

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592076

研究課題名(和文) 周術期肺傷害における RAGE の役割の研究

研究課題名(英文) Role of RAGE in peri-operative lung injury

研究代表者

佐久間 勉 (SAKUMA, Tsutomu)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90215674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：ヒト切除肺を用いて研究した。慢性閉塞性肺疾患(COPD)ではI型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおけるRAGE(Receptor for advanced glycation end-products)の発現は有意に高く、1秒率と負の相関を認めた。細気管支粘膜上皮細胞では有意な差異は認めず、さらにRAGE発現と喫煙指数、%肺活量との相関はなかった。原発性肺癌でのRAGEの発現は腺癌では分化度、粘液産生能、病期の進行との関連も示唆された。粘液非産生性腺癌の癌進展へのRAGEの関与と、リガンドとしてAGEsの関与が示唆された。ラット肺ではPPAR- γ は肺胞水分クリアランスを低下させる。

研究成果の概要(英文)：The expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) was examined in the excised human lungs. The expression of type 1 alveolar cells and alveolar macrophage increased in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The expression was correlated negatively with forced expiratory volume in one second. RAGE expression was not associated with smoking index. In lung cancer, RAGE was highly expressed in both small cell lung cancer and adenocarcinoma. Less differentiated adenocarcinoma expressed RAGE more frequently than well differentiated adenocarcinoma. The enhanced expression of RAGE was present in non-mucinous adenocarcinoma. Adenocarcinoma in the advanced stages tended to show a higher expression score for RAGE. The expression of RAGE inversely correlated with that of AGEs, although it did not show any relationship with the expression of HMGB-1 or S100A4. In rat lung, PPAR- γ impaired alveolar fluid clearance probably through amiloride-sensitive sodium channel.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：RAGE 肺傷害 肺癌 慢性閉塞性肺疾患 周術期 肺胞水分クリアランス PPAR 肺水腫

1. 研究開始当初の背景

申請者らは肺胞水分再吸収(肺胞水分クリアランス)を活性化することが急性肺傷害の回復を早めることを報告してきた。その研究中にヒト切除肺の肺胞液中に Receptor for advanced glycation end-products (RAGE)が多量に存在することを確認した。そこで肺に最も多く存在する RAGE は周術期肺傷害に関与するとの仮説をたて、今回の研究を計画した。

RAGE と肺傷害に関するこれまでの報告(Uchida T et al, Am J Respir Crit Care Med 2006、Stemberg DI et al, J Thorac Cardiovasc Surg 2008、Chrestie JD et al, Am J Respir Crit Care Med 2009)では、RAGE はげっ歯類の肺傷害急性期には関与する。敗血症などで集中治療室に入院した患者で RAGE が肺傷害により上昇する。しかし、申請者らが研究してきた急性期から回復期にわたる役割は不明であり、ヒト肺を用いた研究報告は全くない。

また、近年インスリン抵抗性改善薬とも呼ばれるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR-) 作働薬の塩酸ピオグリタゾン は体内水分調整に関与し、周術期管理に影響するおそれがあるが、肺での作用や RAGE との関連は不明である。

2. 研究の目的

ヒト疾患肺における RAGE の発現を研究する。RAGE は advanced glycation end-products (AGEs) の細胞膜受容体の 1 つで、糖尿病など生活習慣病の進展に重要な役割を演じている。さらに、RAGE が AGEs、HMGB-1、S100A4 などの癌細胞の複数のリガンドを認識し、MAPK や NF- κ B などの活性化を介して癌細胞の増殖・浸潤・転移に関わるとされている。ヒト腫瘍組織における解析により、RAGE 発現と癌の進展・予後との関与が報告されているが、未解明の問題は多い。肺は他の臓器と比較し RAGE が高発現している。しかし、その生理学的役

割は不明で、原発性肺癌における発現の報告は少ない。

本研究の第 1 目的は、原発性肺癌 127 例の組織アレイを用いて RAGE の発現を免疫組織学的に検討して、組織亜型、病期ならびに生命予後との関連を解析し、原発性肺癌における RAGE 発現の意義を明らかにすることである。さらに、肺癌組織における RAGE のリガンドを明らかにするために、RAGE の発現と AGEs、HMGB-1 ならびに S100A4 の発現との関連性を研究した。

慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) はタバコ煙等の有害物質を長期間吸入暴露することで生じる肺の慢性炎症性疾患で、進行性の不可逆的閉塞性換気障害で定義される。Receptor for advanced glycation end products (RAGE) は、炎症を惹起・増幅すると考えられている。慢性炎症肺での RAGE の発現は報告されるが、その機能、肺疾患における意義は不明である。そこで第 2 目的はヒト肺組織における RAGE 蛋白の発現解析により、その COPD の発症と進展における関与の解明を目指した。

また糖尿病における RAGE の関与が報告されている。しかし、糖尿病における RAGE とピオグリタゾンの関係は全く不明である。RAGE の基礎的研究として PPAR- が肺胞上皮細胞機能の肺胞水分クリアランスに及ぼす影響を明らかにし、RAGE との関係を研究した。

3. 研究の方法

(1) 2001~2010年に金沢医科大学呼吸器外科切除を行った原発性肺癌127例の肺癌腫瘍組織を用いた。10%緩衝ホルマリン固定・パラフィン包埋標本から組織スライダルアレイを作製し、RAGE、AGEs、HMGB-1、S100A4の免疫染色を施行した。発現解析とそれらの相互関係および臨床病理学的因子(組織型・組織亜型・病期・分化度・予後)との関連を検討した。免疫染色にはストレプトアビジン・ピオ

チン法を用い、1次抗体はヤギ抗RAGEポリクローナル抗体(RAGE001-050、Biologo社)、ウサギ抗AGEsポリクローナル抗体(ab23722、Abcam社)、ウサギ抗HMGB-1ポリクローナル抗体(ab18256、Abcam社)、ウサギ抗S100A4モノクローナル抗体(ab124805、Abcam社)を使用し、マイクロウェーブによる抗原賦活を行った。

(2) 2010-2012年に金沢医科大学呼吸器外科で手術を施行した1秒率<70%のCOPDを有する38症例および1秒率70%のCOPDを有さない37症例を研究対象とした。気管支喘息および耐糖能障害を有する患者は除外した。外科的切除された、ホルマリン固定・パラフィン包埋肺組織を用いた。免疫組織学的検討としてピオチン・ストレプトアビジン法を用いた。実験は室温でほぼ同じ条件で行った。一次抗体としてヒトRAGE蛋白のアミノ酸配列42-59に対するヤギ抗RAGEポリクローナル抗体(RAGE 001-050, Biologo, 希釈濃度 1/1600)を使用した。抗原賦活にはマイクロウェーブを用い、一次抗体滴下後4でovernight後、PBSで十分洗浄し、二次抗体と反応させた。1症例に対し型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージに関し代表的部位各々3視野を患者背景を知らされていない病理医が対物レンズ40倍で撮影した。抗体の特異性の確認のため、正常肺ならびに肺癌新鮮凍結組織を検体としWestern blot法を行った。I型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージにおける発現を半定量解析し、年齢・性、慢性閉塞性換気障害、1秒率、%肺活量、喫煙指数との関係を検討した。

(3) ラット肺での研究。SDラット肺を摘出し、等張性の5%アルブミン液8ml/kgを気道内に注入し、37に1時間保持した。その後、注入液を採取して、アルブミン濃度を測定し、アルブミン濃度の変化より肺胞水分クリアランスを計算した。ピオグリタゾン(PPAR-刺激薬)、GW9662(PPAR-阻害薬)、アミロ

ライド(ナロチウムチャンネル阻害薬)、テルブタリン(2-交感神経刺激薬)の効果を研究した。

4. 研究成果

肺癌での成果：肺癌127例中30例(23.6%)にRAGEの発現を認めた。組織型別解析では、扁平上皮癌(2/21、9.5%)と比較し腺癌(25/103、24.3%)および小細胞癌(3/3、100%)で高い発現率を認めた($p<0.05$)。腺癌症例では、中・低分化肺癌が高分化肺癌より有意に高い発現を認めた(14/39、35.9%対11/64、17.2%、 $p<0.05$)。スコアリング結果の解析では、粘液非産生型腺癌は粘液産生型腺癌と比べ高い発現スコアを認めた(2.77対1.63、 $p<0.05$)。また、腺癌のIB期以上の症例はIA期と比較し発現スコアが高い傾向があった(2.88対2.24、 $p=0.09$)。AGEsの発現を127例中47例(37.0%)に認めた。組織型別では腺癌での発現率(44/103、42.7%)が、扁平上皮癌(3/21、14.3%)および小細胞癌(0/3、0%)での発現率と比べ高かった

($p<0.05$)。腺癌の分化度や病期との間には有意差は認めなかった。HMGB-1は94例(74.8%)に陽性所見を認めた。組織型別では扁平上皮癌(20/21、95.2%)および小細胞癌(3/3、100%)は腺癌における発現頻度(71/103、68.9%)と比べ高かった($p<0.05$)。腺癌の分化度や病期との間には有意差は認めなかった。S100A4は46例(36.2%)で陽性所見を認めた。組織型、腺癌の分化度や病期との有意な関連性は認めなかった。RAGEの発現と3種のリガンドの発現との相関では、RAGEとAGEsの発現には逆相関の関係を認めたが($p<0.05$)、RAGEとHMGB-1間およびRAGEとS100A4間では有意な相関を認めなかった。RAGEと3種類のリガンドの単独発現ならびに共発現と生命予後との関連を、全症例での解析に加え、組織型別ならびに進行度別の解析を行うと、期腺癌においてAGEs陽性例が有意ではないが予後良好な傾向を示した。全症例、I期腺癌ならびにそれ以外のサブグループでの検討において予後との

有意な関連は得られなかった。今回の研究には、原発性肺癌組織でのRAGE発現は組織型により異なる。特に腺癌においては粘液産生性に影響を受け、分化度が低いほど、病期が進行するほど発現率が上昇した。これらの結果は粘液非産生性腺癌の進展へのRAGEの関与が示唆され、リガンドとしてAGEsの発現が関与している可能性が示唆された。

COPDでの成果：I型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおけるRAGEの発現は、対照群と比較しCOPD群で有意に高く、1秒率と負の相関を認めた。細気管支粘膜上皮細胞では両群間に有意な差異は認めず、さらにRAGE発現と喫煙指数、%肺活量との関連はいずれの細胞群でもみられなかった。肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージで発現されるRAGEがCOPDの発症と進行に関わる可能性が示された。さらにこれらRAGEの発現亢進は喫煙による直接作用ではなく別経路の可能性も示唆され、RAGEはCOPD進行の制御に向けた新たな標的分子となる可能性が示唆された。

ラットでの成果： 10^{-3} - 10^{-4} M ピオグリタゾン (n=8)により肺胞水分クリアランスは22%減少した。 10^{-3} M GW9662によりピオグリタゾン効果は消失した(n=8)。GW9662単独では肺胞クリアランスは効果がなかった。 10^{-5} M アミロライドを追加することにより、肺胞水分クリアランスは68%減少し(n=4)、 10^{-5} M テルブタリンの追加により肺胞水分クリアランスは62%増加した(n=4)。PPAR- 刺激薬により肺胞水分クリアランスは減少することが示唆された。また、交感神経受容体の機能は維持されることが示唆された。糖尿病患者におけるピオグリタゾンの副作用である全身浮腫においては、肺での水分バランスに異常をきたしている可能性があり、その場合に肺胞水分クリアランスが減少していることが示唆された。糖尿病ではRAGEの関与が報告されており、糖尿病におけるRAGEとピオグリタゾンの関係に関して、さらなる研究が必

要である。

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14件)

1. Minato H, Kurose N, Fukushima M, Nojima T, Usuda K, Sagawa M, Sakuma T, Ooi A, Matsumoto I, Oda M, Arano Y, Shimizu J. Comparative Immunohistochemical Analysis of IMP3, GLUT1, EMA, CD146, and Desmin for Distinguishing Malignant Mesothelioma From Reactive Mesothelial Cells. *Am J Clin Pathol*. 2014; 141: 85-93. (査読有)
2. Tanaka M, Sagawa M, Usuda K, Machida Y, Ueno M, Motono N, Sakuma T. Postoperative drainage with one chest tube is appropriate for pulmonary lobectomy: a randomized trial. *Tohoku J Exp Med*. 2014; 232: 55-61. (査読有)
3. Usuda K, Sagawa M, Motono N, Ueno M, Tanaka M, Machida Y, Matoba M, Taniguchi M, Tonami H, Ueda Y, Sakuma T. Relationships between EGFR Mutation Status of Lung Cancer and Preoperative Factors - Are they Predictive? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15: 657-662. (査読有)
4. Sagawa M, Maeda T, Yoshimitsu Y, Sakuma T. Saline-cooled radiofrequency coagulation during thoracoscopic surgery for giant bulla. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014 Feb 28. [Epub ahead of print] PMID: 24585554 [PubMed - as supplied by publisher] (査読有)
5. Usuda K, Sagawa M, Motono N, Ueno M, Tanaka M, Machida Y, Oikawa T, Saito M, Kojima K, Tahahara Y, Shinomiya S, Yamaya A, Sakuma T. Assessment of

- bispectral index monitor during flexible bronchoscopy performed under conscious sedation. The Journal of Japan Society for Respiratory Endoscopy, 2014; 36, 12-19. (査読有)
6. 田中良. 慢性閉塞性肺疾患における Receptor for Advanced Glycation End Product蛋白の発現. 金沢医科大学雑誌 2014掲載予定 (査読有)
 7. 上野正克. 原発性肺癌におけるRAGEおよび関連因子の発現. 金沢医科大学雑誌 2014掲載予定 (査読有)
 8. Sakuma T, Matthay MA. Translational studies in the ex vivo human lung. Respiration Investigation 2014掲載予定 (査読無)
 9. Usuda K, Sagawa M, Motono N, Ueno M, Tanaka M, Machida Y, Matoba M, Kuginuki Y, Taniguchi M, Ueda Y, Sakuma T. Advantages of Diffusion-Weighted Imaging Over Positron Emission Tomography-Computed Tomography in Assessment of Hilar and Mediastinal Lymph Node in Lung Cancer. Ann Surg Oncol. 2013; 20: 1676-1683. (査読有)
 10. Usuda K, Zhao XT, Sagawa M, Aikawa H, Ueno M, Tanaka M, Machida Y, Matoba M, Ueda Y, Sakuma T. Diffusion-weighted imaging (DWI) signal intensity and distribution represent the amount of cancer cells and their distribution in primary lung cancer. Clin Imaging. 2013; 37:265-272. (査読有)
 11. Sagawa M, Shibuya J, Takahashi S, Endo C, Abiko M, Suzuki H, Matsumura Y, Sakuma T, Sato N, Deguchi H, Nakamura Y, Hasumi T, Kondo T. A randomized phase III trial of postoperative adjuvant therapy for completely resected stage IA-IIIA lung cancer using an anti-angiogenetic agent: irsogladine maleate. Minerva Chir. 2013; 68: 587-597. (査読有)
 12. Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, Sakuma T, Fukushima T, Umehara H, Ueno S, Minamoto T, Motoo Y. Loss of HITS (FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis. Int J Oncol. 2012; 41: 1347-1357. (査読有)
 13. Ichikado K, Muranaka H, Gushima Y, Kotani T, Nader HM, Fujimoto K, Johkoh T, Iwamoto N, Kawamura K, Nagano J, Fukuda K, Hirata N, Yoshinaga T, Ichiyasu H, Tsumura S, Kohrogi H, Kawaguchi A, Yoshioka M, Sakuma T, Suga M. Fibroproliferative changes on high-resolution CT in the acute respiratory distress syndrome predict mortality and ventilator dependency: a prospective observational cohort study. BMJ Open. 2012 Mar 1;2(2):e000545. doi: 10.1136/bmjopen-2011-000545. (査読有)
 14. Sagawa M, Nakayama T, Tanaka M, Sakuma T, Sobue T; The JECS Study Group. A Randomized Controlled Trial on the Efficacy of Thoracic CT Screening for Lung Cancer in Non-smokers and Smokers of ≤ 30 Pack-years Aged 50-64 Years (JECS Study): Research Design. Jpn J Clin Oncol. 2012; 42: 1219-1221. (査読有)

{学会発表}(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐久間 勉 (SAKUMA, Tsutomu)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90215674