

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460102

研究課題名(和文) 網羅的発現解析を基盤にした閉塞性肺疾患の治療標的・診断マーカーの探索とその応用

研究課題名(英文) Identification and application of therapeutic targets and diagnostic markers of obstructive pulmonary diseases based on global expression analysis

研究代表者

首藤 剛 (Shuto, Tsuyoshi)

熊本大学・生命科学研究部(薬)・准教授

研究者番号：80333524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアーゼおよび酸化ストレスは、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や嚢胞性線維症(CF)などの閉塞性肺疾患の病体を規定する因子として重要であるが、呼吸機能障害を安定的に呈するC57BL/6- β -ENaC-Tgマウスにおける、これらの経路の役割については不明であった。本研究では、プロテアーゼ阻害薬のONO-3403および抗酸化薬であるN-アセチルシステイン(NAC)投与が、マウスの肺気腫ならびに呼吸機能障害を有意に抑制することを示した。また、抗酸化物質であるビタミンCを体内で産生できない閉塞性肺疾患マウスを作製したところ、体内VCの欠損は、肺気腫病態の悪化、呼吸機能の低下を有意に促進した。

研究成果の概要(英文)：Protease-antiprotease imbalance and oxidative stress are considered to be major pathophysiological hallmarks of severe lung diseases including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cystic fibrosis (CF), but their role in the regulation of pulmonary emphysema and dysfunction of β -ENaC-transgenic (Tg) mice, a murine model of COPD/CF, is unknown. DNA microarray analysis revealed that protease- and oxidative stress-dependent pathways are activated in the lung tissue of β -ENaC-Tg mice. Here, treatments of β -ENaC-Tg mice with a serine protease inhibitor ONO3403 and an antioxidant N-acetylcystein significantly improved pulmonary emphysema and dysfunction. Moreover, depletion of a murine endogenous antioxidant Vitamin C (VC), by genetic disruption of VC-synthesizing enzyme SMP30 in β -ENaC-Tg mice, increased inflammatory status in lung tissue and exaggerated pulmonary emphysema with a significant decrease in pulmonary function, possibly due to an increased oxidative stress.

研究分野：薬理学、細胞生物学

キーワード：閉塞性肺疾患 プロテアーゼ 酸化ストレス ビタミンC

1. 研究開始当初の背景

閉塞性肺疾患は、慢性気道炎症や過剰な粘液貯留、およびこれらの症状に伴う気道閉塞を主徴とする難治性の呼吸器疾患の総称である。慢性気管支炎や肺気腫を主徴とする慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、粘液の貯留や慢性細菌感染が認められる難治性遺伝性疾患の嚢胞性線維症 (CF) などの疾患が、これにあたる。特に、WHO の見解において、世界で約2億人の人が COPD であると推計されており、身近に起こりうる致死率の高い疾患の1つである。一方、CF は、Cl-チャンネルである CFTR の遺伝子変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患で、欧米では出生児 2,500 人に1人の発症頻度を示し、健常者においても25人に1人が原因遺伝子のキャリアであるため、極めて頻度の高い遺伝子疾患として認識されている。これらの閉塞性疾患においては、共通して、炎症による粘液の過剰分泌に伴う粘性痰 (喀痰) が認められることから、粘液貯留を呈する閉塞性換気障害に起因する病態の理解は、疾患発症機構の解明および治療薬開発の観点からも極めて重要であるものと思われる。

このような背景の中、本申請者は、閉塞性肺疾患の主徴である気道における感染・炎症惹起機構に関する種々の検討を行い、いくつかの重要な知見を得た。

- ① 閉塞性肺疾患の起因菌が TLR2 を活性化することを示した (Shuto. T et al., PNAS. 2001).
- ② 起因菌の感染は、TLR2 遺伝子の発現を誘導することを示した (Shuto. T et al., JBC. 2002).
- ③ CF 患者の TLR2 の発現・機能は、恒常的に亢進していた (Shuto. T et al., ASEB J. 2006).
- ④ CF 患者の TLR2 の Promoter 領域には CF 関連メチル化パターンが存在し、そのことにより TLR2 の発現が、恒常的に亢進していた (Furuta. Tand Shuto. T et al., BMC Mol. Biol. 2008).
- ⑤ TLR2 遺伝子の発現を Curcumin が抑制することを示した (Shuto T et al., BBRC., 2010).
- ⑥ IL-17A が、CF 患者の TLR2 シグナルを相乗的に活性化し、CF 気道炎症病態の形成に寄与していることを示した (Mizunoe S. and Shuto.T et al., J Pharmacol Sci., 2012)
- ⑦ 2004 年に Mall らにより作成された β ENaC-Tg マウスの致死率を改善し、独自に、粘液貯留を安定的に呈する閉塞性

肺疾患モデルマウスを確立した (未発表).

2. 研究の目的

本研究では、本申請者が、近年、独自に確立した低致死率 β ENaC-Tg マウスを用い、閉塞性肺疾患における治療標的または診断マーカー分子を探索し、疾患に対する新たな治療薬の開発を推進することを究極の目的とする。

3. 研究の方法

まず第1に、生化学的・組織学的・呼吸力学的な手法により既に明らかにした β ENaC-Tg マウスについて、網羅的な発現差異解析 (ORF 3D-gene) を実施し、そのデータに基づき、閉塞性肺疾患における治療標的または診断マーカー分子の探索を実施した。第2に、上記項目から抽出した標的候補関連経路の中から、プロテアーゼ活性化・酸化ストレス活性化経路に着目し、これらの経路の外因的または内因的阻害が、閉塞性肺疾患病態に与える影響について検討した。最後に、閉塞性肺疾患に関わる新規の Pulmomodulatory 因子を探索するために、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中で発現量の高いインクレチン因子 Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) に着眼し、GLP-1 受容体シグナルの活性化が、閉塞性肺疾患病態に与える影響について種々の検討を行った。

4. 研究成果

4-1. β ENaC 過剰発現マウスを用いた創薬ターゲット候補分子の探索

これまでに、本研究室では、安定した気道閉塞性粘液貯留症状を呈するマウス (C57BL/6- β ENaC-Tg マウス) を作製し、本マウスが新規の閉塞性肺疾患モデルとして有用であることを示唆した。そこで本研究では、本マウスの表現型を明らかにし、薬理的有用性をさらに高めるために、多角的な観点から、組織学的および呼吸力学的解析を実施した。肺の組織学的解析により、特に、平均肺胞径 (Mean Linear Intercepts: MLI) の顕著な増大を主徴とする肺気腫病態を呈することが分かった。また、flexiVent (SCIREQ Inc.) を用いた呼吸力学的解析により、肺気腫病態を反映する肺エラスタンスの低下が認められただけでなく、FEV0.1% (FEV0.1/FVC) が有意に低下していることが分かった。これらの結果により、本マウスは創薬ターゲット候補分子の探索のために活用する際に、極めて有用な閉塞性肺疾患モデルであることが

明らかになったことから、次に、Microarray解析により、病態時に発現変化する遺伝子の網羅的探索を行った。その結果、プロテアーゼ経路及び酸化ストレス経路の顕著な活性化が認められた。

4-2. C57BL/6-βENaC-Tg マウスに対するプロテアーゼ阻害薬とその誘導体の効果

網羅的発現解析の結果より、C57BL/6-βENaC-Tg マウスの肺組織におけるプロテアーゼ経路の活性化が認められた。そこで、本マウスの肺病態に対する既存のプロテアーゼ阻害薬であるメシル酸カモスタット (100 mg/kg, 1日2回, 3週間, p.o.) およびその誘導体である ONO-3403 (20 および 100 mg/kg, 1日2回, 2週間, p.o.) の効果について検討した。その結果、メシル酸カモスタットによりマウスの肺気腫・呼吸機能低下症状の改善傾向が認められ、ONO-3403 により有意な改善を示した。また、粘液遺伝子発現や気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の粘液蛋白質 (MUC5AC) 量の発現上昇も、ONO-3403 により有意に改善した。以上の結果より、プロテアーゼ阻害薬、特に ONO-3403 が、C57BL/6-βENaC-Tg マウスの肺病態を幅広く抑制することを見いだした。

4-3. C57BL/6-βENaC-Tg マウスにおける酸化ストレスおよび内因性ビタミンCの役割に関する研究

一般に、COPD の発症および増悪には、生体内における酸化物質-抗酸化物質のバランスの崩壊が強く関与することが知られており、これは、喫煙により体内に取り込まれた過剰な酸化物質が生体内の抗酸化物質 (e.g. ビタミン C) により除去できなくなることに起因する。事実、COPD 患者では、活性酸素種の代謝物が血漿中で増加しているという報告からも、酸化ストレス要因説は臨床的には支持されている。前述のように、これまで、C57BL/6-βENaC-Tg マウスが、粘液貯留・肺気腫・呼吸機能障害を呈し、さらに、酸化ストレスやプロテアーゼ活性が亢進した COPD 様症状を呈することをマイクロアレイ等により明らかにしてきた。しかしながら、C57BL/6-βENaC-Tg マウスにおいて、酸化ストレスが、肺病態形成にどの程度関与しているのかは不明である。そこで、本検討では、C57BL/6-βENaC-Tg マウスの肺病態形成における酸化ストレスの関与を明らかにするために、まず、抗酸化薬である N-アセチルシステイン (NAC) (0.01, 0.1 mg/kg, 1日/回, 2週間, i.t.) を投与した際のマウス肺病態につい

て検討を行った。その結果、NAC 投与は、マウスの肺気腫ならびに呼吸機能障害に対して、用量依存的に、有意かつ顕著な改善効果を示した。したがって、C57BL/6-βENaC-Tg マウスの肺病態形成には、少なくとも一部、酸化ストレスが関与していることが示唆された。

一方、C57BL/6-βENaC-Tg マウスは、ヒトとは異なり、抗酸化物質ビタミンCを体内で合成できることから、前述の実験結果は、NAC と内因性ビタミンCの共存による効果を観察している可能性も否定できない。そこで次に、C57BL/6-βENaC-Tg マウスが示す肺病態に対して、マウス体内で産生された内因性ビタミンCがどのような役割を担うかについて明らかにすることを目的とし、以下の検討を行った。本検討では、内因性ビタミンC合成酵素 SMP30 を欠損したノックアウト (KO) マウスと C57BL/6-βENaC-Tg マウスを交配し、内因性ビタミンCを体内で産生できない雌雄の C57BL/6-βENaC-Tg-SMP30 KO マウス (雌: C57BL/6-βENaC-Tg-SMP30 ^{-/-}, 雄: C57BL/6-βENaC-Tg-SMP30 ^{Y/-}) をそれぞれ作製し (SMP30 が X 染色体上の遺伝子であるため)、その肺病態について検討した。その結果、SMP30 が欠損した雌雄の C57BL/6-βENaC-Tg マウスは、C57BL/6-βENaC-Tg-SMP30 WT マウスと比較して、肺組織における酸化ストレス関連遺伝子、血清中の H₂O₂ 量が有意に上昇し、酸化ストレス状態が亢進していることが示唆された。また、興味深いことに、SMP30 の欠損は、C57BL/6-βENaC-Tg マウスの肺組織における粘液および炎症関連遺伝子の mRNA 発現を上昇させ、さらにマウス肺気腫病態の悪化、呼吸機能の低下を有意に促進することが明らかになった。

以上、本研究は、閉塞性肺疾患モデル C57BL/6-βENaC-Tg マウスの肺病態形成において、酸化ストレスおよび内因性ビタミンCが重要な役割を担うことを初めて明らかにした。本知見は、COPD 患者において認められる体内ビタミンC量の低下が、その肺病態の悪化と密接に関係していることを示唆するものである。また、本研究において作製した C57BL/6-βENaC-Tg-SMP30 KO マウスは、ヒトと同様に内因性ビタミンCを合成できないことから、本マウスは、ヒトの重篤な COPD 病態を再現する、世界で初めての新規 COPD マウスモデルであるといえる。

4-4. 閉塞性肺疾患モデル動物の肺病態に対する GLP-1 受容体作動薬の影響

一般に、COPD は、肺原性疾患であるが、

近年, COPD 患者の代謝特性やその関連因子が肺病態に影響を与える可能性が示唆されており, COPD 病態を制御する Pulmomodulatory の同定は重要である. 本研究では, 粘液貯留, 肺気腫, 呼吸機能低下を呈する C57BL/6-βENaC-Tg マウスを主に用いて, まず, 肺での機能が不明であり, BALF 中に含量が高いことで知られる代謝性因子 GLP-1 に着目し, COPD 病態に対する影響について検討した. なお, GLP-1 は抗糖尿病作用を示すホルモンとして知られており, GLP-1 受容体作動薬は現在 2 型糖尿病治療薬として臨床応用されている. また, GLP-1 受容体は肺組織においても高発現しているが, 肺組織における GLP-1 の機能は不明である.

まず, 本研究では, 気道上皮における GLP-1 受容体シグナルの生理的および病態生理的機能について検討した. その結果, 正常気道上皮細胞株 (16HBE14o-) 及び COPD モデル細胞株 (βγENaC-16HBE14o-) に対する GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 刺激は, p38 MAPK 依存的に粘液遺伝子 MUC5AC の産生を上昇させることが明らかになった. また, 正常及び COPD 様 C57BL/6-βENaC-Tg マウスに対する Exendin-4 を経気管投与も, 両マウスにおける粘液遺伝子 Muc5AC の発現を上昇させた. このとき, Exendin-4 投与は, C57BL/6-βENaC-Tg マウスの肺気腫病態を亢進したことから, COPD 肺組織における GLP-1 受容体シグナルは, 粘液発現を促進し, 肺病態を悪化させることを示した.

以上, 本研究は, COPD 肺疾患時の GLP-1 受容体の肺への刺激が, COPD 肺病態を悪化させる Pulmomodulatory 因子であることを明らかにするものであり, "COPD-代謝連関"の重要性を強調する極めて重要な知見である.

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 11 件)

- ① 首藤 剛. 2015. 上皮型 Na⁺チャンネル過剰発現マウスを活用した閉塞性肺疾患治療標的の探索. *Jpn J Clin Pharmacol Ther.* 46(1): 33-34, 査読有
- ② 首藤恵子, 水之江翔太, 甲斐広文, 首藤 剛. 2015. 難治性気道炎症疾患における感染誘導性 IL-8 産生に対する IL-17A の作用, アレルギーの臨床, 35: 47-52, 査読有
- ③ Kris Famm, Roy Katso, 首藤 剛. (翻訳) 2015. Electroceuticals を用いた神経制御法の開発とその医療への応用, *ファルマシア*, 51: 1063-1065, 査読有
- ④ Suzuki S, Sargent RG, Illek B, Fischer H, Esmacili-Shandiz A, Yezzi MJ, Lee A, Yang Y, Kim S, Renz P, Qi Z, Yu J, Muench MO, Beyer AI, Guimarães AO, Ye L, Chang J, Fine EJ, Cradick TJ, Bao G, Rahdar M, Porteus MH, Shuto T, Kai H, Kan YW, Gruenert DC. TALENs Facilitate Single-step Seamless SDF Correction of F508del CFTR in Airway Epithelial Submucosal Gland Cell-derived CF-iPSCs. 2016. *Mol Ther Nucleic Acids.* 5: e273. DOI:10.1038/mtna.2015.43, 査読有
- ⑤ Yokoyama T, Takaki S, Chosa K, Sato T, Suico MA, Teranishi Y, Shuto T, Mizuguchi M, Kai H. Structural stabilization of transthyretin by a new compound, 6-benzoyl-2-hydroxy-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione. 2015. *J Pharmacol Sci.* 129(4): 240-3. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.09.006, 査読有
- ⑥ Koga T, Suico MA, Shimasaki S, Watanabe E, Kai Y, Koyama K, Omachi K, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Mori K, Hino S, Nakao M, Kai H. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Induces Sirtuin 1 (SIRT1) Expression via the PI3K-Akt-GSK3β Signaling Pathway and Promotes Hepatocellular Injury. 2015. *J Biol Chem.* 290(51): 30366-74. DOI: 10.1074/jbc.M115.664169, 査読有
- ⑦ Ueno-Shuto K, Kato K, Tasaki Y, Sato M, Sato K, Uchida Y, Sakai H, Ono T, Suico MA, Mitsutake K, Tokutomi N, Kai H, Shuto T#. Lipopolysaccharide decreases single immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule (SIGIRR) expression by suppressing Sp1 via TLR4-p38 pathway in monocytes and neutrophils. 2014. *J Biol Chem.* 289(26): 18097-109. DOI:10.1074/jbc.M113.532093/jbc.M113.532093, 査読有
- ⑧ Suzuki S, Shuto T#, Sato T, Kaneko M, Takada T, Suico MA, Cyr DM, Suzuki H, Kai H. Inhibition of post-translational N-glycosylation by HRD1 that controls the fate of ABCG5/8 transporter. 2014. *Sci Rep.* 4:4258. DOI: 10.1038/srep04258, 査読有
- ⑨ Matsuyama S, Moriuchi M, Suico MA, Yano S, Morino-Koga S, Shuto T, Yamanaka K, Kondo T, Araki E, Kai H. 2014. Mild electrical stimulation increases stress resistance and suppresses fat accumulation via activation of LKB1-AMPK signaling pathway in *C. elegans*. *PLoS One.* 9(12): e114690. doi: 10.1371/journal.pone.0114690,

査読有

- ⑩ Suico MA, Fukuda R, Miyakita R, Koyama K, Taura M, Shuto T, Kai H. The transcription factor MEF/Elf4 is dually modulated by p53-MDM2 axis and MEF-MDM2 autoregulatory mechanism. 2014. *J Biol Chem*. 289(38): 26143-54. doi: 10.1074/jbc.M114.580209, 査読有
- ⑪ 首藤 剛. 2013. 感染時の自然免疫受容体 toll-like receptor-2(TLR2)の発現・機能調節とその炎症応答に関する研究. *薬学雑誌*. 133(12): 1401-1409, 査読有
- ⑫ Fukuda R, Suico MA, Koyama K, Omachi K, Kai Y, Matsuyama S, Mitsutake K, Taura M, Morino-Koga S, Shuto T, Kai H. Mild Electrical Stimulation at 0.1-ms Pulse Width Induces p53 Protein Phosphorylation and G2 Arrest in Human Epithelial Cells. 2013. *J Biol Chem*. 288(22): 16117-26. doi: 10.1074/jbc.M112.442442, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 閉塞性肺疾患モデルを用いた肺病態増悪因子の同定とその治療的応用
首藤 剛, 亀井 竣輔, 坂口 由起, 松本 千鶴, 小野 智美, 菅原 卓哉, 野原 寛文, 藤川 春花, 丸田 かすみ, 中嶋 竜之介, Mary Ann Suico, 近藤 嘉高, 石神 昭人, 甲斐 広文. BMB2015, 2015. 12. 1-4, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ② COPD病態時の気道上皮及び肺組織に対するGLP-1受容体作動薬処理の影響
野原寛文, 首藤剛, 中嶋竜之介, 亀井竣輔, 亀井竣輔, 藤川春花, 藤川春花, 丸田かすみ, SUICO Mary Ann, 甲斐広文, 甲斐広文, 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2015. 11. 19-20, 熊本大学薬学部 (熊本県・熊本市)
- ③ 閉塞性肺疾患モデルにおける亜鉛トランスポーターZIP2の新規スプライシングアイソフォーム発現上昇とその意義
亀井竣輔, 首藤剛, 首藤恵子, 藤川春花, 藤川春花, 野原寛文, 野原寛文, 丸田かすみ, 松本千鶴, 坂口由起, SUICO Mary Ann, 甲斐広文. トランスポーター研究会年会, 2015. 6. 20-21, 慶応義塾大学 (東京都・港区)
- ④ ビタミンCの欠損は, 慢性閉塞性肺疾患モデルマウスにおける呼吸機能低下や肺気腫病態を悪化させる
首藤 剛, 坂口 由起, 野原 寛文, 亀井

竣輔, 藤川 春花, 近藤 嘉高, Suico Mary Ann, 石神 昭人, 甲斐 広文, 日本薬学会年会, 2015. 3. 25-28, 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)

- ⑤ 上皮型 Na⁺チャネル(ENaC)過剰発現と粘液貯留を呈する閉塞性肺疾患
首藤 剛, 甲斐 広文, 日本薬学会年会, 2014. 3. 28-30, 熊本大学 (熊本県・熊本市)
- ⑥ プロテインフォールディングに異常を有するヒト遺伝性疾患に対する創薬研究,
首藤 剛, 甲斐 広文, 日本薬学会年会, 2014. 3. 28-30, 熊本大学 (熊本県・熊本市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.molmed730.org/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 剛 (SHUTO, Tsuyoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬学系)・准教授

研究者番号: 80333524