

p65 キット (Active Motif 社) を用いて測定した。

2. 動物実験

クララ細胞の老化を *in vivo* で誘導するために、雄 C57/BL6 マウスに3週間連続して、週1回クララ細胞を傷害するナフタレン (200 mg/kg) を腹腔内注射した翌日から3日間 BrdU (200 mg/kg) を腹腔内投与した。BrdU の最終投与から1週間後 (実験開始から4週間後) に肺を摘出した。凍結およびパラフィン固定の肺組織切片を製作して SA β -galactosidase 活性および免疫組織染色 [ヤギ抗 Clara cell 10 kDa secretory protein (CC10), ラット抗 CD45, ラット抗 CD90.2, ウサギ抗 phospho-p38-mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) 抗体] を行い、末梢気道のクララ細胞の老化と気道炎症の関係について検討した。一部のマウスについては BrdU を投与する直前に毎回 p38-MAPK 阻害薬 (SB202190) を腹腔内に注射した。

3. ヒト肺組織を用いた研究

肺容量減量術または肺癌切除術の際に得られた残余肺組織のパラフィン切片 (COPD 患者14名, 対照喫煙者7名, 対照非喫煙患者10名) を用いて蛍光免疫染色を行った。用いた一次抗体は、ウサギ抗 phospho (Ser139)-histone H2AX (γ H2AX) (Cell Signaling Technology) マウス抗 γ H2AX (Abcam), ウサギ抗 phospho (Ser25)-p53-binding protein 1 (phospho53BP1) (Abcam), ウサギ抗 phospho (Ser/Thr)-ataxia teleangiectasia mutated kinase (ATM)/ataxia teleangiectasia and Rad3-related kinase (ATR) substrate (Cell Signaling Technology), マウス抗 p16^{INK4a} (p16) (Santa Cruz Biotechnology), ウサギ抗 p21^{WAF1/CIP1} (p21) (Abcam), ウサギ抗 cleaved (Asp175)-caspase-3 (active caspase-3) (Cell Signaling Technology), ウサギ抗 phospho (Ser536)-nuclear factor (NF)- κ B (Abcam), ウサギ抗 phospho (Thr180/Tyr182)-p38-mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) (Cell Signaling Technology), マウス抗 IL-6 (Santa Cruz Biotechnology), マウス抗 8-hydroxy-2-

deoxyguanosine (8-OHdG) (Japan Institute for the Control of Aging), ヤギ抗 surfactant protein-C (SP-C) (Santa Cruz Biotechnology), ヤギ抗 CC10 (Santa Cruz Biotechnology), ヤギ抗 aquaporin-5 (AQP5) (Santa Cruz Biotechnology), マウス抗 CD31 (clone JC70A, Dako Japan), ラット抗 CD45 (BD Pharmingen), ラット抗 CD90.2 (BD Pharmingen) 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。

C. 結果

1. 細胞実験

テロメラーゼ阻害薬または BrdU を添加培養した A549 細胞および NCI-H441 細胞では, 細胞増殖率 (population doubling) が低下し, SA- β -galactosidase の高度発現がみられ, 細胞老化が誘導された。ELISA 法で培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を測定したところ, 老化細胞では非老化細胞に比べて IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF の産生量が有意に増加していた。同時に老化細胞では NF κ B の活性化と p38-MAPK のリン酸化も観察された。

2. 動物実験

ナフタレンと BrdU を3週間反復して腹腔内に注射したマウスでは, ナフタレンのみを腹腔内注射したマウスに比べて, 末梢気道のクララ細胞が老化し (SA- β -galactosidase 陽性), クララ細胞 (CC10 陽性細胞) の再生が抑制されていた。さらにクララ細胞が老化した気道周囲には白血球 (CD45 陽性細胞) や T リンパ球 (CD90.2 陽性細胞) の浸潤が観察された。またナフタレンと BrdU を腹腔内注射したマウスではクララ細胞の p38-MAPK のリン酸化が観察された。そこで p38-MAPK 阻害薬を腹腔内注射したところ, クララ細胞の再生は改善しなかったが, ナフタレンと BrdU の腹腔内注射により誘導された白血球の

浸潤が抑制されていた。

3. ヒト肺組織を用いた研究

ヒト肺組織の蛍光免疫染色では、COPD 患者では対照喫煙者と対照非喫煙者に比べて SP-C 陽性の II 型肺胞上皮細胞における p16 発現率、リン酸化 NF- κ B 発現率、p16 と NF- κ B の共発現率が有意に増加していた。同様に対照喫煙者では、対照非喫煙者に比べて SP-C 陽性の II 型肺胞上皮細胞における p16 発現率、リン酸化 NF- κ B 発現率、p16 とリン酸化 NF- κ B の共発現率が増加していた。II 型肺胞上皮細胞における p16 発現率と NF- κ B 発現率の間には正の相関関係がみられた ($r=0.89$)。さらに p16 と SP-C 共陽性の老化 II 型細胞では、p16 陰性、SP-C 陽性の非老化 II 型細胞に比べてリン酸化 NF- κ B の発現率が有意に増加していた。

さらにヒト気道組織の蛍光免疫染色では、COPD 患者では対照喫煙者と対照非喫煙者に比べて CC10 陽性のクララ細胞における p16 発現率、リン酸化 p38-MAPK 発現率、p16 とリン酸化 p38-MAPK の共発現率が有意に増加していた。さらに p16 と CC10 共陽性の老化クララ細胞では、p16 陰性、CC10 陽性の非老化クララ細胞に比べてリン酸化 p38-MAPK の発現率が有意に増加していた。

次いでヒト肺組織における DNA 障害について検討した。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 γ H2AX (リン酸化 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。対照喫煙者では対照非喫煙者に比べて γ H2AX foci, リン酸化 53BP1 foci, リン酸化 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)、細胞老化 (p16 陽性)、炎症活性化 (リン酸化 NF- κ B

陽性および IL-6 陽性) 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 γ H2AX foci の平均数) との間に強い相関が認められた ($r=0.6\sim 0.8$)。

個々の II 型肺胞上皮細胞について検討すると、 γ H2AX foci の数が多い細胞ほど active caspase-3, p16, リン酸化 NF- κ 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 γ 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

本研究では、1. 老化した II 型肺胞上皮細胞やクララ細胞では、NF- κ B や p38-MAPK が恒常的に活性化し、IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF などの炎症性サイトカインの産生が増加していること；2. ナフタレンと BrdU を反復投与してクララ細胞を老化させ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 の活性化のために気道炎症が誘導されること；3. COPD 患者では肺胞壁の II 型肺胞上皮細胞と末梢気道上皮の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- κ B や p38-MAPK のリン酸化が生じていることが明らかにされた。以上の成績から、COPD では老化した肺胞細胞やクララ細胞が気道や肺の組織修復を阻害するとともに、慢性炎症の原因となることが示された。さらに 4. COPD 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関連していた。

従来より細胞の老化は細胞周期の停止により細胞増殖能力を消失させることから、組織修復の障害要因として COPD や動脈硬化などの高齢者疾

患の病態形成に関与すると考えられてきた。私どもの研究成績からは、老化した肺胞上皮細胞やクララ細胞が肺胞や気道の組織修復を障害するだけでなく、COPDの中心的病態である肺や気道の慢性炎症の原因となることが示された。老化した肺胞上皮細胞やクララ細胞から産生されたTNF α などの炎症性サイトカインはオートクリン的に自己細胞を刺激することから、老化細胞の周囲組織で炎症が持続・遷延する悪循環の形成が考えられる。

さらにCOPDの肺組織における慢性炎症、アポトーシス、細胞老化の程度は、肺胞壁細胞のDNA障害(γ H2AX fociの数)と強く関連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。さらにこのような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なく、NF κ 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、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、炎症の共通した原因であることが示唆される。

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障害の原因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患者では細胞老化が気道や肺の修復不全や慢性炎症の原因となること、さらに細胞老化やアポトーシス、慢性炎症などのCOPDの病態形成の原因にはDNA障害が関与していることが示された。私どもの3年間の研究成績は、COPDの発症機序についての新しい知見を提供するとともに、なぜCOPDが高齢者に多いのか、なぜ禁煙後もCOPDが進行するのかという理由についても一定の説明を与えるものと考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 永井厚志, 青柴和徹: 慢性閉塞性肺疾患(COPD)診断と治療の進歩. 病因と病態, 病因論, 日内会誌, 97: 1177-1183, 2009
2. 青柴和徹: 肺の老化と気腫病変. 呼吸, 27: 143-147, 2008
3. 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
4. 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
5. Tsuji T, Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A: A systemically administered EP2 receptor agonist stimulates pulmonary angiogenesis in a murine model of emphysema. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 90: 85-88, 2009

6. Onizawa S, Aoshiha K, Nagai A. Platinum nanoparticle antioxidants inhibit pulmonary inflammation in mice exposed to cigarettes smoke. *Pulm Pharmacol Therapeutics*, 22: 340-349, 2009
 7. Aoshiha K, Onizawa S, Tsuji T, Nagai A: Therapeutic effects of erythropoietin in murine models of endotoxin shock. *Crit Care Med*, 37: 889-98, 2009
 8. Aoshiha K, Nagai A: An evolutionary perspective on COPD. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41: 507-508, 2009
 9. Aoshiha K, Nagai A: Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of COPD. *Proc Am Thorac Soc*, 6: 596-601, 2009
 10. Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A: Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in COPD patients. *Respiration*, 80: 59-70, 2010
2. 学会発表
1. Onizawa S, Aoshiha K, Nagai A: Clara cell senescence in patients with chronic obstructive pulmonary disease. International conference of American Thoracic Society May 2008, Toronto, Canada
 2. Aoshiha K: Senescence and relationship to COPD. IXth COPD Lund symposium, 2009.4. 22, Lund, Sweden
 3. 青柴和徹: COPD における細胞死と老化. COPD と間質性肺炎の共通点. 第49回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム, 2009.6. 13, 東京
 4. 周方, 青柴和徹, 鬼澤重光, 永井厚志: クララ細胞の老化による気道炎症の誘導. 第49回日本呼吸器学会総会, 2009.6, 東京
 5. Aoshiha K: Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of COPD. *Airway Vista*, 2010.4.17, Seoul, Korea
 6. Aoshiha K: Lung senescence and COPD. 15th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2010. 11. 25, Manila, Philippine
 7. 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
 8. 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
 9. 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] 肺線維症合併肺気腫の臨床的特徴について

[2] COPD 患者における血中アクロレイン濃度の検討

[3] 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

[4] COPD 肺における Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α)-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) シグナルの位置づけに関する検討

[5] 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] 最近肺線維症合併肺気腫症例の特徴について国内外でまとまった報告がなされてきているが、さらにその臨床的特徴を明らかにする必要がある。過去の文献に基づき胸部 CT にて肺気腫病変と肺線維症の所見が併存している56名を対象としレトロスペクティブに検討し、肺線維症の所見を伴わない COPD 患者82名と比較した。呼吸機能上、気流制限および肺過膨張が比較的軽度にかかわらず、ガス交換障害が顕著で、労作時低酸素血症が顕著であった。46.4%に肺癌を合併した。肺線維症の病理学的診断が得られた症例は8例あり特発性肺線維症3例、非特異性間質性肺炎4例、剥離性間質性肺炎1例であった。肺線維症合併肺気腫症例は COPD 患者とは異なった臨床的特徴を有しており、特に肺癌の合併については注意を払うべきと思われる。

[2] アクロレインはタバコ煙中に含まれる毒性が強いアルデヒドで、アクロレインの吸入もしくは、腹腔内投与した動物で肺気腫・慢性気管支炎がおこることから、COPD の原因物質の一つと考えられている。COPD 群 (n=126) と喫煙歴のある対照群 (n=64) の血漿中のアクロレイン濃度を ELISA 法にて測定し両群間で比較した。アクロレイン濃度は、COPD 群 (176.4 \pm 82.4 nmol/ml) の方が対照群 (143.1 \pm 56.0 nmol/ml) より有意に高値 (p=0.004) であった。さらに、禁煙群においても COPD 群 (n=67; 175.3 \pm 78.5 nmol/ml) の方が対照群 (n=25; 135.6 \pm 42.8 nmol/ml) より有意に高値 (p=0.003) であった。禁煙後も血中のアクロレインは COPD 群で高値であり、COPD 群で内因性にアクロレインが産生されており、禁煙後も進行する COPD の病態に関与している可能性が示唆された。

[3] 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、② CSE 群、③ CSE+CMC (125 mg/kg/day) 群、④ CSE+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。

[4] COPD 患者肺における, HIF-1 α 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 α , VEGF 蛋白発現が低下していた。HIF-1 α 蛋白発現は Histone deacetylase (HDAC) 2 発現と正の相関を認めた。② HIF-1 α 蛋白と VEGF 遺伝子との間にも正の相関を認めた。③ HIF-1 α 蛋白発現は %FEV₁ 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 α 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 α 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, 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。

[5] 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。

A. 研究目的

[1] 近年, 肺気腫症に合併する肺線維症の報告が散見される。高率に肺癌や肺高血圧症を合併するとも言われている。本研究では, 肺線維症合併肺気腫症例の臨床的特徴につき明らかにすることを目的とし, COPD との比較を試みた。

[2] アクロレインはタバコ煙中に含まれる毒性が強いアルデヒドで, アクロレインの吸入もしくは, 腹腔内投与した動物で (ラット, イヌ, サル) で肺気腫・慢性気管支炎の報告があることから, COPD の原因物質の一つと考えられている。アクロレインと COPD の関連を検討するため,

COPD 患者と喫煙歴のある対象者間で血中のアクロレイン値を比較した。

[3] カルボシステイン (carboxymethylcysteine; CMC) は喀痰調整薬として日常臨床で広く使用されているが, 近年その抗酸化作用に注目が集まっている。タバコ抽出液 (cigarette smoke extract; CSE) によるラット肺気腫に対する CMC の抑制効果と, その機序を検討した。

[4] COPD患者肺を用いて, 肺胞構成細胞とくに血管内皮細胞の maintenance factor である VEGF の上流因子である低酸素誘導因子 (以下 HIF-1 α) に着目し, この因子が重症 COPD 患者肺において低下しているのかどうか, また VEGF のみならず,

らず、既報の関連因子との関係、患者背景や呼吸機能などとの関係などについて調査した。

[5] 禁煙後においても COPD 症例の血中のアクロレイン濃度がコントロール群より高いことから、内因性のアクロレイン産生が COPD に関与している可能性が考えられる。活性化された好中球は、MPO-H2O2-chloride system によって、ヒドロキシアミノ酸を反応性の高いアルデヒドへ変化させることが報告されており、酸化ストレス下では、myeloperoxidase (MPO) によってスレオニンからアクロレインが産生されることが知られている。そこで内因性のアクロレインの産生に係わる MPO の遺伝子多型と COPD の関連について検討した。

B. 研究方法

[1] 2004年10月～2009年6月に信州大学医学部附属病院呼吸器・感染症内科外来を受診し、肺気腫、肺線維症あるいは肺癌を疑われ胸部 CT 検査を施行した中で、視覚的評価法による LAA (Low attenuation area) が25%以上の明らかな気腫性病変と、両側肺野に原因不明の間質性陰影を認める肺線維症合併肺気腫症例56症例を対象としてレトロスペクティブに臨床的検討を行った。また、2004年10月～2005年6月の2年間に同外来を受診し、LAA が25%以上の明らかな気腫を認めるが、間質性陰影を認めない、安定期にある COPD 82症例を対照として臨床的な特徴を比較した。

[2] ①COPD 群 (n=125) と喫煙歴のあるコントロール群 (n=64) の血漿中のアクロレイン濃度 (アクロレインがリジン残基に付加して生じたアクロレイン付加体) を ELISA 法にて測定し、両群間で比較した。

②COPD 群、コントロール群の中で、喫煙によるアクロレインの影響がない Ex-smoker (禁煙後2年以上経過している者) について、アクロレイン濃度を比較した。

③COPD 群とコントロール群の血漿中の酸化ストレスを BAP テスト (Biological Anti-oxidant

Potential: 抗酸化力分析) と、d-ROM テスト (Reactive Oxygen Metabolites: 酸化ストレス度分析) にて評価し、両群の酸化ストレスを比較し、さらに COPD 群、コントロール群の Ex-smoker 間で、酸化ストレスを比較した。

[3] 6週齢のオス SD ラットを、①コントロール群、②CSE 群、③CSE + CMC 125 mg/kg/day (低用量: L) 群、④CSE + CMC 250 mg/kg/day (高用量: H) 群の4群に分けた。コントロール群は第1, 8, 15日にリン酸緩衝液 (PBS) を、CSE 群は第1, 8, 15日に CSE をそれぞれ腹腔内投与した。CMC は蒸留水に溶解し経食道的に連日投与し、第21日に全身麻酔下で採血と肺の摘出を行った。

①組織学的検討

肺組織のHE染色を行い、肺胞拡大の指標である mean linear intercept (MLI) と、肺胞破壊の指標である destructive index (DI) を計算した。

②抗酸化力の測定

肺と血清の抗酸化力を、bioantioxidant power (BAP) テストにて測定した。

③アポトーシスの検討

肺組織の TUNEL 染色を行い、TUNEL 陽性細胞をカウントし、apoptotic index (AI) を計算した。

④ザイモグラフィ

肺の matrix metalloproteinase (MMP)-2 および MMP-9 の活性をザイモグラフィを用いて測定した。

[4] 肺移植や手術の目的で切除された計26例の新鮮凍結肺組織を用い検討を行った。この26例の肺の内訳は、非喫煙健常者肺7例、GOLD 分類 stage I, II の肺6例、stage III, IV の肺13例であった。これらを順に no COPD 群、mild COPD 群、severe COPD 群の3群に分けて検討を行った。新鮮凍結肺から mRNA、核・細胞質蛋白を抽出し定量的 PCR およびウエスタンブロット法、ELISA 法に用いた。また一部の組織はパラフィン包埋後、免疫組織化学法を行った。

[5] 信州大学医学部附属病院を受診し、喫煙歴を有する。①気管支拡張薬投与後 FEV1.0/FVC <70% or FEV1.0/FVC <70% かつ %FEV1.0% <60%, ② COPD の以外の気流制限を呈する疾患を除外した COPD 群260名と、健康診断・人間ドック目的で当科の関連病院を受診し、①50歳以上、10 pack years 以上の喫煙歴、② FEV1.0/FVC >70%, %FVC>80% を有するコントロール群130名を対象とした。

C. 研究結果

[1] 平均年齢は両群間に差はなく、肺線維症合併肺気腫症例では女性の1名を除いて全て男性喫煙者であった。肺線維症合併肺気腫症例において Body Mass Index の低下が少なかった。喫煙以外の粉塵暴露歴が25%で把握され、6名にアスベスト、5名に農薬の暴露歴を認めたが、COPD 群と比較し有意に多くはなかった。肺線維症合併肺気腫症例において56例中26例で肺癌の合併を認め、特に扁平上皮癌が15例と最も多かった。COPD 群においては82例中6例のみ肺癌合併を認め、明らかに肺線維症合併肺気腫症例で肺癌の合併率が高いという結果であった。表1～4に患者背景、胸部CT所見、肺線維症のパターンおよび呼吸機能検査の結果を示す。

表 1

	肺線維症合併肺気腫症例	COPD
number	56	82
年齢, years old	70.2±1.2	70.5±0.7
性別, 女性/男性	1/55	8/74
Body mass index, kg/m ²	22.5±0.4**	20.5±0.3
喫煙歴, packs·year	58.8±3.8	59.4±3.0
粉塵暴露歴あり, n (%)	14 (25.0%)	35 (42.7%)
肺癌の合併, n (%)	26** (46.4%)	6 (7.3%)
扁平上皮癌	15**	3
小細胞癌	2	0
腺癌	7	3
LCNEC	2	0

Values are mean ± SEM. *p < 0.05 and **p < 0.01 vs COPD

表 2

胸部 CT 所見	肺線維症合併肺気腫症例 (n = 56)	COPD (n = 82)
LAA score	13.4±0.8**	18.9±0.7
上肺野	5.6±0.3**	6.7±0.2
中肺野	4.4±0.3**	6.2±0.2
下肺野	3.4±0.4**	5.9±0.3
肺気腫 type		
centriacinar, %	16 (28.9%)**	49 (59.8%)
panacinar + centriacinar	10 (17.9%)**	26 (31.8%)
paraseptal, %	13 (23.2%)**	7 (8.5%)
paraseptal + centriacinar, %	17 (30.4%)**	0 (0.0%)
間質性肺炎の分布		
上肺野, n	7	NA
中肺野, n	21	NA
下肺野, n	56	NA

Values are mean ± SEM. *p < 0.05 and **p < 0.01 vs COPD

上肺野：大動脈弓直上レベル

中肺野：気管分岐部レベル

下肺野：右横隔膜より 1-3 cm 上方レベル

表 3

肺親維症の所見について	肺線維症合併肺気腫症例 (n = 56)
Thick-walled bulla, n (%)	32 (57.1%)
Honeycombing, n (%)	41 (73.2%)
Reticular OPacity, n (%)	50 (89.3%)
Ground glaSS Opacity, n (%)	34 (60.7%)
ConSolidation, n (%)	5 (8.9%)
Traction bronchiectasis, n (%)	22 (39.3%)
Peribronchovascular thickening, n (%)	4 (7.1%)
Architectural distortion, n (%)	7 (12.5%)
肺親維症の組織学的診断について (n = 8)	
Usual interstitial pneumonia	3
Nonspecific interstitial pneumonia	4
Desquamative interstitial pneumonia	1

[2] 血中アクロレイン濃度は(図1), COPD 群で平均 172.1 ± 75.9 nmol/ml, コントロール群で平均 143.1 ± 56.0 nmol/ml であり, COPD 群で有意に高かった (p = 0.003)。次に, 血中アクロレイン濃度を禁煙後2年以上経過した禁煙群について両群で比較したところ(図2), COPD 群で平均 175.8 ± 79.5 nmol/ml, コントロール群で

表 4

精密肺機能検査 Labo data	肺線維症合併 肺気腫症例 (n = 56)	COPD (n = 82)
% VC, %	94.0 ± 3.1	96.6 ± 2.4
FEV ₁ , % of pred.	78.3 ± 3.0**	54.7 ± 2.7
FEV ₁ /FVC, %	72.1 ± 1.8**	48.0 ± 1.2
FRC, % of pred.	89.9 ± 5.1**	112.5 ± 2.7
RV, % of pred.	116.5 ± 8.7**	181.7 ± 5.5
RV/TLC, %	38.1 ± 1.6**	50.5 ± 1.1
% DLco, %	40.3 ± 2.4**	57.7 ± 2.2
PaO ₂ , torr	68.2 ± 2.1	70.0 ± 1.3
PaCO ₂ , torr	39.0 ± 0.8	40.5 ± 0.6
α ₁ -AT, mg/dl	163 ± 13	190 ± 38
CRP, mg/dl	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.1
KL-6, U/ml	1,037 ± 146	—

Values are mean ± SEM. **p < 0.01 vs COPD

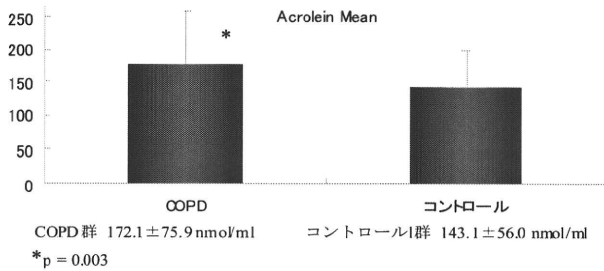


図 1. Acrolein concentration of COPD (n = 125) and control (n = 64) subjects

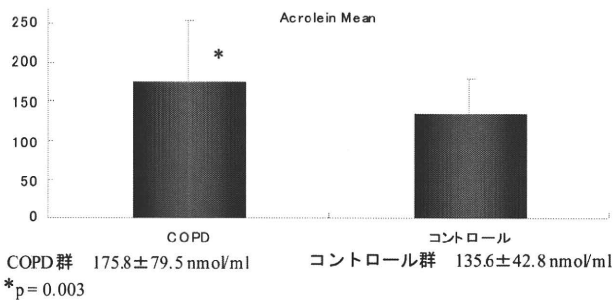


図 2. Acrolein concentration of COPD (n = 66) and control ex-smokers (n = 25) (禁煙後 2 年以上)

135.6 ± 42.8 nmol/ml であり、やはり COPD 群で有意に高かった (p = 0.003)。血中の酸化ストレスは (図 3)、COPD 群で 108.6 ± 30.6 U.CARR、コントロール群で 90.8 ± 16.4 U.CARR であり、COPD 群で有意に高く (p < 0.0001)、禁煙後 2 年以上経過した禁煙群についても (図 4)、COPD 群で 110.8 ± 31.5 U.CARR、コントロール群で

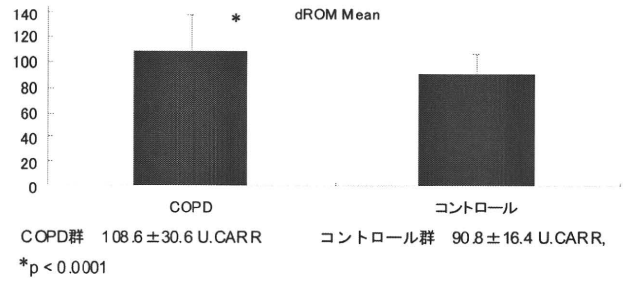


図 3. Oxidative stress of COPD (n = 126) and control (n = 64) subjects

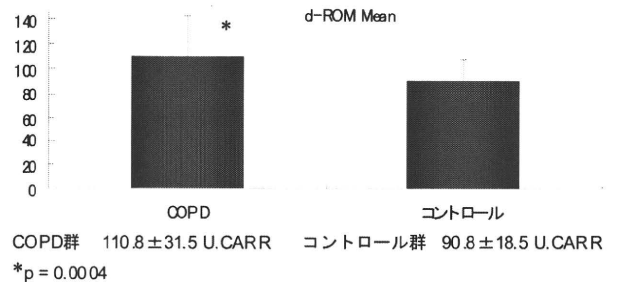


図 4. Oxidative stress of COPD (n = 67) and control ex-smokers (n = 25) (禁煙後 2 年以上)

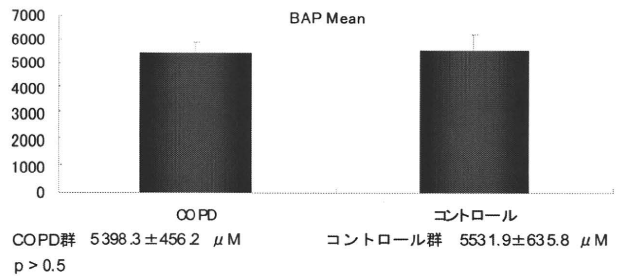


図 5. Biological anti-oxidant potential of COPD (n = 126) and control (n = 64) subjects

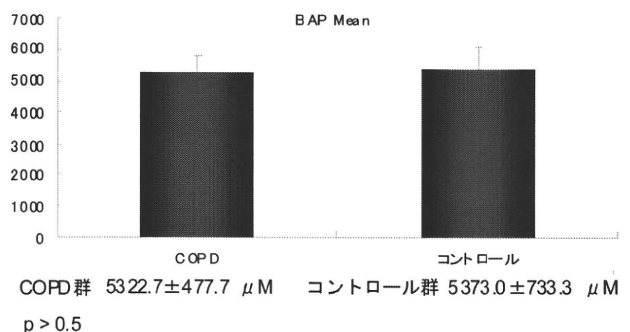


図 6. Biological anti-oxidant potential of COPD (n = 67) and control ex-smokers (n = 25) (禁煙後 2 年以上)

90.8 ± 18.5 U.CARR であり、COPD 群で有意に高かった (p = 0.0004)。一方、抗酸化能について

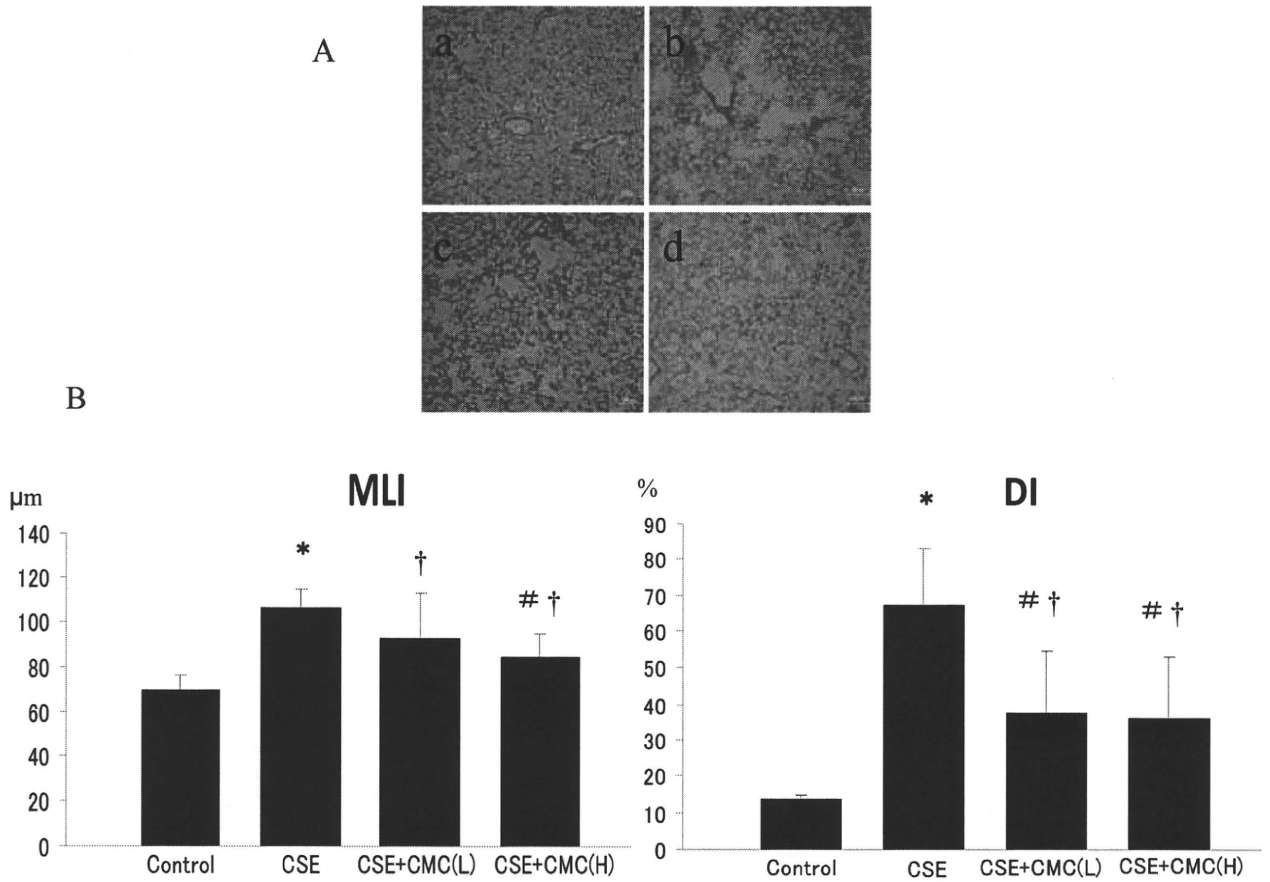


図7. 肺の組織学的検討。A : HE 染色 ; a コントロール群, b CSE 群, c CSE + CMC (L) 群, d CSE + CMC (H) 群, B : mean linear intercept (MLI) と destructive index (DI)

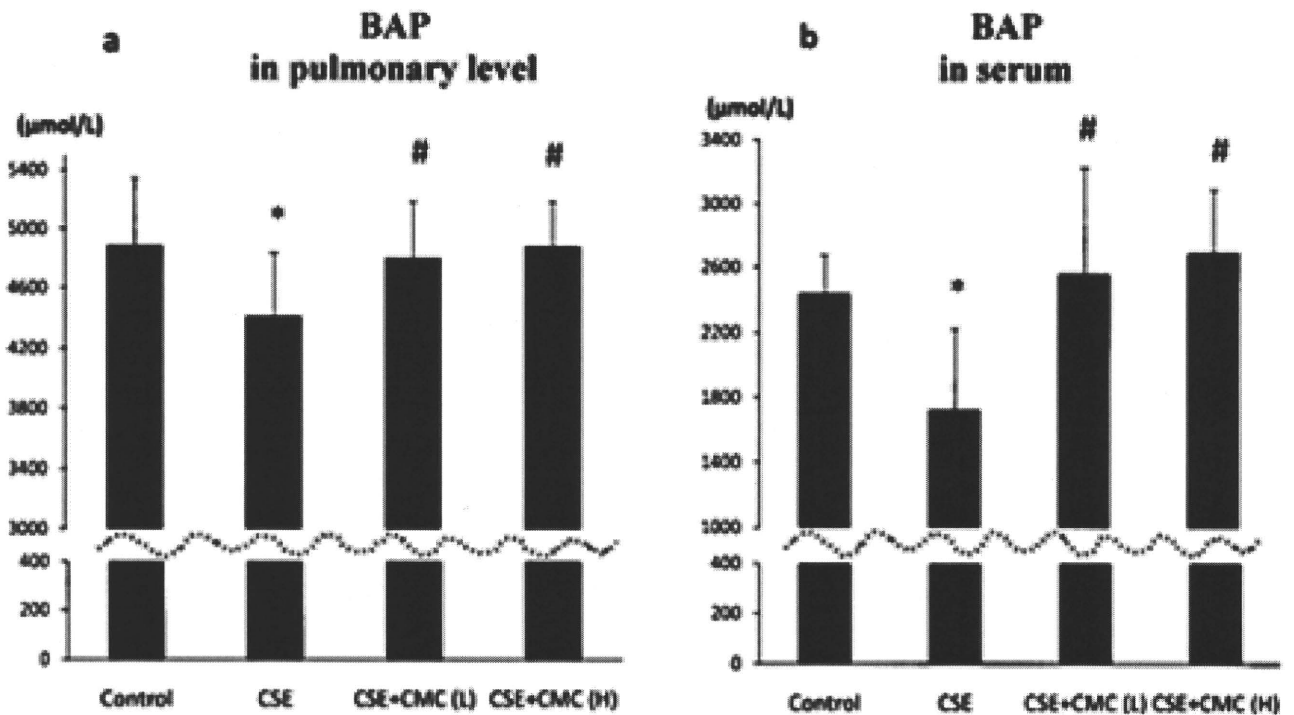


図8. 肺と血清の抗酸化力 (bioantioxidant power ; BAP)

は、両群間で有意差を認めなかった(図5)。禁煙群においても、有意差を認めなかった(図6)。

[3] ①組織学的検討

図7に肺組織のHE染色と、MLIおよびDIを示す。CSEの投与により肺胞腔の有意な拡大と破壊が惹起されたが、これら変化はCMCの同時投与により有意に抑制された。

②抗酸化力

図8に肺と血清の抗酸化力(BAP)を示す。CSEの投与により肺および血清のBAPは有意に低下したが、CMCの同時投与により回復を認めた。

③アポトーシス

図9にTUNEL染色とAIを示す。CSEの投与により肺構成細胞のアポトーシスの著明な亢進を認めたが、CMCの同時投与により有意に抑制された。

④MMP-2 および MMP-9

図10にザイモグラフィーとコントロール群を100%とした時のMMP-2およびMMP-9の濃度比を示す。CSEの投与によりMMP-9の有意な増加

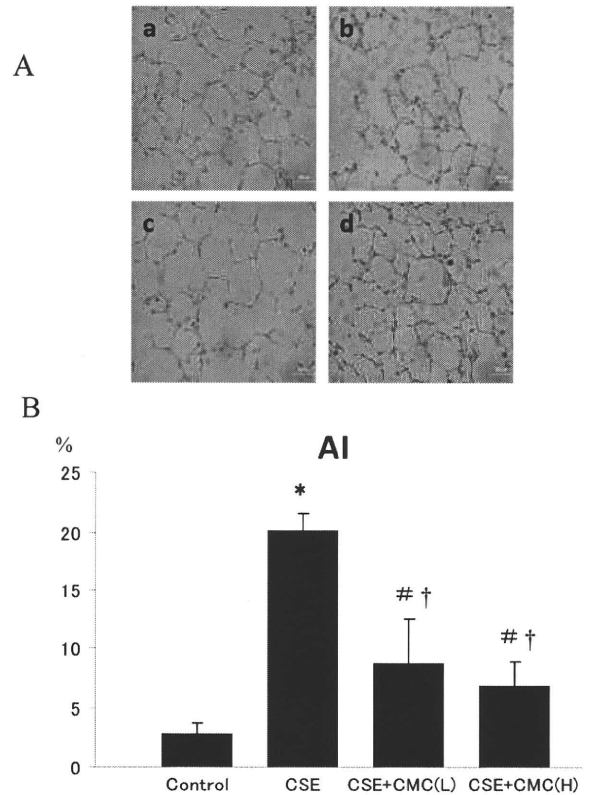


図9. 肺のアポトーシス。A: TUNEL染色; a コントロール群, b CSE群, c CSE+CMC(L)群, d CSE+CMC(H)群, B: apoptotic index (AI)

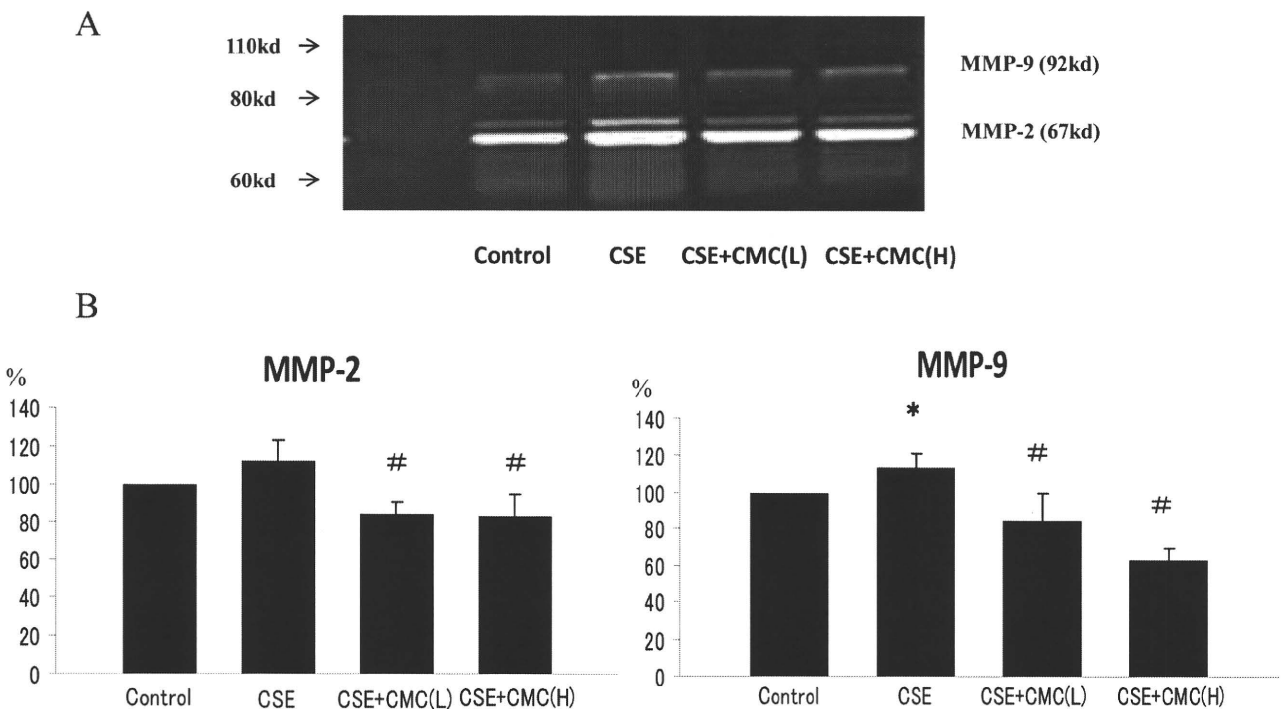


図10. 肺の matrix metalloproteinase (MMP)-2 および MMP-9。A: ザイモグラフィー, B: コントロール群を100%とした時のMMP-2 および MMP-9の濃度比

を認めたが、CMCの同時投与によりMMP-2およびMMP-9の増加は抑制された。

[4] ①Western blot 法による核・細胞質蛋白の発現

個々のWestern blot 法による蛋白発現の解析には、発現の程度をDensitometric analysisにより解析し定量評価した。細胞質蛋白としてVEGFおよびphospho Akt (pAkt)の発現を検討した。Reference 蛋白として、VEGFに対してはβactinを、pAktに対してはAktを用いた(図11A, B)。核蛋白としてHIF-1αおよびHDAC2の発現を検討した。Reference 蛋白としては双方ともLamin

Bを用いた(図11C, D)。

これら4種の蛋白はいずれもno COPD群に比べてsevere COPD群で有意に発現の低下を認めた。また、VEGFではno COPD群とmild COPD群との間に、pAktおよびHDAC2ではmild COPDとsevere COPDとの間にも有意な発現の低下を認めた(図11)。

②ELISA 法によるHIF-1α蛋白の発現解析

Western blot 法で得られたデータの信ぴょう性を確認するために、より定量性が高いと思われるELISA法を用いた解析を行った。図12に示すように、ELISA法によってもno COPD群と比べて

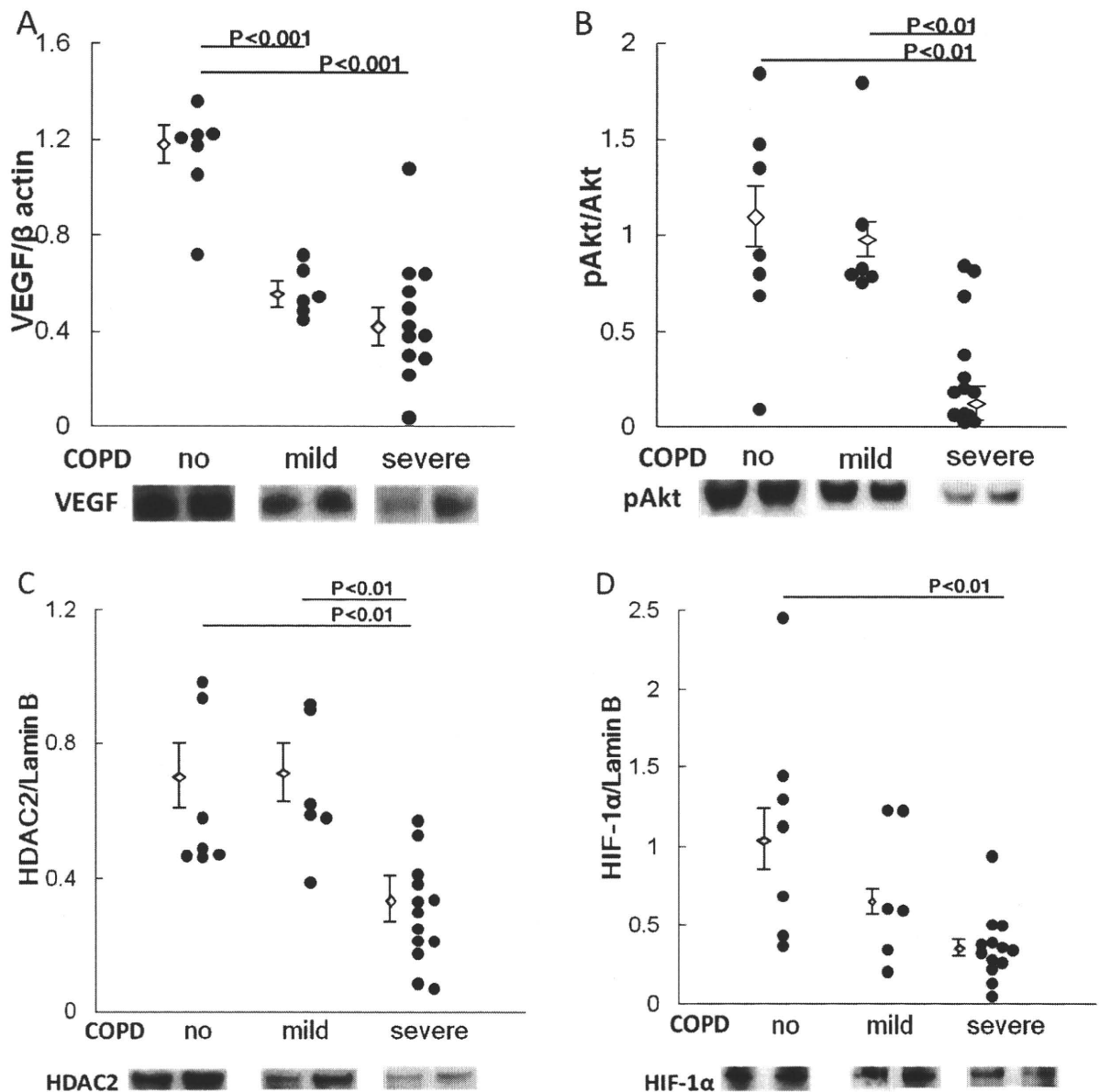


図11. Western blot 法による細胞質・核蛋白発現の検討

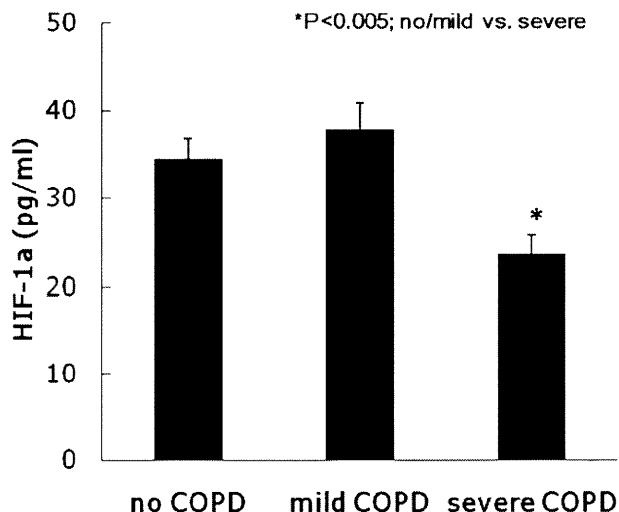


図12. ELISA 法による HIF-1 α 蛋白発現の検討

severe COPD 群の HIF-1 α 蛋白発現は有意に低下していた。

③HIF-1 α 蛋白発現と HDAC2 蛋白発現の関係

すでに COPD 肺での発現の低下が報告されている HDAC2 との関連を検討したところ、Western blot 法による HDAC2 蛋白と HIF-1 α 蛋白発現との間に有意な相関関係が認められた (図 13A)。また、HIF-1 α 蛋白の下流シグナルにあたると思われる、VEGF 遺伝子や VEGF 関連シグナル以外の下流シグナルである GLUT1 遺伝子との間にも有意な正の相関関係を認め、この HIF-1

α 蛋白がシグナル伝達に寄与していることが示唆された (図 13B, C)。

④HIF-1 α 蛋白発現と COPD 重症度との関係

Western blot 法による HIF-1 α 蛋白発現と一秒量との間には正の相関を認めた (図14)。一方で、HIF-1 α 蛋白発現と年齢、喫煙歴との間には有意な相関関係は認められなかった。

⑤HIF-1 α の免疫組織化学的検討

末梢肺における HIF-1 α の免疫組織化学的検討を行ったところ、HIF-1 α 陽性細胞数の alveolar perimeter に対する割合は no COPD 群に比し、severe COPD 群で有意に低下していた (図15)。

⑥HIF-1 α 蛋白と HIF-1 α 遺伝子および HDAC2 遺伝子発現との関連

Western blot 法による HIF-1 α 蛋白と定量 PCR 法による HIF-1 α 遺伝子および HDAC2 遺伝子 (いずれも Reference geneは β actin) との関連を解析したところ、両遺伝子ともに HIF-1 α 蛋白発現との間に正の相関関係を認めた (図 16A, B)。

[5] MPO の血中濃度は、COPD 群とコントロール群との間で有意な差を認めなかった (図 17)。MPO SNPs のアレル頻度に両群間で有意な差を認めなかった (表 5)。さらに、COPD の重症度、MPO 血中濃度、アクロレイン血中濃度と

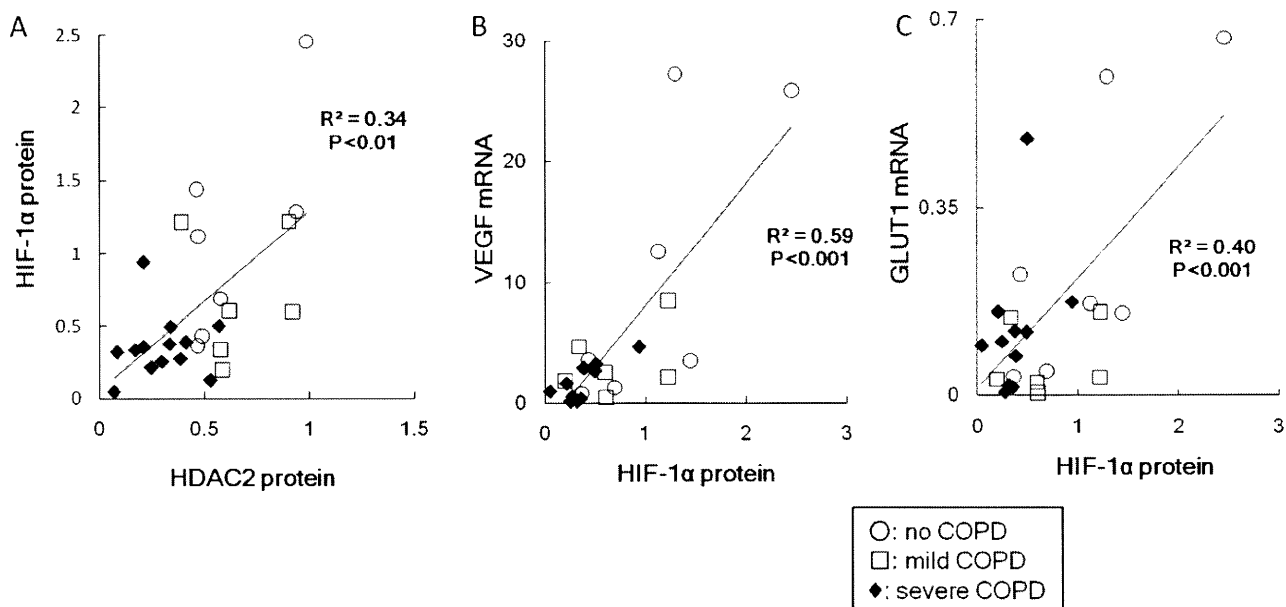


図13. HIF-1 α と HDAC2 蛋白の関係および HIF-1 α 下流シグナルの相関

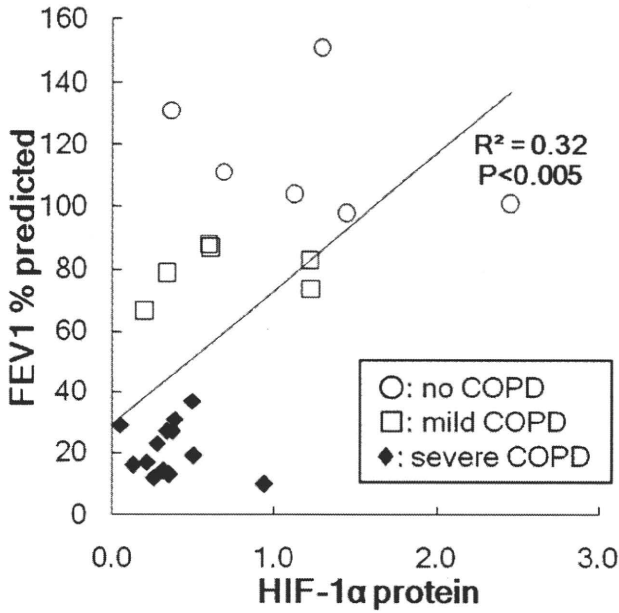


図14. HIF-1α 蛋白発現と %FEV1 との相関関係

MPO SNPs との間に関連を認めなかった (表6)。

D. 考 察

[1] 肺線維症合併肺気腫症例の特徴として、呼吸機能検査では気流制限や肺の過膨張が比較的軽症にもかかわらず、肺拡散能障害が顕著で、労作時の desaturation が顕著であった。気腫性変化は

上肺野に優位で傍隔壁性気腫が目立った。間質性陰影は下肺野に優位で、Honeycombing, Reticular opacity, Ground glass opacity および壁が肥厚した気腫性嚢胞を認める症例が多かった。肺癌の合併は極めて多く、半数弱に見られ、扁平上皮癌が最も多く認められた。様々な文献的考察から、肺線維症合併肺気腫の発生機序は肺癌のそれと何らかの関係がある可能性があり、今後のさらなる研究が待たれる。

[2] アクロレインは、酸化ストレス下で好中球の myeloperoxidase により threonine から産生される。マウスの急性心筋虚血モデルでは、wild-type マウスは、myeloperoxidase-null マウスと比較し、虚血心筋でアクロレインの著増を認め、虚血24時間後の心筋障害が有意に重症であったことが報告されており、内因性のアクロレイン産生により組織障害が起きていることが示唆される。COPD 患者において、酸化ストレスが高まっていることや、禁煙後も病状が進行すること、心血管系の障害を来しやすいことはよく知られているが、COPD のこの禁煙後も進行する病態や、全身性障害の原因の一端を酸化ストレス下に産生さ

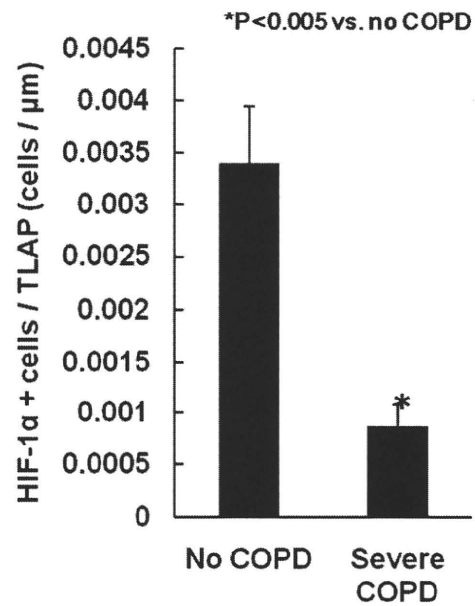
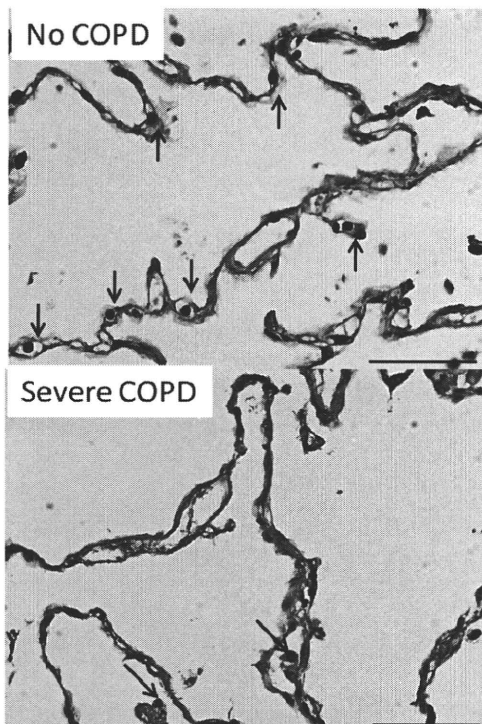


図15. HIF-1α 蛋白発現における免疫組織化学的検討。TLAP = Total length of Alveolar Perimeter

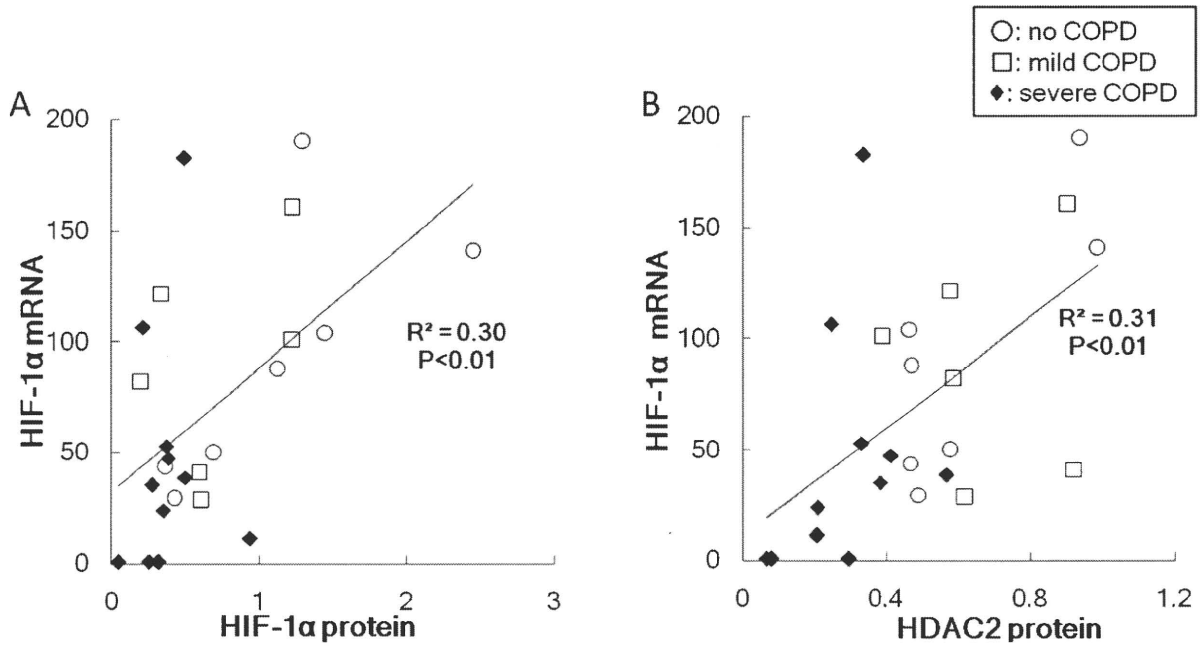


図16. HIF-1α 蛋白と HIF-1α 遺伝子・HDAC2 遺伝子との相関関係

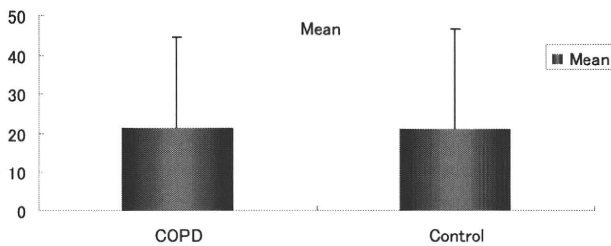


図17. MPO concentration in both groups. COPD : 21.4 ± 23.2 ng/ml, Control : 21.3 ± 25.5 ng/ml, p>0.05 (Student t test)

る内因性のアクロレインが担っている可能性が考えられる。

[3] CMC は喀痰調整薬として広く臨床応用されている薬剤である。2008年に発表された PEACE study では、COPD の増悪抑制効果が示された。近年の様々な基礎研究は、CMC の抗酸化作用を実証しており、特に肺に特異的に作用する

可能性を示唆している。本研究では、CMC の抗酸化作用と、それに伴うアポトーシスの抑制およびプロテアーゼ活性の低下により、CSE による肺気腫が防止された。CMC は副作用が少ない安価な薬剤である。今後は、抗酸化作用に焦点をあてた臨床応用に期待がかかる。CMC が COPD、特に肺気腫の進行抑制薬として注目を集める可能性もある。

[4] ヒト COPD (肺気腫優位型) 肺を用いて、VEGF と同様に HIF-1α 蛋白も有意に発現が低下しており、またこの低下と VEGF 遺伝子との間に相関関係を認めたことで、実際に“Lung structure maintenance program”に於ける VEGF の上流の因子として HIF-1α が位置することを証明し得た。また、我々の今回の検討はまた、既報である重症 COPD 肺での HDAC2 蛋白発現の低下を支

表 5. The allele frequencies of the SNPs in cases and controls

dbSNP	Name	COPD 群 (n=260) freq	コントロール群 (n=130) freq	p* COPD vs コントロール
rs2107545 (T>C)	SNP1	0.11	0.12	ns
rs2243828 (A>G)	SNP2	0.11	0.12	ns
rs7208693 (C>A) (Val→Phe)	SNP3	0.14	0.13	ns
rs2071409 (A>C)	SNP4	0.09	0.08	ns

freq : minor allele frequency, ns : not significant, *p-values : Chi square test

図19. Association of FEV1% predict, MPO concentration, and Acrolein-lysine concentration with MPO genotypes in COPD group

	Allele	FEV1% predict (%)	MPO (ng/ml)	Acrolein-lysine (nmol/ml)	p value* FEV1% predict/MPO/Acrolein-lysine
rs2107545 T>C	Allele C (+)	55.8 ± 19.2	20.3 ± 14.0	157.7 ± 60.3	ns/ns/ns
	Allele C (-)	59.8 ± 22.4	21.0 ± 23.7	175.7 ± 78.8	
rs2243828 A>G	Allele G (+)	55.8 ± 19.2	20.3 ± 14.0	157.7 ± 60.3	ns/ns/ns
	Allele G (-)	59.8 ± 22.4	21.0 ± 23.7	175.7 ± 78.8	
rs7208693 C>A (Val→Phe)	Allele A (+)	58.3 ± 21.0	21.6 ± 22.5	167.4 ± 71.1	ns/ns/ns
	Allele A (-)	59.2 ± 22.1	20.4 ± 21.2	174.2 ± 82.9	
rs2071409 A>C	Allele C (+)	55.2 ± 18.5	19.6 ± 14.6	158.9 ± 21.8	ns/ns/ns
	Allele C (-)	58.9 ± 21.8	20.9 ± 22.5	174.1 ± 79.1	

Values are mean ± SD. By student's t test assuming dominant genetic model, ns : not significant

持するものであった。この HDAC2 蛋白の発現と HIF-1 α の蛋白と遺伝子いずれもが正の相関関係であったことと、HIF-1 α 蛋白と遺伝子発現との間にも正の相関があったことは、これまで考えられてきた HIF-1 α 蛋白の分解による活性制御の他に、HIF-1 α 遺伝子発現による HIF-1 α シグナル伝達の経路の存在を示唆する所見として興味深いと思われた。また、HIF-1 α 蛋白発現の程度は COPD の重症度を規定する要素である一秒量との間に相関関係が認められたが、一方で喫煙歴や年齢との間には相関関係が認められなかった。このことは COPD 肺における HIF-1 α 蛋白の発現は喫煙歴や年齢とは独立した COPD の重症度予測因子であるといえよう。

[5] アクロレインは、グルタチオンによって代謝されるが、この反応は glutathione-S-transferases (GSTs) によって触媒される。GSTs には多くの isoform があり、GST の活性度が異なることが知られている。GSTM1 を保有しない喫煙者は、GSTM1 を保有する喫煙者と比較し、有意に DNA ダメージの頻度が高かったことが報告されている。内因性のアクロレインが COPD の病態に関連しているとすれば、MPO を介したアクロレインの産生ではなく、GST を介したアクロレインの代謝の相違が COPD の病態に関連している可能性が考えられた。

E. 結論

[1] 肺線維症合併肺気腫は線維化を伴わない肺気腫が優位な COPD とは異なった臨床的特徴を有し、特に肺癌の合併には注意を払うべきと考えられた。

[2] COPD の発症や進行に内因性のアクロレイン産生が関与している可能性が考えられた。

[3] CMC は CSE によるラット肺気腫を抑制した。

[4] HIF-1 α は重症 COPD の病態形成に関与している可能性が示唆された。

[5] COPD の病態と MPO 遺伝子多型は関連を認めなかった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Chen Y, Chen P, Hanaoka M, Droma Y, Kubo K : Enhanced levels of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-2 correlate with the severity of airflow limitation in stable COPD. *Respirology*, 13 : 1014-1021, 2008
- Chen Y, Chen P, Hanaoka M, Huang X, Droma Y, Kubo K : Mechanical ventilation in patients

- with hypoxemia due to refractory heart failure. *Intern Med*, 47 : 367-373, 2008
3. Hanaoka M, Ideura G, Ito M, Urushihata K, Koizumi T, Fujimoto K, Kubo K: Pulmonary haemodynamic changes in patients with severe COPD. *Respirology*, 13 : 919-922, 2008
 4. Hanaoka M, Yu X, Urushihata K, Ota M, Fujimoto K, Kubo K: Leptin and leptin receptor gene polymorphisms in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*, 133 : 79-85, 2008
 5. Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Hatayama O, Sato E, Katsuyama Y, Fujimoto K, Ota M: The association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with the emphysema phenotype of COPD in Japanese. *Intern Med*, 47 : 1387-1394, 2008
 6. Tanabe T, Fujimoto K, Yasuo M, Tsushima K, Yoshida K, Ise H, Yamaya M: Modulation of mucus production by interleukin-13 receptor alpha2 in the human airway epithelium. *Clin Exp Allergy*, 38 : 122-134, 2008
 7. 久保恵嗣 : [2 ページで解説! 診療ガイドダイジェスト] 呼吸器 呼吸不全. 治療, 90 : 28-29, 2008
 8. 久保恵嗣 : [呼吸器疾患診療マニュアル] 呼吸器疾患の治療 原発性肺高血圧症. 日本医師会雑誌, 137 : S269-S271, 2008
 9. 藤本圭作 : COPD と診断され, 在宅酸素療法が施行された気管支喘息と考えられた1例. 呼吸, 27 : 739-743, 2008
 10. 藤本圭作 : COPD の予後を変えることができるか? 増悪の現状と予防への戦略. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 18 : 34-39, 2008
 11. 藤本圭作 : [呼吸器疾患の病態を機能検査から考える] COPD の呼吸機能と病態. 呼吸, 27 : 973-976, 2008
 12. 林田美江, 久保恵嗣, 瀬山邦明, 熊坂利夫, 井上義一, 北市正則, 審良正則 : 厚生労働省難治性疾患克服研究事業呼吸不全に関する調査研究班 : リンパ脈管筋腫症 lymphangiomyomatosis (LAM) 診断基準. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 425-427, 2008
 13. 林田美江, 藤本圭作, 久保恵嗣, 瀬山邦明, 井上義一 : 厚生労働省難治性疾患克服研究事業呼吸不全に関する調査研究班 : リンパ脈管筋腫症 lymphangiomyomatosis (LAM) の治療と管理の手引き. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 428-431, 2008
 14. 伊東理子, 久保恵嗣 : Nursing Process 慢性閉塞性肺疾患の理解. クリニカルスタディ, 29 : 51-57, 2008
 15. 田名部毅, 藤本圭作 : [呼吸器疾患診療マニュアル] 呼吸器疾患の患者指導・支援 在宅酸素療法. 日本医師会雑誌, 137 : S313-S316, 2008
 16. 松澤幸範, 藤本圭作, 久保恵嗣 : 禁煙外来受診者の禁煙導入に影響する因子について. 長野県医学会雑誌, 38 : 32-34, 2008
 17. 井上博雅, 相澤久道, 石坂彰敏, 一ノ瀬正和, 植木 純, 大田 健, 大森久光, 小川浩正, 金澤 實, 川山智隆, 黒澤 一, 小林弘祐, 榊原博樹, 玉置 淳, 陳 和夫, 梅 博久, 南須原康行, 飛田 渉, 藤本圭作, 南方良章 : 生活習慣病対策における COPD の重要性「特定健康診査・特定保健指導」への提言. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 583-591, 2008
 18. Chen Y, Hanaoka M, Chen P, Droma Y, Voelkel NF, Kubo K: Protective effect of beraprost sodium, a stable prostacyclin analog, in the development of cigarette smoke extract-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296 : L648-656, 2009
 19. Hanaoka M, Droma Y, Ota M, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K: Polymorphisms of human vascular endothelial growth factor gene in high-altitude pulmonary oedema susceptible subjects. *Respi-*

- rology*, 14: 46-52, 2009
20. Ito M, Yasuo M, Yamamoto H, Tsushima K, Tanabe T, Yokoyama T, Hamano H, Kawa S, Uehara T, Honda T, Kawakami S, Kubo K: Central airway stenosis in a patient with autoimmune pancreatitis. *Eur Respir J*, 33: 680-683, 2009
 21. Komatsu Y, Fujimoto K, Yasuo M, Urushihata K, Hanaoka M, Koizumi T, Kubo K: Airway hyperresponsiveness in young adults with asthma that remitted either during or before adolescence. *Respirology*, 14: 217-223, 2009
 22. Yaegashi H, Fujimoto K, Abe H, Orii K, Eda S, Kubo K: Characteristics of Japanese patients with complex sleep apnea syndrome: a retrospective comparison with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med*, 48: 427-432, 2009
 23. Yasuo M, Fujimoto K, Imamura H, Ushiki A, Kanda S, Tsushima K, Kubo H, Yamaya M, Kubo K: L-carbocysteine reduces neutrophil elastase-induced mucin production. *Respir Physiol Neurobiol*, 167: 214-216, 2009
 24. 久保恵嗣, 藤本圭作: [COPD をめぐって 基礎・診断・治療からリハビリテーションまで] COPD の病態・生理. *アレルギー・免疫*, 16: 1082-1088, 2009
 25. 久保恵嗣, 小泉知展: [最新の肺移植をめぐって 生体肺移植を含めたその適応と手技] 中央肺移植適応検討委員会からみた脳死肺移植の課題. *日本胸部臨床*, 68: 929-934, 2009
 26. 花岡正幸, 久保恵嗣: [最近の COPD と気管支喘息] COPD の治療 COPD の治療一増悪時. *臨床と研究*, 86: 159-162, 2009
 27. 花岡正幸, 久保恵嗣: COPD の病態生理と病因. *呼吸器科*, 16: 153-157, 2009
 28. 花岡正幸: 肺高血圧症の治療指針. *呼吸器科*, 16: 216-221, 2009
 29. 藤本圭作, 牛木淳人, 小松佳道, 吾妻俊彦, 吉川純子, 久保恵嗣: 長時間作用型気管支拡張薬にて加療中の COPD に対する短時間作用型 β_2 刺激薬の add-on 効果. *日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌*, 19: 64-70, 2009
 30. 牛木淳人, 小泉知展, 伊東理子, 津島健司, 山本 洋, 藤本圭作, 久保恵嗣, 坂田信裕, 滝沢正臣, 藤井忠重, 鈴岡正博, 小林俊夫: 遠隔診療支援により長期在宅療養が可能であった重症慢性呼吸不全の 1 例. *呼吸*, 28: 662-665, 2009
 31. Chen Y, Hanaoka M, Droma Y, Chen P, Voelkel NF, Kubo K: Endothelin-1 receptor antagonists prevent the development of pulmonary emphysema in rats. *Eur Respir J*, 35: 904-912, 2010
 32. Kanda S, Fujimoto K, Komatsu Y, Yasuo M, Hanaoka M, Kubo K: Evaluation of respiratory impedance in asthma and COPD by an impulse oscillation system. *Intern Med*, 49: 23-30, 2010
 33. Kitaguchi Y, Fujimoto K, Hanaoka M, Kawakami S, Honda T, Kubo K: Clinical characteristics of combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Respirology*, 15: 265-271, 2010
 34. Tsushima K, Sone S, Fujimoto K, Kubo K, Morita S, Takegami M, Fukuhara S: Identification of occult parenchymal disease such as emphysema or airway disease using screening computed tomography. *Copd*, 7: 117-125, 2010
 35. 久保恵嗣: [COPD の診療 update] COPD 増悪の予防と対応. *日本医師会雑誌*, 138: 2523-2527, 2010
 36. 花岡正幸: [呼吸器病学 TOPICS 2009] 肺循環・肺損傷 低酸素性肺血管攣縮と肺高血圧の分子病態と治療法の新展開. *分子呼吸器病*, 14: 82-83, 2010
 37. 巽浩一郎, 中西宣文, 田邊信宏, 笠原靖紀, 久保恵嗣, 平井豊博, 三嶋理晃: 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「呼

- 吸不全に関する調査研究班」：肺動脈性肺高血圧症 (PAH) および慢性血拴塞栓性肺高血圧症 (CTEPH). 日本呼吸器学会雑誌, 48 : 551-564, 2010
38. 漆畑一寿, 久保恵嗣 : [COPD 診療は難しい! 新たな転換期を迎えた COPD 診療の実践とコツ] COPD 患者への在宅酸素療法および人工呼吸療法. 治療, 92 : 1823-1827, 2010
39. 漆畑一寿, 花岡正幸 : 気道 睡眠時無呼吸症候群 診断と最新治療トレンド. 臨床麻酔, 34 : 329-340, 2010
- ## 2. 学会発表
1. Yasuo M, Fujimoto K, Tanabe T, Yoshida K, Kubo K : Effect of S-Carboxymethylcysteine on Interleukin-13 Induced MUC5AC Expression and Goblet Cell Hyperplasia in Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Crit Car Med*, A200, 2008
 2. Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Yasuo M, Tanabe T, Komatsu Y, Katsuyama Y, Ota M, Fujimoto K, Kubo K : Toll like Receptor 4 Gene Polymorphisms and COPD in Japanese Population. *Am J Respir Crit Car Med*, A660, 2008
 3. Tanabe T, Yamazaki Y, Yasuo M, Yoshida K, Kubo K : The Invasion of Mycobacterium avium Complex (MAC) Altered by Ciliated Cells and Mucus Cells in Human Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Car Med*, A690, 2008
 4. 藤本圭作, 小松佳道, 池川香代子, 牛木淳人, 横山俊樹, 吾妻俊彦, 漆畑一寿, 花岡正幸, 久保恵嗣 : Impulse oscillation system (IOS) による安静呼吸下での呼気気流制限の検出と気管支拡張薬の効果. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 197, 2008
 5. 藤本圭作 : COPD の新たな診断・治療ターゲット Dynamic hyperinflation の評価と対策. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 28, 2008
 6. 藤本圭作 : COPD 患者における動的肺過膨張の病態と治療. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 75, 2008
 7. 藤本圭作, 小松佳道, 横山俊樹, 牛木淳人, 吾妻俊彦, 池川香代子, 吉川純子, 久保恵嗣 : 短時間作用型吸入 β_2 刺激薬の COPD 患者における運動耐容能および動的肺過膨張の改善効果. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 18 : 203s, 2008
 8. 花岡正幸, 北口良晃, 藤本圭作, 久保恵嗣, VoelkelNorbert : 自己免疫性肺気腫モデルにおける耐性誘導. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 122, 2008
 9. 花岡正幸 : 肺高血圧症に関する最近の知見. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 76, 2008
 10. 高見澤明美, 堀内俊道, 小林信光, 甘利俊哉, 久保恵嗣 : 包括的呼吸リハビリテーション実践における病診連携をめざして. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 18 : 213s, 2008
 11. 高見澤明美, 牛木淳人, 吾妻俊彦, 久保恵嗣 : 幼児閉塞型睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) 患者に対する経鼻的持続陽圧呼吸療法 (CPAP) の使用経験. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 162, 2008
 12. 牛木淳人, 藤本圭作, 安尾将法, 漆畑一寿, 山本 洋, 花岡正幸, 小泉知展, 久保恵嗣 : COPD 患者における 6 分間歩行試験・シャトル歩行試験と, QOL および呼吸機能検査の相関に関する検討. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 197, 2008
 13. 工 穰, 茂木英明, 窪田茂男, 伯耆原祥, 漆畑一寿, 藤本圭作, 宇佐美真一 : 多点感圧センサーシート (スリープレコーダ SD-101) による小児睡眠時無呼吸症候群の簡易検査について. 小児耳鼻咽喉科, 29 : 107, 2008
 14. 漆畑一寿, 藤本圭作, 小松佳道, 安尾将法, 山本 洋, 花岡正幸, 小泉知展, 久保恵嗣 : 多点感圧センサーシートによる非侵襲的な睡眠時無呼吸症候群のモニタリングの試み. 長野

- 県医学会雑誌, 38 : 65-66, 2008
15. 野見山哲生, 塚原照臣, 漆畑一寿, 藤本圭作 : 職域における睡眠時無呼吸症候群に関する疫学調査研究 睡眠時無呼吸症候群と自動車交通事故の関連. 産業衛生学雑誌, 50 : P 3043, 2008
 16. 伊東理子, 花岡正幸, 安尾将法, 田名部毅, 吉川純子, 小松佳道, 藤本圭作, 久保恵嗣 : COPD と Toll-like receptor 4 遺伝子多型との関連. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 284, 2008
 17. 江田清一郎, 藤本圭作, 久保恵嗣 : 長野県における在宅酸素療法・在宅人工呼吸療法の推移と現状. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 18 : 193s, 2008
 18. 松澤幸範, 藤本圭作, 久保恵嗣 : 職場の喫煙率に及ぼす受動喫煙対策と個別禁煙指導の効果. 産業衛生学雑誌, 50 : 30, 2008
 19. 松澤幸範, 藤本圭作, 花岡正幸, 小松佳道, 漆畑一寿, 久保恵嗣 : 禁煙外来における禁煙の成否に影響する社会環境因子の検討. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 169, 2008
 20. 安尾将法, 田名部毅, 藤本圭作, 久保恵嗣 : 好中球エラストラーゼ刺激により惹起される気道粘液過剰産生に対するカルボシステインの効果. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 166, 2008
 21. 小松佳道, 藤本圭作, 池川香代子, 牛木淳人, 横山俊樹, 吾妻俊彦, 伊東理子, 吉川純子, 安尾将法, 漆畑一寿, 花岡正幸, 久保恵嗣, 福地義之助 : IOS 法, NEP 法による COPD 重症度の評価. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 197, 2008
 22. 池川香代子, 藤本圭作, 小松佳道, 神田慎太郎, 久保恵嗣 : IOS 法, NEP 法による OSAS 患者における上気道閉塞の評価. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 183, 2008
 23. 堀内俊道, 高見澤明美, 久保恵嗣 : 在宅での非侵襲的陽圧換気療法 (noninvasive positive pressure ventilation ; NPPV) の機器の使用感に関する検討. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 342, 2008
 24. 塩入とも子, 中野和美, 塩原まゆみ, 横山俊樹, 漆畑一寿, 藤本圭作, 久保恵嗣 : 陽・陰圧式体外式人工呼吸器 (RTX) が排痰困難に有効であった特発性肺線維症の 1 例. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, (1881-7319) 18 : 139s, 2008
 25. 野見山哲生, 塚原照臣, 漆畑一寿, 藤本圭作 : 職域における睡眠時無呼吸症候群に関する疫学調査研究 睡眠時無呼吸症候群と自動車交通事故の関連. 産業衛生学雑誌, (1341-0725) 50 : P3043, 2008
 26. 笠原靖紀, 田邊信宏, 坂尾誠一郎, 多田裕司, 黒須克志, 滝口裕一, 巽浩一郎, 久保恵嗣, 栗山喬之 : 臨床調査個人票を用いた原発性肺高血圧症の解析. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 255, 2008
 27. 田邊信宏, 笠原靖紀, 巽浩一郎, 栗山喬之, 久保恵嗣 : 慢性血栓塞栓性肺高血圧症臨床調査個人票による解析. 日本呼吸器学会雑誌, 46 : 255, 2008.
 28. ATS 5月15～20日 サンディエゴ [Poster Board #D26] T Yokoyama, K Tsushima, H Yamamoto, T Tanabe, M Ito, K Kubo : Diagnostic bronchoalveolar lavage for the patients with acute respiratory failure under the non-invasive positive pressure ventilation [Publication Page : A3062] K Tsushima, FR D'Allesio, NR Aggarwal, CD Files, VK Sidhaye, LS King : IL-10 Plays a critical role in accelerated resolution of lung injury by LPS priming [Publication Page : A2500]
 29. Y Komatsu, H Yamamoto, T Yokoyama, K Kubo : Elevation of interleukin-8 in epithelial lining fluid of collapsed lung during 1-lung ventilation. European Respiratory Society, 2008, 10月4～8日, Berlin
 30. 久保恵嗣 : ガイドラインセッション 呼吸器疾患治療薬品の適正使用. 日本呼吸器学会雑誌