

上皮型 Na⁺ チャネルを創薬ターゲット分子とした呼吸器疾患治療薬の開発研究
～気道上皮特異的 βENaC 過剰発現マウスの薬効評価解析と新規 ENaC 制御因子 calreticulin の同定～

分子機能薬学講座 遺伝子機能応用学分野 菅原 卓哉

嚢胞性肺線維症 (CF) や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) において重篤度を左右する極めて重要な症状は、気道粘液の喀出困難あるいは産生過多による気道閉塞である。従って、これら気道粘液過剰症状を改善する薬が、有用な去痰薬として長年使用されてきた。しかしながら、現存する去痰薬は、日本で発売されていても FDA に承認されないものが殆どであることから、その有効性についてはグローバルスタンダードとして認められていないのが現状である。これは、基礎研究において、臨床症状が類似し、かつ、薬効評価に耐えうる安定した病態モデルが存在しなかったこと、さらに創薬ターゲットとしてふさわしい分子が見いだされていなかったことが大きな原因であるといっても過言ではない。

上皮型 Na⁺ チャネル (ENaC) は、種々の上皮組織の管腔側に発現する Na⁺ チャネルである。興味深いことに、気道上皮における ENaC の過剰な活性化は、気道上皮組織内への Na⁺ 吸収に伴った水分吸収を促進させ、気道クリアランスの機能異常などの気道粘液過剰症状を引き起こすことが報告された。そこで、本研究では、ENaC を創薬ターゲット分子とした去痰薬などの呼吸器疾患治療薬の開発を究極の目的とし、第 1 に、気道上皮特異的 ENaC 過剰発現マウス (βENaC Tg マウス) の気道粘液過剰症状の解析とその薬効評価モデルとしての有用性について検討を行い、第 2 に、ENaC の細胞内発現制御機構について検討を行った。

第 1 に、本研究では、2004 年 Mall らが報告した気道上皮特異的 ENaC 過剰発現マウス (βENaC Tg マウス) に着目した。本マウスは、気道粘液過剰症状による気道閉塞のため、出生から 4 週齢までの死亡率が高く薬効解析には不適切であった。そこで、まず、低致死率 βENaC Tg マウスの確立を目指した。その結果、交配を進めていく過程で、致死率の低い長寿命マウスコロニーを安定的に維持、継代することに成功した。次に、8 週齢以降の低致死率 βENaC Tg マウスに関して、肺組織の PAS 染色と気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のフコース濃度の評価解析を行った。その結果、野生型マウスでは確認されない粘液栓とフコースを検出した。さらに、低致死率 βENaC Tg マウスでは、野生型マウスに比べ粘液産生細胞である goblet 細胞のマーカー Clca1, gob-5 の発現が 6~9 倍高く、ムチン関連遺伝子 (MUC4, MUC5AC, MUC5B) の発現も付随して 2~4 倍に上昇することが明らかになった。次に、本マウスに対し、ENaC 抑制作用を有する急性膵炎治療薬メシル酸カモスタットの投与 (100 mg/kg, p.o., 2 weeks) を行ったところ、BALF 中のフコース濃度を約 50% 減少させ、Clca1,

gob-5, MUC5AC, MUC5B の発現量も 30~60% 減少させることが明らかになった。最後に、気道病態の形成や修復過程を評価できるマウスモデルの作製を企図し、ENaC の発現制御が可能な、コンディショナルトランスジェニックマウスの作製に着手した。本研究では、まず、tet-system 応答配列の下流に β ENaC 遺伝子を有するマウス (TRE-mScnn1b Tg マウス) を作製し、PCR および Southern blotting による選別の結果、1 系統の TRE-mScnn1b Tg マウスを得た。次に、本マウスと気道上皮特異的 tet-system 導入マウス (Scgb1a1-rtTA Tg マウス) を交配し、両遺伝子を保有するマウス (TRE-rtTA/TRE-mScnn1b Tg マウス) を作製した。現在、doxycycline (tetracycline 類似化合物) の投与による β ENaC の発現誘導の有無について確認中であるが、今後、本モデルは病態解析、並びに、新たな創薬ターゲット分子の発見に貢献することが期待される。

第 2 に、タンパク質の小胞体内における品質管理および形質膜上発現において重要な役割を果たす、小胞体分子シャペロン calreticulin (CRT) に着目し、ENaC の発現制御機構に対する影響を検討した。まず、ENaC の発現量に対する CRT の影響を Western blotting にて検討したところ、CRT は ENaC の全てのサブユニット (α , β , γ) の細胞内発現量を増加させることが明らかになった。次に、ENaC の合成、分解機構における CRT の影響について検討を行った。その結果、ENaC の合成および分解機構に対して CRT の寄与は殆どないことが明らかになったが、免疫沈降法の結果から ENaC と CRT の間には直接的な相互作用が存在することが明らかになり、また、CRT は ENaC の凝集を抑制し、RIPA buffer 可溶性画分への移行性を高めることによって ENaC の細胞内発現量を増加させることも明らかになった。さらに、CRT は ENaC の形質膜上における発現量を増加させ、ENaC のチャネル機能を亢進させることも明らかになった。CRT は慢性気道疾患時に発現量が上昇する分子シャペロンであることから、CRT は ENaC を介して発症する気道病態の増悪因子である可能性が示唆された。

以上、本研究により、確立した低致死率 β ENaC Tg マウスが安定的に気道粘液過剰症状を発現すること、メシル酸カモスタットが β ENaC Tg マウスの気道粘液過剰症状を改善する傾向にあること、さらに CRT が ENaC の発現量を増加させ、チャネル機能を増強させる正の因子であることが明らかになった。去痰薬開発の基礎研究において、臨床症状に近く、薬効評価に耐えうる病態モデルが存在しなかった背景と、創薬ターゲットとしてふさわしい分子が見いだされていなかった背景を踏まえると、本研究で得られた知見は、有用性が疑問視されている既存の去痰薬の再評価、さらに ENaC を標的とした新規呼吸器疾患治療薬の開発において十分貢献しうる、極めて重要な知見である。