

キチナーゼ様タンパク質 BRP-39 の呼吸器疾患における
生理的役割に関する研究

松浦 寛

目次

略語一覧	p. 2
序論	p. 4
第 1 章 気管支喘息における BRP-39 の役割	p.36
1-1 Th2 炎症反応における BRP-39 の機能	p.37
1-2 抗アポトーシス作用	p.52
1-3 考察	p.59
第 2 章 COPD における BRP-39 の役割	p.62
2-1 マウスたばこ煙曝露肺気腫モデルにおける BRP-39 の解析	p.64
2-2 喫煙者における YKL-40 発現解析	p.74
2-3 考察	p.79
第 3 章 急性肺傷害における BRP-39 の役割	p.81
3-1 高濃度酸素負荷によるマウス肺傷害モデル	p.82
3-2 急性肺傷害における YKL-40 の効果	p.90
3-3 考察	p.99
総括	p.101
実験の部	p.107
参考文献	p.120
論文目録	p.136
謝辞	p.137

略語一覧

ALI	acute lung injury (急性肺傷害)
ARDS	acute respiratory distress syndrome (急性呼吸窮迫症候群)
AMCase	acidic mammalian chitinase
BALF	broncho alveolar lavage fluid (気管支肺胞洗浄液)
BCR	B cell antigen receptor (B細胞抗原受容体)
BPD	broncho pulmonary dysplasia (気管支肺異形成症)
BrdU	bromodeoxyuridine
CC-10	clara cell 10 kDa protein
CFA	complete Freund's adjuvant (フロイント完全アジュバント)
CLP	chitinase-like protein (キチナーゼ様タンパク質)
COPD	chronic obstructive lung disease (慢性閉塞性肺疾患)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial mesenchymal transition (上皮間葉転換)
FEV ₁	forced expiratory volume in 1 st second (一秒量)
FVC	forced vital capacity (努力肺活量)
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HDM	house dust mite (ハウスダスト：ダニ抗原)
IHC	immunohistochemistry (免疫組織化学)
KC	keratinocyte chemoattractant
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LAA	low attenuation area
LABA	long acting beta 2 agonist (長時間作用性 β 2刺激薬)
LTRA	leukotrien receptor antagonist (ロイコトリエン受容体拮抗薬)
mDC	myeloid dendritic cell (骨髄系樹状細胞)
MCP	monocyte chemoattractant protein
MHC	major histocompatibility complex (主要組織適合遺伝子複合体)
MMR	macrophage mannose receptor
OVA	ovalbumin (オボアルブミン：卵白アルブミン)

pro-SPC	pro-surfactant protein C
pDC	plasmacytoid dendritic cell (リンパ球系形質細胞様樹状細胞)
PI	propidium iodide
PS	phosphatidylserine
QOL	quality of life
SABA	short acting beta2 agonist (短時間作用性 β 2 刺激薬)
SHM	somatic hypermutation (体細胞突然変異)
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms (一塩基変異多型)
TCR	T cell antigen receptor (T 細胞抗原受容体)
Treg	regulatory T cell (制御性 T 細胞)
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling Staining
VC	vital capacity (肺活量)
VEGF	vascular endothelial growth factor (血管内皮細胞増殖因子)

序論

呼吸器は文字通り、呼吸をするためになくてはならない器官であり、吸気から酸素を体内に取り込み、体内から二酸化炭素を排出する役割を担う臓器である。呼吸器は肺とそれを包む胸郭から構成される。解剖学的には、気道と呼ばれる気管と気管支、約 3 億個の肺胞から成る弾力性を持った肺、それを包む胸椎、肋骨、胸骨から成る胸郭が呼吸器を形成している。呼吸器によって口から吸い込まれた空気は気管を経て、気管支につながれた左右の肺に入る。気管支の末端は肺胞につながっており、この肺胞を取り巻く細かい血管と肺胞内の空気との間で、酸素と二酸化炭素のガス交換が行われている。血液中に取り込まれた酸素は末梢臓器の細胞内ミトコンドリアに取り込まれ、エネルギー産生のために利用される。

呼吸器疾患は、呼吸器（気道、肺、胸郭）に起こる疾患の総称であり、病態により感染性疾患、閉塞性肺疾患、拘束性肺疾患、肺腫瘍、アレルギー性疾患、肺循環障害、呼吸調節の異常等に分類される。

感染性疾患とは肺結核や肺炎などである。肺結核は、20 世紀前半においては呼吸器疾患の中心的存在であったが、抗結核薬の開発と胸部外科の進歩に伴い、1950 年代以降は予防と治療に目処が立つようになっている。

肺結核に代わって、罹患者数が増加し、医療経済上の大きな負荷となったのが閉塞性疾患である。閉塞性疾患は、肺および気道病変によって息が吐きにくくなっている状態であり、診断上はスパイロメトリーという検査により評価される気流閉塞の評価指標である 1 秒率が 70%未満になった状態を指す。具体的には、1 秒率は、被験者が最大限に吸気したときの努力肺活量 (Forced Vital Capacity : FVC) と、その空気を 1 秒間にどれくらい呼吸できるかを示す 1 秒量 (Forced Expiratory Volume in 1st second : FEV₁) との比 ($FEV_1\% = FEV_1 \div FVC \times 100$) で表される指標である。

閉塞性疾患の中でも、特にたばこ煙を主とする有害物質を長期に吸入することで発症する慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) は、1990 年には全世界で死因の第 6 位であり、2020 年には死因の第 3 位になると予想されている疾患である¹⁾。COPD は、末梢気道病変と気腫性病変が様々な割合で複合的に作用することにより気流閉塞が起こり、呼吸困難や慢性の咳、痰を特徴とする疾患である。1 秒率が気管支拡張薬吸入後に 70%未満であれば他疾患を除外して COPD と診断される。

拘束性疾患とは、肺気量の低下をきたす疾患である。肺のみならず、神経・筋・胸郭の異常などでも生じる。年齢、性別、身長から算出された予測肺活量（基準値）に対する実測肺活量の割合（%Vital Capacity : %VC）で 80%未満が診断の基準に用いられる。

肺腫瘍は、気管・気管支・末梢肺に由来する癌である。WHO の試算²⁾によれば、肺癌による死亡者数は、2008 年の統計で全癌死の中で最も多く 18%を占め、世界で年間 137 万人がこの疾患で死亡している。喫煙が最大の原因とされており、この早期診断と治療は依然大きな課題である。

呼吸器疾患でアレルギー性疾患に分類される代表的な病態は、気管支喘息である。発作性の呼吸困難、気道閉塞症状が繰り返し生じること、この気道閉塞が気管支拡張薬により有意に改善すること、他の心肺疾患の可能性が除外されることで診断される³⁾。

肺循環障害には肺血管外に異常な水分貯留の認められる肺水腫などが分類される。肺の血管透過性が亢進する疾患には、心筋梗塞のような心臓の病気が原因となって起こる内因性肺水腫のものと、誤嚥、重症肺炎、敗血症、高濃度酸素吸入のような外因性のもの引き起こされる急性呼吸急迫症候群（Acute Respiratory Distress Syndrome : ARDS）がある。

呼吸機能調節障害には睡眠時無呼吸症候群などが分類される。日中の傾眠などの自覚症状、睡眠中の低酸素血症などから総合的に診断されている。

呼吸器は生命維持に必須の vital organ である。呼吸器疾患の罹患は生活の質（QOL : Quality of Life）の低下に直結するため、病態生理の把握、適切な診断と治療が必要である。これらの呼吸器疾患の中でも特に患者数が多い気管支喘息、既存薬によって病態が十分にコントロールされず、新しい薬剤開発ニーズが高い COPD、および急性肺傷害を本研究では取り扱う。それら疾患の現在理解されている病態背景と治療の現状を以下に項目に分けて説明する。

気管支喘息

喘息は、気道に炎症が起き、気流が制限される病気である。以前は主たる病態は気道平滑筋の過度の収縮反応と捉えられていたが、慢性的な気道の炎症が病態上重要であることがこの 20 年間で分かってきている⁴⁾。気道炎症が持続すると、気道構造の変化（リモデリング）を引き起こし、気道過敏性の亢進、非可逆性の気流制限が起こり、繰り返し起こる咳、喘鳴、呼吸困難で特徴付けられる喘息症状を発症する（Fig. 1）³⁾。

喘息症状の発症にいたる危険因子としては、臓器感受性のような病態を発症しやすい個体因子と、抗原、感染微生物、喫煙、ストレスのような環境因子があり、これらは患者個々で異なる。

抗原や感染微生物などの外部環境に応答し、自己と非自己を認識して排除し、生体の恒常性維持に寄与するのが免疫応答機構である。生体は体外から進入するウイルス、細菌、カビなどの外来抗原にさらされると防御反応を示すが、免疫応答は、この防御反応の要となっている。喘息の複雑な病態にも免疫機構が深く関わっている。

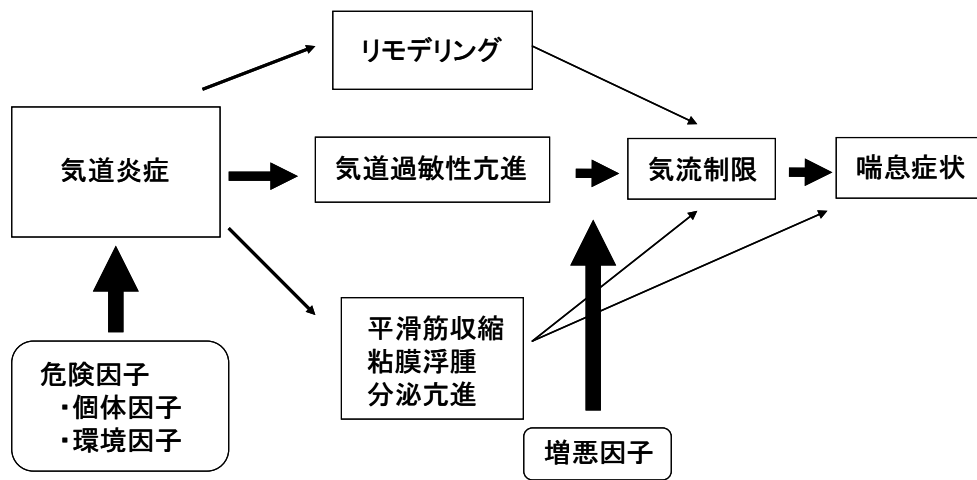


Fig. 1 Pathogenesis of bronchial asthma ³⁾

免疫応答は、自然免疫（Innate Immunity）と獲得免疫（Acquired Immunity）の二つの機構に大別される。自然免疫、獲得免疫に関わる免疫細胞は造血幹細胞からつくられる（Fig. 2）。造血幹細胞は胎児期には肝臓に、生後は骨髄にある。B 細胞や顆粒球に分類される好中球、好酸球、好塩基球は胎児期は肝臓で、生後は骨髄の造血幹細胞から作られている。一方、T 細胞だけは、骨髄の造血幹細胞から分化増殖した前駆細胞が胸腺に移行し、胎児期も生後も、胸腺で作られている。

自然免疫には、骨髄系幹細胞から分化した顆粒球やマクロファージ、樹状細胞といった細胞群が関与し、これらが細胞・ウイルス・異物などを食べて排除することで最前線で体を守る働きをする。この機構は抗原による前感作を必要とせず、生まれながらに生体に備わる防御機構である。

一方、獲得免疫には、リンパ球系幹細胞から分化したリンパ球である B 細胞、T 細胞、NK 細胞が関与する。B 細胞は抗体を作り、ヘルパーT 細胞は B 細胞に抗体産生を指令し、NK 細胞はウイルス感染した細胞や癌細胞を直接殺す働きを持つ。このようにリンパ球は、自然免疫では防ぎ切れないウイルス、細菌、癌細胞などから体を守る役割を果たしている。この機構は生体が生後に抗原と接触することにより後天的に獲得する免疫機構である。

獲得免疫は、進化の過程で脊椎動物（魚類、両生類、爬虫類、哺乳類）になって初めて現れる高度な免疫系であるが、これが何らかの原因によって破綻すると、自己免疫疾患やアレルギー疾患を発症する要因となる。

獲得免疫に関わるリンパ球のうち、形質細胞に分化して抗体産生に関わる B 細胞、B 細胞に抗体産生を指令するヘルパーT 細胞について特にその活性化と機能を詳述する。

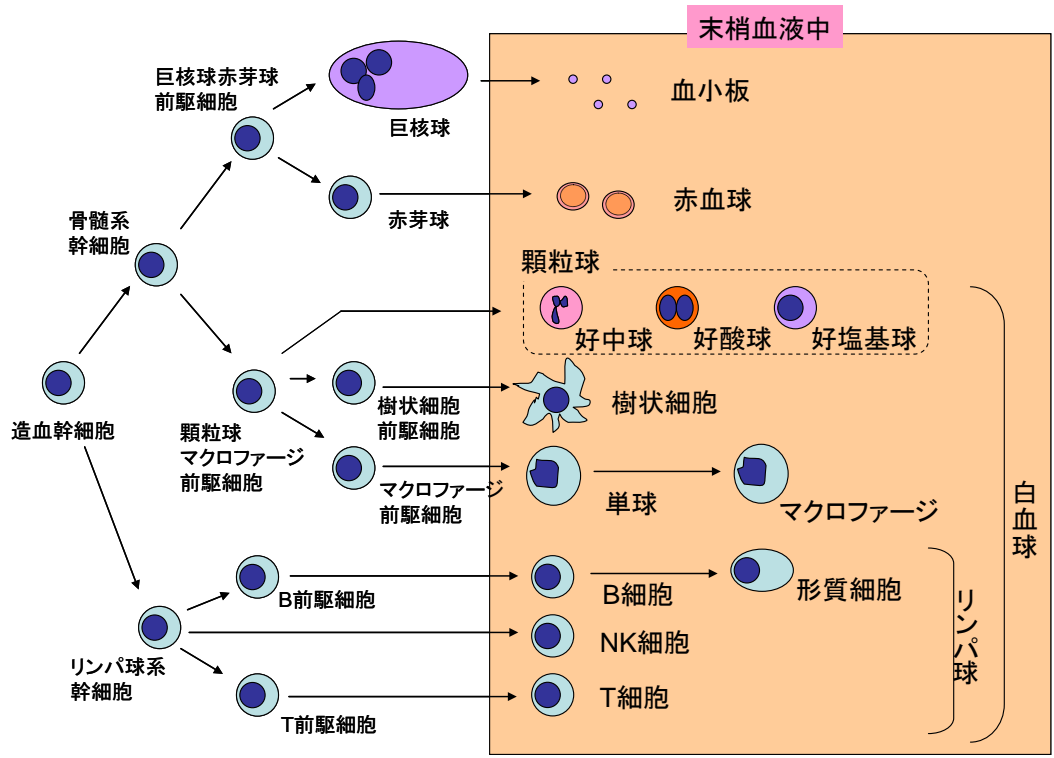


Fig. 2 Differentiation of hematopoietic stem cell

抗体は、B 細胞から産生される糖タンパクであり、細胞・ウイルス・異物などのタンパク質を抗原と認識して結合する性質を持つ。抗体は、抗原と結合することで、その複合体がマクロファージなどの食細胞に認識され、貪食されることで抗原を体内から除去することに寄与し、リンパ球などの免疫細胞が結合して免疫反応を引き起こすことで感染防御に働いている。

抗体は、免疫に関与していることから免疫グロブリン (Ig) と呼ばれ、長いポリペプチド鎖 (H 鎖) と短いポリペプチド鎖 (L 鎖) がそれぞれ 2 本ずつジスルフィド結合 (S-S 結合) によって繋がっている構造を持つ (Fig. 3)。パパイン酵素処理によって得られる N 末端側のフラグメントを Fab (Fragment antigen binding)、C 末端側のフラグメントを Fc (Fragment crystallizable) と呼ぶ。Fab の N 末端側から約半分 (約 110 塩基) は抗原に応じてアミノ酸配列が変わる部分で、可変領域と呼ばれる。可変領域以外のどの抗体でもアミノ酸配列が同じになる Fab、Fc 領域は定常領域と呼ばれる。

免疫グロブリンは H 鎖の定常領域が γ 鎖、 μ 鎖、 α 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖と構造の異なる 5 種類があり、H 鎖の違いによってそれぞれ IgG、IgM、IgA、IgD、IgE の 5 つのアイソタイプに分類される (Fig. 3)。

これらはそれぞれ大きさや生理活性が異なる。ヒト血中で最も多く存在し、ヒト免疫グロブリンの約 80% を占めるのが IgG である。存在比率で言えば、粘膜分泌型で新生児の初乳成分にも含まれる生体防御成分である IgA が約 10%、初感染により最初に産生される IgM が約 10% を占め、この 3 種でヒト免疫グロブリンの 99% 以上を占める。

IgD は B 細胞表面に存在し、抗体産生の誘導に関与する抗体であるが、ヒト免疫グロブリンに占める割合は 1% 以下である。IgE は 0.001% 以下とさらに少ないが、抗体産生後に IgE に対する受容体 FcR ϵ を細胞表面上に持つ肥満細胞や好塩基球に結合してアレルギー反応を引き起こし、気管支喘息発症機序に深く関わっている。

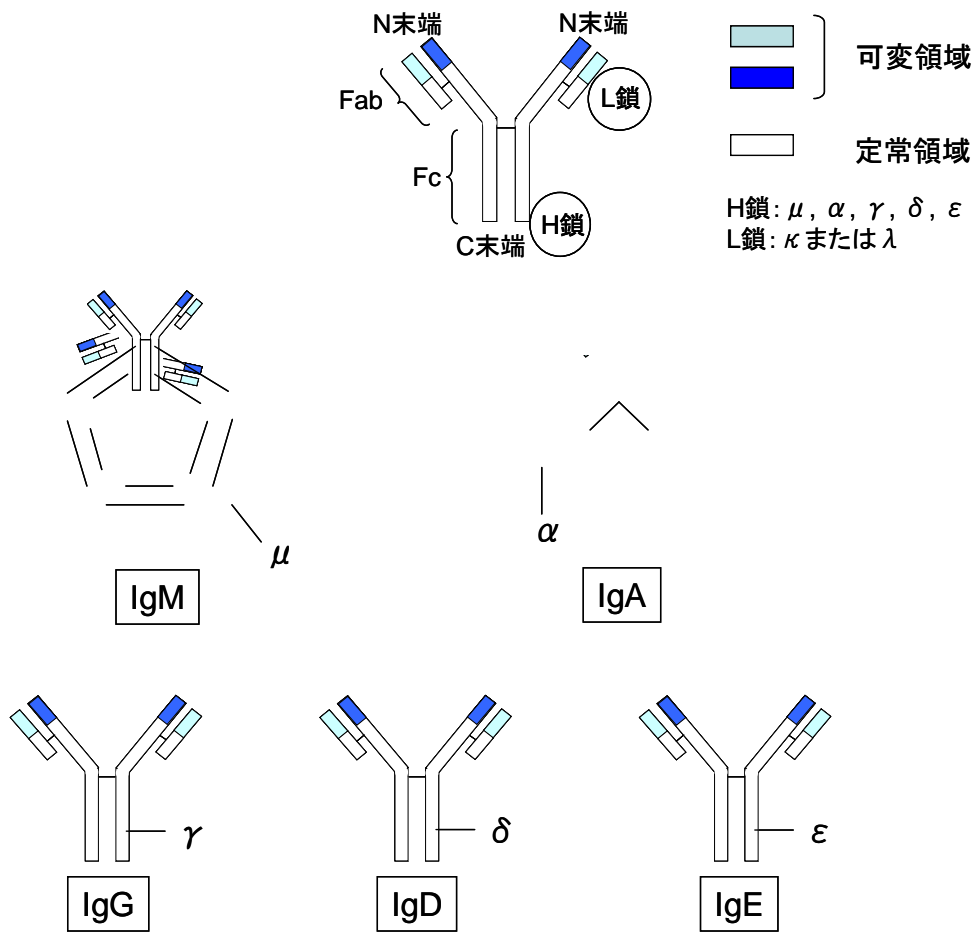


Fig. 3 Structure of antibody

B 細胞は抗体の種類を多様化させることでさまざまな病原を排除している。抗体は、先述のように抗原を認識する可変領域とその抗原を処理する定常領域から構成されているが、可変領域と定常領域でそれぞれ遺伝子改変を行い、遺伝子の多様性を増幅し、さまざまな抗体を産生する。抗原刺激後、可変領域でエクソンに点突然変異を導入する反応が somatic hypermutation (SHM) であり、抗体の親和性成熟に寄与している。一方、定常領域で起こる遺伝子改変は、クラススイッチと呼ばれ、抗体の可変部を変えずに H 鎖定常部の構造が変化する。

抗体産生機構に関与する B 細胞は、骨髄で産生された後、脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織に移動して成熟 B 細胞となり、二次リンパ組織内の濾胞と呼ばれる領域内で活発に増殖する。抗原に出会っていない成熟 B 細胞は、細胞表面に膜型 IgM と IgD を B 細胞抗原受容体 (B cell antigen receptor : BCR) として発現しているものが多いが、サイトカイン環境に応じて IgM の定常領域の構造を変化させることで、産生する抗体のクラススイッチがなされる。

B 細胞より成熟 B 細胞を経てクラススイッチを終えた細胞は形質細胞と呼ばれ、その細胞表面に発現している抗体分子と同じものを産生することができるが、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、TGF- β 、BAFF、CD40L などの作用で、クラススイッチを終えて分化した形質細胞は、IgG、IgE や IgA をそれぞれ産生することが可能となる。

アレルギー、気管支喘息発症に関わる IgE は、IL-4 によって IgE へのクラススイッチが促進される結果、産生が亢進する。一方、IgE へのクラススイッチは、IFN- γ 刺激によって抑制される。

リンパ球系幹細胞からは、B 細胞とともに獲得免疫を担う T 細胞が分化する。T 細胞は細胞表面に T 細胞抗原受容体 (T cell antigen receptor, TCR) と呼ばれる抗原受容体を持つ細胞集団として定義される。

胸腺でさまざまなサブタイプに分化した T 細胞は、血管を介して末梢に出て組織や脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織に分布する (Fig.2)。呼吸器に対する抗原曝露の場合、吸入された抗原が気道の抗原提示細胞 (主として樹状細胞) によって処理され、細胞表面にある主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) と呼ばれる糖タンパクと結合したペプチド断片として提示されると、T 細胞が TCR を介してそれを認識して活性化され、複数のサブタイプに分化する。ヘルパー T 細胞の多くは表面に CD4 を発現し、キラー T 細胞の多くは表面に CD8 を発現する。CD4 と CD8 はそれぞれ、クラス II MHC 分子とクラス I MHC 分子に対する結合性を持ち、CD4 陽性ヘルパー T 細胞と CD8 陽性キラー T 細胞はそれぞれクラス II MHC 分子とクラス I MHC 分子に提示された抗原ペプチドに反応性を示す。

生体は花粉などの外来抗原に対して防御反応を起こすが、その免疫応答と生体の恒常性維持に主要な役割を果たしている細胞がヘルパー T 細胞 (Th) である。抗原タンパク質との接触履歴を持たず、抗原提示を受けていないナイーブ T 細胞は、どのようなサイトカインの存在下で刺激を受けるかによって、大きく分けて Th1、Th2、Th17、制御性 T 細胞 (regulatory T cell : Treg) のどれかに分化する (Fig. 4)。

IL-12 の存在下では IFN- γ を産生する Th1 細胞に、IL-4 の存在下には IL-4、5、13 を産生する Th2 細胞へと分化する。また TGF- β の存在下では TGF- β 、IL-10などを産生する Treg に分化誘導される。TGF- β に加えて、IL-6、IL-23 の刺激が入ると、IL-17A、IL-17F、IL-22 を産生する Th17 細胞へ分化する (Fig.4)。アレルギー性炎症の発症には特に Th2 細胞が重要な役割を担う。Th2 細胞から産生される IL-4 や IL-13 をはじめとするサイトカインは Th2 サイトカインと呼ばれ、気管支喘息やアレルギー性炎症発症の要因の一つとなっている。

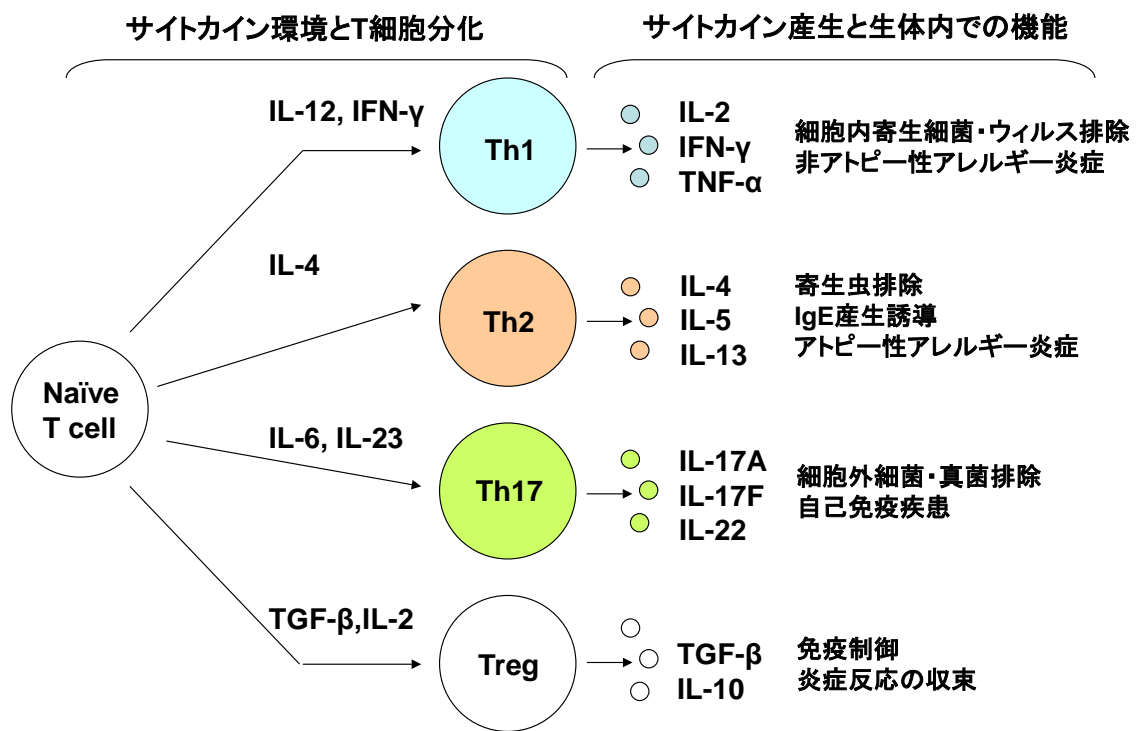


Fig. 4 T cell differentiation and subsequent immune response

気管支喘息は、家族歴や既往歴に気管支喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎、アトピー性皮膚炎がある場合や、皮膚テストや血中 IgE 測定などで抗原特異的 IgE を産生しやすい素因が確認される場合は、アトピー型喘息またはアレルギー性喘息と判断される。アトピー型喘息は、Th2・好酸球優位で、IL-4、IL-5 陽性細胞の浸潤を伴う炎症と血中 IgE の増加が特徴である。これに対し、抗原に対する特異的 IgE の増加を認めない喘息は非アトピー型に分類される⁵⁾。

喘息を悪化させる抗原には、ハウスダスト、ダニ、花粉、カビなどがあり、これらの抗原が吸入により体内に侵入すると抗原提示細胞によってナイーブ T 細胞に提示される。喘息は、その病態や重症度からいくつかの型に分類されるが、Th2・好酸球優位なアトピー型喘息の場合、ナイーブ T 細胞から IL-4 によって分化した Th2 細胞が炎症反応の基点となる (Fig. 5)。

まず Th2 細胞から産生される IL-4、13 が B 細胞に作用し、産生される抗体のクラスを IgE にスイッチさせる。産生された抗原に対する特異的 IgE 抗体は、IgE 受容体 FcεRI を細胞表面上に持つ肥満細胞や FcεRII を細胞表面上に持つ好酸球、マクロファージに結合し、抗原によって架橋される。この結果、これらの細胞が活性化され、ヒスタミン、ロイコトリエンといったケミカルメディエーターが産生され、平滑筋の収縮や血管透過性の亢進を引き起こす。活性化した肥満細胞は IL-4、IL-13 の分泌や CD40 リガンド (CD40L) の発現により B 細胞をさらに刺激し、IgE 定常領域をコードする Cε 遺伝子の転写を亢進させることにより IgE 産生を増幅させている。Th2 細胞や肥満細胞から産生された IL-5 は好酸球の分化や遊走を促進する。

これらの炎症細胞から産生されるサイトカインやケモカイン、細胞傷害性タンパク質、神経ペプチドは、平滑筋収縮や粘液産生亢進、血管透過性亢進といった急性の変化を引き起こす。さらに傷害を受けた気道上皮や気管支平滑筋などの組織構成細胞が、傷害に対する応答として、杯細胞の過形成、線維芽細胞増殖、平滑筋肥厚といったいわゆる気道リモデリングが引き起こされる (Fig. 5)。こうして正常とは異なる非可逆性の慢性変化が誘導され、難治化や重症化につながっていく。

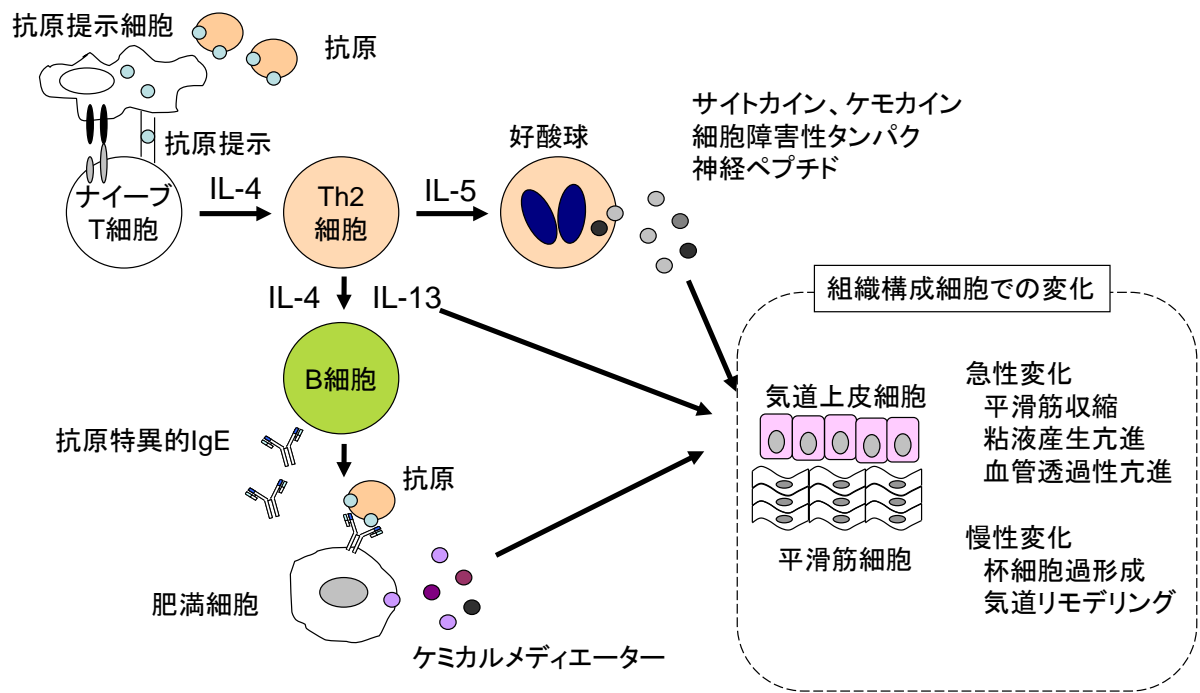


Fig. 5 Th2 cell differentiation and airway inflammation

喘息は、ステロイドの感受性の違いにより 2 つのフェノタイプに分類される⁶⁾。すなわち吸入ステロイドが有効な好酸球優位な軽症・中等症の患者層と、吸入ステロイドの効果が低い好中球優位な重症患者層である⁷⁾。

ステロイド抵抗性の要因は遺伝的な要素による場合もあれば、たばこ煙への曝露や感染のような環境複合要因による場合もあるが、組織破壊と気道のリモデリングが慢性に進行し、平滑筋の分化と肥厚が非可逆的に進むことが、ステロイド抵抗性発症の要因の 1 つと考えられる⁸⁾。

最も重症な慢性の難治性喘息では、高用量の吸入ステロイド薬、経口ステロイド、長時間作用性吸入 β 刺激薬投与にも関わらず、発作が頻発し、症状が持続する。このような難治性喘息患者は成人喘息患者の 5~10%を占めるとされ、医療費に占める割合も大きい⁹⁾。難治性喘息では、喘息症状が続き、重篤な発作や喘息死のリスクが増大し、患者の生活の質(QOL)に与える影響も大きい。また、全身性ステロイドの常用に由来する副作用リスクも多くなる。

このような状況で期待される創薬アプローチの 1 つが、IL-4、5、13 といった Th2 エフェクターサイトカインを制御する方法である¹⁰⁾。IL-4 が IgE 抗体のクラススイッチに、IL-5 が好酸球の分化増殖に重要な役割を果たしているのに対し、IL-13 は、粘液産生の亢進、気道過敏性の亢進や好酸球走化性因子であるエオタキシンの産生亢進作用を有する。

この中でも IL-13 は喘息発症機序やその難治化の機序においてより重要であると考えられている^{11, 12)}。

IL-13 は、分子質量 9-12 kDa のサイトカインであり、活性化 Th2 細胞、肥満細胞、NK 細胞、樹状細胞などから産生される。同じ Th2 サイトカインに分類される IL-4 とは、受容体とシグナル伝達経路を共有している。typeI IL-4 受容体が、IL-2 共通 γ 鎖と IL-4R α 鎖からなるヘテロダイマーであるのに対し、typeII IL-4 受容体/IL-13 受容体 は、IL-13 受容体 $\alpha 1$ 鎖と IL-4 受容体 α 鎖のヘテロダイマーである。IL-13 が結合しうる受容体は、typeII IL-4 受容体/IL-13 受容体以外に IL-13R $\alpha 2$ 鎖があるが、デコイ受容体として機能して、シグナル伝達には寄与していないと考えられている。

シグナル伝達に関わる 2 種の受容体発現分布は、IL-4 と IL-13 の機能の差を生じる。T 細胞や B 細胞には、IL-13 受容体 $\alpha 1$ 鎖がなく、typeI IL-4 受容体のみを発現するため、IgE のクラススイッチには IL-4 が関与する。

一方、気道上皮細胞や線維芽細胞と言った非血球系の組織構成細胞には IL-4 受容体

IL-13 受容体が発現しており、抗原に対する応答反応として起こる粘液過分泌、気道過敏性亢進のような変化では、IL-13 が主に関与する。Junttila らによれば、線維芽細胞において IL-4 受容体/IL-13 受容体を介するシグナル強度は、IL-13 の場合、濃度依存的に上昇するが、IL-4 の場合、低濃度でシグナルが平衡状態に達する¹³⁾。

このような生化学的な側面に加え、IL-13 を過剰発現させたマウスの解析により、IL-13 が喘息発症機序においてより重要であると考えられており^{14, 15)}、IL-13 のエフェクター機能を担う分子の探索が行われている。

喘息の治療指針は、病態理解の変遷に伴い、気道収縮の抑制から抗炎症主体へと変わってきている。「喘息予防・管理ガイドライン 2012」³⁾によれば、ステップ 2（軽症持続型：症状の出現頻度が週 1 回以上）の長期管理において、気道炎症を抑制する吸入ステロイド薬が唯一の第一選択薬となり、他剤と明確に区別されている。

日本における罹患率は 5～7%と推定され、年間約 2000 人が喘息で死亡しているが¹⁶⁾、これは先進国の中でも高い死亡率である。海外に比べて吸入ステロイド薬の普及が低い等の問題点が示唆されてきたが¹⁷⁾、ガイドラインに沿った治療により、これも改善傾向にある。また、近年では、長時間にわたり気管支拡張作用を有する β 2 刺激薬とステロイドを吸入デバイスで同時に服用する合剤が上市され、QOL 改善に大きく寄与している。このように、病態解明とエビデンスに基づいた治療ガイドラインの策定、これを可能にする医薬品の開発が進んだ結果、薬物治療による症状コントロールのレベルが上がってきたといえる。その結果、同ガイドラインでは、現在の喘息治療の目標として、健常人と変わらない日常生活をおくれることを掲げているが、その一方で課題として残されているのが、既存の作用機序の薬剤でコントロールできない難治性喘息である。現在、重症喘息患者が位置づけられる治療ステップ 4（重症持続型）では、高用量吸入ステロイド薬の連用に加え、テオフィリン徐放製剤、ロイコトリエン受容体拮抗薬、長時間作用性 β 2 刺激薬の併用が推奨されているが、これらによってもコントロール不良の場合は、抗 IgE 抗体もしくは経口ステロイド薬を追加する薬物療法の指針が示されている(Fig. 6)。

		治療ステップ1	治療ステップ2	治療ステップ3	治療ステップ4
長期管理薬	基本治療	吸入ステロイド薬 (低用量)	吸入ステロイド薬 (低～中用量)	吸入ステロイド薬 (中～高用量)	吸入ステロイド薬 (高用量)
		上記が併用できない場合 以下のいずれかを用いる LTRA テオフィリン徐放製剤 (症状が稀であれば必要なし)	上記で不十分な場合に 以下のいずれか一剤を併用 LABA(配合剤の使用可) LTRA テオフィリン徐放製剤	上記に下記のいずれか1 剤、あるいは複数併用 LABA(配合剤の使用可) LTRA テオフィリン徐放製剤	上記に下記の複数併用 LABA(配合剤の使用可) LTRA テオフィリン徐放製剤 上記のすべてでも管理不良の場 合は下記のいずれかあるいは両方 を追加 抗IgE抗体 ^{注2)} 経口ステロイド薬 ^{注3)}
	追加治療	LTRA以外の 抗アレルギー薬 ^{注1)}	LTRA以外の 抗アレルギー薬 ^{注1)}	LTRA以外の 抗アレルギー薬 ^{注1)}	LTRA以外の 抗アレルギー薬 ^{注1)}
発作治療 ^{注4)}		吸入SABA	吸入SABA	吸入SABA	吸入SABA

LTRA: ロイコトリエン受容体拮抗薬, LABA: 長時間作用性 β 2刺激薬, SABA: 短時間作用性 β 2刺激薬

注1) 抗アレルギー薬とは、メディエーター遊離抑制薬、ヒスタミンH1拮抗薬、トロンボキササンA2阻害薬、

Th2サイトカイン阻害薬を指す。

注2) 通年性吸入抗原に対して陽性かつ血清総IgE値が30～700IU/mLの場合に適用となる。

注3) 経口ステロイド薬は短期間の間欠的投与を原則とする。他の薬剤で治療内容を強化し、かつ短期間の間欠投与でもコントロールが得られない場合は、必要最小量を維持量とする。

注4) 軽度の発作までの対応を示す。

Fig. 6 Management approach based on control ³⁾

慢性閉塞性肺疾患

慢性閉塞性肺疾患（Chronic Obstructive Pulmonary Disease : COPD）は、たばこ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じた肺の炎症性疾患である。特徴的な症状としては、慢性的な咳や痰、徐々に生じる労作時の息切れなどがあげられる。気流閉塞は末梢気道病変と気腫性病変が様々な割合で複合的に作用することにより起こり、進行的であると定義されている¹⁸⁾。進行すると息苦しさのため日常生活に支障をきたすほか、生命をも脅かすこともあり、2004年に報告された日本の疫学調査では、日本では潜在患者数が推定500万人以上とされる疾患である¹⁹⁾。また、WHO（世界保健機構）の調査によれば2020年には世界の死亡原因の第三位と予想され、世界的な予防・管理への取り組みが急務とされる疾患である²⁰⁾。このような背景から2001年よりWHOとNHLBI（米国心肺血液研究所）の共同プロジェクト（Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease : GOLD）が、COPDの治療ガイドラインを発表している¹⁸⁾。GOLDガイドラインは2003年から毎年updateされ、和訳版も初版、2006年、2009年、2011年と改訂版が発行されている。

COPDは、気管支拡張薬吸入後に1秒量(FEV₁)が70%未満であれば他疾患を除外してCOPDと診断されるが1秒量の予測値（年齢、性別、体格が標準的な人のFEV₁値）に対する割合が病期を分類する指標として用いられている(Fig. 7)。

しかし、FEV₁%やFEV₁に代表される呼吸機能は、COPDの部分的な側面しか測れないとされ、特に初期症状では疾患進行予測が難しいとされる。COPDの病態は、構造的要素（気道のリモデリング、肺気腫、骨格筋消耗）と機能的要素（炎症、アポトーシス、老化）があり、こうした病態の複雑さも予防・管理が難しい背景となっている。このような背景からCOPDの重症度は、呼吸機能に加えて慢性の咳や痰の症状、呼吸困難の程度、運動能力低下の程度、呼吸困難の悪化など急激に症状が悪化する急性増悪の程度から判定されている。

病期分類		
病期		特徴
I期	軽度の気流閉塞	FEV ₁ /FVC < 70% FEV ₁ ≥ 80%予測値
II期	中等度の気流閉塞	FEV ₁ /FVC < 70% 50% ≤ FEV ₁ < 80%予測値
III期	高度の気流閉塞	FEV ₁ /FVC < 70% 50% ≤ FEV ₁ < 50%予測値
IV期	極めて高度の気流閉塞	FEV ₁ /FVC < 70% FEV ₁ < 30%予測値 あるいは FEV ₁ < 50%予測値 かつ呼吸不全合併

1秒量 (FEV₁): 最初の1秒間で吐き出せる息の量

努力肺活量 (FVC): 思い切り息を吸ってから強く吐き出したときの息の量

1秒率 (FEV₁ %): FEV₁ 値をFVC値で割った値

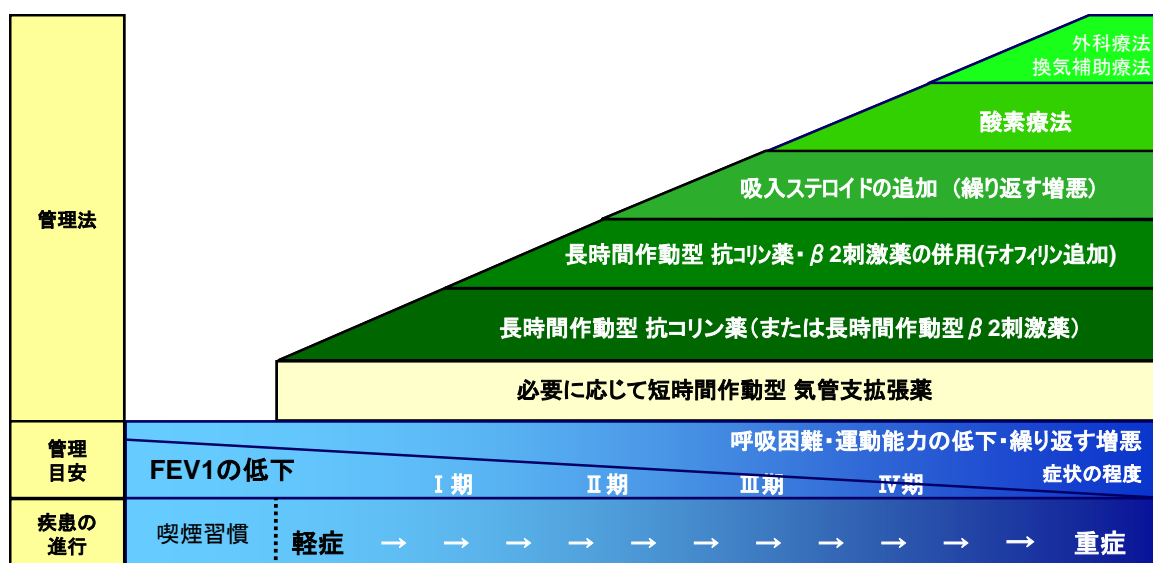
Fig. 7 Spirometric classification of COPD severity based on post-bronchodilator FEV₁²¹⁾

COPD の治療は、大きく急性増悪期と安定期の治療に大別される。COPD では、病状の進行とともに、ウイルス、細菌などによる気管支炎や肺炎を合併しやすくなり、咳、痰の増加や発熱、呼吸困難の悪化など急激に症状が悪化することがあり、急性増悪と呼ばれている。COPD の急性増悪期治療は、この増悪を予防・管理することに主眼が置かれる。中等度の増悪では、ウイルス、細菌の感染による症状を抑制する目的で、抗生物質や吸入ステロイドが処方されるが、呼吸不全が認められる場合や、重篤な増悪の場合は、入院が必要となる。近年の増悪に関する大規模試験²²⁾の結果からは、増悪を予測する最大の単一要因は、過去の増悪経験であり、COPD の病期とは無関係に全ての患者に共通することが分かっている。「頻繁に増悪を起こす患者」はサブグループとして、特別な増悪予防策を取る対象とすべきであり、それほど重症度の高くない患者でも将来的な増悪を減らすための予防策が必要であることが指摘されている。

安定期の薬物療法では、合併症を含む症状の軽減が主眼におかれる。長時間作用性吸入 β 2 刺激薬、長時間作用性吸入抗コリン薬、徐放性経口テオフィリン薬などの気管支拡張薬が、症状のコントロールに有用であり、COPD 薬物療法のベースとなる。一方、増悪を繰り返す患者には、吸入ステロイド薬が有効であり、増悪頻度を軽減することが示されている¹⁸⁾。COPD の薬物療法では、FEV₁ の低下だけではなく、症状の程度を加味し、重症度を総合的に判断した上で治療法を選択することが重要とされている(Fig. 8)。

現在のところいずれの薬物療法も、疾患の症状や合併症を緩和する目的で用いられている¹⁸⁾。COPD の特徴である呼吸機能の経年低下を抑制し、病態の根本治療を可能とする薬剤が求められている。

安定期COPDの薬物管理



- ・FEV1の低下だけでなく、症状の程度を加味し、重症度を総合的に判断したうえで治療法を選択する。
- ・増悪を繰り返す症例には、長時間作用性気管支拡張薬に加えて吸入用ステロイドや喀痰調整薬の追加を考慮する。

Fig. 8 Therapy at each stage of COPD²¹⁾

急性肺傷害

急性肺傷害 (Acute Lung Injury, ALI) は、臨床的に重症の患者に突然起こる呼吸不全の一種であり、特に発症前後の重篤な状態を急性呼吸急迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) と呼ぶ。1992年にまとめられた診断基準²³⁾では、先行する基礎疾患をもち、急性に発症した低酸素血症で、胸部 X 線写真上で両側性の肺浸潤影を認め、かつ心原性の肺水腫が否定できるものが ALI または ARDS に分類される。ALI と ARDS は、吸入気酸素濃度に対する動脈血中の酸素分圧の比である $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (PF ratio) で肺の酸素化度により判定される。 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ は 350 mmHg 以上が正常であるとされるが、300 mmHg 以下であれば、ALI、さらに 200 mmHg 以下であれば ARDS と定義される (Table 1)²⁴⁾。

米国では年間に 20 万人が罹患していると報告され²⁵⁾、死亡率は治療法の進歩にも関わらず、25~50%に及ぶ²⁶⁾。ALI/ARDS は直接的、間接的に肺を損傷する多数の疾患によって引き起こされ、要因、関連する遺伝子も多く複雑な疾患である。直接的な損傷で頻度が多いものは重症肺炎と胃内容物の誤嚥である。一方、間接的な損傷で頻度が多いものは敗血症であり、全体の約 40%を占め、ALI/ARDS の原因として最も頻度が高い。

病態生理学的には ALI/ARDS は肺胞隔壁 (血管内皮、肺胞上皮) の透過性亢進に基づく非心原性肺水腫であると考えられる²⁷⁾。透過性亢進は炎症細胞の活性化による肺血管内皮細胞の損傷とそれに続く炎症によって生じると考えられる。すなわち、好中球を中心とする炎症細胞から好中球エラスターゼや活性酸素などの組織障害性物質が放出され、血管内皮と肺胞上皮の細胞障害を伴う肺の炎症が進んだ結果、肺の微小血管及び肺胞上皮の透過性が亢進する。この結果、間質に浮腫が起こり、さらに進行すると肺胞内に水分が貯留する肺水腫となる。

発症機序はなお不明な点が多いが、近年では、サイトカイン、免疫系、転写制御、抗酸化などに関わる遺伝子多型が報告され²⁶⁾、発症要因との関連が示唆されている。

現在、薬物療法としては、炎症抑制と肺毛細血管透過性の改善を目的としてステロイドが、エラスターゼ阻害や IL-8 分泌抑制を目的として好中球エラスターゼ阻害薬が用いられるが、生存率の改善をエンドポイントとした無作為臨床試験によって有効であると判断された薬剤はないのが現状である。

Table 1 Diagnostic standard of ALI / ARDS²⁴⁾

ALI / ARDSの診断基準

	経過	酸素化	胸部X線写真所見	肺動脈楔入圧
ALI	急性	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300\text{mmHg}$ (PEEPの値によらず)	両側性の浸潤陰影	測定時には $\leq 18\text{mmHg}$ または理学的に左房圧 上昇の所見がない
ARDS	急性	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mmHg}$ (PEEPの値によらず)	両側性の浸潤陰影	測定時には $\leq 18\text{mmHg}$ または理学的に左房圧 上昇の所見がない

ここまで呼吸器疾患の中でも特に喘息、COPD、急性肺傷害について現在理解されている病態背景と治療の現状を述べてきた。しかし、実際にこれら疾患の治療薬を開発し、効果的な治療を行うには、患者毎の発症要因、症状の多様性の壁に直面する。この課題に対する解決策の一つがバイオマーカーである。

FDA(米国食品医薬品局)によれば、バイオマーカーとは「正常なプロセスや病的プロセス、あるいは治療に対する薬理学的な反応の指標として客観的に測定・評価される項目」と定義されている²⁸⁾。バイオマーカーは、治療薬の有効性や安全性を患者毎に判断し、投薬する個別化医療においては特に重要である。投薬前に遺伝子診断で薬効の有無を見極めることができれば、高薬価の新薬を効果の期待できない患者に投薬することもなく、無駄な投薬を避けることができ、医療費抑制にもつながる。

バイオマーカーで最も一般的なものは、疾患を未然に防ぐための日常的な予防指標として使われる血中バイオマーカーである。生活習慣病の指標となるコレステロール値や血糖値、アミノ酸代謝に関わる酵素で肝臓の状態を表す γ -GTP、GOT、GPT はいずれも血中バイオマーカーである。しかし、バイオマーカーの定義に沿えば、血中の生体由来のものに限らず、血圧や心電図、CT 画像、肺機能や、一塩基多型 (SNPs:Single Nucleotide Polymorphisms) のような核酸配列情報もバイオマーカーになりうる。

バイオマーカーは、臨床試験での新薬の有効性を確認するためのサロゲートマーカーとしても非常に重要である。喘息、COPD、急性肺傷害のような呼吸器疾患は、発症要因は単一ではなく、患者の症状も個々に異なり、多様な患者層によって構成されている。このためバイオマーカーによって、新薬の有効性を最も引き出せる患者層を抽出することができれば、効率的な治験を行うことができ、薬剤開発費の抑制や創薬効率を高めることにつながると思われる。

医療につながる基礎研究成果を臨床に実用化させる橋渡し研究 (トランスレーショナルリサーチ) においてもバイオマーカーは重要な役割を果たす。非臨床の創薬研究でよく用いられるマウス、ラットなどのげっ歯類とヒトとの間に種差がないバイオマーカーであれば、培養細胞でのスクリーニングから、モデル動物などによる *in vivo* 試験、大規模な臨床試験と一貫した指標で、薬効・副作用を精度よく見積もることができる。新薬開発の初期段階においては、ターゲット分子のバリデーションにも有用である。

近年、遺伝子解析が進歩し、診断法やバイオマーカー解析手法が高感度化することで、

新たなバイオマーカーが次々と発見されている。バイオマーカー特定は、病態の理解を深め、疾患の治療薬開発のチャンスを広げることにつながるため、医薬・診断分野ではいかに有効なバイオマーカーを発見するかに新薬開発の成否がかかっている。

これまで述べてきた喘息、COPD、急性肺傷害の呼吸器疾患は、いずれも既存の薬剤によって十分な治療満足度が得られていない患者層があり、有効な新規バイオマーカー発見のニーズは高い。

喘息発症機序や重症化において IL-13 が重要な役割を果たしていることは、先に述べたとおりであるが、IL-13 のエフェクター機能を担う分子として 2004 年に報告されたのが、キチナーゼ AMCcase (acidic mammalian chitinase) である²⁹⁾。AMCcase の中和抗体や、阻害物質アロサミジンによってマウス喘息モデルにおける気道過敏性の抑制効果が示されたことによって、創薬標的としての関心も高まった。さらに 2007 年に重症喘息患者の血清中バイオマーカーとしてキチナーゼ様分子 (CLP) YKL-40 が報告され³⁰⁾、2008 年には YKL-40 遺伝子多型と喘息の呼吸機能低下との関連が報告されたことで³¹⁾、トランスレーショナルリサーチの視点でも関心が高まった。

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミンが β -1,4 結合で重合した糖鎖であり、哺乳類は生産しない。自然界では植物細胞の細胞壁や繊維の主成分であるセルロースについて、2 番目に多い多糖である。キチンは、カニやエビの甲殻、菌類の細胞壁³²⁾、線虫のマイクロフィラリア鞘³³⁾、昆虫の外皮や消化管³⁴⁾の重要な構成成分であり、様々な生物によって生産される。キチンの存在は、これらの生物において生合成と分解のバランスによって調節されている。

キチナーゼは自然界に豊富に存在するこのキチンを分解する酵素であり、様々な生物によって生産される。キチンを分解するという共通の活性に基づいて、多様な役割を果たしており、基礎研究また応用面において大変多くの可能性を秘めた酵素である。

キチナーゼは、糖質分解酵素のファミリー分類で、立体構造や触媒反応機構に基づいて大きくファミリー18 とファミリー19 に分類される³⁵⁾。ファミリー18 キチナーゼは、主に細菌、真菌、植物、昆虫、哺乳類、ウイルスなど様々な生物が産生する。X線結晶構造^{36, 37)}から8本のアルファヘリックスと8本のベータストランドから構成される共通のTIMパレル構造を持つことが明らかにされており、キチナーゼ阻害薬であるアロサミジンとの複合体構造の解析³⁸⁾からは、オキサゾリン中間体を經由した加水分解機構で基質となるキチンを分解することが示唆されている。一方ファミリー19 キチナーゼは、主に植物が産生するが、放線菌^{39, 40)}などの細菌も産生することが分かっている。通常は活性ドメインのみ、あるいはキチン吸着ドメインと活性ドメインで構成され、アルファヘリックスに富む構造を持つ。ファミリー18 キチナーゼが1つの酸性アミノ酸残基で触媒反応を進行させるのに対して、ファミリー19 キチナーゼは二つの酸性アミノ酸残基によって触媒反応を進行させる (Fig. 10)。

近年までキチナーゼは哺乳類には存在しないと考えられてきたが、2001年にファミリー18 キチナーゼに分類されるキチナーゼがヒトやげっ歯類で存在することが報告されている⁴¹⁾。哺乳類、げっ歯類には、酵素活性を持つ2種のキチナーゼが存在する。chitotriosidase と acidic mammalian chitinase (AMCase) である (Fig. 9)。

キチン分解活性を持つキチナーゼに対し、酵素活性を持たないキチナーゼ様タンパク質 (chitinase-like protein : CLP) も報告されている。ヒトでは oviductin、YKL-39、YKL-40 が、マウスでは YM-1、YM-2、oviductin、BRP-39 が CLP に分類される。これらは、いずれも微生物由来のキチナーゼと少なからず相同性を持っているが、分子進化の過程で酵素

活性を担う領域の酸性アミノ酸残基に変異が生じたためにキチン分解活性を失ったと考えられている (Fig. 10) ^{42, 43}。

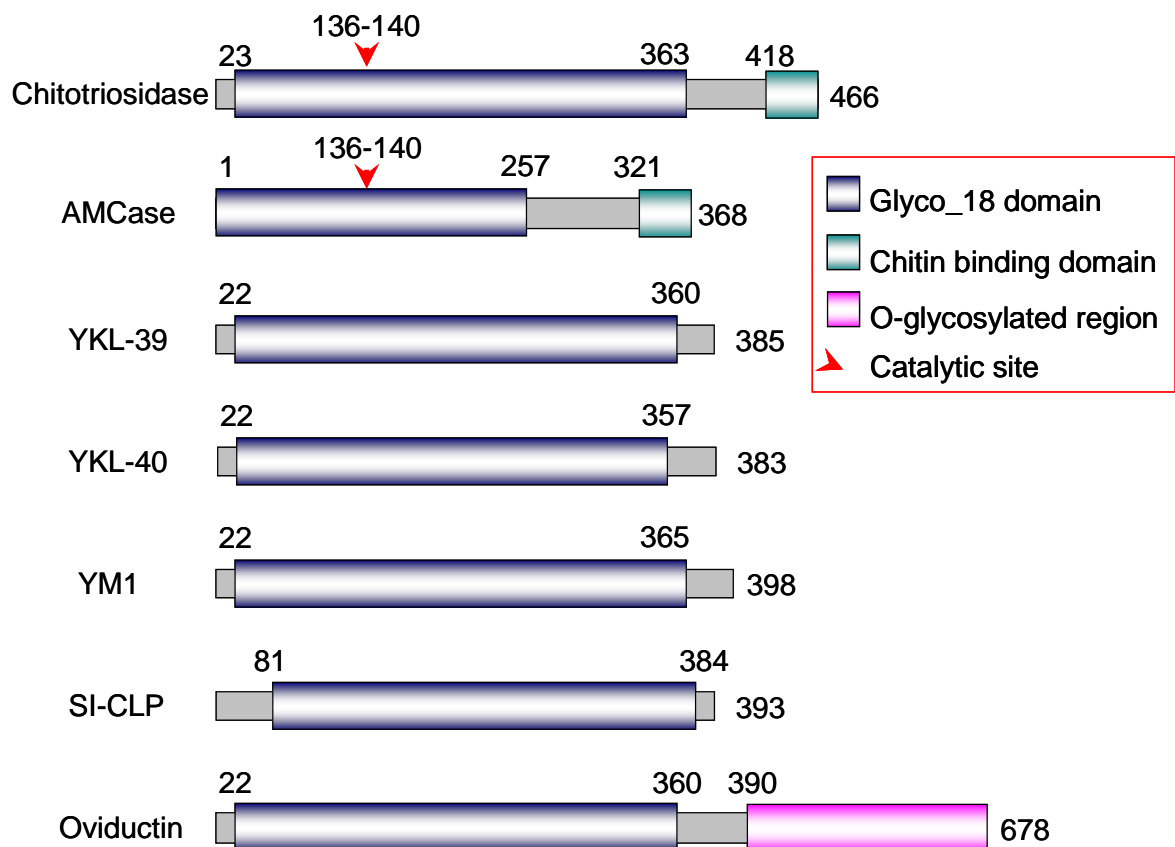


Fig. 9 Schematic representation of domain organisation of mammalian Glyco_18 domain-containing protein. 文献 44)より改変

	F D G I	<u>D I D W E</u>	Y P		Glyco_18 prototype catalytic domain
1-131	F D G L	<u>D L D W E</u>	Y P	-466	Chitotriosidase
1-131	F D G L	<u>D F D W E</u>	Y P	-368	AMCase
1-131	F D G L	D V S W I	Y P	-385	YKL-39
1-131	F D G L	D L A W L	Y P	-383	YKL-40
1-131	F D G L	N L D W Q	Y P	-398	YM1
1-186	F D G F	V V E V W N	Q	-398	SI-CLP
1-132	F D G L	D L F F L	Y P	-678	Oviductin

Fig. 10 Critical aminoacid in catalytic sites. 文献 44)より改変

The characteristic FDG sequence preceding catalytic motif is shown in shadowed box. Acidic aminoacids are shown in red bold. Complete active catalytic motifs are underlined.

ここまでキチナーゼの構造と分類について現在までに明らかにされている背景を述べてきたが、これらキチナーゼの生体における役割について説明する。

古くから研究されている微生物起源のキチナーゼは、キチンを分解して、資化するために主として生産されると考えられている。それらは、昆虫の皮膚、真菌の細胞壁、エビの殻など自然界で大量に生産されるキチンを分解し、その成分を他の生物が利用できるように変換することによって、キチンをリサイクリングする上での主要な役割を果たしている。他にも、真菌類では形態形成にキチナーゼが不可欠であり、カビの菌糸の先端成長、分岐形成、老化した菌糸の自己溶解、酵母における娘細胞と母細胞との分離などにキチナーゼが働いていることが知られている。また、昆虫や寄生虫においても脱皮時等にキチナーゼが必須であることが知られている。

キチナーゼの基質となるキチンは哺乳類の体内には存在しないため、哺乳類におけるキチナーゼは、キチンを外骨格に持つような生物に対する生体防御の役割を果たしている可能性が示唆されてきた^{45, 46)}。生体内においてキチナーゼや CLP の発現量が高い臓器は、外来抗原に対する曝露機会が最も多い肺と胃である。これら臓器ではマクロファージや上皮細胞が定常的にキチナーゼや CLP を発現しており、外来抗原に対する最初の生体防御機構を担っていると考えられる^{47, 48)}。

キチナーゼや CLP の中には、炎症やアレルギー反応で発現が誘導されるものがある^{29, 49, 50)}。近年の研究では、種々の炎症性疾患における重要なエフェクター分子であることが報告されている。例えば、AMCase は、IL-13 依存的に発現し、炎症反応を増幅させることがわかっている²⁹⁾。放線菌由来のキチナーゼを用いた研究では、キチナーゼは気道上皮細胞における protease-activated receptor 2 を活性化することで、気道炎症を引き起こすことが分かっている^{29, 51)}。

AMCase のヒト遺伝子多型が小児喘息感受性と関連していること⁵²⁾や、キチナーゼ様分子 (CLP) YKL-40 の遺伝子多型と喘息の呼吸機能低下との関連が報告されていること³¹⁾を考え合わせると、哺乳類において、アレルギー免疫反応の基点となり、反応を増幅させる機能を持つ可能性がある。

BRP-39 は、マウスの肺癌細胞で見出された CLP である⁵³⁾。類縁のもので分子名が異なる分子として、ヒトの HcGP-39⁵⁴⁾、YKL-40、ブタの porcine 38-kDa heparin-binding glycoprotein (GP-38K)⁵⁵⁾、ウシの 39 kDa ホエイタンパク と *Drosophila* imaginal disc growth factors⁵⁶⁾がある。BRP-39 と YKL-40 は、それぞれマウスとヒトの 1 番、2 番染色体にコードされており、キチナーゼ活性を持たない 39 kDa のタンパク質として産生される。

BRP-39 や YKL-40 様の分子の持つ生理作用として、これまでに組織のリモデリング病態に関わるものがある。ウシ 39-kDa ホエイタンパクは、授乳が終わった後の乳腺退縮の時期に胸部で発現が増えることが知られており、乳腺の組織再構成（リモデリング）に関わると考えられている⁵⁶⁾。ショウジョウバエでは、BRP-39 や YKL-40 様の分子は、成長因子として機能している⁵⁷⁾。ブタでは、GP-38K は、血管平滑筋細胞の分化を誘導する⁵⁵⁾。YKL-40 は、軟骨細胞や滑膜細胞によって産生され、細胞分化と生存を制御している⁵⁴⁾。ヒト皮膚や肺の線維芽細胞、滑膜細胞に分裂を促す作用がある⁵⁸⁾。YKL-40 様の分子は、病態発症においても重要な役割を果たしている可能性がある。循環血液中の YKL-40 分子の産生量は、転移性の肺癌⁵⁹⁾、心筋梗塞⁶⁰⁾、II 型糖尿病⁶¹⁾、サルコイドーシス⁶²⁾、肝線維化^{63, 64)}、重症の細菌性髄膜炎⁶⁵⁾や肺炎⁶⁶⁾などで上がることが知られている。また、HcGP-39/YKL-40 レベルは、リウマチや変形性関節炎で高く、症状と相関することが知られている^{67, 68)}。

先述のように 2007 年には、重症喘息患者の血清中、肺組織中のバイオマーカーとして YKL-40 が報告され³⁰⁾、2008 年には YKL-40 遺伝子多型と喘息の呼吸機能低下との関連が報告されている^{31, 69)}。さらに YKL-40 をコードする CHI3L1 遺伝子が小児におけるアトピー素因と関連があることが報告されている⁷⁰⁾。

本研究の目的

以上、気管支喘息、COPD、急性肺傷害について、またキチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質について述べてきた。呼吸器疾患でもとりわけ、難治性喘息、COPD、急性肺傷害の発症機序は未だ不明な点が多く、現在も呼吸機能を改善させ、患者の QOL 改善に結びつく有効な治療薬やバイオマーカーがない。

本研究では、未だ生理的機能が明らかにされていない CLP である BRP-39 と YKL-40 に着目し、呼吸器疾患の発症機序におけるこれらの分子の役割を明らかにすることにより、全く新しい機序の呼吸器疾患治療薬の創出の可能性を見出すことを目的として研究を行った。本研究は 3 章から構成されており、第 1 章では BRP-39 の遺伝子欠損マウス (BRP-39KO マウス) を用いて、アレルギー性炎症反応を惹起時の表現型を野生型マウスと比較解析した。喘息の主症状であるアレルギー性炎症の中でも、特に Th2 依存性に免疫系が活性化される機構に着目し、BRP-39 の役割、発現誘導機構、発現組織、抗アポトーシス作用、マクロファージ活性化機能について調べた。

第 2 章では、COPD 発症の主要なリスク要因であるたばこ煙を BRP-39 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに長期間曝露することにより肺気腫を誘導し、表現型を比較解析した。主に肺組織の病理の比較から BRP-39 の肺気腫発症における役割、発現誘導機構を明らかにした。また、ヒト組織を用いた解析で、喫煙者における肺組織中、血清中の YKL-40 量の解析を行い、マウスの実験結果のヒト病態への外挿性について検討した。

第 3 章ではマウスに高濃度酸素を曝露することにより急性肺傷害モデルを作製し、BRP-39 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの表現型を比較解析した。高濃度酸素曝露のような外部環境の変化に対し、気道上皮細胞の BRP-39 が肺を保護し、恒常性維持に寄与する機構を明らかにした。さらに気管支肺異形成症患者由来の気管支吸引液中の YKL-40 量の解析を行い、マウスの実験結果のヒト病態への外挿性について検討した。

第1章 気管支喘息における BRP-39 の役割

本章では、気管支喘息における BRP-39 の役割を調べる目的で、卵白アルブミン (ovalbumin : OVA) やダニ (house dust mite : HDM) を抗原としマウス喘息モデルを用いてアレルギー性炎症に関する解析を行った。

1-1 では、まずキチナーゼ様タンパク質 BRP-39 がどのような環境により発現誘導されるかを検討し、同モデルにおける肺組織や気管支肺胞洗浄液 (broncho alveolar lavage fluid : BALF) 中の BRP-39 の発現量の変化をウェスタンブロットおよび免疫組織化学的方法によって解析した。

次に BRP-39 の生理的作用を明らかにする目的で、BRP-39 欠損マウスを作製し、Th2 炎症反応惹起時の表現型を野生型マウスと比較解析した。獲得免疫機構における役割を評価する目的で、Th2 抗原刺激による脾細胞分化と抗原特異的 IgE 産生の変化を調べた。

1-2 では、アレルギー性炎症における Th2 分化以降の機能に対する BRP-39 の作用解析を進めた。まず、細胞のストレス応答シグナルに着目し、アポトーシスに対する作用について検討を行った。BRP-39 遺伝子欠損マウスの肺組織中、BALF 中の炎症細胞について、免疫組織化学的手法を用いて、アポトーシスを起こした細胞数、細胞種を調べ、野生型マウスと比較した。

野生型マウスと比較して BRP-39 遺伝子欠損マウスではアポトーシスを起こす細胞が有意に増加していたことから、この作用が肺特異的かどうかを調べる目的で、野生型マウスおよび BRP-39 遺伝子欠損マウス由来の T 細胞、マクロファージを用い、in vitro でリコンビナント BRP-39 添加後のアポトーシス反応への影響を評価した。

さらにマクロファージ活性化に対する BRP-39 の影響も調べた。野生型マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスから腹腔マクロファージ、肺胞マクロファージを調製し、BRP-39 存在下に誘導されるマクロファージについて解析を行った。以下にそれらの実験と結果の詳細を記す。

1-1 Th2 炎症反応における BRP-39 の機能

1-1-1 Th2 炎症反応における BRP-39 の発現誘導

本実験では、OVA 抗原とその抗原性を増強する補助剤（アジュバント）であるアラムゲルを混合した溶液をマウスの腹腔内に投与して免疫した後に、OVA 抗原をマウスに吸入曝露して Th2 炎症反応を誘導した喘息モデルマウスを用いた。また、比較対照として OVA の代わりに PBS を吸入曝露したコントロールマウスを用いた。両マウスの肺における BRP-39 の発現を比較した結果、肺組織中の BRP-39 の mRNA 量 (Fig. 11A)、タンパク質量 (Fig. 11C) が、OVA 喘息モデルマウスにおいて、有意に高いことが分かった。また、気管支肺胞洗浄液 (Broncho alveolar lavage fluid : BALF) 中の BRP-39 タンパク質の発現 (Fig. 11B) も肺組織同様に OVA 喘息モデルマウスで高いことが分かった。

次に、免疫組織化学的手法により肺組織中の BRP-39 の発現細胞を調べた。BRP-39 特異的な抗体を用いた免疫染色により、発現細胞の一つが気道上皮細胞であることが確認された (Fig. 11D, 黒矢印)。さらに、マクロファージ様の細胞も BRP-39 陽性であったため (Fig. 11D, 白矢印)、マクロファージを認識する F4/80 抗体と BRP-39 抗体の 2 重染色を行ない、肺胞マクロファージが BRP-39 を発現することを確認した (Fig. 11E, 白矢印)。

同様の BRP-39 の発現誘導は、ダニ抗原 (house dust mite : HDM) による免疫と抗原曝露を行ったマウス肺でも確認された (Fig. 11F)。このことから BRP-39 の発現は、OVA や、表皮にキチンを含むダニのような粗抗原で誘導する Th2 炎症反応によっても増加することが分かった。

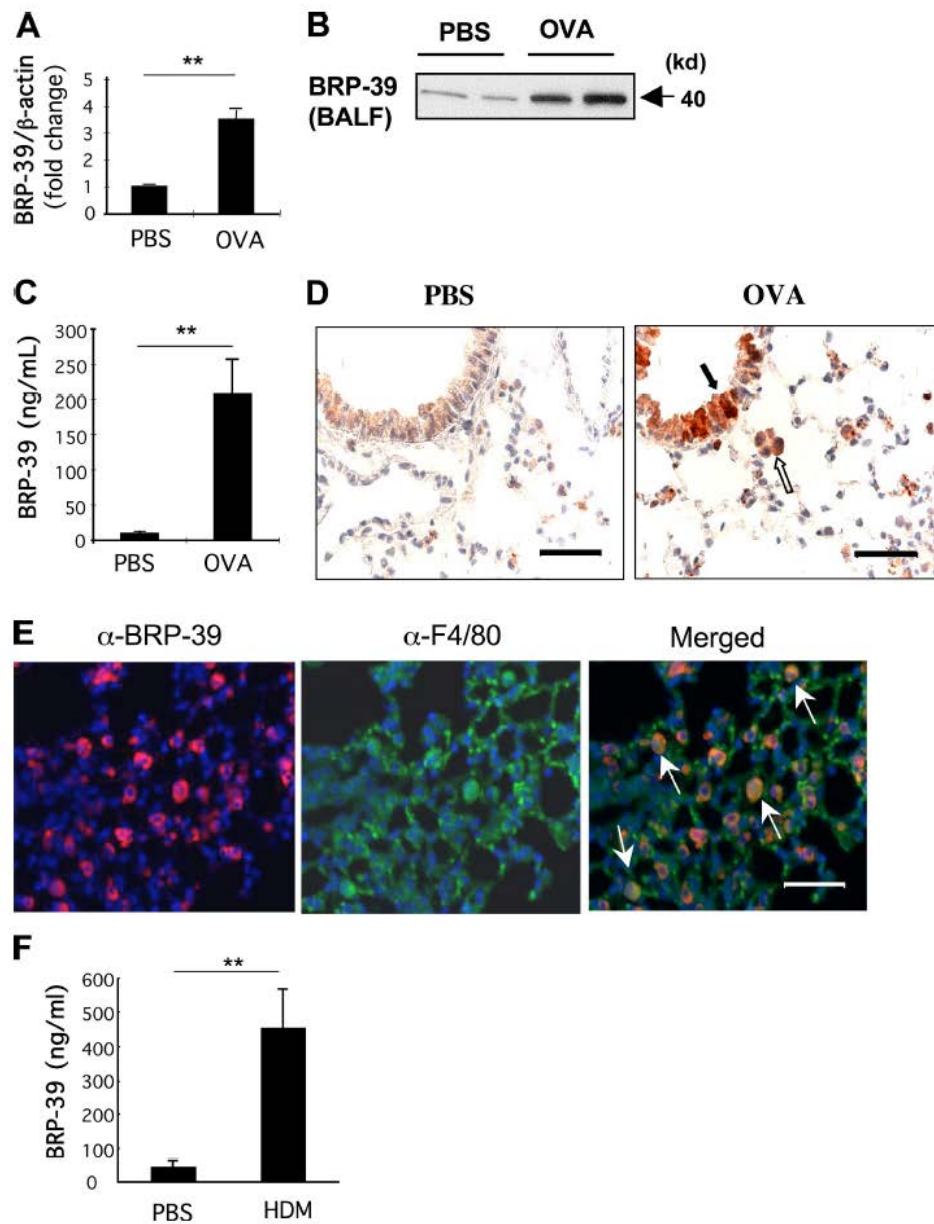


Fig. 11 Regulation of BRP-39 during antigen-induced Th2 inflammation.

(A–F) WT BALB/c mice were sensitized with OVA plus alum and challenged with PBS or OVA (A–E) or sensitized with HDM antigen plus alum and challenged with PBS or HDM (F). (A) The levels of BRP-39 mRNA were evaluated by real time RT-PCR. (B and C) BRP-39 accumulation was assessed via Western analysis (B) and ELISA (C) using lung lysate and BAL fluid, respectively. (D) Immunohistochemistry (IHC) was also used to localize the BRP-39 (solid arrow, airway epithelial cell; open arrow, alveolar macrophage). (E) Double-label IHC using BRP-39 and F4/80 antibodies, localized

BRP-39, and F4/80-positive macrophages (white arrows, double+ cells). (F) The levels of BRP-39 in BAL fluids from PBS- or HDM-challenged mice, assessed by ELISA. Values in A, C, and F are the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals and are representative of two separate evaluations. B, D, and E are illustrative of a minimum of three separate experiments. **, $P < 0.01$. Bars, 25 μm .

1-1-2 OVA 誘発 Th2 炎症反応における BRP-39 の役割

アラムゲルと OVA 抗原の混合液を野生型マウスに腹腔内投与して免疫し、OVA を吸入曝露することで、Th2 炎症反応を起こす OVA 喘息モデルマウスを作製した。この OVA 喘息モデルマウスの BALF では、総細胞数 (Tot)、好酸球 (Eos)、リンパ球 (Lym)、好中球 (Neu) 数の有意な増加 (Fig. 12A) と肺組織の炎症 (Fig. 13) が確認された。また、同マウスの BALF では細胞表面に CD4 抗原を発現する CD4 陽性ヘルパー T 細胞の中でも IL-4 陽性細胞や IL-13 陽性細胞数の有意な増加が確認され (Fig. 12B)、Th2 炎症反応が確認された。また、IL-4、IL-13 によって活性化を受ける代替活性化マクロファージ (alternative macrophage, M2 マクロファージ) の総マクロファージに占める割合を、M2 マクロファージマーカーであるマクロファージマンノース受容体 (macrophage mannose receptor : MMR) 陽性細胞数の割合として産出したところ、OVA 喘息モデルマウスでの有意な増加が確認された (Fig. 12C)。また、気管支収縮物質であるメサコリン濃度を順次上げながら呼吸機能への影響を評価した。気道抵抗 (resistance) と単位圧当たりの肺の縮みやすさの指標であるエラストランス (elastance) がいずれも OVA 喘息モデルマウスでは PBS 吸入曝露群と比べて高く (Fig. 12D)、気道過敏性の亢進が確認された。また、気管支肺胞洗浄液中の粘液タンパクである Muc5ac の発現亢進 (Fig. 12E) が確認された。同様の反応は、抗原としてダニ抗原を用いて Th2 炎症反応を誘導した喘息モデルでも確認された (Fig. 12F)。

OVA やダニ抗原によって誘導される Th2 炎症反応は、いずれも BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、有意に抑制され (Fig. 12A-F, BRP-39 ^{-/-})、肺組織の病理観察結果でも炎症像の抑制が確認された (Fig. 13) ことから Th2 炎症反応の一部は BRP-39 依存的であることが示された。

結核死菌を含む油であるフロイント完全アジュバント (complete Freund's adjuvant : CFA) を補助剤として用いて、OVA と混和してマウスに免疫すると、Th1 炎症反応が誘導され、BALF 中の細胞浸潤数が増加する (Fig. 12G)。この BALF 中総細胞数 (Fig. 12G) や CFA と OVA で誘導された Th1 炎症反応に特徴的な IFN- γ 産生は BRP-39 遺伝子欠損マウスでも影響がなかったことから (Fig. 12H)、BRP-39 の作用の一部は Th2 特異的な反応であることが示された。

アラムゲルと OVA 抗原の混合液を野生型マウスに腹腔内投与して免疫し、OVA を吸入曝露すると、BALF 中に Th2 サイトカイン IL-4、IL-13 の濃度の有意な上昇が認められた (Fig. 12 I)。しかし、BRP-39 欠損マウスでは、これらサイトカインの有意な減少が確認された (Fig. 12 I)。

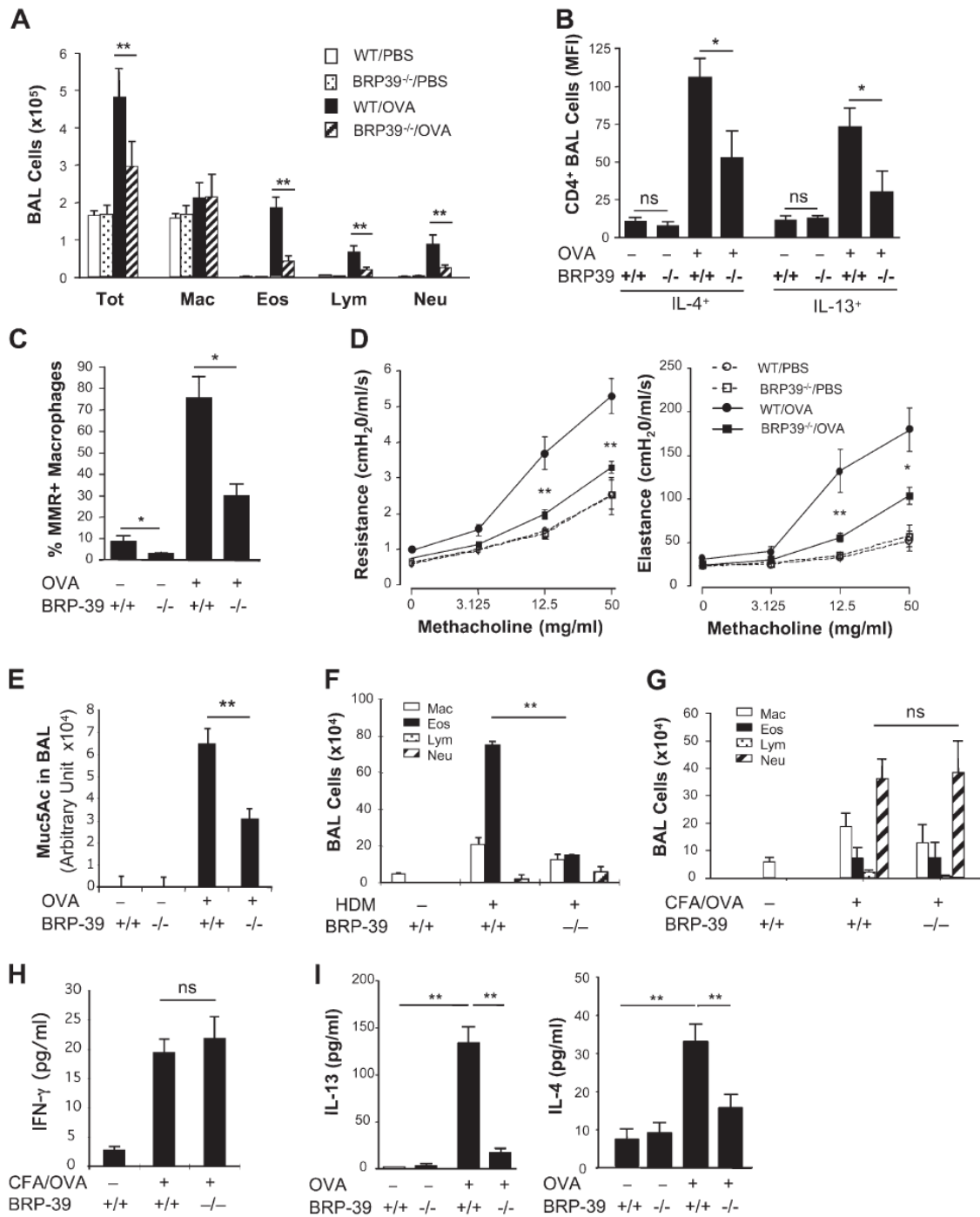


Fig. 12 Antigen-induced responses in BRP-39 (-/-) mice.

(A-C) BALB/c WT (+/+) and BRP-39 (-/-) mice were sensitized and challenged with OVA (OVA+) or PBS (OVA-). Twenty four hour later, BAL total (Tot) cell, macrophage (Mac), eosinophil (Eos), lymphocyte (Lym), and neutrophil (Neu) recovery were quantitated (A), IL-4- and IL-13-expressing Th2 cells were assessed (B), and MMR expressing alterna-

tively activated macrophages were quantitated (C). (D) AHR was addressed by comparing the airways resistance and elastance of OVA-sensitized and -challenged WT mice (solid circles and solid lines) and BRP-39(-/-) mice (solid squares and solid lines), WT mice sensitized with OVA and challenged with PBS (circles and dashed lines), and BRP-39(-/-) mice sensitized with OVA and challenged with PBS (squares and dashed lines). (E) Levels of Muc5ac in the BAL were quantitated by densitometry after slot blotting and immunodetection. (F) WT (+/+) and BRP-39(-/-) mice were also sensitized and challenged by HDM extract, and BAL cells were evaluated 1 d after the last challenge. (G and H) In evaluations of Th1 responses, WT (+/+) and BRP-39(-/-) mice were sensitized with CFA/OVA (CFA/OVA+) or PBS (CFA/OVA-) and challenged by OVA. Twenty four hour after the last challenge, BAL cell recovery (G) and BAL IFN- γ levels (H) were evaluated. (I) ELISA evaluations were also used to quantitate the levels of BAL IL-13 and IL-4 in OVA-induced Th2 responses. The values are the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals and are representative of at least three independent experiments. MFI, median fluorescence intensity; ns, not significant. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

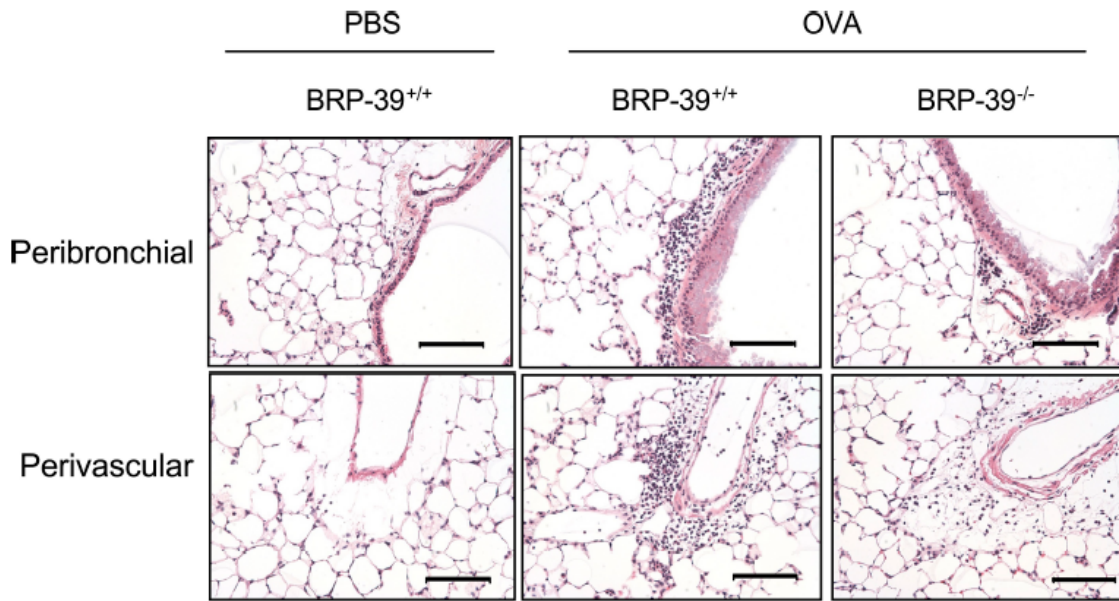


Fig. 13 Role of BRP-39 in OVA-induced tissue inflammation.

Eight-week-old WT (BRP-39^{+/+}) and BRP-39^{-/-} mice were sensitized with OVA plus alum and challenged by the OVA or PBS as described in Materials and methods. One day after the last challenge, the mice were sacrificed and H&E-stained tissue sections were obtained. Each panel is representative of a minimum of five mice from at least five separate experiments. Bars, 50 μ m.

1-1-3 IL-13 誘発炎症反応における BRP-39 の役割

次に Th2 炎症反応が起こっている局所での主要なサイトカインである IL-13 に着目し、IL-13 が BRP-39 の発現を制御しているかどうか、BRP-39 が IL-13 によって誘発される炎症にどのような役割を果たしているかを IL-13 を肺組織特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウス (IL-13TG マウス) を用いて調べた。また、気管支周囲の線維化に特徴付けられる気道リモデリングにおける BRP-39 の役割を調べた。

IL-13TG マウスの肺では野生型のマウスと比べて BRP-39 の mRNA (Fig. 14A) が有意に増加し、BALF 中の BRP-39 タンパク質 (Fig. 14B) も有意に高発現していた。この BRP-39 の発現上昇は肺組織を BRP-39 特異的抗体で免疫染色した結果、気道上皮細胞 (Fig. 14C 黒矢印) と肺胞マクロファージ (Fig. 14C, 白矢印) に認められた。さらに免疫組織化学的方法で肺胞 II 型上皮細胞のマーカである pro-surfactant protein C (pro-SPC)、気道上皮細胞のマーカである clara cell 10 kDa protein (CC-10)、白血球マーカである CD45 を用いて、BRP-39 抗体と 2 重染色することで、発現細胞の同定を行った。この結果、BRP-39 陽性細胞の多くが CC10 陽性の気道上皮細胞と pro-SPC 陽性の肺胞 II 型上皮細胞であり、CD45 陽性リンパ球の中では、形態からマクロファージであることが確認された (Fig. 14D)。

次に肺で IL-13 を過剰発現させたマウスで、BRP-39 発現が正常であるマウス (IL-13TG / BRP-39 +/+) と BRP-39 が欠損しているマウス (IL-13TG / BRP-39 -/-) の肺組織を比較した。既報のとおり^{71, 72)}、IL-13 の過剰発現により、CD4 陽性ヘルパー T 細胞の中でも IL-4 陽性、IL-13 陽性の Th2 細胞の BALF 中への浸潤 (Fig. 14E, IL-13TG +, BRP39 +/+) や肺組織中への炎症細胞の浸潤 (Fig. 14F, 黒矢印) が確認された。また、気管支周囲の線維化が確認された (Fig. 14F, 白矢印)。肺組織標本で確認された線維化は、右肺のコラーゲン量増加 (Fig. 14G) や活性化 TGF- β 1 の増加によっても確認された (Fig. 14H)。

BAL 中や肺組織の炎症、CD4 陽性 Th2 細胞の集積といった気管支喘息に特徴的な Th2 炎症反応も、肺組織の線維化・コラーゲン量、活性化 TGF- β 1 量といった気道リモデリングの指標はいずれも BRP-39 遺伝子欠損により有意に減少した (Fig. 14E-G, IL-13TG +, BRP39 -/-)。IL-13 による気道線維化の原因の一つとし

て、TGF- β 1 の誘導と活性化が関わるという既報どおり⁷³⁾、IL-13TG / BRP-39^{-/-}マウスでは、BAL 中の TGF- β 1 レベルが有意に減少していた(Fig. 14H)。BALF 中の IL-13 濃度に両マウスの間で差がなかった(IL-13TG / BRP-39^{+/+} 3.2 ± 0.089 ng / mL vs. IL-13 TG / BRP-39^{-/-} 3.3 ± 0.074 ng / mL) ことも考え合わせると、BRP-39 は、IL-13 により発現が誘導され、炎症と気道リモデリングを引き起こす IL-13 の病態生理に必要な分子であることが明らかになった。

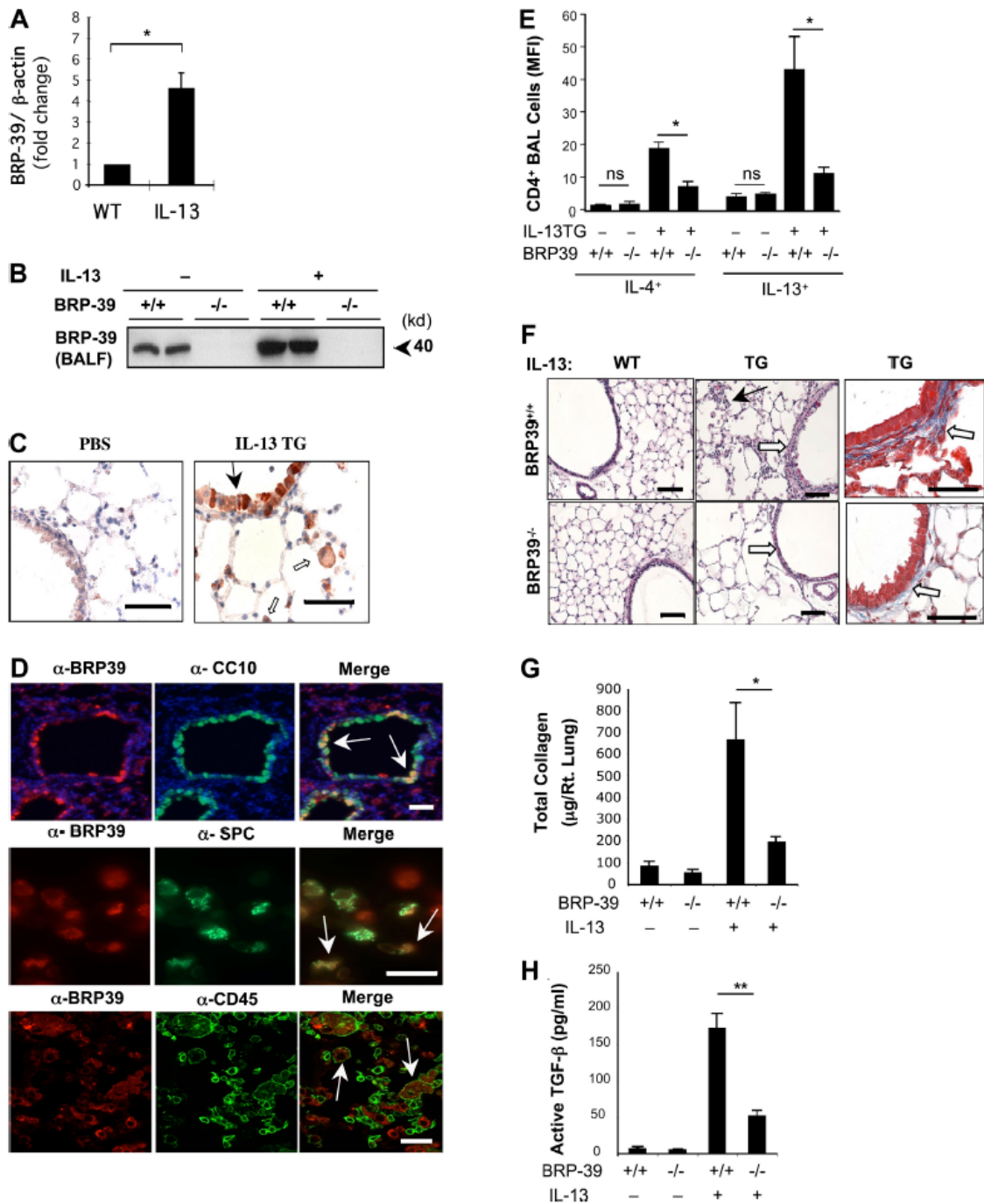


Fig. 14 Regulation and roles of BRP-39 in IL-13-induced tissue responses.

(A and B) Real-time RT-PCR and Western analysis were used to evaluate the levels of mRNA encoding BRP-39 (A) and BALF BRP-39 protein (B) in lungs from C57BL/6 WT (+/+) and IL-13 Tg mice. (C) The localization of the BRP-39 was evaluated with IHC. Solid arrow, airway epithelium; open arrow, macrophage. (D) Further cellular localization was obtained via double label IHC using BRP-39 and cell-specific antibodies (CC10,

airway epithelial cells; pro-SPC, alveolar type II cells; CD45, leukocytes). Arrows, positive for antibodies. (E and F) Using WT and IL-13 Tg mice with WT (+/+) and null (-/-) BRP-39 loci, FACS was used to assess BAL CD4⁺ Th2 cells (E) and histological evaluations were used to evaluate inflammation and airway remodeling (F; left and center are H&E stains [open arrows, peribronchial fibrosis; solid arrow, inflammation] and right are Mallory's trichrome stains [open arrows, subepithelial fibrosis]). (G and H) Total collagen content of the right lung and the levels of BAL total TGF- β 1 were quantitated by Sircol collagen assay (G) and ELISA (H), respectively. The values in A, E, G, and H are the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of four animals and are representative of three separate evaluations. B, C, D, and F are illustrative of a minimum of three separate experiments. MFI, median fluorescence intensity. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Bars, 25 μ m.

1-1-4 抗原感作と IgE 産生における BRP-39 の役割

Th2 炎症反応が BRP-39 の遺伝子欠損により抑制されるメカニズムをさらに調べる目的で、OVA 抗原特異的 IgE 抗体産生における BRP-39 の役割を調べた。まず野生型マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスに対し、アラムゲルと OVA 抗原の混合液を腹腔内投与して免疫し、OVA を吸入曝露し、Th2 炎症反応を誘導した。抗体産生細胞は脾臓に多く含まれるため、これらのマウスより脾細胞を調製し、OVA 抗原刺激による脾細胞分化、OVA 抗原特異的 IgE 産生について調べた。

脾細胞分化は、DNA 合成期の細胞にブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridin : BrdU) を取り込ませて免疫蛍光染色を行い、全細胞数に対する BrdU 陽性細胞数の割合を調べることで評価した。また、OVA 抗原特異的 IgE は ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) により評価した。

その結果、野生型マウスでは、OVA 抗原刺激による脾細胞分化 (Fig. 15A, OVA+, BRP-39 +/+) と抗原特異的 IgE 産生 (Fig. 15B, OVA+, BRP-39 +/+) が起こるのに対し、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは有意にこれら脾細胞分化 (Fig. 15A, OVA+, BRP-39 -/-) と抗原特異的 IgE 産生が抑制された (Fig. 15B, OVA+, BRP-39 -/-)。このことから、BRP-39 は、抗体産生細胞の分化と抗原特異的 IgE 産生に必要な分子であることが示された。

次に抗原提示と T 細胞活性化過程における BRP-39 の役割を明らかにするため、強力な抗原提示細胞である樹状細胞を野生型マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスの肺から調製し、細胞表面発現分子を比較した。樹状細胞には、骨髄系樹状細胞 (myeloid dendritic cell : mDC) とリンパ球系樹上細胞 (plasmacytoid dendritic cell : pDC) の細胞集団があり、どちらも表面に発現する MHC classII 分子を介して抗原由来のペプチド断片をのせて、T 細胞受容体 (TCR) を発現する T 細胞に抗原を提示し、T 細胞を活性化させ、分化させる機能を持つ。

この実験では、OVA チャレンジを行った野生型マウスでは肺中の mDC の数 (Fig. 15C) と pDC の数 (Fig. 15D) は有意に増加していた。

抗原提示細胞による抗原の提示と、T 細胞の活性化には、抗原提示細胞表面上の CD40 分子と、副刺激分子である CD80 / CD86 分子の発現が必要である。まず、抗原提示細胞は、細胞外から取り込んだタンパク質を分解処理し、その結果生じ

たペプチド断片を MHC classII 分子の上に提示する。

一方、まだ一度も活性化を受けていないナイーブ T 細胞は、T 細胞受容体 (TCR) を介して抗原提示細胞と強く結合する。強く結合した T 細胞は、細胞表面に CD40L 分子を発現し、抗原提示細胞上の CD40 分子との結合を介して、抗原提示細胞にシグナルを伝える。シグナルの入った抗原提示細胞は、CD80/CD86 分子を発現し、T 細胞上の CD28 分子に結合する。このように TCR を介するシグナルと、CD28 を介する副刺激とを同時に受けると T 細胞が初めて活性化され、さらにエフェクター細胞へと分化していく。

この実験では、樹状細胞上の CD40 分子と、副刺激分子である CD80、CD86 分子の発現を調べた。OVA を吸入曝露したマウスでは、PBS を曝露したコントロールマウスと比べて、mDC 上の CD40、CD80、CD86 分子の発現量が高かった (Fig. 15E, OVA+, BRP-39 +/+)

mDC と pDC の集積と CD86 と CD40 の発現は、OVA 吸入曝露を行った BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、OVA 吸入曝露を行った野生型マウスと比べて有意に減少していた (Fig. 15, C-E, OVA+, BRP-39 -/-)。一方で、BRP-39 の有無は mDC 上の CD80 発現量には影響を与えなかった (Fig. 15E, OVA+, BRP-39 -/-)。

以上のデータから BRP-39 は、肺における樹状細胞の活性化と集積を促し、抗原提示と T 細胞活性化を促す可能性のある分子であることが明らかとなった。

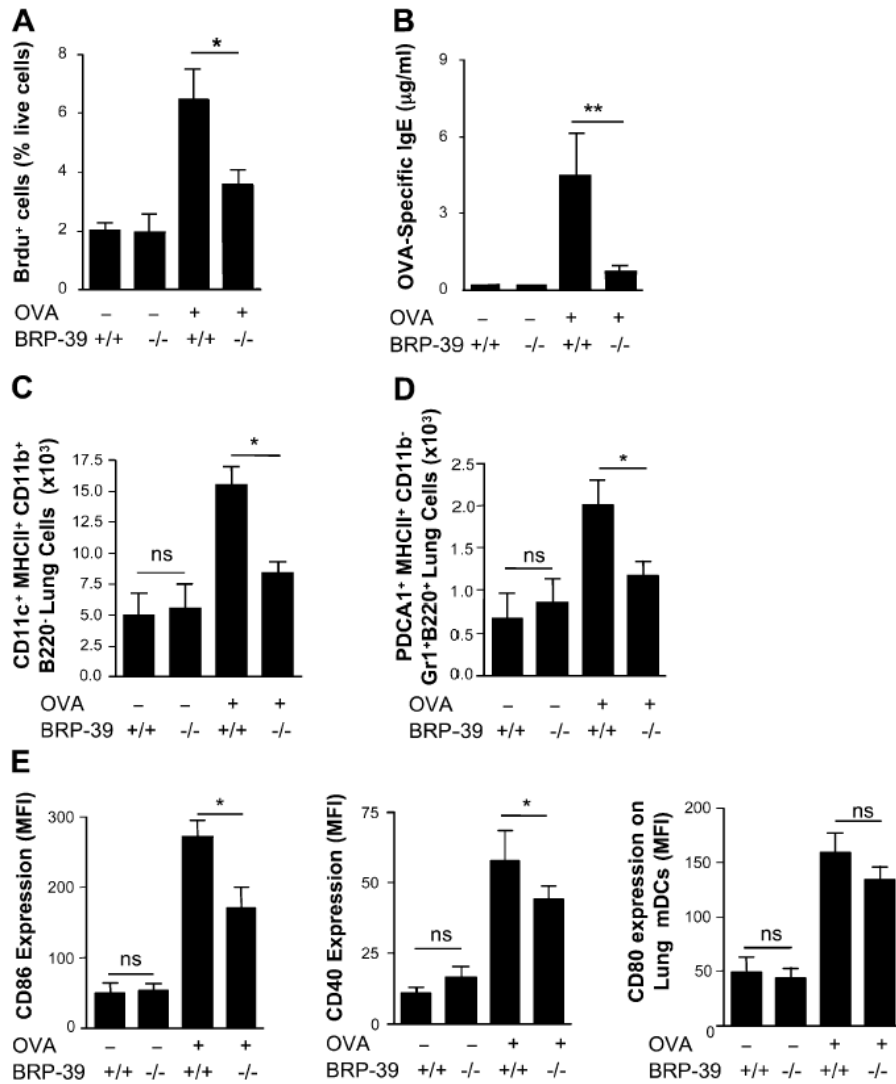


Fig. 15 BRP-39 regulation of antigen sensitization.

Splenocytes were isolated from the BALB/c WT and BRP-39 (-/-) mice that were sensitized and challenged by PBS (OVA-) or OVA (OVA+). (A and B) After restimulation with OVA, splenocyte proliferation was assessed by BrdU staining (A), and OVA-specific IgE levels (B) were evaluated by ELISA. (C-E) FACS was used to assess mDC (C) and pDC (D) numbers and mDC expression of CD86, CD40, and CD80 (E) in lungs from WT and BRP-39 (-/-) mice that were or were not sensitized and challenged with OVA. The values are the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals and are representative of three separate experiments. MFI, median fluorescence intensity; ns, not significant. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

1-2 抗アポトーシス作用

1-2-1 BRP-39 の in vivo 炎症細胞のアポトーシスに対する役割

Th2 エフェクター反応における BRP-39 の役割を調べるために、アラムゲルと OVA 抗原の混合液を腹腔内投与して免疫し、OVA を吸入曝露し、Th2 炎症反応を誘導した。この実験では、野生型マウス、BRP-39 遺伝子欠損マウスについて炎症細胞のアポトーシスに対する寄与を調べた。

アポトーシスを起こした細胞では、アポトーシス過程の早期に、細胞内膜のホスファチジルセリン (phosphatidylserine : PS) やホスファチジルエタノールアミンが細胞表面に移行し露出する。この実験では、標識したアネキシン V がカルシウム存在下にホスファチジルセリンと結合する性質を利用してフローサイトメトリーでアポトーシスを確認した。また、肺組織標本は、アポトーシスに伴って切断された DNA の末端をラベルする TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法で染色して、アポトーシス細胞を検出した。

その結果、OVA を吸入曝露した BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、OVA を吸入した野生型マウスと比べて肺組織中の TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた (Fig. 16A)。また CD4 陽性細胞、マクロファージおよび好酸球のアネキシン V 染色陽性細胞数の割合が増加していることが分かった (Fig. 16B)。肺組織中の細胞には、アポトーシスを反映するアネキシン V のみの発現増加を示す細胞と、アポトーシス後期とネクローシスを反映する PI (propidium iodide) 染色レベル増加を示す細胞が含まれることが分かった (Fig. 16C)。

アポトーシスは、Fas、TNF- α 受容体、DR3 分子などの細胞死受容体がそれぞれのリガンドで活性化されることで誘導される。この細胞死に関する実験では、OVA を吸入曝露した後の BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比べてマクロファージ、T 細胞、好酸球の細胞表面上の Fas (CD95) の発現レベルが上がっていることが確認された (Fig. 16D)。

次に IL-13 を過剰発現させたマウスで、BRP-39 発現が正常であるマウス (IL-13TG / BRP-39 +/+) と BRP-39 が欠損しているマウス (IL-13TG / BRP-39 -/-) の肺組織の炎症細胞を比較した。この結果、BRP-39 を欠損した IL-13TG マウスでは、OVA-アラムゲルによる Th2 炎症反応誘導時の試験結果と符合して、TUNEL

陽性細胞数の増加、CD4 陽性細胞、マクロファージのアネキシン V 陽性細胞数の割合の増加、活性化 caspase3 の発現増加が確認された (Fig. 16E and F)。

これらの結果から、BRP-39 は、好酸球、T細胞、マクロファージの細胞死受容体が関与するアポトーシス、細胞死に対して抑制的な役割を果たす分子であることが分かった。

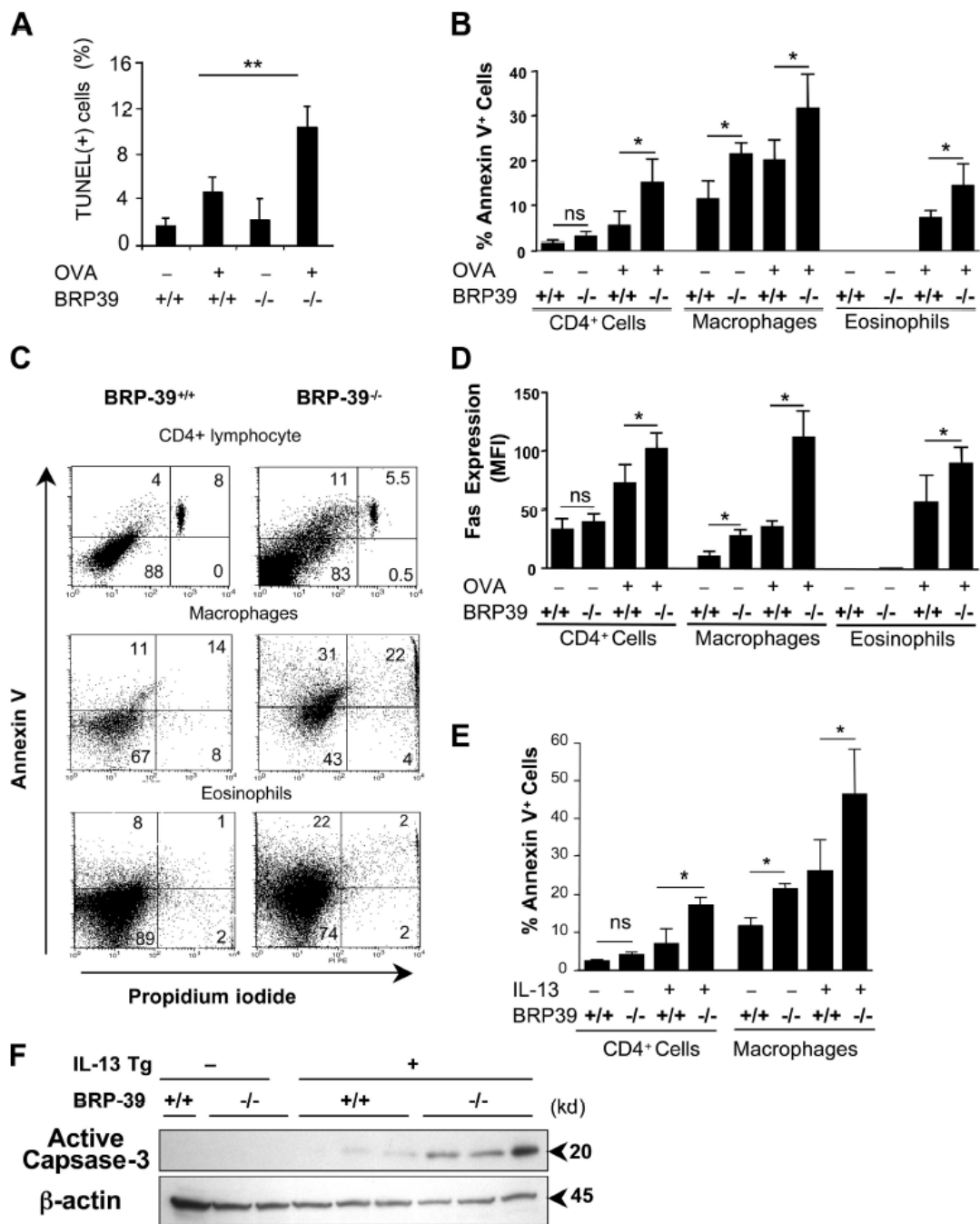


Fig. 16 Roles of BRP-39 in inflammatory cell apoptosis / cell death in vivo.

BALB/c WT (+/+) and BRP-39 (-/-) mice were sensitized and challenged with OVA (OVA+) or PBS (OVA-). (A-C) Apoptosis was evaluated using TUNEL stains (A) and FACS evaluations to evaluate the expression of annexin V (B), and annexin V and the uptake of PI (C). (D) The expression of Fas was also evaluated by flow cytometry.

(E and F) In the C57BL/6 WT and IL-13 Tg mice with WT and null BRP-39 loci, annexin V+ CD4 T cells and macrophages (E) and active caspase 3 expression (F) were evaluated by FACS and Western blot analysis, respectively. The values in A, B, D, and E are the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals and are representative of at least three separate evaluations. C and F are representative of five and two experiments, respectively. MFI, median fluorescence intensity. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

1-2-2 BRP-39 の in vitro 炎症細胞のアポトーシスに対する役割

次に BRP-39 が直接 in vitro で炎症細胞のアポトーシスを抑制するかどうか、またこれまでに得られた結果が肺特異的であるかどうかの検討を行った。この実験では、野生型マウスおよび BRP-39 遺伝子欠損マウス由来の T 細胞、マクロファージを用い、in vitro でリコンビナント BRP-39 添加後のアポトーシス反応への影響を評価した。

まず野生型マウスの脾臓より T 細胞を精製し、Fas リガンドまたは、TNF- α 存在下に培養を行った。アポトーシスは、細胞死にカスパーゼの活性化が関与している。この Fas リガンドや TNF- α 存在下で培養した野生型マウス由来の T 細胞は、無処置群と比較して、活性化 caspase 3、Fas 発現量が増え、アポトーシスが亢進していることが示唆された (Fig. 17A)。このアポトーシス反応は、リコンビナント BRP-39 の存在下では、有意に低下していた (Fig. 17A)。

BRP-39 遺伝子欠損マウス由来の腹腔内浸潤マクロファージ、肺胞マクロファージでも、明らかなアネキシン V 染色レベル、Fas 発現レベル、活性化 caspase-3 発現レベルの増加が認められた (Fig. 17B)。この BRP-39 欠損マウスにおけるアポトーシス反応の亢進は、リコンビナント BRP-39 の添加により用量依存的に抑制された (Fig. 17B)。

アポトーシスを抑制する酵素としてセリン・スレオニンキナーゼである PKB/AKT が知られており、caspase-9 などの基質をリン酸化することでアポトーシス作用を抑制している^{74, 75)}。BRP-39 の添加による抗アポトーシス作用の発現は PKB/AKT のリン酸化レベルの亢進 (Fig. 17A and B) を伴うものであった。

1-2-3 BRP-39 の代替活性化マクロファージに対する役割

Th2 炎症反応や、IL-13 により誘発される代替活性化マクロファージの増加が、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは抑制されることから、BRP-39 が直接的に代替活性化マクロファージ活性化作用を有するか、またこの反応が肺特異的であるかを検証することとした。野生型マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスから腹腔マクロファージ、肺胞マクロファージを調製し、リコンビナント BRP-39 または、溶媒を添加培養した。その結果、BRP-39 添加群は、arginase1 活性、マクロファージマンノースレセプター (MMR) 発現、MHC classII の発現を有意に亢進した(Fig. 17C)。この代替活性化マクロファージの活性化作用の程度は、リコンビナント IL-4 と同様の程度であることが分かった(Fig. 17C)。

一連の実験から BRP-39 は、直接的に代替活性化マクロファージの活性化を誘導し、その作用は肺特異的でないことが示された。

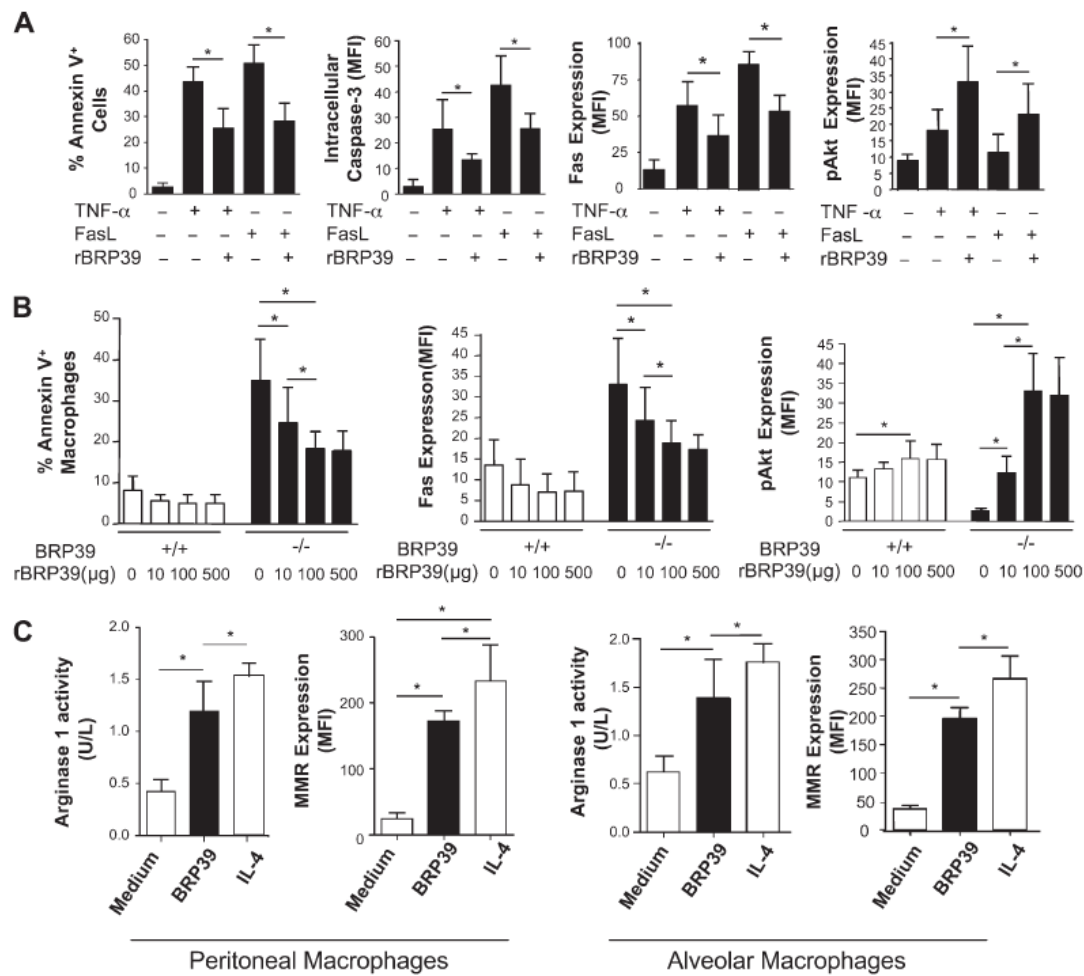


Fig. 17 Roles of BRP-39 in splenocyte and macrophage apoptosis/cell death and macrophage activation in vitro.

(A) Splenocytes from C57BL/6 WT mice were incubated in the presence or absence of 100 ng/ml TNF- α or 100 ng/ml FasL in the presence or absence of 10 μ g/ml rBRP-39. The levels of annexin V staining, intracellular activated caspase 3, Fas expression, and AKT phosphorylation were evaluated. (B) Peritoneal macrophages were elicited from WT (+/+) and BRP-39 -/- mice and incubated in the presence or absence of the noted doses of rBRP-39. Annexin V staining, Fas expression, and the levels of phosphorylated AKT were evaluated. * $P < 0.05$. (C) Peritoneal and alveolar macrophages were obtained from WT mice, incubated with 5 ng/ml rBRP-39 or IL-4 for 48 h, and arginase 1 activity and the expression of MMR were assessed. The values are the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals and are representative of at least three separate evaluations. MFI, median fluorescence intensity. *, $P < 0.05$

1-3 考察

本章では、まず Th2 炎症反応により誘導されるキチナーゼ様タンパク質 BRP-39 に着目し、その主な発現細胞が、気道上皮細胞、肺胞マクロファージであることを明らかにした。次に BRP-39KO マウスを作製し、BRP-39 の生体内での役割を解析した。

BRP-39 遺伝子欠損マウスに対して、OVA・アラムゲルやダニ抗原で免疫、吸入曝露を行ったマウス喘息モデルでは、同じ条件下の野生型マウスと比較して気管支肺胞洗浄液中の細胞数が減少し、メサコリンで誘発される気道過敏性が抑制されていた。BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、Th2 炎症反応を担うサイトカインである IL-4 や IL-13 量が抑制されていたのに対し、OVA とフロイント完全アジュバントで誘導される Th1 炎症モデルでは、BRP-39 遺伝子欠損マウスの IFN- γ 量に変化がなかったことから、BRP-39 の作用の一部は、Th2 特異的な反応であることが明らかになった。

次に Th2 炎症反応における BRP-39 の役割を検討した。アレルギー性炎症は、Th2 細胞が産生する IL-4、13 により B 細胞が IgE 抗体産生細胞へと分化する過程が起点となる。抗原の侵入に対して B 細胞から IgE 抗体が産生され、産生された IgE が肥満細胞や好塩基球上の IgE レセプターと会合する感作の過程を経て、同レセプターを発現するこれらの細胞からヒスタミンや、ロイコトリエンなどのケミカルメディエーターが放出されることで炎症反応が増幅する。BRP-39 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞を用いた実験では、Th2 炎症反応における BRP-39 の作用メカニズムの一部が、抗原刺激後の細胞分化や抗原特異的 IgE 産生の抑制であったことが分かった。

Th2 炎症反応における BRP-39 の役割を解析する過程で、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、肺中、BALF 中にアポトーシス様細胞が多く含まれることが分かった。BALF 中、肺中のアポトーシス様細胞は、CD4 陽性細胞、マクロファージ、好酸球といった炎症細胞であり、BRP-39 遺伝子欠損マウスにおける炎症反応の抑制メカニズムの一部は、アポトーシスの亢進であることが分かった。

細胞の死には、ネクローシスとアポトーシスがある。細胞が、熱やエネルギーの枯渇などの激しい細胞ストレスにさらされて、壊死を起こすことはネクローシスと呼ばれる。ネクローシスを起こした細胞では細胞内外のイオンバランスが崩

れて、細胞が膨潤し、細胞成分を周りに放出して炎症を引き起こす。

一方、アポトーシスは、細胞が自ら選択する細胞死である。ネクローシスが受身の反応であるのに対して、アポトーシスは、生体の恒常性維持に働く積極的な反応である⁷⁶⁾。たとえば不要になった自己細胞や異物化された細胞は、細胞表面にホスファチジルセリンを発現することで、マクロファージや好中球に認識され貪食、除去されている。また、血球系の細胞は、古くなるとアポトーシスを起こして排除され、常に骨髓の造血系幹細胞から新しい細胞が産生されている。

Th2 炎症反応の主要なエフェクターサイトカインである IL-13 を過剰発現させると、肺組織の炎症と組織の線維化が起きる^{71, 72)}。IL-13TG マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスを交配し、得られた IL-13TG/BRP-39KO マウスでは、この肺組織の炎症と組織の線維化が抑制されるとともに、炎症細胞のアポトーシス亢進が確認された。

以上の *in vivo* 試験結果から BRP-39 は、IL-13 下流の Th2 エフェクター分子として機能することが分かった。

アポトーシスの定義の 1 つは、細胞死にカスパーゼの活性化が関与することである。カスパーゼは、アスパラギン酸残基に特異性を示すシステインプロテアーゼのファミリーであり、種々の刺激がカスパーゼ 8、9、10 の活性化を介して細胞内で下流のカスパーゼ 3、6、7 を切断・活性化していくことで、アポトーシスが誘導されると考えられる^{77, 78)}。

カスパーゼの活性化のトリガーとなる経路には、大きく 3 つがある。1 つは、DNA 損傷により転写因子 p53 の活性化が起こり、BAX など細胞死に関わる標的遺伝子の発現が亢進し、ミトコンドリア外膜の透過性が亢進することで、シトクロム c の細胞質への漏出からカスパーゼ 9 の活性化、カスパーゼ 3 の活性化が起こる経路である。2 つ目は、ミトコンドリアは介さず、TNF や Fas リガンドなどのサイトカインが細胞表面上の Fas を介してカスパーゼ 8 を活性化し、カスパーゼ 3 を活性化するケースである。3 つ目は、小胞体ストレスによってカスパーゼ 12 を介して、カスパーゼ 3 が活性化されるケースである。

アポトーシスは、細胞に TNF- α や Fas リガンドなどのサイトカイン（デスリガンド）を添加することで *in vitro* 条件下で誘導することが可能である。野生型マウスの脾細胞を用いた *in vitro* 実験系では、TNF- α や Fas リガンドを添加して得ら

れるアポトーシス様反応（活性化 caspase-3 や Fas 発現量の亢進）が、リコンビナント BRP-39 の添加により抑制されることを明らかにし、BRP-39 が抗アポトーシス作用を担う分子であることを明らかにした。

本章では、キチナーゼ様タンパク質 BRP-39 が抗原刺激後の細胞分化や抗原特異的 IgE 産生制御を介して Th2 炎症反応を担う分子のひとつであることを明らかにした。また、BRP-39 遺伝子欠損マウスにおける炎症細胞の変化に着目し、BRP-39 が抗アポトーシス作用を有することを明らかにした。

アポトーシスは、生物の個体発生の過程や細胞数のホメオスタシスに必要な機構である。このアポトーシスの誘発と抑制のバランスが崩れることによって発症する疾患もある。アポトーシスが異常に抑制された場合には、癌、自己免疫疾患が発症し、逆に異常に亢進すれば、エイズや劇症肝炎、アルツハイマー病などの神経変性疾患が生じる原因になり、種々の疾患で病態メカニズムの一旦を担っていると考えられる。この BRP-39 の役割の解明から、アポトーシスの関与する疾患の新たな治療薬開発の可能性へ繋がることが期待される。

第2章 COPDにおけるBRP-39の役割

本章では、COPD発症におけるBRP-39の生理的役割を調べることを目的として、COPD発症の主要なリスク要因であるたばこ煙をマウスに長期間曝露した肺気腫モデルを用いてBRP-39の解析を行った。また、ヒトにおいては喫煙者における肺組織中、血清中YKL-40の発現解析を行った。

2-1では、まずBRP-39の発現がたばこ煙曝露によって誘導されるかどうかを検討し、同モデルにおける肺組織や気管支肺胞洗浄液(BALF)中のBRP-39の発現量の変化をウェスタンブロットや免疫組織化学的方法によって解析した。

たばこ煙曝露によりBRP-39が発現誘導されるメカニズムをさらに調べる目的で、既にたばこ煙曝露によって有意な発現誘導が報告されているIL-18に着目し^{79, 80}、IL-18受容体欠損マウスを用いて、IL-18シグナルを遮断した条件下で、BRP-39の発現を調べた。

さらにBRP-39がCOPDの発症機序に果たす役割を明らかにする目的で、野生型マウスとBRP-39欠損マウスに、たばこ煙を最長10ヶ月間まで曝露して肺病理を中心とする表現型を野生型マウスと比較解析した。

BRP-39が抗アポトーシス作用を有することが第1章の研究で分かったため、BRP-39欠損マウスで増加するアポトーシス細胞の解析を行った。特に肺を構成する構造細胞の中でアポトーシスが亢進する細胞種を免疫組織化学的方法によって特定し、肺の気腫化との関連を調べた。

2-2では、これまでのマウスにおける発見がヒトの病態に外挿できるかどうかを確認するために喫煙者における肺組織中、血清中YKL-40の発現解析を行った。肺組織の解析では、現在の喫煙者、現在は喫煙をしていない過去の喫煙者、現在も過去も喫煙をしていない非喫煙者というように喫煙状態に応じて肺組織サンプルを分類し、肺組織中のYKL-40発現量を比較した。

血清の解析では、COPDを罹患していない喫煙者、COPDを罹患している喫煙者、非喫煙者と血清を分類し、血清中YKL-40量をELISAによって定量し、比較した。また、COPD患者層をGOLDガイドラインにしたがって、StageI+IIの軽症、中等症とStageIII+IVの重症、最重症の2群に分けてYKL-40量に差があるかどうか比較解析を実施した。また、バイオマーカーとしての血清中YKL-40に着目し、年齢、喫煙

歴のような疫学的項目との相関解析を実施した。

2-1 マウスたばこ煙曝露肺気腫モデルにおける BRP-39 の解析

2-1-1 たばこ煙曝露による IL-18 依存的な BRP-39 の発現亢進

肺における BRP-39 とたばこ煙の関係を調べる目的で、たばこ煙曝露が BRP-39 を誘導するかどうかを調べた。室内気を同じ期間曝露したものを比較対照とした。その結果、たばこ煙は BRP-39 タンパクの蓄積を亢進させることが分かった。たばこ煙曝露開始より 2 週間後から認められたこの効果は、1 ヶ月後に顕著になり、10 ヶ月後においてもその亢進は認められた (Fig. 18A)。すべての時点において、BRP-39 タンパク質量の変化 (Fig. 18B) は、mRNA の変化 (Fig. 18C) と符号していた。次に免疫組織化学的方法により、たばこ煙を曝露した肺における BRP-39 の発現亢進部位を調べたところ、気道上皮細胞、肺泡マクロファージ、肺泡 II 型上皮細胞においてもっとも顕著であった (Fig. 18D)。

Kang らの報告^{79, 80)}のとおり、たばこ煙を曝露した肺では、炎症誘発性のサイトカインである IL-18 の有意な発現誘導が確認された。BRP-39 遺伝子欠損マウスの肺では、IL-18 発現レベルは変わらないことから、この IL-18 の誘導に BRP-39 は関与しないことが分かった (Fig. 18E)。一方、BRP-39 の誘導メカニズムを調べる目的で、野生型マウスと IL-18 受容体遺伝子欠損マウスの肺における BRP-39 の発現量を調べた。この結果、BRP-39 発現量は、IL-18 受容体遺伝子欠損マウスで有意に減少していることが確認された (Fig. 18F)。この結果から、BRP-39 の肺における発現は、IL-18 依存的であることが分かった。

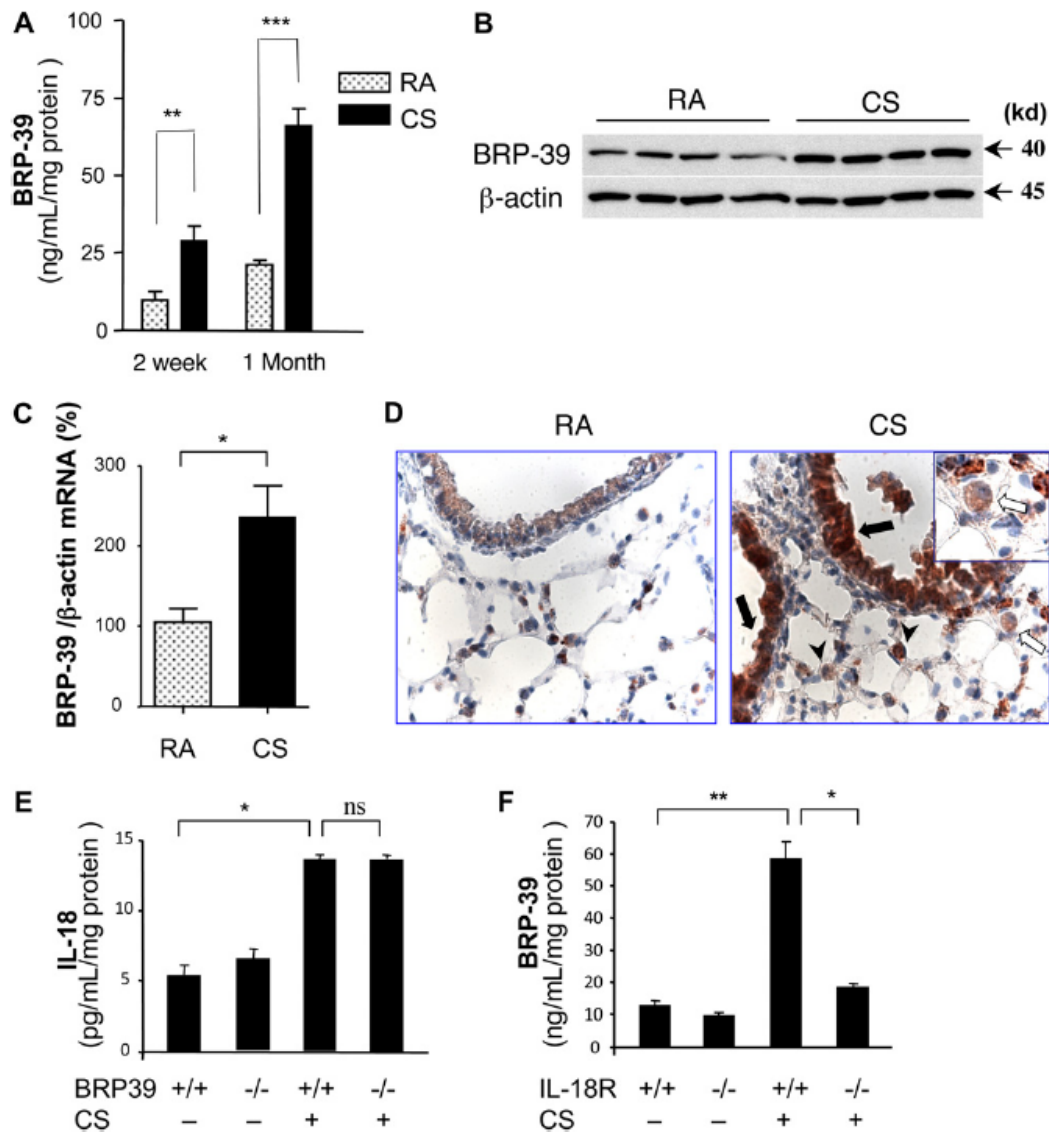


Fig. 18 Effects of exposure to cigarette smoke (CS) on the expression of BRP-39.

Ten-week-old wild-type (WT) mice were exposed to room air (RA) or CS. (A) Protein concentrations of BRP-39 in lung lysates at indicated time points were evaluated by ELISA. (B and C) The expression of BRP-39 protein and mRNA at 1 month after RA or CS exposure was assessed by immunoblot assay and realtime PCR, respectively. (D) Tissue expression of BRP-39 was localized in the lungs of mice after 1 month of RA and CS exposure, using immunohistochemical staining (IHC) (solid arrows, airway epithelial cells; arrowheads, alveolar Type II cells; open arrow, alveolar macrophage; 340 original magnification; inset, 380 original magnification). (E and F) Concentrations of IL-18 or BRP-39 in the lungs from WT (+/+), and BRP-39 or IL-18

receptor (R) null mice (-/-) were evaluated by ELISA. Values in A, C, E, and F represent the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals. B and D are representative of at least two similar evaluations (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; ns, not significant).

2-1-2 BRP-39 のたばこ煙曝露誘発炎症反応に対する効果

気管支肺胞洗浄液と組織中の炎症反応は、室内気曝露群と比較して、たばこ煙曝露により亢進した。3~6 ヶ月間のたばこ煙曝露により、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数 (Fig. 19A, CS/WT)、マクロファージ数 (Fig. 19B, CS+/BRP39 +/+) が有意に増加した。一方、たばこ煙を曝露した野生型マウスに対し、BRP-39 遺伝子欠損マウス由来の肺胞洗浄液中では、総細胞数 (Fig. 19A, CS/BRP39 -/-)、マクロファージ数 (Fig. 19B, CS+/BRP39 -/-) のいずれも有意に減少した。

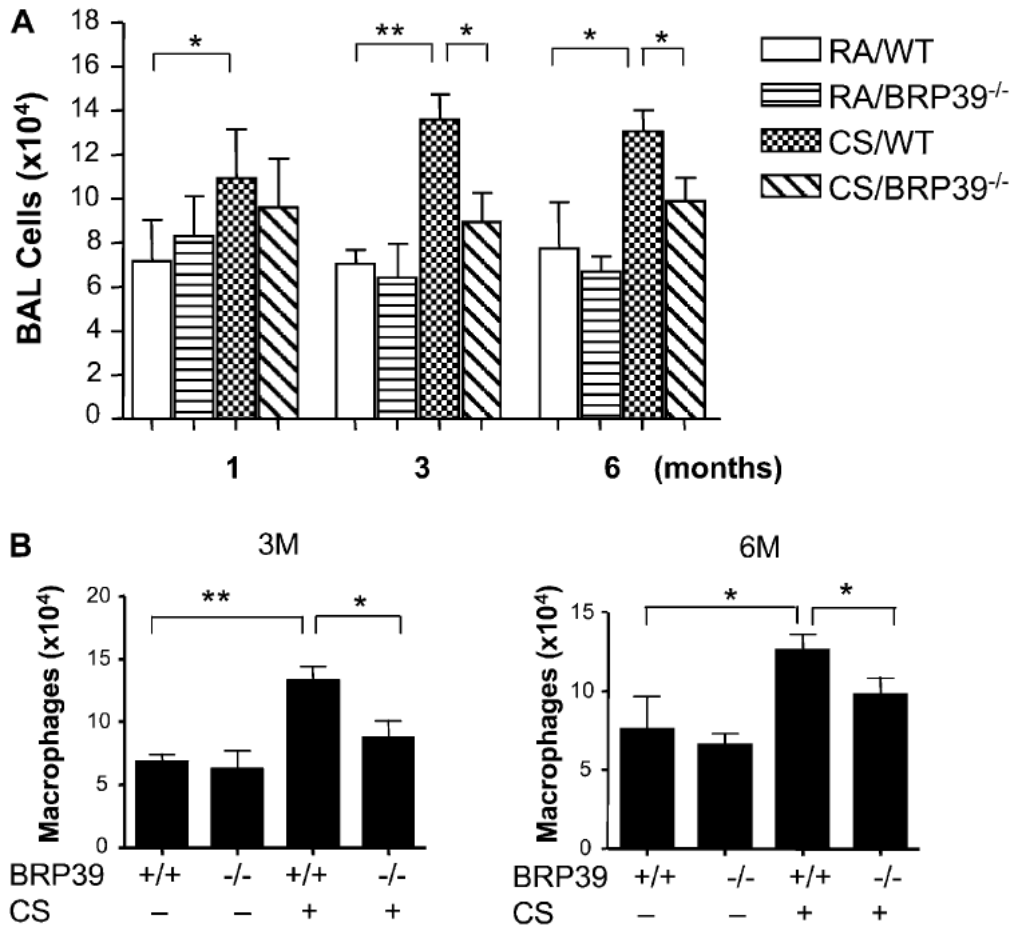


Fig. 19 BRP-39 regulation of CS-induced inflammation.

Ten-week-old WT and BRP-39 null mice (BRP-39^{-/-}) were exposed to CS or RA for 1, 3, and 6 months. The mice were killed, and bronchoalveolar lavage (BAL) total cells (A) and differential counts of macrophages at 3-month (3M) and 6-month (6M) time points (B) were measured. Values in A and B represent the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

2-1-3 BRP-39 のたばこ煙曝露誘発気腫化に対する効果

次に野生型マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスの肺を用いて、たばこ煙曝露によって誘発される気腫化に対する効果を評価した。既報のとおり⁷⁹⁾、慢性的なたばこ煙曝露により組織学的形態学的に明らかな肺胞腔の拡大を認め (Fig. 20A)、3~6 ヶ月で有意な変化を示した (Fig. 20B)。室内気を曝露した BRP-39 欠損マウスの肺胞径は、野生型マウスと比べて有意な差を認めなかったが、たばこ煙を曝露した BRP-39 遺伝子欠損マウスでは気腫化反応が亢進した結果、気腫像が 1 ヶ月から認められ、たばこ煙を曝露した野生型マウスと比較して、3~6 ヶ月のたばこ煙曝露ではさらに気腫化の程度が悪化していた (Fig. 20B)。

以上の結果から、BRP-39 はたばこ煙によって誘発される気腫化に対して保護的な役割を持つことが示された。

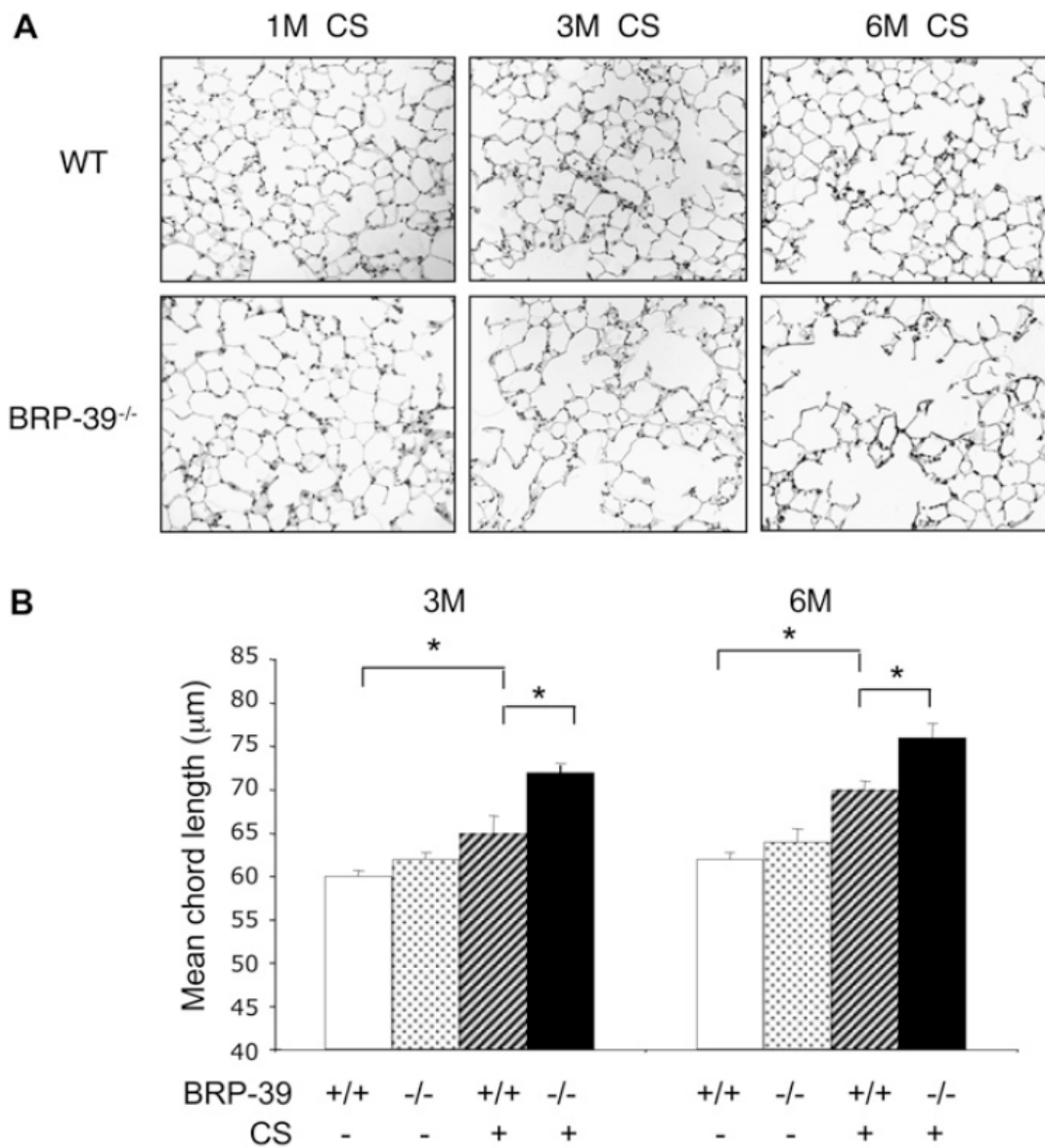


Fig. 20 BRP-39 regulation of CS-induced alveolar destruction.

Tenweek-old WT (+/+) and BRP-39 null mice (BRP-39^{-/-}) were exposed to CS or RA for 1 month (1M), 3 months (3M), and 6 months (6M). The mice were killed, and hematoxylin-and-eosin stains in lung-tissue sections ($\times 20$ original magnification) (A) and mean chord length (B) were evaluated. A represents the composite of a minimum of five mice from each group. Values in B represent the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals (* $P < 0.05$).

2-1-4 BRP-39 によるアポトーシス制御

気道上皮細胞や肺胞 II 型上皮細胞などの肺の構造細胞のアポトーシスは肺の恒常性維持に寄与している可能性がある。このことから肺気腫の病態生理における BRP-39 とアポトーシスの役割をさらに解析した。BRP-39 遺伝子欠損マウスの肺組織で気腫化が亢進していたため、たばこ煙曝露条件下のアポトーシス反応を野生型マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスとで比較する実験を行った。既報のとおり^{79, 80}、室内気曝露群では、野生型マウス、BRP-39 遺伝子欠損マウス由来の肺のいずれも TUNEL 陽性細胞数の有意な増加を認めなかった(Fig. 21A, RA/WT)。一方、たばこ煙曝露群では、野生型マウス由来の肺では、TUNEL 陽性細胞数が増加しており(Fig. 21A and B, CS/WT)、BRP-39 遺伝子欠損マウスではさらにその数が増加していた(Fig. 21A and B, CS/BRP-39^{-/-})。免疫組織化学的方法で二重染色することで、TUNEL 陽性細胞の大部分が気道上皮細胞 (Fig. 21C, CC-10) および肺胞 II 型上皮細胞(Fig.21C, Pro-SPC)とマクロファージ (Fig. 21C, F4/80) であることが確認された。PI 染色 (Fig. 22B)、アネキシン V 染色 (Fig. 22A) を用いたフローサイトメトリーによる解析でも、病理による解析結果が裏付けられ、たばこ煙曝露 BRP-39 遺伝子欠損マウスでのアポトーシス細胞が、上皮細胞、肺胞マクロファージ、好中球であることが確認された (Fig. 22 A and B)。これらのアポトーシスの亢進では、いずれも Fas 分子の発現亢進 (Fig. 22D) と活性化 caspase-3 の発現亢進が確認された (Fig. 22C)。

これらの結果から、BRP-39 は、たばこ煙曝露肺において、上皮細胞と炎症細胞の両方のアポトーシスに対して阻害分子として作用していることが明らかとなった。

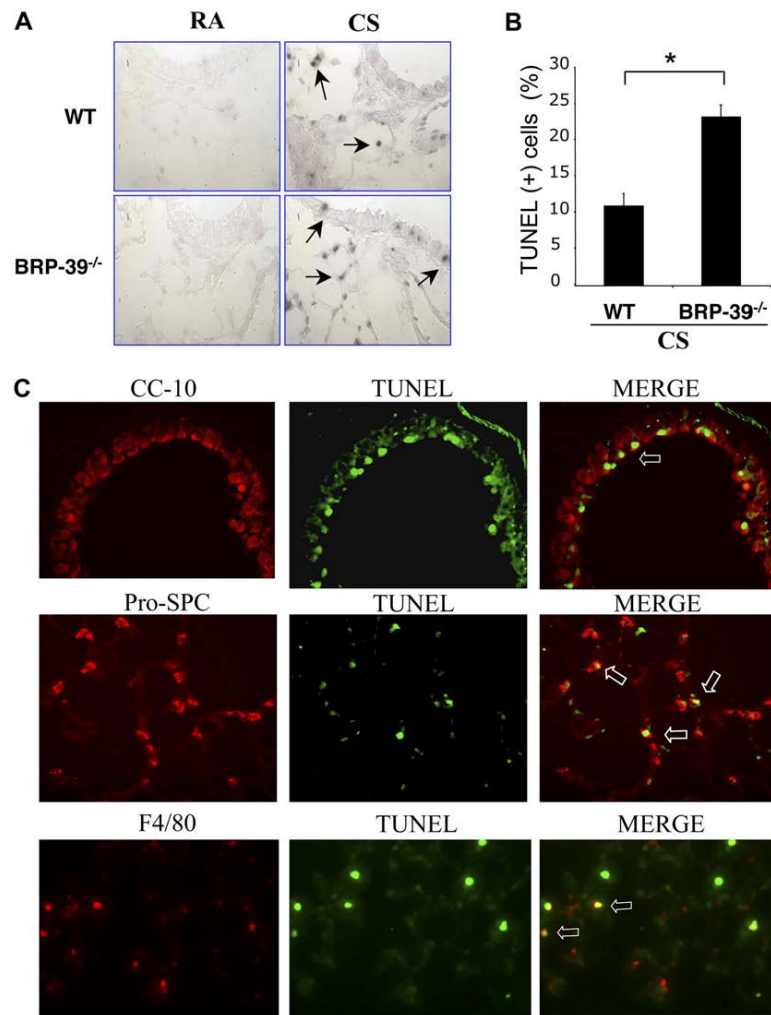


Fig.21 Role of BRP-39 in CS-induced apoptosis in the lung.

(A) Representative TUNEL stains on lung-tissue sections from 3-month RA-exposed or CS-exposed wild-type and BRP-39^{-/-} mice are illustrated (arrows, TUNEL-positive cells; $\times 40$ original magnification). (B) TUNEL positive cells were scored and (C) further localized in lungs from CS-exposed BRP-39^{-/-} mice, as detected by doublelabeled immunohistochemistry (IHC). Top row, Clara cell 10 kD (CC-10) and TUNEL stains and merged image (MERGE; open arrow, double-positive cells; $\times 40$ original magnification); middle row, pro-surfactant C (Pro-SPC) and TUNEL stains and merged image (open arrow, double-positive cells; $\times 40$ original magnification); bottom row, F4/80 and TUNEL stains and merged image (open arrow, double-positive cells; $\times 40$ original magnification). A and B are representative of three similar evaluations. Values in B represent the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of four animals ($*P < 0.01$).

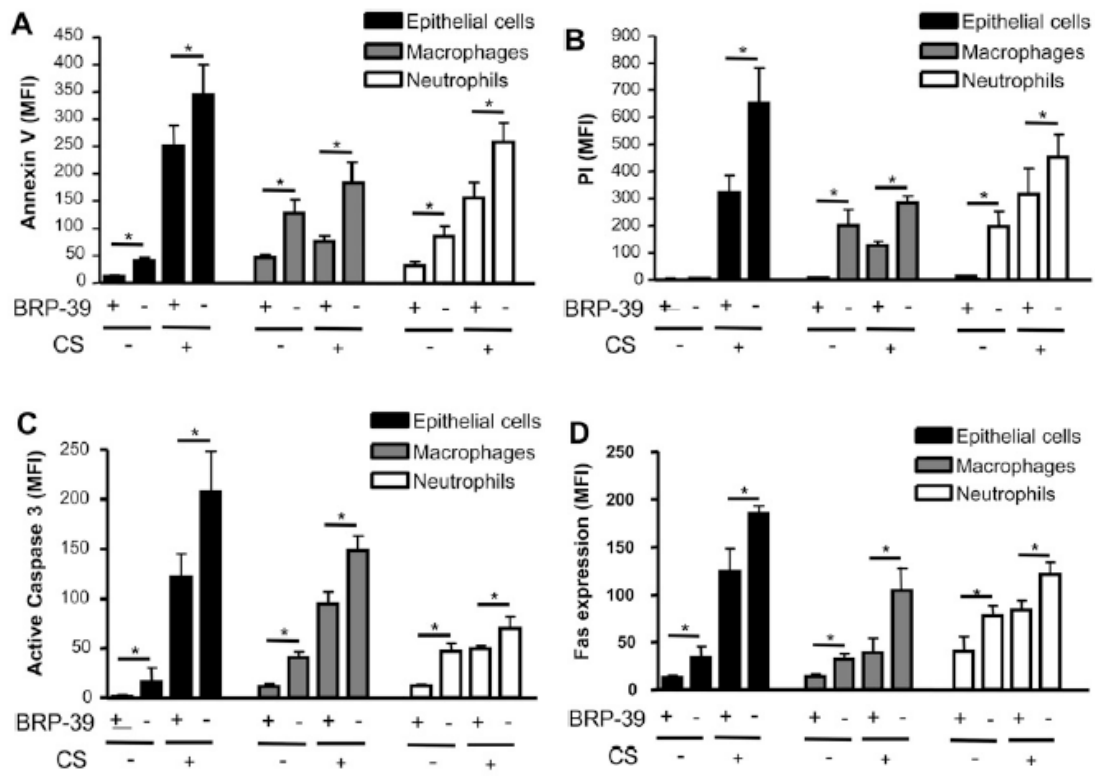


Fig.22 BRP-39 regulation of CS-induced cellular apoptosis and death.

Ten-week-old WT (+) and BRP-39 null mice (-) were exposed to CS or RA for 3 months. The apoptosis/necrosis responses in airway epithelial cells, alveolar macrophages, and neutrophils were evaluated by FACS analysis after staining with annexin V (A), propidium iodide (PI) (B), active caspase-3 (C), and Fas (D). Values represent the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of five animals ($*P < 0.05$). MFI, mean fluorescence intensity.

2-2 喫煙者における YKL-40 発現解析

2-2-1 喫煙者肺組織での YKL-40 発現

これまでのマウスにおける発見がヒトの病態に外挿できるかどうかを確認するために、喫煙曝露されたヒト肺において、YKL-40 発現が亢進しているかどうかを確認した。現在の喫煙者、現在は喫煙をしていない過去の喫煙者、現在も過去も喫煙をしていない非喫煙者から得られた肺組織中の YKL-40 発現量を比較した。組織提供者の臨床情報は、Table 2 に示す通りである。非喫煙者の肺では、少ないながらも YKL-40 発現が認められた (Fig. 23A, 左)。これに対して、喫煙者の肺組織中の肺胞マクロファージ、気道上皮細胞において YKL-40 発現量が増加していることが確認された (Fig. 23A, 右)。検定の結果、喫煙者の肺組織では、非喫煙者に対して $P < 0.01$ 、過去喫煙者に対して $P < 0.05$ のそれぞれ統計学的に有意な発現量の亢進を認めた (Fig. 23B)。過去喫煙者は、喫煙者と禁煙車の中間程度の発現量であった (Fig. 23B)。

Table 2 CHARACTERISTICS OF PATIENTS UNDERGOING LUNG RESECTION ACCORDING TO SMOKING STATUS

	Ex-Smokers (n = 20)	Current Smokers (n = 15)	Never-Smokers (n = 6)	P *
Age (years), median	70 (64–75)	60 (56–63)	59 (50–72)	ns
Male (%)	10 (50)	7 (47)	2 (33)	
Race (%)				
Caucasian	17 (35)	14 (93)	6 (100)	
African American	3 (15)	1 (7)	0	
Hispanic	0	0	0	
Pack-years of smoking (median)	58 (24–79)	75 (40–80)	0	<0.0001
Comorbidities				
Non-small-cell lung cancer	16 (80%)	14 (93%)	2 (25%)	
Chronic obstructive pulmonary disease	9 (45%)	10 (67%)	0	

Definition of abbreviation: ns, nonsignificant.

Medians are given with interquartile ranges.

* Comparison between all three groups, according to Kruskal-Wallis analysis.

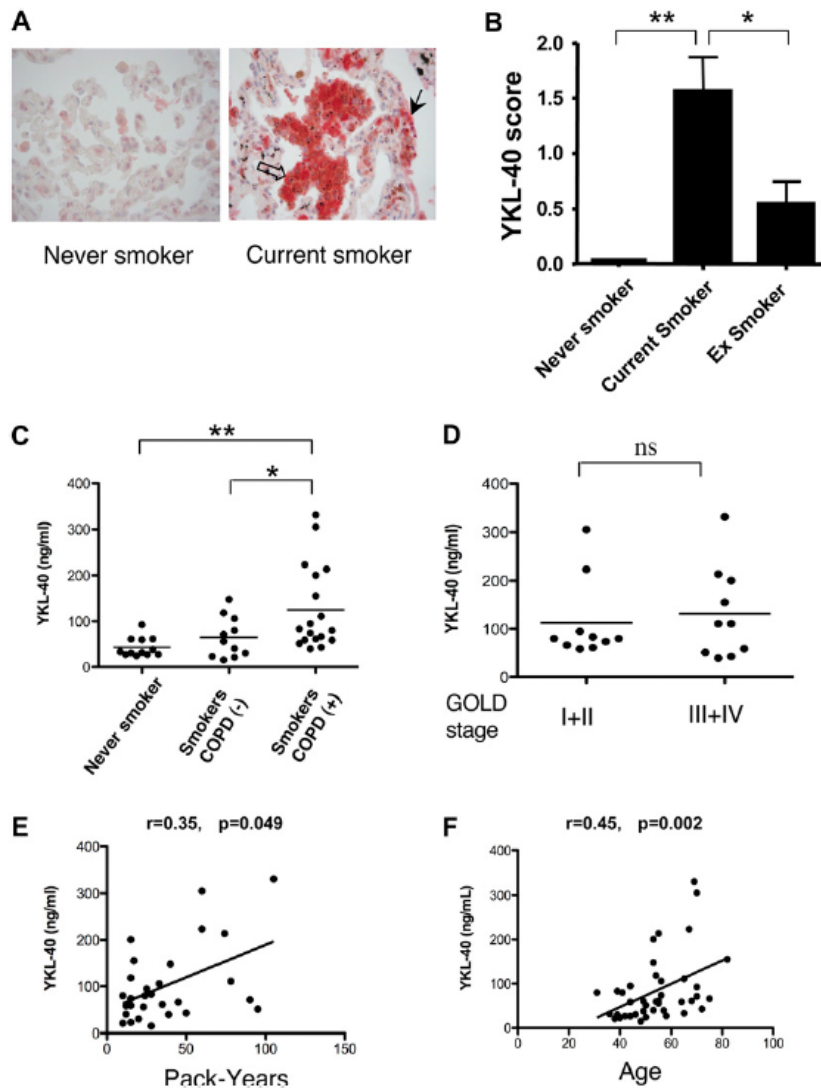


Fig. 23 Expression of YKL-40 in human lungs and sera.

(A) After immunostaining lung tissue sections obtained from never-smokers, current smokers, and ex-smokers with anti-human YKL-40 antibody, representative tissue staining was performed (open arrow, YKL-40-positive macrophages in the inflamed region; solid arrow, YKL-40-positive epithelial cells; $\times 40$ original magnification), and (B) an IHC score was assigned. (C) Concentrations of circulating YKL-40 were assessed by ELISA in age-matched never-smokers, smokers without COPD, and smokers with COPD ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$; ns, no significance). Concentrations of YKL-40 were further stratified according to GOLD stages (D), and correlations between serum YKL-40 concentrations and pack-years of smokers (E) or the ages of individuals (F) were plotted and tested. r , Spearman rank correlation coefficient.

2-2-2 喫煙者血清での YKL-40 発現

次に、血清中の YKL-40 量を比較した。COPD を罹患している喫煙者、COPD を罹患していない喫煙者と年齢が同じ非喫煙者群の血清中 YKL-40 量を比較した。血液提供者の臨床情報は、Table 3 に示す通りである。提供者の COPD 以外の背景情報は、群間で差は認められなかったが、COPD を罹患している喫煙者群には、喫煙歴の長い患者が多い。他の疾患と YKL-40 の血清レベルの間に統計学的有意差は認められなかったが、非喫煙者や COPD を罹患していない喫煙者に対して、COPD を罹患している喫煙者では、有意な YKL-40 発現量の差を認めた (Fig. 23C)。患者層を GOLD ガイドラインにしたがって、StageI+II の軽症、中等症と StageIII+IV の重症、最重症の 2 群に分けて、YKL-40 量の比較を行ったが、有意な差ではなかった (Fig. 23D)。一方、YKL-40 量は年齢 (Fig. 23F)、喫煙歴 (Fig. 23E) と有意な相関関係を示した。

Table 3 DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF CONTROL SUBJECTS, SMOKERS WITHOUT COPD, AND SMOKERS WITH COPD

	Control Subjects (n = 12)	Smokers/COPD-Negative (n = 11)	Smokers/COPD-Positive (n = 18)	P *
Age (years), median	50 (45–63)	53 (40–55)	56 (49–70)	ns
Male sex (%)	3 (25)	3 (27)	8 (44)	
Race (%)				
Caucasian	9 (75)	10 (91)	15 (84)	
African American	0 (0)	0 (0)	1 (5)	
Hispanic	0 (0)	1 (9)	2 (11)	
Asian	3 (25)	0 (0)	0 (0)	
Pack years of smoking (median)	0	20 (12–33)	32 (16–68)	<0.0001

Definition of abbreviation: ns, non significant.

Medians are given with interquartile ranges.

* Comparison between all three groups, according to Kruskal-Wallis analysis.

2-3 考察

本章では、病態メカニズムに炎症とアポトーシスが関与する呼吸器疾患として、COPDに着目し、COPDの主たる原因とされるたばこ煙をマウスに長期間曝露して得られる病態マウスを用いて、BRP-39の病態生理学的役割を解析した。

抗アポトーシス作用を持つBRP-39を欠損させたBRP-39KOマウスでは、肺の構造細胞である気道上皮細胞のアポトーシスが亢進する結果、肺気腫がさらに進展した。また、肺組織に浸潤する炎症細胞のアポトーシスも亢進した結果、炎症反応が抑制された。

第1章では、BRP-39がIL-13シグナル下流のエフェクター分子として機能し、炎症細胞のアポトーシスを通じて、抗原により誘発されるTh2炎症反応を直接的に制御することを示してきた。本章では、まずたばこ煙曝露によりBRP-39の発現が誘導されることを示し、たばこ煙曝露条件下に誘導される炎症性サイトカインIL-18に依存して発現が誘導されることを示した。

COPDの病態生理学的メカニズムは、プロテアーゼ、アンチプロテアーゼ不均衡、酸化ストレス、免疫炎症反応の破綻など様々なメカニズムが提唱されている^{81, 82)}。最近、動物モデルやヒトで提唱されている病態メカニズムに肺の構造細胞のアポトーシスと再生機構の破綻がある⁸³⁾。特に肺気腫の進展と気道上皮細胞のアポトーシスについては、多くの報告がなされている。マウスに血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)受容体阻害薬を投与した場合、肺胞のアポトーシスが進行し、肺気腫に至るとされている⁸⁴⁻⁸⁷⁾。Z-VAD-fmkのような非特異的なカスパーゼ阻害薬の投与によるアポトーシスの阻害により、IFN- γ やTGF- β により誘導される気道と肺胞のリモデリングが阻害される報告^{88, 89)}は、アポトーシスの気道と肺胞リモデリングにおける重要性を示唆している。本章においても慢性のたばこ煙曝露によりTUNEL陽性、アネキシン-V陽性のアポトーシス状態を呈するマクロファージと肺胞および気道の上皮細胞が観察された。BRP-39遺伝子欠損マウスでは、このアポトーシスがさらに進行していた。一連の結果は、内因性のBRP-39が、たばこ煙により誘発されるアポトーシスや細胞死に、保護的な役割を果たしていることを示唆している。

本章ではマウスで得られた知見のヒトへの外挿性を判断する目的で、BRP-39のヒトホモログであるYKL-40についてさらに解析を行った。YKL-40のヒト肺組織

での発現は、マウスでの解析結果と符号して、発現レベルは、現喫煙者で最も高く、元喫煙者、非喫煙者がそれに続いた

本章ではさらに YKL-40 発現レベルと COPD の進展の関連を調べるために、血清中 YKL-40 濃度について検討した。この結果、非喫煙者や、COPD を罹患していない喫煙者に対し、COPD を罹患している喫煙者でのみ有意に高い血清中 YKL-40 濃度を検出した。この結果は、Levute らによる報告⁹⁰⁾とも符号する。興味深いことに、血清中 YKL-40 濃度は、弱いながらも喫煙歴と有意な相関を認められた。しかし、血清中 YKL-40 濃度は、既報⁹¹⁾にもあるように、年齢との相関も認められているため、血清中 YKL-40 は、たばこ煙曝露だけでなく局所もしくは全身性の他の因子の影響^{92, 93)}も受けているものと思われた。

以上の結果から BRP-39 / YKL-40 が喫煙曝露により IL-18 シグナル依存的に発現し、たばこ煙により誘発される炎症反応に寄与する一方で肺気腫の病態生理に対しては、BRP-39 分子のもつ抗アポトーシス作用に基づいて保護的な役割を果たしていることが示された。

第3章 急性肺傷害における BRP-39 の役割

この章では、急性肺傷害発症における BRP-39 の生理的役割を調べることを目的として、高濃度の酸素をマウスに曝露した急性肺傷害モデルを用いて BRP-39 の解析を行った。また、ヒトでは、人工換気による肺傷害が関わる気管支肺異形成症 (bronchopulmonary dysplasia ; BPD) 患者由来の気管支吸引液中の YKL-40 について解析を行った。

3-1 では、まず BRP-39 の発現量が高濃度酸素によってどのように変化するかを検討し、高濃度酸素をマウスに曝露した急性肺傷害モデルにおける肺組織や気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の BRP-39 の発現量の変化をウェスタンブロットや免疫組織化学的方法によって解析した。さらに BRP-39 が急性肺傷害の発症機序に果たす役割を明らかにする目的で、100%酸素を曝露する条件下に野生型マウスと BRP-39 欠損マウスを飼育し、肺病理を中心とする表現型を比較解析した。

BRP-39 欠損マウスでは、肺胞キャピラリーの透過性が亢進し、BALF 中へのタンパク漏出が進み、生存率も低下したため、3-2 では肺胞上皮特異的に YKL-40 を過剰発現させた YKL-40TG マウスを作製し、BRP-39 欠損マウスと YKL-40TG マウスを交配して得られたマウスを解析し、BRP-39 欠損マウスで確認された現象が回復するかどうかを確認した。

また、BRP-39 欠損マウスで確認された炎症反応や肺胞キャピラリー透過性亢進のメカニズムを調べる目的で、BRP-39 の多様な機能のうち、抗アポトーシス作用の寄与について解析を行った。アポトーシス誘導に特徴的な caspase-3 の活性化に着目し、BRP-39 欠損マウスと caspase-3 欠損マウスを交配して、得られたマウスの表現型を BRP-39 欠損マウスと比較した。

第3章では、特に急性肺傷害における BRP-39 の酸化傷害、DNA 損傷、細胞死におけるメディエーターとしての役割を明らかにした。また、マウスにおける BRP-39 の知見がヒトの病態に外挿できるかどうかを確認するために、BPD を発症しなかった新生児と、発症もしくは死亡した新生児の気管支吸引液中の YKL-40 濃度を解析し、肺病態の悪化との関連を解析した。

3-1 高濃度酸素負荷によるマウス肺傷害モデル

3-1-1 高濃度酸素負荷による in vivo での BRP-39 の発現制御

急性肺傷害における BRP-39 の役割を調べる目的で、室内気または、100%酸素を曝露した野生型マウスの肺中の BRP-39 の発現を比較した。室内気曝露群では、BRP-39 は肺組織 (Fig. 24A, RA)、BALF 中 (Fig. 24B and C, RA) のいずれにも豊富に発現しており、免疫組織化学的検討では、肺胞 II 型上皮細胞、肺胞マクロファージに特に強く発現が認められた (Fig. 24D, RA)。

一方、高濃度酸素負荷したマウス肺では、BRP-39 の発現は、mRNA (Fig. 24A, 100%O₂)、タンパク質レベル (Fig. 24B and C, 100%O₂) で有意な発現減少を認め、肺胞 II 型上皮細胞、肺胞マクロファージにおけるタンパク質の蓄積も減少していた (Fig. 24D, 100%O₂)。この結果から、高濃度酸素負荷は、マクロファージと上皮細胞の BRP-39 の発現と蓄積を阻害することが明らかになった。

3-1-2 高濃度酸素負荷による in vitro での BRP-39 の発現制御

高濃度酸素負荷による BRP-39/YKL-40 の阻害メカニズムを調べるため、ヒト気道上皮細胞株である BEAS2B 細胞を室内気または 95%酸素条件下に培養し、YKL-40 発現量の変化と抗酸化物質添加の影響を評価した。この結果、in vivo と同様、高濃度酸素負荷による曝露時間依存的な YKL-40 の発現阻害が確認された (Fig. 24F)。この発現阻害は、抗酸化剤である *N*-アセチル-L-システイン (NAC) の前処置により解除された (Fig. 24G)。この結果から、上皮細胞の YKL-40 発現を酸化依存的なメカニズムにより阻害していることが示された。

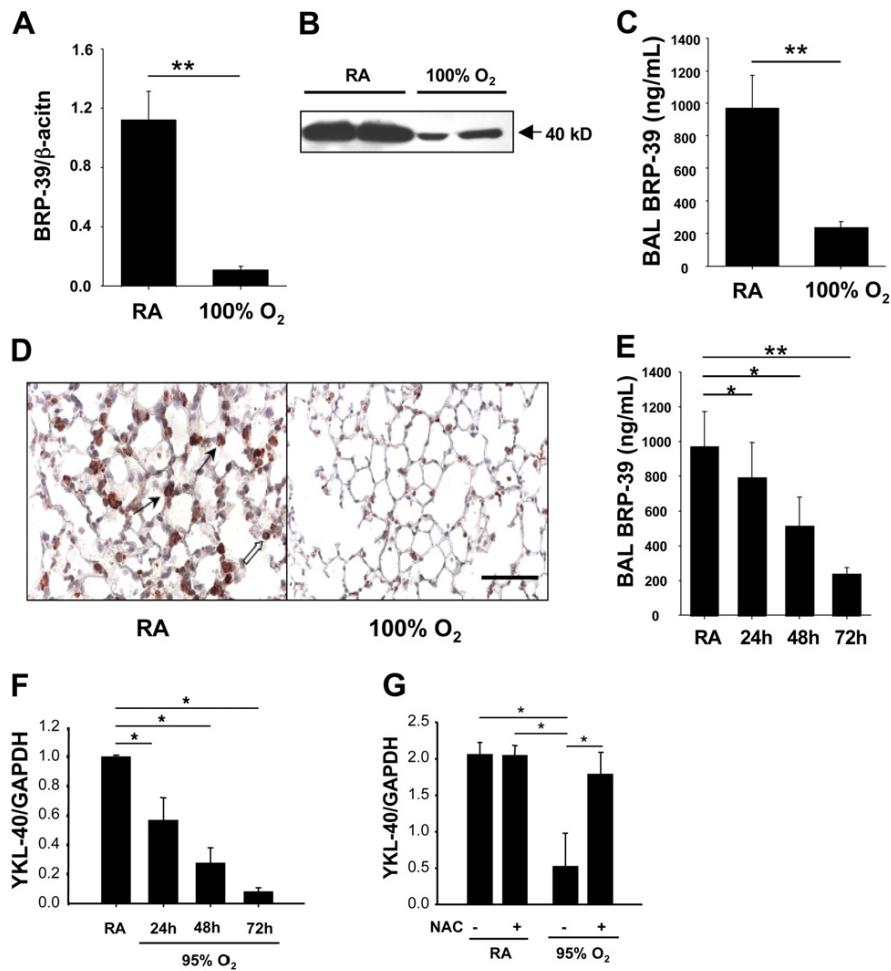


Fig. 24 Hyperoxia regulation of breast regression protein (BRP) in mice

Mice were exposed to room air (RA) or 100% O₂ for up to 72 hours (A–E). The levels of BRP-39 mRNA were evaluated by real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) (A). BRP-39 protein accumulation was assessed via Western analysis (B) and ELISA (C and E) with bronchoalveolar lavage fluid and lung lysates, respectively. Immunohistochemistry was used to localize the BRP-39 (D; closed arrows, alveolar type II cells; open arrow, macrophage). BEAS-2B cells were exposed to 95% O₂ in the presence or absence of *N*-acetyl-L-cysteine (NAC). Real-time RT-PCR was used to evaluate the effects of this exposure on YKL-40 expression (F) and the effects of NAC in this setting (G). The values in A, C, and E represent the mean (\pm SEM) of evaluations in a minimum of five animals. The values in F and G represent the mean (\pm SEM) of triplicate experiments. (B) Representative of two separate experiments. (D) Representative of four similar evaluations. Scale bar = 50 μ m. * P < 0.05, ** P < 0.01.

3-1-3 In vivo 急性肺傷害モデルにおける BRP-39 阻害効果

急性肺傷害における BRP-39 の役割を調べる目的で、100%酸素を曝露する条件下に野生型マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスを飼育し、解析を行った。既報のとおり⁹⁴⁻¹⁰⁰、野生型マウスでは、100%酸素負荷により BALF 中のタンパク質量増加に特徴付けられる肺胞キャピラリーの透過性の変化が観察された。この肺胞キャピラリータンパク質の流出は、高濃度酸素曝露 24 時間後から観察され、72 時間後まで続いた (Fig. 25A and B)。高濃度酸素負荷 4 日後以降では、C57BL/6 系統 (Fig. 25C)、Balb/c 系統 (Fig. 25D) とともに野生型マウスでは、死亡例が観察された。

一方、BRP-39 遺伝子欠損マウスは、高濃度酸素負荷に対して、さらに過剰な反応が見られた。すなわち、BALF 中の総タンパク量は、同条件の野生型マウスより有意に多く (Fig. 25B, 100%O₂/BRP-39^{-/-})、生存率も低下した (Fig. 25C and D, BRP-39^{-/-})。BRP-39 遺伝子欠損マウスにおける急性肺傷害の悪化は、C57BL/6 系統 (Fig. 25C) でも Balb/c 系統 (Fig. 25D) でも観察されたため、マウスの系統に依存するものではないと考えられた。

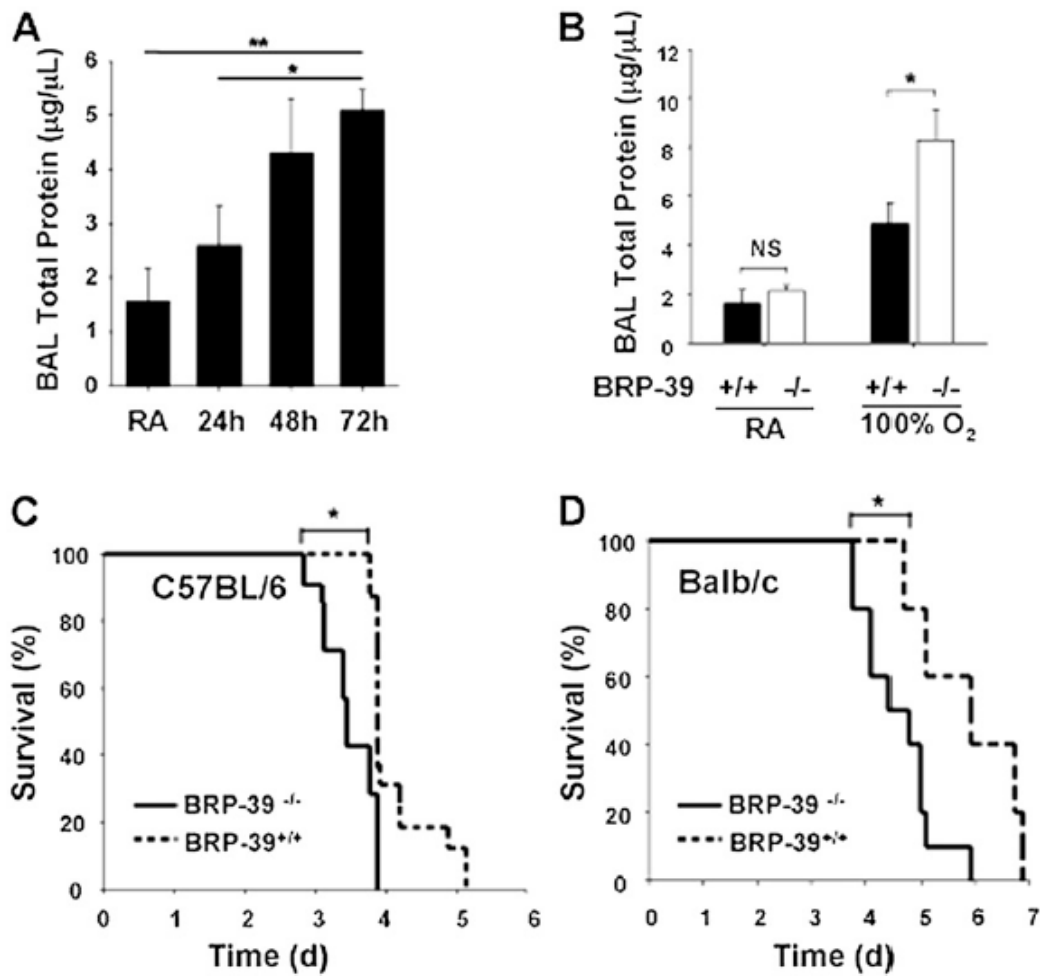


Fig. 25 Role of breast regression protein (BRP)-39 in hyperoxia-induced vascular permeability and premature death.

Wild-type (WT) (+/+) mice were exposed to 100% O₂ up to 72 hours, and bronchoalveolar lavage (BAL) protein was quantitated (A). WT and BRP-39 (-/-) mice were exposed to 100% O₂ for 72 hours, and BAL protein was assessed (B). C57BL/6 (C) and Balb/c (D) mice were exposed to 100% O₂, and survival was assessed. The values in A and B are the mean (\pm SEM) of evaluations in a minimum of five animals, and are representative of two separate experiments. Data in C and D represent assessments in a minimum of eight mice. NS, not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3-1-4 高濃度酸素により誘発されるサイトカイン産生に対する効果

室内気または高濃度酸素負荷した野生型マウス、BRP-39KO マウスについて BALF 中および肺組織中の炎症反応を解析した。高濃度酸素を曝露した野生型マウスでは、BALF 中に回収される総細胞数 (Fig. 26A)、マクロファージ数、好中球数の上昇 (Fig. 26 B) が認められ、肺組織でもこれらの細胞の豊富な浸潤が確認された (Fig. 26C)。これらの浸潤に符号して、keratinocyte chemoattractant (KC) /CXCL1 (Fig. 26D) や monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) /CCL-2 (Fig. 26E) が有意に増加した。

一方、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、BALF 中に回収される総細胞数、マクロファージ数、好中球数、肺組織での炎症細胞浸潤、KC/CXCL-1、MCP-1/CCL-2 産生のいずれも野生型マウスに比べて亢進していた (Fig. 26A-E, BRP-39 ^{-/-})。以上の結果から BRP-39 は、高濃度酸素負荷による肺組織炎症とケモカイン産生を阻害することが分かった。

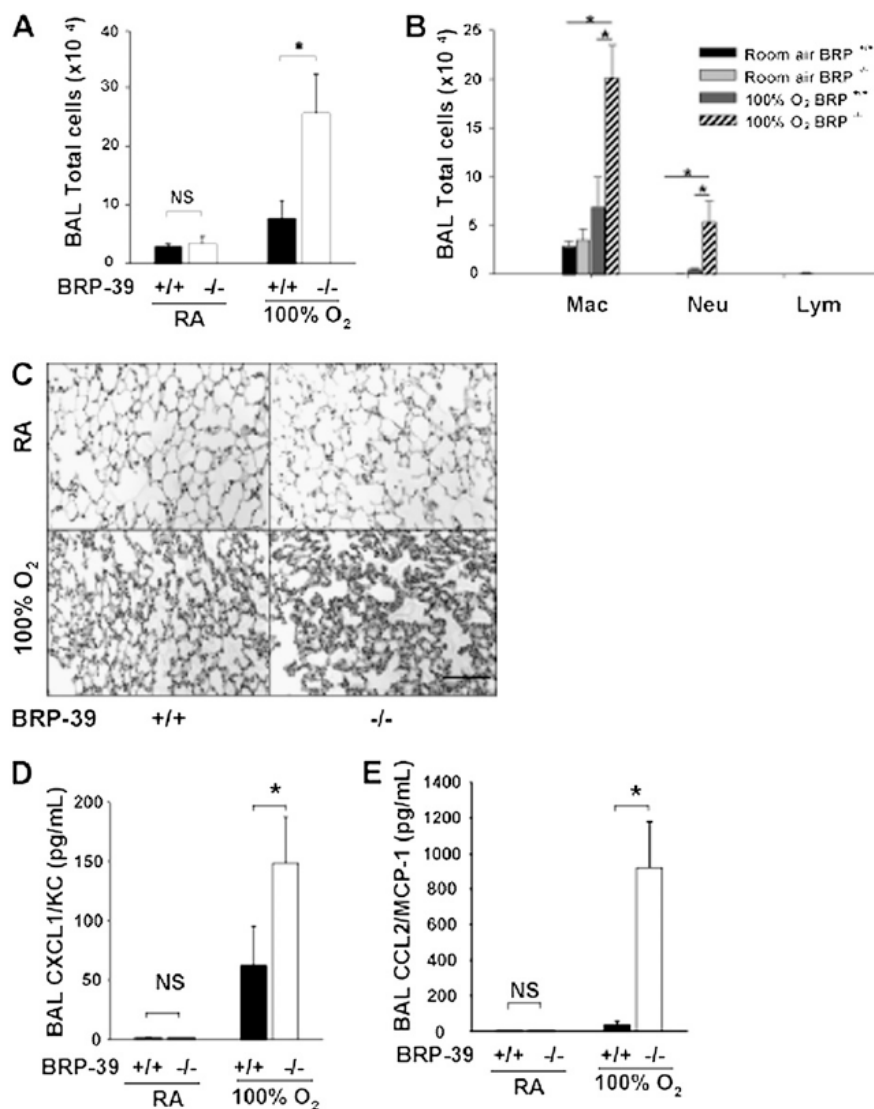


Fig. 26 Role of breast regression protein (BRP)-39 in hyperoxia-induced inflammation and chemokine production.

Wild-type (WT) (+/+) and BRP-39^{-/-} mice were exposed to 100% O₂ for 72 hours, and bronchoalveolar lavage (BAL) total cell recovery (A), differential cell recovery (B), lung histology (C; hematoxylin and eosin stain), and the levels of BAL KC/ CXCL1 (D) and MCP-1/CCL-2 (E) were assessed. The values in A, B, D, and E represent the mean (\pm SEM) of evaluations in a minimum of five animals, and are representative of two separate experiments. C is representative of five similar evaluations. NS, nonsignificant. Scale bar, 100 μ m. * $P < 0.05$.

3-1-5 酸化傷害とアポトーシスに対する BRP-39 の効果

酸化ストレスによる DNA の障害と細胞死は、高濃度酸素負荷による急性肺傷害発症の要因の一つである^{99, 100})。この報告に符号し、野生型マウスに 100%酸素負荷を行うと肺組織に、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 染色陽性として検出される酸化傷害が認められた (Fig. 27A, 黒矢印)。TUNEL 染色で検出される DNA 傷害 (Fig. 27B, 黒矢印) が認められ、TUNEL 陽性細胞の比率が増加した (Fig. 27C)。これらの反応は BRP-39 遺伝子欠損マウスではいずれも亢進していた (Fig. 27A-C, 100%O₂/ BRP-39^{-/-})。TUNEL 染色結果と、細胞特異的な免疫組織化学的検討により、100%酸素負荷条件下の BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、気道上皮細胞 (Fig. 27D, CC-10) ならびに肺胞 II 型上皮細胞 (Fig. 27D, Pro SPC) のアポトーシス亢進が確認された。これらの結果から、BRP-39 は、高濃度酸素負荷条件下の酸化傷害、DNA 損傷、細胞死から組織を保護する分子として働いていることが分かった。

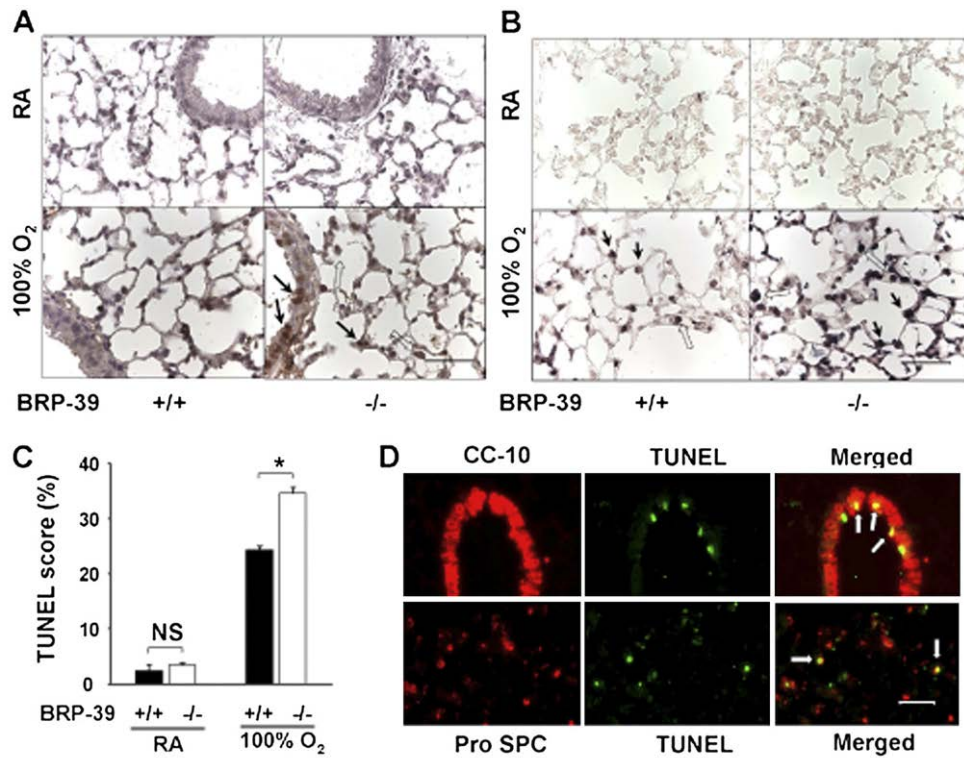


Fig. 27 Role of breast regression protein (BRP)-39 in hyperoxia-induced oxidant and DNA injury.

Wild-type (WT) (+/+) and BRP-39 (-/-) mice were exposed to room air (RA) or 100% O₂ for 72 hours, and subjected to 8-hydroxy-29deoxyguanosine (8-OHdG) (A; closed arrows, airway and alveolar type II epithelial cells; open arrows, macrophage) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) evaluation (B; closed arrows, alveolar type II cells; open arrows, macrophage). TUNEL positive cells were counted and scored (C). TUNEL-positive apoptotic cells were further localized via double-label immunohistochemistry with cell-specific antibodies (CC10, airway epithelial cells; pro-SPC, alveolar type II cells) and TUNEL staining (D; arrows, double-stained cells). (A and B) Representative composites of five similar evaluations. The values in C are the mean (\pm SEM) of evaluations in a minimum of five animals, and are representative two separate experiments. D is representative of two separate experiments. Scale bar, 50 μ m. NS, nonsignificant. * $P < 0.05$.

3-2 急性肺傷害における YKL-40 の効果

3-2-1 急性肺傷害モデルにおける YKL-40TG の効果

BRP-39 とヒトオルソログである YKL-40 の機能をさらに調べる目的で、BRP-39KO/YKL-40TG マウスを用いて解析を行った。このマウスは、BRP-39 を産生せず、肺の気道上皮細胞においてのみ YKL-40 を産生する。このマウスを用いた解析では、内因性の BRP-39 の影響を受けず、高濃度酸素曝露条件下での気道上皮細胞の YKL-40 の機能のみを評価することが可能である。

BRP-39KO/YKL-40TG マウスでは気道上皮細胞のみに YKL-40 を発現させた結果、BRP-39 遺伝子欠損マウスと比べて、高濃度酸素曝露下の生存期間が延長した (Fig. 28A)。また、BRP-39 遺伝子欠損マウスで増加が観察された BALF 中総細胞数 (Fig. 28B)、BALF 中へのマクロファージ、好中球浸潤数 (Fig. 28C) や、肺組織中の炎症細胞浸潤 (Fig. 28F) は、気道上皮細胞特異的な YKL-40 の発現により、野生型マウスレベルにまで回復した。また、ケモカイン産生 (Fig. 28D and E)、TUNEL 陽性細胞数の割合 (Fig. 28G)、活性化 caspase-3 (Fig. 28H)、生存率 (Fig. 28I) のいずれのパラメータも気道上皮細胞特異的な YKL-40 の発現により、野生型マウスレベルにまで回復した。

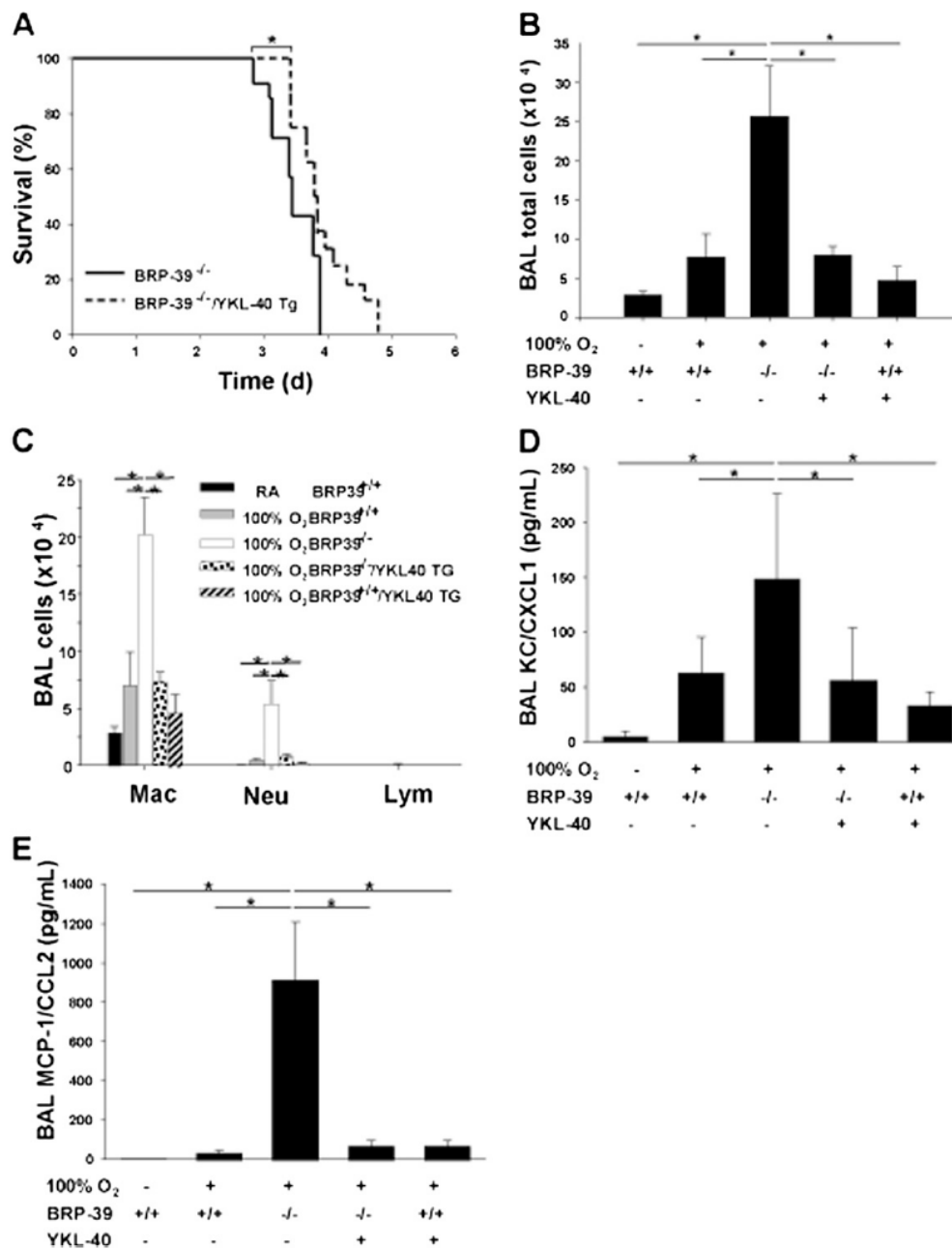


Fig. 28 Effects of transgenic YKL-40 on hyperoxia-induced bronchoalveolar lavage (BAL) and tissue responses.

Wild-type (WT) (+/+) mice, mice with null mutations of breast regression protein (BRP)-39 (BRP-39^{-/-}) mice, and BRP-39^{-/-} mice that express transgenic YKL-40 only in respiratory epithelium (BRP-39^{-/-} / YKL-40 + mice) were exposed to room air (RA) or 100% O₂. (A and D) Survival was assessed. After 72 hours of hyperoxia, BAL total cell recovery (B), differential cell recovery (C), the levels of BAL KC/CXCL1 (D) and MCP-1/CCL-2 (E), lung tissue

histology (F; hematoxylin and eosin stain), and the percentage of terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)–positive cells (G) were also assessed. Caspase-3 activation and ICAD cleavage were evaluated (H). The data in A and I represent assessments in a minimum of eight mice. The values in B–E and G are the mean (\pm SEM) of evaluations in a minimum of five animals, and are representative of two separate experiments. (F and H) Representative of four similar evaluations. Scale bars, 100 μ m. * P < 0.05.

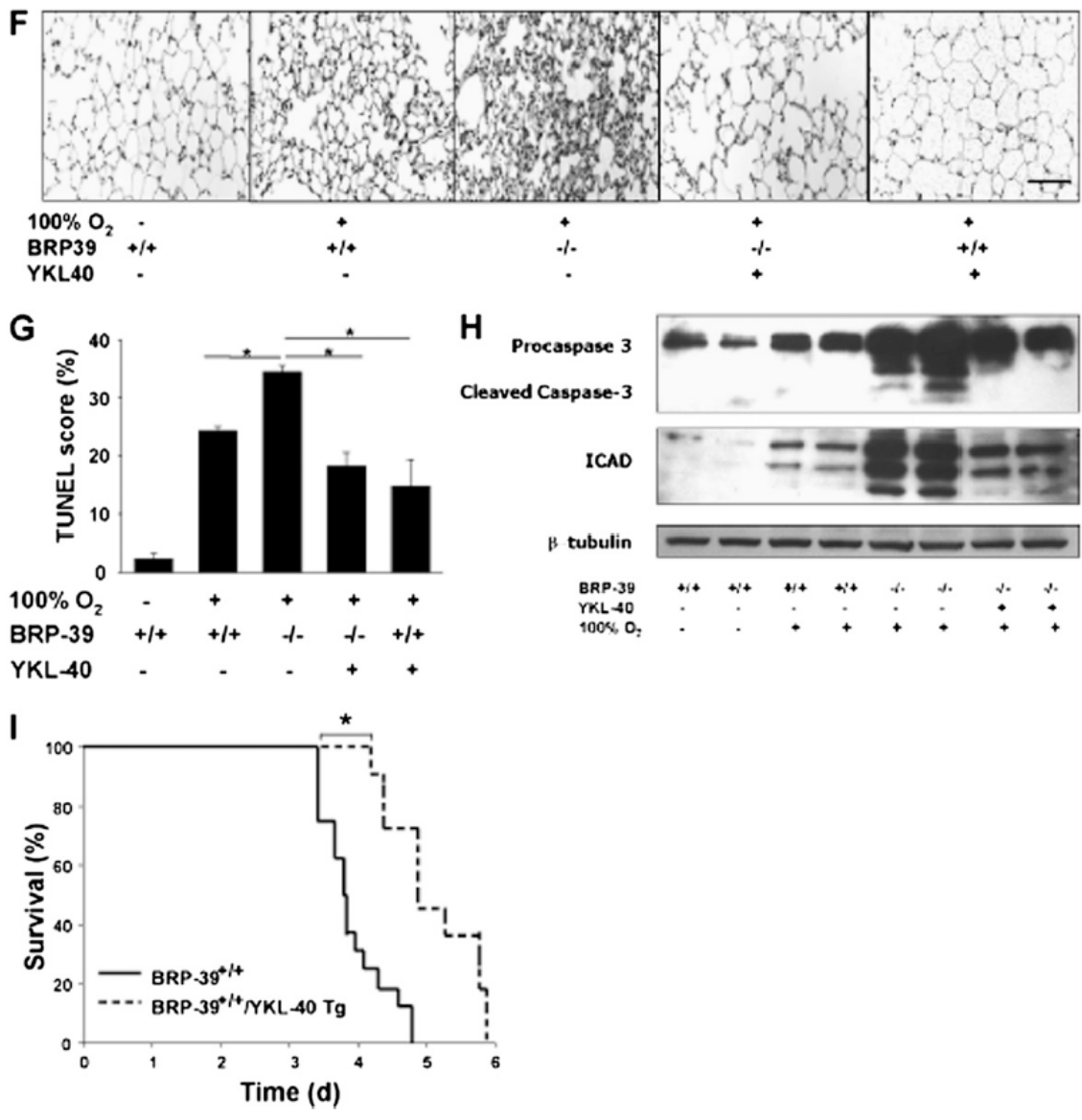


Fig. 28 (Continued). Effects of transgenic YKL-40 on hyperoxia-induced bronchoalveolar lavage (BAL) and tissue responses.

3-2-2 高濃度酸素負荷 BRP-39 遺伝子欠損マウスにおける caspase-3

の寄与

炎症や肺胞透過性と caspase-3 の影響を調べる目的で、野生型マウス、BRP-39 遺伝子欠損マウス、caspase-3 遺伝子欠損マウスに加えて、BRP-39 と caspase-3 を両方欠損させた BRP-39KO/caspase-3KO マウスを用いて、さらに解析を行った。これまでの試験結果と符合して、野生型マウスでは高濃度酸素負荷によりマクロファージ (Fig. 29B)、好中球 (Fig. 29C) が浸潤する炎症反応が確認され、BRP-39 遺伝子欠損マウスではそれがさらに亢進した。

一方、BRP-39KO/caspase-3KO マウスでは、BALF 中、肺組織中の炎症反応は顕著に減弱した (Fig. 29A-C)。BRP-39 遺伝子欠損マウスで観察された肺胞キャピラリー透過性の変化に伴う BALF 中へのタンパク質漏出も、caspase-3 を欠いたマウスでは顕著に減弱した (Fig. 29D)。以上の結果から、高濃度酸素負荷条件下の野生型マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスの炎症と肺胞キャピラリー漏出の変化に、アポトーシスのシグナルを担う主要な要素である caspase-3 が寄与していることが分かった。

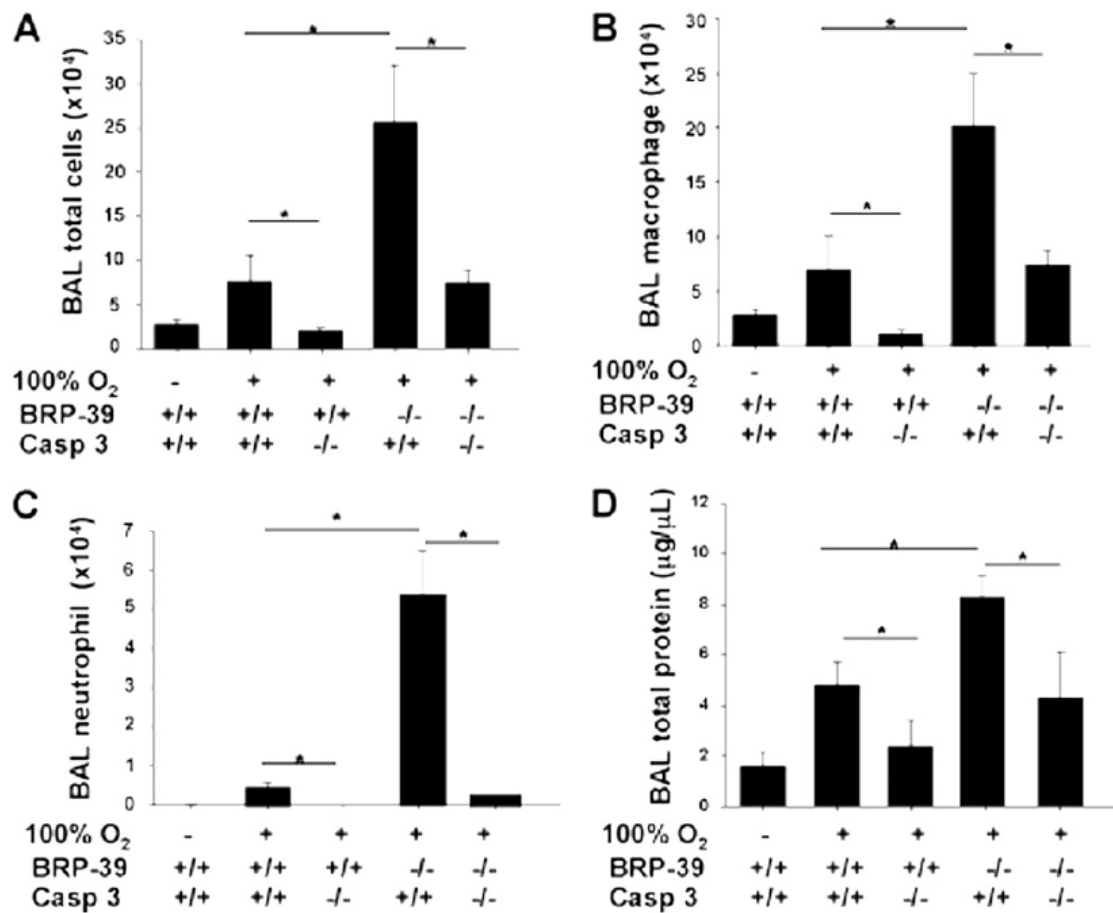


Fig. 29 Roles of caspase-3 in breast regression protein (BRP)-39 regulation of hyperoxia-induced responses.

Wildtype (WT) (+/+) mice, BRP-39(-/-) mice, caspase-3(-/-) mice, and BRP-39(-/-) / caspase-3(-/-) mice were exposed to room air (RA) or 100% O₂ for 72 hours, and bronchoalveolar lavage (BAL) total cell recovery (A), BAL macrophage recovery (B), BAL neutrophil recovery (C), and BAL protein (D) were assessed. The values represent the mean (\pm SEM) of evaluations in a minimum of five animals, and are representative of two separate experiments. Casp 3 = caspase-3. * $P < 0.05$.

3-2-3 BPD 発症と YKL-40 濃度の解析

これまでのマウスにおける発見がヒトの病態に外挿できるかどうかを確認するために、BPD を発症しなかった新生児と、発症もしくは死亡した新生児の気管支吸引液中の YKL-40 濃度を測定した。両群に、出生前のステロイド使用、帝王切開出産の割合、男子の割合、在胎期間、酸素吸入療法の程度で有意差を認めなかったが、出生時の体重は BPD 発症群で有意に低かった。(Table 4) また、BPD 群では、界面活性剤の用量、侵襲的な人工呼吸時間、酸素吸入期間が有意に高く、肺の病態がより重症であると考えられた。YKL-40 は、新生児の気管支吸引液中に容易に検出することができ、BPD 群では、BPD 非発症群に比べて YKL-40 濃度が有意に低かった (Fig. 30)。

Table 4 DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUPS (NO BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA AND BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA OR DIED)

	No BPD (n = 4)	BPD or Died (n = 5)	P Value
Prenatal steroids, %	3 (75)	5 (100)	0.44
C-section delivery, %	3 (75)	5 (100)	0.44
Male sex, %	1 (25)	3 (60)	0.52
Gestational age, wk	26.2 ± 1.8	26.3 ± 1.6	0.92
Birth weight, g	898 ± 111	704 ± 81	0.02
Apgar @ 1 min ≤ 3, %	1 (25)	2 (40)	1.00
Apgar @ 5 min ≤ 7, %	1 (25)	1 (20)	1.00
TA sample collected, d	2.3 ± 1.3	2.4 ± 1.7	0.89
Maximum FI _O ₂ (on TA sample collection day)	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.49
Survanta, doses	1.0 ± 0.0	2.2 ± 0.8	<0.05
ETT PPV, d	7.3 ± 8.8	43.8 ± 11.4	0.001
Oxygen, d	28.8 ± 10.1	68.0 ± 16.9	0.005
Length of hospitalization, d	65.0 ± 14.5	68.4 ± 16.9	0.76

Definition of abbreviations: BPD = bronchopulmonary dysplasia; ETT PPV = endotracheal tube positive pressure ventilation; TA = tracheal aspirate.

Values are expressed as means (±SD).

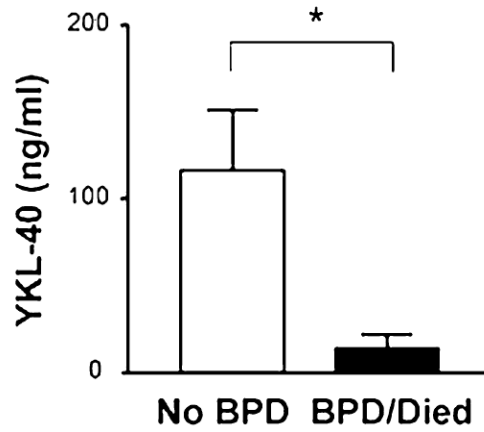


Fig. 30 YKL-40 protein in tracheal aspirates from premature babies with respiratory failure requiring mechanical ventilation and O₂ supplementation.

The levels of YKL-40 were evaluated by ELISA. The values represent the mean (\pm SEM) of evaluations in patients that developed bronchopulmonary dysplasia (BPD) or died (n = 5) and those that did not develop these complications (No BPD; n = 4). * $P < 0.05$.

3-3 考察

本章では、病態メカニズムに炎症とアポトーシスが関与する呼吸器疾患として、急性肺傷害に着目した。高濃度酸素により急性肺傷害を惹起した病態マウスを用いて、BRP-39 の病態生理学的役割を解析した結果、高濃度酸素負荷条件下では、酸化ストレス依存的なメカニズムにより BRP-39 の発現が抑制されることが分かった。

野生型マウスと比較し、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは高濃度酸素負荷時に肺泡キャピラリー透過性の亢進、BALF 中への炎症細胞浸潤、ケモカイン産生亢進と生存率の低下、肺泡ならびに上皮細胞のアポトーシスの亢進が確認された。BRP-39 を産生せず、肺の上皮細胞においてのみ YKL-40 を産生する BRP-39KO/YKL-40TG マウスを用いて、同様の解析を行ったところ、BRP-39 遺伝子欠損マウスのいずれの表現型も回復されたことから、BRP-39 は、高濃度酸素負荷条件下の酸化傷害、DNA 損傷、炎症反応、細胞死を制御していることが明らかとなった。

急性肺傷害 (Acute Lung Injury, ALI) は、臨床的に重症の患者に突然起こる呼吸不全の一種であり、特に発症前後の重篤な状態を急性呼吸急迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) と呼ぶ。米国では年間に 20 万人が罹患していると報告され²⁵⁾、死亡率は治療法の進歩にも関わらず、25~50%に及ぶ²⁶⁾。ALI/ARDS は直接的、間接的に肺を傷害する多数の疾患によって引き起こされ、要因、関連する遺伝子も多く複雑な疾患である。近年では、サイトカイン、血圧制御因子、免疫系、転写制御、抗酸化などに関わる遺伝子多型が報告され²⁶⁾、発症要因との関連が示唆されている。

caspase-3 遺伝子欠損マウスで、高濃度酸素負荷条件下の炎症反応が抑制された結果からは、細胞死も過剰酸素による肺傷害に関与する可能性があることが示唆された。BRP-39 が、アポトーシスや細胞死に保護的な役割を果たす可能性があることを考え合わせれば、BRP-39/YKL-40 産生は病態を緩和することに寄与していることになる。

本章ではマウスで得られた知見のヒトへの外挿性を判断する目的で新生児における BPD 発症の有無と気管吸引液中の YKL-40 濃度の関係を調べた。この結果、BPD 非発症群では、BPD 発症群に比べて有意に高い YKL-40 濃度を検出した。こ

の結果は、YKL-40 による肺病態の緩和を示唆している。酸素負荷による肺傷害が
発症要因の一つとされる BPD は、新生児に一般的に見られる慢性肺疾患である¹⁰¹⁾。
しかし、現在、BPD を予防もしくは、発症後の症状を緩和する効果的な治療法が
なく、発症を予測するバイオマーカーも確立されていない。気管吸引液中 YKL-40
濃度は、BPD 発症の予見に役立つ可能性がある。

総括

BRP-39 は、キチン分解活性を持たないキチナーゼ様タンパク質(CLP)である。キチナーゼ及びキチナーゼ様タンパク質は、外来抗原に対する曝露機会の多い臓器において多く産生されることが報告されているが、病態時における生理的役割は明らかにされていない。本研究では、BRP-39 の呼吸器疾患における生理的機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

第 1 章では、BRP-39 の機能解析の過程で明らかになった知見から BRP-39 の気管支喘息における潜在的な役割について考察を行った。

まず BRP-39 がどのような環境により発現誘導されるかを検討した。OVA で誘発される喘息モデルマウスの肺や、肺特異的に IL-13 を過剰産生する IL-13TG マウスの肺において、BRP-39 の発現誘導が確認されたことが、同分子のアレルギー性炎症における役割に着目した端緒である。

免疫組織化学的方法によって、BRP-39 は気道上皮細胞や、肺胞マクロファージが産生することが分かった。気道上皮細胞は、外部からの刺激因子に最初に曝露される細胞である。気道上皮細胞は、空気と接する細胞表面の繊毛運動と粘液層によって異物を排除する宿主防御機構を担っているほか、種々の刺激に反応して喘息の病態に関与するサイトカインや接着分子を発現する。肺胞マクロファージは、単球由来の免疫担当細胞であり、肺において気道上皮細胞に付着した細菌や微生物を細胞内に取り込んで排除する貪食機構によって、やはり最初に宿主防御の役割を担う細胞である。

気管支喘息の発症要因において、呼吸器が細菌、微生物、スギ花粉、ダニといった様々な抗原に曝露されたときの宿主の免疫応答は、病態の根幹をなす機構である。OVA とアラムゲルで免疫し、OVA を繰り返し吸入曝露させたマウスでは、OVA 特異的な Th2 細胞が分化・誘導され、喘息に似た症状を発症する。

第 1 章では、BRP-39 が持つ生理的作用をさらに解析する目的で、BRP-39 欠損マウスを作製し、OVA 誘発 Th2 炎症反応惹起時の表現型を野生型マウスと比較した。この結果、BRP-39 欠損マウスでは、野生型マウスで認められた抗原刺激による脾細胞分化が抑制された。

次に抗原提示と T 細胞分化における BRP-39 の役割をさらに調べるために、樹状細胞について比較を行った。

抗原提示と T 細胞分化に関わる樹状細胞は、大きく二つの細胞集団に分けられる。ミエロイド系（骨髄系）樹状細胞（mDC）は、DC1 細胞に成熟し、ナイーブ T 細胞を IFN- γ を産生する Th1 細胞に分化させる特徴を持つ。また、リンパ球系樹状細胞（pDC）は DC2 細胞に成熟し、ナイーブ T 細胞を IL-4 を産生する Th2 細胞に分化させる。

BRP-39 欠損マウスでは、mDC と pDC の集積が減少した。また、抗原提示細胞の活性化、成熟化のマーカーであり、抗原提示細胞上に発現して、ナイーブ T 細胞の活性化に関わる共刺激分子 CD40/CD86 の発現も有意に減少していた。BRP-39 を欠損させたことが、なぜ DC の集積と共刺激分子の発現低下に繋がったかは、一連の検討で明らかになっておらず、今後の検討課題であるが、BRP-39 は抗原提示とナイーブ T 細胞活性化に寄与することが分かった。BRP-39 欠損マウスでは、樹状細胞の集積や共刺激分子の発現が抑制された結果とも符合して、抗原特異的 IgE 産生も抑制された。

BRP-39 の発現細胞である気道上皮細胞は、線維芽細胞との相互作用を介して気道のリモデリングへの関与が示唆される細胞である。また、上皮細胞自体が、TGF- β などの刺激により間葉系様の細胞に形態変化する現象（上皮間葉転換/epithelial-mesenchymal transition : EMT）も知られており^{102, 103}、細胞外基質の蓄積や組織の線維化を介して、喘息の重症化にも密接に関連する細胞である。

Th2 炎症反応の主要なエフェクターサイトカインである IL-13 を肺特異的に過剰発現させた IL-13TG マウスでは、BAL や肺組織での炎症や、CD4 陽性 T 細胞の集積、肺組織の組織学的・生化学的線維化が観察される一方で、気道上皮細胞や肺泡マクロファージで BRP-39 が誘導されることが分かった。

IL-13TG マウスと BRP-39KO マウスを交配して新たに作出した IL-13TG/BRP-39KO マウスと IL-13TG マウスとの表現型の比較から、IL-13 下流の Th2 エフェクター分子としての BRP-39 の機能解析を行った。この結果、IL-13TG の表現型の特徴であった、BAL や肺組織での炎症や、CD4 陽性 T 細胞の集積、肺組織の組織学的・生化学的線維化はいずれも BRP-39 遺伝子欠損により有意に減少した。この結果から BRP-39 は喘息の病態生理において、炎症と気道リモデリングを引き起こす IL-13 のエフェクター機能を担う分子であることが分かった。

喘息の難治化に IL-13 が密接に関わることを序論で述べた。すなわち、肥満細胞の活性化と IgE 産生の増幅という過程に関わるだけでなく、気道上皮細胞や線維芽細胞のような非血球系の組織構成細胞における粘液過分泌、気道過敏性亢進やリモデリングを引き起こ

す要素である点である。これらの組織構成細胞における IL-4 受容体/IL-13 受容体の発現分布も IL-13 によるこれらの作用を特徴づけており重要である。

高用量吸入ステロイド薬と長時間作用性 β 2 刺激薬を一定期間実施しても、症状が毎日出現するコントロールできない喘息（＝最重症持続型）を難治性喘息という。疫学的な予測値では 2019 年には日米欧の喘息診断者数予測が 3633 万人に対して、重症持続型患者数はその 18%に相当する 634 万人に上ると推定されている¹⁰⁴⁾。このような重症喘息患者を対象に、ステロイド吸入と気管支拡張薬に加えて IgE 抗体を使用しても 4 割の患者は十分なコントロールに至らないとされている。難治性喘息患者は、夜間症状や、治療下においても起こる発作によって、日常生活が制限を受ける状態にある。

難治性喘息の特徴の一つは、ステロイド治療に抵抗性を示す点である。また、症状や発作の誘引、気道炎症の解析から種々の表現型（phenotype）の存在が明らかになっており、生理学的・病理学的多様性に富んでいることも特徴である。このような既存薬で治療可能な気管支喘息とは異なる疾患概念が必要であり、新たな治療戦略が必要である。

こうした治療戦略の一つとして着目されたサイトカインが IL-13 の制御である。難治性喘息を対象にして、現時点で少なくとも 4 社が IL-13 モノクローナル抗体を開発中であるが¹⁾、この中でも特に Roche 社が開発するレプリキツマブの治験結果¹⁰⁵⁾が興味深い。同治験は、吸入ステロイドなどの治療でコントロール不良の患者に対して、レプリキツマブの上乗せの治療効果を検証した第 II 相臨床試験である。同治験では、細胞外マトリックスタンパク質の一つであるペリオスチンに着目し、血中ペリオスチン濃度によって患者を層別化すると、層別化を行わないと検出できなかった呼吸機能改善効果が、統計学的に有意な効果として検出されている。ペリオスチンは、気道上皮細胞や肺の線維芽細胞で、IL-13 により発現が誘導される分子であり¹⁰⁶⁾、喘息患者を層別化する IL-13 誘導性の遺伝子の一つとして抽出された分子の一つである¹⁰⁷⁾。Roche 社のプレスリリースによれば、同社はペリオスチンを患者層別化の診断薬として開発し、レプリキツマブと同時期に市場に投入することを開発戦略に織り込んでいる。第 1 章で明らかにした BRP-39 / YKL-40 は、IL-13 により誘導される分子の一つである。今後、YKL-40 そのものを治療標的とした抗体医薬の開発の可能性があり、難治性喘息においては、薬剤の効果を最大化するための患者層別化マーカーとして利用される可能性がある。

BRP-39 の機能解析を進める過程で、BRP-39 のもつ抗アポトーシス作用が明らかになった。IL-13TG/BRP-39KO マウスでは、肺組織の炎症と組織の線維化が抑制されるとともに、炎症細胞のアポトーシス亢進が起こる。脾細胞を用いた *in vitro* 実験系では、TNF- α や Fas リガンドを添加して得られるアポトーシス様反応（活性化 caspase-3 や Fas 発現量の亢進）が、リコンビナント BRP-39 の添加により抑制されることを明らかにし、BRP-39 が抗アポトーシス作用を有する分子であることを明らかにした。アポトーシスは、生物の個体発生の過程や細胞数のホメオスタシス、がん抑制、感染防御に必要な機構であり、種々の疾患で病態メカニズムの一旦を担っていると考えられる。

第 2 章では、病態メカニズムに炎症とアポトーシスが関与する呼吸器疾患として、COPD に着目し、たばこ煙をマウスに長期間曝露して得られる病態マウスを用いて、BRP-39 の病態生理学的役割を解析した。

まず BRP-39 がどのような環境により発現誘導されるかを検討した。この結果、たばこ煙曝露により BRP-39 の発現が誘導されることが分かった。たばこ煙曝露によって同様に発現が誘導される IL-18 シグナル^{79, 80)}に着目し、IL-18 シグナルを遮断する IL-18 受容体欠損マウスでは、BRP-39 の発現が有意に低下することを明らかにした。IL-18 は、IL-1, IL-33 と共に IL-1 ファミリーに属するサイトカインであり、T 細胞分化を Th1 優位に傾ける一方で、Th2 細胞の分化や IgE 産生のコファクターとしても機能することが知られている^{108, 109)}。

IL-18 を肺特異的に過剰発現させたマウスでは重度の肺気腫が誘導されることが報告されており¹¹⁰⁾、次に BRP-39 を欠損させたマウスに対してたばこ煙を長期間曝露させ、野生型マウスで誘導される肺気腫がどのように変化するかを比較した。その結果、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、平均肺胞径が拡大し、肺気腫がさらに進行することが分かった。BRP-39 欠損マウスでは、肺胞マクロファージ、好中球に加えて、気道上皮細胞および肺胞 II 型上皮細胞の Fas 発現が有意に亢進し、caspase-3 の活性化、アネキシン V の発現上昇で確認されるアポトーシスの進行が確認された。本来、内因性の BRP-39 分子が持っている抗アポトーシス効果が解除され、組織を構成する構造細胞のアポトーシス進行が気腫化の進行を早めたものと考えられた。BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、BALF 中への炎症細胞浸潤の有意な低下が認められた。構造細胞と同様にこれも炎症細胞にアポトーシスが進行した結果、生細胞数が減少したものと考えられた。

BRP-39 の炎症細胞の細胞死を阻害する効果は、第 1 章の *in vitro* でのリコンビナント

BRP-39 の添加実験からは、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に及ぶ高濃度の BRP-39 を必要とする。OVA・アラムゲルを腹腔内に免疫・OVA を吸入曝露するマウス喘息モデルでは、BALF 中に回収される BRP-39 の濃度が 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることを考えると、生理的条件下における作用からは乖離があるといえる。

このことから喘息や COPD といった疾患の創薬標的として YKL-40 を考える場合、恒常性維持に必要な生理的な濃度が存在することに留意する必要がある。

ヒト肺組織サンプルを用いた解析結果も、マウスでの実験結果と符号するものであった。喫煙者の肺組織中の肺胞マクロファージ、気道上皮細胞において YKL-40 発現量が増加していることが確認され、血清中 YKL-40 量も喫煙歴、年齢と相関することが示された。COPD を罹患していない喫煙者と比較し、COPD を罹患している喫煙者の方が有意な YKL-40 の高値を認めたが、重症度（病期）との相関を認めるには至らなかった。病期分類で再分化すると例数が少なくなることも統計解析には影響を与えたと考えられる。

ごく最近、第 2 章の研究結果を支持する結果が報告された¹¹¹⁾。IL-18 を肺特異的に過剰発現させたマウスにおいて BRP-39 の発現上昇が確認され、COPD 患者においても当研究より多くの患者サンプルを用いて、血清中 YKL-40 レベルの上昇が確認されている。臨床では肺気腫の進行は、CT スキャンを用いた診断によって LAA% で評価され、全肺野に対して、低吸収領域（low attenuation area : LAA）の割合が大きいことが病理学的な肺気腫の進展を反映するとされる。同論文では、血清中 YKL-40 レベルと LAA% が正の相関を示す結果が報告されており、第 2 章の研究結果がさらに支持された結果となった。

COPD は患者毎に発症要因がさまざまであり、薬剤の治療効果を示す治験においては、比較群間、群内の病態の多様性が治療効果の検出力を下げる課題があった。また、COPD は慢性に進行する疾患であり、治験期間が長いものでは 3 年の長期に及ぶ。臨床サンプルを用いた解析においては、解析時点のみではなく、病態の進行程度を予測するマーカーとしての意義が確立されれば、COPD の呼吸機能の経年低下を抑制する新薬の開発に貢献できると考えられる。

第 3 章では、BRP-39 の機能の中でも、肺の構造細胞に保護的に働き、ホメオスタシス維持に寄与する機構をさらに追及した。炎症性の肺疾患として急性肺傷害に着目し、高濃度酸素により急性肺傷害を惹起した病態マウスを用いて、BRP-39 の病態生理学的役割を解析

した。

この結果、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは高濃度酸素負荷時に肺胞キャピラリー透過性の亢進、BALF 中への炎症細胞浸潤、ケモカイン産生亢進と生存率の低下、肺胞 II 型上皮細胞ならびに気道上皮細胞のアポトーシスの亢進が確認された。

気道上皮細胞は、高濃度酸素曝露のような外部環境の変化を最初に直接的に受ける肺の構造細胞である。さらに気道上皮細胞における BRP-39 の役割を明らかにする目的で、内因性の BRP-39 の影響を排除し、肺の気道上皮細胞においてのみヒト由来の YKL-40 を産生する BRP-39KO/YKL-40TG マウスを新たに作出し、表現型を BRP-39 遺伝子欠損マウスと比較した。この結果、BRP-39 遺伝子欠損マウスで確認されたいずれの表現型も BRP-39KO/YKL-40TG では回復することが確認された。

一連の実験結果によって、気道上皮細胞における BRP-39 は高濃度酸素負荷条件下の酸化傷害、DNA 損傷、炎症反応、細胞死に対して保護的に働いていることが明らかとなった。

以上のマウスで得られた知見は、臨床サンプルを用いて行われた解析結果とも符合した。新生児における BPD 発症の有無と気管吸引液中の YKL-40 濃度の関係を調べたところ、BPD 非発症群では、BPD 発症群に比べて有意に高い YKL-40 濃度が検出された。この結果から、BRP-39/YKL-40 産生は病態緩和に寄与することが示唆され、発症を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

以上述べたように本論文では、第 1 章で得られた BRP-39 の分子機能の発見に基づいて、各呼吸器疾患の病態モデルマウスを用いて BRP-39 の生理的役割の解明を試みた。また、BRP-39 のヒトオルソログである YKL-40 の発現解析結果から、一連の発見が臨床病態へ外挿しうるものであることを示した。

アンメットメディカルニーズの高い難治性疾患の治療薬開発には、病態の発症機序の解明に加え、診断と治療の指標となるバイオマーカーの確立が不可欠である。本研究では、遺伝子欠損マウスやトランスジェニックマウスを用いた研究により呼吸器疾患における BRP-39/YKL-40 の生理的役割の一部を明らかにした。また、ヒト組織を用いた研究により BRP-39/YKL-40 がバイオマーカー候補となることを示した。今後、呼吸器疾患の新たな治療薬開発の可能性に繋がることが期待される。

実験の部

実験材料並びに実験方法

第 1 章 気管支喘息における BRP-39 の役割

1-1 Th2 炎症反応における BRP-39 の機能

<実験方法>

1. 遺伝子改変マウスの作製

実験には、野生型マウスとして Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを用いた。

BRP-39 遺伝子欠損マウスは、相同組換えによりまずエクソン 1-6 と BRP-39 のプロモーターの一部を欠損したベクターを構築し (Fig. 31A)、PCR、mRNA、ウェスタンブロットにより、BRP-39 の欠損を確認した (Fig. 31B-D)。Embryonic stem cell を作製し、129/C57BL/6 混合系統の BRP-39KO マウスを作製したのち、さらに 10 世代以上の交配を行い、C57BL/6 系統もしくは、Balb/c 系統として、野生型マウスと系統背景を合わせたマウスを実験に用いた。

YKL-40 の発現を肺特異的に誘導するマウスには、Tet-On システムを用いた。Tet-On システムでは、ドキシサイクリン含有水でマウスを飼育し、肺特異的な YKL-40 発現を誘導することができる。

この YKL-40TG マウス (CC10-rtTA-tTS-YKL-40) は、3 種のベクターを受精卵に導入して、作製した。すなわち、Clara Cell 10 kDa protein (CC-10) プロモーター下流にテトラサイクリン制御性の転写サイレンサー (tTS)をつないだベクター、CC-10 プロモーター下流にテトラサイクリン制御性の転写活性化因子 (rtTA)をつないだベクター、テトラサイクリンオペレーター、CMV プロモーター下流にヒト YKL-40 cDNA をつないだベクターを作製し、TG マウス作製に用いた (Fig. 32)。

また、BRP-39 を欠損し、YKL-40 を肺胞上皮細胞でのみ発現するマウスは、これらの BRP-39 遺伝子欠損マウスと YKL-40TG マウス

を交配することによって作製した。

また、IL-13 をドキシサイクリン誘導下に肺特異的に過剰に産生する IL-13TG マウス (CC10-rtTA-IL-13) も、YKL-40TG マウスの作製手順に準じる方法により作製した。すなわち、肺特異的に rtTA を発現させるベクターを用い、ドキシサイクリン存在下に IL-13 の発現を誘導できるしくみを用いた⁷¹⁾。

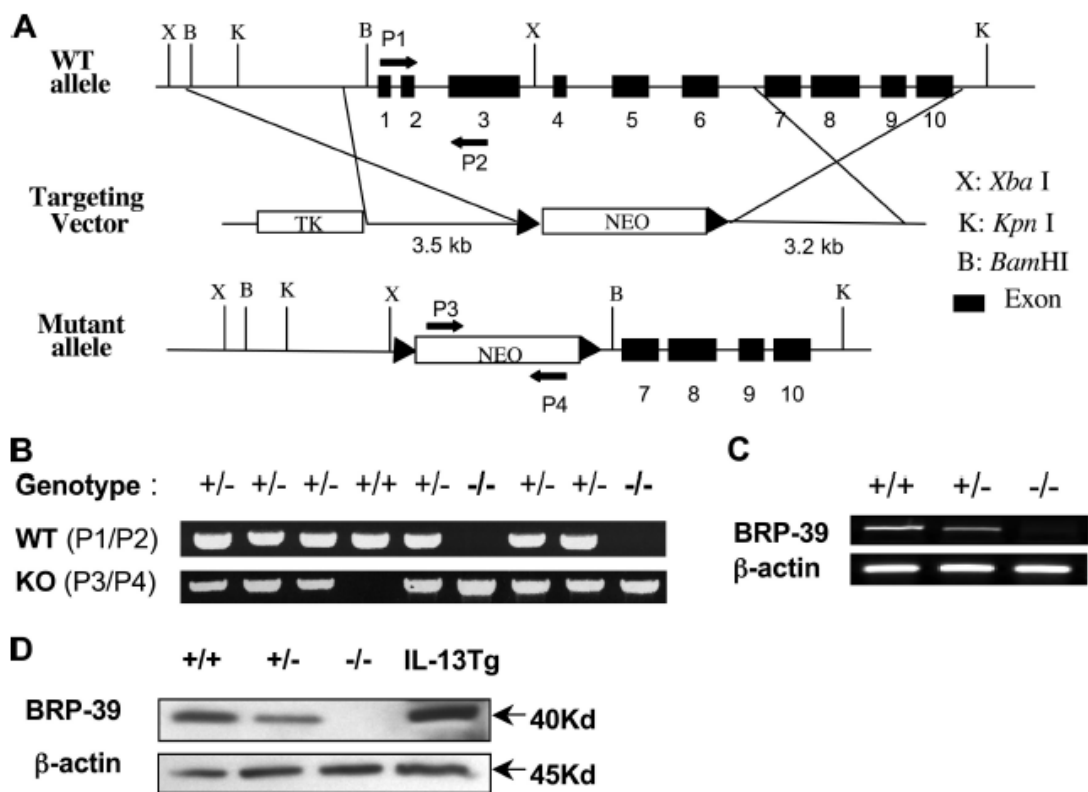


Fig. 31 Generation of BRP-39 null mutant mice.

(A) A targeting vector was constructed by replacing a 4.5-kb genomic region, including exons 1–6 and part of the BRP-39 promoter, with the neomycin (neo) resistance gene cassette to ensure disruption of BRP-39 protein expression. (B) The targeting vector was transfected into embryonic stem cells. Cells with appropriate recombinations were selected with G418 and gancyclovir. BRP-39 stem cells with appropriate mutations were identified using Southern blotting, homologous mutants were injected into C57BL/6 blastocysts, and chimeric mice were generated. These chimeric animals were bred to generate homozygous null animals. BRP-39–null mutant mice were identified by PCR genotyping, using the primers (P1–P4) indicated in A. (C and D) RT-PCR (C) and Western blot analysis (D) confirmed the lack of BRP-39 expression in homozygous mutants.

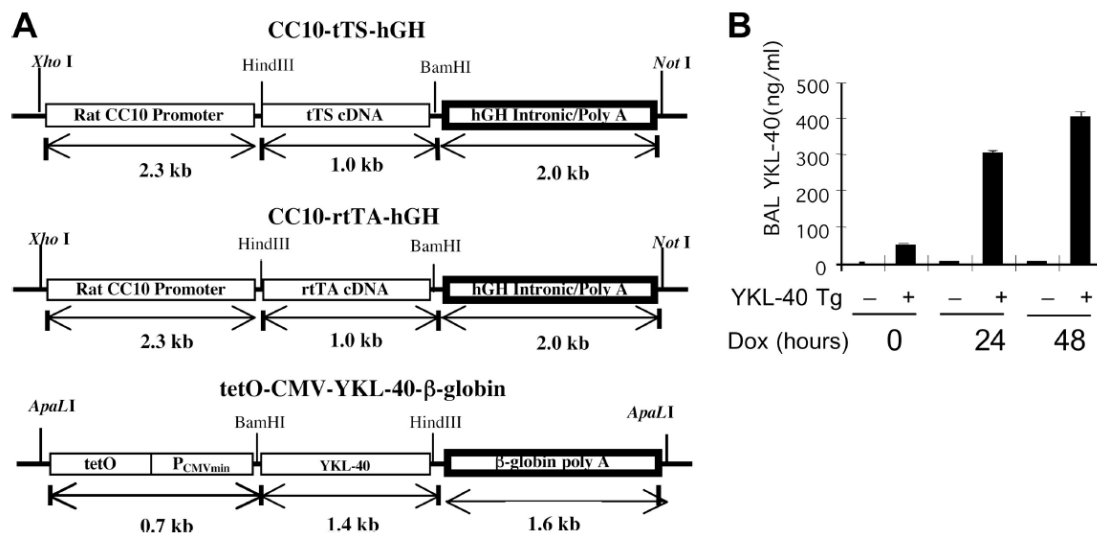


Fig. 32 Generation and characterization of inducibility of YKL-40 Tg mice.

(A) The constructs that were employed are illustrated. In the CC10-tTS-hGH construct, the Clara Cell 10-kD protein promoter (CC10 Promoter) was used to drive the tetracycline-regulated transcriptional silencer (tTS). In the CC10-rtTA-hGH construct, the CC10 promoter drives the reverse tetracycline controlled transcriptional activator (rtTA). The tetO-CMV-YKL-40-β-globin construct contains multimers of the tet operator, a minimal CMV promoter, and a human YKL-40 cDNA. All three constructs were simultaneously injected into fertilized eggs to generate leak-free triple transgenic mice. (B) The inducibility of the transgene was evaluated. In these experiments YKL-40 Tg mice were placed on dox and the levels of BAL transgenic protein were evaluated by ELISA at intervals thereafter. These are the mean \pm SEM of evaluations in a minimum of four animals and are representative of two separate evaluations.

2. OVA 誘発 Th2 反応

抗原誘発 Th2 反応を評価するため、次の方法でオボアルブミン (ovalbumin : OVA) 免疫、吸入曝露を行った。すなわち 6~8 週令のマウスに対し、10 μ g の OVA を含む 1 mg アラムゲル (Imject Alum; Thermo Fisher Scientific) 混合液を 1 日目、8 日目に腹腔内投与して免疫した。免疫補助物質 (Adjuvant) としてアラムゲル (水酸化アルミニウムゲルアジュバント, $\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ が主成分) を用いると IgE 抗体産生などの免疫反応を増強させることができる。偽免疫マウスは、同量の生理食塩水と 1 mg アラムゲルを腹腔内投与した。その後、19~21 日目に、OVA (1%, w/v) を 30 分間、吸入曝露した。エアロゾルはオムロン社超音波ネブライザー NE-07 (Omron Healthcare, Vernon Hills, IL) により発生させた。呼吸機能の測定、気管支肺胞洗浄液 (Broncho Alveolar Lavage Fluid: BALF) の回収は最終曝露から 1 日後に行った。

3. 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の回収

病態モデル動物の炎症の程度を評価する目的で、BALF 中に浸潤する総細胞数や上清中のサイトカインを測定した。BALF は麻酔下マウスの気管に挿管し、0.9 mL PBS を肺内に注入、回収する手順により行った。計 2 回繰り返して得られたサンプルを合わせ、これを遠心して得られたペレットより総細胞数、分画細胞数を評価した。上清は、使用するまで -70°C 保存した。

4. 免疫染色 (Immunohistochemistry; IHC)

単染色、二重染色による免疫染色は、Dr. Homer らの方法⁴⁷⁾により行った。BRP-39 に対するポリクローナル抗体は、ウサギ (New Zealand White Rabbit) に対して、免疫源として Keyhole limpet hemocyanin (KLH) に BRP-39 のペプチド 224-243 を結合した分子を免疫して得られたものを用いた。抗体の特異性は、ウェスタンブロット、ELISA によりマウス AMCcase、YM-1、YM-2、oviductin、chitotriosidase と

比較し、BRP-39 に選択的であることを確認して実験に用いた。Pro-surfactant protein C (pro-SPC) (Millipore)、CC10 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、CD45(BD)、F4/80 (eBioscience) に対する抗体はそれぞれ、肺胞 II 型上皮細胞、気道上皮細胞、マクロファージを特定するために用いた。染色の特異性は、一次抗体を使用しない実験や野生型マウスと BRP-39KO マウスの組織染色像を比較することにより確認した。

5. OVA 誘発 Th1 反応

OVA 誘発 Th1 反応の評価は、Becart らの方法¹¹²⁾を用いた。すなわち、フロイント完全アジュバント：CFA(Difco; BD Diagnostics) 溶液と 50 μ g OVA タンパク(Grade V; Sigma-Aldrich)を混合したものをマウスに皮下投与して初日と 14 日目に免疫し、Th1 反応を誘導した。非免疫マウスは、2 mg の CFA のみを免疫した。18 日目に OVA (5 mg/mL in 20 mL of PBS) を超音波ネブライザーによって霧化して 1 日あたり 30 分間、4 日間連続で抗原曝露を行って、最終抗原曝露より 18~24 時間後にマウスを解剖し、解析に用いた。

6. House Dust Mite(HDM, ダニ抗原)による免疫と吸入曝露

ダニ抗原による免疫と吸入曝露は、Zuleger らの方法¹¹³⁾を改変したものをを用いた。すなわち、免疫時に 10~50 μ g のダニ抗原と 1~4 mg のアラムゲルを混合して 0.5 mL とした溶液を週 1 回腹腔内免疫した。吸入曝露は、10 μ g のダニ抗原を OVA の方法と同様にネブライザーによって吸入曝露した。

7. 組織解析

肺を 0.5%低融点アガロースゲルを含む PBS で 25 cm 圧で伸展させて摘出し、Streck 溶液で固定した。ホルマリン固定の代わりに 50°Cに加温した 0.5%低融点アガロースを用いて肺を膨潤させる方法は、膨潤後に常温に戻してゲルを固定させることで、肺の葉の辺縁部まで均一に進展さ

せることができ、肺病理標本で肺胞径を正確に評価するのに適している。肺を固定後、左葉を病理解析に供し、パラフィン包埋切片を作製し、免疫染色を行った。

8. BRP-39/YKL-40、AMCase、Th2 cytokine、TGF- β 1 の定量

BALF、肺ホモジネート中の BRP-39 の定量は、ELISA 法により行った。ELISA は、1 次抗体として、抗 BRP-39 ウサギポリクローナル IgG 抗体を 2 次抗体として、ビオチン化抗 BRP-39 抗体を用い horseradish peroxidase-labeled streptavidin (GE Healthcare) を検出に用いた。このアッセイによる定量下限は、50 pg/mL である。YKL-40 も同様に MedImmune,Inc.により供給された抗体を用いた ELISA システムおよび、市販のキット (Quidel Corporation) を用いて測定した。他のキチナーゼファミリー遺伝子 (AMCase と chitotriosidase) との交差性がないことは、100 ng/mL の精製発現タンパクを用いて確認した。AMCase も同様に MedImmune,Inc.により供給された抗体を用いた ELISA システムで測定した。BALF 中の Th2 サイトカイン、活性化 TGF- β 1 は市販のキット (R&D Systems) を用いて測定した。

9. 抗原誘発 splenocyte 分化

Ovalbumin(OVA)をアラムゲルに懸濁させ、マウスに 1 日目、8 日目に腹腔内免疫した。19 日目にマウスより放血致死、脾臓を摘出した。単細胞懸濁液を調製し、脾細胞を 10% FCS、5 mmol/L L-glutamine、100 U/mL penicillin/streptomycin を含む RPMI 培地で 100 μ g/mL の OVA 添加、非添加下に 72 時間培養した。72 時間後にサイトカイン解析のために上清を回収し、細胞分化は、製造元のプロトコル (BD) に従い、培養液に添加した BrdU の細胞内への取り込み量により評価した。評価には、FACS DIVA software (BD)、FlowJo software (Tree Star, Inc.) を使用した。

10. OVA 特異的 IgE の定量

マウス OVA 特異的 IgE は、製造元のプロトコル (MD Biosciences) に従って ELISA 法により測定した。

11. BALF 中 Muc5ac の定量

マウスの気道の主要なムチンである BALF 中の Muc-5ac は、スロットブロット法¹¹⁴⁾を用いて評価した。スロットブロット法では、まず Minifold II (Schleicher & Schuell) を用いて 0.1 mL の BALF をニトロセルロース膜に転写し、空気乾燥させた後、5%スキムミルク TTBS (0.1% Tween20, 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl) 中で 2 時間ブロッキングを行った。3 回 TTBS で洗浄した後、抗 Mucin-5AC 抗体 (45M1; Neo-Markers) と 4°C で一晩インキュベーションして、TTBS で洗浄した。この後、HRP が結合した抗マウスもしくは、抗ヤギ IgG (Pierce) 抗体で室温下で 1 時間インキュベーションし、化学発光 (ECL Plus Western blotting detection system, Amersham Biosciences) によってムチンを定量した。

12. mRNA 解析

mRNA レベルの解析は、既報^{88, 115)}の方法に基づき、定量 PCR により行った。プライマー配列は、Primer Bank online (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>) により決定した。

13. 気道過敏性の評価

気道過敏性の評価は、既報¹¹⁶⁾の方法に基づき、霧化したメタコリンの濃度を 50 mg/mL の濃度まで漸増させて、呼吸抵抗を Flexivent で測定して行った。気道過敏性の評価は初回感作から 22 日目の最終 OVA チャレンジ 24 時間後に行った。

1-2 抗アポトーシス作用

<実験方法>

1. マクロファージ活性化の評価

肺胞マクロファージ及び 3% チオグリコレート誘発腹腔マクロファージは、10% FCS 含有 RPMI1640 培地で、10 μ g/mL rBRP39、5 ng/mL IL-4、10 mg/mL rAMCase の添加・非添加条件下、または 1 μ g/mL エンドトキシン (LPS) 添加条件下に 48 時間培養した。細胞は Protease Inhibitor Cocktail tablets (Roche) を含む 0.5% Triton X-100 で溶解し、arginase 1 bioassay (Bioassays Inc.) に供した。細胞表面マーカーの CD206 と MHC クラス II は、Stein らの方法¹¹⁷⁾により評価した。一酸化窒素は 50 μ L の Griess 溶液 (1% sulfanilamide/0.1% *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride/ 2.5% H₃PO₄) を含む 96 穴平底プレートに 50 μ L の試験溶液を添加することにより、griess 反応を惹起させて測定した。

2. TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色

アポトーシスに伴って切断された DNA の末端をラベルする方法である。DNA の断片化と細胞死は既報の方法⁸⁸⁾に基づいて評価した。

3. 脾細胞のアポトーシス・細胞死の評価

回収した脾細胞は、溶血後、10% FCS 含有 RPMI 1640 培地に再懸濁し、24 時間培養した。培養は、100 ng/mL マウス rTNF α (PeproTech)、100 ng/mL マウス rFasL (PeproTech) を添加し、10 μ g/mL マウス rBRP-39 (MedImmune, Inc.) 存在下、非存在下に行った。アポトーシスとネクローシスは、フローサイトメトリーを用いて、Annexin V、PI、CD95 (Fas)、活性化 caspase-3、phospho-Akt を既報の方法¹¹⁸⁾に基づいて評価した。

第2章 COPDにおけるBRP-39の役割

2-1 マウスたばこ煙曝露肺気腫モデルにおけるBRP-39の解析

<実験方法>

1. たばこ曝露

10週令のC57BL/6Jマウスを室内気またはResearch Cigarettes (2R4; University of Kentucky, Lexington, KY, USA)に曝露した。曝露は、Shapiroら¹¹⁹⁾により報告されている喫煙曝露装置を用いた。最初の1週間は、マウスをたばこ煙へ馴化させるために、1/2本のたばこを1日2回曝露させ、2週目以降は1本のたばこを1日2回曝露した。

2. 肺組織の解析

右の主気管を糸で結紮した後、左肺を0.5%低融点アガロースで30cmの一定圧で膨潤させた。この方法は、Halbowerら¹²⁰⁾によると肺実質を均一に広げることができ、肺胞径の解析に適している。

3. TUNEL

アポトーシスを起こした細胞を免疫組織化学的に観察するために、TUNEL In Situ Cell Detection Kit AP (Roche Diagnostics)を用いて、パラフィン包埋組織中の断片化されたDNAの3'-OH末端を染色した。染色の特異性は、反応をターミナルトランスフェラーゼ (terminal transferase)の有無で比較することにより確認した。

4. フローサイトメトリー解析

BALFと肺由来の細胞をフローサイトメトリー解析に供した。BALFは先述の方法で行った。全肺由来の細胞懸濁液は、Riceらの方法¹²¹⁾に従った。すなわち、肺組織をDispase(5 mg/ml; Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada), collagenase

(0.04%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 100 U/ml DNase I (Sigma-Aldrich)で消化した。遠心と溶血操作(11 mM KHCO₃, 152 mM NH₄Cl を含む氷冷溶血バッファーを使用し、4°C、400 g で 5 分間遠心)を数回繰り返して、細胞をストレイナーで濾し、最終的に 10 U/ml DNaseI を添加した FACS バッファー(PBS, 2% BSA, 2% FCS)に懸濁した。

懸濁した細胞は、Fc レセプターへの非特異的結合を防ぐために抗マウス CD16/CD32 モノクローナル抗体(1 mg per 10⁵ cells; BD Biosciences, San Diego, CA) を加えて室温下に 30 分間培養した。

細胞は、マクロファージおよび好中球を識別する目的で細胞表面マーカーF4/80、CD45、Gr-1、CD11b を特異的に認識する抗体を添加し、4°C下で 30 分間培養した。肺胞 II 型上皮細胞は、既報の方法¹¹⁸⁾に従って分画した。すべての試薬と FACS 試薬は BD Biosciences より入手した。抗体の飽和濃度は、予備試験で抗体の希釈系列から得られた情報により決定した。1 サンプルあたり 1 万個の細胞を解析し、特異的抗体の値から、アイソタイプコントロールの値を引いた平均の蛍光強度で算出した。解析は、解析ソフト Cell Quest (Becton-Dickinson、Franklin Lakes、NJ) を用いて行った。全ての実験は triplicate で行った。

2-2 喫煙者における YKL-40 発現解析

<実験方法>

1. ヒト肺組織中 YKL-40 の定量

YKL-40 発現とヒトにおける COPD 発症、喫煙歴との関係を評価する目的で試験を実施した。また、ヒト組織を用いた実験は、全ての患者の書面での同意を得て、Yale 大学のヒト組織調査委員会の承認を受けて実施した。肺組織は、1995 年から 1999 年までに Yale 大学で肺切除を受けた患者の組織を用いた。患者の疾患背景は、Table 2、3 に示すとおりである。

免疫染色は、ヒト YKL-40 抗体 (Rb204; 2204.087, MedImmune Inc.) を用いて行った。解析は、0-4 点の範囲 (0 : 染色されず、4 : 強い広範な染色像) でスコア化して行った。臨床データと組織染色結果の対応は、病理組織の一次評価者が分からないようにマスク化して実施した。一人の患者サンプルについて、重複のない独立した 10 の視野を選んで評価を行った。

2. ヒト血清中 YKL-40 の定量

YKL-40 の血清中濃度測定は、Yale 大学病院より Yale 大学喘息呼吸器疾患センター (Yale Center for Asthma and Airway ; YCAAD) に移され、GOLD ガイドライン¹⁸⁾により COPD と診断された患者および健常人血清を用いて実施した。

喫煙者は、10 pack years 以上の喫煙歴を持つ方と定義した。COPD 患者は、全て臨床症状と肺機能の低下 ($FEV_1\% = FEV_1/FVC < 70$) が認められた喫煙者であった。

第3章 急性肺傷害における BRP-39 の役割

3-1 高濃度酸素負荷によるマウス肺傷害モデル

<実験方法>

1. 高濃度酸素負荷

4~6 週令のマウスを気密性の高い Plexiglas チャンバー (55×40×50 cm) 内のケージに入れて、大気圧下に摂餌、摂水ができる条件下で飼育した^{98, 100, 122})。酸素濃度は酸素供給回路に組み込まれたスイッチに接続された酸素センサーにより常時確認した。

2. BALF 中の CXCL-1、CCL-2 の定量

BALF 中の CXCL-1、CCL-2 の定量は市販のキット (R&D Systems Minneapolis, MN) を用いて測定した。

3-2 急性肺傷害における YKL-40 の効果

<実験方法>

1. BRP-39KO/YKL-40TG マウスの作製

まず、第1章に示す方法で、YKL-40TG マウスを作製した。つぎに、ヒトオルソログである YKL-40 の機能をさらに調べる目的で、CC10-rtTA-tTS-YKL-40 マウスと BRP-39 遺伝子欠損マウスを交配させて、内因性の BRP-39 を欠損しているが、肺の上皮細胞特異的にヒト YKL-40 遺伝子を発現する BRP-39KO/YKL-40TG マウスを作製した。

2. ヒト気管吸引液中の YKL-40 の定量

YKL-40 発現とヒト気管支肺異形成症 (broncho-pulmonary dysplasia, BPD) の関係性を評価する目的で新生児の気管吸引液の YKL-40 量を定量した。全ての新生児が、気管挿管を必要とする呼吸急迫症状を持ち、少なくとも1回の界面活性剤と換気治療を行っている。この気管吸引液を用いた試験は、Yale 大学医学部のヒト組織調査委員会の承認を受けて実施した。患者の疾患背景は Table 4 に示すとおりである。

参考文献

1. Lopez, A.D., K. Shibuya, C. Rao, C.D. Mathers, A.L. Hansell, L.S. Held, V. Schmid and S. Buist, *Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections*. Eur Respir J, 2006. **27**(2): p. 397-412.
2. *Cancer. Fact sheet N°297* 2012; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
3. 喘息予防・管理ガイドライン2012. 2012, 協和企画.
4. *Pocket Guide for Asthma Management and Prevention (updated 2009)*. 2009.
5. Amin, K., D. Ludviksdottir, C. Janson, O. Nettelbladt, E. Bjornsson, G.M. Roomans, G. Boman, L. Seveus and P. Venge, *Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma*. BHR Group. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(6): p. 2295-301.
6. Gold, D.R. and A.L. Fuhlbrigge, *Inhaled corticosteroids for young children with wheezing*. N Engl J Med, 2006. **354**(19): p. 2058-60.
7. Poon, A.H., D.H. Eidelman, J.G. Martin, C. Laprise and Q. Hamid, *Pathogenesis of severe asthma*. Clin Exp Allergy, 2012. **42**(5): p. 625-37.
8. Holgate, S.T. and R. Polosa, *The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 780-93.
9. Durham, A., I.M. Adcock and O. Tliba, *Steroid resistance in severe asthma: current mechanisms and future treatment*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(7): p. 674-84.
10. Bosnjak, B., B. Stelzmueller, K.J. Erb and M.M. Epstein, *Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses*. Respir Res, 2011. **12**: p.

- 114.
11. Blease, K., C. Jakubzick, J. Westwick, N. Lukacs, S.L. Kunkel and C.M. Hogaboam, *Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma*. J Immunol, 2001. **166**(8): p. 5219-24.
 12. Izuhara, K., K. Arima, S. Kanaji, S. Ohta and T. Kanaji, *IL-13: a promising therapeutic target for bronchial asthma*. Curr Med Chem, 2006. **13**(19): p. 2291-8.
 13. Junttila, I.S., K. Mizukami, H. Dickensheets, M. Meier-Schellersheim, H. Yamane, R.P. Donnelly and W.E. Paul, *Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Ralpha, IL-13Ralpha1, and gammaC regulates relative cytokine sensitivity*. J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2595-608.
 14. Elias, J.A., T. Zheng, C.G. Lee, R.J. Homer, Q. Chen, B. Ma, M. Blackburn and Z. Zhu, *Transgenic modeling of interleukin-13 in the lung*. Chest, 2003. **123**(3 Suppl): p. 339S-45S.
 15. Zhu, Z., C.G. Lee, T. Zheng, G. Chupp, J. Wang, R.J. Homer, P.W. Noble, Q. Hamid and J.A. Elias, *Airway inflammation and remodeling in asthma. Lessons from interleukin 11 and interleukin 13 transgenic mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 2): p. S67-70.
 16. 喘息死ゼロ作戦評価委員会. 喘息死ゼロ作戦の実行に関する指針. [cited 2010; Available from: <http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/kenkou/ryumachi/jititai.html>.
 17. Suissa, S. and P. Ernst, *Use of anti-inflammatory therapy and asthma mortality in Japan*. Eur Respir J, 2003. **21**(1): p. 101-4.
 18. *GOLD Executive Summary*. 2009.
 19. Aizawa, H., *[Epidemiology of COPD in Japan: NICE study (Nippon COPD*

- Epidemiology Study*]. Nippon Rinsho, 2007. **65**(4): p. 599-604.
20. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
 21. 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第3版作成委員会, ed. *COPD 診断と治療のためのガイドライン*. Vol. 第3版. 2009, メディカルレビュー社.
 22. Hurst, J.R., J. Vestbo, A. Anzueto, N. Locantore, H. Müllerova, R. Tal-Singer, B. Miller, D.A. Lomas, A. Agusti, W. MacNee, P. Calverley, S. Rennard, E.F.M. Wouters and J.A. Wedzicha, *Susceptibility to Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(12): p. 1128-1138.
 23. Bernard, G.R., A. Artigas, K.L. Brigham, J. Carlet, K. Falke, L. Hudson, M. Lamy, J.R. Legall, A. Morris and R. Spragg, *The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(3 Pt 1): p. 818-24.
 24. 社団法人日本呼吸器学会 ARDS ガイドライン作成委員会, ed. *ALI/ARDS 診療のためのガイドライン*. 2010, 秀潤社.
 25. Rubenfeld, G.D., E. Caldwell, E. Peabody, J. Weaver, D.P. Martin, M. Neff, E.J. Stern and L.D. Hudson, *Incidence and outcomes of acute lung injury*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1685-93.
 26. Gao, L. and K.C. Barnes, *Recent advances in genetic predisposition to clinical acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **296**(5): p. L713-25.
 27. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
 28. Walton, M.K., *Biomarkers and Qualification A focus on drug development*.

- 1998.
29. Zhu, Z., T. Zheng, R.J. Homer, Y.K. Kim, N.Y. Chen, L. Cohn, Q. Hamid and J.A. Elias, *Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation*. Science, 2004. **304**(5677): p. 1678-82.
 30. Chupp, G.L., C.G. Lee, N. Jarjour, Y.M. Shim, C.T. Holm, S. He, J.D. Dziura, J. Reed, A.J. Coyle, P. Kiener, M. Cullen, M. Grandsaigne, M.C. Dombret, M. Aubier, M. Pretolani and J.A. Elias, *A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma*. N Engl J Med, 2007. **357**(20): p. 2016-27.
 31. Ober, C., Z. Tan, Y. Sun, J.D. Possick, L. Pan, R. Nicolae, S. Radford, R.R. Parry, A. Heinzmann, K.A. Deichmann, L.A. Lester, J.E. Gern, R.F. Lemanske, Jr., D.L. Nicolae, J.A. Elias and G.L. Chupp, *Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function*. N Engl J Med, 2008. **358**(16): p. 1682-91.
 32. Kuranda, M.J. and P.W. Robbins, *Chitinase is required for cell separation during growth of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19758-67.
 33. Araujo, A.C., T. Souto-Padron and W. de Souza, *Cytochemical localization of carbohydrate residues in microfilariae of Wuchereria bancrofti and Brugia malayi*. J Histochem Cytochem, 1993. **41**(4): p. 571-8.
 34. Sakuda, S., A. Isogai, S. Matsumoto and A. Suzuki, *Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor*. J Antibiot (Tokyo), 1987. **40**(3): p. 296-300.
 35. B.Henrissat, in *Chitin and Chitinases*, R.A.A.M. P.Jolles, Editor. 1999, Birkhauser Verlag: Basel. p. 137-156.
 36. Hollis, T., A.F. Monzingo, K. Bortone, S. Ernst, R. Cox and J.D. Robertus, *The*

- X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus Coccidioides immitis.* Protein Sci, 2000. **9**(3): p. 544-51.
37. Perrakis, A., I. Tews, Z. Dauter, A.B. Oppenheim, I. Chet, K.S. Wilson and C.E. Vorgias, *Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution.* Structure, 1994. **2**(12): p. 1169-80.
38. Terwisscha van Scheltinga, A.C., S. Armand, K.H. Kalk, A. Isogai, B. Henrissat and B.W. Dijkstra, *Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis.* Biochemistry, 1995. **34**(48): p. 15619-23.
39. Matsuura, H., S. Okamoto, S. Anamart, Q. Wang, Z.Y. Zhou, T. Nihira, Y. Yamada, T. Kuzuyama, H. Seto, J. Nakayama, A. Suzuki, H. Nagasawa and S. Sakuda, *Nucleotide sequences of genes encoding allosamidin-sensitive and -insensitive chitinases produced by allosamidin-producing Streptomyces.* Biosci Biotechnol Biochem, 2003. **67**(9): p. 2002-5.
40. Watanabe, T., R. Kanai, T. Kawase, T. Tanabe, M. Mitsutomi, S. Sakuda and K. Miyashita, *Family 19 chitinases of Streptomyces species: characterization and distribution.* Microbiology, 1999. **145** (Pt 12): p. 3353-63.
41. Boot, R.G., E.F. Blommaart, E. Swart, K. Ghauharali-van der Vlugt, N. Bijl, C. Moe, A. Place and J.M. Aerts, *Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase.* J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6770-8.
42. Bleau, G., F. Massicotte, Y. Merlen and C. Boisvert, *Mammalian chitinase-like proteins.* EXS, 1999. **87**: p. 211-21.
43. Chang, N.C., S.I. Hung, K.Y. Hwa, I. Kato, J.E. Chen, C.H. Liu and A.C. Chang, *A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin.* J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17497-506.

44. Kzhyshkowska, J., A. Gratchev and S. Goerdt, *Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer*. *Biomark Insights*, 2007. **2**: p. 128-46.
45. Herrera-Estrella, A. and I. Chet, *Chitinases in biological control*. *EXS*, 1999. **87**: p. 171-84.
46. Shibata, Y., L.A. Foster, J.F. Bradfield and Q.N. Myrvik, *Oral administration of chitin down-regulates serum IgE levels and lung eosinophilia in the allergic mouse*. *J Immunol*, 2000. **164**(3): p. 1314-21.
47. Homer, R.J., Z. Zhu, L. Cohn, C.G. Lee, W.I. White, S. Chen and J.A. Elias, *Differential expression of chitinases identify subsets of murine airway epithelial cells in allergic inflammation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **291**(3): p. L502-11.
48. Mizoguchi, E., *Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(2): p. 398-411.
49. Johansen, J.S., *Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer*. *Dan Med Bull*, 2006. **53**(2): p. 172-209.
50. Kawada, M., Y. Hachiya, A. Arihiro and E. Mizoguchi, *Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions*. *Keio J Med*, 2007. **56**(1): p. 21-7.
51. Hong, J.H., J.Y. Hong, B. Park, S.I. Lee, J.T. Seo, K.E. Kim, M.H. Sohn and D.M. Shin, *Chitinase activates protease-activated receptor-2 in human airway epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. **39**(5): p. 530-5.
52. Bierbaum, S., R. Nickel, A. Koch, S. Lau, K.A. Deichmann, U. Wahn, A. Superti-Furga and A. Heinzmann, *Polymorphisms and haplotypes of acid*

- mammalian chitinase are associated with bronchial asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(12): p. 1505-9.
53. Morrison, B.W. and P. Leder, *neu and ras initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in c-myc and int-2-initiated tumors*. Oncogene, 1994. **9**(12): p. 3417-26.
54. Hakala, B.E., C. White and A.D. Recklies, *Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25803-10.
55. Shackelton, L.M., D.M. Mann and A.J. Millis, *Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13076-83.
56. Rejman, J.J. and W.L. Hurley, *Isolation and characterization of a novel 39 kilodalton whey protein from bovine mammary secretions collected during the nonlactating period*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **150**(1): p. 329-34.
57. Kawamura, K., T. Shibata, O. Saget, D. Peel and P.J. Bryant, *A new family of growth factors produced by the fat body and active on Drosophila imaginal disc cells*. Development, 1999. **126**(2): p. 211-9.
58. Recklies, A.D., C. White and H. Ling, *The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase B-mediated signalling pathways*. Biochem J, 2002. **365**(Pt 1): p. 119-26.
59. Jensen, B.V., J.S. Johansen and P.A. Price, *High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(12): p. 4423-34.

60. Nojgaard, C., N.B. Host, I.J. Christensen, S.H. Poulsen, K. Egstrup, P.A. Price and J.S. Johansen, *Serum levels of YKL-40 increases in patients with acute myocardial infarction*. Coron Artery Dis, 2008. **19**(4): p. 257-63.
61. Rathcke, C.N., J.S. Johansen and H. Vestergaard, *YKL-40, a biomarker of inflammation, is elevated in patients with type 2 diabetes and is related to insulin resistance*. Inflamm Res, 2006. **55**(2): p. 53-9.
62. Johansen, J.S., N. Milman, M. Hansen, C. Garbarsch, P.A. Price and N. Graudal, *Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis--a potential marker of disease activity?* Respir Med, 2005. **99**(4): p. 396-402.
63. Johansen, J.S., S. Moller, P.A. Price, F. Bendtsen, J. Junge, C. Garbarsch and J.H. Henriksen, *Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis?* Scand J Gastroenterol, 1997. **32**(6): p. 582-90.
64. Nojgaard, C., J.S. Johansen, E. Christensen, L.T. Skovgaard, P.A. Price and U. Becker, *Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease*. J Hepatol, 2003. **39**(2): p. 179-86.
65. Ostergaard, C., J.S. Johansen, T. Benfield, P.A. Price and J.D. Lundgren, *YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(3): p. 598-604.
66. Nordenbaek, C., J.S. Johansen, P. Junker, N. Borregaard, O. Sorensen and P.A. Price, *YKL-40, a matrix protein of specific granules in neutrophils, is elevated in serum of patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization*. J Infect Dis, 1999. **180**(5): p. 1722-6.
67. Johansen, J.S., J. Hvolris, M. Hansen, V. Backer, I. Lorenzen and P.A. Price, *Serum YKL-40 levels in healthy children and adults. Comparison with serum and synovial fluid levels of YKL-40 in patients with osteoarthritis or trauma of the knee joint*. Br J Rheumatol, 1996. **35**(6): p. 553-9.

68. Johansen, J.S., H.S. Jensen and P.A. Price, *A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid.* Br J Rheumatol, 1993. **32**(11): p. 949-55.
69. Ober, C. and G.L. Chupp, *The chitinase and chitinase-like proteins: a review of genetic and functional studies in asthma and immune-mediated diseases.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2009. **9**(5): p. 401-8.
70. Sohn, M.H., J.H. Lee, K.W. Kim, S.W. Kim, S.H. Lee, K.E. Kim, K.H. Kim, C.G. Lee, J.A. Elias and M.G. Lee, *Genetic variation in the promoter region of chitinase 3-like 1 is associated with atopy.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(6): p. 449-56.
71. Zheng, T., Z. Zhu, Z. Wang, R.J. Homer, B. Ma, R.J. Riese, Jr., H.A. Chapman, Jr., S.D. Shapiro and J.A. Elias, *Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema.* J Clin Invest, 2000. **106**(9): p. 1081-93.
72. Zhu, Z., R.J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, G.P. Geba, J. Wang, Y. Zhang and J.A. Elias, *Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production.* J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 779-88.
73. Louhelainen, N., M. Myllarniemi, I. Rahman and V.L. Kinnula, *Airway biomarkers of the oxidant burden in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: current and future perspectives.* Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2008. **3**(4): p. 585-603.
74. Rane, M.J. and J.B. Klein, *Regulation of neutrophil apoptosis by modulation of PKB/Akt activation.* Front Biosci, 2009. **14**: p. 2400-12.
75. Zhu, X., S. Chen, X. Yin, A. Shen, S. Ji, Z. Shen and J. Gu, *Constitutively active PKB/Akt inhibited apoptosis and down-regulated beta1,4-galactosyltransferase*

- 1 in hepatocarcinoma cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(2): p. 279-85.
76. Chowdhury, I., B. Tharakan and G.K. Bhat, *Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited.* Cell Mol Biol Lett, 2006. **11**(4): p. 506-25.
77. Degterev, A. and J. Yuan, *Expansion and evolution of cell death programmes.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 378-90.
78. Walsh, J.G., S.P. Cullen, C. Sheridan, A.U. Luthi, C. Gerner and S.J. Martin, *Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 12815-9.
79. Kang, M.J., R.J. Homer, A. Gallo, C.G. Lee, K.A. Crothers, S.J. Cho, C. Rochester, H. Cain, G. Chupp, H.J. Yoon and J.A. Elias, *IL-18 is induced and IL-18 receptor alpha plays a critical role in the pathogenesis of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema and inflammation.* J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1948-59.
80. Kang, M.J., C.G. Lee, J.Y. Lee, C.S. Dela Cruz, Z.J. Chen, R. Enelow and J.A. Elias, *Cigarette smoke selectively enhances viral PAMP- and virus-induced pulmonary innate immune and remodeling responses in mice.* J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2771-84.
81. Churg, A., M. Cosio and J.L. Wright, *Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(4): p. L612-31.
82. MacNee, W., *Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.* Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(4): p. 258-66; discussion 290-1.
83. Demedts, I.K., T. Demoor, K.R. Bracke, G.F. Joos and G.G. Brusselle, *Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema.* Respir Res,

2006. **7**: p. 53.
84. Kasahara, Y., R.M. Tudor, C.D. Cool, D.A. Lynch, S.C. Flores and N.F. Voelkel, *Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**(3 Pt 1): p. 737-44.
85. Kasahara, Y., R.M. Tudor, L. Taraseviciene-Stewart, T.D. Le Cras, S. Abman, P.K. Hirth, J. Waltenberger and N.F. Voelkel, *Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(11): p. 1311-9.
86. Petrache, I., V. Natarajan, L. Zhen, T.R. Medler, A.T. Richter, C. Cho, W.C. Hubbard, E.V. Berdyshev and R.M. Tudor, *Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice*. *Nat Med*, 2005. **11**(5): p. 491-8.
87. Tang, K., H.B. Rossiter, P.D. Wagner and E.C. Breen, *Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice*. *J Appl Physiol*, 2004. **97**(4): p. 1559-66; discussion 1549.
88. Lee, C.G., S.J. Cho, M.J. Kang, S.P. Chapoval, P.J. Lee, P.W. Noble, T. Yehualaeshet, B. Lu, R.A. Flavell, J. Milbrandt, R.J. Homer and J.A. Elias, *Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis*. *J Exp Med*, 2004. **200**(3): p. 377-89.
89. Zheng, T., M.J. Kang, K. Crothers, Z. Zhu, W. Liu, C.G. Lee, L.A. Rabach, H.A. Chapman, R.J. Homer, D. Aldous, G.T. De Sanctis, S. Underwood, M. Graupe, R.A. Flavell, J.A. Schmidt and J.A. Elias, *Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in IFN-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema*. *J Immunol*, 2005. **174**(12): p. 8106-15.
90. Letuve, S., A. Kozhich, N. Arouche, M. Grandsaigne, J. Reed, M.C. Dombret, P.A.

- Kiener, M. Aubier, A.J. Coyle and M. Pretolani, *YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages*. *J Immunol*, 2008. **181**(7): p. 5167-73.
91. Rathcke, C.N., I. Raymond, C. Kistorp, P. Hildebrandt, J. Faber and H. Vestergaard, *Low grade inflammation as measured by levels of YKL-40: association with an increased overall and cardiovascular mortality rate in an elderly population*. *Int J Cardiol*, 2010. **143**(1): p. 35-42.
92. McNicholas, W.T., *Chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea: overlaps in pathophysiology, systemic inflammation, and cardiovascular disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **180**(8): p. 692-700.
93. Yanbaeva, D.G., M.A. Dentener, E.C. Creutzberg and E.F. Wouters, *Systemic inflammation in COPD: is genetic susceptibility a key factor?* *COPD*, 2006. **3**(1): p. 51-61.
94. Wang, X., S.W. Ryter, C. Dai, Z.L. Tang, S.C. Watkins, X.M. Yin, R. Song and A.M. Choi, *Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(31): p. 29184-91.
95. O'Reilly, M.A., R.J. Staversky, H.L. Huyck, R.H. Watkins, M.B. LoMonaco, C.T. D'Angio, R.B. Baggs, W.M. Maniscalco and G.S. Pryhuber, *Bcl-2 family gene expression during severe hyperoxia induced lung injury*. *Lab Invest*, 2000. **80**(12): p. 1845-54.
96. Barazzone, C., S. Horowitz, Y.R. Donati, I. Rodriguez and P.F. Piguet, *Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. **19**(4): p. 573-81.
97. Mantell, L.L., S. Horowitz, J.M. Davis and J.A. Kazzaz, *Hyperoxia-induced cell death in the lung--the correlation of apoptosis, necrosis, and inflammation*. *Ann*

- N Y Acad Sci, 1999. **887**: p. 171-80.
98. Ward, N.S., A.B. Waxman, R.J. Homer, L.L. Mantell, O. Einarsson, Y. Du and J.A. Elias, *Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(5): p. 535-42.
 99. He, C.H., A.B. Waxman, C.G. Lee, H. Link, M.E. Rabach, B. Ma, Q. Chen, Z. Zhu, M. Zhong, K. Nakayama, K.I. Nakayama, R. Homer and J.A. Elias, *Bcl-2-related protein A1 is an endogenous and cytokine-stimulated mediator of cytoprotection in hyperoxic acute lung injury*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 1039-48.
 100. Waxman, A.B., O. Einarsson, T. Seres, R.G. Knickelbein, J.B. Warshaw, R. Johnston, R.J. Homer and J.A. Elias, *Targeted lung expression of interleukin-11 enhances murine tolerance of 100% oxygen and diminishes hyperoxia-induced DNA fragmentation*. J Clin Invest, 1998. **101**(9): p. 1970-82.
 101. Bhandari, A. and V. Bhandari, *Pitfalls, problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia*. Pediatrics, 2009. **123**(6): p. 1562-73.
 102. Nieuwenhuis, B., A. Luth and B. Kleuser, *Dexamethasone protects human fibroblasts from apoptosis via an S1P3-receptor subtype dependent activation of PKB/Akt and Bcl XL*. Pharmacol Res, 2010. **61**(5): p. 449-59.
 103. Deng, R., J. Tang, B.F. Xie, G.K. Feng, Y.H. Huang, Z.C. Liu and X.F. Zhu, *SYUNZ-16, a newly synthesized alkannin derivative, induces tumor cells apoptosis and suppresses tumor growth through inhibition of PKB/AKT kinase activity and blockade of AKT/FOXO signal pathway*. Int J Cancer, 2010. **127**(1): p. 220-9.
 104. Mohan, A.L., M.D. Friedman, D.R. Ormond, M. Tobias, R. Murali and M. Jhanwar-Uniyal, *PI3K/mTOR signaling pathways in medulloblastoma*. Anticancer Res, 2012. **32**(8): p. 3141-6.

105. Cheng, A.C., T.C. Huang, C.S. Lai, J.M. Kuo, Y.T. Huang, C.Y. Lo, C.T. Ho and M.H. Pan, *Pyrrrolidine dithiocarbamate inhibition of luteolin-induced apoptosis through up-regulated phosphorylation of Akt and caspase-9 in human leukemia HL-60 cells*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(12): p. 4215-21.
106. Takatani, T., K. Takahashi, Y. Uozumi, T. Matsuda, T. Ito, S.W. Schaffer, Y. Fujio and J. Azuma, *Taurine prevents the ischemia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes through Akt/caspase-9 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(2): p. 484-9.
107. Jee, S.H., H.C. Chiu, T.F. Tsai, W.L. Tsai, Y.H. Liao, C.Y. Chu and M.L. Kuo, *The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway is involved in interleukin-6-mediated Mcl-1 upregulation and anti-apoptosis activity in basal cell carcinoma cells*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(5): p. 1121-7.
108. Kasashima, S., M. Hiroshi, M. Toshinori and O. Yoshio, *Lipomatous mixed tumor with follicular differentiation of the skin*. J Cutan Pathol, 2006. **33**(5): p. 389-94.
109. Sabbatini, P. and F. McCormick, *Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24263-9.
110. Cho, Y., M.J. Park, M. Park, S.S. Min, J. Yee, C. Kim, M.S. Han and S.H. Han, *Effects of CAY10404 on the PKB/Akt and MAPK pathway and apoptosis in non-small cell lung cancer cells*. Respirology, 2009. **14**(6): p. 850-8.
111. Sakazaki, Y., T. Hoshino, S. Takei, M. Sawada, H. Oda, S. Takenaka, H. Imaoka, K. Matsunaga, T. Ota, Y. Abe, I. Miki, K. Fujimoto, T. Kawayama, S. Kato and H. Aizawa, *Overexpression of chitinase 3-like 1/YKL-40 in lung-specific IL-18-transgenic mice, smokers and COPD*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24177.
112. Becart, S., C. Charvet, A.J. Canonigo Balancio, C. De Trez, Y. Tanaka, W. Duan,

- C. Ware, M. Croft and A. Altman, *SLAT regulates Th1 and Th2 inflammatory responses by controlling Ca²⁺/NFAT signaling*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2164-75.
113. Zuleger, C.L., X. Gao, M.S. Burger, Q. Chu, L.G. Payne and D. Chen, *Peptide induces CD4(+)CD25+ and IL-10+ T cells and protection in airway allergy models*. Vaccine, 2005. **23**(24): p. 3181-6.
114. Lee, C.G., R.J. Homer, L. Cohn, H. Link, S. Jung, J.E. Craft, B.S. Graham, T.R. Johnson and J.A. Elias, *Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35466-74.
115. Ma, B., M.R. Blackburn, C.G. Lee, R.J. Homer, W. Liu, R.A. Flavell, L. Boyden, R.P. Lifton, C.X. Sun, H.W. Young and J.A. Elias, *Adenosine metabolism and murine strain-specific IL-4-induced inflammation, emphysema, and fibrosis*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1274-83.
116. Wagers, S.S., H.C. Haverkamp, J.H. Bates, R.J. Norton, J.A. Thompson-Figueroa, M.J. Sullivan and C.G. Irvin, *Intrinsic and antigen-induced airway hyperresponsiveness are the result of diverse physiological mechanisms*. J Appl Physiol, 2007. **102**(1): p. 221-30.
117. Stein, M., S. Keshav, N. Harris and S. Gordon, *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
118. Hartl, D., C.H. He, B. Koller, C.A. Da Silva, R. Homer, C.G. Lee and J.A. Elias, *Acidic mammalian chitinase is secreted via an ADAM17/epidermal growth factor receptor-dependent pathway and stimulates chemokine production by pulmonary epithelial cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33472-82.

119. Shapiro, S.D., *Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klotho and marlboro mice.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(1): p. 4-7.
120. Halbower, A.C., R.J. Mason, S.H. Abman and R.M. Tuder, *Agarose infiltration improves morphology of cryostat sections of lung.* Lab Invest, 1994. **71**(1): p. 149-53.
121. Rice, W.R., J.J. Conkright, C.L. Na, M. Ikegami, J.M. Shannon and T.E. Weaver, *Maintenance of the mouse type II cell phenotype in vitro.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(2): p. L256-64.
122. Wang, J., Q. Chen, J. Corne, Z. Zhu, C.G. Lee, V. Bhandari, R.J. Homer and J.A. Elias, *Pulmonary expression of leukemia inhibitory factor induces B cell hyperplasia and confers protection in hyperoxia.* J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31226-32.

論文目録

本学位論文は下記の発表論文による。

遺伝子改変マウスの作出部分についてはいずれも Dr.Chun Geun Lee によるものである。

1. **Matsuura H**, Hartl D, Kang MJ, Dela Cruz CS, Koller B, Chupp GL, Homer RJ, Zhou Y, Cho WK, Elias JA, Lee CG, *Role of Breast Regression Protein (BRP)-39 in the Pathogenesis of Cigarette Smoke-Induced Inflammation and Emphysema*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2011.**44**(6):p.777-786.
2. Sohn MH, Kang MJ, **Matsuura H**, Bhandari V, Chen NY, Lee CG, Elias JA, *The chitinase-like proteins breast regression protein-39 and YKL-40 regulate hyperoxia-induced acute lung injury*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2010. **182**(7): p. 918-28.
3. Lee CG, Hartl D, Lee GR, Koller B, **Matsuura H**, Da Silva CA, Sohn MH, Cohn L, Homer RJ, Kozhich AA, Humbles A, Kearley J, Coyle A, Chupp G, Reed J, Flavell RA, Elias JA, *Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis*. The Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(5): p. 1149-66.

Reprinted with permission of the American Thoracic Society.

Copyright © 2014 American Thoracic Society.

Cite:

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2011.44(6): p.777-786.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2010.182(7): p.918-28.

Official Journal of the American Thoracic Society.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご高配を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科長・農学部長 応用生命化学専攻 生物有機化学研究室 教授長澤寛道先生に謹んで御礼申し上げます。さらに、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 生物有機化学研究室 准教授 作田庄平先生、東京大学 生物生産工学研究センター 細胞機能工学研究室 准教授 葛山智久先生に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、終始懇切なるご指導とご高配を賜りました Yale University, Waldemar Von Zedtwits Professor of Medicine and Professor of Immunobiology; Chair, Department of Internal Medicine, Jack.A.Elias 先生、Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, Associate Professor of Medicine, Chun Geun Lee 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、共同研究者として多大なるご協力とご助言を賜りました University Children's Hospital Tübingen, Department of Pediatrics I, Professor of Medicine, Dominik Hartl 博士、Yale University Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, Assistant Professor of Medicine, Min-Jong Kang 博士、Yale University Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, Assistant Professor of Medicine, Charles S. Dela Cruz 博士、Yonsei University College of Medicine, Department of Pediatrics, Professor of Medicine, Sohn Myung Hyun 博士に心より感謝申し上げます。

エール大学呼吸器救命救急内科への留学と研究の機会を与えて頂きました田辺三菱製薬関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に本論文作成に当たり終始応援し続けてくれた家族に心から感謝します。