

「臨床研究に関する倫理指針」およびこれらに基づき制定された順天堂大学倫理規定を遵守して行った。

### C. 研究結果

下肢のリンパ浮腫は8例に認め(頻度 8/228 = 3.5%), 8例すべてが女性で sporadic LAM であった。LAM の平均発症年齢は32.5 (23~44) 歳, リンパ浮腫の発症年齢は33.3 (23~42) 歳であった。6例(75%)で LAM の初発症状がリンパ浮腫であり, 1例が気胸, 残りの1例が労作時息切れであった。リンパ浮腫の臨床的特徴として, 部位は右下肢2例(25%), 左下肢4例(50%), 両下肢2例(25%)であり, International Society of Lymphology の分類では stage 1 が1例(12.5%), stage 2 が7例(87.5%)とすべての症例で stage 2 以下であった。胸部 CT 画像による嚢胞性変化の重症度スコアでは, mild 4例(50%), moderate 2例(25%), severe 2例(25%)と各重症度でリンパ浮腫合併症例が存在した。腹部 CT 所見では, リンパ節腫大 (lymphangioliomyomas) が8例すべての症例に存在し, その内訳は後腹膜2例, 骨盤腔2例, 後腹膜と骨盤腔の両方に存在する例が3例, 鼠径部のみが1例, であった。腹水は4例(50%)と半分に存在し, 穿刺未施行の1例を除いてすべて乳び腹水であった。治療は全例で脂肪制限食, リンパマッサージが行われており, 3例では GnRH 療法が行われていた。全例でリンパ浮腫の軽減を認め, 8例中6例でリンパ浮腫はほぼ改善を示した。

### D. 考察

現在までに LAM に合併したリンパ浮腫の報告は2例のみであり, 我々の retrospective な検討では, 8/228例(3.5%)と非常に希であった。興味深い点としては, 自験例のうち6例で, リンパ浮腫が LAM の初発症状として出現していたことである。一般に, 続発性リンパ浮腫は乳癌や婦人科癌の手術後や放射線治療後に多く, リンパ浮腫の

存在のみでは LAM は疑われない。また, 同時に腹部や骨盤内に lymphangioliomyoma (リンパ節腫大) を合併しているため, 軟部組織腫瘍, リンパ腫などの腫瘍性疾患による浮腫を疑われた。そのため確定診断のため3症例では開腹手術が施行されていた。手術や放射線治療歴のない女性に下肢リンパ浮腫が出現し, 後腹膜腔や骨盤腔から鼠径部のリンパ流路にそってリンパ節腫大を疑わせる軟部腫瘍を合併している際には, LAM による続発性リンパ浮腫の可能性を考慮する必要がある。

LAM に合併する続発性リンパ浮腫は, LAM 細胞の増殖とリンパ管新生によりリンパ流の停滞, 閉塞, などのリンパ管障害により生じたと考えられる。画像所見の検討では LAM による続発性リンパ浮腫は肺病変の重症度に関係なく出現している。HOT を導入し, 移植を待機している症例もあれば, 軽症で無症状の症例もある。一方, 全例で腹部や骨盤内に lymphangioliomyoma を認めており, リンパ浮腫では腹部から骨盤部のリンパ流路に沿った病変がより重要であると考えられる。

リンパ浮腫のステージ分類では, 全例Ⅱ期以下であり重度のリンパ浮腫は認めなかった。治療としては, リンパマッサージを全例に施行し, 程度に応じて弾性ストッキング着用, 基礎病態である LAM の重症度, 乳び腹水の合併の有無により脂肪制限食や GnRH 療法が施行されていた。これらの治療により, リンパ浮腫は全例で軽減もしくは改善していた。一般に, 高度なリンパ浮腫が長期間に渡って持続すると皮膚の線維化, 肥厚, 脂肪沈着などの皮膚変化が生じうる。LAM にみられるリンパ浮腫は, 多くはⅡ期の軽症で治療に反応しやすく, 早期からリンパマッサージを主軸とした治療を行うべきであると考えられる。

### E. 結論

リンパ浮腫は LAM の稀な合併症であるが, 初発症状として出現することがあり注意が必要であ

る。リンパマッサージを主とした理学療法、食事療法、内科的治療により良好な管理が期待できるため、早期に適切な治療を行うべきである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Malinowska-Kolodziej I, Finlay G, Campbell G, et al: Lymphangioliomyomatosis: cause of a malignant chylous pleural effusion. *J Clin Oncol*, 28: e4-6, 2010
2. Takagi Y, Sato T, Morio Y, et al: A pleuro-peritoneal communication through the diaphragm affected with lymphangioliomyomatosis. *Intern Med*, 49: 439-345, 2010
3. Seyama K, Mitani K, Kumasaka T, et al: Lymphangioliomyoma cells and lymphatic endothelial cells: expression of VEGFR-3 in lymphangioliomyoma cell clusters. *Am J Pathol*, 176: 2051-2052, 2010
4. Seyama K, Kumasaka T, Kurihara M, et al: Lymphangioliomyomatosis: a disease involving the lymphatic system. *Lymphat Res Biol*, 8: 21-31, 2010
5. Nurok M, Eslick I, Carvalho CR, et al: The International LAM Registry: a component of an innovative web-based clinician, researcher, and patient-driven rare disease research platform. *Lymphat Res Biol*, 8: 81-87, 2010
6. Koike K, Kondo Y, Sekiya M, et al: Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol*

*Physiol*, 298: L784-792, 2010

7. 瀬山邦明: リンパ脈管筋腫症 (LAM) 薬 シロリムス (ラパミューン). 日本内科学会雑誌, 99: 1617-1622, 2010

##### 2. 学会発表

1. 瀬山邦明: 「リンパ脈管筋腫症の認定基準とその問題点」第50回日本呼吸器学会 特別報告「リンパ脈管筋腫症の展望—特定疾患認定を受けて—」. 第50回日本呼吸器学会, 平成22年4月25日, 京都
2. 小池建吾, 瀬山邦明, 石神昭人, 他: SMP30 ノックアウトマウスにおけるビタミンCの肺気腫治療効果の検討. 第50回日本呼吸器学会, 平成22年4月25日, 京都
3. 飛野和則, 瀬山邦明, 平井豊博, 他: 胸部CT画像の定量解析を用いた嚢胞性肺疾患と肺気腫の病態の比較検討. 第50回日本呼吸器学会, 平成22年4月25日, 京都
4. 飛野和則, 瀬山邦明, 星加義人, 他: リンパ脈管筋腫症の胸部・腹部画像所見の検討. 第14回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会, 平成22年9月17・18日, 大宮
5. 星加義人, 瀬山邦明, 鈴木洋平, 他: 婦人科疾患に多発肺嚢胞を認めた2例. 第14回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会, 平成22年9月17・18日, 大宮

#### H. 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

## 睡眠時無呼吸症候群患者の内臓脂肪に対する CPAP 治療の影響

研究分担者 赤 柴 恒 人

日本大学医学部睡眠学・呼吸器内科教授

### 研究要旨

睡眠時無呼吸症候群（SAS）患者においては肥満例であっても内臓脂肪の蓄積があり代謝機能異常がしばしば認められる。SAS に対する最も有効な治療法である nasal CPAP の短期治療が代謝機能および内臓脂肪に及ぼす影響を検討した。平均1.5ヶ月の治療後に、一般臨床検査と腹部 CT を再検査したが、血圧、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1c に有意な変化は認められず。また、CT による全脂肪、内臓脂肪、皮下脂肪にも有意な変化は認められなかった。

### A. 研究目的

睡眠時無呼吸症候群（SAS）と耐糖能異常については近年多くの報告があり、両者の強い関連が疑われている。我々も、昨年の本会議で、非肥満例であっても、内臓脂肪の過度の蓄積が認められ、これが、SASの重症度と有意に関連することを報告した。今回、nasal CPAP 治療を短期間（1.5ヶ月）施行し、CPAP が内臓脂肪に及ぼす影響を検討した。

### B. 研究方法

対象は睡眠検査（polysomnography: PSG）で SAS と確定診断され、nasal CPAP 治療の適応とされた男性30例である。まず、身長、体重から body mass index (BMI) を算出し、首周囲径、腹囲を測定した。PSG では、AHI の他、arousal index、平均酸素飽和度 (M-SaO<sub>2</sub>)、最低 SaO<sub>2</sub> (L-SaO<sub>2</sub>) を算出し、AHI > 20 の症例を研究対象とした。血圧、耐糖能を含めた一般臨床検査を行った後、腹部 CT を臍部でとり、標準的な方法で全脂肪面積、内臓脂肪面積 (VFA) と皮下脂肪面積 (SFA) を算出した。

CPAP titration を施行して適正圧を決定し、在宅で週に5日以上、一晩に4時間以上使用するよう指導した。治療後1ヶ月後に体重、その他を再測定し、同時に血圧、一般検査を再検査した。CPAP のアドヒアランスについては、機器に内蔵されたカードで判定し、条件を満たした症例には腹部 CT による腹部脂肪測定を再検査した。

### (倫理面への配慮)

本研究の意義を十分に被験者に説明し、インフォームドコンセントを得た。

### C. 研究結果

対象の平均年齢は49.3歳、平均 BMI は 28.1 kg/m<sup>2</sup>、腹囲は 94.3 cm であった。PSG および腹部 CT の結果では、AHI, arousal index, 平均 SpO<sub>2</sub>, 最低 SpO<sub>2</sub> は、各々 42.7, 42.9, 95.0, 72.9% で重症例が主体であった。CT の結果では、全脂肪面積、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積の平均は、各々 368.7, 140.4, 228.3 cm<sup>2</sup> であった。BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> の非肥満例は30例中10例に認められ、その各脂肪面積は232.5, 125.4, 107.0 と肥満例の436.8, 147.8, 288.8に比し有意に低値であった。一般臨床検査成績では MS の構成要

素である血圧の平均は 136.5/81.7 mmHg であり、TG, HDL-C, FBS, HbA1c は、各々 155.5, 53.0, 115.1, 115.1であった。

CPAP 治療 1 ヶ月後の結果では、全体例においては、再検査により有意な変化は全く認められなかった。また、非肥満例の 10 例についても全く有意な変化を認めなかった。

#### D. 考 察

近年、睡眠の障害が耐糖能異常を引き起し metabolic syndrome (MS) の大きな原因の一つとして考えられるようになった。睡眠不足や夜更かしなど現代人が陥り易い状態が糖尿病の蔓延の要因と考えられている。SAS は睡眠時に繰り返し上気道の閉塞が出現し、その結果しばしば中途覚醒が引き起されるため十分な睡眠をとることができなくなる。言わば睡眠障害を引き起す代表的な疾患である。さらに、SAS には上気道閉塞により著明なガス交換障害が生ずる、日中では見られないような強度の低酸素状態がしばしば出現する。この間欠的に出現する低酸素血症は睡眠障害以上に代謝機能を障害し耐糖能異常をもたらして糖尿病の発症に関与することが多くの報告から明らかにされている。SAS 患者には肥満の合併が多いため、MS の合併が多いことは当然と考えられていたが、非肥満の SAS 患者においても高頻度に MS の合併が認められることを我々は報告している。さらには、腹部 CT を用いて非肥満 SAS 症例の内臓脂肪を評価したところ、肥満ではないにもかかわらず内臓脂肪面積が増大しており、この内臓脂肪面積が SAS の重症度である AHI と有意に相関することを認めた。この成績は、内臓脂肪蓄積を基本的病態とする MS の発症に SAS が肥満とは独立して関与する可能性を示唆している。

今回の検討では、耐糖能を含めた一般臨床検査値及ぶ腹部 CT 上の内臓脂肪面積、皮下脂肪面積になんら有意の変化を認めなかった。その最大の理由は治療期間が 1.5 ヶ月と短かったためと考え

られる。1.5 ヶ月という短期間で再検査を行った理由は、長期に経過すると体重に変化が起り、内臓脂肪に影響を与えるためと考えたためである。しかし、実際には、1.5 ヶ月程度で全ての指標で変化が認められず、やはり治療の効果を見るためには 3～6 月程度の期間が必要であると考えられる。今後、6 ヶ月、1 年と経過を追い治療の効果を見て行く必要があると思われる。

#### E. 結 論

30 例の男性 SAS 患者の耐糖能、内臓脂肪に及ぼす nasal CPAP 短気治療の影響を見るため、治療前後に一般臨床検査、腹部 CT 検査を再検査し、その変化を検討した。治療 1.5 ヶ月後の再検査では、MS の構成要素である血圧、中性脂肪、HDL コレステロール、空腹時血糖、HbA1c に有意な変化を認めなかった。腹部 CT による内臓脂肪面積も治療後に変化を認めなかった。30 例中 10 例が非肥満症例であったが、この 10 例に関しても何ら有意な変化が見られなかった。治療効果の判定には 3～6 ヶ月程の期間が必要とか考えられ、今後さらに長期効果を検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Akahoshi T, Uematsu A, Akashiba T, Nagaoka K, Kiyofuji K, Kawahara S, Hattori T, Kaneita Y, Yoshizawa T, Takahashi N, Uchiyama M, Hashimoto S: Obstructive sleep apnoea is associated with risk factors comprising the metabolic syndrome. *Respirology*, 15: 1122-1126, 2010
2. 瀬在 明, 赤星俊樹, 南 和友, 関野久邦, 秦 光賢, 吉武 勇, 和久井真司, 宇野澤聡, 高坂彩子, 村上朝彦, 塩野元美, 内山 真, 赤柴恒人: 睡眠時無呼吸症候群を合併し

- た冠動脈バイパス術後患者に持続的気道内陽圧 (CPAP) 療法が著効した症例. 日大医学雑誌, 69 : 198-202, 2010
3. 赤柴恒人 : [生活習慣と呼吸器疾患] 睡眠時無呼吸症候群と体型. 呼吸器内科, 17 : 511-515, 2010
  4. 赤柴恒人 : [睡眠時無呼吸症候群の最新の話] 睡眠時無呼吸症候群の定義・診断基準と疫学. 日本胸部臨床, 69 : 577-583, 2010
  5. 赤柴恒人 : [COPD の併存症・合併症] COPD における睡眠障害. 呼吸と循環, 58 : 159-164, 2010
  6. 赤柴恒人 : [睡眠と生活習慣病] 睡眠時無呼吸症候群. 成人病と生活習慣病, 40 : 390-394, 2010
  7. 赤柴恒人 : [COPD の診療 update] COPD と睡眠時無呼吸症候群. 日本医師会雑誌, 138 : 2522, 2010
  8. 赤柴恒人 : [睡眠時無呼吸症候群 研究と臨床の新時代] 睡眠時無呼吸症候群とメタボリックシンドローム. *The Lung perspective*, 18 : 259-262, 2010
- ## 2. 学会発表
1. 植松昭仁, 赤星俊樹, 赤柴恒人 : メタボリックシンドロームと睡眠時無呼吸症候群 (シンポジウム : 全身性疾患としての睡眠時無呼吸症候群). 日呼吸会誌, 48(S) : 27, 2010
  2. 岡本直樹, 清藤晃司, 赤星俊樹, 服部知洋, 植松昭仁, 永岡賢一, 伊藝孔明, 松本健, 吉澤孝之, 高橋典明, 赤柴恒人, 橋本 修. 指摘量を考慮した安定期 COPD の短時間作用型  $\beta_2$  刺激薬 (SABA) assist use の検討. 日呼吸会誌, 48(S) : 395, 2010
  3. 平沼久人, 服部知洋, 関山忠孝, 山口賢二, 伊藤玲子, 清藤晃司, 松本 健, 赤星俊樹, 赤柴恒人, 橋本 修 : 慢性咳嗽で受診し咳喘息と診断されその後肺炎として加療された気管支結核の 1 症例. 日呼吸会誌, 48(S) : 234, 2010
  4. 永岡賢一, 赤星俊樹, 植松昭仁, 清藤晃司, 川原誠司, 岡本直樹, 伊藝公明, 神津 悠, 服部知洋, 辻野一郎, 吉澤孝之, 橋本 修, 赤柴恒人 : 閉塞型睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) における代謝機能異常と体脂肪分布の検討. 日呼吸会誌, 48(S) : 126, 2010
  5. 須金紀雄, 馬場雅行, 山本直敬, 中嶋美緒, 宮本忠昭, 今井礼子, 鎌田正, 溝江純悦, 辻井博彦, 高橋典明, 赤柴恒人, 橋本 修 : 高齢者肺癌に対する治療戦略—高齢者 I 期非小細胞肺癌に対する炭素イオン線治療の効果. 肺癌, 49(5) : 580, 2010
  6. 山口賢二, 服部知洋, 伊藤玲子, 平沼久人, 関山忠孝, 松本 健, 橋本奈緒美, 植松昭仁, 清藤晃司, 赤星俊樹, 馬島 徹, 赤柴恒人, 橋本 修 : 気管支喘息とアディポサイトカインの関連について. アレルギー, 59(3-4) : 390, 2010
  7. 赤星俊樹, 植松昭仁, 川原誠司, 桂 一仁, 蜂須賀久喜, 内山 真, 赤柴恒人, 橋本 修 : 糖代謝異常は OSAS の治療でどのように改善しうるか? (シンポジウム : SAS と糖尿病). 日本睡眠学会誌, S : 34, 2010
  8. 矢橋真奈美, 川原誠司, 石川典恵, 長田佳子, 芝宮ゆり, 古川沙央里, 清水健一郎, 野尻さと子, 植松昭仁, 赤星俊樹, 赤柴恒人 : ポストポリオ症候群に合併した閉塞型睡眠時無呼吸症候群に nCPAP 治療が有効であった 1 例. 日本睡眠学会誌, S : 207, 2010
  9. 清藤晃司, 永岡賢一, 赤星俊樹, 岡本直樹, 植松昭仁, 服部知洋, 松本 健, 吉澤孝之, 赤柴恒人, 橋本 修 : ハイ・チェッカーによる FEV1.0 および FEV1.0/FEV6.0 の有用性についての検討. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 20(S) : 231, 2010
  10. 植松昭仁, 吉澤孝之, 石黒俊彦, 吉澤明孝, 赤星俊樹, 権寧 博, 赤柴恒人, 橋本 修 : 閉塞性睡眠時無呼吸症候群と喫煙—特に高血圧との関連について—. 日本呼吸ケア・リハ

- ビリテーション学会誌, 20(S) : 302, 2010
11. 橋田洋史, 石黒俊彦, 吉澤孝之, 吉澤明孝, 鈴木雅明, 古川恭司, 権寧 博, 赤柴恒人, 波多江奈緒美 : n-CPAP 療法における「Easy Life」マスクの有用性について. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 20(S) : 303, 2010
  12. 大城祐介, 吉澤孝之, 岩城 基, 久野絵里, 佐々木正美, 平井菜穂子, 吉澤明孝, 赤柴恒人, 橋本 修 : バッテリー内蔵小型ベンチレーター trilogy100 の有用性. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 20(S) : 205, 2010
  13. 大城祐介, 岩城 基, 吉澤孝之, 古市祥子, 吉澤明孝, 宮本園江, 榊原美沙, 成田理恵, 赤柴恒人, 橋本 修 : NPPV 導入が困難な慢性 2 型呼吸不全に対する Average Volume Assured Pressure Support の有用性. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 20(S) : 202, 2010
  14. 赤柴恒人 : 睡眠時無呼吸症候群の病態と治療 (ランチョンセミナー). 日本公衆衛生学会誌
  15. 藤田之彦, 橋本 修, 住友直方, 堀越 昶, 赤柴恒人, 竹内 仁, 戸田宗宏. 日本大学医学部と芸術学部演劇学科との学部間協力による模擬患者 (SP) 養成の試み. 医学教育, 41(S) : 99, 2010
- H. 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

## [1] スタチンの喫煙暴露肺上皮細胞再生効果の検討

## [2] 日本人肺動脈性肺高血圧症患者のBMPR2遺伝子解析研究

研究分担者 浅野 浩一郎

慶應義塾大学医学部呼吸器内科准教授

### 研究要旨

[1] スタチンの多面的作用が慢性閉塞性肺疾患の病態を改善する可能性が指摘されているがその機序は明らかではない。これまでの検討でスタチンはエラストーゼ誘導肺気腫モデルにおいて上皮細胞の再生を促進した。本研究ではスタチンが喫煙により傷害された上皮細胞の修復に関わるか否かを検討した。スタチンは短期タバコ煙暴露マウスにおいて肺胞上皮細胞の増殖を促すことが示された。BALF中のVEGF濃度はスタチン投与により増加しており、スタチンの肺胞上皮細胞増殖促進機序の一つとしてVEGFの増加が関与している可能性が考えられた。

[2] 特発性あるいは家族性肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 患者では、BMPR2 遺伝子のミスセンス、ナンセンス、フレームシフト変異に加え、遺伝子の再構成を伴う症例が報告されている。本研究では、日本人 PAH 患者での BMPR2 遺伝子再構成の頻度を検討した。PAH 患者家族性7家系、特発性41例において、BMPR2 遺伝子変異を直接塩基配列決定法により、遺伝子再構成を定量 PCR 法および MLPA 法により検討した。ミスセンス変異5例、ナンセンス変異4例、フレームシフト変異6例を含む15例、31.3%（家族性3例、特発性12例）で BMPR2 遺伝子の点変異が同定された。一方、BMPR2 遺伝子再構成は5例、10.4%（家族性1例、特発性4例）で同定された。欧米人患者での BMPR2 遺伝子再構成の頻度は5～12%と報告されており、日本人でもほぼ同様の頻度であった。

### A. 研究目的

[1] HMG-CoA 還元酵素阻害剤（スタチン）は COPD 患者に対して肺機能改善などの臨床効果が示唆されているが、その機序は不明である。慢性肺気腫の病因として肺胞上皮細胞の細胞死、再生障害という病態が近年注目されている。我々はスタチンがタバコ煙により傷害を受けたⅡ型肺胞上皮細胞の増殖促進作用を介してタバコ煙暴露肺における肺胞上皮細胞のホメオスタシス維持に保護的に働くと仮説を立てて検証する。

[2] TGF- $\beta$  スーパーファミリーの BMPR2 が特発性・家族性肺動脈性肺高血圧症の原因遺伝子として同定され、2008年のダナポイント分類においても遺伝子変異の有無を重視している。しかし、BMPR2 遺伝子変異には point mutation 以外に direct sequence 法で検出できない gene re-arrangement も存在するため、変異陽性率は検査方法により報告毎に大きな差がある。日本人を含むアジア人患者でも BMPR2 遺伝子変異が報告されているが、いずれも direct sequence 法でのみ検討したものである。本研究では、日本人 PAH 患者で

の *BMPR2* 遺伝子変異について *BMPR2* 遺伝子再構成の頻度を含めて検討した。

## B. 研究方法

[1] 8週齢の C57Bl/6 雌を用いて、喫煙チャンパー内で day 1 から 5 までの 5 日間 1 日 2 回、各 2 本のタバコ煙（ケンタッキー大学研究用タバコ 3R4F）を暴露し、day 6 に 2 本最終暴露を行い、その 2 時間後に犠牲死させた。摘出した肺を 25 cmH<sub>2</sub>O の定圧でホルマリン固定した。タバコ煙暴露群および非暴露群の各々に 20 μg のシンバスタチンまたは vehicle を day 1 から 5 まで 1 日 1 回腹腔内投与した。マウス肺標本は proliferating cell nuclear antigen (PCNA) および BrdU に対する免疫染色を行い、顕微鏡下に陽性細胞数をカウントした。肺胞 II 型上皮細胞の同定には抗 ProSP-C 抗体を用いた。また BALF 中サイトカイン、増殖因子濃度を Bioplex 法を用いて測定した。本研究計画は慶應義塾大学医学部における動物実験プロトコールとして承認済みである。

[2] 慶應義塾大学病院通院中の日本人肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 患者を対象とした。膠原病、Eisenmenger 症候群など、原因が明らかな症例は除外した。研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認された研究計画に基づき実施した。

*BMPR2* 遺伝子変異陽性率を調べるため、PCR-direct sequence 法により point mutation を検討した。*BMPR2* 遺伝子の第 1～11, 13 エクソンについて、アミノ酸標識領域をはさむ PCR プライマーを作成した。第 12 エクソンについては重複する 500 bp 前後の 3 つの増幅産物が生成されるよう、PCR プライマーを設計した。増幅産物は direct sequence 法により塩基配列を決定した。

Gene re-arrangement を検出するためには、定量 PCR 法と Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法の 2 つの方法により解析を行った。定量 PCR 法では *BMPR2* 遺伝子の第 1～13 エクソンを CYBR-Green 存在下で増幅し、リアルタイム PCR 装置で検出した。健常者の

DNA で検量線を作成し、*BMPR2* 遺伝子各エクソンの各サンプルのコピー数を求めた。

MLPA 法は *BMPR2* 遺伝子の第 1～13 エクソンに対してそれぞれ末端に共通配列を含む長さの異なる 2 つのプライマーを結合させたのちにライゲーション反応により 1 本鎖 DNA とし、共通配列部分を PCR プライマーとして増幅反応を行った。増幅産物はキャピラリーシークエンサーで泳動し、それぞれのエクソン由来のピーク高を比較した。

## C. 研究結果

[1] PCNA 陽性細胞は喫煙暴露で増加し、シンバスタチン投与によりさらに増加した。PCNA 陽性細胞のほとんどが proSP-C 陽性であり、II 型肺胞上皮と考えられた。BALF 中の総細胞数およびマクロファージ数は喫煙により増加したが、シンバスタチン投与では変化を認めなかった。BALF 中 IL-1β, IL-6, VEGF 濃度はシンバスタチン投与喫煙群で増加した。BrdU 染色でもシンバスタチン投与群で陽性細胞が増加する傾向が見られた。

[2] 家族性 PAH は 7 家系、特発性 PAH は 41 名について検討を行った。特発性 PAH 41 例の内、男性が 13 例、診断時の平均年齢が 30 歳であった。

Point mutation は 15 例 [家族性 3 例 (43%), 孤発例 12 例 (29%)] で認められた。うち 5 例が misense mutation, 4 例が nonsense mutation, 6 例が frameshift mutation であり、エクソン 12 が最も多く 6 例で、次いでエクソン 3 とエクソン 9 が 3 例ずつ、エクソン 8 が 2 例、エクソン 4 が 1 例であった。

Gene re-arrangement は定量 PCR 法では 5 例、10.4% (家族性 1 例、特発性 4 例) で同定されたが、MLPA 法ではそのうち 3 例のみが確認できた。

## D. 考察

[1] 短期喫煙暴露マウスモデルにおいてスタチンは II 型肺胞上皮細胞の増殖を促進し、タバコ煙に



よる傷害に対し肺胞上皮細胞の再生を促進している可能性が示唆された。その機序の一つとして VEGF の産生亢進が考えられた。今後肺胞上皮細胞 (A549 細胞) を用い、タバコ抽出液, シンバスタチン, VEGF を投与し, 喫煙暴露下の細胞増殖に及ぼすスタチンと VEGF の影響を検討する。またマクロファージを用い, スタチン投与の VEGF 産生に及ぼす影響を検討する予定である。

[2] PAH 患者における BMPR2 遺伝子変異の頻度は家族性 PAH で 36~82%, 特発性 PAH で 16~40% と報告されている。今回の検討でも, 家族性 PAH で 43%, 特発性 PAH で 29% に検出され, 過去の報告と一致する結果であった。実際に認められた変異のうち, エクソン 3, 9, 12 で認められた nonsense mutation は過去に報告例があったが, misense mutation, frameshift mutation には報告例と一致するものはなかった。

Gene re-arrangement に関しての報告は少なく, 欧州からの家族性 PAH で 12%, 特発性 PAH で 5% との報告と, 米国からの家族性 PAH で 33%, 特発性 PAH で 0% との報告があるのみである。今回の日本人 PAH 患者での定量 PCR 法による検討では家族性 PAH で 1 例 (14%), 特発性 PAH で 4 例 (10%) に gene re-arrangement の存在が疑われ, 欧米の結果とほぼ一致した。

## E. 結論

[1] スタチンが喫煙により傷害された肺胞上皮の再生を促進する可能性が示唆され, その機序の一つとして VEGF の増加を介する可能性が考えられた。

[2] 日本人特発性・家族性 PAH 患者においても, BMPR2 遺伝子の gene re-arrangement をきたしている症例が存在する。

## F. 健康危険情報

現在のところなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1. Chubachi S, Nakamura H, Minematsu N, Tsuduki K, Yoshida S, Takahashi S, Tateno H, Asano K, Ishizaka A: Effect of simvastatin on alveolar epithelial cell proliferation in short-term cigarette smoke-exposed mice. International Conference of ATS, May 2010, New Orleans, USA
2. 中鉢正太郎, 仲村秀俊, 峰松直人, 続 敬之, 吉田秀一, 高橋佐枝子, 館野博喜, 浅野浩一郎, 石坂彰敏: 短期喫煙マウスにおける気道上皮細胞増殖に及ぼすスタチンの効果. 日本呼吸器学会学術講演会, 2010年4月, 京都

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 呼吸不全に関する基礎研究：COPD を中心に

研究分担者 長 瀬 隆 英  
東京大学大学院医学系研究科教授

研究協力者 石井 聡<sup>1</sup>，幸山 正<sup>2</sup>，三谷 明久<sup>3</sup>  
秋田大学大学院医学系研究科教授<sup>1</sup>，東京大学大学院医学系研究科講師<sup>2</sup>  
東京大学医学部附属病院<sup>3</sup>

### 研究要旨

COPD，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) 脂質性メディエーターに着目し，炎症性肺疾患発症との関連を探索した。

2) 肺の発生・機能への関与が示唆されている新規転写コアクチベーター TAZ に着目し，炎症性肺疾患発症との関連を探索した。

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可能性が示された。本知見は，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。

### A. 研究目的

COPD，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，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。

#### 1. 発生工学を駆使した基礎研究

COPD，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 $\alpha$ ，IL-1 $\beta$ ，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，さらに発生への関与が示唆されている転写コアクチベーター

TAZ 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する。

## 2. 脂質性メディエーター

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、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。

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よりなる構造をもち、生体ではリン脂質から細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>) 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。

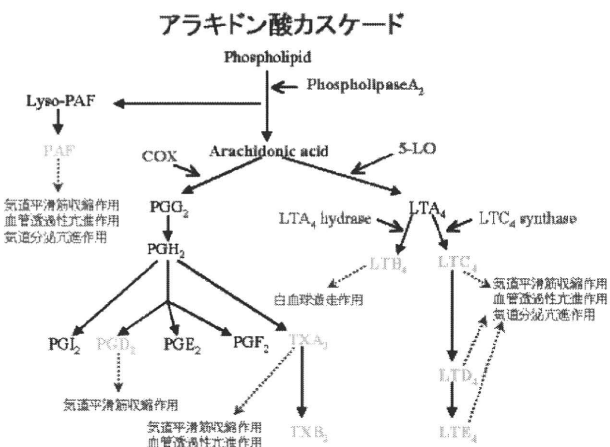


図 1. アラキドン酸カスケードの模式図

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。

特にロイコトリエン (LT) 系は、好中球遊走因子としての LTB<sub>4</sub> 受容体 (BLT1, BLT2 の 2 種類) や、炎症・免疫関連疾患に関わることが想定されている CysLT 受容体 (CysLT1-R, CysLT2-R の 2 種類) が発見され (Nature, 1997, 1999), 現在、本グループが遺伝子改変マウスを作成中である。

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高齢者肺疾患発症機序における意義を明らかにし、治療薬の開発および実用化を目指す。

## 3. 転写コアクチベーター TAZ

転写コアクチベーター TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) は、14-3-3 protein をはじめとする、PDZ domain を持つ転写因子と

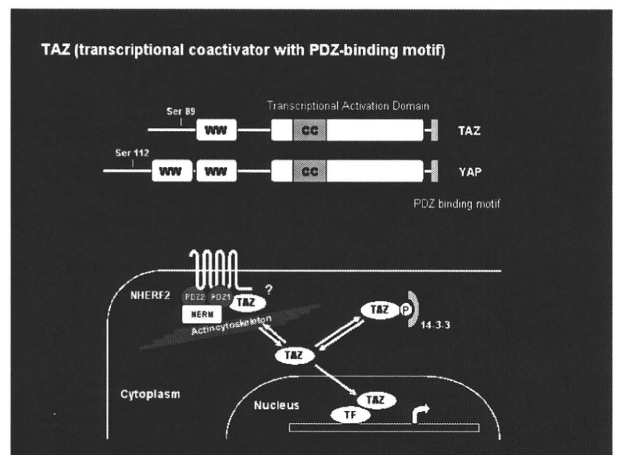


図 2. 転写コアクチベーター TAZ は、WW domain を有し、PPXY モチーフと結合して機能を発現する。

結合しその活性を制御する分子として同定・報告されたものである (*EMBO J*, 19: 6778-6791, 2000)。TAZ は, WW domain を有しており, PPXY モチーフと結合することにより, 転写コアクチベーターとしての機能を発現する。(図2)。

また最新の研究により, 転写コアクチベーター TAZ が, TTF-1 (thyroid transcription factor-1) や Pax3 と協調的に働くことにより, 発生に大きく関与することが明らかにされつつある (*J Biol Chem*, 279: 17384-17390, 2004), (*Biochem Biophys Res Commun*, 339: 533-539, 2006) (図3)。

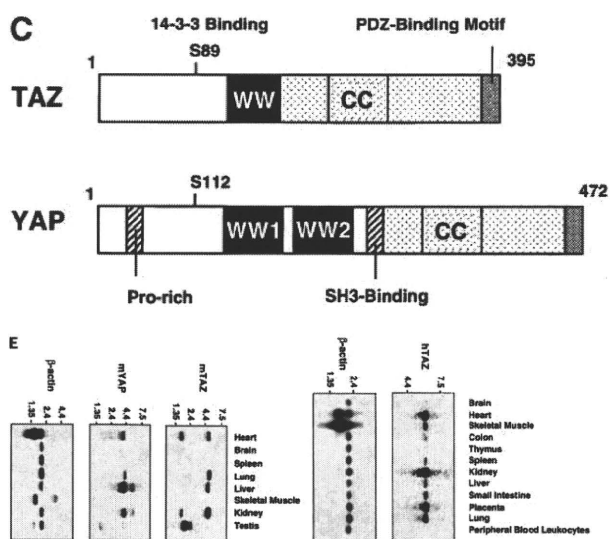


図3. 転写コアクチベーター TAZ は, Yes-associated protein (YAP) とホモロジーを有する。また, 肺にも強く発現している (*EMBO J*, 19: 6778-6791, 2000)。

また, 神経管, 神経堤, 骨格筋などの発生に重要な役割を持つ Pax3 と協調的に働く因子を探す目的で, 酵母 Two hybrid 法により Pax3 に結合する分子をスクリーニングした結果, TAZ タンパクが同定されている。さらに *in vitro* アッセイの結果, Pax3-TAZ の結合には, Pax3 C末端側の PPXY モチーフおよび TAZ N末端側の WW domain が深く関わっていることが示された。TAZ の発現を *in situ* hybridization で調べると, 胎生10.5日マウス胚において神経管内側, 鰓丘の外胚葉性間葉, 体節で発現が見られており, TAZ は Pax3 などの転写因子と相互作用して形態形成

に関わっている可能性が考えられる。転写コアクチベーター TAZ は, 発見当初より, 腎臓および肺において強く発現していることが報告されている。本研究では, 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検討する。

## B. 研究方法

### 1. CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成

LTC<sub>4</sub> /D<sub>4</sub> /E<sub>4</sub> 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。

### 2. 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した。まず, TAZ ノックアウトマウスの作成を行い, 次にその解析に着手した (図4, 表1)。

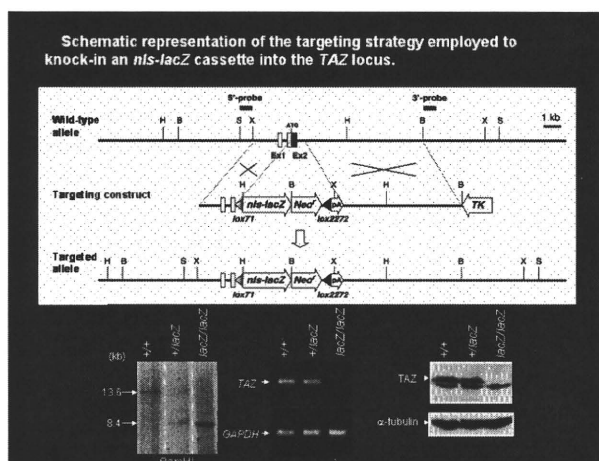


図4. TAZ ノックアウトマウスの作成

表 1

Gene	Primer Sequence		Size (bp)
	Forward (5'→3')	Reverse (3'→5')	
<i>GAPDH</i>	GGAGCCAGACCCCACTAACA	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	90
<i>TAZ</i>	TACAGTGTCCCACAACCTCC	CAGAGCAGACTCTACATCATTG	205
<i>TTF-1</i>	CCAGGACACCATGCGGAACA	GGCCATGTTCTTGCTCACGT	182
<i>SPA</i>	ACTCTACGAGATCAACATCAGATTCTG	AGTTGACTGACTGCCATTGGT	113
<i>SPB</i>	GCTGCTTCTACCCTCTGCT	CCAGGCTTTGGCACCAGAAT	95
<i>SPC</i>	CCACTGGCATCGTTGTGTATG	GTAGGTTCTCTGGAGCTGGCTTA	88
<i>SPD</i>	ATGGACGGGATGGGAGAGAA	TCTCTTTGGTCCAACCTGG	115
<i>CCSP</i>	AAGCCTCCACCTCTACCCTG	ATGTCGGAAGAGCTGAGCTG	86
<i>BMP4</i>	GAGCCAACACTGTGAGGAAT	TGCTGCTGAGGTTGAAAGAGG	102
<i>Fkl1</i>	AeCTGTCTGCTGTGTGTTCT	TCTGTGTGCTGAGCTTGGG	93
<i>PDGF-A</i>	AGTCAGATCCACAGCATCCG	CTCGGACACATGGTTAATGG	123
<i>PDGFR-α</i>	CCGGATGGTACACTTGTCTAC	CCTCTTCCACGATGACTAAG	144
<i>α1-AI</i>	TTTGCAAGTCAAGAGGAGGC	GTCTCAGGATCGAATGGCT	188
<i>MMP2</i>	CACCATCGCCCATCATCAAG	TCCTTGGGGCAGCCATAGAA	100
<i>MMP9</i>	GTGCTTCTCCCAAAAGACCT	GCTTCTCTCCCATCATCTGG	112
<i>MMP12</i>	GCTGCTCCCATGAATGACA	GCCCAAGTGTCTTCAAGCCCA	183
<i>MT1</i>	CTAAAGCTCACCACGACTTC	TCTTGCAAGAGGTGCACCTG	170
<i>MT2</i>	ATGGATCCTGCTCTGCGCT	GGAAAGCCTCTTTGCAAGATG	134
<i>Tm4Sfl</i>	ACCACCTCAAGCCGTTTCGTG	GCAAGCAACCACAGCAATCTCT	146
<i>Fbn5</i>	GCAAGTGCACAACGGCTTTG	CCGCCATTCTGGTTGACACA	120
<i>CTGF</i>	CTCTTCTGCGATTTCGGCTC	CITTTGAAAGGACTCACCCTG	117

また、RT-PCR には、以下の primer を用いた。  
(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。

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。

## C. 研究結果

### 1. CysLT<sub>2</sub> 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成

### Targeted Disruption of Mouse CysLT<sub>2</sub> Gene in C57BL/6 ES Cells

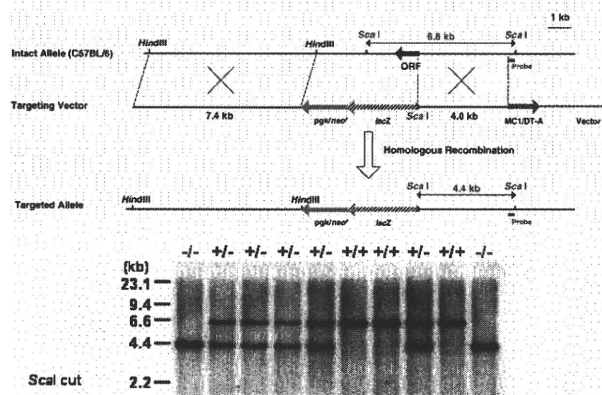


図 5. CysLT<sub>2</sub> 受容体ノックアウトマウスの作成

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（図 4）。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体 CysLT<sub>2</sub>-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ていない（図 5）。

### 2. 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 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た。

また呼吸生理学的にも、TAZ ノックアウトマウスでは、PV カーブにおいて典型的な「肺気腫」型の所見（PV カーブの上方移動、コンプライアンス増加）を認めた（図 6, 7）

次に、胎生期から成体までの、野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見を検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスの肺は、胎生期においては、ほぼ正常の発育であるが、生後 5 日以降には気腔の拡張が認められ、その後、

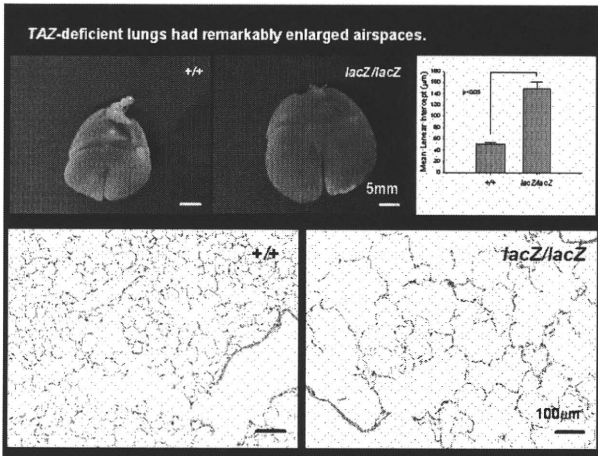


図 6. 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見

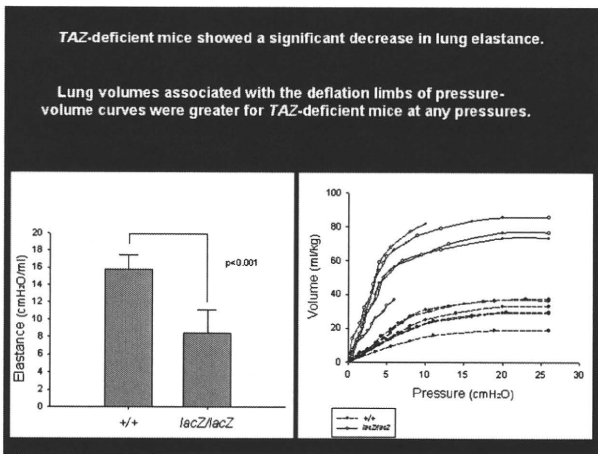


図 7. 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺生理学的解析

気腔の拡張が増大していた (図 8)。

### 3. TAZ ノックアウトマウス肺における遺伝子発現の解析

胎生期から成体までの、野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、肺の発達・成長に必須とされる TTF-1 の発現が、TAZ ノックアウトマウスにおいても野生型と変わらないことが示された。

一方、2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では、MMP 12 (macrophage elastase) が著明に発現していることが明らかになった (図 9)。

次に、胎生期の野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を microarray 解析を用いて検討した。その結果、

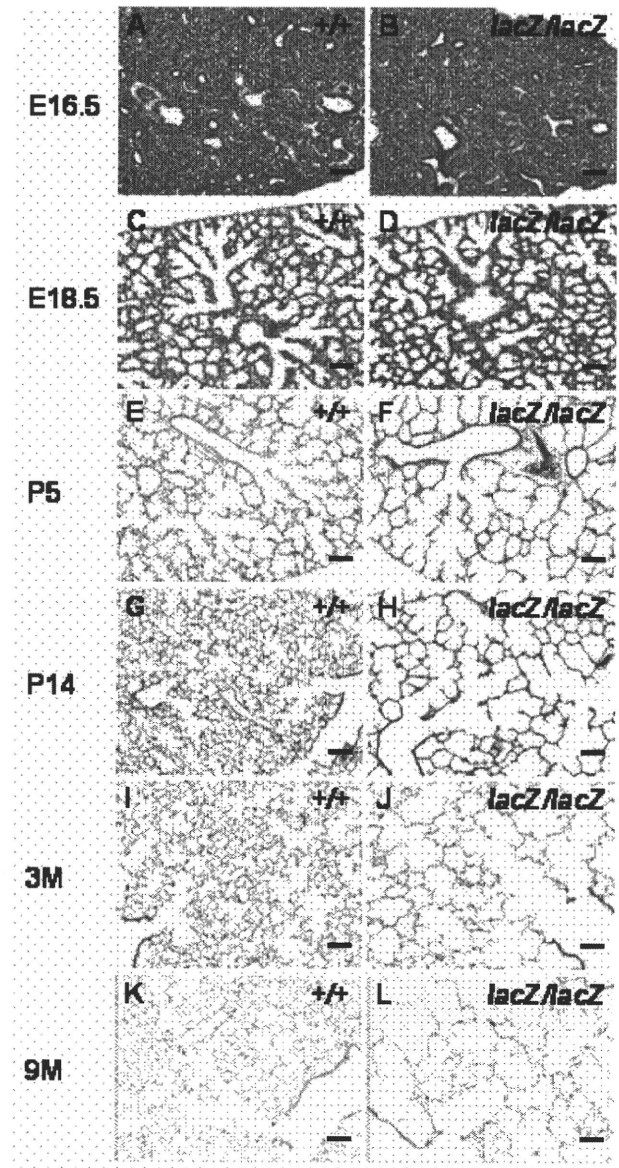


図 8. 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見 (胎生期から成体まで)

TAZ ノックアウトマウスにおいて発現低下が認められた遺伝子を 5 つ選び、さらに real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では、Fbln5 と CTGF の発現が有意に低下していることが明らかになった (図 10)。

### 4. TAZ siRNA を用いた検討：培養細胞における遺伝子発現の解析

次に、培養細胞 LA4 および TAZ siRNA (TAZ-994) を用いて、TAZ ノックアウト細胞における各種遺伝子発現を real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、TAZ ノックアウト細胞では、

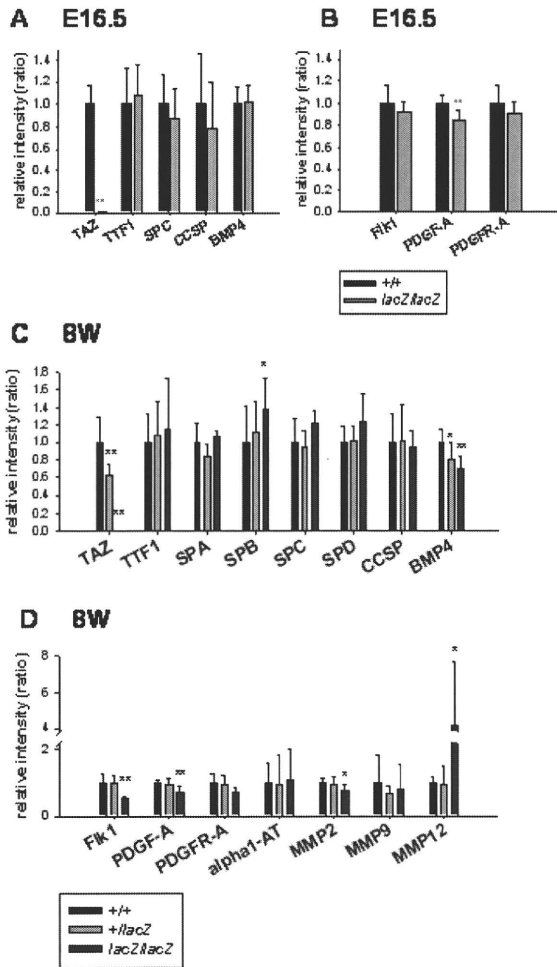


図9. 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現

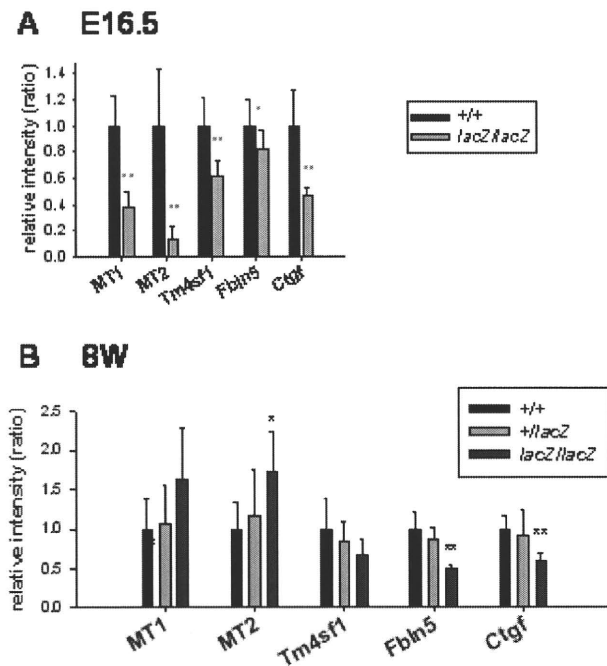


図10. 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現

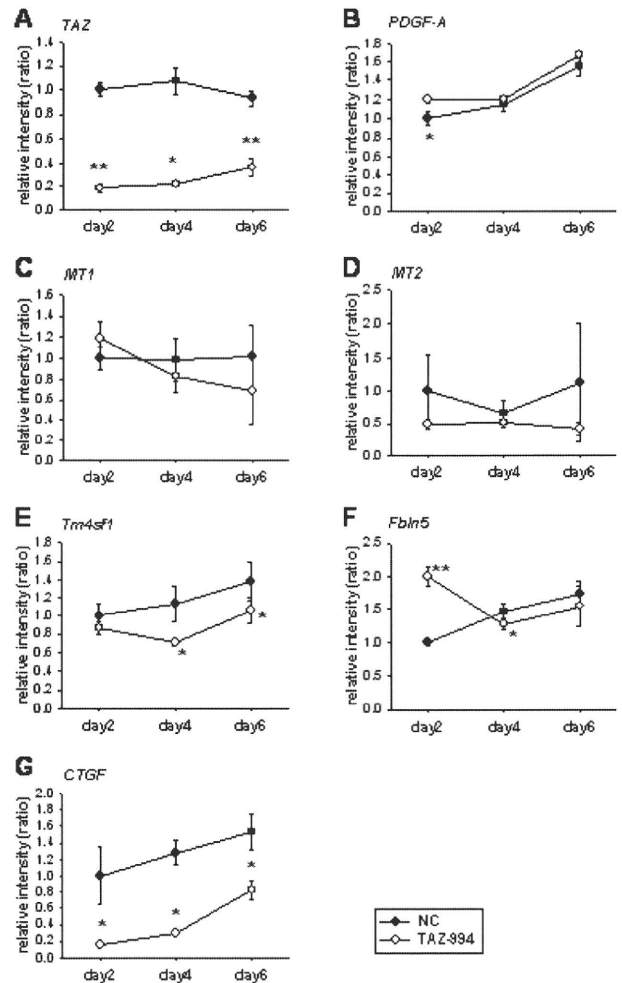


図11. TAZ siRNA (TAZ-994) による TAZ ノックアウト細胞における各種遺伝子発現

CTGF の発現が有意に低下していることが明らかになった。(図11)。

#### D. 考察

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、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。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T: Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem*, 337: 77-81, 2010
2. Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H, Kamitani

S, Desaki M, Takami K, Kawasaki S, Kato J, Nagase T: Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1. *Exp Lung Res*, 36: 12-24, 2010

3. Narumoto O, Horiguchi K, Horiguchi S, Moriwaki Y, Takano-Ohmuro H, Shoji S, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N: Down-regulation of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (slurp-1), an endogenous allosteric alpha7 nicotinic acetylcholine receptor modulator, in murine and human asthmatic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 398: 713-718, 2010
4. Ihara Y, Kihara Y, Hamano F, Yanagida K, Morishita Y, Kunita A, Yamori T, Fukayama M, Aburatani H, Shimizu T, Ishii S: The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 TDAG8 facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 17309-17314, 2010
5. Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano M R, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S: LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 2010 (in press)

## 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およびその製造方法



## COPD の発症機序に関する研究

研究分担者 永井厚志

東京女子医科大学第一内科学教授

### 研究要旨

近年増加しつつある慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の原因解明と対策は厚生労働行政や社会医学的に重要な課題である。COPD の発症には喫煙習慣による肺の慢性炎症とアポトーシス、細胞老化などの細胞異常が重要な役割を果たしているが、その機序は明らかではない。一方、喫煙は肺胞細胞に DNA 障害をもたらすが、COPD の発症機序との関係は不明である。私どもは、COPD における慢性的な肺の炎症、アポトーシス、細胞老化は肺胞細胞に生じた DNA 障害が原因ではないかとの仮説をたてて検討した。その結果、1) COPD 患者の肺組織では対照喫煙者や非喫煙者に比べて、肺胞壁細胞（I 型細胞、II 型細胞、血管内皮細胞）の DNA 障害が増加していること、2) DNA 障害が高度な肺組織ではアポトーシス、細胞老化、炎症の程度も高度であること、3) DNA 障害が高度な肺胞壁細胞ではアポトーシスと細胞老化が進行し、炎症性サイトカインの産生も高度であること、4) DNA 障害の原因には酸化ストレスが関与していることを見いだした。以上の結果から、慢性炎症、アポトーシス、老化の異常には共通して肺胞細胞の DNA 障害が関与していることが示された。COPD では DNA 障害が生じているために肺病変が慢性化し、禁煙後も病態が進行する原因になると考えられた。

### A. 研究目的

近年患者数が増加しつつある慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の発症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みても重要な課題である。COPD の発症には喫煙習慣による肺の慢性炎症とアポトーシスや細胞老化などの細胞異常が関与していることが知られているが、その機序は明らかではない。一方、喫煙は肺細胞に DNA 障害をもたらすが、COPD の発症機序との関連は不明である。私どもは、COPD における慢性的な肺の炎症、アポトーシス、細胞老化の原因には肺胞壁細胞の DNA 障害が関与しているのではないかとの仮説をたてて検討した。

### B. 研究方法

肺容量減少術時に採取された COPD 患者 (n = 14, 全員過去喫煙者) の肺組織および末梢性肺癌の切除時に採取された非喫煙者 (n = 10) および喫煙者 (n = 7) の残余肺組織から 3  $\mu$ m のパラフィン包埋切片を作製した。抗原賦活化のために 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 30 分オートクレーブ処理後、カゼイン溶液 (Dako Japan) と反応させて非特異的蛋白接着を阻害し、一次抗体と一晩、4 度で反応させた。用いた一次抗体は、ウサギ抗 phospho (Ser139)-histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) (clone 20E3, Cell Signaling Technology), マウス抗  $\gamma$ H2AX (Clone 3F2, Abcam), ウサギ抗 phospho (Ser25)-p53-binding protein 1 (phospho

53BP1) (Abcam), ウサギ抗 phospho (Ser/Thr)-ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)/ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase (ATR) substrate (Cell Signaling Technology), マウス抗 p16<sup>INK4a</sup> (p16) (clone 3F-12, Santa Cruz Biotechnology), ウサギ抗 cleaved (Asp175)-caspase-3 (active caspase-3) (Cell Signaling Technology), ウサギ抗 phospho (Ser536)-nuclear factor (NF)- $\kappa$ B (Abcam), マウス抗 IL-6 (clone R-49L, Santa Cruz Biotechnology), マウス抗 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) (clone N45.1, Japan Institute for the Control of Aging), ヤギ抗 surfactant protein-C (SP-C) (Santa Cruz Biotechnology), ヤギ抗 aquaporin-5 (AQP5) (Santa Cruz Biotechnology) およびマウス抗 CD31 (clone JC70A, Dako Japan) であった。一次抗体は, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 で蛍光ラベルした二次抗体 (Invitrogen) と反応させ, さらに必要に応じて 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma) による核染色を行った。蛍光免疫染色を施した肺切片は, 蛍光顕微鏡 (Olympus BX60) を用いて1,000倍率下で観察し, AQP5 陽性細胞 (I型肺胞上皮細胞), SP-C 陽性細胞 (II型肺胞上皮細胞), CD31 陽性細胞 (血管内皮細胞) 中の  $\gamma$ H2AX foci, リン酸化 53BP1 foci, リン酸化 ATM/ATR substrate foci の数 (double-strand DNA breaks, DNA 障害の指標), active caspase-3 陽性率 (アポトーシスの指標), p16 陽性率 (細胞老化の指標), リン酸化 NF $\kappa$ B 陽性率 (炎症活性化の指標), IL-6 陽性率, 8-OHdG 陽性率 (DNA 酸化ストレスの指標) を算定した。

3群間の差の検定にはクラスカル・ワリス検定を用い, スティール・ドゥワス検定による多群比較を行った。相関関係の解析にはスピアマンの順位相関係数の検定を行った。P値が0.05未満の時に統計学的に有意であるとみなした。

#### (倫理面での配慮)

本研究は臨床研究に関する倫理指針 (平成20年厚生労働省告示第415号) を遵守し, 東京女子医

科大学倫理委員会の承認 (承認番号1783) を得て行われた。

### C. 結果

対照喫煙者や対照非喫煙者と比べて COPD 患者の I 型肺胞上皮細胞, II 型肺胞上皮細胞, 血管内皮細胞では, DNA 障害 (double-strand DNA breaks) の指標である  $\gamma$ H2AX foci, リン酸化 53BP1 foci, リン酸化 ATM/ATR substrates foci の数が有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。対照喫煙者では対照非喫煙者に比べて  $\gamma$ H2AX, phospho-53BP1 foci, phospho-ATM/ATR substrates foci の数が増加する傾向にあったが有意差は認められなかった。また COPD 患者の肺組織では非喫煙者や喫煙者に比べて II 型細胞のアポトーシス (active caspase-3 陽性率), 細胞老化 (p16 陽性率), 炎症活性化 (リン酸化 NF $\kappa$ B 陽性率および IL-6 陽性率) の程度も増加していたが, これらの増加は II 型肺胞上皮細胞の DNA 障害の程度 ( $\gamma$ H2AX foci の平均数) との間に強い相関がみられた ( $r = 0.6 \sim 0.8$ )。

個々の II 型肺胞上皮細胞について検討すると,  $\gamma$ H2AX foci の数が多い細胞ほど active caspase-3, p16, リン酸化 NF $\kappa$ B および IL-6 の陽性率が増加していた。さらに 8-OHdG (酸化 DNA) 陽性の II 型肺胞上皮細胞では, 8-OHdG 陰性の II 型肺胞上皮細胞に比べて  $\gamma$ H2AX foci の数が有意に増加していた。

以上の結果から, COPD 患者の肺胞壁では酸化ストレスによる DNA 障害 (DNA double-strand breaks) が増加しており, DNA 障害の程度はアポトーシス, 細胞老化, 炎症と関連していることが示された。

### D. 考察

近年, DNA 障害の鋭敏な検出法として DNA double-strand breaks に反応してリン酸化した H2AX ( $\gamma$ H2AX), 53BP1, ATM/ATR 基質を蛍光免疫染色により可視化する方法が用いられるよう

になった。この方法を用いた本研究では、COPDの肺組織における慢性炎症、アポトーシス、細胞老化の程度が肺胞壁細胞のDNA障害( $\gamma$ H2AX fociの数)と強く相関していることが明らかにされた。炎症、アポトーシス、細胞老化とDNA障害の間の相関関係は、肺組織レベルだけではなく、個々の細胞レベルでも観察された。このようなDNA障害の原因には酸化ストレスの関与が考えられた。近年の研究から、DNA障害(double-strand breaks)はアポトーシスや細胞老化の原因となるだけではなく、NF $\kappa$ Bの活性化やIL-6などの炎症性サイトカインの産生を刺激することが知られている。したがって本研究の結果からは肺胞壁細胞のDNA障害がCOPDの病態を形成するアポトーシス、細胞老化、炎症の共通原因である可能性が示唆された。

タバコ煙の曝露はin vitroの細胞培養系でDNA障害を生じることが報告されている。しかし本研究においては、対照喫煙者の肺胞壁細胞のDNA障害は、非喫煙者よりも一部高度なものはあったが統計学的有意差は認められなかった。したがってCOPD患者における持続的なDNA障害には喫煙曝露量だけではなく、個体の喫煙感受性やDNA障害の修復能力なども関与していると考えられる。

従来のCOPDの発症機序についての考え方によれば、喫煙刺激により気道や肺組織が傷害されて炎症やアポトーシス、細胞老化が起きると説明されているが、なぜ禁煙してもCOPDの病態が進行し続けるのかについては不明である。しかしCOPDの本態を喫煙による気道や肺の反復性組織傷害ととらえるのではなく、DNA障害が修復されずに細胞に固定化された状態と理解するならば、禁煙後も続くCOPDの病態進行を説明することが可能と思われる。

## E. 結論

COPD患者の肺病変の原因としてDNA障害の関与が示された。DNA障害を生じた肺胞壁細胞

が肺組織に蓄積することが、COPDの病態が慢性的であり、喫煙後も病変が進行する一因ではないかと考えられた。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A: Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 80: 59-70, 2010
2. 青柴和徹: COPDにおける細胞老化. 第37回箱根呼吸討論会記録, 呼吸, 29: 76-88, 2010
3. 青柴和徹: 分子病態からみたCOPDの進行予防と治療への道. 分子呼吸器病, 14: 26-27, 2010

### 2. 学会発表

1. Aoshiba K: Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of COPD. Airway Vista 2010, 2010.4.17, Seoul, Korea
2. Aoshiba K: Lung senescence and COPD. 15th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2010.11.25, Manila, Philippine
3. Tsuji T, Houghton AM, Leme AS, Nagai A: High fat diet ameliorates cigarette smoke-induced weight loss. International Conference of American Thoracic Society, 2010.5, New Orleans
4. 周方, 青柴和徹, 鬼澤重光, 永井厚志: COPDにおける気道炎症と再生障害における老化の役割. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 2010.4.23, 東京
5. 辻隆夫, Houghton AM, Leme AS, Shapiro SD, 青柴和徹, 永井厚志: 高脂肪食は慢性喫煙曝露による体重および脂肪組織の減少を減弱する. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 2010.4.25, 東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

[1] タバコ抽出液によるラット肺気腫におけるカルボシステインの効果  
[2] COPD肺におけるHypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )-Vascular  
Endothelial Growth Factor (VEGF) シグナルの位置づけに関する検討  
[3] COPDとMPO遺伝子多型との関連

研究分担者 久保 恵 嗣  
信州大学医学部内科学第一講座教授

研究要旨

[1] タバコ抽出液 (cigarette smoke extract; CSE) によるラット肺気腫モデルにおけるカルボシステイン (CMC) の効果とその機序を検討した。オス SD ラットを、①コントロール群、②CSE 群、③ CSE + CMC (125 mg/kg/day) 群、④CSE + CMC (250 mg/kg/day) 群の4群 (各群とも n=6) に分けた。CSE は週 1 回腹腔内投与し、CMC は経食道的に連日投与した。3 週後に肺を摘出し、肺組織における mean linear intercept (MLI) および destructive index (DI) の計測、抗酸化力の測定、TUNEL 染色、matrix metalloproteinase (MMP)-2 および MMP-9 活性の測定を行った。CMC は CSE による肺気腫、すなわち肺胞気腔の拡大と破壊を有意に抑制した。さらに、CMC 投与群では CSE 群と比較し、肺および血清中の抗酸化力が保持され、アポトーシスが減少し、MMP-2 および MMP-9 の活性化が抑制された。カルボシステインが CSE による肺気腫の発症を抑制する機序として、カルボシステインの抗酸化作用と、それに続くアポトーシスの抑制および MMP 活性の低下が関与する可能性が示唆された。

[2] COPD 患者肺における、HIF-1 $\alpha$  および VEGF 発現と各種因子との関係について検討した。26 症例の切除肺の内、7 例は正常 (no COPD 群)、GOLD 分類 stage I, II を mild COPD 群 (6 例)、stage III, IV を severe COPD 群 (13 例) とした。① severe COPD 群では HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白発現が低下していた。HIF-1 $\alpha$  蛋白発現は Histone deacetylase (HDAC) 2 発現と正の相関を認めた。② HIF-1 $\alpha$  蛋白と VEGF 遺伝子との間にも正の相関を認めた。③ HIF-1 $\alpha$  蛋白発現は %FEV<sub>1</sub> とも正の相関を認めたが、喫煙歴、年齢との間には相関がなかった。④ no COPD 群と比較して、severe COPD 群で HIF-1 $\alpha$  免疫染色陽性細胞数の有意な低下が認められた。severe COPD において HIF-1 $\alpha$  が低下していたことは、既報である VEGF 低下の主原因であると思われる、COPD における肺組織構造維持の破綻に重要な影響を及ぼしている要素の一つであると考えられた。

[3] 酸化ストレス下においてスレオニンから内因性にアクロレインを産生する酵素である myeloperoxidase (MPO) の遺伝子多型と COPD の関連について検討した。COPD 群260例とコントロール群130例の血液サンプルより DNA を抽出し、MPO 遺伝子の 4ヶ所の単塩基多型について TaqMan プローブとリアルタイム PCR システムを用いて、遺伝子型のタイピングを行い、その遺伝子頻度を比較した。そのうち COPD 群165例とコントロール群76例の血漿中の MPO 濃度を ELISA 法にて測定し、両群間で比較した。さらに、血漿中 MPO 濃度、COPD の重症度と MPO 遺伝子多型との関連を COPD 群で検討した。COPD 群、コントロール群で MPO の血漿中濃度、遺伝子多型の頻度に有意差を認めなかった。また、血漿中 MPO 濃度、COPD の重症度と MPO 遺伝子多型との間に関連を認めなかった。