

検出が可能と考えられた。本年度は年齢、喫煙歴のマッチした4群で気腫化、気流制限の2つの因子に寄与する分子の同定を進める戦略を選択したが、この手法は有望と考えられる。

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検出された蛋白についても、同定の後、同様な検証が必要と考えられる。

E. 結論

近年開発したマイクロサンプリングプローブで採取した気道被覆液を用い、プロテインチップによる蛋白発現パターンの比較が可能であると考えられた。COPD患者気道被覆液と血漿を用いたプロテインチップ解析により、COPDに特異的なバイオマーカーの検出が可能と考えられた。さらにCOPDの病型と関連するバイオマーカーの存在が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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。

Minematsu, N., Nakamura, H., Furuuchi, M., Nakajima, T., Takahashi, S., Tateno, H., Ishizaka, A. Limitation of cigarette consumption by CYP2A6*4, *7 and *9 polymorphisms. Eur. Respir. J. 2006; 27: 289-292.

仲村秀俊、中村美穂、石坂彰敏。 COPDのプロテオミクス解析。 呼吸と循環 2006; 54:1311-1316.

仲村秀俊、石坂彰敏。 気管支鏡を用いた上皮被覆液(ELF)のマイクロサンプリング法。 アレルギーの臨床 2006; 26: 718-721.

仲村秀俊、中村美穂、石坂彰敏。 呼吸器疾患のバイオマーカー：気道被覆液。 呼吸と循環 2006; 54:585-590.

白畑 亨、仲村秀俊、石坂彰敏：呼吸器 呼吸不全。 総合臨床56(増刊)：1038-1043, 2007

Minematsu N, Nakamura H, Furuuchi M, Nakajima T, Takahashi S, Tsujimura S, Tateno H, Ishizaka A. Common functional polymorphisms in cathepsin S promoter in Japanese subjects; possible contribution to pulmonary emphysema. *Respirology* (in press)

渡辺真純、神山育男、神谷一徳、佐和貞治、仲村秀俊、石坂彰敏、小林紘一：気道上皮被覆液のプロテオーム解析 気管支鏡下マイクロサンプリング検体での検討。 気管支学28(8) 592-596, 2006

2. 学会発表

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

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

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

渡辺真純、石坂彰敏、神谷一徳、神山育男、仲村秀俊、長谷川直樹、小林紘一：呼吸器内視鏡による新診療法 中枢から末梢まで 肺末梢病変に対するマイクロサンプリング法の応用 肺癌における各種マーカーの解析。(日本呼吸器学会総会、東京、2006、6月)。

仲村秀俊、辻村周子、佐藤 勲、中村美穂、石坂彰敏：
呼吸管理における非侵襲的モニタリング（FG視覚セ
ンサー）。（日本呼吸管理学会総会、札幌、2006、7
月）。

渡辺真純、神谷一徳、神山育男、佐和貞治、仲村秀俊、
石坂彰敏、小林紘一：気道病変に対する分子生物学的
アプローチ 肺上皮被覆液のプロテオーム解析 気管
支鏡下マイクロサンプリング検体での検討。（日本呼
吸器内視鏡学会総会、つくば、2006、6月）。

S Tsujimura, H Nakamura, I Sato, M. Nakamura,
S. Takahashi, T. Nakajima, A Ishizaka. Utilization
of Fiber Grating vision sensor for the assessment of
pulmonary functions in COPD. 第11回APSR(京都)、
2006年11月

M. Nakamura, H Nakamura, N. Minematsu, M.
Yamamoto, T. Nakajima, S. Tsujimura, S. Takahashi,
A. Ishizaka. Association of TGF- β 1 polymorphisms
with COPD in Japan. 第11回APSR(京都)、2006年1
1月

白畑亨、仲村秀俊、本田康之、中島隆裕、峰松直人、石
坂彰敏：COPDにおける血漿中Soluble E-Cadherin
測定の意味。日本呼吸器学会総会、東京、2007.5月

中島隆裕、仲村秀俊、辻村周子、白畑亨、中村美穂、高
橋左枝子、峰松直人、館野博喜、石坂彰敏：E-Cadherin
遺伝子多型とCOPD。日本呼吸器学会総会、東京、
2007.5月

中村美穂、仲村秀俊、辻村周子、白畑亨、高橋左枝子、
中島隆裕、峰松直人、石坂彰敏：COPDにおける気流
制限に關与する血漿バイオマーカーの検出。日本呼吸
器学会総会、東京、2007.5月

S Tsujimura, H Nakamura, I Sato, T Shirahata, M
Nakamura, S Takahashi, T Nakajima, M Nakajima,
A Ishizaka Analysis of quiet breathing in COPD using
Fiber Grating vision sensor. ERS (ストックホルム)、
2007年9月

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

呼吸不全に関する基礎・臨床研究：COPDを中心に

分担研究者 長瀬 隆英
東京大学医学部附属病院呼吸器内科 教授

研究要旨

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

1) 血流制限下レジスタンストレーニング（加圧トレーニング）は、特殊なベルトを四肢の付け根に巻いて適度に血流を制限した状態でレジスタンストレーニングを行う方法で、この加圧トレーニングにより健常者において著明な筋肥大と筋力増大を認めることが知られる。COPD患者を中心として、呼吸器疾患患者の呼吸リハビリテーションにおける加圧トレーニング運動療法のプロトコールが検討された。

2) 脂質性メディエーターやCGRPファミリーに着目し、炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索した。その結果、各々のメディエーターが肺疾患病態に重要な役割を呈していることが示された。

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

び新治療法の開発を目指す。

研究協力者

石井 聡・東京大学大学院医学系研究科准教授

永田泰自・東京大学医学部附属病院講師

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究:

運動療法を中心とした呼吸リハビリテーションのCOPD患者に対する有効性は、多くの科学的な証拠に裏づけられている。国際的ガイドラインであるGOLDによれば、運動能力の改善、呼吸困難感の軽減、健康関連QOLの向上、入院回数・日数の減少、不安・抑うつ軽減が証明されており、さらには生存率の改善も報告されている。しかし、いまだに標準的な運動療法は確立されておらず、安全性・有効性においてより質の高い運動処方求められている。

近年スポーツ医学の分野では、血流制限下レジスタンストレーニング（登録商標名：加圧トレーニング）という筋力トレーニングが注目されている。これは特殊なベルトを四肢の付け根に巻いて適度に血流を制限しながら

A. 研究目的

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

行うもので、低負荷かつ短時間の筋力トレーニングにより筋肥大と筋力増強効果が得られることが特徴である。また同時に筋持久力が増加することも報告されている。

加圧トレーニングは血中の成長ホルモン（GH）を著しく増加させることも報告されており、筋肥大のメカニズムの一つと考えられている。四肢の血行制限により筋組織が低酸素状態となり、乳酸などの代謝産物の蓄積を介して下垂体からのGHの分泌が活性化される可能性が推測されている。東京大学医学部附属病院においても本法のメカニズムの解明と臨床応用を目指して虚血循環生理学講座が開設され研究が進められている。加圧トレーニングは既にスポーツ外傷など整形外科領域のリハビリテーションにも用いられているが、呼吸リハビリテーションへの応用はこれまでに報告がない。

このように低負荷かつ短時間で筋力増強と持久力改善を期待できる加圧トレーニングの特徴は、呼吸困難で運動が制限されているCOPD患者にこそ特に適している可能性がある。運動療法に加圧トレーニングを応用して、より安全かつ有効な呼吸リハビリテーションを開発できる可能性は十分に期待できる。本研究では、COPD患者に実際に加圧トレーニングを行い、その有効性と安全性を検討する。

さらに、加圧トレーニングの効果が筋組織の低酸素状態や乳酸蓄積などに依存している可能性を考えれば、もともと低酸素状態となりやすく乳酸が蓄積しやすいCOPD患者に対しては健常人以上に有効な可能性がある。そしてGHの増加を介して、呼吸筋など全身筋組織に影響を与える可能性もある。本研究では下肢のみの筋力トレーニングによる、GH等の血中物質の変動、上肢筋力と呼吸筋力の変化など、副次的効果も合わせて検討する。

2) 発生工学を駆使した基礎研究：

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

脂質性メディエーターであるプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどはエイコサノイドと総称され、アラキドン酸を起点とする代謝経路の代謝産物である。アラキドン酸は、炭素数20よりなる構造を持ち、生体ではリン脂質から細胞質型ホスホリパーゼA₂ (cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂)によって切り出される。この際に、同時にリゾPAF (lyso-PAF)が生成され、リゾPAFから血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF)が作られる。アラキドン酸は、図1に示すように、アラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て様々なエイコサノイドを生成する。その2つの大きな経路が、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX)系および、5-リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase, 5-LO)系である。プロスタグランジン、トロンボキサンはシクロオキシゲナーゼ系の代謝物であり、ロイコトリエンは5-リポキシゲナーゼ系の代謝物である。

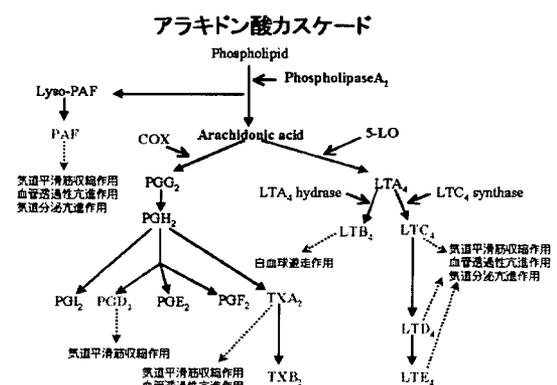


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

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

PAFおよびエイコサノイドは、その生理活性作用より、炎症性肺疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が推察されるが、未だに検証されていない。本研究では、

発生工学的手法を応用し、脂質性メディエーターの炎症性肺疾患発症機序における重要性について検討する。特に、COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などにおける、PAFおよびエイコサノイド関連遺伝子の意義を明らかにする。さらに、治療の標的を明確にし、有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的とする。

CGRPファミリー：

近年、炎症を促進あるいは抑制する生理活性因子として、エンドセリン-1 (endothelin-1, ET-1)、アドレノメデュリン(adrenomedullin, AM)、calcitonin gene-related peptide (CGRP)などのペプチドが注目されている。ET-1は、炎症促進、血管・気管支平滑筋収縮、エイコサノイド産生、サイトカイン産生刺激能を有することが報告されている (T.Nagase. *Am. J. physiol.* 1995)。一方、CGRPは、炎症抑制、血管・気管支平滑筋の拡張・弛緩作用を有しており (T.Nagase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996)、アドレノメデュリンも同様の血管平滑筋拡張・弛緩作用が報告されている。CGRPおよびアドレノメデュリンは、受容体を共有することが報告されており、CGRPファミリーと呼ばれるペプチド群に属している。CGRPおよびアドレノメデュリンは、気管支喘息やARDSの発症メカニズムに重要な役割を担っている可能性が考えられるが、国内・海外において未だ十分な検討がなされていないのが現状である。生理活性作用を有する循環ペプチドは、気管支喘息などの治療薬開発の標的としても画期的な系であると考えられる。

本研究では、このCGRP遺伝子の高齢者呼吸器疾患発症機序への関与について探索する。CGRPは37アミノ酸残基より構成され、循環器・神経系を中心に多彩な作用を有することが知られている。肺・気管支にはCGRPを含む感覚神経C-fiberが豊富に存在し、またreceptorも豊富に存在することが報告されている。従って、CGRPが気道疾患発症機序に関与する可能性が想定されるが、未だ十分に検討されていない。最近、CGRP遺伝子欠損マウスが作成され(Ohashi. *Circ. Res.* 2001; 89: 983-990)、CGRPが循環動態に重要であることが報告されている。本研究では、このCGRP遺伝子欠損マウスを用いて、CGRPのARDS発症機序への関与について検討を加える。

B. 研究方法

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究：

外来通院中の中等症または重症（1秒量が予測値の30%以上80%未満）のCOPD患者を対象とした。過去3ヶ月以内の急性増悪あるいは経口ステロイド使用のあった例は除外した。また「呼吸リハビリテーションマニュアル—運動療法—」（日本呼吸管理学会・日本呼吸器学会・日本理学療法士協会）に基づき、運動療法あるいは運動負荷試験の禁忌症例（不安定狭心症、重度肺高血圧等）も除外した。さらに、加圧が血管病変を誘発する可能性を考慮し、深部静脈血栓症の既往、肺血栓塞栓症の既往、閉塞性動脈硬化症の既往、下肢静脈瘤、血栓傾向のある症例も対象から除外した。全例で運動療法前に心電図、心臓超音波検査、下肢超音波検査を施行し、明らかな虚血性心疾患、肺高血圧症、深部静脈血栓症のないことを確認した。

呼吸リハビリテーションの前後で、呼吸機能、動脈血液ガス、運動耐容能、筋量、筋力、ADL、健康関連QOLの評価を行った。

運動耐容能は6分間歩行試験で評価した。上下肢の筋量は四肢周径、上肢筋力は握力、下肢筋力は等速性筋力測定器（トルクマシーン）による膝伸展筋力、膝屈曲筋力で評価し、呼吸筋力は最大吸気圧 (P_Imax) および最大呼気圧 (P_Emax) で評価した。ADLは千住らのADLスコア、健康関連QOLは日本語版St. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) を用いて評価した。

さらに加圧トレーニングによる短期的な全身への影響を評価するために、トレーニング直前・直後・15分後・30分後・60分後の上肢静脈血中の乳酸・GH・インスリン様成長因子5 (IGF-5)・血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を測定した。乳酸は乳酸オキシダーゼ酵素法、GHとIGF-5はRIA固相法、VEGFはELISA法で測定した。

週2回の通院による運動療法を当院リハビリテーション室にて10週間行った。初めの2週間は、呼吸法習得とストレッチを中心としたコンディショニングを行った。その後の8週間は、20%1RMの低負荷で下肢の加圧筋力トレーニングを行った。具体的には、圧力センサーを組み込んだ特製の弾性ベルトを両側大腿近位部に巻き、下肢血流を制限しながら、1セット30回、3セットの膝伸展筋力トレーニングを行った。

運動療法中は医師が付き添い、脈拍とSpO₂を連続的にモニターしながら安全に配慮した。「呼吸リハビリテーションマニュアル—運動療法—」の運動療法中止基準

(修正Borgスケール7~9の呼吸困難、SpO₂90%以下の低酸素血症など)に従った。

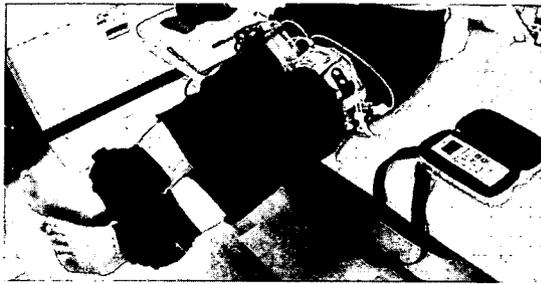


図2 加圧トレーニング

2) 発生工学を駆使した基礎研究：

<LTB₄受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

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

<CysLT₂受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

LTC₄/D₄/E₄などcysteinyllt受容体(CysLT1-R, CysLT2-R)は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。特に、CysLT2-Rは大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、このCysLT2-Rを標的としたKO、Tgマウスの新規作成にも着手する。これらのマウスを用いて、脂質性メディエーターと炎症性肺疾患との関連について評価・検討を加える。

<CGRPのARDS発症機序への関与>

Oh-hashiraらによって確立されたCGRPノックアウトマウス(ホモ接合体)と、そのlittermateコントロールの野生型マウスを用いた。

CGRPノックアウトマウス(ホモ接合体)と、そのlittermateコントロールの野生型マウスを用いた。胃液誤嚥性ARDSモデルとして、塩酸の気管内投与を行い、2時間後に、呼吸不全・肺障害の進展度を検討した(Nagase, *Nature Immunol* 1:42-46, 2000)。

(倫理面への配慮)

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

済産業省告示第1号)に基づき、研究を進める。

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

動物実験に際しては、東京大学医学部動物実験施設内規に則して、動物愛護への配慮を最大限に行った。また本研究で行う遺伝子組換え実験は、平成16年9月10日の東京大学医学部組換えDNA実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエーター受容体、合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられている。

C. 研究結果

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究：

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

現時点の対象は2例である。第1例目(69歳、男性、中等症COPD)は、初回のトレーニング時に左膝違和感があり中止した。症状は当日中に改善したが、もともと社会人野球で膝を傷めた既往があったため、その後も筋力トレーニングは中断している。第2例目は予定した10週間の呼吸リハビリテーションを完遂したので経過を報告する。

報告症例は66歳、男性、現在喫煙中の重症COPD患者である。修正MRCスケールでgrade2の呼吸困難があり、サルメテロールとオキシトロピウムを使用中である。運動療法は、最大圧170mmHgの下肢血流制限下で、20%1RMの負荷で、1セット30回、3セットの膝伸展筋力トレーニングを行った(運動療法の様子を図2に示す)。トレーニング中に呼吸困難、SpO₂低下はみられなかった。5~6週目に大腿四頭筋のはりを感じたが、スケジュール変更を要さず自然軽快した。

図3に呼吸リハビリテーション前後の下肢筋力の変化を示す。膝伸展筋は、等尺性運動においても等速性運動においても、左右の筋力増強がみられた。膝屈曲筋においても同様の筋力増強がみられた。大腿周径はリハビリ

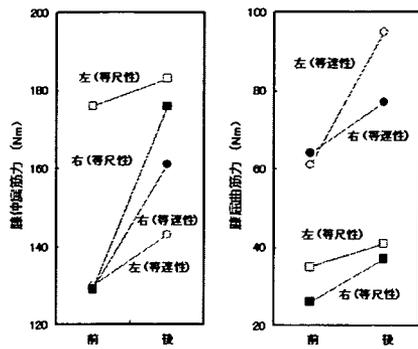


図3 呼吸リハビリテーション前後の下肢筋力の変化

テーションの前後で明らかな変化はなかった。

表1にその他の評価項目を示す。上肢筋力に明らかな変化はみられなかったが、呼吸筋力はPI_{max}、PE_{max}ともに増加した。努力性肺活量と1秒量はわずかながら増加し、動脈血液ガス上ではPaO₂の増加、A-aDO₂の減少がみられた。6分間歩行距離は54mの増加があった。ADLスコアに変化はなかった。SGRQスコアは活動性、インパクト、合計点で減少がみられQOLの改善を示した。

図4は、運動療法開始4週目に加圧トレーニングの前後の乳酸、GHの血中濃度を測定した結果である。乳酸は運動直後に、GHは15分後にピークを示す増加がみられた。IGF-5(ng/mL)については、運動前205、直後207、15分後220、30分後204、60分後226とほぼ横ばいであった。VEGF(pg/mL)も、運動前56、直後31未満、15分後35、30分後43、60分後31未満と増加はみられなかった。

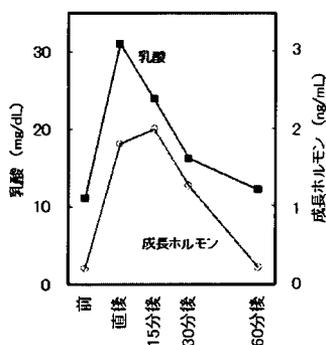


図4 運動療法開始4週目に加圧トレーニングの前後の乳酸、GHの血中濃度を測定した結果

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

表1

	前	後
上肢筋力		
右握力 (kg)	39	41
左握力 (kg)	36	34.5
呼吸筋力		
PI _{max} (cmH ₂ O)	-140	-170
PE _{max} (cmH ₂ O)	59	88
呼吸機能		
FVC (L)	3.08	3.18
FEV1 (L)	1.04	1.19
%FEV1 (%)	40	46
RV/TLC (%)	43.6	44.8
DLCO (mL/min/mmHg)	18.7	15.2
動脈血液ガス		
PaO ₂ (Torr)	77.3	86.7
PaCO ₂ (Torr)	41.5	38.4
A-aDO ₂ (Torr)	20.8	15.3
運動耐容能(6分間歩行試験)		
歩行距離 (m)	487	541
歩行前 SpO ₂ (%)	95	95
歩行後 SpO ₂ (%)	93	96
歩行前 PR(bpm)	78	84
歩行後 PR(bpm)	122	129
修正 Borg scale (息切れ)	2	2
修正 Borg scal (下肢疲労)	1	1
ADL・QOL		
千住らの ADL スコア	96	96
SGRQ 症状	34.5	34.5
SGRQ 活動性	54.4	47.7
SGRQ インパクト	28.4	24.9
SGRQ 合計	37.3	33.4

2) 発生工学を駆使した基礎研究：

<LTB₄R-KOマウスの作成>

LTB₄R-KOマウスの作成プロセスは順調に進展した。キメラマウスの中で、germ line にノックアウトDNA

コンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体LTB₄Rノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体LTB₄Rノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。

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

BALF中のPGE₂、LTB₄は抗原感作・吸入負荷により著明に増加していた。なお、BALF中のLTB₄はノックアウトマウス群で有意に減少していたが、BALF中のPGE₂は両群で差を認めなかった。

<CysLT2受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

キメラマウスの中で、germ lineにノックアウトDNAコンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体LTB₄Rノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体LTB₄Rノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めていない。

<CGRPのARDS発症機序への関与>

野生型群では、塩酸の気管内投与により著明な呼吸不全・肺障害を認め、saline群に比べ有意に肺エラスタンスが増加していた。一方、塩酸を投与されたCGRPノックアウトマウス群は、野生型群と比べて有意に呼吸不全・肺障害・肺エラスタンスが低下しており、CGRPがARDS発症機序に関わる可能性が示唆された。

BALF細胞分画解析において、塩酸の気管内投与により著明なneutrophiliaが認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間において有意差は認めなかった。

D. 考 察

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究:

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

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

スポーツ医学の分野ではすでに認知され、スポーツ外傷などのリハビリテーションに応用され始めている。

COPD患者における加圧トレーニングの安全性についても今後の検討が必要である。もともと健常人における安全性についても十分な情報がなかったため、我々は全国195施設に対しアンケート調査を実施し、105施設から得られた有害事象を本年度既に報告している。

施設は病院、接骨院、トレーニング施設、リハビリテーション施設など多彩であり、トレーニングの目的は整形外科疾患・脳血管障害のリハビリテーション、各種スポーツの能力向上が主であった。調査した105施設で加圧トレーニングを実施した12642例のうち、有害事象は皮下出血1651例(13.1%)、しびれ164例(1.3%)、脳貧血35例(0.3%)の頻度が最も高かった。しかし他にも静脈血栓症7例(0.06%)、虚血性心疾患2例(0.02%)、横紋筋融解1例(0.008%)と、稀ながらも注意を要する偶発症が報告された。

今回の検討においてもこのアンケート調査に基づき、全例で運動療法前に心電図、心臓超音波検査、下肢超音波検査を施行し、明らかな虚血性心疾患、肺高血圧症、深部静脈血栓症を除外することとした。また今回報告した症例では、運動療法後に血中のCKとDダイマーの増加はなく、明らかな横紋筋融解と静脈血栓症が発症していないことを確認している。

健常人においては、加圧トレーニングにより血中のGH、IGF-5、VEGFが増加することが報告されている。本研究でGHはCOPD患者においても増加し得ることが示されたが、IGF-5増加しなかった。一般的にトレーニングによる筋肥大にはGHが大きく関わっているとされるが、GHが肝臓に作用して分泌されるIGF-5が強い筋肥大効果を発揮するためと考えられている。今回の報告例では8週間の運動療法によって筋肥大がみられなかったことも、IGF-5の増加がなかったことと関連するかもしれない。COPD患者に一般的な現象か否かも不明であり、今後多

くの症例で検討しなければならない。

2) 発生工学を駆使した基礎研究：

PAF、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどは、多彩な生理活性作用を有するメディエーターであり、呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。特に、高齢者炎症性肺疾患において、白血球遊走・賦活化は極めて重要な位置を占めると考えられる。本研究では、白血球遊走に関与するロイコトリエン B_4 (LTB $_4$) 受容体やCysLT2受容体遺伝子の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、その機能解析を目指した。

本研究グループは、LTB $_4$ 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成に着手し、LTB $_4$ 受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索することを目指した。その結果、ホモ接合体LTB $_4$ Rノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。この知見は、LTB $_4$ が生殖・発達に大きく寄与しない可能性を提示するものである。

LTB $_4$ Rノックアウトマウスが出生時形態的奇形を呈しておらず、発育・成長においてもコントロールの野性型マウスと比べ全く差を認めていないという知見は、たとえばLTB $_4$ 拮抗薬治療薬の開発・実用化の見通しに寄与すると考えられる。

また本研究グループは、CysLT2受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成に着手し、疾患への寄与度を検索することを目指した。その結果、ホモ接合体のCysLT2受容体遺伝子ノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。

今後は、本研究により確立されたCysLT2受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いてARDSモデル (Nagase, **Nature Immunol**, 2000)や肺線維症 (特発性間質性肺炎) モデル (Nagase, **Nature Medicine**, 2002)の検討を進める予定である。今後、各々のエイコサノイドがもつ生理的意義・重要性が解明されることにより、難治性呼吸器疾患に対する有効な治療法・治療薬の開発および実用化が期待される。

CGRPファミリー：

<CGRPのARDS発症機序への関与>

現在、ARDSの有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的として、様々な研究アプローチがなされており、研究面では、有望と思われる分子機序が報告され

つつある。例えば、CGRPなどの生理活性ペプチドは、血管透過性に影響を与えることによりARDS発症に関わる可能性も考えられる。そこで、塩酸誤嚥によるARDSモデルを作成しCGRP遺伝子欠損マウスを用いて解析・検討した。その結果、塩酸を投与されたCGRPノックアウトマウス群は、野生型群と比べて有意に呼吸不全・肺障害・肺エラスタンスが低下しており、CGRPがARDS発症機序に関わる可能性が示唆された。しかしながらCGRPノックアウトマウスにおいて好中球浸潤に対する影響は認められなかった。この所見より、CGRPが炎症細胞浸潤よりも血管透過性に影響を与えることによってARDS発症機序に関わる可能性が推察されるが、今後さらなる検討が必要である。

CGRP遺伝子欠損マウスは、CGRPが関与する呼吸器疾患の病態メカニズムの解明に寄与することが期待される。

E. 結論

1) 血流制限下レジスタンストレーニング (加圧トレーニング) は、特殊なベルトを四肢の付け根に巻いて適度に血流を制限した状態でレジスタンストレーニングを行う方法で、この加圧トレーニングにより健常者において著明な筋肥大と筋力増大を認めることが知られる。COPD患者を中心として、呼吸器疾患患者の呼吸リハビリテーションにおける加圧トレーニング運動療法のプロトコールが検討された。

2) 脂質性メディエーターやCGRPファミリーに着目し、炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索した。その結果、各々のメディエーターが肺疾患病態に重要な役割を呈していることが示された。

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi Y, Nagase T, Tomita T, Nakamura K, Fukuhara S, Amano T, Yamamoto H, Ide Y, Suzuki M, Teramoto S, Asano T, Kangawa K, Nakagata N, Ouchi Y, Kurihara H. Beta-defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C2141-9.
- 2) Yamamoto H, Nagase T, Shindo T, Teramoto S, Aoki-Nagase T, Yamaguchi Y, Yokomizo T, Nagai R, Kurihara H, Ouchi Y. Impaired innate adreno medullin function deteriorates airway hyperresponsiveness in mice: possible roles of allergen-induced airway wall remodeling. *J Appl Physiol* 2007; 102: 2361-8.
- 3) Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashii Y, Kurihara Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Nagata T, Kurihara H, Ouchi Y. Calcitonin gene-related peptide mediates acid-induced lung injury in mice. *Respirology* 2007; 12: 807-13.
- 4) Sugimoto K, Kage H, Aki N, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. The Induction of H3K9 Methylation by PIWIL4 at the p16Ink4a Locus. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 497-502.
- 5) Sano A, Kage H, Sugimoto K, Kitagawa H, Aki N, Goto A, Fukuyama M, Nakajima J, Takamoto S, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. A second-generation profiling system for quantitative methylation analysis of multiple gene promoters: application to lung cancer. *Oncogene* 2007; 26: 6518-25.
- 6) Goto Y, Nagase T. 12-h pretreatment with methylprednisolone versus placebo for prevention of postextubation laryngeal oedema: a randomised double-blind trial (Correspondence letter). *Lancet* 2007; 370: 25.
- 7) Schaefer MB, Ott J, Mohr A, Bi MH, Grosz A, Weissmann N, Ishii S, Grimminger F, Seeger W, Mayer K. Immunomodulation by n-3- vs. n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury - role of platelet-activating factor receptor. *Crit Care Med* 2007; 35: 1756-62.
- 8) Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, Shimizu T. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. *J Biol Chem.* 2007; 282: 6532-9.
- 9) Yanagida K, Ishii S, Hamano F, Noguchi K, Shimizu T. LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J Biol Chem.* 2007; 282: 5814-24.
- 10) Tsuda M, Ishii S, Masuda T, Hasegawa S, Nakamura K, Nagata K, Yamashita T, Furue H, Tozaki-Satoh H, Yoshimura M, Koizumi S, Shimizu T, Inoue K. Reduced pain behaviors and extracellular signal-related protein kinase activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. *J Neurochem.* 2007; 102: 1658-68.
- 11) Witzenrath M, Gutbier B, Owen JS, Schmeck B, Mitchell TJ, Mayer K, Thomas MJ, Ishii S, Rosseau S, Suttorp N, and Schutte H. Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 2007;35:1756-62.
- 12) van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, Schuurman R, Florquin S, Shimizu T, Ishii S, Jansen HM, Lutter R, van der Poll T. Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L194-9.

13) Nakajima T, Kurano M, Iida H, Takano H, Oonuma H, Morita T, Meguro K, Sato Y, Nagata T, Kaatsu Training Group. Use and safety of KAATSU training: Results of a national survey. *Int J KAATSU Training Res* 2006;2:5-13.

14) Sugimoto K, Makihara T, Saito A, Ohishi N, Nagase T, Takai D. Betaine improved restriction digestion. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:1027-9.

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

16) Jo T, Iida H, Kishida S, Imuta H, Oonuma H, Nagata T, Hara H, Iwasawa K, Soma M, Sato Y, Nagase T, Nagai R, Nakajima T. Acute and chronic effects of eicosapentaenoic acid on voltage-gated sodium channel expressed in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 1452-9.

17) Nagase T. Roles of lipid mediators in acute lung injury and pulmonary fibrosis. In: Hamid Q, Shannon J, Martin J, editors. *Physiologic basis of respiratory disease*. BC Decker, Hamilton, Ontario, CANADA 2005;489-494

2. 学会発表

1) 炎症性呼吸器疾患とアラキドン酸カスケード： 第46回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、教育講演），2006.

2) 脂質性メディエーター関連分子： 第46回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、ワークショップ），2006.

3) COPDガイドラインを高年齢者診療にどう生かすか： 第48回日本老年医学会総会（発表者：長瀬隆英、ミニレビュー），2006.

4) 末梢気道炎症の評価法： 第56回日本アレルギー学

会総会（発表者：長瀬隆英、教育セミナー），2006.

5) 肺炎症における脂質性メディエーターに関して： 第47回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、特別講演），2007.

6) 高齢者COPDの臨床： 第49回日本老年医学会総会（発表者：長瀬隆英、教育企画），2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（出願準備中 1件）

発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘

発明の名称：筋ジストロフィー症の病態モデル哺乳動物、及びその製造方法

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の病態形成機序についての研究

分担研究者 永井 厚志
東京女子医科大学第一内科 教授

研究要旨

COPDは加齢とともに増加する疾患であることから、老化とCOPDの病態形成機序には密接な関連性が示唆される。平成17年度からの研究においては、肺の老化がCOPDの末梢気道病変の形成に果たす役割について検討した。その結果、1) COPD患者では末梢気道のクララ細胞が老化していること、2) クララ細胞を老化させたマウスでは、ナフタレンによる気道上皮傷害の修復が抑制されて気道炎症が増悪すること。3) 老化したクララ細胞からは多量のTNF- α , sICAM-1, TGF- β などの炎症性および線維化サイトカインが産生されること、4) 高齢マウスでは末梢気道や肺胞領域に炎症細胞の浸潤がみられることが明らかにされた。以上の結果から、COPD患者ではクララ細胞の老化のために末梢気道の傷害の修復が抑制されるとともに、老化細胞から産生されたメディエータが気道炎症や線維化を促進する機序が示唆された。したがって気道の老化がCOPDにおける慢性気道炎症やリモデリングを促進する可能性が示された。

A. 研究目的

世界的に増加傾向にある慢性閉塞性肺疾患（COPD）の危険因子を明らかにすることは社会医学的に重要な課題である。COPDは加齢とともに増加することから、COPDの病態形成機序における気道の老化の役割について検討した。

B. 研究方法

ヒト肺組織および動物、培養細胞を用いた研究を行い、COPDにおける末梢気道の老化について検討した。

1) ヒト肺組織を用いた研究

COPD患者では気道上皮の老化が生じているかについて検討した。ヒト肺組織は肺気腫に対する肺容量減少術ないし肺癌に対する肺葉切除術に際して過去に採取された組織を用いた。組織の採取にあたっては患者より文書にて同意を得た。細胞老化の検討のためには、パラフィン包埋された肺組織切片を抗p16抗体を用いて免疫蛍光

染色した。また抗CC10抗体を用いた免疫蛍光染色を行ない、クララ細胞を同定した。肺組織切片を蛍光顕微鏡を用いて観察し、p16陽性のクララ細胞数を算出した。

2) 気道老化動物モデル

末梢気道上皮の再生母細胞であるクララ細胞を老化させた動物モデルを作製した。雄C57/BL6マウスに3週間連続して、週1回クララ細胞を傷害するナフタレンまたは溶媒を腹腔内注射した。薬剤投与の翌日から3日間老化を誘導させるBrdUまたは溶媒を腹腔内投与した。薬剤の最終投与から1週間後に肺を摘出した。凍結肺組織切片を作製し、senescence-associated β -galactosidase活性を測定し、細胞老化の指標とした。またパラフィン包埋肺組織切片を作製し、抗CD45抗体を用いて免疫組織染色を行ない、気道周囲の炎症細胞を同定した。動物実験については東京女子医科大学動物実験倫理委員会の審査許可を受け、動物愛護上の観点からなるべく苦痛を除去するように配慮した。

2) 高齢動物モデル

3ヶ月齢（若齢）および24ヶ月齢（高齢）の雌Balb/cマウスの肺を摘出後、右肺をホモジェネートしてmRNAを抽出した。得られたサンプルをTOYOBO社製のDNAマイクロアレイシステム（GeneNavigator cDNA array system）を用いて解析し、炎症関連遺伝子（538遺伝子）の発現を網羅的に検索した。3ヶ月齢マウスに比べて24ヶ月齢マウスで3倍以上の発現量の増加がみられた遺伝子についてはリアルタイムRT-PCR法（TOYOBO社製）を用いて定量的に評価を行なった。左肺については50%OCTコンパウンドを経気道的に注入した後、液体窒素中で凍結し3 μ mの薄切切片を作製した。その後、抗マウスCD4抗体、抗マウスCD8抗体、抗マウスマクロファージ抗体を用いて免疫染色を行い、顕微鏡観察下に単位肺胞壁長、単位気道壁面積、単位肺動脈壁面積に浸潤した炎症細胞数を測定した。

3) 細胞培養実験

in vitroでクララ細胞の老化を誘導するためにヒトクララ様細胞（NCI-H441）にテロメラーゼ阻害剤を添加して培養し、培養上清中に産生されたIL-8、TNF- α 、sICAM-1、TGF- β の濃度をELISA法により測定した。

C. 研究結果及び考察

1) ヒト肺組織を用いた研究

COPD患者の末梢気道では対照非喫煙者に比べて細胞老化の指標であるp16陽性のクララ細胞が有意に増加していた。

2) 気道老化動物モデル

ナフタレンとBrdUを反復与したマウスではsenescence-associated β -galactosidase陽性の老化クララ細胞が増加し、気道上皮の再生が抑制されていた。このクララ細胞老化マウスでは末梢気道周囲に浸潤したCD45陽性細胞が他群のマウスに比べて有意に増加していた

3) 高齢動物モデル

cDNAアレイにより検索した538個の炎症関連遺伝子のうち9遺伝子（CD20, B1r1, CXCR-3, Pim-2, CD72, IL-8RB, C-Fgr, IkB- ϵ , and CD8 β ）については、若齢マウスに比べて高齢マウスの肺におけるmRNAの発現量が3倍以上に増加していた。リアルタイムRT-PCR法においてもこれらの遺伝子の発現増加が確認された。肺の免疫組織学的な検討を行ったところ、高齢マウスで

は若齢マウスに比べて、肺胞領域のCD8細胞数とB細胞数、気道壁のB細胞数とマクロファージ数、肺動脈壁のCD4細胞数、CD8細胞数、マクロファージ数が有意に増加していた。

4) 培養細胞を用いた研究

テロメラーゼ阻害剤を添加して老化させたNCI-H441細胞からは非老化細胞に比べて多量のTNF- α 、sICAM-1、TGF- β が産生されていた。IL-8の産生量については非老化細胞と有意差はみられなかった。

D. 考察

本研究では、1) COPD患者では末梢気道のクララ細胞が老化していること、2) クララ細胞を老化させたマウスでは、ナフタレンによる気道上皮傷害の修復が抑制されて気道炎症が増悪すること、3) 老化したクララ細胞からは多量のTNF- α 、sICAM-1、TGF- β などの炎症性および線維化サイトカインが産生されること、4) 高齢マウスでは若齢マウスに比べて気道や肺組織における炎症性遺伝子の発現と炎症細胞の浸潤が増加していることが知られた。以上の結果から、COPD患者ではクララ細胞の老化のために末梢気道の傷害の修復が抑制されるとともに、老化細胞から産生されたメディエータが気道炎症や線維化を促進する機序が示唆された。したがって気道上皮の老化がCOPDにおける慢性気道炎症やリモデリングを促進する可能性が示された。

COPDは加齢とともに増加する疾患である。本研究ではCOPDの病態形成機序における気道の老化が重要な役割を果たしている可能性が明らかにされたことから、なぜ高齢者においてCOPDなどの慢性炎症性気道疾患が好発するかについて一定の説明をしようものと考えられる。

E. 結論

COPDの病態形成機序における気道の老化について検討した。COPDでは細胞の老化のために末梢気道の修復が抑制されているとともに、老化が気道炎症や線維化を促進する機序が明らかにされた。すなわち細胞の老化がCOPDの気道炎症やリモデリングを促進する可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Aoshiha K, Nagai A. Chronic lung inflammation in aging mice. FEBS Lett 581:3512-6, 2007.

Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. Alveolar cell senescence in pulmonary emphysema patients. Am J Respir Crit Care Med 174: 886-893, 2006

青柴和徹 COPDの発症メカニズム 呼吸器疾患 state of arts ver.5 医学のあゆみ 別冊:18-19, 2007

青柴和徹 COPD発症のメカニズム 医学と薬学 54(4): 425-431, 2005.

青柴和徹 肺の老化とCOPD Progress in Medicine 25 (4): 989-992, 2005.

辻隆夫、青柴和徹 COPDと老化の関わり The Lung perspectives 13; 123-126, 2005.

永井厚志、青柴和徹、近藤光子、玉置淳 COPD：病態形成機序の解明と治療法の開発 最新医学 61(2):306-336;2006.

青柴和徹 病態形成における肺胞の役割 慢性閉塞性肺疾患-最近の動向 最新医学 62:30-35, 2006.

青柴和徹 肺の加齢と喫煙 日老医誌 43:582-584, 2006

2. 学会発表

Aoshiha K, Nagai A. Chronic lung inflammation with aging in mice. 2006 American Thoracic Society Conference 2006. 5. 23. San Diego

Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. The relationship between cellular senescence and lung inflammation. 2006 American Thoracic Society Conference 2006.5. San Diego

Aoshiha K. Alveolar cell death and senescence in the pathogenesis of COPD. The 11th COngress of the Asian Pacific Society of Respirology. 2006. 11. 21. Kyoto

Tsuji T, Aoshiha K, Onizawa S, Nagai A. Relationship between cellular senescence and lung inflammation. The 11th COngress of the Asian Pacific Society of Respirology. 2006. 11. Kyoto

鬼澤重光 青柴和徹、辻隆夫、永井厚志COPD患者におけるクララ細胞の老化 第46回日本呼吸器学会総会 2007. 4 東京

青柴和徹 肺の加齢と喫煙 Meet the Expert 第48回日本老年医学会学術集会 2006. 6. 8 金沢

辻隆夫 青柴和徹、永井厚志 細胞老化による肺の炎症の検討 第44回日本呼吸器学会総会 2006.6. 東京

青柴和徹 上皮細胞の老化と気道・肺組織の炎症・リモデリング 第35回日本アレルギー学会秋季学術大会シンポジウム 2005.10.21 盛岡

青柴和徹 肺胞細胞の細胞死と老化 COPDの病因と病態-気道病変から肺胞病変まで- 第45回日本呼吸器学会総会シンポジウム 2005.4.16 千葉

辻隆夫、青柴和徹、永井厚志 COPDにおけるテロメア依存性老化の検討 第45回日本呼吸器学会総会 2005.4. 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
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

本邦原発性肺高血圧症の遺伝子異常、 および本邦肺動脈性肺高血圧症治療 ガイドラインに関する研究

分担研究者 友池 仁暢

国立循環器病センター 病院長

（研究協力 国立循環器病センター 中西 宣文，京谷 晋吾，森崎 隆幸）

研究要旨

原発性肺高血圧症（PPH）の発症原因の一部と考えられている BMPR2 遺伝子変異・ALK1遺伝子変異に関して、本邦PPH例を対象に症例探索研究をおこなった。本邦PPH例総数の8.6%と算出される83症例の解析が終了した。対象の39.8%に BMPR2 遺伝子変異が、4.8%にALK1遺伝子変異の存在が確認された。本邦PPHの遺伝子変異の実態が明らかにされた。PPHの治療について、2007年6月に発表されたACCPによる肺動脈性肺高血圧症（PAH）治療ガイドラインの本邦における実効性と有用性について検討した。本症の主要治療薬であるepoprostenolについては、本邦でも有効性に関するエビデンスが集積されており、PAH例のNYHA III度IV度例について有用性が実証された。bosentanについては、発売後2年しか経過しておらず長期予後は評価に至らなかった。2007年のACCPのPAH治療ガイドラインには本邦での未承認薬が含まれており、本ガイドラインの有用性評価について、現時点で全てを検証することはできなかった。

A. 研究目的

原発性肺高血圧（PPH）は、これまで原因も不明で有効な治療法がない疾患として認識されてきた。しかし発症原因については、2000年にBoneMorphogenetic Protein Receptor type 2 遺伝子（BMPR2）に変異が存在し、これが本症発症の一因である可能性が報告された。ついで2001年はActivin receptor like kinase 1（ALK-1）遺伝子にも変異が存在することが報告された。本邦PPH例でも、これらの遺伝子変異の有無や頻度、遺伝子型と臨床症状や治療感受性との関連等についての検討は幾つかの施設で開始されているが、多数の例についての解析ない。そこで今回本邦PPH遺伝子変異の実態を推察するため、我々は、多数例の日本人PPHにおける遺伝子変異を調査し、本邦PPH例の遺伝的背景が欧米と異なるかを明らかにすることを第一の研究課題とした。

PPHの治療法については、従来のCa拮抗薬（CCB）

に加え、prostacyclinを化学合成したepoprostenol、prostacyclin誘導体のberaprost、endothelin受容体拮抗薬のbosentan、PDE5阻害薬のsildenafilなど、様々の作用機序に着目した治療薬が開発され、臨床応用が始まった。そこで2003年の肺動脈性肺高血圧症（PPHや膠原病性肺高血圧症、先天性心疾患合併肺高血圧症を含んだ疾患概念、以下PAH）ワールドシンポジウムでは、CCBとepoprostenol、bosentanを主要な治療薬とするPAH治療ガイドラインが設定され、治療の標準化が行われた。また2005年にはsildenafilが新たに本症の治療薬として承認されたため、2007年にACCPによりPAH治療ガイドラインの改訂が行われた。そこで本邦でも2007年改訂版PAH治療ガイドラインにそった治療体系の確立が試みられている。ただ本邦のPAH治療ガイドラインは海外のガイドラインの骨子を援用して作成され、本邦のエビデンスによる検証はほとんど行われていない。本研究では可能な限り我が国のエビデンスを用い、2007

年PAHガイドラインが本邦においても適用できるのか、又、問題点はないのかについて検討した。

B. 研究方法

2003年から2007年までに国立循環器病センターで診断を確定し、治療継続中のPPH患者を対象とした。遺伝子検査について十分な説明を行い、書面同意を確認した後、末梢血の採取を行い、白血球よりDNAを抽出し、PPH発症に関連があると報告されているBMPR2遺伝子・ALK1遺伝子について変異の有無を探索した。

PAHの治療ガイドラインの妥当性についての研究では、epoprostenolとbosentanの本邦での治療成績について検討した。epoprostenolとbosentanは本邦ではともにPAHに対する希少疾病用医薬品に指定されている。このため治療薬として市販後は一定期間、製造販売後臨床試験として発売元の企業により副作用情報などの臨床情報の収集が義務付けられている。そこで各々の治療薬の発売元であるグラクソスミスクライン社とアクテリオン社に市販後調査結果（投与患者総数、投与例の年齢、性別、重症度などの基礎資料に加え、投与量、自覚症状の改善度、副作用の有無、予後等）の提供を要請した。

（倫理面での配慮）

遺伝子検査については、本院倫理委員会で遺伝子検査の項目と実施方法について審査を受け、承認を得た。採血後は速やかに検体の匿名化を行い、施設の情報管理者が個人情報対応表を保管・管理した。

ガイドラインの検討では、製造販売後臨床試験は薬事法に基づいて実施されている。個人情報を含まない治療効果のみの情報の解析は、倫理面での問題は無いと判断される。発売元から提供を受けた臨床資料はすべて統計情報で、個人を識別する情報は含まれていない。

C. 研究結果

遺伝子変異については、PPHの発端者83例について解析が終了し、BMPR2遺伝子変異例33例（39.8%）、ALK1遺伝子変異例4例（4.8%）であった。特に家族歴のあるPPHについては全ての症例でBMPR2遺伝子変異を確認した。同じ変異を持つ患者が5組存在したが、血縁関係は認められなかった。ALK1遺伝子変異に同一変異例はなかった。

PAH例の治療については、epoprostenolの製造販売後臨床試験の結果、本薬剤は市販開始後に総数256名の

PPH患者に対し投与されていた。現在、厚労省特定疾患臨床調査個人票による本邦PPH患者総数は、961名と発表されている。したがって、本邦PPH患者の26.7%がepoprostenol治療を受けていると概算することが可能である。epoprostenolはガイドラインではNYHA III度以上の重症者が治療対象者となっている。調査では約43%の患者がNYHA II度の段階でepoprostenolが開始されていた。epoprostenolの投与量は経年的に増加し、治療開始後は47 ng/min/kgに達した例もあり、投与量は個人間で差が大きい。epoprostenol投与に起因する副作用は、投与例の35.1%で報告された。副作用の内容は頭重感や下顎痛が主で、低血圧は6.2%に見られるが重篤な症状は少なかった。治療効果に関しては、予後が通常半年と言われるNYHA IV例でも5年生存率は49%に達した結果が得られた。また、epoprostenol治療開始時のNYHA IV例とIII度例の比較では後者の予後が有意に良好で、本治療はNYHA III度での開始が望ましいと考えられる。

bosentanは総数で約600例に投与されていた。治療開始時の重症度はほぼ全例がNYHA III度かIV度例で、ガイドラインの勧告に沿った治療の実態であった。bosentanは本邦での承認後約2年しか経過しておらず、生命の長期予後や運動耐容能などの治療効果に関する情報は入手できず、bosentanの本邦患者における有用性については確定することが出来なかった。約40%に何らかの副作用を認め、その過半数は肝機能異常であった。しかし重篤な副作用は認められなかった。

2007年PAHガイドラインに記載されているsildenafilは本邦で未承認なので十分なエビデンスの収集に至っていない。

D. 考察

特定疾患医療受給者証交付件数より、現在本邦では961名のPPH患者が登録されている。今回、83例の遺伝子検査が終了し、日本人PPH患者の8.6%で遺伝子検査が終了したと考えられる。日本人PPHの44.6%に遺伝子変異が存在し、欧米の報告に比し遺伝子変異例の頻度が高いことが判明した。

PAH例の治療に関しては、製造販売後臨床試験の結果、epoprostenolの治療効果については、PPH例に対し生命予後の改善、運動耐容能やNYHA classで示される臨床的重症度の改善効果は明らかであった。また本薬自体に起因する有害事象も軽微であった。しかし製造販

売後臨床試験では示されなかったが、自験例から epoprostenol の投与方法に起因する有害事象、即ち中心静脈カテーテルを用いた持続点滴静注法によるカテーテル感染や血栓症、また点滴ラインの破損、輸注ポンプの故障などが少なからず存在することは明らかである。PPH に対する内科的治療として epoprostenol 治療は、ガイドラインに沿って NYHA III 度以上の重症例に適応すべき方法と考えられた。また epoprostenol 治療の NYHA IV 度での開始例は、NYHA III 度開始例より明らかに統計学的には予後不良であった。epoprostenol の開始時期は、病状が NYHA IV 度となる前が望ましいと考えられた。

bosentan は、本邦では比較的少数例・短期間の臨床試験で承認された。今回の製造販売後臨床試験では、長期生命予後に関する情報は入手できなかった。また既に示されている肝機能異常は、従来の報告よりやや多い頻度で存在する可能性が示された。今後遠隔期の治療効果に関する成績の公表を待って、その位置づけを再評価する必要があると考えられた。自験例の結果では、肺血行動態については著明な改善は得られない場合が多いが、運動耐容能や自覚症状は改善傾向が見られる。現時点で bosentan は、一定の治療効果が存在し投与方法が経口投与が可能であることから、PAH に対する第一次選択薬として妥当とおもわれた。

E. 結論

遺伝子検査の結果、本邦 PPH 例の 8.6% で解析が終了し、その 44.6% に何らかの変異が認められた。本邦 PPH 例では、遺伝子変異を有する症例の頻度がこれまでの報告に比し高い可能性が示唆された。治療については、2007 年に改定された ACCP 肺高血圧症治療ガイドラインを下限に、本邦の肺高血圧症治療ガイドラインが作成された。本ガイドラインの妥当性は、本症の治療薬である sildenafil や bosentan をとるややくしたときの長期予後に関し有用性を示す明確なエビデンスは未だ得られていない。しかし epoprostenol に関しては海外の結果と同様の良好な治療成績が示された。現時点で 2007 年 ACCP 肺高血圧症治療ガイドライン改訂版を本邦で用いるとしても、sildenafil を除けば、特に大きな問題は無いと考えられた。

追記：本邦 PAH 治療ガイドラインは、2007 年 ACCP 肺高血圧症治療ガイドライン改訂版を参考に、日本呼吸器学会、日本循環器病学会など関連 8 学会に加え、厚生

労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）呼吸不全調査研究班が作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

Morisaki H, Nakanishi N, et al. BMPR2 mutations found in Japanese patients with familial and sporadic primary pulmonary hypertension. *Hum Mutat* 23: 632, 2004

中西宣文. 肺高血圧症の治療効果判定. In: 工藤翔二, 他 編. *Annual Review 呼吸器* 2007. 初版. 東京: 中外医学社; 2007. P151~154.

中西宣文, 他. 肺高血圧症の薬物治療, prostacyclin. *心臓*. 2006; 38: 96~100.

中西 宣文: 肺高血圧症治療における医薬品の適正使用を目的としたガイドライン、日本呼吸器病学会/呼吸器疾患治療用薬品の適正使用を目的としたガイドライン. *日本呼吸器学会雑誌*, 2005. 44: 71-76

2 学会発表

Nakanishi N, et al. The Frequency of Positive Antinuclear Antibodies(ANA) Is Low in Patients with Primary Pulmonary Hypertension (PPH) Who Have TGF β Surperfamily Receptor Gene Mutation. 2006, ATS

Nakanishi N, et al. Dose TGF β Surperfamily Receptor Gene Mutation Predict the Response to IV Epoprostenol Therapy in Patients with Idiopathic or Familial Pulmonary Arterial Hypertension. 2007, ATS

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

- (A) リンパ脈管筋腫症（LAM）に関する研究
- (B) 在宅酸素療法、在宅人工呼吸法に関する調査研究
- (C) COPDの病態解明
- (D) 運動耐容能に関する研究
- (E) 呼吸障害による身体障害者3級の認定基準に関する研究

分担研究者 坂谷 光則

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 院長

（研究協力 大阪府呼吸器アレルギー医療センター 石原英樹、
大垣市民病院 安藤守秀、近畿中央胸部疾患センター 井上義一）

A. 研究目的

- (A) リンパ脈管筋腫症（LAM）に関する研究（近畿中央胸部疾患センター井上担当）
 - (i) LAMの臨床病態を解明
 - (ii) LAM患者の精神社会的側面を明らかにし患者支援法の探索
- (B) 在宅酸素療法、在宅人工呼吸法に関する調査研究（大阪府呼吸器アレルギー医療センター石原担当）
- (C) COPDの病態解明（大阪府呼吸器アレルギー医療センター石原担当）
- (D) 運動耐容能に関する研究
シャトルウォーキングテストの有用性を明らかにする。（大垣市民病院安藤および近畿中央胸部疾患センター井上担当）
- (E) 呼吸障害による身体障害者3級の認定基準に関する研究

B. 研究方法

- (A)(i) LAMの臨床病態の解明
LAM患者の3次元CTを用いた定量CTと肺機能等の臨床マーカーと比較、LAM患者血清、病理組織を用いた解析を実施。
- (ii) LAM患者HR-QOL調査の実施と解析を行う。
LAM勉強会の実施。
- (B) 疫学調査班と協力し在宅呼吸管理の事態調査を実施

する。

- (C) COPD重症度分類の後ろ向き検証を行う。
- (D) シャトルウォーキングテストおよび6分間歩行テストについて後ろ向き調査を実施。
- (E) 呼吸障害による身体障害者3級の認定基準に関する研究

（倫理面への配慮）

疫学研究指針に則り研究を実施。データは匿名化、必要な研究には、同意書を取得して研究を実施。

C. 研究結果及び考察

- (A)(i) LAMの臨床病態の解明
3次元CTを用いた定量CTで計算されたLow attenuation volumeと肺機能による残気量、一秒量等の指標が相関、吸気呼気の解析で更に詳細に肺機能と相関した。またLAM Foundation、呼吸不全班のLAM重症度とも相関した。LAM患者血清、病理組織を用いた解析ではLAM細胞臓側を巡る増殖因子の発現とサイトカインの異常が明らかになった。またマスト細胞増殖にかかわるサイトカインの動向も明らかになった。
- (ii) LAM患者HR-QOL調査の実施と解析を行い、LAM患者では更年期障害の症状が認められまた、うつと不安の尺度が高値を示した。心療内科との連携を行った。患者参加型研究会として患者会の協力

のもと、第4回LAM患者会（2005年、大阪）、第5回LAM勉強会（2006年、東京）、第6回LAM勉強会、2007年大阪）を実施した。

- (B) 疫学調査班と協力し在宅呼吸管理の事態調査を全国レベルで実施した。本資料作成時はアンケート配付と回収中であり解析結果はH19年度中に終了する。
- (C) COPD重症度分類の後ろ向き検証を行う。BODE Indexを用いて大阪府呼吸器アレルギー医療センターCOPD症例の重症度を解析した。
- (D) COPD、他疾患においても運動耐容能検査としてシャトルウォーキングテストは有用である。
- (E) 呼吸機能障害による身体障害者3級の認定には従来の指標に加え、6分間歩行距離を何らかの形で判定の指標に加えることがADLの評価から望ましいと考えられる。

D. 評価

1) 達成度。

本書類作成時点（H19年11月）でまだ解析中のデータもあるが、予定していた研究はほぼ実施され何らかの結果が得られた。

2) 研究成果の学術・国際的・社会的異議について。

- (A) LAMに関する研究。2006年ATS（San Diego）においてLAMのHR-QOL調査の結果はミニシンポジウムに取り上げられた。また米国Rare Lung Disease Consortium（NIH研究）でHR-QOLの結果、3次元CTの結果を発表した。我々は患者の参加型研究会として、第1回、第2回のLAM勉強会を実施し、第3回から本研究班の支援を得て東京と大阪で実施してきたが、患者会の恒例行事としても定着し、患者と医療スタッフ、行政の情報が得られる貴重な会議として定着しつつある。研究班がこのような会議を支援する事は重要である。
- (B) 在宅酸素療法、在宅人工呼吸法に関する調査研究。本調査の結果は在宅白書として定期的に実施し貴重な我が国の疫学データとなっている。
- (C) COPDの病態解明。COPDにおける運動耐容能検査の重要性が再確認された。
- (D) 運動耐容能に関する研究
シャトルウォーキングテストを評価し実施する施設が増えつつある。
- (E) 呼吸障害による身体障害者3級の認定基準に関する研究。以前と呼吸器障害の基準は変わらないが引き続

き他の身体障害のADLと差の無い評価法が望まれる。

3) 今後の展開について。

各研究項目すべて、今後も引き続き実施する予定である。

4) 研究内容の効率性について。

他の研究グループと共同しながら実施する場合もいくつかあり、効率よく研究は実施されていると考えられる。

E. 結論

- (A) LAMは有効な治療法がなく進行性の難病たる難病である。非侵襲的診断法、臨床評価指標の開発が必要であり、副作用の無い有効な治療法の開発が急務である。患者の精神社会的サポートの対策も重要である。特定疾患治療対象疾患への格上げも患者の要望の上位を占めており行政の対策を望む。
- (B) 在宅酸素療法、在宅人工呼吸法に関する調査研究は今後も引き続き継続が必要である。
- (C)(D) COPD等の呼吸器疾患では運動耐容能の評価が日常診療レベルで実施されることが望ましい（保険適応が必要である）。
- (E) ADLを評価に含めた身体障害呼吸障害基準の見直しが必要であろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表 75 件

原著論文による発表 15 件

それ以外（レビュー等）の発表 50 件そのうち主な物

論文発表

- 1. 安藤守秀, 進藤丈, 安部崇, 長谷哲成, 伸健浩, 山下良, 堀場通明, 井上義一, 鈴木克洋, 坂谷光則.: COPD患者におけるシャトルウォーキングテストの歩行距離とADLとの関係. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 2007 1: 25-27
- 2. 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:

113-119, 2006

3. 大家晃子、井上義一. リンパ脈管筋腫症. In 工藤翔二、中田紘一郎、貫和敏博編. 呼吸器疾患の最新の治療2007-2009. 南江堂, P318-320. 2007.
4. 大家晃子、井上義一、田中勲、小塚健倫、審良正則、前田優華、深水玲子、新井徹、林清二、木村謙太郎、坂谷光則. 肺リンパ脈管筋腫症の嚢胞性病変の評価 三次元computed tomographyによる試み. 臨床放射線. 50(1): 104-107, 2005.
5. 井上義一、大家晃子. リンパ脈管筋腫症、LAMの疫学、ラパマイシン治療臨床試験. LAM Handbook 日本版 p2-9. 特定非営利活動法人 障害者団体 定期刊行物協会. 2005.

学会発表

1. 9. 大家晃子、井上義一、所昭宏、前田優華、深水玲子、新井徹、林清二、木村謙太郎、坂谷光則、平井啓、リンパ脈管筋腫症 (LAM; Lymphangiomyomatosis) の健康関連QOL、第45回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.
2. 所昭宏、大家晃子、井上義一、前田優華、深水玲子、新井徹、林清二、坂谷光則、平井啓. リンパ脈管筋腫症 (LAM Lymphangiomyomatosis) に関する心身医学的研究. 第10回日本診療内科学会総会・学術大会. 東京、2006.

2) 海外

口頭発表 40 件

原著論文 24 件

それ以外 (レビュー等) の発表 0 件

そのうち主な物

論文発表

1. Hayashida M, Seyama K, Inoue Y, Fujimoto IK, Kubo K, Respiratory failure research group of the Japanese ministry of health, labour, and welfare. The epidemiology of lymphangiomyomatosis in Japan: A nationwide cross-sectional study of presenting features and prognostic factors. *Respirology* 12:523-30, 2007.
2. Young L, Inoue Y, McCormick F. Diagnostic potential of serum VEGF-D for lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med* (in press)

3. Hirata K, Sugama Y, Ikura Y, Ohsawa M, Inoue Y, et al. : Enhanced mast cell chymase expression in human Idiopathic interstitial pneumonia. *Int J Mol Med*. 19: 565-570, 2007.
4. Mai HN, Hijikata M, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kimura K, Kobayashi N, Toyot E, Kudo K, Nagai H, Kurashima A, Kajiki A, Oketani N, Hayakawa H, Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Sakurada S, Tokunaga K, Keicho N. Pulmonary Mycobacterium avium complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 Jul, 11(7):808-13
5. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine*. 2007 Apr 20; 25(16):3038-40. Epub 2007 Jan 23.
6. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris M, DeMello D, Chen P. J, Yamamoto Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv Exp Med Biol* 2006; 581-566
7. Inoue Y, Nakata K, Arai T, Tazawa R, Hamano E, Nukiwa T, Nakata K, Keicho N, Hizawa N, Yamaguchi E, Eda R, Oishi K, Maeda Y, Koreeda Y, Kodo N, Sakatani M. Epidemiological and clinical feature of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *Respirology* 11: S55-60, 2006
8. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K,