

GnRH療法の呼吸機能および血清 VEGF-D値に対する影響

順天堂大学医学部呼吸器内科

瀬山 邦明 飛野 和則 郡司 陽子 久能木 真喜子

小池 建吾 佐藤 輝彦 秋吉 妙子 高橋 和久

人体病理病態学

熊坂 利夫

はじめに

リンパ脈管筋腫症Lymphangiomyomatosis (LAM)は、平滑筋細胞様の形態を示す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し、肺では肺組織の破壊により嚢胞が形成される疾患である(1,2)。そのため、拡散障害および閉塞性換気障害を主とする進行性の呼吸機能障害を認め、その経年的肺機能の低下率はおおよそFEV1で -118 ± 142 ml/year(3)、 -75 ± 9.0 ml/year(4)、DLcoでは -0.91 ± 1.54 ml/min/mmHg/year(3)、 -0.69 ± 0.07 ml/min/mmHg/year(4)、と報告されている。一方、日本における全国調査ではLAMの発症様式により予後が異なることが報告され、LAMの臨床像の多様性が明らかにされた(5)。全国調査の結果では、労作時の呼吸困難を契機に診断された症例は予後が不良で、経年的肺機能の低下率がFEV1は -285 ml/year ($-582.9 \sim -71.3$)、FEV1/FVCは -6.1% /year ($-10.7 \sim -2.1$)、%DLcoは -11.9% /year ($-20.7 \sim -3.2$)であったのに対し、自然気胸を契機に診断された予後良好な群では、FEV1は -16.8 ml/year ($-157.1 \sim -46.8$)、FEV1/FVCは -2.5% /year ($-4.2 \sim -0.1$)、%DLcoは -1.6% /year ($-7.2 \sim -6.4$)であった(5)。

LAMに対する治療として、従来からプロゲステロン投与を主体とするホルモン治療が行われていたが、有効性については一定しない(3,4)。年間DLco低下率の有意な減少やFEV1低下率の減少傾向を認めたとする報告もあるが(3)、有効性があっても減少率の軽減あるいは安定化が主であり、呼吸機能が改善したとの報告はない。一方、日本では欧米で主に使用される4週間に1回投与が可能なプロゲステロン製剤が入手できないため、GnRH (gonadotropin-releasing hormone agonist)

治療が主に実施されている。GnRH治療は、LAMと同様に女性ホルモン依存性の良性平滑筋細胞腫瘍である子宮筋腫に対する有用性が確立されており、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し(6,7)、縮小させる効果が報告されている(8)。一方、プロゲステロンは子宮筋腫細胞に対しては、増殖抑制ではなく、むしろ筋腫細胞の増殖を促進する効果が報告されている(9)。

昨年の分担研究では、乳糜胸水や腹水を合併するLAM症例におけるGnRH治療の効果をレトロスペクティブに検討し、乳糜漏の管理を容易にし、乳糜中のLAM細胞クラスターの減少と大きさの縮小、LAM細胞のアポトーシスを誘導することを報告した(10)。そこで、本年度はGnRH治療の肺機能への効果とリンパ管新生の指標として血清VEGF-D値をレトロスペクティブに検討した。

対象と方法

1985年から現在までの期間に、順天堂大学医学部附属順天堂医院を受診したLAM症例115例 (sporadic LAM 100例、TSC-LAM15例)のうち、GnRH療法 (leuprorelin acetate 1.88mg/4週毎、あるいはgoserelin acetate 1.8 mg/4週毎)を施行して2年以上経過し、呼吸機能検査値が得られている19例を検討対象とした。診断時年齢は平均 33.1 ± 5.7 歳であった。7例は数年間の無治療での経過観察期間中に%FEV1 (FEV1 % predicted)、%DLco/VA (DLco/VA % predicted)などの呼吸機能検査値に悪化を認めたため、経過途中でGnRH療法を開始した(A群)。一方、12例は診断時より高度の呼吸機能障害を認めたため、診断後間もなくGnRH療法を開始した(B群)。両群での呼吸機能検査値の経年的推移を解析した。一方、

図1

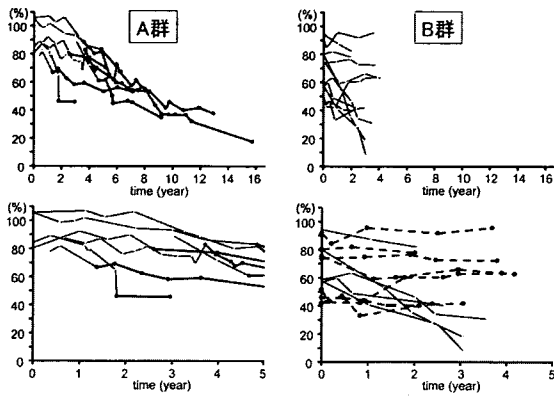


図1. 経年的%FEV1の推移に対するGnRH治療の効果
上段の図は全経過の推移を示し、下段は最初の5年間の推移のみを示している。
A群ではGnRH治療開始後の推移を太線で示している。
B群では最初からGnRH治療が行われているが、点線は推移が横ばいあるいは安定化している症例を示す。

図2

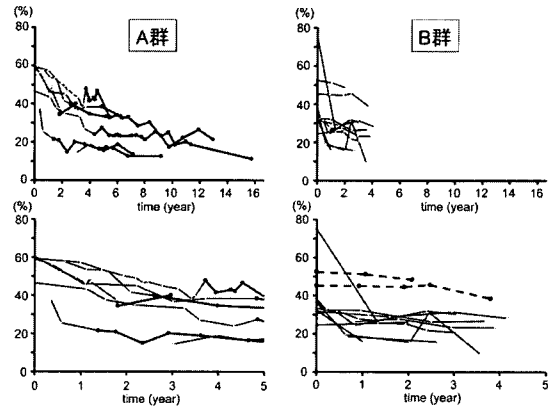


図2. 経年的%DLco/VAの推移に対するGnRH治療の効果
図1と同様に、上段の図は全経過の推移、下段は最初の5年間の推移のみ、を示している。A群ではGnRH治療開始後の推移を太線で示し、B群では%DLco/VA>40%の時点でGnRH治療を開始し、かつ経過が安定している症例を点線で示している。

血清VEGF-D値は1年以上の経過で反復測定した14例を評価した。血清は採取後-70度に保存し、ELISAキットを用いて測定した(11)。

結果

1. 経年的肺機能の推移に対するGnRH治療の効果

%FEV1と%DLco/VAの推移を図1および2に示す。%FEV1の経年的悪化の軽減はA群で3例、B群では7例にGnRH療法開始後に認められた。しかし、B群ではGnRH

図3

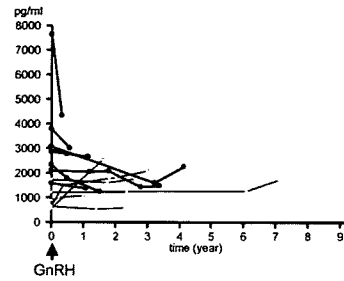


図3. 血清VEGF-Dの推移に対するGnRH治療の効果
GnRH治療開始前のデータを時間0とし、GnRH治療開始後のVEGF-D値の推移を示す。太線で示した症例は低下あるいは低下傾向を認めた症例を示す。

治療前の経過が不明であり、安定化した経過がGnRH治療によるものか、自然経過であるのか不明である。一方、%DLco/VAの推移については両群ともGnRH治療後は比較的安定化した推移を示していた。しかし、両群とも治療開始時に%DLco/VA<40%の症例がほとんどであった。林田らによる全国調査の結果では、%DLco/VA<40%になると病態が進行しても呼吸機能検査値の変化はわずかとなり、呼吸機能検査値を指標とした効果判定は困難であることが報告されている。例数は少ないが、B群では2例がGnRH治療開始時に%DLco/VA>40%であったが、この2症例では治療後安定した経過が得られていた。

2. 血清VEGF-Dの推移に対するGnRH治療の効果

図3に結果を示す。7例で治療後に低下あるいは低下傾向、4例で不変、3例で増加、が認められた。

考察

GnRH治療を開始した症例は、昨年に本研究班でまとめたLAMの治療および管理の手引きに準じて実施している(12)。LAMの診断当初からGnRH治療が行われた症例は、診断当時の%FEV1や%DLco/VAにばらつきが認められるが、スパイロメトリーの結果は比較的良好でも酸素化障害の強い症例、乳糜胸腹水を合併する症例、などが含まれているためである。一定期間の経過観察後にGnRH治療が開始された症例では、3例は%FEV1の悪化率は軽減されている(奏効率3/7=42%)。一方、LAM診断時から開始した症例では7/12例に安定化した経過が得られている(奏効率7/12=58%)。このような

評価が妥当であるかは一定の患者選択基準、評価基準にもとづいておこなう前向き研究が必須であるが、①疾患の稀少性、経過の多様性、等の疾患自体の特殊性、②たとえ何らかの治療効果が期待されるにしてもLAMの進行を防止し肺機能を改善する効果がないことは明かである、という治療法のメリットの少なさ、の2点から実施は困難である。最近、NIHグループは11例の閉経前LAM症例に対してtriptorelinというGnRHを用いた3年間の治療を行い肺機能への効果を検討したが、有意な効果を得られなかったと報告している(13)。一方、イタリアのグループは肺機能を指標とした評価ではなく生存率に関して考察し、ホルモン治療の有効性を示唆している(14)。10年以上の慢性的経過をたどる疾患に対する治療効果を数年間の呼吸機能指標の推移のみで評価することの困難さを示しているわけであるが、観点を変えればLAMに対するホルモン治療は有効性の高い治療ではないことと表裏一体であることを示している。ラバマイシンなどのより有効性の期待される新規治療の開発が望まれるが、それまでの代替治療としてGnRH療法には一定の役割があることを、後ろ向き研究ではあるが、本研究成果は示していると考えられる。

文 献

- Carrington CB, Cugell DW, Gaensler EA et al. Lymphangi leiomyomatosis. Physiologic-pathologic-radiologic correlations. *Am Rev Respir Dis*;116: 977-95, 1977.
- Arnold S, Kristof JM. Lymphangi leiomyomatosis. In: Marvin I, Schawarz TEKJ, ed. *Interstitial Lung Disease, Fourth Edition ed.* London: BC Decker Inc., 2003;851-864.
- Johnson SR, Tattersfield AE. Decline in lung function in lymphangi leiomyomatosis: relation to menopause and progesterone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*;160:628-33, 1999.
- Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Hathaway O, Moss J. Decline in lung function in patients with lymphangi leiomyomatosis treated with or without progesterone. *Chest*;126:1867-74, 2004.
- Hayashida M, Seyama K, Inoue Y, Fujimoto K, Kubo K. The epidemiology of lymphangi leiomyomatosis in Japan: A nationwide cross-sectional study of presenting features and prognostic factors. *Respirology*;12:523-30, 2007.
- Watanabe Y, Nakamura G, Matsuguchi H, Nozaki M, Sano M, Nakano H. Efficacy of a low-dose leuprolide acetate depot in the treatment of uterine leiomyomata in Japanese women. *Fertil Steril*;58: 66-71, 1992.
- Broekmans FJ. GnRH agonists and uterine leiomyomas. *Hum Reprod*;11 Suppl 3:3-25, 1996.
- Higashijima T, Kataoka A, Nishida T, Yakushiji M. Gonadotropin-releasing hormone agonist therapy induces apoptosis in uterine leiomyoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*;68:169-73, 1996.
- Maruo T, Matsuo H, Samoto T et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids*;65:585-92, 2000.
- 瀬山邦明ら. 乳糜胸腹水合併LAM症例における低用量GnRH療法の効果. 厚生労働科学研究費補助金難治性弛緩克服研究事業 呼吸不全に関する調査研究平成18年度研究報告書:112-120, 2007.
- Seyama K, Kumasaka T, Souma S et al. Vascular endothelial growth factor-D is increased in serum of patients with lymphangi leiomyomatosis. *Lymphat Res Biol*;4:143-52, 2006.
- 呼吸不全に関する調査研究. リンパ脈管筋腫症Lymphangi leiomyomatosis (LAM)の治療および管理の手引き 厚生労働科学研究費補助金難治性弛緩克服研究事業 呼吸不全に関する調査研究平成18年度研究報告書:19-22, 2007.26-29, 2007.
- Harari S, Cassandro R, Chiodini J, Taveira-DaSilva AM, Moss J. Effect of a gonadotrophin-releasing hormone analogue on lung function in lymphangi leiomyomatosis. *Chest*, 2007.
- Schiavina M, Di Scioscio V, Contini P et al. Pulmonary lymphangi leiomyomatosis in a karyotypically normal man without tuberous sclerosis complex. *Am J Respir Crit Care Med*;176:96-8, 2007.

リンパ脈管筋腫症におけるマスト細胞の役割： 血清中マスト細胞関連バイオマーカーの検討（第一報）

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

臨床研究センター 内科

井上 義一 広瀬 雅樹 松室 昭子 橋 和延 大家 晃子
西山 明秀 新井 徹 服部小夜子 中川美紀子 坂谷 光則

【研究要旨】 【目的】 我々はこれまでリンパ脈管筋腫症(LAM)の肺組織中でLAM細胞増殖部位でマスト細胞が多く認められbFGFを発現、かつLAM細胞はFGFRsを発現している事を報告した。マスト細胞は他臓器、他疾患においても組織修復、脈管新生の場で重要な役割を担っていると考えられるが、今回マスト細胞の増殖に関連する各血液中バイオマーカーの挙動について検討を行った。

【対象と方法】 LAM患者48名（女性48名男性0名、年齢 33 ± 18 才）、健常コントロール21名（女性21名、男性0名、年齢 26 ± 4 才）の血清中のIL-4, IL-5, IL-10, tryptase, bFGF, VEGF-A, VEGF-DをEIA法で測定した。

【結果】 LAM患者血清中IL-5, IL-10, VEGF-Dは健常者に比べて有意に増加していた ($p < 0.05$)。Tryptase（一部患者で測定）は健常者と差を認めなかった。bFGFは今回感度以下であった。血清中IL-5, IL-10は各々有意相関し変動を示したが ($p < 0.05$)、VEGF-Dとは相関しなかった。

【考察】 LAM患者ではTh2サイトカインの発現が亢進しており、マスト細胞の増殖への関与が示唆された。

目 的

我々はこれまでリンパ脈管筋腫症(LAM)の肺組織中でLAM細胞増殖部位でマスト細胞が多く認められbFGFを発現、かつLAM細胞はFGFRs(Flg, Bek)を発現している事を報告した(1)。更に我々はマスト細胞が線維化の場でも増加していること、LAMの結節中にはcollagenが栓出される事を報告した(1)。また最近線維化部位で増加するマスト細胞にchymaseが発現する事(2)、LAM組織中でマスト細胞もchymaseを発現すると共にrenin-angiotensin系の酵素をすべて含有している事、angiotensin IIがLAM細胞の増生に係わっている可能性も示唆されている(3)。マスト細胞はTh2有意の状態増生活性化される事が多いが線維症ではTh2サイトカインの発現が増加していると考えられている(4)。今回我々はLAM患者の血液中のTh2サイトカインの変動について検討した。

「対象と方法」

(1) 対象はLAM患者48名（女性48名男性0名、年齢 33 ± 18 才）、健常コントロール21名（女性21名、男性0名、

年齢 26 ± 4 才）

(2) 血清中のtryptase IL-4, IL-5, IL-10, bFGF, VEGF-A, VEGF-DをEIA法で測定した。

「結 果」

IL-5, IL-10は健常者（それぞれ 2.7 ± 1.7 pg/ml, 3.5 ± 2.3 pg/ml）に比べてLAM患者血清中（それぞれ 1.2 ± 1.1 pg/ml, 1.9 ± 2.3 pg/ml）で有意に増加していた（図1, $p < 0.01$ ）。Tryptase（一部患者で測定）は健常者と差を認めなかった（図2, $p > 0.05$ ）。血清中bFGFは今回の測定法では多くの患者で測定感度以下であったが一部LAM患者で高い値を示す患者がいた（データ示さず）。VEGF-AはcontrolとLAMで有意差を認めなかったが、VEGF-DはLAMではcontrolに比べて有意差を認めた（図3, $p < 0.05$ ）。

血清中IL-4濃度は今回controlとLAMの間で有意な差を認めなかったものの、血清中IL-5, IL-10と有意相関した（それぞれ $r = 0.986$, $r = 0.942$, $p < 0.05$ ）。IL-5とIL-10も強い有意相関を認めた（ $r = 0.98$, $p < 0.05$ ）。しかしながら、VEGF-Dは他のサイトカインとは相関

しなかった(表1)。

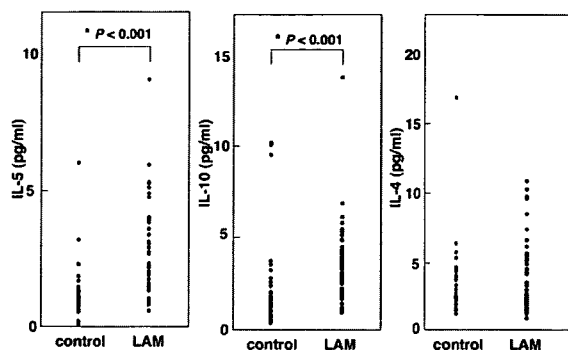


図1 LAM患者血清中のIL-5、IL-10、IL-4濃度。LAM患者ではIL-5、IL-10が健常者に比べ有意に高値であった(p<0.001)。

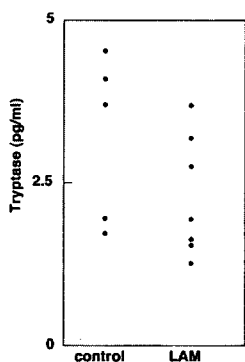


図2 LAM患者血清中のtryptase濃度。LAM患者と健常者で有意差を認めなかった。

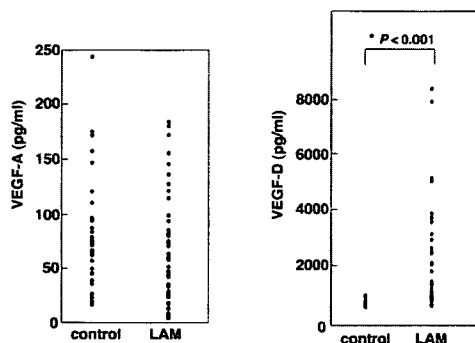


図3 LAM患者血清中のVEGF-A、VEGF-D濃度。LAM患者ではVEGF-Dは健常者に比べ有意に高値であった(p<0.001)。

表1 LAM患者の血清中のIL-4、IL-5、IL-10、FGF (basic FGF)、VEGF(VEGF-A)、VEGF-Dの相関係数。(＊は有意相関を認めた。P<0.05)

	IL-4	IL-5	IL-10	FGF	VEGF	VEGF-D
IL-4		<u>0.9862*</u>	<u>0.9421*</u>	-0.2411	0.1108	0.0723
IL-5	0.9862		<u>0.9803*</u>	-0.0874	0.2687	0.1047
IL-10	0.9421	0.9803		0.0602	0.3980	0.2543
FGF	-0.2411	-0.0874	0.0602		<u>0.9287*</u>	0.2864
VEGF	0.1108	0.2687	0.3980	0.9287		0.2243
VEGF-D	0.0723	0.1047	0.2543	0.2864	0.2243	

「考 察」

LAM患者の血清中で増加していたIL-5、IL-10はTh2サイトカインに分類される。LAMは進行性難治性の疾患であるが(1)、LAM細胞の集合する結節部位ではcollagenが沈着し、組織修復や脈管新生に関わるマスト細胞が増加している(1)。線維化部位では一般的に線維化部位ではTh1からTh2へのシフトが生じていると考えられている(4)が、マスト細胞はこれらTh2サイトカインにより活性化、modulateされる。LAM患者におけるTh2サイトカインの発現が亢進は、マスト細胞の増殖の関与と組織破壊と修復、線維化への関与が示唆される。また最近LAM患者血清中でVEGF-Dが増加していると報告されているが(6)、我々の検討でも、LAMに特異的に増加しLAMの診断に有用であると考えられた(7)。しかしながら、VEGF-Dの増加はTh2サイトカインの変動と相関せず、LAM病態形成の役割は異なる可能性がある。これらの病態解析はLAM克服のための今後の治療戦略のためにも重要であると考えられた。

文 献

- (1) Inoue Y, King TE Jr, Barker E, Daniloff E, Newman LS. : Basic fibroblast growth factor and its receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and lymphangioliomyomatosis. *Am J Resp Crit Care Med* 166: 765–773, 2002.
- (2) Hirata K, Sugama Y, Ikura Y, Ohsawa M, Inoue Y, Yamamoto S, Kitaichi M, Ueda M: Enhanced mast cell chymase expression in human Idiopathic interstitial pneumonia. *Int J Mol Med*.19: 565–570, 2007.
- (3) Valencia JC, Pacheco–Rodriguez G, Carmona AK, Xavier J, Bruneval P, Riemenschneider WK, Ikeda Y, Yu ZX, Ferrans VJ, Moss J. : Tissue–specific renin–angiotensin system in pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 40, 2006.
- (4) Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, Alms WJ, White B. : Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Reum.* 42: 1168–78, 1999
- (5) Hayashida M, Seyama K, Inoue Y, Fujimoto K, Kubo K; Respiratory Failure Research Group of the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare. : The epidemiology of lymphangioliomyomatosis in Japan: a nationwide cross–sectional study of presenting features and prognostic factors. *Respirology*. 12: 523–530, 2007.
- (6) Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, Tominaga S, Fukuchi Y. Vascular endothelial growth factor–D is increased in serum of patients with lymphangioliomyomatosis. *Lymphat Res Biol*. 4:143–52, 2006.
- (7) Young L, Inoue Y, McCormick F. Diagnostic potential of serum VEGF–D for lymphangioliomyomatosis. *N Engl J Med* (in press)

胸部HRCT像によるリンパ脈管筋腫症 (LAM) の 肺野および気道病変の解析

順天堂大学医学部呼吸器内科

飛野 和則 郡司 陽子 小池 建吾 久能木 真喜子 佐藤 輝彦
秋吉 妙子 高橋 和久 瀬山 邦明
京都大学大学院医学研究科呼吸器内科学
平井 豊博 三嶋 理晃

はじめに

リンパ脈管筋腫症 (Lymphangiomyomatosis : LAM) は、主として妊娠可能年齢の女性に発症する希少疾患で、肺の嚢胞性病変が徐々に進展し、労作時の息切れ、血痰、咳嗽、乳糜胸水などを認める[1]。LAMの胸部HRCTについては多くの検討がなされており、嚢胞性病変は全肺野にびまん性にほぼ均一に分布し、コンピューターソフトによる定量的な解析から、低吸収領域 (low attenuation area : LAA) の占める割合と肺機能検査値が有意な相関を示すと報告されてきた[2-4]。また、嚢胞性肺疾患である肺気腫においても既に同様の検討がなされており、肺気腫の場合は嚢胞性病変が上肺野により多く認められることと、下肺野における嚢胞性病変の占める割合が肺機能検査値により大きく影響することが分かっている[5,6]。また、COPDや喘息では、胸部HRCTにおける気管支壁の厚みと肺機能検査値に一定の相関が見られると報告されているが[7,8]、LAMの病理組織の検討でも病勢の進行とともに気道病変が認められることが報告されている[9]。そこで今回我々は、当科で経験したLAM症例について、胸部HRCTでのLAAの占める割合やその分布と、肺機能検査値の相関について検討した。また、気道壁の厚みと肺機能検査値の相関についても併せて検討した。

対象と方法

1. 対象

2000年1月1日から2006年10月30日までの間に当科を受診したLAM症例のうち、HRCTを撮影し、かつ肺機能検査を施行している30症例を対象とした。内訳は、全

例女性かつsporadic LAMで、CT撮影時年齢は 38.3 ± 8.9 歳 (平均 \pm SD) であった。

2. 方法

[胸部HRCT]

Aquilion 64 (東芝メディカルシステムズ株式会社)

臥位・深吸気条件下、造影剤使用せず

撮影パラメーター：管電圧120kV、管電流150mA、スライス厚2.0mm、スライス間隔1cm、field of view 32cm、再構成関数 FC83

[CT画像解析]

・嚢胞の分布と肺機能検査値

HRCTで得られたデータを用い、コンピューターソフトにより -960 HU以下のCT値を持つピクセルをLAAと定義し、肺野を自動抽出し、各スライスにおいて肺野面積に対するLAA面積の100分率 (LAA%) を計測した (図1) [7,10]。そして、肺野全体のLAA%の平均値と肺機能検査値 (FEV1/FVC、%RV/TLC、%DLCO/VA) の相関について検討した。

次に気管分岐部上2cmと横隔膜上5cmを分割線とし肺野を上・中・下肺野の3肺野に分割後、各肺野のスライスにおけるLAA%の平均値を算出した。3肺野のLAA%平均値の差について統計学的検定を行い、上・中・下肺野のいずれかの肺野のみでLAA%平均値が優位に大きい症例をそれぞれ上・中・下肺野型とし、下肺野のみ少ない例を上中肺野型、中肺野のみ少ない例を上下肺野型、上肺野のみ少ない例を中下肺野型、3肺野で有意差のない例をびまん性とした (図3)。また、それぞれの肺野のLAA%平均値と肺機能検査値との相関についても検討した。

・気道壁の厚さと肺機能検査値

右下葉区域枝であるB8・B9・B10が同一スライス上

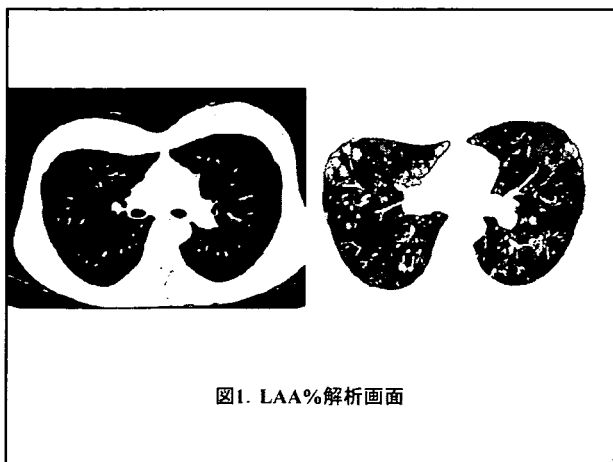


図1 : low attenuation areaのコンピューター解析画面

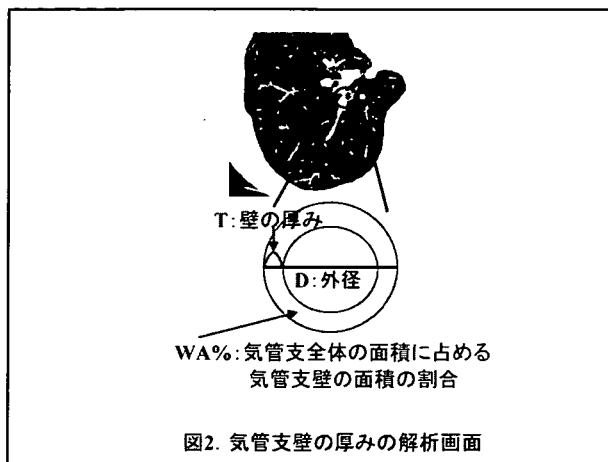


図2 : 気管支壁の厚みのコンピューター解析画面

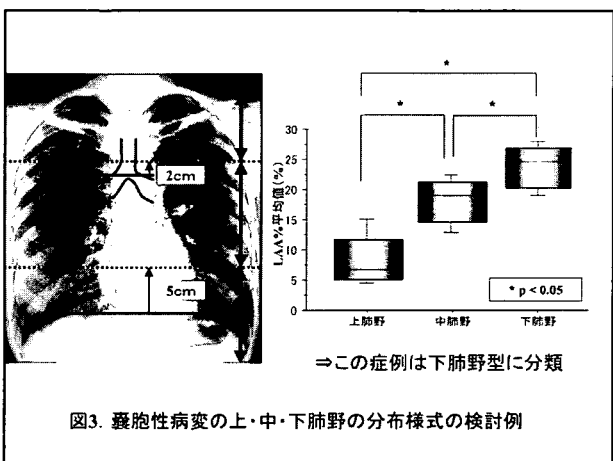


図3 : 嚢胞性病変の上・中・下肺野の分布様式の検討例

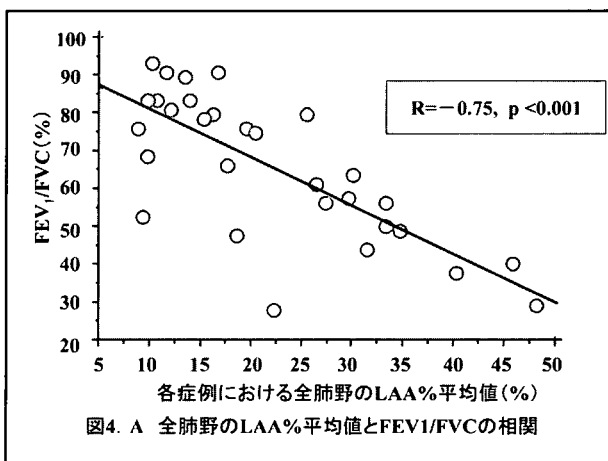


図4 : A 全肺野のLAA%平均値とFEV1/FVCの相関

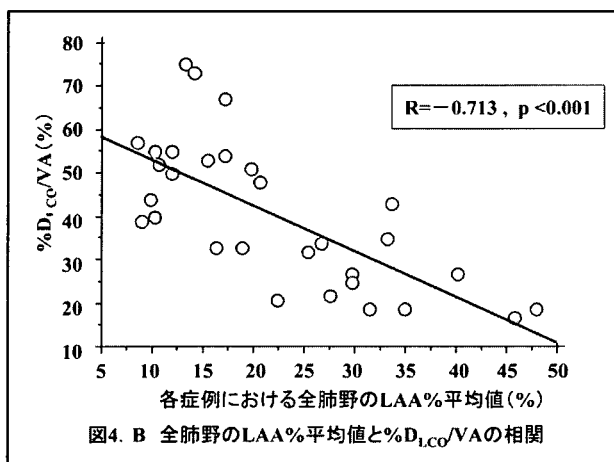


図4 : B 全肺野のLAA%平均値と%D_{1,CO}/VAの相関

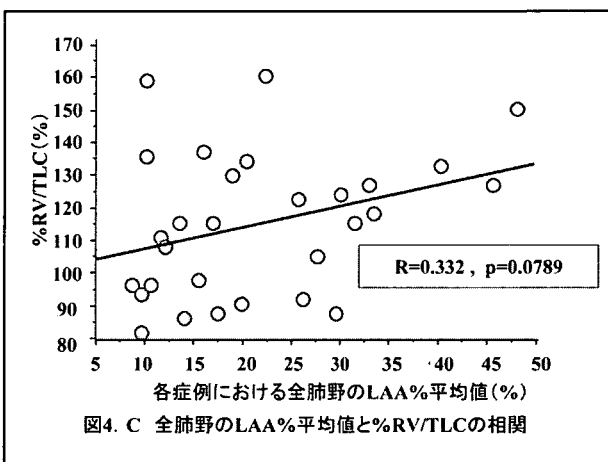


図4 : C 全肺野のLAA%平均値と%RV/TLCの相関

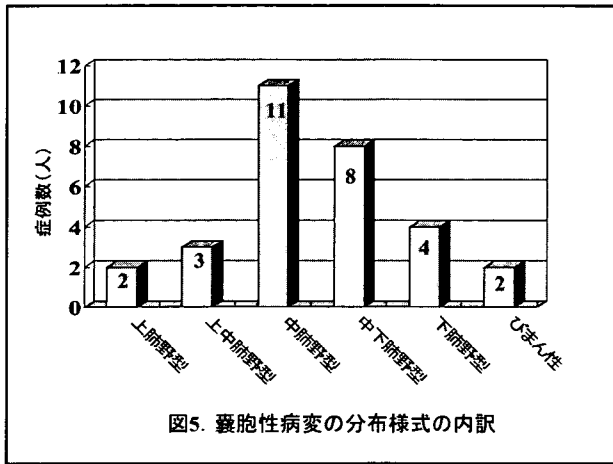


図5. 嚢胞性病変の分布様式の内訳

図5：嚢胞性病変の分布様式の内訳

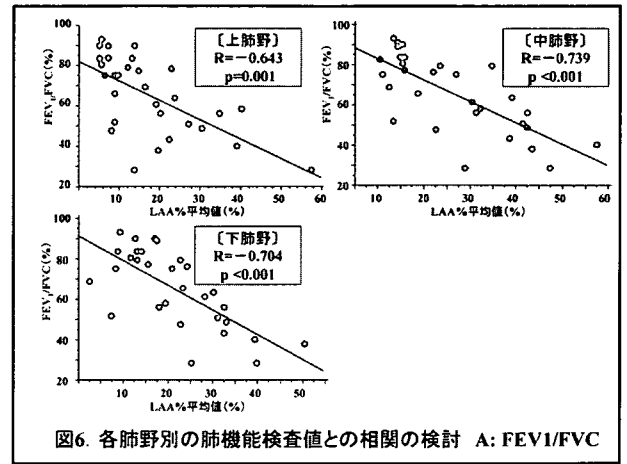


図6. 各肺野別の肺機能検査値との相関の検討 A: FEV1/FVC

図6：各肺野別の肺機能検査値との相関の検討
A FEV1/FVC

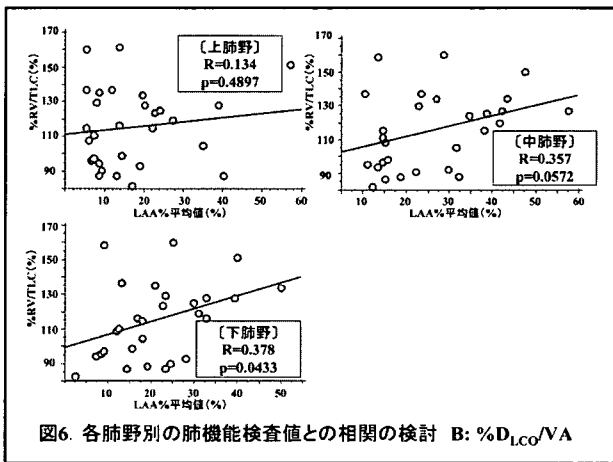


図6. 各肺野別の肺機能検査値との相関の検討 B: %D_{LCO}/VA

図6：B %D_{LCO}/VA

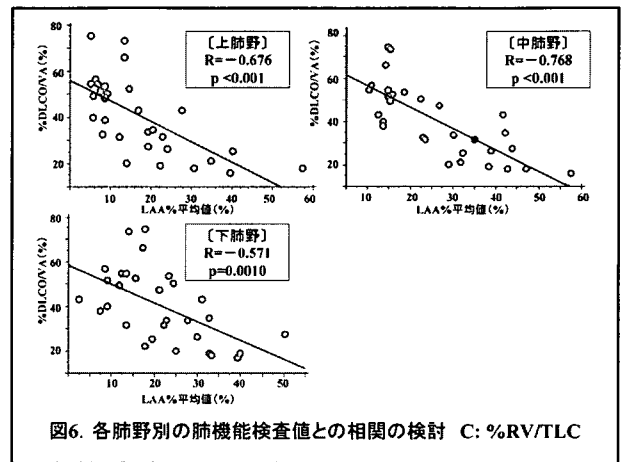


図6. 各肺野別の肺機能検査値との相関の検討 C: %RV/TLC

図6：C %RV/TLC

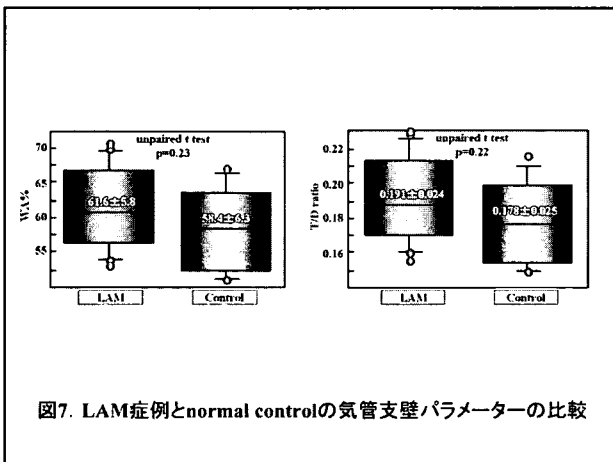


図7. LAM症例とnormal controlの気管支壁パラメーターの比較

図7：LAM症例とnormal controlの気管支壁パラメーターの比較

	Linear regression		Multiple regression vs LAA%+WA%
	LAA%	WA%	
FEV1/FVC	-0.758**	-0.506*	-0.812**
%FEV1	-0.741**	-0.460	-0.782**
RV/TLC	0.523*	0.110	0.525
%RV/TLC	0.456	0.089	0.459
DLCO/VA	-0.828**	-0.343	-0.834**
%DLCO/VA	-0.805**	-0.325	-0.810**

*: p<0.05 ** : p<0.01

表1. WA%と肺機能検査値の相関と、LAA%にWA%を付加した場合の肺機能検査値との相関

表1：WA%と肺機能検査値の相関と、LAA%にWA%を付加した場合の肺機能検査値との相関の検討

に確認できるスライスのみを選択し、これらのうち最もよく描出できた気管支を対象として、コンピューターソフトを使用し気管支壁の厚みを計測した(図2)[6,7]。気管支壁の厚みを示すパラメーターとして、気管支壁の厚さ(T)と気管支外径(D)の比(T/D ratio)、気管支全体の面積に占める気管支壁の面積の割合(WA%)を算出した。対象としたsporadic LAM 30症例のうち、この方法で解析できたのは17症例であった(38.5±7.4歳;平均±SD)。normal control 8例(全例女性・非喫煙者、33.0±3.1歳;平均±SD)を対照とし、同様にHRCTを撮影し気管支壁の厚みの検討を行い、両者の比較を行った後、LAM症例においてT/D ratio、WA%と各種肺機能検査値との相関を検討した。

結 果

・全肺野のLAA%平均値と肺機能検査値

全肺野のLAA%平均値は、10%未満のものが4例、10%台が12例、20%台が7例、30%台が4例、40%台が3例であった。肺機能検査値との相関を検討した結果、FEV1/FVC ($r=-0.75$, $p<0.001$)、%DLCO/VA ($r=0.713$, $p<0.001$)と強い負の相関を示し、%RV/TLC ($r=0.332$, $p=0.0789$)とは有意な相関関係は認められなかった(図4A-C)。

・嚢胞性病変の上・中・下肺野の分布様式と、肺野別の肺機能検査値との相関

分布様式の内訳は、上肺野型2例、上中肺野型3例、中肺野型11例、中下肺野型8例、下肺野型4例、びまん性2例であり、中・下肺野を中心に嚢胞が分布している症例が多かった(図5)。上・中・下の各肺野別のLAA%平均値と肺機能検査値の相関について検討したところ、FEV1/FVCについては中・下肺野で強い負の相関を示し(中肺野; $r=-0.739$, $p<0.001$ 、下肺野; $r=-0.704$, $p<0.001$)、%RV/TLCでは下肺野のみで有意な相関が認められ($r=0.378$, $p=0.043$)、%DLCO/VAでは中肺野で最も強い相関を示した($r=-0.768$, $p<0.001$)(図6A-C)。これらのことから、中・下肺野における嚢胞性病変の程度は、上肺野と比べより肺機能検査値に与える影響が大きいことが示された。

・気管支壁の厚みと肺機能検査値

気管支のパラメーターについてLAM症例とnormal controlと比較した結果、症例数の問題から統計学的有

意差は得られなかったものの、LAM症例においてT/D ratio (LAM vs normal control ; 0.191 ± 0.024 vs 0.178 ± 0.025)、WA% (LAM vs normal control ; 61.6 ± 5.8 vs 58.4 ± 6.3)ともに値が大きい傾向が認められた(図7)。

肺機能検査値との相関について検討した結果、T/D ratioは有意な相関を示さず、WA%はFEV1/FVCについて弱い相関を示すのみであった。そこで、COPDにおいて過去に報告されているように[6]、LAA%と肺機能検査値の相関がLAA%にWA%を付加した時に改善されるかどうかを検討した。その結果、FEV1/FVCにおいて良好な改善が認められ、肺胞障害を示すLAA%と中枢気道障害を示すWA%が相補的にLAMの閉塞性障害を説明できることが示唆された(表1)。

考 察

LAMの胸部HRCT所見についての報告は多数あるが、肺の嚢胞性病変の分布について定量的に検討した報告は少なく、視覚的な評価も含めて、上・中・下肺野の分布は均一であるとされてきた。しかし今回当院の症例について検討した結果、中・下肺野を中心に嚢胞性病変が分布するパターンが多いことが示された。中・下肺野は生理学的に血流・組織間液の多い部位であり、同部位に優位に嚢胞性病変が存在していたという今回の結果は、LAMはCOPDと病態が異なり、LAM細胞が転移により進展することを示唆している可能性があると考えられる。また、肺野全体のLAA%平均値とFEV1/FVC、%DLCO/VAが強い負の相関を示すことと、中・下肺野のLAA%が上肺野のそれと比べてより強くこれらの検査値と相関することが確認され、この点においてはCOPDと同様であった。

気管支壁はnormal controlと比しLAM症例の群で肥厚している傾向が認められ、これはLAMの中枢気道病変を表しているものと考えられる。肺機能検査値との相関の検討において、肺胞障害を示すLAA%と中枢気道障害を示すWA%が相補的にLAMの閉塞性障害を説明できることが示唆され、この点でもCOPDと同様の所見であった。今後normal controlとLAM症例をさらに蓄積し、気管支壁の厚みについて統計学的有意差が得られるか再検討する予定である。また、気管支壁の厚みの経時的変化の検討、LAA%との相関、上・下葉の気道病変の均一性の検討などを行い、気道病変の進展について検討する予定である。

参考文献

1. Corrin B, L.A., Friedman P., Pulmonary lymphangiomyomatosis: a review. . Am J Pathol, 1975. 79: p. 348–82.
2. Crausman, R.S., et al., Quantitative CT predicts the severity of physiologic dysfunction in patients with lymphangiomyomatosis. Chest, 1996. 109(1): p. 131–7.
3. Avila, N.A., et al., Lymphangiomyomatosis: correlation of qualitative and quantitative thin-section CT with pulmonary function tests and assessment of dependence on pleurodesis. Radiology, 2002. 223(1): p. 189–97.
4. Paciocco, G., et al., Diffuse cystic lung diseases: correlation between radiologic and functional status. Chest, 2004. 125(1): p. 135–42.
5. Nakano Y, S.H., Muro S et al., Comparison of low attenuation areas on computed tomographic scans between inner and outer segments of the lung in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence and contribution to lung function. . Thorax, 1999. 54: p. 384–9.
6. Tadashi OHARA, T.H., Susumu SATO, Atsuyasu SATO, Michiyoshi NISHIOKA, Shigeo MURO and A.M. MISHIMA, Comparison of airway dimensions in different anatomic locations on chest CT in patients with COPD. Respirology, 2006. 11: p. 579–585.
7. Nakano Y, M.S., Sakai H et al., Computed tomographic measurements of airway dimensions and emphysema in smokers: correlation with lung function. . Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2000. 162: p. 1102–8.
8. Niimi A, M.H., Amitani R. et al., Airway wall thickness in asthma assessed by computed tomography: relation to clinical indices. A. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2000. 162: p. 1518–23.
9. Moss, J., LAM and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation, in Lung Biology in Health and Disease. 1999, National Institutes of Health: Bethesda, Maryland. p. 171–217.
10. Sakai N, M.M., Nishimura K, Itoh H, Kuno K., An automated method to assess the distribution of low attenuation areas on chest CT scans in chronic pulmonary emphysema patients. . Chest, 1994. 106: p. 1319–25.

肺リンパ脈管筋腫症(Lymphangiomyomatosis: LAM)における、matrix metalloproteinase-7 (MMP-7)とcaveolin-1発現の検討

北海道大学大学院医学研究科呼吸器内科学分野

北海道大学病院第一内科

別役 智子 小田島 奈央 南須原 康行 西村 正治

はじめに

LAMは妊娠可能な年齢の女性に好発し、病理学的に異常な平滑筋細胞増殖(LAM細胞)と嚢胞形成を特徴とする稀な不可逆進行性の疾患である(1)。細胞外基質を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteinases:MMPs)の中で、4型コラーゲン分解酵素であるMMP-2 (gelatinase A, 72kD) やMMP-9 (gelatinase B, 92kD) はLAM細胞に発現することが過去に報告されており、これらの酵素により肺胞壁が分解され嚢胞が形成されると考えられている(2,3)。一昨年度、我々はGelatin zymographyを用いた検討でLAM患者の血清MMP-9が高値を示すこと、また昨年度は、MMPs誘導能を有するExtracellular matrix metalloproteinase (EMMPRIN)がLAM細胞に高発現することを報告し、LAMの病態形成への関与を示してきた。

MMP-7はEMMPRINが誘導しうる蛋白で、近年LAMの治療薬として注目されているsirolimus投与により直腸癌のcell lineにおけるMMP-7発現が低下する報告がある(4)。また、血管内皮細胞・肺胞I型上皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞などの細胞膜に内在する蛋白であるcaveolin-1は、細胞増殖などを調節する生理学的役割を有している(5,6)が、この発現が癌細胞で低下していること(7,8)や、caveolin-1がEMMPRINの糖鎖修飾や多量体形成を阻害することが報告されている(9,10)。我々は、EMMPRINが高発現する線維化肺の再生上皮において、MMP-7が高発現し(11)、caveolin-1発現が低下することを報告している(12)。そこで、本年度は、MMP-7とcaveolin-1に注目し、そのLAM細胞における発現を免疫組織学的に検討し、LAM結節におけるMMP-7 mRNAやcaveolin-1 mRNA発現、またBAL液中MMP-7量を測

定する。

対象と方法

1. 免疫染色

臨床病理学的に診断されたLAM患者4名の肺組織パラフィン切片を用いてMMP-7とcaveolin-1の免疫染色を施行した。方法は、以前我々が報告したものと同様である(13)。使用した抗体は、マウス抗ヒトMMP-7モノクローナル抗体(Clone ID2, NeoMarkers)、ラビット抗ヒト・マウスcaveolin-1モノクローナル抗体(N20 sc894, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)である。

2. RT-PCR

手術で得たLAM患者4名の全肺組織と非喫煙妊娠可能年齢の健常女性コントロール4名の肺組織を1cm四方に切断し、OCTcompoundを肺に注入し再膨張させた後、凍結組織標本として-70℃にて保存する。7ミクロン厚に薄切した凍結標本切片約15枚からQiagen社製RNeasy Mini kitを用いてtotal RNAを抽出し、増幅後RT-PCRを用いてmRNA量を定量した(14)。Reverse transcription後の検体をcDNAとし希釈した後、ABI PRISM 7700 Sequence Detector(PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてMMP-7 mRNA発現とcaveolin-1 mRNA発現を定量的PCR法にて測定し、内因性コントロールglyceraldehyde-3-phosphatase-dehydrogenase (GAPDH) mRNAの発現で補正した。使用したTaqman Gene Expression Assays probe (Applied Biosystems)は、ヒトMMP-7はHs00159163_m1、ヒトcaveolin-1はHs00184697_m1である。

3. Laser capture microdissection(LCM)

LCM法は、組織から特定の細胞を採取し、遺伝子発現を解析する方法である(15)。このLCM(Arcturus Engineering社製 PixCell II system)を用いて、4名のLAM患者凍結肺組織と健常コントロール凍結肺組織から顕微鏡下にLAM結節と18Gの針先を用いて肺脈管系、末梢気道、胸膜などを除去した肺胞隔壁部分を回収し、上記の方法でMMP-7 mRNAとcaveolin-1 mRNA発現を検討した。

4. 気管支肺胞洗浄(BAL)

BALはsequential BAL法を用いた(16)。右中葉あるいは舌区枝より生理食塩水を50mlずつ4回に分けて注入し、最初の50mlからの回収液は太い気道から得られた成分を比較的反映している分画として今回の測定には用いず、残り150mlからの回収液を肺胞領域の成分を反映しているとして以下の解析に用いた。遠心分離機によりBAL液上清と細胞成分に分離した後、細胞成分について細胞数、細胞分画を算出した。

5. ELISA

LAM患者8名と健常コントロール9名のBAL液を用いて、ELISA法(Quantikine, Human MMP-7 (total) Immunoassay, DMP700)でMMP-7量を測定した。

結 果

1. 免疫染色

MMP-7はLAM結節に高発現していた(Figure. 1A,B)。一方、caveolin-1は、LAM結節のLAM細胞には発現が低下し、血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞には発現が亢進していた(Figure. 2A,B)。

2. 全肺組織及びLAM結節におけるEMMPRIN mRNA量

肺組織を用いた対象患者の特徴を示す(table1)。LCM法にて選択採取したLAM結節をFig.3に示す。採取した細胞がLAM細胞のみであることがわかる。MMP-7 mRNA発現は、全肺組織homogenateから得たコントロールとLAM患者の間で差を認めなかった(2.0 ± 0.6 vs. 1.4 ± 0.4 , $n=4$, NS) (Fig.4)が、採取したLAM結節でのMMP-7 mRNA発現を同一LAM患者の全肺組織のMMP-7 mRNAと比較したところ、その発現はLAM結節において統計学的差に至らないが、上昇する傾向が認められた

(2.0 ± 0.6 vs. 5.7 ± 2.4 , NS)。また、肺胞隔壁部分と比べてLAM結節でのMMP-7 mRNA発現も上昇していた(5.7 ± 2.4 vs. 2.0 ± 0.4 , NS) (Fig.4)。

一方、全肺組織homogenateにおけるcaveolin-1 mRNA発現は、コントロール肺に比べLAM患者で発現が低下していた(0.5 ± 0 vs. 0.9 ± 0.1 , $p=0.0546$)。LAM患者の肺胞上皮細胞と比べると、LCM法で採取したLAM結節では有意にその発現は低下していた(0.6 ± 0.1 vs. 1.3 ± 0 , $p=0.0085$) (Fig.5)。

3. BAL液中のEMMPRIN量

BALに用いた対象患者の特徴を示す(table2)。LAM患者のBAL液中のMMP-7値は健常コントロールと比較して差を認めなかった(3.4 ± 2.2 ng/ml vs. 0.8 ± 0.2 ng/ml, NS) (Fig.6)。

考 察

LAM結節は、形態学的に2種類の細胞より構成されるheterogeneousな細胞集塊である(1-3)。LAM細胞のマーカーとされるHMB-45、PR、ERは、2種類のLAM細胞のうち上皮型のLAM細胞に陽性になることが示されており、一方、紡錘型LAM細胞には、細胞増殖マーカーであるPCNAやMMP-2、MMP-9が陽性となると報告されている(1-3,17)。今回の検討では、これらのMMPsに加えてMMP-7も陽性になることが明らかとなった。MMP-7は、癌細胞組織で過剰発現し、癌の進行に関与し、他のMMPsと同様に、細胞外基質の分解やpro-MMP-2やproMMP-9のような様々な蛋白の活性化を起し腫瘍の浸潤を促進すると報告されている(18)。LAM細胞におけるMMP-7発現も、MMP-2やMMP-9の活性化を介してLAM細胞の浸潤・増殖あるいは嚢胞形成に働いている可能性がある。これらの細胞にMMPsが誘導される機序については、これまで明らかとはなっていないが、以前我々はEMMPRINが紡錘型LAM細胞にMMPsを誘導し、嚢胞形成に関与している可能性を示してきており、今回のMMP-7もEMMPRINにより誘導されている可能性も示唆される。Caveolin-1は、これまでの細胞増殖の報告また、EMMPRINの膜表面への輸送や糖鎖修飾、およびEMMPRINの多量体形成に関与すると報告されている(19,20)caveolin-1蛋白の発現がLAM細胞で低下していることや、また、caveolin-1発現の低下は、LAM細胞におけるEMMPRINのMMP誘導能に関与している可能性とLAM細胞の増殖を促進

Fig. 1 LAM結節における免疫染色-MMP7

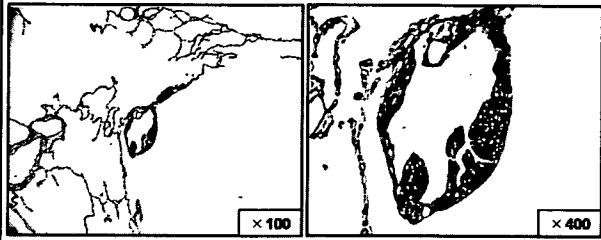


Fig. 2 LAM結節における免疫染色-caveolin-1

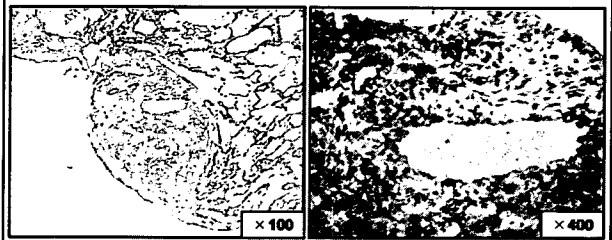


Fig. 3 LCMを用いたLAM細胞の採取

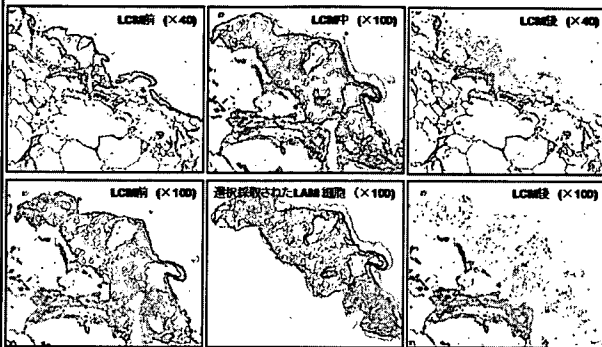


Fig. 4 LCMで採取したLAM細胞におけるMMP-7 mRNA発現

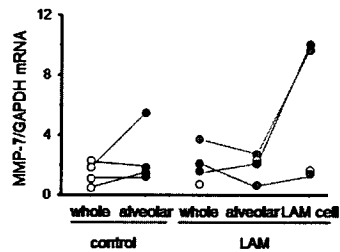


Fig. 5 LCMで採取したLAM細胞におけるcaveolin-1 mRNA発現

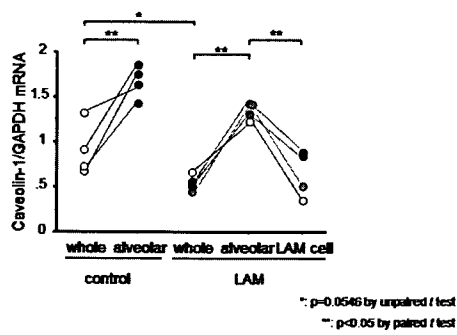
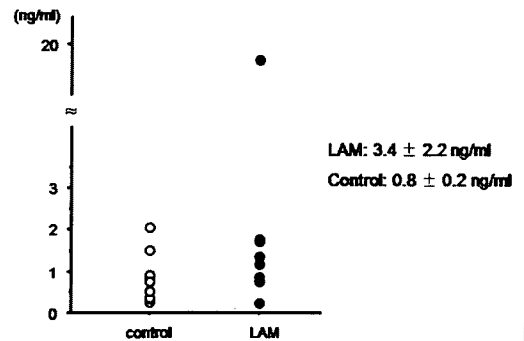


Fig. 6 BAL液中MMP-7濃度 (ELISA)



している可能性を示唆する。今後ラパマイシン投与により、MMP-7が低下するかどうか臨床検体を用いた測定系の確立や、TSC蛋白とcaveolin-1の相互作用についても検討する必要がある。

結 語

MMP-7はLAM結節に高発現し、caveolin-1は、LAM

結節のLAM細胞には発現が低下していた。LCM法にて採取したLAM結節ではLAMの全肺組織と比べその発現が上昇し、また肺胞上皮細胞に比べ有意に上昇していた。LAM患者の肺胞上皮細胞と比べると、LCM法で採取したLAM結節では有意にその発現は低下していた。

参考文献

- 1) Ferrans VJ, Yu ZX, Nelson WK, Valencia JC, Tatsuguchi A, Avila NA, Riemenschneider W, Matsui K, Travis WD, Moss J. Lymphangiolo-myomatosis (LAM). A review of clinical and morphological features. *J Nippon Med Sch* 2000;67: 311–329.
- 2) Hayashi T, Fleming MV, Stetler–Stevenson WG, Liotta LA., Moss J, Ferrans VJ, Travis WD. Immunohistochemical study of matrix metallopro-teinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangiolo-myomatosis (LAM). *Hum Pathol* 1997;28:1071–1078.
- 3) Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. Role for activation of matrix metall-oproteinases in the pathogenesis of pulmonary lymphangiolo-myomatosis. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:267–275.
- 4) Kyuichi Kawabata, Akira Murakami, Hajime Ohigashi. Citrus auraptene targets translation of MMP–7 (matrilysin) via ERK1/2–dependent and mTOR–independent mechanism. *FEBS Letters* 2006; 580: 5288?5294.
- 5) Liu P, Rudick M, Anderson RGW. Multiple functions of caveolin–1. *J Biol Chem* 2002;277:41295–8.
- 6) Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, et al. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 2004;84:1341–1379.
- 7) Williams TM, Lisanti MP. Caveolin–1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C494–C506.
- 8) Torres VA, Tapiá JC, Rodriguez DA, et al. Cave-olin–1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein surviving. *J Cell Sci* 2006;119:1812–1823.
- 9) Tang W, Hemler ME. Caveolin–1 regulates matrix metalloproteinases–1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem* 2004; 279:11112–8.
- 10) Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin–1. *Mol Biol Cell* 2004;15:4043–50.
- 11) Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Itoh T, Fukuda Y, Senior RM, Nishimura M. Extracellular matrix metalloproteinase inducer in interstitial pneumonias. *Hum Pathol* 2006;37:1058–1065.
- 12) Nao Odajima, Tomoko Betsuyaku, Yasuyuki Nasuhara, and Masaharu Nishimura. Loss of Caveolin–1 in Bronchiolization in Lung Fibrosis. *J Histochemi Cytochem* 2007; 55: 899–909.
- 13) Betsuyaku T, Kadomatsu K, Griffin GL, Muramatsu T, Senior RM. Increased basigin in bleomycin–induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:600–606.
- 14) Betsuyaku T, Griffin GL, Watson MA, Senior RM. Laser capture microdissection and real–time reverse transcriptase/polymerase chain reaction of bronchiolar epithelium after bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:278–284.
- 15) Matsumoto Y, Horiba K, Usuki J, Chu SC, Ferrans VJ, Moss J. Markers of cell proliferation and expression of melanosomal antigen in lymphangio-leiomyomatosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:327–336.
- 16) Betsuyaku T, Tanino M, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M, Senior RM. Extracellular matrix metalloproteinase inducer is increased in smokers’ bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:222–227.
- 17) Kumasaka T, Seyama K, MD, Mitani K, Souma S, Kashiwagi S, Hebisawa A, Sato T, Kubo H, Gomi K, Shibuya K, Fukuchi Y, Suda K. Lympha-angiogenesis–mediated shedding of LAM cell clusters as a mechanism for dissemination in lymphangiol-eiomyomatosis. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1356–1366.
- 18) li M, Yamamoto H, Y Adachi Y, Maruyama Y and Shinomura Y. Role of Matrix Metalloprotein-ase–7 (Matrilysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis. *Exp Biol Med* 2006; 231:20–27.
- 19) Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin–1. *Mol Biol Cell* 2004;15:4043–4050.
- 20) Tang W, Hemler ME. Caveolin–1 regulates matrix metalloproteinases–1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem* 2004; 279:11112–11118.

間歇的低酸素曝露がヒト単球細胞からの サイトカイン産生能に及ぼす影響

奈良県立医科大学内科学第二講座

玉置 伸二 山内 基雄 太田 浩世 森岡 崇
熊本 牧子 福岡 篤彦 児山 紀子 友田 恒一
吉川 雅則 濱田 薫 木村 弘

はじめに

閉塞型睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea: OSAS) 患者に高血圧および心疾患、脳血管疾患が高頻度に合併することは以前から指摘されていたが¹⁾、最近睡眠時低酸素ストレスが粥状硬化病変の独立した危険因子となりうることが示された²⁾。さらにOSAS患者ではメタボリックシンドローム (MS) の合併率が有意に高いことが報告されている³⁾。

またtumor necrosis factor- α (TNF- α)をはじめとする炎症性サイトカインや接着分子、macrophage chemo attractant protein-1 (MCP-1) などのケモカイン、matrix metallo- proteinases (MMPs) などの動脈硬化病変への関与が解明されつつある⁴⁾。

これまでにわれわれはOSAS患者では低酸素ストレスによりTNF- α 、MMP-9、MCP-1産生能が亢進し、それらは長期CPAP治療により改善することを報告してきた⁵⁾⁶⁾。更に転写因子であるnuclear factor- κ B (NF κ B) は炎症性サイトカインの制御に中心的役割を果たしているとされているが⁷⁾⁸⁾、われわれはOSAS患者では単球中のNF κ Bの発現が亢進しており、夜間低酸素ストレスの指標と有意な相関を示すことを明かにした⁹⁾。OSASの病態においては、夜間低酸素ストレスにより転写因子を介した炎症性サイトカインの産生が亢進し、動脈硬化病変の形成が促進されると考えられる。今回われわれは、低酸素ストレスが単球のサイトカイン産生能に及ぼす影響を明かにするために、低酸素培養器を用いて低酸素曝露様式を変更しながら検討を行った。

対象と方法

健康人12例からヘパリン加採血を行い、検体採取後直ちにプラスチック付着法で単球を分離し、細胞数を 0.5×10^6 /wellに調整した。単球細胞は1) 21%O₂下培養 (normoxia, N群) (2) 1%O₂ 5分、21%O₂ 10分の間歇的低酸素培養 (intermittent hypoxia, IH群) (3) 1% O₂での持続的低酸素培養 (sustained hypoxia, SH群) の各群に分類し5時間培養を行い、培養上清中のTNF- α 濃度をELISA法により測定した。その後、単球細胞をLPS無刺激および刺激下で計24時間になるまで培養を行った。21%O₂下培養は24時間継続し (N→N群)、IH群、SH群ではnormoxia環境に移し (IH→N群、SH→N群)、SHで24時間継続培養する群も設定した (SH→SH群)。24時間培養後、各群における培養上清中のTNF- α 濃度をELISA法により測定した。

結果

低酸素曝露5時間後のTNF- α 自然産生能では各群間で有意差は認めなかった(図1)。

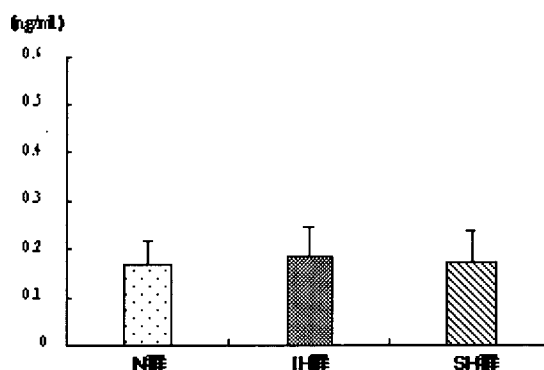


図1. TNF- α 自然産生能(曝露5時間後)

また24時間培養を継続した検討では、TNF- α 自然産生能に各群間で有意差は認めなかった(図2)。

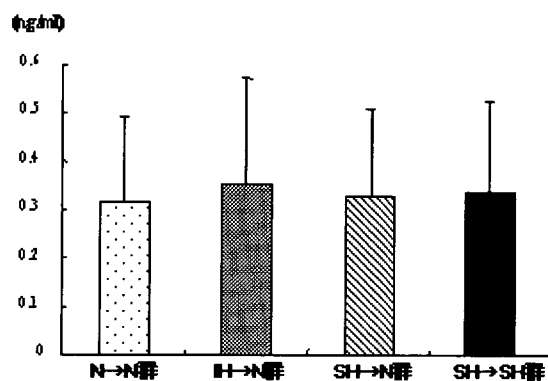


図2 TNF- α 自然産生能(24時間後)

LPS刺激下培養では、TNF- α 産生能はIH→N群でN→N群およびSH→N群に比べて有意に亢進していた(図3)。

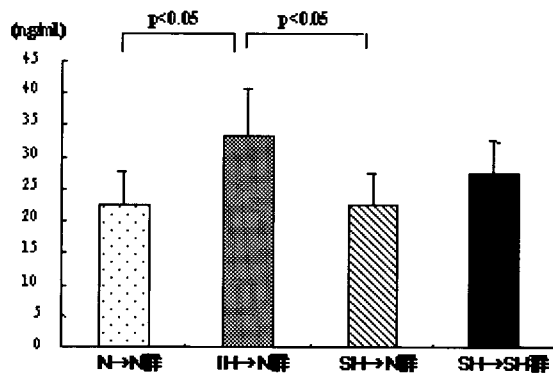


図3 TNF- α 産生能(24時間後 LPS刺激下)

考案

動脈硬化の発症・進展において、多くの炎症性メディエーターの関与が明らかにされ、動脈硬化病変は炎症・免疫反応の場として認識されるようになった。TNF- α は血管内皮細胞での接着分子発現の亢進やIL-8、MCP-1などのケモカインの産生亢進などによって動脈硬化病変の形成を促進する⁴⁾。一方OSAS患者においては、TNF- α や、IL-6、高感度CRPなどの炎症マーカーが上昇していることが報告されている¹⁰⁾⁻¹²⁾。

今までにわれわれは、OSAS患者では単球からの炎症性サイトカイン・ケモカイン産生能が亢進しており、また単球の動的機能も亢進していることを報告した⁵⁾⁶⁾。

転写因子であるNF- κ Bは炎症性サイトカインや接着分子の産生を誘導することから、免疫機能や炎症を活性化する因子として考えられている。また、TNF- α やLPS、酸化LDLなどで活性化され、近年では動脈硬化病変形成にも重要な役割を果たしているとされている¹³⁾。OSAS患者では夜間低酸素ストレスと関連してNF- κ Bも発現が亢進していた⁹⁾。OSASでは病態に基づいたこれらの炎症過程の亢進により動脈硬化病変が形成されると考えられた。

OSASにおける低酸素/再灌流ストレスが病態に及ぼす影響を明らかにするため、間歇的低酸素刺激を用いた検討が主に動物実験の手法を用いて行われてきた。間歇的低酸素により交感神経系等を介した血圧上昇、インスリン抵抗性、脂質代謝異常や脂質過酸化を介して動脈硬化病変が形成されたと報告されている¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。また近年では、細胞培養などを用いた分子細胞レベルでの検討も行われている。Ryanらは、HeLa細胞を用いた検討で、間歇的低酸素刺激によりNF- κ Bの発現が亢進したと報告している¹⁷⁾。

今回われわれは健常人の単球を用いて、低酸素ストレスがサイトカイン産生能に及ぼす影響を明らかにするため低酸素曝露様式を変更して検討を行った。低酸素曝露5時間および24時間後では単球からのTNF- α 産生能に各群間で有意差はみられなかったが、LPS刺激下培養では、間歇的低酸素曝露群で有意なTNF- α 産生能の亢進を認めた。LPSはToll-like receptor 4に結合してNF- κ Bの活性化をもたらすが¹⁸⁾、間歇的低酸素刺激により単球のLPSに対する反応性が亢進すると考えられた。

今回の検討で間歇的低酸素曝露により単球からの炎症性サイトカイン産生能が亢進することが示唆された。さらに詳細な機序を解明するため、低酸素曝露時間の設定やOSAS患者の単球との反応性の相違、NF- κ Bなどの転写因子の発現などについても検討を行う必要があると考えられる。

結論

間歇的低酸素曝露により単球からの炎症性サイトカイン産生能が亢進しており、OSASにおける動脈硬化病変形成機序の一因である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) National Commission on sleep disorders research, Wake up America: National Sleep alert. Washington DC government Printing Office 1993.
- 2) Suzuki T, Nakano H, Maekawa J, et al: Obstructive Sleep Apnea and Carotid-Artery Intima-Media Thickness. *Sleep* 2004; 27: 129-133.
- 3) Sasanabe R, Banno K, Otabe K, et al: Metabolic syndrome in Japanese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Hypertens Res* 2006; 29: 315-322.
- 4) Young JL, Libby P, Schonbeck U: Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2002; 88: 554-567.
- 5) 吉川雅則, 玉置伸二, 木村 弘, 他: 閉塞型睡眠時無呼吸症候群におけるサイトカインと接着分子の検討. 厚生労働省特定疾患呼吸不全に関する調査研究 平成15年度研究報告書 2004; 129-131.
- 6) 玉置伸二, 吉川雅則, 木村 弘, 他: OSASにおける動脈硬化病変の形成機序. 厚生労働省特定疾患呼吸不全に関する調査研究 平成16年度研究報告書 2005; 135-139.
- 7) Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
- 8) Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260.
- 9) Yamauchi M, Tamaki S, Tomoda K, et al: Evidence for activation of nuclear factor κ B in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2006; 10: 189-1870.
- 10) Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, et al: Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1313-1316.
- 11) Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, et al: Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003; 107: 1129-1134.
- 12) Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, et al: Elevated production of tumor necrosis factor- α by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 2004; 126: 1473-1479.
- 13) Monaco C, Paleolog E: Nuclear factor κ B: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 671-682
- 14) Fletcher EC: Physiological consequence of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1600-1605.
- 15) Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, et al: Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mouse. *J Physiol* 2003; 552: 253-264.
- 16) Savransky V, Nanayakkahara A, Li J, et al: Chronic intermittent hypoxia induced atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1290-1297.
- 17) Ryan S, Taylor TC, McNicholas WT: Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2660-2667.
- 18) Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC: Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem* 2000; 275: 20861-20866.

閉塞型睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) における 血中多量体アディポネクチンの分泌動態

奈良県立医科大学内科学第二講座

吉川 雅則 玉置 伸二 太田 浩世 森岡 崇
友田 恒一 福岡 篤彦 山内 基雄 児山 紀子
濱田 薫 木村 弘

はじめに

アディポネクチン (APN) は内臓脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインであり、抗動脈硬化作用を有し、肥満者での血中濃度の低下¹⁾。冠動脈疾患との関連が報告されている²⁾。OSASは心血管イベント発症の重要なリスクファクターとなることが知られている³⁾。OSAS患者における睡眠時低酸素ストレスとAPNの血中濃度との関連についても報告されているが、一致した見解は得られていない^{4) 5) 6)}。アディポネクチンは血中では種々の多量体、すなわち高分子量 (high molecular weight : HMW-APN)、中分子量 (MMW-APN)、低分子量 (LMW-APN) として存在することが明らかにされている。HMWアディポネクチンはMMWおよびLMWアディポネクチンに比べて著しく細胞膜表面への結合能が高く、AMPキナーゼの活性化能が強く、インスリン感受性と深く関わっている⁷⁾。さらにHMWが総アディポネクチンよりもメタボリックシンドローム (metabolic syndrome : MS) の合併予測に有用であることも報告されている⁸⁾。以上のことから、OSAS患者における粥状硬化病変の形成機序や高率なMSの合併機序を解明するうえでも、血中総APN濃度のみならず、HMWアディポネクチン濃度についても評価することが重要と考えられる。本研究では男性OSAS患者の血中総アディポネクチンおよびHMW-APN濃度の測定を行い、病態との関連および長期にわたる持続気道陽圧呼吸 (nasal CPAP) 治療の効果について検討した。

対象と方法

polysomnography (PSG) にて診断した男性OSAS患者33例と年齢・BMIを一致させた健常男性19例を対象と

した。PSGはAlice 4 (Respironics社製) で行いapnea-hypopnea index (AHI)、3% oxygen desaturation index (ODI3)、SpO₂が90%未満の時間 (% time in SpO₂<90%) lowest SpO₂を睡眠時低酸素の指標とした。早朝空腹時に患者群および健常群から血清を採取し、ヒト多量体アディポネクチン分別測定キットを用いて、血清HMW-APNおよび総アディポネクチン濃度 (Total-APN) をELISA法で測定した。OSAS患者では3ヶ月以上の長期CPAP治療後に同様の検討を行った。

結 果

1) PSGデータ

AHI、ODI3、% time in SpO₂<90%は患者群で高値、lowest SpO₂は患者群で低値を示した。尚、年齢、BMIは両群間で有意差を認めなかった (表1)。

また、CPAP前後でBMIに有意な変化はなかった。

表1 対 象

	OSAS (n=33, male)	Controls (n=19, male)	p value
Age (years)	42.6±8.3	40.4±5.9	N.S
BMI (kg/m ²)	28.8±3.6	27.1±2.6	N.S
AHI	57.4±20.8	5.3±1.9	<0.001
ODI 3%	48.8±18.8	10.2±6.5	<0.001
Lowest SpO ₂ (%)	72.7±11.4	88.7±4.0	<0.001
%time in SpO ₂ <90 (%)	34.2±36.7	0.1±0.3	<0.001

2) OSAS群と健常群における血清Total-APNおよびHMW-APN濃度

Total-APNについては両群間で有意差を認めなかった (図1)。

血清HMW-APN濃度はOSAS群では健常群よりも有

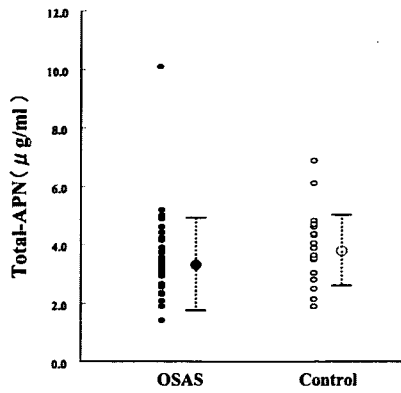


図1 血清 Total-APN濃度

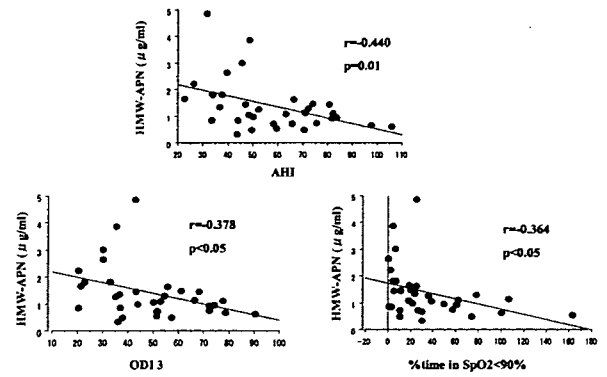


図4 血清 HMW-APNと病態との関連

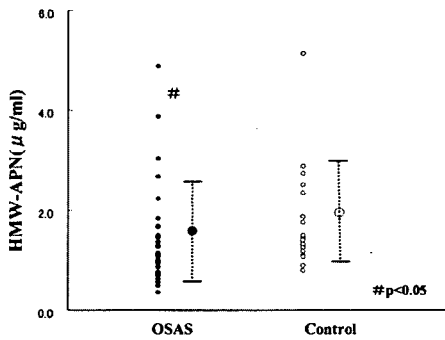


図2 血清 HMW-APN濃度

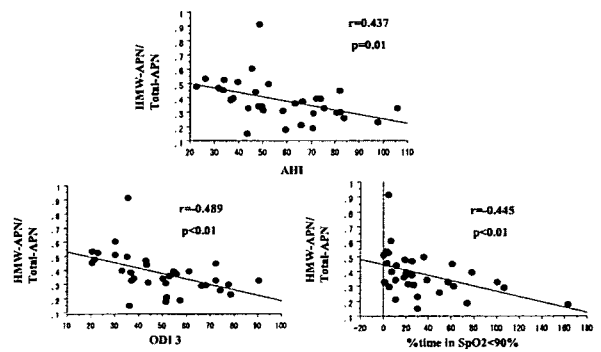


図5 HMW-APN/Total-APNと病態との関連

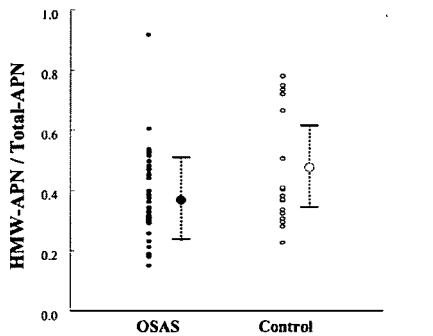


図3 HMW比(HMW-APN/Total-APN)

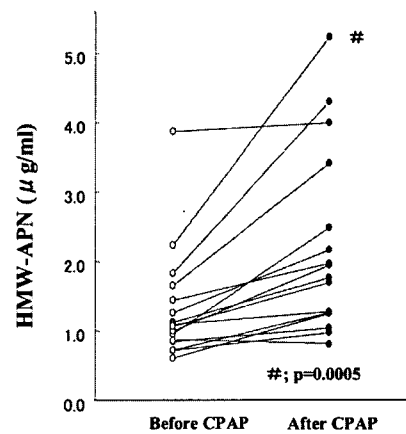


図6 長期CPAP治療の効果

意に低値を認めた(図2)。

さらに、HMW-APNとTotal-APNの比を検討した。HMW-APN/Total-APN比は、OSAS群で低値傾向を認めた。

3) 睡眠時低酸素との関連

血清HMW-APNはAHI、ODI3、% time in SpO₂<90%と有意な負の相関を認めた(図4)。

HMW-APN/Total-APN比においても、同様にAHI、ODI3、% time in SpO₂<90%と有意な負の相関を認めた(図5)。

尚、血清Total-APNとこれらの指標とは有意な関連

を認めなかった。

4) 長期CPAP効果

3ヶ月以上の長期CPAP治療後に、血清HMW-APNは有意に上昇していた(図6)。また血清Total-APNも有意に上昇していた。