

間質性肺炎の原因遺伝子解明と新規治療薬開発

●星野 友昭

久留米大学・医学部・第一内科

〈研究の目的と進め方〉

間質性肺炎は原因不明の予後が悪い肺疾患である。サイトメガロウイルス等のウイルス性肺炎、一部の細菌性肺炎、また臨床においてよく遭遇するadult respiratory distress syndrome(ARDS)は間質性肺炎が原因の一つと考えられている。また急性間質性肺炎は、しばしばSystemic inflammatory response syndrome (SIRS)、高サイトカイン血症、多臓器不全などを伴うことが知られている。多くのメディエーターが急性間質性肺炎の原因に関与していると考えられている。新規抗癌剤イレッサ(ゲフィチニブ)をはじめとする抗癌剤は放射線療法の併用などにより重篤な急性肺障害である間質性肺炎をおこすことが大きな社会問題となっている。我々はIL-18をIL-2とともにマウスに連日投与すると肺のみにリンパ球浸潤が急激に起こり肺線維症を伴う急性間質性肺炎が誘導されほぼ100%死亡するサイトカインによって誘導される間質性肺炎モデルを確立した。この間質性肺炎マウスモデル、我々が樹立した遺伝子改変マウス、間質性肺炎患者検体等を用い間質性肺炎の原因遺伝子解明と全く新しい間質性肺炎治療薬を開発することを最終目標とする。

〈研究開始時の研究計画〉

IL-18による間質性肺炎の発症のメカニズムを分子レベルでマウスモデル及びヒト検体を用いて以下のように具体的に行った。

I. 間質性肺炎病変部におけるケモカイン、IL-18R発現の解析

申請者が樹立した間質性肺炎マウスモデルの特徴は肺のみにリンパ球浸潤が急激に起こることである。IL-18によりIL-8をはじめとするケモカインが誘導される事が報告されている。そこで組織特異的に(間質性肺炎病変部に)ケモカイン、IL-18R発現が起こっているかNorthern blotting, RNase protection assay (RPA),モノクロナール抗体を用い解析を行う。

II. 間質性肺炎マウスモデルでのサイトカインの発現の解析

間質性肺炎マウスモデルにおけるサイトカイン(TNF,IFN,IL-1等)の発現をNorthern blotting,RPA,ELISA等を用い解析する。同時にこれらサイトカインのシグナル伝達に関与する遺伝子欠損マウス(STAT1KO,STAT6KO,TNFKO,caspase-1KO etc)を用い解析を行う。

III. 間質性肺炎マウスモデルでのcaspase familyの発現の解析

caspase family(ICE etc)によってmatureIL-18はproIL-18から造られる。しかしながらいまだcaspase-1の発現制御の機序は不明である。そこで間質性肺炎マウスモデルでのcaspase familyの発現の解析をWestern blotting,合成蛍光物質(Ac-YVAD-MCA etc)を用い行う。

IV. IL-18 transgenicマウスの樹立

matureIL-18はproIL-18からcaspase(ICE etc)によって造られる。そこで申請者はmatureIL-18をproIL-18 cDNAをテンプレートとしPCR法を用いsignal peptideを付加し増幅しこれをIgH プロモーター(pEmIgH)及びインスリンプロモーター(pIns-1)を用いて組織特異的発現IL-18 Tgマウスの樹立を試みる。これらのマウスに間質性肺炎、糖尿病の変化もしくはアレルギー様症状がないか観察する。

V. 新規間質性肺炎治療薬開発

これまで間質性肺炎動物モデルは外来物質、例えば超大量(例100mg/kg iv投与)のブレオマイシンを投与するブレオマイシン肺炎やシリカ吸入肺炎モデルぐらいしかなかった。それゆえこれらのモデルを用いての間質性肺炎の解析には限界があった。申請者はIL-18とIL-2の連日投与で誘導される致死性間質性肺炎モデルを確立した(Blood, 2002)。またTet on systemを用いて肺特異的に成熟マウスにIL-18を発現させると間質性肺炎が誘導された(未発表)。事実イレッサが原因で亡くなった患者の肺局所でIL-18が著明に発現していた(未発表)。これらの事実は我々が樹立した致死性間質性肺炎モデル、肺特異的発現TGマウスを間質性肺炎(例えばNSIP,LIP膠原病肺)患者と比較検討することでヒト間質性肺炎の病態が解明できる可能性がある。また今回申請者によって樹立されたヒト間質性肺炎マウスモデルの特徴は内因性物質(proinflammatoryサイトカイン)であるIL-18により間質性肺炎が誘導されるということである。それゆえこのIL-18による間質性肺炎モデルは間質性肺炎の原因解明に非常に有用なだけでなくIL-18のシグナルを制御することがこの疾患の治療への応用が期待できると考えられる。

〈研究期間の成果〉

I. 間質性肺炎病変部におけるケモカイン、IL-18R発現の解析

II. 間質性肺炎マウスモデルでのサイトカインの発現の解析

(リスト7, 13, 18, 19)

IL-18をIL-2とともにマウスに連日投与するとすべての投与マウスに肺のみにリンパ球浸潤が急激に起こりfibrosisを伴う急性間質性肺炎が誘導され死亡する事を見出した。この急性間質性肺炎はIL-18,IL-2の量依存的でマウスのストレインに関係なくに発症した。急性間質性肺炎病変部におけるケモカイン、サイトカインの発現をRNase protection assay (RPA),ELISA法で解析したところ肺病変部に著明なMIP-1 α , β ,MIP-2,IFN- γ ,IL-6等のケモカイン、サイトカインが発現していた。その上IL-18とIL-2で誘導される急性間質性肺炎はIL-18RaKOマウスで完全に抑制されたがIFN- γ KOマウスでは一部抑制された。つまりこの急性間質性肺炎マウスモデルはIL-18Ra依存的だが、IFN- γ には一部依存的であることが判明した(Blood, 2002)。これらの結果はヒト特発性間質性肺炎発症においてIL-18が重要な役割を果たすと考えられる。そ

ここでIL-18,IL-18 receptora鎖に対するモノクロナール抗体を当教室で作成し特発性間質性肺炎の患者の肺生検組織で免疫組織染色を行った。患者病変部には正常肺より著明にIL-18,IL-18 receptora鎖の発現していた (AJRCMB, 2004)。

III. 間質性肺炎マウスモデルでのcaspase familyの発現の解析

肺線維症のマウスモデルのブレオマイシン (BLM)肺炎はIL-18欠損マウスまたはIL-18Ra欠損マウスで抑制されることが判明した。またcaspase-1欠損マウスで抑制されることが判明した。このことからIL-18,caspase-1が急性間質性肺炎だけでなく肺線維症発症にも関与していることが示唆された(論文投稿中)。

IV. IL-18 transgenicマウスの樹立 (リスト6, 10, 11, 12, 16)

1) リンパ球特異的IL-18 TGマウスの作製

in vivoにおけるIL-18の役割解析のためIgプロモーターを用いIL-18 transgenic (TG)マウスを世界で初めて樹立した。IL-18がin vivoでもIgE産生誘導、Th2誘導することを証明した (J.Immunol.,2001)。

2) 皮膚特異的IL-18 TGマウスの作製

ヒトケラチノサイトプロモーターK5を用い皮膚特異的発現IL-18 TGマウスを作製した。成熟マウスはアトピー性皮膚炎を発症した。また (JID, 2003)。

3) 肺特異的IL-18 TGマウスの作製

Tet-on/Cre systemでヒトサーファクタントプロモーターSP-Cを用い肺特異的、Tet誘導発現IL-18 TGマウスを作製した。成熟マウスに1ヶ月間肺特異的にIL-18を発現すると間質性肺炎が発症した。同時に、恒常的発現、肺特異的IL-18 TGマウスを作製したところ肺気腫が発現した。新規肺気腫・COPDマウスモデルとして論文投稿中である。

V. 新規間質性肺炎治療薬開発 (リスト9, 17, 20, 22, 23, 27, 30, 31)

チオレドキシン (TRX)は高く保存された活性部位(-Cys-Gly-Pro-Cys-)においてジチオール/ジルフィド交換反応による酸化還元活性を有する分子量約12KdaのRedox活性蛋白である。この新規間質性肺炎マウスモデルを用いredox蛋白チオレドキシンが間質性肺炎を抑制することを発見した(本論文は2003年11月1日付けのAmer. J. Respiratory Critical Care Med誌の表紙を飾り特集された)。TRXが喘息マウスモデルにおいて気道過敏性 (AHR)と肺への炎症細胞浸潤を抑制することを報告した (BBRC, 2005)。またTRXがCOPDマウスモデルの肺気腫を抑制することを見いだした (論文投稿中)。TRXやレドックス蛋白が新規の呼吸器治療薬となる可能性を世界に先駆け証明した。

<国内外での成果の位置づけ>

数多くの研究者によりIL-18はIL-12と協同しTh2誘導を抑制しTh1型サイトカイン (IFN- γ)産生及びTh1型細胞への分化を強力に誘導すると考えられていた。しかし我々と兵庫医大の中西らによって別々にIL-18がTh1誘導だけでなくTh2誘導及びIgE,IgG1産生誘導に関与していると報告した。これらの結果よりIL-18はTh1,Th2の両方の分化誘導に関与していることが判明した。また我々や他のグループによる研究で間質性肺炎、骨粗鬆症、感染症、アレルギー性皮膚炎、動脈硬化、膠原病等の疾患にIL-18の関与が明らかになった。IL-18TGマウスを世界で初め

て樹立した。これらの研究で肺を含む組織におけるIL-18の過剰発現が組織障害を誘導することが判明した。redox蛋白チオレドキシン (TRX)が間質性肺疾患マウスモデルを抑制することを米国呼吸器学会誌に報告した (Am J Respir Crit Care Med 168:1075-1083, 2003)。この論文は掲載号のeditorialでも取り上げられ表紙を飾った。現在、TRXのARDSを含む急性肺障害に対する探索医療が京都大学病院で進行中である。また申請者は一連の研究で平成15年度の日本呼吸器学会奨励賞を受けた。これらの事実からも我々の研究は国内外で注目されている。樹立したIL-18/IL-2で誘導される新規間質性肺炎マウスモデルは日本と米国で特許の査定が下った。おそらく日米初めての特許が認められた呼吸器疾患モデルである。樹立した疾患マウスモデルに関しては複数の製薬企業との共同研究が進行中である。この疾患マウスモデルに対するライセンス料が久留米大学に支払われている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

matureIL-18をproIL-18 cDNA をテンプレートとしPCR法を用いsignal peptideを付加し増幅しこれをインスリンプロモーター (pIns-1)を用いて肺特異的IL-18TGマウスの作製を何度も試みた。しかしすべて致死であった。このことは炎症性サイトカインが生まれながらに特定の臓器に発現すると致死になる可能性がある。Tet-on/Cre systemで肺及び組織特異的発現IL-18 TGマウスを作製したが良く繁殖できず苦勞している。

<今後の課題>

我々の研究で炎症性サイトカインIL-18が間質性肺炎発症に関与している可能性が明らかになった。しかしながらその発症の機序が不明である。またレドックス蛋白チオレドキシンが呼吸器疾患に効く機序が不明である。これらが今後の課題である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1. Cutting edge: IL-18-transgenic mice: in vivo evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function / Hoshino T, Kawase Y, Okamoto M, Yokota K, Yoshino K, Yamamura K, Miyazaki J, Young HA, Oizumi K - J Immunol (2001, 166(12): 7014-7018)
2. Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL-18R beta chain / Kim SH, Reznikov LL, Stuyt RJ, Selzman CH, Fantuzzi G, Hoshino T, Young HA, Dinarello CA - J Immunol (2001, 166(1): 148-154)
3. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells / Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, Choe YK, Park SN, Hoshino T, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY - J Immunol (2001, 167(1): 497-504)
4. The restricted expression of granzyme M in human lymphocytes / Sayers TJ, Brooks AD, Ward JM, Hoshino T, Bere WE, Wiegand GW, Kelley JM, Smyth MJ - J Immunol (2001, 166(2) : 765-771)
5. Cis3/socs3/ssi3 plays a negative regulatory role in stat3 activation and intestinal inflammation / Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A - J Exp Med (2001, 193(4) 471-482)
6. Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense

- against infection by *Mycobacterium tuberculosis*: a comparative study with IL-12p40 / Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Hoshino T, Okamoto M, Kawase Y, Yokota K, Yoshino K, Takeda K, Akira S, Saito A - *J Immunol* (2002, 169(1): 323-329)
7. Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia / Okamoto M, Kato S, Oizumi K, Kinoshita M, Inoue Y, Hoshino K, Akira S, McKenzie AN, Young HA, Hoshino T - *Blood* (2002, 99(4) : 1289-1298)
8. Partial impairment of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 signaling in *Tyk2*-deficient mice / Shimoda K, Tsutsui H, Aoki K, Kato K, Matsuda T, Numata A, Takase K, Yamamoto T, Nukina H, Hoshino T, Asano Y, Gondo H, Okamura T, Okamura S, Nakayama KI, Nakanishi K, Niho Y, Harada M - *Blood* (2002, 99(6): 2094-2099)
9. Redox-active protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury / Hoshino T, Nakamura H, Okamoto M, Kato S, Araya S, Nomiyama K, Oizumi K, Young HA, Aizawa H, Yodoi J - *Am J Respir Crit Care Med* (2003, 168(9): 1075-1083)
10. Interleukin-18 overproduction exacerbates the development of colitis with markedly infiltrated macrophages in interleukin-18 transgenic mice / Ishikura T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Sawada T, Nakamura T, Miyata T, Kitahora T, Hibi T, Hoshino T, Watanabe M - *J Gastroenterol Hepatol* (2003, 18(8): 960-969)
11. Exacerbated and Prolonged Allergic and Non-Allergic Inflammatory Cutaneous Reaction in Mice with Targeted Interleukin-18 Expression in the Skin / Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Kirii Y, Nishiwaki E, Maeda Y, Takeda J, Okamoto M, Kato S, Imaizumi T, Aizawa H, Yoshino K - *J Invest Dermatol* (2003, 121(3): 502-509)
12. Bone malformations in interleukin-18 transgenic mice / Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Nakamura M, Maeda Y, Nishiwaki E, Zenmyo M, Hiraoka K, Aizawa H, Yoshino K - *J Bone Miner Res* (2003, 18(6): 975-983)
13. Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis / Kitasato Y, Hoshino T, Okamoto M, Kato S, Koda Y, Nagata N, Kinoshita M, Koga H, Yoon DY, Asao H, Ohmoto H, Koga T, Rikimaru T, Aizawa H - *Am J Respir Cell Mol Biol* (2004, 31(6): 619-625)
14. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism / Matsumoto K, Inoue H, Nakano T, Tsuda M, Yoshiura Y, Fukuyama S, Tsushima F, Hoshino T, Aizawa H, Akiba H, Pardoll D, Hara N, Yagita H, Azuma M, Nakanishi Y - *J Immunol* (2004, 172(4) : 2530-2541)
15. Molecular cloning, chromosomal location, and biological activity of porcine interleukin-21 / Muneta Y, Kikuma R, Uenishi H, Hoshino T, Yoshihara K, Tanaka M, Hamashima N, Mori Y - *J Vet Med Sci* (2004, 66(3): 269-275)
16. Limited role for interleukin-18 in the host protection response to pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice - Nakasone C, Kawakami K, Hoshino T, Kawase Y, Yokota K, Yoshino K, Takeda K, Akira S, Saito A - *Infect Immun* (2004, 72(10): 6176-6180)
17. Thioredoxin suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation in asthma / Ichiki H, Hoshino T, Kinoshita T, Imaoka H, Kato S, Inoue H, Nakamura H, Yodoi J, Young HA, Aizawa H - *Biochem Biophys Res Commun* (2005, 334(4) : 1141-1148)
18. 発明の名称： Method of preparing an animal model for interstitial pneumonia
 発明者： 星野友昭
 出願者： 星野友昭
 出願先： 米国特許庁
 特許出願年月日： 平成13年4月23日
 特許出願番号： PCT/JP01/03467（日本：特願2001-577988）
 特許査定年月： 平成16年5月31日
 特許番号： US 6899,869 B2
19. 発明の名称： 間質性肺炎治療薬および当該疾病の動物モデルの作成方法並びにそれを用いるスクリーニング方法
 発明者： 星野友昭
 出願者： 星野友昭
 出願先： 特許庁
 特許出願年月日： 平成13年4月23日
 特許出願番号： PCT/JP01/03467（日本：特願2001-577988）
 特許登録年月： 平成16年4月2日
 特許番号： 特許第3538616号
20. 発明の名称： 間質性肺炎治療薬
 発明者： 星野友昭
 出願人： 星野友昭
 出願日： H13.4.23
 出願番号： 特願2003-435216
 特許登録年月： 平成17年1月28日
 特許番号： 特許第3640254号
21. 発明の名称： 肥満および肥満関連疾病治療薬並びにその評価方法
 発明者： 星野友昭
 出願人： 星野友昭
 出願日： 平成12年10月15日
 出願番号： PCT/JP01/09022（日本：特願2000-315323号）
 現状： 審査未請求
22. 発明の名称： チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチド類を含む抗炎症予防乃至治療薬
 発明者： 淀井淳司、中村肇、星野友昭
 出願人： 淀井淳司
 出願日： 平成12年10月20日
 出願番号： 特願2000-321457
 現状： 審査未請求
23. 発明の名称： 間質性肺炎治療薬および当該疾病の動物モデルの作成方法並びにそれを用いるスクリーニング方法
 発明者： 星野友昭
 出願人： 星野友昭
 出願日： 平成13年4月23日
 出願番号： PCT/JP01/03467（日本：特願2001-577988）
 現状： 登録済（特許第3538616号）
 その他（外国状況）：
 米国（4件）：出願番号 ①10/257,965 ②10/786,016 ③10/786,015 ④10/785,961
 EP：出願番号 1 922 013.6
24. 発明の名称： 代謝性骨疾患治療剤
 発明者： 星野友昭、横田耕一、川瀬裕介

出願人：星野友昭
出願日：平成14年2月25日
出願番号：PCT/JP02/01662（日本：特願2002-565621）
現状：審査請求済
その他（外国状況）：
米国：出願番号 10/468,011
現状：審査請求済
25. 発明の名称：皮膚炎，脱毛，掻痒の治療剤の評価方法，
皮膚炎，脱毛，掻痒の予防又は治療剤，トランスジェニ
ック動物
発明者：星野友昭、川瀬裕介、野見山 佳子、横田 耕
一、吉野 公一郎
出願人：星野友昭
出願日：平成16年1月29日
出願番号：特願2004-22314
26. 発明の名称：Preventive or therapeutic agents for
dermatitis or alopecia, evaluation method of the agents,
and transgenic mouse
発明者：星野友昭
出願人：星野友昭
PCT出願：出願番号PCT/JP2004/5580
出願日 平成16年4月19日
27. 発明の名称：アレルギー性疾患又は呼吸器系疾患の予
防及び治療剤
発明者：淀井淳司、相沢久道、星野友昭、孫安生、中村
肇
出願人：レドックス・バイオサイエンス株式会社
出願日：平成16年2月13日
出願番号：特願 整理番号8442003JP
現状：審査未請求
29. 発明の名称：組換遺伝子，疾患動物モデル，及び被
験物の評価方法並びに疾患予防・治療剤
発明者：星野友昭
出願人：学校法人 久留米大学
出願日：平成16年3月11日
出願番号：特願2004-69835
現状：審査未請求
30. 発明の名称：プロテアーゼ阻害剤及び慢性閉塞性肺
疾患の予防又は治療剤
発明者：星野友昭、相澤久道
出願人：学校法人 久留米大学
出願日：平成16年3月29日
出願番号：特願2004-94065
現状：審査未請求
31. 発明の名称：可溶性ヒトインターロイキン18レセ
プター α ，その測定方法，測定用キット及び医薬組成物
発明者：星野友昭
出願人：星野友昭
出願日：平成16年7月26日
出願番号：PCT/JP2004/10621
現状：国際段階（各国未移行）