

タバコ曝露マウスモデルの確立と解析：脂質メディエーターの役割の検討

和田 裕 雄

杏林大学医学部第一内科学

I. 緒 言

(1) タバコ曝露による炎症性疾患と

直接的、あるいは間接的なタバコ曝露により気道炎症が発症することが知られており、慢性閉塞性肺疾患 chronic obstructive pulmonary disease (COPD) の原因となり [1], あるいは、気管支喘息の難治化や肺癌の表現型に関与していることが示唆されている [2,3]。例えば、COPD は 2020 年には、第 5 位の死亡率に達すると考えられており [4], 喫煙曝露による炎症誘発メカニズムの解明と治療法の確立は急務である。

(2) マウスモデルの確立

喫煙曝露のメカニズムを解明するため、われわれはマウスの喫煙曝露モデルを確立してきた。比較的短期間の喫煙曝露でも好中球の遊走を認め、GM-CSF, TNF- α , KC(ヒト CXCL-8/IL-8 の orthologue), MMP-9 など気道炎症と関連した分子の発現レベルが増加していた [5-8]。薬物スクリーニングの観点からは、この炎症反応はステロイドに反応せず、一方、マクロライドでは抑制されることが示された [6-8]。その分子メカニズムとしては、Sirt-1 活性の抑制や HDAC-2 の抑制が生じて、クロマチン修飾を介して炎症性遺伝子の発現が制御されることが示唆されている [5,6]。以上はヒト COPD 患者と共通した表現型である。さらに、COPD では、健常人と比較して IL-10 の発現が低下しているが、IL-10 遺伝子欠損マウスに喫煙曝露を行うと、好中球性炎症が増大かつ遷延することが示された [9]。

以上より、本マウスは、原因となる分子メカニズムが不明な疾患の動物モデルで論じられる「表面妥当性」「構成妥当性」「予測妥当性」の 3 条件を満たしており [10,11], COPD をはじめとするタバコ曝露誘発性炎症の

良いモデルと考えられた。

(3) 脂質メディエーター

さて、COPD 患者ではロイコトリエン leukotriene B₄ (LT-B4) が増加することが知られており、これが COPD の好中球性炎症の原因の一つとして考えられている [1]。タバコの煙中にはオキシダント oxidant が含まれているが、この酸化ストレスにより細胞内では炎症誘導性に活性化された細胞質型ホスホリパーゼ cytosolic phospholipase A₂ (cPLA2) によりアラキドン酸が膜脂質から遊離され細胞外に産出される [12,13]。このアラキドン酸が代謝され LT-B4 が生じ、好中球の遊走の一因となると考えられた。しかし、LT-B4 の阻害薬についての臨床治験をまとめると、必ずしも一定の効果が得られておらず、その原因として、LT-B4 以外のアラキドン酸代謝物、酸化物も好中球遊走作用を有することが判った。このことから、脂質メディエーターの役割を明示するためには、アラキドン酸カスケード全体を抑制する必要があると考えられ、cPLA2 遺伝子欠損マウスの応用が有用と考えられた [14]。

以上より、「喫煙曝露による炎症性疾患では、脂質メディエーターが増加し好中球性炎症を惹起している」との仮説を立てた。本研究では、この仮説を検証するため、(1) cPLA2 遺伝子欠損マウスでは、喫煙曝露による好中球性炎症が抑制される (2) 喫煙曝露による炎症性疾患である COPD 患者ではアラキドン酸やその代謝物の量が上昇する との二つの事柄を予想し、検討した。

II. 方 法

(1) cPLA2 遺伝子欠損マウスの喫煙曝露 [15]

cPLA2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを喫煙曝露装



Figure 1.

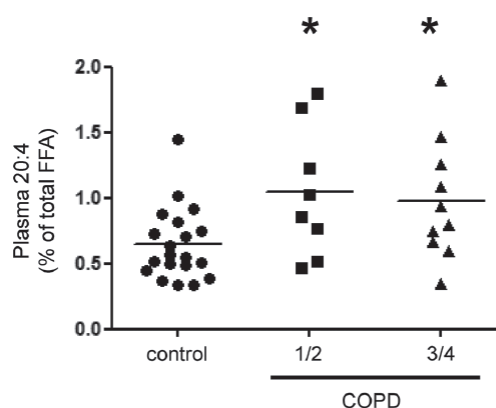


Figure 2.

置 (Figure 1, INH06-CIGR02A, MIPS 社, Osaka, Japan) を用いて 9 日間の喫煙曝露を行った。最終曝露から 24 時間後に採材と以下の解析を行った。

① 気管支肺胞洗浄液 bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 中の総細胞数と細胞分画を同定した。②また, BALF 中の KC, IL-17, MMP-9 の濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。③肺での各種炎症性メディエーターを qRT-PCR により測定する (未施行)。以上は申請者らがこれまでに確立してきた方法によって行った [5-9]。

(2) COPD 患者臨床サンプルのアラキドン酸

COPD 患者および年齢が合致した対照群とから採血を行い [16], Yamamoto らの方法 [17] により脂肪酸を網羅的に測定し比較した [16,18]。

(3) データは mean \pm SD で示した。また, 統計学的な検討は Prism ver5.0 を用いて行い, $p < .05$ を有意とした。

III. 結果

(1) cPLA2 遺伝子欠損マウスの喫煙曝露 [15]

① BALF 中の炎症細胞

cPLA2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの比較を行ったところ, 総細胞数, マクロファージとはほぼ同数であったが, 好中球の遊走は cPLA2 遺伝子欠損マウスで 69.7% の有意な抑制を認めた (** $p = 0.0087$)。

② BALF 中の KC と IL-17 の濃度

BALF 中の KC 濃度は, cPLA2 遺伝子欠損マウスで 41.3% 抑制され ($p = 0.0414$), さらに MMP-9 の濃度も 72.5% 抑制されていた ($p = 0.0295$)。一方, IL-17 の濃度は同等であった。

(2) COPD 患者でのアラキドン酸の量 [18]

COPD 患者の血中で測定した総遊離脂肪酸は初期から低下しているが, アラキドン酸を含む各遊離脂肪酸も低下していた [17, 18]。各脂肪酸の総脂肪酸に対する割合 (%) もほぼ同様で遊離脂肪酸全体が COPD 患者では減少していることが示された。しかし, その中でアラキ

ドン酸だけは, 健常人 $0.6 \pm 0.1\%$, と比し COPD では I / II 期の患者で $0.9 \pm 0.4\%$, III / IV 期の患者で $1.1 \pm 0.6\%$ と COPD 患者で有意に上昇していることが判った (Figure 2, $p < 0.05$)。

IV. 考察

cPLA2 は複数あるホスホリパーゼのうち, 炎症依存性に活性化され, 膜脂質からアラキドン酸を遊離する働きがある。本結果より喫煙曝露の誘発する気道炎症発症に脂質メディエーターが関与することが示された。脂質メディエーターが, 微量でも強い活性を有すること, 不安定であること等を考慮すると画期的な結果と考えられる。また, 肺での炎症性メディエーターの転写物 (mRNA) も②に準じて cPLA2 遺伝子欠損マウスで低下していることが予想された。

さらに, 血中の各遊離脂肪酸の低下は低栄養を反映していると考えられ, 遊離脂肪酸全体の産生に影響していると考えられた。しかし, 我々の結果は, アラキドン酸は, 量的には減少しているものの, 他の脂肪酸と比べて減少は少ないと考えられた。これは, アラキドン酸の量を増加させる炎症の存在のためと考えられた。このことから, ヒト COPD 患者の血中アラキドン酸が増加していることが示された。

V. 結論と今後の展望

以上の結果より,

(1) 脂質メディエーターは, 喫煙曝露により量的にも質的にも活性化されることが判った。

(2) ヒト疾患でも, 同様のことが発症していることが示唆された。われわれのマウスモデルは, 疾患解明に役立つことが示唆された。

今後は, このマウスの解析とモデルにさらなる改変を加えて, より詳細なタバコ誘発炎症の解析を行う。また, その結果を, 疾患の発症メカニズムの理解と治療法の確立に応用する予定である。

V. 引用文献

1. Barnes PJ Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2000; 343: 269-280.
2. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2006; 25: 552-563.
3. Barnes PJ, Adcock IM. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: a lethal association. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 866-867
4. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1498-1504.
5. Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, Milne JC, Ito M, Rossios C, Elliot M, Hogg J, Goto H, Bemis JE, Elliott P, Barnes PJ and Ito K. "A protein deacetylase SIRT1 is a negative regulator of metalloproteinase-9" *FASEB J* 2009; 23: 2810-2819
6. Kobayashi Y, Wada H, Rossios C, Takagi D, Charron C, Barnes PJ and Ito K. "A novel macrolide/fluoroketolide, splithromycin (CEM-101), reverses corticosteroid insensitivity via phosphoinositide 3-kinase pathway inhibition" , *Br J Pharmacol* 2013; 169: 1024-1034.
7. Koybayashi Y, Wada H, Rossios C, Takagi D, Higaki M, Mikura S, Goto H and Barnes PJ. A novel macrolide solithromycin exerts superior anti-inflammatory effect via NF- κ B inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 345: 76-85.
8. Mikura S, Wada H, Higaki M, Yasutake T, Ishii H, Kamiya S and Goto H "Erythromycin prevents the pulmonary inflammation induced by exposure to cigarette smoke" *Transl Res* 2011; 158: 30-37.
9. Higaki M, Wada H, Mikura S, Yasutake T, Nakamura M, Niikura M, Kobayashi F, Kamma H, Kamiya S, Takizawa H and Goto H. Enhanced neutrophilic inflammation in IL-10-deficient mice exposed to cigarette smoke via TNF- α regulation. *Eur Respir J* 2012; 40: Suppl. 56, 303s. [abstract presented in ERS 2012 in Vienna, Austria, 3 September 2012]
10. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci*. 2010; 11: 490-502.
11. Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, Barbaro RP, Barbaro JR, Wilson LM, Threadgill DW, Lauder JM, Magnuson TR, Crawley JN. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res*. 2007; 176:4-20.
12. Asai K, Hirabayashi T, Houjou T, Uozumi N, Taguchi R, Shimizu T. Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2 γ). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J Biol Chem*. 2003; 278: 8809-8814.
13. Pawliczak R, Huang XL, Nanavaty UB, Lawrence M, Madara P, Shelhamer JH. Oxidative stress induces arachidonate release from human lung cells through the epithelial growth factor receptor pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 722-731.
14. Wada H and Takizawa H. Future Treatment for COPD: targeting oxidative stress and its related signal. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2013; 7: 1-11.
15. Wada H, Nakamura M, Higaki M, Uozumi N, Kita Y, Nakamura M, Shimizu T, Takizawa H and Goto H. cPLA2 α plays a role in neutrophilic inflammatory response in mice induced by tobacco smoke exposure. [abstract accepted in ERS 2013 in Barcelona, Spain, 8 September 2013]
16. Yamamoto Y and Yamashita S. Ubiquinol/ubiquinone ratio as a marker of oxidative stress. *Methods Mol Biol*. 2002;186: 241-6.
17. Wada H, Hagiwara S, Saitoh E, Ieki R, Okamura T, Ota T, Kodaka T, Yamamoto Y and Goto H, "Reduction in Plasma Free Fatty Acid in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease" , *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1465.
18. Wada H, Hagiwara S, Saitoh E, Ieki R, Yamamoto Y, Adcock IM and Goto H. Up-regulation of blood arachidonate (20:4) levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *BioMarkers* 2012; 17: 520-523.

LIST OF PUBLICATIONS

英文原著

1. Kobayashi Y, Wada H, Rossios C, Takagi D, Charron C, Barnes PJ and Ito K. A novel macrolide/fluoroketolide, splithromycin (CEM-101), reverses corticosteroid insensitivity via phosphoinositide 3-kinase pathway inhibition. *Br J Pharmacol* 2013, in press.
2. Koybayashi Y, Wada H, Rossios C, Takagi D, Higaki M, Mikura S, Goto H and Barnes PJ. A novel macrolide solithromycin exerts superior anti-inflammatory effect via NF- κ B inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 345: 76-85.
3. Wada H, Hagiwara S, Saitoh E, Ieki R, Yamamoto Y, Adcock IM and Goto H. Up-regulation of blood arachidonate (20:4) levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *BioMarkers* 2012; 17: 520-523.

英文総説

1. Wada H and Takizawa H. Future Treatment for COPD: targeting oxidative stress and its related signal. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2013; 7: 1-11.

和文総説

1. 和田裕雄, 滝澤始「喘息と COPD の併存例の診断と治療」呼吸器内科 2013; 23: 209-215.
2. 和田裕雄, 滝澤始「禁煙と禁煙指導」アレルギーの臨床 2012; 32: 1299-1304.
3. 和田裕雄, 檜垣学, 三倉真一郎, 滝澤始「難治化因子としての喫煙：受動喫煙も含めて」呼吸器内科 2012, 21: 8-15.

講演記録

学会発表 (海外発表分)

1. Wada H, Nakamura M, Higaki M, Uozumi N, Kita Y, Nakamura M, Shimizu T, Takizawa H and Goto H. cPLA2 α plays a role in neutrophilic inflammatory response in mice induced by tobacco smoke exposure. [abstract accepted in ERS 2013 in Barcelona, Spain, 8 September 2013]
2. Higaki M, Wada H, Mikura S, Yasutake T, Nakamura M, Niikura M, Kobayashi F, Kamma H, Kamiya S, Takizawa H and Goto H. Enhanced neutrophilic inflammation in IL-10-deficient mice exposed to cigarette smoke via TNF- α regulation. *Eur Respir J* 2012; 40: Suppl. 56, 303s. [abstract presented in ERS 2012 in Vienna, Austria, 3 September 2012]

3. Ito K, Kobayashi Y, Wada H, Barnes PJ and Fernandes P. "A novel macrolide/fluoroketolide, solithromycin exerts superior anti-inflammatory effect via NF- κ B inhibition in COPD cells" ID week 2012 San Diego, USA, *October 20, 2012*

学会発表 (国内発表)

1. 檜垣学, 和田裕雄, 新倉保, 安武哲生, 三倉真一郎, 中村益夫, 神谷茂, 菅間博, 小林富美恵, 滝澤 始, 後藤 元「タバコが惹起する肺の炎症への IL-10 の抑制的影響」(第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日,

福岡)

2. 檜垣学, 和田裕雄, 新倉保, 小林富美恵, 神谷茂, 菅間博, 滝澤始, 後藤元「喫煙曝露マウスにおける Interleukin-10 の役割」*Ann Jpn Respir Soc* 2012; 1s: (第 52 回日本呼吸器病学会総会, 2012 年 4 月 20 日, 神戸)

受賞記録

受賞

2012 年 European Respiratory Society (ERS), Travel Grants for the best abstracts on COPD 受賞