

表 2. 登録時評価項目

- 年齢・性別
- 身体計測 (身長・体重・BMI)
- 体成分分析
 - ・上腕筋囲 (AMC) : 簡易型アディポメーター
 - ・ fat-free mass index (FFMI) :
dual energy X-rayabsorptiometry (DXA)
- 労作時呼吸困難 (MMRC スケール : 0 ~ 4)
- 呼吸機能 (スパイロメトリー)
- 6 分間歩行試験
- 併存症の有無
 - ・循環器疾患 (高血圧・虚血性心疾患・脳血管障害)
 - ・代謝性疾患 (糖尿病・脂質異常症)
 - ・その他
- 在宅酸素療法の有無
- 薬物治療

記録する。

5) データ解析

予後解析 : BMI のカットオフ値やスコアリングを変更し、オリジナル BODE index と比較検討する。6 分間歩行距離と BMI の 2 因子に代わり、% AMC (or FFMI) を用いた解析を行う。

増悪との関連 : 観察期間中の増悪回数や最初の増悪による入院までの期間と BODE index との関連を解析する。

結 果

現時点で 193 例が登録され、185 例 (男性 171 例、女性 14 例) が解析対象となった。解析例の BMI は $21.3 \pm 3.3 \text{ kg/m}^2$ 、 $\% \text{FEV}_1$ は $56.9 \pm 22.8\%$ であった。閉塞性障害の重症度 (GOLD) は、stage I : 36 例 (19.4%)、stage II : 71 例 (38.4%)、stage III : 58 例 (31.4%)、stage IV : 20 例 (10.8%) であった (表 3)。

BMI $\leq 21 \text{ kg/m}^2$ の症例は 83 例 (45%) を占め、BMI $< 18.5 \text{ kg/m}^2$ の低体重が 20% に認められた。BODE index では、0:33 例 (18%)、1:25 例 (14%)、2:28 例 (15%)、3:29 例 (16%)、4:24 例 (13%)、5:16 例 (9%)、6:10 例 (5%)、7:10 例 (5%)、8:5 例 (3%)、9:2 例 (1%)、10:3 例 (2%) であった (図 1)。

オリジナルの層別化¹⁾では、Quartile 1 : 87 例

表 3. 患者背景

登録症例数, 例	193
解析症例数	185
性別 (男/女)	171/14
年齢, 歳	72.8 ± 7.4
BMI, kg/m^2	21.3 ± 3.3
$\% \text{FEV}_1$, %	56.9 ± 22.8
重症度 (GOLD)	
I	36 (19.4%)
II	71 (38.4%)
III	58 (31.4%)
IV	20 (10.8%)
6 分間歩行距離, m	369.1 ± 94.8

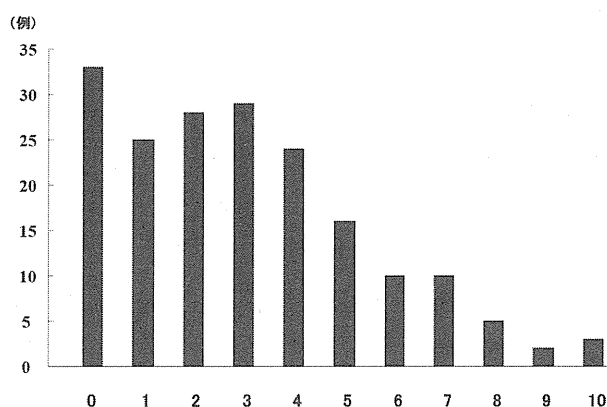


図 1. BODE index の分布

(47.0%), Quartile 2 : 52 例 (28.1%), Quartile 3 : 26 例 (14.1%), Quartile 4 : 20 例 (10.8%) であった。体成分では $\% \text{AMC} : 95.4 \pm 10.9\%$ 、 $\% \text{TSF} : 75.4 \pm 44.2\%$ であり、AMC および TSF の低下率は各々 30.5%、75.3% であった。併存症では高血圧症 (36.2%) と骨粗鬆症 (21.0%) が高率に認められた。

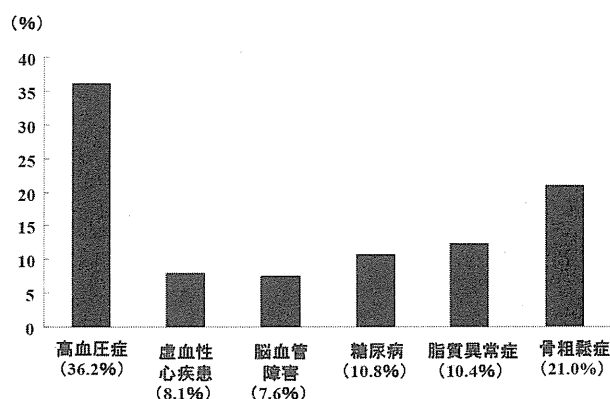


図 2. 併存症の頻度

薬物治療では、長時間作用性抗コリン薬(78.9%)、長時間作用性 β_2 刺激薬(40.0%)、長時間作用性 β_2 刺激薬/吸入ステロイド薬配合薬(33.5%)、テオフィリン薬(22.7%)の順で使用頻度が高かった。在宅酸素療法は28例(15.1%)で導入されていた。

考 察

わが国の COPD 患者を対象とした BODE index の有用性は確立されていない。特に、わが国では体重減少が欧米と比較して高率かつ高度に認められる²⁾。今回の検討でも BMI が 21 kg/m^2 以下の症例が 45% と高率であり、かつ $\text{BMI} < 18.5 \text{ kg/m}^2$ の低体重が 20% に認められた。これらは BMI のカットオフ値やスコアリングの妥当性を検討する必要性を示唆している。筋蛋白量の指標である AMC は約 30% で低下しており、FFM の減少を加味することによって、新たな多元的予後指標を開発できる可能性がある。

現時点における登録症例では BODE index 0, 1 が高率であった。BMI をはじめとする各指標のスコアリングの妥当性の問題とともに登録症例に比較的軽・中等症が多かったことも関連していると思われる。今後重症例を中心に登録症例を集積する必要があると考えられる。

また、併存症としては高血圧症と骨粗鬆症が高率であり欧米の報告⁵⁾と同様であった。また、高血圧症が高率である一方、虚血性心疾患の合併は低率であった。わが国における特徴を明らかにす

るためには、今後さらなる症例の集積が必要と考えられる。

結 論

わが国の COPD 患者を対象とした BODE index の評価において、BMI のカットオフ値やスコアリングを再検討する必要があると考えられた。併存症では高血圧症と骨粗鬆症が高率に認められた。今後さらに症例登録をすすめる予定である。

参考文献

1. Celli BR, Cote CG, Marin JM, et al : The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350 : 1005 - 1012, 2004
2. 吉川雅則, 山内基雄, 木村 弘, 他 : 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の栄養状態および併存症の実態調査. 厚生労働省呼吸不全調査研究班平成 20 年度研究報告書 : pp247 - 251, 2009
3. Slinde F, Gronberg A, Engstrom CP, et al : Body composition by bioelectrical impedance predicts mortality in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir Med* 99 : 1004 - 1009, 2005
4. Vestbo J, Prescott E, Almdal T, et al : Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample. Findings from the Copenhagen City Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med* 173 : 79 - 83, 2006
5. Miller J, Edwards LD, Agusti A, et al : Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort. *Resp Med* 107 : 1376 - 1384, 2013

喫煙曝露肺気腫モデルラットにおける骨粗鬆症の解析

友田 恒一¹, 久保 薫², 吉川 雅則¹, 木村-須田 廣美³, 木村 弘¹
奈良県立医科大学内科学第二講座¹, 同 動物実験施設², 千歳科学技術大学バイオ・マテリアル学科³

はじめに

COPD 患者において骨粗鬆症は重要な併存症であり, 骨粗鬆症に起因した骨折は ADL の低下をもたらす¹⁾。骨強度は, 骨量だけでなく骨質も関与していることが知られている²⁾。FTIR イメージング法および顕微ラマン分光法は, 試料をホモジナイズすることなく, 成分の構造解析が行える方法であり骨質の評価法として有用な評価法である³⁾。今回我々は, FTIR イメージング法および顕微ラマン分光法を用いて, 喫煙曝露肺気腫モデルラットにおける骨質の変化について検討を行った。

対象と方法

1) 肺気腫モデル

10 週齢雄 SHR ラットを用いて, 特殊給餌 (繊維除去食の非連続的給餌) と 8 週間の喫煙曝露により肺気腫モデルを作成した⁴⁾。

2) 骨評価

大腿骨を摘出し, X 線撮影および DXA による骨密度, 骨塩量測定を行い, FTIR イメージング測定法ならび顕微ラマン測定法⁵⁾を用いて骨質 (石灰化度, 炭酸塩含有量, 結晶化度) についても検討した。

結果

1) X 線像

大腿骨頭で骨密度の著明な低下を認めた。(図 1)

2) DEXA

骨密度と骨塩量の低下を認めた。(図 2, 図 3)

3) FTIR イメージング (図 4)

リン酸塩含有ハイドロキシアパタイト(PO_4^{3-}),

コラーゲン (Amide), 炭酸塩含有ハイドロキシアパタイト (CO_3^{2-}) の分布はいずれも減少を認めた。

4) 骨質

海綿骨で石灰化度の低下を認めた。結晶化度は

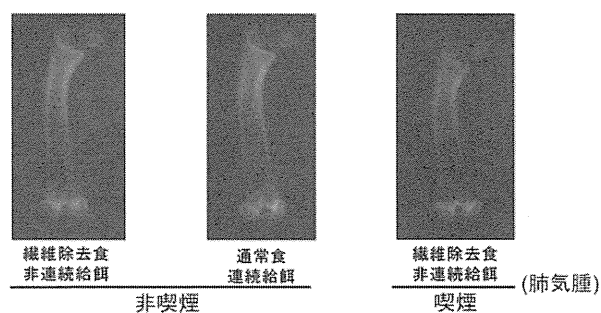


図 1. 大腿骨 X 線像

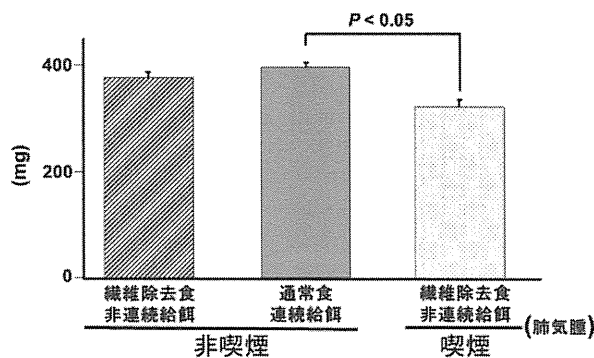


図 2. 骨塩量

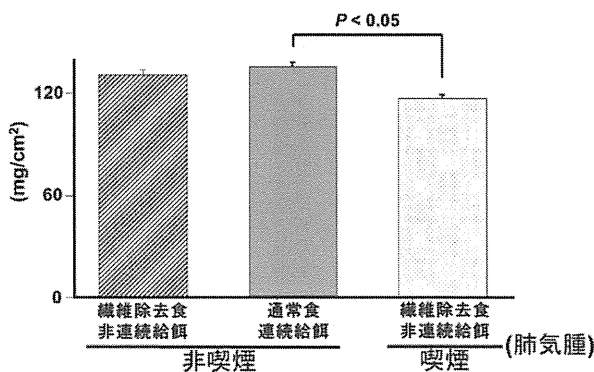


図 3. 骨密度

皮質骨および海綿骨で低下していた。炭酸塩含有量の割合は皮質骨で増加していた。(図5, 図6, 図7)

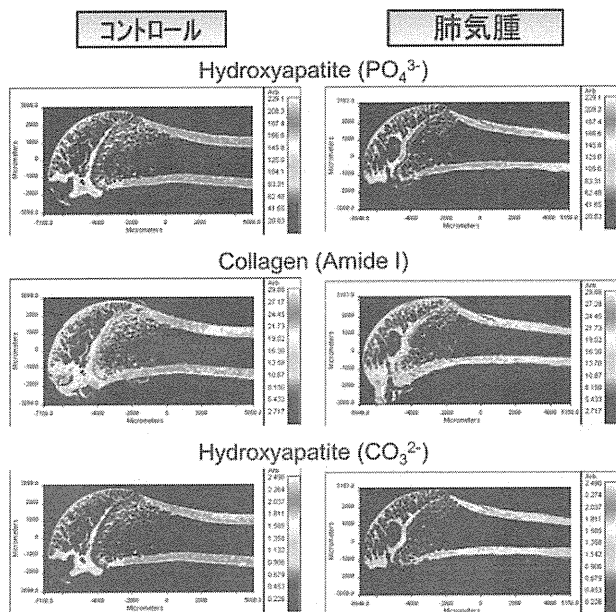


図4. FTIR イメージング

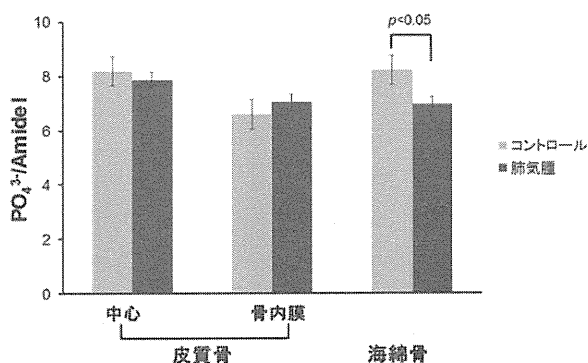


図5. 石灰化度

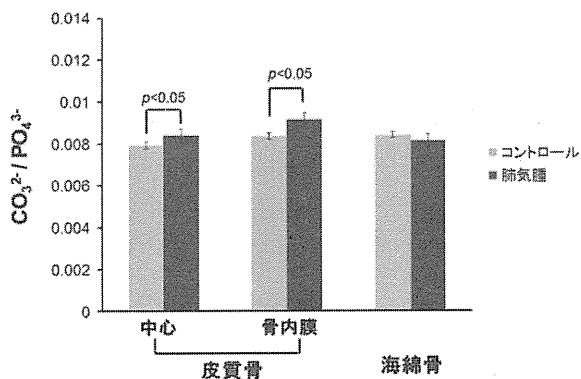


図6. 炭酸塩含有量の割合

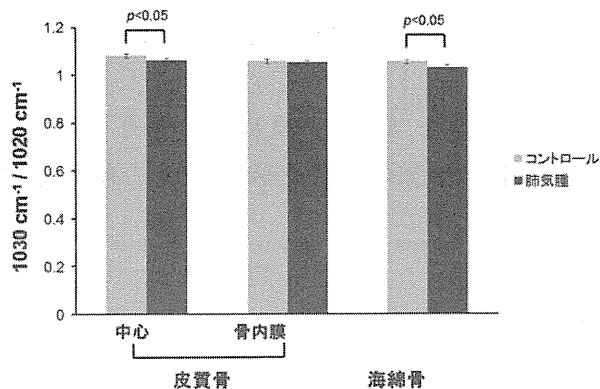


図7. 結晶化度

考察

骨質は①構造, ②骨代謝, ③骨疲労, ④石灰化度, ⑤骨基質などから規定される²⁾。特殊給餌下(繊維除去食の非連続的給餌)の喫煙曝露肺気腫モデルラットでは, 石灰化度や結晶度の低下を認める一方で, 炭酸塩含量の増加が認められた。これらの骨質の変化には腎不全モデルにおける骨質の変化³⁾とは異なる点が認められる。肺気腫における骨病変は, 他疾患で見られる骨病変とは異なる特徴的な病態である可能性も考えられ, 今後さらなる検討が必要と考えられた。

結論

特殊給餌下の喫煙曝露肺気腫モデルラットでは, 骨密度や骨塩量の低下だけでなく骨質も変化しており, 肺気腫における骨病変に関与している可能性が示唆された。

参考文献

1. Graat-Verboom L, Wouters EF, Smeenk FW, van den Borne BE, Lunde R, Spruit MA: Current status of research on osteoporosis in COPD: a systematic review. Eur Respir J 34 : 209-218, 2009
2. NIH Consensus Development Panel. JAMA 285 : 785-789, 2001
3. Kimura-Suda H, Kajiwara M, Matsumoto N, Murayama H, Yamato H : Characterization of apatite and collagen in bone with FTIR imaging. Mol Cryst Liq Cryst 64 : 505, 2009

4. Tomoda K, Kubo K, Yamamoto Y, Nishii Y, Nakamura A, Yamauchi M, Yoshikawa M, Hamada K, Kimura H: Discontinuous feeding with fiber-free diet accelerates emphysema, malnutrition and osteoporosis by cigarette smoke in rats. ATS 2013 in Philadelphia
5. 木村－須田廣美, 大和英之: 赤外イメージングと顕微ラマン分光を用いた骨の分析. 腎と骨代謝 22: 207, 2009

慢性閉塞性肺疾患患者の1秒量経年変化に関連する 血漿バイオマーカーの探索

鈴木 雅, 牧田比呂仁, 今野 哲, 長井 桂, 清水 薫子, 西村 正治

北海道 COPD コホート研究グループ

北海道大学大学院医学研究科呼吸器内科学分野

はじめに

我々は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者における呼吸機能 (1 秒量) の変化は様々に経過し, 1 秒量の経年低下に関して Rapid decliners, Slow decliners, Sustainers が存在することを北海道 COPD コホート研究により報告した¹⁾。1 秒量の経年低下には体重減少と肺気腫の程度が関連していたが, 1 秒量経年変化を予測し得る末梢血バイオマーカーについては十分な知見が得られていない。本研究では, 5 年間の前向きコホート研究である北海道 COPD コホート研究において, COPD 患者の 1 秒量経年変化と関係する血漿バイオマーカーを探索することを目的とする。また, 得られたバイオマーカー候補を別人種のコホートで検証する。

対象と方法

北海道 COPD コホート研究での対象 (表 1)

北海道 COPD コホート研究 (追跡期間: 5 年間, 中央値: 4.98 年) に参加し, 登録時の血漿を得られた 261 名 (GOLD 1: 25%, GOLD 2: 45%, GOLD 3: 25%, GOLD 4: 5%) を対象とした。そのうち, 気管支拡張薬投与後 1 秒量の経年変化量は 3 回以上の呼吸機能検査が施行された 244 名において算出された。

DLSCT/CBQ study での対象 (表 2)

肺癌死亡率に対する CT スクリーニングの有用性を検討する目的でデンマークにて施行された 4 年間の前向き研究である Danish Lung Cancer Screening Trial (DLCST)²⁾ のサブ研究として行われた, COPD quantification by Computed Tomography, Biomarkers and Quality of life (CBQ) study を検討コホートとして用いた。本研究の呼吸機能検査は気管支拡張薬投与前のもののみである。CBQ study に参加した 1812 名のうち, 血漿を得られ (登録 3 年目で

表 1. 北海道 COPD コホート研究の対象

	全対象	GOLD 1	GOLD 2	GOLD 3	GOLD 4
N	261	66	118	64	13
年齢, 年	70 ± 8	67 ± 8	70 ± 8	71 ± 6	70 ± 8
女性, N (%)	16 (6)	9 (14)	7 (6)	0 (0)	0 (0)
BMI, kg/m ²	22 ± 3	23 ± 3	23 ± 3	21 ± 3	21 ± 4
現喫煙者, N (%)	73 (28)	20 (30)	38 (32)	10 (16)	5 (38)
喫煙指数, pack-years	63 ± 30	64 ± 34	63 ± 30	65 ± 26	55 ± 22
呼吸機能					
気管支拡張薬投与後					
FEV ₁ , L	1.74 ± 0.67	2.53 ± 0.42	1.75 ± 0.42	1.10 ± 0.19	0.70 ± 0.14
FEV ₁ , % predicted	64 ± 22	93 ± 11	65 ± 9	41 ± 5	26 ± 4
FVC, % predicted	100 ± 19	118 ± 13	100 ± 14	89 ± 14	70 ± 20
FEV ₁ /FVC	0.51 ± 0.13	0.64 ± 0.06	0.53 ± 0.08	0.38 ± 0.07	0.31 ± 0.07
FEV ₁ 経年変化量, ml*	-32 ± 24	-31 ± 25	-32 ± 23	-36 ± 24	-17 ± 14

平均 ± 標準偏差 または 対象数 (%). *N = 244.

表 2. CBQ study の対象

	全対象	GOLD 1	GOLD 2	GOLD 3
N	226	118	99	9
年齢, 年	58 ± 5	57 ± 5	59 ± 4	61 ± 5
女性, N (%)	105 (46)	61 (52)	41 (41)	3 (33)
BMI, kg/m ²	24 ± 3	24 ± 3	25 ± 3	25 ± 4
喫煙者, N (%)	162 (72)	86 (73)	70 (71)	6 (67)
喫煙指数, pack-years	38 ± 12	36 ± 11	40 ± 14	49 ± 8
Lung function				
気管支拡張薬投与前				
FEV ₁ , L	2.40 ± 0.65	2.71 ± 0.63	2.12 ± 0.44	1.33 ± 0.15
FEV ₁ , % predicted	80 ± 15	91 ± 8	70 ± 7	45 ± 5
FVC, % predicted	103 ± 17	114 ± 13	94 ± 11	74 ± 13
FEV ₁ /FVC	0.63 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.61 ± 0.06	0.49 ± 0.05
FEV ₁ 経年変化量, ml	-92 ± 29	-93 ± 30	-91 ± 27	-89 ± 47

平均 ± 標準偏差 または 対象数 (%)。

採取), かつ気管支拡張薬投与前の 1 秒率が 70% 未満で 1 秒量の経年変化量が得られた 226 名を検証コホートの対象とした。

血漿バイオマーカー測定

両研究において, 血漿は Myriad RBM 社の Human CardiovascularMAP[®] を用いて炎症・代謝・組織リモデリングに関わる 50 種類の蛋白濃度を測定した。そのうち, 40% 以上の検体が測定感度以下であった 5 種類の蛋白は以降の解析から除外した。北海道 COPD コホート研究の検体を用いて, 血漿アディポネクチン濃度と血漿レプチン濃度は Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit ならびに Human Leptin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を用いて検証した。

統計解析

1 秒量経年変化量は mixed-effects model を用いて算出した。各血漿蛋白濃度は対数 (log₂) 変換の上, 1 秒量経年変化量との相関については性別・年齢・身長・BMI で補正した線形回帰分析を用いて解析し, 多重比較の補正を false discovery rate (FDR) 法にて行った。その上で重回帰分析を用いて多変量解析を行った。Rapid decliners への寄与因子解析はロジスティック回帰モデルを用い算出し, 生命予後に対する解析は Cox 比例ハザード

モデルならびに Kaplan-Meier 曲線 (log-rank test) を用いて行った。

結 果

北海道 COPD コホート研究での検討では, 測定した血漿蛋白のうち, アディポネクチン高値, シスタチン C 低値, E-セレクトリン低値, 2 型 TNF 受容体低値が有意に 1 秒量経年低下量と関連した ($p < 0.05$) (表 3)。これら 4 種類の血漿蛋白と性別, 年齢, 身長, BMI, CT 肺気腫スコア, 末梢血好中球数・好酸球数を用いた重回帰分析では, 4 種類の血漿蛋白のうちアディポネクチン高値のみが他因子と独立して 1 秒量経年低下量と有意に関連していた ($p = 0.01$) (表 3)。血漿レプチン/アディポネクチン比の低値も性別, 年齢, 身長, BMI と独立して 1 秒量経年低下量と有意に関連していた ($p = 0.004$) (表 4)。実際に Rapid decliners では他群と比して血漿アディポネクチンが高値および血漿レプチン/アディポネクチン比が低値であった (図 1)。ロジスティック回帰モデルでは血漿アディポネクチン高値および血漿レプチン/アディポネクチン比の低値は年齢, 身長, BMI と独立して 1 秒量急速低下群に寄与しており (各々のオッズ比 1.86, 0.75), また Cox 比例ハザードモデルでは両者は追跡期間中の総死亡にも有意に関連しており (各々のハザード比

表 3. 北海道 COPD コホート研究における 1 秒量経年変化量と関連する血漿バイオマーカー

(A) 線形回帰分析にて有意であった血漿蛋白

血漿蛋白	β	p value	FDR q value
Adiponectin	-0.22	0.003	0.08
Tumor necrosis factor 2	0.20	0.004	0.08
E-selectin	0.17	0.007	0.11
Cystatin-C	0.17	0.01	0.15

β = 標準化偏回帰係数 (正の係数は蛋白の低下が 1 秒量経年低下と関連することを意味する)。FDR = false discovery rate。解析は性別, 年齢, 身長, BMI を補正して行われ, 各血漿蛋白濃度は log2 変換後に解析。

(B) 重回帰分析

変数	β	p value
年齢	-0.002	0.98
性別	-0.07	0.34
身長	0.09	0.95
BMI	-0.005	0.18
CT 肺気腫スコア	-0.13	0.049
末梢血好中球数*	-0.08	0.20
末梢血好酸球数*	0.16	0.01
Adiponectin*	-0.19	0.01
Tumor necrosis factor 2*	0.13	0.22
E-selectin*	0.09	0.19
Cystatin-C*	0.07	0.52

β = 標準化偏回帰係数 (正の係数は蛋白の低下が 1 秒量経年低下と関連することを意味する)。*log2 変換後に解析。

表 4. 北海道 COPD コホート研究および CBQ study における血漿アディポネクチン・レプチン濃度と 1 秒量経年変化量との関連

変数	北海道 COPD コホート		CBQ study	
	β	p value	β	p value
Adiponectin	-0.22	0.003	-0.13	0.05
Leptin	0.14	0.13	0.13	0.06
Leptin/adiponectin ratio	0.26	0.004	0.16	0.01

β = 標準化偏回帰係数 (正の係数は蛋白の低下が 1 秒量経年低下と関連することを意味する)。FDR = false discovery rate。解析は性別, 年齢, 身長, BMI を補正して行われ, 各血漿蛋白濃度と比は log2 変換後に解析。

1.68, 0.75), 早期の死亡と関連していた (図 2)。

検証コホートに用いた CBQ study の対象は北海道 COPD コホート研究の対象よりも若年で女性の割合が高く, 現喫煙者も多く, 1 秒量経年低下のスピードも速いなど, 大きくその背景を異にしていた (表 2)。CBQ study では, 血漿アディポネクチン高値は性別, 年齢, 身長, BMI と独立して 1 秒量経年低下量と関連する傾向にあり (p =

0.05), 血漿レプチン/アディポネクチン比の低値は 1 秒量経年低下量と有意に関連した (p = 0.01) (表 4)。

最後に Human CardiovascularMAP®で測定した血漿アディポネクチン値とレプチン値を ELISA 法にて検証したが, 両方法で測定した値は非常に良好に相関していた (r > 0.90)。

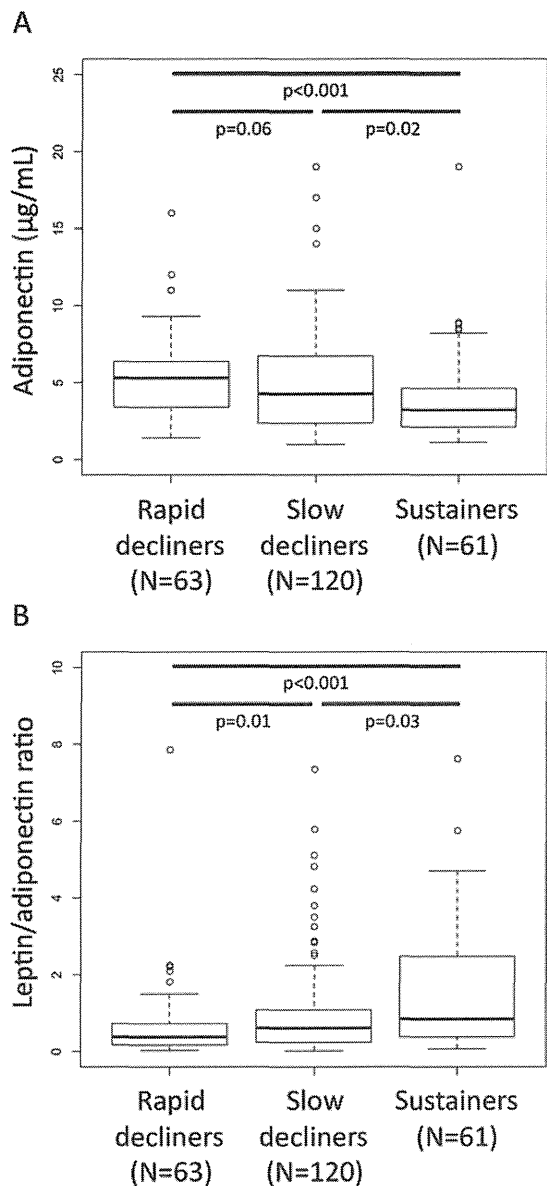


図1. 1秒量経年変化群毎の血漿アディポネクチン値 (A) と血漿レプチン/アディポネクチン比 (B)

考察

アディポネクチンは主に脂肪細胞から産生され血中に豊富に存在する蛋白であり、肥満関連のメタボリックシンドロームにおいて保護的な役割を担うとされている一方で、COPDを含めて慢性炎症性疾患でその血中濃度が上昇していることが報告されている³⁾。しかしながらそのメカニズムは不明である。興味深いことにアディポネクチンとその受容体 (AdipoR1) が気道上皮細胞に発現し、

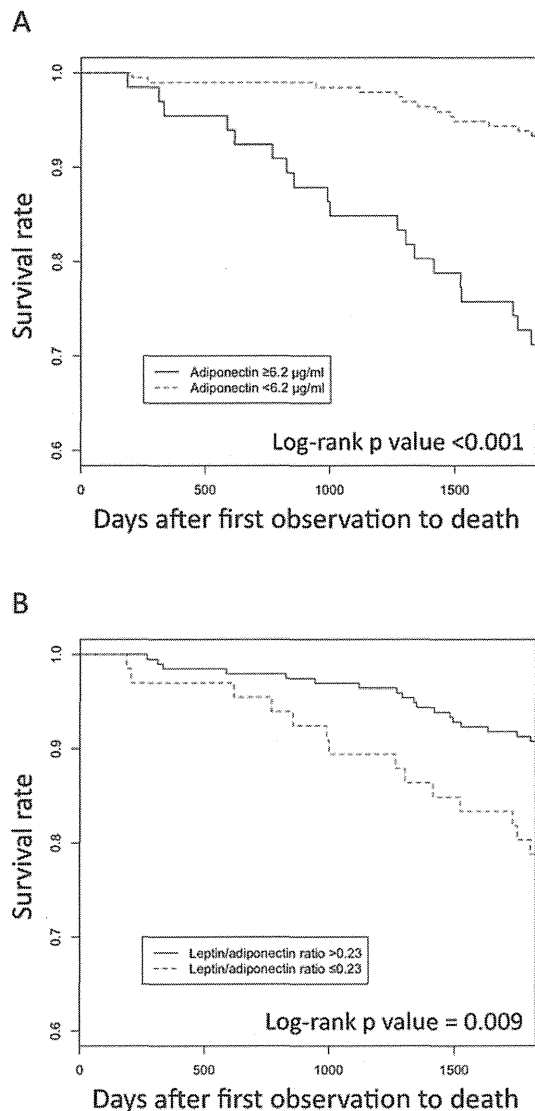


図2. 血漿アディポネクチン値 (A) と血漿レプチン/アディポネクチン比 (B) と生存期間

COPD患者でその発現が増加していることが報告されており、さらにアディポネクチンが気道上皮細胞において炎症を惹起する働きがあることも示唆されている⁴⁾。よって、高い血中アディポネクチン濃度は肺局所の炎症と関連し、速い呼吸機能の低下と関わっている可能性が考えられる。

本検討の強みは他人種のコホートを用いて結果を検証したことである。デンマークで行われたCBQ studyは北海道COPDコホート研究と対象の背景を全く異にしているが、血漿レプチン/ア

ディポネクチン比の低値は両コホートで共通して有意に 1 秒量経年低下に関連していた。一般的にアディポネクチンとレプチンは性別や BMI の影響を強く受け、しかも脂肪量に対する関係は逆向きのため、その比をとることでより普遍的で安定したバイオマーカーとなり得る可能性が考えられる。

結 論

血漿レプチン/アディポネクチン比の低値は、背景の異なる二つのコホートにおいて COPD 患者の 1 秒量経年低下に関連した。

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

Gentofte Hospital, University of Copenhagen : Prof. Asger Dirksen, Dr. Laura H. Thomsen

参考文献

1. Nishimura M, Makita H, Nagai K, et al: Annual change in pulmonaru function and clinical phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 ; 185 : 44-52
2. Pedersen JH, Ashraf H, Dirksen A, et al : The Danish randomized lung cancer CT screening trial--overall design and results of the prevalence round. *J Thorac Oncol* 2009 ; 4 : 608-14
3. Fantuzzi G : Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases. *Cytokine* 2013 ; 64 : 1-10
4. Miller M, Cho JY, Pham A, et al : Adiponectin and functional adiponectin receptor 1 are expressed by airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2009 ; 182 : 684-91

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, 高橋 史行, 加藤 元康, 鈴木 洋平

児玉 裕三, 関谷 充晃, 高橋 和久, 瀬山 邦明

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 (chronic obstructive pulmonary disease: 以下 COPD) は, タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じる肺の炎症性疾患である。2020 年までには全世界の死亡原因の第 3 位になると推測されており, Fukuchi らの大規模疫学研究では, 日本全国の患者数は約 530 万人と推定されている¹⁾。しかし, 本疾患は国民に十分認知されているとはいえず, 治療を受けている患者数は約 17 万 3 千人に過ぎない。そこで, 2013 年度より国民の健康づくり運動として展開されている「健康日本 21」の対象疾患に追加され, 国をあげての啓発活動が展開されている。COPD の中心的な発症メカニズムは, 喫煙, 大気汚染物質の吸入, あるいは職業性曝露による, 気道や肺の慢性的な炎症反応と考えられている。さらに, この「異常な炎症反応」は, 禁煙後も持続する²⁾。したがって, COPD 患者では, 気道や肺における炎症の制御機構に何らかの異常が生じていることが推測されるが, その全貌は未だ明らかになっておらず, 進行を抑制し, 予後を改善する治療法も確立していないのが現状である。

これまでにわれわれは, 老化促進マウスとして Senescence Marker Protein (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³⁾。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⁴⁾。われわれは, SMP30-KO マウスが, 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⁵⁾, ま

た, 8 週間という比較的短期間のタバコ煙曝露により, 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 モデル動物になることを報告した⁶⁾。さらに, SMP30-KO におけるタバコ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^{7,8)}, タバコ煙曝露を行った後にビタミン C を補充する介入実験の結果, ビタミン C により破壊された肺胞が再生されることを明らかにした⁹⁾。

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り, 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を in vitro 解析により明らかにした¹⁰⁾。microRNA は 20-25 塩基の非常に小さな 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り, 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關与することが明らかになってきている。近年 COPD に関しても, ヒト全ゲノムを対象とした相関研究により責任遺伝子の探索が試みられているが, 単一の遺伝子の発現変化では COPD の臨床的多様性は説明できず, それゆえエピジェネティックな遺伝子発現調節機構としての microRNA が, COPD 発症において重要な役割を担っている可能性が推察される。

今年度は, COPD モデルとして SMP30-KO マウスへ慢性タバコ煙曝露実験を行い, miR-146a が COPD の主病態である「異常な炎症反応」に

与える影響について in vivo での解析を開始した。

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

a) ビタミンCコントロール下タバコ煙曝露実験とマウス肺組織中 microRNA 発現解析

SMP30-KO マウスに3ヶ月齢まで十分量のビタミンCを摂取させ (1.5g/L VC 水), その後ビタミンC充足条件 (1.5g/L VC 水) あるいは欠乏条件 (壊血病予防量の 0.0375g/L VC 水) に群別して飼育を継続し, 4ヶ月齢から2.5%タバコ煙あるいは新鮮大気への曝露実験を行った (Fig.1)。実験タバコとしてノンフィルターピース (日本たばこ) を用い, タバコ煙曝露装置 SG-200 (柴田科学) により経鼻的曝露を行った。曝露実験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, リアルタイム PCR 法にて, miR-146a および Cyclooxygenase (COX)-2, Interleukin (IL)-6 の発現を検討した。

b) miR-146a inhibitor のマウス肺投与実験

ビタミンC充足条件下で飼育した4ヶ月齢 SMP30-KO マウスに対して, Day 1 および 8 に in vivo ready miR-146a inhibitor (Ambion: 5mg/kg/ml) を経鼻投与した上で, タバコ煙曝露実験を2週間行った (Fig.2)。タバコ煙曝露後の摘出肺は, 経気道的に定常圧 (25 cmH₂O) を与えて10%ホルマリン液中で24時間固定し, 病理組織学的検討に供出した。また解剖時, 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取を行い, 総細胞数, 細胞分画の解析および EIA kit (Cayman) を用いた Prostaglandin E₂ (PGE₂) の測定を施行した。さらに, a) と同様に, 肺組織中の COX-2 および IL-6 の発現を解析した。

3. 統計解析

群間の統計解析は Mann Whitney U test を行なった。統計解析ソフトは GraphPad Prism 5 (GraphPad) を用い, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

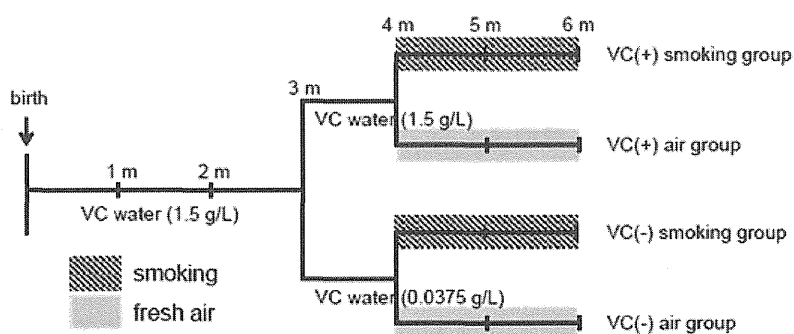


Fig. 1. ビタミンCコントロール下タバコ煙曝露実験フロー

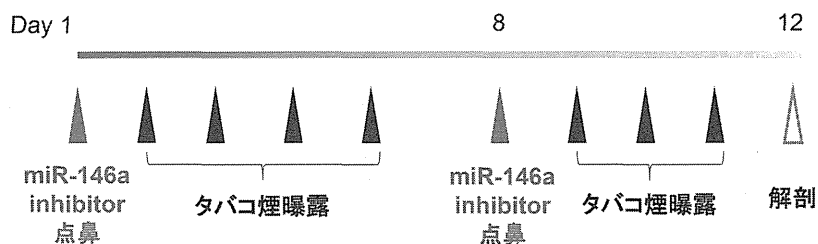


Fig. 2. miR-146a inhibitor のマウス肺投与実験フロー

結 果

1. SMP30-KO マウスに対するタバコ煙曝露が、肺組織中 miR-146 および COX-2, IL-6 発現に与える影響

まず, Fig.1 の通り 8 週間の慢性タバコ煙曝露実験を行った後の肺組織を用いて, miR-146a の発現解析を行った。その結果, 各群で miR-146a の発現に有意差は見られなかった。ただ, miR-146a は炎症刺激により誘導される性質を有する microRNA であることから, タバコ煙曝露期間による変動を検討する必要があると考え, ビタミン C コントロール下の SMP30-KO マウスを用いてタイムコース実験を行った。その結果, miR-146a はビタミン C 欠乏条件下で, ビタミン C 充足条件下と比較して, 比較的早期の時相 (4 週まで) において発現が亢進することが分かった。一方, それ以降においてはビタミン C 投与条件に関わらず, 発現の抑制がみられた (Fig.3)。また, 肺組織中の COX-2 および IL-6 も, ビタミン C 欠乏条件下の早期の時相で, 発現の亢進が観察された (Fig.4A, B)。

2. miR-146a inhibitor がタバコ曝露により誘導される炎症反応に与える影響

次いで, 本モデルにおける, タバコ煙曝露により誘導される炎症反応の早期の時相に miR-146a が与える影響をみるために, 既述の miR-146a inhibitor 投与実験を行った。対象動物をビタミン C 充足条

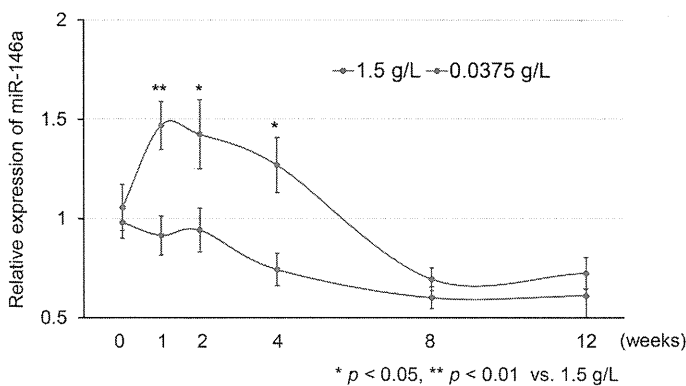


Fig. 3. タバコ煙曝露期間と miR-146a 発現との関連

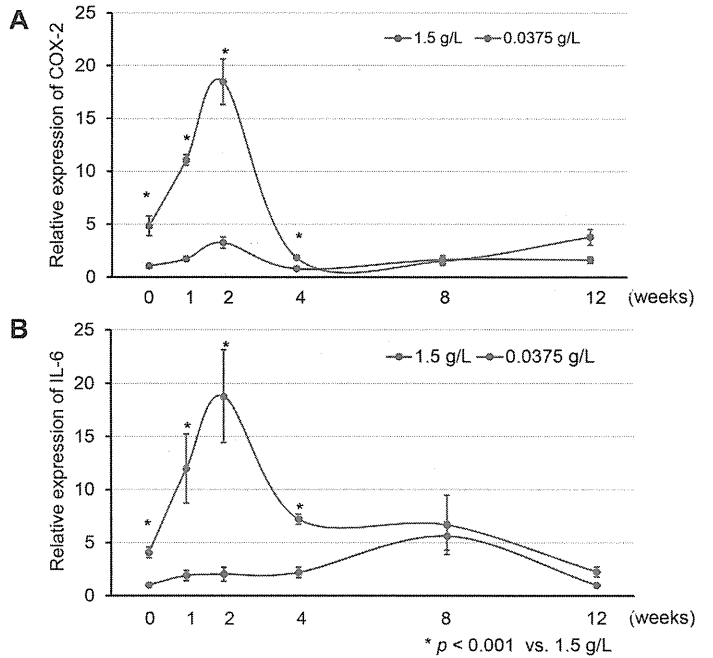


Fig. 4. タバコ煙曝露期間と COX-2, IL-6 発現との関連

件下で飼育した SMP30-KO マウスとし, タバコ煙曝露期間を 2 週間と短期間に設定したことから, マウス肺病理組織所見には群間で違いは観察されなかった (Data not shown)。しかし, BALF においては miR-146a inhibitor 投与により, 総細胞数およびリンパ球分画の増加がみられた (Fig.5)。また, BALF 中の PGE₂ (Fig.6) および肺組織中の COX-2 (Fig.7A) は, miR-146a inhibitor 投与下でのタバコ煙曝露により, 有意に増加することが確認された。なお, 肺組織中 IL-6 については増加する傾向を示したが有意差はなかった (Fig.7B)。

考 察

今回, miR-146a が in vivo モデルにおいても, タバコ煙曝露により誘導される炎症反応を制御する可能性について報告した。これは, われわれがすでに報告した肺線維芽細胞を用いた in vivo 解析の結果を補完するものであった。昨年度, われわれは SMP30-KO マウスと野生型マウスとの肺組織において, microRNA 発現プロファイルに明らかな相違があることを報告した。しかし今年度, 本研究を進める上でいくつかの疑問が生じた。ひ

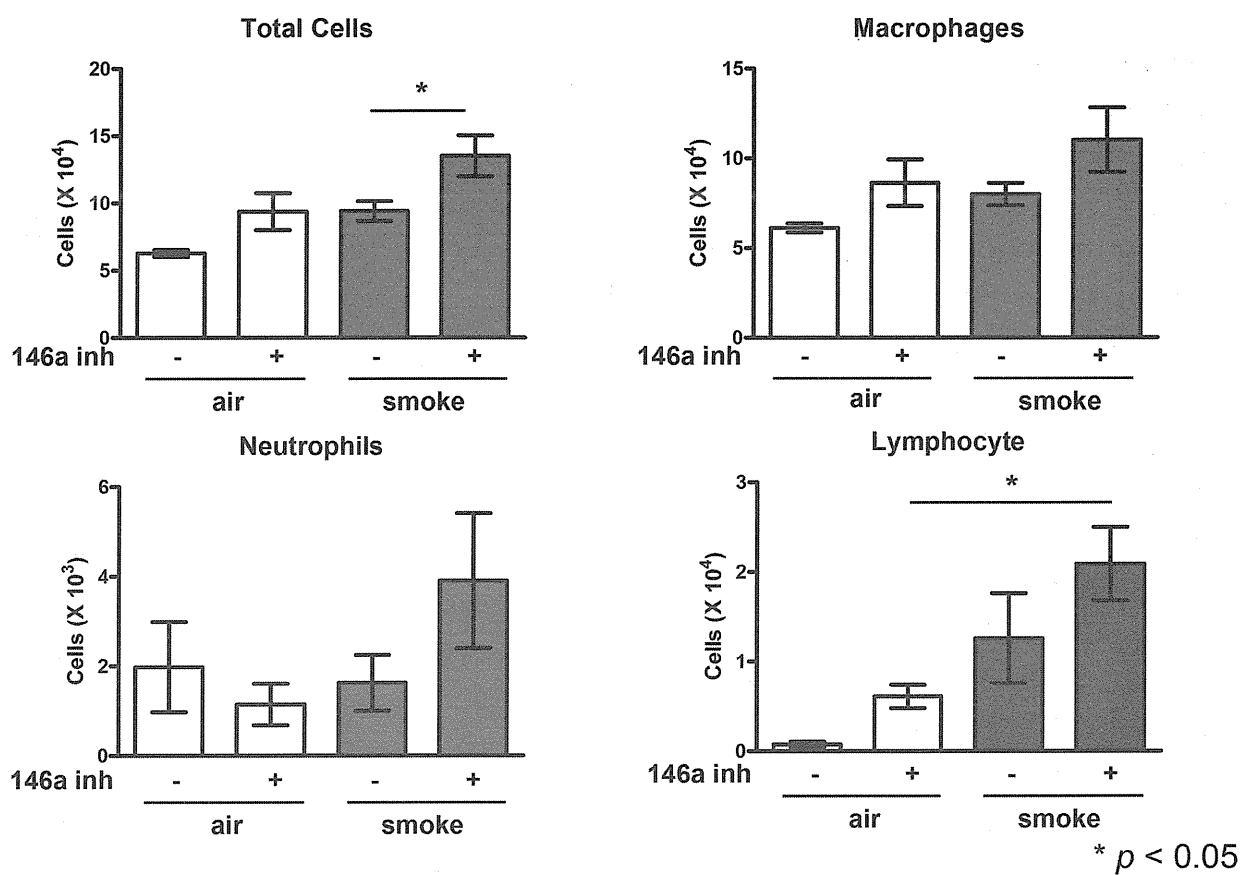


Fig. 5. miR-146a inhibitor が BALF 総細胞数, 細胞分画に与える影響

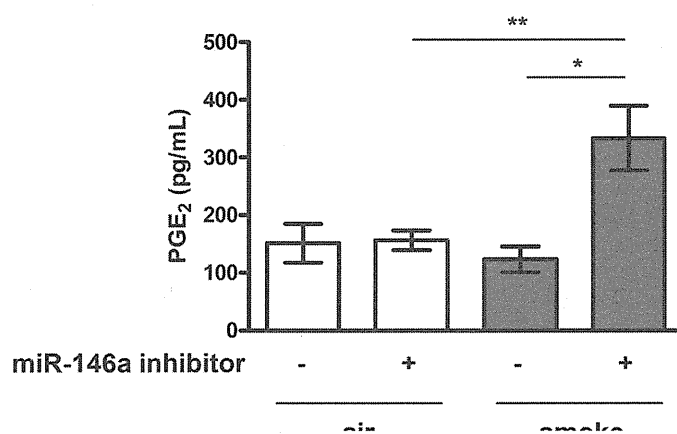


Fig. 6. miR-146a inhibitor が BALF 中 PGE₂ 濃度に与える影響

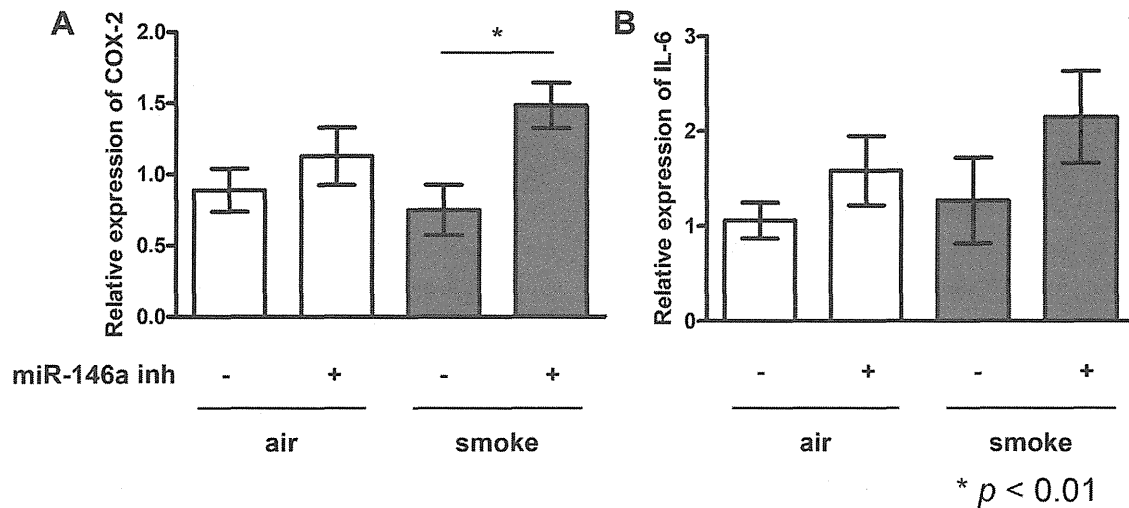


Fig. 7. miR-146a inhibitor が肺組織中 COX-2, IL-6 発現に与える影響

とつは、昨年報告した発現プロファイルの違いを解析する上で、SMP30 遺伝子の有無とビタミン C の多寡とが交絡因子となりうるのではないかということ、さらに、発現プロファイルの違いが、タバコ煙曝露による COPD 発症においてその原因なのか結果なのかということであった。そこで、今年度は対象動物としてビタミン C 投与条件の異なる SMP30-KO マウスを用いることとし、タバコ煙曝露実験についてはタイムコースを設定した。miR-146a は IL-1 β などの炎症性サイトカインにより誘導される NF- κ B 依存性の microRNA で、複数の炎症関連タンパクの翻訳を制御することがすでに知られている¹¹⁾。miR-146a 欠損マウスに Lipopolysaccharide 刺激を行った報告でも、野生型と比較して Tumor necrosis factor- α や IL-6 の著明な亢進が観察されている¹²⁾。ただ、IL-6 遺伝子に関しては miR-146a と直接の対合はなく、間接的な影響を与えていることが推察されている¹³⁾。一方、COX-2 に関しては、われわれが報告したように miR-146a との直接の対合性が証明されている¹⁰⁾。今回、COX-2 と IL-6 の動態にやや違いがみられた理由と推察される。

今回の結果から、miR-146a がタバコ煙曝露により誘導される炎症反応の比較的早期の時相に関与する可能性が示唆されることは興味深いとわれ

われは考えている。miR-146a の変動は、本モデルにおける COPD 発症において、結果ではなく原因となりうると思われるためである。今後、miR-146a を投与することで、タバコ煙曝露による COPD 発症が予防されるかを検討することが必要と考えられる。

結 論

miR-146a はわれわれの確立した COPD モデルである SMP30-KO マウスにおいて、タバコ煙曝露により誘導される炎症反応の比較的早期の時相に関与する可能性が示唆され、さらに miR-146a inhibitor 投与実験により、in vivo においても miR-146a が炎症を制御しうるということが強く示唆される。今後、miR-146a による肺保護作用について検討を行い、COPD における抗炎症治療ターゲットとしての可能性を追究していく。

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., M. Nishimura, M. Ichinose, et al : COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*, 2004. 9 (4) : 458 - 65
2. Turato, G., A. Di Stefano, P. Maestrelli, et al : Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 152 (4 Pt 1) : 1262 - 7
3. Ishigami, A., T. Fujita, S. Handa, et al : Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol*, 2002. 161 (4) : 1273 - 81
4. Fujita, T., K. Uchida, and N. Maruyama : 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
5. Mori, T., A. Ishigami, K. Seyama, et al : Senescence marker protein-30 knockout mouse as a novel murine model of senile lung. *Pathol Int*, 2004. 54 (3) : 167 - 73
6. Sato, T., K. Seyama, Y. Sato, 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
7. Kondo, Y., Y. Inai, Y. Sato, et al : Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103 (15) : 5723 - 8
8. Koike, K., Y. Kondo, M. Sekiya, 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
9. Koike, K., A. Ishigami, Y. Sato, et al : Vitamin C Prevents Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Emphysema in Mice and Provides Pulmonary Restoration. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013
10. Sato, T., X. Liu, A. Nelson, et al : Reduced miR-146a increases prostaglandin E(2) in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 182 (8) : 1020 - 9
11. Taganov, K.D., M.P. Boldin, K.J. Chang, et al : NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103 (33) : 12481 - 6
12. Boldin, M. P., K. D. Taganov, D. S. Rao, et al : miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med*, 2011. 208 (6) : 1189 - 201
13. McMillan, D. H., C. F. Woeller, T. H. Thatcher, et al : Attenuation of inflammatory mediator production by the NF-kappaB member RelB is mediated by microRNA-146a in lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013. 304 (11) : L774 - 81

COPD と CPFE における呼吸抵抗と QoL の相違

安尾 将法¹, 濱 峰幸¹, 牛木 淳人¹

漆畑 一寿¹, 花岡 正幸¹, 久保 恵嗣²

信州大学医学部内科学第一講座¹, 地方独立行政法人 長野県立病院機構²

はじめに

2005年にCottinらによって提唱された気腫合併肺線維症(CPFE)の概念¹⁾は,息切れと上肺野の気腫,下肺野の線維化,およびガス交換障害を呈する症候群ととらえられている²⁾。呼吸機能では比較的保たれるスパイロメトリーの項目に対して著明な拡散能の低下が特徴とされる²⁾。

CPFEの特徴として,肺高血圧症^{1,3)}や肺癌⁴⁾を高率に合併することなどが報告されているが,肺気腫の観点からみたCOPDとの異同,線維症の観点からみた特発性肺線維症(IPF)ないしは他の間質性肺疾患との異同をはじめ,なぜ同一肺に異なる病態が存在するのかについての病態生理学的な事象については不明な点が多い⁵⁾。

我々の施設では,本研究班の研究事業の一環としてCPFE患者の病態生理について,CPFE患者はほぼ100%が喫煙者であることから,喫煙関連の炎症とRAGE(receptor for advanced glycation end products)およびEgr-1(Early growth response gene 1)に注目し,免疫組織化学的検討を行い,CPFEの気腫部分にはRAGEやEgr-1発現が高く,線維化部分では低い傾向がある可能性を報告するとともに,呼吸機能についてCOPDおよびIPF患者の呼吸機能と比較し,肺拡散能はCPFEが最も低値をとるが,多くの呼吸機能検査項目はCOPDとIPFとの中間の値をとり,これらはそれぞれの病態を反映した呼吸機能がお互いに相殺しあう結果であろうと考察し報告した⁶⁾。

近年,患者の呼吸努力に依存せずに呼吸抵抗を測定する,強制オシレーション法の閉塞性肺疾患における有用性が認知されてきている⁷⁾。一方,

CPFEとCOPDとの相違については我々の検索した範囲では一報のみであり⁸⁾,またQoLとの関連についての報告はない。

対象と方法

2013年4月1日~10月31日に信州大学附属病院にて精密呼吸機能検査を行った,COPD患者53名,CPFE患者17名を対象とした。CPFEの選択はKitaguchiらの基準に準拠した⁴⁾。

呼吸抵抗測定機器として,マスタースクリーンIOS-J(フクダ産業:以下IOS)およびMostGraph-01(チェスト株式会社:以下MostGraph)を用いた。

また健康関連QoL調査票としてSt.George's Respiratory Questionnaire(SGRQ)およびCOPD Assessment Test(CAT)を使用した。

結果

(1)患者背景

COPD,CPFE両群間における年齢(順に70.3±6.8,72.7±7.7歳)および喫煙歴(順に49.6±27.7,45.4±33.7 pack-year)に有意差はなかった。COPDは53名中3名が女性,CPFEは17例全例が男性であった。

(2)IOSとMostGraphとの相関

CPFEのR20の相関係数が $r=0.48$ で $P=0.066$ と,有意差が得られなかった他は,CPFE,COPDいずれの疾患の結果においても有意な相関関係がみられた。相関係数が $r=0.60$ 以上であった項目は,CPFEのR5-R20,Fres,X5,COPDのR20,Fresであり,閉塞性肺疾患の評価に有用と考えられる低周波領域の変化についてはいずれの機器も鋭敏に捉えているものと推測された。相関係数の最も

良好であった、CPFEの共振周波数におけるIOSとMostGraphの結果について図に示す(図1)。

(3) MostGraphと呼吸機能検査

CPFEにおいては共振周波数と予測一秒量が最も良い相関($r=-0.74$)を示した(図2A)。COPDにおいては共振周波数と%RV/TLCが最も良い相関($r=0.58$)であった(図2B)。

(4) IOSと呼吸機能検査

MostGraphの場合と同じく、CPFEにおいては共振周波数と予測一秒量が($r=-0.65$)、COPDにおいては共振周波数と%RV/TLCが最も良い相関を示した($r=0.77$)。強制オシレーション法と呼吸機能検査との間の相関係数が0.50以上を示

した項目を表1に示す。

(5) 強制オシレーション法におけるCOPDとCPFEの相違

IOS, MostGraphのいずれも、CPFEと比較してCOPDの方が、有意に呼吸抵抗が大きく、リアクタンスは小さいという結果が得られた。すなわち、COPDにおいて、X5が低値(図3A)でALXやFresが大きいという結果(図3B, C)であった。

(6) 健康関連QoLにおけるCOPDとCPFEの相違

SGRQの各パラメータおよびTotal scoreとCAT総合点数においてCOPDとCPFEとの間に有意差は見られなかった(図4A, B)。CATの3番目の質問項目(息切れ)に関して、CPFEで有意に低値であった(図4C)。

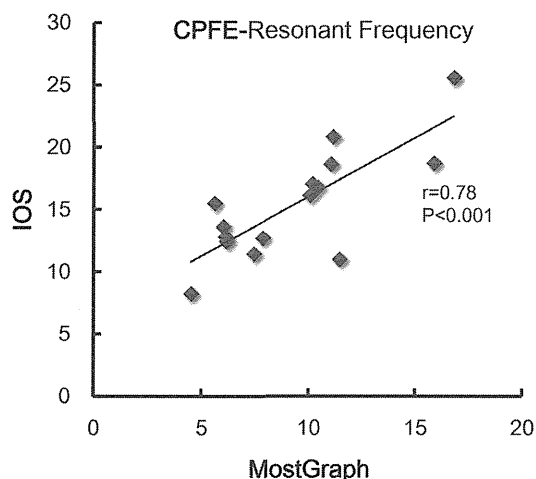


図1. CPFE患者(n=17)における共振周波数データのIOSとMostGraphの相関

考 察

同一肺に気腫性病変と線維化病変を合併し、両者の肺病変を併せ持つために拡散能がそれぞれの疾患よりもより低下するとされるCPFEにおける強制オシレーションおよび健康関連QoLにおけるCOPDとの相違について検討した。

MoriらはMostGraphを用いてCPFE, COPDおよびIPFの3群の強制オシレーションの比較を行い⁸⁾、我々が過去に報告したこの3群における呼吸機能検査の結果⁶⁾と同様、CPFEはIPFと

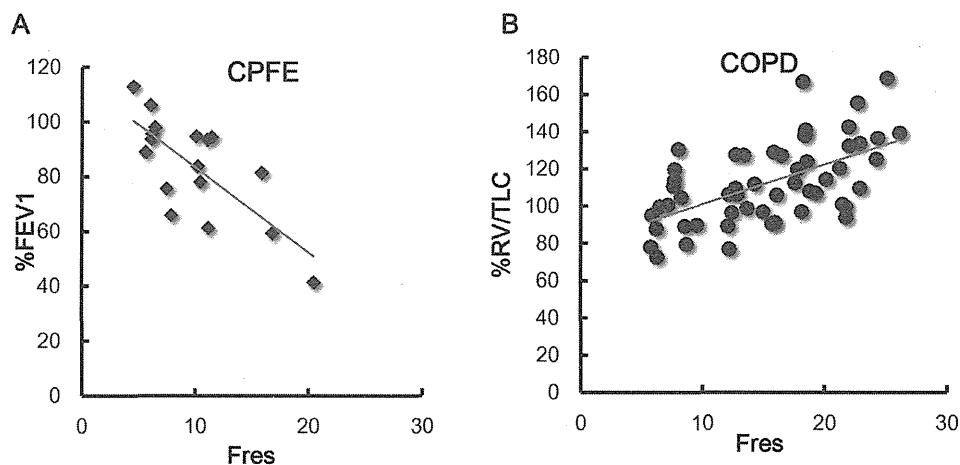
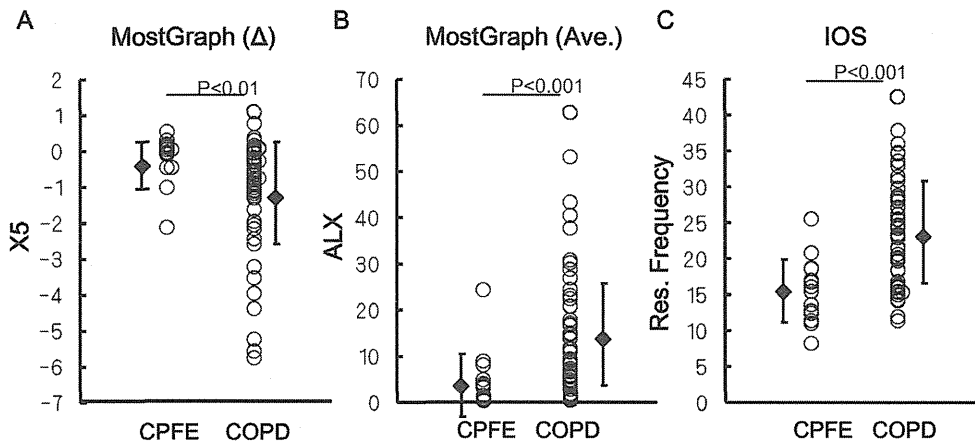


図2. MostGraphと呼吸機能検査との相関

表 1. 強制オシレーション法と呼吸機能検査の相関

CPFE			COPD		
MostGraph	r	P value	MostGraph	r	P value
$\Delta R5/\%CV/VC$	0.53	<0.05	$X5/\%RV/TLC$	-0.51	<0.001
$\Delta R20/\%CV/VC$	0.59	<0.05	$X5/\%FEV_1$	0.52	<0.001
$Fres/\%FEV_1$	-0.74	<0.001	$\Delta X5/\%FEV_1$	0.51	<0.001
			$ALX/\%FEV_1$	-0.54	<0.001
			$Fres/\%RV/TLC$	0.58	<0.001
			$ALX/\%RV/TLC$	0.51	<0.001
IOS			IOS		
	r	P value		r	P value
$R5/\%FEV_1$	-0.60	<0.05	$X5/\%FVC$	0.53	<0.001
$X5/\%FEV_1$	0.62	<0.05	$X5/\%FEV_1$	0.53	<0.001
$R5-R20/\%FEV_1$	-0.53	<0.05	$R5-R20/\%FVC$	-0.51	<0.001
Resonant Frequency/ $\%VC$	-0.62	<0.05	Resonant Frequency/ $\%FVC$	-0.59	<0.001
Resonant Frequency/ $\%FEV_1$	-0.65	<0.01	Resonant Frequency/ $\%FEV_1$	-0.72	<0.001
			Resonant Frequency/ $\%MMF$	-0.65	<0.001
			Resonant Frequency/ $\%V50$	-0.63	<0.001



Δ : 呼気吸気間の差。 Ave. : 呼気吸気の平均値。

図 3. 強制オシレーション法における COPD と CPFE の相違

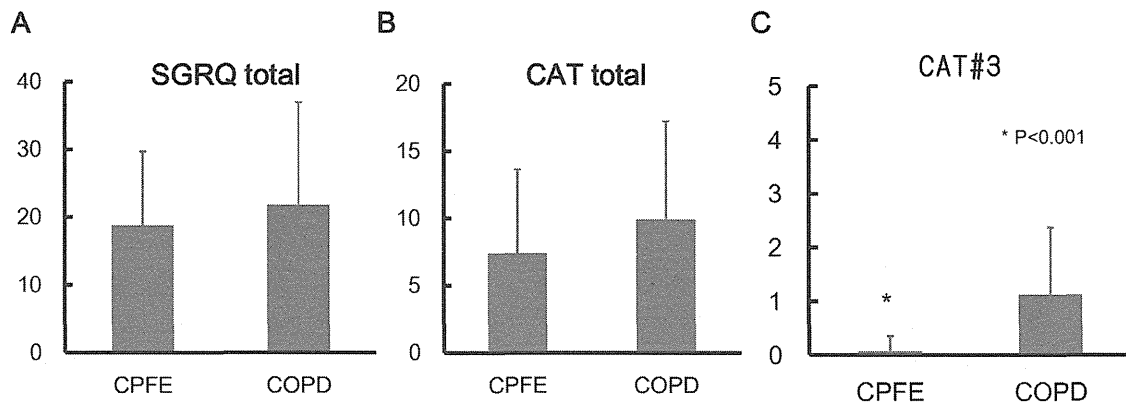


図 4. 健康関連 QoL における COPD と CPFE の相違

COPD の中間の値をとると報告している⁸⁾。今回我々は、COPD と CPFE の 2 疾患を用いて IOS と MostGraph の 2 種の強制オシレーション検査機器を使用してその相違の有無を検討した。IOS と MostGraph の相関は良好で、特に異常値を呈すると考えられる低周波領域での相関が良好であることを確認できた。いずれの機器も低周波領域の両疾患の異常を的確に捉えていると考えられた。2 疾患での相違については、Mori らの結果⁸⁾と同様、COPD において、X5 が低値、共振周波数や ALX など周波数依存性に関連する項目が有意に高値であった。共振周波数に関しては CPFE は COPD と比較した場合には有意に低値であるにもかかわらず、CPFE の中では呼吸機能（とくに%FEV₁）と最も相関のよい項目であった（図 2A）。CPFE の予後規定因子として FEV₁ の低下率が最も関連しているという報告もあり⁹⁾、興味深い結果と考えられる。

健康関連 QoL に関しては、拡散能が低値であり、肺高血圧などの合併が多いとされる CPFE で QoL がより低下している可能性も考えられたが、今回の検討では COPD と同程度の QoL であった（図 4A, B）。また、CAT の 3 番目の質問項目（息切れ）については CPFE 患者で有意に低値をとっており、これも予想とは異なる結果であった（図 4C）。

本研究の問題点としては、CPFE 患者数が COPD 患者に比較して少ないこと、対照疾患として IPF が入っていないことが挙げられる。同一期間に呼吸機能検査を行った IPF 患者が CPFE よりもさらに少数であり、今回の検討には対象として加えることができなかった。また健康関連 QoL 調査票としての SGRQ および CAT については CPFE に使用することの信頼性や妥当性の検討が行われておらず、CPFE 患者の QoL を的確に評価できる質問票でない可能性がある。この点につき今後検討を要すると考えられた。

結 論

COPD と比較した場合、CPFE において強制オシレーション法の低周波数領域の異常は軽度であるが QoL の低下は同程度である。

参考文献

1. Cottin V et al : Eur Respir J 26 : 586-93, 2005
2. Jankowich MD et al : Chest 141 : 222-31, 2012
3. Cottin V, Le Pavec J, Prévot G, Mal H, Humbert M, Simonneau G, Cordier JF ; GERM"O"P. Pulmonary hypertension in patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome. Eur Respir J 35 : 105-11, 2010
4. Kitaguchi Y, Fujimoto K, Hanaoka M, Kawakami S, Honda T, Kubo K : Clinical characteristics of combined pulmonary fibrosis and emphysema. Respirology. 15 : 265-71, 2010
5. Papisiris SA, Triantafyllidou C, Manali ED, Kolilekas L, Baou K, Kagouridis K, Bouros D: Combined pulmonary fibrosis and emphysema. Expert Rev Respir Med 7 : 19-31, 2013
6. 野村弥生, 安尾将法, 牛木淳人, 漆畑一寿, 山本 洋, 花岡正幸, 久保恵嗣, 北口良晃 : 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. 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）分担研究報告書
7. Mishima M : Physiological differences and similarities in asthma and COPD--based on respiratory function testing. Allergol Int 58 : 333-40, 2009
8. Mori K, Shirai T, Mikamo M, Shishido Y, Akita T, Morita S, Asada K, Fujii M, Hozumi H, Suda T, Chida K : Respiratory mechanics measured by forced oscillation technique in combined pulmonary fibrosis and emphysema. Respir Physiol Neurobiol 185 : 235-40, 2013
9. Schmidt SL, Nambiar AM, Tayob N, Sundaram B, Han MK, Gross BH, Kazerooni EA, Chughtai AR, Lagstein A, Myers JL, Murray S, Toews GB, Martinez FJ, Flaherty KR : Pulmonary function measures predict mortality differently in IPF versus combined pulmonary fibrosis and emphysema. Eur Respir J 38 : 176-83, 2011