

学位論文題名

# Chemokines in Bronchiolar Epithelium in the Development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

(慢性閉塞性肺疾患の発症機序における末梢気道上皮での  
炎症性ケモカインの発現)

## 学位論文内容の要旨

【背景】慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) は中高年の喫煙者に発症する進行性、不可逆的疾患である。その病態において、末梢気道への炎症細胞浸潤が重要な役割を果たすと考えられている。われわれの気管支肺胞洗浄液を用いた一連の研究から、COPDの発症には、好中球の活性化が関与し、C-X-Cケモカインのひとつである interleukin-8 (IL-8) の多寡がそのひとつの要因であることが示唆されてきた。しかし肺内の IL-8 の産生細胞は多種にわたり、COPDの病態と関連した IL-8 の産生亢進がどの細胞由来であるのかは必ずしも明らかではない。近年開発された laser capture microdissection (LCM) 法は組織標本から顕微鏡下に任意の細胞を採取し、細胞特異的な遺伝子発現の定量的解析を可能にするものである。

【目的】末梢気道上皮および肺内マクロファージにおける IL-8、macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha)、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の3種類の炎症性ケモカイン遺伝子発現と慢性喫煙、COPD発症との関連を明らかにする。

【方法】対象は肺癌の治療目的にて、肺葉切除術を施行された患者30名。術前に喫煙歴の聴取、高分解能CT、呼吸機能検査を施行し、非喫煙者10名、COPDを合併していない喫煙者10名、COPD合併喫煙者10名の3群に分類した。摘出肺の非腫瘍部分の一部を凍結保存した。組織標本を薄切し、末梢気道上皮細胞については、ヘマトキシリン染色を施行した後、LCMを用いて1症例あたり40,000発のレーザー発射にて選択的に採取した。肺マクロファージは抗ヒトCD68抗体を用いて免疫染色した後、1症例あたり30,000発のレーザー発射にて選択的に採取した。また、全肺組織として薄切した組織切片を用いた。その後、IL-8、MIP-1 alpha、MCP-1の遺伝子発現を定量的RT-PCR法にて測定した。各遺伝子発現は内因性コントロールの発現で補正した。さらに、末梢気道上皮細胞における96種類の炎症性ケモカインおよびそれらのレセプターの遺伝子発現をcDNAアレイを用いて網羅的に解析した。

【結果】LCMで採取した末梢気道上皮におけるIL-8の発現は、COPD合併喫煙者群において、非喫煙者群と比較して1.9倍、COPDを合併していない喫煙者群と比較して2.4倍にそれぞれ有意に上昇していた。さらに、MIP-1 alphaの発現はCOPD合併喫煙者群では、COPDを合併していない喫煙者群と比較して2.2倍に有意に上昇していた。MCP-1の発現は、IL-8と同様に、COPD合併喫煙者群において、非喫煙者群と比較して1.7倍、COPDを合併していない喫煙者群と比較して3倍にそれぞれ有意に上昇していた。また、末梢気道上皮におけるIL-8の発現とMCP-1の発現は有意に相関していた。しかし、これらの遺伝子発現と一秒率、肺拡散能、CT上気腫性変化の程度との関係はなく、喫煙歴や禁煙期間とも関連はなかった。肺マクロファージにおいては各群間でIL-8、MIP-1 alpha、MCP-1の発現に有意差は認めなかった。全肺組織においては、MIP-1 alphaの発現のみが、COPD合併喫煙者群において、COPDを合併していない喫煙者群、非喫煙者群と比較し、それぞれ有意に上昇していた。末梢気道上皮を用いたcDNAアレイの検討により、

IL-8 の発現はRT-PCR法の結果と同一であることを確認し、さらに、C-C chemokine receptor 2 (CCR2) の発現がCOPD合併喫煙者群で他群より有意に亢進していることを新たに発見した。MIP-1 alpha、MCP-1 の発現はアレイの検出感度以下であった。

【考察】末梢気道上皮は喫煙等の外来吸入物質の主たる標的細胞であり、肺の防御機構に重要な役割を果たしている。気道上皮細胞は慢性喫煙により形態的および機能的に変化し、末梢気道領域における炎症はほとんどの喫煙者に認められる病理学的所見である。末梢気道における炎症の程度と肺胞破壊の程度が相関するという報告や、気道炎症が肺胞破壊に先行するという報告がある。これらの知見より、肺気腫をはじめとするCOPDの発症初期においては、末梢気道上皮における病態が関与していると考えられる。

COPD合併喫煙者群の末梢気道上皮でのIL-8、MIP-1 alpha、MCP-1 の発現は、COPDを合併していない喫煙者群に比べ有意に亢進していた。末梢気道上皮における炎症性ケモカインの発現亢進は、喫煙による影響ではなく、閉塞性換気障害もしくは気腫性変化の病態に関係していると考えられる。De Boerらはin situ hybridizationや免疫染色を用いて、COPD患者の末梢気道上皮におけるIL-8 産生亢進を報告したが、われわれは、この知見をより定量的手法を用いて支持するものである。また、肺内でのもうひとつの有力な炎症性ケモカインの産生細胞として肺マクロファージに注目し、同組織からLCM法にて肺マクロファージを採取し、各群間で比較検討した。各ケモカイン発現には3群間で有意差は認めなかったが、喫煙により肺内マクロファージ数は増加することから、病態への関与は否定できない。LCM法は特定の細胞集団を選択的に採取し、RT-PCR法と組み合わせることで、注目する遺伝子の発現を定量的に解析することが可能である。さらにcDNAアレイに応用することで、不特定多数の遺伝子を網羅的に解析できることを示した。末梢気道上皮細胞は、長期の喫煙曝露により形態的には様々な変化をきたす。これらの細胞の機能がどのように変化し、COPD発症に至るのかについて、今後さらに分子生物学的に研究を進める必要がある。

今回の検討では、肺における炎症性ケモカインの発現は末梢気道上皮や肺マクロファージなど個々の細胞群によって一様ではないこと、慢性喫煙曝露のみでは、末梢気道上皮や肺マクロファージでの炎症性ケモカイン発現は亢進しないこと、COPD合併喫煙者群の末梢気道上皮では、炎症性ケモカイン発現亢進が認められ、一部の患者では禁煙後も持続していることが明らかにされた。

【結語】COPD 合併喫煙者においては、末梢気道上皮において、炎症性ケモカインである IL-8、MIP-1 alpha、MCP-1 の発現が亢進している。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

### Chemokines in Bronchiolar Epithelium in the Development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

(慢性閉塞性肺疾患の発症機序における末梢気道上皮での  
炎症性ケモカインの発現)

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) は中高年の喫煙者に発症する進行性、不可逆的疾患である。その病態において、末梢気道への炎症細胞浸潤が重要な役割を果たすと考えられている。COPD の発症には、好中球の活性化が関与し、interleukin-8 (IL-8) の多寡がそのひとつの要因であることが示唆されてきた。しかし肺内の IL-8 の産生細胞は多種にわたり、COPD の病態と関連した IL-8 の産生亢進がどの細胞由来であるのかは必ずしも明らかではない。Laser capture microdissection (LCM) 法は組織標本から顕微鏡下に細胞を採取し、細胞特異的な遺伝子発現の定量的解析を可能にした。そこで、末梢気道上皮および肺内マクロファージにおける IL-8、macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 $\alpha$ )、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の 3 種類の炎症性ケモカイン遺伝子発現と慢性喫煙、COPD 発症との関連を明らかにすることを目的とした。対象は肺癌の治療目的にて、肺葉切除術を施行された患者。術前に喫煙歴の聴取、高分解能 CT、呼吸機能検査を施行し、非喫煙者 10 名、COPD を合併していない喫煙者 10 名、COPD 合併喫煙者 10 名の 3 群に分類した。摘出肺の非腫瘍部分の一部を凍結保存した。組織標本を薄切し、末梢気道上皮細胞については、LCM を用いて 1 症例あたり 40,000 発のレーザー発射にて選択的に採取した。肺マクロファージは抗ヒト CD68 抗体を用いて免疫染色した後、1 症例あたり 30,000 発のレーザー発射にて選択的に採取した。また、全肺組織として薄切した組織切片を用いた。その後、IL-8、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて測定した。さらに各群ごとに末梢気道上皮細胞を LCM で採取し、炎症性ケモカインおよびそれらのレセプターの遺伝子発現を cDNA アレイを用いて解析した。

LCM で採取した末梢気道上皮における IL-8 の発現は、COPD 合併喫煙者群に

において、非喫煙者群と比較して1.9倍、COPDを合併していない喫煙者群と比較して2.4倍にそれぞれ有意に上昇していた。さらに、MIP-1 $\alpha$ の発現はCOPD合併喫煙者群では、COPDを合併していない喫煙者群と比較して2.2倍に有意に上昇していた。MCP-1の発現は、IL-8と同様に、COPD合併喫煙者群において、非喫煙者群と比較して1.7倍、COPDを合併していない喫煙者群と比較して3倍にそれぞれ有意に上昇していた。肺マクロファージにおいては各群間でIL-8、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1の発現に有意差は認めなかった。全肺組織においては、MIP-1 $\alpha$ の発現のみが、COPD合併喫煙者群において、非喫煙者群やCOPDを合併していない喫煙者群と比較し、それぞれ有意に上昇していた。cDNAアレイを用いた末梢気道上皮の検討により、IL-8の発現亢進以外にC-C chemokine receptor 2 (CCR2)の発現がCOPD合併喫煙者群で他群より有意に亢進していた。以上より、早期あるいは軽症COPDにおいて、末梢気道上皮でのIL-8、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1の発現亢進が認められた。

審査にあたり、副査近藤教授より、1) これまでにCOPDにおいてLCMを用いた報告の有無、2) cDNAアレイを一例ずつに用いなかった理由、3) 喫煙だけがCOPDの発症要因ではないと考える根拠についての質問があり、副査西村教授より1) 肺胞マクロファージと間質マクロファージの役割の違い、2) 全肺組織の検討でMIP-1 $\alpha$ の有意差を認める意義について、3) COPDの病態におけるマクロファージの役割についての質問があった。主査長嶋教授からは、1) 採取したRNAの品質に関しての確認は行ったか、2) cDNAアレイでMIP-1 $\alpha$ 、MCP-1の発現を認めなかった理由、3) 肺気腫におけるこれまで明らかにされている遺伝子多型について、4) タバコ煙に含まれる直接の毒性因子、4) このような検討を欧米では行っていないか否かについての質問があった。

申請者はこれらの質問に対して、自験データと文献を引用して概ね適切な解答を行った。この論文は、ヒトの細気管支上皮におけるケモカインの発現を定量的に評価し、COPDの病態との関連を世界で初めて明らかにした研究として高く評価され、今後COPDの病態のさらなる解明につながることを期待される。

審査員一同は、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。