

75g OGTT は8時間の空腹後施行した。75g OGTT により、WHO 基準に応じて正常耐糖能 (NGT: normal glucose tolerance), prediabetes (IFG: Impaired fasting glucose, IGT: impaired glucose tolerance), 糖尿病 (DM: diabetes mellitus) に分類した。NGT は空腹時血糖が 110mg/dl 未満かつ2時間値血糖が 140mg/dl 未満。IFG は空腹時血糖が 110mg/dl 以上 126mg/dl 未満かつ2時間値血糖が 140mg/dl 未満。IGT は空腹時血糖が空腹時血糖が 126mg/dl 未満かつ2時間値血糖が 140mg/dl 以上から 200mg/dl 未満。DM は HbA1c が 6.5% 以上あるいは、空腹時血糖が 126mg/dl 以上あるいは2時間値血糖が 200mg/dl 以上。

呼吸機能検査は、アメリカ胸部疾患学会の推奨に合わせて、経験豊富な検査技師によりフローボリュームを測定し、吸気努力と呼気努力が十分と認め、数回行ったうちで最良値を測定結果として用いた。

横断的研究では糖尿病や prediabetes と肺機能が有意に相関しているか評価し、縦断的研究では正常耐糖能から prediabetes の発症を観察し、肺機能が prediabetes 発症の危険因子であるかどうか評価した。

(倫理面への配慮)

高知大学医学部倫理委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

横断的研究での耐糖能と肺機能との検討

まず、975名の受診者を用いて、耐糖能異常と肺機能との関連について横断的研究を行った。75g OGTT の結果により、641名の NGT、86名の IFG、152名の IGT、96名の DM に分けられた。年齢 (p for trend: <0.001), BMI (p for trend = <0.001), 収縮期血圧 (p for trend = 0.001), 喫煙指数 (p for trend = 0.01), 総コレステロール (p for trend = <0.001), 肺機能検査値はグループ間で有意差を認めた。特に%FVC は IGT と DM 群では NGT 群に比べて有意に低かったが、IFG では有

意差を認めなかった。

肺機能と耐糖能異常について調べるために、%FVC と FEV₁% によりそれぞれ4等分の集団を作成した。年齢、BMI、収縮期血圧、総コレステロールはこれらの群では有意差を認めたので、これらの因子で補正して、耐糖能異常に対するオッズ比を求め、%FVC は耐糖能異常と有意に相関していたが (IGT; p for trend = 0.03, IFG or IGT; 0.02, DM; 0.003, IFG or IGT or DM; 0.001), FEV₁% は相関していなかった。%FVC でも IFG のみ相関は認めなかった。

縦断的研究での prediabetes 発症の検討

次に、低肺機能が prediabetes 発症の危険因子であるかどうか縦断的研究を行った。観察期間 28.5 ± 6.1 カ月の間に 511 名から 40 名が IFG を発症し、49 名が IGT を発症した。DM 発症者はいなかった。

肺機能と prediabetes 発症を検討するために %FVC と FEV₁% によりそれぞれ4等分の集団を作成した。BMI、収縮期血圧はこれらの群では有意差を認めた。prediabetes 発症に対するハザード比を補正してない素の値と年齢と BMI、収縮期血圧で補正した値を求めた。素の値では低%FVC は IGT と prediabetes の有意な危険因子であったが (IGT; p for trend = 0.03, IFG or IGT; 0.01), IFG の有意な危険因子ではなく、低 FEV₁% はどれについても有意な危険因子ではなかった。年齢や BMI、収縮期血圧で補正すれば prediabetes のみ有意な独立した危険因子であったが (p for trend = 0.04), IGT では有意な危険因子ではなかった。

D. 考察

横断的研究では、%FVC が糖尿病や prediabetes と有意に相関していたが、FEV₁% は相関していなかった。縦断的研究で肺機能の prediabetes 発症への影響を調べ、低%FVC が prediabetes 発症の独立した危険因子であったが、低 FEV₁% は危険因子ではなかった。閉塞性換気障害の指標が耐糖能と有意に相関していないことは、COPD は進行すれば併存症がますます増えていくが、本研究

では肺機能正常者のみを用いているからと考えられる。

IGT は IFG よりも低肺機能とより緊密に関連しているのは興味深い。IFG と IGT はともに糖尿病の危険因子であるが、IGT は IFG よりも心血管疾患発症のリスクが高いと報告されている。本研究では、低%FVC が IGT と有意に関連し、糖尿病だけではなく心血管疾患の危険因子の指標になる可能性が示唆された。

我々の結果は、肺容量がインスリン抵抗性、メタボリック症候群発症との逆相関を明示した今までの疫学研究と同様であった。中心性肥満は肺容量を減少させるかもしれないが、これが原因となる可能性は低いと考えている。拘束性換気障害はメタボリックシンドロームとより密に関連しているが、以前の研究では中心性肥満は拘束性換気障害だけでなく、閉塞性換気障害とも有意に関連していることが報告されている。中心性肥満の影響は不明であるが、BMI 補正後も低%FVC が prediabetes 発症の有意な危険因子であったことより中心性肥満以外の可能性が原因に大きく関わっていると考える。

低肺機能が糖尿病境界型の高い発症率である理由は現在不明である。肺機能が正常範囲内であっても低肺機能であれば、最大酸素摂取量が有意に減少し、これにより身体活動が低下し、インスリン抵抗性と糖尿病を引き起こす。さらに低肺機能は低出生体重や胎生期の栄養とも関連し、これらが糖尿病発症とも関連している。

本研究ではいくつかの問題点がある。女性受診者の数が少なく、対象者が日本人男性に限られている。日本人は他の民族よりも肥満が少なく、インスリン抵抗性が小さいと言われていた。しかし近年では日本でもインスリン抵抗性が大きい人が増えている。耐糖能異常の危険性を減少させるシムバスタチンを含む薬剤の影響を本研究では全く無視することはできないが、高血圧や高脂血症、高尿酸血症の治療薬を受けている受診者の割合は、%FVC と FEV₁% の 4 等位でのそれぞれのグ

ループ分けでも有意な違いはなかった。

E. 結 論

横断的研究だけでなく、縦断的研究でも低%FVC が prediabetes 発症と相関した。これらの結果により肺容量が prediabetes 発症の重要な危険因子であることが示唆された。COPD と糖尿病との関連について論文が増えているが、prediabetes では早期 COPD と関連していないと考えられた。

F. 健康危険情報

観察研究であり、特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakashima T, Yokoyama A, Inata J, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Kohno N: Mucins carrying selectin ligands as predictive biomarkers of disseminated intravascular coagulation complication in ARDS. *Chest* 2011 ; 139 : 296 - 304
2. Mukaida K, Hattori N, Kondo K, Morita N, Murakami I, Haruta Y, Yokoyama A, Kohno N: A pilot study of the multiherb Kampo medicine bakumondoto for cough in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Phytomedicine* 2011 ; 18 : 625 - 629
3. Doi M, Hattori N, Yokoyama A, Onari Y, Kanehara M, Masuda K, Tonda T, Ohtaki M, Kohno N: Effect of mustard gas exposure on incidence of lung cancer : a longitudinal study. *Am J Epidemiol* 2011 ; 173 : 659 - 666
4. Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Shoda H, Takano A, Nishino R, Okada M, Arihiro K, Inai K, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N: Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a prognostic biomarker in patients with surgically resected nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2011 ; 2 : 377 - 387
5. Nakashima T, Yokoyama A, Ohnishi H, Yamasaki M, Shiode M, Haruta Y, Hattori N, Hozawa S,

- Yamakido H, Kohno N: Chronic hepatitis C virus infection is associated with more severe asthma. *Allergol Int* 2011; 60: 299-304
6. Ishikawa N, Hattori N, Tanaka S, Horimasu Y, Haruta Y, Yokoyama A, Kohno N, Kinnula VL: Levels of Surfactant Proteins A and D and KL-6 Are Elevated in the Induced Sputum of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients: A Sequential Sputum Analysis. *Respiration* 2011; 82: 10-18
 7. Kawase S, Hattori N, Ishikawa N, Horimasu Y, Fujitaka K, Furonaka O, Isobe T, Miyoshi S, Hamada H, Yamane T, Yokoyama A, Kohno N: Change in serum KL-6 level from baseline is useful for predicting life-threatening EGFR-TKIs induced interstitial lung disease. *Respir Res* 2011; 12: 97
 8. Miyamoto S, Hattori N, Senoo T, Onari Y, Iwamoto H, Kanehara M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Yokoyama A, Kohno N: Intra-airway administration of small interfering RNA targeting plasminogen activator inhibitor-1 attenuates allergic asthma in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 301: 908-916
 9. Shiota N, Yokoyama A, Haruta Y, Hattori N, Kohno N: Association of airway inflammation with asthma control level evaluated by the asthma control test. *J Asthma* 2011; 48: 907-913
 10. 横山彰仁: 「COPD の治療・管理 update」増悪期管理の概要. *日本胸部臨床*, 2011; 70: Suppl182-188.
 11. 横山彰仁: 特集 = アレルギー疾患治療の話題 気管支喘息. *MEDICAMENT NEWS* 第 2044 号, pp 6-7, 2011.
 12. 大西広志, 横山彰仁: IPF のバイオマーカー: 間質性肺炎のバイオマーカー KL-6. *呼吸器内科*, 2011; 19: 590-596.
 13. 横山彰仁: 肺機能検査を考える. *呼吸器と循環*, 2011; 59: 955.
 14. 横山彰仁: 吸入ステロイドの選び方 強度, デバイス, 粒子径からみた選択. *医学のあゆみ* 最新の喘息治療薬, 2011; 239: 258-262.
2. 学会発表
- 国際学会
1. M. Sakai, T. Kubota, M. Isaka, T. Yamane, N. Shiota, H. Ohnishi, H. Iwamoto*, A. Yokoyama: Lung Injury Model Using Human MUC1Transgenic Mice. *ATS 2011 Denver International Conference*, 2011.5.14, HYATT REGENCY, Denver
 2. Takashi Yamane, Akihito Yokoyama, Yoshihiro Kitahara, Yoshinori Haruta, Noboru Hattori, Kiminori Yamane, Hitoshi Hara, Nobuoki Kohno: Lung function is inversely related to the incidence of prediabetes. *European Respiratory Society Annual Congress*, 2011.9.26, Amsterdam RAI, Amsterdam
- 国内学会
省略
- 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

慢性閉塞性肺疾患増悪をもたらす呼吸器ウイルス感染症の検討

研究協力者 山 谷 睦 雄

東北大学大学院医学系研究科先進感染症予防学寄附講座教授

研究要旨

1) COPD 増悪抑制が報告されている喀痰調整薬 L-カルボシステインの Respiratory syncytial (RS) ウイルス感染抑制効果を検討した。L-カルボシステインは RS ウイルス感染受容体の一つ ICAM-1 の発現抑制を介して RS ウイルス感染を抑制していることが示唆された。また、炎症性サイトカインの減少作用も認めた。2) COPD 安定期管理薬である、長時間作用性 β 2 刺激薬、吸入用ステロイドおよび配合薬のライノウイルス感染抑制作用を検討した。その結果、感染受容体発現抑制あるいはウイルス RNA 進入抑制を介して、ライノウイルス感染抑制効果を有すると示唆された。また、炎症性サイトカインの減少作用も示唆された。

A. 研究目的

Respiratory syncytial (RS) ウイルス感染は小児の風邪症候群や細気管支炎の原因とみなされてきたが、最近では高齢者にも感染し、冬季の風邪症候群の原因として報告されている。また、ライノウイルスと同様に、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 増悪を惹起することが報告されてきた。RS ウイルス感染は気道上皮細胞に作用して炎症性物質を放出し、COPD 増悪や小児の喘鳴を引き起こすと考えられている。一方で、RS ウイルスに対する抗体を用いた治療法は存在するが、RS ウイルス感染および感染に伴う気道炎症を抑制する薬品は開発されていない。

喀痰調整薬である L-カルボシステインは COPD 患者の風邪症候群の頻度を減少させ、COPD の増悪を抑制する作用が明らかになってきた。しかし、COPD の増悪の原因となる RS ウイルス感染に対する効果は明確になっていない。このため、本年度は L-カルボシステインの RS ウイルス感染抑制作用と抑制機序を明確にするため

に、これまで行ってきた研究をまとめた。すなわち、RS ウイルス感染受容体であるヒト気管上皮細胞におけるヘパラン硫酸発現、活性化 RhoA 発現、細胞接着分子発現に対する抑制作用に関して検討を加えた。

COPD の安定期管理薬として長時間作用性 β 2 刺激薬、吸入用ステロイドが使用され、さらに β 2 刺激薬/吸入用ステロイド配合薬の COPD 増悪抑制効果が報告されている。また、吸入用ステロイドの抗炎症作用が報告されている。他方で、長時間作用性 β 2 刺激薬のライノウイルス感染に伴う炎症性物質の気道上皮細胞からの放出に関しては抑制作用がないと報告がなされ、臨床効果との乖離が認められている。本年度はヒト気管上皮細胞にライノウイルスを感染させ、長時間作用性 β 2 刺激薬、吸入用ステロイドおよび 2 剤の併用による抑制効果を検討した。

B. 研究方法

1) L-カルボシステインの RS ウイルス感染に対する作用を測定するため、ヒト気管上皮細胞を試験

管に培養した。ウイルス感染3日前からL-カルボシステイン (10 μ M) をヒト気管上皮細胞に作用させた。作用時間の作用を測定する際には1, 3, 6, 12, 24時間あるいは3日間作用させた。また、濃度依存性を調べる際には 10^{-9} ~ 10^{-4} MのL-カルボシステインをウイルス感染3日前から作用させた。その後、RSウイルスを 10^4 TCID₅₀ units/ml (TCID₅₀; tissue culture infective dose 50) の濃度で準備し、1時間感染させた。RSウイルスを感染した気道上皮細胞は、ウイルスを除去、洗浄し、培養液で置換した。ウイルス感染後33°Cで回転培養した。ウイルス感染前、感染後24時間、72時間あるいは120時間の時点で培養液を回収し、ウイルス量と炎症性物質であるインターロイキン (IL)-1 β 、IL-6、およびIL-8放出量を測定した。ライノウイルス量の測定は、10倍希釈した培養液をHep2細胞に感染させ、50%細胞変性効果を示す希釈倍率 (TCID₅₀ units/ml) で求めた。感染後、細胞からRNAを抽出し、細胞内RSウイルスRNA量を測定した。インターロイキンはELISA法で測定した。受容体の1つ、細胞接着分子 (ICAM)-1の細胞内発現はRT-PCR法で、培養液遊離ICAM-1蛋白量はEIA法で測定した。

2) ヘパラン硫酸発現量を測定するため、ヒト気管上皮細胞を6-ウエルプレートに培養し、7~10日目に実験に使用した。さらに、培養液にL-カルボシステイン (10 μ M) を添加して細胞を3日間培養した。その後、細胞剥離液を用いて細胞を単離した。細胞を一次抗体 (Monoclonal anti-heparan sulfate) と二次抗体 (goat anti-mouse IgM-FITC) で処理し、フロー・サイトメトリーを用いて細胞表面のヘパラン硫酸発現量を測定した。

3) RSウイルスの受容体である活性化RhoA発現量を測定するため、ヒト気管上皮細胞を6-ウエルプレートに培養し、7~10日目に実験に使用した。さらに、培養液にL-カルボシステイン (10 μ M) を添加して細胞を3日間培養した。LPA (lysophosphatidic acid) を細胞に作用させ、活性化RhoA量をウエスタンブロット法で測定した。

4) 吸入用ステロイドのブデソニドおよび長時間作用性 β 2刺激薬であるフォルモテロールのライノウイルス感染に対する作用を測定するため、ヒト気管上皮細胞を試験管に培養した。ウイルス感染3日前からブデソニド (10 nM)、フォルモテロール (10 nM)、あるいはブデソニド (10 nM) + フォルモテロール (10 nM) をヒト気管上皮細胞に作用させた。その後、ライノウイルスを 10^5 TCID₅₀ units/ml (TCID₅₀; tissue culture infective dose 50) の濃度で準備し、1時間感染させた。ライノウイルスを感染した気道上皮細胞は、ウイルスを除去、洗浄し、培養液で置換した。ウイルス感染後33°Cで回転培養した。ウイルス感染前、感染後24時間、72時間の時点で培養液を回収し、ウイルス量と炎症性物質であるIL-1 β およびIL-6放出量を測定した。ライノウイルス量の測定は、10倍希釈した培養液をヒト胎児線維芽細胞に感染させ、50%細胞変性効果を示す希釈倍率 (TCID₅₀ units/ml) で求めた。インターロイキンはELISA法で測定した。また、ライノウイルスRNAの放出部位である酸性エンドゾームを蛍光色素で染色して検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養は東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

1) ヒト気管上皮細胞から放出されるRSウイルスは、感染によって時間経過とともに、感染後5日間増加した。L-カルボシステイン (10 μ M) の3日間の前処理によって、感染3日後および5日後にRSウイルス放出量は明らかに減少した。前処理の時間を変えた場合、感染前12時間以上の処理によってRSウイルス放出量の減少を認めた。1~6時間のL-カルボシステイン (10 μ M) の前処理はRSウイルス放出量に変化を認めなかった。

2) 濃度依存性に関して、L-カルボシステインは 10^{-7} M (0.1 μ M) から抑制効果を認めた。濃度が高くなるにつれて抑制作用は強く、 10^{-4} Mまで結

果が得られた。臨床では $5\mu\text{M}$ ~ $70\mu\text{M}$ の血中濃度が報告されている。

3) 細胞内の RS ウイルス RNA 複製量は感染 5 日まで増加した。また、L-カルボシステイン ($10\mu\text{M}$) の 3 日間前処理によって、細胞内 RS ウイルス RNA 複製量は感染 3 日後および 5 日後に減少した。

4) RS ウイルスの感染受容体の 1 つである細胞接着分子 (ICAM)-1 の mRNA 発現量は L-カルボシステイン ($10\mu\text{M}$) の 3 日間前処理によって、減少した。また、培養液可溶性 ICAM-1 放出量も L-カルボシステイン ($10\mu\text{M}$) の 3 日間前処理によって、減少した。

5) 細胞内の活性化 RhoA およびヘパラン硫酸発現、および培養液ヘパラン硫酸濃度は L-カルボシステイン ($10\mu\text{M}$) の 3 日間前処理で変化しなかった。

6) RS ウイルス感染によって、ヒト気管上皮細胞から炎症性物質 IL-1 β 、IL-6 および IL-8 の放出量が増加した。L-カルボシステイン ($10\mu\text{M}$) の 3 日間前処理で減少した。

7) ヒト気管上皮細胞培養液において、ライノウイルス感染 3 日目に放出量は最大となった。また、フォルモテロール (10nM)、およびブデソニド (10nM) はそれぞれ単独でライノウイルス放出量を減少させた。フォルモテロール (10nM) + ブデソニド (10nM) の処理はライノウイルス量を減少させた。しかし、フォルモテロール (10nM)、およびブデソニド (10nM) 単独の処理におけるウイルス放出量と比較して有意差を認めなかった。併用によるライノウイルス放出量減少に対する相乗作用は認めなかった。

8) ライノウイルス培養液放出量減少の機序を検討するため、感染受容体 ICAM-1 の培養液放出量を測定した。フォルモテロール (10nM) は減少傾向を示したが、有意差は得られなかった。ブデソニド (10nM) は有意に ICAM-1 の培養液放出量を減少させた。併用効果による ICAM-1 の培養液放出量のさらなる減少効果の傾向は認められた。

9) ライノウイルス RNA の細胞質への進入経路である酸性エンドゾームは数量がフォルモテロール (10^{-8}M) の処理で減少し、酸性エンドゾームから生じる蛍光強度も低下した。他方で、ブデソニド (10nM) は酸性エンドゾームの数量を変化させず、酸性エンドゾームから生じる蛍光強度も変化しなかった。

10) ライノウイルス感染で IL-1 β 放出量および IL-6 放出量は増加した。フォルモテロールおよびブデソニドの処理で減少した。さらに、フォルモテロールおよびブデソニドの併用処理によって、IL-1 β および IL-6 放出量は更に減少した。

D. 考 察

1) 本研究班において、喀痰調整薬 (去痰薬) である L-カルボシステインが風邪の主因であり、COPD 増悪を引き起こすライノウイルス感染を抑制する効果があることをこれまで報告してきた。L-カルボシステインはライノウイルス感染受容体の発現を抑制し、ライノウイルス RNA 進入経路である酸性エンドゾーム機能を抑制して、気道上皮細胞におけるライノウイルス感染を抑制する効果を有する。

また、L-カルボシステインが COPD 患者の風邪罹患および増悪回数を減少する効果を有することを、私たちの施設および当研究班の多施設研究で報告がなされている。COPD 増悪を引き起こすウイルスはライノウイルスはじめ、インフルエンザウイルス、RS ウイルスなど多種が報告されている。

これまで、ライノウイルス感染およびインフルエンザウイルス感染に対する L-カルボシステインの抑制効果と機序について報告してきた。L-カルボシステインはヒト型インフルエンザウイルスの感染受容体である気道上皮細胞膜上の受容体 SA α 2,6Gal の発現抑制とインフルエンザウイルス RNA を細胞質内に放出する経路である細胞質の酸性エンドゾームを減少させ、季節性インフルエンザウイルス感染を抑制する。

本年度の研究より、L-カルボシステインはRSウイルスの感染を抑制し、炎症性物質の放出を減少させることが明らかとなった。機序としては、受容体の1つ、ICAM-1の発現抑制が示された。

2) COPDの安定期管理薬として長時間作用性抗コリン薬（チオトロピウム）に加えて長時間作用性 $\beta 2$ 刺激薬および吸入用ステロイドが使用され、さらに $\beta 2$ 刺激薬/吸入用ステロイド配合薬のCOPD増悪抑制効果が報告されている。また、吸入用ステロイドの抗炎症作用が報告されている。他方で、長時間作用性 $\beta 2$ 刺激薬のライノウイルス感染に伴う炎症性物質の気道上皮細胞からの放出に関しては抑制作用がないと報告がなされ、臨床効果との乖離が認められている。私たちはこれまでCOPD急性期の治療に用いられるステロイドの濃度において、ステロイドがライノウイルス感染を抑制し、炎症性物質の放出を減少させることを報告してきた。また、本邦で長時間作用性 $\beta 2$ 刺激薬として内服で使用され、また短時間作用性 $\beta 2$ 刺激薬として吸入されているプロカテロールがライノウイルス感染を抑制し、炎症性物質の放出を減少させることを報告してきた。

本年度の研究において長時間作用性 $\beta 2$ 刺激薬であるフォルモテロールおよび吸入用ステロイドであるブデソニドがライノウイルスの培養液中への放出を抑制することを明らかにした。また、抑制機序として、ブデソニドは感染受容体のICAM-1の発現を抑制し、フォルモテロールはライノウイルスRNAが細胞質に進入する酸性エンドゾームを減少することを報告した。また、これらの薬品は単独で炎症性物質の放出を減少させた。さらに、併用により、炎症性物質の放出減少は相乗作用を示した。

これまでの報告では長時間作用性 $\beta 2$ 刺激薬のライノウイルス感染に伴う炎症性物質の気道上皮細胞からの放出に関しては抑制作用がないと報告がなされていた。結果の違いの原因は不明であるが、研究に使用した細胞が継代細胞でなく、初代培養細胞であったこと、および培養液の違い

が考えられる。本研究により、長時間作用性 $\beta 2$ 刺激薬、吸入用ステロイドおよび配合薬のCOPD増悪抑制機序として、ライノウイルス感染抑制と気道炎症抑制が関与していることが明らかとなった。

E. 結論

喀痰調整薬L-カルボシステインはライノウイルス感染抑制、季節性インフルエンザ感染抑制に加えて、RSウイルス感染抑制作用を有することが明らかとなった。L-カルボシステインの、ウイルス感染に伴うCOPD増悪抑制効果の機序の1つであると示唆される。さらに、本年度の研究において、長時間作用性 $\beta 2$ 刺激薬、吸入用ステロイドおよび配合薬は感染受容体発現抑制あるいはウイルスRNA進入抑制を介して、ライノウイルス感染抑制効果を有すると示唆された。また、炎症性サイトカインの減少作用も示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaya M, Nishimura H, Hatachi Y, Yoshida M, Fujiwara H, Asada M, Nakayama K, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, Kubo H, Nagatomi R: Procateterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 650 : 431 - 444, 2011
2. Sasaki T, Nakayama K, Yasuda H, Yamaya M: A new strategy with proton pump inhibitors for the prevention of acute exacerbations in COPD. *Ther Adv Respir Dis* 5 : 91 - 103, 2011
3. Asada M, Yoshida M, Hatachi Y, Sasaki T, Yasuda H, Deng X, Nishimura H, Kubo H, Nagatomi R, Yamaya M: L-carbocysteine inhibits respiratory syncytial virus infection in human tracheal epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol* 180 :

112-118, 2012

4. Yamaya M, Nishimura H, Hatachi Y, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, Kubo H, Nagatomi R :

Inhibitory effects of tiotropium on rhinovirus infection in human airway epithelial cells. Eur Respir J (in press)

COPD 患者における葉別の気腫性病変と最大吸気量との関係に関する研究

研究協力者 中野 恭 幸

滋賀医科大学 呼吸器内科 病院教授

研究要旨

最大吸気量は肺全体の低吸収領域と関連が見られ、特に下葉の低吸収領域により強く影響を受ける

A. 研究目的

COPD は進行性で不可逆性の気流閉塞が主な病態である。気流閉塞のため、呼気時にエアートラッピングをきたし、肺の過膨張をきたす。動的肺過膨張は最大吸気量（IC）の減少に反映され、結果として労作時呼吸困難、運動耐容能の低下をもたらす。低吸収領域（Low attenuation Volume; LAV%）と肺機能検査の間には良好な関係があることがよく知られているが、IC と葉別の気腫性変化との関係についての報告は少ない。本研究では IC と葉別の気腫性変化の関係について検討することを目的とする。

B. 研究方法

75 人の COPD 患者に対して、胸部 CT と肺機能検査を施行した。CT データを用い 3 次元的に定量的画像解析を行った。葉別の LAV% を -910HU を閾値として算出し、IC と葉別の LAV% についての関係を評価した。葉ごとの LAV% と肺機能検査との関連は、Spearman's rank test を用い、有意差は $p < 0.05$ とした。

（倫理面への配慮）

参加した患者よりインフォームドコンセントをとった。患者のデータは匿名化し、個人が特定できないようにした。

C. 研究結果

対象患者 75 名の平均年齢は 66 歳であり、重症度は GOLD I が 7 人、GOLD II が 31 人、GOLD III、IV が 37 人であった。全肺の LAV% と IC は有意な相関関係を示した ($r = 0.301$, $p = 0.01$)。右肺と左肺の LAV% はそれぞれ IC と有意な相関関係を示した ($r = -0.276$, $p = 0.021$, $r = -0.31$, $p = 0.009$)。右肺においては、右上葉と中葉の LAV% は IC と有意な相関関係を示さなかったが ($p = 0.062$, $p = 0.364$)、右下葉の LAV% は IC と有意な相関関係を示した ($r = -0.3984$, $p < 0.01$)。左肺に関しては、左上葉と下葉の LAV% は IC と有意な相関関係を示したが ($r = -0.241$, $p = 0.045$, $r = -0.431$, $p < 0.01$)、下葉により強い相関関係が見られた。

D. 考 察

IC は、VC や TLC が LAV% と関連しているという以前の報告と同様に、LAV% と相関関係を示した。また、下葉の LAV とより強い相関関係を示したことから、下葉の気腫性病変がより IC と強く関連すると考えられた。

E. 結 論

IC は肺全体の LAV と関連が見られ、上葉よりも下葉の LAV により強く影響を受けると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wada H, Seto R, Yamada H, Nagao T, Hajiro T, Nakano Y: Respiratory Failure of Williams-Campbell Syndrome is Effectively Treated by Noninvasive Positive Pressure Ventilation. *Internal Medicine* 50 : 1729 - 1732, 2011
2. Seto R, Yamada H, Wada H, Osawa M, Nagao T, Nakano Y: Diffuse alveolar haemorrhage may be associated with intravitreal injection of bevacizumab in a patient with systemic risk factors. *BMJ Case Reports* 2011 doi : 10.1136/bcr.08.2010.3224, 2011
3. 龍神 慶, 中野恭幸 : 画像 - 胸部単純写真とCT. *総合臨床*, 60 (4) : 556 - 560, 2011
4. 龍神 慶, 中野恭幸 : 【呼吸器の病気のすべて】呼吸器の検査 CT検査. *からだの科学*, 268 : 27 - 32, 2011
5. 中野恭幸 : 循環器外来における COPD の簡便なスクリーニング法の検証 - 電子式携帯型 FEV1/FEV6 メータ (PiKo-6) と COPD 質問票の併用の有用性 -. *Essential for Physicians* 2, 2011.
6. 中野恭幸 : 大津市医師会 COPD 連携パス ~ 運用の実際と目指すところ ~. *大津市医師会誌*, 34 (6) : 26 - 28, 2011.
7. 中野恭幸 : CT 検査からだの科学 2011. 冬号 : 2, 2011.
8. 中野恭幸 : COPD 新ガイドラインにおける薬物療法. *日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌*, 20 : 134 - 137, 2011

2. 学会発表

国際学会

1. Wada H, Masuda G, Ryujin Y, Oguma T, Yamada H, Nagao T, Suzuki H, Kawata Y, Niki N, Nakano

Y: Evaluation of airway dimensions during respiration. *Joint Meeting combining, The 3rd meeting of the Japanese Society of Pulmonary Functional Imaging and 5th International Workshop for Pulmonary Functional Imaging (2011.01.28-30 Hyogo, Japan)*

2. Yamaguchi M, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Hirai T, Nakano Y, Mishima M : Dynamic property of central airway walls as assessed by computed tomography (CT) : Correlation with asthma pathophysiology. *Joint Meeting combining, The 3rd meeting of the Japanese Society of Pulmonary Functional Imaging and 5th International Workshop for Pulmonary Functional Imaging (2011.01.28-30 Hyogo, Japan)*
3. Tani S, Noma K, Suzuki H, Saita S, Kawata Y, Niki N, Miyazaki M, Nakano Y: Analysis of respiratory movement using 4-dimensional chest CT image. *Joint Meeting combining, The 3rd meeting of the Japanese Society of Pulmonary Functional Imaging and 5th International Workshop for Pulmonary Functional Imaging (2011.01.28-30 Hyogo, Japan)*
4. Matsuhira M, Saita S, Kawata Y, Niki N, Nakano Y, Mishima M, Ohmatsu H, Eguchi K, Kaneko M, Moriyama N: Segmentation of thoracic organs from multi-slice CT images. *Joint Meeting combining, The 3rd meeting of the Japanese Society of Pulmonary Functional Imaging and 5th International Workshop for Pulmonary Functional Imaging (2011.01.28-30 Hyogo, Japan)*
5. Saita S, Kawata Y, Niki N, Ohmatsu H, Tsuchida T, Eguchi K, Kaneko M, Moriyama N, Nakano Y, Mishima M: Clinical chest CAD system for Lung Cancer, COPD, and Osteoporosis based on MDCT images. *Joint Meeting combining, The 3rd meeting of the Japanese Society of Pulmonary Functional Imaging and 5th International*

*Workshop for Pulmonary Functional Imaging
(2011.01.28–30 Hyogo, Japan)*

6. Kawata Y, Hosokawa K, Niki N, Umetani K, Nakano Y, Ohmatsu H, Moriyama N, Itoh H: Human pulmonary acinar airspace segmentation from three-dimensional synchrotron radiation micro CT images of the secondary pulmonary lobule. *SPIE Medical Imaging (Feb. 2011. Florida, USA,)*
7. Matsuhiro M, Kawata Y, Niki N, Nakano Y, Ohmatsu H, Ohmatsu H, Tsuchida T, Eguchi K, Kaneko M, Moriyama N: Classification algorithm of lung lobe for lung disease cases based on multi-slice CT images. *SPIE Medical Imaging (Feb. 2011. Florida, USA,)*
8. Niki N, Kawata Y, Suzuki H, Harada M, Otsuka H, Ueno J, Shimada M, Takayama T, Abe M, Itoh H, Kaneko M, Eguchi K, Kusumoto M, Tsuchida T, Ohmatsu H, Takahashi M, Nakano Y, Sakai H: Computer-aided diagnosis based on computational anatomical models: progress overview FY2010. *The 2nd International Symposium on the Project “Computational Anatomy”.* (2011.03.06–07 Nagoya)
9. Miwa Takemura Fumiko Kawanishi, Kuniko Yoshio, Akiko Furukawa, Shinichi Kinjyo, Kanae Kawai, Yasutaka Nakano, Hanako Misao: Risk factors for the colonization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a neonatal intensive care unit. *APIC.* (2011.06.27–29 Baltimore)
10. Wada. H, Nguyen Van. T, Le Thi Huyen. T, Kanda. R, Ryujin. Y, Yamaguchi. M, Oguma. T, Nagao, Ogawa. E, Le Thi Tuyet. L, Nakano. Y: The relationship between inspiratory capacity and emphysematous changes assessed by CT in Vietnamese COPD patients. *ERS.* (2011.9.24 – 28 Amsterdam)

国内学会

1. 細川拓也, 河田佳樹, 仁木 登, 中野恭幸, 大松広伸, 梅谷啓二, 森山紀之, 伊藤春海: 放射光 CT 画像による肺二次小葉の構造解析. 医用画像研究会. (2011.01.19–20 那覇市)
2. 小熊哲也: 気管吸引に必要な呼吸生理と解剖. 平成 22 年度滋賀県理学療法士会特別研修会. (2011.02.13 大津)
3. 高橋英治, 河田佳樹, 仁木 登, 中野恭幸, 大松広伸, 西谷 弘, 森山紀之: 胸部マルチスライス CT 画像を用いた骨粗鬆症診断支援システム. 第 18 回日本 CT 検診学会学術集会. (2011.02.18–19 岡山)
4. 松廣幹雄, 財田伸介, 河田佳樹, 仁木 登, 中野恭幸, 三嶋理晃, 大松広伸, 土田敬明, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之: マルチスライス CT 画像の胸部構造解析. 第 18 回日本 CT 検診学会学術集会. (2011.02.18–19 岡山)
5. 鈴木秀宣, 河田佳樹, 仁木 登, 大松広伸, 土田敬明, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之, 中野恭幸, 三嶋理晃: マルチスライス CT 画像を用いた COPD の解析. 第 18 回日本 CT 検診学会学術集会. (2011.02.18–19 岡山)
6. 榊田 元, 長尾大志, 重森 度, 坂下拓人, 神田理恵, 龍神 慶, 和田 広, 山田英人, 小熊哲也, 山口将史, 中野恭幸: 当科における Bevacizumab が奏功した 1 例. 第 21 回滋賀癌化学療法研究会. (2011.02.26 草津)
7. 中野恭幸: 生物学的製剤投与時の安全管理について. 滋賀乾癆治療セミナー. (2011.03.11 草津)
8. 龍神 慶: 第 3 回 COPD アンケート調査結果: 禁煙と COPD への 5 年間にわたる取り組みとその結果. 第 6 回滋賀 COPD 研究会. (2011.03.12 草津)
9. 鈴木秀宣, 野間和夫, 河田佳樹, 仁木 登, 宮崎正義, 中野恭幸: 4 次元 CT 画像を用いた呼吸動態解析. 第 6 回京滋呼吸器リサーチ

フォーラム. (2011.04.09 京都)

10. 河田佳樹, 細川拓也, 仁木 登, 梅谷啓二, 中野恭幸, 大松広伸, 森山紀之, 伊藤春海: 放射線 CT 画像を用いた肺 2 次小葉のミクロ構造解析. 第 6 回京滋呼吸器リサーチフォーラム. (2011.04.09 京都)
11. 春名 茜, 繁郎 室, 西村尚志, 星野勇馬, 小川恵美子, 平井豊博, 中野恭幸, 西村浩一, 三嶋理晃: COPD の予後についての検討. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会. (2011.4.22 - 23 東京)
12. 長尾大志, 大澤 真, 坂下拓人, 重森 度, 榊田元, 龍神 慶, 和田 広, 山田英人, 山口将史, 小熊哲也, 中野恭幸: 臨床研修医が呼吸器内科を専門分野に選択するには. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会. (2011.4.22 - 23 東京)
13. 中野恭幸: COPD の診断と治療. 平成 23 年度滋賀県薬剤師会認定禁煙支援薬剤師研修会. (2011.07.3 大津).
14. 中川雅登, 坂下拓人, 神田理恵, 龍神 慶, 福永健太郎, 和田 広, 小熊哲也, 山口将史, 長尾大志, 小川恵美子, 中野恭幸: 左心房内に腫瘍が浸潤した肺小細胞癌の一例. 第 107 回日本結核病学会・第 77 回日本呼吸器学会. (2011.7.23 大阪)
15. 河島 暁, 中川雅登, 坂下拓人, 神田理恵, 福永健太郎, 龍神 慶, 和田 広, 伊藤まさみ, 小熊哲也, 山口将史, 長尾大志, 中野恭幸: Lambert-Eaton 筋無力症候群合併小細胞肺癌の一例. 第 77 回日本呼吸器学会近畿地

方会. (2011.7.23 大阪)

16. 柏木裕美子, 龍神 慶, 坂下拓人, 和田 広, 小熊哲也, 山口将史, 大澤 真, 長尾大志, 小川恵美子, 中野恭幸: 非免疫不全患者に発症した播種性非結核性抗酸菌感染症の一例. 第 107 回日本結核病学会近畿地方会. (2011.7.23 大阪)
17. 小熊哲也: 肺胞たんぱく症に気管支喘息を合併した 1 例. 第 10 回京滋呼吸器疾患勉強会. (2011.10.15 京都)
18. 中野恭幸: CT による動態解析と微細構造解析. 第 20 回 *Pneumo Forum*. (2011.11.26 東京)
19. 重森 度, 月野光博, 渡邊勇夫, 内田泰樹, 山口将史, 中野恭幸, 長尾大志, 小熊哲也: 進行肺癌に伴う上大静脈症候群に対して血管内ステント治療が著効した一例. 第 78 回日本呼吸器学会近畿地方会. (2011.12.3 大阪)
20. 児玉浩志, 龍神 慶, 中川雅登, 坂下拓人, 神田理恵, 福永健太郎, 和田 広, 伊藤まさみ, 小熊哲也, 山口将史, 長尾大志, 小川恵美子, 中野恭幸: 肺血流シンチグラムにより診断に至った肝肺症候群の一例. 第 78 回日本呼吸器学会近畿地方会. (2011.12.3 大阪)

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

特発性肺動脈性肺高血圧に関する研究

研究分担者 草野研吾, 中村一文, 赤木 達, 三浦 綾, 伊藤 浩

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科循環器内科

研究要旨

高容量 PGI₂ は Fas リガンドの上昇を介して特発性肺動脈性肺高血圧患者の肺動脈平滑筋細胞のアポトーシスを誘導する。

A. 研究目的

特発性肺動脈性肺高血圧（IPAH）患者に対する高容量 PGI₂ (>40ng/kg/min) が、肺動脈平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し、肺高血圧を改善させる可能性があるが、その詳細なメカニズムについては不明である。今回、アポトーシス誘導効果に関する Fas リガンドの関与について検討した。

B. 研究方法

IPAH 患者から得られた肺動脈平滑筋細胞の培養系を用い、高容量 PGI₂ が肺動脈平滑筋細胞に及ぼす効果を TUNEL, caspase 3, 7 assay, 透過型電顕にて検討した、また血清 Fas リガンド濃度と PGI₂ 投与量の相関についても検討した。

(倫理面への配慮)

当大学の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

TUNEL, caspase assay, 透過型電顕, いずれも高濃度 PGI₂ によるアポトーシス誘導効果が確認された。同時に Fas リガンドは mRNA レベルで 3.98 倍, 蛋白レベルで 1.70 倍に上昇していたが, PGI₂ 受容体拮抗薬によってこれらの効果や細胞内 cAMP 上昇効果は消失した。さらに PGI₂ 投与量と IPAH 患者 Fas リガンド濃度は正相関を認め

た ($r = 0.57, p < 0.0001$)。

D. 考察

IPAH に対する治療として PGI₂ は確立した治療法であり、その効果は血管拡張作用によってもたらされるとされている。今回の結果から、PGI₂ の肺動脈平滑筋細胞に対する強いアポトーシス誘導作用が証明されたことは、PGI₂ の長期投与による血管の negative リモデリングが導かれることが示唆され、こうした血管構造の再構築をターゲットとした治療が今後有効となる可能性が考えられた。

E. 結論

高容量 PGI₂ は、Fas リガンド上昇を介して肺高血圧患者の肺動脈平滑筋細胞のアポトーシスを誘導する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kusano, KF: Treatment of pulmonary vascular disease including lung transplantation. Gen Thorac Cardiovasc Surg 59, 538-546, 2011

2. Akagi S, Nakamura K, Matsubara H, Kusano KF, Kataoka N, Oto T, Miyaji K, Miura A, Ogawa A, Yoshida M, Ueda-Ishibashi H, Yutani C, Ito H: Prostaglandin I (2) induces apoptosis via upregulation of Fas ligand in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol* 2011 Epub
3. Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura D, Fuke S, Nishii N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Miura A, Yutani C, Ohe T, Ito H: Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary artery hypertension. *Int J Cardiol* 2011 Epub
4. Ogawa A, Nakamura K, Mizoguchi H, Fujii N, Fujio H, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Prednisolone ameliorates idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 183: 139-140, 2011

2. 学会発表

国際学会

1. Akagi S, Nakamura K, Matsubara H, Kusano KF, Ito H: Prostaglandin I2 induces apoptosis via upregulation of Fas ligand in pulmonary artery smooth muscle cells from idiopathic pulmonary arterial hypertension. ESC 2011, Paris
2. Fuke S, Kusano KF, Tanaka M, Ogawa A, Nagase S, Nakamura K, Sato T, Ujihira T, Ito H: Difference in right ventricular adaptation to afterload between patients with pulmonary hypertension in mild stage and patients with left-sided heart failure. ESC 2011, Paris
3. Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura A, Miura D, Kohno K, Morita H, Ito H: Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from

patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. ESC 2011, Paris

4. Miura A, Nakamura K, Kusano KF, Matsubara H, Ito H: Diameter variations of pulmonary capillary vessels in patients with pulmonary hypertension using scanning electron microscope. ESC 2011, Paris

国内学会

1. 斎藤幸弘ら：肺動脈性肺高血圧症患者におけるニカルジピンによる急性肺血管反応正史権の安全性と有用性。第59回日本心臓病学会，神戸
2. 福家総一郎ら：肺高血圧では肺動脈圧波形の augmentation index は増大している。第59回日本心臓病学会，神戸
3. Akagi S, et al: Prostaglandin I2 induces apoptosis via upregulation of Fas ligand in pulmonary artery smooth muscle cells of idiopathic pulmonary hypertension. 第75回日本循環器学会
4. Fuke S, et al: Assessment of right ventricular function in patients the early stage of pulmonary hypertension. 第75回日本循環器学会，福岡
5. Ogawa A, et al: Antiproliferative effect of bosentan in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. 第75回日本循環器学会，福岡
6. Nakamura K, et al: Pro-apoptotic effects of imatinib on pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension -role of Akt-. 第75回日本循環器学会，福岡

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
特記事項なし

研 究 報 告

呼吸不全に関する基礎研究：COPDを中心に

長瀬 隆英¹, 幸山 正¹, 三谷 明久¹, 石井 聡²

東京大学大学院医学系研究科呼吸器内科学¹, 秋田大学大学院医学系研究科生体防御学²

はじめに

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。

呼吸不全を呈する呼吸器疾患発症に関しては, 種々の化学物質が複雑に関与していると考えられ, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 等のサイトカインなどが関与している可能性が報告されている。しかし, サイトカイン以外のメディエーターとの関連については, 十分な検討がなされていない。また, 治療の標的が不明確であるため, 有効な治療法, 治療薬も存在せず, 画期的な新治療法の開発が急務とされている。

COPD の病変は, 末梢気道および間質における炎症が主因と想定されている。その炎症進展の機序は, 喫煙など外的刺激物質の関与により炎症細胞と生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられる。しかしながら COPD 発症の分子機構については未だ解明されていない。今回我々は, COPD の病変を, 「異常な線維化による臓器障害」という視点からアプローチすることを試みる。COPD は, 肺胞壁・間質における弾性組織の不可逆的な変性・減少を特徴とするが, これは末梢気道および間質における炎症・線維化異常が極まった状態である可能性がある。一

方, 逆方向の線維化異常の場合は, 肺線維症へと向かうものである。

近年, COPD, 間質性肺炎, 気管支喘息などは, いずれも免疫・炎症を主体とする病態であると想定されている。これらの免疫・炎症性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る。今回, 我々は, その機序を解明する手法の一端として, In vitro 気道リモデリング解析法を開発・応用した。これは, 1 種類の蛋白質と 1 種類の細胞系よりなる, 究極に単純化された人工的肺・気管支モデルであり, Gel contraction 法と呼ばれる。

本研究では, 近年, その生理学的意義が注目されている各種メディエーターなどに着目し, 呼吸不全を呈する呼吸器疾患発症との関連を探索する。

対象と方法

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

LTC₄/D₄/E₄ など cysteinyl LT の受容体 (CysLT1-R, CysLT2-R) は肺・気管支に豊富に存在し, 気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。特に, CysLT2-R は大きく注目されているが, その機能は未だに解明されていない。本研究では, この CysLT2-R を標的とした KO, Tg マウスの新規作成にも着手する。これらのマウスを用いて, 脂質性メディエーターと炎症性肺疾患との関連について評価・検討を加える。

<転写コアクチベーター TAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーター TAZ の遺伝子改変マウスを作成し, 呼吸器系における病態生理学的意義

および呼吸器疾患発症への関与の可能性を探索する。まず始めに、TAZ ノックアウトマウスの作成と解析に着手する。

<In vitro 気道リモデリング>

<Gel contraction 法>

Type I collagen 作成: Rat の Tail から腱を摘出し腱鞘, その他の結合組織を注意深く取り除いた後, 0.9%NaCl 10 mM Tris pH 7.5, 50% Ethanol, 75% Ethanol, 95% Ethanol で洗浄する。6 mM HCl 300 ~ 400 ml 4℃で一昼夜 Staring することにより Type I collagen を抽出する。Sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE で type I collagen 以外の蛋白が混入していないことを確認する。collagen 濃度はそれぞれの lot から乾燥重量を測定して求めた。

<3 次元的培養:>

抽出した Type I collagen を 4 倍濃度の DMEM と蒸留水とで生理的浸透圧に調整する。最終 collagen 濃度を 0.75 mg/ml に調節後 3 X 10⁵ cells/ml 細胞濃度でゲル内に線維芽細胞を加える。24 well プレートで 0.5 ml/well になるようゲルを入れ 20 分でゲル化させる。固まったゲルの周囲を plate 壁から切り離し, 各種試薬が添加された 6 cm dish (5 ml DMEM) 内に浮遊させる (図 1)。

<収縮能測定:>

上記方法により線維芽細胞は Type I collagen 内

で 3 次元的に培養される。そして線維芽細胞はこのゲルのなかでその収縮能によりゲルを引っ張る。その収縮能はゲルのサイズを計測することにより求めることができる。変化するゲルのサイズは CD カメラでコンピューターに取り込み計測する (図 2)。

(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

Floating gels in the media

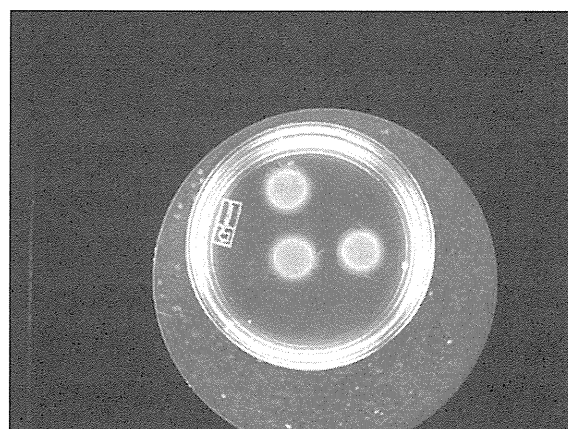
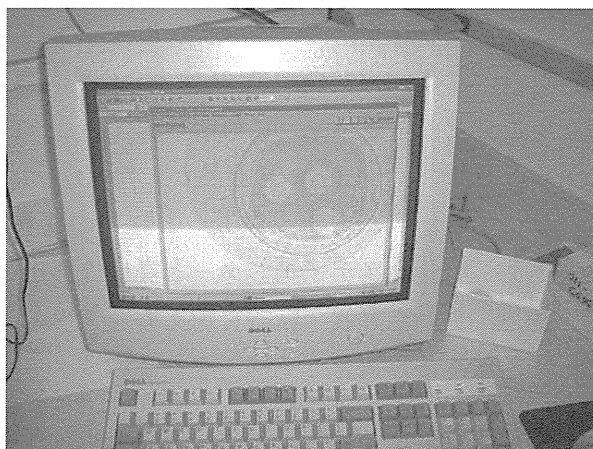


図 1. Gel contraction 法: Floating gels in the media

Gel contraction assay



Gelを浮かせている培養液に検討する物質(例えば PGE₂、PGD₂、PGI₂、TXA₂)を添加しgelの面積を計測する。この面積の変化を contractionの程度として評価する。

図 2. Gel contraction 法

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。

結 果

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

キメラマウスの中で、germ line にノックアウト DNA コンストラクトが移行したのを選び、ヘテロ接合体を得た (図 1)。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体 CysLT2-R ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体 CysLT2-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。目下、バッククロスによる遺伝的純化が完了し、疾患モデルを用いた解析が進行中である。

<転写コアクチベーター TAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーター TAZ ノックアウトマウスの作成に着手した。キメラマウスの中で、germ line にノックアウト DNA コンストラクトが移行したのを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体 TAZ ノックアウトマウスが得られた。なお外表所見上では重大な奇形を生じていないが、9 ヶ月令 TAZ ノックアウトマウス個体の肺の組織標本において、肺胞の異常が示された。

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。

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、気腔の拡張が増大していた。

<In vitro 気道リモデリング>

Gel contraction 法の開発がなされ、再現性の確認がなされた。

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、ARDS、特発性間質性肺炎は、難治性において他に類をみない程、重篤な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。肺炎や気管支喘息は、世界的にも発症頻度、死亡率が増大しつつあり、画期的な治療薬の開発が期待されている。これら炎症性呼吸器疾患の発症分子機構は、極めて複雑であり、より一層の研究が必要である。

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

また、呼吸器系において、正常の肺・気管支では、線維芽細胞は炎症後の創部へと遊走し、コラーゲンなどの細胞外器質を産生し欠損部をうめる。さらに創傷治癒の終盤には創部を収縮させて創傷治癒を完成させる。しかし、この過程に異常が生じた場合は組織修復はうまくいかず、機能障害を引き起こす。とくに末梢気道周囲で過度の収縮が生じた場合は気流制限を引き起こし COPD や気管支喘息の増悪に関与する。今回開発に着手した in vitro 気道リモデリング系は、末梢気道周囲において増加した線維芽細胞とコラーゲンが作り出

す収縮について検討できるモデルであると考えられる。

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¹⁻⁴⁾。

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。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（難治性

疾患克服研究事業）の助成によりなされたものである。

参考文献

1. Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, et al: Multiple renal cysts with concentration defects and pulmonary emphysema in mice lacking TAZ. *Am J Physiol* 2008; 294: F542-53
2. Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, et al: Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 326-338.
3. Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, et al: Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2010; 337: 77-81
4. Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H, et al: 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* 2010; 36: 12-24
5. Kage H, Sugimoto K, Sano A, et al: Suppression of transforming growth factor β 1 in lung alveolar epithelium-decells using adeno-associated virus type 2/5 vectors to carry short hairpin RNA. *Exp Lung Res* 2011; 37: 175-185
6. Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, et al: Simultaneous stimulation with TGF- β 1 and TNF- α induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155: 119-128

COPD の全身性影響についての研究： 気腫病変とやせ症状に対する治療法の開発

辻 隆夫, 青柴 和徹, 有村 健, 永井 厚志

東京女子医科大学第一内科学

はじめに

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) はやせ症状や心血管病変, 骨粗鬆症などの多彩な併存症を伴う全身性疾患である。COPD の全身併存症の治療法の開発は, 増加しつつある COPD 患者の予後や QOL を改善するために重要な医学的および厚生労働行政上の課題である。COPD の発症機序は未だ不明であるが, 近年, COPD の新しい発症仮説として肺や全身組織の血管新生能の低下が注目されている。例えばヒトの気腫肺の検討では, 健常肺に比べて肺胞の血管床が減少していることが知られているが, マウスを用いた動物実験でも血管内皮成長因子 (VEG) のシグナルを阻害すると気腫病変が誘導されることが報告されている^{1,2)}。さらに最近の研究では, COPD 患者では, 肺組織だけではなく全身組織における血管新生能が低下していることから, endothelial phenotype という COPD のフェノタイプ分類も提唱されている³⁾。一方私たちは, マウスの喫煙肺気腫モデルにおいては皮下脂肪組織の血管新生能が低下するために, 脂肪新生が抑制されて体重が減少する原因になることを明らかにしている⁴⁾。そこで今年度の研究では, エラスターゼ誘起肺気腫マウスを用いて, 強力な血管新生促進物質である E-prostanoid 2 (EP2) 受容体作動薬 ONO-AE1-259 の全身投与が, 気腫病変や皮下脂肪の減少 (やせ症状) を改善させるかについて検討した。

対象と方法

本研究は東京女子医科大学実験動物倫理委員会の許可を得て行われた。8 週齢雄性 C57BL/6J マ

ウスを 4 群 (生食対照群, 生食 + ONO-AE1-259 群, エラスターゼ + 生食群, エラスターゼ + ONO-AE1-259 群) に分けて検討を行った。エラスターゼ + 生食群およびエラスターゼ + ONO-AE1-259 群には気管内に豚豚エラスターゼ (2.5 U, Sigma Chemical Co.) を注入して気腫病変を誘導した。生食対照群および生食 + ONO-AE1-259 群には同量の生食のみを気管内に注入した。エラスターゼまたは生食の気管内投与の 4 週間後から ONO-AE1-259 (100 μ g/kg, 小野薬品から供与; 生食 + ONO-AE1-259 群およびエラスターゼ + ONO-AE1-259 群) または生食 (生食対照群およびエラスターゼ + 生食群) を週 5 日間, 4 週間連続して腹腔内に注射した。エラスターゼまたは生食の気管内投与前から ONO-AE1-259 または生食の腹腔内注射終了後まで, 定期的に 1 日当たりの摂餌量と, 飼育ケージ内に設置された回転板の回転数から運動量を測定した。その後, 肺組織および全身の皮下脂肪組織, 内臓脂肪組織, 腓腹筋を摘出した。摘出臓器については, それぞれの湿重量を測定後, 一部を mRNA およびタンパク質解析用に凍結保存し, 残存組織は 10% 中性ホルマリンで固定してパラフィン包埋切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。肺組織については 25 cmH₂O 圧で経気道的にホルマリン拡張固定を行い, 形態計測に用いた。

結 果

エラスターゼ + 生食群の肺組織では平均肺胞壁間距離 (Lm) が増大して気腫病変が形成されるとともに, 肺血管床 (平均肺胞血管床容積) が減少していた (図 1)。エラスターゼ + ONO-AE1-259