

管内部の空気のCT値を用いてその患者の各スライスの各画素について補正を行った。気道病変の評価項目として、気管支壁厚(T)、気管支壁面積の気道全体に対する割合(WA%)、気道径(D)に対する気道壁厚の割合(T/D比)を求めた。肺気腫病変の評価は、各症例について上中下肺野3スライスずつを解析対象とし、CT画像上の肺野全体に占める肺野低吸収領域の割合(percentage of the low attenuation area; LAA%、閾値-960HU)を評価項目として用いた。

C. 研究結果

- a. 今回の結果は気腔の形に関するフラクタル次元(Dsp)は4週から7週にかけて増加傾向を示し、気腔の面積の分布に関するフラクタル次元(Dsn)は7週齢で有意に低下した。次に、2種類のモデルシミュレーションを行った。ランダムに肺胞破壊が起こるモデル2では、気腔の数が減少するにつれてLmが増加し、フラクタル次元Dsnは実測値にみられるような低下を示さないのに対し、均一な破壊プロセスが起こるモデル1では、実測値に合致する値を示した。
- b. LAA%の経年変化量は肺活量(VC)、FEV₁、一秒率(FEV₁/FVC)、予測一秒量に対する一秒量の比率(%FEV₁)と負の相関を認め、WA%の経年変化量はFEV₁/FVCのみと負の相関を認めた。FEV₁の経年変化量はWA%の経年変化量と負の相関を認めたが($r = -0.459$, $p = 0.003$)、FEV₁の経年変化量とLAA%の経年変化量とは有意な相関を認めなかった。

D. 考察

- a. フラクタル次元Dspは、4週から7週

にかけて増加傾向を示し、肺実質の破壊で気腔の形状が複雑さを増していることを示唆している。一方Dsnは有意に低下し、肺胞壁の破壊により隣り合わせの気腔が融合するため、小さな気腔の数が減少して、より大きな気腔の数が増加することを反映していると考えられる。2種類のシミュレーションモデルの結果は、Klothoマウスの肺気腫の形成が、局所的な肺実質の破壊を繰り返す不均一なプロセスによるというより、均一な破壊によるものであることが推測された。

フラクタル解析は、肺の組織学的な評価においても有用であり、形態学的な気腫の形成過程の解析に有力な手法であることが示唆された。

- b. 肺気腫病変の程度を示すLAA%は経年的に増加していくものと考えられたが、対象症例のうち11例でLAA%の経年的低下を認めた。FEV₁の改善を認めた15例では、いずれもWA%も低下しており、WA%が増加した10例では、いずれもFEV₁の経年的低下を認めた。この2群間で研究開始時の身体所見、呼吸機能、喫煙歴、治療内容、CTでの計測値に有意な差は認められなかった。本研究では、気道病変の進行と気流閉塞の進行が相関を持つことが示された。治療により気道病変が改善する群と、治療を行っても気道病変が進行する群がある可能性が示唆され、それが何に起因するのかは今後の課題と考えられた。

F. 研究発表

論文発表 (原著)

1. Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Minakuchi M, Tabuena RP, Chin K, Mio T, Ito Y, Muro S, Hirai T, Morita S, Fukuhara S, Mishima M. Relationship of airway

- wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. *Thorax*; 60:277-81, 2005.
- 2 . Muro S, Sato S, Nishioka Y, Ohara T, Sato A, Ogawa E, Hirai T, Hajiro T, Mishima M, Horstman DH, Snapper JR, Nakano Y. Airway wall thickening assessed by CT correlates with the responsiveness to bronchodilators in COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med*; Sup. A258, 2005.
 - 3 . Sato A, Hoshino Y, Hara T, Muro S, Nakamura H, Yodoi J and Mishima M. Thioredoxin ameliorates cigarette smoke-induced local and systemic inflammation in mice. International Conference of American Thoracic Society/American Lung Association (May 24, 2005, San Diego), 2005.
 - 4 . Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiro T, Mishima M. Exercise capacity deterioration in patients with COPD: longitudinal evaluation over 5 years. *Chest*; 128: 62-69, 2005.
 - 5 . Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiro T, Koyama H, Mishima M. Longitudinal changes in patient vs. physician-based outcome measures did not significantly correlate in asthma. *J Clin Epidemiol*; 58: 532-539, 2005.
 - 6 . Takahashi K, Chin K, Sumi K, Nakamura T, Matsumoto H, Niimi A, Ikai I, Mishima M. Resistant hepatic hydrothorax: a successful case with treatment by nCPAP. *Respir Med* ; 99:262-4,20005
 - 7 . Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishimabn M. Matrix Metalloproteinase-9 Promoter Polymorphism Associated with Upper Lung Dominant Emphysema; *Am J Respir Crit Care Med*.172:1398-1382,2005.
 - 8 . Ito I, Nagai S, Kitaichi M, Nicholson AG, Johkoh T, Noma S, Kim DS, Handa T, Izumi T, Mishima M. Pulmonary manifestations of primary Sjogren's syndrome: a clinical, radiologic, and pathologic study. *Am J Respir Crit Care Med*. Mar 15; 171(6):632-8.,2005”
 - 9 . Isozumi R, Ito Y, Ito I, Osawa M, Hirai T, Takakura S, Iinuma Y, Ichiyama S, Tateda K, Yamaguchi K, Mishima M. An outbreak of Legionella pneumonia originating from a cooling tower; *Scand J Infect Dis.* ;37(10):709-11,2005
 10. Niimi A, Torrego A, Nicholson AG, Cosio BG, Oates TB, Chung KF. Nature of airway inflammation and remodeling in chronic cough. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:565-70
 11. Niimi A, Kihara Y, Sumita Y, Okano Y, Tambara K, Fujita M:Cough reflex by ventricular premature contractions.*Int Heart J*, in pres
 12. Sato S, T Hirai, Muro S, Ohara T, Mishima M. Time course of Airway resistance after inhaled bronchodilator in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med*; Sup. A654, 2005.
 13. Nakano Y, Wong JC, de Jong PA, Buzatu L, Nagao T, Coxson HO, Elliott WM, Hogg JC, Pare PD: The Prediction of Small Airway Dimensions Using Computed Tomography. *Am J Respir Crit Care Med*; 171:142-146, 2005

14. Nakano Y, Saita S, Eguchi K, Moriyama N, Sasagawa M, Niki N. Three-dimensional analysis method for quantifying emphysema using multislice computed tomography. Proc Am Thorac Soc; 2: A257, 2005.
15. 三嶋理晃、中野恭幸、西村浩一、新美彰男、平井豊博、室繁郎、小賀徹、星野勇馬、中村肇、淀井淳司. 2005年度（第42回）ベルツ賞1等賞受賞論文：COPD病態解析と治療法開発、治療評価への挑戦－CT画像解析、チオレドキシリン創薬、アウトカムスタディを通して－

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告

- 1) LAM細胞の初代培養と細胞生物学的特性の検討
- 2) SMP30は加齢及び喫煙に伴う酸化ストレスからマウス肺を保護する

分担研究者 瀬山邦明
順天堂大学医学部呼吸器内科 講師

研究要旨

- 1) リンパ脈管筋腫症（LAM）は、LAM細胞の増殖と転移により生じる疾患であり、病態の理解や治療法の開発にはLAM細胞の生物学的特徴を検討することが必要である。剖検肺、生検肺・リンパ節組織、乳糜胸腹水中のLAM細胞クラスターを材料としてLAM細胞の初代培養を試みた。その結果、複数のLAM症例において大型紡錘形細胞、小型星芒状～紡錘形細胞の少なくとも2種類の細胞を分離することが可能であった。遺伝子解析や増殖因子・増殖阻害因子に対する反応性を検討した結果、両細胞に相違が認められ、LAMの病変は形態学的・機能的の異なる複数種類の細胞より成り立つ可能性が示唆された。
- 2) 高齢者疾患との関連が示唆される加齢指標蛋白質（Senescence Marker Protein-30; SMP30）に着目し、SMP30ノックアウト（SMP30Y/-）マウスの加齢に伴う肺カルボニルタンパク質の変化、慢性喫煙負荷による酸化ストレスの影響と肺病理変化を検討した。SMP30Y/-マウス肺では加齢に伴いカルボニル化タンパク質が優に増加し、喫煙により容易に肺気腫を生じた。SMP30は酸化ストレスから肺を保護し肺気腫発生に防御的に作用すると考えられた。

A. 研究目的

- 1) リンパ脈管筋腫症Lymphangiomyomatosis（LAM）は、LAM細胞の増殖と転移により肺、体軸系リンパ組織に病変が進展する疾患である。LAMの病態を理解するにはLAM細胞の細胞生物学的特徴を明らかにすることが必要であり、臨床検体からLAM細胞の初代培養とその増殖特性の検討を試みた。
- 2) 加齢指標蛋白質30（Senescence Marker Protein-30; SMP30）は、加齢に伴い減少するタンパク質として同定され、その後、細胞庇護機能を有する多機能タンパク質であることが報告され、高齢者疾患における生理学的・病理学的

役割が期待される。COPDの発症や病態における役割を検討するため、SMP30ノックアウトマウス（SMP30Y/-マウス）に喫煙負荷を与え肺の病理変化を検討した。

B. 研究方法

- 1) 剖検肺組織、生検肺組織・リンパ節組織、肺移植時の摘出肺組織、乳糜胸水中のLAM cell cluster、等々を用いoutgrowth法によりLAM細胞を試みた。細胞は3～5継代の時点で免疫染色、細胞増殖能の評価、TSC1およびTSC2近傍のDNAマイクロサテライトマーカーによるLOHの解析、を行った。

- 2) SMP30Y/−マウス及び野生型マウス (SMP30Y/+、正常対照) を用い、タバコ煙負荷 (ノンフィルターピースを用いて2.5% 希釈タバコ煙を30分間/日、週5日、8週間) 前後での平均肺胞径 (MLI)、肺胞破壊指数 (DI)、肺組織カルボニル化蛋白質定量、肺組織中の過酸化脂質量の測定 (マロンジアルデヒド (MDA) の測定)、BALF中総グルタチオンの測定、を行った。

C. 研究結果

- 1) LAM病変組織から培養により、大型～中型の紡錘形細胞、小型の星芒状～紡錘形の細胞、の2～3種類の形態を示す細胞が得られた。大型の紡錘形細胞は α -smooth muscle actin (SMA) 陽性、HMB45も弱陽性、TSC2 LOH陽性、細胞増殖のスピードは遅く、継代とともに増殖は低下し静止期を迎えるようであった。一方、小型の、星芒状～紡錘形細胞は増殖が比較的早く、長期間継代が可能であるが、SMA陰性のものがほとんどで、また、HMB45もほぼ陰性、TSC2 LOH陰性であった。増殖因子としてestradiol-17 β 、増殖阻害因子としてrapamycin、AG1296 (PDGF受容体阻害剤)、AG1478 (EGFR阻害剤) を添加して大型紡錘形細胞と小型紡錘形細胞の増殖特性を比較検討したところ、rapamycinによる増殖抑制は大型細胞で顕著であるが小型細胞では抑制効果が弱かった。estradiol-17 β では増殖は刺激されなかった。PDGFR阻害剤であるAG1296、およびEGFR阻害剤であるAG1478では、高濃度で増殖が抑制されたが、AG1478でより顕著な増殖抑制効果が認められた。
- 2) SMP30Y/−マウスでは野生型マウスに比べて、加齢に伴い肺カルボニル蛋白質が増加し、タバコ煙曝露によりさ

らに増加した。SMP30Y/−マウスでは、曝露によってMLIが23.3%増加し、DIは10%以上と有意な肺胞破壊を認め肺気腫が誘導されたが、対照SMP30Y/+マウスでは肺気腫は生じなかった。肺組織のカルボニル化蛋白質は、両群マウスでタバコ煙曝露により増加する傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。しかし、タバコ煙曝露群を比較するとSMP30Y/−マウスはSMP30Y/+マウスに比べて有意に高値であった。肺組織の過酸化脂質はSMP30Y/+マウスではタバコ煙曝露による有意な変化はなかったが、SMP30Y/−マウスで曝露後有意に上昇していた。

D. 考察

- 1) LAM細胞にはcellular heterogeneity、すなわち、形態学的に異なる複数種のLAM細胞が存在することが古くから報告されていた。①比較的大型で紡錘形の細胞 (large spindle-shaped cells)、②小さくて、やや細長い細胞 (small, slightly elongated cells)、③大型で、類上皮型細胞 (large epithelioid cells)、の3種類が存在し、これらの細胞のMatrix metalloproteinases (MMPs) やTIMPに対する免疫染色結果が異なることから、機能的にも異なる細胞種であることを示唆されていた。一方、これらは独立した別個の細胞集団ではなく、LAM細胞の連続した形態スペクトラムの一時期をみているに過ぎないとする考え方も報告されている。最近、腎血管筋脂肪腫から細胞培養を試み、TSC2 LOHを示し平滑筋細胞様の形態を示すSMA陽性細胞 (A+ cell) とTSC2 LOHはないがkeratin 8/18陽性の上皮様細胞 (R+ cell)、の2種類を分離し、EGF受容体とIGF-I受容体を介したシグナ

ルに依存して生存することが報告されている。我々の成績はLAM細胞のcellular heterogeneityを支持する結果と思われ、今後、LAMの病態における役割を明らかにする必要がある。

- 2) 肺カルボニル化タンパク質の測定により、生物学的老化因子を欠損するSMP30Y/−マウスでは野生型マウスに比べて生理的状況下での肺酸化ストレスが亢進し、また、喫煙による外的酸化ストレスの負荷に対し感受性が亢進していると考えられた。また、8週間という短期間のタバコ煙曝露で肺気腫が生じることから、タバコ煙に対する感受性も亢進していると考えられる。SMP30Y/−マウスの肝細胞ではアポトーシスに対する感受性が亢進し、脂質代謝異常を生じるため、SMP30Y/−マウスが喫煙により容易に肺気腫を発症するメカニズムとしては、酸化ストレスの増大のみならず、今後、炎症、アポトーシスの視点での解析が必要である。最近、肺細胞のアポトーシスではセラミドが重要な役割を担うことが報告されたため、今後、SMP30Y/−マウスでのセラミド代謝動態の検討が必要である。

E. 結 論

- 1) LAM細胞には形態学的、機能的視点から複数の細胞種が存在して病変を形成する可能性が示唆される。
- 2) SMP30Y/−マウスは慢性タバコ煙曝露による肺気腫の病態解析に有用なモデルマウスであることが示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kasagi S, Seyama K, Mori H, Souma S, Sato T, Akiyoshi T, Suganuma H, Fukuchi Y. Tomato juice prevents from developing emphysema induced by chronic exposure to tobacco smoke in senescence-accelerated mouse P1 strain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Oct 7; [Epub ahead of print]
2. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Souma S, Kashiwagi S, Hebisawa A, Sato T, Kubo H, Gomi K, Shibuya K, Fukuchi Y, Suda K. Lymphangiogenesis—Mediated Shedding of LAM Cell Clusters as a Mechanism for Dissemination in Lymphangiomyomatosis. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29: 1356–1366.
3. 瀬山邦明：質疑応答Q&A「肺リンパ脈管筋腫症の診断、特に画像上の特徴を」*日本医事新報* 2005; No.4248: 89–90.
4. 瀬山邦明：LAMの遺伝子異常と病態とのかかわりをみる．*分子呼吸器病* 2005; 9: 31–37.
5. 丸山直記、瀬山邦明、佐藤匡：肺の老化の分子機構．*呼吸* 2005; 24: 741–745.
6. 佐藤輝彦、熊坂利夫、井上恵美、郡司陽子、瀬山邦明：リンパ脈管筋腫症（LAM）．*呼吸と循環* 2005; 53: 719–727.
7. 井上恵美、瀬山邦明、佐藤輝彦、熊坂利夫：COPDとLAM—診断上の問題

- 点一．化学療法の領域 2005 ; 21 : 2005
年増刊号 : 96-104.
- 8 . 佐藤輝彦, 井上恵美, 瀬山邦明 : 講座
「画像診断」リンパ脈管筋腫症 - 初
期 - . 呼吸 2005 ; 24 : 315-319.
- 9 . 佐藤輝彦, 井上恵美, 瀬山邦明 : 講座
「画像診断」リンパ脈管筋腫症 - 進
行期 - . 呼吸 2005 ; 24 : 320-324.
- 10 . 森貴紀, 瀬山邦明, 石神昭人, 丸山
直記, 福地義之助. Senescence marker
protein-30ノックアウトマウス. 分
子呼吸器病 2005 ; 9 : 55-60.
- 2 . 学会発表
- 1 . Yoshimi K, Ueki J, Seyama K, Aizawa
H, Ichinose M, Kuriyama T, Kono
N, Nagai A, Nagase T, Nishimura
M, Mishima M, Sasaki H, Horie T,
Fukuchi Y. High prevalence of air
-flow limitation among pedestrians
in metropolitan Tokyo. European
Respiratory Society Annual Congress,
Copenhagen, Denmark, September
19, 2005.
- 2 . Kasagi S, Seyama K, Mori H, Souma
S, Suganuma H, Fukuchi Y. Lycopene
prevents from developing alveolar
space enlargement induced by chronic
exposure to tobacco smoke in senes-
cence-accelerated mouse P1 strain.
Annual meeting of American Thoracic
Society, San Diego, USA, May 22,
2005.
- 3 . Hayashida M, Fujimoto K, Kubo K,
Seyama K, Inoue Y. The epidemiology
of lymphangiomyomatosis: A
nationwide mass study in Japan.
Annual meeting of American Thoracic
Society, San Diego, USA, May 23,
2005.
- 4 . Inoue E, Seyama K, Shiota T, Ihata
M, Miyata F, Fukuchi Y. The effect
of bronchodilator inhalation in
patients with lymphangiomyoma-
tosis. Annual meeting of American
Thoracic Society, San Diego, USA,
May 23, 2005.
- 5 . Seyama K, Kumasaka T, Souma S,
Sato T, Kurihara M, Mitani K,
Kasagi S, Suda K, Fukuchi Y. Vas-
cular endothelial growth factor-D
is elevated in serum of patients with
lymphangiomyomatosis. Annual
meeting of American Thoracic Society,
San Diego, USA, May 23, 2005.
- 6 . 高濱由紀子, 深澤伸慈, 鈴木勉, 瀬山
邦明, 福地義之助 : IPVを在宅導入し
た慢性気道感染症の一例. 第15回日
本呼吸管理学会総会. 仙台, 2005年
7月29, 30日.
- 7 . 佐藤 匡, 石神昭人, 丸山直記, 児玉
裕三, 瀬山邦明, 福地義之助 : SMP3
0ノックアウトマウスの肺におけるカ
ルボニル化蛋白質量の加齢変化. 第4
7回日本老年医学会学術集会. 2005年
6月東京
- 8 . 瀬山邦明 : 教育講演16「肺リンパ
脈管筋腫症 - ハマルトからラムへの展
開 -」第45回日本呼吸器学会学術講
演会, 千葉, 2005年4月14-16日.
- 9 . Kasagi S, Seyama K, Mori H, Souma
S, Suganuma H, Fukuchi Y. Lycopene
prevents from developing alveolar
space enlargement induced by chronic
exposure to tobacco smoke in senes-

cence-accelerated mouse P1 strain.
第45回日本呼吸器学会学術講演会、
千葉、2005年4月14-16日。

10. 児玉裕三、瀬山邦明、森貴紀、笠木
聡、吉見格、佐藤匡、守博昭、植木純、
福地義之助：慢性閉塞性肺疾患患者管
理におけるGOLDガイドラインのアジ
ア太平洋地域の活用状況の検討。第45
回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、
2005年4月14-16日。

H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得：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） 分担研究報告

マイクロサンプリング法により採取したCOPD患者気道被覆液ならびに
上皮細胞中蛋白のプロテオーム解析

分担研究者 石坂 彰 敏
慶應義塾大学医学部呼吸器内科 教授

研究要旨

COPDの気道炎症のメカニズムは複雑で臨床上有用なバイオマーカーも限られており、炎症をターゲットとした有効な治療薬も開発されていない。本研究ではマイクロサンプリングプローブを用い、約100例のCOPD患者末梢気道より気道被覆液ならびに上皮細胞を採取し、プロテオーム解析を行う。蛋白発現パターンとスパイロメトリー、HRCT、喫煙歴、臨床症状との関連を解析するとともに、対照群（喫煙者ならびに非喫煙者）との比較を行い、COPDの病態との関連を検討する。全例でプロテインチップを用いた解析を行い蛋白発現パターンを比較し、重要と判断された蛋白を同定し、COPDの病態への関与とバイオマーカーとしての有用性を検証する予定である。これまでの検討により、マイクロサンプリングにより得た検体を用い、プロテインチップによる蛋白発現パターンの比較が可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

COPDの病因として酸化ストレス、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡、アポトーシスなどの関与が考えられている。しかしながら、気道炎症のメカニズムは複雑で臨床上有用なバイオマーカーも限られている。炎症をターゲットとした有効な治療薬の開発が望まれる。また、COPDには気道病変優位型、気腫優位型などの異なる病型が存在すると考えられている。本研究ではマイクロサンプリングプローブを用い、COPD患者末梢気道より気道被覆液ならびに上皮細胞を採取し、プロテオーム解析を行う。蛋白発現パターンと臨床所見との関連を解析し、喫煙の影響ならびにCOPDの病態との関連を検討する。これらの解析により重要と判断された蛋白を同定し、COPDの病態への関与とバイオマーカーとしての有用性を検証する。将来的には本研究の成果が、COPDの新規治療薬の開発につ

ながることが期待される。

B. 研究方法

対象はCOPD患者約100名と対照喫煙者ならびに非喫煙者それぞれ約30名。気管支鏡下に末梢気道より気道被覆液ならびに上皮細胞を採取し、プロテオーム解析を行う。蛋白発現パターンとスパイロメトリー、HRCT、喫煙歴、臨床症状との関連を解析するとともに、対照群（喫煙者ならびに非喫煙者）との比較を行い、COPDの病態との関連を検討する。全例でプロテインチップ(SELDI-TOF-MS)を用いた解析を行い蛋白発現パターン解析を行い、選択した症例においては2次元電気泳動(2D-DIGE)も施行予定である。これらの解析により重要と判断された蛋白を同定し、COPDの病態への関与とバイオマーカーとしての有用性を検証する。

マイクロサンプリング法は非侵襲的な手

技であるが、サンプリングは事前に患者への十分な説明を行い、同意を得た上で行うものとする。本研究プロトコールは慶應義塾大学医学部倫理委員会において承認済みである。

C. 研究結果

現在までにCOPD患者3名、喫煙対照者2名、非喫煙者2名の気道被覆液を用いた予備実験を行い、以下のことが明らかとなった。

1、気管支鏡下サンプリングの注意点

気道被覆液の採取に際しては血液の混入を防ぐことが重要である。このため、採取部位はB8またはB9の末梢に統一すべきである。

同定には比較的多量の蛋白を要するため、プロテインチップ用の検体は最小限とし、サンプルのロスを防ぐ必要がある。プロテインチップ用には5-10倍希釈した気道被覆液がスポットあたり2 μ lあれば十分である。炎症細胞分画の判定と中枢気道からのサンプリングは断念し、末梢気道から3本のプローブで気道被覆液ならびに上皮細胞を採取することとする。

2、気道被覆液の精製

気道被覆液からアルブミン、免疫グロブリンなどを除去する操作は蛋白のロスを伴うこともあり、またプロテインチップの解析結果にも大きな変化がみられなかったことから、行わないこととした。

3、プロテインチップの選定

陰イオン交換、陽イオン交換チップを用いた場合、それぞれ異なった蛋白のピークが数十ずつ検出された。そのうちのいくつかは、COPD、喫煙者、非喫煙者の間で異なっていた。各チップで検出される蛋白の数は多くとも数十程度であり、可能な限り網羅的な検索を行うため、今後はQ10, CM10, H4, NP20, IMAC30の5種類のチップを使用する予定である。

4、血清蛋白の解析

血液混入の補正、気道被覆液との対比のため、対象症例からは血清もサンプリングを行う。

5、気道上皮細胞からの蛋白抽出

細胞成分のサイトスピン標本の観察からは、プロテインチップ解析に必要な 10^3 以上の細胞は採取可能と考えられた。Lysis Bufferの調整と蛋白抽出液を用いた解析条件について、現在検討中である。

6、蛋白同定法の選択

蛋白発現パターンの検討から絞り込んだ蛋白の同定方法は多数報告されている。HPLC、2次元電気泳動などを経て、MS/MS解析を行うが、ターゲットピークの分子量や発現強度等も考慮し、同定方法を選択する予定である。

D. 考 察

COPDの気道炎症のメカニズムは複雑で有用なバイオマーカーも限られており、炎症をターゲットとした有効な治療薬も開発されていない。また、COPDには異なる病型が存在するがその違いの原因となる分子は明らかになっていない。したがって、COPDは近年普及しつつあるプロテオーム解析によるバイオマーカー研究の格好のターゲットと考えられる。しかしながら、COPD患者は低肺機能であるため、気管支肺胞洗浄や肺生検でサンプリングを行うことは困難である。近年分担者らが開発したマイクロサンプリングプローブは、非侵襲的に任意の部位から気道被覆液の採取が可能である。この方法を応用し、COPDにおける気流制限の最大の原因と考えられている末梢気道病変の炎症メカニズムを解明することを本研究では目指している。

これまでの予備実験の結果、マイクロサンプリングプローブにより採取した気道被覆液のごく一部を用いるだけでプロテインチップによる解析が可能であることが判明した。一方で、これまでの報告にもあるように、プロテインチップで検出される蛋白

は分子量5万以下の低分子がほとんどであり、その数も多くない（おおよそ100種類以下）ことが示された。この欠点を補うため、複数の異なる性質のチップを用いることと、一部の症例では他の方法を併用する必要がありと考えられた。

今後は統一したプロトコールに基づき、多数の症例での蛋白発現と臨床指標の関連について解析し、COPDの診断と治療に有用な蛋白の同定を行う予定である。

E. 結 論

近年開発したマイクロサンプリングプローブで採取したCOPD患者気道被覆液を用い、プロテインチップによる蛋白発現パターンの比較が可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

現在のところなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Minematsu, N., Nakamura, H., Furuuchi, M., Nakajima, T., Takahashi, S., Tateno, H., Ishizaka, A. Limitation of cigarette consumption by CYP2A6*4, *7 and *9 polymorphisms. *Eur. Respir.* 27:1-4, 2005.

渡辺真純、石坂彰敏、仲村秀俊、神谷一徳、神山育男、佐和貞治、小林紘一：末梢小型肺腺癌の診断における気管支鏡下マイクロサンプリング法の意義 腫瘍マーカー解析からプロテオーム解析へ 気管支学 27:296-301, 2005.

Ueno, H., Matsuda, T., Hashimoto, S., Amaya, F., Kitamura, Y., Tanaka, M., Kobayashi, A., Maruyama, Y., Yamada, S., Hasegawa, N.,

Soejima, J., Koh, H., Ishizaka, A. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170: 1310-1316.

石坂彰敏、田坂定智：経気管支鏡的マイクロサンプリング法による気道・肺胞の病態の評価 呼吸2004、23：623-630。

2. 学会発表

仲村秀俊、中島隆裕、石坂彰敏：肺の炎症と細胞応答、その制御 炎症性肺疾患の病態 気道被覆液中の分子（日本呼吸器学会総会、幕張、2005、4月）。

仲村秀俊、中島隆裕、渡辺真純、石坂彰敏：気道の炎症マーカー マイクロサンプリング法によるCOPD患者気道における炎症マーカーの検討（日本呼吸器内視鏡学会総会、東京、2005、6月）。

渡辺真純、石坂彰敏、長谷川直樹、仲村秀俊、神谷一徳、神山育男、小林紘一：気道をめぐる新しい診断システムの成績と評価 気管支鏡下マイクロサンプリング法による肺上皮被覆液の解析 各種病態への応用（日本呼吸器内視鏡学会総会、東京、2005、6月）。

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）
分担研究報告

呼吸不全に関する基礎・臨床研究：COPDを中心に

分担研究者 長 瀬 隆 英
東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、呼吸不全を呈する呼吸器疾患であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの疾患の病態機序・治療標的は未だに不明であるため、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、COPDを中心として、1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究、および 2) 発生工学を駆使した基礎研究、を遂行することにより、呼吸不全を呈する難治性肺疾患の病態解明、治療標的の同定、および新治療法の開発を目指す。その結果、以下の新知見が得られた。

- 1) 白血球遊走に関与するロイコトリエンB4 (LTB4) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、LTB4受容体遺伝子ノックアウトマウスのホモ接合体・生存個体が得られた。
- 2) LTB4受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析により、気管支喘息モデルにおける気道過敏性、炎症細胞浸潤にLTB4受容体が関与することが示唆された。
- 3) 血流制限下レジスタンストレーニング（加圧トレーニング）は、特殊なベルトを四肢の付け根に巻いて適度に血流を制限した状態でレジスタンストレーニングを行う方法で、この加圧トレーニングにより健常者において著明な筋肥大と筋力増大を認めることが知られる。COPD患者を中心として、呼吸器疾患患者の呼吸リハビリテーションにおける加圧トレーニング運動療法のプロトコルが検討された。

以上の知見は、呼吸不全を呈する難治性の呼吸器系疾患に対する新しい治療薬・治療法開発の実現化に寄与することが期待される。

研究協力者

横溝 岳彦・

東京大学大学院医学系研究科助教授

石井 聡・

東京大学大学院医学系研究科講師

永田 泰自・

東京大学医学部附属病院特任講師

A. 研究目的

COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、呼吸不全を呈する呼吸器疾患であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの疾患の病態機序・治療標的は未だに不明であるため、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、COPDを中心として、1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究、および 2) 発生工学を駆使した基礎研究、を遂行することにより、呼吸不全を呈する難治性

肺疾患の病態解明、治療標的の同定、および新治療法の開発を目指す。

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究:

COPDに対するリハビリテーションに関しては、近年、その有効性を支持するエビデンスが集積しつつある。血流制限下レジスタンストレーニング（登録商標名：加圧トレーニング）は、特殊なベルトを四肢の付け根に巻いて適度に血流を制限した状態でレジスタンストレーニングを行う方法で、この加圧トレーニングにより健常者において著明な筋肥大と筋力増大を認めることが知られる。

本研究では、COPD患者を中心として、呼吸器疾患患者の呼吸リハビリテーションにおける加圧トレーニング運動療法の効果、副次的な効果、副作用等を検討する。

2) 発生工学を駆使した基礎研究:

COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、呼吸不全を呈する呼吸器疾患である。これらの肺疾患発症に関しては、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられ、 $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-8$ 等のサイトカインなどが関与している可能性が報告されている。しかし、サイトカイン以外のメディエーターとの関連については、十分な検討がなされていない。また、治療の標的が不明確であるため、有効な治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている脂質性メディエーターなどに着目し、呼吸不全を呈する呼吸器疾患発症との関連を探索する。

脂質性メディエーターであるプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどはエイコサノイドと総称され、アラキドン酸を起点とする代謝経路の代謝産物である。アラキドン酸は、炭素数20よりなる構造をもち、生体ではリン脂質から細

胞質型ホスホリパーゼA₂(cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂)によって切り出される。この際に、同時にリゾPAF(lyso-PAF)が生成され、リゾPAFから血小板活性化因子(platelet-activating factor, PAF)が作られる。アラキドン酸は、図1に示すように、アラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て様々なエイコサノイドを生成する。その2つの大きな経路が、シクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase, COX)系および、5-リポキシゲナーゼ(5-lipoxygenase, 5-LO)系である。プロスタグランジン、トロンボキサンはシクロオキシゲナーゼ系の代謝物であり、ロイコトリエンは5-リポキシゲナーゼ系の代謝物である。

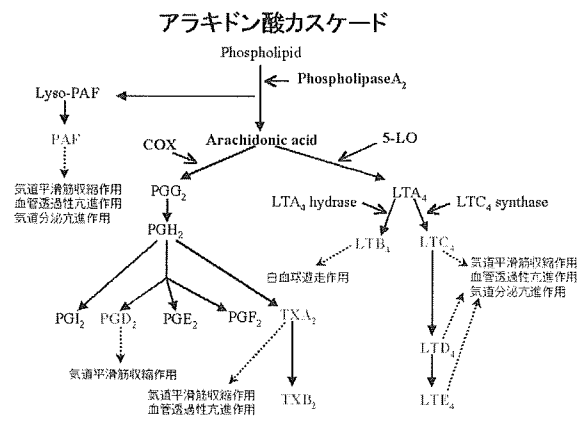


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

アラキドン酸カスケードの代謝産物であるエイコサノイドは、ごく微量で多彩な生理活性作用を呈するのが特徴である。呼吸器系においても、エイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが示唆されている。例えば気管支喘息は、気道平滑筋収縮、血管透過性亢進、血管拡張等による気管支収縮を主体とする病態であり、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられるが、近年、特にトロンボキサン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドが重要な発症因子とされ、有効な治療標的となりつ

つある。

PAFおよびエイコサノイドは、その生理活性作用より、炎症性肺疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が推察されるが、未だに検証されていない。本研究では、発生工学的手法を応用し、脂質性メディエーターの炎症性肺疾患発症機序における重要性について検討する。特に、COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などにおける、PAFおよびエイコサノイド関連遺伝子の意義を明らかにする。さらに、白血球遊走に関与するロイコトリエンB₄ (LTB₄) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、解析・検討を行う。以上を総括して、治療の標的を明確にし、有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的とする。

B. 研究方法

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究:

COPDに対する血流制限下レジスタンストレーニング（登録商標名：加圧トレーニング）の応用について、今後2年間で以下のプロトコルを予定する。

本研究では、COPD患者を中心として、呼吸器疾患患者の呼吸リハビリテーションにおける加圧トレーニング運動療法の効果、副次的な効果、副作用等を検討する。測定項目として、運動療法開始前および終了後に、呼吸困難度、呼吸機能、運動耐容能、四肢の筋力・筋量を測定する。またGHなどの各種ホルモン、乳酸などの血中濃度を測定し、治療効果の判定などに用いる。

2) 発生工学を駆使した基礎研究:

<LTB₄受容体遺伝子

ノックアウトマウスの作成>

高齢者炎症性肺疾患において、白血球遊走・賦活化は極めて重要な位置を占めると考えられる。本研究では、白血球遊走に関与するロイコトリエンB₄ (LTB₄) 受容体

の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、その機能解析を行う。

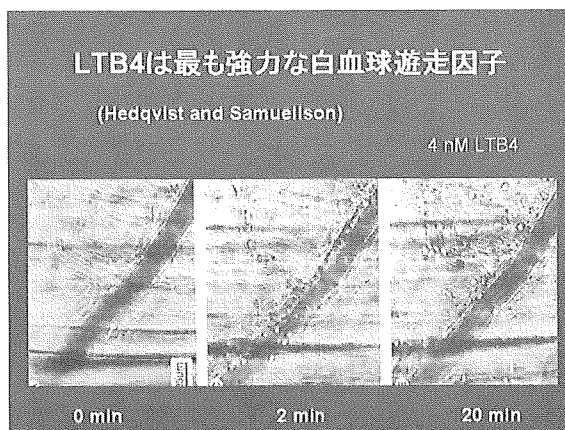


図2 ロイコトリエンB₄ (LTB₄) 投与により白血球遊走が生じる様子 (1982年、SamuelssonがNobel Lectureで提示)。

1997年、東京大学の横溝らは、世界ではじめてロイコトリエンB₄ (LTB₄) 受容体のクローニングに成功し(Nature 1997)した。そこで本研究グループは、LTB₄受容体遺伝子ノックアウトマウス（以下LTB₄R-KOマウス）の作成に着手した。

本年度は発生工学的技術を用いてLTB₄R-KOマウスを完成させ、LTB₄受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索することを目指した。

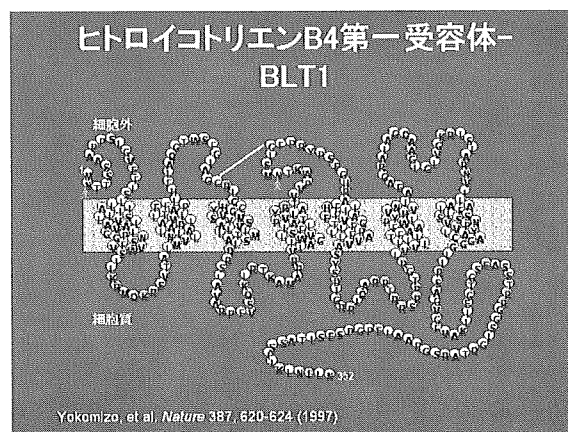


図3 ロイコトリエンB₄ (LTB₄) 第1受容体 (BLT1) の構造。

＜炎症性肺疾患におけるLTB₄遺伝子発現の関与＞ 炎症性肺疾患モデルとして、COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息の動物モデルを用いる(T.Nagase, J.Clin.Invest. 1999; T.Nagase, Nature Immunology 2000)。マウス各群に、塩酸気管内投与 (ARDS)、プレオマイシン気管内投与 (特発性間質性肺炎)、抗原感作 (気管支喘息) などの処置を行い、生理学的、生化学的、免疫組織化学的、分子生物学的検討により、LTB₄遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加える。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究における危険の排除、説明と理解 (インフォームドコンセント) について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号) に基づき、研究を進める。

臨床研究については、研究課題「呼吸リハビリテーションにおける血流制限下レジスタンストレーニングの有効性に関する検討」として、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会にて審議のうえ許可された。

動物実験に際しては、東京大学医学部動物実験施設内規に則して、動物愛護への配慮を最大限に行った。また本研究で行う遺伝子組換え実験は、平成16年9月10日の東京大学医学部組換えDNA実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエーター受容体、合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」、および呼吸器内科学講座「テトラサイクリン誘導性siRNAベクターを用いたDNAメチルトランスフェラーゼの抑制及びメチル化の変化に関する解析」に

含まれており、適切な拡散防止措置がとられる。

C. 研究結果

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究:

COPDに対する血流制限下レジスタンストレーニング (登録商標名: 加圧トレーニング) の応用について、今年度は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会へのプロトコル申請および認証を獲得し、パイロット的にプロトコルの検証を実施した。

本研究では、COPD患者を中心として、呼吸器疾患患者の呼吸リハビリテーションにおける加圧トレーニング運動療法の効果、副次的な効果、副作用等を検討するものであり、症例集積のための広報を行っている。

2) 発生工学を駆使した基礎研究:

＜LTB₄R-KOマウスの作成＞

LTB₄R-KOマウスの作成プロセスは順調に進展した。キメラマウスの中で、germlineにノックアウトDNAコンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体LTB₄Rノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体LTB₄Rノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、

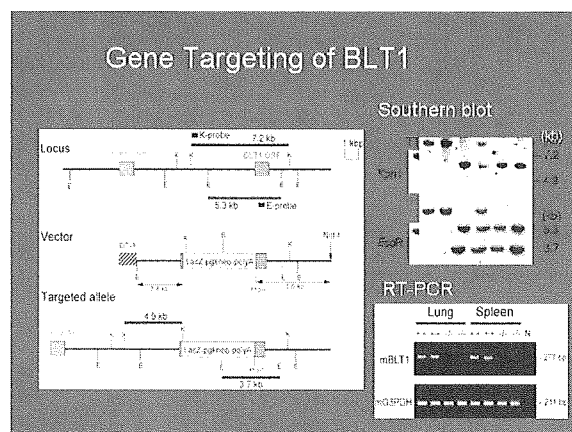


図4 ロイコトリエンB₄ (LTB₄) 第1受容体 (BLT1) ノックアウトマウスの作成。

生育も野生型マウスと差異を認めなかった。

確立されたBLT1ノックアウトマウス（ホモ接合体）と、そのlittermateコントロールの野生型マウスを用いて、気管支喘息モデルにおける検討を行った。アレルギー性気管支喘息モデルとして、ovalbuminによる抗原感作・吸入負荷を施行した。その結果、LTB₄ノックアウトマウスでは、感作されたノックアウトマウス群は、野生型群と比べてMCh気道反応性が低下していることが示唆された。BALF解析において、ノックアウトマウス群ではeosinophiliaが著明に軽減していることが認められた。BALF中のTh2サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減していた。

Reduced Methacholine Response in BLT1-null Mice

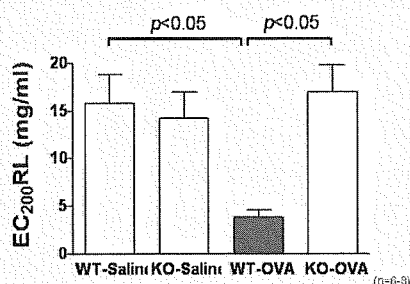


図5 Methacholine (MCh) 気道反応性。OA感作・野生型群で認められる気道過敏性が、OA感作・BLT1ノックアウトマウス群では有意に抑制されている。

Reduced Eosinophil Accumulation in BLT1-null Mice

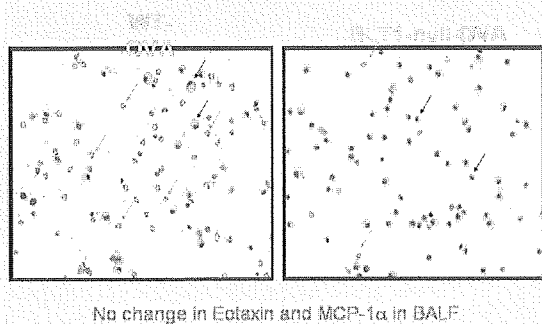


図6 BALF中の細胞。OA感作・野生型群では好酸球が著明。OA感作・BLT1ノックアウトマウス群では好酸球を認めるが少ない。

Inflammatory Cells in BALF

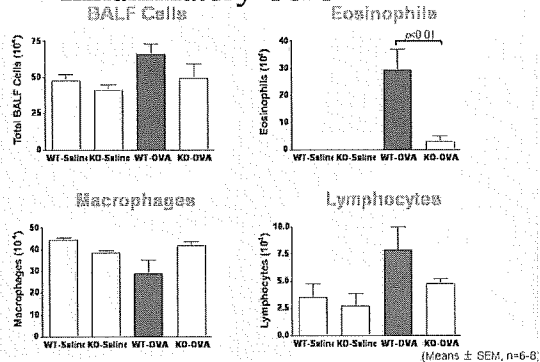


図7 BALF中の白血球細胞分画。OA感作・野生型群で認められる好酸球浸潤が、OA感作・BLT1ノックアウトマウス群では抑制されている。

Th2 Cytokines Are Reduced in BALF

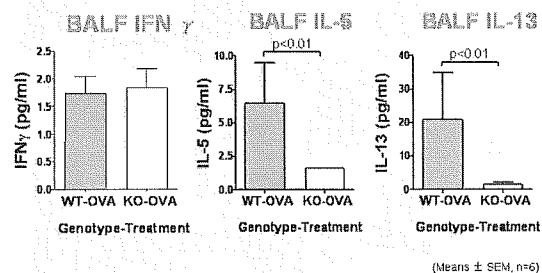


図8 Th2サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減。

D. 考 察

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究:

Global initiative for obstructive lung disease (GOLD)によれば、COPDに対するリハビリテーションに関して、その有効性を支持すると報告されている。

加圧筋力トレーニングとは、四肢を圧迫することにより血流を制限しながら行うトレーニングである。これは低負荷かつ短時間で筋肥大と筋力増強効果が得られるという、日本で開発された技術である。

スポーツ医学の分野ではすでに認知され、スポーツ外傷などのリハビリテーションに

応用され始めている。



図9 加圧トレーニングによるリハビリテーションの一例



図10 慢性心不全に対する加圧トレーニングによるリハビリテーションの一例

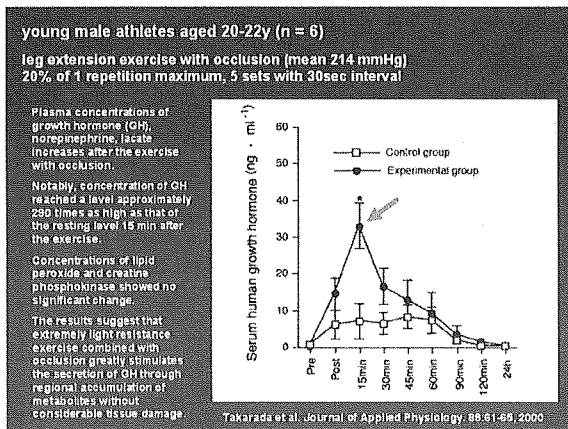


図11 加圧トレーニングにより、成長ホルモン産生が有意に上昇する報告

東大病院では、本法のメカニズムの解明と臨床応用を目指して、虚血循環生理学講座が開設されている。今後、本研究では、

COPD患者を中心として、呼吸器疾患患者の呼吸リハビリテーションにおける加圧トレーニング運動療法の効果、副次的な効果、副作用等を検討する予定である。特に、加圧トレーニング運動療法は、通常の運動療法が困難である重症、最重症COPD症例に対する効果が期待されている。

2) 発生工学を駆使した基礎研究：

<LTB₄受容体遺伝子

ノックアウトマウス>

PAF、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどは、多彩な生理活性作用を有するメディエーターであり、呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。

特に、高齢者炎症性肺疾患において、白血球遊走・賦活化は極めて重要な位置を占めると考えられる。本研究では、白血球遊走に参与するロイコトリエンB₄ (LTB₄)受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、その機能解析を目指した。

1997年、東京大学の横溝らは、世界ではじめてLTB₄受容体のクローニングに成功し(Nature 1997)した。LTB₄受容体は、G-protein coupled receptor (GPCR)群のひとつであり、系統樹としてはPAF受容体やCysLT1受容体からはやや遠い位置にある。

Phylogenetic Tree of various GPCRs

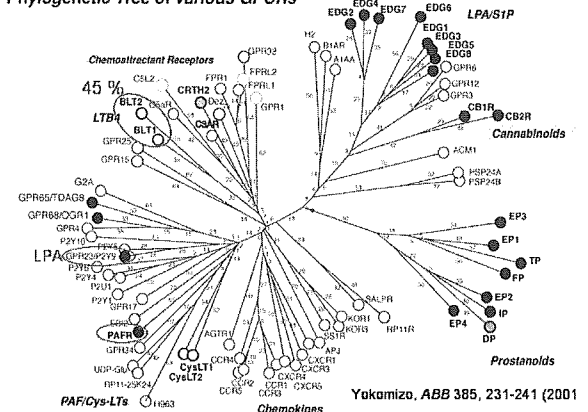


図12 GPCRの系統樹。

本研究グループは、LTB₄受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成に着手し、LTB₄受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索することを目指した。その結果、ホモ接合体LTB₄Rノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。この知見は、LTB₄が生殖・発達に大きく寄与しない可能性を提示するものである。

LTB₄Rノックアウトマウスが出生時形態的奇形を呈しておらず、発育・成長においてもコントロールの野生型マウスと比べ全く差を認めていないという知見は、たとえばLTB₄拮抗薬治療薬の開発・実用化の見通しに寄与すると考えられる。

また、LTB₄R-KOマウスを用いて、気管支喘息モデルにおける検討を行った。その結果、LTB₄ノックアウトマウスでは、感作されたLTB₄R-KOマウス群は、野生型群と比べてMCh気道反応性が低下していることが示唆された。またBALF解析において、ノックアウトマウス群ではeosinophiliaが著明に軽減していることが認められた。BALF中のTh2サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減していた。この実験結果より、LTB₄受容体が気管支喘息モデルにおいて、気道過敏性および好酸球浸潤の発現に決定的な意義を有していることが示唆された。

なお今後は、本研究により確立されたLTB₄R-KOマウスを用いてARDSモデル(Nagase, Nature Immunol, 2000)や肺線維症(特発性間質性肺炎)モデル(Nagase, Nature Medicine, 2002)の検討を進める予定である。今後、LTB₄を含めて各々のエイコサノイドがもつ生理的意義・重要性が解明されることにより、高齢者の難治性呼吸器疾患に対する有効な治療法・治療薬の開発および実用化が期待される。

E. 結 論

- 1) 白血球遊走に関与するロイコトリエンB₄ (LTB₄) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、LTB₄受容体遺伝子ノックアウトマウスのホモ接合体・生存個体が得られた。
- 2) LTB₄受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析により、気管支喘息モデルにおける気道過敏性、炎症細胞浸潤にLTB₄受容体が関与することが示唆された。
- 3) 血流制限下レジスタンストレーニング(加圧トレーニング)は、特殊なベルトを四肢の付け根に巻いて適度に血流を制限した状態でレジスタンストレーニングを行う方法で、この加圧トレーニングにより健常者において著明な筋肥大と筋力増大を認めることが知られる。COPD患者を中心として、呼吸器疾患患者の呼吸リハビリテーションにおける加圧トレーニング運動療法のプロトコールが検討された。

以上の知見は、呼吸不全を呈する難治性の呼吸器系疾患に対する新しい治療薬・治療法開発の実現化に寄与することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Terawaki K, Yokomizo T, Nagase T, Toda A, Taniguchi M, Hashizume K, Yagi T, Shimizu T. Absence of leukotriene B₄ receptor 1 confers resistance to airway hyperresponsiveness and Th2-type immune responses. J Immunol 2005; 175: 4217-25.

- 2) Jo T, Iida H, Kishida S, Imuta H, Oonuma H, Nagata T, Hara H, Iwasawa K, Soma M, Sato Y, Nagase T, Nagai R, Nakajima T. Acute and chronic effects of eicosapentaenoic acid on voltage-gated sodium channel expressed in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 1452-9.
- 3) Nagase T, Aoki-Nagase T, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Ouchi Y. Molecular mechanisms underlying inflammatory lung diseases in the elderly: development of a novel therapeutic strategy for acute lung injury and pulmonary fibrosis. *Geriatics Gerontology International* 2005; 5: 139-145.
- 4) Zhang Q, Mousdicas N, Yi Q, Al-Hassani M, Billings SD, Perkins SM, Howard KM, Ishii S, Shimizu T, Travers JB. Staphylococcal lipoteichoic acid inhibits delayed-type hypersensitivity reactions via the platelet-activating factor receptor. *J Clin Invest* 2005; 115: 2855-61.
- 5) Ishii S, Kihara Y, Shimizu T. Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2005; 280: 9083-7.
- 6) Shindou H, Ishii S, Yamamoto M, Takeda K, Akira S, Shimizu T. Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A:lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J Immunol* 2005; 175: 1177-83.
- 7) Kihara Y, Ishii S, Kita Y, Toda A, Shimada A, Shimizu T. Dual phase regulation of experimental allergic encephalomyelitis by platelet-activating factor. *J Exp Med* 2005; 202: 853-63.
2. 学会発表
- 1) Dual pathways of airway inflammation: 第45回日本呼吸器学会総会(発表者:長瀬隆英、Seminar), 2005.
- 2) 高齢者喘息の特徴と対策:病態・免疫アレルギー所見など: 第55回日本アレルギー学会総会(発表者:東京大学呼吸器内科 幸山正、司会 長瀬隆英、シンポジウム), 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 番号:特願2003-034885
 発明者:栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘
 発明の名称:筋ジストロフィー症の病態モデル哺乳動物、及びその製造方法
 出願人:財団法人くまもとテクノ産業財団
 出願日:平成15年2月13日

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告

COPDにおける細胞老化の役割に関する研究

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

COPDは高齢者に好発する疾患であることから、老化とCOPDの発症には密接な関連が示唆される。私どもの研究室では細胞の老化に焦点をあてた研究を続けてきたが、これまでに1) COPD患者の肺組織では上皮細胞が老化していること、2) 慢性的な喫煙刺激が上皮細胞の老化をもたらすこと、3) 上皮細胞の老化はCOPDの病態だけではなく、肺線維症の動物モデルにおいても観察されることを見いだした。これらの結果からCOPDを始めとする慢性肺疾患においては細胞老化のために上皮が再生できなくなり、その結果、傷害が慢性化して組織のリモデリングが促進される機序が推測された。

さらに今年度の研究においては、細胞老化が上皮の再生障害だけではなく、炎症性サイトカインの放出に関わることにより複合的に肺組織の炎症やリモデリングの持続に関わる可能性が指摘された。すなわち1) 高齢マウスの肺では若齢マウス肺に比べて、リンパ球、好中球、マクロファージの活性化に関わる炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が増加していること、2) 培養細胞を用いた研究では、老化上皮細胞からTNF α が産生されることが見出された。以上の結果は、加齢そのものが肺組織の炎症を促進する因子であることを示唆する成績であり、高齢者においてCOPDを始めとする慢性肺疾患が好発する理由の一端を説明するものと思われる。

A. 研究目的

COPDは高齢者に好発する疾患であることから、その発症機序には老化との関連性が示唆される。本邦においても人口の高齢化に伴い、COPDの罹患率はますます増加することが予測されるが、老化とCOPD発症との因果関係を明らかにすることは、社会医学および厚生労働行政の観点からも重要な課題であると思われる。

個体や細胞の老化がCOPDの原因になるという成績はこれまでは得られていないが、1961年にHayflickが細胞の分裂寿命が有限であることを発見して以来、細胞老化によりもたらされた細胞分裂の停止や細胞機能の異常が個体の老化や高齢者疾患の発症を促進するという研究成績が公表され

てきた。例えば、肝硬変患者では肝細胞のテロメア長が短縮していることや動脈硬化の病変部では老化した血管内皮細胞が蓄積していることなどが明らかにされている。したがってCOPDの主病態である肺気腫においても個体の老化に密接に関連した細胞老化がその発症に関与している可能性がある。

一方、最近では肺気腫の発症仮説として肺胞細胞のアポトーシスが注目されている。ヒト肺組織を用いた検討では、肺気腫患者では健常者に比べて肺胞上皮細胞や血管内皮細胞のアポトーシスが增加していることが見出され、マウスの肺胞上皮細胞や血管内皮細胞にアポトーシスを誘導すると肺気腫病変が形成されることから、肺胞細胞の過剰なアポトーシスが肺気腫の成因に関与