

6. Outlaw MC, Dimmock NJ: Insights into neutralization of animal viruses gained from study of influenza virus. *Epidemiol Infect* 1991; 106: 205–220.
7. Hampe W, Zimmermann P, Schulz I: GTP-induced fusion of isolated pancreatic microsomal vesicles is increased by acidification of the vesicle lumen. *FEBS Letters*. 1990; 271: 62–66.

知的所有権の取得状況

特許申請中

発明の名称：ライノウイルス感染予防剤

出願者：山谷睦雄、安田浩康、佐々木英忠

出願番号：特願2004-98995号

好中球エラスターゼ刺激による気道粘液産生亢進に 対するカルボシステインの効果

信州大学医学部内科学第一講座

安尾 将法 藤本 圭作 田名部 毅 久保 恵嗣

はじめに

慢性気道炎症における気道粘液過剰産生および粘液過剰分泌は気道における有害物質や有害刺激を除去するために起こる生体の防御機構と考えられる¹⁾が、一方でこの気道粘液過剰産生は気道のクリアランスを悪化させ、換気、ガス交換障害および細菌感染をきたし、COPDや気管支喘息患者においては生命に関わる重症病態を招来しうる²⁾。

(ヒト)好中球エラスターゼ(Human Neutrophil Elastase; HNE)はCOPD、気管支拡張症、重症喘息など慢性気道炎症症例の気道粘液において高濃度に存在していることが報告されており^{3),4)}、気道に対してMUC5ACを中心とした粘液過剰産生や杯細胞過形成を惹起することが報告されている^{5),6)}。

気道粘液の主体はMUC5AC蛋白であり、気道粘液過剰産生の程度の測定はこのMUC5ACを測定することで可能であることが我々の施設を含め報告されている⁷⁾。

気道上皮におけるHNEを介した粘液過剰産生の経路は相当程度解明されている⁸⁾。即ち、HNE-Protein kinase C-Reactive oxygen species-TNF α converting enzyme (TACE) activation-TGF α -EGFR-Ras-Raf-MEK 1/2-ERK 1/2-Sp1-MUC5AC transcriptionというカスケードである⁸⁾。このいずれかの経路を抑制する能力を持つ薬剤はHNEによる気道粘液過剰産生を抑制しうると考えられる。実際、EGFRやTGF α の抗体による中和やTACE inhibitorによる気道上皮細胞におけるHNE刺激によるMUC5ACの産生抑制が報告されている^{8),9)}。

カルボシステイン(S-Carboxymethylcysteine; S-CMC)は1981年に上市され、現在喀痰調整薬に分類されている薬剤である。去痰作用以外の作用について最も検討されているのはN-アセチルシステインであるが、期待された抗酸化作用によるCOPDの急性増悪抑制効果は、大規模臨床試験において吸入ステロイド非使用例において認め

られるにとどまった¹⁰⁾。S-CMCに関する最も早期に行われた大規模臨床試験はAllegraらによる慢性気管支炎患者に対するものである¹¹⁾。この試験結果はプラセボコントロール群に対して有意に増悪が抑制されたというものであった。また近年、S-CMCがライノウイルス感染抑制効果を有することが示された¹²⁾ことなどを背景として、COPDの増悪に対するS-CMCの臨床効果の検討がPEACE study (Preventive Effect on Acute Exacerbation of COPD with Carbocisteine 1,500mg/day study)という多施設共同研究として行われ^{13),14)}、S-CMCは併用薬の有無、疾患のフェノタイプを問わず、COPDの急性増悪回数を有意に減じることが報告された。

一方で近年S-CMCにもN-アセチルシステインなどのチオール系薬剤と同様に抗酸化作用が存在することが示されてきており^{15),16)}、S-CMCに多様な作用が存在する可能性が示唆されている。このような経過・結果を受け、当施設ではS-CMCが抗酸化作用を有し、HNEによる気道上皮細胞に対する粘液過剰産生作用を抑制しうのではないかと考え、気道粘液をその主体成分であるMUC5ACを用いて評価するとともにその作用機序として、生細胞における活性酸素種(Reactive oxygen species (ROS))産生の程度、 γ -GCS(γ -glutamylcysteine synthetase)遺伝子発現量、細胞内Glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine(GSH))発現量などを用いて検討・考察した。

方 法

<細胞培養>

NCI-H292細胞(a human mucoepidermoid carcinoma cell line)を用いた。培養はRPMI1640 (SIGMA)に10%FBS (fetal bovine serum), Antibiotic-Antimycotic (1%, GIBCO)を添加した培養液にて行った。HNE刺激の24時間前に血清による粘液産生の影響を除去するため

に上記から血清を除いた培養液に置換した。

<HNE刺激>

HNE(ヒト喀痰由来)(Elastin Products)の濃度および刺激時間は過去の論文^{8),9)}を参考とし、100nM、30分間とした。

<MUC5AC, γ -GCS測定>

MUC5ACおよび γ -GCS遺伝子の測定は定量PCR(Light Cycler 3.5 software (Roche Diagnostics))を用いた。遺伝子発現の多寡はGAPDH発現量に対する比で検討した。またMUC5AC蛋白の定量はELISA法を用いた。 γ -GCS遺伝子発現はHNE刺激終了後15,30,60分で評価した。MUC5AC遺伝子発現はHNE刺激終了後8時間で評価した。MUC5AC蛋白の発現はHNE刺激終了後24時間で評価した。

<活性酸素種(ROS)産生測定>

HNE刺激後の生細胞におけるROS産生を評価するために、Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (Molecular Probe)を用いた。HNE刺激時間を30分間とし、その後5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetateを30分間添加、インキュベートし、蛍光顕微鏡(Olympus BX-51)を用いて緑色蛍光を検出した。この蛍光輝度の程度でROS産生の多寡を評価した。蛍光輝度の定量はAdobe Photoshop™を用いて行なった。

上記試薬添加後30分以降、どのタイミングで最もROSが産生されているかについて事前に検討した。30,60,90,120分後に蛍光輝度の検出を行ったが、100nMのHNE30分間添加において、30分後が最も蛍光輝度が高かった。したがって、S-CMC添加の有無に対するROS産生量の評価については30分後(試薬インキュベート終了直後で行った。

<細胞内GSH測定>

細胞内GSH産生測定はOXIS Research™社のBIOXYTECH GSH-420 Quantitative, Colorimetric Determination of Total Glutathione®を用いた。GSH産生量の評価はHNE刺激終了後15,30,60分後に行った。

<統計>

有意差検定にはいずれもunpaired t検定を用いた。

結 果

1. HNE刺激によるMUC5AC遺伝子産生亢進とS-CMCによる抑制効果

HNE刺激あり・なしおよび、S-CMC各種濃度添加

におけるMUC5AC遺伝子産生量を定量すると、100nMのHNE刺激によって有意なMUC5AC遺伝子産生の亢進がおり、S-CMCはこの遺伝子産生亢進を濃度依存性に抑制し、10,100 μ Mの濃度で有意な抑制であった(図1)。

2. HNE刺激によるMUC5AC蛋白産生亢進とS-CMCによる抑制効果

培養上清中のMUC5AC産生量をELISAにより評価した。100nMのHNE刺激によって有意な培養上清MUC5AC蛋白産生の亢進がおり、S-CMCはこの蛋白産生亢進を濃度依存性に抑制し、10,100 μ Mの濃度で有意な抑制であった(図2)。

3. HNEによるROS産生とS-CMCによる抑制効果

Intracellular oxidation indicatorと称されるDichlorodihydrofluorescein (DCF)を用いて、生細胞におけるROS産生の程度を評価した。100nMのHNE刺激およびこれに各種濃度のS-CMCを添加した場合の蛍光顕微鏡像を示す(図3)。蛍光輝度の検討ではS-CMC 100 μ M添加時に、S-CMCなしの場合に比べて有意なROS産生の抑制効果が見られた(図4)。

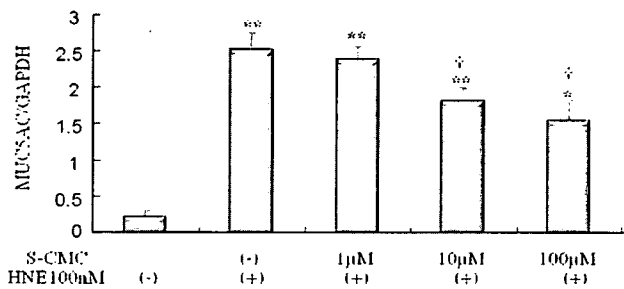
4. 細胞内 γ -GCS遺伝子動態

S-CMCはROS産生を抑制していたので、100 μ MのS-CMCの添加によって細胞における酸化ストレスが減弱していたと考えられた。細胞内での抗酸化物質増加がこれに関与していると考え、HNE刺激下、上記濃度のS-CMC添加の有無による γ -GCS遺伝子の経時的な動態について定量PCRにより評価した(図5)。N=2の結果であり、有意差検定まで行っていないがS-CMC添加群において γ -GCS遺伝子が経時的に増加する傾向がみられた。一方でHNE添加のみの群では γ -GCS遺伝子が経時的に低下する傾向がみられた。

5. 細胞内GSH産生動態

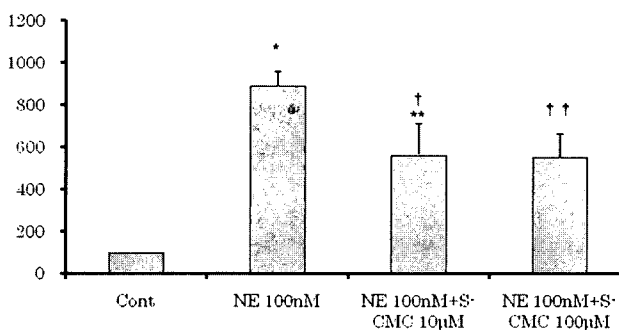
上記遺伝子から産生される物質はGSHであるので、GSHの産生量についても検討した。こちらもN=1の結果であるが、HNE刺激開始後60分(=HNE刺激終了後30分)までにS-CMC添加群ではGSHの上昇が、HNE添加のみの群ではGSHの経時的な低下がみられた(図6)。

図1. HNEによるMUC5AC遺伝子発現亢進とS-CMCによる抑制



*p<0.005, **p<0.001 vs. control; † p<0.05 vs. HNE 100nM

図2. HNEによる培養上清中MUC5AC蛋白産生亢進とS-CMCによる抑制



*; p<0.001 vs Control, **; p<0.05 vs Control, ***; p<0.005 vs Control
† ; p<0.05 vs NE 100nM, † † ; p<0.01 vs NE 100nM

図3. HNE刺激によるROS産生 (蛍光顕微鏡像)

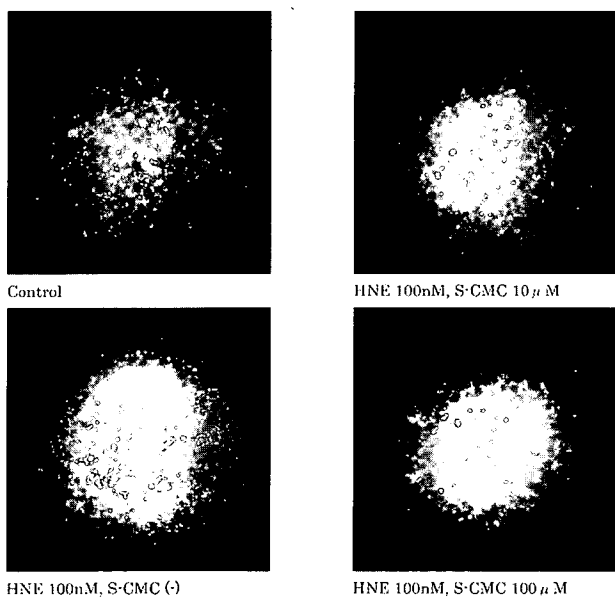


図4. HNE刺激によるROS産生 (蛍光輝度定量)

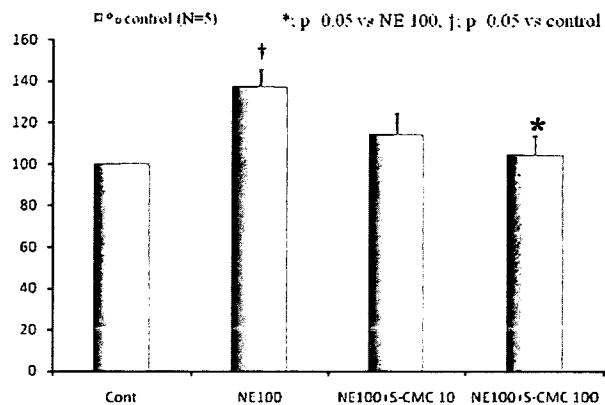


図5. HNE刺激、S-CMC添加の有無による細胞内γ-GCS遺伝子動態

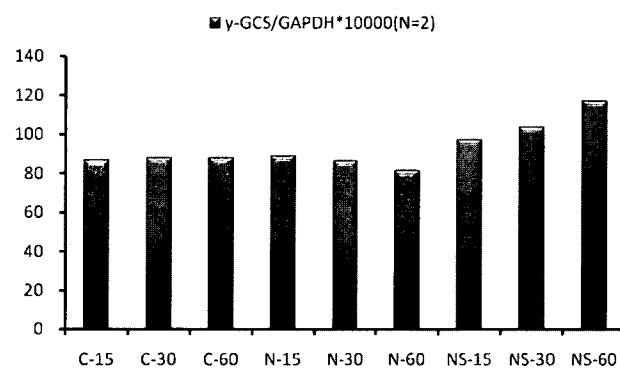
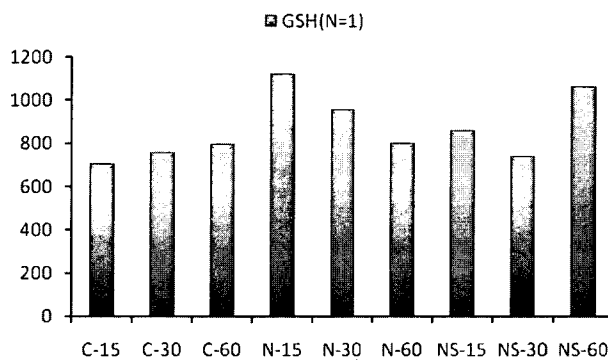


図6. HNE刺激、S-CMC添加の有無による細胞内GSH産生動態



考 察

今回の検討から、HNEによる気道粘液過剰産生がS-CMCによって抑制されることが示された。この作用機序として、S-CMC添加による細胞に対する γ -GCS遺伝子産生亢進作用とこれに引き続く細胞内GSH量増加が酸化ストレスを減弱させることで粘液過剰産生抑制がおこる可能性が示唆された。

酸化ストレスおよびこれに引き続く慢性炎症はCOPDの病態を説明するうえで不可欠な要素である。活性酸素は生体内で感染防御などの役割を担っている¹⁶⁾。一方で、気道における酸化ストレスによりアンチプロテアーゼ作用やサーファクタントによる作用の不活性化、細胞膜表面の酸化、気道粘液過剰産生、気道リモデリング、肺胞上皮障害、アポトーシスなどが惹起される¹⁷⁾。この故に、生体内で起こる酸化ストレスの制御はCOPDなど慢性気道炎症を主体とする疾患の治療に重要であると考えられ、関連する研究が継続的になされている^{3)~6)}, ^{8)~11)}, ^{15)~18)}。GSHは生体内において豊富に存在する抗酸化物質であり、気道被覆液中には血清に比べて極めて多量(100 μ M)に存在し、各種外来有害物質や炎症細胞由来の酸化ストレス制御に働いている¹⁷⁾。

γ -GCS(別名Glutamate cysteine ligase (GCL))はGSH合成の第一段階かつ律速段階に位置する酵素であり、その酵素活性によりGSH合成の程度が決定される¹⁸⁾。また、 γ -GCSの分解は合成されたGSHによりfeedback-inhibitionを受ける¹⁸⁾。以上のことから、HNE刺激による酸化ストレスの増加は気道上皮細胞においてROS産生を亢進させることによって気道粘液過剰産生を惹起するが、この作用に対しS-CMCを事前に添加しておくことで細胞内で利用可能なcysteineが供給され γ -GCS産生増加 \rightarrow GSH産生増加がおこり、気道粘液過剰産生が抑制されうると考えられる。

今回我々が行った実験ではHNEは確かに細胞においてROS産生を増加し、気道粘液過剰産生を惹起していた。また、S-CMC投与群において γ -GCS遺伝子産生量の増加および細胞内GSH産生が増加する傾向がみられたことはこのことを裏付ける可能性がある結果であると考えられる。有意な γ -GCS遺伝子増加と細胞内GSH産生増加があるかどうかについては今後の検討課題である。

結 論

HNE刺激による気道粘液過剰産生はS-CMCにより抑

制され、その抑制機序として活性酸素種産生の抑制、 γ -GCS増加による細胞内GSH産生増加が考えられた。

参考文献

- 1) Rogers DF. The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 1-6.
- 2) Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992; 101: 916-21.
- 3) Vandivier, R. W., V. A. Fadok, P. R. Hoffmann, D. L. Bratton, C. Penvari, K. K. Brown, J. D. Brain, F. J. Accurso, P. M. Henson. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J. Clin. Invest.* 2002; 109:661-670.
- 4) Liu, H., S. C. Lazarus, G. H. Caughey, J. V. Fahy. Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro. *Am. J. Physiol.* 1999; 276:L28-L34.
- 5) Breuer, R., T. G. Christensen, E. C. Lucey, P. J. Stone, G. L. Snider. An ultrastructural morphometric analysis of elastase-treated hamster bronchi shows discharge followed by progressive accumulation of secretory granules. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136:698-703.
- 6) Voynow, J. A., L. R. Young, Y. Wang, T. Horger, M. C. Rose, B. M. Fischer. Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 1999; 276:L835-L843.
- 7) Yasuo M, Fujimoto K, Tanabe T, Yaegashi H, Tsushima K, Takasuna K, Koike T, Yamaya M, Nikaido T. Relationship between calcium-activated chloride channel 1 and MUC5AC in goblet cell hyperplasia induced by interleukin-13 in human bronchial epithelial cells. *Respiration.* 2006; 73: 347-59.
- 8) Shao MX, Nadel JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF-alpha-converting

- enzyme. *J Immunol.* 2005; 175: 4009–16.
- 9) Kohri, K., I. F. Ueki, J. A. Nadel. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002; 283: L531. –L540.
- 10) Decramer M, Rutten-van Molken M, Dekhuijzen PN, Troosters T, van Herwaarden C, Pellegrino R, van Schayck CP, Olivieri D, Del Donno M, De Backer W, Lankhorst I, Ardia A. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005; 365: 1552–60.
- 11) Allegra L, Cordaro CI, Grassi C. Prevention of acute exacerbations of chronic obstructive bronchitis with carbocysteine lysine salt monohydrate: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Respiration* 1996; 63: 174–80.
- 12) Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Tomita N, Yoshida M, Sasaki H. Carbocysteine reduces frequency of common colds and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Geriatr Soc.* 2006; 54: 378–80.
- 13) 福地義之助、相澤久道、一ノ瀬正和、三嶋理晃、久保惠嗣、永井厚志、長瀬隆英、高橋和久、栗山喬之、三上正志、山谷睦雄、西村正治. *呼吸* 2007; 26: 955–963.
- 14) Tatsumi K, Fukuchi Y; PEACE Study Group. Carbocysteine improves quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Geriatr Soc.* 2007; 55: 1884–6.
- 15) Vogt W. Oxydation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 93–105.
- 16) Brandolini L, Allegretti M, Berdini V, Cervellera MN, Mascagni P, Rinaldi M, Melillo G, Ghezzi P, Mengozzi M, Bertini R. Carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-LYS) is a selective scavenger of reactive oxygen intermediates (ROIs). *Eur Cytokine Netw.* 2003; 14: 20–6.
- 17) Rahman I, Kilty I. Antioxidant therapeutic targets in COPD. *Curr Drug Targets.* 2006; 7: 707–20.
- 18) Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 1405–20.

喫煙曝露ラットにおける血漿グレリン およびレプチンと体重減少

奈良県立医科大学内科学第二講座

友田 恒一 吉川 雅則 濱田 薫 木村 弘
福岡 篤彦 山本 佳史 小林 真也
同 動物実験施設
久保 薫

はじめに

COPDは喫煙を主因として発症する全身性疾患であり、栄養障害はCOPDの重要な“systemic effect”であるとともに、発症や進展にも関与することが報告されている¹⁾。また、近年、種々の内分泌ホルモンの栄養障害への関与が注目されている。グレリンは、1999年に児島、寒川らによって、成長ホルモン分泌促進因子受容体の内因性リガンドとして胃組織より発見された成長ホルモン分泌促進因子である。視床下部弓状核に存在するneuropeptide-Y (NPY) ニューロンに作用して摂食を促進させるとともに、脂肪組織の蓄積作用と体脂肪の利用抑制作用を持っている²⁾。われわれはCOPD患者において血漿グレリン濃度が体重減少に伴い上昇し、残気量、残気率と相関することを報告した³⁾。一方、レプチンは主として白色脂肪細胞から分泌され、視床下部の腹内側核、室傍核、弓状核、背内側核などに存在するレセプターを介して摂食を抑制し、エネルギー消費を亢進させる⁴⁾。COPD患者では血中レプチンレベルが食事摂取量や栄養治療の効果を規定し、急性増悪時の血中レプチンの上昇は負のエネルギーバランスを助長すると報告されている⁵⁾。

今回は、慢性喫煙曝露が栄養状態に及ぼす影響と、血中グレリンおよびレプチンの動態との関連について動物実験モデルを用いて検討した。

対象と方法

10週齢のWistar-Kyoto (WKY/Izm) ラットを用い、喫煙曝露群と曝露を行わないコントロール群の2群を設定した。喫煙曝露は、ハンブルグII (Borgwaldt, Germany) を用いて行った。ハイライトを1回につき2

0分間30本、1日2回、週5日間曝露し、計4週間継続した。毎週末に体重と摂餌量を測定し、4週曝露後に血漿中のアシルグレリン、デスアシルグレリンおよびレプチン濃度をELISA法にて測定した。

結 果

- 1) 喫煙曝露による体重の変化：喫煙曝露開始1、2、3、4週後のいずれの時期においても、喫煙曝露群ではコントロール群と比較し、体重は有意に軽く、喫煙曝露によって体重の増加が抑制されていた。(図1)

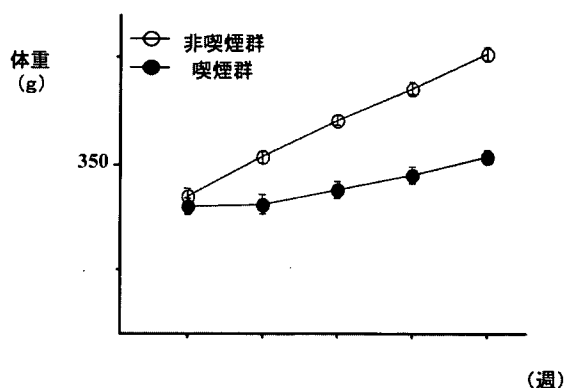


図1 体重の変化

- 2) 喫煙曝露による摂食量の変化：曝露一週目の摂食量は著しく減少し、その後増加傾向が認められるものの、すべての時期においてコントロール群と比較して有意に少なかった。(図2)
- 3) 体重と摂食量の関連性：喫煙曝露群とコントロール群を含めた全体では、強い正の相関が認められ、摂

餌量が体重を規定していることが確認された。(図3)

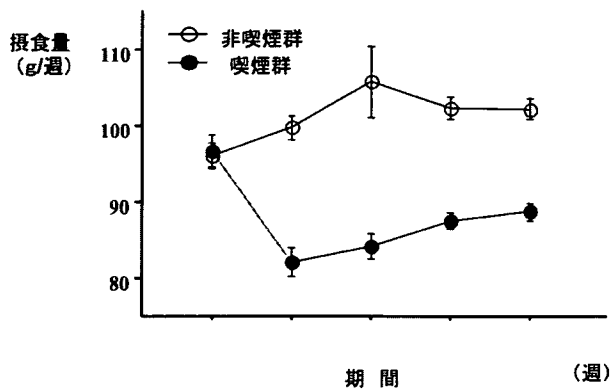


図2 摂取量の変化

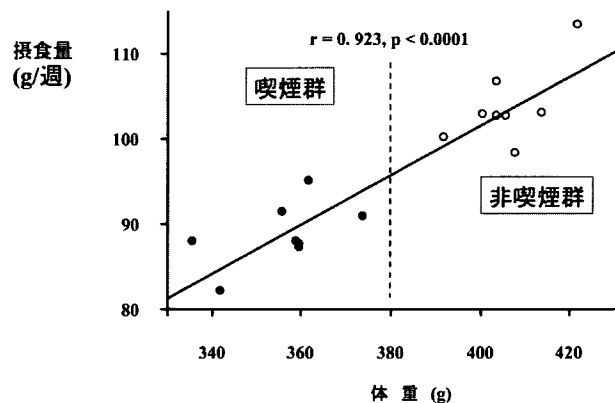


図3 摂取量と体重の関連性

4) 喫煙曝露による血漿中グレリン濃度の変化：喫煙曝露群ではコントロール群と比較し、アシルグレリン濃度が有意に高値を示した。一方、デスアシルグレリン濃度および総グレリン濃度は、喫煙曝露群とコントロール群の間には有意差は認められなかった。(表1)

表1 喫煙曝露によるグレリンの濃度の変化

	非喫煙群 (n=8)	喫煙群 (n=8)	p value
Acyl ghrelin (fmol/ml)	46.5±3.3	75.9±5.1	0.002
Des-acyl ghrelin (fmol/ml)	417.2±35.0	411.3±23.5	0.600
Total ghrelin (fmol/ml)	463.7±37.6	487.1±25.9	0.916
Acyl / Desacyl ghrelin	0.10±0.01	0.19±0.01	0.001

mean ± SD

5) グレリン濃度と摂取量の関連性：喫煙曝露群およびコントロール群いずれの群においても、摂取量とア

シルグレリン濃度は負の相関を認めた。喫煙曝露群ではコントロール群と比較して、回帰直線の傾きが、大きかった。(図4)

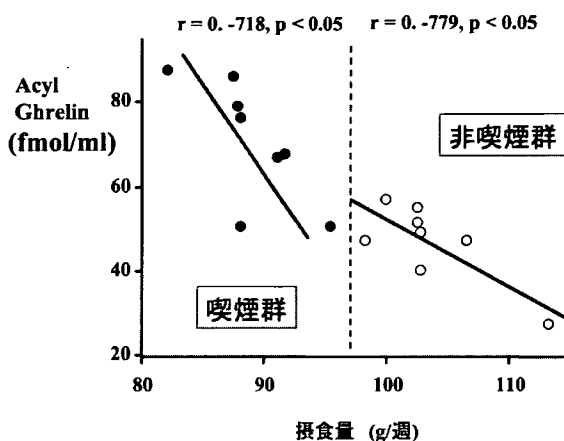


図4 血中グレリン濃度と摂取量の関連性

6) 喫煙曝露による血漿中レプチン濃度の変化：喫煙曝露群ではコントロール群と比較し、レプチン濃度が有意に低値を示した。(図5)

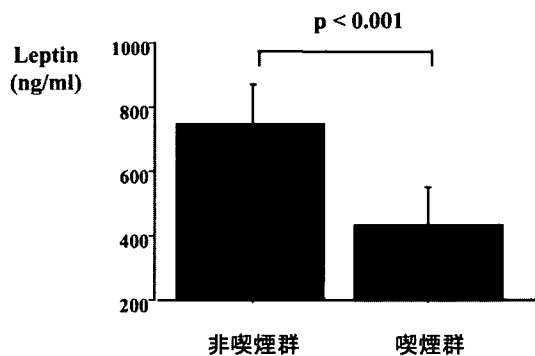


図5 血中レプチン濃度の変化

7) グレリン濃度とレプチン濃度の関連性：有意の負の相関を認めた。(図6)

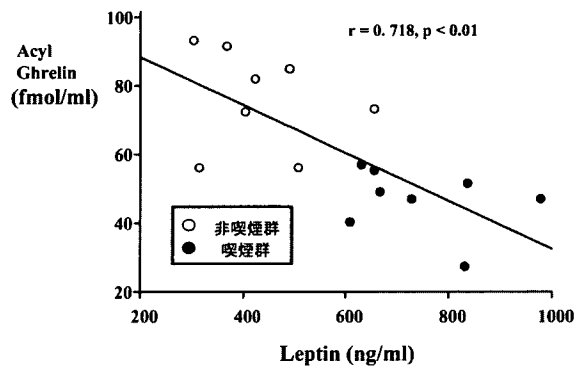


図6 レプチン濃度とグレリン濃度の関連性

考 察

Wistar-Kyotoラットに4週間喫煙曝露を行ったところ食餌摂取と体重が減少し、血中アシルグレリン濃度の上昇とレプチン濃度の低下を認めた。

血中グレリン濃度は飢餓状態⁶⁾、悪液質⁷⁾、神経性食思不振症⁸⁾などで、上昇することが報告されている。我々は栄養障害を認めるCOPD患者では血中グレリン濃度が上昇し、BMIと負の相関が認められ、エネルギーインバランスに対し代償的に上昇していることを報告した³⁾。本研究の結果から喫煙による摂食量の低下、体重減少に対して、血漿中グレリンは代償的に上昇していると考えられた。

グレリンにはオクタン酸で修飾されているアシルグレリンと脱オクタン酸化されたデスアシルグレリンがある。血中にはアシルグレリンとして分泌されるが、ただちに脱オクタン酸化され、デスアシルグレリンへ代謝され、血中ではデスアシルグレリンとして多く存在する⁹⁾。アシルグレリンは活性型として知られ、脱オクタン酸化されたデスアシルグレリンは非活性型として知られていたが、近年様々な生理活性を持つことが報告されている¹⁰⁾。本研究では、喫煙曝露によってアシルグレリンのみが上昇していた。その機序については明らかではないが、喫煙による摂食量低下と関連していると考えられた。また、アシルグレリンとデスアシルグレリンとは並行して変動することが知られているが、本検討では両者の関連が認められなかった。喫煙がグレリンの代謝に影響を及ぼす可能性や喫煙曝露の直接的作用も考えられるが、喫煙とグレリンの分泌動態に関して更なる検討が必要である。

レプチンは視床下部に作用してNPYを抑制し、摂食抑制作用を示す。本研究では、レプチン濃度は低下し、グレリンと同様に体重減少に対して代償的な分泌動態を示した。喫煙による摂食抑制効果はNPYの抑制が関与していると報告されており、この抑制に対してグレリン、レプチンが互いに関連しながら、代償的な分泌動態を呈していると考えられた。

文献

1. Coxson HO, et al. Early emphysema in patients with anorexia nervosa. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 748–52.
2. Kojima M, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*

- 1999; 402: 656–60.
3. Itoh T, et al. Elevated plasma ghrelin level in underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 879–82.
4. Prentice AM, et al. Leptin and undernutrition. *Nutr Rev* 2002; 60(10 Pt 2):S56–67; discussion S68–84, 85–7.
5. Shols AM, et al. Plasma leptin is related to proinflammatory status and dietary intake in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1220–1226.
6. Nagaya N, et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 2001; 104:2034–8.
7. Shimizu Y, et al. Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* 2003; 9:774–8.
8. Otto B et al. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:669–73.
9. Nakazato M, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409:194–8.
10. Toshinai K, et al. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2006; 147:2306–14.

Respiratory Syncytial Virusの気道上皮細胞への 感染に対するチオトロピウムの 防御機構に関する研究

千葉大学大学院医学研究院加齢呼吸器病態制御学
家里 憲 巽 浩一郎 栗山 喬之

はじめに

Respiratory Syncytial Virus (以下RSV) は乳幼児における急性下気道疾患の主たる原因のひとつである。最近の研究では、感冒症状を有する高齢者やhigh-riskの成人において、RSV感染がA型インフルエンザと同程度に認められることが報告され、成人においても重要な病原体であることが指摘されている(1)。また、RSVはCOPD急性増悪をきたした患者において0.8~22%で検出されている(2,5)。加えて、COPD患者において持続的なRSV感染が気道炎症や一秒率の経年的な低下に関連しているとの報告もみられる(6)。したがって、RSVはCOPD急性増悪および安定期の病態のいずれにも関与しうる重要な病原体であることが認識されつつある。しかし、成人におけるRSV感染に対する治療は、対処療法が主体であり、限られているのが現状である。

RSV粒子は脂質エンベロープを有し、glycoproteinであるF蛋白およびG蛋白などを有している。G蛋白はウイルスの接着に関連していると考えられている(9)。F蛋白はウイルスと細胞の融合(fusion)、合胞体形成に関与している(10)。F蛋白は、Ras superfamilyに属するsmall GTPase結合蛋白質であるRhoAと相互作用する(11)。RhoAは哺乳類細胞に普遍的に発現しており、様々な重要な生物学的機能を有している(12,13)。RhoAのsignaling pathwayはまた、IL-1 β 、IL-6、IL-8といった様々なサイトカイン産生を誘導し、RSV感染細胞によって産生される(14)。RSV感染はRhoAを活性化し、細胞膜に結合する活性型RhoAを増加させる(15)。一方、RSVによる合胞体形成はRhoA signalingに依存することが報告されている(16)。Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) はRSVのF蛋白と結合することでヒト気道上皮細胞へのRSVの侵入を促進する(17)。また、RSV感染は肺の上皮細胞におけるICAM-1の発現を増強し

(18,19)、早期の急性炎症反応を促進しうる(20-22)。

チオトロピウムプロマイドは長時間型ムスカリン受容体拮抗薬であり、COPD患者における肺機能の経時的な進行や急性増悪を抑制することが知られている(23,24)。しかし、チオトロピウムがCOPD急性増悪を抑制する機序はまだ明らかにされていない。アセチルコリンは副交感神経系の神経伝達物質であり、平滑筋の収縮や粘液の分泌といったairway functionに関与している。最近の知見では、アセチルコリンは気管支上皮や炎症細胞のような非神経性細胞からも放出されることが示唆されている(25)。さらには、気道におけるムスカリン受容体のsignalingは気道炎症やリモデリングといった様々な生物学的機能を調節することが最近の研究で明らかになりつつある(26)。以上のことから、チオトロピウムはRSVに対して抗ウイルス作用および抗炎症作用を発揮し、COPD急性増悪を抑制することに貢献しているかもしれない。その仮説を検討すべく、われわれは、HEp-2細胞株を使用し、チオトロピウムのRSVに対する抗ウイルス作用を検討した。

対象と方法

○ウイルスと細胞株

RSV A2株はATCC (Rockville, MD) より入手し、既出の論文に従い(27)ストックした。RSVのtiterはメチルセルロースプラークアッセイにより測定した。HEp-2細胞(CCL-23, ATCC)は10%FBS含有Eagle's MEMにて維持した。

○半定量的real time RT-PCR

RNAはTaqman technique (Roche Molecular Diagnostic System, Basel, Switzerland) を用いてreal-time RT-PCRによって定量した。primerとprobeの設計はPrimer Express version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

により行い、RSV A2株のF2 蛋白およびICAM-1 mRNA に対するforward primer、reverse primerおよびprobe を設計した。

real time RT-PCRはone-step protocolに従い施行した (28)。測定はABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) にて施行した。Negative controlとして、RNAの代わりにbufferを用いたものと、MultiScribe™ and RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems) のRNase Inhibitorを入れずにサンプルに加えたものを使用した。Internal controlとして18s ribosomeのmRNAに対するforward primer、reverse primerおよびprobeを設計した。結果はApplied Biosystemsのプロトコールに述べられているstandard curve methodを用い、正規化されたRNA量を相対的な比として示した。

○イムノブロット解析

細胞はNovex Tris-Glycine SDS sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用い溶解し、超音波攪拌によりホモジナイズした。サンプルはSDS-PAGEに引き続き、polyvinylidene difluoride membraneにトランスファし解析した。2% skim milkでブロッキング後、500倍の抗RSV Fusionモノクローナル抗体 (Argene, Varilhes, France) と反応させ、引き続き4000倍のEnVision+ System labeled polymer-HRP anti-mouse antibody (DakoCytomation, Carpinteria, CA) と反応させた。蛋白質は、ECL plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) により発光させた。RhoAに対しては、一次抗体として、anti human RhoA monoclonal antibody (Cytoskeleton, Denver, CO) を用いて行った。

○サイトカイン測定

培養細胞上清を用いて、IL-6およびIL-8をELISAにて測定した。

○ICAM-1の発現の測定

細胞表面へのICAM-1の発現をフローサイトメトリーにて検討した。細胞表面のICAM-1の免疫蛍光染色はmouse anti human CD54-FITC conjugated antibody (Beckman Coulter, Marseille, France) にて反応させて施行した。20,000の細胞をFACS-Calibur system (BD Biosciences, San Jose, CA) で解析した。

○RhoA活性の測定

RhoA活性化の測定には、G-LISA™ RhoA Activation Assay Biochem Kit™ (Cytoskeleton) を使用した。コントロールとして、無血清培養HEp-2細胞を用いた。なぜなら、血清欠乏状態は細胞内の

RhoAを不活化するからである(29)。方法は、HEp-2細胞を10%FBSのmediumで60% confluencyまで培養後、0.5 % FBSのmediumに代えて24時間培養し、最後にFBSの入っていないmediumで更に24時間培養した。すべてのサンプルとコントロールのLuminescence signal (RhoA活性) はmicroplate luminescence reader (Wallac 1420 Arovo multilabel counter) を用いて測定した。全ての値はコントロールに対するパーセンテージで表した。

○統計学的解析

結果は平均±SEで表示した。統計学的有意差はANOVA、もしくはStudent's t testに引き続きBonferroni's testを行い検証した。

結果

○RSVの上清titerにおけるtiotropiumの効果

HEp-2細胞をRSV感染前3日間連日、0, 1, 10, 100 nMのチオトロピウムが入ったmediumにて培養した。その後、0.1MOIのRSVを接種し、1時間培養させた。その後、新しい同じ濃度のチオトロピウムが入ったmediumで培養した。RSV感染48時間後に上清を採取し、ウイルスのtiterをメチルセルロースプラークアッセイにて測定した。RSVのtiterは濃度依存性に減少した (Fig.1A)。

Fig.1

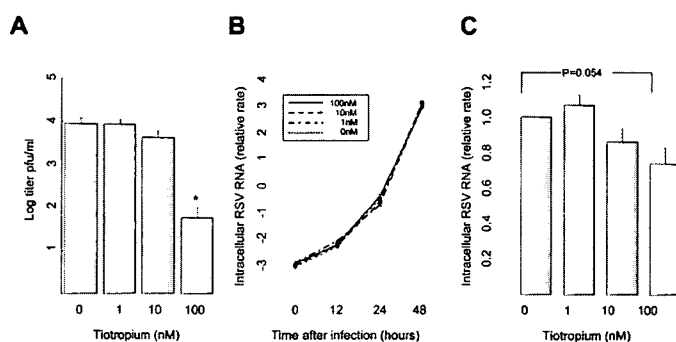


図1 上清のRSV titerおよび細胞内ウイルスRNA (vRNA) に対するチオトロピウムの効果

(A) 0.1MOIのRSV感染48時間後に採取された上清のviral titer (n=5)。培養細胞はRSV感染前3日間連日、チオトロピウム0, 1, 10, 100 nMのmediumでpremedicationし、RSV感染後に同じ濃度のmediumで培養した。Viral titerはpfu/mlで示した。Titerは用量依存性に低下し、100nMで有意に抑制効果を認めた(*p<0.05) (B) 0.1MOIのRSV感染直後、12、24、および48時間後の細胞内vRNA (n=5)。vRNAはコントロールに対する各サンプルにおける正規化されたvRNA量の比として示した。増殖曲線は各濃度に変化を認めなかった。(C) 0.1MOIでのRSV感染48時間後における細胞内vRNA (n=4)。vRNAはコントロールに対するvRNA量の相対比として示した。用量依存性に低下する傾向を認めた(p=0.054)。

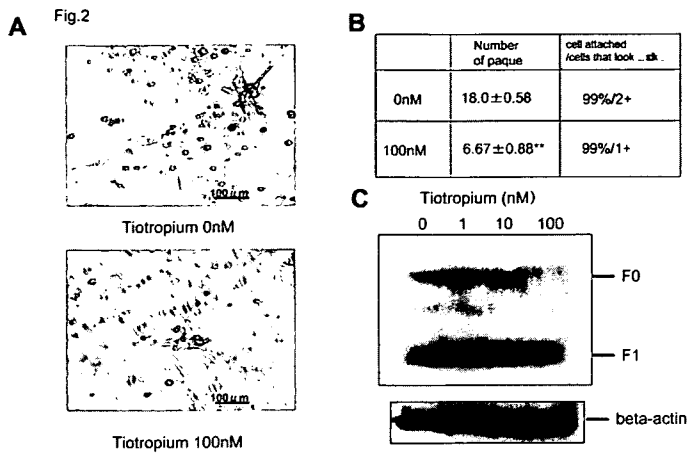


図2 合胞体形成能およびF蛋白におけるチオトロピウムの効果 (A)10MOIでのRSV感染24時間後のHEp-2細胞の形態学的変化。チオトロピウムにより、合胞体形成(矢印)の抑制を認めた。(B)(A)におけるHEp-2細胞のプラーク数および細胞の状態。Cell attachedは%で、cells that look 'sick'は細胞の状態が病的な割合を(0:0%, 1+:<25%, 2+:25-50%, 3+:50-75%, 4+:>75%)で示した。チオトロピウムによりプラーク数が有意に減少した(** $p<0.01$)。(C)0.1MOIでのRSV感染48時間後のRSVのF蛋白および β -actinのイムノブロット解析。培養細胞は、Fig.1(A)と同様にチオトロピウムを付加した。チオトロピウムにより、F1蛋白に差を認めず、F0→F1への開裂の抑制を認めなかった。

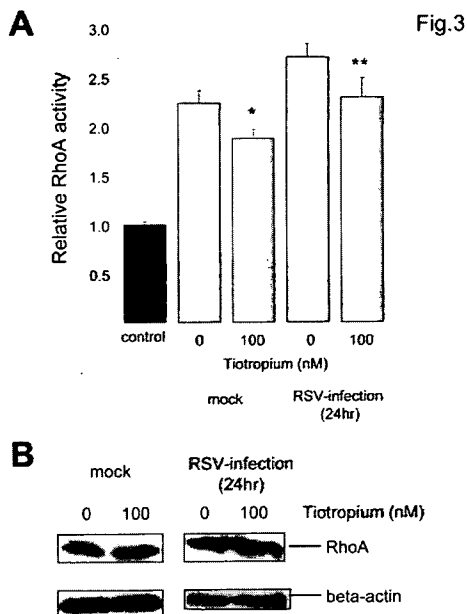


図3 RhoA活性におけるチオトロピウムの効果

(A)チオトロピウム0nMおよび100nMで3日間premedicationを行った後の、RSV非感染HEp-2細胞および0.1MOIでのRSV感染24時間後の細胞におけるRhoA活性($n=5$)。チオトロピウムは非感染および感染後の細胞においてRhoA活性を有意に抑制した(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。非感染と比較して、RSV感染により、有意にRhoAは活性化された($p<0.01$, $p<0.05$ それぞれチオトロピウム0nMおよび100nM, Figureにはp値は示さず)。(B)チオトロピウム0nMおよび100nMで3日間処理した、RSV非感染およびRSV感染24時間後の細胞RhoA蛋白の発現。RhoA蛋白発現には差を認めなかった。

100nMのチオトロピウム処理は、有意にRSV感染を抑制した($p<0.05$)。

○細胞内ウイルスRNAにおけるチオトロピウムの効果

細胞内ウイルスRNAを、RSV感染直後、12時間後、24時間後および48時間後の、チオトロピウム0,1,10および100nMで処理した細胞からのライセートにて、半定量的real time RT-PCRを施行し比較検討した。ウイルスRNAの増殖曲線は薬剤濃度に関わらずほぼ同様であった(Fig.1B)。しかし、RSV感染48時間後の時点における細胞内ウイルスRNAは、チオトロピウム100nMで、コントロール(0nM)と比較して有意差はないものの減少する傾向を認めた($p=0.054$)(Fig.1C)。

○合胞体形成とF蛋白におけるチオトロピウムの効果

HEp-2細胞株をRSV感染前3日間連日、0nMおよび100nMのチオトロピウムの入ったmediumにて培養し、RSVを10MOIにて感染させ、新しい同じチオトロピウムの濃度のmediumにて24時間培養し、HEp-2細胞の形態学的変化を、位相差顕微鏡にて観察し検討した。チオトロピウム100nMの培養細胞における合胞体のサイズは0nMと比較し小さく(Fig.2A)、数も有意に減少していた(Fig.2B)。チオトロピウムは合胞体形成を抑制することが示唆された。

細胞内のRSV F蛋白は合胞体形成に関与する為、細胞内F蛋白をウエスタンブロットにて検討した。RSV感染前3日間連日、チオトロピウム0,1,10,100nMのmediumで培養後、RSVを0.1MOIにて感染させ、新しい同濃度のmediumで培養24時間後の培養細胞のライセートを使用した。F1蛋白(matureなF蛋白)はチオトロピウム100nMでは変化を認めず(Fig.2B)、少なくともprecursorなF0蛋白からF1蛋白質への開裂は抑制しないことが示された。

○RhoA活性のチオトロピウムの効果

RhoAの活性化はRSVによる合胞体形成に関与することが報告されている(16)。RhoA活性におけるチオトロピウムの効果を検討するために、HEp-2細胞を3日間連日、チオトロピウム0および100nMのmediumにて培養し、RSV0.1MOIで感染させ、新しいチオトロピウム同濃度のmediumで24時間培養した。細胞を採取し、RhoA

活性をRhoA activation assayにて計測した。コントロールとして無血清培養細胞を前述の如く作製した。RhoA活性はRSV感染前後両者でチオトロピウムによって有意に抑制された (Fig.3A)。ちなみにfigure 3Bに示すように、RhoAのウェスタンブロットの検討では、RhoAの発現にはチオトロピウムは影響しないことが示された。

○ICAM-1発現におけるチオトロピウムの効果

ICAM-1はRSV F蛋白と結合することで、RSVのentryおよび感染を促す(17)。HEp-2細胞をチオトロピウム0および100nMのmediumで3日間連日培養し、免疫蛍光染色を行った。Flow cytometry解析の結果、ICAM-1の細胞表面発現はチオトロピウムによって有意に抑制を認めた (Fig.4A,B,C)。さらに、ICAM-1のmRNAを半定量的real time RT-PCRにて検討したが、ICAM-1 mRNAに対するチオトロピウムの抑制効果は認めなかった (Fig.4C)。

○サイトカイン産生におけるチオトロピウムの効果

RhoA signaling pathwayは、RSV感染細胞によって産生されることが知られているIL-6およびIL-8といったサイトカインの産生を誘導する(14)。チオトロピウムがRhoA活性を抑制したため、RSV感染後のサイトカイン産生におけるチオトロピウムの効果を検討した。細胞は感染前3日間連日、チオトロピウム0,1,10および100nMのmediumにて培養し、RSVを0.1MOIにて感染させたのち、新しい同濃度のmediumで48時間培養した。

その時点で、上清を採取し、IL-6およびIL-8を測定した。figure 5に示すように、両方のサイトカイン濃度が濃度依存性に減少した。我々はまた感染直前の上清でも検討したが、IL-6およびIL-8の値は非常に低く、チオトロピウム濃度には関係は認めなかった (data not shown)。

考 察

本研究では、HEp-2細胞におけるRSV感染はチオトロピウム100nMにより有意に抑制され、細胞内ウイルスRNAはRSV感染48時間後で低下する傾向を認めた。しかし、細胞内ウイルスRNAの増殖曲線はチオトロピウム濃度に関わらず同様であった。この結果から、チオトロピウムは少なくとも部分的にはウイルスの侵入を抑制すると考えられる。さらには、プラークアッセイによるtiterと細胞内ウイ

ルスRNAとの乖離は、チオトロピウムはその他の機序を通じてHEp-2細胞へのRSV感染を抑制することが示唆される。

RSV感染による形態学的観察については、RSV感染24時間後の合胞体の大きさはチオトロピウム100nMを付

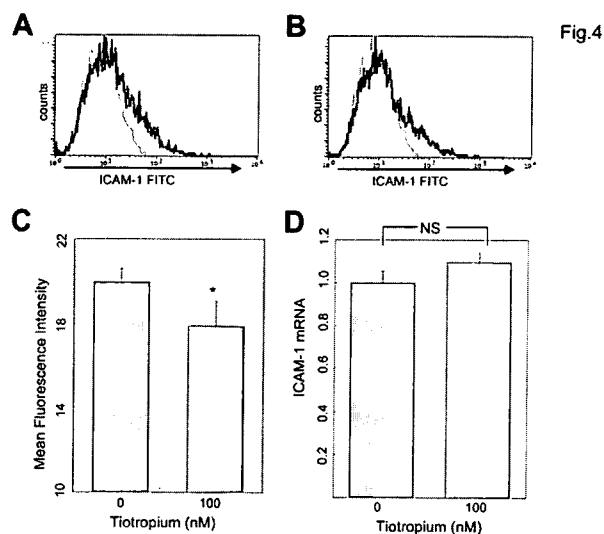


図4 ICAM-1発現におけるチオトロピウムの効果 (A,B)チオトロピウム0(A)および100 nM(B)を3日間付加したHEp-2細胞のICAM-1細胞表面発現に関するFlow cytometry解析。灰色の部分にはICAM-1モノクローナル抗体で染色していないHEp-2細胞を示している。(C)flow cytometryによるICAM-1細胞表面発現のmean fluorescence intensity (n=3)。チオトロピウムによりICAM-1細胞表面発現を有意に抑制した (*p<0.05 versus control culture (0 nM)) (D)細胞内ICAM-1 mRNAの発現。チオトロピウムにより発現に差を認めなかった。

Fig.5

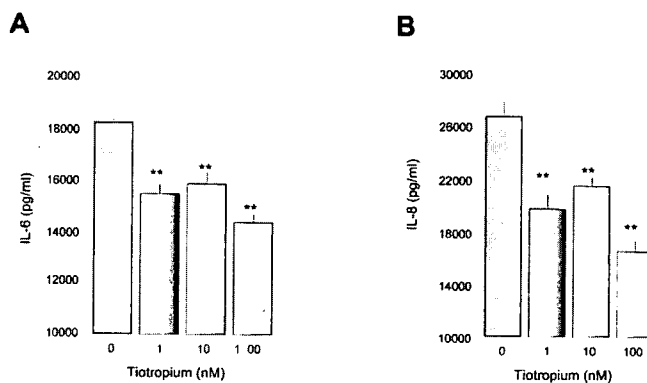


図5 上清におけるIL-6 (A) およびIL-8 (B) 濃度に対するチオトロピウムの効果 (n=6) IL-6およびIL-8はチオトロピウムにより有意に用量依存性に低下を認めた (**p<0.01)。

加した培養細胞で抑制効果を認め (Fig. 2A)、合胞体の数も減少していた (Fig. 2B)。F蛋白はRSV感染における合胞体形成に関わっている(10)ことから、我々はRSVに感染させた培養細胞におけるF蛋白の発現を検討した。しかし、F1蛋白の発現にチオトロピウムは影響しなかった。加えて、precursor F0蛋白からF1への開裂はチオトロピウムにより抑制しなかった。F1蛋白の発現に明らかな変化を認めないことから、チオトロピウムは他のメカニズムを通じて合胞体形成の抑制に関わっていることが示唆された。

この研究において、チオトロピウムはRSV非感染およびRSV感染のHEp-2細胞におけるRhoA活性を有意に抑制した。以前の研究においてすでにRhoAの活性化はRSVによる合胞体形成に関与することが示されている(16)。したがって、チオトロピウムがRhoA活性の抑制を通じてRSVによる合胞体形成を抑制する可能性がこの研究により示された。最近の研究では、RhoAの活性はウイルスのfilamentの形成やRSVのlipid raftsからのbuddingに必要なが、ウイルスの複製には必然ではないことも示されている(30)。また、いくつかのcell lineにおいて、RhoAによって制御される細胞骨格の再構築が、部分的にRSVの増殖に関連しているようである(31)。それらの蓄積される所見は、チオトロピウムの抗ウイルス効果がRhoA活性の抑制のみでは説明できないことを示唆している。その点を明らかにするためには、更なる研究が必要であろう。RSV感染24時間後のRhoA活性における抑制効果は、感染前より強い抑制効果を認めており、ムスカリン受容体がRSV感染においてRhoA活性に関与していることを示唆している。RSV感染後のRhoA活性がチオトロピウムにより有意に抑制されるという我々の結果は、ムスカリン受容体からのシグナリングが、RSVによってもたらされる細胞環境の変化に関与していることを示している。

ICAM-1の発現におけるチオトロピウムの効果を検討するために、免疫蛍光染色およびreal time RT-PCRによりICAM-1の発現を検討した。フローサイトメトリーの結果では、ICAM-1の発現が3日間のチオトロピウム100nMでの連日付加により抑制されることが示された。その結果から、ICAM-1の細胞表面への発現を抑制することで、HEp-2細胞へのRSVのattachmentが抑制され、RSV感染が抑制される可能性が示唆された。一方、ICAM-1 mRNAの発現には差を認めなかった。このことから、ICAM-1の細胞表面への輸送を抑制することで、ICAM-1の細胞表面への発現を抑制している可能性が示唆された

が、詳細な機序は不明である。RhoAは細胞機能、小胞体輸送、細胞接着など重要な生物学的機能に関連している。RhoAの活性化は少なくとも部分的に、ICAM-1の細胞表面への発現に関わっているかもしれない。加えて、3日間のチオトロピウムのpremedicationを行わず、RSV接種30分後にチオトロピウムを付加した群と付加しない群では、0.1MOIのRSV感染48時間後の上清のtiterには差を認めなかった (data not shown)。このことから、チオトロピウムはICAM-1の発現を含めたgeneralな細胞内環境の変化を通じてRSVに対する抗ウイルス効果を発揮すると思われる。

チオトロピウムはHEp-2細胞におけるRSV感染によるIL-6およびIL-8の産生を抑制することが示された。RhoA signaling pathwayはIL-6およびIL-8を含めた幾つかのサイトカインを誘導する(14)。IL-6およびIL-8の発現は転写因子であるNF- κ Bとactivator protein-1 (AP-1)によって密に調節されている(32-34)。また、RhoA蛋白がNF- κ Bの活性化を促進することから、NF- κ BとRhoA familyの相互作用も示唆されている(35,36)。それらの所見は、チオトロピウムがRhoA活性を抑制することでIL-6およびIL-8の産生を抑制する可能性がある。IL-6およびIL-8といった炎症性サイトカインの過剰な産生はRSV感染の病原性に関与している。加えて、RhoA pathwayの干渉が、感作されたマウスにおいて、RSV感染によりもたらされる気道過敏性を低減することから(37)、RhoA signaling pathwayはRSVの病原性に関わっているようである。最近の臨床研究で、チオトロピウムはCOPD急性増悪を減じるが、喀痰や血中のIL-6およびIL-8での検討において、気道炎症や全身性炎症の抑制に影響しないとの報告がなされているが(38)、COPD急性増悪の原因はRSV感染単独によるものではない。本研究は、チオトロピウムがin vitroで、RSV感染における気道炎症を抑制する可能性を示唆した。チオトロピウムがCOPDの動物モデルにおいてRSV感染により気道炎症や全身性炎症を抑制しえるかどうか、さらなるin vivoでの研究が必要である。

まだ、幾つかの疑問が残る。チオトロピウムの抗ウイルス効果を説明するに、我々の結果のみに基づいての説明では困難である。チオトロピウムの未知の効果がRSVに対する抗ウイルス作用に関与している可能性がある。チオトロピウムは、RSVのattachmentやassemblyさらにはbuddingに関連する他の細胞表面受容体の発現を制御しているかもしれない。今後の更なる検討が待たれる。

結 論

チオトロピウムはRhoA活性およびICAM-1細胞表面発現の抑制により、RSV感染を抑制することを示した最初の報告である。更に、チオトロピウムはRSV感染後の合胞体形成を抑制し、IL-6およびIL-8といった炎症性サイトカインの産生を有意に抑制した。それらの所見は、チオトロピウムがICAM-1の細胞表面発現およびRhoA活性を含めた細胞内環境を修飾し、RSV感染および合法体形成を抑制することが示唆された。サイトカイン産生の抑制は、部分的にRhoA活性化の抑制によるものと考えられた。チオトロピウムはCOPD患者に対する治療の第一選択薬として現在使用されているが、我々の結果は、RSVの感染予防やRSV感染による気道炎症の治療に関して重要な可能性を示した。RSV感染に対するチオトロピウムの臨床的有効性を検討するさらなる研究が望まれる。

参考文献

1. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 2005; 352: 1749-1759
2. Beckham JD, Cadena A, Lin J, Piedra PA, Glezen WP, Greenberg SB, Atmar RL. Respiratory viral infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect.* 2005; 50: 322-330.
3. Rohde G, Wiethege A, Borg I, Kauth M, Bauser TT, Gillissen A, Bufe A, Schultze-Werninghaus G. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax* 2003; 58: 37-42.
4. Walsh EE, Falsey AR, Hennessey PA. Respiratory syncytial virus and other infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 791-795.
5. Sommerville RG. Respiratory syncytial virus in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Lancet* 1963; II: 1247-1248.
6. Wilkinson TM, Donaldson GC, Johnston SL, Openshaw PJ, Wedzicha JA. Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173: 871-876
7. Welliver RC. Respiratory syncytial virus infection: therapy and prevention. *Paediatr Respir Rev.* 2004; 5: Suppl A: S127-S133
8. Magon K, Barik S. New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol.* 2004; 14: 149-168
9. Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1987; 68: 2521-2524
10. Walsh EE, Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol.* 1995; 14: 479-485
11. Pastey MK, Crowe JE Jr, Graham BS. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus induced syncytium formation. *J Virol.* 1999; 73: 7262-7270
12. Hall A. Rho GTPases and cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509-514
13. Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem.* 1996; 120: 215-228
14. Arnold A, Konig B, Gallatti H, Werchau H, Konig W. Cytokine (IL-8, IL-6, TNF-alpha) and soluble TNF receptor-1 release from human peripheral blood mononuclear cells after respiratory syncytial virus infection. *Immunology.* 1995; 85: 364-372
15. Gower TL, Peeples ME, Collins PL, Graham BS. RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *Virology.* 2001; 283: 188-196
16. Pastey MK, Gower TL, Spearman PW, Crowe JE Jr, Graham BS. A RhoA derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat Med.* 2000; 6: 35-40
17. Behera AK, Matsuse H, Kumer M, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 188-195
18. Makogoba, MW, Sanders ME, Gunther Luce GE, Gugel EA, Dustin ML, Springer TA, Shaw S. Functional evidence that intercellular adhesion

- molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for LFA-1-dependent adhesion in T cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 1998; 18: 637-640
19. Vignola AM, Campebell AM, Chanez P, Bousquet J, Paul-Lacoste P, Michel FB, Gorderd P. HLA-DR and ICAM-1 expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148: 689-694
 20. Arnold R, Werchau H, Konig W. Expression of adhesion molecules (ICAM-1, LFA-3) on human epithelial cells (A549) after respiratory syncytial virus infection. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996; 107: 392-393
 21. Arnold R, Konig W. ICAM-1 expression and low-molecular-weight G-protein activation of human bronchial epithelial cells (A549) infected with RSV. *J Leukoc Biol.* 1996; 60: 766-771
 22. Matsuzaki Z, Okamoto Y, Sarashina N, Ito E, Togawa K, Saito I. Induction of intercellular adhesion molecule-1 in human nasal epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. *Immunology.* 1996; 88: 565-568
 23. Vincken W, van Noord JA, Greefhorst AP, Bantje TA, Kesten S, Korducki L, Cornelissen PJ; Dutch/Belgian Tiotropium Study Group. Improved health outcomes in patients with COPD during 1yr's treatment with tiotropium. *Eur Respir J.* 2002; 19: 209-216
 24. Anzueto A, Tashkin D, Menjoge S, Kesten S. One-year analysis of longitudinal changes in spirometry in patients with COPD receiving tiotropium. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005; 18: 75-81
 25. Wessler IK, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001; 14: 423-434
 26. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res.* 2006; 7: 73
 27. Graham BS, Perkins MD, Wright PF, Karzon DT. Primary respiratory syncytial virus infection in mice. *J Med Virol.* 1988; 26: 153-62
 28. Mentel R, Wegner U, Bruns R, Gurtler L. Real-time PCR to improve the diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 893-896.
 29. Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 1999; 18: 578-585
 30. McCurdy LH, Graham BS. Role of plasma membrane lipid microdomains in respiratory syncytial virus filament formation. *J Virol.* 2003; 77: 1747-1756
 31. Bitko V, Oldenburg A, Garmon NE, Barik S. Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC Microbiol.* 2003; 3: 9
 32. Mukaida N, Matsumoto T, Yokoi K, Harada A, Matsushima K. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8). *Infamm Res.* 1998; 47: 151
 33. Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Redondo JM, de Landazuri MO. Pyrrolidine dithioracetate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. *Blood.* 1996; 88: 3482-90
 34. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1066-1071
 35. Montaner S, Perona R, Sanger L, Lacal JC. Multiple signaling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem.* 1998; 273: 779
 36. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 1997; 11: 463
 37. Hashimoto K, Peebles RS Jr, Sheller JR, Jarzecka K, Furlong J, Mitchell DB, Hartert TV, Graham BS. Suppression of airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin sensitisation and RSV infection with Y-27632, a Rho kinase inhibitor. *Thorax.* 2002; 57: 524-527
 38. Powrie DJ, Wilkinson TM, Donaldson GC, Jones

P, Scrine K, Viel K, Kesten S, Wedzicha JA. Effect of tiotropium on sputum and serum inflammatory markers and exacerbations in COPD. *Eur Respir J*. 2007; 30: 472–478

COPD患者における気道被覆液ならびに 血漿バイオマーカーの検索

東京電力病院内科

仲村 秀俊

慶應義塾大学医学部呼吸器内科

中村 美穂 白畑 亨 辻村 周子 舘野 博喜

佐山 宏一 石坂 彰敏

川崎市立川崎病院内科

中島 隆裕 高橋 左枝子

はじめに

COPDの罹患率と死亡率は全世界的に増加傾向にある。本邦では喫煙率はいまだに高く、在宅酸素療法、非侵襲的陽圧換気療法等の高額医療を要する呼吸器疾患患者の多くはCOPD患者となっている。

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が、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、それぞれが異なる治療を要する可能性もある。

COPD患者は低肺機能のため気管支鏡下に気管支肺胞洗浄や肺生検を行うことは困難であり、病態解明の障害となってきた。近年石坂らは気管支鏡下に非侵襲的に気道被覆液を採取するマイクロサンプリング法を開発した^{1, 2)}。さらにプロテオーム解析の技術の進歩により、微量の検体から網羅的な蛋白の検出が可能となってきた。

本研究ではマイクロサンプリングプローブにより採取したCOPD患者末梢気道被覆液および血漿を用い、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、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予定である。さらに今年度は、気道上皮細胞間接着分子E-cadherinの可溶型であるsE-cadherinのCOPDバイオマーカーとしての可能性についても検討を加えた。

対象と方法

(検討1) COPD患者15名、対照患者12名において気管支鏡下にマイクロサンプリングプローブを用い、末梢気道より気道被覆液を採取し、バイオラド社(旧サイファージェン社)製プロテインチップ(Q10)を用い、プロテオーム解析を行った。

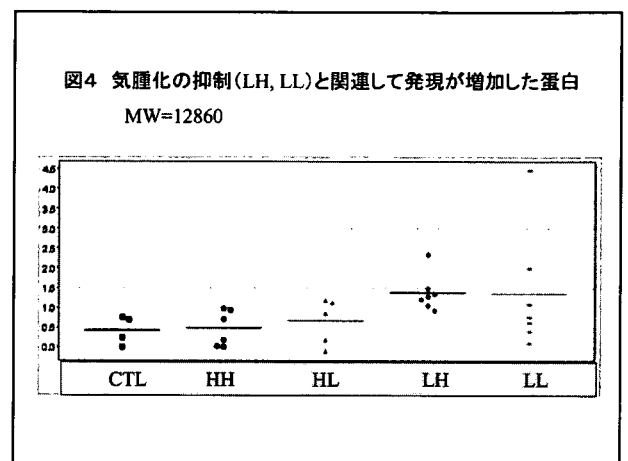
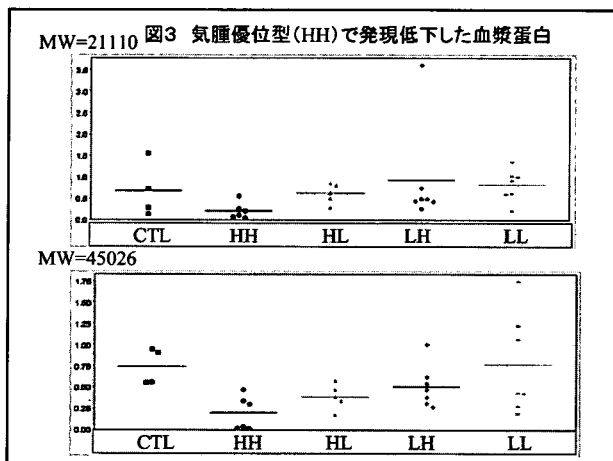
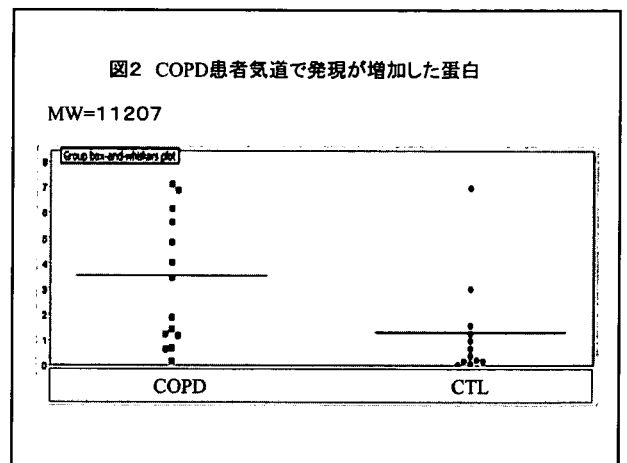
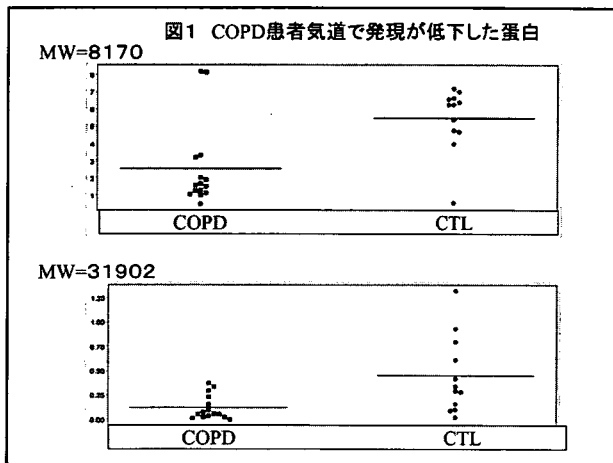
(検討2) 10pack-years以上の喫煙歴を有するCOPDおよびハイリスク患者238名のうち、LAAスコア(胸部CTでの気腫化の程度を視覚法で定量:24点満点)>8かつ%FEV_{1.0}>80%(気腫優位型HH,19例)、LAAスコア<2.4かつ%FEV_{1.0}<60%(気道病変優位型LL,14例)、LAAスコア>8かつ%FEV_{1.0}<60%(気腫気道病変合併型HL,25例)、LAAスコア<2.4かつ%FEV_{1.0}>80%(気腫気道病変軽微型LH,25例)の4群を抽出した。4群間で年齢、喫煙量、現喫煙者比率はマッチさせた。これに対照非喫煙群(17例)を加えた5群でCM10を用い、プロテオーム解析を行った。

(検討3) COPD患者153例、ハイリスク患者69例、喘息患者60例、健常者20例より血漿を採取し、sE-cadherin濃度をELISA法で測定した。また、マイクロサンプリング法により採取したCOPD患者18例、対照患者24例の気道被覆液を用い、同様にsE-cadherin濃度を測定した。

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。

結果

(検討1) 分子量3000-70000Daの間に62のピークが検出された。COPDと対照群(CTL)の比較により、8170、



31902Daのピークは対照群で発現が増強していた ($p < 0.05$, 図1)。一方、11207DaではCOPD群で発現が増強していた ($p < 0.05$, 図2)。

(検討2) 分子量3000-70000Daの間に45のピークが検出された。分子量21110, 45026Daのピークで気腫優位型は他の4群に比べ発現が低下していた ($p < 0.05$, 図3)。また、分子量12860Daのピークで気腫気道病変軽微型と気道病変優位型で他の3群に比べ発現が増加していた ($p < 0.05$, 図4)。

(検討3) COPD群(平均376 ng/ml)およびリスク群(350 ng/ml)では喘息群(295 ng/ml)、健常群(269 ng/ml)に比べ血漿sE-Cadherin濃度が有意に高かった ($p < 0.01$)。ELF中のsE-Cadherinは、Control群(548 ng/ml)とCOPD群(809 ng/ml)で有意差は認めなかったものの、COPD群で高い傾向がみられた。

考 察

プロテインチップによるELF中蛋白の解析によりCOPD特異的なバイオマーカーの検出が可能と考えられた。検

出された蛋白の同定が必須であるが、今後複数のチップを用いた解析を継続し、同定すべき蛋白を決定する予定である。また、血漿を用いた多数例の解析では、COPDの病型を決定する因子の検出が可能と考えられた。

血漿sE-CadherinはCOPDの発症初期より増加し、COPDの診断ならびに喘息との鑑別に有用な可能性が示唆された。ELF中濃度測定の意義については追加データを要すると考えられたが、sE-Cadherin濃度は気道において血中より高く、肺局所での産生が示唆された。

プロテインチップでは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解析が可能である。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(およそ100種類以下)。この欠点を補うため、少なくとも複数の異なるチップを用いる必要があると考えられる。また、一部の症例では2次元電気泳動など、他の方法も併用する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Ishizaka A, Watanabe M, Yamashita T, Ogawa Y, Koh H, Hasegawa N, Nakamura H, Asano K, Yamaguchi K, Kotani M, Kotani T, Morisaki H, Takeda J, Kobayashi K, Ogawa S. New bronchoscopic microsampling probe to measure the biochemical constituents in epithelial lining fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001, 29: 896–898.

- 2) 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。