

特集 明日の診療に役立つ細胞分子生物学

## Topics 3

# 呼吸器疾患と動物モデル

鉄本 訓史 / 武田 吉人 / 木島 貴志  
立花 功 / 熊ノ郷 淳

要旨：種々の遺伝的素因に環境要因が加わることで発症する、多くの慢性疾患の病態解明には、適切な疾患モデル動物の開発が必須である。多くの呼吸器疾患においてモデル動物が開発されているものの、ヒトに類似したモデル動物の実現は困難で、解析方法も限られているのが現状である。本稿では、慢性閉塞性肺疾患（COPD）のモデル動物開発の現状、イメージングを中心とした解析方法の進歩、今後の課題について概説する。

キーワード：疾患モデル動物, COPD, イメージング  
Animal models of disease,  
Chronic obstructive pulmonary disease, Imaging

連絡先：武田 吉人  
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2  
大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫アレルギー内科  
(E-mail: yoshito@imed3.med.osaka-u.ac.jp)

## はじめに

生活習慣病を含む多くの疾患は、個々の遺伝子や蛋白質の変異そのものが病態を形成するのではなく、それらが相互作用して形成された細胞分子ネットワークの調節不全が基礎となって発症する。慢性閉塞性肺疾患(COPD)や喘息を含む多くの呼吸器疾患も例外ではない。臨床の現場においては、同一疾患といえども、多様な表現型を含むため、病態や治療をひとくくりにすることに限界を感じることも多い。最近では、各々の疾患が複合するオーバーラップ症候群も存在することから、問題はさらに複雑である。

このように複雑多岐にわたる慢性疾患を理解するうえで欠かせないのが、疾患モデル動物である。一方で、動物モデルを利用する際には、さまざまなモデルの特性や利点、ヒトの病態との相違などを理解しておくことが重要である。

多くの疾患モデル動物の作製に、マウスが利用される。その理由として、①体が小さく、繁殖や飼育が容易である、②ゲノム解析が進みヒトとのゲノム相同性も高い、③寿命が短い、④遺伝子操作が容易であり抗体など利用しうるツールも多い、などがあげられる。

現在までに多くの呼吸器疾患(COPD、喘息、間質性肺炎、肺癌、肺炎)において、種々のモデル動物が開発されてきた。肺は常に外界と接するため、喫煙や大気汚染などの外因性危険因子と、遺伝素因などの内因性危険因子を区別して評価することは困難であり、遺伝的背景が明確な動物を用いた解析がより有用と考えられる。一方でヒトの肺と異なる点として、①線毛や気管支粘膜下腺の発達不良、②呼吸細気管支がない、③鼻腔呼吸であること、を理解することが肝要である<sup>1)</sup>。

本稿では誌面の都合上、肺の生活習慣病として注目され、呼吸器疾患において最も多様な表現型を示すCOPDの疾患モデル動物を例にして、その利用法と最近進歩の著しいイメージング技術について触れる。

## COPD モデル

COPDは、喫煙や大気汚染が原因の気流閉塞を主体とする肺の炎症性疾患で、高齢化に伴い患者数の増加が予想されている。さらにCOPDは肺の炎症が全身に波及す

るために、心血管疾患や骨粗鬆症などが高率に合併する全身性疾患とみなされるようになった。COPDの主要な発症メカニズムとして、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡、酸化ストレスやアポトーシスがあげられる。COPDの病態形成には、マクロファージや好中球だけでなく、肺を構成する肺胞上皮細胞や血管内皮、さらには種々の細胞外マトリックスが関与することが知られているが、病態解明は不十分である。米国では、COPDがNational Institute of Health (NIH) 特別研究推進テーマに採択され、COPDモデル動物作製と解析が主研究テーマとされた。COPDの病態だけでなく、新規治療法の開発に欠かせない主要なCOPDモデルについて、その長所と短所を比較しながら、利用法について概説する。

### 1. 喫煙曝露モデル

COPDの主要な原因が喫煙であることから、喫煙曝露モデルはゴールドスタンダードと考えられている。6ヶ月の喫煙曝露により、ヒトに類似した小葉中心性の肺胞破壊を伴う肺気腫病変だけでなく、気道病変(リモデリング)や血管病変(肺高血圧)も誘導することが可能である<sup>2)</sup>。一方で、臨床で主な治療の対象となる重症の肺気腫を誘導することが困難であるだけでなく、長期にわたる喫煙曝露が必要であることが難点とされる。また骨粗鬆症は喫煙曝露によっても誘導されることが知られているが、他の併存症については解析が不十分のため、今後の課題である。

### 2. エラスターゼモデル

喫煙曝露モデルと大きく異なる点は、3週間という短期間で肺胞破壊を伴う肺気腫を簡単に誘導できることである。さらに重度の肺気腫を誘導できるため、組織学的解析に頼らなくても、呼吸機能でも十分にとらえることが可能である。しかしこのモデルはあくまでエラスターゼ肺気腫であり、広く利用されている porcine pancreatic peptide (PPE) により誘導される限局したモデルである。よって動物や strain により、内因性のエラスターゼ活性阻害作用が異なることに留意しなければならない。さらに喫煙曝露モデルと違い、気道病変や骨粗鬆症などの併存症を誘導することが難しく、治療介入による効果には慎重な解釈が必要である。

### 3. 遺伝子改変マウス

現在までにSP-D、IL-18、IFN $\gamma$ など種々の遺伝子操作マウスが開発された。そのほとんどは肺気腫モデルであり、気道リモデリングを検討したものは少ない。上記2つの標準モデルと異なり、短期間に効率よくCOPDモデ

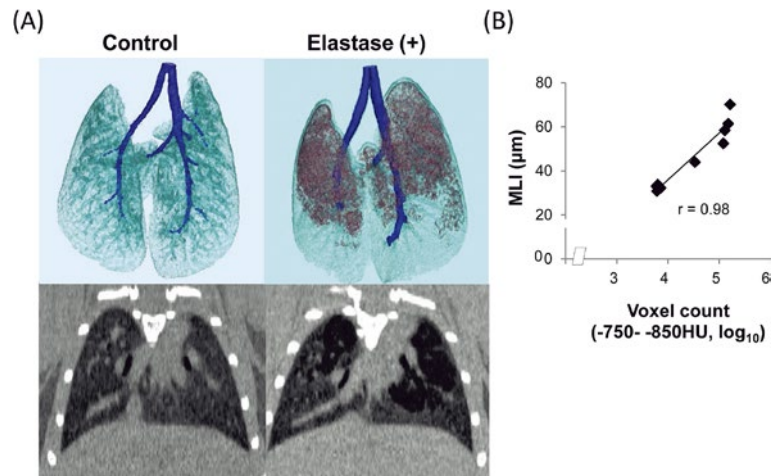


図1 コントロールマウスとエラストラーゼ刺激マウスのCT像と組織切片の比較。(A) コントロールマウスとエラストラーゼ刺激マウス肺のCT画像を三次元処理した画像(上段)と冠状断像(下段)。三次元画像の茶色の領域は気腫性変化を示す。(B) 肺の組織切片より算出したMLI値と、肺CT画像における低濃度吸収領域のvoxel countとの相関 ( $r=0.98$ )。

ルマウスを作製できる。さらに遺伝子操作マウスには、骨粗鬆症や心血管疾患などの全身性疾患としてのCOPD類似病態を呈するものがあるという報告や<sup>3)4)</sup>、予想外の新規メカニズムの解明に至るものもある<sup>5)</sup>。これらのモデルにおいては、恒常的にある遺伝子を増加・欠損させており、肺の発達にも影響を与えることが予想されるため、コンディショナルノックアウトマウスによる検討も必要である。

#### 4. 利用に際しての注意点

以上のモデル動物を、用途に応じて、可能な環境のなかで使い分けることが必要であるが、今後老化と急性増悪モデルの改良も重要である。老化はCOPDだけでなく、種々の慢性炎症性疾患の発症基盤をなすことから、そのメカニズムを解明することは、新規病態解明や創薬に寄与すると考える。さらにCOPD患者の予後を規定する因子として急性増悪に関するモデルも少なからず報告されているが<sup>6)</sup>、急性増悪は感染や他の因子も関与するためヒトに近いモデルについては、今後の課題である。

最後に、治療介入に関して、Everything prevents emphysemaと題する興味深い論文を紹介する<sup>7)</sup>。すなわち、マウス肺気腫モデル(喫煙)は軽症であるだけでなく、多くの治療実験は、発症前からの予防的治療(進行抑制)であり、ヒトにおける治療介入とは異なるという内容である。確かに呼吸器疾患に限らず多くの基礎研究では、

早期に治療を開始しているため、マウスでは有効であったがヒトでは効果がみられない事例を散見する。早期介入の意義を検討するうえでは動物モデルを用いた検討は有用であるが、ヒトへの応用を目指すためには、後期介入実験の追加も必要であることを示唆する。

## 小動物における画像解析の進歩

臨床では、computed tomography (CT)・magnetic resonance imaging (MRI)・positron emission tomography (PET)といった画像解析が取り入れられ、機能と形態の両面を同時にとらえながら、疾患の診断や治療効果の評価に生かしている。

肺疾患においても、画像解析は近年飛躍的な進歩を遂げた。なかでもCOPDに関しては、CTの技術的な進歩により解像度が上がり、末梢気道の解析などが進んでいる。そのほか、肺疾患に重要な機能解析を行うため、偏極させた希ガス(<sup>3</sup>He, <sup>129</sup>Xe)を吸入しMRIにて撮影する、超偏極MRIもヒトへの応用と安全性が検討されている<sup>8)</sup>。

従来、実験動物の気腫病変の解析は、形態的には病理組織、機能的にはプレチスモグラフィーによる呼吸機能検査で評価を行ってきたが、これらの解析法では病態発

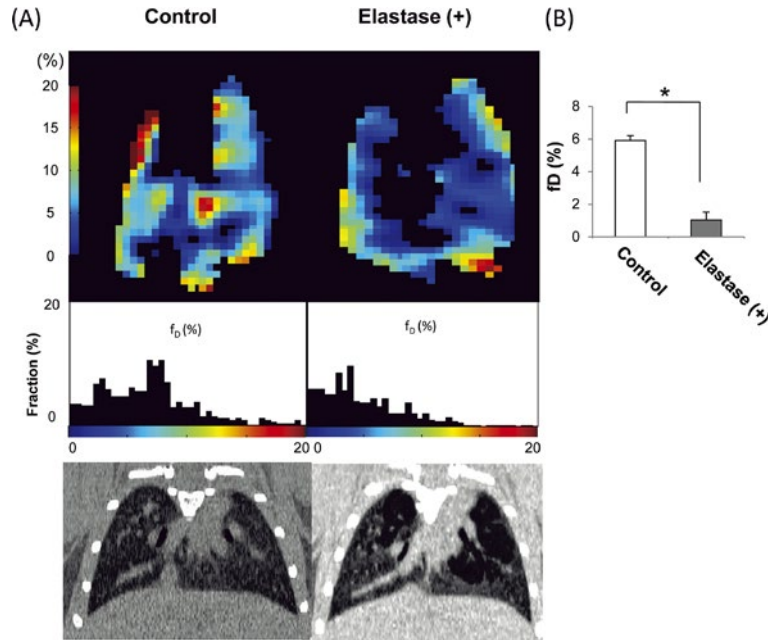


図2 コントロールマウスとエラスターゼ刺激マウスの超偏極  $^{129}\text{Xe}$  MRI 画像と CT 画像. (A) 上段: 超偏極  $^{129}\text{Xe}$  MRI のパラメーターである fD 値の肺内分布 (赤: 高値, 青: 低値). 中段: fD 値のヒストグラム (縦軸: それぞれの fD 値の出現頻度, 横軸: fD 値). 下段: 超偏極  $^{129}\text{Xe}$  MRI 撮影を行った同一マウスの冠状断 CT 画像. (B) コントロールマウスとエラスターゼ刺激マウスの fD 値の平均値比較 (\* $p < 0.01$ ).

症のタイミングの把握や同一個体を用いての経時的な評価は困難であった. しかし非侵襲的, かつリアルタイムで評価可能なモダリティが開発されたおかげで, 経時変化の追跡が可能となるだけでなく, 最小限の動物で効率的かつ詳細な解析が可能となった<sup>9)</sup>.

### 1. Micro-CT

実験動物における CT 撮影に関しては, 従来気管切開後に人工呼吸器を装着し呼吸サイクルを調節した撮影方法が多く用いられてきた. しかし, 自発呼吸下で呼吸同調システムを搭載した CT 装置が開発されたことで, 飛躍的に解析が容易かつ迅速になった.

たとえば, エラスターゼ肺気腫モデルについて micro-CT 撮影後に, 三次元イメージを作成したところ, 上肺野に広がる低吸収領域を生きたまま観察することができた (図 1). 実際, 病理組織標本による mean linear intercept (MLI) は, CT 像における低吸収領域に強い相関を認めた. よって自発呼吸下での micro-CT の利用は, 従来の病理解析と同等の結果が得られることが確認できた<sup>10)</sup>.

### 2. MRI

従来 MRI に関しては, 空気による artifact や呼吸運動・心拍のため, 技術的に撮影が困難なため, 肺の解析には不向きと考えられてきた. しかし, 光ポンピング法により信号強度を増強した希ガス ( $^3\text{He}$ ,  $^{129}\text{Xe}$ ) を吸入させる技術の開発により, 組織・airspace の形態だけではなく, 換気機能を解析することが可能となった. さらに  $^{129}\text{Xe}$  は  $^3\text{He}$  と異なり血液中に溶解するため, 超偏極  $^{129}\text{Xe}$  は血中の希ガスを肺胞内の希ガスとは異なる信号として解析でき, 肺胞と血管のガス交換能を部位別に評価することが可能である. そこで超偏極  $^{129}\text{Xe}$  MRI によるガス交換能と micro-CT による肺気腫の評価を検討した. MRI 解析では, 呼吸リズムに同調して経時的なガス分布を測定し, ガス交換能を脱分極パラメーター fD として算出した. ガス交換能パラメーター fD 値の分布図では, 肺気腫病変部位である上肺野では fD 値が低下しており, コントロールマウスに比較すると, ガス交換能が低下していることを確認した. また, そのヒストグラムは肺気腫モデルでは大きく左 (交換能の低下方向) にシフトし, fD 値は無刺激群に比べ, 著明に減少した (図 2). さらに,



CT画像の低吸収領域はMRI画像の換気能パラメーターFDの低値領域と合致するだけでなく、肺気腫病変における換気能の低下も示された<sup>10)</sup>。

### 3. Bioluminescence imaging (BLI)

Bioluminescence (生物発光)とは、生物が光を生成し放射する現象である。生物発光を利用し画像化したものがBLIであり、実験動物における分子イメージングの手法として近年飛躍的に進歩している。生体におけるBLIの欠点として、動物組織を通過する際に光が減衰してしまうことと、PETやMRIとは異なり二次元の表示のため、深さの情報が得られない点があげられる。しかし、低エネルギーで組織を透過する光子モデルや、回転ミラーによる撮影により、BLIの解析技術が進歩した<sup>11)</sup>。生物発光物質としてルシフェラーゼを用いて、*in vivo*での遺伝子発現の解析などが行われている。たとえば*in vivo*でNF- $\kappa$ Bの発現を解析するために、肺の組織でルシフェラーゼを発現するマウスを作製し、LPS刺激によるNF- $\kappa$ Bの発現増強を示した。さらに、NF- $\kappa$ Bの阻害物質を投与することで、リアルタイムにNF- $\kappa$ Bの発現低下を示すことに成功した<sup>12)</sup>。

しかし各々の解析法には欠点・利点があり、一つの解析法だけでは十分とはいえない。今後は、非侵襲的な評価法を複数組み合わせることで(マルチモーダル)、病態解明や薬効評価を経時的に検討することが求められる。

## 今後の課題

COPDは、高齢化や喫煙率を背景として、ここ数十年間に増加の一途をたどっており、潜在患者の多さと疾病負担の大きさから、21世紀の生活習慣病と位置づけられている。1990年代後半から展開された大規模臨床試験の成果により、COPDは「治療反応性の乏しい疾患」から「予防可能で治療可能な疾患」へと疾患概念の変遷までもたらし、しかし現在の治療薬は、気管支拡張剤が主体であり、炎症や肺泡破壊を根本的に治療する薬剤はもちろん、全身性疾患としてのCOPD治療薬は存在しない<sup>13)</sup>。基礎から臨床へのトランスレーショナルリサーチが重要な位置づけとして注目されているが、基礎研究の成果が臨床に応用されるまでの道のりは、極めて長い。

本稿で紹介した疾患モデルマウスや新規イメージング以外に、細胞の運動、1分子の動き、細胞周期を*in vivo*でとらえることも可能となり、テクノロジーの進歩は著

しい。さらにトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどの網羅的解析やこれらを統合した解析(マルチオミックス)を駆使した基礎研究により、呼吸器疾患における新規病態解明や治療法のさらなる開発が期待されている<sup>14)</sup>。もちろんこれら疾患モデル動物から得られた知見(病態、解析法、バイオマーカー)を臨床に還元するとともに、ヒトから得られた研究成果は、再び基礎研究へフィードバックされるという両方向の働きかけが重要である。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特に申告なし。

### 引用文献

- 1) Wright JL, et al. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med* 2010; 4: 723-34.
- 2) Wright JL, et al. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L1-15.
- 3) Hoshino T, et al. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 49-62.
- 4) Takeda Y, et al. Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. *J Biol Chem* 2008; 283: 26089-97.
- 5) Nakanishi K, et al. Involvement of endothelial apoptosis underlying chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in adiponectin-null mice: implications for therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 1164-75.
- 6) Kobayashi S, et al. A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49: 971-7.
- 7) Churg A, et al. Everything prevents emphysema: are animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease any use? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45: 1111-5.
- 8) Coxson HO, et al. New and current clinical imaging

- techniques to study chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 588-97.
- 9) Schuster DP, et al. Recent advances in imaging the lungs of intact small animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 129-38.
  - 10) Tetsumoto S, et al. Validation of noninvasive morphological and diffusion imaging in mouse emphysema by micro-computed tomography and hyperpolarized ( $^{129}\text{Xe}$ ) magnetic resonance imaging. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49: 592-600.
  - 11) Dothager RS, et al. Molecular imaging of pulmonary disease in vivo. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 403-10.
  - 12) Ansaldi D, et al. Imaging pulmonary NF-kappaB activation and therapeutic effects of MLN120B and TDZD-8. *PLoS One* 2011; 6: e25093.
  - 13) Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 543-59.
  - 14) Agusti A, et al. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease: from phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology, and P4 medicine. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 1129-37.

## Abstract

### Animal models in respiratory diseases

Satoshi Tetsumoto, Yoshito Takeda, Takashi Kijima, Isao Tachibana and Atsushi Kumanogoh  
Department of Respiratory Medicine, Allergy and Rheumatic Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine

Because various genetic predisposition and environmental factors have been involved in the pathogenesis in chronic diseases, the development of appropriate animal models is critical to understand their mechanisms. Although various animal models have been developed to reproduce and analyze human respiratory diseases, ideal models have not been established. Moreover, the methodology to analyze these models is limited. Novel technologies, however, such as MRI and micro-CT, to assess the lung function and morphology in small animals have recently been developed. Here we discuss the advantages and disadvantages of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) animal models as well as novel imaging technology.