

図 5. 経年変化による病型の特徴

表 3. ロジスティック回帰分析 – Rapid decliners vs. Slow decliners

	肺拡散能力 (% Kco) を除外			肺気腫スコアを除外		
	オッズ比 (95% 信頼区間)	p-value		オッズ比 (95% 信頼区間)	p-value	
肺気腫スコア	1.46	(1.01 to 2.11)	0.047			
肺拡散能力: % Kco (10%)				0.84	(0.73 to 0.96)	0.014
1 秒量 (% predicted)	1	(0.99 to 1.02)	0.66	1	(0.99 to 1.02)	0.75
1 秒量の可逆性	1.01	(0.98 to 1.05)	0.45	1.02	(0.98 to 1.06)	0.36
末梢血好中球数 (100 cells/ μ l)	1.03	(1.00 to 1.07)	0.036	1.04	(1.01 to 1.07)	0.021
末梢血好酸球数 (10 cells/ μ l)	0.98	(0.95 to 1.01)	0.12	0.98	(0.95 to 1.01)	0.12
慢性気管支炎症状	1.47	(0.50 to 4.36)	0.49	1.34	(0.44 to 4.11)	0.61
MRC 息切れスケール ≥ 2	0.85	(0.33 to 2.23)	0.75	0.77	(0.30 to 2.02)	0.6
喫煙の有無	0.84	(0.35 to 1.98)	0.68	0.7	(0.30 to 1.76)	0.42
増悪の頻度 (events/y)	1.17	(0.54 to 2.54)	0.69	1.16	(0.54 to 2.52)	0.7
年齢 (y)	0.99	(0.94 to 1.03)	0.52	0.98	(0.94 to 1.03)	0.39
性別: Female sex	0.2	(0.02 to 1.67)	0.14	0.22	(0.03 to 1.85)	0.16

表 4. ロジスティック回帰分析 – Sustainers vs. Decliners

	肺拡散能力 (% Kco) を除外			肺気腫スコアを除外		
	オッズ比 (95% 信頼区間)	p-value		オッズ比 (95% 信頼区間)	p-value	
肺気腫スコア	0.68	(0.47 to 0.99)	0.042			
肺拡散能力: % Kco (10%)				1.21	(1.06 to 1.38)	0.004
1 秒量 (% predicted)	1	(0.98 to 1.01)	0.58	1	(0.98 to 1.02)	0.9
1 秒量の可逆性	0.98	(0.95 to 1.01)	0.23	0.98	(0.94 to 1.01)	0.19
末梢血好中球数 (100 cells/ μ l)	1.01	(0.98 to 1.04)	0.51	1.01	(0.98 to 1.04)	0.71
末梢血好酸球数 (10 cells/ μ l)	1.04	(1.01 to 1.06)	0.007	1.03	(1.01 to 1.06)	0.013
慢性気管支炎症状	2.68	(1.14 to 6.30)	0.024	2.97	(1.24 to 7.12)	0.014
MRC 息切れスケール ≥ 2	0.84	(0.37 to 1.91)	0.67	0.91	(0.39 to 2.11)	0.82
喫煙の有無	0.99	(0.48 to 2.07)	0.99	1.23	(0.59 to 2.57)	0.58
増悪の頻度 (events/y)	0.98	(0.41 to 2.34)	0.97	1.04	(0.43 to 2.50)	0.94
年齢 (y)	0.97	(0.93 to 1.01)	0.13	0.98	(0.94 to 1.02)	0.29
性別: Female sex	1.14	(0.31 to 4.20)	0.84	1.01	(0.27 to 3.72)	0.99

において、すべての COPD が Fleture & Peto のダイアグラムに示されるような経年低下をするわけではなく、一部の COPD 症例では、充分治療効果が期待でき、肺機能を保たせられることを示している。

第二に、この 1 秒量の経年変化の寄与因子を解析すると、COPD の病期を表す、気流閉塞の程度ではなく、肺気腫病変の重症度が、1 秒量の急速低下に関連することを明らかにしている。

1 秒量の経年変化を解析する際、少なくとも 5 年以上の長期間の観察が必要であること、またその間になるべく多くの 1 秒量の測定ポイントが必要であることが報告されている⁴⁾。本研究では、5 年間に、11 回の肺機能検査があり、測定回数の中央値は 11 回、25%位が 9 回であり、60%以上の COPD 症例が 5 年間 11 回の検査を完遂している。

1 秒量の経年低下に関与する独立した因子として、喫煙コントロール、頻回な増悪、薬物治療が報告されているが⁵⁻⁹⁾、この 3 群間において、喫煙、増悪、気管支拡張薬治療の程度に、有意差を認めていない。

さらに、1 秒量の急速低下に関するロジスティック解析の結果でも、これら肺気腫病変の進行、肺拡散能力の低値は、1 秒量の急速低下と関連が示された。

今後、遺伝的要因も含め、急速進行する病型とその機序を解明することは、臨床的に重要と考えられる。

結 論

- * 適切な治療下で追跡調査された COPD 症例において、1 秒量の経年低下は、さまざまであり、一部、ほとんど経年変化を認めない症例も存在する。
- * 一方、1 秒量の経年低下が大きい、急速進行例が存在し、その独立した寄与因子は、肺気腫病変が強い、あるいは肺拡散能力が低いことである。

謝 辞

呼吸器疾患コホート研究所：足利秀香，
近藤絢子，高木優子

参考文献

1. Makita H, Nasuhara Y, Nagai K, et al: Characterisation of phenotypes based on severity of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2007 ; 62 : 932-7
2. 日本呼吸器学会：COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン第 3 版. 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第 3 版作成委員会 (編): メディカルレビュー社, 東京, 2009
3. 日本呼吸器学会肺生理専門委員会：呼吸機能検査ガイドライン—スパイロメトリー, フローボリューム曲線, 肺拡散能力—. メディカルレビュー社, 東京, 2004
4. Burrows B: An overview of obstructive lung diseases. *Med Clin North Am* 1981 ; 65 : 455
5. Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, et al: Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study. *JAMA* 1994 ; 272 : 1497
6. Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, et al: Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 ; 161 : 381
7. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA: Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002 ; 57 : 847. Erratum in : *Thorax* 2008 ; 63 : 753
8. Decramer M, Celli B, Kesten S, et al: UPLIFT investigators. Effect of tiotropium on outcomes in patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease (UPLIFT): a prespecified subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 2009 ; 374 : 1171
9. Celli BR, Thomas NE, Anderson JA, et al: Effect of pharmacotherapy on rate of decline of lung function in chronic obstructive pulmonary disease : results from the TORCH study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 ; 178 : 332

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

和田 広, Nguyen Van Tho, 中野 恭幸

滋賀医科大学呼吸器内科

はじめに

COPD は進行性で不可逆性の気流閉塞が主な病態となっている疾患である¹⁾。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) の減少に反映されるとされており、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%) や気道壁厚 (Wall Area % ; WA%) 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。

対象と方法

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 データは、Pulmonary Workstation 2 (VIDA Diagnostics) を用いて 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。

結果

対象患者 75 名の平均年齢は 66.29 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 (Table 1)。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、

Table 1.

Characteristics of COPD subjects

Number	75
Sex(M/F)	72/3
Age (±SD)	66.29±9.92
Pack-year	33.89±18.4
MRC	2.04±0.91
BMI	22.13±3.52
FEV ₁	1.30±0.56
%FEV ₁	52.5±19.3
Severity Mild (GOLD stage I)	7
Moderate (GOLD stage II)	31
Severe (GOLD stage III,IV)	37
IC	1.47±0.61

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 (Fig 1, 2)。

Correlation between IC and LAV% of left upper lobe

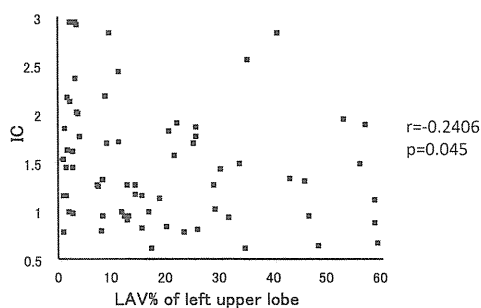


Figure 1.

Correlation between IC and LAV% of left lower lobe

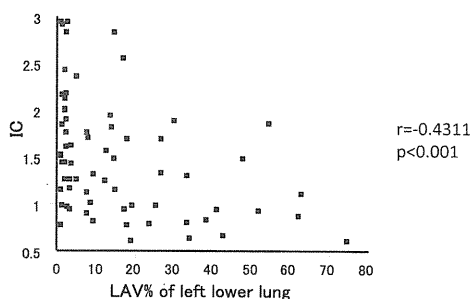


Figure 2.

考察

ICは、VCやTLCがLAA%と関連しているという以前の報告²⁾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。

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。

参考文献

1. Rabe KF, Beqhe B, Luppi F, et al: Update in chronic obstructive pulmonary disease 2006, Am J Respir Crit Care Med 2007 ; 175 (12) : 1222 – 1232
2. Nakano Y, Sakai H, Muro S, et al: Comparison of low attenuation areas on computed tomographic scans between inner and outer segments of the lung in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Thorax ; 54 (5) : 384 – 9

気腫合併肺線維症における呼吸機能と喫煙関連炎症の検索

野村 弥生¹, 安尾 将法¹, 牛木 淳人¹, 漆畑 一寿¹
山本 洋¹, 花岡 正幸¹, 久保 恵嗣¹, 北口 良晃²
信州大学内科学第一講座¹, 市立岡谷病院²

はじめに

気腫合併肺線維症 (CPFE) は、画像上、上葉に優位な肺気腫と下葉に優位な肺の線維化を合併する疾患概念である。未だその病態については不明である。

Cottin ら¹⁾ は、CPFE の呼吸機能について、VC が正常ないし正常下限、肺拡散能の低下を示し、運動時の低酸素が著明であると報告している。我々は、CPFE と COPD の呼吸機能の比較を行い²⁾、CPFE では、%RV, %FRC, %DLco が有意に低値であったと報告した。過去に CPFE と IPF を比較した報告はない。

CPFE の大半が喫煙者であることが知られている。また、肺気腫 (COPD) の発症には喫煙が主に関与している。特発性肺線維症患者 (IPF) では 7 割に喫煙歴があるとされる。

気腫と線維化の両者が併発する場合、喫煙という共通の因子が肺気腫と間質性肺炎を同一肺に起こし、CPFE を発症するのであろうか。

我々は、CPFE の発症に喫煙に関連する炎症が関与しているのではないかと考えた。これを評価するため、RAGE (receptor for advanced glycation end products) と Egr-1 (Early growth response gene 1) に注目した。

RAGE は AGE (advanced glycation end products) のレセプターである。生理的に肺に豊富に存在しており、肺のホメオスタシスに関与していると考えられており、その発現の多寡により、肺の慢性の炎症や異常な組織修復をきたしうると考えられている³⁾。RAGE は COPD 肺や喫煙者肺で発現が上昇することが報告されている³⁾。一方、IPF 肺

では RAGE 発現の低下が報告されている⁴⁾。

Egr-1 は転写因子であり、喫煙刺激による RAGE の発現亢進に関与すると考えられている⁵⁾。

対象と方法

CPFE の臨床的特徴を明らかにするべく、2004 年 1 月から 2007 年 12 月の間に当院で精密呼吸機能検査を行った CPFE 47 例、COPD 82 例、IPF 35 例の呼吸機能検査所見を retrospective に検討した。多重比較検定 (Scheffe 法) を使用した。

CPFE での喫煙に関連する炎症を評価、比較するため、肺癌やびまん性肺疾患の診断目的の手術で得られた CPFE, COPD, IPF の肺組織を用いて、RAGE と Egr-1 の免疫組織化学的検討を行った。

結 果

○ CPFE と呼吸機能

各症例の Profile を Table 1 に示す。

平均年齢は CPFE 群 71.2 ± 1.3 歳、COPD 群 70.6 ± 0.7 歳、IPF 群 71.5 ± 1.4 歳と差は認めなかった。性別は各群共に男性が多かった。BMI (kg/m^2) は CPFE 群 (22.9 ± 0.4) が COPD 群 (20.4 ± 0.3) より有意に高かった。喫煙歴は、IPF 群では never smoker が多かった。IPF 群の never smoker を除外して、喫煙歴 (pack years) を比較したところ差は認められなかった。肺癌の合併は他の 2 群と比較して CPFE 群で 46.8% と有意に多かった。

呼吸機能検査 (Table 2, Fig. 1-5) については、%VC は正常範囲内であり COPD と同程度であったが、IPF より有意に高かった。%1 秒量、%RV, %FRC は COPD と IPF の中間に位置した。%

Table 1. 患者背景

	IPF (n = 35)	CPFE (n = 47)	COPD (n = 82)
Age, years	71.5 ± 1.4	70.2 ± 1.3	70.6 ± 0.7
Gender, F/M	9/26	1/46	6/76
BMI, kg/m ²	23.6 ± 0.5	22.9 ± 0.4**	20.4 ± 0.3
Smoking history, Pack years	(54.8 ± 7.9)	58.7 ± 4.4	62.6 ± 3.1
Never smoker/Ex or current smoker	8/26	1/45	0/82
Lung cancer	5 (14.7%)	22 (46.8%)**, [†]	5 (6.1%)

**P<0.01 versus COPD. ^{††}P<0.01 and [†]P<0.05 versus IPF
Values are the mean ± SEM.

Table 2. 呼吸機能検査結果

	IPF	CPFE	COPD
%VC	75.2 ± 2.9	94.7 ± 3.5 ^{††}	93.4 ± 2.3
%FEV1	80.0 ± 2.8	79.0 ± 3.1*	48.4 ± 2.2
%FRC	74.0 ± 3.6	89.9 ± 5.8* [†]	111.1 ± 2.4
%RV	74.0 ± 3.6	114.0 ± 10.3* [†]	185.3 ± 5.7
%DLco	45.7 ± 2.5	39.5 ± 2.5*	55.3 ± 2.2

**P<0.01 versus COPD. ^{††}P<0.01 and [†]P<0.05 versus IPF
Values are the mean ± SEM.

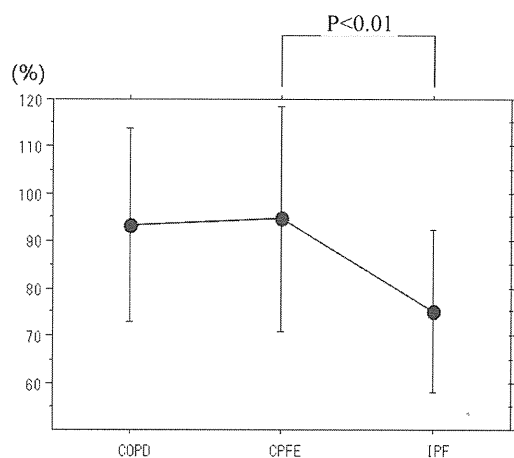


Fig. 1. %VC

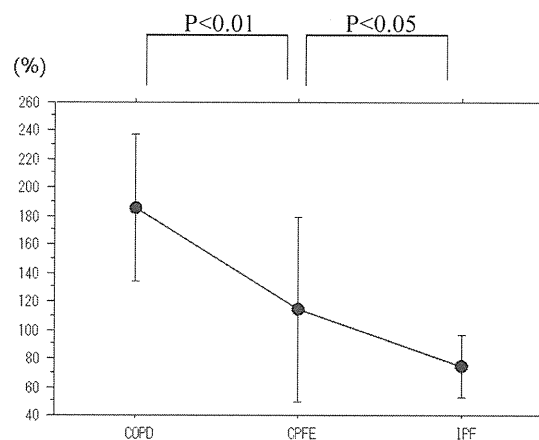


Fig. 3. %RV

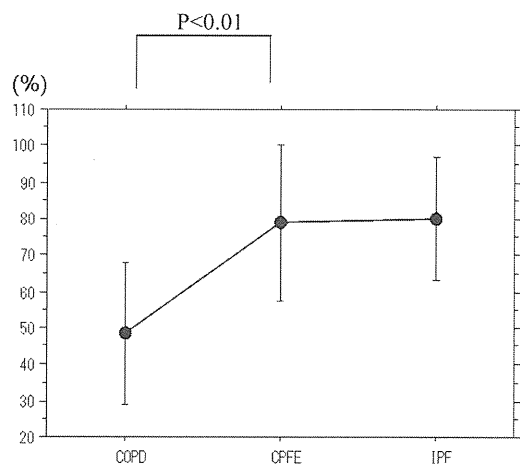


Fig. 2. %1秒量

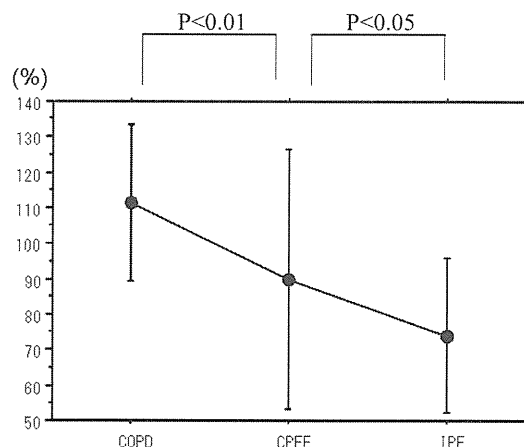


Fig. 4. %FRC

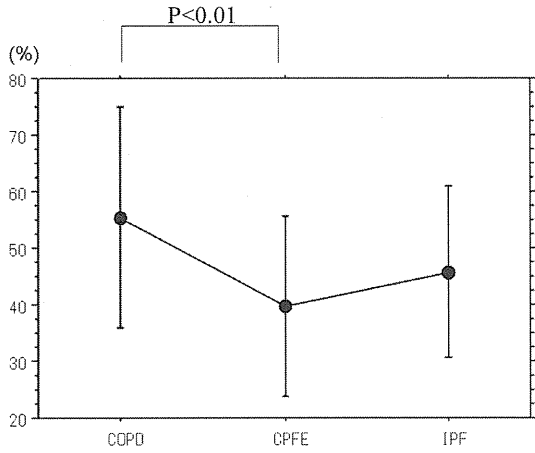


Fig. 5. %DLco

DLco は最も低い傾向で、COPD とは有意差を認めた。

○ CPFE と喫煙関連炎症

RAGE (Fig. 6) は COPD の肺胞上皮細胞で最も強く染まった。CPFE 気腫部分の肺胞上皮細胞でも陽性所見が見られたが、COPD よりはやや弱い印象であった。IPF では、線維化の部分ほとんど染まらず、上皮のみに染まりが見られた。CPFE 線維化部分も IPF と同様の結果であった。

Egr-1 (Fig. 7) は、COPD と CPFE 気腫部分の肺胞上皮細胞に陽性であり、細胞質の他、核にも陽性所見が見られた。IPF, CPFE 線維化部分では上皮および線維芽細胞の細胞質に陽性所見が見られたが核には陽性所見が見られなかった。

RAGE免疫染色

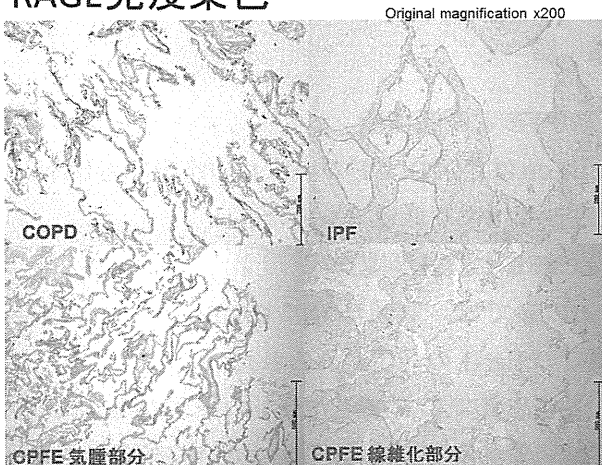


Fig. 6

RAGE免疫染色

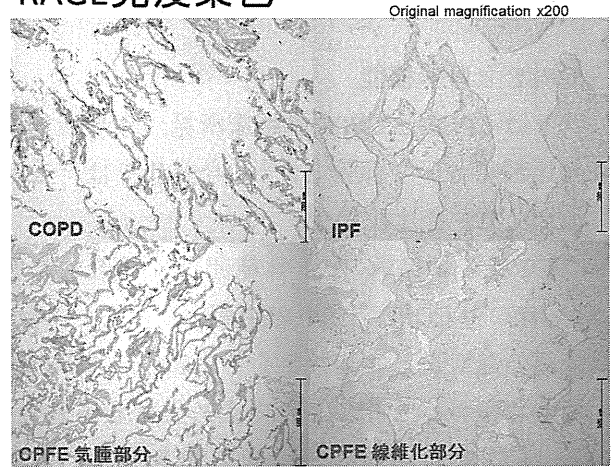


Fig. 6-2

Egr-1 免疫染色

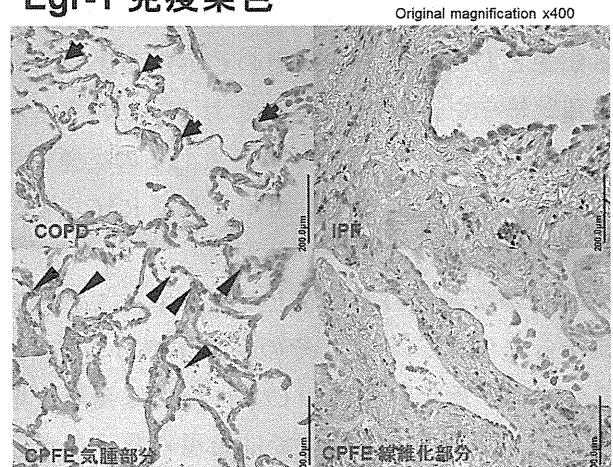


Fig. 7

Egr-1 免疫染色

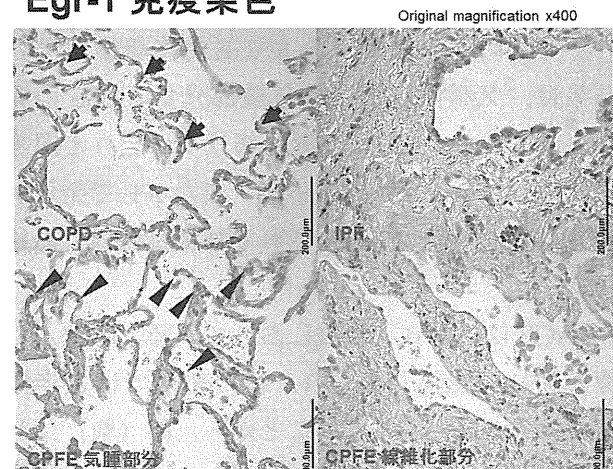


Fig. 7-2

考 察

○ CPFE と呼吸機能

我々は CPFE と CPFE の臨床所見, 呼吸機能検査の比較について報告した²⁾。今回我々は, これに加えて IPF を比較した。

CPFE 群では %VC が正常範囲内に保たれ, %RV, %TLC は COPD と IPF の中間に位置したのは, 気腫部の過膨張とコンプライアンスの低さが線維化部の容積減少と相殺されるためと推察された。DLco は COPD, IPF で共に低下するため, 相加的に CPFE では低値になると考えられた¹⁾。

○ CPFE と喫煙関連炎症

今回 CPFE の病因を考えるにあたり, 対象とする疾患として肺気腫優位型の COPD および特発性肺線維症を選択した。CPFE およびこれら 2 疾患に共通するリスクファクターとしての喫煙に注目し, その炎症に関わる因子として RAGE をまず調査した。

AGE が喫煙者の血管などで上昇することは以前から知られていた⁶⁾。その受容体である RAGE について, 近年喫煙者や COPD 肺では発現の増加が^{3,7)}, 特発性肺線維症では発現の低下⁴⁾が報告されている。これまでにこれら疾患について横断的にその発現を調査した報告や RAGE の発現量に関するメカニズムについて調査した報告はない。今回の我々の行った RAGE 免疫組織化学の結果は, 気腫優位型の肺気腫部分で RAGE の発現が最も強く, CPFE の気腫部分ではそれと同等またはやや弱い発現であった。また IPF で発現が最も弱く, 既報から推察される結果と同様であった。

RAGE は正常ヒト組織において, 肺 (肺胞) で特異的に高発現しており, 他の組織では炎症に伴ってしか高発現しないことから, 肺 (胞) における定常状態の RAGE 発現は肺の恒常性維持に関与していると考えられている⁸⁾。このことから, おそらく COPD においては RAGE 発現が亢進す

るシグナルが, IPF においては RAGE 発現が低下するシグナルが働いているのではないかと推察される。Egr-1 はこの RAGE 発現を調節する転写因子である。Egr-1 は喫煙刺激で発現が亢進することが細胞レベルで報告されている⁹⁾。また喫煙非 COPD 患者肺よりも COPD 患者肺で発現が亢進していることが報告されている¹⁰⁾。喫煙刺激による過剰な酸化ストレスやこれに伴う AGE の上昇が RAGE を活性化し, Egr-1 の発現が亢進する。Egr-1 発現の亢進は RAGE の発現を上昇させ, 一種の positive feedback メカニズムを惹起するのではないかと考えられている⁵⁾。Egr-1 の活性化はまた他の炎症性サイトカイン産生を上昇させるため, COPD における炎症が遷延化する一因であると考えられる。今回の我々の検討でも, COPD の肺胞領域や CPFE の気腫部分では Egr-1 の核における陽性像がみられていたが, IPF および CPFE の線維化部分では核への集積はみられなかった。Egr-1 は核内において転写因子として働く蛋白であるため, 核における発現上昇が活性化の指標であると考えられる。CPFE において, 同一肺でありながら気腫部分と線維化部分における Egr-1 発現に大きな違いがみられたことおよび, COPD の肺胞領域と IPF においても同様の結果であったことから, 今後定量的な評価が必要であるが, 肺における Egr-1 活性化や RAGE 発現量の多寡が線維化や気腫をきたす方向性を決定する要因である可能性が考えられた。

結 語

○ CPFE と呼吸機能

DLco は COPD, IPF のいずれの疾患でも低下し, CPFE ではより低値であった。

○ CPFE と喫煙関連炎症

CPFE では, 気腫部分に RAGE の発現が強く, 核での Egr-1 の発現がみられた。

各疾患群での RAGE, Egr-1 の発現の違いについては定量的な検討を今後行っていく予定である。

参考文献

1. Cottin V, Nunes H, Brillet PY et al: Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J* 2005 ;26 :586-593
2. Kitaguchi Y, Fujimoto K, Hanaoka M, et al: Clinical characteristics of combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Respirology* 2010 ; 15 :265-271
3. Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, et al: Expression of High-Mobility Group Box 1 and of Receptor for Advanced Glycation End Products in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *AmJ Respir Crit Care Med.* 2010 ; 181 : 917-927
4. Queisser MA, Kouri FM, Königshoff M, Wygrecka M, Schubert U, Eickelberg O, Preissner KT: Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 ; 39 : 337-345
5. Reynolds PR, Kasteler SD, Cosio MG, et al: RAGE: developmental expression and positive feedback regulation by Egr-1 during cigarette smoke exposure in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 ;294 : 1094-1101
6. Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE, Ritchie AJ, Archer DB, Bucala R: Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol Med.* 1998 ;4 : 594-601
7. Wu L, Ma L, Nicholson LF, Black PN: Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. *Respir Med.* 2011 ; 105 :329-336
8. Buckley ST, Ehrhardt C: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *J Biomed Biotechnol.* 2010 ;2010 :917108
9. Reynolds PR, Cosio MG, Hoidal JR: Cigarette smoke-induced Egr-1 upregulates proinflammatory cytokines in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 ; 35 : 314-319
10. Ning W, Li CJ, Kaminski N, Feghali-Bostwick CA, Alber SM, Di YP, Otterbein SL, Song R, Hayashi S, Zhou Z, Pinsky DJ, Watkins SC, Pilewski JM, Sciruba FC, Peters DG, Hogg JC, Choi AM: Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ; 101 : 14895-14900

COPD 合併肺癌

田中希宇人, 浅野浩一郎, 加畑 宏樹, 上石 修史
宮田 純, 鈴木 雄介, 福永 興壺, 猶木 克彦
副島 研造, 佐山 宏一, 別役 智子
慶應義塾大学医学部呼吸器内科

はじめに

COPD の悪性腫瘍の合併率は今までの報告では約 6-18% と推定されている¹⁾が, その中でも COPD の死因は 5-38% が肺癌とされており²⁾, 非常に重要な合併症であると考えられる。また, 1 秒量の減少が大きいほど肺癌のリスクが高いこと³⁾, 喫煙量や喫煙期間が長いほど肺癌のリスクが高いこと⁴⁾が過去の報告で分かっており, COPD と肺癌の関連性が指摘されている。

しかしいくつかの研究で肺気腫が喫煙歴や閉塞性換気障害とは独立した肺癌のリスクと報告されている^{5,6)}が, 肺気腫と特定の肺癌の組織型の関係は明らかにされていない。また, 閉塞性換気障害の進行とともに肺癌のリスクが上がるという報告がある³⁾かたわら, 閉塞性換気障害の軽度な患者群の方が肺癌のリスクが高かったとの報告⁷⁾もある。

そこで今回, 我々は COPD に合併した肺癌の臨床像を検討するために, 当院に通院する COPD 患者から肺癌の既往や発生を抽出し, その関連性を患者背景, 臨床症状, 肺機能, 気腫化の面からレトロスペクティブに評価した。

対象と方法

COPD 症例として, 2006 年から 2009 年に当院で肺機能検査を実施した 20, 220 例から,

- ①呼吸器内科に通院
- ②40 歳以上
- ③喫煙歴がある
- ④1 秒率 70% 未満

⑤1 秒量が予測値の 80% 未満

と①から⑤の基準を満たす 550 例を抽出した。その中から肺癌の既往, あるいは観察期間中に肺癌発症した症例 71 例を COPD 合併肺癌症例として検討した。

調査項目としては肺癌発症年齢, 性別, 初診時の症状(喀痰, 咳嗽の有無, MRC 息切れスケール), 喫煙歴と肺機能検査を検討した。初診時の症状はカルテの記載から抽出した。また肺癌の発症部位, 組織型, 肺癌病期についてもカルテ記載, CT 画像, CT レポート, 手術記事からできる限り抽出した。

また CT 画像を解析するために, 2006 年から 2011 年までの COPD 合併肺癌症例で CT 画像の残存している 91 例に対して, 肺癌発症時の CT 画像を検討した。

気腫化については COPD ガイドラインの Goddard 分類に基づいて各肺野についてスコアリングを行った。

結 果

COPD 患者 550 症例のうち男性が 86%, 平均年齢は 68.7 ± 9.9 歳 (40-92 歳) であり, うち 71 例で肺癌の合併がみられた。組織型の内訳は非小細胞肺癌 55 例 (腺癌 37 例, 扁平上皮癌 11 例, 大細胞癌 3 例, NSCLC-NOS 4 例), 小細胞癌 11 例であり, 診断時の肺癌病期は I A 期 16 例, I B 期 9 例, II 期 3 例, III A 期 6 例, III B 期 13 例, IV 期 16 例であった。この組織型と肺癌病期の内訳は当院呼吸器内科に通院する肺癌患者の割合とほぼ同等であることが分かった。

年齢, 性別, 慢性気管支炎症状 (咳嗽, 喀

痰)や息切れの程度(MRC息切れスケール)と肺癌の発症頻度に差は認められなかった。また、COPD病期(閉塞性換気障害の程度)と肺癌発症は関係を認めなかった(chi square test, $P=0.60$)が、肺癌の発症した人は有意に気腫化のスコアが高い(Mann Whitney's U test, $p<0.05$)ことが分かった。

2006年から2011年における91例のCOPD合併肺癌症例の画像の解析では発生母地から以下の5つの画像パターンに分けて検討した。

- ①Central broncus(central): 第3分岐気管支周囲までに発生
- ②Pericyclic lesion(pericyclic): 既存のcyst周囲に発生
- ③Severe emphysema(emphysema): 周囲がgrade2以上の気腫化病変
- ④Fibrosis(fibrosis): 周囲が線維化病変
- ⑤Unclassified: その他

の5種類の画像パターンに分類した。

その結果、「pericyclic」と「emphysema」では気腫化は同程度であったが、「pericyclic」が平均年齢62.1歳、「emphysema」が75.1歳と有意に若くに肺癌を発症することが分かった。(One way ANOVA, $p<0.01$)

また、「emphysema」や「fibrosis」では末梢発生の癌と考えられるのにも関わらず扁平上皮癌や小細胞癌などの非腺癌が過半数を占めているのに対し、同程度の気腫化である「pericyclic」では腺癌が多いことが分かった。

「central」では中枢型を反映して扁平上皮癌と小細胞癌が7割近くを占め、逆に「unclassified」では一般的な末梢型を反映して腺癌が7割以上を占める結果となった。

考 察

肺癌は現在、本邦での死亡原因の第1位となっている。肺癌に対する治療は手術、放射線療法、化学療法が一般的であるが、手術を行える可能性があるI、II期の症例は当院での検討でも約3割程度にとどまっている。肺癌とCOPDとの関連は

過去の報告^{3,5,6)}では気腫化や閉塞性換気障害の程度が強くなるにつれ肺癌のリスクが高いとされていたが、本研究では気腫化との関連は認められたが、COPD病期との関連性は認められなかった。現在、1秒量が予測値の80%未満のCOPD病期の中等度から高度の症例での検討にとどまっているが、COPD病期の軽度の症例での検討も行う必要がある。

肺癌発生母地による画像パターン分類は過去に大きな報告がない。今後前向きにCOPD症例を検討することで、画像パターンから組織型を類推したり経過観察の方法の個別化が可能になったりする可能性がある。また、線維化や気腫化の中から発生する肺癌の発症パターンを分子組織学的に分類することができる可能性がある。

結 論

肺癌発症では年齢、性別、慢性気管支炎症状(喀痰、咳嗽)や息切れの程度とは無関係であった。また、肺癌発症はCOPDの重症度(閉塞性換気障害の程度)とは無関係であったが、気腫化の程度との関連がみられた。

発症母地による画像パターン分類では気腫化病変や線維化病変では非腺癌が多いのに対し、cyst周囲に発生する癌では若年の腺癌が多いことが判明した。

参考文献

1. Chatila WM, Thomashow BM, Minai OA, Criner GJ, Make BJ: Comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 2008 May 1; 5(4): 549-55
2. Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agusti AG: Mortality in COPD: Role of comorbidities. Eur Respir J. 2006 Dec; 28(6): 1245-57
3. Wasswa-Kintu S, Gan WQ, Man SF, Pare PD, Sin DD: Relationship between reduced forced expiratory volume in one second and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Thorax. 2005 Jul; 60(7): 570-5
4. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ: The accumulated

- evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997 Oct 18 ; 315 (7114) : 980-8
5. de Torres JP, Bastarrika G, Wisnivesky JP, Alcaide AB, Campo A, Seijo LM, Pueyo JC, Villanueva A, Lozano MD, Montes U, Montuenga L, Zulueta JJ : Assessing the relationship between lung cancer risk and emphysema detected on low-dose CT of the chest. *Chest*. 2007 Dec ; 132 (6) : 1932-8
 6. Wilson DO, Weissfeld JL, Balkan A, Schragin JG, Fuhrman CR, Fisher SN, Wilson J, Leader JK, Siegfried JM, Shapiro SD, Sciruba FC : Association of radiographic emphysema and airflow obstruction with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Oct 1 ; 178 (7) : 738-44. Epub 2008 Jun 19
 7. de Torres JP, Marín JM, Casanova C, Cote C, Carrizo S, Cordoba-Lanus E, Baz-Dávila R, Zulueta JJ, Aguirre-Jaime A, Saetta M, Cosio MG, Celli BR : Lung Cancer in patients with COPD : Incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 28

Toll 様受容体シグナルによる気道分泌増強効果の検討

玉田 勉, 村松 聡士, 村上 康司
柴田 尚子, 貫和 敏博, 海老名雅仁
東北大学大学院医学系研究科呼吸器病態学分野

はじめに

気道分泌液は粘液線毛運動に最適な環境を提供することで気道粘膜防御の中心的役割を果たす¹⁻⁴⁾。気道上皮細胞は気道被覆液の吸収に働くと考えられており^{2,5,6)}、気道分泌の主要な役割は気道粘膜下腺が担うことが知られている⁷⁻¹⁰⁾。気道粘膜下腺は水分、電解質、ムチン及び抗菌蛋白等を分泌することで気道の非特異的防御機構の中心的役割を果たすとともに、分泌型免疫グロブリンを分泌し病原微生物や外来異物を中和、排除することで特異的防御機構としても機能することが知られている¹¹⁾。近年、大型実験動物やヒト気管を用いて気道粘膜下腺における生理的な分泌機序の解明が進んできている^{1-3,5-10,12,13)}。我々も今までに気管から単離した新鮮な粘膜下腺細胞に対しパッチクランプ法を用いてその特性を研究してきた。今までにヒト、ネコ及びブタ気道粘膜下腺細胞を用いた実験系で、低濃度コリン作動性刺激または α -アドレナリン作動性刺激が細胞内 Ca^{2+} 増加を介して、クロライドイオン電流を惹起することを明らかにしてきた¹³⁻¹⁶⁾。欧米ではcAMP依存性 Cl^- チャネル (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CFTR) が注目されているのに対して、我々は Ca^{2+} 感受性 Cl^- チャネルが最も重要なチャネルであると考えている。CFTRと異なり Ca^{2+} 感受性 Cl^- チャネルは長年その分子構造は明らかにされていなかったが、近年注目されている気道上皮や粘膜下腺に存在するTMEM16A (Transmembrane protein 16A) がその有力な候補であると考えられるようになってきている^{9,17)}。これまで我々はACh刺激により発生するイオン電

流の細胞外調節経路として上皮成長因子受容体 (epithelial growth factor receptor; EGFR) の系を、また細胞内調節経路として環状アデノシン2リン酸リボース (cADPR) 及びNO/cGMP/cGK系などが関与することを報告してきた^{13,18,19)}。

TLRは病原体特異的分子パターンを認識し自然免疫を誘導する受容体である²⁰⁾。ヒトでは今までに10種類が同定され²¹⁾、その自然免疫機構における重要性が広く知られている。呼吸器領域では気道上皮や肺泡マクロファージに複数のTLRが発現し、外来病原体に対する初期防御機構として重要な働きをすることが報告されている^{22,23)}。しかし、気道粘膜下腺にTLRが発現しているのかどうか、また気道分泌を即時的に増加させることができるかどうかに関しては検討がなされていない。

本研究で我々は、気道感染に重要と考えられるTLR2, TLR3, TLR4 およびTLR5シグナルによる気道分泌調節効果を検討した。これらの中でTLR4 およびTLR5が生理的低濃度ACh刺激に伴う気道粘膜下腺からの基礎イオン分泌を増強することが明らかとなった。気道粘膜防御機構においてTLR4 およびTLR5は粘膜下腺細胞からの水分-電解質分泌を増加させる外的調節因子として機能し得ることが示された。

対象と方法

気道分泌を調節する外的調節因子としてのTLRの役割、及びその細胞内機序を明らかにすることを目的とする。ブタ気管支粘膜下腺細胞を単離しパッチクランプ法を用いて生理的な水・電解質分泌を微弱なイオン電流の形として測定

する。この反応に対して今回はTLR2, 3, 4, 5の各リガンドがどのような効果を及ぼすのか検討する。またブタ気道粘膜下腺における分泌増強候補TLRサブタイプの発現を免疫組織学的およびPCR法を用いて検討する。

結果

TLR4リガンドとして慢性気道炎症性疾患において気道に定着することが知られている緑膿菌由来のLPSを使用した。始めにAChにより惹起されるイオン電流に対する効果を検討した。図1Aに示すように、LPS 20 $\mu\text{g/ml}$ はACh刺激による I_o を2.1倍 { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 105.1 \pm 15.5 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{LPS}20) = 220.8 \pm 29.5 \text{ pQ/s}$, $P < 0.05$; $n = 10$ } 及び I_i を1.7倍 { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 12.5 \pm 2.3 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{LPS}20) = 21.3 \pm 3.7 \text{ pQ/s}$, $P < 0.05$; $n = 10$ } と有意に増強した。更にLPS 10 $\mu\text{g/ml}$ も同様に I_o を1.6倍 { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 193.5 \pm 25.8 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{LPS}10) = 318.3 \pm 33.2 \text{ pQ/s}$, $P < 0.05$; $n = 13$ } 及び I_i を1.4倍 { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 25.3 \pm 4.8 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{LPS}10) = 36.3 \pm 6.9 \text{ pQ/s}$, $P < 0.05$; $n = 13$ } と有意に増強した(図1B)。ところがLPS 1 $\mu\text{g/ml}$ は I_o { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 189.3 \pm 26.4 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{LPS}1) = 184.3 \pm 24.0 \text{ pQ/s}$, $P = 0.31$; $n = 11$ } 及び I_i { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 34.1 \pm 7.4 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{LPS}1) = 33.3 \pm 7.6$

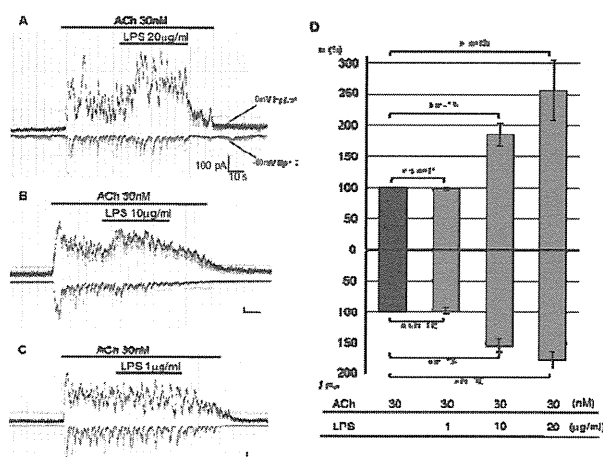


図1. ACh 30nM 刺激によるイオン電流に対するTLR4リガンド(LPS)の効果

pQ/s, $P = 0.28$; $n = 11$) と、共に有意な増強効果を示さなかった(図1C)。これらの結果を定量化しグラフで表したものが図1Dである。

グラム陽性菌の細胞壁構成成分でTLR2リガンドであるPGNを用いてAChによるイオン電流に対する効果を検討した。100 $\mu\text{g/ml}$ という高濃度PGN刺激でも I_o { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 119.8 \pm 19.8 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{PGN}) = 117.9 \pm 17.9 \text{ pQ/s}$, $P = 0.87$; $n = 7$ } 及び I_i { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 11.6 \pm 0.7 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{PGN}) = 11.3 \pm 1.0 \text{ pQ/s}$, $P = 0.13$; $n = 7$ } と有意な増強効果は認めなかった(図2A)。同様に、別のTLR2リガンドであるLTA 10 $\mu\text{g/ml}$ もAChによる I_o { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 97.9 \pm 23.2 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{LTA}) = 92.7 \pm 24.7 \text{ pQ/s}$, $P = 0.11$; $n = 7$ } 及び I_i { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 21.8 \pm 13.2 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{LTA}) = 23.2 \pm 14.2 \text{ pQ/s}$, $P = 0.14$; $n = 7$ } と増強効果は認めなかった(図2B)。これらの結果を定量化しグラフで表したものが図2Dである。

2本鎖RNAウイルスの合成アナログでTLR3リガンドの一つであるPoly(I:C)を用いてACh刺激によるイオン電流に対する効果を検討した。100 $\mu\text{g/ml}$ という高濃度Poly(I:C)刺激でも, I_o { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 121.9 \pm 56.1 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{Poly}(\text{I:C})) = 107.5 \pm 39.6 \text{ pQ/s}$, $P = 0.47$; $n = 6$ } 及び I_i { $I_{\text{mean}}(\text{ACh}) = 17.7 \pm 5.7 \text{ pQ/s}$, $I_{\text{mean}}(\text{ACh} + \text{Poly}(\text{I:C})) = 15.8 \pm 2.9 \text{ pQ/s}$, $P = 0.53$; $n = 6$ } と増強効果は示さなかった(図2C)。この結果を定量化しグラフで表したものが図2Eである。

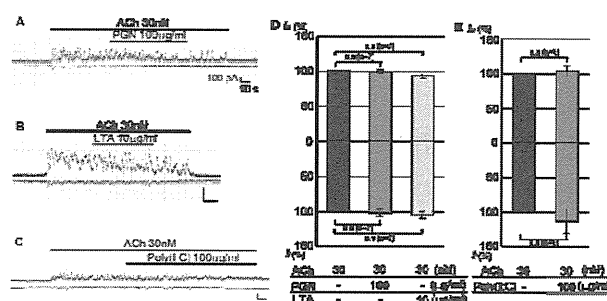


図2. ACh 30nM 刺激によるイオン電流に対するTLR2及びTLR3リガンドの効果

これらの結果より、グラム陽性菌由来の TLR2 リガンド及びウイルス由来の TLR3 リガンドは明らかな水分-電解質分泌に対する増強作用はなく、グラム陽性菌由来の TLR4 リガンドのみが気道粘膜下腺における水分-電解質分泌増強作用を持つことが示唆された。

TLR5 のリガンド (Flagellin) は ACh 30nM という極めて低濃度刺激で惹起される生理的なイオン電流に対して、TLR4 リガンドほどではなかったが明らかな増強効果を示した (図 3)。

気道粘膜下腺細胞上の TLR4 および 5 の発現を確認するため、蛍光免疫染色法を施行した。陽性対照としてブタ脾臓組織を同様の方法で染色した。気道組織は既に TLR4 の存在が報告されてい

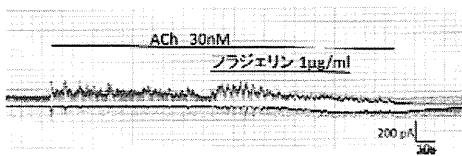


図 3. ACh 30nM 刺激によるイオン電流に対する TLR5 リガンド (フラジェリン) の効果

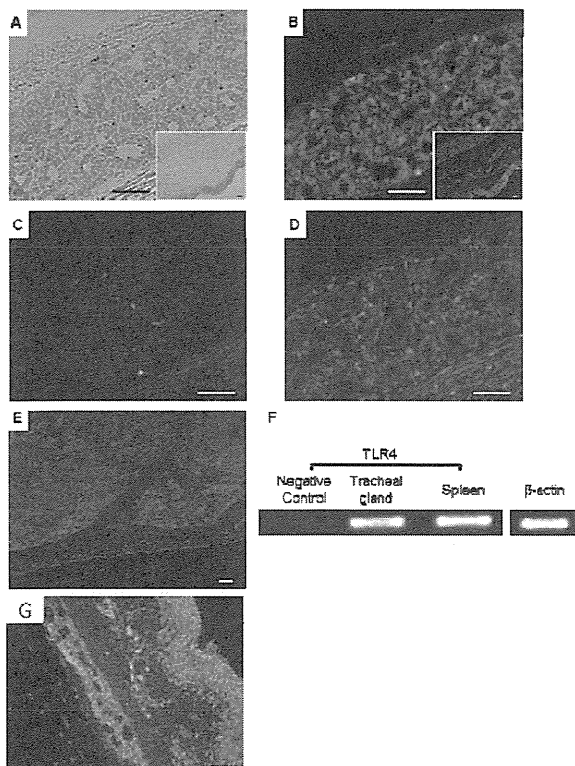


図 4. ブタ気道粘膜下腺における TLR4 および TLR5 の発現

る気道上皮だけでなく、気道粘膜下腺においても蛋白レベルでの発現 (赤) が確認された (図 4A-E)。同様に、TLR4 の mRNA レベルでの発現を RT-PCR 法を用い検討したところ、気道粘膜下腺サンプルにおいて TLR4 の発現が確認された (図 4F)。TLR5 においても同様の結果であった (図 4G)。

これらの結果より気道粘膜下腺細胞における TLR4, 5 の発現が蛋白レベル及び mRNA レベルにおいて確認された。

考 察

従来、気道が病原菌や吸入異物による刺激を受けた際には、気道粘膜に密に分布している副交感神経が気道分泌物の成分・粘度及び追加分泌を調整する中心的役割を果たすと考えられていた^{2,24-27})。実際に近年の主な報告では、様々な神経伝達物質刺激による気道粘膜下腺からの水分分泌に関する生理学的特性を検討したものが大部分である^{1-3,5-10,12,13,28-30})。しかし、この機序のみでは細菌感染の際にウイルス感染と比べより強く・選択的に気道分泌が促進する現象に対する説明は困難である。本研究において、TLR2, TLR3, TLR4 および TLR5 の中で TLR4 と TLR5 が気道粘膜下腺からの電解質分泌を増強することを初めて示した。つまり、迷走神経末端から放出される神経伝達物質のみでなく粘膜下腺に発現する TLR4 および TLR5 も気道分泌を調節する役割を持ち、粘液線毛運動の活性化を介することでグラム陰性菌の排除が容易となるとの説明が可能かもしれない。

TLR4 に関して臨床上的意義を考慮した場合、本研究で示した TLR4 の気道分泌増強効果は利点と欠点、どちらも持ち合わせていると考えられる。利点としては細菌が気道に侵入した際に、TLR4 が重篤な感染症に移行する前に細菌を排除する初期防御機構として働く点である。正常な気管では TLR4 が気道分泌を増強することは気道防御の最前線として働き、初期免疫 (白血球やマクロファージ) や獲得免疫 (リンパ球や免疫グロブリン) が

適切に活性化することを補助すると考えられる。慢性気道炎症性疾患を考えた場合、迷走神経が興奮していない状態での TLR4 の活性化は細菌感染が重篤化する前に病原体を排除する上で有用である可能性をこれらの結果は強く支持している。一方で、適度に迷走神経が興奮した状態で TLR4 が活性化した場合は、過分泌をもたらす可能性がある。後者の点から考えると今回明らかとなった機序は欠点となると思われる。これらの疾患ではインフルエンザ桿菌や緑膿菌といったグラム陰性菌が気道表面にコロニーを形成し定着することが度々ある。細菌より遊離した LPS は気道粘膜下腺上の TLR4 を活性化し水分-電解質分泌を過度に増強することで粘液線毛輸送を障害する可能性もある。つまり、慢性気管支炎や気管支拡張症など慢性気道炎症性疾患では長時間の TLR4 活性化により過剰な気道分泌が促進されて病態を悪化させる可能性もある。本研究で用いた TLR5 リガンドは緑膿菌鞭毛由来のものであり、これも同様に分泌増強に働くことが確認された。TLR4 および TLR5 どちらかだけでなく両方がそろった場合にはより生体にとって危機的状況である可能性もあり、今後これらの細胞内増強機序の解明と相互作用についてより詳細な検討を予定している。

結 論

本研究により TLR4 リガンドおよび TLR5 リガンドが気道分泌における新たな外因性増強効果を持つことが明らかとなった。将来、この経路は気道分泌を調整するための治療標的となり得ると考えられる。

参考文献

1. Basbaum CB, Jany B, Finkbeiner WE: The serous cell. *Annu Rev Physiol* 1990; 52: 97-113
2. Widdicombe JH, Bastacky SJ, Wu DX, Lee CY: Regulation of depth and composition of airway surface liquid. *Eur Respir J* 1997; 10: 2892-7
3. Knowles MR, Boucher RC: Mucus clearance as a

- primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 2002; 109: 571-7
4. Fahy JV, Dickey BF: Medical Progress Airway Mucus Function and Dysfunction. *N Engl J Med* 2010; 363: 2233-47
5. Boucher RC: Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 271-81
6. Iwase N, Sasaki T, Shimura S, et al: Signature current of SO₂-induced bronchitis in rabbit. *J Clin Invest* 1997; 99: 1651-61
7. Quinton PM: Composition and control of secretions from tracheal bronchial submucosal glands. *Nature* 1979; 279: 551-2
8. Ballard ST, Spadafora D: Fluid secretion by submucosal glands of the tracheobronchial airways. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 159: 271-7
9. Lee RJ, Foskett JK: Mechanisms of Ca²⁺-stimulated fluid secretion by porcine bronchial submucosal gland serous acinar cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298: L210-31
10. Joo NS, Cho HJ, Khansaheb M, Wine JJ: Hyposecretion of fluid from tracheal submucosal glands of CFTR-deficient pigs. *J Clin Invest* 2010; 120: 3161-6
11. Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP, Sibille Y: Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J* 2001; 18: 571-88
12. Green FH, Williams DJ, James A, McPhee LJ, Mitchell I, Mauad T: Increased myoepithelial cells of bronchial submucosal glands in fatal asthma. *Thorax* 2010; 65: 32-8
13. Tamada T, Nara M, Kanatsuka H, et al: A potentiating effect of endogenous NO in the Physiologic secretion from airway submucosal glands. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37: 357-65
14. Sasaki T, Shimura S, Wakui M, Ohkawara Y, Takishima T, Mikoshiba K: Apically localized IP3 receptors control chloride current in airway gland acinar cells. *Am J Physiol* 1994; 267: L152-8
15. Irokawa T, Sasaki T, Shimura S, et al: Cholinomimetic action of macrolide antibiotics on airway gland electrolyte secretion. *Am J Physiol* 1999; 276: L951-7
16. Tamada T, Sasaki T, Saitoh H, et al: A novel function of thyrotropin as a potentiator of electrolyte secretion from the tracheal gland. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 566-73
17. Ousingsawat J, Martins JR, Schreiber R, Rock JR, Harfe

- BD, Kunzelmann K: Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca^{2+} -dependent chloride transport. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 28698 – 703
18. Iwase N, Sasaki T, Oshiro T, et al: Differential effect of epidermal growth factor on serous and mucous cells in porcine airway submucosal gland. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2002 ; 132 : 307 – 19
19. Sasamori K, Sasaki T, Takasawa S, et al: Cyclic ADP-ribose, a putative Ca^{2+} -mobilizing second messenger, operates in submucosal gland acinar cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004 ; 287 : L69 – 78
20. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006 ; 124 : 783 – 801
21. Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010 ; 11 : 373 – 84
22. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP: Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004 ; 31 : 358 – 64
23. Maris NA, Dessing MC, de Vos AF, et al: Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. *Eur Respir J* 2006 ; 28 : 622 – 6
24. Nadel JA, Davis B: Parasympathetic and sympathetic regulation of secretion from submucosal glands in airways. *Fed Proc* 1980 ; 39 : 3075 – 9
25. Tom-Moy M, Basbaum CB, Nadel JA: Localization and release of lysozyme from ferret trachea: effects of adrenergic and cholinergic drugs. *Cell Tissue Res* 1983 ; 228 : 549 – 62
26. Wine JJ: Parasympathetic control of airway submucosal glands: central reflexes and the airway intrinsic nervous system. *Auton Neurosci* 2007 ; 133 : 35 – 54
27. Liu X, Engelhardt JF: The glandular stem/progenitor cell niche in airway development and repair. *Proc Am Thorac Soc* 2008 ; 5 : 682 – 8
28. Delavoie F, Molinari M, Milliot M, et al: Salmeterol restores secretory functions in cystic fibrosis airway submucosal gland serous cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009 ; 40 : 388 – 97
29. Joo NS, Wine JJ, Cuthbert AW: Lubiprostone stimulates secretion from tracheal submucosal glands of sheep, pigs, and humans. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2009 ; 296 : L811 – L24
30. Cho HJ, Joo NS, Wine JJ: Mucus secretion from individual submucosal glands of the ferret trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010 ; 299 : L124 – L36

COPDにおけるウイルス感染による気道炎症制御法の研究

山谷 睦雄¹, 西村 秀一², 久保 裕司³

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¹

仙台医療センター臨床研究部病因研究室²

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³

はじめに

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¹⁾。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²⁻⁴⁾。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 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⁵⁻⁶⁾。また、吸入用ステロイドの抗炎症作用が報告されている⁷⁻⁸⁾。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⁷⁻⁸⁾、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初代培養細胞にライノウイルスを感染させ、 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。

(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。

対象と方法

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10⁻⁹~10⁻⁴M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10⁴ 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℃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 μM) 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⁹⁾。

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 μM) 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 β2 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 10⁵ 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℃ 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-1β 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。

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 (図 1A)。L-カルボシステイン (10 μM) 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 (図 1B)。1~6 時間の L-カルボシステイン (10 μM) 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 μM) 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 (図 2)。臨床では 5 μM ~ 70 μM の血中濃度が報告されている¹⁰⁾。

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 (図 3)。また、L-カルボシステイン (10 μM) 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)-1¹¹⁾ の mRNA 発現量は L-カルボシステイン (10 μM) の 3 日間前処理によって、減少した (図 4A)。また、培養液可溶性 ICAM-1 放出量も L-カルボシステイン (10 μM) の 3 日間前処理によって、減少した (図 4B)。

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 μM) の 3 日間前処理で変化しなかった (結果未表示)。

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-1β, IL-6 および IL-8 の放出

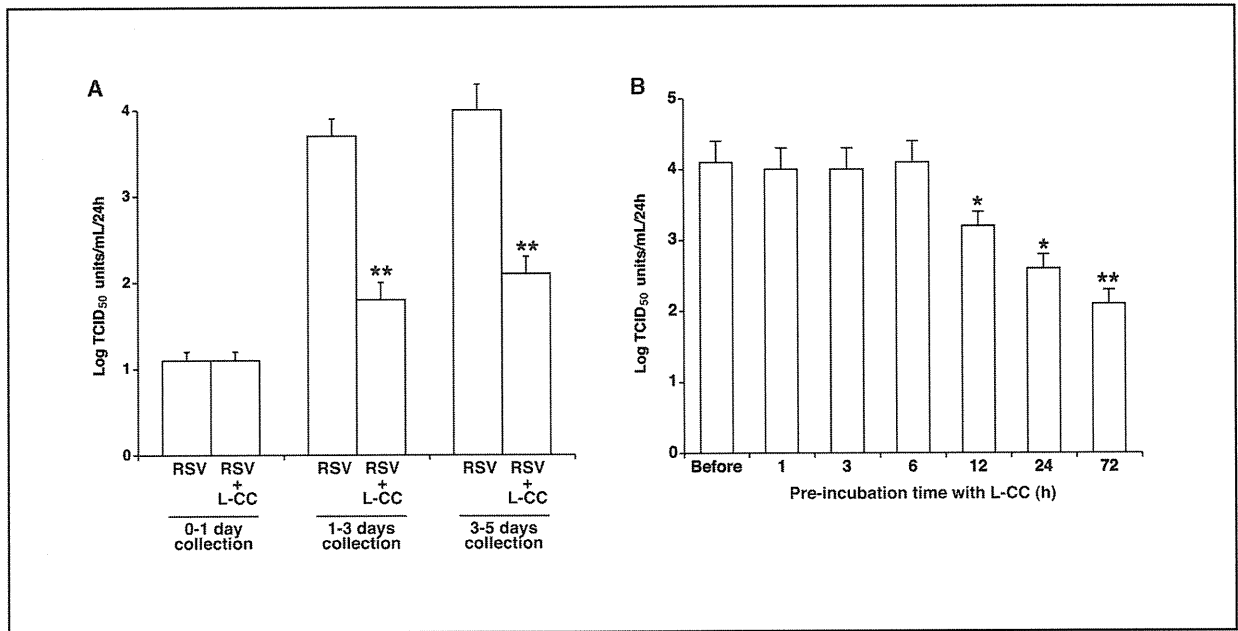


図 1. RS ウイルス感染に対する L-カルボシステインの効果

A : 培養液ウイルス放出量は時間経過で増加した。感染3日後および5日後にL-カルボシステイン(L-CC)で放出量が減少した。** P < 0.01 ; RS ウイルスのみ (RSV) と比較した有意差。B : L-カルボシステイン (L-CC) の前処理時間と RS ウイルス放出抑制作用の比較。12 時間以上の前処理でから RS ウイルス放出量は減少した。* P < 0.05, ** P < 0.01 ; ウイルスのみ (Before) と比較した有意差。

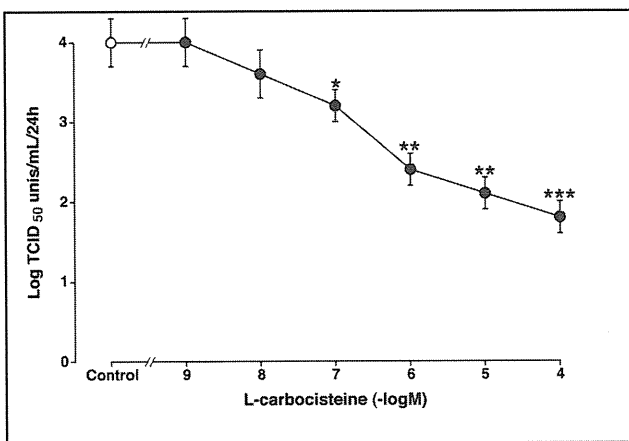


図 2. RS ウイルス放出に対する L-カルボシステインの濃度依存性抑制作用

培養液ウイルス放出量は L-カルボシステインの濃度に依存して減少した。* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 ; RS ウイルスのみ (Control) と比較した有意差。

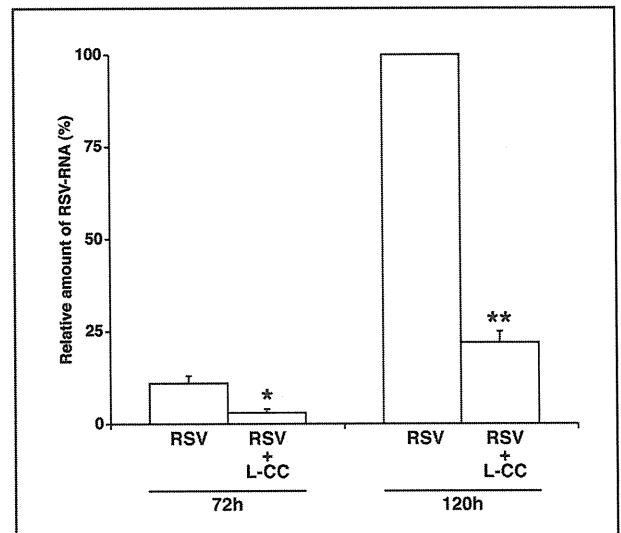


図 3. RS ウイルス RNA 細胞内複製に対する L-カルボシステインの抑制作用

細胞内 RS ウイルス RNA 複製量は時間経過で増加した。また、L-カルボシステイン (L-CC) の 3 日間前処理で減少した。* P < 0.05, ** P < 0.01 ; RS ウイルスのみ (RSV) と比較した有意差。