

のFEV1が低値であったため、このような結果となった可能性が考えられた。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。同様の結果は既報^{7),11)}にも認められ、CT撮影時における若干の吸気位の違いがLAA%測定に影響を与えた可能性も否定はできないが、Soejimaら⁷⁾は喫煙により細気管支炎がLAA%低下の原因と推測している。気道病変の程度を示すWA%の経年変化量と、FEV1の経年変化量は負の相関関係を認めた($r = -0.459$, $p = 0.003$)。本研究では気管支拡張薬吸入前のFEV1を用いたが、この負の相関は、気管支拡張薬吸入前後のFEV1を用いても同様の結果であった。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。

b. COPDの病態は、気道病変と肺実質の破壊からなり、それらの病変は混在しており、その程度は症例によって異なる。その為COPDの古典的な分類である、Pink pufferとBlue bloaterと言う概念は、COPDの複雑な病態が明らかになればなるほどCOPDの病態を正しく反映していない分類のように見える。その一方で、臨床の現場では、痩せの強い患者とそれほど強くない患者が認められることから、体型の差異はCOPDの病態の一側面を反映していると考えられる。これまで、私共はCT画像データを用いて、気腫性病変と気道病変を評価することでCOPDを4群(気腫性病変も気道病変も顕著でない群、気腫性病変優位群、気道病変優位群、気腫性病変及び気道病変も顕著な群)に分類することを提唱してきた。本研究では、患者の体格に注目し、4群の群間比較からBMIは気腫性病変と有意に相関するが、気道壁肥厚とは相関を認めなかったことを示し、phenotypingの有用性を明らかにした。更には、BMIとLAA%との相関を示すことで気腫性病変と痩せの関係を明らかにした。

以上の結果は、これまで私共が提唱してきたCOPDのphenotypingの有用性と、COPDが単に呼吸器に局限した疾患ではなく全身疾患であることを認識することが病態解明及び治療を行う上で重要であることを示唆している。

低栄養が肺に及ぼす影響については、今後もその病態の解明と介入研究を施行予定である。

c. 今回の検討では、vitamin D欠損餌によるKlotho Mouseの表現型は、肺機能でも救済された。

オキシレーション法の検討では、KL(D+)において弾性抵抗、エラストランスの増加を示す結果となった。これは肺気腫モデルとしては反する結果である。しかしながら、Klotho MouseのTLCは第7週齢でおよそ0.8mlと非常に小さく、自験例より野生型の第2から3週齢に匹敵した。マウス肺の肺容量がimpedanceに与える影響、或いは成長に準じた計測値の変化は報告されており、今回のオキシレーション法で得られた結果を支持するものである。この方法における比較対象として、単純に同一週令よりも、同一肺容量の個体がふさわしいことを示唆した。また、Klotho Mouseの肺気腫は、離乳後より始まった発達障害がもたらした結果とも考えられた。

quasi-static pressure-volume曲線の検討では、k値はklotho mouseにおいて有意に高値を示した。このことよりklotho肺は低い弾性を有すると考えられた。この検討においては、volumeによる影響を受けることが無く排気位での肺の弾性を観察することが可能である。また、TLC位より50%位のvolumeまでの評価は気管支の閉塞などの影響もなく、正確に観察できることが報告されている。以上より、klotho Mouse肺の弾性は、quasi-static pressure-volume曲線により、肺気腫モデルに矛盾しないものであると示された。本検討から、モデルマウスにおける肺気腫病変の評価は対象に準じて行うことが望ましいと考えられた。結論として、Klothoマウスにおける肺気腫は、Vitamin D欠損食を摂取させることにより形態だけでなく機能的にも救済されることが判明した。

d. 胸部CT検査によりCOPDにおける肺気腫の程度と骨密度との有意な関係が明らかとなった。

e. OSAS患者が高血圧、脳・心血管障害などの生活習慣病発症のリスクが高い機序の一つとして酸化ストレスがあげられる。今回TRXはOSAS患者に有意に高値でありnCPAPにて減少した。これは肥満などの様々な因子に独立しており、TRXはOSAS患者の酸化ストレスやnCPAPの効果のよい指標となる可能性がある。アディポネクチンは逆にOSAS患者で低値でありnCPAP治療にて増加した。アディポネクチンは抗動脈硬化作用をもち、肥満者のアディポネクチンの低下がメタボリックシンドロームの病態に強く関与すると考えられている。脂肪細胞にかかる酸化ストレスがアディポネクチン分泌低下の

原因とする報告もあり、今回の結果もOSASとの関連性の存在を示唆する。OSAS患者は酸化ストレス曝されており、TRXはOSAS患者における酸化ストレスとnCPAPの効果のよい指標になる可能性がある。

f. NPPVの術後使用について成人例の報告はみられるが、小児例の報告は極めて少ない。小児特に乳幼児例の少ない理由には、乳幼児の呼吸に同期するNPPV機器の無いことが挙げられていたが、我々は、timedモードを使用して乳幼児の呼吸に同期しなくても高PaCO₂血症の改善、低酸素血症の改善、術後無気肺などにNPPVが有効であることを明らかにした。しかしながら、使用マスクについては今後さらなる改善の必要があると考えられた。臓器移植後の小児例の肺合併症の治療にNPPV療法は使用可能で且つ有効であった。

g. OSA患者では血小板凝集能が亢進しており、その機序には間欠的低酸素と再酸素化の程度が有意に関与していることを示した。

F. 論文発表（原著）

- 1 : Yamaguchi M, Niimi A, Minakuchi M, Matsumoto H, Shimizu K, Chin K, Mishima M. Corticosteroid-induced myopathy mimicking therapy-resistant asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007 Oct; 99(4):371-4.
- 2 : Ito Y, Osawa M, Isozumi R, Imai S, Ito I, Hirai T, Ishida T, Ichiyama S, Mishima M; Kansai Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. Pneumococcal surface protein A family types of *Streptococcus pneumoniae* from community-acquired pneumonia patients in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 Oct;26(10):739-42.
- 3 : Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiro T, Mishima M. Analysis of longitudinal changes in the psychological status of patients with asthma. *Respir Med.* 2007 Oct;101(10):2133-8.
- 4 : Chin K, Takahashi K, Ohmori K, Toru I, Matsumoto H, Niimi A, Doi H, Ikeda T, Nakahata T, Komeda M, Mishima M. Noninvasive ventilation for pediatric patients under 1 year of age after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007 Jul;134(1):260-1.
- 5 : Hoshino Y, Nakamura T, Sato A, Mishima M, Yodoi J, Nakamura H. Neurotropin demonstrates cytoprotective effects in lung cells through the induction of thioredoxin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Oct;37(4):438-46.
- 6 : Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Takahashi M, Mishima M, Nakano T, Kubo H. Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Immunol.* 2007 Jul 1;179(1):708-14.
- 7 : Handa T, Nagai S, Miki S, Ueda S, Yukawa N, Fushimi Y, Ito Y, Ohta K, Mimori T, Mishima M, Izumi T. Incidence of pulmonary hypertension and its clinical relevance in patients with interstitial pneumonias: comparison between idiopathic and collagen vascular disease associated interstitial pneumonias. *Intern Med.* 2007;46(12):831-7.
- 8 : Matsumoto H, Niimi A, Tabuena RP, Takemura M, Ueda T, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jinnai M, Chin K, Mishima M. Airway wall thickening in patients with cough variant asthma and nonasthmatic chronic cough. *Chest.* 2007 Apr;131(4):1042-9.
- 9 : Mishima M. [CT imaging of COPD—importance of phenotyping (emphysema dominant and airway disorder dominant)] *Nippon Rinsho.* 2007 Apr; 65(4):648-54. Review. Japanese.
- 10 : Osawa M, Ito Y, Hirai T, Isozumi R, Takakura S, Fujimoto Y, Iinuma Y, Ichiyama S, Tanaka K, Mishima M. Risk factors for invasive aspergillosis in living donor liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2007 Apr;13(4):566-70.
- 11 : Isozumi R, Ito Y, Ishida T, Osawa M, Hirai T, Ito I, Maniwa K, Hayashi M, Kagioka H, Hirabayashi M, Onari K, Tomioka H, Tomii K, Gohma I, Imai S, Takakura S, Iinuma Y, Ichiyama S, Mishima M; Kansai Community Acquired Pneumococcal

- Pneumonia Study Groupe. Genotypes and related factors reflecting macrolide resistance in pneumococcal pneumonia infections in Japan. *J Clin Microbiol*. 2007 May;45(5):1440–6.
- 12 : Sato A, Hirai T, Imura A, Kita N, Iwano A, Muro S, Nabeshima Y, Suki B, Mishima M. Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 13;104(7):2361–5.
- 13 : Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jinnai M, Chin K, Mishima M. Prevalence and clinical manifestations of gastro–oesophageal reflux–associated chronic cough in the Japanese population. *Cough*. 2007 Jan 8;3:1.
- 14 : Handa T, Nagai S, Fushimi Y, Miki S, Ohta K, Niimi A, Mishima M, Izumi T. Clinical and radiographic indices associated with airflow limitation in patients with sarcoidosis. *Chest*. 2006 Dec;130(6):1851–6.
- 15 : Maniwa K, Taguchi Y, Ito Y, Mishima M, Yoshida S. Retrospective study of 30 cases of Legionella pneumonia in the Kansai region. *J Infect Chemother*. 2006 Oct;12(5):272–6. Epub 2006 Nov 6.
- 16 : Ueda T, Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Hirai T, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jinnai M, Muro S, Chin K, Mishima M. Role of small airways in asthma: investigation using high–resolution computed tomography. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Nov;118(5):1019–25.
- 17 : Tabata C, Kadokawa Y, Tabata R, Takahashi M, Okoshi K, Sakai Y, Mishima M, Kubo H. All–trans–retinoic acid prevents radiation– or bleomycin–induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec 15;174(12):1352–60.
- 18 : Sato A, Hara T, Nakamura H, Kato N, Hoshino Y, Kondo N, Mishima M, Yodoi J. Thioredoxin–1 suppresses systemic inflammatory responses against cigarette smoking. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep–Oct;8(9–10):1891–6.
- 19 : Chin K, Nakamura T, Takahashi K, Sumi K, Matsumoto H, Niimi A, Fukuhara S, Mishima M, Nakamura T. Falls in blood pressure in patients with obstructive sleep apnoea after long–term nasal continuous positive airway pressure treatment. *J Hypertens*. 2006 Oct;24(10):2091–9.
- 20 : Ohara T, Hirai T, Sato S, Sato A, Nishioka M, Muro S, Mishima M. Comparison of airway dimensions in different anatomic locations on chest CT in patients with COPD. *Respirology*. 2006 Sep;11(5):579–85.
- 21 : Sumi K, Chin K, Takahashi K, Nakamura T, Matsumoto H, Niimi A, Mishima M. Effect of nCPAP therapy on heart rate in patients with obstructive sleep apnoea–hypopnoea. *QJM*. 2006 Aug;99(8):545–53.
- 22 : Kazawa N, Kitaichi M, Hiraoka M, Togashi K, Mio N, Mishima M, Wada H. Small cell lung carcinoma: Eight types of extension and spread on computed tomography. *J Comput Assist Tomogr*. 2006 Jul–Aug;30(4):653–61.
- 23 : Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiro T, Mishima M. Longitudinal deteriorations in patient reported outcomes in patients with COPD. *Respir Med*. 2007 Jan;101(1):146–53.
- 24 : Takemura M, Matsumoto H, Niimi A, Ueda T, Matsuoka H, Yamaguchi M, Jinnai M, Muro S, Hirai T, Ito Y, Nakamura T, Mio T, Chin K, Mishima M. High sensitivity C–reactive protein in asthma. *Eur Respir J*. 2006 May;27(5):908–12.
- 25 : Handa T, Nagai S, Miki S, Fushimi Y, Ohta K, Mishima M, Izumi T. Incidence of pulmonary hypertension and its clinical relevance in patients

- with sarcoidosis. *Chest*. 2006 May;129(5):1246–52.
- 26 : Fujita S, Katakami N, Takahashi Y, Hirokawa K, Ikeda A, Tabata C, Mio T, Mishima M. Postoperative complications after induction chemoradiotherapy in patients with non–small–cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006 Jun;29(6):896–901.
- 27 : Konno T, Takehana T, Mishima M, Ishihara T. Palladium–catalyzed regio– and stereoselective formate reduction of fluorine–containing allylic mesylates. A new entry for the construction of a tertiary carbon attached with a fluoroalkyl group. *J Org Chem*. 2006 Apr 28;71(9):3545–50.
- 28 : Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Tabuena R, Yamaguchi M, Matsuoka H, Hirai T, Muro S, Ito Y, Mio T, Chin K, Nishiyama H, Mishima M. Prognosis of cough variant asthma: a retrospective analysis. *J Asthma*. 2006 Mar;43(2):131–5.
- 29 : Handa T, Nagai S, Ito I, Shigematsu M, Hamada K, Kitaichi M, Ohta K, Izumi T, Mishima M. Multiple bone fractures found in a young sarcoidosis patient with long stable disease. *Intern Med*. 2005 Dec;44(12):1269–75.
- 30 : Sakuma K, Fujimoto I, Hitoshi S, Tanaka F, Ikeda T, Tanabe K, Toyokuni S, Wada H, Mio T, Mishima M, Ikenaka K. An N–glycan structure correlates with pulmonary metastatic ability of cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Feb 17;340(3):829–35.
- 31 : Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Hajiro T, Mishima M. Dyspnoea with activities of daily living versus peak dyspnoea during exercise in male patients with COPD. *Respir Med*. 2006 Jun;100(6):965–71.
- 32 : Tabata C, Kubo H, Tabata R, Wada M, Sakuma K, Ichikawa M, Fujita S, Mio T, Mishima M. All–trans retinoic acid modulates radiation–induced proliferation of lung fibroblasts via IL–6/IL–6R system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Mar;290(3):L597–606.
- 33 : Nakatani K, Hagihara S, Goto Y, Kobori A, Hagihara M, Hayashi G, Kyo M, Nomura M, Mishima M, Kojima C. Solution structure of a small–molecular ligand complexed with CAG trinucleotide repeat DNA. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2005;(49):49–50.
- 34 : Tabuena RP, Nagai S, Tsutsumi T, Handa T, Minoru T, Mikuniya T, Shigematsu M, Hamada K, Izumi T, Mishima M. Cell profiles of bronchoalveolar lavage fluid as prognosticators of idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia among Japanese Patients. *Respiration*. 2005 Sep–Oct;72(5):490–8.
- 35 : 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*. 2005;37(10):709–11.
- 36 : Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase–9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Dec 1;172(11):1378–82.
- 37 : Handa T, Nagai S, Shigematsu M, Tabuena RP, Takeuchi M, Mikuniya T, Hamada K, Izumi T, Mishima M. Patient characteristics and clinical features of Japanese sarcoidosis patients with low bronchoalveolar lavage CD4/CD8 ratios. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2005 Jun;22(2):154–60.
- 38 : 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*. 2005 Jul;128(1):62–9.
- 39 : Nakatani K, Hagihara S, Goto Y, Kobori A,

- Hagihara M, Hayashi G, Kyo M, Nomura M, Mishima M, Kojima C. Small-molecule ligand induces nucleotide flipping in (CAG)_n trinucleotide repeats. *Nat Chem Biol*. 2005 Jun;1(1):39-43.
- 40 : Handa T, Nagai S, Ito I, Tabuena R, Shigematsu M, Hamada K, Kitaichi M, Izumi T, Aoyama T, Toguchida J, Mishima M. Polymorphisms of B7 (CD80 and CD86) genes do not affect disease susceptibility to sarcoidosis. *Respiration*. 2005 May-Jun;72(3):243-8.
- 41 : Handa T, Nagai S, Kawabata D, Nagao T, Takemura M, Kitaichi M, Izumi T, Mimori T, Mishima M. Long-term clinical course of a patient with anti PL-12 antibody accompanied by interstitial pneumonia and severe pulmonary hypertension. *Intern Med*. 2005 Apr;44(4):319-25.
- 42 : 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*. 2005 May;58(5):532-9.
- 43 : Takahashi K, Chin K, Ogawa K, Kasahara M, Sakaguchi T, Hasegawa S, Sumi K, Nakamura T, Tamaki A, Mishima M, Nakamura T, Tanaka K. Living donor liver transplantation with noninvasive ventilation for exertional heat stroke and severe rhabdomyolysis. *Liver Transpl*. 2005 May;11(5):570-2.
- 44 : Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Minakuchi M, Tabuena R, 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*. 2005 Apr;60(4):277-81.
- 45 : 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*. 2005 Mar;99(3):262-4.
- 46 : Chin K, Uemoto S, Takahashi K, Egawa H, Kasahara M, Fujimoto Y, Sumi K, Mishima M, Sullivan CE, Tanaka K. Noninvasive ventilation for pediatric patients including those under 1-year-old undergoing liver transplantation. *Liver Transpl*. 2005 Feb;11(2):188-95.
- 47 : 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*. 2005 Mar 15;171(6):632-8.

国際学会発表

《 2 0 0 5 》

International Conference of American Thoracic Society (May 2005, San Diego CA, USA)

1. Sumi K, Chin K, Takahashi K, Nakamura T, Mishima M. The effects of hypoxemia and adiponectin on the heart rate throughout the day in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome.
2. Takahashi K, Chin K, Sumi K, Nakamura T, Nakamura H, Yodoi J, Mishima M. Increased Levels of Thioredoxin and Decreased Levels of Adiponectin in Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome are Inverted by Nasal Continuous Positive Airway Pressure.
3. Niimi A, Takemura M, Matsumoto H, Ueda T, Matsuoka H, Yamaguchi M, Mishima M. Capsaicin cough receptor sensitivity in cough variant asthma.
4. Takemura M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Matsuoka H, Yamaguchi M, Mishima M. Central airway dimensions in asthma during stable episodes: relation to frequency of exacerbations.
5. Ito I, Martin JG, Lajoie-Kadoch S, Joubert P, Ludwig MS, Hamid QA. Effect of cytokines/

chemokines on ADAM33 expression in human airway smooth muscle cells.

6. Sato A, Hoshino Y, Hara T, Muro S, Narita M, Nakamura H, Yodoi J, Mishima M. Thioredoxin Ameliorates Cigarette Smoke—Induced Local and Systemic Inflammation in Mice.
 7. Sato S, Hirai T, Muro S, Ohara T, Mishima M. Time Course of Airway Resistance after Inhaled Bronchodilator in the Patients with COPD.
 8. 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 Patient.
- 15th European Respiratory Society Annual congress (September 2005, Copenhagen, Denmark)
9. Chin K, Nakamura T, Takahashi K, Sumi K, Fukuhara S, Mishima M, Nakamura T Falls in blood pressure in patients with obstructive sleep apnea syndrome after long—term nasal continuous positive airway pressure treatment.
 10. Nishioka M, Ogawa E, Hirai T, Muro S, Mishima M. Regulation of Connective Tissue Growth Factor Gene by Lipopolysaccharide in Bronchial Epithelial Cells
- 10th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology (November 2005, Guangzhou, China)
11. Ohara T, Hirai T, Sato S, Terada K, Kinose D, Nishioka M, Sato A, Ogawa E, Muro S, Mishima M. Airway dimensions of the basal segment bronchi in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

《2006》

16th Congress of Interasma Japan/North Asia (March 31-April 1, Tokyo, Japan)

12. Akio Niimi. Airway inflammation as a mechanism of chronic cough: Emerging evidence. Luncheon Seminar.

International Conference of American Thoracic Society (May 2006, San Diego CA, USA)

13. Takahashi K, Chin K, Akamizu T, Sumi K, Nakamura T, Kangawa K, Mishima M. Elevated acylated ghrelin may accelerate body weight gain in patient with obstructive sleep apnea before treatment.
14. Nishioka M, Ogawa E, Hirai T, Muro S, Mishima M. Regulation of Connective Tissue Growth Factor Gene Expression by Lipopolysaccharide in Bronchial Epithelial Cells.
15. Ogawa E, Nakano Y, Muro S, Sakai H, Hirai T, Mishima M. Body Mass Index in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease; Correlation with Low Attenuation Areas on Computed Tomography.
16. Sato A, Hoshino Y, Nakamura H, Narita M, Muro S, Mishima M, Yodoi J. Thioredoxin Prevents Cigarette Smoke Induced Oxidative Stress and Apoptosis.
17. Ohara T, Hirai T, Sato S, Ogawa E, Sato A, Nishioka M, Terada K, Kinose D, Muro S, Mishima M. Annual Changes in Computed Tomography Measurements and Pulmonary Function in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
18. Niimi A, Leung S—Y, Lam A, Kapoun AM, Williams A, Nath P, Luedtke GR, Chakravarty S, Dugar S, Protter AA, Higgins LP, Chung KF. Reversal of IL—1beta—induced impairment of beta—adrenoceptor—mediated bronchodilation by a p38 MAP—kinase

inhibitor, SD-282.

19. Ueda T, Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jin-nai M, Chang L, Minakuchi M, Shirakawa T, Mishima M. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism as a determinant of capsaicin cough sensitivity in healthy young males.
20. Matsumoto H, Niimi A, Tabuena R, Takemura M, Ueda T, Yamaguchi M, Matsuoka H, Chang L, Jinnai M, Chin K, Mishima M. Triggers of cough in patients with cough variant asthma and other causes of chronic cough. Ito I, Lajoie-Kadoch S, Asai K, Sumi Y, Soussi-Gounni A, Martin JG, Hamid QA. Effect of cytokines/chemokines on MMP/TIMP expressions in human airway smooth muscle cells.

4rd International Symposium on Cough (June 2006, London, UK)

21. Niimi A.
Geography and cough aetiology.
Symposium: Cough Acute and Chronic.

American Society of Clinical Oncology Society (June 2006, Chicago IL, USA)

22. Kim Y, Goto K, Nishiwaki Y, Kubota K, Omatsu H, Tamura T, Ohe Y, Kunitoh H, Sekine I, Yamamoto N, Saijo N. Phase II study of weekly cisplatin, etoposide and irinotecan (PE/CPT) for refractory relapsed small cell lung cancer (SCLC).

16th Annual Congress of European Respiratory Society (September 2006, Munich, Germany)

23. Takemura M, Niimi A, Ueda T, Matsuoka H, Yamaguchi M, Jinnai M, Matsumoto H, Mishima M.
Antitussive and antiinflammatory effect of monte lukast in patients with cough variant asthma.

25. Yamaguchi M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Matsuoka H, Jinnai M, Mishima M.

Association of transforming growth factor-β with asthmatic airway remodelling: a study using induced sputum and computed tomography.

26. Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiro T, Mishima M.
Longitudinal deteriorations in patient centered versus physiological measurements in patients with COPD.

11th Congress of The Asian Pacific Society of Respirology (November 2006, Kyoto, Japan)

27. Takahashi K, Chin K, Akamizu T, Sumi K, Nakamura T, Kangawa K, M. Mishima M.
Elevated acylated ghrelin may accelerate body weight gain in patient with obstructive sleep apnea before treatment.

28. Chin K.
New and unconventional applications of NPPV (e. g. weaning, infection diseases, immunocompromised patients, post-surgical respiratory distress): potential benefits and risks. Workshop: Noninvasive positive pressure ventilation: principles and practice.

29. Ohara T, Hirai T, Sato S, Terada K, Kinose D, Haruna A, Nishioka M, Sato A, Ogawa E, Muro S, Mishima M.
Serial changes in airway dimensions assessed by computed tomography in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

30. Niimi A.
Management of chronic persistent cough.
Symposium "Chronic cough: pathogenesis and treatment"

31. Matsuoka H, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Yamaguchi M, Jin-nai M, Mishima

M.

Induced sputum in asthma: patient's characteristics associated with successful induction.

Mini-symposium

32. Ueda T, Niimi A, Tamemura M, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jin-nai M, Mishima M.

Utility of impulse oscillometry system in the diagnosis of cough variant asthma.

33. Ohara T, Hirai T, Sato S, Sato A, Nishioka M, Muro S, Mishima M.

Comparison of airway dimensions in different anatomic locations on chest CT in patients with COPD.

《2007》

International Conference of American Thoracic Society (May 2007, San Francisco CA, USA)

34. Chin K, Sumi K, Horiuchi H, Oga T, Takahashi K, T.Nakamura, Kita T, Mishima M.

Increased platelet aggregability in obstructive sleep apnea hypopnea syndrome patients is improved by nasal continuous positive airway pressure treatment.

35. Kinose D, Ogawa E, Nishioka M, Hoshino Y, Hirai T, Muro S, Mishima M.

Corticosteroid suppressed LPS induced NOD2 gene expression in airway epithelial cells.

36. Sato A, Muro S, Sato S, Nishioka M, Hoshino Y, Ogawa E, Hirai T, Nakamura H, Yodoi J, Mishima M.

Arterial Hypoxia Correlated with the Inflammatory Profile in Induced Sputum from COPD Patients.

37. Kinose D, Ogawa E, Nishioka M, Hoshino Y, Hirai T, Muro S, Mishima M.

Corticosteroid Suppressed LPS Induced NOD2 Gene Expression in Airway Epithelial Cells.

38. Sato A, Hoshino Y, Takenaka M, Muro S, Nakamura

H, Yodoi J, Mishima M.

Thioredoxin Suppressed Cigarette Smoke Induced Emphysema in Mice.

39. Matsumoto H, Moir LM, Oliver GG B, Burgess KJ, Roth M, Black JL, McParland BE.

Comparison of gel contraction mediated by asthmatic and non-asthmatic airway smooth muscle cells.

40. Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jinai M, Oguma T, Takeda T, Otsuka K, Chin K, Mishima M.

Long-term changes of airway wall thickness on computed tomography in asthmatic patients.

41. Ito I, Asai K, Sumi Y, Soussi-Gounni A, Fixman E, Martin JG, Hamid Q.

TGF-beta and PDGF modulate expressions of MMPs/TIMPs and migratory function of human airway smooth muscle cells.

42. Matsuoka H, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Yamaguchi M, Jinnai M, Minakuchi M, Otsuka K, Oguma T, Takeda T, Mishima M.

Induced Sputum in Asthma: Patient's Characteristics Associated with Successful Induction.

43. Niimi A, Ueda T, Matsumoto H, Chung KF, Mishima M. Geographic Difference in Chronic Cough Etiology: Comparison of Japan with the UK.

44. Yamaguchi M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Matsuoka H, Jinnai M, Mishima M.

Dynamic Property of Central Airway Walls as Assessed by Computed Tomography (CT): Correlation with Asthma Pathophysiology.

The 5th World Congress of the World Federation of Sleep Research and Sleep Medicine Societies (September 2007, Cairns, Australia)

45. Chin K, Nakamura T, Takegami M, Sumi K,

Takahashi K, Oga T, Nakayama—Asida Y, Minami I, Horita S, Oka Y, Wakamura T, Fukuhara S, Kadotani H.

The influence of sleep—disordered breathing on the occurrence of metabolic syndrome from the population based study.

47th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (September 2007, Chicago IL, USA)

46. Imai S, Ito Y, Ishida T, Hirai T, Ito I, Osawa M, Isozumi R, Maekawa K, Takakura S, Iinuma Y, Ichiyama S, Mishima M.

High prevalence of the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) clones among *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients with community—acquired pneumonia (CAP) in Japan.

Annual Fall Meeting of Biomedical Engineering Society (September 2007, Los Angeles CA, USA)

47. Sato S, Hirai T, Moro S, Mishima M.
Respiratory Resistance In COPD Patients Using Impulse Oscillometry.

48. Hirai T, Sato A, Muro S, Imura A, Nabeshima Y, Mishima M.
Morphological Mechanism of the Development of pulmonary Emphysema in Klotho Mice.

17th Annual Conference of European Respiratory Society (September 2007, Stockholm, Sweden)

49. Jinnai M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Yamaguchi M, Matsuoka H, Otsuka K, Oguma T, Takeda T, Ito Y, Mishima M.
Induced sputum concentrations of mucin in patients with asthma and chronic cough.

50. Yamaguchi M, Niimi A, Ueda T, Takemura M,

Matsuoka H, Jinnai M, Otsuka K, Oguma T, Takeda T, Matsumoto H, Mishima M.
Effect of hydrofluoroalkane—134a beclomethasone dipropionate (HFA—BDP) on small airways involvement in asthma: assessment using impulse oscillometry system (IOS).

51. Matsuoka H, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Yamaguchi M, Jinnai M, Otsuka K, Oguma T, Takeda T, Mishima M.
Inflammatory subtypes in cough variant asthma: assessment using induced sputum.

52. Session 353: Airway regulation, provocation and monitoring — III — Tuesday, 18.09.2007 — 12:50:00—14:40:00 — Hall C—19
Terada K, Muro S, Niimi A, Ogawa E, Hoshino Y, Sato S, Ohara T, Kinose D, Haruna A, Marumo S, Mishima M.
Impacts of gastro—oesophageal reflux symptoms on exacerbations of COPD.

G. 知的所有権の取得状況

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 分担総合研究報告

呼吸不全に関する研究 (特に、1)肺リンパ脈管筋腫症(LAM)と 2)COPDに関して)

分担研究者 瀬山 邦明
順天堂大学医学部呼吸器内科 先任准教授

A. 研究目的

1) リンパ脈管筋腫症 (LAM) は、生殖可能な若年女性に発症し、100万人あたり約1.2-2.3の有病率が推測される稀な難治性疾患である。有効な治療法がないため、呼吸不全に至った重症例では肺移植が実施されるが、根本的治療法の開発が望まれる。LAMは、LAM細胞の増殖とリンパ管新生により特徴づけられる疾患であり、有効な治療法を開発するには症例の蓄積と臨床情報（肺機能や胸部HRCT画像データ）の解析に加え、LAM細胞を培養して細胞学的特性を解析する基礎研究が重要である。そのため、診断目的の肺生検、肺移植時に摘出した肺組織、乳糜胸水や腹水中のLAM細胞クラスターなどを材料としてLAM細胞の培養をおこなう。また、LAMに対するホルモン治療として低用量GnRH療法を実施している症例の呼吸機能、乳糜腹水や胸水、リンパ管新生、等への効果を検討する。さらに、重症例の病理学的評価を、特にLAM細胞浸潤による気道病変に焦点をあてて行う。

2) 慢性閉塞性肺疾患 (COPD)は、喫煙に代表される有害粒子の慢性的暴露により生じる気道や肺実質の慢性炎症性疾患で、高齢者に多く認められる。COPDは、約40年前後の長期間にわたる喫煙とそれによる慢性的病的反応過程に基づいて発病するため、COPDモデル実験動物を用いて病態研究を行うには、このような病変進行期間と加齢因子を加味したモデル動物系が望まれる。我々はSMP30ノックアウトマウス (SMP30Y/-マウス) が加齢肺モデルとなることを明らかにしているため、慢性的なタバコ煙曝露により肺気腫が誘導されるモデル系に

なりうるか、ひいては喫煙による肺気腫の病態評価に有用なモデル系となりうるかを検討する。

B. 研究方法

1) LAM細胞の初代培養は、剖検や生検時の肺組織、生検リンパ節組織、肺移植時の摘出肺組織、乳糜胸水や腹水中のLAM cell cluster、等々を用いoutgrowth法によりLAM細胞を試みた。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、BrDUの取り込みを指標とした細胞増殖アッセイ、等を行った。

臨床例のretrospectiveな検討は、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-LAM 15例) をretrospectiveに検討し、乳糜漏の合併の有無、治療内容、治療効果 (呼吸機能検査値の経時的变化、乳糜漏の変化、血清VEGF-D値の推移)、胸部HRCT画像データを解析し嚢胞の分布や嚢胞性変化と呼吸機能データとの関連性、等々を評価した。肺組織の病理学的検討は、岡山大学附属病院呼吸器外科および京都大学附属病院呼吸器外科において移植により摘出された肺5例および順天堂医院での剖検肺4例の気管支について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は順天堂大学医学部倫理審査委員会にて承認を受けたものである。

2) 雄SMP30Y/-マウス及び正常対照として雄SMP30Y/+マウスを対象動物とした。加齢に伴う肺の病理形

態学的変化（平均肺胞径MLI、肺胞破壊指数DI）、酸化ストレスの指標として肺組織カルボニル化蛋白質の免疫染色や定量的評価、肺組織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、等を行った。また、3ヶ月齢SMP30Y/−及びSMP30Y/+マウスを対象として、ノンフィルターピース（日本たばこ）を用いて2.5%希釈タバコ煙として30分間、週5日、8週間の曝露実験を行い、上記評価指標を検討した。

（倫理面への配慮）

本動物実験は東京都老人総合研究所及び順天堂大学医学部実験動物委員会にて承認を受けたものである。

C. 研究結果

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。これらの結果から、LAMの病変は形態学的・機能的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。

当院で診療しているLAM症例では、乳糜漏は14例（12.2%）に認めた。乳糜胸水のみ6例（5.2%）、乳糜腹水のみ2例（1.7%）、乳糜胸水と腹水を認めた症例4例（3.5%）、左乳糜胸水、腹水、心嚢水を認めた症例1例（0.9%）、乳糜腹水・右胸水・経腔乳糜漏を合併した症例1例（0.9%）であった。14例中8例は当科での治療あるいは紹介医との密接な連携のもとに治療経過が評価可能であった。2例（胸水のみ1例、胸水+腹水1例）は経過観察、1例（胸水）は胸膜癒着術が行われた。4例（胸水1例、腹水+胸水1例、腹水+胸水+心嚢水1例、腹水1例）

は低用量GnRH療法（leuprorelin acetate 1.88 mg/month）が行われ、乳糜漏の減少あるいは安定した経過が得られた。乳糜腹水中のLCCについて観察し得た2例では、低用量GnRH療法後にLCCのサイズの減少、濃度の減少、アポトーシス+cluster構造の崩壊、を認めた。従って、低用量GnRH療法は乳糜漏の治療や管理に有用である可能性が示唆された。

GnRH療法の呼吸機能に対する効果は、GnRH療法が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 \pm 5.7歳であった。7例は数年間の%FEV₁、%DLco/VAなどの呼吸機能検査値の推移に基づき経年的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）。%FEV₁の経年的減少はA群で3例、B群では7例にGnRH療法開始後に認められた。一方、%DLco/VAでは両群とも治療開始時に%DLco/VA <40%の症例がほとんどであり、経年変化に対するGnRH療法の評価は困難であった。血清VEGF-D値は1年以上の経過で反復測定しえた14例を評価した。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。これらの結果から、乳糜漏に対してはほぼ全例で効果が確認されるが、呼吸機能指標やリンパ管内皮細胞増殖因子であるVEGF-Dの血清値を指標とした場合には有効と判断できる症例とできない症例が存在し、GnRH療法に対する反応は多様であることが明らかとなった。

平成12年1月1日～平成18年10月30日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症例を対象として検討した。コンピューターソフトにより-960HU以下のCT値を持つピクセルを低吸収領域（LAA）と定義し、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%）を計測したところ、LAMではCOPDと異なり、中・下肺野を中心にLAAが分布するパターンが多いことが示された。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。また、右下葉区域枝であるB8・B9・B10が同一スライス上に確認できるスライスのみを選択し、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ところ、健常者と比しLAM症例の群で気道壁が肥厚している傾向が認められ、気管支壁の厚みを示すパ

ラメーター単独では肺機能検査値と強い相関を認めないものの、LAA%と併せ重回帰分析を行うことで、それぞれ単独よりも強い相関を認めた。

LAMでは閉塞性換気障害や拡散障害が主たる呼吸機能障害であるため、移植摘出肺（5例）およびの剖検肺（4例）を用いて気道を中心とした病理学的検討を行った。その結果、軟骨を伴う中枢側気管支にはさまざまな程度のLAM細胞の浸潤が認められ、増殖したLAM細胞は気管支壁を構成する軟骨、気管支腺、平滑筋などにも浸潤しそれらの構造の破壊を認めた。特に、LAM細胞による気管支軟骨の破壊は、軟骨の脱臼による気管支内腔の著しい狭窄をもたらしていた。また、気管支壁が高度に破壊され支持組織が消失した場合には、あたかも膜様気管支壁しか持たない細気管支様の気管支に変化している（気道の細気管支化）場合も見られた。気道粘膜に浸潤する炎症細胞を計測したところ、若年女性肺癌摘出肺での気道粘膜に比して、Tリンパ球と肥満細胞の浸潤が有意に多く、LAMにおける気道炎症にこれらの細胞が深く関与する可能性が示唆された。

2) SMP30Y/−マウスでは野生型マウスに比べて、加齢（生後1から12ヶ月まで検討）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、野生型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、両マウス（SMP30Y/−と野生型）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/−マウスは野生型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野生型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。BALF中の総グルタチオン含量は、大気曝露群の比較ではSMP30Y/−マウスで高い傾向にはあるが統計学的有意差は認めなかった。しかし、SMP30Y/−マウスではタバコ煙曝露によって著明な上昇を認め、一方野生型マウスでは有意な変化を認めなかった。

以上の結果から、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、加齢と酸化ストレスとの関連性の観点から加齢肺モデルとしての有用な実験動物であると思われる。また、2ヶ月間の喫煙曝露により容易に肺気腫を生じるため、加齢因子を加味した喫煙肺気腫モデルマウスとして今後のCOPDの病態や

治療薬物の効果判定などに有用なモデルと考えられた。また、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重要な機能タンパク質であると考えられた。

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。

LAM細胞はMatrix metalloproteinaseの発現することにより、肺胞や末梢気道の構造の破壊を引き起こすことはよく知られている。LAM重症例においては、末梢気腔のみならずLAMの進展に伴って気管支壁の構造を破壊し、気管支壁の脆弱性を亢進させ気管支の“細気管支化”や軟骨の脱臼を引き起こしたと考えられる。これらの気管支病変は、高度の気道閉塞を引き起こす可能性がある。さらに、LAM細胞や新生リンパ管が気管支壁・粘膜のみならず肺血管に浸潤することが今回の検討により明らかになった。これらの浸潤は小血管にも認められ、特にLAM細胞の増殖は血管腔の狭窄・閉塞をきたし血管床の減少や血管抵抗の増加を引き起こすものと思われる。気道粘膜に浸潤する炎症細胞は好中球、好酸球をほとんど認めず、リンパ球やマスト細胞などの単核細胞が高度であった。

病理学的に高度な中枢気道病変の存在が明らかになった点と一致して、胸部HRCTデータからも気管支壁の肥

厚が明らかとなった。LAMの嚢胞は中下肺野を中心に分布する症例が多く、COPDとは明らかに異なる病態であることが画像解析からもうかがえる。中下肺野は生理学的に血流・組織間液が多い部位であり、分子生物学のおよび病理学的解析からLAMはLAM細胞の転移により肺病変が進展していく病態との考えを支持する結果と思われる。嚢胞性病変の占める割合と肺機能検査値が有意な相関を示すこと、中下肺野における嚢胞性病変の割合が上肺野のそれと比べてより強く肺機能検査値と相関すること、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確認され、これらの点は過去にCOPDについて報告された事柄と同様であった。LAMとCOPDの病態は異なるが、嚢胞性病変と気道病変が成立した後の呼吸生理学的な表現型としては同様であることが示唆された。

低用量GnRH療法には乳糜漏を軽減し、LCCサイズと量の減少、LAM細胞のアポトーシスが確認され、LAMに合併する乳糜漏に対する治療効果があると考えられた。乳糜漏の治療として、プロゲステロン投与の有効性を示唆する報告があるが、低用量GnRH療法の効果に関する報告はなかった。長期のプロゲステロン療法ではエストロゲンレセプターやプロゲステロンレセプターのdown regulationが起こることが報告されているが、LAM細胞のアポトーシスについて報告した研究は、本研究が初めてである。また、呼吸機能の経年的悪化率を軽減し、リンパ管新生の指標である血清VEGF-D値も減少する症例があることが明らかとなったことより、エストロゲンはLAM細胞の増殖・リンパ管新生に役割を担っていると考えられる。LCCの産生、生存、ならびにその特徴的な構造を維持する点でも、エストロゲンが深く関わっていることが示唆される。

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。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。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、観点を換えれば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。ラパ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。

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。

LAMに合併する乳糜漏では、乳糜漏の程度、貯留速度、自覚症状や合併症の有無に応じて個別に治療を選択する必要がある。乳糜漏、特に乳糜複数の治療に苦慮する場合には低用量GnRH療法は有用な選択肢であることが示唆された。その背景には低エストロゲン状態によりLAM細胞クラスターの産生抑制とアポトーシスが関与している可能性がある。

重症のLAM症例では中枢気道にもLAM細胞の浸潤とリンパ管新生が認められ、管支壁を構成する軟骨、気管支腺、平滑筋などの構造の破壊を認め、気管支粘膜にはTリンパ球や肥満細胞の浸潤による慢性気道炎症性変化を認めた。特に、LAM細胞による気管支軟骨の破壊は、軟骨の脱臼、気道の細気管支化をもたらし、気管支内腔の著しい狭窄を生じていた。

LAMは嚢胞性肺病変が中下肺野に多く存在する点でCOPDと異なるが、中下肺野の嚢胞性病変が肺機能検査値により大きく影響し、さらに気道病変を加えて検討することで、特に閉塞性障害との相関がより良好となる点では、COPDと同様であった。

GnRH療法には昨年報告した乳糜胸腹水への効果に加え、肺機能の経年的悪化率の軽減や血清VEGF-D値の

低下など、効果の規模の問題はあるにせよ、反応を認める症例があることは事実である。新規治療法の開発までは、昨年に呼吸不全調査研究班がまとめた「治療と管理の手引き」に準じてGnRH治療を行うことは妥当であると考えられる。

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. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

1. 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 Oct; 29(10): 1356–66.
2. Kasagi S, Seyama K, Mori H, Souma S, Sato T, Akiyoshi T, Suganuma H, Fukuchi Y. Tomato juice prevents senescence-accelerated mouse P1 strain from developing emphysema induced by chronic exposure to tobacco smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Feb; 290(2): L396–404.
3. Fukuchi Y, Nagai A, Seyama K, Nishimura M, Hirata K, Kubo K, Ichinose M, Aizawa H, Research Group TB. Clinical efficacy and safety of transdermal tulobuterol in the treatment of stable COPD: an open-label comparison with inhaled salmeterol. *Treat Respir Med*. 2005; 4(6): 447–55.
4. Yamazaki A, Miyamoto H, Futagawa T, Oh W, Sonobe S, Takahashi N, Izumi H, Hiramama M, Seyama K, Fukuchi Y. An early case of pulmonary lymphangiomyomatosis diagnosed by video-assisted thoracoscopic surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Dec; 11(6): 405–7.
5. Sato T, Seyama K, Sato Y, Mori H, Souma S, Akiyoshi T, Kodama Y, Mori T, Goto S, Takahashi K, Fukuchi Y, Maruyama N, Ishigami A. Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Sep 1; 174(5): 530–7.
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 lymphangiomyomatosis. *Lymphat Res Biol*. 2006; 4(3): 143–52.
7. 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 lymphangiomyomatosis in Japan: a nationwide cross-sectional study of presenting features and prognostic factors. *Respirology*. 2007 Jul; 12(4): 523–30.
8. Hiramama M, Atsuta R, Mitani K, Kumasaka T, Gunji Y, Sasaki S, Iwase A, Takahashi K, Seyama K. Lymphangiomyomatosis diagnosed by immunocytochemical and genetic analysis of lymphangiomyomatosis cell clusters found in chylous pleural effusion. *Intern Med*. 2007; 46(18): 1593–6.
9. Mori H, Nose T, Ishitani K, Kasagi S, Souma S, Akiyoshi T, Kodama Y, Mori T, Kondo M, Sasaki S, Iwase A, Takahashi K, Fukuchi Y, Seyama K. PDE4 inhibitor (GPD-1116) markedly attenuates the development of cigarette smoke-induced emphysema in senescence accelerated mice P1 strain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Nov 9; [Epub ahead of print]

(和文)

1. 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 9; 55–60, 2005.
2. 佐藤輝彦, 井上恵美, 瀬山邦明. 画像診断 稀ではあるが知っておきたい肺疾患の画像診断シリーズ リンパ脈管筋腫症 初期. 呼吸24; Page 315–319, 2005.
3. 佐藤輝彦, 井上恵美, 瀬山邦明. 画像診断 稀ではあるが知っておきたい肺疾患の画像診断シリーズ リンパ脈管筋腫症 進行期. 呼吸24; Page 320–324, 2005.
4. 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53; Page719–727, 2005.

5. 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9; Page407-413, 2005.
 6. 林田美江, 藤本圭作, 久保恵嗣, 瀬山邦明, 井上義一. わが国におけるLAMの疫学. 日本胸部臨床 65; Page 113-119, 2006.
 7. 熊坂利夫, 瀬山邦明, 三谷恵子, 相馬早苗, 林大久生, 柏木聡子, 佐藤輝彦. LAMにおけるリンパ管新生とLAM細胞の転移メカニズム. 日本胸部臨床65; 129-141, 2006.
 8. 佐藤輝彦, 郡司陽子, 三谷恵子, 熊坂利夫, 瀬山邦明. LAMと遺伝子多型. 呼吸と循環54; Page827-832, 2006.
 9. 瀬山邦明, 熊坂利夫. リンパ脈管筋腫症 TSC遺伝子解析からLAMの進展機序への展開. 日本内科学会雑誌95; Page1048-1057, 2006.
 10. 熊坂利夫, 瀬山邦明, 三谷恵子, 郡司陽子, 相馬早苗, 林大久生, 佐藤輝彦, 柏木聡子, 城宝翠. 肺リンパ脈管筋腫症の病理と病態. 病理と臨床24; Page939-948, 2006.
 11. 瀬山邦明, 熊坂利夫, 三谷恵子, 佐藤輝彦, 林大久生, 郡司陽子. LAMは腫瘍か?. 呼吸26; Page23-30, 2007.
 12. 八戸敏史, 瀬山邦明. 肺疾患をCTで診る その他のびまん性肺疾患 リンパ脈管筋腫症. Medicina 44; Page327-329, 2007.
 13. 吉見格, 瀬山邦明. スパイロメトリーによるスクリーニング検査および呼吸機能精密検査. 日本臨床65; Page664-669, 2007.
 14. 平間未知大, 瀬山邦明. 【診断ピットフォール 症例から学ぶ】 呼吸器 息切れ・呼吸困難 若年女性で胸部X線肺野に異常がなくても、進行性の息切れを認めることもある. 内科99; Page1111-1113, 2007.
 15. 平間未知大, 瀬山邦明. 【診断ピットフォール 症例から学ぶ】 呼吸器 息切れ・呼吸困難 息切れを自覚している患者で、喫煙歴は診断の手がかりとなる. 内科99; Page1114-1115, 2007.
 16. 平間未知大, 瀬山邦明. 【診断ピットフォール 症例から学ぶ】 呼吸器 息切れ・呼吸困難 重症の閉塞性換気障害を認めてもCOPDではないことがある. 内科99; Page1116-1117, 2007.
 17. 瀬山邦明. チェックポイント 見落としやすい病気の話 リンパ脈管筋腫症 治療の実際と今後の展望. MMJ3; Page504-505, 2007.
 18. 瀬山邦明. チェックポイント・見落としやすい病気の話 リンパ脈管筋腫症(中)LAM確定診断には病理検査を推奨. MMJ3; Page416-417, 2007.
2. 学会発表 (国際学会)
 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 senescence-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 lymphangiomyomatosis. 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. Vascular 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. Mori H, Nose T, Ishitani K, Seyama K, Kasagi S, Souma S, Akiyoshi T, Yamaguchi Y, Kondo M, Sato T, Takahashi K. PDE4 inhibitor (GDP-1116) prevents senescence-accelerated mice P1 strain (SAMP1) from developing cigarette smoke-induced emphysema. The 11th Annual meeting of Asian Pacific Society of Respiriology, Kyoto, Japan, Nov. 19-22, 2006.
 7. Seyama K, Kumasaka T, Sato T. LAM and Lymp

- angiogenesis. Invited talk in Global LAM summit, Stockholm, Sweden, Feb. 25–26, 2007.
8. Seyama K, Sato T, Gunji Y, Kumaska T, Mitani K, Akiyoshi T, Tobino K, Hayashi T. Effect of long term administration of gonadotropin-releasing hormone analogues on chylous effusion in patients with lymphangiomyomatosis. LAM research conference in Cincinnati, USA, April, 2007.
 9. Mitani K, Kumaska T, Takemura H, Hayashi T, Hosokawa Y, Suda K, Gunji Y, Akiyoshi T, Seyama K. Cytological, Immunocytochemical, and Ultrastructural Characterization of LAM Cell Clusters in Chylous Effusion in Patients with Lymphangiomyomatosis. LAM research conference in Cincinnati, USA, April, 2007.
 10. Hayashi T, Kumaska T, Mitani K, Gunji Y, Suda K, Seyama K. Loss of Heterozygosity of the TSC Genes and Overexpression of mTOR-related Proteins in Multifocal Micronodular Pneumocyte Hyperplasia of the Lung. LAM research conference in Cincinnati, USA, April, 2007.
 11. Seyama K. Lymphangiomyomatosis – Lymphangiogenesis and GnRH therapy. Invited talk in LAM Treatment Alliance Conference, Nov. 1 (Thu), 2007.
 12. Seyama K. Lymphangiomyomatosis (LAM) A pulmonary disease involving lymphatic endothelial cells – Experience in Japan –. Invited talk in The Ludwig Institute for Cancer Research Seminar, Nov. 29 (Thu), 2007.
 13. Gunji Y, Seyama K, Kumaska T, Mitani K, Akiyoshi T, Tobino K, Takahashi K. Effect of long term administration of gonadotropin-releasing hormone analogues on chylous effusion in patients with lymphangiomyomatosis. The 12th Annual meeting of Asian Pacific Society of Respiriology, Gold Coast, Australia, Nov. 30–Dec. 4, 2007.
- (国内学会)
1. リンパ脈管筋腫症における腫瘍進展機構 熊坂利夫, 瀬山邦明, 三谷恵子, 柏木聡子, 蛇沢晶, 五味淳, 野中博子. 日本病理学会誌 94巻1号 Page201, 2005
 2. 瀬山邦明. 肺リンパ脈管筋腫症 ハマルトからラムへの展開. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page10, 2005
 3. 久保恵嗣, 林田美江, 藤本圭作, 瀬山邦明, 井上義一. Pulmonary lymphangiomyomatosis. 日本呼吸器学会雑誌43巻増刊 Page14, 2005.
 4. 瀬山邦明, 熊坂利夫, 三谷恵子, 佐藤輝彦, 相馬早苗, 須田耕一, 福地義之助. 肺リンパ脈管筋腫症の病態と治療の現状 肺リンパ脈管筋腫症の進展におけるリンパ管新生の役割. 移植40巻1号 Page84–85, 2005.
 5. 佐藤匡, 石神昭人, 丸山直記, 森貴紀, 児玉裕三, 瀬山邦明, 福地義之助. SMP30ノックアウトマウスの肺におけるカルボニル化蛋白質質量の加齢変化. 日本老年医学会雑誌42巻Suppl. Page79, 2005.
 6. 熊坂利夫, 瀬山邦明, 三谷恵子, 柏木聡子, 佐藤輝彦, 相馬早苗, 福地義之助, 須田耕一. 肺リンパ脈管筋腫症の腫瘍進展におけるLAM cell cluster (LCC)の役割. 家族性腫瘍5巻2号 Page A33, 2005.
 7. 佐藤匡, 瀬山邦明, 石神昭人, 丸山直記. 加齢に伴う呼吸器疾患モデルとしてのSMP30欠損マウスの有用性の検討. 日本病理学会誌95巻1号 Page212, 2006.
 8. 佐藤匡, 瀬山邦明, 守博昭, 児玉裕三, 森貴紀, 笠木聡, 高橋和久, 福地義之助. SMP30ノックアウトマウスは生物学的老化因子を有する新たな肺気腫モデルとなる. 日本呼吸器学会雑誌44巻増刊 Page194, 2006.
 9. 林大久生, 熊坂利夫, 三谷恵子, 宮国泰香, 瀬山邦明, 郡司陽子, 須田耕一. 女性生殖器にみられるリンパ脈管筋腫症の病理組織学的特徴 肺・リンパ節病変との比較. 日本病理学会誌96巻1号 Page254, 2007.
 10. 郡司陽子, 瀬山邦明, 熊坂利夫, 三谷恵子, 佐藤輝彦, 秋吉妙子, 小池建吾, 高橋和久. 乳糜胸腹水合併LAM症例における低用量GnRH療法の効果. 日本呼吸器学会雑誌45巻増刊 Page275, 2007.
 11. 熊坂利夫, 三谷恵子, 林大久生, 須田耕一, 山鳥一郎, 郡司陽子, 瀬山邦明. 重症肺リンパ脈管筋腫症における中枢気道の病理学的解析. 日本呼吸器学会雑誌45巻増刊 Page275, 2007.
 12. 飛野和則, 瀬山邦明, 平井豊博, 郡司陽子, 佐藤輝彦, 三嶋理晃, 高橋和久. リンパ脈管筋腫症(LAM)における胸部HRCT像と肺機能検査値の比較検討. 日本呼吸器学会雑誌45巻増刊 Page275, 2007.
 13. 三谷恵子, 熊坂利夫, 林大久生, 須田耕一, 郡司陽子, 秋吉妙子, 瀬山邦明. 乳び体腔液中LAM cell cluster (LCC)の細胞学的特徴とその意義. 日本呼吸器学会雑誌45巻増刊 Page275, 2007.

14. 北島紀子, 佐藤匡, 佐藤安訓, 瀬山邦明, 後藤佐多良, 丸山直記, 石神昭人. ビタミンC不足は喫煙による慢性閉塞性肺疾患(COPD)発症リスクを高める. 基礎老化研究31巻2号 Page47, 2007.
15. 三谷恵子, 竹村浩之, 大沼八千代, 林大久生, 郡司陽子, 秋吉妙子, 瀬山邦明, 熊坂利夫, 須田耕一. LAM患者の乳糜体腔液中LAM細胞集塊の細胞学的特徴と治療効果判定への応用. 日本臨床細胞学会雑誌46巻Suppl.2 Page592, 2007.

G. 知的財産権の出願・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） 分担総合研究報告

COPD患者における気道被覆液及び 血漿バイオマーカー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には不明な点が多く、臨床上有用なバイオマーカーは限られている。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ならびに血漿を用い、プロテオーム解析を行った。これまでの検討により、気道被覆液、血漿の蛋白発現パターンがCOPD患者では対照群に比べ異なることが明らかとなった。COPDと対照群の比較により、8170, 31902Daの気道被覆液中蛋白は対照群で発現が増強し、11207DaではCOPD群で発現が増強していた。一方、気腫優位型で発現が低下した2種類の血漿蛋白と気腫病変が軽微な群で発現が増加していた1種類の血漿蛋白が検出された。さらに、上皮細胞間接着分子の可溶性sE-CadherinはCOPD群(376 ng/ml)およびCOPDリスク群(350 ng/ml)で喘息群(295 ng/ml)、健常群(269 ng/ml)に比べ血漿濃度が有意に高く、COPD関連バイオマーカーとして有用と考えられた。

A. 研究目的

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。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。近年筆者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。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った。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、気道上皮細胞間接着分子E-cadherinの可溶性である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。

B. 研究方法

17年度

COPD患者と対照喫煙者ならびに非喫煙者に対し、気管支鏡下に末梢気道より気道被覆液を採取し、プロテオーム解析を行った。プロテインチップ(SELDI-TOF-MS)を用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。

18年度

(検討1) COPD患者3名、対照喫煙者1名、非喫煙者1名に気管支鏡下に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, CM10, H50)を用い、プロテオーム解析を行った。COPD患者1名、対照非喫煙者1名では比較のため血漿を用いた解析も行った。

(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、%FEV_{1.0}が最大の21名(喫煙抵抗群、平均108%)と最小の20名(喫煙感受性群、平均25%)を抽出し、CM10を用いて血漿蛋白のプロテオーム解析を行った。

19年度

(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、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COPDハイリスク患者238名のうち、LAAスコア(胸部CTでの気腫化を視覚法で定量: 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。

C. 研究結果

17年度

予備実験の結果、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, H50の3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、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。

18年度

(検討1)

3種類のプロテインチップにより、気道被覆液、血漿ともに異なる蛋白発現パターンがみられた。CM10では気道被覆液中蛋白の吸着がやや不良であった。

同一症例において、同じ種類のチップを用いた解析に

より、気道被覆液と血漿では異なる発現パターンとなる
ことが確認された (Q10, CM10, H50のいずれの場合も)。

Q10を用いた気道被覆液中蛋白の症例間比較では、
COPD患者3例と対照2例でそれぞれに特異的と思われ
るピークが検出された。H50での気道被覆液中蛋白の比
較でも、COPD患者と対照例に特異的な可能性のあるピー
クが検出された。

COPD患者1例と非喫煙者1例のみでの血漿蛋白の比
較では、3種類のチップともに複数のピーク発現に違い
がみられた。

(検討2)

分子量1500-70000の間の全シグナルを用いた補正に
より、normalization factor 2.5以上を除外した抵抗群1
7名、感受性群18名の血漿蛋白の解析により37のピーク
が検出された。このうち分子量17330 ($p < 0.01$)、8628、
17461、8973 ($p < 0.05$) の4種類の蛋白が喫煙抵抗群
で感受性群に比べ発現が増加していた。

19年度

(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 ($p < 0.05$)。一
方、11207DaではCOPD群で発現が増強していた ($p <$

0.05)。

(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 ($p < 0.05$)。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 ($p < 0.05$)。

(検討3)

COPD群(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。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。

D. 考察

17年度

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
る必要があると考えられた。

18年度

COPDはその気道炎症の多様性のため、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、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。また、マイクロサンプリ
ングと平行した血漿のサンプリングは、より大きなサン
プルサイズでの統計解析を可能とし、気道被覆液中蛋白
との比較対照の意味からも重要と考えられる。

本年度の検討1の結果より、複数の種類のプロテイン
チップを用い、気道被覆液と血漿の両方を解析の対象と
することの意義が確認された。また、いまだ少数例での
比較ではあるが、気道被覆液、血漿の各々において、
COPD患者と健常者に特異的に発現する複数のバイオマ
ーカーが検出される可能性が示唆された。

検討2の結果からは、約20例程度の2群間比較により、
バイオマーカー検索が統計的に可能であることが確認さ
れた。今回焦点をあてた気流制限については、4種類の
蛋白の発現が喫煙感受性群で喫煙抵抗群に比べ低下して
おり、これらの中に、喫煙抵抗性を規定する因子が含ま
れている可能性がある。今回の検討では、比較した2群
間の年齢、喫煙状況などが必ずしもマッチしていない。
また、気腫化の程度など、他の因子により層別化を行う
ことも可能である。

19年度

本年度症例数を増やした結果、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
の検出が実際に可能と考えられた。検出された蛋白の同
定が必須であるが、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