

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591139

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患におけるフェノタイプ解析と分子病態解析による新規診断治療法の確立

研究課題名(英文) Study on the molecular and cellular markers associated with clinical phenotype of COPD

研究代表者

中山 勝敏 (NAKAYAMA, KATSUTOSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40321989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)の表現型として特に臨床的に重要な「肺機能急速減衰」と「増悪難治化」の表現型に關与する分子細胞因子を検討した。肺機能急速減衰は全身性炎症指標のTNF- α 値が初期の低値から高値へ増高する際におこりやすく、増悪難治化は増悪の引金が宿主常在GNRである場合におこりやすいことが示された。さらに、COPD、喘息(BA)、両者合併(ACOS)における「全身性炎症」と「酸化ストレス」について検討した。その結果、全身性炎症は喫煙病態をもつCOPD/ACOSがBAに比して強く、また酸化ストレスは抗酸化能がCOPDで極端に低下しているためBA/ACOSに比して亢進していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We studied the molecular and cellular markers associated with important clinical phenotypes of chronic pulmonary disease (COPD), “rapid decline of pulmonary function” and “refractory exacerbation of COPD”. As the results, rapid decline is associated with expansion of systemic inflammation with serum TNF- α level elevation. Refractory exacerbation of COPD is associated with triggering infection with enteric or non-fermenting Gram negative rods. Furthermore, we evaluated systemic inflammation and oxidative stress among COPD, bronchial asthma (BA), and overlap of them (ACOS). Systemic inflammation is significantly higher in COPD/ACOS than BA, because of smoking-induced pathogenesis. Oxidative stress is significantly higher in COPD than BA/ACOS, because of reduction of anti-oxidative activity in COPD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 フェノタイプ 肺機能急速減衰 難治化増悪 全身性炎症 酸化ストレス 喘息COPDオーバーラップ症候群

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、喫煙を主因とし気道炎症から進行性の気流制限を呈する病態である。これまで我々は、ヒト手術検体を用いた細胞レベルの検討や当院外来 COPD 患者のコホート研究を行ってきた。これらを発展させ、COPD 増悪や肺機能減衰に関連する臨床表現型と血液や喀痰サンプル由来の分子細胞レベルの表現型との関連を検討することが課題である。

臨床表現型の中でも、予後および医療資源消費に対する重大性から、急速に肺機能が低下する表現型、および COPD 増悪の重症化・難治化の表現型は特に重要であると考えられる。そこで、解析対象の COPD 臨床的表現型として「肺機能急速減衰」、「COPD 増悪の重症化・難治化」を選択した。これらに関する分子細胞因子の評価は、特に研究期間の前半において精力的に検討した。一方、研究期間中に COPD が単一でない症候群であり、その中でも気管支喘息(BA)コンポーネントの合併患者(ACOS)の臨床表現型が重要であることが COPD および BA の国際ガイドラインにも取り上げられた。こうして、COPD、BA、ACOS の臨床表現型のリスク評価が新たな研究課題として浮上してきた。そこで、研究期間の後半においては、COPD、BA、ACOS における「全身性炎症」と「酸化ストレス」の状態について検討した。

2. 研究の目的

1) COPD 患者における肺機能急速減衰の表現型に関する因子の検討(特に TNF- α 値の意義)

2) COPD 増悪重症化・難治化の表現型に関する因子の検討。

3) COPD、BA、ACOS における全身性炎症と酸化ストレスの表現型に関する研究。

3. 研究の方法

当院呼吸器内科を受診している COPD 患者に関して、肺機能、喘息合併の有無、各種分子細胞指標(全身性炎症指標、酸化ストレス指標、栄養指標)を収集し、前向きにフォローした。年 1 回肺機能および各種指標をチェックし、肺機能の減衰、増悪の発現を検討した。増悪をおこした患者に対しては、喀痰・鼻咽頭スワブを採取し、Multiplex Real-time PCR (細菌 6 種、ウイルス 11 種)および培養等従来法により起因微生物を検討した。以上により COPD 患者における肺機能急速減衰の表現型に関する因子と COPD 増悪重症化・難治化の表現型に関する因子を検討した。また、新たに気管支喘息患者(BA)をリクルートし、COPD および BA 患者の中から両者の合併(ACOS)患者を同定し、COPD、BA、ACOS の各群における全身性炎症指標(WBC、CRP)、酸化ストレス指標(8OHdG、HO-1)を測定することで、3 者における全身性炎症と酸化ストレスの表現型の違いを検討した。

4. 研究成果

1) 肺機能急速減衰の表現型に関する因子としての TNF- α 低値のメカニズムの解析。

我々は、COPD の全身炎症と予後に関する以前の解析において、肺機能急速減衰の関与分子細胞指標として、LAMA(チオトロピウム)の使用と TNF- α の低値を検出した。そこでは、当院呼吸器内科を受診中の COPD 患者 45 名について、肺機能の減衰と各種因子(年齢、性別、肺機能の他、BMI、喫煙指標、治療薬、併存症、TNF- α 、hrCRP、8-OHdG/Cr)を調査した。FEV1 の年間減少量が 60mL 以上の場合を肺機能急速減衰と定義し、そのリスク因子について多変量解析を行った(肺機能急速減衰群 15 名 vs 非肺機能急速減衰群 30 名)。肺機能急速減衰の表現型に関する因子としては LAMA 使用が OR= 0.095 (95%CI= 0.012- 0.725) P=0.023、TNF- α 初期値 <1.0pg/mL であることが OR=20.8 (95%CI= 1.77- 250.0) P=0.016 と有意であった。TNF- α 値は全身炎症の指標でもあることから、今回はさらに TNF- α 値が肺機能急速減衰の表現型に関する意義について検討した。肺機能急速減衰群、非肺機能急速減衰群に関して TNF- α の初期値と 1 年後値、および健康喫煙者の初期値を評価した(図 1)。

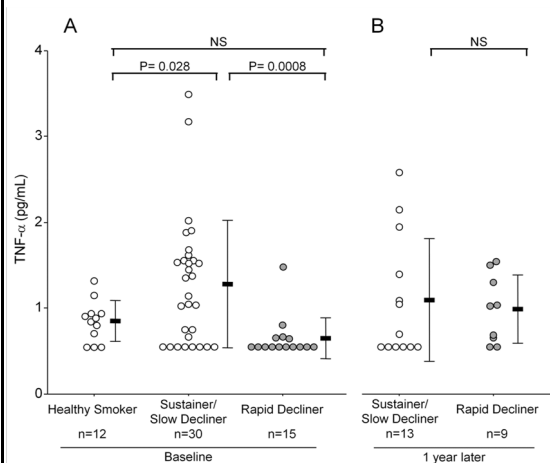


図1. 肺機能早期減衰群および非肺機能早期減衰群におけるTNF- α の初期(A)と1年後(B)値の変化

その結果、肺機能急速減衰群は TNF- α 初期値は低値であるが、1 年後には高値となっており、将に全身性炎症が発現しようとしている状態であると考えられた。すなわち、全身性炎症が将に発現する時に肺機能の急速減衰が起こる可能性が示唆された。全身性炎症が顕在化していない COPD 患者に LAMA の治療介入をすることで、肺機能急速減衰を回避できる可能性が示唆されたと云える。これは COPD の治療戦略の策定する上において、重要な事象であると云える。

2) COPD 増悪重症化・難治化の表現型に関する因子の検討。

COPDの臨床表現型の中でも増悪は、予後および医療コストの観点からも重要である。我々は、COPD増悪の重症化・難治度を規定するリスク因子を検討した。分子細胞マーカーとしては、炎症(WBC, CRP)、栄養(Alb)、に加えて、遺伝子レベルで検索した増悪原因微生物(ウイルス、細菌等)とした。増悪の多くが、ウイルスや細菌感染を引き金にすることから、増悪重症・難治の表現型を検討する分子細胞因子としては、宿主の因子のみならず、その引き金となった病原体を検討することが必須と考えられた。

増悪に絞った解析を行うため、今回はCOPD増悪により受診した患者50名を対象とし(2012年8月から1年)、受診時に鼻咽頭スワブと喀痰を用いて Multiplex Real-time PCR(細菌6種、ウイルス11種)および培養等従来法により起因微生物を検討した。次に、重症増悪(死亡、ICU入室、人工呼吸器装着)および難治性増悪(死亡、2週間を超えた入院)と各種因子(年齢、性別、肺機能の他、HOT使用、WBC、CRP、Alb、起因微生物等)との関連を多変量解析にて検討した。

結果、COPD増悪例は50症例(男47例)、平均年齢76.4歳、起因微生物の同定は43例(86%)で行われ、ウイルスの関与は16例(33%)に認められた。検出微生物中では、*S.pneumoniae*、*H.influenzae*、Influenza virusの順に多く認められたが、*Paeruginosa*や*S.aureus*なども検出された。また増悪の程度としては、重症増悪が9例、難治性増悪は20例であった。

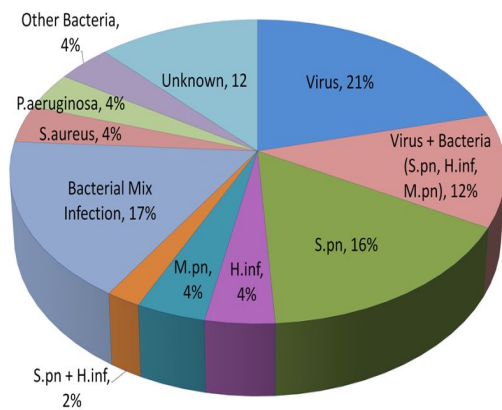


図2. COPD増悪時の検出微生物・Multiplex PCR, 従来法

これに対する多変量解析の結果、重症増悪に対する有意なリスク要因は認められなかった。一方、難治性増悪に対しては、HOT使用(重度呼吸不全の存在)がOR=6.23(95%CI=1.51-25.78)P=0.01、喀痰からの*Paeruginosa*や腸内細菌等GNRの検出(Entero/NF-GNR)がOR=5.25(95%CI=1.06-26.03)P=0.042で有意な因子であった(表1)。

Variable	Logistic Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	p-value
Age ≥ 75y	1.06 (0.26 - 4.28)	0.940
Male gender	1.30 (0.03 - 57.59)	0.892
Albumln <3.5 mg/dl	0.90 (0.22 - 3.73)	0.883
WBC >10,000/μl	1.55 (0.39 - 6.13)	0.534
HOT	6.23 (1.51 - 25.78)	0.012
Entero/NF-GNR	5.25 (1.06 - 26.03)	0.042

* Logistic multivariate analysis performed using age, male gender, Albumin, HOT, WBC, and Enter/NF-GNR

表1. COPD増悪による入院長期化に及ぼす因子 - 多変量解析 -

これらGNRは安定時の喀痰からも検出されており、宿主に常在していると考えられる。一方、*S.pneumoniae*、*H.influenzae*、*Mycoplasma*等は宿主に常在しているものではなく、主に外来性/一過性の微生物と定義できる。そこで、ウイルス以外の起因病原微生物によるCOPD増悪の入院期間をその平均値の短い方から順に並べてみると(図2)、全入院期間の平均約2週間を狭間として、外来微生物群の増悪がより入院期間が短く、内在微生物群の増悪がより長く分布することが分かる(図2)。

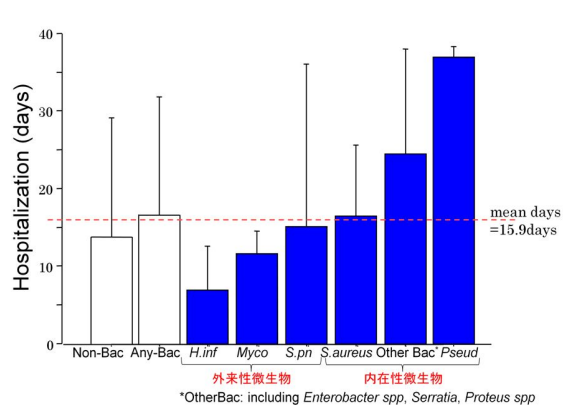


図2. 菌種別に見たCOPD増悪による入院期間

以上から、重症呼吸不全の存在と下気道のGNR常在はCOPD増悪の際に難治化する要因として重要と考えられる。安定期のCOPD患者の喀痰中の常在菌を検討し、陽性患者に対して気管支拡張薬や喀痰調整薬、ネブライザー等により気道のクリアランスのアップを図ることは増悪の難治化の予防に重要と考えられる。

3) COPD、気管支喘息(BA)、両者合併(ACOS)の全身性炎症と酸化ストレスの表現型に関する研究。

近年、COPDと気管支喘息(BA)の合併症(ACOS)が重要な臨床表現型として、強調されるようになった。全COPDの中で、ACOSの割合は30~50%に達するとも云われ、実臨床において積極的に考慮すべき病態である。COPDの発症、増悪には、喫煙による酸化ストレスの存在が重要とされる。本研究では、

分子細胞表現型と臨床表現型の関連を検討することが課題であり、今回は、COPD、BA、ACOS の各群における全身性炎症および酸化ストレスに関する分子細胞レベルの表現型を検討した。

当院通院中の COPD、BA、ACOS と診断されている安定状態の患者 59 名(各 17/30/12)に対し、全身炎症指標(WBC、CRP)、酸化ストレス指標(8OHdG/Cr、HO-1)を検討した。COPD、BA、ACOS の全身炎症指標においては、WBC は各 $7,200 \pm 1,700$ 、 $5,300 \pm 1,100$ 、 $6,280 \pm 1,400$ (COPD vs BA、 $p < 0.05$)であり、CRP は各 0.065 ± 0.06 、 0.045 ± 0.06 、 0.120 ± 0.08 (ACOS vs BA、 $p < 0.05$)であった。喫煙刺激により肺病変をもつ COPD、ACOS では喫煙刺激のない BA に比して全身炎症が強いことが示された(図 3)。

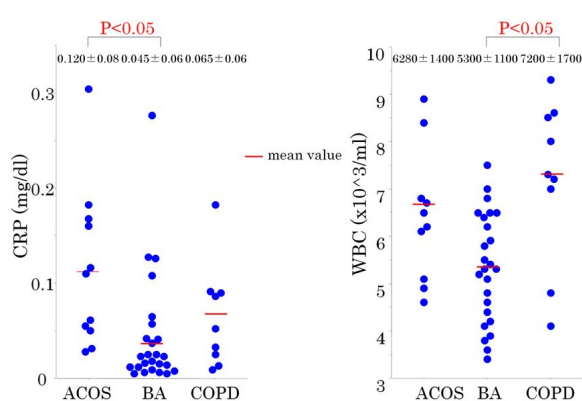


図3. 炎症分子細胞指標-WBC, CRP

一方、酸化ストレス指標においては、8OHdG/Cr は酸化ストレス高値群の割合が各 36.4%、28.0%、36.4% (COPD vs BA、 $p < 0.02$)であり、抗酸化酵素 HO-1 は各 0.09 ± 0.01 、 0.11 ± 0.03 、 0.11 ± 0.04 (COPD vs BA、 $p < 0.05$)であった。特に、HO-1 に関しては、高抗酸化能群の割合が各 0.0%、36.0%、41.7%であり、酸化ストレスは COPD 単独群で特に高く、その分子細胞表現型としては、抗酸化能が BA、ACOS に比して極端に低下していることが示された(図 4)。

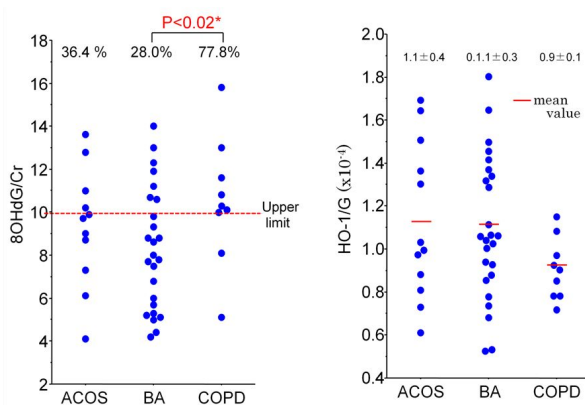


図4. 酸化ストレス分子細胞指標-8OHdG/Cr, HO-1

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 29 件)

英文

1. Ito S, Nakayama K, et al. (21 人中 20 番目) PARK2-mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis. *Autophagy*. (査読有) 2015; 11: 547-59. doi: 10.1080/15548627.2015.1017190.
2. Kaneko Y, Nakayama K, et al. (12 人中 2 番目) Relation between recurrence of tuberculosis and transitional changes in IFN- γ release assays. *Am J Respir Crit Care Med*. (査読有) 2015; 191: 480-3. doi: 10.1164/rccm.201409-1590LE.
3. Saito N, Nakayama K, et al. (6 人中 5 番目) A survival case of invasive thymoma accompanied by acute fulminant myocarditis. *Respirol Case Rep*. (査読有) 2013; 1: 36-8. doi: 10.1002/rccr.2.6.
4. Yoshii Y, Nakayama K, et al. (15 人中 14 番目) Lung adenocarcinoma complicated by Trousseau's syndrome successfully treated by a combination of anti-coagulant therapy and chemotherapy. *Intern Med*. (査読有) 2014; 53: 1835-9. PMID: 25130121.
5. Takasaka N, Nakayama K, et al. (24 人中 23 番目) Autophagy induction by SIRT6 through attenuation of insulin-like growth factor signaling is involved in the regulation of human bronchial epithelial cell senescence. *J Immunol* (査読有) 2014; 192: 958-68. doi: 10.4049/jimmunol.1302341.
6. Araya J, Nakayama K, et al. (19 人中 18 番目) Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (査読有) 2013; 304: L56-L69. doi: 10.1152/ajplung.00213.2012.
7. Kojima J, Nakayama K, et al. (23 人中 22 番目) Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression in alveolar macrophages in COPD. *Respir Res* (査読有) 2013; 14: 30. doi: 10.1186/1465-9921-14-30.
8. Hara H, Nakayama K, et al. (8 人中 7 番目) Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence. (17 人中 16 番目) *Am J of Physiol Lung Cell Mol Physiol* (査読有) 2013; 305: L737-46. doi: 10.1152/ajplung.00146.2013.
9. Kadota T, Nakayama K, et al. (8 人中 6 番目) Organizing pneumonia complicated by cyst and pneumothorax formation. *Intern Med*. (査読有) 2012;

- 51: 3155-8. PMID: 23154723.
10. Fujii S, Nakayama K, et al. (17 人中 16 番目) Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *OncoImmunology* (査読有) 2012; 1: 630-41. PMID: 22934255.
 11. Hara H, Nakayama K, et al. (17 人中 16 番目) Involvement of creatine kinase B in cigarette smoke induced-bronchial epithelial cell senescence. *Am J Respir Cell and Mol Biol* (査読有) 2012; 46: 306-12. 61. doi: 10.1165/rcmb.2011-0214 OC.
- 邦文
12. 高坂直樹, 中山勝敏, 他. (13 人中 12 番目) SIRT6 によるオートファジー制御と気道上皮細胞老化. *分子呼吸病学* (査読無) 2015; 73: 446-454.
 13. 中山勝敏, 清水健一郎, 小島淳, 桑野和善. 【特集 COPD を改めて問う】 治療: 気管支拡張薬の限界. *THE LUNG-perspectives* (査読無) 2014; 22: 136-143
 14. 小島淳, 中山勝敏, 他. (15 人中 12 番目) 慢性閉塞性肺疾患の肺胞マクロファージにおける AIM の発現. (査読無) *分子呼吸器病学* 2014; 18: 163-165.
 15. 金子由美, 橋本典生, 中山勝敏, 桑野和善. 中等症/重症の COPD 患者に対するブデソニド/ホルメテロール配合剤の上乗せあるいは変更が有効であった 3 症例の経験. *呼吸* (査読有) 2014; 33: 1162-1166
 16. 小島淳, 河石真, 荒屋潤, 中山勝敏, 桑野和善. 治療薬剤選択に難渋した慢性壊死性肺アスペルギルス症の 1 例. *日本胸部臨床* (査読有) 2014; 73: 446-54
 17. 小島淳, 中山勝敏, 桑野和善. 【特集 すぐ役立つ呼吸器薬の標準的使い方】 COPDz 増悪期の治療. *Medicina* (査読無) 2014; 51: 1854-57
 18. 桑野和善, 中山勝敏, 荒屋潤. 肺の気種化と線維化. *呼吸* (査読無) 2014; 33: 346-352.
 19. 清水健一郎, 中山勝敏, 他. (31 人中 27 番目) 治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎を合併した Clinically amyopathic dermatomyositis (CADM) の 1 剖検例. *慈恵医大誌* (査読無) 2014; 129: 11-7.
 20. 中山勝敏, 荒屋潤, 河石真, 桑野和善. 【特集 呼吸器疾患の増悪を考える】 増悪時の呼吸機能変化. *THE LUNG-perspectives* (査読無) 2013; 21: 229-236.
 21. 原弘道, 中山勝敏, 他. (12 人中 11 番目) 喫煙による細胞老化におけるクレアチニンキナーゼ(CK)B の役割. *分子呼吸器病学* (査読無) 2013; 17: 130-132.
 22. 中山勝敏, 原弘道, 荒屋潤, 桑野和善. 呼吸器疾患とオートファジー. *呼吸* 2012; 31: 427-432.
 23. 荒屋潤, 中山勝敏, 他. (8 人中 7 番目) 喫煙による気道上皮細胞老化亢進のオートファジーによる制御. *臨床呼吸生理* 2012; 44: 61-63.
 24. 沼田尊功, 中山勝敏, 他. (14 人中 13 番目) Double strand-RNA による気道上皮細胞のアポトーシスとインスリンによる制御. *分子呼吸器病* 2012; 16: 140-2.
 25. 高坂直樹, 中山勝敏, 他. (12 人中 11 番目) 迅速抗原検査陰性のパンデミック(H1N1) 2009 重症肺炎の 1 例. *日本胸部臨床* (査読有) 2012; 71: 813-7.
- 〔学会発表〕(計 48 件)
1. Nakayama K. [Special Lecture]: Molecular mechanism and clinical conditions in COPD cigarette smoke-induced cellular senescence and autophagy. *Autum Congress of Korea Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease (KATRD)*. Seol, Nov 2013
 2. Ishikawa T, Nakayama K, Mikami J, Ito S, Takasaka N, Yumino Y, Fujii S, Tsurushige C, Kojima J, Numata T, Hara H, Kawaishi M, Araya J, Kuwano K. The involvement of thrombospondin-1 in COPD oathogenesis through IL-8 production. *European Respiratory Society Annual Congress 2013*. Barcelona, September 2013.
 3. Nakayama K, Yumino Y, Mikami J, Ishikawa T, Ito S, Takasaka N, Fujii S, Tsurushige C, Kojima J, Hara H, Numata T, Shimizu K, Kawaishi M, Saito K, Araya J, Kuwano K. The effect of comorbidity, systemic inflammation, and oxidative stress on the prognosis in COPD patients. *American Thoracic Society 2012 International Conference*. San Francisco, May 2012.
 4. Ishikawa T, Nakayama K, Mikami J, Ito S, Takasaka N, Yumino Y, Fujii S, Tsurushige C, Kojima J, Numata T, Hara H, Kawaishi M, Araya J, Jung B, Schneider FJ, Runggaldier D, Sugimoto T, Kono T, Encinas J, Kuwano K. Correlation between thrombospondin-1 and pulmonary function after long-term cigarette smoke exposure. *American Thoracic Society 2012 International Conference*. San Francisco, May 2012.
 5. Araya J, Ito S, Takasaka N, Hara H, Fujii S, Tsurushige C, Kojima J, Shimizu K, Numata T, Ishikawa T, Kawaishi M, Saito K, Nakayama K, Kuwano K. Cellular senescence with insufficient autophagy of metaplastic epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Thoracic Society*

2012 International Conference. San Francisco, May 2012.

6. 中山勝敏. [招待講演] COPDにおけるオートファジー. 東京呼吸器疾患懇話会. 東京, 2014年7月
7. 中山勝敏. [Web 講演] 見落とされがちな COPD 増悪とその治療戦略. COPD Web 講演会. CareNet.com, 2014年6月.
8. 中山勝敏. COPD の増悪. 第 53 回臨床呼吸機能講習会 (日本呼吸器学会主催). 東京, 2013年8月34.
9. 中山勝敏. [シンポジウム] COPD の治療戦略について. シムピコート Premium Live Symposium 2013. 東京, 2013年8月.
10. 中山勝敏. [シンポジウム] COPD の増悪. Scientific Exchange Meeting~呼吸器疾患の増悪を考える~. 札幌, 2013年11月.
11. 中山勝敏, 弓野陽子, 三上慈郎, 伊藤三郎, 高坂直樹, 鶴重千加子, 藤井さと子, 小島淳, 石川威夫, 沼田尊功, 原弘道, 清水健一郎, 河石真, 齊藤桂介, 荒屋潤, 桑野和善. 当院における COPD 併存症に関する前向き研究. 第 52 回日本呼吸器医学会学術講演会. 神戸, 2012年4月.
12. 中山勝敏. [班会議] 高齢者の呼吸器系感染防御に寄与する要因とそれに基づく治療戦略の策定に関する研究. 平成 23 年度厚生労働省長寿医療研究開発事業 22 -11 研究班 班会議. 府, 2012年2月.

〔図書〕(計 件)

1. 中山勝敏. 診断の進歩 COPD のクラスター分類(病型分類). Annual Review 呼吸器 2013, 中外医学社, 東京, 2013:163-176. (ISBN: 978-4-498-13009-8)

2.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 勝敏 (Nakayama Katsutoshi)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：4 0 3 2 1 9 8 9

(2)連携研究者

石川 威夫 (Ishikawa Takeo)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：6 0 3 6 6 2 0 0

(3)連携研究者

荒屋 潤 (Araya Jun)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：9 0 4 6 8 6 7 9