

# 序

2006年に欧米で始まったIKMC（国際ノックアウトマウスプロジェクト）は2011年末で終了する。その成果は、相同組換えによるノックアウトESクローン16,436個、遺伝子トランプクローンも18,418個とほぼ目標値に達した。すなわち、マウスのほぼ全遺伝子の破壊が可能となり、ESクローンは、リクエストさえすれば誰でも入手できるようになる。したがってこれからのノックアウトマウスの作製は最初から自分でやらなくてもよい時代になってきた。

2011年9月にIMPC（国際マウス表現型解析コンソーシアム）がスタートした。このプロジェクトは、IKMCで開発したマウスの全遺伝子について、ES細胞からマウスを作製し、“マウスクリニック”によって表現型解析を行い、その結果をデータベース化するものである。これによって基本的な表現型解析データを伴ったノックアウトマウスがMTA（Material Transfer Agreement）のもとに全世界の研究者に供給されることになる。

IMPCは人間でいうと、いわば総合病院の一般外来である。患者である“疾患モデルマウス”は、ここで人間ドックのような基礎的な検査を受けたのち、専門外来に向かうことになる。しかし、どのような疾患か原因をきちんとみてくれる専門家は見当たらないし手だてもない。時に困難であり、わらをもつかむ手がかりが欲しいことさえある。

本書は、疾患モデルマウスを用いた研究を行う際、自分の専門としない領域であっても、この手引きを参考に実験計画を立てて進めれば、そのまま論文が書けるというのが狙いである。したがって、自分の専門とする領域の研究をさらに進めるためにどのような表現型解析を行えばいいという解説書でもなく、各遺伝子のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスについて紹介されているわけでもない。近年、論文を発表するにも、単なる観察のデータだけではアクセプトされず、大なり小なり「メカニズムの解析」が求められる傾向が強くなっている。自分の専門とする領域であれば、何を調べなければならないかはおのずとわかるが、そうでない場合は、はたと行き詰まることもある。そこで、本書では各分野の専門の先生方に可能な限り、1. イントロダクション、2. 病因、3. 表現型解析法、4. 遺伝子改変モデルマウスの順に記述していただいた。この順に解析すればIntroduction, Methods and Materials, Resultsと論文ができあがるという手はずである。

本書を手がかりに、研究を進めるうえでの具体的な考え方や遺伝子改変モデルマウスの資料など利用していただき、晴れて“疾患モデルマウスのカルテ”が価値ある論文に結実することを願うものである。

2011年12月

山村 研一  
若菜 茂晴

# CONTENTS

## 1 章 疾患モデルマウスで研究を始める前に…………… 山村研一 2

## 2 章 疾患モデルマウス：表現型解析の潮流

表現型解析基盤の標準化……………	若菜茂晴, 茂木浩未, 鈴木智広	20
表現型の数値化と定量解析……………	沼田興治, 阿部訓也, 太田聡史	35
エピジェネティクスと表現型……………	久保田健夫	48

## 3 章 疾患モデルマウス：臓器・疾患別解析・実験法

### ■ 臓器系

#### 脳・神経系

##### 中枢系

Alzheimer 病……………	高島明彦	58
てんかん……………	石田紗恵子, 芹川忠夫	65
運動失調……………	渡瀬 啓	70
精神疾患……………	大西哲生, 吉川武男	76
発達障害……………	中井信裕, 内匠 透	84
リズム障害……………	南 陽一, 上田泰己	93

##### 末梢系

家族性アミロイドポリニューロパチー……………	山村研一	102
------------------------	------	-----

##### 感覚器

視覚……………	佐藤 肇	109
視覚（緑内障）……………	中澤 徹	114

聴覚	吉川欣亮, 鈴木沙理, 野口佳裕	121
味覚	實松敬介, 二ノ宮裕三	128
痛覚	井手聡一郎, 南 雅文, 池田和隆	134
<b>COLUMN</b> 初めて疾患モデルマウスを手にした若手研究者へ	和田圭司	140
<b>心臓</b>		
心筋症	森本幸生	145
心筋虚血	田中秀央, 足達哲也	151
不整脈	桑原正貴	158
<b>肺(呼吸器)</b>		
急性呼吸窮迫症候群	田坂定智	164
肺気腫	山村研一	170
<b>消化管</b>		
胃・腸管	大島正伸	175
炎症性腸疾患	西尾 光, 竹内孝治	181
肝臓	小原恭子, 小原道法	188
脾臓	大村谷昌樹, 山村研一	193
腎臓	高橋 智	199
<b>泌尿器</b>		
生殖器系	原田理代, 山田 源	203
腎臓・尿路(腎臓発生とその異常)	内山裕佳子, 西中村隆一	208
<b>生殖細胞</b>		
不妊	藤原祥高, 伊川正人	213
<b>筋肉</b>		
筋ジストロフィー	野口 悟, May Christine Malicdan, 西野一三	221
<b>骨格</b>		
変形性関節症	池川志郎	226
脊椎	仙波 圭, 山村研一	233
皮膚	田中成和, 山本博章	240
造血	指田吾郎, 岩間厚志	248
血管形成	高倉伸幸	254

## ■代謝・内分泌系

高血圧	石田純治, 濱田樹理, 永野克将, 村田知弥, 中村匠子, 松倉 頼, 齋藤千明, 深水昭吉	259
-----	--	-----

糖尿病		
1 型糖尿病	馬場谷 成, 池上博司	266
2 型糖尿病	井形元維, 河島淳司, 荒木栄一	271
脂質異常症 (高脂血症)	佐藤弘泰, 武富芳隆, 山本 圭, 村上 誠	278
副腎	佐々木悟郎, 長谷川奉延	288
甲状腺	渋谷信行, 山田正信	295

## ■免疫系

免疫	吉田尚弘	304
リウマチ	角田 茂	316
アレルギー	田中あかね, 松田浩珍	322

## ■癌

大腸癌	落合雅子, 中金 斉	329
造血系	高橋 智	334
DNA 修復	大野みずき, 續 輝久	339

# 4 章 マウス・表現型データのインフォマティクス

表現型データの国際標準化とデータの利用	榎屋啓志	348
マウス表現型関連データベースの紹介	高田豊行	360
付表		373
索引		469

# 肺（呼吸器）

## 肺気腫

### はじめに

過去に発見された肺気腫のモデルマウスを紹介するのではなく、自分もっているモデルマウスに肺気腫が発生すると思われたとき、どういう手順で表現型解析を行えばよいのだろうか。一筆者らが経験した、 $\alpha/\beta$  *hydrolase domain containing 2* (*Abhd2*) 遺伝子のノックアウトマウスを用いた解析例について述べる。

### イントロダクション

#### 1 *Abhd2* 遺伝子について

*Abhd2* 遺伝子は、筆者らの研究室で遺伝子トラップ法により発見した遺伝子である。つまり機能がわからないまま、遺伝子が先に発見された例である。遺伝子が発見されれば、文献的に検索できるので、*Abhd2* 遺伝子を調べたところ、もともとは肺気腫の組織において発現が低下しているとして単離された3つの遺伝子の一つで、最初は *lung  $\alpha/\beta$  hydrolase 2* と命名された遺伝子であった<sup>1)</sup>。

遺伝子構造から、膜タンパクであること、リパーゼのような加水分解酵素に共通の $\alpha/\beta$  hydrolase foldをもつことがわかっている。しかし、文献的にも多くの組織で発現しており、実際どのような機能をもつかが不明な遺伝子であった。そこで、まずは発現の特異性について解析を行った。

### 2 遺伝子の発現解析と作業仮説の設定

#### 1. 遺伝子発現解析の方法

これにはいくつかの方法がある。検索した文献に出ていけばよいが、出ていない場合もあるので、そのときはデータベース検索を行う。以下の手順で簡単に調べられるが、データがない場合は、自らでノーザンブロットやRT-PCRで解析することになる。

- ① <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene> で Unigene のホームページに入る
- ② 遺伝子記号（例：Abhd2）を入力し search する
- ③ 各種生物の遺伝子リストが表示されるので、マウスを選択する
- ④ 2つ目のボックスに Gene Expression があるので、「EST profile」をクリックする
- ⑤ 各組織での EST の発現頻度が表示される。バンドの濃さでも表示されるので非常にわかりやすい
- ⑥ *Abhd2* の場合、多くの組織でかなり均等に発現しているのがわかる

#### 2. 発現の細胞特異性の解析

上記では、単に組織特異性がわかるのみで、細胞特異性は不明であるので、各組織における機能を推定するうえでは不十分である。そこで、興味ある組織で、mRNA *in situ* hybridizationを行う必要がある。筆者らの場合、トラップマウスで見つかった遺伝子なので、すでに遺伝子の中に *lacZ* が組み込まれており、組織切片を用いた X-gal 染色で簡単に細胞特異性を調べることが可

能であった。その結果、*Abhd2*が肺の肺胞II型上皮細胞で発現していることがわかった。この細胞は、surfactantを分泌していることが知られており、したがって、この細胞が異常になれば肺気腫が発生すると予想される。

### 3. 作業仮説の設定

これらを考えあわせ、「*Abhd2*欠損マウスでは自然発症で肺気腫になる」という作業仮説を立てて実験を始めることとした。

さて、ここからが本題である。つまり、筆者らは肺の専門家でもなく、ましてや肺気腫は今まで扱ったことのない疾患である。そこで、その肺気腫の発生をどのように解析していけばいいのかという主題となる。

## 病因について

環境汚染や少子高齢化が進むなか、肺気腫は重要な疾患である。文献的にも非常に多くのモデルマウスについての論文が発表され、分子メカニズムについて多くの知見が得られている。これを調べるのは、素人としては大変であった。肺気腫の発生は、要約すれば6つの要因に分類でき、以下にその概要を記す。

#### ① 肺の発生異常に基づく肺気腫<sup>2,3)</sup>

たとえば、*PDGF-A*のノックアウトマウスでは、肺胞のmyofibroblastの欠損が起り、そのため肺胞の隔壁ができずに、結果として肺気腫になる。

#### ② 内因性のprotease/antiproteaseのバランス異常に基づくもの<sup>4-7)</sup>

たとえば、protease活性を増加させたり、antiproteaseを破壊すると肺気腫になる。

#### ③ oxidant/antioxidantのバランス異常に基づくもの<sup>5,8,9)</sup>

たとえば、oxidantが増加するか、antioxidantが低下すれば肺気腫が起る。

#### ④ 肺胞上皮細胞のアポトーシスに基づくもの<sup>10)</sup>

たとえば、VEGFリセプターを介するシグナリングが、肺胞構造を維持するのに必要で、した

がって、VEGFリセプターをノックアウトすると肺胞上皮細胞のアポトーシスが誘導され、肺気腫になる。

#### ⑤ 老化あるいは自己免疫に基づくもの<sup>11-14)</sup>

たとえば、*senescence marker protein-30* (*SMP-30*)のノックアウトマウスでは、肺気腫になる。自己免疫に関してはまだ異論もある。

#### ⑥ 炎症の関与<sup>15)</sup>

上記以外に、肺の炎症が<sup>8)</sup>、protease/antiprotease, oxidant/antioxidantのバランス崩し、またアポトーシスを誘導し肺気腫に至る。

#### ⑦ 複合メカニズム<sup>14,16)</sup>

上記のメカニズムが<sup>8)</sup>、単独というよりは互いに作用し合って肺胞を破壊し、その維持や修復が阻害され、肺気腫が発生すると考えられている。

## 肺気腫の表現型解析

### 1 発現の確認

肺胞II型上皮細胞で発現していると述べたが、それはあくまで組織学的な話であり、実はまだ十分な証拠ではない。そこで、肺胞II型上皮細胞で発現しているマーカータンパクを用いて二重染色で確認する必要がある。

文献を調べてみると、P180 lamellar body proteinが肺胞II型上皮細胞で発現しており、かつ抗体が市販されていることがわかったので、*lacZ*の抗体とともに、蛍光二重染色を行った。その結果、同じ細胞であることがわかり、*Abhd2*が明らかに肺胞II型上皮細胞で発現していることが確認された。

### 2 実験以前のマウスの準備

マウスの準備が一番大変である。準備には「実験以前の準備」と「実験のための準備」があることを忘れてはならない。実験以前の準備としては、筆者らの場合、最初のノックアウトマウスは、B6とCBAとのCBF1から樹立されたTT2 ES

細胞を用いて作製したので、マウスの遺伝的背景を揃えることがまず重要であった。B6に戻し交配をして完全に近交系化することが望ましいが、最低5世代で一般的には了解されているので、5世代目以降を実験に用いた。また、この場合のコントロールとしては、同腹の野生型を使うことが望ましい。必要なマウスの数が多くなれば、つい野生型は処分しがちであるが、残しておくことが重要である。

### 3 実験のためのマウスの準備

重要となるのは、何歳齢までを、どの程度の間隔で、何匹ずつ解析する必要があるかである。ことに長期にわたる観察を要し、あとで1歳齢のマウスが欲しいとなった場合、そのために1年が浪費されることになるので、入念な準備が必要である。

この場合、まずは肺気腫を確認する時期を決定する。この際にも文献をくまなく調べ、自然発症モデルマウスではおよそ6か月で発生するという情報を得た。これにより、生後1年までを目標に、途中においては原則生後2か月、4か月、6か月、12か月で解析することにした。

次に、必要なマウス数を決定する。実験群とコントロールでそれぞれ最低3匹必要であり、さらに表現型の項目によってばらつきが予想されたため、有意差検定を考えて5匹以上を準備した。期間が長くなればそれだけ不慮の事故によりマウスが死亡することもあるので、つねに2匹増し程度で計画をするほうがよい。

また、肺気腫の確認だけでも1年を要するので、他の解析も同時に並行して進めることとした。

### 4 表現型解析項目

何をどこまで解析するかは、そのときの研究室の状況により異なる。十分な研究費とたっぷりの時間、人手がある場合は、相当な実験計画を立てることができる。しかし、人手も限られ、急いで発表する必要に迫られる場合もある。いずれの場

合でも、解析項目は肺気腫に直接関連するものとメカニズムと関連するものに分けて考えるとよい。

#### 1. 肺気腫に直接関連する解析項目

肺気腫になっているのかどうか、それに伴って肺機能が低下しているのかどうかの解析が含まれる。前者には組織学的な検査が、後者にはsurfactantの成分であるリン脂質とタンパクの生化学的解析、静肺コンプライアンスなどの専門的な解析が含まれる。

##### ① 組織学的検査

普通の方法で肺を取り出すと肺は萎縮するので、肺気腫の同定ができなくなる。このため、特殊な固定方法である伸展固定が必要となる。これには専門家のアドバイスが必要で、熊本大学生命科学研究部機能病理学分野の伊藤隆明博士に協力を依頼した。固定後、通常のHE染色を行うが、肺気腫の同定は一般的にMLI(mean linear intercept)法で行われる。これは、顕微鏡下の20視野において、一定の距離内にいくつ肺胞中隔が存在するかを算出し、その数を有意差検定して判定する方法である。肺気腫であれば肺胞中隔が断裂し、肺胞が拡張するので数が低下する。実際、生後6か月と12か月でその数が低下しており、肺気腫が発生していることが明らかとなった。

肺気腫になれば、エラスチン線維が減少することがわかっており、その抗体を用いて染色したところ、その減少も明らかとなった。

また、肺気腫が発生した場合、それが肺胞II型上皮細胞の数の減少に起因するのか、あるいは質的な変化に起因するのかを判定するため、その数も計測する必要がある。これにはanti-P180抗体を用いた免疫組織化学的な染色を行い、400倍の倍率化で10視野の数を算定して、有意差検定を行うのが一般的である。この結果、生後6か月では正常と変わりがなかったが、12か月ではその数が減少していた。

##### ② surfactantの成分解析

リン脂質とタンパクの生化学的解析については、熊本大学生命科学研究部薬物活性学分野の磯濱洋

## 11 Genetically engineered mice related to emphysema

Classification	Genes	Function	Type of mouse	Age at onset of emphysema	Spontaneous or induced	Mechanisms for emphysema	Reference
defect in alveogenesis	<i>Pdgfra</i>	PDGF is one of the numerous growth factors, or proteins that regulate cell growth and division	KO	2 weeks of age	spontaneous	abnormal development of alveolar septation	Boström et al. Cell 1996; 85: 863-873
	<i>Pdgfra</i>	see above	KO	2 weeks of age	spontaneous	alveogenesis failure due to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors	Lindahl et al. Development 1997; 124: 3943-53
	<i>Ltb-3</i>	One function of LTBP-3 may be to target latent TGF- $\beta$ complexes to the extracellular matrix	KO	6 days of age	spontaneous	transient decrease of TGF- $\beta$ signaling between 4 to 6 days of age	Colarossi et al. Am J Pathol 2005; 167: 419-28
	<i>Ltb-4</i>	One function of LTBP-4 may be to target latent TGF- $\beta$ complexes to the extracellular matrix	KO	9 days of age	spontaneous	reduced deposition of TGF- $\beta$ in the extracellular space	Sternier-Kock et al. Genes Dev 2002; 16: 2264-73
	<i>Fbn1</i>	LTBP-1 has been immunolocalized to microfibrils containing fibrillin-1 and LTBP-1 and LTBP-4 interact with fibrillin-1	KO	9 days of age	spontaneous	dysregulation of TGF- $\beta$ signaling	Neptune et al. Nature Genetics 2003; 33: 407-11
	<i>ltgb6</i>	receptor for latent TGF- $\beta$	KO	6 to 12 months of age	spontaneous	dysregulation of TGF- $\beta$ signaling, increased expression of MMP12	Morris et al. Nature 2003; 422: 169-73
	<i>Fut8</i>	add fucose to TGF- $\beta$ receptor	KO	18 days of age	spontaneous	dysregulation of TGF- $\beta$ signaling, increased expression of MMP-12 and -13.	Wang et al. PNAS 2005; 102: 15791-6
	<i>Smad3</i>	signaling molecule downstream of TGF- $\beta$	KO	7 days of age	spontaneous	decreased peripheral lung cell proliferation and tropoelastin, resulting retarded alveolarization	Chen et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 288: L683-91
	<i>Eln</i>	elastin provides reversible distensibility during respiratory cycling. Within the parenchyma, elastin is distributed extensively within the alveoli, including the alveolar septae, septal junctions, and along the septal-free edges.	KO	after birth	spontaneous	branching defect is accompanied by fewer distal air sacs.	Wendel et al. Am J Respir Cell Mol Med 2000; 23: 320-6
	<i>Eln</i>	elastin provides reversible distensibility during respiratory cycling. Within the parenchyma, elastin is distributed extensively within the alveoli, including the alveolar septae, septal junctions, and along the septal-free edges.	KO+ human BAC Tg	after birth	spontaneous, CS induced	low levels of elastin results in congenital emphysema and mouse with intermediate elastin develop worse emphysema following CS	Shifren et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007; 292: L778-87
surfactant protein	<i>Ada</i>	ADA is an enzyme involved in purine metabolism. ADA irreversibly deaminates adenosine the nucleoside inosine by the removal of an amino group.	KO, KO+Tg (trophoblast specific promoter + Ada minigene)	18 days of age	spontaneous	increased adenosine and 2'-deoxyadenosine caused aberrant adenosine signaling, leading to abnormal alveogenesis at 5 dysa of age which is later accompanied by macrophage related inflammation, finally resulting emphysema.	Blackburn et al. J Eep Med 2000; 192: 159-170
	<i>Sftpd</i>	surfactant protein	KO	3 weeks of age	spontaneous	enlarged, foamy macrophage, increased MMP-2 and -9, increased hydrogen peroxide	Wert et al. PNAS 2000; 97: 5972-7
	<i>Sftpa1, Sftpd</i>	surfactant protein	double KO	3 weeks of age	spontaneous	accumulation of macrophage leading to expression of high level of MMP-12	Hawgood et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 283: L1002-10
	<i>Sftpd, (tetO) CMV-rat SP-D Tg</i>	surfactant protein	KO and Tg	rescue of emphysema in newborn, but not in adult	spontaneous	treatment with doxycyclin after birth correct lung pathology, but can not correct emphysema in adult although phospholipid homeostasi and alveolar macrophage became normalized	Zhang et al. J Biol Chem 2002; 277: 38709-13
<i>Sftpd, rSftpdCDM Tg</i>	surfactant protein	KO and Tg (collagen domain deletion mutant)	no rescue by collagenous domain mutant SP-D	spontaneous	collagenous domain of Sftd gene can correct lipid homeostasis, macrophage activity, structural integrity of peripheral airspace	Kingma et al. J Biol Chem 2006; 281: 24496-505	

## II (続き)

Classification	Genes	Function	Type of mouse	Age at onset of emphysema	Spontaneous or induced	Mechanisms for emphysema	Reference
surfactant protein	<i>Sftpd</i>	surfactant protein	KO and intranasal application of truncated 60-kDa fragment of human recombinant SP-D	no data on emphysema	spontaneous	treatment with rhsp-D results in clearance of apoptotic macrophage leading to attenuation of macrophage-mediated inflammation	Clark et al. Ann N Y Acad Sci 2003; 1010: 113-116
	<i>Sftpd</i>	surfactant protein	KO and intranasal application of truncated 60-kDa fragment of human recombinant SP-D	attenuation of emphysema	spontaneous	By intranasal application of rhsp-D, structural abnormalities is prevented as judged by the light and electron-microscopic studies	Knudsen et al. Respir Res 2007; 8: 70
	<i>Sftpd</i>	surfactant protein	KO + iNOS inhibitor	attenuation of emphysema	spontaneous	treatment with iNOS inhibitor by osmotic pump for 7 wk from 3 wk of age resulted decreased total lung NO synthase activity and decreased MMP-2, -9, chemokines, INF- $\gamma$	Atochina-Vasserman et al. J Immunol 2007; 179: 8090-7
	<i>Adipoq</i>	adipocyte-derived clection (lectin)	KO	3 months of age	spontaneous	increased TNF- $\alpha$ and MMP-12 by macrophage	Summer et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008; 294: L1035-42
phospholipid	<i>Lipa</i>	Lal hydrolyze cholesteryl ester and triglyceride to free cholesterol and free fatty acid	KO	6 months of age	spontaneous	blockage of neutral lipid metabolism, increased neutrophils and macrophages influx, increased production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , then MMP-8, -9, -12.	Lian et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 286: L801-7
protease/antiprotease	collagenase (MMP-1)	MMP-1 is one of interstitial collagenase, like MMP-8, -13, involved in the breakdown of extracellular matrix.	Tg: haptoglobin promoter-collagenase	1 to 12 months of age depending on transgenic line	spontaneous	disruption of the alveolar walls and coalescence of the alveolar spaces with no evidence of fibrosis or inflammation	D'Armiento et al. Cell 1992; 71: 955-61
	papain	elastase activity	intratracheal injection of papain into rat lung	6 hours after papain injection	induced by papain	histological analysis only, silicotic lungs (produced by inhalation of silica dust) were less susceptible to the development of papain-induced emphysema	Gross et al. Arch Environ Health 1965; 11: 50-8
	<i>Mmp12</i>	macrophage elastase, degrade $\alpha$ 1-antitrypsin	KO	protection of emphysema	CS induced for 6 days per week for 6 months	reduced macrophage accumulation in the lung	Hautamaki et al. Science 1997; 277: 2002-4
	<i>Elane</i>	serine proteinase, degrade tissue inhibitor of methalloproteinase-1	KO	protection (59%) of emphysema	CS induced for 6 days per week for 6 months	decreased recruitment of neutrophils and monocytes, decreased macrophage accumulation	Shapiro et al. Amer J Pathol 2003; 163: 2329-35
	$\alpha$ 1-antitrypsin	serine protease inhibitor	pallid mouse, $\alpha$ 1-antitrypsin level 60%	8 months of age	spontaneous	the lung changes in pallid mice are the result of an elastolytic process due to a severe inborn deficiency of serum $\alpha$ 1-antitrypsin	Martorana et al. Lab Invest 1993; 68: 233-41, de Santi et al. Lab Invest 1995; 73: 40-7
	$\alpha$ 1-antitrypsin	serine protease inhibitor	pallid mouse, $\alpha$ 1-antitrypsin level 60%	5 days/week for 7 months in B6 and ICR, for 4 months in pallid mouse	CS-induced	emphysema development in B6 and DBA/2, but not in ICR. This is due to decrease of elastase inhibitory capacity (low $\alpha$ 1-antitrypsin) in B6 and antioxidant capacity in B6 and DBA/2.	Cavarra et al. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 886-90
	$\alpha$ 1-antitrypsin	serine protease inhibitor	pallid mouse, $\alpha$ 1-antitrypsin level 60%	4 or 6 months after CS in pallid or B6, respectively	CS induced from 3 months of age for up to 6 months	The pattern of emphysema in pallid is more diffuse than in B6.T cell (CD4, CD8 etc) inflammation in the alveolar wall in pallid, but no in B6.	Takubo et al. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166: 1596-603
	<i>Timp3</i>	secreted protein, localized at the ECM, inhibit MMP-1, -2, -3, -9	KO	2 weeks of age	spontaneous	increased MMP activity, but no increase of inflammatory cell infiltration	Leco et al. J Clin Invest 2001; 108: 817-29
oxidant/antioxidant	NADPH Oxidase	involved in oxidant production, inactivate MMP-7 and MMP-12 by cross-linking adjacent tryptophane and glycine residues within the catalytic domain of enzyme.	KO	start at 6 months of age and progresses with age	spontaneous	increased MMP-12 activity, but not expression, led to the enhanced migratory activity of macrophage	Kassim et al. J Biol Chem 2005; 280: 30201-5