

難治性肺疾患の新規標的の解明および DNA 鑑定の利用に関する研究
—代謝-肺連関制御因子の分子基盤と Y-STR からの出身地推定システムの構築—
熊本大学大学院薬学教育部 創薬・生命薬科学専攻
HIGO プログラム専門コース 遺伝子機能応用学分野 野原 寛文

近年、解析技術の劇的な進歩に対して、医薬品開発から科学行政分野にわたって有用なシーズの開発は困難を極めている。この現状を打破するため、固定概念に捕われない柔軟な発想が必須であり、各分野におけるこれまでにない挑戦的な研究が求められている。本研究では、第1に、難治性肺疾患の新規標的の解明を企図し、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 治療における肺-代謝連関という新領域の開拓を試みた。また、科学捜査の視点からの研究テーマとして、第2に、DNA 鑑定の利用に関する新規プラットフォームの開拓を目指し、DNA 鑑定による出身地推定システムの構築を試み、種々の検討を行った。

1. 難治性肺疾患の新規標的の解明のための肺-代謝連関制御因子の分子基盤

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、慢性気道炎症、過剰粘液による気道閉塞、肺気腫病態を引き起こし、最終的に呼吸困難に陥る難治性呼吸器疾患である。一般に、COPD は、肺原発性疾患であるが、近年、COPD 患者の代謝特性やその関連因子が肺病態に影響を与える可能性が示唆されており、COPD 病態を制御する代謝関連制御因子の同定は重要である。本研究では、まず、粘液貯留、肺気腫、呼吸機能低下を呈する COPD 様マウス (β ENaC-Tg マウス) を主に用いて、まず、肺での機能が不明である代謝性因子 GLP-1 に着目し、COPD 病態に対する影響について検討した (研究 1-1)。また、COPD の合併症として注目される 2 型糖尿病との病態間相互作用について合併症モデルマウスを作製し、検討した (研究 1-2)。さらに、COPD 病態を制御する代謝関連制御因子として同定されているアディポネクチンの活性化酵素 DsbA-L に着目し、これまで不明であった呼吸器における機能を評価した (研究 1-3)。

研究 1-1 2 型糖尿病治療薬 GLP-1 受容体作動薬 が COPD 病態に与える影響

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は抗糖尿病作用を示すホルモンであり、GLP-1 受容体作動薬は現在、2 型糖尿病治療薬として臨床応用されている。GLP-1 受容体は肺組織においても高発現しているが、肺における GLP-1 の機能は不明である。本章では、気道上皮における GLP-1 受容体シグナルの生理的および病態生理的機能について検討した。まず、正常気道上皮細胞株 (16HBE14o-) および COPD モデル細胞株 (β/γ ENaC-16HBE14o-) に対する GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 刺激は、p38 MAPK 依存的に粘液遺伝子 MUC5AC の産生を上昇させることを明らかにした。また、正常および COPD 様 β ENaC-Tg マウスに対する Exendin-4 を経気管投与も、両マウスにおける粘液遺伝子 MUC5AC の発現を上昇させた。このとき、Exendin-4 投与は、 β ENaC-Tg マウスの肺気腫病態を亢進したことから、COPD 肺組織における GLP-1 受容体シグナルは、粘液発現を促進し、肺病態を悪化させることを示した。

研究 1-2 肥満誘導性 2 型糖尿病併発が COPD 病態に与える影響とその機序の解明

2 型糖尿病は、COPD における重要な合併症であり、その肺病態に与える影響についてはほとんど明らかでない。特に、2 型糖尿病が、主要代謝臓器 (肝臓、骨格筋、脂肪細胞など) におけるインスリン抵抗性を引き起こすことはよく知られているが、肺の組織レベルで、直接的なインスリン不応答性、すなわち”肺組織インスリン抵抗性”を引き起こすか、また、そのことが、COPD 肺病態に影響を与えるか否かについては不明である。本章では、COPD・2 型糖尿病合併症モデルマウスを作製し、合併症が COPD 肺病態に与える影響について検討した。まず、 β ENaC-Tg マ

ウスに高脂肪食を負荷し、2 型糖尿病の誘導を行い、合併症モデルマウスを作製した。その結果、2 型糖尿病の併発は、呼吸機能 (0.1 秒率) の低下および肺気腫病態を増悪させた。興味深いことに、合併症モデル肺組織では、インスリンシグナルの低下に伴う FOXO1 の増加とアポトーシスシグナルの活性化が認められ、”肺組織インスリン抵抗性”が惹起されていることが示された。また、インスリン様肺修復因子 IGF-1 の受容体阻害剤の経気管投与によっても、COPD 病態の増悪が認められ、IGF-1 が COPD 病態に対して保護的役割を担い、IGF-1 誘導性のインスリンシグナルの低下が病態悪化に繋がることが示された。最後に、肥満病態で増加する飽和脂肪酸 (パルミチン酸) は、正常気道上皮細胞株の IGF-1 シグナルを顕著に抑制したことから、肥満誘導性 2 型糖尿病併発は、飽和脂肪酸による”肺組織インスリン抵抗性”により、COPD 肺病態を悪化させることが示唆された。

研究 1-3 アディポネクチン多量体化酵素 DsbA-L の気道上皮細胞における機能解析

アディポネクチンは、COPD に保護的に働く代謝関連制御因子であり、DsbA-L によって多量体化し活性化することが知られている。そのため、DsbA-L は肺機能の新規制御因子となり得ることが考えられるが、肺組織における機能は不明である。そこで、本章では、気道上皮における DsbA-L の生理的および病態生理的機能について検討した。その結果、正常気道上皮細胞株における DsbA-L のノックダウンは、酸化ストレスを亢進させ、JNK MAPK 経路依存的に粘液遺伝子 MUC5AC の産生を上昇させた。DsbA-L が肺の恒常性維持に重要であることが新たに証明された。

2. Y-STR DNA 鑑定を活用した出身地推定システムの構築

DNA 鑑定は、犯罪捜査や身元確認など、行政において必要不可欠な技術となっている。一方、大規模な災害時に、多くの身元不明遺体が発見されることが予想され、死者本人の DNA から直接的に身元を推定する技術の確立が求められているが、未だ前例はない。本研究では、Y 染色体の DNA 型である Y-STR に着目し、特に大規模地震による被害が懸念されている宮崎県をモデル地区とした DNA 出身地推定システムの構築を試みた (研究 2-1)。

研究 2-1 宮崎県在住者における Y-STR 分布解析による出身地推定システムの構築

Y 染色体の DNA 型である Y-STR は、遺伝学的に男系間で基本的に同じとなり、同型の Y-STR は近い居住エリアに分布する傾向にあることが予想される。一方、Y-STR データベースは、我が国には存在しておらず、Y-STR による出身地推定の検討は未だなされていない。本章では、宮崎県在住者を中心に、研究同意書が取れた検体 1,705 名分の Y-STR 解析および Y 染色体の分類とされるハプログループの解析を実施し、出身地推定が可能か否かを検討した。ハプログループ解析の結果、宮崎県内外でハプログループ地理的分布傾向が異なることが示された。また、Y-STR 解析の結果、宮崎県出身者特有の Y-STR 配列および宮崎県の南部および北部に集中的に分布する Y-STR 配列の存在を示した。さらに、1,705 名分のデータベースを作成し、Y-STR による出身地推定システムを構築し、良好な予測精度を得ることに成功した。

以上、本研究は、GLP-1 受容体の経気管刺激、肥満誘導性 2 型糖尿病の併発および DsbA-L の肺での恒常性維持機構が、それぞれユニークな機序により、肺病態を制御する代謝関連制御因子であることを初めて明らかにするものであり、”肺-代謝関連”という新規標的を提起するものである。また、本研究は、DNA 鑑定を活用した出身地推定システムのプロトタイプを提供するものであり、今後、災害や犯罪捜査などへの活用が期待される。