

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

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

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミンが $\beta$ -1,4 結合で重合した多糖である。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り、カニやエビの甲殻、菌類の細胞壁、線虫のミクロフィラリア鞘、昆虫の外皮や消化管等の主要な構成成分である。キチナーゼは、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。しかし、哺乳類は体内に基質となるキチンを持たないため、哺乳類の生産するキチナーゼは、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。

哺乳類は、酵素活性を持つキチナーゼとして、chitotriosidase と acidic mammalian chitinase (AMCase) の 2 種を生産する (表 1)。酵素活性を持つキチナーゼに対し、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なったキチナーゼ様タンパク質(chitinase-like protein : CLP)も報告されている。

キチナーゼ、CLP のいずれも、外来抗原に対する曝露機会が多い肺と胃において発現量が高く、これらの臓器を標的とする疾患で発現が誘導されることがこれまでに報告されているが、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、CLP に着目することで、キチナーゼファミリーの酵素活性に依存しない機能の解明を目指した。特に、ヒト、マウスに共通して発現する CLP 3 分子 (BRP-39 / YKL-40, Oviductin, SI-CLP) のうち (表 1)、肺で高い発現が認められる BRP-39 / YKL-40 に着目し、呼吸器疾患における生理的役割の解明を目指した。

表 1 ヒト、マウスの代表的なファミリー18キチナーゼ

名称	別名	ヒト	マウス
Chitotriosidase	Chitinase 1	+	+
Acidic mammalian chitinase (AMCase)	CHIA, eosinophil chemotactic cytokine	+	+
YKL-40 / BRP-39	CHI3L1, cartilage glycoprotein 1, GP-39, HcGP-39	+	+
Oviductin	Oviductal glycoprotein 1	+	+
Stabilin-1-interacting chitinase-like protein (SI-CLP)		+	+
YKL-39	Chondrocyte protein 39, CHI3L2	+	
Ym1	Ch313		+
Ym2	Ch314		+

本研究では、呼吸器疾患の中でも特に患者数が多い気管支喘息や、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慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease : COPD）、および急性肺傷害に着目し、病態メカニズムの一部を反映するモデルマウスを作製した。また、BRP-39 遺伝子欠損マウスを作製し、病態誘導時の表現型を野生型マウスと比較することで BRP-39 タンパク質の生理的役割を明らかにすることを目指した。

第 1 章では、BRP-39 の気管支喘息における役割について解析した。まず、マウス肺組織での発現部位を調べたところ、BRP-39 は気道上皮細胞や肺胞マクロファージによって産生されることが分かった。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。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おり、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。また、肺胞マクロファージは、単球由来の免疫担当細胞であり、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り最初に宿主防御の役割を担っている。

気管支喘息の発症メカニズムにおいて、宿主が細菌、微生物、スギ花粉、ダニといった様々な抗原に曝露されて引き起こす免疫応答は、病態の中心的な要素である。抗原曝露後、抗原提示細胞による抗原提示をうけた T 細胞の活性化と分化が起こり、抗原特異的 IgE 産生、肥満細胞の活性化、生理活性物質の放出による血管透過性亢進、気管支収縮、粘液分泌亢進と喘息症状の発現につながっていく。

マウス喘息モデルは、水酸化アルミニウムゲル（アラムゲル）を免疫補助剤として用い、卵白アルブミン（ovalbumin : OVA）との混合液を腹腔内に投与した後、OVA を繰り返し吸入曝露させることで作製できる。OVA によって Th2 炎症反応を惹起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、抗原提示と T 細胞分化に関わる樹状細胞（DC）の肺への集積が減少した。また、抗原提示細胞の活性化、成熟化マーカーであり、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、BRP-39 は抗原提示とナイーブ T 細胞活性化に寄与する可能性があることが分かった。また、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、抗原特異的 IgE 産生も抑制された。

BRP-39 を発現する気道上皮細胞は、線維芽細胞との相互作用を介して細胞外基質の蓄積や組織の線維化を介して、喘息の重症化に関わる細胞である。Th2 サイトカインである IL-13 はこのプロセスに寄与し、喘息の重症化に関わる分子として知られており、AMCase の発現を誘導することが報告されている。本研究ではさらに IL-13 のエフェクター機能における BRP-39 の機能を明らかにする目的で、IL-13TG マウスと BRP-39KO マウスを交配して IL-13TG/BRP-39KO マウスを作製し、表現型を IL-13TG マウスと比較した。

その結果、IL-13 を気道上皮細胞に過剰発現させた IL-13TG マウスでは、CD4 陽性 T 細胞の集積を伴う肺組織での炎症、線維化が観察され、気道上皮細胞や肺胞マクロファージで BRP-39 の誘導が確認された。

一方、IL-13TG/BRP-39KO マウスでは、IL-13TG マウスで亢進した肺組織の炎症や線維化が有意に抑制された。この結果から BRP-39 は喘息の病態生理において、抗原提示、T 細胞活性化、IgE 産生といったアレルギー性炎症に加え、気道炎症の繰り返しによって起こる構造的変化である気道リモデリングにも寄与する分子であることが明らかとなり、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。

IL-13TG/BRP-39KO マウスでは、肺組織の炎症と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観察された。脾細胞を用いた *in vitro* 試験では、TNF- $\alpha$  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。

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、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease : COPD）に着目した。COPD は喫煙と非常に関係が深く、患者の約 90%が喫煙者である。本章では、たばこ煙を長期間曝露して得られる病態モデルマウスを用いて、BRP-39 の役割を解析した。

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起こる、進行性の疾患である。たばこ煙を長期間曝露した野生型マウスでは、肺胞壁が壊れる結果、平均肺胞径が拡大し、肺気腫を発症する。一方、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比べて、平均肺胞径がさらに拡大し、肺気腫がより悪化することが分かった。

BRP-39 遺伝子欠損マウスでは、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 の発現上昇で特徴付けら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 分子が持つ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。また、BRP-39 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。

たばこ煙を曝露した野生型マウスの肺では気道上皮細胞や、肺胞マクロファージの BRP-39 の発現が確認された。本章では、たばこ煙曝露による BRP-39 の発現誘導機構の検討過程で、たばこ煙曝露によって誘導される IL-18 シグナルに着目した。IL-18 は、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おり、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いる。

BRP-39 発現誘導機構を検討した結果、IL-18 シグナルを遮断した IL-18 受容体欠損マウスの肺組織では、BRP-39 の発現が有意に低下する一方で、BRP-39 遺伝子欠損マウスの肺組織中 IL-18 濃度には変化がなかった。この結果から、BRP-39 は IL-18 シグナル依存的に産生される分子であることが分かった。

ヒトサンプルを用いた解析結果も、マウス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 BRP-39 のヒトオルソログである YKL-40 の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では有意に高い YKL-40 の差を認めた。

BRP-39 遺伝子欠損マウスで肺気腫がさらに進行した結果とヒトサンプルで得られた結果を考え合わせると、BRP-39 は病態の進行に伴って産生される生体防御因子の一つであり、抗アポトーシス作用により肺の構造細胞を保護することで、結果的に肺気腫進行に抵抗する役割を持つと考えられた。

第 3 章では、急性肺傷害に着目し、BRP-39 が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調べた。臨床では、長期間の高濃度酸素の吸入による低酸素血症の治療で急性肺傷害を発症することがある。本章では、高濃度酸素を曝露して急性肺傷害を惹起した病態モデルマウスを用いて、BRP-39 の役割を解析した。

その結果、BRP-39 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して、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。その結果、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。すなわち BRP-39 は、気道上皮細胞において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な役割を果たしていることが明らかとなった。

気管支肺異形成症 (BPD) は、特に未熟児において高濃度の酸素吸入によって発症する。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。この結果からも、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。

本研究では、気管支喘息、COPD、急性肺傷害について病態モデルマウスを作製し、BRP-39 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの病態発症時の表現型の違いから、呼吸器疾患における BRP-39 の生理的役割を明らかにした。また、患者サンプルにおける YKL-40 の発現解析結果から、一連の発見が臨床病態に外挿しうるものであることを示し、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を期待される。