUT8 activity and elevated matrix metalloproteinase (MMP)-9 activities were observed at an early stage of exposure. Emphysema developed in only half the exposed-period required for wild type mice. TGF- β 1-Smad2 signaling pathway has lost its function. Moreover, our investigation showed that, among symptomatic current or ex-smokers with stable COPD or at risk outpatients (n=226), a faster annual decline of the forced expiratory volume in 1s (FEV1) was significantly associated with lower FUT8 activity. Patients with lower FUT8 activity experienced exacerbations more frequently. These data suggest that reduced FUT8 activity is associated with the progression of COPD and serum FUT8 activity is a minimally invasive predictive biomarker for progression and exacerbation of COPD.

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：慢性閉塞性肺疾患 FUT8 喫煙暴露 コアフコース TGF

1. 研究開始当初の背景

肺気腫や慢性気管支炎を主要な病態とする慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、主に中高年に発症する喫煙関連疾患である。COPD 発症は喫煙など外的環境因子のほか、加齢、生体の酸化機構の破壊、細胞外マトリクス分解因子の増加などの内在因子に関係すると考えられる。様々な原因による肺胞中隔結合組織の破壊と修復機構の不均衡が慢性閉塞性肺疾患の発症につながる。

alpha 1,6 fucosyltransferase (FUT8) は N 結合型糖タンパク質にコアフコース糖鎖をつくる反応を触媒する酵素である。Fut8 遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) の胎児死亡率が高く、生まれたマウスも著明な成長障害と肺気腫様病変を示す (*Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102:15791-15796)。一方、Fut8 欠損によるマウス肺静的コンプライアンス (Cst) の増加、肺サーファクタント C の産生が胎児期から生後 18 日までの間で著しく低下することなどが見られている。さらに、ノックアウトマウスでは VEGF の発現低下、セラミド沈着の増加、および肺胞上皮細胞アポトーシスが Fut8 の欠損に伴って、著しく増加していることが分かった。

近年の医療環境の向上により様々な疾患による死亡者が減少しているのに対して、COPD による死亡者数が増加の一途をたどる。WHO の統計によると、2020 年には世界死因の第 3 位になると予想されている。COPD 及びその合併症に対する病因究明、治療開発が急務な課題である。COPD には酸化ストレス亢進や ECM 破壊活性化が見られるが、そのメカニズムについてはまだ明快な解答が得られていない。その一方、糖鎖修飾 (コアフコース) の欠損が肺気腫を引き起こすことは Fut8 ノックアウトマウスにより示唆された。肺気腫の発症に喫煙が単因子として作用しているのみならず、糖鎖の異常という背景因子と共に肺胞破壊・気腫化に関与しているという、新たな知見が得た。肺気腫並びにその合併症の病態解明するために、糖鎖修飾を背景因子として取り入れることが必要である。

2. 研究の目的

COPD は喫煙習慣などにより炎症細胞の浸潤やサイトカインの過剰分泌などの炎症反応、マトリクスメタロプロテナーゼ (MMP) の活性化による肺間質の破壊が見られる。本研究課題では、alpha 1,6 fucosyltransferase (FUT8) の触媒産物である alpha 1,6 fucose 構造が欠損するマウスを用いて、このような臨床症状を再現し、肺組織において、喫煙など環境因子から受ける酸化ストレス、細胞死及び上皮修復に関わる機能の変化及びそれらを制御する分子メカニズムの詳細を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 喫煙モデルマウスの作成: 8-10 週齢メス C57BL6/J マウス (Fut8 ヘテロ欠損マウス及び野生型) に毎日 4 本、週 6 日の喫煙暴露プログラムを実施する。期間は実験の都合に合わせて 2 週間から三ヶ月と設定していた。中毒症状のないように体重の変化や血中一酸化炭素ヘモグロビンのレベルなどを確認する。

(2) 喫煙モデルマウスの解析: 喫煙暴露プログラムを実施後、マウスの肺切片を用意し、肺組織の状態を HE 染色などにて観察する。マウスの肺組織から FUT8 の酵素活性及びその遺伝子発現を測定する。また MMP の発現や活性、ならびにそれを制御する一連のシグナル伝達分子の発現を検討する。採集した気道洗浄液、血清などのサンプルから炎症細胞の浸潤、サイトカインの産生など炎症反応の指標を観察する。すべての結果において、Fut8 変異マウスと野生型との差異を検討する。

(3) Fut8 発現レベルが異なる細胞株の樹立: 気道上皮細胞、血管内皮細胞及び繊維芽細胞の培養細胞株を用いて、糖鎖の影響を検討する。これらの細胞に Fut8 cDNA を遺伝子導入し、Fut8 の高発現細胞を作成する。その一方、Fut8 の siRNA や miRNA を用いて、培養細胞にある Fut8 の発現をノックダウンし、Fut8 が低レベルに発現或いは発現しない細胞を作成する。

上記の培養細胞を用いてマウス実験で見られた組織破壊などについてより単純な実験系でシグナル伝達経路の検討をする。タバコ抽出液を用意し、様々な濃度や培養時間下において細胞の MMP の発現や活性、ならびにそれを制御する一連のシグナル伝達分子の発現を検討する。

(4) 臨床サンプルを用いた検討: 164 名 COPD 患者 (喫煙歴あり或は現在も喫煙中) 及び 64 名リスク有りの通院患者から肺機能検査 (LAA%, 気道気流制限、一秒間努力呼吸容量 FEV₁), COPD の病期、ならびに血液中の FUT8 の酵素活性や MMP の活性などのデータを収集し、FUT8 の酵素活性とヒト COPD の相関を検討する。

4. 研究成果

COPD 発症の最も重要な原因である喫煙が肺気腫の発症・進展に及ぼす分子メカニズムは十分に解明されてはいない。喫煙と糖鎖構造変化の相乗作用が新たな発症原因となる可能性を探るため、Fut8 ヘテロマウスに対する喫煙曝露を行い、糖転移酵素の活性低下が炎症細胞浸潤や肺気腫の発症時期への作用を検討した。

(1) 喫煙曝露実験では、野生型および Fut8 ヘテロ欠損マウスのいずれも、FUT8 酵素活性が喫煙後 2 週目から有意な低下を示し、その活性の低下は喫煙曝露期間が終了するまで続いた (図 1)。またその低下は特異性がある。FUT8 と同様に N-glycan のコア構造を作るに必要な他の糖転移酵素、例えば N-アセチルルグ

リコサミノ転移酵素(GnT)-III, IV, Vなどの

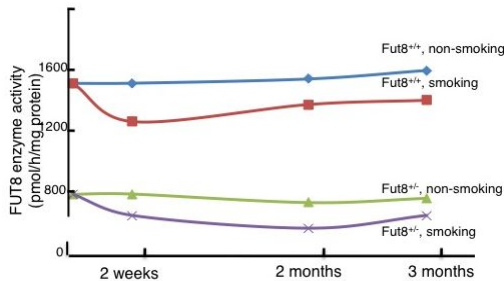


図1 喫煙暴露がFUT8の酵素活性を低下させた。

活性の変化が認められなかった。

(2) *Fut8* ヘテロ欠損マウスでは早期の MMP の発現及び活性の上昇があった。各喫煙暴露期間(2週間、4週間、8週間と12週間)の肺組織サンプルを収集し、real-time PCR や蛍光ラベルした基質を用いる活性測定法などで MMP の発現を検討した。*Fut8*ヘテロ欠損マウスではわずか二週間の喫煙暴露が MMP-9 の遺伝子発現やタンパク質活性を有意に増加させたことがわかった。一方、同様に肺組織の破壊に関係深い MMP12 の変動は認められなかった。

(3) *Fut8* ヘテロ欠損マウスにおいて炎症反応が亢進した。肺組織の破壊は肺での炎症反応の程度と密に関係する。*Fut8*ヘテロ欠損マウスにおいては喫煙暴露の早期から炎症細胞の総数、マクロファージの浸潤数が多く、喫煙 12 週間の時にピークに達した。

(4) 喫煙暴露 12 週後、肺組織切片を用いて組織染色や肺気腫の指標である平均肺胞径の測定など肺気腫の程度を判定した。野生型マウスに比べて *Fut8* ヘテロ欠損マウスでは肺胞壁の破壊度が有意に増加を示す(図 2)。

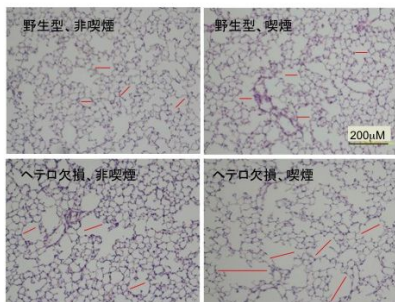


図2 喫煙暴露による肺組織の破壊は *Fut8* ヘテロ欠損マウスにおいて顕著である。

従来喫煙暴露による肺気腫モデルマウスの作成には 6 ヶ月間を要すると考えられたが、*Fut8*ヘテロ欠損喫煙暴露マウスは3ヶ月という短い期間で発症することから、早期肺気腫発症モデルと位置付けることができる。

(5) MMP の発現を制御する Smad パスウェイは *Fut8* ヘテロ欠損マウスにおいては正常に機能発揮できない。喫煙誘導性肺気腫のメカニズムを理解するため、まず *Fut8* 変異繊維芽細胞を用いて、タバコ抽出液の刺激下で、Smad2 の発現、リン酸化レベル、さらに MMP9

の発現を確認した。正常の細胞と比べて、*Fut8*変異細胞では Smad2 の発現量の変化がないものの、リン酸レベルが著しく低下したことがわかった。その結果、細胞培地への MMP9 の分泌量も顕著に増加した。

このような結果は喫煙暴露マウスを用いて確認した所、同様な結果を得られた。さらに、喫煙暴露において、Smad2 のリン酸化を調節する他の因子も検索した。Real-time PCR の解析結果によって、Smad7 の発現レベルが喫煙暴露下で大きく上昇したことを見出した(図 3)。Smad7 は Smad2,3 などのリン酸化を抑制的にコントロールする分子である。

*Fut8*ヘテロマウスの解析は COPD 病態形成

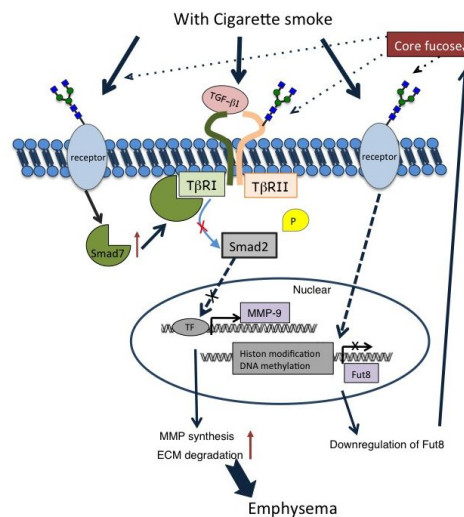


図3. FUT8活性の低下はTGFβ-Smad2-MMP9シグナル伝達経路に損傷を来す。

における環境因子と糖鎖構造変化の相互作用に有用の知見を与えるのみならず、短期間に発症するこのマウスは今後の薬物開発を効率的に進めるためにも有効なモデル動物となる。

(6) 日本医科大学呼吸外来と共同研究を行い、COPD 及びリスクありの患者の肺気腫の程度、肺機能ならびに増悪頻度と *FUT8* 活性の

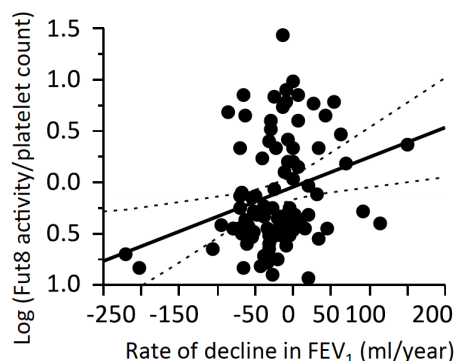


図4. FUT8の酵素活性がFEV1と相関する相関を検討した。FUT8 の酵素活性はリスクありの患者において年齢の上昇と共に低下することが認められた。FEV₁ の急速な減少は FUT8 の酵素活性が低い患者からよく見られる(図 4)。さらに、FUT8 の活性低下は特に増

悪頻度の高い、しかも重症の患者ほどよく見られる傾向がある。血清 FUT8 活性は *Fut8* の遺伝子型に強く規定されていた。プロモーター近傍の SNP rs7145500 と血清 FUT8 活性の相関については $p = 7.7 \times 10^{-25}$ である。

マウス及びヒト血清解析の結果から、FUT8 の活性低下や変異は生体に喫煙や空気汚染等の外襲性因子への高い感受性をもたらし、さらに肺間質の合成と破壊のバランスを崩し、COPD の発症につながると考えられる。

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2件)

Gao, C., Maeno, T., Ota, F., Ueno, M., Korekane, H., Takamatsu, S., Shirato, K., Matsumoto, A., Kobayashi, S., Yoshida, K., Kitazume, S., Ohtsubo, K., Betsuyaku, T., and Taniguchi, N. (2012) Sensitivity of heterozygous alpha1,6-fucosyltransferase knock-out mice to cigarette smoke-induced emphysema: implication of aberrant transforming growth factor-beta signaling and matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* (査読有り)287,16699-16708, doi: 10.1074/jbc.M111.315333.

#Kamio, K., #Yoshida, T., #Gao, C., Ishii, T., Ota, F., Motegi, T., Kobayashi, S., Fujinawa, R., Ohtsubo, K., Azuma, A., Gemma, A., Nishimura, M., Betsuyaku, T., Kida, K., and Taniguchi, N. (2012) alpha1,6-Fucosyltransferase (*Fut8*) is implicated in vulnerability to elastase-induced emphysema in mice and a possible non-invasive predictive marker for disease progression and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Biochem Biophys Res Commun* (査読有り)424, 112-117, doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.081. (#equal contribution)

[学会発表](計3件)

Gao, C. Lowered level of core fucosylation is a possible non-invasive predictive marker for chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

22nd International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XXII) Jun 23-28, 2013 Dailian China

Gao, C. Sensitivity of heterozygous alpha1,6-fucosyltransferase knock out mice to cigarette smoke-induced emphysema: Implication of aberrant TGF-beta signaling and MMP gene expression. 8th International Symposium on Glycosyltransferases June 5-9, 2012, Hannover, Germany

Gao, C. Molecular mechanism of the high susceptibility of alpha 1,6 fucosyltransferase (*Fut8*) heterozygous knockout mice to cigarette smoke-induced emphysema 第84回日本生化学会大会 2011年9月21~24日 京都

[その他]

掲載新聞名:

日刊工業新聞 平成24年4月6日(金曜日)
化学工業日報 平成24年4月9日(月曜日)
科学新聞 平成24年4月16日(月曜日)
薬事日報 平成24年4月20日(金曜日)

掲載ホームページ名、URL:

理化学研究所 プレスリリース
<http://www.riken.go.jp/r-world/research/results/2012/120404/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高 叢笑 (Gao, Congxiao)

大阪大学・産業科学研究所・招へい教員

研究者番号: 50379260

研究成果の概要(和文)

Fut8 ヘテロ欠損マウスを用いて、COPD 病態とコアフコース糖鎖修飾の関連性の解析を試みた。喫煙暴露の早期から FUT8 の活性低下や MMP-9 の発現上昇が見られた。ヘテロ欠損マウスの肺気腫変化は野生型より早く呈すことを見出した。糖鎖修飾の異常が TGF- β 1-Smad2 シグナル伝達経路に損傷を来した事がわかった。ヒトの症例において FUT8 活性は低い程、呼吸機能を示す一秒率の年間減少率が大きくなり、増悪の頻度も高くなることがわかった。FUT8 は肺気腫発症の感受性因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)

The physiological relevance of core fucosylation in the pathogenesis of COPD was investigated using cigarette smoke exposed *Fut8* heterozygous knockout mice. A marked decrease in FUT8 activity and elevated matrix metalloproteinase (MMP)-9 activities were observed at an early stage of exposure. Emphysema developed in only half the exposed-period required for wild type mice. TGF- β 1-Smad2 signaling pathway has lost its function. Moreover, our investigation showed that, among symptomatic current or ex-smokers with stable COPD or at risk outpatients (n=226), a faster annual decline of the forced expiratory volume in 1s (FEV1) was significantly associated with lower FUT8 activity. Patients with lower FUT8 activity experienced exacerbations more frequently. These data suggest that reduced FUT8 activity is associated with the progression of COPD and serum FUT8 activity is a minimally invasive predictive biomarker for progression and exacerbation of COPD.