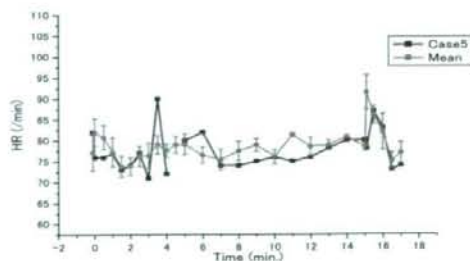
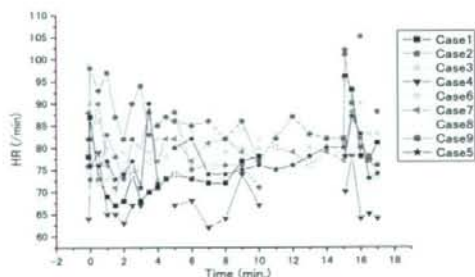
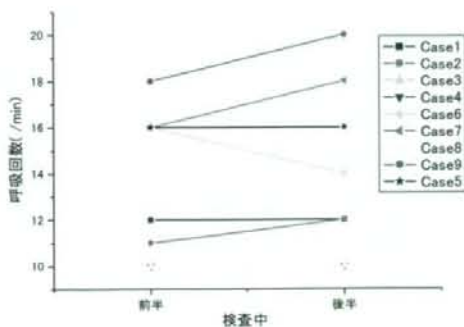


しかしながら、同時計測の脈拍数には明らかな差異は認めなかった。



負荷の前後で呼吸回数の変動に明らかな傾向は認めなかった。



考察

まだ予備研究の段階であり統計学的処理ができていない。現時点での傾向として、自覚症状の乏しい過去の重喫煙者であっても今回の低酸素負荷によって明らかに著しい低酸素血症を呈することが明らかとなった。今後も症例数を増やして統計学的に有意な傾向がつかめるかどうか検討していく予定である。

また、今回は喫煙者および COPD 患者を対象として研究デザインを組んでいるが、他の疾患に対しても応用が可能かもしれないと考えている。かつては難治性の呼吸不全を呈していたびまん性汎細気管支炎 (DPB) はマクロライド少量長期療法の登場により著しい臨床所見の改善が認められ現在では患者数も激減している。しかしながら、マクロライドによって治療された患者がその後どのような経過をたどったかに関しては不明な点が多い。非常に興味深い

症例報告がある⁽⁴⁾。すなわち、DPB 診断後マクロライド療法によって多くの臨床所見は改善したが、唯一肺機能検査での一秒率(FEV_{1.0})は約 65%のままで不変であったという。この症例に他疾患のため開胸肺生検が施行され、肺組織を詳細に検討したところ、37 か所の細気管支領域のうち全カ所でリンパ濾胞は消失していたものの、13 カ所で線維化を認めていたというものである。この症例からは、マクロライドで治療した DPB 患者の多くは細気管支領域に線維化を残し、肺機能検査でも閉塞性換気障害が残存するということが明らかとなった。このような症例が将来的に呼吸不全状態に陥り予後が短縮しているようなことがあってはならない。我々はこのような症例に対し、今回の低酸素負荷試験を応用することで残存病変の程度を推測し、その結果積極的な治療介入が行われるようになる可能性もあり得ると考えている。

結論

実験的に低酸素負荷をかけることにより潜在的な呼吸不全患者を早期に発見することができるかどうか検討した。まだ予備研究の段階であり結論には至っていないが、傾向としては非喫煙健常者に比べて、既喫煙者および軽症 COPD 患者は著しい低酸素血症を呈し、明らかに鑑別することができる可能性がある。また、今回の低酸素負荷により有害事象は出現せず、安全な検査である可能性も示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたってご協力いただいたボランティアの方々に深謝申し上げます。

参考文献

- (1) A.M. Luks and E.R. Swenson. *Eur Respir J*, 29: 770-792, 2007
- (2) P.T. Kelly, M.P. Swanney, L.M. Seccombe et al, *Chest*, 133(4): 920-926, 2007
- (3) R. Doll, R. Peto, J. Boreham et al. *BMJ*, 328: 1519-1528, 2004.
- (4)日胸疾会誌 29(7), 893-899,1991.

呼吸不全に関する基礎・臨床研究：COPDを中心に

東京大学大学院医学系研究科¹呼吸器内科学、²細胞情報学

¹長瀬隆英、¹永田泰自、²石井 聡

はじめに

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。

呼吸不全を呈する呼吸器疾患群の中でも、慢性閉塞性肺疾患（COPD）は患者数500万人以上と推定される社会的に極めて重大な疾患である。根本的治療がないために、多くの患者が死に至るまでの長期間にわたり、呼吸困難などの症状およびそれに伴うADLの制限とQOLの低下に苦しんでいる。したがって基礎研究による根本的治療の開発とともに、現在の患者の症状と生活を改善する治療の開発が重要であり、そのためにはより有効な呼吸リハビリテーションを求める臨床研究

が必要である。

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されている^{1)~3)}。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⁴⁾が求められている。

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。

さて、呼吸不全を呈する呼吸器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各種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。

対象と方法

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ー運動療法ー」(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、筋力、筋量、運動耐容能、ADL、健康関連QOLの変化を評価した。

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)による膝伸展筋力と膝屈曲筋力で評価し、呼吸筋力は最大吸気圧(PImax)と最大呼気圧(PEmax)で評価した。運動耐容能は6分間歩行試験で評価した。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I (IGF-I)・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-I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、20%1RMの負荷で、原則として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。

2) 発生工学を駆使した基礎研究

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

LTC₄/D₄/E₄など cysteinyl LT の受容体 (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。

転写コアクチベーターTAZ:

<転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZの遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を探索する。まず始めに、TAZ ノックアウトマウスの作成と解析に着手する。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究における危険の排除、説明と理解 (インフォームドコンセント) について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成16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。

1) 呼吸リハビリテーションをテーマとした臨床研究

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H17年6月27日に許可されている。

2) 発生工学を駆使した基礎研究

本研究で行う予定の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る。

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

今回は、10 週間の呼吸リハビリテーションを完遂した 2 症例の経過を報告する。2 症例の臨床的背景を表 1 に示す。

図 1 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。症例 1 の膝伸展筋力と膝屈曲筋力は左右ともに増加した。症例 2 の伸展筋力は左では増加したが右ではむしろ減少した。症例 2 の屈曲筋力は左右ともに増加した。膝上 15cm で測定した大腿周径 (cm) は、両症例ともに

表 1 症例の臨床的背景

| | 症例 1 | 症例 2 |
|--------------------------|---------|---------|
| 年齢/性別 | 66/M | 69/M |
| 身長 (cm) | 166 | 165 |
| 体重 (kg) | 82.5 | 62.8 |
| COPD の重症度 | 重症 | 重症 |
| 修正 MRC スケール | grade 2 | grade 3 |
| 呼吸機能 | | |
| FVC (L) | 3.08 | 4.57 |
| FEV ₁ (L) | 1.04 | 0.95 |
| %FEV ₁ (%) | 40.0 | 39.5 |
| RV/TLC (%) | 43.6 | 29.0 |
| %DLCO (%) | 103 | 42.4 |
| 動脈血液ガス | | |
| PaO ₂ (Torr) | 77.3 | 64.4 |
| PaCO ₂ (Torr) | 41.5 | 45.4 |

ずかながら増加した (症例 1、右 51.5→52.6、左 52.6→52.7; 症例 2、右 44.3→45.3、左 45.2→45.8)。下腿周径は症例 1、症例 2 ともに明らかな変化がなかった。

呼吸筋力では、症例 1、症例 2 ともに、PI_{max} と PEmax の増加がみられた。

運動耐容能の指標とした 6 分間歩行距離 (m) は、症例 1 で増加がみられた (487→541)。症例 2 は初回の 6 分間歩行テストで SpO₂<85% となる著明な低酸素血症を呈したため、以後は同検査を中止した。

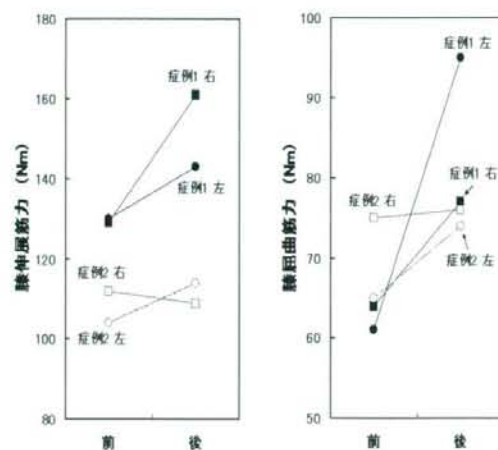


図 1 下肢筋力の変化

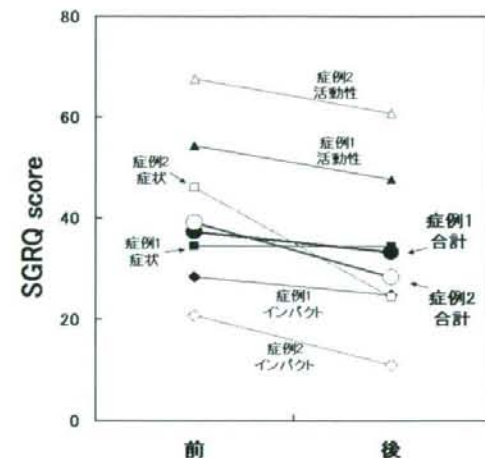


図 2 健康関連 QOL の変化

ADL スコアは、症例 1 ではリハビリテーション前後で変化しなかったが (96→96)、症例 2 では改善がみられた (89→92)。SGRQ スコアは、2 症例とも合計点の減少がみられ QOL の改善を示した (図 2)。個別の項目でも、症例 1 の「症状」が不変であった他は全項目が改善した。

図 3 に加圧トレーニングの前後に測定した乳酸、GH の血中濃度の経時変化を示す。症例 1 では乳酸は運動直後に、GH は 15 分後にピークを示す増加がみられた。症例 2 では乳酸が 15 分後をピークとして増加したものの、GH はほとんど変化しなかった。IGF-1 および VEGF は、両症例ともに運動に伴う変化はみられなかった。

2) 発生工学を駆使した基礎研究

<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のを選び、ヘテロ接合体を得た (図 4)。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体

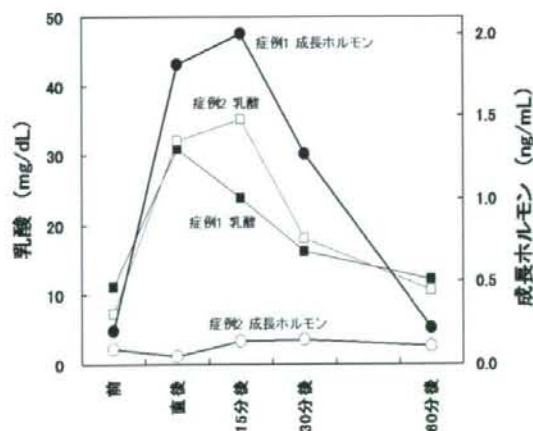


図 3 乳酸と成長ホルモンの変動

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。目下、バッククロスによる遺伝的純化が完了し、疾患モデルを用いた解析が進行中である。

<転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成に着手した。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 TAZ ノックアウトマウスが得られた。なお外表所見上では重大な奇形を生じていないが、9ヶ月令 TAZ ノックアウトマウス個体の肺の組織標本において、肺胞の異常が示されつつある。

考察

COPD 患者における加圧トレーニングの

Targeted Disruption of Mouse CysLT₂ Gene in C57BL/6 ES Cells

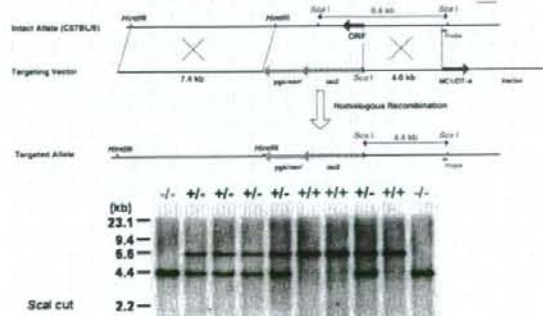


図 4 CysLT₂ 受容体ノックアウトマウスの作成

有効性について、症例数の少ない今回の結果で評価することは難しい。しかし健康人で報告される低負荷での筋力増強と筋肥大が、COPD 患者においても実際にあり得ることが示された。また特に QOL の改善が著明であったことより、呼吸リハビリテーションとしての有効性も大いに期待される。いずれにせよ今後症例を蓄積して検討する価値は充分にあるものと考えられる。

健康人においては、加圧トレーニングにより血中の GH、IGF-1、VEGF が増加することが報告されている。一般的に筋肥大には GH が大きく関わっているが、その機序は GH が肝臓に作用して分泌される IGF-1 が強い筋肥大効果を発揮するものと考えられている。また VEGF には血管新生を介して筋肥大に寄与する可能性がある。COPD 患者においても症例 1 のように十分な加圧トレーニングを行えば GH は増加したが、この症例でも IGF-1 と VEGF の増加をみとめなかった。症例 1 は筋力増強のわりに筋肥大はわずかであったが、IGF-1 と VEGF が増加しなかったことと関連するのかもしれない。COPD 患者が筋肥大を得にくいことと関係する一般的な現象である可能性もあり、今後多くの症例での検討を進めなければならない。

呼吸不全を呈する炎症性肺疾患は、社会的に極めて重大な疾患となっている。特に、COPD、ARDS、特発性間質性肺炎は、難治性において他に類をみない程、重篤な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。肺炎や気管支喘息は、世界的にも発症頻度、死亡率が増大

しつつあり、画期的な治療薬の開発が期待されている。これら炎症性呼吸器疾患の発症分子機構は、極めて複雑であり、より一層の研究が必要である。

COPD は、高齢者における重要な炎症性呼吸器疾患であり、その発症には喫煙など外的刺激物質の関与が想定されている。しかしながら、COPD の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。一方、近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。

今日まで、COPD の病態を理解するためには呼吸生理学的アプローチが必須であり、その成果は GOLD ガイドラインの作成という形で結実している。一方、まさしく GOLD ガイドラインにあるように、COPD 発症分子機構の解明のためには、多様な学問領域を結集・統合したアプローチを必要とするであろう。

本研究の成果により、脂質性メディエーター、転写コアクチベーター TAZ などをはじめとして、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いことが期待される。

結論

COPD 患者においても健康人と同様に、低負荷の加圧トレーニングによって下肢の筋量と筋力の増加が得られる可能性が示唆された。さらに呼吸筋力、運動耐容能、QOL

の改善効果もみられた。加圧トレーニングを用いた運動療法は COPD 患者の呼吸リハビリテーションに有用な可能性があり、呼吸不全を呈する難治性呼吸器系疾患に対する新しい治療となることが期待される。

また発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性肺疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供する独創的なものであり、本研究の成果は呼吸不全を呈する肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）の助成によりなされたものである。

参考文献

- 1) Nakajima T, Takano H, Kurano M, et al. Effects of KAATSU training on haemostasis in healthy subjects. *Int J KAATSU Training Res.* 2007 ;3:11-20.
- 2) Nakajima T, Kurano M, Iida H, et al. Use and safety of KAATSU training: results of a national survey. *Int J KAATSU Training Res.* 2006; 2:5-13.
- 3) Iida H, Takano H, Meguro K, et al.

Hemodynamic and autonomic nervous responses to the restriction of femoral blood flow by KAATSU. *Int J KAATSU Training Res.* 2005; 1:57-64.

COPD の病態形成機序に関する研究

東京女子医科大学 第一内科学

青柴和徹、辻隆夫、鬼澤重光、周方、永井厚志

はじめに

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は加齢とともに増加する疾患である (1)。近年の COPD 患者の増加は、高齢者人口の増大を背景としていることから、加齢による COPD の発症促進機序を解明することは厚生労働行政ならびに社会医学的にも重要な課題である。そこで私どもは、肺の老化が COPD の発症に与える影響について検討した。これまでの私どもの研究では、COPD 患者の肺組織には老化した肺胞上皮細胞が蓄積していることが知られていたが (2)、今年度の研究では老化肺胞上皮細胞が COPD の中心的病態である肺の炎症の原因となる可能性について調査した。

対象と方法

細胞実験においては、10%血清含有 DMEM 培地中で増殖させた II 型肺胞上皮様 (A549) 細胞を、テロメラザー阻害薬 (2,6-bis(3-(N-piperidino)propionamido)anthracene-9,10-dione, 1 μ M, Calbiochem 社) を添加して 3 週間継代培養し、細胞老化を誘導し

た (3)。その後上清を保存し、ELISA 法によりサイトカイン濃度を測定した。細胞については senescence-associated β -galactosidase 染色を行うとともに (4)、細胞核の抽出液中の NF- κ B 活性を TransAM NF- κ B p65 キット (Active Motif 社) を用いて測定した。検体を保存する 12 時間前に、一部の細胞についてはリポポリサッカライド (10 μ g/ml ; LPS: *Escherichia coli* serotype 055 ; Sigma) により刺激した。

肺組織の検討では、肺容量減量術または肺癌切除術の際に患者の組織採取への同意が得られ (倫理面への配慮)、すでに当研究室に保存してある肺組織のパラフィン切片 (COPD 患者 8 名、対照喫煙癌患者 9 名、対照非喫煙癌患者 7 名) を用いて、ヤギ抗 SP-C 抗体 (SantaCruz 社)、ウサギ抗リン酸化 NF- κ B 抗体 (Abcam/DAKO Japan 社)、マウス抗 p16 抗体 (SantaCruz 社) による蛍光免疫染色を行った。二次抗体には Alexa Fluor 350 抗ヤギ抗体、Alexa Fluor 488 抗ウサギ抗体、

Alexa Fluor 594 抗マウス抗体 (Invitrogen 社) を用いた。

結果

テロメラーゼ阻害薬を3週間添加培養した A549 細胞では、細胞増殖率 (population doubling) が低下し、senescence-associated β -galactosidase の高度発現がみられ、細胞老化が誘導されたことが確認された。さらに ELISA 法で培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を測定した

ところ、老化細胞では非老化細胞に比べて IL-6、IL-8、TNF α の産生量が有意に増加していた (図 1)。老化細胞における炎症性サイトカインの産生増加は、LPS で刺激後にも観察された。炎症性サイトカインの産生増加はテロメラーゼ阻害薬の添加早期 (10 日前) にはみられないことから、本薬剤による直接の刺激作用によるものではないと考えられた。LPS の刺激前後の細胞核抽出液中の NF- κ B 活性を測定したところ、老化細胞では非老化細胞に比べて有意に増加していた (図 2)。

ヒト肺組織の蛍光免疫染色では、COPD 患者では対照喫煙者と対照非喫煙者に比べて SP-C 陽性の II 型肺胞上皮細胞における p16 発現率、リン酸化 NF- κ B 発現率、p16 と NF- κ B の共発現率が有意に増加していた (図 3)。同

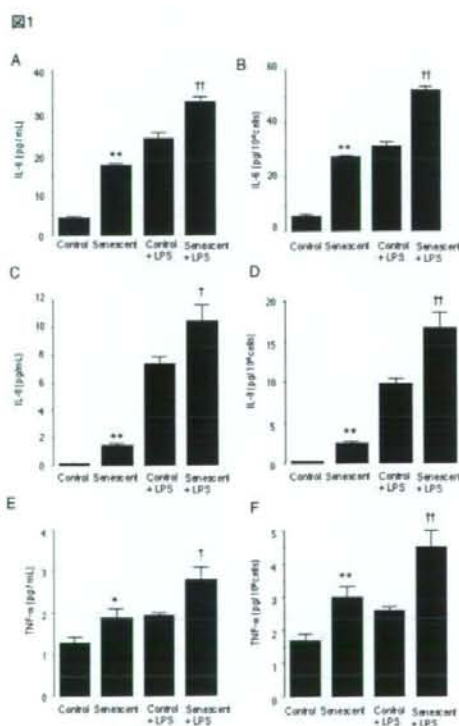


図 1 老化 A549 細胞と非老化 A549 細胞における炎症性サイトカインの産生。** $P < 0.01$ vs 無刺激非老化細胞、†† $P < 0.01$ vs LPS 刺激非老化細胞。各郡とも $n = 5$ 。

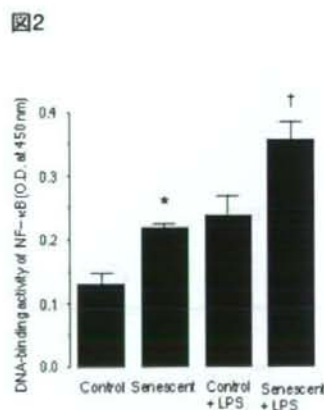


図 2 老化 A549 細胞と非老化 A549 細胞における NF- κ B の活性化。* $P < 0.05$ vs 無刺激非老化細胞、† $P < 0.05$ vs LPS 刺激非老化細胞。各郡とも $n = 5$ 。

様に对照喫煙者では、对照非喫煙者に比べてSP-C陽性のII型肺胞上皮細胞におけるp16発現率、リン酸化NF- κ B発現率、p16とリン酸化NF- κ Bの共発現率が増加していた。II型肺胞上皮細胞におけるp16陽性率とNF- κ B陽性率の間には正の相関関係がみられた($r=0.89$)。さらにp16とSP-C共陽性の老化II型細胞では、p16陰性、SP-C陽性の非老化II型細胞に比べてリン酸化NF- κ Bの発現率が有意に増加していた(図4)。非老化細胞に比べた老化II型細胞のリン酸化NF- κ B高発現率

は、COPD患者、对照喫煙者、对照非喫煙者のいずれの群においても観察された。

考察

本研究では、1) 老化したII型肺胞上皮様(A549)細胞では、NF- κ Bが恒常的に活性化し、IL-6、IL-8、TNF α の産生が増加していること；2) COPD患者の肺組織ではII型肺胞上皮細胞の老化が促進し、老化したII型肺胞上皮細胞ではNF- κ Bのリン酸化が生じていることが明らかにされた。以上の成績から、COPD患者で増加した老化肺胞細胞が肺の炎症の原因となる可能性が示された。

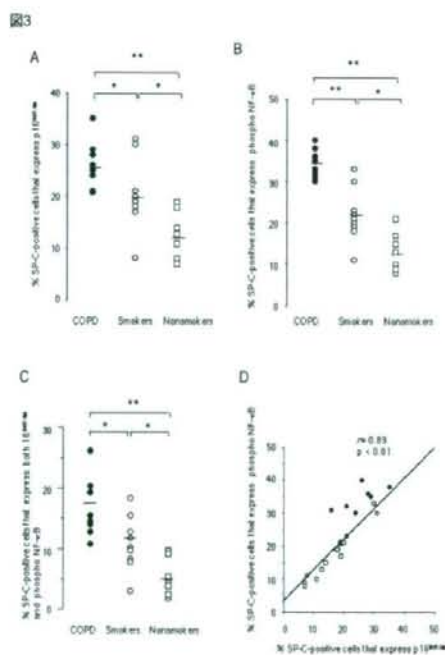


図3 ヒト肺組織のII型肺胞上皮細胞におけるp16発現率(A)、リン酸化NF- κ B発現率(B)、p16とリン酸化NF- κ Bの共発現率(C)。(D)II型肺胞上皮細胞におけるp16発現率とリン酸化NF- κ B発現率の相関関係。

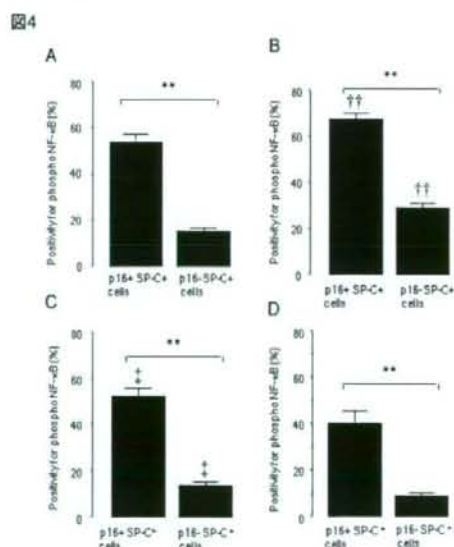


図4 老化II型肺胞上皮細胞(p16陽性、SP-C陽性)と非老化II型肺胞上皮細胞(p16陰性、SP-C陽性)におけるリン酸化NF- κ Bの発現率。(A)全患者、(B)COPD患者、(C)对照喫煙者、(D)对照非喫煙者。

従来より細胞の老化は細胞周期の停止により細胞増殖能力を消失させることから、組織修復の障害要因として COPD や動脈硬化などの高齢者疾患の病態形成に関連すると考えられてきた (2、5、6)。本年度の研究成績からは、老化肺胞上皮細胞が肺胞の修復反応を障害するだけではなく、COPD の中心的病態である肺の慢性炎症の原因となることが示された。老化肺胞上皮細胞から産生された TNF α などのサイトカインはオートクリン的に自己を刺激することから、老化細胞の周囲肺組織では炎症が持続・遷延するものと考えられる。老化肺胞上皮細胞における炎症性サイトカインの産生機序は不明であるが、私どもの成績からは NF- κ B の持続的活性化が生じているためと考えられた。NF- κ B の活性化は、対照喫煙者でも対照非喫煙者に比べて増加していたことから、喫煙刺激の重要性が指摘された。

結論

COPD 患者の肺組織では細胞老化が進行しているが、細胞老化が肺の慢性炎症を引き起こす原因となることが示された。私どもの研究成績は、高齢者に COPD 患者が増加するという疫学調査の結果について、その原因の一部を説明しうる可能性があると考えられた。

謝辞

研究に助力いただいた杉村好美検査技師、篠昌幸検査技師に感謝いたします。

参考文献

1. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, et al. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology* 2004; 9: 45-65.
2. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in pulmonary emphysema patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 886-93.
3. Riou JF, Guittat L, Mailliet P, et al. Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 2672-7.
4. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 643-9.
5. Karrasch S, Holz O, Jörres RA. Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respir Med*.

2008; 102: 1215-30.

6. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005; 120: 513-22.

タバコ煙の E-cadherin 発現に対する影響

東京電力病院¹、慶應義塾大学医学部呼吸器内科²、川崎市立川崎病院³

仲村秀俊¹、白畑 亨²、峰松直人²、吉田秀一²、続 敬之²、辻村周子²、
中村美穂²、高橋左枝子³、舘野博喜²、佐山宏一²、石坂彰敏²

はじめに

cadherin は分子量 120-135kDa の細胞間接着因子であり、Ca²⁺ 依存性の細胞間接着を担い、形態形成・維持・創傷治癒・アポトーシスに参与する。

cadherin は superfamily を形成し、気道上皮には E-cadherin, 血管内皮には VE-cadherin が存在する。その動態はたえず調整されており、①転写レベルの制御、②局在の変化、すなわち細胞内 (エンドソーム) ⇄ 細胞表面 (接着部位) 間の輸送システム、③細胞間接着活性の細胞内ドメインへの結合による調節 (p120/βカテニン/IQGAP1 など)、④MMP (特に MMP-3, 7) などによる細胞外からの cadherin 分解、などの機序が知られている。また、cadherin が細

胞表面で分解され、放出された約 80 kDa の可溶性断片 (soluble form) は上皮系癌細胞における MMP-2, 9, 14 の発現亢進と細胞浸潤促進機能を有すると報告されている¹⁾。

しかし、COPD や喫煙による E-cadherin の動態変化に関する報告は少ない。動物および培養細胞実験で、タバコ煙により気道上皮細胞表面の E-cadherin 蛋白発現の減少、細胞質内蛋白の増加、気道上皮にアポトーシス細胞の増加が認められ、E-cadherin の mRNA レベルは不変であった、とする報告が散見されるのみである^{2, 3)}。

一方、我々のこれまでの検討で、COPD 患者の血漿 sE-cadherin 濃度は COPD のリスクを有する喫煙者 (AR)、健常喫煙者 (HS)、非喫煙者 (HN) に比べ上昇していた (図 1)。さらに E-cadherin プロモーター多型

図1 sE-/VE-cadherin in plasma

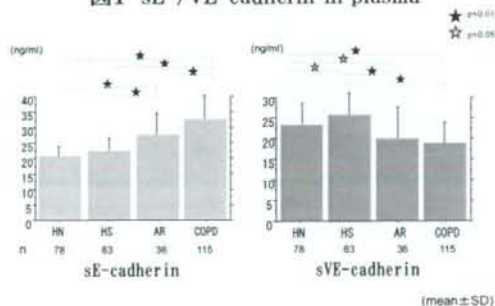
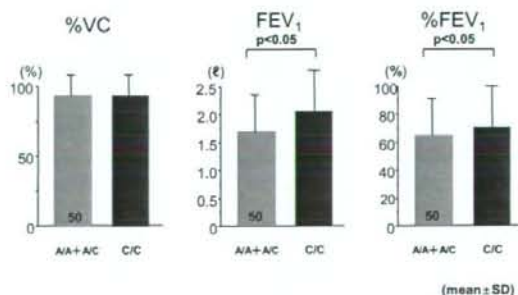


図2 肺機能とE-Cadherin遺伝子型



(-160C/A)の検討により、Aアレルを有し、E-cadherin産生が抑制されると考えられる遺伝子型では、閉塞性障害が高度となる傾向が認められた(図2)。

これらの所見より、我々はE-cadherinによる細胞間接着の調節はタバコ煙刺激後の上皮細胞の傷害、アポトーシス、再生に深く関与すると考えた。タバコ煙刺激により、細胞表面E-cadherinの細胞内への輸送増加、MMP-7などの産生を介した可溶性断片の分解亢進、細胞内から細胞表面へのE-cadherin輸送の障害、E-cadherinと β -cateninの結合の解離によるフリーの β -cateninの働きによる細胞増殖の亢進などが惹起される可能性がある。これにより、細胞間接着は著明に減弱すると予想される。一方、sE-cadherinの放出が増加し、これを介し気道上皮からのMMP-2, 9の産生が亢進すれば、生体内ではこれらが基底膜損傷を惹起し気道上皮のアポトーシスが進行すると考えられる。

これらの仮説を検証するため、気道上皮細胞のタバコ抽出液刺激によるin vitroの実験を計画した。

対象と方法

1、細胞

BEAS2B(SV-40でtransformした気道上皮、BEBM or DMEM/F12で培養)

A549(II型肺胞上皮系腺癌、DMEM/F12で培養)

Primary Culture(今後使用予定)

2、アポトーシス細胞の検出

MTTアッセイ: BEAS2B(BEBM)を0, 2, 5, 10%タバコ抽出液(CSE)で24時間刺激後に判

定。

3、CSE刺激実験

(1) BEAS2B(BEBM)を0, 5, 10%CSEで4, 10, 24h刺激。

(2) A549, BEAS2B(DMEM/F12)を0, 10%CSEで24h刺激。

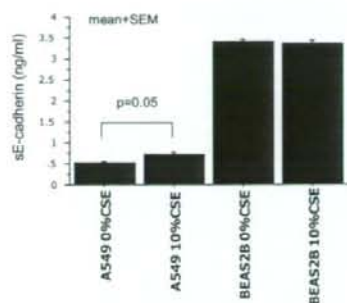
4、sE-cadherin濃度測定

ELISA kit(R&D Systems, sensitivity 0.04 ng/ml)を使用。

結果

10%タバコ抽出液によるBEAS2B細胞の24時間刺激(FBS freeのBEBMを増殖および刺激時に使用)により、約30%のMTT活性の低下を認めた。また、同じ条件下では10%抽出液により10または24時間刺激後に、上清中のsE-cadherinが低濃度ながら検出された(0.08-0.1 ng/ml)。一方、10%FBS加DMEM/F12で増殖後、FBS freeなCSE入りのDMEM/F12に交換した場合、培養上清中sE-cadherin濃度は著明に増加した。この条件では10%CSE24h刺激でA549ではsE-cadherinは増加傾向を示した。一方、高濃度のsE-cadherinが検出されたBEAS2Bでは10%CSE24h刺激の影響は認められなかった(図3)。

図3 10%CSE24h刺激のsE-cadherin放出への影響(A549, BEAS2B)



考察

気道上皮系 cell line の培養上清にて sE-cadherin が検出可能であった。その量は細胞の種類、培養条件、細胞密度、タバコ抽出液濃度と刺激時間により大きく異なっていた。今後、タバコ煙刺激による気道上皮のアポトーシスの誘導過程において、E-cadherin の細胞内動態、MMPs, TIMPs の発現の推移について検討を行う予定である。

上皮細胞間接着因子 E-cadherin は MMP-3, 7 等により分解され、可溶型 sE-cadherin が細胞外に放出される。sE-cadherin は気道上皮細胞に作用し、MMP-2, 9 などを誘導し、基底膜等の損傷を惹起する可能性が示唆されている。今後は上皮細胞の培養条件と CSE による刺激強度と時間などを調整し、こうしたメカニズムがタバコ煙により惹起されるか否かも検証する予定である。

参考文献

1) Nawrocki-Raby B, Gilles C, Polette M, Bruyneel E, Laronze JY, Bonnet N, Foidart JM, Mareel M, Birembaut P. Upregulation

of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer*. 2003; 105(6):790-5.

2) Liu L, Yuan Y, Li F, Liu H. Relationship between apoptosis and E-cadherin expression in bronchial epithelium of smoking mouse. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2003;23(3):216-8.

3) Wang X, Wu R, Hao T, Chen F. Effects of cigarette smoke extract on E-cadherin expression in cultured airway epithelial cells. *J Tongji Med Univ*. 2000;20(1):32-5.

ビタミンC欠乏マウス肺の酸化ストレスと形態変化

順天堂大学呼吸器内科

小池建吾 関谷充晃 飛野和則 高橋和久 瀬山邦明

東京都老人総合研究所・老化制御

近藤義高 石神昭人 丸山直記

〈はじめに〉

慢性閉塞性疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) の発症には、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡、アポトーシス、酸化ストレス等の複数の因子が関与している。その中でも最も中心的な役割を演じているのは、酸化ストレスである¹。強力な抗酸化物質であるビタミンC (VC) が肺に及ぼす影響についてはいくつかの報告がある。例えば、呼吸機能の低下とVCの摂取量に負の相関がある事が報告されている²。また、グルタチオンシステインリガーゼの多型性と肺機能の低下には相関があり、さらにVC摂取量が少ないほどCOPDが重症になる傾向があるという報告もある³。COPDはタバコ煙を代表とする有害ガスに長期間曝露する事により発症する慢性疾患であり、日々の生活の中で安全に補充する事が可能なVCの研究は非常に重要である。しかし、人では膨大な年月を要するという難点があり、またマウスやラットでは体内でVCを生合成するためVCの研究には有用ではないという問題がある。

加齢指標蛋白 Senescence Marker Protein 30 (SMP30) はマウスの諸臓

器に発現され、性差の影響を受けずに加齢により減少する事が報告された新しい蛋白質である⁴。SMP30の機能を解析する為に、C57BL/6を遺伝的背景にSMP30が欠損したマウス (SMP30KOマウス) がIshigamiらにより開発された。通常食餌下において野生型マウスは約2年で半数が死亡するのに対し、SMP30KOマウスは約6ヶ月で半数が死亡し、4倍早く死亡する事が報告された⁵。その後、SMP30はVC合成酵素であるグルコノラクトナーゼである事が判明し、SMP30KOマウスはVCが合成できず、投与しなければ壊血病になる事がIshigamiらにより報告された⁶。我々は野生型マウス (C57BL/6) とSMP30KOマウスで肺の形態計測を行い、野生型マウスに比して同月齢のSMP30KOマウスで平均肺胞径が有意に増加し、加齢性の変化を生じている事を報告し、SMP30KOマウスが新しい有用な老化肺モデルマウスである可能性を示した⁷。また、我々は通常食餌下では、SMP30KOマウスは2ヶ月間という短期間の喫煙で肺気腫を呈する事も報告している⁸。

肺とVCについての既報告や我々の研究結果から、VC不足により肺の加

齢性変化が早まる事が予想された。そこで今回我々は、野生型マウスと SMP30KO マウスに VC 量を調節して投与し、VC がマウス肺の加齢性変化あるいは気腫性変化に及ぼす影響を肺組織での酸化ストレスを指標として検討した。

＜対象と方法＞

動物：野生型マウス (C57BL/6) と SMP30KO マウスを使用した。

餌・飲料水：離乳 (1ヶ月齢) までは通常食で飼育し、その後は VC 欠乏食餌である CL-2 (日本クレア株式会社) に変更した。VC 水は、アスコルビン酸を超純水製造装置 (Milli-Q) から得られた超純水で濃度が 1.5g/L (+ 10 μM EDTA pH8.0) となるように希釈し、濾過滅菌 (0.45 μm filter) を行った。

飼育方法：離乳する1ヶ月齢までは VC 水 (VC 1.5g/L) を投与し、離乳後に、VC 水 1.5g/L と通常水 (VC 0g/L) 投与群 (以下 VC (-) 群) に分ける (n=5)。そして、2ヵ月齢と 3ヶ月齢の時点で解剖を行った。

解剖方法および評価項目：マウスをネンブータルで麻酔後に開腹・開胸し、心臓より採血して脱血死させる。その後、右心室より肺動脈にカニューレを挿入し、肺を灌流・脱血する。主気管支にカニューレを挿入し、気管支

Table 1. Body weight of WT and SMP30KO mice (g)

| | WT VC(-) | WT VC(+) | SMP30KO VC(-) | SMP30KO VC(+) |
|----------|------------|------------|---------------|---------------|
| 2 months | 24.8 ± 1.6 | 24.6 ± 0.6 | 24.7 ± 1.3 | 24.6 ± 1.3 |
| 3 months | 25.2 ± 1.6 | 24.5 ± 1.1 | 23.0 ± 2.0* | 23.7 ± 0.8 |

Definition of abbreviations: WT = wild type; VC = vitamin C.

SMP30KO = senescence marker protein 30 knock out

Values are expressed as mean ± SD of five animals.

* p < 0.05 when compared with 3 months' WT VC(-).

Table 1. 体重変化

肺胞洗浄液を回収後に、肺を摘出した。肺組織中の酸化ストレス評価として、VC 濃度、活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS), 過酸化脂質 (thiobarbituric acid reactive substances: TBARS), 抗酸化酵素 (glutathione peroxidase: GSH-Px) を測定した。また、肺組織の形態計測として、肺胞壁間平均直線距離 (mean liner intercepts: MLI), 肺胞破壊指標 (destructive index: DI) を測定して肺構造の変化を評価した。

＜結果＞

体重変化 (Table 1) : 2ヶ月齢の時点では、野生型マウス群, SMP30KO マウス群, VC(+) 群, VC(-) 群間で体重の差は認めなかった。しかし、3ヶ月齢では SMP30KO マウス VC(-) 群は、野生型マウス VC(-) 群と比較して、有意な体重の減少を認めた。

肺組織中の VC 濃度 (Figure 1) : 2, 3ヶ月齢ともに SMP30KO マウスでは VC(-) 群で VC(+) 群と比較して肺組織中 VC 濃度が著明に低値であった。特に 3ヶ月齢の肺組織中 VC 濃度は検出以下であった。また、両月齢で野生型

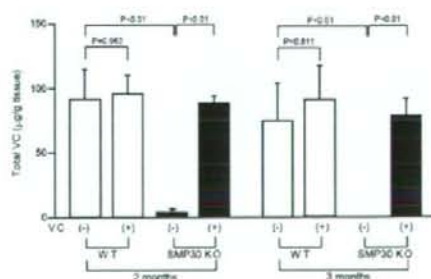


Figure 1. 肺組織中の VC 濃度

マウスでは VC(-) と VC(+) 間で肺組織中 VC 濃度は有意な差はなく、VC を投与しても組織中の VC 濃度に変化が起こらない事が示された。そして、VC を補充した SMP30KO マウスの肺組織中 VC 濃度は野生型マウスと同レベルであった。

気管支肺胞洗浄液中の総細胞数 (Table 2): 両月齢で SMP30KO マウス VC(-) 群では野生型マウス VC(-) 群と比較して著明に気管支肺胞洗浄液中の総細胞数が増加した。また、両月齢で野生型マウス VC(-), VC(+) 群, SMP30KO マウス VC(+) 群間で有意な細胞数の変化は認めなかった。細胞分画に関しては、両月齢で4群間に有意な差はなく、90%以上がマクロファージ

Table 2. Cell populations in bronchoalveolar lavage fluid from WT and SMP30KO mice

| | Total cell count ($\times 10^3$) | %Macrophages | %Lymphocytes | %Neutrophils |
|---------------|------------------------------------|----------------|---------------|---------------|
| 2 months | | | | |
| WT VC(-) | 0.7 \pm 0.1 | 91.7 \pm 1.2 | 7.5 \pm 1.2 | 0.8 \pm 0.6 |
| WT VC(+) | 0.9 \pm 0.2 | 92.5 \pm 1.9 | 7.0 \pm 1.4 | 0.5 \pm 0.5 |
| SMP30KO VC(-) | 1.4 \pm 0.7* | 92.2 \pm 1.7 | 7.3 \pm 1.7 | 0.8 \pm 0.6 |
| SMP30KO VC(+) | 1.0 \pm 0.3 | 92.0 \pm 1.8 | 7.5 \pm 1.8 | 0.5 \pm 0.3 |
| 3 months | | | | |
| WT VC(-) | 0.6 \pm 0.1 | 92.6 \pm 1.5 | 6.7 \pm 2.0 | 0.7 \pm 0.5 |
| WT VC(+) | 0.7 \pm 0.2 | 91.7 \pm 1.7 | 7.7 \pm 1.2 | 0.5 \pm 0.3 |
| SMP30KO VC(-) | 1.7 \pm 0.5** | 91.6 \pm 1.5 | 7.3 \pm 2.0 | 0.7 \pm 0.5 |
| SMP30KO VC(+) | 1.1 \pm 0.2 | 91.0 \pm 2.1 | 6.2 \pm 2.2 | 0.8 \pm 0.6 |

Values are expressed as mean \pm SD of five animals.

* $p < 0.01$ when compared with 2 months' WT VC(-).

** $p < 0.01$ when compared with 3 months' WT VC(-).

Table 2. 気管支肺胞洗浄液中の総細胞数と分画

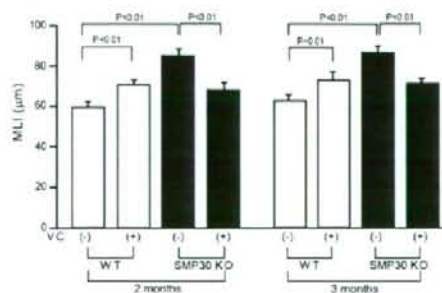


Figure 2. MLI

で占められていた。

肺の形態学的変化 (Figure 2, 3, 4): 両月齢で SMP30KO マウスでは VC(-) 群で VC(+) 群と比較して著明に MLI・DI が高値であった。DI 10%以上は有意な肺胞破壊とされ⁹, VC 枯渇により SMP30KO マウスでは有意な末梢気腔拡大・肺胞破壊が起こる事が示された。一方、両月齢で野生型マウスでは VC(+) 群で VC(-) 群と比較して有意な MLI・DI の増大を認めた。DI は 10%以下と肺胞破壊は軽度であったが、野生型マウスでは VC 投与によって末梢気腔拡大が起こる事が示された。また、SMP30KO マウス VC(+) 群は野生型マウス VC(-) 群と比較して有意に MLI・DI が高値であり、肺組織中 VC 濃度を同

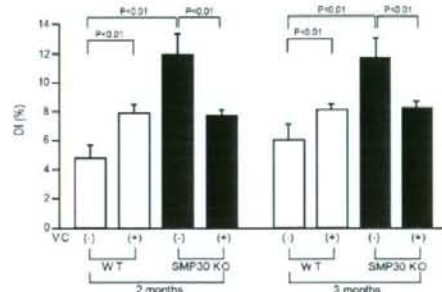


Figure 3. DI

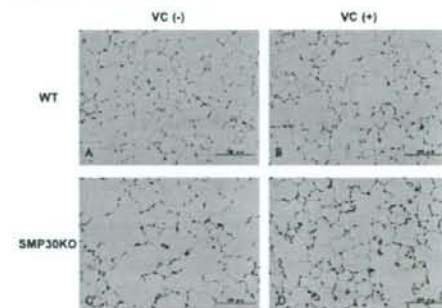


Figure 4. 肺病理像 {hematoxylin-eosin(HE)染色}