

喘息モデルマウスを用いた蛍光生体イメージング

岩下淳, 小林薫, 安田将人, 村田純

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

喘息, COPD 患者の気道では粘液ムチン MUC5AC の産生亢進が起き, 気道閉塞, 呼吸困難等の症状が誘発される. 我々はヒト気道初代細胞及び, ヒト気道上皮細胞株を用いて細胞外マトリックスからのシグナルが, インテグリンや ERK 経路等を介して MUC5AC の産生を制御することを以前報告した. これまでの研究成果を元として生体における喘息治療効果を解析, 評価するため, 本研究では, 初めてヘアレスマウスを用いて喘息モデルマウスを作製し, 低酸素環境下で発光するイリジウム錯体を用いて低酸素状態が予想される肺を中心に生体イメージングで観察し, 非侵襲的に喘息病態を解析した. 喘息病態を誘起するオボアルブミン噴霧の結果, ヘアレスマウスの血中に抗オボアルブミン抗体の増加が観察された. この増加はオボアルブミン噴霧を 10 日間休止しても, 低下は見られなかった. さらに喘息モデルの指標である TNF- α mRNA と MUC5AC ムチンの気道での増加も観察された. イリジウム錯体を尾静脈に投与した喘息モデルマウスで生体イメージングを行った結果, 肺を中心とした発光が観察された. これらの結果から, ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスが作製され, 生体イメージングにより喘息症状に伴う肺等での低酸素状態を非侵襲的に解析, 評価できる可能性が示された.

キーワード: 喘息, モデルマウス, MUC5AC, オボアルブミン (OVA), 蛍光生体イメージング

気道表面を覆う粘液の主成分であるムチンタンパク質は生体防御に重要である (Fahy et al., 2010). しかし喘息患者の気道ではムチンの一種である MUC5AC が過剰に産生されて閉塞し, 呼吸を困難にする (Fahy et al., 2002; Rose et al., 2006; Lai et al., 2010., Button et al., 2012). 我々は喘息症状の原因となる MUC5AC ムチンの産生の制御機構を明らかにして, その分泌を減らし, 症状の予防, 改善を目的とした研究を行ってきた.

我々はこれまでにヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 において, 細胞間接着因子 E カドヘリンや, 細胞外マトリックスからのシグナルが粘液ムチン MUC5AC 及び MUC5B の産生を制御することを発見した (Iwashita et al., 2011; Ito et al., 2015., Iwashita et al., 2016). 代表的な細胞外マトリックスである 4 型コラーゲンからのシグナルは MUC5AC を減少させる (Iwashita et al., 2010). この減少には細胞と細胞

外マトリックスを結ぶ接着分子インテグリン, そしてその下流にある Akt や ERK キナーゼが重要であった (Iwashita et al., 2013; Iwashita et al., 2014).

これらの研究成果を元に喘息症状の改善策を生体で探るため, 本研究ではまずヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスを作製した. さらに新たな試みとして生体を傷つけない非侵襲的な方法である生体イメージングを用いて喘息症状の解析を行った.

喘息モデルマウスは, 喘息病態を再現したマウスである. マウスにオボアルブミン (OVA) を投与し, 気道に炎症を誘起して, 喘息様のアレルギーを引き起こし作製する (Kumar et al., 2008) (図 1). OVA を投与したマウスが喘息病態となった確認には, 一般的な指標である血中抗 OVA 抗体量, 喘息患者の気道中で増加する炎症性サイトカインの TNF- α , 気道中の MUC5AC 産生量の増加が用いられる.

今回喘息モデルマウス作製に加えて, 蛍光生体イ

イメージングを試みるため、初めてヘアレスマウス (Hos:HR-1) を用いた。Hos:HR-1 は、Hr^{hr}/Hr^{hr} 遺伝子の導入により、イメージングを阻害する体毛を欠失している。我々は喘息病態になると、肺への酸素量の減少により、肺を中心に低酸素状態になると予想した。そして低酸素環境で発光するイリジウム錯体を用いた生体イメージング法での発光量を、喘息症状評価の新たな指標として用いることを着想し、本実験を行った。

本研究では、ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスを作製し、非侵襲的な方法である生体イメージングで体内の低酸素状態について解析を行ったので報告する。

材料と方法

喘息モデルマウス作製

ヘアレスマウス (Hos:HR-1) を喘息モデルマウス作製に用いた。本実験では星野試験動物飼育所から6週齢マウス雌を購入し、実験に供した。

マウスに気道炎症を誘起し、喘息モデルとするため、腹腔注射と、噴霧により OVA を投与した。腹腔注射では、マウス1匹当たり OVA 20 µg, 水酸化アルミニウム 2 mg in 200 µL PBS を注射した。OVA の噴霧では 1% OVA in PBS をネブライザーで霧化し、毎日 30 分間噴霧した。

血中における抗 OVA 抗体の検出

マウス尾静脈より採取した血液を材料として、血中に含まれる抗 OVA 抗体を Anti-ovalbumin IgG EIA Kit : cayman, (MI, USA) を用いて定量した。

RT-PCR

マウスの気道と肺を摘出し、TRIZOL solution (株式会社インビトロゲン Tokyo Japan) を用いて total RNA を抽出した。SYBR Green RT-PCR Kit (Epithelix Sarl, Geneva, Switzerland) と light cycler (Roche, Tokyo, Japan) を用い、TNF- α と β -actin について特定のプライマーを用いて RT-PCR により発現量を測定した。

プライマー配列, mouse betaactin SE: ATT GCT GAC

AGG ATG CAG A, mouse betaactin AS: GAG TAC TTG CGC TCA GGA GGA, mouse TNF-alpha SE: AGC CGA TGG GTT GTA CCT TGT CTA, mouse TNF-alpha AS: TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT

Dot Blot 法による検出

マウスの気道を 100 µL の PBS で 3 回洗浄した後、回収し、これを気道洗浄液とした。この気道洗浄液 3 µL を PBS で 300 倍希釈し、サンプル中の MUC5AC 産生量を検出した。PVDF 膜 (MILLIPORE, MA, USA) を 1 分間メタノールに浸した後、10 分間×2 回 TBS-T 溶液 (0.02 M Tris-HCL (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 0.1% Tween-20) の中に静置した。メンブレンを Dot Blot 装置 (Scie-Plas, Cambridge, UK) に装着し、40 µL のサンプルを加えた。PVDF 膜に 1% スキムミルク in TBS-T を加え、4°C で一晩ブロッキングした。一次抗体である抗 MUC5AC 抗体 (Thermo SCIENTIFIC, Kanagawa, Japan), 又は抗 β actin 抗体 (Sigma, MO, USA) に 1 時間室温で浸した。5 分間×5 回 TBS-T 溶液で振とう洗浄した。二次抗体である ECL 抗マウス IgG HRP 標識抗体で 1 時間反応後、5 分間 5 回 TBS-T 溶液で振とう洗浄した。PVDF 膜を Luminata Forte HRP 液で 5 分間処理し、Chemidoc image analyzer でシグナルを検出した。

生体イメージング

穂坂正博教授からご提供いただいた、低酸素環境化で発光するイリジウム錯体で長波長改良体である BTPHSA をプローブとして用いた。マウスを固定器に入れ、尾静脈から 1 匹あたり 200 µL (5mM BTPHSA を生理食塩水で 4 倍希釈) 投与した。生体イメージングを行う際は、ペントバルビタールナトリウムをマウスに腹腔注射して麻酔し、Maestro EX を用いて発光を検出した。

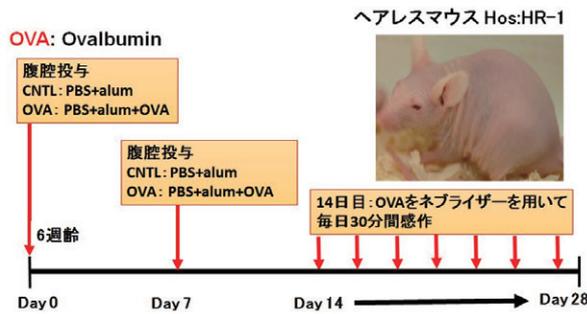


図1 OVA 投与による喘息モデルマウスの作製 (模式図)

結果

OVA を投与したマウスでは血中の抗 OVA 抗体が増加する。

OVA 投与によりヘアレスマウスの喘息モデル作製を試みた (図1)。喘息となったマウスでは血中の抗 OVA 抗体が増加する。ELISA 法を用いて検出した結果、OVA を噴霧したヘアレスマウス群 (OVA 群) では OVA を噴霧しない対照群 (CNTL) と比較して OVA に対する抗体量が 50 倍以上増加した (図2)。増加した抗 OVA 抗体量は、その後 OVA 噴霧を 10 日間休止しても減少は観察されなかった (図3)。

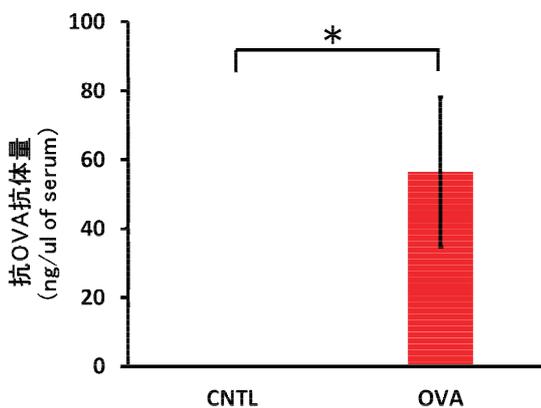


図2 OVA 投与による血中抗 OVA 抗体量への影響。
* : $p < 0.05$

OVA 投与マウスの肺及び、気道では TNF- α mRNA 発現量が増加する。

喘息となったマウスでは気管組織中の TNF- α mRNA 発現量が増加する。RT-PCR を用いて気道、肺における TNF- α mRNA を定量した。その結果、対照群と比較して OVA 群で TNF- α mRNA 量が増加した (図4)。また、同じく喘息モデルマウスの指標となるサイトカイン IL-13、ケモカイン CXCL-1 などでも発現量増加が見られた (Data not shown)。

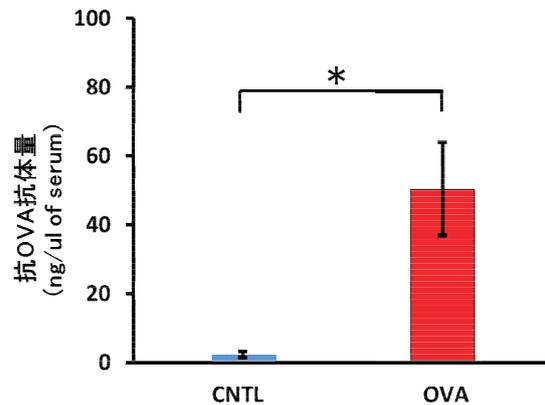


図3 OVA 投与を 10 日間休止した場合の血中抗 OVA 抗体量への影響。* : $p < 0.05$

OVA 投与マウスでは気道中の MUC5AC 産生量は増加する。

喘息となったマウスでは気道での MUC5AC タンパク質発現量が増加する。Dot blot 法を用いて MUC5AC を検出した結果、OVA 群では気道洗浄液に含まれる MUC5AC タンパク質が対照群と比較して 40 倍以上増加した (図5)。

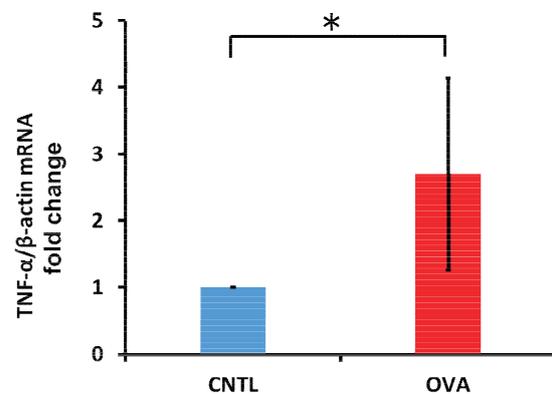


図4 OVA 投与のヘアレスマウス肺、気道における TNF- α mRNA 発現量への影響。* : $p < 0.05$

低酸素状態で発光するイリジウム錯体を用いた生体イメージングでは、OVA 投与マウスで肺を中心とした発光が観察される。

低酸素条件下で発光するイリジウム錯体 BTPHSA をマウスに投与し、生体イメージングを行った。その結果、OVA 群（喘息群）の肺を中心とした部位が対照群と比較して、より強く発光した（図6）。発光強度は、対照群と比較して、約7倍強く発光していた。この結果から喘息モデルマウスの肺は、低酸素環境になっており、生体イメージングで観察可能であることが示唆された。

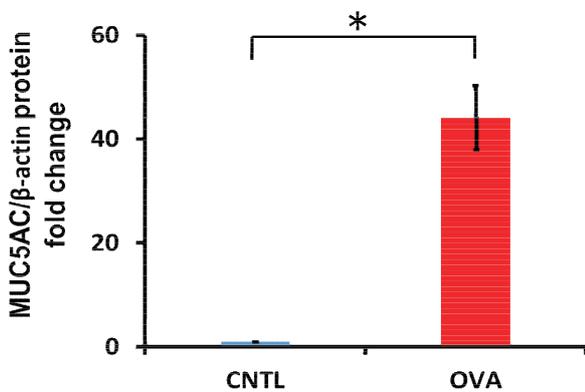


図5 OVA 投与したマウス気道での MUC5AC タンパク質発現量への影響。* : $p < 0.05$

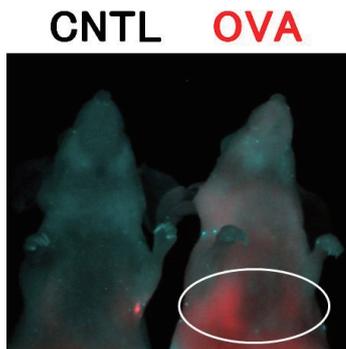


図6 OVA 投与により作製した喘息モデルマウスの生体イメージング。白丸部分が肺を示す。血中イリジウム錯体により、低酸素の部分が発光する（赤色）。

考察

喘息患者の気道では MUC5AC ムチンが増加し、呼吸を困難にする。我々はこれまでヒト気道上皮細胞株 NCI-H292, 及び喘息患者気道から摘出した初代

細胞の実験系 MucilAir を用いて解析を行ってきた。その結果、培養細胞株、初代細胞双方においてインテグリンの活性化が MUC5AC 産生を抑制する、そしてインテグリン経路の主要なキナーゼである Akt が MUC5AC 産生を抑制し、MEK/ERK 経路は MUC5AC 産生を増加させることを報告した。さらに4型コラーゲンからのシグナルが MUC5AC を抑制することを示した。これらの結果は、今後インテグリン経路の活性化、MEK/ERK 経路の抑制、4型コラーゲンの投与などにより、喘息症状を改善する手法の開発につながる結果である。この改善効果を評価するための新たな試みとして、今回ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスの作製と生体イメージングを行った。この手法を確立すれば、喘息症状の改善策の効果を、従来のように組織や気道洗浄液を採取するためマウスを犠牲させることなく、同一個体で観察が可能となり、経時的で、個体差が少ない結果が期待できる。

喘息モデルマウスでは OVA 投与によりマウスに炎症を誘起して喘息病態に近づける手法が確立されている (Nials et al., 2008)。これまでは C57BL/6 や BALB/c などのマウス種を使用している喘息モデル作製が一般的である (Kumar et al., 2008, Boyce et al., 2005)。今回蛍光生体イメージングを行うにあたり、マウス体毛は強い自家蛍光を発するため、イメージングの際に障害となる。体毛を欠いた代表的なマウス種にヌードマウスがあるが、ヌードマウスには胸腺が無く、免疫不全である。OVA に対するアレルギー反応を起こさせるため、今回は免疫系が備わるヘアレスマウスを用いた。ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウス作製は初の試みであり、これまでに報告はない。そのため、まずヘアレスマウスが OVA 投与によって喘息モデルマウスになっていることを、喘息モデルの指標である抗 OVA 抗体量、TNF- α 量、気道中の MUC5AC 産生量を用いて確認した。その結果、全て OVA 投与群で増加した（(図2-5)。これらの結果から、ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスの作製に成功したと考えられる。喘息モデルマウスに喘息症状を抑制する薬剤などを与え、その効果を評価するため、一時的に OVA 投与を休止する場合がある。喘息モデルとなったへ

アレスマウスへの OVA 噴霧を 10 日間休止して、血中抗 OVA 抗体量を観察したところ、抗体量の低下は見られなかった (図 3)。この結果から喘息モデルマウスへの OVA 噴霧を 10 日間程度休止しても、その喘息病態は大きな変化は無く、薬剤などの効果を観察することが可能であることが示唆された。同様に MUC5AC などの産生量の低下が見られないか、今後調べる必要がある。

次に喘息状態になると、MUC5AC 産生の増加と、気道の収縮により、肺への酸素量が減少し、肺を中心にした部位が低酸素環境になるのではないかと予想した。この可能性を検証するため、低酸素環境を非侵襲的な方法である生体イメージング法を用いて測定し、病態の指標として用いるため解析を行った。マウス尾静脈から低酸素環境で発光するイリジウム錯体 BTPHSA を投与し、肺をイメージングした (図 6)。その結果 OVA 投与群では肺を中心にした部位が CNTL 群に比べ、約 7 倍強く発光した。よって、喘息病態では、肺が低酸素環境になることが示唆された。肺以外の部分 (肝臓など) が発光しているのは、肺だけでなく、体全体の酸素量が減少し、低酸素環境になっているため、発光した可能性がある。

以上の結果から、①ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウス作製に成功した②喘息病態になると慢性的に肺が炎症を起こして低酸素状態にあり、非侵襲的な方法である生体イメージング法を用いて解析できる、等が示唆された。

以前の研究で、インテグリンや 4 型コラーゲンからのシグナルで喘息症状を悪化させる MUC5AC ムチンの産生を抑制できることを我々は明らかにした。今後ヘアレスマウスを用いた喘息モデルマウスを作製して 4 型コラーゲンなどを噴霧などにより投与し、その喘息病態の改善効果を、生体イメージングによる発光量の変化を利用して、解析を行う予定である。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 28 年度学長プロジェクト (創造的研究費) によって行われたものであり、ここに謝意を表します。また、蛍光色素 BTP-HSA をご提供いただき、蛍光解析をご指導いただいた穂

坂正博教授にお礼申し上げます。

文献

- Boyce J. A., Austen K. F. (2005). No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *J. Exp. Med.* 201, 1869–1873
- Button, B., Cai, L. H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D. B., Sheehan, J. K., Boucher, R. C., and Rubinstein, M. (2012). A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science (New York, N.Y.)*, **337**, 937-941.
- Fahy, J. V. (2002) Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. *Chest*, **122**, 320S-326S.
- Fahy, J. V., and Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine*, **363**, 2233-2247.
- Ito, Y., Iwashita, J., Kudoh, A., Kuramata, C., and Murata, J. (2015). MUC5B mucin production is upregulated by fibronectin and laminin in human lung epithelial cells via the integrin and ERK dependent pathway. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **79**, 1794-1801.
- Iwashita, J., Yamamoto, T., Sasaki, Y., and Abe, T. (2010). MUC5AC production is downregulated in NCI-H292 lung cancer cells cultured on type-IV collagen. *Molecular and cellular biochemistry*, **337**, 65-75.
- Iwashita, J., Ose, K., Ito, H., Murata, J., and Abe, T. (2011). Inhibition of E-cadherin dependent cell-cell contact promotes MUC5AC mucin production through the activation of epidermal growth factor receptors. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **75**, 688-693.
- Iwashita, J., Hongo, K., Ito Y, Abe T, Murata J. (2013). Regulation of MUC5AC mucin production by the cell attachment dependent pathway involving integrin $\beta 1$ in NCI-H292 human lung epithelial cells. *Advances in Biological Chemistry*, **3**, 1-10.
- Iwashita, J., Ito, Y., Yokoo, M., Takahashi, S., and Murata, J. (2014). Akt induces down regulation of MUC5AC production in NCI-H292 human airway

epithelial cells cultured on extracellular matrix.

Bioscience, biotechnology, and biochemistry, **78**, 212-221.

Iwashita, J., Ito, Y., Kudou, A., Murata, J. (2016).

MUC5B production is unaffected by Akt inhibition in human lung epithelial NCI-H292 cells. *Advances in Biological Chemistry*, **6**, 35-42.

Kumar R. K., Herbert C., Foster P. S. (2008). The

'classical' ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr. Drug Targets*, **9**, 485-494.

Lai, H. Y., and Rogers, D. F. (2010). Mucus

hypersecretion in asthma: intracellular signalling pathways as targets for pharmacotherapy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, **10**, 67-76.

Nials, A. T., Uddin, S. (2008). Mouse models of allergic

asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*, **1**, (4-5), 213-220.

Rose, M. C., and Voynow, J. A. (2006). Respiratory tract

mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological reviews*, **86**, 245-278.

〔平成29年6月30日受付〕
〔平成29年7月11日受理〕

The fluorescent bioimaging of ovalbumin-induced asthmatic mice

Jun Iwashita, Kaori Kobayashi, Masato Yasuda, Jun Murata

Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

Asthma or COPD is defined as a chronic inflammatory disease of the airways and causes breathing problems. The ovalbumin-induced asthma model in mouse is a strong tool for assessing the *in vivo* efficacy of anti-asthma remedies. This model mouse features many similarities to human allergic asthma, including the presence of lung inflammation, the release of inflammatory cytokines, the hypersecretion of MUC5AC mucin, and the presence of airway hyperresponsiveness. However, no method of noninvasive bioimaging of asthmatic mouse has been established. In this report, we made an asthmatic model with a hairless mouse strain, which might be suitable for bioimaging, and investigated oxygen levels in the lungs of asthmatic mice using fluorescent bioimaging.

We found that ovalbumin challenge induced the upregulated production of anti-ovalbumin antibodies in the blood of hairless mouse. This upregulation was not changed by pausing ovalbumin challenge for 10 days. The ovalbumin challenge induced the upregulation of TNF- α mRNA and MUC5AC protein in the airway, which was a representative marker of asthmatic mouse. The fluorescent bioimaging of ovalbumin-challenged mouse by injection of iridium complex, which produces fluorescent light under low-oxygen conditions, induced luminescence in the lung of ovalbumin-induced asthmatic mice. These results suggest that the ovalbumin challenge produced the asthmatic model in the hairless mouse and that fluorescent bioimaging shows the level of low-oxygen symptoms of asthmatic mice.

Keywords: asthma, model mouse, MUC5AC, Ovalbumin, fluorescent bioimaging