

分担研究報告書

高齢者慢性閉塞性肺疾患の遺伝的要因と病態解明ならびに新治療戦略の開発
「高齢 COPD 患者に対する経口キサンチン製剤の肺機能、呼吸困難感、
および生活の質への効果の検討」

分担研究者 寺本信嗣 東京大学 医学部大学院 加齢医学講座 助手

研究要旨

高齢慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者における徐放性キサンチン製剤の経口投与の効果と呼吸生理学的に検討した。80歳以上のCOPD患者12名について徐放性キサンチン製剤Unifil[®] 200mgを夕食後経口投与し、1週間継続し、投与開始前と開始1週後で安静時肺機能、呼吸筋力、運動時呼吸困難感を評価した。さらに、翌週はUnifil[®] 400mgを経口投与し、400mg投与開始1週後に前回と同様の検討を行った。Unifil[®] 200mg投与では明らかな肺機能の改善は見られなかったが、400mg投与では肺活量、一秒量とも有意の増加を示した。呼吸筋力についても、400mg投与によって最大吸気圧(P_Imax)が増加した。ボルグスケールで評価した運動時呼吸困難感は、200mg投与後は明かな変化を示さなかったが、400mg投与によって有意の減少を示した。副作用については200mg投与では一例も見られなかったが、400mg投与では2例で消化器症状の訴えがあった。従って、徐放性キサンチン製剤は高齢COPD患者に対して投与量を工夫することで呼吸生理学的な改善をもたらすと考えられた。

A. 研究目的

喫煙人口と高齢者人口の増加に伴い、高齢者における慢性閉塞性肺疾患(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)は増加を続けている¹⁾。COPDは慢性に進行し、根治的な治療法がないため、吸入療法や呼吸リハビリテーションによって肺機能の悪化を食い止め、一定の生活の質(quality of life, QOL)を維持することが治療の目標となる^{2,3)}。COPD患者に対する気管支拡張薬による吸入療法の有効性については、多くの報告があるが、経口薬の気管支拡張薬であるキサンチン製剤の高齢COPD患者に対する有用性はほとんど検討されていない。我々はすでに吸入抗コリン薬およびβ刺激薬の肺機能、生活の

質への効果を報告したが^{4,5)}、今回経口薬のキサンチン製剤についてdose-escalation studyを行い、呼吸生理学効果を確認したので報告する。

B. 研究方法

一秒率が予測肺活量の70%未満、肺拡散機能DL_{co}が予測値の60%未満で、胸部X線写真上肺過膨張所見が明らかな80歳以上の外来通院COPD患者男性12名を対象とした。対象患者のCOPDの重症度は、全例がGlobal initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)ガイドラインの2度であった。

対象者はすべて、かつての喫煙者で最近は

1年以上禁煙しているものとし、現在も喫煙を続けている人は対象から除外した⁴⁾。喘息患者を除外するため、病歴をよく調査し、喘息発作の既往がないこと、 β_2 刺激薬吸入治療、キサンチン製剤点滴、ステロイド剤点滴などの治療歴がないことを確認した。ピークフローメーターのモニタリングにより、ピークフロー値の日内変動は認めなかった。気道閉塞の可逆性の指標となる β_2 刺激薬吸入後の一秒量の改善が20%または300ml以上の症例は対象から除外した。検査に先立って治療試験と検査の内容、意義を説明し、口頭でinformed consentを得た。また、今回の試験、治療に先立ち呼吸器系の全ての治療薬を8週間中止した。今回の検討前の治療内容は、抗コリン薬単独定期吸入が6例、 β 刺激薬の不規則的吸入が2例、無治療が4例であった。今回の検討の前に、キサンチン製剤の内服を行っていたものはなかった。キサンチン製剤の効果の検討のため、血中濃度の持続時間が最も長い徐放性キサンチン製剤Unifil[®]を選択した。以上の条件のもと、徐放性キサンチン製剤Unifil[®]投与前の午前中9-10時、つぎに毎日夕食後に200mg内服を1週間継続した翌日の午前中9-10時、および毎日夕食後に400mg内服を1週間継続した翌日の午前中9-10時の計3回、(1)安静時肺機能、(2)呼吸筋力、(3)運動時呼吸困難感を評価した。これらの検査に先立ってテオフィリンの血中濃度を測定する目的に静脈血を採血した。なお、検討前の採血では、キサンチンは血中に検出されなかった。キサンチン製剤の代謝に影響を与えるシメチジンなどの薬剤の服用者、肝障害患者は含まれていなかった。安静時肺機能についてCHESTAC-55v(チェストエムアイ社)を用い、肺活量(VC)、一秒量(FEV1)、最大呼気流速値(PEFR)、肺拡散能(DLco)、残気量(RV)、および全肺気量(TLC)を測定し

た⁴⁾⁵⁾。正常値として日本胸部疾患学会(現、日本呼吸器学会)肺機能生理委員会の報告した基準値を用いた⁶⁾。(2)呼吸筋力について、BlackとHyatt⁷⁾の方法に従い、口腔内圧方法で座位にて全肺気量位における最大吸気圧(PImax)および、残気量位における最大呼気圧(PEmax)を測定した。測定値は、1秒以上の間隔を置いて連続3回行い、そのうちの最大値を採用した。(3)運動時呼吸困難感について、自転車エルゴメータによる運動負荷試験を行い、運動時の息切れの強度をBorg scale(BS)によって評価した。運動負荷試験は10ワット漸増法で、質量分析計と気流計で分時換気量(V_E)、酸素摂取量(V_{O_2})、炭酸ガス排泄量(V_{CO_2})、呼吸数(Rf)を測定した。各運動強度と呼吸困難度との関連を定量的に検討する目的で、BSと V_{O_2} との回帰直線を導き、その傾き($\Delta BS / \Delta V_{O_2}$)をBorg scale slope(BSS)(BS/L/min))として、またX切片をThreshold load of dyspnea (TLD)(ml/min)として求めた(Fig.1)⁸⁾この臨床試験の施行にあたっては病院および学内倫理委員会の承認を得た。測定値は、平均値±標準誤差で示した。統計学的検討は、Statview 4.0(Abacus concept, Ardsley, CA, USA)を用いて、吸入前後の変化についてはpaired t testで検討し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。個々の測定値の相関については、一次相関分析を用いて検討した。

B. 研究結果

対象は平均年齢 82.1 ± 0.6 歳、平均身長 162 ± 0.9 cm、平均体重 52.3 ± 2.1 kgであった。Unifil[®]の投与前後の安静時肺機能、呼吸筋力測定の成績をTable 1に示す。Unifil[®]200mg投与1週後は、肺機能上で明らかな変化はなかったが、Unifil[®]400mg投与1週後は、VC、FVC、FEV₁は有意に増加し、RV、RV/TLCは減少した。呼吸筋力については、

最大吸気圧(P_Imax)は、Unifil[®]400mg 投与 1 週後に有意に増加したが、最大呼気圧 (PE_{max})は明らかな増加を示さなかった(Table 1)。

Table 1 Pulmonary function data before and after the administration of Unifil (sustained release of theophylline)

	Before Theophylline		
	one week after Administration 200mg of Theophylline	one week after 400mg of Theophylline	one week after 400mg of Theophylline
FVC (L)	2.37±0.11	2.40±0.10*	2.47±0.11*
%FVC (%)	73.5±2.8	74.6±2.9	77.6±2.9*
FEV ₁ (L)	1.21±0.09	1.23±0.08	1.30±0.09*
FEV ₁ % (%)	37.6±4.1	38.2±4.2	42.2±4.2*
PEFR (L/s)	3.99±0.42	4.01±0.40	4.08±0.43*
TLC (L)	4.99±0.18	5.00±0.16	5.02±0.17*
VC (L)	2.59±0.11	2.62±0.11	2.70±0.12*
FRC (L)	3.28±0.11	3.22±0.12	3.12±0.12*
RV (L)	2.38±0.16	2.34±0.13	2.25±0.13*
RV/TLC (%)	47.5±2.1	46.8±2.0	43.8±2.0*
P _I max	47.6±3.1	48.3±4.2	56.3±4.2*
PE _{max}	72.6±4.6	73.1±4.7	74.1±4.5

Presented as mean±SE

運動時呼吸困難感については、体動に伴う息切れの開始の指標となる TLD については、Unifil[®]投与前後で有意の変化を示さなかったが、運動負荷量の増加にともなって増加する息切れの度合いを示す BSS は、Unifil[®] 400mg 投与 1 週後には低下を示した(Table 2)。

Table 2 Quantitative assessment of dyspnea during exercise before and after administration of Unifil

	Before administration of Theophylline	After administration of 200mg of Theophylline	After administration of 400mg of Theophylline
--	---------------------------------------	---	---

BSS (BS/L/min)	27.1±2.6	26.8±2.5	23.4±2.2*
TLD (ml/min)	392.1±21.9	390.1±21.3	394.3±20.6
Vo ₂ max(ml/min)	686.5±39.2	690.6±40.2	742.6±44.8*

Presented as mean±SE, BSS: Borg scale slope, TLD: Threshold of load of dyspnea* p <0.01 compared with the data before administration of theophylline

TLD、BSS と安静時肺機能との関連を検討した結果、BSS と FEV₁、PEFR、RV/TLC が有意の一次相関を示したが、TLD は安静時肺機能指標と有意の相関を示さなかった (Table 3)。

Table 3 Correlations of dyspnea indices during exercise with physiologic and pulmonary function data

	BSS		TLD	
	r	p	r	p
Age	0.198	0.224	0.111	0.468
Height	0.108	0.221	0.199	0.404
Weight	0.141	0.303	0.176	0.429
FVC	0.288	0.076+	0.298	0.087+
FEV ₁	0.405	0.014*	0.385	0.076+
PEFR	0.388	0.036*	0.296	0.088+
TLC	0.222	0.122	0.301	0.196
FRC	0.298	0.134	0.227	0.282
RV	0.326	0.087+	0.298	0.167
RV/TLC	0.399	0.049*	0.344	0.154
P _I max	0.382	0.051+	0.325	0.102
PE _{max}	0.203	0.222	0.201	0.301

テオフィリンの血中濃度は、投与前は全例で血中濃度は 0 であった。投与 1 週後は 5.8 ± 1.5 (3.6-8.1) μg/ml であり、2 週後には 12.6 ± 2.5 (7.4-15.6) μg/ml となった。1 週目

と2週目の血中濃度には有意差があった。キサンチン製剤服用後の副作用については、200mg 投与には、明らかなものはなく、400mg 投与後に 12 例中 2 例で胃もたれ、吐気、などの消化器症状がみられた。しかしながら、この消化器症状に対して新たな投薬治療などは必要なかった。また、全例で試験終了までキサンチン製剤の内服の継続が可能であった。ほかに、治療薬の投与を中止するような重篤な副作用、合併症はみられなかった

考察

COPD は持続性の気流閉塞を特徴とする疾患であり、呼吸困難などの自覚症状は通常 60 歳以上の高齢者になってから認められる。しかし、80 歳前後の後期高齢者については、症状について老化現象の一部とみなされて十分な注意がはられていないことが多い。我々は、80 歳以上の高齢者についても吸入療法によって肺機能の改善と QOL の改善が期待できることから高齢者についても COPD を診断し、治療することの重要性を報告してきた^{4,5)}。これまで、COPD の吸入療法の効果を中心に検討してきたが、本邦では従来よりキサンチン製剤が喘息と共に COPD にもしばしば用いられており、高齢 COPD 患者について、キサンチン製剤が有効であるかに興味を持たれる。特に高齢者では、吸入補助具を使用しても十分に吸入が出来ない症例もあるため、経口気管支拡張薬の効果を検証する意義は必ずしも少なくない。

今回の検討から、高齢 COPD 患者において徐放性キサンチン製剤は、投与容量を増加することによって安静時肺機能、吸気筋力の改善をもたらすことが確認された。ただし、今回の検討では二つの投与容量の検討であるため、厳密には、容量依存的に効果がみられるとはいえない。効果の容量依存性を証明するためには、さらに高容量の投与(たとえば、600mg

投与)を検討すべきである。しかし、血中濃度を考慮すると高齢者について 600mg 投与を外来診療の範囲で行うのは妥当とは考えにくく、今回の検討では行わなかった。

また、400mg 投与においても 12 例中 2 例で胃もたれ、吐気、などの消化器症状がみられた。今回の検討の範囲では治療薬の投与を中止するほどの重篤な副作用、合併症はみられなかったが、Sekizawa らは⁹⁾、20 μ g/ml 未満の治療濃度の範囲内でも、高齢者では意識障害を生ずる可能性を指摘しており、キサンチン製剤の投与にあたっては呼吸生理学的効果とともに常に副作用の出現に留意する必要がある¹⁰⁾。

今回の検討では、キサンチン製剤 200mg で認められなかった肺機能、呼吸筋力、呼吸困難感の改善が 400mg 投与で認められたが、このことが、キサンチン製剤が効果を発揮するためには、必ず 400mg 以上の投与量を必要とする、という訳ではない。本研究では投与量に関して crossover 方法で検討していないので、400mg に増量せずとも 200mg 投与を継続した場合に同様の効果が認められる可能性がないとは断定できない。特に、高齢者の薬物動態は個人差が大きいので、服薬を長期に行った場合の効果や血中濃度については、さらに検討する必要がある。しかしながら、今回対象とした症例の中で 5 例について、その後、パイロツ的に 2-4 週間 unifi1200mg を夕食後に継続して服薬させたが、血中濃度は 400mg(/日)1 週間内服後に比べ有意に低く、肺機能上の効果はみられなかった。したがって、200mg の投与量は少なくとも 1 カ月の範囲では余り有効ではないと考えられる。しかし、結論を導き出すためには、投与方法と有効性の関係について一層詳しい検討が求められる。

体動時の息切れについて段階的運動負荷試験を用いてボルグスケールで評価したところ、

投与量を増すことで運動時の呼吸困難感の軽減がみられた。このボルグスケールの改善と他の呼吸生理学的指標との関連を検討した結果、FEV1、PEFR、RV/TLCと呼吸困難度の中に相関がみられた。したがって、キサンチン製剤による気流閉塞の改善、残気率の改善、吸気筋力の改善が運動時呼吸困難感の改善に寄与した可能性が考えられる。呼吸困難感と呼気筋力指標 PEmax との相関関係はなかったが、吸気筋力指標 PImax とは $p=0.51$ で相関がみられた。

キサンチン製剤は、従来より呼吸筋力の増強作用が報告されている¹¹⁾¹²⁾。今回の検討では、呼気筋力指標である PEmax については明らかな改善が見られなかったが吸気筋力の指標である PImax については有意の改善が得られた。これらの検討は、呼吸筋力そのものを測定した訳ではなく口腔内圧による代用であるため、呼吸筋発生圧の変化を厳密に測定したものではない。したがって、今回の PImax の改善が、吸気筋の筋力そのものの増進によるのか、残気率の改善にみる横隔膜ドームの位置の改善による解剖学的な変化によるのかは必ずしも明らかではない。今後、キサンチン製剤の高齢者 COPD の呼吸筋に対する作用を科学的に実証するためには、さらに食道バルーン法による厳密な検討が求められる。

COPD は慢性で進行性の疾患であるため、今回 1 週間投与で確認された生理学的効果が慢性的に確認出来るか否かが重要である。また、この薬剤の定期的な服薬が COPD の気道炎症の改善や経年的気流閉塞の進行を抑制するかについても今後検討が必要である。さらに、現在、安定期 COPD の治療の中心である、抗コリン薬や β 刺激薬と併用した場合に、相加効果が見られるかについても興味もたれる。

従って、キサンチン製剤の長期効果について、

未解決な問題点も残されてはいるが、高齢者についてもキサンチン製剤投与によっては呼吸生理学的改善が望めることから、吸入療法がうまく行えない高齢 COPD 患者では血液中濃度をよくモニタリングした上で治療の選択薬一つとして考慮すべきと思われる。

現行の本邦の COPD のガイドラインでは経口テオフィリン製剤の投与は step2 からしか推奨されていないが、この際、吸入治療がうまく行えない高齢者は特に配慮されていない。今後、今回のような検討を多数例で長期間行うことで、「吸入不能の高齢者 COPD に対する治療ガイドライン」としては、経口テオフィリン製剤の投与が step1 の治療法の一つとして今後加えられる可能性もあると考えられる。

【知的財産の出願・登録情報】

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

A. 研究発表

論文発表

1) Teramoto S, Kume H, Mastsue T. Altered Swallowing Physiology and Aspiration in COPD. *Chest*. 2002;122:1104-5;

6) Teramoto S, Kume H, Ishii T, Mastsue T. Production of oxygen radicals by peripheral blood neutrophils is increased in patients with stable asthma and during exacerbations. *Respiration*. 2002;69:286.

2) Teramoto S, Ishii T, Matsuse T. Genetic susceptibility to tobacco smoke toxicity and chronic obstructive pulmonary disease. *Gerontol. Geriatr. Int.* 2002; 2: 1-7.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

（総括・分担）研究報告書

GSTP1 の肺線維芽細胞におけるアポトーシス防御能について

研究協力者 石井健男 横浜市立大学医学部客員研究員

（長寿科学振興財団リサーチレジデント）

主任研究者 松瀬 健 横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター

【目的】 Glutathione S-transferase P1（以下GSTP1と略）は解毒酵素の一種である。肺線維芽細胞にてGSTP1の発現量を減らすことによるアポトーシス誘導に関して調べた。

【方法】 Human Lung Fibroblast-1 (HFL-1)細胞に、GSTP1 の cDNA を sense 及び antisense の向きに組み込んだ vector を transfection して細胞内の GSTP1 の量を増加及び減少させ、その際のアポトーシスの誘導の是非とその機序を検討した。

【結果】 GSTP1 の antisense vector によりアポトーシス及びネクローシスの細胞数の増加が見られた。GSH の量及び JNK の活性化については、それぞれの transfectant の間にて相違は見られなかった。

【結論】 GSTP1 の発現の低下により肺線維芽細胞においてアポトーシスの誘導がみられ、これより GSTP1 は気道細胞におけるアポトーシスに対する防御能を有すると考えられたが、その機序については将来の研究が待たれる。

A. 研究目的

Fibroproliferationはさまざまな疾患、たとえば特発性間質性肺炎や acute respiratory distress syndrome の病態において主たる役割を担っていると想定されており (Bitterman PB, et al. Chest 1991; 99: 81S-84S)、線維芽細胞の集積と細胞外器質の沈着により特徴付けられる (Fukuda Y, et al. Am J Pathol. 1987; 126: 171-182)。肺線維芽細胞の増殖とアポトーシスのバランスを制御することは正常な肺機能の維持に重要と目されている。Glutathione S-transferase P1 (GSTP1)は glutathione S-transferase gene family

いる。このgene familyはさまざまな求電子的な化合物を還元型グルタチオンにて抱合する酵素であり、第2相の解毒酵素とされる (Mannervik, B. Adv. Enzymol. 1985; 57: 357-417)。GSTP1は末梢肺の肺胞、肺胞マクロファージ、呼吸細気管支に存在することが報告されている (Cantlay AM, et al. Thorax. 1994; 49: 1010-1014)。我々は、肺線維芽細胞HFL-1においてGSTP1が煙草の煙に対する防御能を有することをin vitroでの実験にて示し報告してきた (Ishii T, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: L1189-L1195)。

最近になり、GSTP1は was also considered to have inhibitory capacity of c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)のインヒビターであるとする報告がなされた (Adler V, et al. EMBO J. 1999; 18: 1321-1334)。JNKはMAPキナーゼの一種であり細胞のストレス反応や増殖、アポトーシスの制御において一定の役割を果たしていると考えられている (Davis RJ. Cell 2000; 103: 239-252)。マウス胎児線維芽細胞において細胞増殖経路にGSTP1が影響を及ぼすことも報告されている (Ruscoe JE, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 298: 339-345)。故に、我々はGSTP1がヒト肺線維芽細胞においても、安定状態において増殖や生存能に重要な役割を果たしているとの仮説をたてた。

この仮説が正しいか検証するために、今回の研究において我々はヒト肺線維芽細胞HFL-1にGSTP1のセンス及びアンチセンス・ベクターを遺伝子導入して細胞増殖、アポトーシス、及びネクローシスに影響を与えるかどうかについて検討を行うこととした。

B. 研究方法

<細胞培養>

ヒト胎児肺線維芽細胞由来HFL-1細胞はRiken細胞銀行から分与され (つくば市、日本)、10%牛胎児血清(FBS; Interon Inc., NY, USA)と100U/mlペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含むDulbecco's modified Eagle 培地 (DMEM; Invitrogen Corporation, CA, USA) にて継代した。細胞は1週間に2回の継代を行い、14-18 passageにて実験に供した。

<GSTP1のセンス及びアンチセンス・ベクターの構造>

プラスミドベクターのpIRES2-EGFP (以下、pIEと略)は、ribosomal entry site (IRES)により目的遺伝子産物と同時に enhanced green fluorescent protein (EGFP)を発現する性質を有する。同ベクターをClontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA, USA)より購入した。pUC19ベクターに組み込まれたGSTP1のcDNAは埼玉医科大学化学教室の村松教授より分与していただいた。全ての制限酵素はNew England Biolabs (MA, USA)より購入した。pIEベクターを基盤としてGSTP1のcDNAを順及び逆方向に組み込み、GSTP1センス及びアンチセンス・ベクターを作成した。同ベクターにより遺伝子導入した細胞にてGSTP1の発現量が増減されることは以前の我々の報告 (Ishii T, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: L1189-L1195)にて確認済みである。これらのセンス及びアンチセンス・ベクターをそれぞれ pIE-GSTP-S、pIE-GSTP1-A、と名づけた。

<DNA の細胞への導入>

細胞は6ウエルの培養プレートに10%FBS含有DMEMを加えた形で 3×10^5 cells/ウエルの密度で撒き、24時間後にFuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いて添付されていたプロトコール通りに遺伝子導入を行った。遺伝子導入の48時間後に、それらの細胞をさらに解析した。

<フローサイトメトリー：EGFPの検出、Annexin V-PIの解析、及びTUNEL解析>

pIRES2-EGFPを基盤にしたベクターを遺伝子導入した細胞におけるEGFPの

発現の検出は以前の報告通り行った (Ishii T, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: L1189-L1195)。細胞からの蛍光はFACScan (Becton Dickinson, CA, USA)を用いて解析し、FL1にてEGFP (励起波長, 488 nm; 蛍光波長, 507 nm) の発現を検出して、遺伝子導入効率やセンス及びアンチセンスGSTP1 cDNAの転写レベルの想定を行った。FACScanはEGFPを発現しない細胞が蛍光強度10未満となるように調整を行った。

細胞のアポトーシス及びネクローシスについては、若干の修飾を加えたものの既報告 (Banzet N, et al. Redox Rep 1999; 4: 229-236) と同様に解析を行った。ホスファチジルセリン (phosphatidylserine [PS]) の細胞表面への露出はアポトーシスの早期の指標と目されており、これをPSへの結合能の高いアネキシンVを用いてモニターすることとした。膜の破綻はネクローシスを示唆し、7-アクチノマイシン D (7-actinomycin D [7-AAD]) の細胞内への取り込みにより評価することとした。細胞はphosphate-buffered saline (PBS)にて2度洗浄した後、5 μ l アネキシンV-PE (PharMingen, CA, USA) と 5 μ l 7-AAD solution (Via-Probe™; PharMingen, CA, USA) を 1 x binding buffer (10mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂) 加えた液に終濃度が 1 x 10⁶ cells/100 μ l solutionとなるように加え、15分間インキュベートした。それから、細胞はフローサイトメトリーにてThen, the cells were analyzed by flow cytometry for fluorescence from PE-の結合したアネキシンV (蛍光波長, 570 nm)と7-AAD (蛍光波長,

660 nm)をそれぞれFL2及びFL3にて感知し、解析を行った。細胞をアネキシンVと7AADの2色の組み合わせでラベルすることにより、アネキシン、7-AAD共に陰性なら生存細胞、アネキシン陽性で7-AAD陰性ならアポトーシス細胞、7-AADが陽性ならネクローシス細胞と認識し区別することができる。アポトーシス及びネクローシスの細胞の割合は以下のように計算することができる。

$$\text{apoptosis (\%)} = \frac{\text{Number of [AnnexinV(+)] and 7AAD(-)] cells}}{\text{Number of 7AAD(-) cells}} \times 100 (\%)$$

$$\text{necrosis (\%)} = \frac{\text{Number of 7AAD(+) cells}}{\text{Number of all cells}} \times 100 (\%)$$

我々は、アポトーシスの検出を別の方法でも行った。TdT-mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL) 法を、*In situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いて行った。以下、方法を簡略に説明する。terminal deoxynucleotidyl transferaseを用いて、Tetramethylrhodamine-labeled nucleotides を結合させる形でDNA傷害部位のラベル(TUNEL反応)を行う。このtetramethylrhodamineの赤い蛍光 (蛍光波長, 580 nm) にて“アポトーシス細胞”をフローサイトメトリーのFL2にて感知し定量する。

ベクターにより遺伝子導入された細胞は、FL1によりEGFP陽性細胞であることにより遺伝子導入されていない細胞とFL1を用いて分離認識することができ、1つのデータ採取にあたり1 x 10⁴個以上の遺伝子導入細胞を解析した。このような細胞にお

いてアポトーシス及びネクローシスを解析する場合、EGFP陽性細胞についてアネキシンVの結合と7-AADの取り込みを計測することによりデータを採取した。

全てのFACSのデータ解析はCellQuest software (Becton Dickinson, CA, USA)を用いて行った。

<磁気細胞分離>

ウエスタンブロッティングおよびGSHの計測のために遺伝子導入細胞のみを収集するため、我々はMACS™ 磁気細胞分離システム(Miltenyi Biotec GmbH, Germany)を用いた。HFL-1細胞において、pIEを基盤としたプラスミドと、人為的に短くしたマウスのH-2Kk分子をコードしたpMACS Kk.IIプラスミドを一緒に遺伝子導入した。48時間後、細胞は3mM EDTA/PBSを用いてウエルから回収、pMACS Kk.IIにコードされている細胞表面マーカーへのモノクローナル抗体の結合したMACSselect Kk磁気マイクロビーズと共にインキュベートした。遺伝子導入細胞はMS分離カラムを用いて磁気的に分離され、収集された細胞はウエスタンブロッティングおよびGSHの計測に用いられた。

<ウエスタンブロッティング>

JNKのリン酸化の状態を解析するため、PhosphoPlus SAPK/JNK (Thr183/Try185) Antibody Kit (Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA, USA)を用いた。このキットにはJNK及びリン酸化JNK特異的な抗体が含まれている。PBSにて穏やかに洗浄してから、細胞をRIPA バッファー(50mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS)とComplete Mini protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Basel,

Switzerland)のストック液の混合液を用いて溶解し回収した。同液を20000g, 4°Cにて30分間遠心し、上清を-80°Cにて保存し解析に供した。この上清(100µg)を2x サンプルバッファー(0.1M Tris-HCl pH 6.8, 4% sodium dodecyl sulfate [SDS], 6% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue)と混合し、100°Cにて10分間煮沸し、すぐにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を行った。マーカーとしてECL protein molecular weight markers (Amersham Biosciences Corp, NJ, USA)を用い、またプレキャストの10%ゲルで200Vの一定の電圧にて電気泳動した。SDS-PAGE後、蛋白はPVDF (polyvinylidene difluoride)膜にブロッティングし、適当な抗体と共にインキュベートした。ECL Western blotting analysis system (Amersham Biosciences Corp, NJ, USA)及びFAS-1000 Lumino Imaging Analyzer (Toyobo Biochemicals, 東京, 日本。)を用いて解析を行った。ゲル、膜、SDS-PAGEやウエスタンブロッティングの機材はATTO corporation (東京, 日本)より購入した。

<GSHの計測>

GSHのレベルはTotal Glutathione Quantification Kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc., MD, USA)を用いて決定した。その原理は、以下のとおりである。DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))とグルタチオン(GSH)は反応して2-nitro-5-thiobenzoic acidとglutathione disulfide (GSSG)を生成する。2-nitro-5-thiobenzoic acidは黄色なので、サンプル液中のGSHの濃度は412nmの吸光度の測定により決定することができる。吸光

度測定はmultiwell plate reader NJ-2300 (Nalge Nunc International Corp., NY, USA)を用いて行った。

<統計解析の方法>

結果は平均 ± 標準偏差 (SD) にて提示した。比較は Student' s t 検定あるいは analysis of variance (ANOVA)を適宜用いて行った。これらの解析は StatView J-4.5 ソフトウェア(SAS Institute Inc., NC, USA) を使用して行った。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的有意とみなした。

C. 研究結果

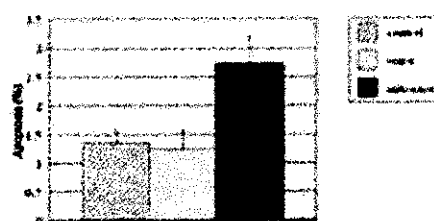
<GSTP1 アンチセンス・ベクターの導入によるアポトーシスとネクローシスの誘導>

我々はまず最初に、GSTP1 の細胞死に対する効果について検討することとした。pIE, pIE-GSTP-S, 及び pIE-GSTP1-A ベクターを遺伝子導入した HFL-1 細胞を EGFP 陽性細胞として認識し、アポトーシスとネクローシスについて解析を行った。図 1-a に示すように、アポトーシスの程度はベクターの導入により明らかに影響を受けている。GSTP1 アンチセンス・ベクターを導入した細胞におけるアポトーシスの割合 ($2.73 \pm 0.47\%$) は、コントロール($1.34 \pm 0.23\%$) 及びセンス・ベクター ($1.24 \pm 0.31\%$) による遺伝子導入に比較して有意に高値であった ($p=0.0003$)。GSTP1 アンチセンス・ベクターを導入した細胞においてはまた、ネクローシスの割合 ($13.47 \pm 1.08\%$) もコントロール($4.85 \pm 0.96\%$) 及びセンス・ベクター ($4.73 \pm 1.37\%$) の場合と比較して有意に高値であった($p<0.0001$)。これを図 1-b に示す。

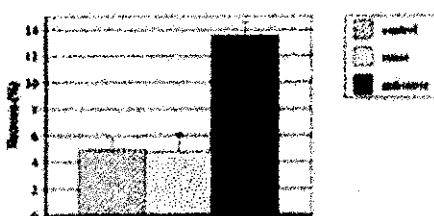
図 1

pIE (コントロール), pIE-GSTP1-S (センス), および pIE-GSTP1-A (アンチセンス) の vector を HFL-1 細胞に遺伝子導入して、アポトーシス (図 1a) およびネクローシス (図 1b) を調べた。各値は mean ± S.D. (n=4)である。

<図 1a>



<図 1b>

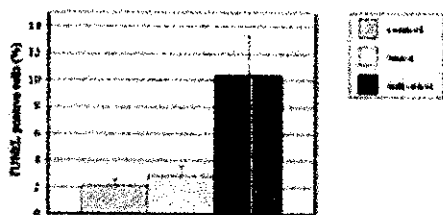


pIE-GSTP1-A を導入した細胞におけるアポトーシス現象は、図 2 に示すように TUNEL 解析においても観察された。GSTP1 のアンチセンス・ベクターを導入した細胞は TUNEL 陽性細胞の割合($10.3 \pm 3.0\%$) が、コントロール($2.07 \pm 0.52\%$)及びセンス・ベクター ($2.77 \pm 0.81\%$)を用いた場合に比較して有意に高かった($p = 0.0002$)。

図 2

pIE (コントロール), pIE-GSTP1-S (センス), および pIE-GSTP1-A (アンチセンス) の遺伝子導入によりアポトーシスの誘導された細胞を TUNEL 法にて検討した。各値は mean ± S.D. (n=4)である。GSTP1 のアン

チセンスベクターの導入された細胞にてアポトーシスの割合が有意に高値であった。



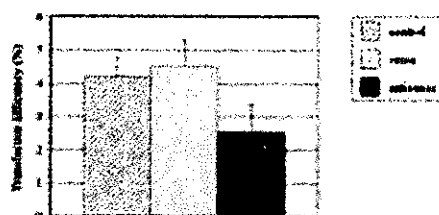
<EGFP発現ベクターの細胞への遺伝子導入における導入効率とベクターの発現レベルについて>

pIE, pIE-GSTP1-S 及び pIE-GSTP1-A ベクターの導入された細胞における GSTP1 の発現レベルを解析するため、遺伝子導入の確認は GFP の発現によりモニターされた。pIE ベクターに比較し、pIE-GSTP1-S 導入細胞にて GSTP1 の発現が増加し、pIE-GSTP1-A 導入細胞において GSTP1 の発現が減少していることは、以前の報告のなかで確認済みである (Ishii T, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: L1189-L1195)。GSTP1 のアンチセンス・ベクターの遺伝子導入効率 (2.52 ± 0.85 %) は、コントロール (4.18 ± 0.60) 及びセンス・ベクター (4.49 ± 0.82 %) の場合と比較して有意に低値であった (p=0.0111) (図 3-a)。pIRES2-EGFP はバイシストロニックなプラスミドであり、EGFP の発現は遺伝子導入効率のマーカーであるだけでなく、プラスミドに組み込まれた cDNA の転写レベルのマーカーともなっていると考えられる (Kobune M, et al. Cancer Research 2001; 61: 5116-5125)。pIRES2-EGFP, pIE-GSTP1-S 及び pIE-GSTP1-A の導入による効果は、遺伝子導入された細胞の平均蛍光強度 (mean

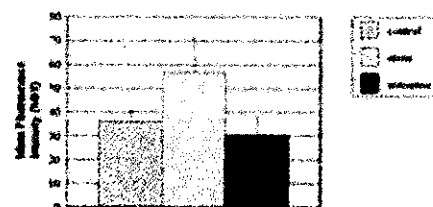
fluorescence intensity [MFI]) より算定することとした。蛍光強度は、GSTP1 のセンス・ベクターを導入した HFL-1 細胞において (MFI: 56.2 ± 14.8)、コントロール (MFI: 35.9 ± 4.5) 及びアンチセンス・ベクターを導入した細胞 (MFI: 30.1 ± 8.3) と比較し有意に高値であった (p=0.0129) (図 3-b)。

図 3
pIE (コントロール), pIE-GSTP1-S (センス), および pIE-GSTP1-A (アンチセンス) の遺伝子導入を行った細胞において、遺伝子導入効率 (Fig.3-a) および平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity; MFI) (Fig.3-b) を検討した。各値は mean ± S.D. (n=4) である。

<図 3 a>



<図 3 b>



<GSTP1の転写レベルのJNKリン酸化への影響>

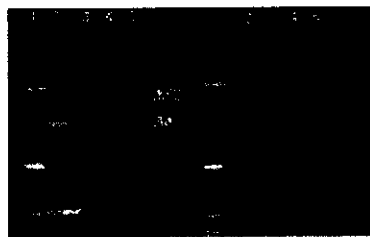
ヒト肺線維芽細胞を用いた上記の遺伝子導入実験にて、GSTP1がアポトーシス抵抗性に寄与していることが観察されたた

め、そのメカニズムについて検討することとした。

MAP キナーゼの一つである JNK は、ストレス反応、増殖、及びアポトーシスの制御において役割を果たしていると考えられており (Davis R.J. Cell. 2000; 103: 239-252)、GSTP1 は JNK に対するインヒビターとして働くことが報告されている (Adler V, et al. EMBO J. 1999; 18: 1321-1334)。故に、我々は GSTP1 のセンス及びアンチセンス・ベクターを遺伝子導入することにより JNK の活性化レベルに変化をもたらすか検討を行った。遺伝子導入された細胞は磁気細胞分離により分離され得られた蛋白について、JNK1, JNK2 及びそのリン酸化部位特異的な抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 4)。JNK1 のバンドはほとんど見えず、JNK2 の総発現量及びリン酸化レベル共に、コントロール、センス、アンチセンスの 3 者間にて差は認められなかった。

図 4

JNK 及びリン酸化 JNK のウエスタンブロッティング。pIE, pIE-GSTP1-S, 及び pIE-GSTP1-A ベクターの遺伝子導入の 48 時間後に回収。a) JNK. JNK1 及び JNK2 の高さを図示している。b) リン酸化 JNK。1st lane: molecular standard (97, 66, 45, 31, 20.1, 14.1 kD, respectively). 2nd lane: JNK1 recombinant protein. 3rd lane: pIE 導入。4th lane: センスベクター導入。5th lane: アンチセンスベクター導入。

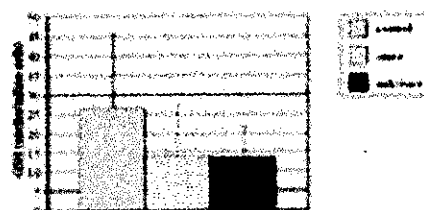


<GSTP1の発現レベルのGSH濃度への影響>

GSTP1 は毒性物質の求電子的部位に GSH を結合させることを触媒する酵素である。しばしば GSTP1 は GSH と共に安定した Michaelis 複合体として存在するため (Caccuri AM, et al. Biochemistry. 1998; 37: 3028-3034)、GSTP1 は GSH 濃度に影響を及ぼすことが想定される。GSTP1 のセンス、アンチセンスおよびコントロールのベクターが遺伝子導入された細胞を磁気細胞分離により分離回収し、その GSH 濃度の測定を行った (図 5)。これらの遺伝子導入細胞の間に細胞内 GSH レベルの有意差は認められなかった ($p=0.4947$)。

図 5

pIE (コントロール), pIE-GSTP1-S (センス), および pIE-GSTP1-A (アンチセンス) の遺伝子導入を行った細胞における GSH の細胞内濃度。各値は mean \pm S.D. (n=4) である。



D. 考察

当研究において、我々はGSTP1の欠乏によりヒト肺線維芽細胞HFL-1においてアポトーシス及びネクローシスが誘導されることを示した。アンチセンス・ベクターにおいて遺伝子導入後の転写レベルが低くまた遺伝子導入効率も低かったことは、アンチセンス・ベクターによるGSTP1発現の抑制が細胞の生存能に影響を与える可能性を示唆すると考えられた。

GSTP1は、抗酸化作用及び解毒作用を有するGST familyに属する。GSTP1は末梢肺において、肺胞、肺胞マクロファージ、及び呼吸細気管支に発現が認められる (Cantlay AM, et al. Thorax. 49: 1010-1014, 1994)。GSTの過剰発現は酸化ストレス (Zimniak L, et al. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1997; 143: 221-229) や種々の発ガン性物質 (Fields WR, et al. Mol. Pharmacol. 1998; 54: 298-304)、抗癌剤 (Doroshov JH, et al. Cancer Research. 1995; 55: 4073-4078) への抵抗性を増加させることが示唆されている。我々は、以前HFL-1細胞においてGSTP1が煙草の煙に対し抵抗性を高める効果を有することを報告した (Ishii T, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001; 280: L1189-L1195.)。GSTP1がH2O2誘導性の細胞死をストレスキナーゼの制御を介して抑えることも報告されている (Yin Z, et al. Cancer Research 2000; 60: 4053-4057.)。当研究において、我々はGSTP1が特に刺激を与えない状態のHFL-1細胞における生存能への効果を調べ、GSTP1が失われることにより細胞の生存能が障害されアポトーシス及びネクローシスを誘導することが観察された。GSTP1のアンチセンス・ベクターによる遺伝子導入効率

の低さは、上記のネクローシスの誘導によって、またGSTP1に細胞増殖を促進する効果があることが報告されているため、それによる可能性も推察される (Ruscoe JE, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 298: 339-345)。

さらに、我々はHFL-1細胞におけるGSTP1の抗アポトーシス効果のメカニズムについて検討することとした。最近、GSTP1がMAPキナーゼの一つであるc-Jun NH₂-terminal kinaseへの抑制効果を持つとの報告がなされた (Adler V, et al. EMBO J. 1999; 18: 1321-1334)。mGSTM1-1がapoptosis signal-regulating kinase 1の酵素活性を抑制するとの報告もあり (Cho SG, et al. J. Biol. Chem. 2001; 20: 12749-12755)、GSTが複数のメカニズムでJNKのシグナル経路を内因性に制御している可能性が示唆されている。GSTP1がマウス胎児線維芽細胞において細胞増殖に影響を及ぼしGSTP1のインヒビターであるTLK199がアポトーシスを誘導するとの報告も見られる (Ruscoe JE, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 298: 339-345)。JNKも肺由来の細胞を含めた複数種類の細胞においてアポトーシスを誘導することが知られており (Butterfield L, et al. J Biol Chem. 1997; 272: 10110-10116)、いくつかの異なるシグナル伝達経路がこれに関わると考えられている (Davis RJ. Cell. 2000; 103: 239-252)。当研究において、GSTP1の欠如がヒト肺線維芽細胞においてアポトーシスを誘導し、アンチセンス・ベクターによるGSTP1の発現の抑制が細胞の生存能に影響を与えることを示唆された。しかしながら、遺伝子導入の48時間後においては、JNKのリン酸化の状態に変化は観察されな

かった。

我々はまた、GSTP1のセンス及びアンチセンス・ベクターを遺伝子導入し、細胞内のGSHのレベルについても検討を行った。GSHは種々の肺疾患、例えば特発性間質性肺炎 (Beeh KM, et al. Eur. Respir. J. 2002; 19: 1119-1123)、喘息、COPD (Rahman I, et al. Eur. Respir. J. 2000; 16: 534-554)の病態生理に関連があると考えられている。GSHを失うことによりヒト肺線維芽細胞にてアポトーシスが起こること (Aoshiha, K, et al. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1999; 21: 54-64)、またGSTP1がアポトーシスを抑制する際にGSHに依存していること (Cumming RC, et al. Nature Medicine. 2001; 7: 814-820)が報告されている。GSTP1はGSHと共に安定したMichaelis複合体として存在するため (Caccuri AM, et al. Biochemistry. 1998; 37: 3028-3034)、GSTP1はGSH濃度に影響を及ぼすことが想定される。しかしながら、我々はGSTP1の発現レベルと細胞内のGSHレベルとの間に相関を認めなかった。GSTpiのノックアウトマウスにおいては刺激を加えない状態では肝臓のGSH含有量は変化せず (Henderson CJ, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 5275-5280)、アセトアミノフェン処理にて野生型のマウスと比較しGSTpiノックアウトマウスではGSHレベルが高いことが報告されている (Henderson CJ, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 12741-12745)。よって、我々の実験系が無刺激の状態であることが、GSHレベルに影響を与えぬ理由であった可能性がある。

アポトーシスは臓器の発達、細胞分化、ホメオスタシスの維持において重要

な役割を果たしていると思われており、肺の発達、障害、及び肺線維症の近年の研究により徐々に、発達、修復、及び線維増生における線維芽細胞のアポトーシスの役割が明らかになりつつある (Fine A, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 279: L423-427)。細胞増殖性疾患を制御するために、線維芽細胞の蓄積と細胞外器質成分の沈着から臓器障害にいたるメカニズムについて認識することは重要と考えられる (Fukuda Y, et al. Am J Pathol. 1987; 126: 171-182)。当研究において、肺線維芽細胞においてGSTP1それ自体がアポトーシスを抑制することが示唆され、前記の複数の疾患への防御能と関連している可能性があると考えられる。

E 結論

我々は、解毒代謝酵素の一つとして重要なGSTP1の欠如によりヒト肺線維芽細胞においてアポトーシスが誘導されることを報告した。この結果より、GSTP1が細胞増殖や細胞の生存能を介して肺において一定の役割を有していること、また肺のホメオスタシスの制御に参画している可能性が示唆された。

F 健康危険情報

G 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H 知的財産の出願・登録情報

(予定を含む)

3. 特許取得
4. 実用新案登録
5. その他

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Hosoi T, Fukuchi Y, Ouchi Y.	Association between alpha-1-antichymotrypsin polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease.	Eur J Clin Invest	30	543-548	2000
Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y, Ouchi Y.	Neither IL-beta, IL-1 receptor antagonist, nor TNF-alpha polymorphisms are associated with susceptibility to COPD.	Respir Med	94	847-851	2000
Kuwahira I, Iwasaki M, Koga K, Iwamoto T, Tazaki G, Ishii M, Inoue H, Ohta Y.	Effectiveness of fold plication method in lung volume reduction surgery.	Internal Medicine	39	381-384	2000
植木純、高橋英気、鈴木勉、福地義之助。	大学病院における COPD の包括的内科治療プログラム	日本呼吸管理学会誌	9	346-351	2000
Ishii T, Matsuse T, Igarashi H, Masuda M, Teramoto S,	Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: protective effect of glutathione S-transferase P1.	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	280	L1189-L1195	2001

Ouchi Y.					
Ishii T, N. Keicho, Teramoto S, Azuma A, Kudoh S, Fukuchi Y, Ouchi Y, Matsuse T.	Association of Gc-globulin variation with susceptibility to COPD and diffuse panbronchiolitis.	Eur Respir J	18	753-757	2001
Nezu K, Yoshikawa T, Yoneda K, Kawaguchi M, Kimura A, Kobayashi H, Takenaka A, Fukuoka A, Narita N, Taniguchi S.	The Effect of nutritional status on morbidity in COPD patients undergoing bilateral lung reduction surgery.	Thorac Cardiovasc Surg	49	216-220	2001
石井健男、慶長直人、寺本信嗣、吾妻良太、工藤翔二、福地義之助、大内尉義、松瀬 健	NADPH/NADH oxidase の遺伝子多型とびまん性汎細気管支炎 (DPB)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) との関連についての検討。	日本呼吸器学会雑誌	59	328-332	2001
山口聖子、滝沢真季子、植木純、福地義之助	包括的呼吸リハビリテーションプログラム	日本呼吸管理学会雑誌	11	226-230	2001
Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tsukaguchi K, Okamoto Y, Takenaka H.	Plasma levels of amino acids and hypermetabolism in patients with chronic obstructive pulmonary disease.	Applied Nutritional Investigation	17	95-99	2001

石井健男、寺本信嗣、宮下明、鈴木基好、石ヶ坪良明、桑平一郎、植木純、大内尉義、福地義之助、松瀬健。	内科標榜医師の高齢者慢性閉塞性肺疾患（COPD）の治療についての実態調査—日本呼吸器学会ガイドラインの普及・施行状況を中心に—	日本呼吸器学会誌	40(2)	I113-122	2002
石井健男、寺本信嗣、宮下明、石ヶ坪良明、木村弘、桑平一郎、植木純、福地義之助、大内尉義、松瀬健。	内科標榜医師の高齢者COPD患者の禁煙指導についての実態調査。	日本老年医学会雑誌	39(3)	308-313	2002
松瀬 健	COPD（慢性閉塞性肺疾患）ガイドライン—日常診療への活用—	Physicians' Therapy Manual	2 (Oct)	PTM2(6)	2002

20020267

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.89-P.91の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。