

COPD の全身性炎症と酸化ストレス、アクロレインの関与

安尾 将法¹, 花岡 正幸¹, 川久保雅友², 今村 仁美¹

伊東 理子¹, 小林 信光¹, 市山 崇史¹, 久保 惠嗣¹

信州大学内科学第一講座¹, 信州大学医学部附属病院臨床検査部 臨床研究支援室²

はじめに

アクロレインはタバコ煙に多く含まれるのみならず、ガソリン・ディーゼルエンジンの排気ガス、食用油を使用した揚げ物などの調理によっても発生する、日常生活でしばしば遭遇するアルデヒドである¹⁾。アクロレインは生体に酸化ストレスを惹起する物質の一つである²⁾。ヒトにおける外因性アクロレインの最も重要なソースはタバコ煙であり²⁾、アクロレインを(外因性に)投与する検討は比較的多く行われている³⁻⁵⁾。一方、アクロレインは内因性にも産生される。その主な産生ルートはアミノオキシダーゼによるポリアミン代謝またはミエロペルオキシダーゼによるスレオニンの分解による¹⁾。COPDなどの呼吸器疾患においては外因性のアクロレインは主に肺に、内因性のアクロレインは血流を介して肺および全身に影響を及ぼすと考えられる。臨床的には腎不全や脳梗塞患者において血漿中のアクロレインが高値であったとする報告がある^{6,7)}が、COPD患者における血漿中アクロレインの報告はない。

COPDは近年、全身性の慢性炎症の一環であるという認識がなされ、非喫煙者はもとより、喫煙者と比較してもCOPD患者には様々な併発症が有意に多いことがわかっている⁸⁾。

今回我々は、COPDが慢性全身性疾患であるという観点から、血漿および肺組織中のアクロレインがCOPDの慢性炎症に関与している可能性について酸化ストレスや抗酸化力との関連を中心に検討した。

対象と方法

健常喫煙者16名、COPD患者41名(GOLD 1;10名, 2;11名, 3;10名, 4;10名)を対象とした。健常喫煙者は検診受診時に、COPD患者は当院にて精密呼吸機能検査施行時にそれぞれ承諾を得て採血を行い、血漿を-80度で保存した。これとは別に、肺癌などの診断の下に肺葉切除が施行された非喫煙者、健常喫煙者、COPD患者肺(それぞれ10例ずつ)から、組織蛋白(細胞質蛋白)の抽出を行い-80度で保存した。血漿および肺組織のアクロレイン測定は液体クロマトグラフィー(LC-MS)法で行った。同じ患者血漿、肺組織蛋白を用いて、活性酸素代謝物(Reactive Oxygen Metabolites, dROMs)および抗酸化力(Biological Antioxidant Potential, BAP)をフリーラジカル解析装置(FREETM, Wismell Co. Ltd., Tokyo)により測定した。

結果

<患者プロフィール>

(a) 血漿解析群(57名)の年齢において、健常喫煙者群はGOLD I群に比し、有意に若年であった。また喫煙歴においては健常喫煙者群とGOLD II群がGOLD IV群よりも有意に少ない喫煙量(Pack-Year)であった(表1)。

(b) 肺組織解析群(30名)においては年齢と喫煙歴に群間差を認めなかった。

<血漿解析>

1. アクロレイン濃度

LC-MS法による血漿中アクロレインは健常喫煙者群に比べてCOPD患者群で有意に高値($P < 0.001$)であった。また、GOLD 1, 2を mild

表 1. Patient Profiles (Plasma Cohort)

	Healthy smokers	GOLD I	GOLD II	GOLD III	GOLD IV
Age	68.4 ± 6.5*	74.7 ± 5.9	70.1 ± 5.5	72.5 ± 5.7	70.3 ± 4.2
Smoking history (pack-year)	45.9 ± 8.5‡	60.1 ± 28.9	49.4 ± 13.8†	62.3 ± 26.5	82.5 ± 34.1

Age: *P<0.05 vs. GOLD I by Tukey test

Smoking history: ‡P<0.001 vs. GOLD IV, †P<0.05 vs. GOLD IV by Dunn's test

表 2. Patient profiles (Lung cohort)

	Never smoker (n = 10)	Healthy smoker (n = 10)	COPD (GOLD I (n = 4), II (n = 6))
Age	69.1 ± 12.0	67.2 ± 10.3	69.8 ± 7.3
smoking history (Pack-Year)	0	39.0 ± 27.7	68.9 ± 44.4

COPD, GOLD 3, 4 を severe COPD とした場合、重症 COPD でより高値を示す傾向が見られた (図 1A, B)。

2. dROMs および BAP

酸化ストレスの総合的な指標とされる dROMs および抗酸化力の指標とされる BAP をフリーラジカル解析装置 (FREE™) を用いて測定した。dROMs は健常喫煙者群に比し、COPD 患者群で有意な増加 (P<0.01) が見られた (図 2)。BAP は両群間で有意な差は見られなかった。

3. dROMs とアクロレイン濃度との関係

健常喫煙者血漿中の dROMs とアクロレインとの間には相関関係は見られなかった (図 3A)。COPD 患者血漿中の dROMs とアクロレイン濃度

との間には良好な正の相関関係が見られた (図 3B)。

4. 呼吸機能との関連

COPD 患者血漿中アクロレインは機能的残気量 (FRC), 残気量 (RV) との間に有意な正の相関を認めた (図 4A, B)。

<肺組織解析>

1. アクロレイン濃度

LC-MS 法による肺組織抽出蛋白中アクロレインは非喫煙者と比較して、健常喫煙者 (P<0.05), COPD (P<0.01) の肺でいずれも高値であった。一方、健常喫煙者と COPD との間には有意差は見られなかった (図 5)。

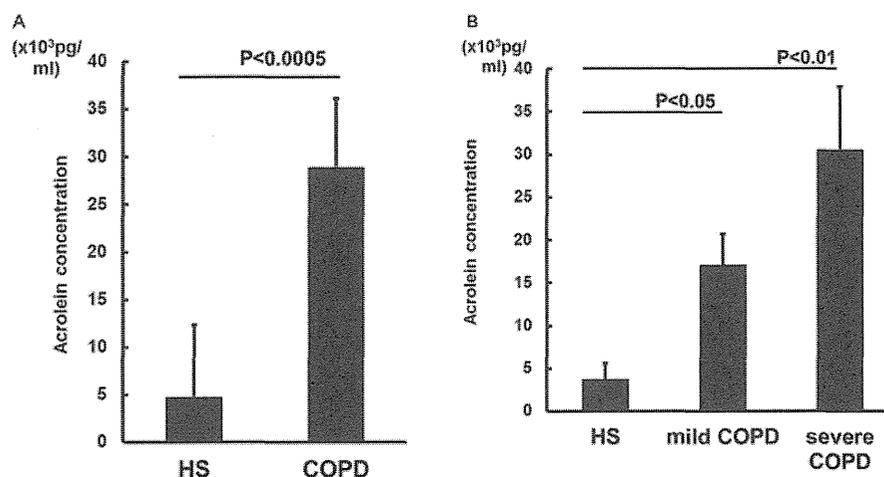


図 1. 健常喫煙者と COPD 患者血漿におけるアクロレイン濃度

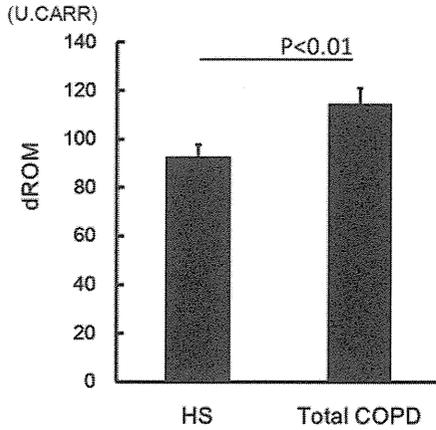


図 2. 健常喫煙者と COPD 患者血漿における dROMs

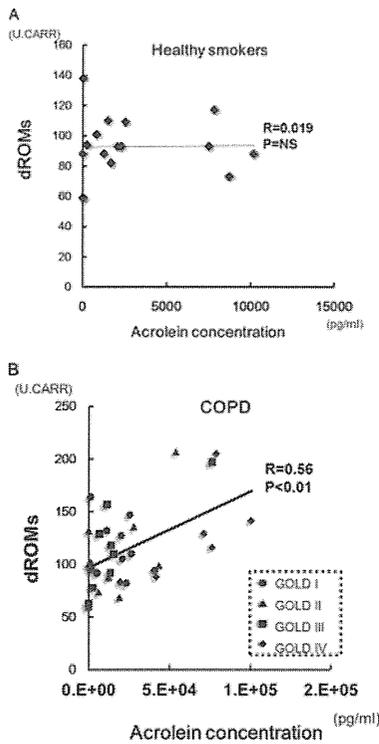


図 3. 健常喫煙者, COPD 患者血漿中 dROMs とアクロレインとの関係

2. dROMs および BAP

肺組織抽出液中の dROMs は非喫煙者と比較して COPD で有意に高値 ($P < 0.05$) であった。健常喫煙者のそれは非喫煙者と COPD 患者の中間程度の値であった。BAP については 3 群間に有意差を認めなかった (図 6)。

3. dROMs とアクロレイン濃度との関係

肺組織においては dROMs とアクロレインの関

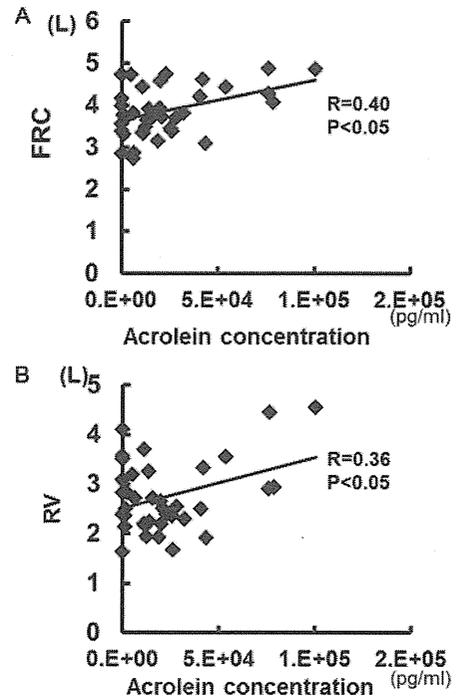


図 4. COPD 患者血漿中アクロレイン濃度と呼吸機能検査との関係

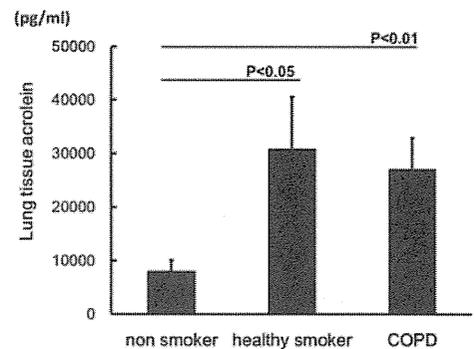


図 5. 肺組織蛋白抽出液中アクロレイン濃度

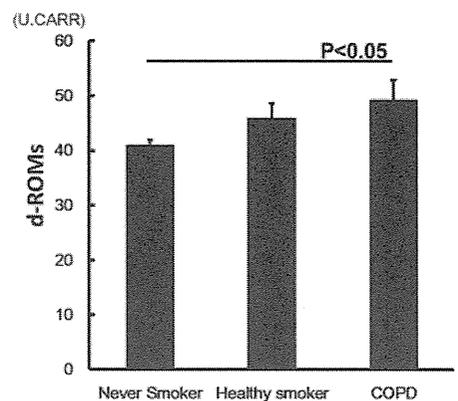


図 6. 肺組織蛋白抽出液中 dROMs

係は、非喫煙者、喫煙者、COPDの順に有意な相関関係が消失していき、COPD肺においてはdROMsとアクロレインとの相関は全く見られなかった(図7A-C)。

4. 呼吸機能との関連

COPD患者肺において肺組織抽出液中アクロレインと各種呼吸機能のパラメータとの相関を検討した。ピークフロー(L/s)において非常に良好な負の相関が認められた($R = 0.70, P < 0.05$) (図8)。

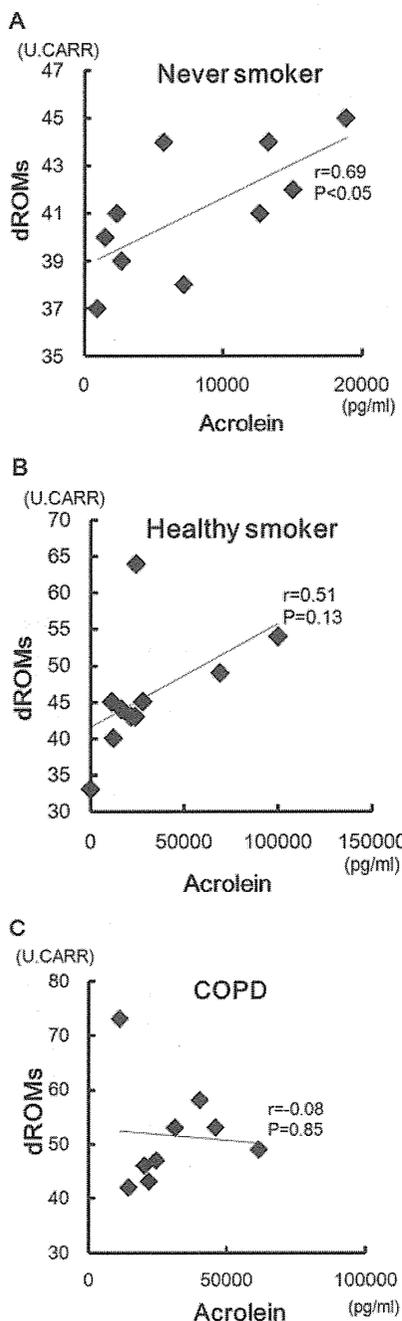


図7. 肺組織中dROMsとアクロレインとの関係

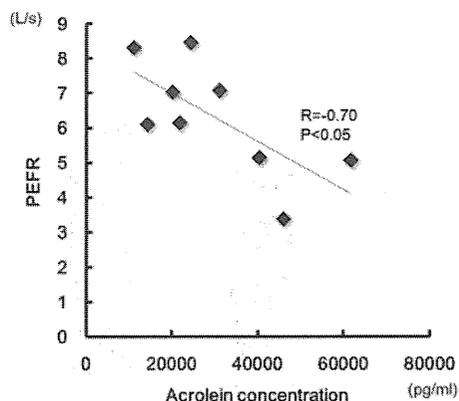


図8. COPD患者肺組織中アクロレイン濃度と呼吸機能検査との関係

考 察

今回の我々の研究は、酸化ストレスを惹起する物質の一つであるアクロレインがCOPDの全身性炎症にどのように関与しているのかを検討したものである。全身性の酸化ストレスを評価するために血漿をサンプルとして用いた。同一患者ではないが、対照として肺局所でのアクロレインの関与について検討した。

Sakataらは、慢性腎不全患者血漿において、アクロレイン濃度が上昇していること、腎不全の重症度が高いほど、アクロレイン濃度も高くなる傾向を報告している⁶⁾。また、Tomimoriらは、脳梗塞患者の血漿中アクロレインが梗塞のサイズに応じて高値をとること、アクロレインやその基質であるポリアミン、ポリアミノオキシダーゼなどが梗塞の存在を示唆するマーカーとなり得ることを報告している⁷⁾。

我々は、血漿中アクロレイン濃度はCOPD患者において健常喫煙者よりも有意に高値であり、COPDの重症度が高いほどアクロレイン濃度も高値になる傾向を示した(図1A, B)。この結果は、①動脈硬化や糖尿病など全身性の疾患が存在する脳梗塞や慢性腎不全患者血漿においてアクロレインが高値であったという報告があること、②COPDが全身性の炎症性疾患であり、動脈硬化性疾患や慢性腎不全が併存症としてしばしばみられる⁹⁾こととの関連から妥当な結果であると思われる。

る。我々の知る限り、これまでに COPD 患者血漿におけるアクロレインを調べた報告はない。

一方、肺組織蛋白抽出液中のアクロレイン濃度は非喫煙者と比較すると健常喫煙者、COPD 患者ともに高値であったが、健常喫煙者と COPD 患者との間には有意差を認めなかった (図 5)。酸化ストレス負荷の指標とされる dROMs とアクロレインとの相関においては血漿中では COPD 患者において良好な相関がみられた (図 3B) のに対して、肺組織においては非喫煙者、健常喫煙者、COPD 患者の順に dROMs とアクロレインとの相関が悪くなった (図 7A-C)。肺はアクロレイン他、外界からの酸化ストレス惹起物質と直接接触する臓器であり、健常喫煙者肺でも COPD 患者肺と同レベルのアクロレインであったことは驚くべきことではないと思われる。COPD 患者肺でアクロレインと dROMs との間に全く相関がない理由については、COPD 患者肺では酸化ストレス制御などに対する肺の構造保持に係る恒常性維持の破綻が病因として考えられており¹⁰⁾、個々の酸化ストレス惹起物質に対する適切な制御ができていない可能性がある。

アクロレインをマウスに吸入投与すると CD8 陽性細胞の働きにより肺胞マクロファージの集積が起こり、気腔の拡大を惹起するという報告¹¹⁾や、肺血管の修復に係る骨髄細胞のアポトーシスが惹起され、VEGF シグナルによる骨髄からの肺血管修復細胞の放出が抑制されるという報告¹²⁾がある。また、アクロレインをラットに腹腔内投与した場合でも肺胞構成細胞のアポトーシスを惹起し、気腔の拡大がみられる⁴⁾。このような外的なアクロレイン投与は過剰なアクロレイン負荷であり、確かに肺に変化を引き起こすかもしれないが、我々の今回の結果から考えると実際の環境下でのアクロレイン暴露においては、アクロレインが酸化ストレスを惹起する主体なのではなく、アクロレインをはじめとした酸化ストレス惹起物質に対する酸化ストレス制御の破綻が COPD の病因ではないかと考えられた。

血漿中アクロレインは生体内で産生されるものと考えられるが、アクロレインの存在は生体に酸化ストレスを惹起し^{1,2)}、酸化ストレスの存在は生体内でのアクロレイン産生を惹起し得る^{13,14)}ため、上述した肺の恒常性維持の破綻¹⁰⁾やクロマチンのリモデリング¹⁵⁾などの制御不全が COPD 患者に存在し、これがアクロレイン - 酸化ストレス間の炎症のサイクルを遷延させていると思われる。血漿中で有意に上昇しているアクロレインは血漿中酸化ストレス負荷の指標である dROMs と相関関係にあり、COPD の全身性疾患としての側面にアクロレインが関与していると推測された。

結 論

COPD 患者血漿において、dROMs (酸化ストレス負荷の指標) とアクロレイン (酸化ストレス惹起物質) の良好な相関がみられたことから、COPD 患者における血漿アクロレイン高値は、COPD における全身性の炎症に関与しているとともに、COPD の重症度を反映するマーカーにもなり得ると考えられた。

参考文献

1. Moretto N, Volpi G, Pastore F, Facchinetti F: Acrolein effects in pulmonary cells: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1259: 39-46
2. Stevens JF, Maier CS: Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52: 7-25
3. Birrell MA, Belvisi MG, Grace M, Sadofsky L, Faruqi S, Hele DJ, Maher SA, Freund-Michel V, Morice AH: TRPA1 agonists evoke coughing in guinea pig and human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180: 1042-7
4. Kitaguchi Y, Taraseviciene-Stewart L, Hanaoka M, Natarajan R, Kraskauskas D, Voelkel NF: Acrolein induces endoplasmic reticulum stress and causes airspace enlargement. *PLoS One.* 2012; 7: e38038
5. Borchers MT, Wesselkamper SC, Harris NL, Deshmukh H, Beckman E, Vitucci M, Tichelaar JW, Leikauf GD:

- CD8+ T cells contribute to macrophage accumulation and airspace enlargement following repeated irritant exposure. *Exp Mol Pathol.* 2007 ; 83 : 301 - 10
6. Sakata K, Kashiwagi K, Sharmin S, Ueda S, Irie Y, Murotani N, Igarashi K: Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 305 : 143 - 9
 7. Tomitori H, Usui T, Saeki N, Ueda S, Kase H, Nishimura K, Kashiwagi K, Igarashi K: Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke. *Stroke.* 2005 ; 36 : 2609 - 13.
 8. Agusti A, Calverley PM, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Rennard S, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters E, Yates JC, Vestbo J: Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) investigators. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res.* 2010 ; 11 : 122
 9. Divo M, Cote C, de Torres JP, Casanova C, Marin JM, Pinto-Plata V, Zulueta J, Cabrera C, Zagaceta J, Hunninghake G, Celli B: BODE Collaborative Group. Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 ; 186 : 155 - 61
 10. Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Mizuno S: COPD/emphysema : The vascular story. *Pulm Circ.* 2011 ; (3) : 320 - 6
 11. Borchers MT, Wesselkamper SC, Harris NL, Deshmukh H, Beckman E, Vitucci M, Tichelaar JW, Leikauf GD: CD8+ T cells contribute to macrophage accumulation and airspace enlargement following repeated irritant exposure. *Exp Mol Pathol.* 2007 ; 83 : 301 - 310
 12. Wheat LA, Haberzettl P, Hellmann J, Baba SP, Bertke M, Lee J, McCracken J, O'Toole TE, Bhatnagar A, Conklin DJ: Acrolein inhalation prevents vascular endothelial growth factor-induced mobilization of Flk-1+/Sca-1+ cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 ; 31 : 1598 - 1606
 13. Ghilarducci DP, Tjeerdema RS: Fate and effects of acrolein. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1995 ; 144 : 95 - 146
 14. Sugiyama A, Sun J, Nishinohara M, Fujita Y, Masuda A, Ochi T, Takeuchi T: Expressions of lipid oxidation markers, N(ϵ)-hexanoyl lysine and acrolein in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Vet Med Sci.* 2011 ; 73 : 821 - 826
 15. Sundar IK, Yao H, Rahman I: Oxidative Stress and Chromatin Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Smoking-Related Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2012 Nov 6. [Epub ahead of print]

COPD と *HIF1A* 遺伝子多型との関連

堀内 俊道¹, 花岡 正幸¹, 安尾, 将法¹, 伊東 理子¹

小林 信光¹, 太田 正穂², 久保 惠嗣¹

信州大学医学部内科学第一講座¹, 信州大学医学部法医学講座²

はじめに

COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: 慢性閉塞性肺疾患) は, タバコ煙などに含まれる有害物質 (外因性因子) の吸入により生じる肺の慢性炎症性疾患である。しかし, NICE study (2001 年) によれば COPD の有病率は現在喫煙者が約 15%, 非喫煙者が約 5% と報告されており¹⁾, COPD の病因については患者側の因子 (内因性因子) の関与も指摘されている。その中には $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症のように原因機序が明らかになっているものもあるが, 他にもさまざまな因子が存在する可能性がある。

HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) は HIF-1 α と HIF-1 β からなる二量体タンパク質であり, 細胞が低酸素状態になった際に誘導され転写因子として重要な役割を果たすことが知られている^{2,3)}。低酸素状態下では HIF-1 α はプロリン水酸化酵素による分解が低下し安定化し, 細胞核内にてさまざまな遺伝子の転写を促進し, VEGF やエリスロポエチンなどの産生を誘導する^{4,5)}。

当施設では, 以前に肺気腫患者の肺では HIF-1 α 蛋白の発現が低下していることを報告し, VEGF の減少による血管内皮細胞の障害がアポトーシスを介して COPD の発症, 進行に関与する可能性があることを示した⁶⁾。

今回我々は HIF-1 α 蛋白の発現の程度が COPD の発症や肺気腫の重症度に関与する可能性を考え, HIF-1 α 蛋白をコードする *HIF1A* 遺伝子の単塩基多型 (SNP) を健常喫煙者と COPD 患者で比較した。

対象と方法

I. COPD 患者群と健常喫煙者群の比較

関連病院等に健康診断目的で受診し, 呼吸機能検査で一秒率 70% 以上, 予測一秒量 80% 以上であった健常喫煙者 138 名と, 当院で診断された喫煙歴を有する COPD 患者 265 名を対象とした。

対象者に研究に対する説明を行い, 承諾を得て血液を採取し血漿を抽出した。血漿サンプルから Quickgene-800 (FUJIFILM) を用いて DNA を抽出した。

HIF1A 遺伝子上に存在する 7 か所の単塩基多型 (SNPs) (*rs19517975*, *rs1957757*, *rs2057482*, *rs2301113*, *rs4902080*, *rs10129270*, *rs11549465*) についてリアルタイム PCR 法を用いて genotyping を行い, COPD 群, 健常喫煙者群間で allele の発現頻度を χ 二乗検定で比較した。

II. COPD 患者の肺気腫スコアを用いた比較

I で有意差を認めた SNP について以下の解析を行った。

① COPD 患者群のうち, CT が施行された 160 例につき CT 画像の解析を行い, Goddard 分類⁷⁾ に基づき両肺野の 6 領域で low attenuation area (LAA) をスコア化 (LAA < 5% = 0 点, 5 < LAA < 25% = 1 点, 25 < LAA < 50% = 2 点, 50 < LAA < 75% = 3 点, 75% < LAA = 4 点) し, 合計 1 点以上の症例を肺気腫患者群として抽出し, 肺気腫患者群と健常喫煙者群で I と同様に allele の発現頻度を比較した。

② 有意差を認めた SNPs の遺伝子型において, minor allele の発現群と非発現群の間で, 肺気腫スコアの点数に差があるかを Mann-Whitney の U 検

定で比較した。

結果

患者背景を比較したところ、健常喫煙者群は COPD 群と比較して有意に年齢が若く、喫煙歴も少なかった。また、呼吸機能検査上は COPD 群において、一秒量などの低下を認めた。(表 1)

I. COPD 患者群と健常喫煙者群の比較

HIF1A 遺伝子上の 7 か所の SNP について COPD 患者群と健常喫煙者群間で allele の発現頻度を比較したところ *rs4902080* で有意差を認めた

表 1. 患者背景

	COPD N = 265	Control N = 138
年齢	71.2 ± 7.6*	63.3 ± 10.0
性別 (男/女)	253/5	136/4
喫煙歴 (pack years)	59.6 ± 29.6*	39.1 ± 18.9
FEV1.0	1.61 ± 0.65*	2.63 ± 0.51
FEV1.0%	51.9 ± 11.4*	80.4 ± 5.9
%FEV1.0	59.1 ± 22.0*	88.6 ± 13.2

Data are expressed as mean ± SD

* P < 0.01 vs control by the Mann-Whitney U test

(P = 0.0145)。その他の SNPs では有意差を認めなかった。(表 2)

rs4902080 について、さらに両群間で比較検討したところ、各遺伝子型の発現頻度について有意差を認めた (P = 0.0363)。

また、COPD 群では健常喫煙者群と比較して遺伝子型において minor allele T の発現頻度が有意に高かった (P = 0.0100, O.R. 0.50)。(表 3)

一方 major allele C の発現頻度には差を認めなかった。

II. COPD 患者の肺気腫スコアを用いた比較

rs4902080 について、COPD 患者群から抽出した肺気腫患者群と健常喫煙者群間で I と同様に allele 頻度、遺伝子型の発現頻度を比較したが、いずれも有意差を認めなかった。

また、minor allele T の発現群 (CT または TT) 36 例と非発現群 (CC) 124 例の肺気腫スコアを比較したところ、有意な差を認めた (P = 0.0312)。平均点は allele T 発現群 12.6 ± 9.01 点、非発現群 9.36 ± 7.68 点であった。(表 4)

表 2. COPD 患者 (COPD) と健常喫煙者 (Control) における *HIF1A* 遺伝子内の SNPs の allele 発現頻度の比較

db SNP *	location	Allele	COPD	Control	O. R.	P
			2N = 530	2N = 276		
Allelic Positivity n (%)						
rs1951795	intron	C	412 (77.7)	224 (81.2)	0.81	0.258
		A	118 (22.3)	52 (18.8)		
rs10129270	intron	G	461 (87.0)	247 (89.5)	0.78	0.300
		A	69 (13.0)	29 (10.5)		
rs1957757	intron	C	444 (83.8)	243 (88.7)	0.66	0.061
		T	86 (16.2)	31 (11.3)		
rs2301113	intron	A	314 (59.7)	174 (63.5)	0.85	0.295
		C	212 (40.3)	100 (36.5)		
rs11549465	exon	C	495 (93.8)	254 (92.0)	1.3	0.359
		T	33 (6.3)	22 (8.0)		
rs4902080	intron	C	451 (86.1)	252 (92.0)	0.54	0.0145
		T	73 (13.9)	22 (8.0)		
rs2057482	terminator	C	418 (79.5)	233 (84.4)	0.71	0.08
		T	108 (20.5)	43 (15.6)		

* SNP designations are from the NCBI SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

表 3. COPD 患者 (COPD) と健常喫煙者 (Control) における *HIF1A* 遺伝子内の *rs4902080* の allele 発現頻度および遺伝子多型の頻度の比較

rs4902080	Type	COPD N = 265	Control N = 138	O. R.	P	P †
Allelic frequency n (%)	C	451	252	0.54	0.0145	
	T	73	22	1.84*		
	CC	192	126	0.5	0.0100	
	CT	67	10	2.01	0.0117	0.0363
Genetic distribution n (%)	TT	3	1	1.58	0.693	
	CC	192	116	0.50		
	CT+TT	70	21	2.01**	0.0100	

N number of subjects, n number of present alleles or genotypes correspondingly

P and P † values were calculated with χ square tests of 2 x 2 contingency table and 3 x 2 contingency table,

* Odds ratio = 1.84, 95% Confidence Intervals = 1.12 - 3.06

** Odds ratio = 2.00, 95% Confidence Intervals = 1.17 - 3.45

表 4. COPD 患者の *HIF1A* 遺伝子内の *rs4902080* の minor allele T 発現群 (CT + TT) と非発現群 (CC) における肺気腫スコアの比較

rs4902080	COPD with CT		P
	CC N=124	CT + TT N=36	
Score	9.36 ± 7.68	12.6 ± 9.01	0.0312*

Data are expressed as mean ± SD

N = number of subjects

P value were calculated with the Mann-Whitney U

考 察

HIF1A 遺伝子は第 14 染色体上 (14q23.2, 52.86Kb) に存在し, 15 exons から構成される遺伝子である。

HIF-1 α は正常酸素圧下では速やかに分解されてしまうが, 細胞が低酸素状態に陥ると安定化し, 核内において転写因子として VEGF やエリスロポエチンなどの産生を促進する。

COPD 患者では HIF-1 α 活性が健常者よりも低下していることが知られており, COPD の発症や進行に関連する内因的な要因の一つである可能性がある。

健常喫煙者群と COPD 患者群で *HIF1A* 遺伝子の SNPs を比較したところ, *rs4902080* において有意差を認め, COPD 群で allele T を保持する割合が健常喫煙者群と比較して有意に高かった。

rs4902080 の allele は C と T があり, *HIF1A* 遺伝

子の exon 12 の近傍の intron に存在する。*HIF1A* 遺伝子のこの SNP が COPD の発現に関連する可能性が考えられた。

COPD 患者では, HIF-1 α 蛋白によって制御される VEGF の産生が低下することで, 血管内皮細胞のアポトーシスが惹起され, 肺気腫を誘導する仮説がある。このため COPD 患者群の CT 画像から Goddard 分類に基づき肺気腫患者群のみを抽出し, Goddard 分類の肺気腫スコアを allele T を持つ群 (CT + TT) と持たない群 (CC) で比較したところ allele T を持つ群で有意にスコアが高かった。

しかし健常喫煙者群と肺気腫患者群の比較では, *rs4902080* の発現頻度に有意差を認めなかった。

rs4902080 の検討で, allele T を保持している頻度が健常喫煙者群より COPD 患者群で有意に高く, allele T 保持者で肺気腫が重症化する傾向がみられたことは興味深く, 今後さらに解析をしていく予定である。

結 論

COPD 患者と非喫煙健常者の *HIF1A* 遺伝子上の遺伝子多型に関連が認められ, 遺伝子型の変異が肺気腫の重症度に関連する可能性が示唆された。

参考文献

1. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, Adachi M, Nagai A, Kuriyama T, Takahashi K, Nishimura K, Ishioka S, Aizawa H, Zaher C: COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study, *Respirology* 2004 Nov; 9(4): 458-65
2. Ikeda E: Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. *Pathol Int* 2005; 5510: 603-610
3. Damert A, Ikeda E, Risau W: Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells, *Biochem J* 1997 ; 327pt 2 : 419-423
4. Damert A, Ikeda E, Risau W: Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells, *Biochem J* 1997 ; 327pt 2 : 419-423
5. Semenza GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol Cell Biol* 1992; 1212: 5447-5454
6. Yasuo M, Mizuno S, Kraskauskas D: Hypoxia inducible factor-1alpha in human emphysema lung tissue, *Eur Respir J* 2011 ; 374 : 775-783
7. Goddard PR, Nicholson EM, Laszlo G, Watt I: Computed tomography in pulmonary emphysema, *Clin Radiol* 1982 ; 33 : 379-87

早期の COPD における VEGFR2 と肺機能, 気腫性変化との関連

室 繁郎¹, 高橋 珠紀¹, 小川恵美子^{2,3}, 清川 寛文¹, 佐藤 晋¹
星野 勇馬¹, 平井 豊博¹, 中野 恭幸³, 三嶋 理晃¹

京都大学大学院医学研究科呼吸器内科学¹, 滋賀医科大学保健管理センター²
滋賀医科大学呼吸器内科³

背景

慢血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は血管内皮細胞の増殖, 遊走, アポトーシスの阻害に関与する。VEGF とその受容体 1・2 は末梢血管と気道のリモデリングの過程に関与していることが報告されている¹⁾。気腫肺において, VEGF の発現は減少していた²⁾。さらに, 気道上皮細胞での VEGF 発現は非喫煙者・non-COPD 喫煙者に比べて COPD 患者で減少していた³⁾。また受容体についての既報によると, 気腫肺における VEGFR2 の発現は減少し²⁾, COPD 患者での VEGFR2 発現も減少していた³⁾。さらに, VEGF 受容体阻害剤はラット肺で肺胞隔壁のアポトーシスを引き起こし血管密度を減少させることも報告されている⁴⁾。これらのことから, COPD の病因には VEGF および VEGF 受容体が密接にかかわっていると考えられる。

仮説

肺における VEGF 受容体の減少が血管内皮細胞の機能異常を引き起こし, 拡散能の低下と気腫につながる。

目的

VEGF, VEGF 受容体, 肺機能, CT パラメータとの関連を検討する。

対象と方法

京都大学における肺組織バンクレジストリ 85 検体 (26 非喫煙者/29 非 COPD 喫煙者/30COPD 患者)を用いた。造影 CT にて Low attenuation volume (LAV%), 肺機能検査, 全肺組織での VEGF, VEGFR1, VEGFR2, eNOS の mRNA 発現を検討した。

結果

患者背景を表 1 に示す。

表 1. 患者背景

n = 85				
	非喫煙者 (n = 26)	非 COPD 喫煙者 (n = 29)	COPD 患者 (n = 30)	P
Age (year)	62 (58-71)	68 (59.5-73)	70.5 (62.8-76)	0.0348
Sex (M/F)	6/20	22/7	26/4	<0.0001
喫煙状況 (C/F)	-	10/19	17/13	0.12
喫煙歴 (Pack-year)	0	57 (38.8-78.5)	56 (38.2-84)	0.82
BMI (kg/m ²)	21.6 (19.9-23.7)	22.8 (20.2-24.8)	21.5 (20.1-23.8)	0.483
FEV ₁ (L)	2.11 (1.87-2.48)	2.58 (2.31-2.89)	2.19 (1.89-2.64)	0.0119
FEV ₁ (%)	102.1 (91.7-108.6)	97.4 (87.0-105.9)	83.3 (75.3-92.0)	<0.0001
DL _{CO} /V _A	4.73 (3.87-5.34)	3.31 (2.73-4.86)	3.00 (2.11-3.90)	<0.0001
RV/TLC	38.4 (35.3-41.7)	38.2 (33.3-42.2)	43.0 (34.8-45.1)	0.197

非喫煙者が他の2群よりも若年で女性が有意に多かった。1秒量, %1秒量は COPD 患者群で低下が見られ, DL_{CO}/V_A は喫煙者で低下していた。

3群間での全肺での mRNA 発現を検討すると, eNOS, VEGF, VEGFR1 発現は喫煙歴や COPD かどうかとは関連していなかった。VEGFR2 は COPD 患者で他の2群よりも低い傾向が見られた ($p = 0.066$, 図1)。

さらに喫煙者にしぼった解析では, VEGFR2 は DL_{CO}/V_A と正の相関があり ($\rho = 0.343, p = 0.010$, 図2), %LAV と負の相関の傾向が見られた ($\rho = -0.278, p = 0.051$, 図3)。VEGFR2 は %FEV₁ や RV/TLC との相関は見られなかった。

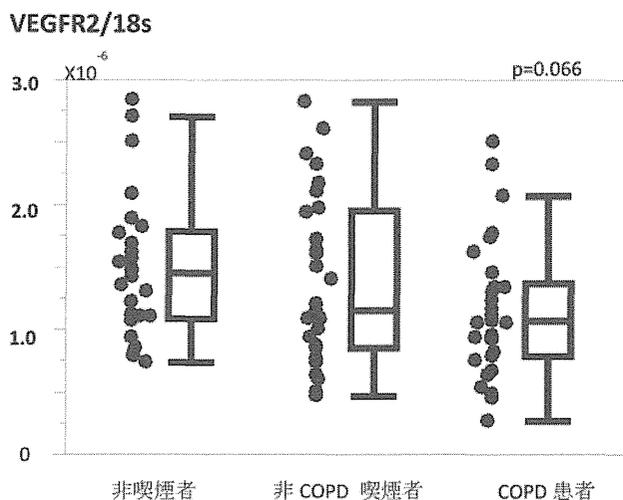


図1. 全肺での VEGFR2 発現 (mRNA)

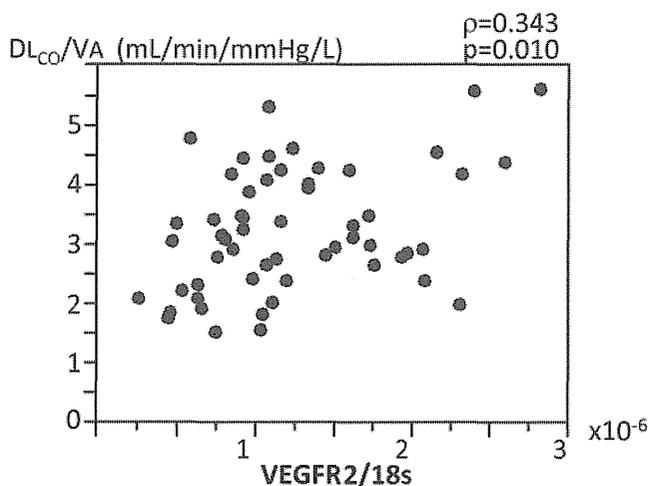


図2. DL_{CO}/V_A と VEGFR2 の関係

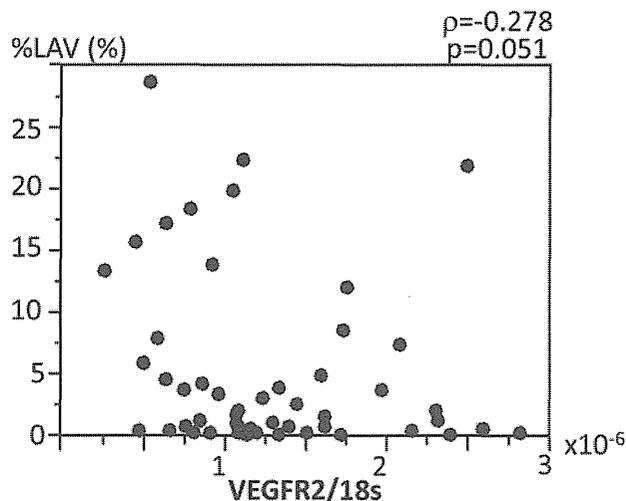


図3. %LAV と VEGFR2 の関係

考案

COPD 患者での VEGFR2 発現は全肺で減少していた。 DL_{CO}/V_A は血管でのガス交換を反映するが, これは気腫肺で有意に減少していた。またこの DL_{CO}/V_A は COPD 患者で初期から低下が見られるが, 今回の検討でも非 COPD 喫煙者でも低下が見られていた。これらのことから, VEGFR2 発現の減少が早期 COPD 患者の拡散能の低下および気腫の進行と関連している可能性があると考えられる。

結語

COPD患者において VEGFR2 発現の低下は COPD 発症早期における拡散能の低下, および気腫の進行と関連している可能性がある。

参考文献

1. Siafakas NM, et al. : *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007
2. Kasahara Y, et al. : *Am J Respir Crit Care Med.* 2001
3. Suzuki M, et al. : *Inhal Toxicol.* 2008
4. Kasahara Y, et al. : *J Clin Invest.* 2000

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 増悪が骨密度に及ぼす影響

室 繁郎, 清川 寛文, 高橋 珠紀, 佐藤 晋
小熊 毅, 星野 勇馬, 平井 豊博, 三嶋 理晃

京都大学医学部附属病院呼吸器内科

はじめに

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は肺のみならず全身性併存症を引き起こす全身性疾患¹⁾として知られている。その中でも骨粗鬆症は骨折を引き起こし QOL 低下²⁾や呼吸機能低下を起こしうるため、COPD における重要な併存症である。ただその詳細なメカニズムは依然として不明であり、全身性炎症の関与などが示唆されている程度である。我々は以前の報告³⁾で、COPD 増悪と骨密度低下が強く関連していることを縦断的研究で示した。ただその研究では増悪に伴うどの因子が骨密度低下を引き起こしているのかまでは検討できておらず、病態学的な解明が必要となっている。

そこで我々は COPD 増悪における骨密度低下のメカニズムを検討するため以下のような動物モデルを作成し病態検討を行った。使用したモデルは喫煙マウスモデルで、そこに Poly (I:C) 投与 (以下 PIC とする) を行い疑似増悪マウスモデルとした。PIC は dsRNA であり TLR3 を介し炎症の増強や気腫の増悪を引き起こすことが既報⁴⁾で示されており、疑似ウイルス感染として使用される物質である。

方法

喫煙マウスモデル (C57Bl/6, 10 週齢, オスマウス) に対して3日間の全身性喫煙暴露 (40 本/日) を行った。その後3日目の喫煙暴露終了後に経気道的に PIC 投与 (1mg/kg) を行った。PIC 投与3時間後に血中サイトカイン, PIC 投与24時間後骨における破骨細胞関連因子, 破骨前駆細胞の分化能の検討を行った。

破骨前駆細胞の分化能については、各マウスの脛骨から PBS を使用し採取, その後10日間 α MEM 培地にて培養を行った。培養終了後, TRAP 染色を施行し, TRAP 陽性細胞を成熟破骨細胞としてカウントを行った。

結果

血中サイトカインについては CS/PIC 投与群では他群 (control 群/CS 単独群/PIC 投与群) に比べ, IL-6・MCP-1 が有意に増加していた (以下喫煙暴露は CS と略す)。

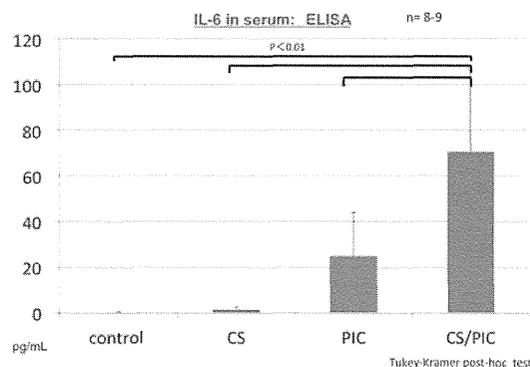


図1. PIC 投与3時間後の血中 IL-6 濃度

同様に CS/PIC 群においては他群に比べ破骨細胞関連因子である RANKL/OPG, TRAP がともに有意に増強していた。

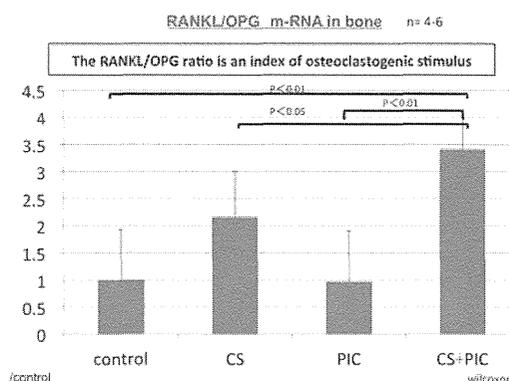


図2. PIC 投与24時間後の RANKL/OPG 発現

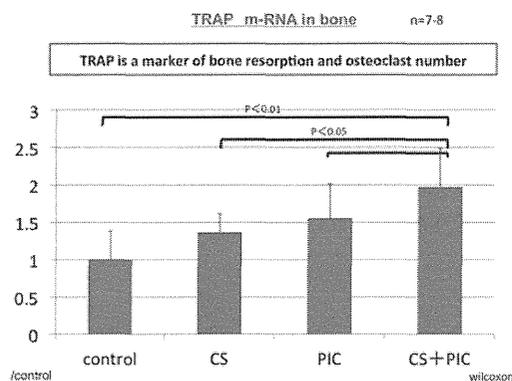


図 3. PIC 投与 24 時間後の TRAP 発現

また破骨前駆細胞の分化能も CS/PIC 群においては他群に比べ有意に亢進していた。

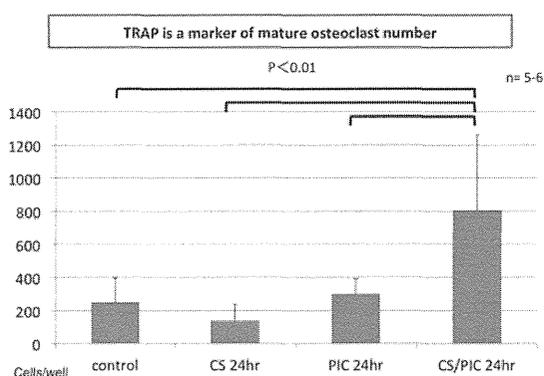


図 4. 各群における破骨前駆細胞の分化能

考 察

喫煙マウスに対する経気道的 PIC 投与が炎症性サイトカインの増強を引き起こし、破骨細胞の分化促進など骨に対する全身性の影響を引き起こしていることが確認された。このモデルにおける破骨細胞への影響を検討することで COPD 患者

における骨密度低下の要因を解明できると考えられる。

今後の検討課題としては、①各群における破骨前駆細胞の分化能亢進がどのような機序によるものかを解明し、② IL-6, MCP-1 などのサイトカインと関連しているのかを検討する必要があると考えられる。

結 語

COPD 増悪における骨密度の低下の要因として、ウイルス感染を契機とする全身性炎症の増悪が破骨細胞の分化に寄与している可能性が示唆された。今後は長期喫煙マウスモデルにて同様の検討を行い、実際に骨密度の低下がみられるかどうか検討する必要がある。

参考文献

1. Rondriguez-Roisin R : Global strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD (UPDATED 2010). <http://www.goldcopd.com> December 2010
2. Lehouck A, Boonen S, Decramer M : COPD, bone metabolism, and osteoporosis. Chest 2011 Mar ; 139 (3) : 648 - 657
3. H. Kiyokawa, S. Muro, M. Mishima et. al : Impact of COPD Exacerbations on Osteoporosis Assessed by Chest CT Scan, COPD 2012 Jun ; 9 (3) : 235 - 42
4. Kang MJ, Lee CG, Lee JY, et. al : Cigarette smoke selectively enhances viral PAMP- and virus-induced pulmonary innate immune and remodeling responses in mice J Clin Invest. 2008 Aug ; 118 (8) : 2771 - 84

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の発症と病態に關与する microRNA - SMP30 ノックアウトマウスを用いた解析 -

佐藤 匡, 三井 亜樹, 加藤 元康, 鈴木 洋平, 高橋 史行
児玉 裕三, 関谷 充晃, 瀬山 邦明, 高橋 和久
順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科学

はじめに

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は代表的な老年呼吸器疾患である。本邦においては 40 歳以上の約 8.5%, 人口にして約 530 万人が罹患しているとされ, 死亡原因として今後も増加することが予想されている¹⁾。しかしながら, 現存の薬物治療では, 病気の進行を予防し, 予後を改善する効果は乏しいのが現状である。COPD の中心的な発症メカニズムは, 気道や肺の慢性炎症による障害であると考えられ, リスク因子として最も重要なのは喫煙であることは論を待たない。COPD 患者では健常喫煙者に比較して, 喫煙による気道や肺の炎症が異常に亢進している。

これまでにわれわれは, 老化促進マウスとして SMP30 (Senescence Marker Protein 30: 加齢指標タンパク質 30) ノックアウトマウス SMP30-KO を確立した。SMP30 は性ホルモンによる制御を受けず, 雌雄ともに加齢に伴い肝臓や腎臓, 肺で減少するタンパク質である²⁾。われわれは, SMP30-KO マウスにおいて, 加齢に伴う気腔の拡大が, 対照マウスと比較して早期に出現する老人肺モデルとなること³⁾, また, 8 週間という比較的短期間の喫煙曝露により, COPD の主要な病理変化である肺気腫, すなわち肺胞径の拡大と肺胞壁の破壊を生じることを見出し, このマウスが老化因子を有するユニークな COPD モデルマウスになることを報告した⁴⁾。さらにこれに続く研究で, SMP30-KO における喫煙感受性の変化の原因として, ビタミン C 合成能の欠損が深く関わり^{5, 6)}, ビタミン C を補充する治療介入実験の結果, ビ

タミン C は喫煙に伴う肺気腫を改善することを明らかにした (論文作成中)。

また, COPD の病態を検討・解明する上で, 気道上皮細胞のみならず肺線維芽細胞がその発症に深く関わっており, さらに線維芽細胞が関与すると考えられる COPD 肺における, 増幅し遷延する「異常な炎症」が特定の microRNA, miR-146a により制御されうることが *in vitro* 解析により明らかにし, 報告した⁷⁾。すなわち, COPD における炎症サイトカインによる miR-146a の不十分な上昇が, COPD の中心病態である, 異常に亢進しかつ遷延する炎症反応の原因となっている可能性が考えられた。microRNA は非常に小さな non-coding RNA の一種で, 遺伝子発現調節機構に関わる重要な因子である。近年, 発生や細胞死, 細胞増殖といった多くの生物学的プロセスにこの因子が関与することが分かってきている。

本研究では, われわれが確立した COPD 動物モデルである SMP30-KO マウスに, 8 週間の喫煙曝露実験を行い, COPD 発症に関わる microRNA について網羅的に検討した。

対象と方法

1. 対象動物

東京都健康長寿医療センター研究所動物施設 SPF において飼育された雄 SMP30-KO マウス及び正常対照として雄 C57BL/6 マウスを使用した。本動物実験は東京都老人総合研究所及び順天堂大学医学部実験動物委員会にて承認を受けたものである。

2. 方法

3ヶ月齢 SMP30-KO 及び C57BL/6 (野生型) マウスを対象として、ノンフィルターピース (日本たばこ) を用いて 2.5% 希釈タバコ煙として 30 分間、週 5 日、8 週間の曝露実験を行った。タバコ煙曝露装置 SG-200 (柴田科学) にて経鼻的に曝露させた。なお、両マウスそれぞれに同期新鮮大気を曝露したものを対照とした。

タバコ煙曝露後のマウス肺組織から *mirVana* miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて Total RNA を抽出し、マイクロアレイ法 (TORAY Mouse miRNA Oligo chip ver. 16 使用) および TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を用いた real-time PCR 法にて、microRNA の発現プロファイルを検討した。

群間の統計解析は ANOVA を行い、ポストテストとして Kruskal-wallis test を行った。統計ソフトは GraphPad Prism 5 (GraphPad) を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

結果

1. 慢性喫煙曝露後の肺組織中 microRNA 発現プロファイル

8 週間のタバコ煙曝露あるいは新鮮大気曝露を

行った、SMP30-KO および野生型マウスの 4 群間での肺組織中 microRNA 発現を網羅的に解析した。各群間の microRNA 発現プロファイルの相違に関する階層クラスター分析の結果を Fig. 1 に示す。野生型マウスにおける喫煙の有無による変化 (レーン①) および SMP30-KO と野生型マウスの非喫煙 (新鮮大気曝露) 群での発現の相違 (レーン②) が同じクラスターに、一方、SMP30-KO マウスにおける喫煙の有無による変化 (レーン③) とタバコ煙曝露後の SMP30-KO および野生型マウスでの相違 (レーン④) が同じクラスターに分類された。

非喫煙群では、SMP30-KO と野生型マウスを比較すると、肺組織において 1.5 倍以上の発現の相違がみられた microRNA 数は 86 であった (SMP30-KO > 野生型 = 19, SMP30-KO < 野生型 = 67)。

タバコ煙曝露群では、40 の microRNA が SMP30-KO マウス肺で発現が有意に亢進しており、miR-155 及び miR-223 などが含まれていた (Table 1)。一方、喫煙後の SMP30-KO マウス肺で発現が有意に低下している microRNA は 59 であり、miR-1, 133, 206 といった microRNA が含まれていた (Table 2)。

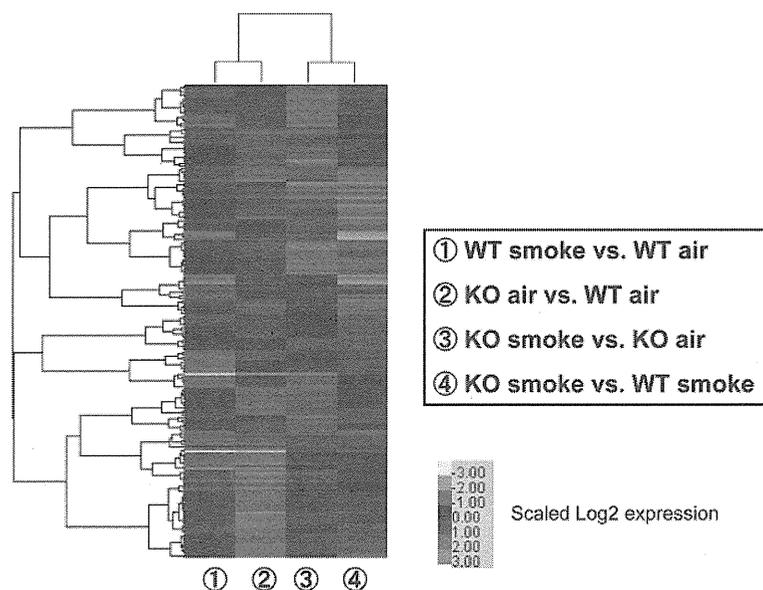


Fig.1. Hierarchical clustering result of differentially expressed miRNAs in lungs

Table 1. Top 10 UP-regulated miRNAs in the lungs of SMP30-KO mice compared with wild type mice after cigarette smoke exposure

miRNA	Log2 ratio	(KO smoke/WT smoke [†])
mmu-miR-30c-1*	1.22	(22.7/9.7)
mmu-miR-155	0.96	(227.8/116.8)
mmu-miR-135b	0.88	(28.4/15.5)
mmu-miR-146b	0.84	(1285.9/718.8)
mmu-miR-672	0.73	(65.7/39.7)
mmu-miR-200b*	0.73	(35.2/21.3)
mmu-miR-223	0.70	(2018.3/1243.8)
mmu-miR-34a*	0.67	(27.8/17.5)
mmu-miR-3096-3p	0.65	(123.5/79.0)
mmu-miR-652	0.63	(682.3/440.2)

([†] Values of expression after global normalization)

Table 2. Top 10 DOWN-regulated miRNAs in the lungs of SMP30-KO mice compared with wild type mice after cigarette smoke exposure

miRNA	Log2 ratio	(KO smoke/WT smoke [†])
mmu-miR-206	-4.75	(7.1/191.0)
mmu-miR-615-5p	-2.08	(8.3/35.3)
mmu-miR-219-3p	-1.99	(6.6/26.1)
mmu-miR-133a	-1.89	(173.6/643.1)
mmu-miR-679-5p	-1.85	(10.0/36.1)
mmu-miR-205	-1.81	(70.5/246.6)
mmu-miR-133b	-1.61	(333.0/1014.6)
mmu-miR-1	-1.53	(693.9/1998.7)
mmu-miR-142-5p	-1.43	(186.3/502.2)
mmu-miR-133a*	-1.42	(28.5/76.4)

([†] Values of expression after global normalization)

2. Real-time PCR による microRNA 発現 validation

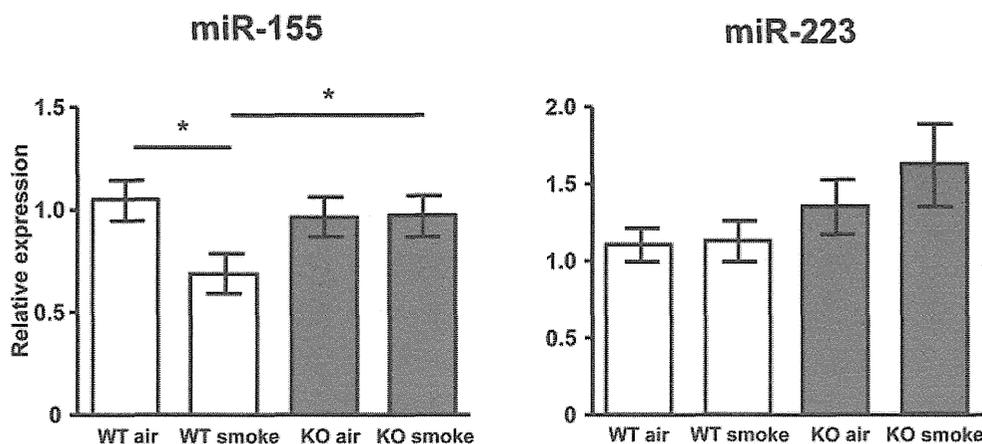
タバコ煙曝露群において、SMP30-KO マウス肺と野生型マウス肺との間で発現変化が認められた microRNA について、real-time PCR 法を用いて定量的な発現解析を追加した。マイクロアレイの結果より 1.5 倍以上の発現変化があり、また、一定以上 (global normalization を行った後の value が 100 以上) の発現量が認められる microRNA を選択した。

miR-155 は野生型マウスで、タバコ煙曝露により有意に発現が低下し、SMP30-KO マウス肺ではその傾向がみられないことがわかった。また、miR-223 についてはタバコ煙曝露後の SMP30-KO マウス肺で発現が亢進する傾向はみられたが統計学的有意差はなかった (Fig. 2)。

一方、miR-1, 133a, 133b, 206 の各 microRNA は、野生型マウスにおいてタバコ煙曝露により発現が亢進することが明らかとなり、miR-206 と miR-133b については統計学有意差を認めた (Fig. 3)。

考 察

今回、COPD モデルマウスの肺組織において、野生型マウスとの間で microRNA の発現プロファイルが大きく異なることが明らかとなった。マイクロアレイの結果より抽出された microRNA と

**Fig. 2.** Validation of differentially expressed miRNAs. miR-155 and miR-223.

* $P < 0.05$.

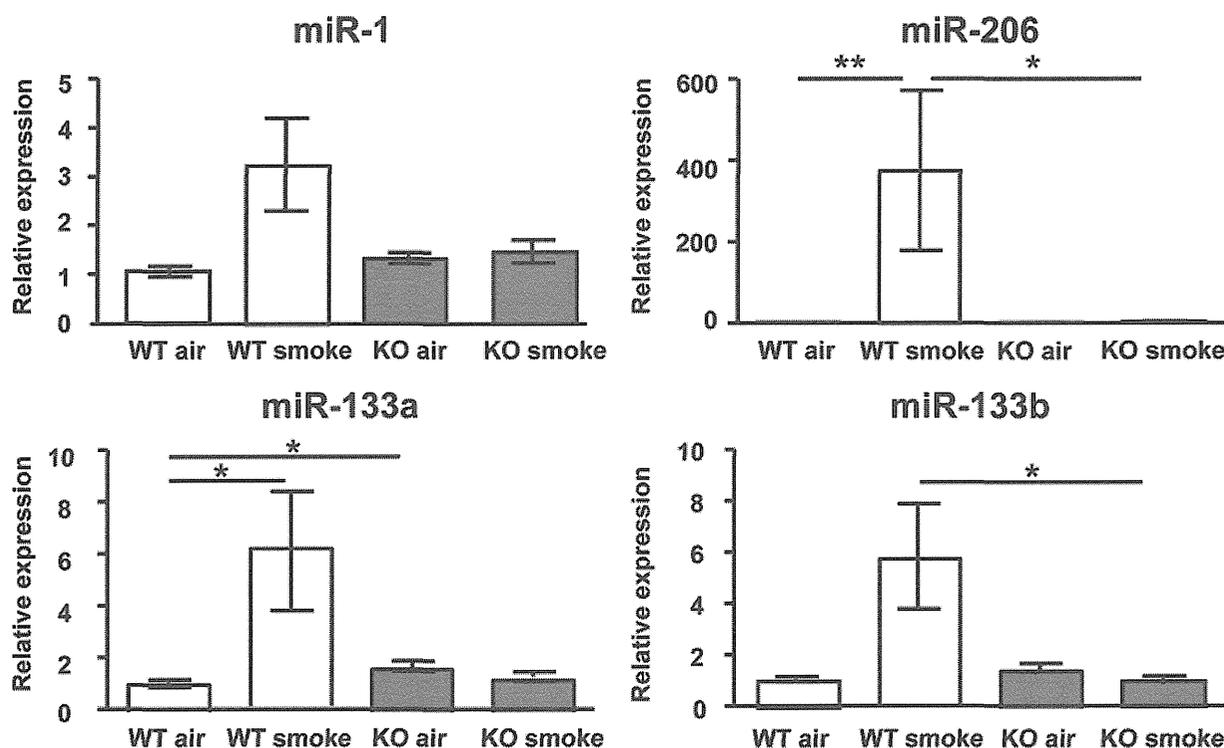


Fig. 3. Validation of differentially expressed miRNAs. miR-1, 133a, 133b and 206.
* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$.

して、これまで炎症性疾患との関連が報告されている miR-155 や miR-223 が含まれていたことは、COPD の発症メカニズムとの関連を示唆すると思われる興味深い。また、miR-1, 133a, 133b, 206 といった一連の microRNA は同一あるいは近位のクラスターとして存在しており、これまでの報告では筋疾患や虚血性心疾患との関連が示唆されている⁸⁾。2011 年の Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) の改訂においても、心疾患をはじめとした併存症の存在をより積極的に考慮すべきとする COPD の治療管理戦略が強調されている⁹⁾。全身性疾患として COPD を捕らえ直してみると、こうした microRNA が病態に関わっている可能性は大いにあると考えられる。いずれにせよ、今回抽出した microRNA が COPD の発症メカニズムにどのように関わるかを検討していくことが次の課題である。すでに今回解析したのと同じ RNA を用いて、それぞれの

microRNA が標的とし得る遺伝子の発現解析を開始している。

COPD の発症メカニズムについては多方面からのアプローチがなされ、多くの知見が集積している¹⁰⁾。しかし、COPD 患者の損なわれた肺機能を劇的に回復させる治療薬がまだ出現していないことが、最大の臨床的問題点である。COPD の症例ごとの多様性、さらには同一個体内における病変の多様性を鑑みるに、エピジェネティックな調節機構が COPD 発症において重要な役割を担っている可能性がある。DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティクス制御に加え、microRNA による制御が注目されており、COPD に関わる可能性のある microRNA についても少しずつ報告されてきている¹¹⁻¹⁴⁾。われわれは今後も、microRNA が COPD の画期的なバイオマーカーあるいは治療ターゲットとなると信じて研究を進めていく。

結 論

慢性喫煙曝露により、COPD モデル動物である SMP30-KO マウスと野生型マウスとの肺組織において、microRNA 発現プロファイルの明らかな相違を認めた。喫煙によって肺組織での発現が変化するこれらの microRNA は、COPD の病態に関与する可能性があると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、SMP30-KO マウスを供与いただきました、東京都健康長寿医療センター研究所老化制御研究グループ、石神昭人先生、近藤嘉高先生、丸山直記先生に深謝申し上げます。

参考文献

1. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, et al: COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology* 2004 ; 9 (4) : 458 - 65
2. Fujita T, Uchida K, Maruyama N: Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1992 ; 1116 (2) : 122 - 8
3. Mori T, Ishigami A, Seyama K, et al: Senescence marker protein-30 knockout mouse as a novel murine model of senile lung. *Pathol Int* 2004 ; 54 (3) : 167 - 73
4. Sato T, Seyama K, Sato Y, et al: Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 ; 174 (5) : 530 - 7
5. Kondo Y, Ishigami A, Kubo S, et al: Senescence marker protein-30 is a unique enzyme that hydrolyzes diisopropyl phosphorofluoridate in the liver. *FEBS Lett* 2004 ; 570 (1 - 3) : 57 - 62
6. Koike K, Kondo Y, Sekiya M, et al: Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010 ; 298 (6) : L784 - 92
7. Sato T, Liu X, Nelson A, et al: Reduced miR-146a increases prostaglandin E₁ in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 ; 182 (8) : 1020 - 9
8. Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D: MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2010 ; 42 (8) : 1252 - 5
9. Global strategy for the diagnosis, Management and Prevention of COPD. (www.goldcopd.org) 2011
10. MacNee W, Tuder RM: New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. *Proc Am Thorac Soc* 2009 ; 6 (6) : 527 - 31
11. Ezzie ME, Crawford M, Cho JH, et al: Gene expression networks in COPD: microRNA and mRNA regulation. *Thorax* 2011 ; 67 (2) : 122 - 31
12. Pottelberge GR, Mestdagh P, Bracke KR, et al: MicroRNA expression in induced sputum of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011 ; 183 (7) : 898 - 906
13. Mizuno S, Bogaard HJ, Gomez-Arroyo J, et al: MicroRNA-199a-5p is associated with hypoxia-inducible factor-1alpha expression in lungs from patients with COPD. *Chest* 2012 ; 142 (3) : 663 - 72
14. Akbas F, Coskunpinar E, Aynaci E, et al: Analysis of serum micro-RNAs as potential biomarker in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res* 2012 ; 38 (6) : 286 - 94

COPD 随伴症状としての慢性咳嗽および気道過分泌の病態に関する研究： CASA-Q 質問票を用いた検討

近藤 光子, 山田 武, 多賀谷 悦子, 切士 紗織, 武山 廉, 玉置 淳

東京女子医科大学第一内科学

はじめに

咳嗽・喀痰は、労作時息切れと並んで COPD の重要な臨床症状である。とくに“慢性気管支炎”患者では、冬季に上記症状が連続して認められることが特徴的であり診断の条件でもある。通常、COPD でみられる咳嗽は、気道過敏性に由来する喘息の咳とは異なり、気道分泌亢進に付随するもの、すなわち痰を喀出するために生ずる咳であることが多い。これまでに報告されたいくつかの疫学調査によれば、COPD 患者のうち慢性的に喀痰を有する症例では、痰のない症例に比較して COPD 増悪の頻度が高いこと、救急外来受診や入院回数が多いこと、長期的な予後が悪いことなどがわかっており、また病理学的にも末梢気道の気腔における粘液分泌物の占有率と閉塞性換気障害の程度との間に正の相関が認められている¹⁾。これらの詳細なメカニズムは不明であるが、粘稠な粘液糖蛋白（ムチン）が気管支内腔に滞留するために気道抵抗が増大するとともに、粘液線毛輸送障害に基づく気道感染が惹起されやすくなるものと想定されている²⁾。さらに最近、若年のうちから慢性的に咳嗽・喀痰のある者は、そうでない者よりも将来 COPD を発症する危険が高いことが報告された^{3, 4)}。したがって、気道分泌亢進は COPD の重症度や増悪を規定するのみならず、本症の発症にも関わる因子である可能性が窺える。このような背景より、薬物治療によって気道分泌を制御することは、COPD の管理・治療にとどまらず、発症予防の面からも重要と考えられる。

対象と方法

本研究は東京女子医科大学倫理委員会の許可を得て行われた。対象疾患は COPD であり、そのうち過去 8 週間以上にわたって継続的に咳嗽および喀痰を訴えている、当院外来患者である。臨床試験へのエントリー除外基準は、現在喫煙中の患者、過去 4 週間以内に気道感染に罹患した患者、過去 8 週間以内に投薬内容の変更のあった患者、副腎皮質ステロイド薬を服用している患者、マクロライド系抗生物質の少量長期療法を行っている患者とした。また、1 秒量が予測値の 50% 未満の重症および最重症例も除外した。本試験は、4 週間の観察期間の後、すべての患者にチオトロピウム 18 μ g/day の吸入（ベーリンガーインゲルハイム ジャパン株式会社、東京）を 8 週間行った。主要評価項目は、CASA-Q (Cough and Sputum Assessment Questionnaire) 質問票⁵⁾における咳症状、咳インパクト、痰症状、痰インパクトの 4 ドメイン、20 の質問項目であり、それぞれのスコアは 0 ~ 100 点であり、スコアが大きいほど軽症と判定される。また、副次評価項目として、サッカリンテストと喀痰解析を行った。サッカリンテストは、下鼻甲介の奥 5mm に静置したサッカリン粒が線毛運動により咽喉頭に運搬されてゆき、被験者が甘味を感じるまでの時間を測定するものであり、これを鼻クリアランス時間とした。喀痰の解析は、その solid composition（喀痰の乾燥重量/湿重量）を測定することにより、喀痰中に占める粘液糖蛋白（ムチン）の割合の評価を行った。