

論文の内容の要旨

論文題目 Abnormal lung development and COPD-like phenotype in TAZ-deficient mice

和訳 転写コアクチベーターTAZ 欠損マウスの解析：

末梢肺形成の異常と新たな COPD モデルとしての可能性

指導教員 長瀬 隆英 教授 (呼吸器内科学)

専攻 東京大学大学院医学系研究科博士課程 内科学専攻

入進学年 平成16年4月入学

学生氏名 三谷 明久

転写コアクチベーターTAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)は、転写因子の L/PPXY motif と結合する WW ドメインと転写活性ドメインを有し、Runx2/Cbfa1, TTF-1/Nkx2.1, Tbx5, Pax3 など様々な転写因子の活性を調節することが知られている。特に、mesenchymal stem cell において、Runx2/Cbfa1 や PPAR- γ の転写活性を調節し、骨芽細胞への分化を促進、脂肪細胞への分化を抑制する。また、TAZ の C 末端に存在する PDZ-binding motif により、TAZ は核内のみならず形質膜へも局在する。このことから、TAZ は形質膜のシグナルを核内へ伝達する働きを持つ可能性が考えられている。

TAZ の生理学的な機能の解析のために作製した TAZ 欠損マウスは、主として腎臓と肺に異常所見を認めた。腎臓においては、多発性嚢胞腎様の所見と著明な尿濃縮障害を呈した。本研究では、TAZ 欠損マウスにおける肺の表現型について解析を行った。

成体の TAZ 欠損マウスの肺は、過膨張所見を認め、病理標本において著明な気腔の拡大を認め

た。平均肺胞径の指標である MLI (Mean Linear Intercept) は、野生型の $51.6 \pm 1.0 \mu\text{m}$ に対し TAZ 欠損マウスでは $149.6 \pm 5.7 \mu\text{m}$ と有意に増加していた。また、気管支肺胞洗浄液中の細胞数を計測すると、TAZ 欠損マウスのマクロファージやリンパ球の数は、有意に大きかった。生理学的な検査では、肺エラスタンスは、野生型の $15.8 \pm 0.7 \text{cmH}_2\text{O/ml}$ に対し TAZ 欠損マウスでは $8.4 \pm 1.2 \text{cmH}_2\text{O/ml}$ と有意に低下しており、圧-容量曲線を描くと、TAZ 欠損マウスでは明らかに肺容量が増大していた。これらの所見は、ヒトの慢性閉塞性肺疾患 (COPD) において認められる肺気腫に非常によく類似している。

TAZ 欠損マウスの肺の病理所見を時系列的に解析すると、胎生期にはやや未熟な印象はあるものの野生型と大きな違いは認められなかったが、生後 5 日目には明らかに分岐数が減少しており、その後の生後 14 日目までの肺胞期において、肺胞形成が十分に行われていないことが示唆された。つまり、肺発生の過程における囊状期から肺胞期の末梢肺の形成不全が、TAZ 欠損マウスの肺気腫様の病態をもたらしていると考えられた。

TAZ の正確な発現部位についての解析は、抗 TAZ 抗体が TAZ の homologue である YAP (yes-associated protein) とも結合することから、困難である。TAZ 欠損胎生肺の抗 TAZ 抗体による免疫染色では、中枢側の気管支上皮は野生型と同様の染色性を示し、末梢肺の上皮でのみ染色性の低下が認められた。YAP が気道上皮にて発現することが示されていることと併せて考えると、TAZ が従来報告されているよりも末梢に限局して発現している可能性が考えられた。

先行論文において、TAZ は肺上皮において転写因子 TTF-1 (thyroid transcription factor-1) の転写活性を亢進することが報告されている。このことから、TAZ 欠損肺における TTF-1 の下流遺伝子 (サーファクタント蛋白 C など) の発現を real time RT-PCR にて調べたが、予想に反して野生型のものと有意な差は認められなかった。また、 $\alpha 1$ アンチトリプシンなどの肺気腫に関連する遺伝子の発現にも大きな変化は認められなかった。一方で、Flk1 や PDGF-A (platelet-derived growth factor-A) などの発現は軽度低下しており、病態への関与が考えられた。これらの結果は、

TAZ は上皮に発現するとされているにもかかわらず、欠損肺では血管や間質への影響がより大きい可能性を示唆している。

TAZ 欠損肺の病態に関与する因子を網羅的に解析するために、胎生肺から抽出した total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。TAZ 欠損肺にて低下していた 5 つの遺伝子に関して解析を進めたが、特に connective tissue growth factor (CTGF) は、肺腺癌の cell line である LA4 細胞を用いた実験系において、TAZ siRNA による TAZ ノックダウンにより発現が低下、発現ベクターを用いた TAZ 過剰発現により発現が増加したことから、TAZ との密接な関連性が示唆された。抗 CTGF 抗体を用いた TAZ 欠損肺の免疫染色では、末梢肺における CTGF の発現低下が示された。

CTGF は、線維芽細胞の増殖、血管新生、細胞外マトリックス沈着などに関与することが知られており、肺においては特に間質性肺炎における発現の増加が知られている。一方で、肺発生において、肺胞形成には弾性線維などの間質成分が重要であるとされる。このことから、CTGF は末梢肺の形成に重要な働きをする可能性が考えられ、TAZ は CTGF の発現を調節する形で病態に関与しているのかもしれない。

ヒト COPD における肺気腫は、一般的に一旦正常に形成された肺胞の破壊による病態であると考えられており、今回の TAZ 欠損マウスにおける肺発生の異状による肺気腫様病態とは厳密には異なる。しかし、一方で肺の発生に関わる因子が、COPD を含む成人後に発症する肺疾患への罹患のしやすさに関与する可能性がある。

TAZ ヘテロマウスは、TAZ mRNA の発現は野生型に比し低下しているものの、病理学的には野生型との明らかな差異は認められなかった。このことから、TAZ ヘテロマウスに対し、LPS 刺激および短期喫煙暴露試験を施行した。サンプル数やマウスのバックグラウンドの問題はあるものの、これらの刺激により TAZ ヘテロマウスの気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数は野生型のものに比し増加する傾向にあった。現在、TAZ ヘテロマウスの長期喫煙暴露試験を計画中である。

以上、本論文では、TAZ 欠損マウスのホモ個体は末梢肺形成不全をきたし、これにより成体では肺気腫様の所見を認めること、ヘテロ個体では LPS/喫煙刺激により炎症が惹起されやすい傾向があることを示した。TAZ は肺発生に重要な働きをする因子であると考えられ、特に CTGF の発現の調節が大きく関わっている可能性がある。また、ホモ個体における肺気腫様病態、ヘテロ個体における炎症刺激への感受性亢進は、それぞれ COPD の異なる側面に類似しており、TAZ 欠損マウスが新たな COPD モデル動物となる可能性が考えられた。