

FE_{NO}測定機器(NIOX-MINO®)の妥当性の検討

対象

外来通院患者20人(喘息患者18人、健常者2人)

FE_{NO}測定法

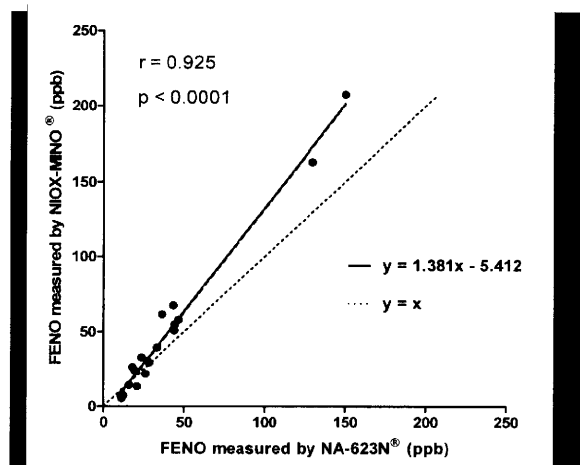
FE_{NO}測定はERS/ATSガイドラインに基づいて施行

NIOX-MINO®(電子化学反応法)によるFENO値を、NA-623N®(化学発光法)の出力(流速、口腔内圧、FE_{NO})と比較

FE_{NO}値測定は2~3回行い、ほぼ同程度の2回の平均値を採用

平野綱彦他、呼吸 2009; 28: 753-7

従来の化学発光法とNIOX MINOで測定した呼気NO濃度 臨床応用機器による測定値の妥当性



平野綱彦他、呼吸 2009; 28: 753-7

日本人における呼気NO濃度の正常値算出試験

Number	240
Gender (Female/Male)	131/109
Smoking status (Nonsmoker/Ex-smoker)	197/43
Age (years)	39.4 ± 13.6
Height (m)	1.63 ± 0.08
Body weight (kg)	59.6 ± 11.5
Body mass index (kg/m ²)	22.2 ± 3.1

Definition abbreviation: SD = standard deviation

和歌山県立医科大学、久留米大学、国立病院機構相模原病院、帝京大学の共同研究

Matsunaga K et al. Allergol Int 2010; 59: 363-367

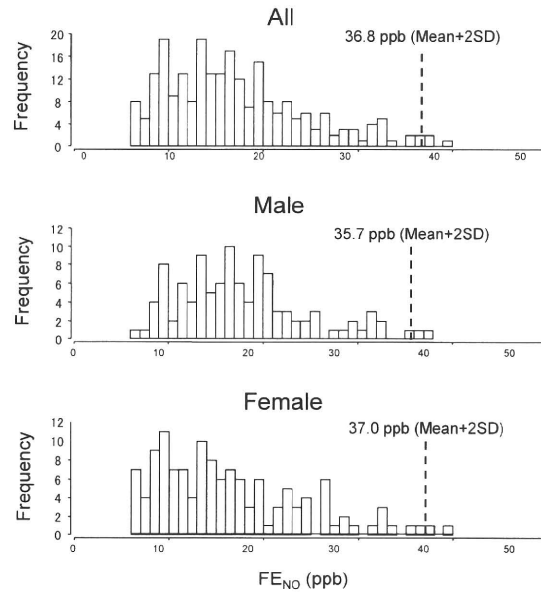
日本人の成人健常者における 呼気NO濃度の正常値と参照範囲

Group	Geometric mean (SD)	90% confidence interval	Mean±2SD*
All	15.44 (1.54)	14.75, 16.17	6.49, 36.76
Female	14.64 (1.59)	13.69, 15.66	5.79, 37.04
Male	16.46 (1.47)	15.48, 17.51	7.60, 35.68
Nonsmoker	15.34 (1.56)	14.55, 16.17	6.27, 37.57
Ex-smoker	15.91 (1.44)	14.49, 17.48	7.67, 33.02

*対数変換した呼気NO濃度±2×対数変換した呼気NO濃度の標準偏差を逆変換した値

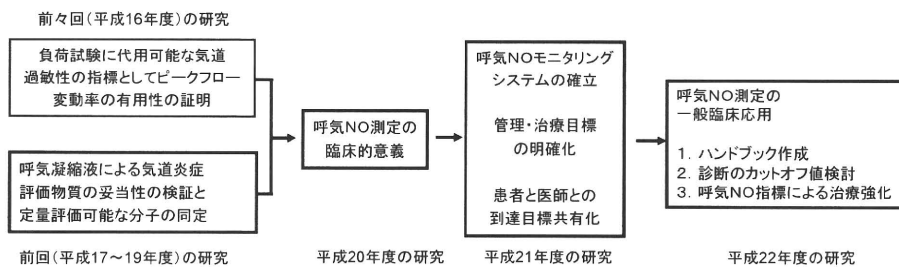
Definition abbreviation: SD = standard deviation

呼気NO濃度のヒストグラムと正常上限値



研究の流れ図

当該研究事業(平成20-22年度)



基礎的検討

一般臨床応用・展開に向けた検討

呼気NO濃度測定的一般臨床応用化 (現在医薬品医療機器総合機構に医療機器申請中)

- ★ 1.測定ハンドブック
- 2.喘息診断のカットオフ値
- 3.呼気NO高値症例に対する治療強化

呼気NO(一酸化窒素) 測定ハンドブック

— 喘息診断の新しいツール —

喘息における管理・治療の目標

- ① 健康人と変わらない日常生活が送れること
- ② 正常に近い、肺機能を維持すること
- ③ 夜間や早朝の咳や呼吸困難がなく、十分な夜間睡眠が可能なこと
- ④ 喘息発作が起こらないこと
- ⑤ 喘息死の回避
- ⑥ 治療薬による副作用がないこと
- ⑦ 非可逆的な気道リモデリングへの進展を防ぐこと

【出典】 社団法人日本アレルギー学会 喘息予防・管理ガイドライン2009

発行：厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
気道炎症モニタリングの一般臨床応用化：新しい喘息管理目標の確立に関する研究班

主任研究者：一ノ瀬正和（和歌山県立医科大学）
分担研究者：相澤久道（久留米大学）
秋山一男（国立病院機構相模原病院）
大田 健（帝京大学）
研究協力者：松本和人、平野綱彦、磯澤 悟（和歌山県立医科大学）

この資料に関する問い合わせは下記までお願いします。

〒641-8509
和歌山県和歌山市紀三井寺811-1 和歌山県立医科大学内科学第三講座
TEL (073) 441-0619 FAX (073) 446-2877

2010年12月作成

厚生労働科学研究費補助金
免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業による

2010年12月作成

呼吸NOと喘息

喘息とはどんな病気？

喘息は気道の慢性炎症、可逆性のある種々の程度の気道狭窄と気道過敏性の亢進、そして、臨床的には繰り返す咳、喘鳴、呼吸困難で特徴付けられる閉塞性呼吸器疾患です。

気道狭窄は、自然に、あるいは治療により可逆性を示します。気道炎症には、好酸球、リンパ球、マスト細胞などの炎症細胞、気道上皮細胞、線維芽細胞、気道平滑筋細胞などの気道構成細胞、および種々の液性因子が関与します。持続する気道炎症は、気道障害とそれに引き続く気道構造の変化（リモデリング）を惹起し、非可逆性の気流制限をもたらす。気道過敏性を亢進させます。

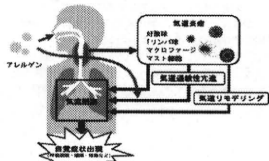
【出典】 社団法人日本アレルギー学会 編集 呼吸器・管科ガイドライン2009

気道炎症のマーカー

気道炎症は喘息の重要な病態で主たる治療標的ですが、呼吸器支那腔洗浄液中の好酸球比率の増加は気道炎症の存在を示唆しますが、これらの方法は標準度が高く、反復して実施することは困難です。

呼気一酸化窒素 (NO) 濃度は簡便かつ非侵襲的に測定が可能で、再現性にも優れているため、臨床応用に近い気道炎症のバイオマーカーと考えられます。

現在考えられている気管支喘息の概念



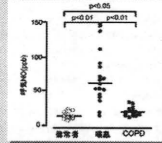
【出典】 気管支炎のすべて、工藤和久監修、大塚隆一・藤田和典、文光堂、2008

1

呼気NOはなぜ喘息で上昇するのか？

NOは一酸化窒素合成酵素 (NOS) の作用により産生されますが、NOSは気道にも存在し、喘息の炎症物質のひとつと考えられています。喘息の気道炎症では炎症性サイトカインなどによりNOSが誘導され多量のNOが産生されるため、健康者やCOPD（慢性閉塞性肺疾患）に比べて呼気NOが高濃度で検出されます。

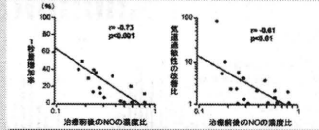
呼気NO濃度と呼吸器疾患
健康人やCOPDに比べて喘息では呼気NO濃度の上昇が認められます。
【出典】 Am J Respir Crit Care Med 2000; 162: 701-706 & リー・聖英、李勇



喘息管理における呼気NOの有用性

呼気NOは喘息で上昇しており、喘息中の好酸球数や気道過敏性と相関することから、喘息補助診断に有用なマーカーと考えられています。吸入ステロイド薬による呼気NOの減少が閉塞性障害や気道過敏性の改善と相関するため、喘息治療の指標としての有用性も示されています。

呼気NOと気道閉塞、気道過敏性の関連



喘息患者では吸入ステロイド薬治療により呼気NO濃度が減少しますが、その減少程度と気道閉塞、気道過敏性の改善程度は有様に相関します。
【出典】 Eur Respir J 2000; 15: 248-250

2

呼気NO濃度測定の実際

呼気NO濃度の測定条件

呼気NO濃度は呼気流速や呼出時の肺気量位などの影響を受けるため測定条件を統一する必要があります。2005年にアメリカ胸部疾患学会とヨーロッパ呼吸器学会から測定に関するガイドラインが掲載されました。

- 呼気NO濃度は呼気流速に依存して変化するため、測定の際には50mL/秒の呼気流速を保つ。
- 呼出時の肺気量位としては、全肺気量位から呼出する。
- 鼻腔では高濃度のNOが産生されており、鼻腔由来のNOを下気道由来のNOから分離する必要がある。そのため呼出の際に5~15cm H₂Oに口腔内圧を高め軟口蓋を閉鎖することが必要である。
- 呼気NOは呼出初期に鼻腔や死腔由来のNOによるピーク相を形成し、その後一定のプラトー相を形成する。このプラトー相のNO値は、測定条件が一定であれば安定した値を示し、これを下気道由来の呼気NO値として表わす。

【出典】 Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 912-930

呼気NO濃度の測定機器

呼気NO濃度は化学発光法または電子化学法を用いて測定します。代表的な化学発光式測定器としてはSIEVERS NO Analyzer 280i® (SIEVERS社) やNA-623N® (紀本電子工業、チェスト) があり、測定条件を確認しながらリアルタイムでの測定が可能です。携帯型の電子化学式測定器 (NIOX MINO®, Aerocrine社) は、特別な保守や管理を必要とせず、内蔵されたソフトウェアが測定状態を感知しガイドラインの測定条件を満たすように測定を誘導します。

【付記】

呼気NO濃度の測定方法には、これまで述べたように呼出された呼気を直接NO分析器で測定するオンライン法と、呼気をいったんバッグに収集し、後でNO濃度を測定するオフライン法があります。

【参考文献】 Allergol Int 2007; 16: 37-43

3

呼気NO濃度の測定方法

【SIEVERS NO analyzer 280i®、NA-623N®の測定方法】

- 被検者は座位にてマウスピースをくわえます。
- 最大吸気位から呼出を始めます。その際に呼気の一部をサンプリングポートより分析器に誘導し、NO濃度の測定が開始されます。
- 被検者はモニター画面上の呼気流速および口腔内圧 (SIEVERS NO Analyzer 280i®) または流量計 (NA-623N®) を見ながら一定の流速を維持したまま10秒から20秒程度の呼出を行います。
- 呼気NO濃度はリアルタイムにモニター上に表示されます。

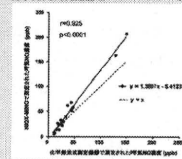
【NIOX MINO®の測定方法】

- 被検者は座位で口内の空気を全て吐き出します (最大吸気位まで)。
- マウスピースをくわえて息を深く吸い込みます (最大吸気位まで)。
- 最大吸気位から呼出を始めます。
- 被検者はモニターにアニメーションで表示される呼気流速の目安を見ながら、一定の呼気流速で10秒間の呼出を行います。
- 呼気NO濃度が1分40秒後に数値で表示されます。

【参考データ】

化学発光式測定器を用い呼気流速と口腔内圧をモニターしながら厳密な条件で測定した呼気NO濃度とNIOX MINO®で測定した呼気NO濃度の比較では、両機器の測定値に強い相関を認められました。両機器の測定値の差は10%程度であり、実臨床での使用においては十分信頼性があると考えられます。

化学発光式測定器とNIOX MINO®で測定した呼気NO濃度の比較



【出典】 呼吸 2009; 26: 753-758

4

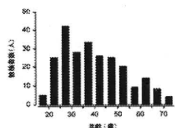
日本人の呼気NO濃度正常値

呼気NO濃度測定を一般臨床における喘息管理に应用するために、管理目標を明確にすることが必要です。厚生労働科学研究「気道炎症モニタリングの一般臨床応用化：新しい喘息管理目標の確立に関する研究」班では、日本人の成人健常者における呼気NO濃度の正常値算出試験を実施しました。

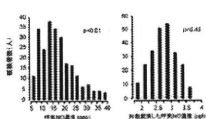
(試験デザイン)
多施設共同横断的研究 (和歌山県立医科大学、国立病院機構相模原病院、帝京大学、久留米大学)
(対象症例)
18歳以上の日本人の健常者240名(男性131名、女性109名)
(試験方法)
呼気NO濃度はNIOX MINOを用い測定しました。呼気NO濃度の参照範囲は、データが正規分布するよう対数変換を行い、Mean±2SDを算出し逆変換しました。

【出典】Allergol Int 2010; 99: 302-307

対象症例の年齢分布
呼気NO濃度測定は18歳から74歳の年齢層(平均年齢39歳)を対象に実施されました。



呼気NO濃度の正規性の検討
呼気NO濃度測定値は対数変換を行うことにより正規分布することが確認されました。



5

日本人の成人健常者における呼気NO濃度の正常値と参照範囲

対象	Geometric mean (SD)	90% 信頼区間	Mean±2SD*
全対象	15.44 (1.54)	14.75, 15.17	6.46, 36.76
女性	14.64 (1.59)	13.69, 15.66	5.79, 37.04
男性	16.46 (1.47)	15.46, 17.51	7.60, 35.68
非喫煙者	15.34 (1.56)	14.55, 16.17	6.27, 37.57
喫煙者	15.91 (1.44)	14.49, 17.48	7.67, 33.02

*対数変換した呼気NO濃度±2σ。対象者算出した呼気NO濃度の標準偏差、を逆変換した値
Geometric mean = 幾何平均値、SD = 標準偏差

本研究から、日本人の成人健常者における呼気NO濃度の正常値は約15 ppb、正常上限値は約37 ppbと算出されました。発作性の喘鳴のような喘息を疑わせる症状に加え、呼気NO濃度が上記の正常上限値を超える場合は喘息が強く疑われます。現在、喘息補助診断のための呼気NO濃度カットオフ値を算出中です。

喘息管理目標への到達に向けて

喘息治療の目標は、気道炎症と気流制限を惹起する因子の回避・除去、そして薬物療法による炎症の抑制と気道拡張により、気道過敏性と気流制限を軽減ないし寛解することです。その結果、可能な限り呼吸機能を正常化し、患者のQOLを改善し、健常人と変わらない日常生活が送れるようにすることです。これまで用いられてきた症状や呼吸機能の評価に、呼気NO測定による気道炎症評価を加えていくことにより、治療目標への到達に向けて喘息の管理効率をさらに向上することが期待されます。

6

喘息における管理・治療の目標

- ① 健常人と変わらない日常生活が送れること
- ② 正常に近い、肺機能を維持すること
- ③ 夜間や早朝の咳や呼吸困難がなく、十分な夜間睡眠が可能なこと
- ④ 喘息発作が起らないこと
- ⑤ 喘息死の回避
- ⑥ 治療薬による副作用がないこと
- ⑦ 非可逆的な気道リモデリングへの進展を防ぐこと

【出典】社団法人日本アレルギー学会 喘息予防・管理ガイドライン2009

発行：厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
気道炎症モニタリングの一般臨床応用化：新しい喘息管理目標の確立に関する研究班

主任研究者：一ノ瀬正和 (和歌山県立医科大学)

分担研究者：相澤久道 (久留米大学)

秋山一男 (国立病院機構相模原病院)

大田 健 (帝京大学)

研究協力者：松永和人、平野編彦、磯澤 悟 (和歌山県立医科大学)

この資料に関する問い合わせは下記までお願いします。

〒641-8509

和歌山県和歌山市紀三井寺811-1 和歌山県立医科大学内科学第三講座

TEL (073) 441-0819 FAX (073) 446-2877

2010年12月作成

2010年12月作成

呼気NO濃度測定的一般臨床応用化

(現在医薬品医療機器総合機構に医療機器申請中)

- ★ 1. 測定ハンドブック
- ★ 2. 喘息診断のカットオフ値
- 3. 呼気NO高値症例に対する治療強化

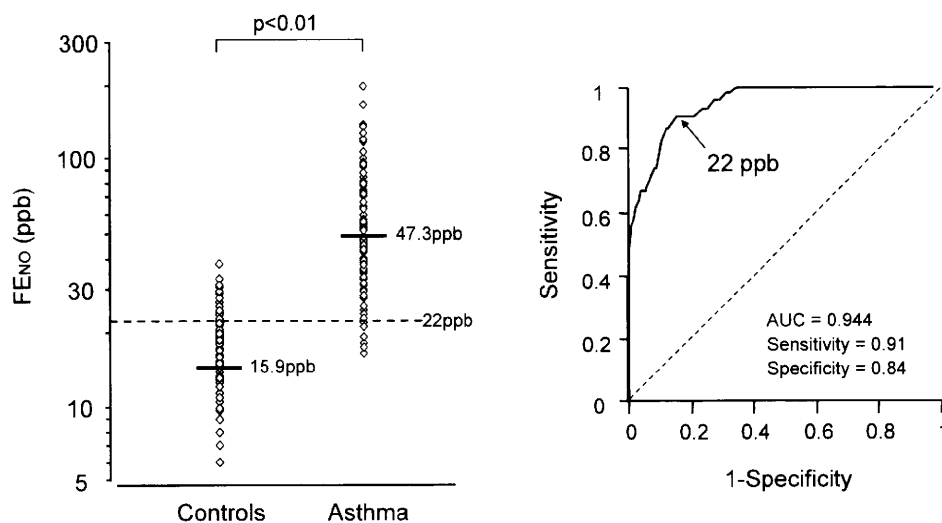
呼気NO濃度の喘息診断におけるカットオフ値

	Controls	Asthma
Subjects (n)	224	142
Age (years)	39.4 ± 0.9	41.5 ± 1.4
Male/Female (n)	98/126	69/73
Height (m)	1.64 ± 0.01	1.64 ± 0.01
Body weight (kg)	58.3 ± 0.8	61.2 ± 1.0
Body mass index (kg/m ²)	21.7 ± 0.2	22.7 ± 0.3
Current smoker	52 (23%)	52 (36%)
Rhinitis	101 (45%)	94 (66%)
Lung function		
FVC (L)	3.55 ± 0.06	3.61 ± 0.09
%FVC (%)	103.0 ± 0.6	97.7 ± 1.0
FEV ₁ (L)	3.08 ± 0.05	2.84 ± 0.08
FEV ₁ % (%)	87.0 ± 0.3	78.3 ± 0.9
%FEV ₁ (%)	98.7 ± 0.6	89.1 ± 1.2
FE _{No} (ppb)	15.9 ± 0.4	47.3 ± 2.9

Values are means ± SE

Matsunaga K, et al. *Allergol Int* 2011, in press

呼気NO濃度の分布とカットオフ値

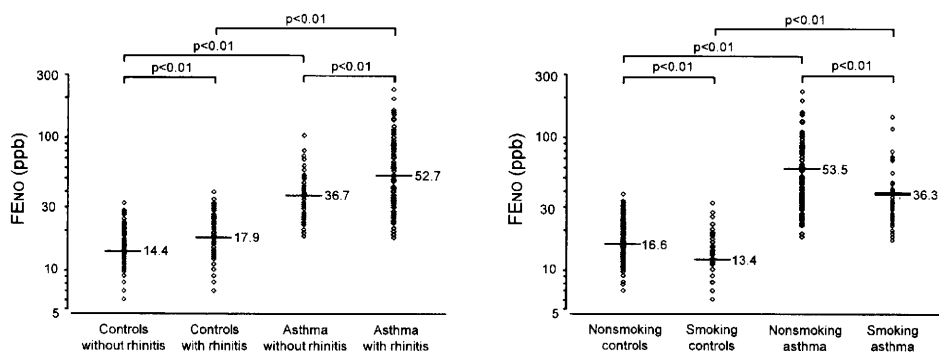


呼気NO濃度に有意な影響を与える背景因子

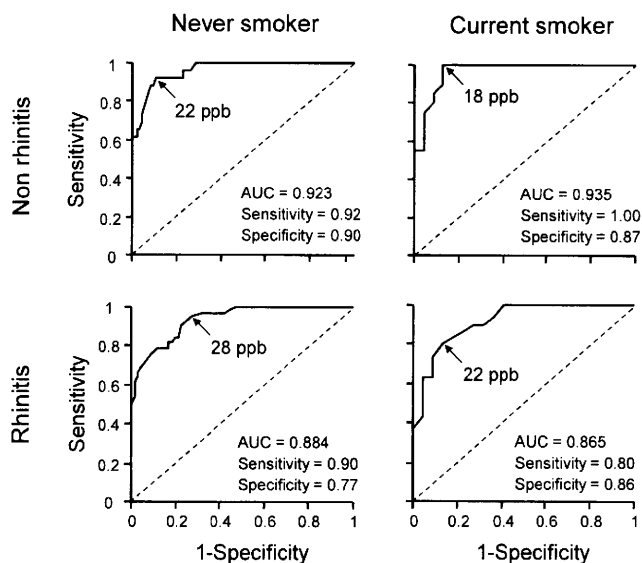
年齢、性別、BMI、喫煙状況、鼻炎、喘息を説明変数としてステップワイズ変数選択後に多変量解析を実施した。

Variables	Coefficient (95% CI)	p value
Intercept	0.83 (0.47; 1.19)	<0.0001
Gender (male vs. female)	0.07 (-0.02; 0.17)	0.13
Body mass index (per kg/m ²)	0.01 (-0.00; 0.03)	0.09
Smoking (current smoker vs. non-smoker)	-0.27 (-0.37; -0.17)	<0.0001
Allergic rhinitis	0.22 (0.13; 0.31)	<0.0001
Asthma	0.94 (0.84; 1.03)	<0.0001

呼気NO濃度に対する鼻炎および喫煙の影響



鼻炎および喫煙状況に基づいた呼気NOカットオフ値



Matsunaga K, et al. Allergol Int 2011, in press

標準的治療を行っている症例における 喘息コントロールと呼気NO濃度との関連

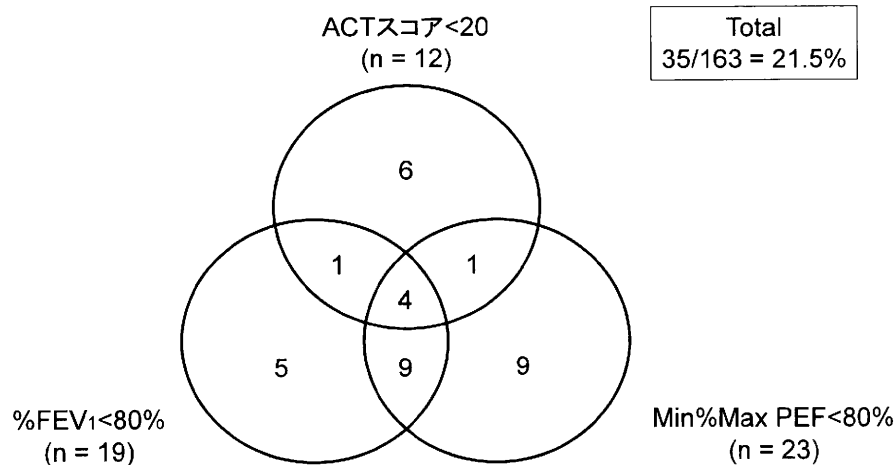
Number	244 (F/M = 148/96)
Mean age (Years)	48.7 ± 14.2
Smoking status, Never/ Ex/ Current	167/ 77/ 0
Atopy, n (%)	187 (76.6)
Allergic rhinitis, n (%)	166 (68.0)
Chronic rhinosinusitis, n (%)	58 (23.8)
GERD, n (%)	35 (14.3)
Inhaled corticosteroid, n (%)	244 (100.0)
LABA, n (%)	111 (45.5)
LTRA, n (%)	57 (23.4)
Teophylline, n (%)	29 (11.9)
FVC (L)	3.40 ± 0.87
FVC % of predicted (%)	103.4 ± 13.0
FEV ₁ (L)	2.60 ± 0.74
FEV ₁ % of predicted (%)	95.5 ± 16.0
PEF variability (Min%Max) (%)	87.5 ± 6.4
FENO (ppb)	37.8 ± 29.2
Asthma control test (points)	23.0 ± 2.3

Values are means ± SD

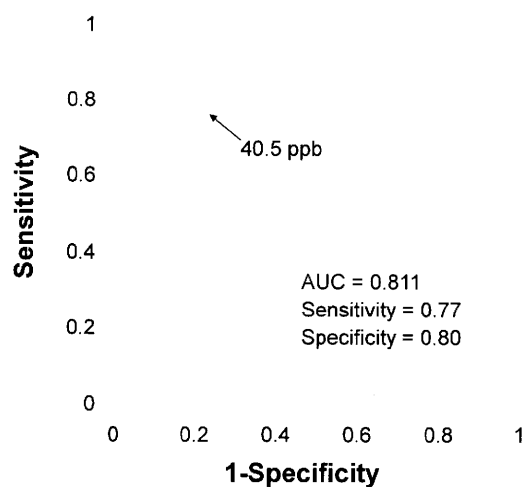
平成22年度全体研究、投稿準備中

喘息コントロール不良症例の割合

ACT、スパイロメトリー、PEF測定、NO濃度測定の全てが実施された163例のうち、ACTスコア<20、%FEV₁<80%、Min%Max PEF<80% のいずれか一つでも満たした35例を“喘息コントロール不良症例”とした。



喘息コントロール不良を検出する呼気NOのカットオフ値



呼気NO濃度測定的一般臨床応用化

(現在医薬品医療機器総合機構に医療機器申請中)

- ★ 1.測定ハンドブック
- ★ 2.喘息診断のカットオフ値
- ★ 3.呼気NO高値症例に対する治療強化

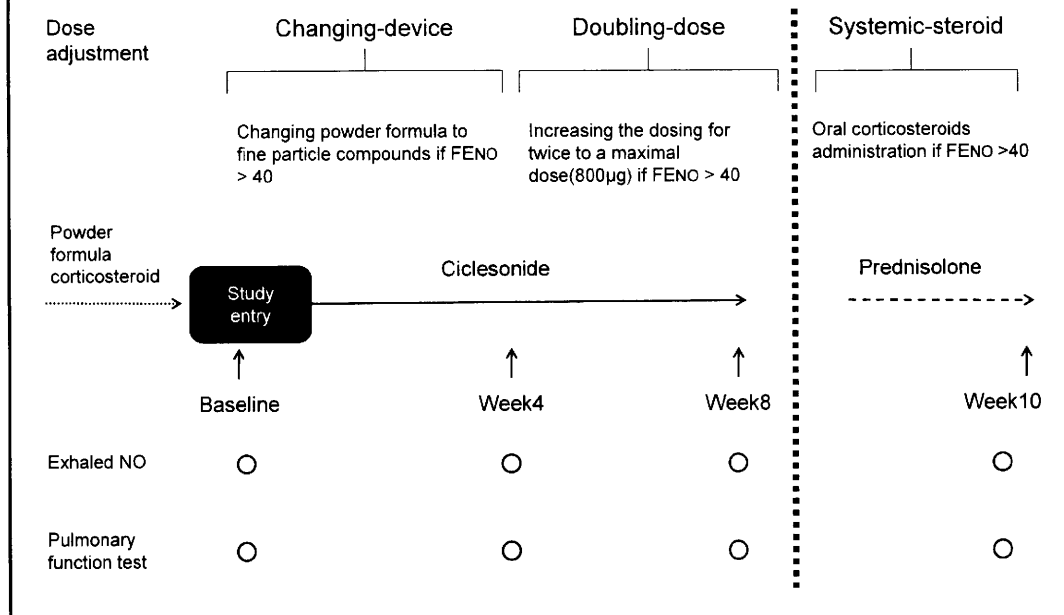
気道炎症が遷延している喘息患者(FENO>40ppb) に対するステロイドによる治療強化の意義

Number (F/M)	13 (11/2)
Age (years)	55.8 ± 3.4
Smoking status (non/ EX / Cu)	3/9/1
Inhaled corticosteroids, N (%)	13 (100)
Inhaled corticosteroids (FP · μg / day)	300 ± 46
Long-acting β ₂ -agonist, N (%)	7 (54)
Leukotriene modifier, N (%)	2 (15)
Theophylline . N (%)	1 (8)
FVC (L)	3.70 ± 0.22
FVC % pred (%)	102.8 ± 5.1
FEV ₁ (L)	2.72 ± 0.18
FEV ₁ / FVC (%)	73.1 ± 2.9
FEV ₁ % pred (%)	89.7 ± 5.3
FEF _{50%} FVC % pred (%)	60.8 ± 6.7
FEF _{75%} FVC % pred (%)	41.0 ± 5.3
CV / VC (%)	15.1 ± 2.6
CC / TLC (%)	52.4 ± 1.8
dN2 (%)	1.39 ± 0.20
DLco (% pred)	115.2 ± 6.4
DLco / VA % pred (%)	103.7 ± 4.9
FENO (ppb)	73.1 ± 13.3
Calv (ppb)	10.1 ± 1.0

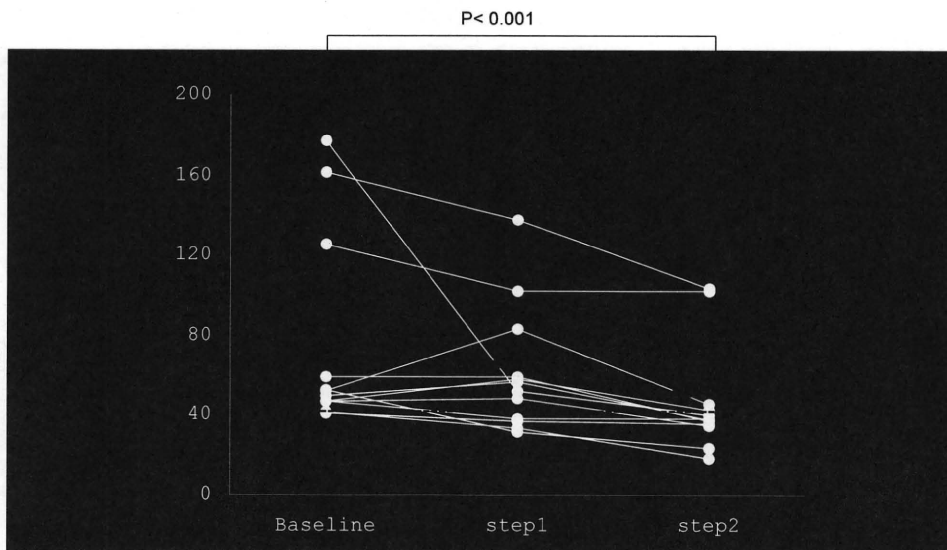
Values are means ± SE

Hirano T et al. in preparation

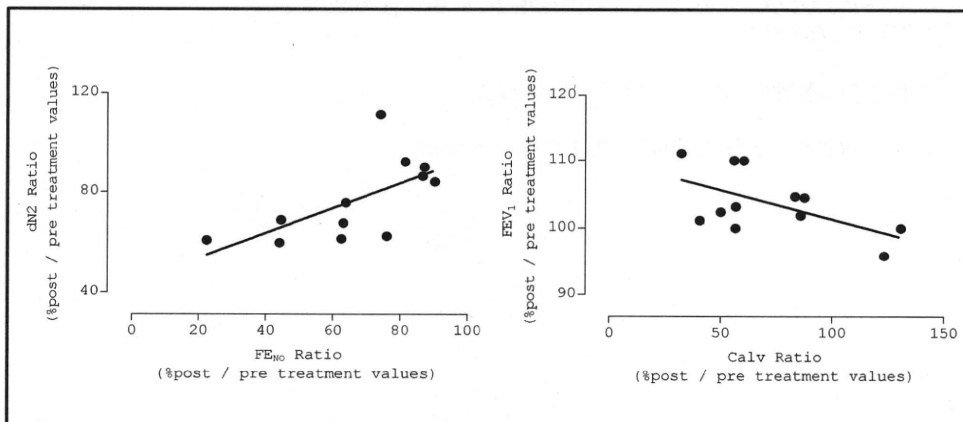
プロトコール



吸入ステロイド治療の強化による呼気NOの改善

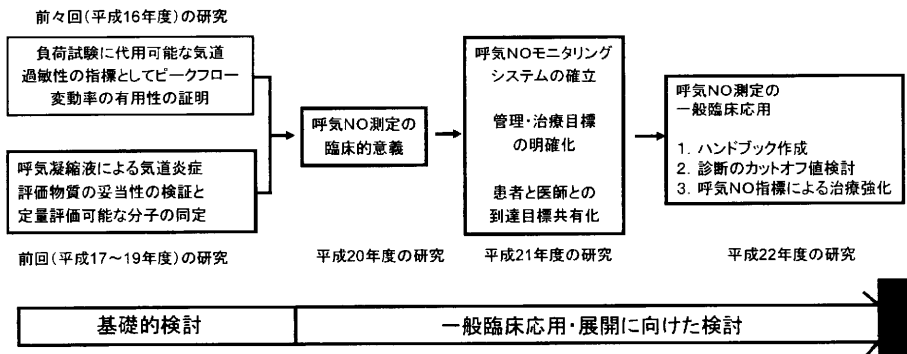


呼気NO濃度の改善程度と閉塞性障害の改善程度との相関性



研究の流れ図

当該研究事業(平成20-22年度)



NOが低下しない場合の理由

- ・アドヒアランス、鼻炎、全身性好酸球増多、好中球性喘息
- ・喀痰も合わせた検討も

問題点も整理して内容に加えていただきたい

最終報告書に上記内容(西間先生のコメント)入力

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
A. Koarai, H. Sugiura, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, Y. Minakata, T. Hirano, K. Akamatsu, M. Ichinose	Oxydative stress enhances toll-like receptor 3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells	Am J Respir Cell Mol Biol	42	651-660	2010
M. Ichinose, T. Fujimoto, Y. Fukuchi	Tiotropium 5 µg via respimat and 18 µg via handihaler: efficacy and safety in Japanese COPD patients	Respir Med	104	228-236	2010
M. Ichinose, K. Seyama, M. Nishimura, Y. Fukuchi, A. Nagai, M. Mishima, K.Kubo, for the Beta-2 Agonist Research and Evaluation Committee in COPD (BAREC) Study Group	Additive effects of transdermal tulobuterol to inhaled tiotropium in patients with COPD	Respir Med	104	267-274	2010
N. Sugihara, S. Kanada, M. Haida, M. Ichinose, M. Adachi, M. Hosoe, C. Emery, M. Higgins, B.Kramer	24-h bronchodilator efficacy of single doses of indacaterol in Japanese patients with asthma: A comparison with placebo and salmeterol	Respir Med	104	1629-1637	2010
Y. Minakata, M. Ichinose	High COPD prevalence in the patients with liver diseases.	Intern Med	49	2687-2691	2010
K. Kamio, XD. Liu, H.Sugiura, S. Togo, S.Kawasaki, X. Wang, Y. Ahn, C. Hogaboam, SI. Rennard	Statins inhibit MMP release from human lung fibroblasts	Eur Respir J	35	637-646	2010
S. Togo, H. Sugiura, A. Nelson, T. Kobayashi, X. Wang, K. Kamio, S. Kawasaki, P. Bitterman, S.I. Rennard, X. Liu.	Hepatic growth factor (HGF) inhibits cigarette smoke extract induced apoptosis in human bronchial epithelial cells	Exp Cell Res	316	3501-11	2010

K. Matsunaga, T. Hirano, T. Kawayama, T. Tsuburai, H. Nagase, H. Aizawa, K. Akiyama, K. Ohta , M. Ichinose	Reference ranges for exhaled nitric oxide fraction in healthy Japanese adult population	Allergol Int	59	363-367	2010
S. Togo, T. Sato, H. Sugiura, X. Wang, H. Basma, A. Nelson, X. Lui, T.W. Bargar, J.G. Sharp, S.I. Rennard	Differentiation of embryonic stem cells into fibroblast-like cells in three-dimensional type I collagen gel cultures	In Vitro Cell Dev Biol Anim	47	114-124	2010
ノ瀬正和	喘息予防・管理ガイドライン 2009 -薬物療法のポイント-	アレルギー	59	92-97	2010
平野綱彦, 一ノ瀬正和	呼吸器検査 呼気NOの測定方 法とその意義	アレルギー・ 免疫	17	116-123	2010
一ノ瀬正和	喘息と COPD の類似点と相違 点：病態から	呼吸器内科	18	193-201	2010
一ノ瀬正和,相澤久道,秋山一 男,大田 健,松永和人,平野綱 彦,柳澤 悟	呼気 NO (一酸化窒素) 測定ハ ンドブック - 喘息診断の新 しいツール -			1-6	2011

VI. 研究成果の刊行物

Oxidative Stress Enhances Toll-Like Receptor 3 Response to Double-Stranded RNA in Airway Epithelial Cells

Akira Koarai¹, Hisatoshi Sugiura¹, Satoru Yanagisawa¹, Tomohiro Ichikawa¹, Yoshiaki Minakata¹, Kazuto Matsunaga¹, Tsunahiko Hirano¹, Keiichi Akamatsu¹, and Masakazu Ichinose¹

¹Third Department of Internal Medicine, Wakayama Medical University, School of Medicine, Wakayama, Japan

Virus infections are a major cause of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbations. Recently, Toll-like receptor 3 (TLR3) has been demonstrated to react to double-stranded RNA (dsRNA) and to be involved in the immune responses after viral infections. In the present study, we examined whether oxidative stress, which is involved in the pathogenesis of COPD, enhances the responses of TLR3 in airway epithelial cells. The effect of hydrogen peroxide (H₂O₂) on the release of IL-8 from BEAS-2B cells and primary human bronchial epithelial cells after stimulation with polyinosine-polycytidylic acid [poly(I:C)], a synthetic analog of viral dsRNA and a ligand for TLR3, and the signal transduction were examined. One hundred to 150 μ M H₂O₂ significantly potentiated the release of IL-8 from the epithelial cells after stimulation with 10 μ g/ml poly(I:C). The H₂O₂-augmented IL-8 release was inhibited by treatment with N-acetylcysteine. One hundred micromoles of H₂O₂ enhanced the translocation of nuclear factor (NF)- κ B p65, but not that of interferon regulatory factor-3 (IRF-3), into the nucleus and the NF- κ B DNA binding activity after poly(I:C) stimulation, which effect was inhibited not by the silencing of IRF-3 but by MG132, a proteasome inhibitor, or dexamethasone. One hundred micromoles of H₂O₂ potentiated the TLR3 expression on the airway epithelial cells treated with poly(I:C). These data suggest that oxidative stress augments the response of TLR3 in airway epithelial cells via NF- κ B and that this effect might be partly mediated by the enhancement of TLR3 expression. Modulation of this pathway may be a therapeutic target for viral-induced exacerbations of COPD.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; exacerbation; hydrogen peroxide; nuclear factor- κ B

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the fourth leading cause of death in the world, and further increases in its prevalence and mortality can be expected in the coming decades (1). Many patients with COPD experience periodical exacerbations, which are worsenings of their symptoms such as cough, sputum, and/or dyspnea, causing an acute deterioration in lung function and airway inflammation (1–4). Preventing the exacerbations is necessary to inhibit the progression of the disease and to reduce medical expenses for hospitalization during exacerbations (3–5). However, the precise mechanism of these exacerbations has not been fully elucidated.

In COPD, inflammatory cells including macrophages, neutrophils, and CD8-positive lymphocytes are involved in the pathophysiology of the airway inflammation. These cells are activated by cigarette smoke and release proteases including neutrophil elastase and matrix metalloproteinases, which break

CLINICAL RELEVANCE

Oxidative stress can augment the response of Toll-like receptor 3 (TLR3) in airway epithelial cells via NF- κ B, and this effect might be partly mediated by the enhancement of TLR3 expression. Modulation of this pathway may be a therapeutic target for viral-induced exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.

down connective tissue in the lung parenchyma and stimulate mucus hypersecretion (6, 7). Oxidants derived from cigarette smoke or released by inflammatory cells play a pivotal role in the pathogenesis of COPD (6) and, in fact, oxidative stress markers including hydrogen peroxide (H₂O₂) are elevated in the airways of patients with COPD (8–11). During exacerbations, greater amounts of H₂O₂ are produced in the airways of patients with COPD than those in the stable disease condition (12, 13). In addition, antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and carbocysteine have been shown to reduce the number of COPD exacerbations (14, 15), suggesting that oxidative stress might be involved in the exacerbation of COPD.

Recently, viral infections including rhinovirus, corona virus, respiratory syncytial virus (RSV), and influenza virus have been demonstrated to be a major cause of COPD exacerbations (16, 17). In addition, the role of Toll-like receptors (TLRs) in recognizing the pathogen-associated molecular patterns, including TLR3, TLR7, and TLR8, has been demonstrated in innate immunity (18, 19). Especially, TLR3 reacts with viral-derived double-strand RNA (dsRNA) and is thought to play a key role in the viral infection in the respiratory system (20–22). The expression of TLR3 has been detected on airway epithelial cells, dendritic cells, and macrophages (20, 22). When TLR3 is activated, both nuclear factor (NF)- κ B and interferon regulatory factor-3 (IRF-3) are translocated into the nucleus and activate their DNA binding (18, 21, 23). The former has been reported to regulate the expression of proinflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β , and the potent neutrophil chemoattractant IL-8 (24). The latter regulates the expression of type I interferon (IFN) (23). Although both oxidative stress and viral infection are involved in the exacerbations in COPD, it has been not elucidated whether oxidative stress potentiates the TLR signaling and mediator production.

IL-8 is a potent neutrophil chemoattractant and is related to the accumulation of neutrophils in the airways of patients with COPD (25). In patients with COPD, the levels of IL-8 in sputum, bronchoalveolar lavage, exhaled breath condensate, and serum are elevated compared with healthy subjects (26–29), and the level is further increased during exacerbations (28, 30, 31), which leads to airway neutrophilia (32, 33). Airway epithelial cells produce large amounts of IL-8, and TLR3 activation induces IL-8 production in airway epithelial cells (21, 22).

The present study, therefore, was designed to determine, using a synthetic dsRNA, polyinosinic-cytidylic acid [poly(I:C)], the following: (1) whether oxidative stress could affect the

(Received in original form September 7, 2008 and in final form June 7, 2009)

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Masakazu Ichinose, M.D., Ph.D., Third Department of Internal Medicine, Wakayama Medical University, School of Medicine, 811-1 Kimiidera, Wakayama 641-8509, Japan. E-mail: masakazu@wakayama-med.ac.jp

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 42, pp 651–660, 2010

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2008-0345OC on July 13, 2009
Internet address: www.atsjournals.org

poly(I:C)-mediated IL-8 release in airway epithelial cells; (2) whether oxidative stress modulates the poly(I:C)-mediated TLR3 signaling; and (3) whether oxidative stress affects TLR3 expression on airway epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Commercially available reagents were obtained as follows: R848 and bafilomycin were purchased from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland); poly(I:C) was from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ); MG132, a proteasome inhibitor, and R837 were from Calbiochem (La Jolla, CA); control rabbit IgG was purchased from Dako (Glostrup, Denmark); serum-free Keratinocyte Basal Medium and its supplement including recombinant epidermal growth factor and bovine pituitary extract, and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) were purchased from Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY); 3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB), propidium iodide (PI), H₂O₂, lipopolysaccharide (LPS), N-acetylcysteine (NAC), dexamethasone (DEX), Hanks' balanced salt solution (HBSS), RPMI 1640 medium, bovine serum albumin (BSA), paraformaldehyde, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, leupeptin, thiazolyl blue tetrazolium, and dimethyl sulphoxide (DMSO) were from Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO).

Preparation of Epithelial Cells

The human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B cells) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Four strains of primary human bronchial epithelial cells (HBEpC) were purchased from Cell Applications, Inc. (San Diego, CA) and ScienCell research laboratories (Carlsbad, CA). BEAS-2B cells (passages 45–55) or HBEpC (passages 3–7) were cultured in serum-free Keratinocyte Basal Medium supplemented with 10 ng/ml recombinant epidermal growth factor and 30 µg/ml bovine pituitary extract. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and passaged. Cells were routinely grown to 80% confluence and growth arrested overnight before experimental procedures by transfer to growth factor-free media. Cells were cultured in 96-well plates for investigation of the effect of poly(I:C)-induced IL-8 release. To investigate the effect of poly(I:C)-induced IL-8 release, the supernatants were harvested at 24 hours after treatment with poly(I:C) and stored at –80°C until the measurement. To estimate the effect of H₂O₂ on the poly(I:C)-induced IL-8 release, H₂O₂ was added to the media 30 minutes before the treatment with poly(I:C) (34). To evaluate the effects of bafilomycin, NAC, MG132, and DEX, these drugs were added to the media at various concentrations 30 minutes before H₂O₂ or poly(I:C) treatment.

Detection of TLR3 by Immunocytochemistry

Cells were seeded in 8-well chamber slides at a density of 1 × 10⁵/ml and cultured for 24 hours, and then the medium was replaced with growth factor-free media for a further 24 hours. After washing with PBS, the slides were fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. The slides were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes at room temperature. The slides were blocked for 1 hour at room temperature by 5% BSA and then rinsed. The slides were then incubated overnight with goat polyclonal anti-TLR3 antibody (10 µg/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) at 4°C. After washing with PBS, the slides were incubated with FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG antibodies (1:2,000 dilution; Sigma) for 1 hour at room temperature. Nuclei of the cells were stained with PI (1 µg/ml). The slides were then viewed with an epifluorescence microscope (E-800; Nikon, Tokyo, Japan) and photographed with a digital camera (DMX-1200C; Nikon) under ×400 magnification.

Detection of TLR3 by Immunoblotting

Cells were treated with 10 µg/ml poly(I:C) in the presence or absence of 100 µM H₂O₂ for 24 hours. After washing with HBSS, cells were homogenized in cell lysis buffer (0.05% Triton X, 35 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.4 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 1 µM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100 µg/ml aprotinin, and 1 µg/ml leupeptin) at 4°C. Samples

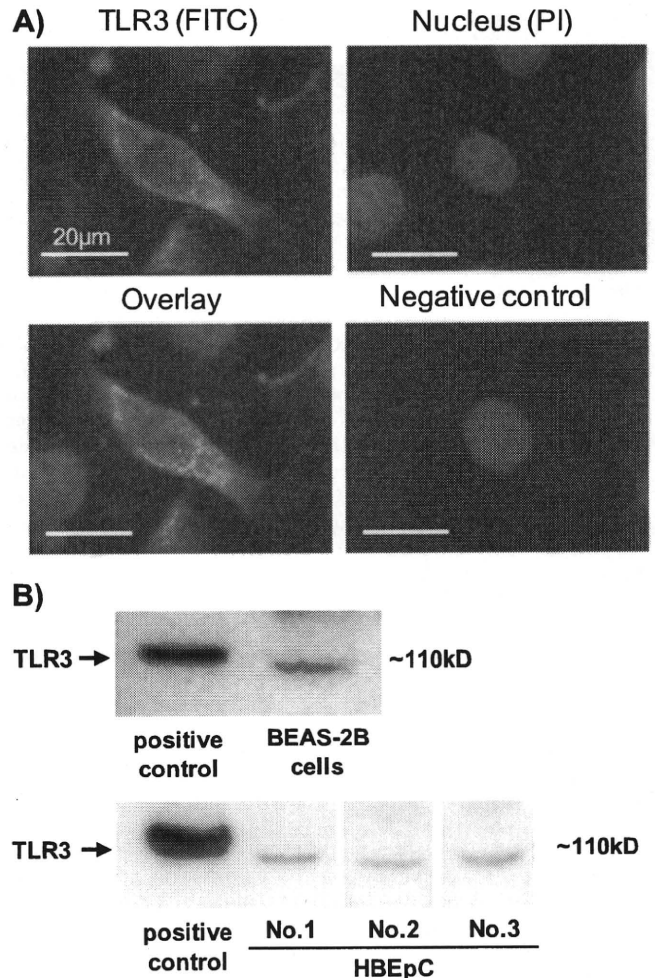


Figure 1. Expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) in human bronchial epithelial cells. (A) Panels show representative photographs of immunoreactivity of TLR3 in BEAS-2B cells (upper left panel, green), immunofluorescence of the nucleus (upper right panel, red), an overlaid image (lower left panel), and a negative control (lower right panel). Original magnification: ×400. (B) The expression of TLR3 in BEAS-2B cells and three different strains of primary human bronchial epithelial cells was detected at 110 kD by immunoblotting. Recombinant human TLR3 was used for positive control. PI, propidium iodide; HBEpC, primary human bronchial epithelial cells.

were solubilized in SDS-PAGE sample buffer. Equal amounts of protein and recombinant human TLR3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) for positive control were loaded and separated by electrophoresis on 12.5% SDS polyacrylamide gels. After electrophoresis, the separated proteins were transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Goat polyclonal anti-TLR3 antibody (0.2 µg/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) or mouse monoclonal anti-β-actin antibody (1:10,000 dilution; Sigma) were used for the detection of target proteins. Peroxidase-conjugated appropriate secondary antibodies were used. Binding antibodies were detected using ECL-plus (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and visualized with a chemiluminescence imaging system (Luminocapture AE6955; Atto Co., Tokyo, Japan). Each band intensity was quantified by densitometry (Image J; NIH, Frederick, MD).

Cell Viability Assay by MTT Assay Method

One milligram per milliliter of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was prepared using HBSS. Once the supernatants had been removed from the cells, 50 µl MTT solution