

期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている脂質性メディエーター、さらに発生への関与が示唆されている転写コアクチベーター TAZ に着目し、炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索する。

脂質性メディエーター：

本研究では、発生工学的手法を応用し、脂質性メディエーターの炎症性肺疾患発症機序における重要性について検討する。特に、COPD、特発性間質性肺炎、気管支喘息などにおける、PAF およびエイコサノイド関連遺伝子の意義を明らかにする。

脂質性メディエーターであるプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどはエイコサノイドと総称され、アラキドン酸を起点とする代謝経路の代謝産物である。アラキドン酸は、炭素数 20 よりなる構造をもち、生体ではリン脂質から細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂) によって切り出される。この際に、同時にリゾ PAF (lyso-PAF) が生成され、リゾ PAF から血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF) が作られる。アラキドン酸は、図 1 に示すように、アラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て様々なエイコサノイドを生成する。その 2 つの大きな経路が、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX) 系および、5-リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase, 5-LO) 系である。

プロスタグランジン、トロンボキサンはシクロオキシゲナーゼ系の代謝物であり、ロイコトリエンは 5-リポキシゲナーゼ系の代謝物である。

アラキドン酸カスケードの代謝産物であるエイコサノイドは、ごく微量で多彩な生理活性作用を呈するのが特徴である。呼吸器系においても、エイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが示唆されている。例えば気管支喘息は、気道平滑筋収縮、血管透過性亢進、血管拡張等による気管支収縮を主体とする病態であり、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられるが、近年、特にトロンボキサン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドが重要な発症因子とされ、有効な治療標的となりつつある。

特にロイコトリエン (LT) 系は、好中球遊走因子としての LTB₄ 受容体 (BLT1, BLT2 の 2 種類) や、炎症・免疫関連疾患に関わることが想定されている CysLT 受容体 (CysLT1-R, CysLT2-R, の 2 種類) が発見され (*Nature*, 1997, 1999), 現在、本グループが遺伝子改変マウスを作成・解析中である。

本研究では、発生工学的手法を応用し、脂質性メディエーターの高齢者肺疾患発症機序における意義を明らかにし、治療薬の開発および実用化を目指す。

転写コアクチベーター TAZ：

転写コアクチベーター TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) は、14-3-3 protein をはじめとする、PDZ domain を持つ転写因子と結合しその活性を制御する分子として同定・報告されたものである (*EMBO J* 9: 6778-91, 2000)。TAZ は、WW domain を有しており、PPXY モチーフと結合することにより、転写コアクチベーターとしての機能を発現する。

また最新の研究により、転写コアクチベーター TAZ が、TTF-1 (thyroid transcription factor-1) や Pax3 と協調的に働くことにより、発生に大きく関与することが明らかにされつつある (*J Biol Chem* 279: 17384 - 90, 2004) (*Biochem Biophys Res*

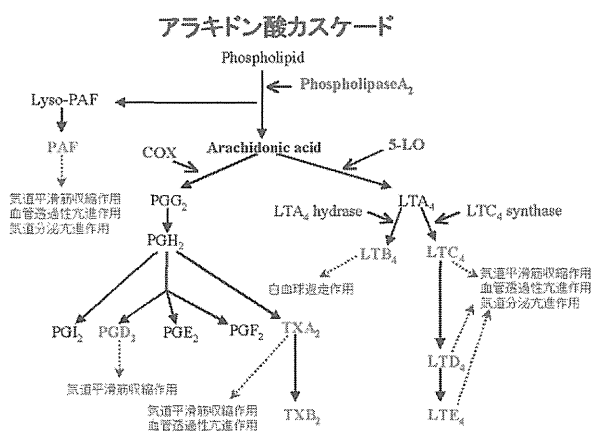


図 1. アラキドン酸カスケードの模式図

Commun 339:533-9, 2006)。

また、神経管、神経堤、骨格筋などの発生に重要な役割を持つ Pax3 と協調的に働く因子を探す目的で、酵母 Two hybrid 法により Pax3 に結合する分子をスクリーニングした結果、TAZ タンパクが同定されている。さらに *in vitro* アッセイの結果、Pax3-TAZ の結合には、Pax3 C 末端側の PPXY モチーフ及び TAZ N 末端側の WW domain が深く関わっていることが示された。TAZ の発現を *in situ* hybridization で調べると、胎生 10.5 日マウス胚において神経管内側、鰓丘の外胚葉性間葉、体節で発現が見られており、TAZ は Pax3 などの転写因子と相互作用して形態形成に関わっている可能性が考えられる。転写コアクチベーター TAZ は、発見当初より、腎臓および肺において強く発現していることが報告されている。本研究では、転写コアクチベーター TAZ の遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を検討する。

In vitro 気道リモデリングおよび EMT :

COPD の病変は、末梢気道および間質における炎症が主因と想定されている。

その炎症進展の機序は、喫煙など外的刺激物質の関与により炎症細胞と生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられる。しかしながら COPD 発症の分子機構については未だ解明されていない。今回我々は、COPD の病変を、「異常な線維化による臓器障害」という視点からアプローチすることを試みる。COPD は、肺胞壁・間質における弾性組織の不可逆的な変性・減少を特徴とするが、これは末梢気道および間質における炎症・線維化異常が極まった状態である可能性がある。一方、逆方向の線維化異常の場合は、肺線維症へと向かうものである。

近年、COPD、間質性肺炎、気管支喘息などは、いずれも免疫・炎症を主体とする病態であると想定されている。これらの免疫・炎症性肺疾患発症に関しては、種々の化学物質が複雑に関与し

ていると考えられる。今回、我々は、その機序を解明する手法の一端として、*In vitro* 気道リモデリング解析法を開発・応用した。これは、1 種類の蛋白質と 1 種類の細胞系よりなる、究極に単純化された人工的肺・気管支モデルであり、Gel contraction 法と呼ばれる。

さらにまた、近年、EMT が注目されている。EMT は上皮細胞が間葉系細胞に転換する現象で、呼吸器系では気道リモデリングに関わる可能性が指摘されている。我々は、EMT に関するモデルを構築し、関連遺伝子を探索した。

B. 研究方法

< CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成 >

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

< 転写コアクチベーター TAZ ノックアウトマウスの作成と解析 >

転写コアクチベーター TAZ の遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を探索した。まず、TAZ ノックアウトマウスの作成を行い、次にその解析に着手した。

In vitro 気道リモデリングと EMT :

< Gel contraction 法 >

Type I collagen 作成 : Rat の Tail から腱を摘出し腱鞘、その他の結合組織を注意深く取り除いた後、0.9% NaCl 10 mM Tris pH 7.5, 50% Ethanol, 75% Ethanol, 95% Ethanol で洗浄する。6 mM HCl 300 ~ 400 ml 4℃ で一昼夜 Staring することにより Type I collagen を抽出する。Sodium dodecyl sulfate

(SDS)-PAGE で type I collagen 以外の蛋白が混入していないことを確認する。collagen 濃度はそれぞれの lot から乾燥重量を測定して求めた。

< 3 次元的培養 : >

抽出した Type I collagen を 4 倍濃度の DMEM と蒸留水とで生理的浸透圧に調整する。最終 collagen 濃度を 0.75 mg/ml に調節後 3×10^5 cells/ml 細胞濃度でゲル内に線維芽細胞を加える。24 well プレートで 0.5 ml/well になるようゲルを入れ 20 分でゲル化させる。固まったゲルの周囲を plate 壁から切り離し、各種試薬が添加された 6 cm dish (5 ml DMEM) 内に浮遊させる。

< 収縮能測定 : >

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

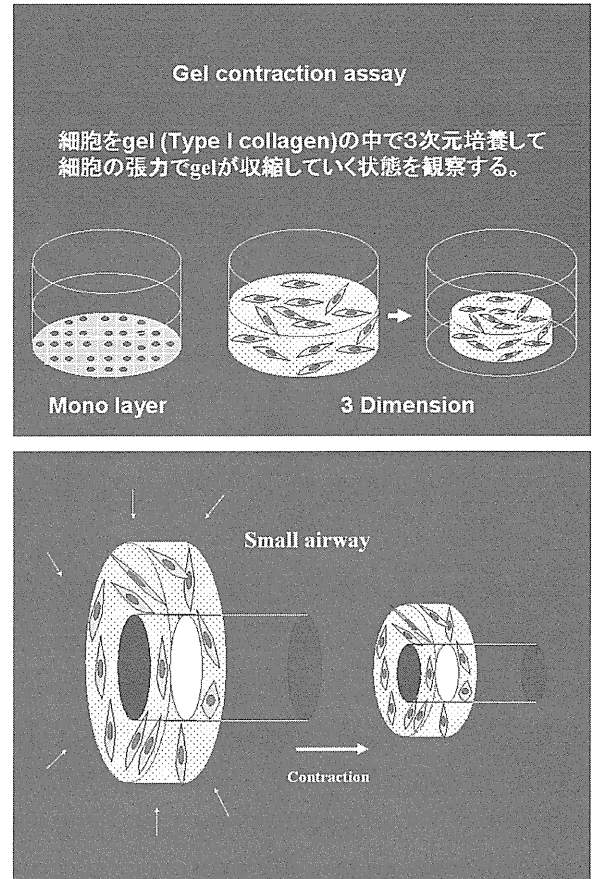
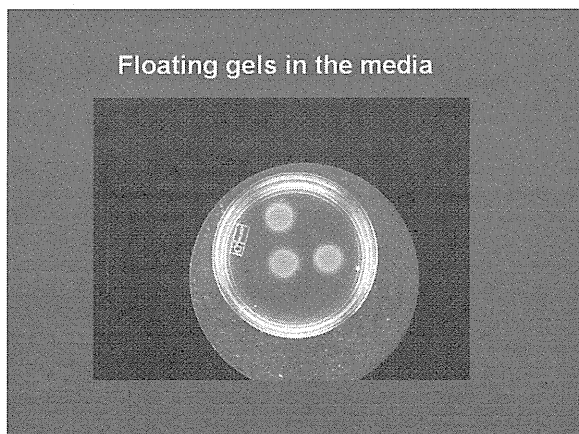
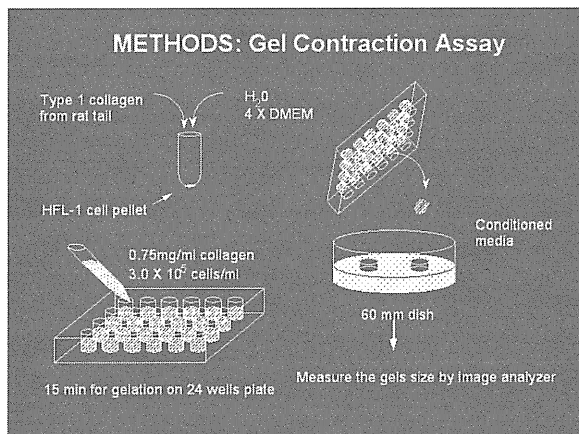


図 2. Gel contraction 法。
線維芽細胞は Type I collagen 内で 3 次元的に培養される。



< EMT >

確立された肺癌細胞の系を用いて検討した。
(倫理面への配慮)

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究における危険の排除、説明と理解 (インフォームドコンセント) について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に基づき、研究を進める。

本研究で行う予定の遺伝子組換え実験は、平成 16 年 9 月 10 日の東京大学医学部組換え DNA 実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエーター受容体、合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」に含まれており、

適切な拡散防止措置がとられる。

C. 研究結果

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

キメラマウスの中で, germ line にノックアウト DNA コンストラクトが移行したのを選び, ヘテロ接合体を得た (図 4)。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体 CysLT2-R ノックアウトマウスは, 胎内死亡および周産期死亡を呈さず, 生育も野生型マウスと差異を認めていない。

<転写コアクチベーター TAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

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

次に, 胎生期から成体までの, 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見を検討した。その結果, TAZ ノックアウトマウスの肺は, 胎生期においては, ほぼ正常の発育であるが, 生後 5 日以降には気腔の拡張が認められ, その後, 気腔の拡張が増大していた。

<TAZ ノックアウトマウス肺における遺伝子発現の解析>

胎生期から成体までの, 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を real time RT-PCR を用いて検討した。その結果, 肺の発達・成長に必須とされる TTF-1 の発現が, TAZ ノックアウトマウスにおいても野生型と変わらないことが示された。

一方, 2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では, MMP12 (macrophage elastase) が著明に発

現していることが明らかになった。

次に, 胎生期の野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を microarray 解析を用いて検討した。その結果, TAZ ノックアウトマウスにおいて発現低下が認められた遺伝子を 5つ選び, さらに real time RT-PCR を用いて検討した。その結果, 2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では, Fbln5 と CTGF の発現が有意に低下していることが明らかになった。

<TAZ siRNA を用いた検討：培養細胞における遺伝子発現の解析>

次に, 培養細胞 LA4 および TAZ siRNA (TAZ-994) を用いて, TAZ ノックアウト細胞における各種遺伝子発現を real time RT-PCR を用いて検討した。その結果, TAZ ノックアウト細胞では, CTGF の発現が有意に低下していることが明らかになった。

Fig. 8

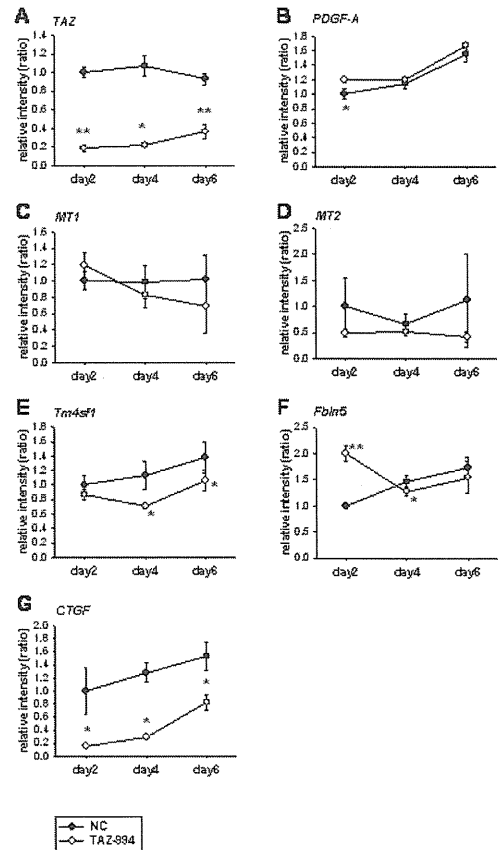


図 3. TAZ siRNA (TAZ-994) による TAZ ノックアウト細胞における各種遺伝子発現

<TAZノックアウトマウス肺におけるCTGF発現の解析>

胎生期の、野生型マウスとTAZノックアウトマウスの肺におけるCTGFの発現を免疫組織染色を用いて検討した。その結果、TAZノックアウトマウスの肺では、CTGFの発現が低下していることが明らかになった。

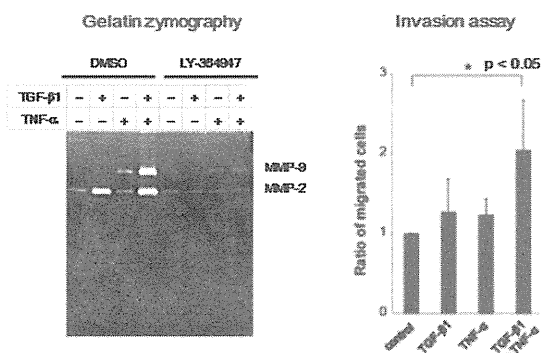
In vitro 気道リモデリングとEMT:

Gel contraction 法の開発がなされ、再現性の確認がなされた。

A549細胞に、TGF-beta および TNF-alpha を添加することにより、EMTが誘導された。またこのEMTは、smadに依存することが示された。

また、TNF super family のひとつであるLIGHTに注目し、培養細胞系およびgel contraction法を用いて検討したところ、LIGHTがEMTにおいて重要な役割を果たす可能性が示唆された。

TNF- α enhances TGF- β -mediated EMT in A549 lung cancer cells



TGF- β -mediated EMT is Smad-dependent

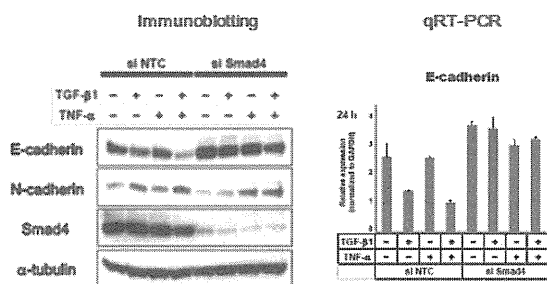
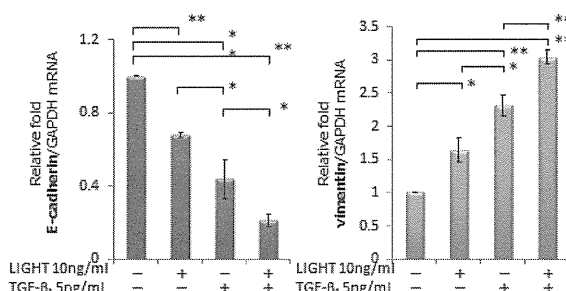


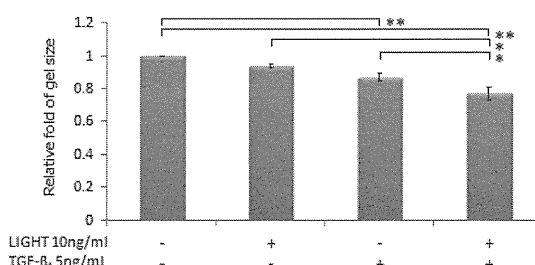
図4. EMTはTGF-betaおよびTNF-alphaにより誘導され、smadに依存する

The Effect of LIGHT on TGF- β 1-induced EMT



The expression of mRNA for E-cadherin and vimentin in A549 cells stimulated with LIGHT and/or TGF- β 1 for 48 hours. The expression of E-cadherin decreased significantly in the combination of LIGHT and TGF- β 1, compared with TGF- β 1 alone while simultaneously increasing expression of vimentin. N = 5 separate experiments. *: means p < 0.05, **: means p < 0.01

Gel contraction assay



The effect of LIGHT and/or TGF- β 1 on collagen gel contraction mediated by A549 cells. The gel size significantly decreased the combination of TGF- β 1 and LIGHT compared with TGF- β 1 alone. EMT-induced cells obtained contractility. Gels size were measured 72 hours after gelation. N = 6 separate experiments. *: means p < 0.05, **: means p < 0.01

図5. LIGHTは、EMTに関与する。

D. 考察

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

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

と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。

また、呼吸器系において、正常の肺・気管支では、線維芽細胞は炎症後の創部へと遊走し、コラーゲンなどの細胞外器質を産生し欠損部をうめる。さらに創傷治癒の終盤には創部を収縮させて創傷治癒を完成させる。しかし、この過程に異常が生じた場合は組織修復はうまくいかず、機能障害を引き起こす。とくに末梢気道周囲で過度の収縮が生じた場合は気流制限を引き起こし COPD や気管支喘息の増悪に関与する。今回開発に着手した *in vitro* 気道モデリング系は、末梢気道周囲において増加した線維芽細胞とコラーゲンが作り出す収縮について検討できるモデルであると考えられる。また、EMT も実際に末梢気道病変形成に関与している可能性が高い。

今日まで、COPD の病態を理解するためには呼吸生理学的アプローチが必須であり、その成果は COPD ガイドラインの作成という形で結実している。一方、まさしくガイドラインにあるように、COPD 発症分子機構の解明のためには、多様な学問領域を結集・統合したアプローチを必要とするであろう。

本研究の成果により、脂質性メディエーター、転写コアクチベーター TAZ などをはじめとして、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いことが期待される。

E. 結 論

発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性肺疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供する独創的なものであり、本研究の成果は呼吸不全を呈する肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito A, Suzuki HI, Horie M, Ohshima M, Morishita Y, Abiko Y, Nagase T : An integrated expression profiling reveals target genes of TGF- β and TNF- α possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PLoS One* 2013; 8: e56587
2. Noguchi S, Hijikata M, Hamano E, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Nagase T, Keicho N : MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics* 2013;65:107-114
3. Noguchi S, Hamano E, Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Nagase T, Keicho N : Differential effects of a common splice site polymorphism on the generation of OAS1 variants in human bronchial epithelial cells. *Hum Immunol* 2013;74:395-401
4. Narumoto O, Niikura Y, Ishii S, Morihara H, Okashiro S, Nakahari T, Nakano T, Matsumura H, Shimamoto C, Moriwaki Y, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N : Effect of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1) on airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 ; 438 : 175 - 179
5. Mikami Y, Yamauchi Y, Horie M, Kase M, Jo T, Takizawa H, Kohyama T, Nagase T : Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces epithelial-mesenchymal transition in A549 human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 ; 428 : 451 - 457
6. Yamauchi Y, Kohyama T, Jo T, Nagase T : Dynamic change in respiratory resistance during inspiratory and expiratory phases of tidal breathing in patients with chronic obstructive

pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2012 ; 7 : 259 – 269

7. Narumoto O, Matsuo Y, Sakaguchi M, Shoji S, Yamashita N, Schubert D, Abe K, Horiguchi K, Nagase T, Yamashita N : Suppressive effects of a pyrazole derivative of curcumin on airway inflammation and remodeling. *Exp Mol Pathol* 2012 ; 93 : 18 – 25.
8. Kawakami M, Narumoto O, Matsuo Y, Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, Sakaguchi M, Lipp M, Nagase T, Yamashita N : The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure. *Cell Immunol* 2012 ; 275 : 24 – 32
9. Kage H, Sugimoto K, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Ohishi N, Takai D : Suppression of transforming growth factor β 1 in lung alveolar epithelium-decells using adeno-associated virus type 2/5 vectors to carry short hairpin RNA. *Exp Lung Res* 2011 ; 37 : 175 – 185
10. Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T : Simultaneous stimulation with TGF- β 1- and TNF- α induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2011 ; 155 : 119 – 128

2. 学会発表

国際学会

1. Cellular and molecular mechanisms of epithelial mesenchymal transition in airway epithelial cells under airway inflammation. The 18th APSR Meeting, Yokohama. (発表者 : 山内康宏, 招待講演), 2013
2. Cellular and molecular models of lung diseases. The 17th APSR Meeting, Hongkong. (発表者 : 長瀬隆英, 招待講演), 2012
3. Molecular mechanisms underlying respiratory diseases. The 16th APSR Meeting, Shanghai. (発表者 : 長瀬隆英, 招待講演), 2011

国内学会

1. モデルマウスを用いた呼吸器疾患の病態解明 : 第 53 回日本呼吸器学会総会 (発表者 : 長瀬隆英, 教育講演), 2013
2. 高齢者の慢性閉塞性肺疾患の管理 : 第 54 回日本老年医学会総会 (発表者 : 長瀬隆英, 教育講演), 2012
3. 高齢者の呼吸器疾患 : 第 53 回日本老年医学会総会 (発表者 : 長瀬隆英, 教育講演), 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

COPD の病態生理に関する研究

研究分担者 玉 置 淳

東京女子医科大学第一内科学 教授

研究要旨

慢性閉塞性肺疾患（COPD）の病態として、全身性の併存症、咳嗽・喀痰などの呼吸器症状の重要性が指摘されている。本分担研究では、これらの病態生理の詳細を細胞レベルあるいは分子レベルで明らかにするため、肺気腫に併存する痩せ症状、慢性咳嗽および気道分泌亢進に焦点を絞り、*in vivo*, *in vitro*, ヒトの3つの系を用いて研究を行った。その結果、血管新生促進物質である E-prostanoid 2 (EP2) 受容体作動薬 ONO-AE1-259 が COPD に随伴する痩せ症状を改善すること、抗コリン薬であるチオトロピウムは咳嗽および喀痰症状を改善させるとともに、喀痰の粘液分泌を減らし気道クリアランスを改善させること、COPD でみられる気道分泌亢進はタバコ煙による EGFR リン酸化が杯細胞増生をきたすことがその原因であることなどが解明された。

A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は痩せ症状や心血管病変、骨粗鬆症などの多彩な併存症を伴う全身性疾患であるとともに、慢性的な咳嗽、喀痰、呼吸困難などの呼吸器症状を有することが特徴である。そこで、COPD の全身併存症および上記の臨床症状の治療法の開発は、増加しつつある COPD 患者の予後や QoL を改善するために重要な医学的および厚生労働行政上の課題である。

そこで本分担研究の目的は、第一に、エラスターゼ誘起肺気腫マウスを用いて、強力な血管新生促進物質である E-prostanoid 2 (EP2) 受容体作動薬 ONO-AE1-259 の全身投与が、気腫病変や皮下脂肪の減少（痩せ症状）を改善させるか否かを検討すること、第二に、咳嗽および気道分泌亢進は 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あることに注目し、COPD 患者における咳嗽と喀痰に対する抗コリン薬の効果を明らかにすること、第三に、

COPD 患者で観察される気道粘液分泌亢進の発現機序や、かかる組織変化の維持機構が不明であることを鑑み、代表的な気道リモデリングである杯細胞増生の分子メカニズムをを解明することを目的とした

B. 研究方法

全身症状としての痩せに関する研究では、8週齢雄性 C57BL/6J マウスを4群（生食対照群、生食+ONO-AE1-259群、エラスターゼ+生食群、エラスターゼ+ONO-AE1-259群）に分けて検討を行った。エラスターゼ+生食群およびエラスターゼ+ONO-AE1-259群には気管内に豚膵エラスターゼを注入して気腫病変を誘導した。エラスターゼまたは生食の気管内投与の4週間後から ONO-AE1-259 または生食を週5日間、4週間連続して腹腔内に注射した。次いで、肺組織および全身の皮下脂肪組織、内臓脂肪組織、腓腹筋を摘出し形態計測を行った。

呼吸器症状としての咳嗽、喀痰に関する研究で

は、当院の外来通院中の COPD 患者のうち、過去 8 週間以上にわたって継続的に咳嗽および喀痰のある症例を対象とし、チオトロピウム 18 μ g/day の吸入を行った。主要評価項目は CASA-Q (Cough and Sputum Assessment Questionnaire) であり、副次評価項目は、サッカリンテストと喀痰解析とした。

また、気道粘液分泌亢進のメカニズム解明の研究では、気道上皮培養細胞株 NCI-H292 細胞を用い、タバコ煙、EGFR の代表的なリガンドである TGF α などで刺激を行い、EGFR リン酸化、EGFR 遺伝子、MUC5AC 遺伝子および蛋白発現を *In situ* hybridization, Northern blotting, Western blotting などで検討した。また、それらの効果に対する EGFR リン酸化阻害薬 (BIBX 1522, AG1478) の影響も検討した。さらに喫煙曝露ラットの気道粘膜における杯細胞増生と、それに対する EGFR リン酸化阻害薬の影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は東京女子医科大学倫理委員会および東京女子医科大学動物実験倫理委員会の許可を得て行われた。

C. 研究結果

痩せ症状に関する研究では、エラスターゼ + 生食群の肺組織では平均肺胞壁間距離 (Lm) が増大して気腫病変が形成されるとともに、肺血管床が減少した。エラスターゼ + ONO-AE1-259 群では、エラスターゼ + 生食群に比べて Lm には変化はなかったが、平均肺胞血管床容積が有意に改善していた。エラスターゼ + 生食群では皮下脂肪重量および皮下脂肪組織中の脂肪新生の指標である CEBP α (CCAAT/enhancer-binding proteins α) mRNA 発現量が減少したが、ONO-AE1-259 の投与により有意に改善した。また、エラスターゼ + 生食群では皮下脂肪組織中の平均血管密度および VEGF 量が減少したが、ONO-AE1-259 の投与により有意に改善した。

COPD 患者の慢性咳嗽および喀痰に関する臨床

試験では、チオトロピウム投与前および投与 8 週後の評価では、CASA-Q スコアの咳症状ドメイン、痰症状ドメインは有意に改善した。また、咳インパクトドメイン、痰インパクトドメインも有意な上昇がみられた。サッカリンテストにより測定した鼻クリアランス時間は、チオトロピウム投与により有意に短縮し、喀痰 solid composition も有意に減少した。

杯細胞増生に関する研究においては、タバコ煙曝露により気道上皮細胞 EGFR のリン酸化が誘導され、EGFR 遺伝子の発現も亢進した。また、MUC5AC の遺伝子発現もタバコ煙や TGF α 刺激により亢進した。さらに、喫煙刺激はラット気道粘膜の著明な杯細胞過形成を誘導した。また、上記の *in vitro* および *in vivo* の効果は EGFR リン酸化阻害薬により著明に抑制された。

D. 考察

以上の研究成績より、COPD 患者に対する血管新生を促進する EP2 受容体作動薬の全身性投与は、エラスターゼで破壊された肺血管床を再生するだけではなく、皮下脂肪の血管新生を刺激して脂肪細胞の増殖を促進し、肺気腫に伴う痩せ症状を改善すると考えられた。また、抗コリン薬であるチオトロピウムは、COPD 患者の慢性咳嗽と気道分泌亢進を軽減し、気道クリアランスを改善させることが明らかとなった。気道における粘液産生細胞には迷走神経支配があり、アセチルコリンによるムスカリン M3 受容体刺激はムチン分泌を促進させることを勘案すると、迷走神経トーンの高い COPD 患者においては粘液の産生が増加しているものと考えられ、チオトロピウムはその過程を抑制することが期待された。さらに、粘液分泌亢進の背景には喫煙刺激に基づく気道杯細胞増生があるが、そのメカニズムとして気道上皮細胞における EGFR リン酸化を介するムチン遺伝子 MUC5AC の発現が重要な役割を果たしていること、その治療には EGFR リン酸化抑制薬が有効である可能性が推測された。

E. 結 論

1. 血管新生を促進する EP2 受容体作動薬の全身性投与は、エラスターゼ誘起肺気腫マウスにおける気腫化肺組織の血管再生と皮下脂肪の新生を誘導する。EP2 受容体作動薬は瘦せた COPD 患者に対する新しい治療法となりうる可能性が示された。
2. 長時間作用性抗コリン薬は COPD 患者における咳嗽および気道分泌亢進に基づく症状を軽減させ、気道クリアランスの改善をもたらした。
3. COPD における気道分泌亢進には EGFR のリン酸化が重要な役割を果たしており、ムチン遺伝子の発現調節は杯細胞過形成の成立・維持機構の阻害につながり、COPD の新しい治療ストラテジーとして期待された。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhou F, Onizawa S, Nagai A, Aoshiba K : Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury. *Respir Res* 12 : 78, 2011
2. Aoshiba K, Zhou F, Tsuji T, Nagai A : DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. *Eur Respir J* 39 : 1368 - 1376, 2012
3. 玉置 淳 : 長引く咳にどう対処するか? 迅速な診断と最新の治療について. *都耳鼻会報* 139 : 9 - 13, 2012
4. 玉置 淳 : 慢性気道疾患における咳・痰のリスクと治療 : 主に COPD 患者の喀痰・咳症状を理解し治療することの意義. *Ther Res* 33 : 897 - 904, 2012
5. 玉置 淳 : COPD の診断と治療の進歩 : COPD の疫学と病態. *東京都医師会誌* 66 : 1401 -

1407, 2013

2. 学会発表

国際学会

1. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A : EP2 receptor agonist improves subcutaneous fat wasting in a murine model of elastase-induced emphysema. International Conference of in a murine model of elastase-induced emphysema. International Conference of American Thoracic Society. May 2011, Denver
2. Tagaya E, Tamaoki J, Kirishi S, Isono K, Nagaoka M, Kimura N, Kondo M, Nagai A : Effect of tiotropium on mucus hypersecretion and their impact and nasal mucociliary clearance in patients with COPD. Annual Meeting of The American Thoracic Society. May 2012, San Francisco
3. Tamaoki J : Invited lecture: Regulation of airway cleaning in inflammatory airway diseases. 8th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. Nov 2013, Yokohama
4. Tamaoki J : Symposium: Management of mucus secretion airway diseases: Role of airway hypersecretion in COPD exacerbations. 16th Asian Research Symposium in Rhinology. Aug 2013, Yokohama
5. Tamaoki J : Symposium: Novel action of macrolide antibiotics: The mechanism of action & future prospects: Regulation of airway clearance in inflammatory airway diseases. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 2013, Yokohama

国内学会

1. 辻 隆夫, 青柴和徹, 永井厚志 : COPD エラスターゼ肺気腫マウスの体脂肪量減少に対する EP2 受容体作動薬の効果. 第 51 回日本呼吸器学会, 2011 年 4 月, 東京
2. 多賀谷悦子, 切士紗織, 新井尚希, 奥出 梓, 難波麻衣, 近藤光子, 玉置 淳 : COPD 患者

における粘液の過剰分泌および粘液線毛ク
リアランスにおけるチオトロピウムの効果.
第62回日本アレルギー秋季学術大会, 2012
年11月, 大阪

3. 玉置 淳: シンポジウム: COPD と喘息の相
違: 病態・病理学の立場から. 第63回日本
アレルギー秋季学術大会, 2013年11月, 東京
4. 玉置 淳: シンポジウム: 気道クリアランス:
気道における粘液線毛輸送系の制御機構と
病態. 第23回日本呼吸ケア・リハビリテー

ション学会学術集会, 2013年10月, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

[1] リンパ脈管筋腫症，特定疾患臨床調査個人票（2009～2011年度）集計報告

[2] 気腫合併肺線維症における喫煙関連炎症の検索

[3] COPD の全身性炎症と酸化ストレス，アクロレインの関与

[4] COPD と *HIF1A* 遺伝子多型との関連

[5] COPD と CPFE における呼吸抵抗と QoL の相違

研究分担者 久保恵嗣

信州大学医学部内科学第一講座 特任教授

研究要旨

[1] リンパ脈管筋腫症（LAM）は2009年10月より特定疾患治療研究事業の対象疾患に追加認定された。厚生労働省健康局疾病対策課へ臨床調査個人票データ使用の申請を行い，2011年10月6日付で作成された個人票データ（対象期間；2009～2011年度，対象地域；全国）が提供された。28都道府県から247患者が登録され，すべて女性であった。年ごとには，2009年の新規登録患者43人，2010年の更新登録患者95人（2010年9月以前での新規登録患者を含む），2010年の新規登録148人，2011年の更新登録17人，2011年の新規登録8人であった。（医療受給者証の有効期限は9月末であり，2011年になされている多くの申請は，10月現在において登録に上っていない可能性がある。）登録データの集計結果をまとめた。

[2] 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。病態については不明であるが，大半が喫煙者である。RAGE（receptor for advanced glycation end products）は喫煙による過剰な酸化ストレスで発現が上昇する。Egr-1（early growth response gene 1）は，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。手術検体からヒト肺組織を取得し，非喫煙健常者，CPFE，COPD，IPFの各群において，RAGEおよびEgr-1の発現，局在について免疫組織学的手法により検討した。その結果，IPFでRAGEの発現の低下，COPDの気腫部分で肺胞上皮細胞においてRAGEの発現の上昇が見られた。CPFEでは，気腫部分はRAGEの発現がやや高いが肺気腫におけるRAGE発現よりも弱いと思われた。線維化の部分では，RAGEの発現が低下していた。一方，Egr-1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であったが，核は染色されなかった。

[3] 血漿および肺組織中のアクロレインについて酸化ストレスとの関連を中心に検討した。血漿：健常喫煙者16例，COPD患者41例。肺組織抽出液：非喫煙者，健常喫煙者，COPD患者，各々10例。アクロレインは液体クロマトグラフィー法で測定した。活性酸素代謝物（dROMs）はフリーラジカル解析装置（FREE carpe diem™）により測定した。血漿中アクロレインはCOPD群で有意に高値であった。肺組織中アクロレインは健常喫煙者群とCOPD群で同等であった。COPD患者血漿および肺組織中アクロレインはdROMsと相関を認めた。一方，COPD患者血漿中アクロレインは喫煙歴と相関したが，肺組織中アクロレインは喫煙歴と相関を認めなかった。

[4] 重症 COPD（肺気腫）の肺組織では hypoxia inducible factor-1 α （HIF-1 α ）および VEGF の発現が低下しており，特に HIF-1 α の蛋白発現は COPD の重症度と相関する（平成 22 年度信州大学分担研究報告書）。今回，COPD 患者肺における HIF-1 α 蛋白の発現低下に遺伝子多型が関与している可能性について検討した。COPD 群 267 例と健常喫煙者群 141 例の血液サンプルより DNA を抽出した。HIF1A 遺伝子配列内の 7 か所の単塩基多型（rs1951795, rs10129270, rs1957757, rs966824, rs2301113, rs4902080, rs6573399）について，TaqMan プローブとリアルタイム PCR システムを用いて遺伝子型のタイピングを行い，その遺伝子頻度を比較した。COPD 群と健常喫煙者群で，1 か所の単塩基多型（rs4902080）の発現頻度に有意差（ $p=0.0145$ ）を認めた。

[5] 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。今回，CPFE と COPD との相違を検討するため，強制オシレーション法や健康関連 QoL を調査した。その結果，CPFE では COPD と比較して強制オシレーション法の低周波領域における異常は有意に軽度である一方，健康関連 QoL の障害の程度は同程度であることがわかった。また息切れについては，CPFE では拡散能力がより低下している疾患であるにも関わらず，COPD 患者に比べて自覚に乏しい可能性も示唆された。

A. 研究目的

[1] リンパ脈管筋腫症（LAM）は 2009 年 10 月より特定疾患治療研究事業の対象疾患に追加認定された。臨床調査個人票は，呼吸不全に関する調査研究班によってそれまで行われてきた全国疫学調査の調査票を基に，特定疾患認定に沿った形式として，また更新手続きのため毎年提出されることを前提に考慮してまとめられたものである。最も早い認定患者では 2 回目の更新を迎える時期となり，全国における個人票データの現況を把握する目的で集計を行った。

[2] 気腫合併肺線維症（CPFE）の発症に喫煙関連の炎症が関与すると仮定し，RAGE（receptor for advanced glycation end products）と Egr-1（early growth response gene 1）に注目し，その発現について免疫組織化学的解析を行った。

[3] 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。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，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。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。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が，COPD 患者における血漿中アクロレインの報告はない。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。

[4] 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。我々は，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。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。

[5] 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。

B. 研究方法

[1] 厚生労働省健康局疾病対策課へ臨床調査個人票データ使用の申請を行い、2011 年 10 月 6 日付で作成された個人票データ（対象疾患：LAM, 対象期間：2009～2011 年度, 対象地域：全国）が提供された。各個人票データには個人番号が付され、申請年度および申請区分（新規申請または更新申請）ごとに作成されたファイル間で同一患者の確認が行えることになっているが、データの集計に先だて、新規申請および毎年の更新申請がどの程度継続されているかの確認集計を行った。

[2] 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。

[3] 健常喫煙者 16 名, COPD 患者 41 名 (GOLD1; 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。

[4] 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。HIF1 α 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 の発現頻度を比較した。さらに、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 allele の発現頻度を比較した。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検討した。

[5] 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 らの選択基準に準拠した。

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。

(倫理面への配慮)

患者肺、血清を使用する研究においても、臨床的に肺葉切除が必要、検診時の採血と同時に承諾を得て行うなど、可能な限り新たな侵襲が患者に加わることの無いように配慮した。すべての研

究について、個別の研究を行うことに関して同意を得たうえで行った。患者情報は全て匿名化（連結可能）をおこない、研究に当たっては新たに付した番号により行った。個人情報の管理については、連結可能な文書に関しては別の担当者に預けて行っている。

C. 研究結果

[1] データに含まれる個人票数はのべ311、28都道府県から247患者として登録されていた。申請年度および申請区分ごとの内訳を図1に示す。2009年度新規申請者のうち31人のその後の更新申請（入力）がなく、2010年度更新申請者のうち45人と2011年度更新申請者のうち3人の新規申請（入力）がなかった。また2010年度新規申請者のうち96人については、2010年度更新申請に係る可能性がある。尚、医療受給者証の有効期限は9月末であり、2011年になされている多くの申請は、10月現在において登録に上っていない可能性がある。

個人を特定するためのデータは含まれていないが、出生年と住所都道府県につき確認を行ったところ、同一の個人番号では完全に一致した。2009、2010年度新規申請者と2010年度更新申請者の間で、または2009～2011年度新規申請者と2011年度更新申請者の間では11組の一致がみられたため、他のデータを確認したところ2010年

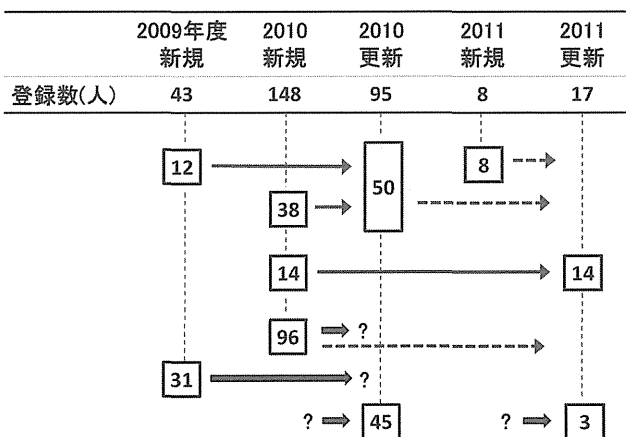


図1. 臨床調査個人票の申請年度および申請区分ごとの内訳

度新規申請と2010年度更新申請の1組は詳細な内容が一致しており同一個人と考えられた。2010年度更新申請者からこの1人を除外するかたちで、のべ246人としてデータの集計を行った。主な結果を表1～12に示す。

246人はすべて女性であり、発病時年齢の平均は34±9（1-61）歳（n=198）、個人票が作成された医療機関への初診時年齢の平均は37±9（18-70）歳（n=237）、初診年は1981～2011年、申請時の平均年齢は42±9（24-71）歳（n=243）であった。身体障害者手帳を持つものが27%である一方、社会活動としては81%が就労または家事労働にあっていた。表には示さないが周産期の気胸の合併ありと回答された9人

表1. 新規申請199人の臨床背景

	n	%
喫煙歴；あり	4/194*	2
過去にあり	49/194*	25
なし	141/194*	73
家族歴；TSC	6/192*	3
LAM	3/191*	2
気胸	3/192*	2
閉経	77/178*	43
妊娠歴	95/176*	54
平均妊娠回数	1.9±1（1-6）**	
出産歴	87/176*	49
平均出産回数	1.6±0.7（1-4）**	

*分母は質問に対して回答（入力）されている個人票の数
**平均値±SD（range）

表2. 新規申請199人の初発症候

	n	%
労作時息切れ	75	38
気胸	86	43
胸部異常陰影	13	7
その他	47	24

呼吸器症状；血痰5、胸水4、咳3、痰2、胸痛2、肺炎1
 腹部症状；腰背部・腹部痛7、腹部膨満感1、腹痛+発熱1、腹水4、肢の（リンパ）浮腫3、下腎腫瘍2、腎出血1、血尿1、後腹膜腫瘍1、腹部リンパ節腫大1、不正出血1
 その他；頸部皮下腫瘍1、貧血1

表 3. 246 人の現在の症候

	n	%
無症状	60	24
労作時息切れ	153	62
咳	43	17
痰	29	12
血痰	18	7
喘鳴	4	2
気胸	10	4
腹痛	10	4
血尿	0	0
腎機能障害	10	4
下肢のリンパ浮腫	12	5
その他	20	8

表 4. 新規申請 199 人の検査所見

	n	%
胸部 CT ; 異常あり	195	98
多発性嚢胞	189	95
縦隔リンパ節腫大	4	2
胸水	9	5
その他	5	3
腹部画像検査 ; 施行	179	90
腎血管筋脂肪腫	63 (/179)	35
腎臓以外の血管筋脂肪腫	18 (/179)	10
腹部リンパ節腫大	67 (/179)	37
腹水	18 (/179)	10

表 5. 新規申請 199 人の病理組織診断

	n	%
病理組織診断あり	159	80
肺	139	70
リンパ節	15	8
その他	8	4
免疫染色所見		
α-SMA 陽性	113/113*	100
HMB-45 陽性	98/110*	89
estrogen receptor 陽性	57/ 76*	75
progesterone receptor 陽性	59/ 72*	82

* 分母は検査施行数

表 6. 新規申請 199 人の細胞診断

	n	%
LCC の証明あり	11	6
胸水	6	3
腹水	3	2
(不明)	(2)	
免疫染色所見		
α-SMA 陽性	6/7*	86
HMB-45 陽性	6/7*	86
estrogen receptor 陽性	3/3*	100
progesterone receptor 陽性	3/3*	100
D2-40	4/4*	100
VEGFR-3	3/3*	100

* 分母は検査施行数

表 7. 246 人の総合診断

	n	%
病型		
sporadic LAM	200	81
TSC-LAM	34	14
(不明)	(12)	5
診断の種類		
診断確実例	155	63
診断ほぼ確実例	26	11
{ 組織診断例	22	9
{ 細胞診断例	3	1
{ (不明)	(1)	0.4
臨床診断例	54	22
(不明)	(11)	4

表 8. 246 人の最新の検査結果

	Mean ± SD	(Range)	n
動脈血液ガス*			
PaO ₂ (Torr)	76.5 ± 16.6	(44.5 - 127)	82
PaCO ₂ (Torr)	38.9 ± 6.7	(21.5 - 65.8)	82
呼吸機能検査			
%VC	84.9 ± 19.8	(33.1 - 135.1)	184
%FVC	86.1 ± 21.0	(30.5 - 140)	186
%FEV ₁	65.3 ± 26.1	(12.7 - 123.4)	186
FEV ₁ /FVC (%)	64.3 ± 20.1	(18.0 - 103.2)	192
%DLco	56.6 ± 23.4	(17.5 - 119.4)	149
%DLco/VA	59.9 ± 25.8	(11.4 - 153.6)	146

* 非 O₂ 吸入下

表 9. 新規申請 199 人の経過

	初診時		最終検査	
	Mean ± SD	(n)	Mean ± SD	(n)
動脈血液ガス*				
PaO ₂ (Torr)	77.1 ± 15.1	(36)	72.0 ± 16.7	(36)
PaCO ₂ (Torr)	38.9 ± 5.3	(36)	40.7 ± 7.1	(36)
呼吸機能検査				
%VC	89.0 ± 16.3	(112)	87.0 ± 19.2	(112)
%FVC	90.4 ± 18.2	(108)	88.8 ± 20.0	(108)
%FEV ₁	74.8 ± 25.0	(112)	66.9 ± 26.6	(112)
FEV ₁ /FVC (%)	70.8 ± 18.4	(108)	63.4 ± 20.3	(108)
%DLco	61.3 ± 23.6	(87)	57.2 ± 21.8	(87)
%DLco/VA	64.5 ± 24.5	(82)	57.8 ± 22.2	(82)

*非 O₂ 吸入下

表 10. 246 人の現在の治療内容①

	n	%
ホルモン治療あり	71/233*	30
Gn-RH アゴニスト	47	20
プロゲステロン	14	6
外科的卵巣摘出術	3	1
その他	5	2
治療効果		
あり	11	5
なし	3	1
不明	20	9

*分母は回答（入力）されている個人票数

表 11. 246 人の現在の治療内容②

	n	%
気管支拡張療法	89/240*	37
キサンチン製剤	18	8
抗コリン薬	65	27
長時間作用型吸入	55	23
短時間作用型吸入	3	1
β 刺激薬	56	23
長時間作用型吸入	42	18
短時間作用型吸入	5	2
貼付 β 刺激薬	14	6
経口 β 刺激薬	2	1

*分母は回答（入力）されている個人票数

表 12. 246 人の現在の治療内容③

	n	%
在宅酸素療法	70	28
在宅人口呼吸療法	2	1
NPPV	1	0.4
TPPV	1	0.4
脳死肺移植登録（待機中）	25	10
肺移植	15	6
脳死肺移植	9	4
生体肺移植	5	2
不明	1	0.4

は、出産歴ありの 87 人を分母とすると 10% にあたり、この 9 人中 8 人は気胸回数が入力されており、平均気胸回数は 6.5 ± 3.3 (1-10) 回であった。呼吸機能検査所見（表 8）では肺拡散能の低下が著明にみられ、%DLco が 80% 未満であるのは 79% であった。%FEV₁ が 80% 未満であるのは 68% であった。表 9 では 2 回分の検査結果が明らかである場合のみを集計しているが、検査間隔が 6 カ月以上である場合のみに限って計算を行うと、FEV₁ 低下率は $-80.0 \pm 145\text{ml}/\text{年}$ (n = 104)、DLco 低下率は $-0.44 \pm 1.8\text{ml}/\text{min}/\text{mmHg}/\text{年}$ (n = 78) であった。在宅酸素療法は 28% で行われており（表 12）、肺移植症例は 15 例含まれた。

[2] RAGE（図 2）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、線維化の部分はほとんど染まらず、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（図 3）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。

[3] 血漿解析群（57 名）の年齢において、健常喫煙者群は GOLD 1 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 2 群が GOLD 4 群よりも有意に少ない喫煙量

RAGE免疫染色

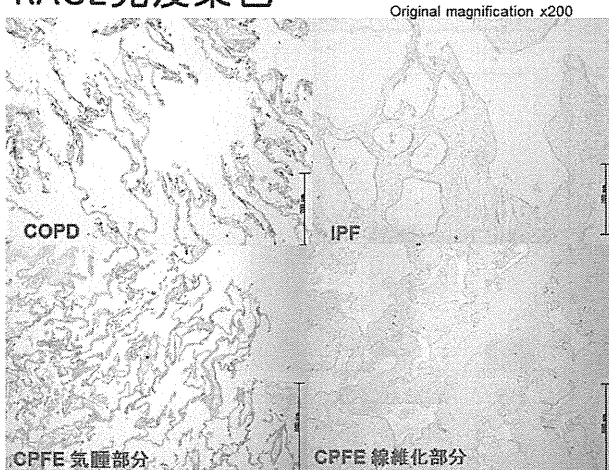


図 2

Egr-1 免疫染色

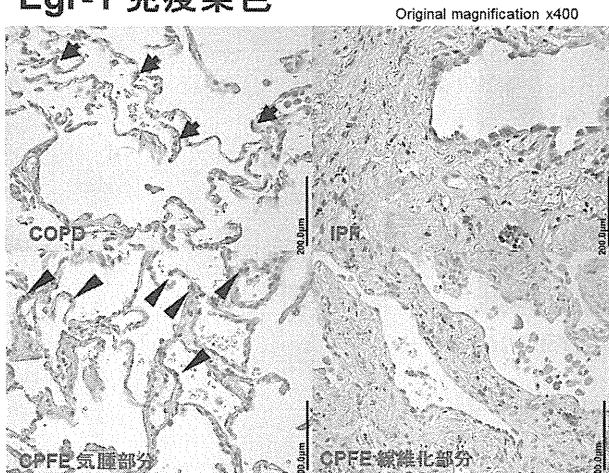


図 3

(Pack-Year) であった (表 13)。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 (表 14)。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 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 4A, B)。血漿中の 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 5)。BAP は両群間で有意な差は見られなかった。健常喫煙者血漿中の dROMs とアクロレインの間には相関関係は見られなかった (図 6A)。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 6B)。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 7A, B)。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 8)。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

表 13. 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 14. 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

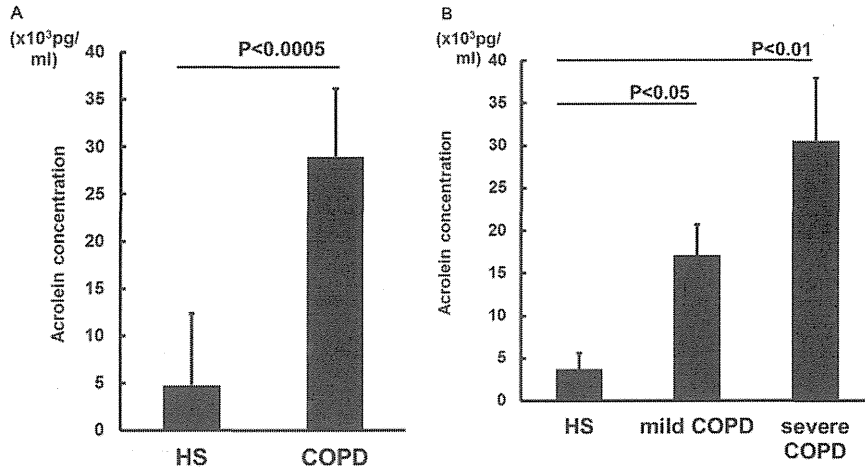


図4. 健常喫煙者と COPD 患者血漿におけるアクロレイン濃度

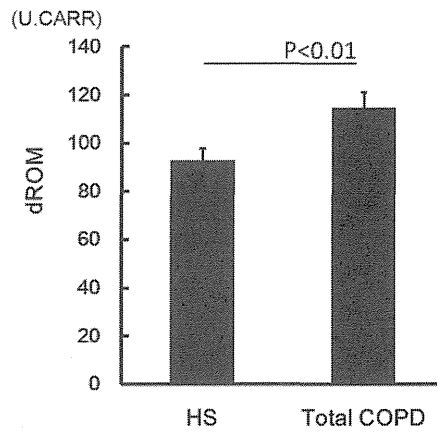


図5. 健常喫煙者と COPD 患者血漿における dROMs

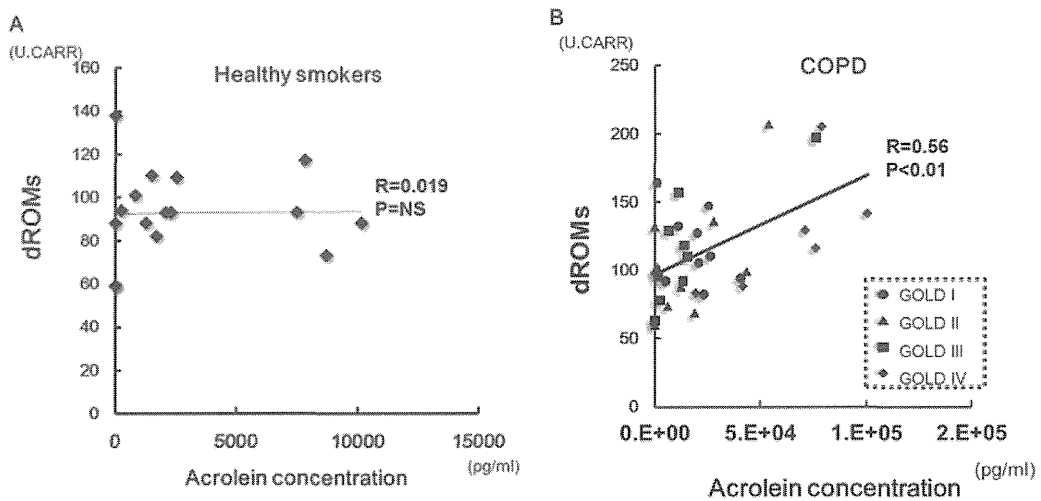


図6. 健常喫煙者, COPD 患者血漿中 dROMs とアクロレインとの関係

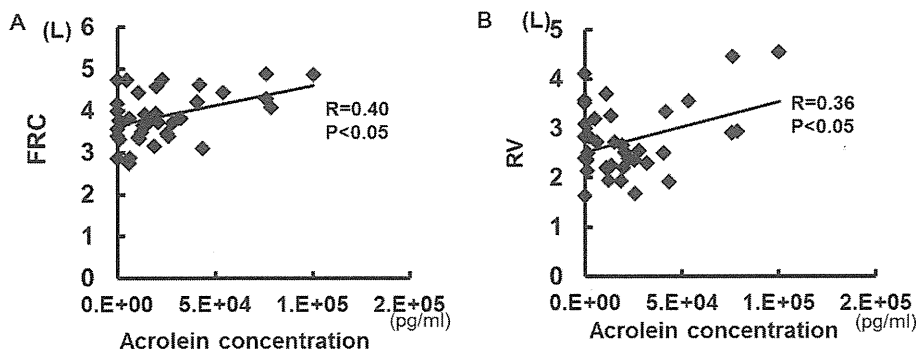


図 7. COPD 患者血漿中アクロレイン濃度と呼吸機能検査との関係

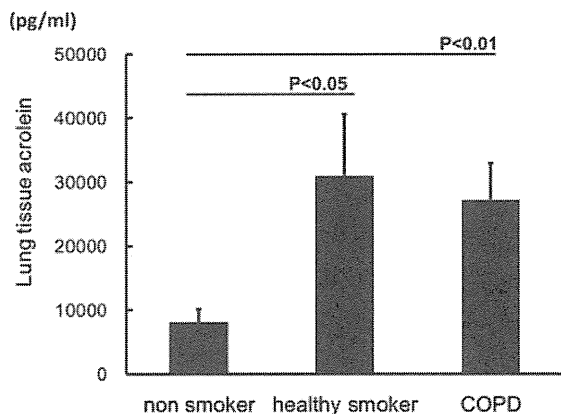


図 8. 肺組織蛋白抽出液中アクロレイン濃度

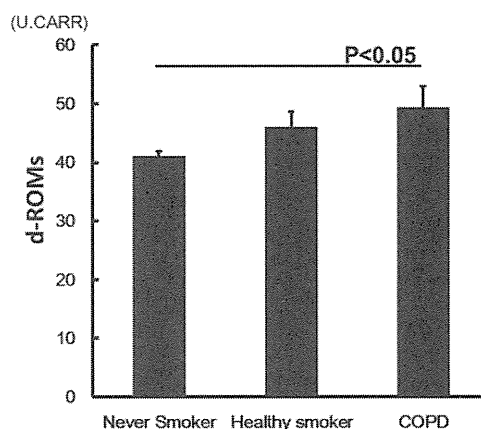


図 9. 肺組織蛋白抽出液中 dROMs

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 9)。肺組織においては dROMs とアクロレインの関係は、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 10A-C)。COPD 患者肺における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では、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 11)。

[4] 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 15)。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 (P

$= 0.0145$)。その他の SNPs では有意差を認めなかった (表 16)。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 17)。一方 major allele C の発現頻度には差を認めなかった。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 18)。

[5] (1) 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