

笠木聡, 福地義之助. : 日常診療におけるGOLDの位置付け. 内科 93(1):5-9, 2004.

塩田智美, 福地義之助. : 肺機能検査 Master Screen Impulse Oscillometry (MS-IOS)の信頼性と肺疾患における有用性. 循環器情報処理研究会雑誌 18:21-26, 2003.

福地義之助. COPDへのアプローチ その1 慢性閉塞性肺疾患の概念と変遷. Medical Practice 21(11):1786-1790, 2004. 文光堂

2. 学会発表

Fukuchi Y. : COPD Meeting in Hawaii, “COPD in Japan: an Overview” Jan 1.9-12, 2003 Kona/Hawaii.

Fukuchi Y. : The 7th Congress of APSR, Workshop “Prevalence and Risk Factors of COPD in Asia Countries” Oct .25-27, 2002 Taipei/ Taiwan

Fukuchi Y. : The 7th Congress of APSR, Symposium “GOLD: The Asia Pacific Perspective” Oct .25-27, 2002 Taipei/ Taiwan

Fukuchi Y. : The 26th International Congress of Internal Medicine, Symposium “Global Burden of Respiratory Disease in the 21st Century Novel Strategy for Diagnosis and Treatment” May 26-30, 2002 Kyoto/ Japan

Shiota T et al. : Assessment of Respiratory Impedance by Master Screen Impulse Oscillometry. 98th

International conference of ATS in Atlanta, 2002.5-17-21

Yoshimi K, Ueki J, Kasagi S, Togo S, Fukuchi Y. : Does aging affect the outcome of comprehensive pulmonary rehabilitation in patients with COPD? European Respiratory Society Meeting, Glasgow, United Kingdom, 2003.

Kodama Y, Seyama K, Mori T, Kasagi S, Ishigami A, Soma S, Onai R, Maruyama N, Fukuchi Y. : Role of senescence marker protein-30 (SMP30) in the development of cigarette smoke-induced lung pathology in mice. Geriatrics and Gerontology International, 3(suppl 1): S63, 2003 The 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo, Japan

Ueki J, Yoshimi K, Kasagi S, Togo S, Fukuchi Y. : Does aging affect the outcome of comprehensive pulmonary rehabilitation in patients with COPD? Geriatrics and Gerontology International, 3(suppl 1): S141, 2003 The 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo, Japan

Fukuchi Y. : Prevalence and risk factors of COPD in Asian countries. The 8th congress of Asian Pacific Society of Respirology in Malaysia, 12. 2. 2003

Fukuchi Y. : Inflammatory Component of COPD. World Asthma Meeting in Thailand, 2.18.2004.

Fukuchi Y. : Morning Seminar I “COPD Management for the Allergist” . The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Critical Immunology, Tokyo, 10. 7. 2004.

Fukuchi Y. : Epidemiology of COPD in Japan. The 9th congress of Asian Pacific Society of Respirology in Hongkong, 12. 11. 2004.

Kodama Y, Seyama K, Ueki J, Oka H, Ikari Y, Fukuchi Y. : Implementation survey for the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guideline in the Asian Pacific regions. The 9th congress of Asian Pacific Society of Respirology in Hongkong, 12. 11. 2004.

Sato T, Seyama K, Fukuchi Y. . Retrospective analysis of the clinical experience of 42 patients with lymphangioleiomyomatosis: identification of factors influencing to select treatment modality and predicting the course. The LAM Foundation International Research Conference. March 26-28, 2004, Cincinnati, USA.

Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Sato T, Soma S, Kondo T, Hayashi S, Minami S, Uekusa T, Fukuchi Y., Suda K. : Lymphangiogenesis in lymphangioleiomyomatosis: its implication in the progression of lymphangioleiomyomatosis. The LAM Foundation International Research Conference. March 26-28, 2004,

Cincinnati, USA.

塩田 智美、藤井充弘、植木純、福地義之助. : 高齢者呼吸器疾患におけるMS-IOS の有用性の検討. 日本老年医学会雑誌、39 : 増刊号、p111、2002 (第44 回日本老年病学会総会、2002. 6. 12-14、東京)

塩田 智美、藤井充弘、鈴木勉、福地義之助. : MS-IOS を用いた呼吸インピーダンスの各種肺疾患患者の検討. 日本呼吸器学会雑誌、40 : 増刊号、p118、2002 (第42 回日本呼吸器学会総会、2002. 4. 4-6、仙台)

児玉裕三、森貴紀、瀬山邦明、笠木聡、石神明人、丸山直記、福地義之助. : 加齢指標蛋白 30 (SMP30) の肺における役割. 日老医誌 40 巻第 Suppl V : 118, 2003.

植木 純、吉見 格、笠木 聡、森 貴紀、福地義之助. : ワークショップ4. 慢性呼吸不全の総合的アプローチ、COPD の急性増悪を回避するための戦略 : 予防戦略としての包括的呼吸リハビリテーション、日呼吸会誌 41 巻第 Suppl 号:19, 2003.

植木 純、吉見 格、笠木 聡、塩田 智美、森 貴紀、福地義之助. : 70 歳以上の高齢 COPD における包括的呼吸リハビリテーションの有用性の検討 日老医誌 40 巻第 Suppl 号: 118, 2003.

植木 純、吉見 格、福地義之助. : イブニングシンポジウム 1. COPD の治療、包括的呼吸リハビリテーション、Jpn J Appl physiol 巻第 3suppl 号: 58, 2003.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許権取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担総合研究報告

肺気腫発症におけるプロテアーゼ・アンチプロテアーゼの関与
ならびに

F G 視覚センサーを用いた睡眠時無呼吸症候群の診断

分担研究者 山口 佳寿博
佐野厚生総合病院 副院長

研究要旨 はじめに COPD 患者 110 例で MMP-1(-1607GG/G), MMP-9(-1562C/T), TIMP-2(-418G/C, +853G/A) の遺伝子型を決定し、肺機能検査、胸部 CT 所見との相関を解析した。MMP-9 で変異を持つ群は持たない群より気腫化スコアが高く ($p=0.03$)、%DL_{CO}/VA は低値であった ($p=0.01$)。他の多型では同様な解析で有意差を認めず、肺気腫進展には MMP-9 遺伝子多型の関与が大きいと考えた。次に、重症肺気腫患者 7 例、対照喫煙者 4 例、非喫煙者 4 例の肺組織を用い、マイクロアレイ法により、各種プロテアーゼとそのインヒビター、計 57 の遺伝子発現を検討した。肺気腫肺ではエラスターゼ活性を有する MMP-7, 9, cathepsin K, S の発現が喫煙者肺に比べ亢進していた。一方、F G 視覚センサーの睡眠時無呼吸症候群診断における有用性を検証するため、34 例の患者を対象に polysomnography (PSG) または簡易型アプノモニターと F G センサーによる解析を同時に行った。F G センサーにより解析した無呼吸、低呼吸時間と回数は PSG の測定値とよく相関し、睡眠時無呼吸症候群の診断と重症度の判定が F G センサーにより可能であると考えられた。

A. 研究目的

14 年度

プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡は肺気腫発症の主因と考えられており、種々の基礎研究より、Matrix metalloproteinase (MMP)-1、9 は肺気腫の病因として重要な可能性が示唆されている。筆者らは 110 名の日本人喫煙者において MMP-9:-1562T アレルを持つ群で肺気腫化が促進、肺拡散能が低下することを報告した。また、平野らは MMP 阻害物質である TIMP-2 遺伝子多型について検討し、COPD 患者では -418C アレル頻度が健常喫煙者よりも高く、+853A アレル頻度は逆に低いと報告した。本研究では MMP 活性に関わる 4 箇所の多型の気腫化への影

響を同時解析した。

15 年度

肺に存在するプロテアーゼとして多数の分子が同定されており、対応するアンチプロテアーゼも多岐にわたっている。これまでに neutrophil elastase, MMP-9 など個々の因子の関与については報告されてきたが、多数の因子を同時に解析し、いずれの因子が重要であるかについては十分に検討されてこなかった。本研究ではマイクロアレイ法を用い、重症肺気腫患者末梢肺組織における多数のプロテアーゼ・アンチプロテアーゼの遺伝子発現を解析し、肺気腫の進展にいずれの因子が重要であるかを検討した。

16 年度

SAS の診断には気流センサー、酸素飽和度モニター、脳波などを装着し、詳細な解析が必要と考えられてきた。職業上運転をする人など、多くの人々に対し SAS のスクリーニングを行うためにも、より簡便な診断法の開発が望まれる。近年、中島らは微量のレーザー光による輝点の上下動を解析することにより呼吸運動のモニタリングが可能であることを報告した (FG 視覚センサー)。本研究では、FG 視覚センサーの SAS 診断機器としての有用性の検証を目的とした。

B. 研究方法

14年度

対象は日本人喫煙者 110 名、慶應義塾大学病院外来通院中で、50 歳以上、生涯喫煙量 10pack-years 以上、肺機能、胸部 CT に影響を及ぼす他の疾患を持たないものとした。胸部 CT における気腫性変化を視覚法で評価し、LAA スコアを算出した (0-24 点)。遺伝子型の決定は ARMS 法ならびに RFLP 法により行った。

15年度

肺癌のため肺葉切除術を施行された非喫煙者 4 例、過去喫煙者 4 例の切除肺の一部、肺容量減少術を施行された重症肺気腫 6 例ならびに肺癌手術施行重症肺気腫 1 例、計 7 例の肺気腫肺の一部を患者の同意を得て凍結保存した。末梢肺組織から total RNA を抽出し、2 本鎖 cDNA の作成、*In vitro* transcription によるビオチン標識 cRNA の作成、標識 cRNA の分断を経て、Affymetrix 社 GeneChip (U95A) とハイブリダイゼーションした。プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ関連の 57 遺伝子について、喫煙者肺と非喫煙者肺、肺気腫肺と喫煙者肺の間で発現を比較した。

16年度

平成 15 年 1 月より 11 月までの間に、慶應義塾大学病院に睡眠時無呼吸症候群の診断のために入院した患者 34 例を対象とした。性別は全員男性、年齢は平均 49 歳、A I は平均 34.4 回/時間であった。PSG を 21 例、簡易型アプノモニターを 12 例、酸素飽和度モニターを 22 例で施行した。FG 視覚センサーでは全輝点の上下動の総和が、基準の 20%未満の場合を無呼吸、50%未満の場合を低呼吸と定義した。

C. 研究結果

14年度

MMP-1(-1607G), MMP-9(-1562T), TIMP-2(-418C), TIMP-2(+853A) を有する患者はそれぞれ 52, 32, 30, 24%であった。MMP-9 遺伝子多型において T アレルを持つ群は肺拡散能が低値 ($p=0.01$)、LAA スコアが高値 ($p=0.03$) を示した。MMP-1 および TIMP-2 多型においては遺伝子型間で有意差を認めなかった。各遺伝子型が LAA スコア 8 以上となる危険因子となるか否かをロジスティック回帰分析で検討した結果、有意な危険因子は MMP-9 遺伝子多型のみであった (Odds ratio=2.69, $p=0.02$)。同様に %DL_{CO}/VA が 65%未満となる危険因子も MMP-9 のみであった (Odds ratio=5.14, $p<0.01$)。

15年度

serine protease と serine protease inhibitor の発現については、cathepsin G と α_1 -antitrypsin の発現が喫煙者で非喫煙者より亢進していたが、肺気腫と喫煙者の間では有意な変化を認めなかった。MMP と TIMP の発現については、MMP-7, 9, 11, TIMP-2 の発現が喫煙者と非喫煙者では不変であったが、多くの肺気腫患者肺で喫

煙者肺より亢進していた（それぞれ 383, 243, 280, 165%）。一方、cysteine protease とその inhibitor については、cathepsin C, Z, cystatin A, B が喫煙者で非喫煙者より亢進し、肺気腫では喫煙者よりもさらに亢進する傾向が見られた。また、cathepsin K, S, W, cystatin F は喫煙者と非喫煙者での発現は同等であったが、肺気腫では喫煙者よりも亢進していた（それぞれ 185, 206, 161, 164%）。

16年度

閉塞性無呼吸の場合でも胸腹部全体の動きは相殺されており、PSG のフローと FG の波形は一致していた。また、側臥位の場合でも FG で無呼吸、低呼吸の判定が可能であった。PSG と FG の間での AI, AHI の相関は、AI ($R^2=0.69$, $p<0.0001$), AHI ($R^2=0.67$, $p<0.0001$) とともに良好であった。一方、FG センサーと PSG の間で平均無呼吸時間 ($R^2=0.76$, $p<0.0001$) と最長無呼吸時間 ($R^2=0.72$, $p<0.0001$) はよく相関したが、FG センサーと簡易型アプノモニターの間では有意な相関を認めなかった。FG センサーによる AHI は CPAP 施行中の酸素飽和度低下時間 (90%未満の割合) と相関した。

D. 考察

MMP-9 遺伝子多型において T アレルを持つ群は持たない群に比して %DL_{CO}/VA は低値、LAA スコアは高値を示した。またロジスティック回帰分析においても T アレルを持つことは年齢、生涯喫煙量と独立した肺気腫の危険因子であると考えられた。MMP-1, TIMP-2 の各多型においては今回の検討では肺気腫化進展と有意な関連を認めなかった。Joos らは MMP-1, 9, 12 の複数の遺伝子多型を解析し、今回検討した中では MMP-1 遺伝子多型のみが

COPD 発症と関連したと報告し、MMP-9 遺伝子多型では有意差を認めなかったと報告している。Joos らの報告との違いは、人種、対象の選定条件の違いによるものと考えられた。今回の検討でも、MMP-9 (-1562C/T) 遺伝子多型は LAA スコアと肺拡散能では有意差が出たものの、一秒率では差を認めなかった。従って、一秒量を基準とした Joos らの 2 群間比較と筆者らの結果の違いは、気腫化と閉塞性換気障害を規定する遺伝的因子が異なっているためとも考えられる。また、TIMP-2 遺伝子多型に関しても、平野らの報告との違いは対象の選定条件と解析法が異なっていたためと考えられた。

マイクロアレイ解析により、多くのプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ遺伝子の発現が喫煙者肺で非喫煙者肺よりも亢進しており、肺気腫肺においてはさらに上昇傾向を認めた。発現増強を認めた遺伝子数、発現増加の程度はプロテアーゼでアンチプロテアーゼよりも顕著であった。具体的には、エラスターゼ活性を有する MMP-7, 9, cathepsin K, S の発現が亢進していることが確かめられたのに加え、cathepsin C, D, Z, W, MMP-11 など、これまでに肺気腫との関連が予想されていなかったプロテアーゼ遺伝子の関与の可能性が示された。アンチプロテアーゼの発現低下による肺気腫の進展の可能性は今回の検討からは否定的と考えられた。

本研究で用いた末梢肺組織には様々な種類の細胞が含まれ、肺気腫肺と正常肺ではその構成比率も異なると考えられる。しかしながら、肺気腫進展における肺実質でのプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡は、肺胞上皮、血管内皮、炎症細胞などから産生される多数のメディエーターの

相互作用によるものと考えられる。

FG視覚センサーでは、測定された無呼吸、低呼吸の時間と回数はPSGで測定した値とよく相関し、体位の変化や閉塞型、中枢型にかかわらず、無呼吸の検出が可能であり、CPAP療法の適応基準となる無呼吸指数 (AI)、無呼吸低呼吸指数 (AHI) の判定も可能であり、無呼吸イベントの検出において、簡易型アプノモニターよりも信頼性が高いと考えられ、CPAP療法施行中でフローセンサーの装着が困難な症例においても、無呼吸、低呼吸の評価法として有用である、と考えられた。長所として、非接触であることより自然な状態での検査が可能であること、必要時に他の検査、治療との併用が可能であること、モニターがはずれるなどの測定エラーが少ないこと、静穏で比較的小型であり、大部屋での検査も可能であること、などがあげられる。問題点としては、外来患者にポータブルで行うことが難しい点、閉塞型、中枢型の区別ができない点などが考えられる。

E. 結論

関連解析の結果からは、MMP-1, 9, TIMP-2 の遺伝子多型の中では、MMP-9(-1562C/T) 遺伝子多型が日本人喫煙者における肺気腫の進展に最も関与していると考えられた。一方、マイクロアレイ解析により、重症肺気腫患者肺においてプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ双方の発現亢進状態が継続し、MMP-7, 9, cathepsin K, S などのエラスターゼ活性を有するプロテアーゼの関与の可能性が示されたのに加え、cathepsin C, D, Z, W, MMP-11 など、いまだ役割が明らかとなっていないプロテアーゼの関与の可能性も示唆された。こうした遺伝子発

現の特徴がいかなる遺伝子多型と関連するかについては、今後、詳細な検討が必要と思われる。

16年度の研究結果からは、FG視覚センサーが睡眠時無呼吸症候群を簡便かつ正確に診断する機器として実用可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, Yamaguchi K.: Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 289:116-119, 2001.

Yamaguchi K, Soejima K, Koda E, Sugiyama N.: Inhaling gas with different CT densities allows detection of abnormalities in the lung periphery of patients with smoking-induced COPD. *Chest* 120:1907-1916, 2001.

Takeshita, K., Suzuki, Y., Takeuchi, O., Nishio, K., Toda, K., Kudo, H., Miyao, N., Ishii, M., Sato, N., Naoki, K., Aoki, T., Suzuki, K., Hiraoka, R. and Yamaguchi, K.: Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor- κ B activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29(1):124-132, 2003.

Minematsu, M., Nakamura, H., Iwata, M., Tateno, H., Nakajima, T., Takahashi, S., Fujishima, S. and Yamaguchi, K.: CYP2A6 deletion polymorphism is associated with smoking habit and development of

pulmonary emphysema. *Thorax* 58(7):623-628, 2003.

Tateno, H., Nakamura, H., Minematsu, N., Nakajima, T., Takahashi, S., Nakamura, M., Fukunaga, K., Asano, K., Lilly, C. M., Yamaguchi, K.: Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid. *Respir. Med.* 98(8):782-90, 2004.

Inoue, T., Fujishima, S., Ikeda, E., Yoshie, O., Tsukamoto, N., Aiso, S., Aikawa, N., Kubo, A., Matsushima, K., Yamaguchi, K.: CCL22 and CCL17 in rat radiation pneumonitis and in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 24(1):49-56, 2004.

Ishii, M., Suzuki, Y., Takeshita, K., Miyao, N., Kudo, H., Hiraoka, R., Nishio, K., Sato, N., Naoki, K., Aoki, T., Yamaguchi, K.: Inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activity improves ischemia/reperfusion injury in rat lungs. *J Immunol.* 172(4):2569-77, 2004.

2. 学会発表

Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, Yamaguchi K.: Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. (2002 ATS International Conference, Atlanta, Georgia, U. S. A.).

仲村秀俊、峰松直人、舘野博喜、中島隆裕、藤島清太郎、山口佳寿博:喫煙による肺機能障害、気腫性変化、肺高血圧の進展と NOS3 遺伝子多型の関連。42 回日本呼吸器学会総会。2002.

峰松直人、仲村秀俊、舘野博喜、中島隆裕、山口佳寿博:日本人喫煙者における matrix metalloproteinase (MMP)-9 遺伝子多型と肺の気腫化。42 回日本呼吸器学会総会。2002.

中島隆裕、仲村秀俊、峰松直人、舘野博喜、石坂彰敏、山口佳寿博:マイクロサンプリング法による COPD 患者気道被覆液中システインプロテアーゼ・アンチプロテアーゼの検出。42 回日本呼吸器学会総会。2002.

Nakamura, H., Nakajima, T, Takahashi, S., Minematsu, N., Tateno, H., Inoue, T. and Yamaguchi, K.: Differential expression of matrix metalloproteinases between severe emphysema patients and control smokers by a microarray analysis. (2003 ATS International Conference, Seattle, Washington, U. S. A.).

高橋佐枝子、仲村秀俊、中島隆裕、峰松直人、舘野博喜、井上卓、山口佳寿博:マイクロアレイ法による肺気腫患者肺組織における Matrix Metalloproteinases (MMPs) 遺伝子発現の解析、(43 回日本呼吸器学会総会、福岡、2003、3 月)。

仲村秀俊、竹村安弘、青木広宙、村井理恵、平岡理佳、味村一弘、中島真人、山口佳寿博:FG 視覚センサーを用いた非接触状態での睡眠時無呼吸症候群の診断、(44 回日本呼吸器学会総会、東京、2004、3 月)。

Nakamura, H., Takemura, Y., Aoki, H., Murai, M., Hiraoka, R., Mimura, K.,

Nakajima, M., Yamaguchi, K. :
Diagnosis of Sleep Apnea Syndrome
Using a Fiber Grating Visual Sensor
without Airflow Monitoring. (2004
ATS International Conference,
Orlando, Florida, U.S.A.).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

肺気腫の発症機序の解明と治療法への展開

分担研究者 永井 厚志
東京女子医科大学 第一内科 教授

研究要旨 前年度までの研究から肺気腫の発症機序には肺胞細胞の細胞死が重要な役割を果たしていることが知られた。平成14年度からの研究においては細胞死とともに細胞老化が肺気腫の発症機序に関与することを見いだした。すなわち1) 喫煙曝露により肺胞上皮細胞が老化を生じること、2) ヒト喫煙者の肺組織では肺胞上皮細胞と血管内皮細胞の老化が生じていることが明らかにされた。以上の研究成績を総合して、肺気腫の発症機序として「細胞死と老化仮説」を提唱した。さらにこの仮説にもとづいて、「肺胞細胞の防御」が肺気腫に対する新しい治療戦略となりうるかについて検討した。細胞実験および動物実験の成績からは、既存の抗潰瘍薬である geranylgeranylacetone (GGA) が肺胞上皮細胞や血管内皮細胞の細胞死を抑制し、喫煙曝露による肺気腫の発症を抑制することが知られた。

A. 研究目的

前年度までの研究から、肺気腫の発症機序には肺胞上皮細胞や血管内皮細胞の細胞死が関与することが明らかにされた。その成績から肺気腫では肺胞細胞の死が細胞増殖に比べて過剰に生じた結果、肺胞の消失が生じている可能性が示された。かかる「細胞死仮説」は肺気腫の発症機序の一部を説明すると思われるが、同時に肺胞細胞の老化による増殖反応の停止が細胞死による肺胞消失を促進する原因になるのではないかと考えた。本研究では、細胞実験、動物実験、ヒト気腫肺組織の検討から肺気腫の発症機序における細胞老化の関与を明らかにし、ひいてはこれまでの研究成績を総合して「細胞死と老化仮説」を構築することを目的とした。さらにこの仮説にもとづいて、「肺胞細胞の防御」が肺気腫に対する新しい治療戦略となりうるかについて検討した。すなわち

細胞死を防御する heat shock proteins (HSPs) 誘導薬が喫煙曝露による肺気腫の発症を抑制するかについて検討した。HSPs を誘導する治療薬としては、日本において1984年から広く使用されている胃粘膜保護薬 Geranylgeranylacetone (GGA) を用いた。

B. 研究方法

1. 細胞老化の研究

1) 細胞および動物実験

喫煙刺激が肺胞上皮細胞の老化をもたらすかを明らかにするために、II型肺胞上皮様細胞 (ScienCell社) を培養してタバコ煙濃縮液 (cigarette smoke extract: CSE) に曝露した。細胞老化の指標として細胞形態、酸性β-ガラクトシダーゼ [senescence-associated (SA) β-galactosidase] 活性、細胞内リゾソーム量、BrdUの核内取り込みについ

て検討した。動物実験においては喫煙チャンバー内で8週齢雄性ICRマウスにタバコ主流煙（ピース®：タール29mg、ニコチン2.5mg、日本タバコ社）を一日あたり3本、週5日、2週間継続して吸入させた。その後OCTコンパウンドを経気道的に注入して肺を拡張させたのち、急速凍結後3µmの凍結切片を作成した。

2) ヒト気腫化肺組織を用いた研究

肺容量減少術にて採取された気腫化肺組織（全例喫煙者）、肺癌切除術時に採取された健常部分の肺組織（対照喫煙者および対照非喫煙者）を用いた。組織の採取にあたっては事前に患者より文書で同意を得た。採取された肺組織断片は注射器に入れて陰圧で拡張し、10%ホルマリン中で固定後パラフィン包埋したのち□µmの薄切切片を作成した。細胞老化の指標として老化関連 cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) である p16 および p21 蛋白の発現を免疫組織学的に検討した。またテロメア長を PNA プロブ FISH 法（ダコ・ジャパン）を用いて測定した。同一標本を抗 SP-A 抗体、抗 CD31 抗体を用いて免疫染色し、II 型肺胞上皮細胞と血管内皮細胞を同定した。

2. 喫煙曝露肺気腫モデルに対する Heat shock protein 誘導薬の効果

1) 細胞実験

ヒト正常肺胞上皮細胞（ScienCell 社）およびヒト細小肺血管内皮細胞（Clonetech 社）を subconfluent 密度まで培養し、 10^{-8} - 10^{-5} M 濃度の GGA（エーザイより供与）に6時間前処理したのち、GGA を除去してタバコ煙濃縮液（0.01 - 1%）、過酸化水素（0.2 - 1 mM）、増殖因子欠乏培地、anoikis 刺激（細胞接着阻害プレートに培養）に曝露した。2 - 24 時間後に細胞を回

収し、アラマーブルーアッセイ法（細胞死）、ヘキスト 33342 核染色法（アポトーシス）、カスパーゼ-3 活性測定（アポトーシス）、LDH 遊離率の測定（ネクローシス）、トリパンプルーアッセイ法（ネクローシス）を用いて細胞死に対する抑制効果を定量評価した。また HSP-60、70、90 の蛋白質発現をウエスタンブロッティング法により確認した。

2) 動物実験

生後4週齢の雄性 Hartley 系モルモットを無処置で溶媒を経口投与する群（G1）、同じく無処置で GGA 200mg/kg を経口投与する群（G2）、喫煙させて溶媒を投与する群（G3）及び喫煙させて GGA 200mg/kg を投与する群（G4）に分けた。G3 及び G4 のモルモットに対しては、毎週5回（月～金曜日）、10週間喫煙させた。G1 及び G3 に対しては GGA の媒体を、G2 及び G4 に対しては GGA 200mg/kg を毎喫煙前に強制経口投与した。喫煙曝露の方法としては、モルモットを10角形のアクリル製固定器に入れて中央のチャンバーに頭部だけを出して固定し、Peace® の煙をポンプでチャンバー内に送り込み、タバコ煙を吸入させた。タバコ煙を約10分間（タバコ1本分）曝露した後、チャンバー内に煙が充満した状態で20分間放置した。これを1日に連続10回（5時間）繰り返した。喫煙曝露の終了後、肺組織を摘出し、10%ホルマリン液を用いて25cm水柱圧にて肺を拡張固定した。その後3µmの薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し通常の方法を用いて形態計測を行なった。

C. 研究結果

1 細胞老化の研究

A549 細胞および正常ヒト肺胞上皮

細胞に CSE を曝露すると SA β -galactosidase 活性の増加、細胞の扁平・巨大化、細胞内リソゾームの増大など老化に特徴的な形態学的・生化学的变化が観察された。さらに CSE を除去した後に再度血清刺激を負荷しても BrDU の核内取り込みはみられず、老化に特徴的な細胞周期の不可逆的な停止が生じたと考えられた。喫煙曝露を行なったマウスでは、肺胞上皮細胞に SA β -galactosidase 活性の増加、p21 蛋白発現などの老化関連変化が観察された。またヒト肺組織の検討では、II 型肺胞上皮細胞および血管内皮細胞における老化関連 p16 蛋白の陽性率は肺気腫患者と対照喫煙者では対照非喫煙者に比べて有意に高値であった。しかし肺気腫患者と対照喫煙者との間には有意差はみられなかった。一方、老化関連 p21 蛋白の発現率は 3 群間に有意差はみられなかった。以上の結果からヒト肺組織においても喫煙による肺胞上皮の細胞老化が生じている可能性が示された。

2. 喫煙曝露肺気腫モデルに対する Heat shock protein 誘導薬の効果

1) 細胞実験

ヒト正常肺胞上皮細胞およびヒト細小肺血管内皮細胞に GGA を曝露すると 10^{-6} M 以上の濃度で HSP-60、70、90 の蛋白質発現を増強させた。さらに喫煙刺激、活性酸素（過酸化水素）、増殖因子欠乏（VEGF など）、anoikis による細胞死（アポトーシス、ネクローシス）を 10^{-6} M 以上で濃度依存性に抑制した。

2) 動物実験

タバコ煙を 10 週間曝露したモルモットでは肺胞径の拡大 (Lm: $79.4 \pm 1.4 \mu\text{m}$ vs. $54.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$ for untreated animals, $p < 0.01$) と肺胞内容積比率 (V_{valv. air}: $84.2 \pm 0.4\%$ vs. 78.3

$\pm 0.5\%$ for untreated animals, $p < 0.01$) の増加を伴う気腫病変が形成された。喫煙曝露と同時に GGA を経口投与したモルモットでは喫煙曝露とともに媒体のみを経口投与した群に比べて、肺胞径の拡大 ($70.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) と肺胞内容積比率 ($81.3 \pm 0.3\%$, $p < 0.01$) が有意に減少した。以上の結果から、GGA は喫煙曝露による気腫病変の発症を減少させることが知られた。

D. 考察

本研究では 1) 喫煙による刺激が肺胞上皮細胞の老化 (stress-induced senescence) を誘導すること、2) 喫煙による細胞老化はヒトの肺組織でも生じていることが明らかにされた。この研究からは喫煙による直接刺激が細胞老化の原因になることが示されたが、肺気腫患者ではそれ以外の機序によっても細胞老化がもたらされる可能性がある。すなわち 1) 肺気腫患者の多くは高齢者であることから加齢に伴う細胞周期回転を繰り返していること、2) 肺気腫患者では肺胞上皮細胞の細胞死とそれを代償する細胞増殖が繰り返されていることによっても細胞周期回転が亢進していること、からテロメア長が短縮する可能性 (replicative senescence) が考えられる。事実、ヒト肺組織を用いた検討では、肺気腫患者や喫煙者では肺胞上皮細胞のテロメア長が短縮していた。これまでの私どもを含む複数の研究により、肺気腫の発症には細胞死が関与していることが明らかにされているが、肺胞壁に老化細胞が蓄積すれば、たとえ細胞死により細胞が消失しても細胞増殖による細胞の補填が行われないうちに、肺胞細胞が徐々に減少していくものと想定される。かか

る肺気腫の発症仮説における「細胞死と老化」という新しい概念の導入は、肺気腫が高齢者に好発し、年余をかけて徐々に進行する理由の一端を説明しうる可能性がある。

さらに本研究では「細胞死と老化」仮説にもとづき、肺胞細胞の防御（細胞死の抑制）が肺気腫に対する新たな予防・治療法の標的になるかについての研究を進めた。その成績からは1) GGA は HSPs を誘導して肺胞上皮細胞や血管内皮細胞のアポトーシスやネクローシスを抑制すること、2) 動物に連日経口投与すると喫煙による肺気腫の発症（肺胞径の拡大）が 38%抑制されることが明らかにされた。以上の研究成績は細胞死の抑制が COPD に対する新しい治療戦略になりうることを示している。GGA は日本で開発された胃粘膜保護薬であり、すでに 20 年におよぶ使用経験が得られている。高齢者の慢性疾患である COPD の治療薬には、薬剤としての有効性ととも
1) コンプライアンス（経口薬が望ましい）、2) 安全性、3) 経済性（廉価）の要件が必要であるが、GGA は過去の使用経験からこれらの要件を満たす薬剤と考えられる。肺胞細胞の防御という新しい観点から既存の薬剤を応用することにより、早期に臨床実用化が可能な COPD の治療法を開発できる可能性が考えられた。

E. 結論

肺気腫の発症機序を説明する仮説として新しく「細胞死と老化仮説」を構築した。その仮説にもとづいて肺胞細胞の防御を目指した研究では、HSPs 誘導作用のある胃粘膜保護薬 GGA が肺胞細胞の細胞死を抑制して肺気腫の発症を抑制する可能性が示された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Aoshiha K, Koinuma M, Yokohori, N, Nagai A.: Differences in the distribution of CD4+ and CD8+ T-cells in emphysematous lungs. *Respiration* 71:184-190, 2004.

Tsuiji T, Aoshiha K, Nagai A.: Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:643-649, 2004.

Aoshiha K, Nagai A.: Differences in airway remodeling between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 27: 35-44, 2004.

Yokohori N, Aoshiha K, Nagai A.: Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 125:626-32, 2004.

Aoshiha K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A.: Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. *Inhal Toxicol* 15:1029-1038, 2003.

Aoshiha K, Yokohori N, and Nagai A.: Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Mol Cell Biol* 28:555-562, 2003.

2. 学会発表

Aoshiha K, Koinuma M, Nagai A. : Elevated number of TNF- α immunopositive airway epithelial cells in subjects with COPD: implications for airway inflammation. 2004 American Thoracic Society Conference 2004. 4. Orlando

Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. : Cellular senescence in alveolar epithelial cells in smokers and patients with pulmonary emphysema. Thoracic Society Conference 2004. 4. Orlando

Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. : Cigarette smoke induction of cellular senescence in alveolar epithelial cells. 2003 American Thoracic Society Conference 2003. 5. Seattle

Yokohori N, Aoshiha K, Nagai A. : KGF and EGF enhance adult rat alveolar type II cell proliferation by activating MAPK cascade pathway. 2003 American Thoracic Society Conference 2002. 5. Atlanta

辻隆夫、青柴和徹、永井厚志 : 喫煙による肺胞上皮の細胞老化に関する組織学的研究 第44回日本呼吸器学会総会 2004 東京

八木理充 青柴和徹、永井厚志 : COPD患者におけるNF κ Bの活性化の検討 第44回日本呼吸器学会総会 2004 東京

青柴和徹:COPD研究の進歩 肺のリモ

デリングと病因 第42回日本呼吸器学会総会 2003 仙台

横堀直子、青柴和徹、川田博、永井厚志 : II型肺胞上皮細胞に対するKeratinocyte growth factorとEpidermal growth factorの増殖促進作用 第42回日本呼吸器学会総会 2003 仙台

辻隆夫、青柴和徹、永井厚志 : タバコ煙曝露によるII型肺胞上皮様細胞の細胞老化の誘導 第42回日本呼吸器学会総会 2003 仙台

鯉沼みゆき 青柴和徹、永井厚志 : COPD患者の末梢気道におけるTNF α と炎症像の解析 第42回日本呼吸器学会総会 2003 仙台

永井厚志 : 閉塞性肺疾患 now and then 第42回日本呼吸器学会総会 2002 福岡

青柴和徹 : 肺疾患におけるアポトーシスの制御と治療への応用 肺気腫とアポトーシス 第42回日本呼吸器学会総会 2002 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担総合研究報告

本邦肺動脈肺高血圧症例における遺伝子変異に関する研究

分担研究者 友池 仁暢
国立循環器病センター 院長

研究要旨

本院にて診断・加療中の肺動脈肺高血圧症 100 例を対象に、患者の末梢血から genomic DNA を抽出し、肺高血圧症の発症に関連があると報告されている Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 (BMPR2) 及び Activin Receptor Like Kinase 1 (ALK1) 遺伝子の変異の有無を検討した。また Serotonin transporter (5-HTT) 遺伝子多型, Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 遺伝子多型についても測定を行った。結果、肺動脈肺高血圧症中の原発性肺高血圧症 (PPH) については 56 例中 23 例 (41.1%) に BMPR2 の遺伝子変異が検出された。また特に家族性 PPH と診断されている 6 家系 7 例については全例に BMPR2 遺伝子変異の存在が確認された。一方、膠原病性肺高血圧症、先天性心疾患合併肺高血圧症、肝疾患合併肺高血圧症などの二次性肺動脈肺高血圧症 44 例では膠原病性肺高血圧症で 1 例の BMPR2 遺伝子変異が発見された。ALK1 遺伝子については PPH 56 例中 3 例 (5.4%) に変異が発見された。二次性肺動脈肺高血圧症では先天性心疾患合併肺高血圧症 1 例で ALK1 遺伝子の変異が認められた。以上を総合すると肺動脈肺高血圧症中の PPH では 56 例中 26 例 (46.4%) と高頻度に BMPR2 または ALK1 遺伝子変異が確認され、PPH の発症にはこれらの遺伝子変異が強く関与している可能性が示唆された。一方二次性肺高血圧症では、これらの遺伝子変異の関与は少なかった。また 5-HTT 遺伝子多型については、肺高血圧の成立に関係すると言われる LL 型は、本邦症例では低値で、本遺伝子多型の関与は少ないと考えられた。

A. 研究目的

原発性肺高血圧症 (PPH) はこれまで発症頻度は極めて希であるが、原因不明で予後不良の疾患として知られている。また先天性心疾患に合併する肺高血圧症や膠原病に合併する肺高血圧症も PPH と類似した臨床症状や病理学的所見を呈することからその発症には PPH と共通の要因が関与している可能性が示唆され、1998 年の WHO 専門家会議でこれら二次性肺高血圧症は PPH とともに肺動脈肺高血圧症

(Pulmonary Arterial Hypertension : PAH) としてまとめて取り扱うことが提案された。さらに 2003 年には 3 回目の世界 PAH 専門家会議が開催され、本症の名称が PPH から Idiopathic PAH (IPAH) と Familial PAH (FPAH) に変更することが推奨されることとなった。これは 1997 年、家族性 PPH 例には 2q31-32 染色体上の遺伝子に変異が存在し、2000 年にはこれが Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 (BMPR2) 遺伝子であることが解明さ

れ、2002年には弧発性 PPH に BMPR2 遺伝子異常が発見され、PPH はもはや「Primary」と称することが困難となった理由による。しかし、BMPR2 遺伝子変異が PPH に特異的所見か否か、本邦 PPH 例の発症さらには PAH の発症にどのように関与しているかは明らかでなく、また他の PPH 関連遺伝子変異の有無についての検討も無い。そこで本研究の目的は、可能な限り多数の本邦 PAH 例を対象に BMPR2 遺伝子変異の有無を検討し、加えて文献上肺高血圧症の発症に関連すると考えられる Activin receptor like kinase 1 (ALK1) 遺伝子変異と最近肺高血圧症との関連が報告されている Serotonin transporter (5-HTT) 遺伝子多型、Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 遺伝子多型についても測定を行い、PAH 発症に関わる遺伝子変異の実態を明らかにすることにある。

B. 研究方法

方法：BMPR2 遺伝子変異は、末梢血より抽出した DNA を分離し、BMPR2 遺伝子のイントロンから作成したプライマーにより 13 個のエクソンを増殖した。更に PCR により増殖後、ダイレクトシーケンス法により BMPR2 内の変異を同定した。また同様の方法により ALK-1 の遺伝子変異についても検討を行った。さらに別に PPH 発症に関連すると報告されている 5-HTT 遺伝子多型や PAH の程度と関連すると報告されている Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 遺伝子多型についても測定をおこなった。本研究は当院倫理委員会（受付番号 15-14、肺高血圧症の病因解明のための遺伝子解析）の承認を得て行った。

C. 研究結果

BMPR2：解析結果が得られた PPH56 例中 23 例 (41.1%) に BMPR2 の遺伝子変異が検出された。この内、6 家系計 7 例の家族性 PPH 例では全例 (100%) に BMPR2 遺伝子変異の存在が確認された。弧発性 PPH49 例では 16 例、32.7% に遺伝子変異が認められた。膠原病性肺高血圧症、先天性心疾患合併肺高血圧症、肝疾患合併肺高血圧症などの二次性 PAH では、膠原病性肺高血圧症で一例の BMPR2 遺伝子変異が検出された。BMPR2 遺伝子は大きく分けて、Ligand binding / extracellular、Transmembrane、Kinase、Cytoplasmic tail の各ドメインに分けられることが報告されている。BMPR2 遺伝子内の変異部位は家族性 PPH、弧発性 PPH 合わせて 21 カ所に認められ、Ligand binding / extracellular ドメインに 4 カ所、Transmembrane ドメインに 1 カ所、Kinase ドメインに 8 カ所、Cytoplasmic tail ドメインに 8 カ所存在した。同じ変異を持つ患者が 4 組存在し、同一変異を持つ患者 1 組は親子であったが、他の 3 組は聞き取り調査で判明した限り血縁関係は認められなかった。発症年代別の遺伝子変異陽性率は、17 歳以下は 13 例中 6 例 (46.2%)、18-39 歳で 31 例中 16 例 (51.6%)、40 歳以上 10 例中 1 例 (10%) で、若年発症例で BMPR2 遺伝子変異の陽性率が高かった。

ALK1：PPH56 例中 3 例 (5.4%) に ALK1 の遺伝子変異が検出された。一方、二次性 PAH では先天性心疾患合併肺高血圧症で一例の ALK1 遺伝子変異が発見された。6 家系の家族性 PPH には ALK1 遺伝子の変異は認められず、変異は弧発性 PPH に限定された。同定された ALK1 遺伝子変異は同一変異ではなかった。ALK1 遺伝子変異が陽性の PPH 例 3 例は、いずれも 10 歳代に高度の

肺高血圧を主訴として発症し当初は若年 PPH としか診断できなかった症例であったが、一人は頻回の鼻出血の既往が存在し家族歴から遺伝性出血性毛細血管拡張症と診断できる症例であった。

5-HTT:5-HTT は LL/L, L, LL/S, L/S, S の 5 種類の遺伝子多型が確認された。その頻度は PPH で順に 0, 2, 1, 19, 34 例、二次性 PAH で、1, 0, 0, 14, 29 例で両群間で大きな差は認められず、L/S, S 型が主であった。

ACE:ACE 多型については、I, I/D, D 型が存在する事が知られているが、今回結果では、PPH で順に 26, 31, 9 例、二次性 PAH で、20, 20, 3 例の頻度であった。ACE 多型も両群間で差は認められなかった。

D. 考察

今回我々の PAH を対象とした遺伝子検査では、PPH で高頻度に BMPR2 もしくは ALK1 遺伝子異常が発見された。一方、二次性 PAH 症例では、BMPR2, ALK1 各々一例ずつの遺伝子変異例が発見されたが、その発現頻度は低く、PPH の発症に BMPR2, ALK1 遺伝子異常の存在が強く関与する可能性が示唆された。

以前より PPH 例には弧発性 PPH と家族性 PPH 例が存在することが知られ、家族性 PPH の頻度は PPH の約 6-7% と報告されている。本所見は PPH の発症には遺伝性素因が存在する可能性を示唆し、これまで本症発症にかかわる遺伝子変異の研究が進められてきた。そして 1997 年に家族性 PPH 例の 2q31-32 染色体上にある特定の遺伝子が責任遺伝子である可能性が示され、2000 年にはこれが BMPR2 遺伝子であることが同定された。また 2001 年には弧発性 PPH 例にも BMPR2 遺伝子変異

が存在することが報告された。現在までの報告を総括すると家族性 PPH の 60%、弧発性 PPH では約 20% に本遺伝子変異が存在することが報告されている。一方二次性 PAH では PVOD で一例、食欲低下剤誘発 PAH で一例の BMPR2 遺伝子変異例が報告されているが、膠原病性肺高血圧症や先天性心疾患合併肺高血圧症における遺伝子異常は未だ報告されていない。

今回我々の結果は家族性 PPH の 100%、弧発性 PPH では 32.7% と、従来の報告に比して高頻度に BMPR2 遺伝子変異が存在した。

近年、遺伝性出血性毛細血管拡張症 (hereditary hemorrhagic telangiectasia、Osler-Rendu-Weber syndrome) の発症に ALK1 遺伝子変異が関与する可能性が示され、また極めて希であるが本症に高度肺高血圧症が合併することも報告されている。そこで今回我々が対象とした症例について、BMPR2 とともに ALK1 についても平行して遺伝子解析をおこなった。この結果、PPH 56 例中 3 例に、二次性 PAH では先天性心疾患合併肺高血圧症に 1 例の ALK1 変異が存在した。BMPR2 と ALK1 は同じ TGF β スーパーファミリーに属するサイトカインの血管内皮に存在する受容体で、細胞内では共通のシグナル伝達系を介して細胞の増殖・分化・アポトーシスなどを制御していることが知られている。今回我々の結果では BMPR2, ALK1 何れかの遺伝子変異を有する症例は、PPH で 56 例中 26 例 (46.4%) と極めて高率となり、細胞内 TGF- β シグナル伝達系の破綻が PPH 発症の大きな素因となっている可能性が示された。また二次性 PAH でも 44 例中 2 例 (4.5%) と低率ではあるが本伝達系の異常が肺高血圧発症に関与している可能性が示さ

れた。

PPHの発症に関与する可能性がある遺伝性素因として5-HTT遺伝子(17q11.2.)多型が報告されている。5-HTTにはL型, L/S型, S型の多型が存在し, L型細胞では肺血管平滑筋の細胞増殖が3倍亢進していることが示されているが, PPHではL型が65%に達し, 正常対象では27%であったことから5-HTT遺伝子多型もPPHの発症に関連すると考えられている。しかし我々の結果ではLL/L, LL/S, L型の総計はPPHで0.5%, 二次性PAHで0.2%に過ぎず, 本邦例では5-HTT遺伝子多型が発症に関与する可能性は低いと考えられた。

ACE遺伝子多型(染色体17q23)にはI型, I/D型, D型の多型が存在することが知られている。ACE遺伝子多型と肺高血圧との関係についても種々の報告があり, I/I型遺伝子型は肺動脈平均圧が高いとの報告がある。今回我々の結果では, PPHでも二次性PAHでも, I/I型遺伝子型はそれぞれ全体の46%, 45%を占め優位であった。

E. 結論

【結語】本邦PAH例の遺伝子解析を行った結果、PPH例では極めて高頻度にBMP2、ALK1の遺伝子変異が存在した。一方、二次性PAHでのBMP2、ALK1遺伝子変異例の頻度は少なかった。これは、PAHにおいて、PPHと二次性PAHの発症原因には根本的な差が存在する可能性を示すとともに、遺伝的素因の観点からPPHについては、その個々の例については発症要因に差異が存在する可能性を示す結果となった。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表: Morisaki H, Nakanishi N, Kyotani S, Takashima A, Tomoike H, Morisaki T. BMP2 mutations found in Japanese patients with familial and sporadic primary pulmonary hypertension. Hum Mutat. 2004; 23: 632.
2. 学会発表: 第77回AHA (American Heart Association), Nakanishi N, Kyotani S, Oya H, Nitoube J, Morisaki H, Morisaki T. Prevalence of Bone Morphogenetic Protein Receptor type II and Activin Receptor-Like Kinase-1 Gene Mutation in Pulmonary Arterial Hypertension.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担総合研究報告

肺高血圧症の重症度評価、併用療法、疫学

分担研究者 白土 邦男
東北大学大学院医学系研究科内科学病態学 教授

研究要旨

- a. 肺高血圧症（PH）患者にポジトロン CT を用いて、PH の肥大した右室心筋のグルコース利用と右室負荷の関連とエポプロステノール（PGI₂）持続静注療法の効果判定への有用性について検討した。PET は、非侵襲的に右室負荷を評価でき、肺高血圧症患者の重症度評価、治療効果の判定に有用であった。
- b. 高い肺血管抵抗と低い右室仕事量は肺動脈性高血圧症患者の重症度を反映する事が示唆される。
- c. PGI₂ と一酸化窒素の併用療法は原発性肺高血圧症の患者の血行動態において PGI₂ 単独投与に比べ、平均肺動脈圧、平均右房圧、肺血管抵抗を有意に低下させることを示した。慢性 PGI₂ 使用下での一酸化窒素の有用性は、単にこれら 2 薬剤の併用に止まらず様々な併用療法の臨床的可能性を示唆する。
- d. 人口動態調査に基づく肺血栓塞栓症の日内変動および季節変動を調査する。現在、人口動態調査目的外使用申請中である。

A. 研究目的

- a. ポジトロン CT（PET）を用いて、肺高血圧症（PH）患者の肥大した右室心筋のグルコース利用と右室負荷の関連につき検討した。さらに PET を用いて測定した右室心筋のグルコース利用が、PGI₂ 持続静注療法の効果判定に有用かどうか調べる。
- b. 治療経過中の肺動脈性高血圧症患者重症度に関連する血行動態的指標を検討すること。
- c. 臨床における PGI₂ と一酸化窒素（NO）の、作用の異なる 2 剤の併用における有用性を検討する。
- d. 肺血栓塞栓症の日内変動および季節変動に関して、本邦における大規模の調査はない。人口動態調査に基づくこれらの検討を行う。

B. 研究方法

- a. 右心カテーテル検査で肺高血圧症と診断された慢性右室圧負荷疾患患者 11 例で、PGI₂ 持続静注療法を導入していない症例を対象とした。心電図同期 PET を施行し、右室自由壁、心室中隔、左室自由壁の各領域における体重と投与量で補正した単位心筋あたりの FDG 取り込みの指標である standardized uptake value（SUV）を求めた。
- b. 肺動脈性高血圧症患者のカテーテル検査施行時（治療前、治療中）における血行動態指標と NYHA 分類、6 分歩行距離、BNP 等をレトロスペクティブに検討した。
- c. 原発性肺高血圧症 10 例を対象として、PGI₂ 慢性使用時の右心カテーテル法検査で、NO 急性負荷時の血行動態指標変化を調べた。
- d. 人口動態調査データ・ベースをも

とに、死亡場所、死亡時間、死亡日、発病から死亡までの時間およびこれより逆算した発症月を求める。また、気温および湿度との関係を分析することにより、本症の Circadian rhythm および Circannual rhythm に対するこれらの因子の影響を明らかにする。

C. 研究結果

a. 右室自由壁の補正 SUV は BNP、平均肺動脈圧、肺血管抵抗と有意な正相関を認めた。右室自由壁の補正 SUV は右室自由壁の壁厚と相関を認めなかった。PGI₂ 持続療法導入3ヵ月後の肺血管抵抗が30%以上改善した例（改善例）と改善しなかった例（非改善例）を比較すると、改善例では肺血管抵抗の改善に伴って右室の SUV が減少していたが、EBCT で求めた右室心筋重量には有意な変化を認めなかった。非改善例では右室の SUV も右室心筋重量も有意な変化を占めさなかった。

b. 心係数は NYHA I/II 度に比して III/IV 度で有意に低値であったが、平均肺動脈圧は両群間で差がなかった。総肺血管抵抗は III/IV 度で有意に高く、右室仕事量は III/IV 度で有意に低値であった。

c. PGI₂ 慢性使用下での NO 急性負荷により、平均肺動脈圧、平均右房圧、肺血管抵抗の有意な低下が認められ、心拍出量は有意に増加した。しかし、平均動脈圧、体血管抵抗に有意な変化を認めず、肺/体血管抵抗比は有意に減少した。

d. 現在、人口動態調査の目的外使用について申請中である。

D. 考察

a. 我々は、肺高血圧症患者において部分容積効果を補正した右室の補正 SUV が増加すること示した。右室の補

正 SUV が増加する理由として、心筋が利用するエネルギー基質が脂肪酸からグルコースへ変化する可能性、負荷によりエネルギー需要そのものが増大する可能性が考えられる。これまで我々は、大動脈狭窄ラットにおいて、肥大した左室心筋のグルコース利用の増加と脂肪酸利用の低下を報告している。圧負荷や容量負荷、あるいは心筋梗塞による左室肥大においてはグルコース利用が増大し、脂肪酸利用が減少するという報告があり、本研究でみられた右室における補正 SUV の増加は、心筋のエネルギー基質利用が脂肪酸からグルコースへのシフトの可能性を示唆する。

b. 初回診断時、および治療経過中のデータを用いた検討により、高い肺血管抵抗と低い右室仕事量は肺動脈性高血圧症患者の重症度を反映する事が示唆される。過去に行った初回診断時の右室心筋重量との関連では、右室心筋重量は右室仕事量と有意な正の相関を認めたが、高い全肺血管抵抗に比較して小さい右室心筋重量を示す症例が早期死亡例や、頻回に失神発作を繰り返した症例でみられた。今後、治療の選択や、あるいはフローラン持続静注治療からの離脱、また長期における右室機能保持を目的とした治療とその評価を検討する必要があると思われる。

c. PGI₂ の慢性投与下では、PGI₂ 使用前と比べて、血行動態諸量の有意な改善を認めていたが、NO 吸入の追加により、更なる血行動態の改善が得られた。肺動脈性肺高血圧症患者における併用療法対象の選択、併用療法の開始時期（初期からの併用あるいは効果のない場合の併用）、併用薬のベストの組み合わせなどが今後検討されるべき課題である。