

- knock-out mice. Seoul in Korea, 2009 Nov 17, APSR meeting
4. 久能木真喜子, 瀬山邦明, 熊坂利夫, 他: GnRH 療法の呼吸機能および血清 VEGF-D 値に対する影響. 第48回日本呼吸器学会総会, 平成20年6月, 神戸
  5. 後藤直人, 瀬山邦明, 吉本啓助, 他: リンパ脈管筋腫症の診断後に妊娠・出産を試みた5症例の臨床的検討. 第12回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会総会, 平成20年9月6日(土), 東京
  6. 飛野和則, 瀬山邦明, 栗原正利, 他: 胸部CT画像の定量的解析を用いた Birt-Hogg-Dubé 症候群とリンパ脈管筋腫症の比較とその鑑別診断. 第12回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会総会, 平成20年9月6日(土), 東京
  7. 小池建吾, 瀬山邦明, 袁益明, 他: SMP30ノックアウトマウスにおけるビタミンCがマウス肺の老化に及ぼす影響. 第48回日本呼吸器学会総会, 平成20年6月, 神戸
  8. 小池建吾, 瀬山邦明, 袁益明, 他: 抗酸化剤摂取は SAMP1 の老化を抑制するか? 第23回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 2008年7月18日(金), 京都大学百年記念館
  9. 石神昭人, 瀬山邦明, 小池建吾, 他: SMP30ノックアウトマウスにおけるビタミンCが肺の老化に及ぼす影響 喫煙科学財団研究発表会. 平成20年7月23日, 東京
  10. 瀬山邦明: Lymphangiomyomatosis (LAM) に関する最近の知見. 第101回 ACCP 日本部会定期教育講演会 仙台. 平成21年10月31日
  11. 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摂取による COPD 発症リスク軽減効果の検討. 第49回日本呼吸器疾患学会総会, 平成21年6月, 東京
  12. 久能木真喜子, 秋吉妙子, 瀬山邦明, 他: 嚢胞性肺疾患 Birt-Hogg-Dubé (BHD) における遺伝子解析. 第49回日本呼吸器疾患学会総会, 平成21年6月, 東京
  13. 飛野和則, 瀬山邦明, 栗原正利, 他: Birt-Hogg-Dubé 症候群における嚢胞性変化と呼吸機能の検討. 第13回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会総会. 平成21年9月11・12日, 大阪
  14. 久能木真喜子, 瀬山邦明, 吉川美加, 他: 新たな嚢胞性肺疾患の病因解明を目指して. 第13回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会総会. 平成21年9月11・12日, 大阪
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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日・18日, 大宮
  19. 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日・18日, 大宮
- 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

## 睡眠時無呼吸症候群と代謝機能異常に関する研究

研究分担者 赤 柴 恒 人

日本大学医学部睡眠学・呼吸器内科分野教授

### 研究要旨

睡眠時無呼吸症候群と耐糖能異常を含めた代謝機能異常との関連を検討した。416例の SAS 患者中、Metabolic syndrome (MS) は53.9%と高率に認められた。非肥満 SAS 例においても39.8%に MS を認めた。非肥満 SAS 10例の腹部 CT をとり内臓脂肪面積 (VFA) と SAS の重症度との関連を検討すると、AHI は VFA と有意に相関し、SAS は肥満とは独立して MS の発症に関与する可能性が示唆された。この非肥満 SAS 例に1～3ヶ月 nasal CPAP 治療を行い変化をみたが、内臓脂肪面積に変化は見られなかった。

#### A. 研究目的

睡眠時無呼吸症候群と耐糖能を含めた代謝機能異常との関連を検討するために、比較的多数例の SAS 患者を対象に Metabolic syndrome (MS) の頻度を検討し、さらに非肥満についても MS の頻度、腹部 CT による内臓脂肪の測定を行った。さらに非肥満 SAS 例には nasal CPAP 治療後の変化を検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

睡眠検査で SAS と確定診断された416例を対象とした。1年目は、MS の頻度を算出し、さらに非肥満例における頻度も検討した。2年目は、非肥満 SAS 例を対象として腹部 CT をとり内臓脂肪面積を測定し SAS の重症度との関連を検討した。3年目は、nasal CPAP 治療を開始した30例について1～3ヶ月後に一般臨床検査、腹部 CT を再検査し短期間の治療効果を検討した。

#### 倫理面への配慮

被験者にはこの研究の意義を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た。

#### C. 研究結果

全症例中 MS の合併は416例中213例 (53.9%) に認められた。MS の合併は重症になるほど高く、肥満度が強くなる程高かった。BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> の非肥満例は101例であったが、このうち40例 (39.6%) MS の合併が認められた。

非肥満例に対する腹部 CT の結果では、VFA の平均は 126.6 cm<sup>2</sup> で、無呼吸低呼吸指数 (AHI) と arousal index と有意な相関が認められたが、低酸素の指標とは相関が認められなかった。

30例に対し nasal CPAP 治療を1～3ヶ月間行い、MS の構成成分および腹部 CT の再検査を行い変化を検討したが、臨床検査値、VFA のいずれもが有意な変化を示さなかった。また、非肥満の10例についても検討したが有意な変化は認められなかった。

#### D. 考察

MS は、肥満に伴うインスリン抵抗性を基盤とする病態であり、近年動脈硬化性疾患の危険因子として大きな注目を集めている。SAS 患者には

肥満の合併が多いため当然 MS の合併率は高いと考えられる。この検討において、53.9%と高率に MS の合併が認められた。一般人口における頻度(23.4%)に比較すると2倍以上の高頻度である。しかし、本研究で示したように非肥満例においても40%に近い合併率が認められたことは注目に値する。近年、SAS が肥満とは独立してインスリン抵抗性の発症に関与する可能性が報告されているが、我々の成績もこれらと一致するものである。

内臓脂肪の蓄積は、インスリン抵抗性を基盤とした MS の発症に大きな役割を果たすと考えられるが、本研究で示したように、非肥満例においても  $100 \text{ cm}^2$  を越える内臓脂肪面積の増大が認められた。さらに、この VFA は SAS の重症度である AHI と有意な相関が認められた。従って、SAS そのものが肥満度と独立して内臓脂肪の蓄積に関与する可能性が示唆された。しかし、低酸素状態の指標とは関連を認めなかった。これまでの報告では、インスリン抵抗性や糖尿病の発症には SAS 患者にみられる睡眠時の間欠的低酸素が重要な役割を果たすと考えられており今後さらなる検討が必要であろう。

Nasal CPAP は SAS 治療の gold standard であり、SAS を完全に防止することができる。短期間の CPAP 治療の影響を検討したが、一般臨床検査値、VFA とも全く有意な変化が認められず、1～3ヶ月程度では不十分であった可能性がある。今後は6～12ヶ月の治療効果についても検討していく必要があると考えられる。

## E. 結論

SAS 患者における MS の合併率は53.9%と一般人口の合併率(23.4%)より高率であった。また、非肥満患者においても39.6%と高率に認められた。非肥満 SAS 患者の内臓脂肪面積(VFA)は、平均で $100 \text{ cm}^2$ 以上であり非肥満者といえども内臓脂肪の蓄積が顕著であった。さらには SAS の重症度と VFA は有意に相関し、SAS 自体

が肥満とは独立して内臓脂肪蓄積に関連する可能性が示唆された。しかし、短期間の治療では、これらに有意な変化は認められなかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 赤柴恒人：CPAP 治療における治療圧の決定方法. *Clinical Engineering*, 19: 1153-1157, 2008
2. 赤柴恒人：ポリソムノグラフィー. 簡易検査と精密検査. 呼吸器疾患マニュアル. 日本医師会雑誌, 137: S135-S137, 2008
3. 赤柴恒人：睡眠と呼吸のかかわり. 呼吸, 27: 753-754, 2008
4. 赤柴恒人：睡眠時無呼吸症候群の検査と診断のポイント—外来における診断の実際. *Medical Practice*, 25: 1151-1154, 2008
5. Akahoshi, T, Akashiba T, Kawahara S, Uematsu A, Nagaoka K, Kiyofuzi, K, Okamoto N, Hattori T, Takahashi N, Hashimoto S: Predicting optimal continuous positive airway pressure in Japanese patients with obstructive sleep apnea. *Respirology*, 14(1): 1-13, 2009
6. Takegami M, Hayashino Y, Chin K, Sokejima S, Kadotani H, Akashiba T, Kimura H, Ohi M, Fukuhara S: Simple four-variable screening tool for Identification of patients with sleep-disordered breathing. *Sleep*, 32: 939-48 2009
7. 赤柴恒人：[睡眠時呼吸障害と循環器疾患] 睡眠呼吸障害の病態とその診方. *Cardiac Practice*, 20(1): 21-25, 2009
8. 赤柴恒人：[睡眠時無呼吸症候群の臨床 up-to-date 2009 睡眠時無呼吸症候群のトータルマネジメント] 病態 肥満低換気症候群と睡眠時無呼吸症候群. *Modern Physician*, 29(8): 1135-1137, 2009

9. 赤柴恒人：[睡眠時無呼吸 最新の進歩と展望] 治療 CPAP 治療と治療アドヒランス (adherence) 向上の工夫. 最新医学, 64(1) : 42-49, 2009
  10. 赤柴恒人：[実地医家のための呼吸管理] 臨床場面別の呼吸管理 睡眠時無呼吸症候群. 診断と治療, 97(1) : 139-147, 2009
  11. 赤柴恒人：[呼吸器疾患診療ガイドラインのエッセンス] 睡眠時無呼吸症候群 診断と治療のためのガイドライン. 呼吸器科, 15(3) : 208-214, 2009
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 赤柴恒人：[睡眠時無呼吸症候群の最新の話題] 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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
  19. 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. Uematsu A, Akashiba T, et al : Obstructive sleep apnea syndrome, rather than obesity, is associated with metabolic abnormalities in Japanese patients. Asian-Pacific Society of Respiriology, Bangkok, 2008
    2. Umematsu A, Akahoshi T, Nagaoka K, Nomura N, Okamoto N, Akashiba T, Hashimoto S : Obstructive sleep apnea is associated with both metabolic abnormalities and visceral fat accumulation. Asia-Pacific Society of Respiriology, Soaul, 2009
    3. Akashiba T, Pathophysiology in upper airway during sleep. (Educational Workshop), World Congress of Sleep Apnea, Soaul, 2009
    4. 赤柴恒人：睡眠呼吸障害に対する治療が生活習慣病（特に心血管疾患）に及ぼす影響. 第34回日本睡眠学会, 大阪, 2009
    5. 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
    6. 岡本直樹, 清藤晃司, 赤星俊樹, 服部知洋, 植松昭仁, 永岡賢一, 伊藤孔明, 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
    7. 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
8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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
  19. 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] 喫煙による気道炎症と肺胞上皮再生に対するスタチンの影響  
[2] 可溶性 E-cadherin の COPD の病態への関与（基礎的，臨床的検討）  
[3] 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 石坂 彰 敏（平成20～21年度）

慶應義塾大学医学部呼吸器内科教授

研究分担者 浅野 浩一郎（平成21～22年度）

慶應義塾大学医学部呼吸器内科准教授

### 研究要旨

スタチンには血中脂質低下作用以外に、抗炎症・抗酸化・血管内皮機能改善など多彩な作用がある。本研究では COPD 患者および喫煙者に対するシンバスタチン投与により、気道被覆液中サイトカイン (IL-4, IL-6, IL-8 など)、増殖因子 (GM-CSF, VEGF など) 濃度の低下を認めた。一方、短期タバコ煙暴露マウスを用いた実験では、PCNA 染色によりスタチンは肺胞上皮細胞の増殖を促すことが示された。BALF 中 VEGF 濃度はスタチン投与により増加しており、肺胞上皮増殖への関与が示唆された。

上皮細胞間接着因子 E-cadherin は MMP により分解され可溶性 sE-cadherin が放出される。本研究ではタバコ抽出液による気道上皮細胞の刺激により MTT 活性の低下を認め、上清中に sE-cadherin が検出された。気道上皮のアポトーシスに伴い、sE-cadherin が放出されたと考えられた。さらに、COPD 患者気道被覆液において MMP-7 が増加し、可溶性 E-cadherin の放出に関与する可能性が示唆された。

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 遺伝子の点変異に加え、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 例の解析において、15 例、31.3%（家族性 3 例、特発性 12 例）で点変異が同定された。一方、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、欧米人患者での頻度（5～12%）と同等であった。

#### A. 研究目的

[1] 平成20年度：スタチンには血中脂質低下作用以外に、抗炎症・抗酸化・血管内皮機能改善など多彩な作用がある。近年、スタチン投与による動物モデルにおける肺気腫の改善や、疫学的検討で

の COPD 患者の肺機能の改善が報告されているが、その作用機序は十分には解明されていない。本研究では臨床検体を用い、気道被覆液中の各種サイトカイン、増殖因子濃度に対するスタチンの影響を検討した。

平成21～22年度：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可能性について検討した。

[2] 平成20年度：Cadherin は分子量 120~135 kDa の細胞間接着因子であり、 $Ca^{2+}$  依存性の細胞間接着を担い、形態形成・維持・創傷治癒・アポトーシスに関与する。Cadherin は superfamily を形成し、気道上皮には E-cadherin が存在する。その動態はたえず調整されており、転写レベルの制御、局在の変化、細胞内ドメインの結合による調節、細胞外ドメインの分解などの機序が知られている。E-cadherin は MMP-3, 7 等により分解され、可溶性 sE-cadherin が細胞外に放出される。これまでの検討により、血漿 sE-cadherin 濃度は COPD 患者で健常者に比べ高値であり、患者気道被覆液中では血漿の約20倍と高濃度であった。一方、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。本研究では気道上皮系 cell line をタバコ抽出液で刺激し、アポトーシスの誘導とその過程における E-cadherin の動態について検討した。

平成21年度：COPD 患者および対照患者の気道被覆液中 sE-cadherin ならびに MMP-7 濃度を測定し、病態への関与について検討した。また、ヒト由来気道上皮細胞からの CSE 刺激による sE-cadherin の遊離についても検討した。

[3] 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] 平成20年度：COPD 患者 5 名・喫煙者11名に3ヶ月間シンバスタチン 20 mg を投与した。投与前後でマイクロサンプリングプローブを用いて気道上皮被覆液を採取し、Bioplex 法により18種類の炎症性サイトカイン・ケモカイン・増殖因子濃度を測定した。また、動脈血液ガス分析・肺機能検査を施行し、臨床的評価も行った。本研究プロトコールは川崎市立川崎病院倫理委員会において承認済みである。

平成21~22年度：8週齢の C57Bl/6 雌を用いて、喫煙チャンバー内で day1 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 cm H<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  $\mu$ g のシンバスタチン（SS 群）または vehicle（Veh 群）を day-1 から day 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。

[2] 平成20年度：はじめに BEAS2B 細胞を 0, 5 または10%のタバコ抽出液（CSE）で24時間刺激後、MTT アッセイを行った。次に、細胞を 0, 5, 10%抽出液で4, 10, または24時間刺激し、培養上清中の sE-cadherin を ELISA 法で測定した。

平成21年度：Control 症例（12名）と COPD 患者（14名）より気管支鏡下マイクロサンプリング

法により気道被覆液 (epithelial lining fluid: ELF) を採取した。ELF 中の sE-cadherin (R & D), MMP-7 (Boster) 濃度を ELISA 法で測定した。本研究プロトコルは慶應義塾大学医学部倫理委員会において承認済みである。また、細胞実験として Small airway epithelial cells (SAEC, Lonza) を 0, 2, 5, 10% CSE で 24 h 刺激し、培養上清中の sE-cadherin 濃度を測定した。

[3] 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。研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会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。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。

### C. 研究結果

[1] 平成20年度：シンバスタチン投与後、気道被覆液中 IL-4・IL-6・IL-8・IL-10・GM-CSF・IFN $\gamma$ ・IL-1 $\beta$ ・IL-7・IL-12 p 70・MCP-1・VEGF ( $P \leq 0.01$ ), GCSF ( $P \leq 0.05$ ) 濃度の低下を認めた。一秒量は改善傾向であった (約70 ml 増加・ $P = 0.14$ )。1名での皮疹以外に副作用を認めなかった。

平成21～22年度：タバコ煙暴露に対するマウスの耐用性は良好で、暴露によるマウスの死亡は約

10%であった。喫煙暴露により PCNA 陽性細胞は有意に増加し、本法によるタバコ煙暴露は気道・肺胞上皮に対する障害・再生を惹起するに十分な強度であり、スタチン効果を評価するモデルとなりうると考えた。タバコ煙暴露群での比較でシンバスタチン投与群において PCNA 陽性細胞はさらに56%増加した。非暴露群においてはスタチンによる有意な効果はみられなかった。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-1 $\beta$ , 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] 平成20年度：10%タバコ抽出液による BEAS2B 細胞の24時間刺激により、約30%の MTT 活性の低下を認めた。また、10%タバコ抽出液による10または24時間刺激後に、上清中の sE-cadherin が検出された。

平成21年度：COPD 群 (14名：平均年齢71歳, FEV<sub>1.0</sub>% = 58) では、Control 群 (12名：平均年齢66歳, FEV<sub>1.0</sub>% = 80) と比べ ELF 中 MMP-7 濃度は有意に高かった ( $p < 0.05$ )。また、MMP-7 濃度は %FEV<sub>1.0</sub> と相関傾向を認めた ( $r = 0.14$ )。一方、ELF 中の Soluble E-Cadherin と MMP-7 は強い相関を認めた ( $r = 0.75$ ,  $p < 0.0001$ )。SAEC は24時間の CSE 刺激により、濃度依存的に sE-cadherin を遊離した。また、SAEC は非刺激でも一定量の soluble form を放出していた。

[3] 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 44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%), 弧発例12例 (29%)] で認められた。うち5例が missense 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、8.6% (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] 平成20年度：今回測定したサイトカイン、ケモカイン、増殖因子は線毛細胞、杯細胞、クララ細胞、炎症細胞などから産生されたと考えられる。COPD 患者では、喫煙による histone deacetylase の機能低下などにより、多数の炎症性遺伝子発現が亢進するため、その治療には多数の因子を同時に抑制する必要があると考えられる。今回の結果は喫煙による広範な炎症の出現とスタチンによるその制御の可能性を明らかにしたものと考えられる。

平成21～22年度：本研究に用いた短期タバコ煙暴露モデルは COPD の最大の原因であるタバコ煙により惹起される肺障害の初期を検討するために有用な方法であり、短期に成果を得ることができる利点がある。過去の報告でも単回から2週間のタバコ煙暴露により ECM 分解、細胞老化など長期暴露による肺気腫モデルにおいてみられる生理・病理学的変化の一部が見られることが知られている。本研究により5.5日間のタバコ煙暴露によりマウス肺における PCNA 陽性細胞数は有意に増加していた。これはタバコ煙により傷害された気道・肺胞上皮細胞の turn over が亢進していることを示唆している。このスタチン効果は長期タバコ煙暴露により生じる上皮細胞再生不良を改善しうる可能性を示している。

スタチンが肺胞上皮再生作用を発現する機序の一つとして VEGF の産生亢進が考えられた。VEGF 産生細胞として肺胞マクロファージがあげられるが、スタチンによる BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 の増加がマクロファージ由来の VEGF 産生増加に関与した可能性がある。この結果は20年度の臨床研究におけるスタチンによる気道被覆液中サイ

トカインと VEGF 濃度低下とは反対の作用と考えられる。その原因としては、動物実験では肺胞領域、臨床研究では末梢気道における濃度を測定した点、COPD の種々の病期における各メディエーターの役割の違い、スタチンの濃度による2相性の生体反応、などが想定される。いずれにしてもスタチンの臨床効果を解明する上で重要な所見と考えられ、さらなる検討を要する。

現在、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 の影響について検討中である。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] 平成20年度：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。

平成21年度：本研究の結果、COPD 患者気道において、MMP-7 が増加し、E-cadherin の細胞外ドメインの放出に関与する可能性が示唆された。一方、ヒト由来気道上皮細胞のタバコ煙刺激により、培養上清中に sE-cadherin が放出されるのが観察された。この系における MMP-7 の関与については、今後検討を加える必要があるが、タバコ煙が直接 E-cadherin の細胞内動態に影響を与えた可能性に加え、上皮細胞からの MMP-7 産生を増加させた可能性が考えられる。

sE-cadherin は気道上皮細胞において 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 CSE との相互作用により、こうしたメカニズムが増強されるか否かも検証する予定である。詳細なメカニズムについては検討を要するが、本研究により、MMP-7 および E-Cadherin が COPD の病態と密接に関わって

いる可能性が示唆された。

[3] 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40%, 特発性 PAH で27%で検出され、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 に関する報告は少なく、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] 臨床研究の結果、スタチンは喫煙による気道の炎症を抑え、COPD の病態を改善する可能性が示唆された。一方、動物実験では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 の関与が考えられた。

[2] 細胞実験により、タバコ抽出液刺激による気道上皮細胞のアポトーシスへの移行に伴い、sE-cadherin が放出されたと考えられた。臨床研究では、気道で増加した MMP-7 および sE-Cadherin が COPD の病態に関与する可能性が示唆された。

[3] 日本人特発性・家族性 PAH 患者においても、BMPR2 遺伝子の遺伝子再構成をきたしている症例が存在していた。

## 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

1. Takahashi S, Nakamura H, Seki M, Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, Nakajima T, Tsujimura S, Shirahata T, Nakamura M, Minematsu N, Yamasaki M, Tateno H, Ishizaka A: Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294(5): L882-890, 2008
2. 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*, 13: 498-504, 2008
3. 中村美穂, 仲村秀俊, 石坂彰敏: [呼吸器疾患の臨床検査 up to date] 内視鏡 気管支鏡下マイクロサンプリング法. 日本胸部臨床, 67巻増刊: S166-S170, 2008.11
4. 仲村秀俊, 中村美穂, 渡辺真純, 石坂彰敏: マイクロサンプリング. 呼吸器科, 13(4): 366-372, 2008.4
5. Asano K, Nakade S, Shiomi T, Nakajima T, Suzuki Y, Fukunaga K, Oguma T, Sayama K, Fujita H, Tanigawara Y, Ishizaka A: Impact of pharmacokinetics and pharmacogenetics on the efficacy of pranlukast in Japanese asthmatics. *Respirology*, 14(6): 822-827, 2009
6. 原田尚子, 浅野浩一郎: COPD, 気管支喘息における吸入ステロイド薬の使用法の類似点・相違点. *COPD Frontier*, 8(1): 24-30, 2009
7. 浅野浩一郎: COPD と肥満: 体重減少だけが問題か. *LUNG-perspectives*, 17(1): 45-48, 2009

### 2. 学会発表

1. 白畑 亨, 仲村秀俊, 中村美穂, 辻村周子, 高橋左枝子, 中島隆裕, 舘野博喜, 石坂彰敏: COPD における Soluble E-/VE-Cadherin 測定の意味. 日本呼吸器学会総会, 神戸, 2008年6月
  2. 高橋左枝子, 仲村秀俊, 舘野博喜, 山本美由紀, 関 誠, 辻村周子, 中村美穂, 白畑亨, 中島隆裕, 石坂彰敏: Elastase 気道内投与マウスを用いた simvastatin による肺気腫改善機序の検討. 日本呼吸器学会総会, 神戸, 2008年6月
  3. 仲村秀俊, 中村美穂, 白畑 亨, 中島隆裕, 辻村周子, 高橋左枝子, 舘野博喜, 渡辺真純, 小林紘一, 石坂彰敏: 気道病変における内視鏡下での分子生物学的アプローチ—マイクロサンプリングによる気道被覆液中蛋白を用いた COPD の病態解析. 日本呼吸器内視鏡学会, 大阪, 2008年6月
  4. Toru Shirahata, Hidetoshi Nakamura, Yasuyuki Honda, Shuko Tsujimura, Miho Nakamura, Saeko Takahashi, Takahiro Nakajima, Hiroki Tateno, Akitoshi Ishizaka: Plasma Soluble E-cadherin and VE-cadherin levels in patients with COPD. International Conference of American Thoracic Society, 2008年5月, トロント
  5. 辻村周子, 高橋左枝子, 仲村秀俊, 白畑亨, 小熊 剛, 上石修史, 宮庄 拓, 峰松直人, 舘野博喜, 大曾根康夫, 秋月哲史, 石坂彰敏: シンバスタチンの気道炎症に対する効果. 日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2009年6月
  6. 吉田秀一, 中島隆裕, 仲村秀俊, 峰松直人, 白畑 亨, 続 敬之, 辻村周子, 中村美穂, 高橋左枝子, 舘野博喜, 石坂彰敏: COPD の診断と重症度判定における血漿中カテプシン S 濃度測定の意味. 日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2009年6月
  7. 小倉裕美, 浅野浩一郎, 宮田 純, 友松克允, 堀内奈緒, 樹神元博, 上田壮一郎, 滝原崇久, 加行淳子, 新美京子, 若木美佐, 福永興彦, 小熊 剛, 佐山宏一, 石坂彰敏: 在宅酸素療法中の慢性呼吸不全患者における骨粗鬆症予測マーカーの検討. 日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2009年6月
  8. 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 American Yhoracic Society, 2010年5月, ニューオリンズ
  9. 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, 舘野博喜, 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。

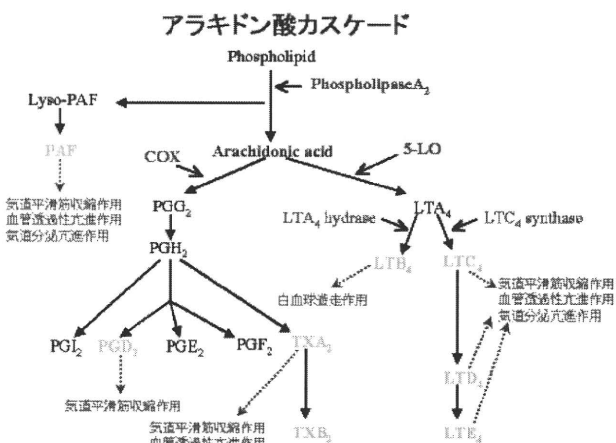


図 1. アラキドン酸カスケードの模式図

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

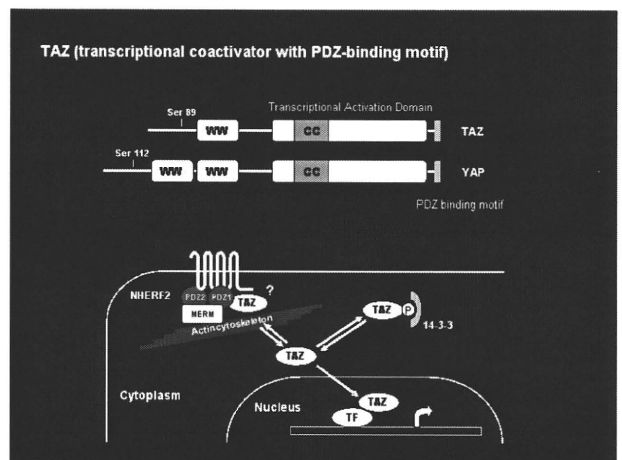


図 2. 転写コアクチベーター TAZ は、WW domain を有し、PPXY モチーフと結合して機能を発現する。

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)。

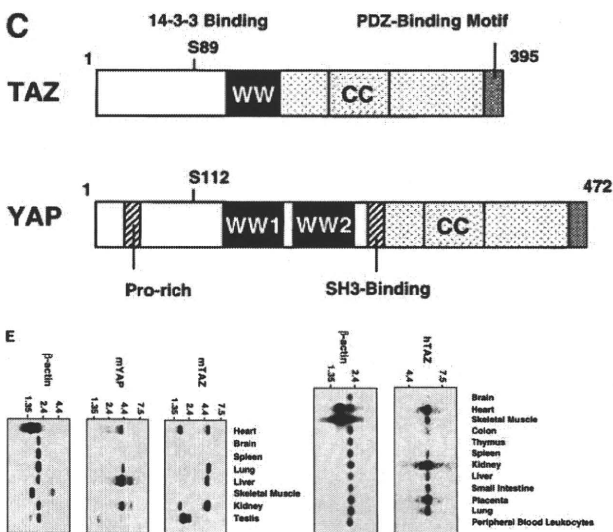


図3. 転写コアクチベーター TAZ は, Yes-associated protein (YAP) とホモロジーを有する。また, 肺にも強く発現している (*EMBO J*, 19 : 6778-6791, 2000)。

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)。

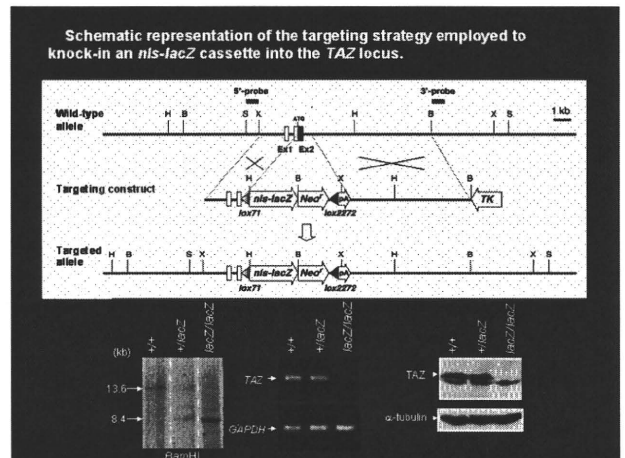


図4. TAZ ノックアウトマウスの作成

表 1

Gene	Primer Sequence		Size (bp)
	Forward (5'→3')	Reverse (3'→5')	
<i>GAPDH</i>	GGAGCCAGACCCCACTAACA	GCTTCTCCATGGTGGTGAA	90
<i>TAZ</i>	TACAAGTGTCCCAACTCC	CAGAGCAGACTCTACATCATTG	205
<i>TTF-1</i>	CCAGGACACCATGCGGAACA	GGCCATGTTCTTGCTCACGT	162
<i>SPA</i>	ACTCTACGAGATCAACATCAGATTCTG	AGTTGACTGACTGCCATTGGT	113
<i>SPB</i>	GCTGCTTCTCACCCTCTGCT	CCAGGCTTTGGCCACAGAAT	95
<i>SPC</i>	CCACTGGCATCGTTGTGTATG	GTAGGTTCTCTGGAGCTGGCTTA	68
<i>SPD</i>	ATGGACGGGATGGGAGAGAA	TCTCCTTTGGGTCCAACTGG	115
<i>CCSP</i>	AAAGCTCCCAACTCTACCATG	ATGTCCGAAAGCTGAGCTG	86
<i>BMP4</i>	GAGCCAACTGAGGAGT	TGCTGCTGAGGTTGAAAGAGG	102
<i>Flk1</i>	AGCTGTCTGCTGTGGTTCT	TTCTGTGTGCTGAGCTTGGG	93
<i>PDGF-A</i>	AGTCAGATCCACAGCATCCG	CTCGGGCACATGGTTAATGG	123
<i>PDGFR-α</i>	CCGGATGGTACACTTGGTAC	CCTCTCCACGATGACTAAG	144
<i>α1-AT</i>	TTTGCAGAGTCAGAGGAGGC	GTTCTCAGGATCGAATGGCT	168
<i>MMP2</i>	CACCATCGCCCATCATCAAG	TCCTTGGGGCAGCCATAGAA	100
<i>MMP9</i>	GTTGCTCTCCCAAAAGACCT	GCTTCTCTCCCATCATCTGG	112
<i>MMP12</i>	GCTGCTCCCATGAATGACAG	GCCCAAGTTGCTTCTAGCCCA	163
<i>MT1</i>	CTAAGCGTCAACACGACTTC	TCTTGCAGGAGGTGCACCTTG	170
<i>MT2</i>	ATGGATCCTGCTCTCGGCT	GGAAAGCCTCTTTGCAGATGC	134
<i>Tm4Sfl</i>	ACCACCTCAAGCCGTTTCGTG	GCAACAACACAGCAAGTCCT	146
<i>Fbhl5</i>	GCAGTGCACAACGCGCTTTG	CCGCCATTCTGTTGACACA	120
<i>CTGF</i>	CTCTTCTGCGATTTCGCTC	CTTTGGAAAGACTCACCCT	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

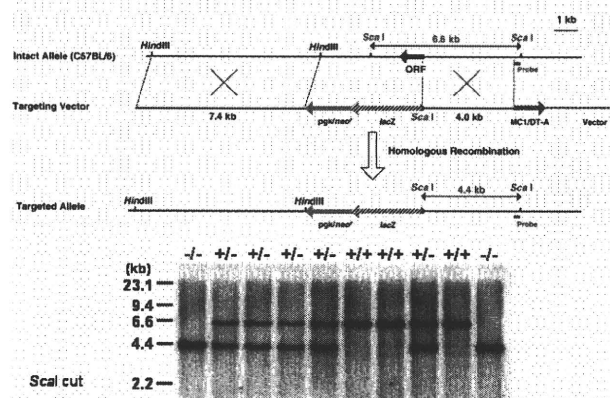


図 5. CysLT<sub>2</sub> 受容体ノックアウトマウスの作成

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、

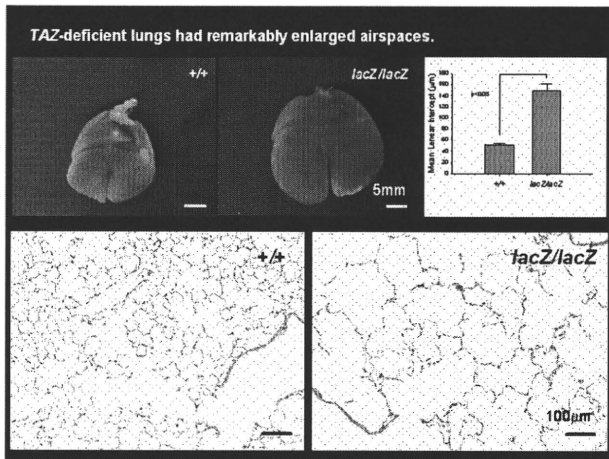


図 6. 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見

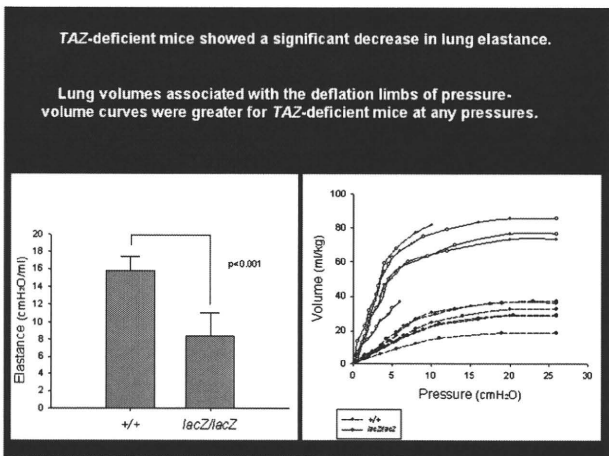


図 7. 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺生理学的解析

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、

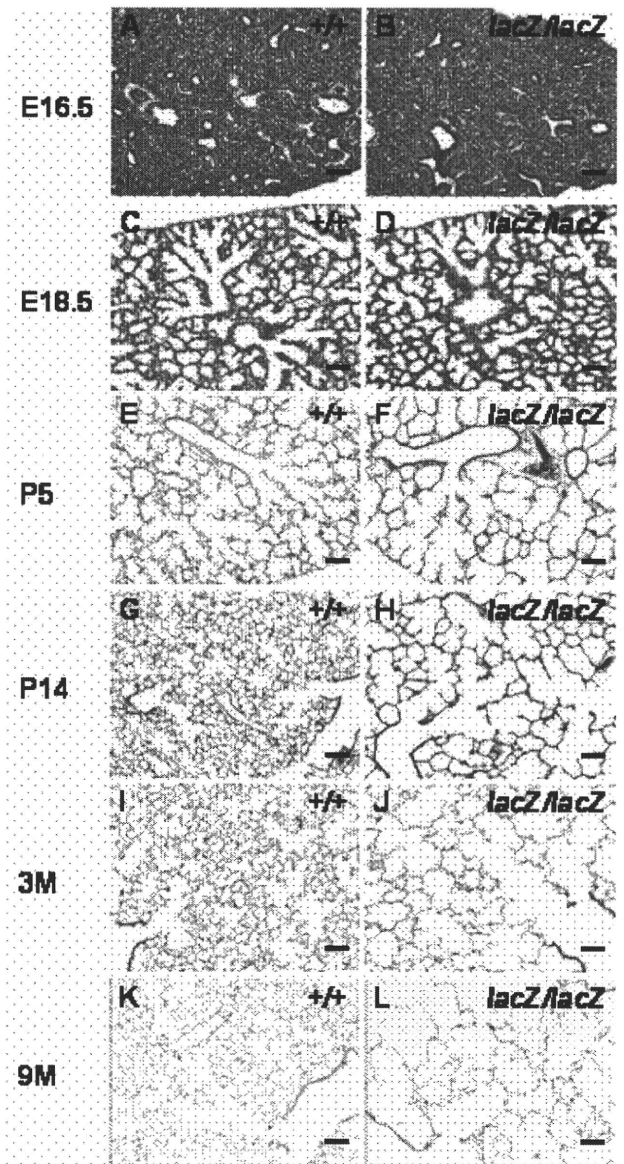


図 8. 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見 (胎生期から成体まで)

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、



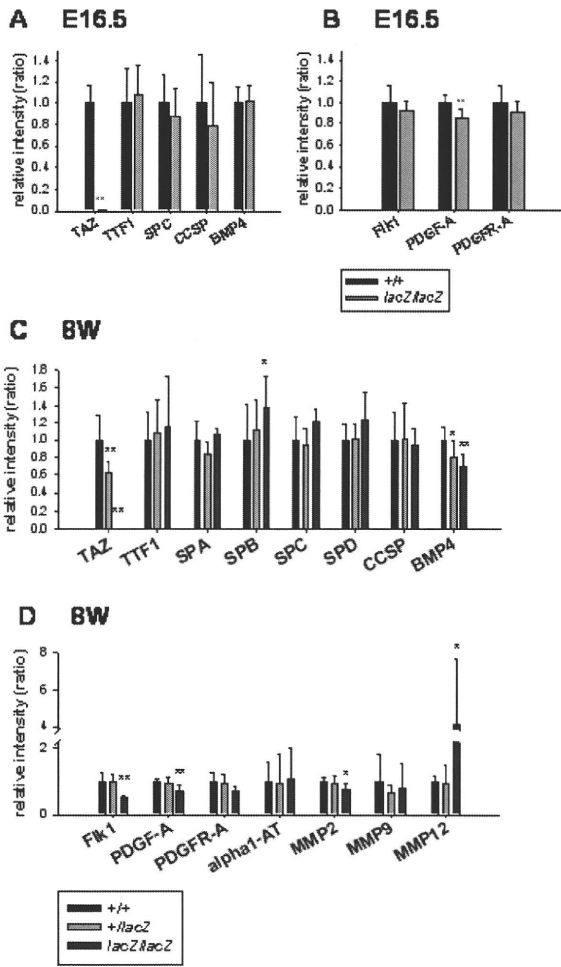


図9. 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現

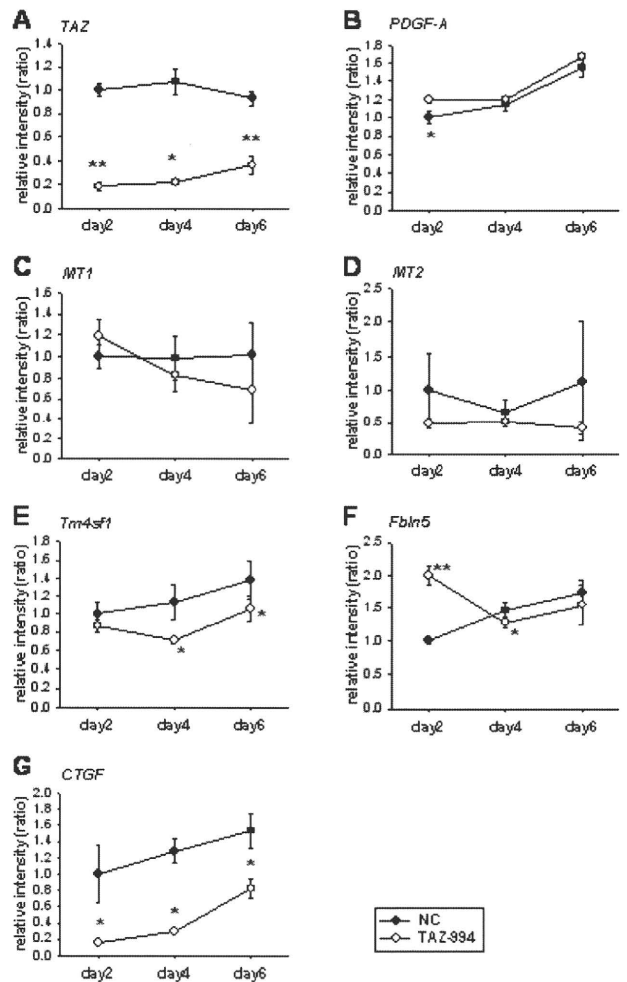


図11. TAZ siRNA (TAZ-994) による TAZ ノックアウト細胞における各種遺伝子発現

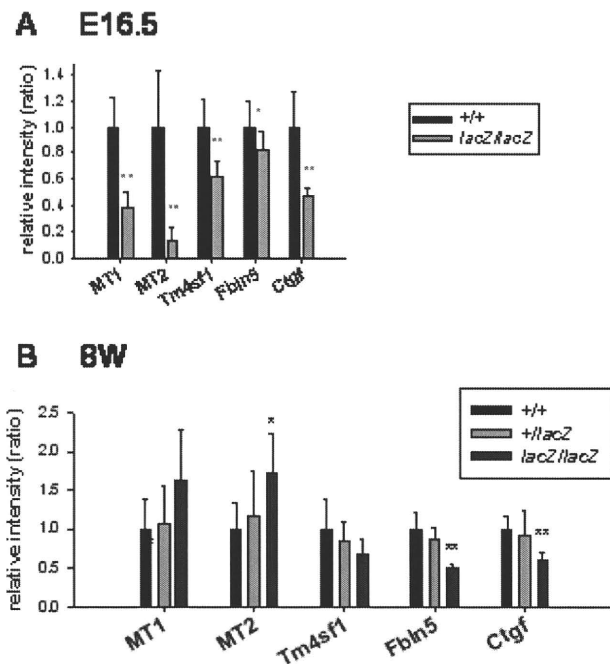


図10. 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現

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

- Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H: Renal tubular dysmorphogenesis leading to multicystic formation and lung emphysema in mice lacking TAZ. *Am J Physiol*, 294: F542-553, 2008
- Nakajima T, Jo T, Meguro K, Oonuma H, Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T: Effect of dexamethasone on voltage-gated Na<sup>+</sup> channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci*, 82: 1210-1215, 2008
- Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N: Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull*, 31: 1434-1438, 2008
- Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Kato J, Nagase T: Clarithromycin inhibits fibroblast migration. *Respir Med*, 12: 1769-1776, 2008
- Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, Aburatani H, Makita R, Kurihara H: Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 180: 326-338, 2009
- Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K: Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 69: 2783-2791, 2009
- Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Desaki M, Kawasaki S, Nagase T: Procatenol inhibits lung fibroblast migration. *Inflammation*, 32: 387-392, 2009
- Nakajima T, Kubota N, Tsutsumi T, Oguri A, Imuta H, Jo T, Oonuma H, Soma M, Meguro K, Takano H, Nagase T, Nagata T: Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol*, 156: 420-431, 2009
- Kikuchi K, Kohyama T, Yamauchi Y, Kato J, Takami K, Okazaki H, Desaki M, Nagase T, Rennard SI, Takizawa H: C-reactive protein

- modulates human lung fibroblast migration. *Exp Lung Res*, 35 : 48-58, 2009
10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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
2. 学会発表
    1. 慢性閉塞性肺疾患 : 第50回日本老年医学会総会 (発表者 : 長瀬隆英, 教育企画), 2008
    2. Respiratory research using genetically-engineered mice. The14th APSR Meeting, Seoul (発表者 : 長瀬隆英, 招待講演), 2009
- 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重要な課題である。本研究では、COPD の発症機序における気道・肺胞細胞の老化の役割およびその原因としての DNA 障害について検討した。その結果、1. 老化したⅡ型肺胞上皮細胞やクララ細胞では、NF- $\kappa$ B や p38-MAPK が恒常的に活性化し、IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , GM-CSF などの炎症性サイトカインを産生していること、2. クララ細胞が老化したマウスでは気道上皮の再生が抑制され、老化クララ細胞の p38-MAPK 活性化のために気道炎症が誘導されること、3. COPD 患者の肺組織ではⅡ型肺胞上皮細胞とクララ細胞が老化し、老化したⅡ型肺胞上皮細胞やクララ細胞では NF- $\kappa$ B や p38-MAPK のリン酸化が生じていること、4. さらに COPD 患者の肺組織では DNA 障害（DNA double-strand breaks）が増加し、その程度は炎症、アポトーシス、細胞老化の程度と強く相関していることが明らかにされた。以上の成績から、細胞老化が COPD 患者の気道や肺胞の修復を障害する原因になるとともに、慢性炎症の原因にもなること、さらに COPD の病態を形成する細胞老化、アポトーシス、慢性炎症はいずれも DNA 障害が原因である可能性が示された。

### A. 研究目的

近年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重要な課題である。私どもは、肺と気道の老化およびその原因としての DNA 障害が COPD の発症機序に果たす役割について検討した。

### B. 研究方法

培養細胞、動物、ヒト肺組織を用いた研究を行った。動物実験については東京女子医科大学実験動物倫理委員会の承認（承認番号09-45）を得た。ヒト肺組織を用いた研究は、臨床研究に関する倫理指針（平成20年度厚生労働省告示第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。

#### 1. 細胞実験

ヒト肺胞Ⅱ型上皮様（A549）細胞およびヒトクララ細胞様（NCI-H441）細胞を10%血清含有DMEM培地またはRPMI1640中で増殖させ、テロメラゼ阻害薬（2,6-bis(3-(N-pipendino)propionamido)anthracene-9,10-dione, 1 $\mu$ m, Calbiochem社）または5-bromo-2'-deoxyuridine（BrdU, 25 $\mu$ M）を添加して10日間～3週間培養し、細胞老化を誘導した。その後上清を回収し、ELISA法により炎症性サイトカイン濃度を測定した。細胞成分については senescence-associated（SA）- $\beta$ -galactosidase 染色を行うとともに、細胞核の抽出液中の NF- $\kappa$ B 活性を TransAM NF- $\kappa$ B