

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461187

研究課題名(和文)肺高血圧症合併間質性肺炎における、肺細動脈のトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of pulmonary arterioles in interstitial pneumonia with pulmonary hypertension

研究代表者

半田 知宏 (Handa, Tomohiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10432395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：はじめに、9例の間質性肺炎の肺移植摘出肺を用いて肺動脈病理像の評価を行った。線維化が高度な領域では、肺高血圧症の有無に関わらずで肺動脈の病変が広範囲に認められた。一方で、線維化が少ない領域での肺動脈病変は軽度であった。次に肺高血圧症合併/非合併特発性肺線維症の肺組織を用いて、matrix metalloproteinases (MMPs) のRNA定量と免疫染色を行った。肺高血圧症合併特発性肺線維症の肺組織ではMMP-2,9等の発現が上昇していたが、その発現は主に上皮細胞であり、肺動脈での発現は軽度であった。

研究成果の概要(英文)：First, pathological grades of pulmonary arterioles in resected lungs from patients with interstitial pneumonias who underwent lung transplantation was assessed. In fibrotic areas, pulmonary arterial lesion was observed extensively, while pathological findings of pulmonary arteries were mild in less fibrotic areas. Secondary, RNA expression of matrix metalloproteinases (MMPs) was analyzed using whole lung specimen from IPF patients with and without pulmonary hypertension (PH). RNA expression of MMP-2 and MMP-9 were increased in patients with PH. In immunohistochemical analysis, their expression was mainly observed on lung epithelial cells, and their expression on pulmonary arterial cells were mild.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間質性肺疾患 肺高血圧症 メトリックスメタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

間質性肺疾患 (interstitial lung disease: ILD) において、肺高血圧症 (pulmonary hypertension: PH) は予後を規定する重要な合併症である。ILD における PH の発症には、間質の病変に伴う肺血管床の減少、低酸素による肺血管攣縮、肺動脈病変など種々の要因が関与する。一般的には肺線維症の重症度に伴って PH の頻度が増加するが、一部の ILD では肺線維症の程度と比較して重度の PH を合併する事がある。このような症例では、肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) に用いる治療薬の適応となる可能性がある。PH の治療に関する欧州のガイドラインにおいて、一般的に ILD 関連 PH に対する PAH 治療薬の使用は推奨されていないが、肺線維症の程度と比較して重度の PH を認める症例に対しては臨床試験として導入を試みてもよいとされており (1)、その妥当性を検証することが求められている。しかし、PH を伴う ILD において肺動脈の病変を評価した研究は乏しい。

2. 研究の目的

本研究では、外科的肺生検、および肺移植を行った間質性肺炎症例の肺動脈の病理像を評価し、その遺伝子発現について検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

まず、当院で肺移植を施行した間質性肺疾患における肺動脈病理像の検討を行った。次に、特発性肺線維症における MMPs の検討を行い、最後に肺高血圧症合併間質性肺炎における肺組織の MMPs 発現の検討を行った。それぞれの研究の方法、結果を次に示す。

4. 研究成果

4-1. 当院で肺移植を施行した間質性肺疾患における肺動脈病理像の検討

対象：2010 年から 2015 年に京都大学呼吸器外科で肺移植を施行した特発性間質性肺炎 9 例を対象に、肺動脈病理像の検討を行った。方法：肺動脈圧は、移植術中の右心カテーテルで評価した。移植摘出肺組織において、間質性肺炎の病理診断を再評価した。線維化の強い領域、目立たない領域それぞれにおいて、肺動脈所見を Heath Edwards の分類 (2) に従って評価し、異常が認められる肺動脈の割合を 10% きざみで評価した。また、肺静脈病変 (intimal thickening) の有無を各領域で評価した。さらに、胸部 HRCT における線維化の広がりを 3 段階で評価した (スコア 1 ; <25% 2 ; 25-50% 3 ; >50%)。

結果：表 1 に示すように、比較的軽症を含む肺高血圧合併例 8 例と非合併例 1 例を対象とした。

線維化領域の肺動脈病変は、PH の有無に関わらず比較的広範囲に認められた。肺静脈病変は PH を有する症例の半数で認められた。一方で、線維化が少ない領域での肺動脈病変は軽度で、PH 8 例中 4 例では病変を認めなかった (表 2)。PH を有さない症例においても、線維化領域では肺動脈の変化が認められた (図 1)。肺動脈病変の grade や割合は

必ずしも肺高血圧の程度と相関せず、CT での線維化の広がりが寄与している可能性がある (表 3)。以上より、進行期間質性肺炎における PH の病態には、主に線維化領域の肺動脈病変が関与している可能性が示唆された。

表 1 患者背景

症例番号	年齢	性別	診断	術中肺動脈圧
1	17	男	unclassifiable	58/31 (42)
2	54	男	unclassifiable	mean 37
3	63	男	unclassifiable	52/23 (33)
4	53	男	IPF	49/20 (30)
5	54	男	unclassifiable	38/22 (27)
6	51	女	unclassifiable	43/15 (26)
7	60	男	IPF	36/19 (25)
8	56	男	fNSIP	35/20 (25)
9	56	男	unclassifiable	25/8 (15)

図 1 移植摘出肺の肺動脈病理像

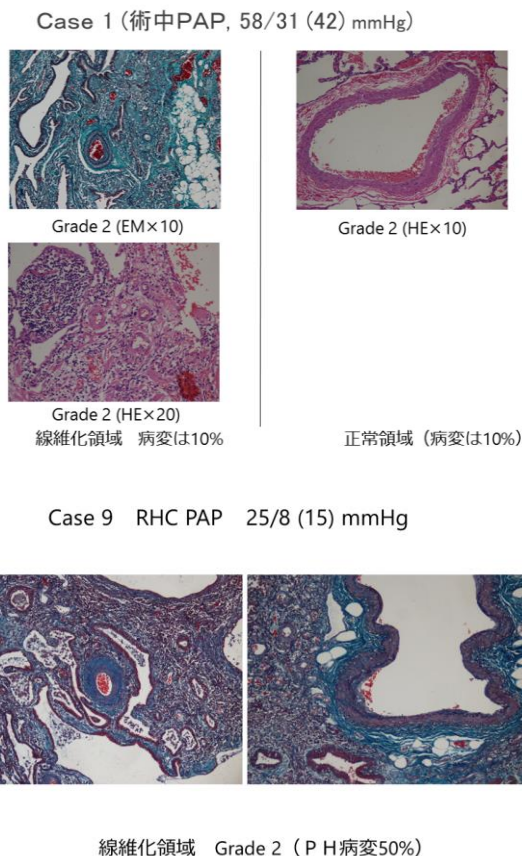


表 2

肺動脈病変評価

Case	PAP (mmHg)	線維化領域				正常領域			
		Heath Edwards grade		PH lesion extent*	静脈病変	Heath Edwards grade		PH lesion extent*	静脈病変
		Observed grades	Most frequent grade			Observed grades	Most frequent grade		
1	58/31(42)	2	2	10%	absent	2	2	10%	absent
2	mean 37	2,3	3	100%	absent	none		0%	absent
3	52/23(33)	2,3	3	50%	absent	none		0%	absent
4	49/20(30)	2,3,4	2	100%	present	2	2	20%	present
5	38/22(27)	2,3	3	80%	present	none		0%	absent
6	43/15(26)	2	2	20%	absent	none		0%	absent
7	36/19(25)	2,3,4	2	70%	present	2	2	10%	absent
8	35/20(25)	2, 3	3	100%	present	2	2	10%	present
9	25/8(15)	2,3	2	50%	absent	none		0%	absent

表 3 胸部HRCTにおける線維化の広がり の評価

症例	HRCTにおける線維化病変 (1:<25% 2 25-50% 3>50%)		PAP
1	3		58/31 (42)
2	3		mean 37
3	3		52/23 (33)
4	2		49/20 (30)
5	2		38/22 (27)
6	3		43/15 (26)
7	3		36/19 (25)
8	2		35/20 (25)
9	2		25/8 (15)

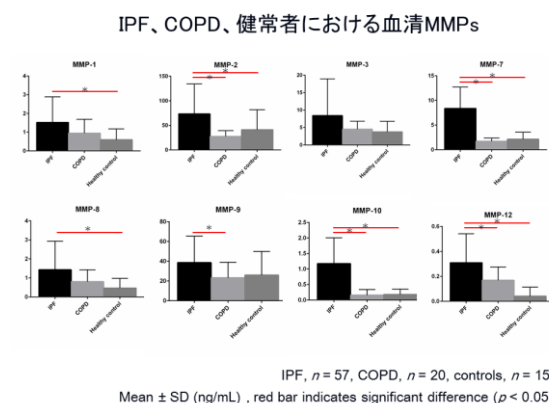
次に、肺高血圧症合併特発性肺線維症のパラフィン包埋組織を用いて、肺動脈RNAの抽出を試みた。Microdissectionで採取したサンプルでは、RNAが感度以下の濃度であった。そこで、18G針を用いて顕微鏡下に用手的採取を行った。その結果、RNAはナノドロップで感度以下。バイオアナライザーで400pg/μl、RIN値2.4であった。マイクロアレイに必要なRNA量が250ng以上であることとホルマリンサンプルでは増幅ができないことから、網羅的解析は困難であった。そのため、肺線維症(3)と肺高血圧症(4)のいずれの病態にも関与する事で注目されているマトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteinases: MMPs)に焦点を当て、解析を行った。

4-2 特発性肺線維症におけるMMPsの検討

背景: 従来間質性肺炎ではMMP/TIMPバランスがTIMP優位に傾いていると考えられていたが、近年の研究によって多くのMMPsは線維化を促進する方向に働くことが分かってきた(3)。なかでもMMP-7は動物モデルで線維化を促進する事が示され、その血中の値がIPFのバイオマーカーとなりうる事が報告されている。一方で、他のMMPに関して十分な検討は行われていない。本研究では、IPFを対象に、複数のMMPのバイオマーカーとしての有用性を検討した。方法: 京都大学を受診した57名のIPFを対象にマルチプレックス法を用いて血清の

MMP濃度を測定し、生理学的指標、臨床的悪化との関連を評価した。慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者20名と健常者15名を対照群とし、血清MMP濃度の比較を行った。結果: IPF群は健常群と比較して血清MMP-1, -2, -7, -8, -10, -12の濃度が有意に上昇しており、COPDではMMP-12のみが上昇していた(図2)。IPFにおいて、血清MMP-7が%FVC、%DL_{CO}と有意に相関し、血清MMP-10は%FVC、%DL_{CO}、6分間歩行距離、動脈血液ガス中の酸素分圧と有意な負の相関を有していた。また、血清MMP-10は6か月間の臨床的悪化と生存率に関連した。更に、IPF患者の肺組織では肺泡マクロファージと肺胞上皮細胞にMMP-10が発現していた。以上より、IPFにおいて血清MMP-10は疾患重症度を反映し、病勢の進行を予測する新しいバイオマーカーと考えられた(5)。

図 2



4-3 肺高血圧症合併間質性肺炎における肺組織のMMPs発現の検討

背景: MMPsは、肺線維症の病態に関わっている一方で、肺高血圧症の病態との関連も報告されている(4)。間質性肺炎合併肺高血圧症の病態においても重要な役割を果たしている可能性があり、検証した。方法: PHを有するIPF4例、PHを有さないIPF4例、PHを有する強皮症合併間質性肺炎2例、特発性肺動脈性肺高血圧症3例を対象に、外科的肺生検、および移植摘出肺組織からRNAを抽出し、MMP-2, 7, 9, 10を定量化した。また、免疫組織化学で各MMPsの染色を行った。結果 PHを有するIPFでは、PHを有さないIPFと比較してMMP-2, 7, 9, 10のRNA発現が増加していた。IPAHの肺組織でもMMP-2, 9は発現が認められたが、MMP-7の発現はわずかであった(図3)。免疫染色の結果、MMP-2はPHを有するIPFの線毛上皮の一部で強い発現が認められ(図4 実線矢印)、肺動脈にも淡い発現が確認された(図4 点線矢印)。PHを有さないIPFにおいても上皮細胞に発現が認められたが、PHを有するIPFと比較すると発現が弱かった。また、MMP-9はIPFの上皮細胞で発現が認められたが、PHを有する群では上皮、間葉系細胞など全体に発現が亢進していた。IPAHの肺組織では、肺動脈ではなく上皮細胞にMMP-9の発現が認められた(図4)。コントロール組織(肺癌摘出組織の非癌部)において、MMP-2, 9の発現はほとんど

確認できなかった。

図3 肺組織における RNA 発現量 ($/\beta$ -actin)

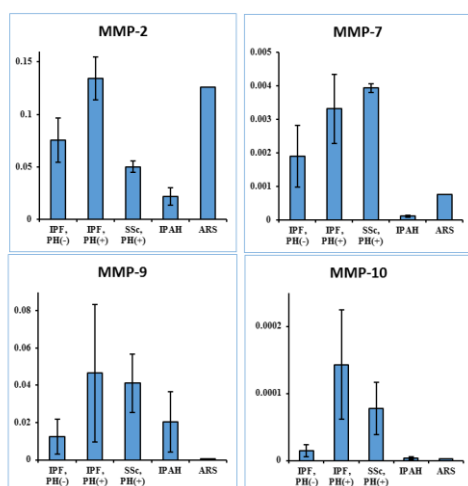
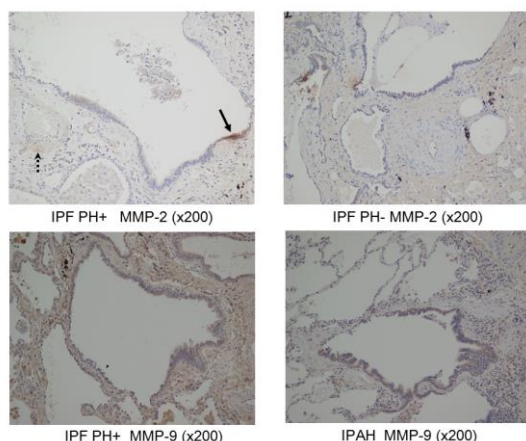


図4



以上より、PHを有するIPFではMMP-2, 7, 9の発現上昇が確認されたが、肺動脈の発現は目立たず、IPAH症例においても同様であった。MMPsの上昇はIPの重症度を反映した可能性があり、MMPsが間質性肺炎の肺血管病変に寄与しているか否かについては今後の検討を要する。

参考文献

- Galiè N, Hoepfer MM, Humbert M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2009;30(20):2493-537.
- Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation*. 1958;18(4 Part 1):533-47.
- Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, Owen CA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic

pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(5):585-600.

- Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2012;40(3):766-82.
- Sokai A, Handa T, Tanizawa K, et al. Matrix metalloproteinase-10: a novel biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2015;16:120.

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8件)

- Tanizawa K, Handa T, Nakashima R, Kubo T, Hosono Y, Watanabe K, Aihara K, Ikezoe K, Sokai A, Nakatsuka Y, Taguchi Y, Hatta K, Noma S, Kobashi Y, Yoshizawa A, Oga T, Hirai T, Chin K, Nagai S, Izumi T, Mimori T, Mishima M. The long-term outcome of interstitial lung disease with anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies. *Respir Med in press*
- Handa T, Watanabe K, Tanizawa K, Oga T, Aihara K, Ikezoe K, Sokai A, Nakatsuka Y, Hirai T, Nagai S, Chin K, Horiuchi H, Mishima M. Platelet aggregability in patients with interstitial pneumonias. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2016; 33(2):143-50.
- Tanizawa K, Handa T, Nagai S, Niimi A, Oguma T, Kubo T, Ito Y, Aihara K, Ikezoe K, Matsumoto H, Hirai T, Chin K, Mishima M. Comprehensive evaluation of airway involvement in pulmonary sarcoidosis. *ERJ Open Res* 2017; 3(1).
- Sokai A, Handa T, Chen F, Tanizawa K, Aoyama A, Kubo T, Ikezoe K, Nakatsuka Y, Oguma T, Hirai T, Nagai S, Chin K, Date H, Mishima M. Serial perfusion in native lungs in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases after single lung transplantation. *Clin Transplant*. 2016;30:407-14.
- Sokai A, Handa T, Tanizawa K, Oga T, Uno K, Tsuruyama T, Kubo T, Ikezoe K, Nakatsuka Y, Tanimura K, Muro S, Hirai T, Nagai S, Chin K, Mishima M. Matrix metalloproteinase-10: a novel biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2015; 16: 120.
- Tanizawa K, Handa T, Nagai S, Hirai T, Kubo T, Oguma T, Ito I, Ito Y, Watanabe K, Aihara K, Ikezoe K, Oga T, Chin K, Izumi T, Mishima M. Clinical impact of high-attenuation and cystic areas on computed tomography in fibrotic

- idiopathic interstitial pneumonias. BMC Pulm Med. 2015; 15: 74.
7. Ikezoe K, Handa T, Tanizawa K, Kubo T, Ito I, Sokai A, Nakatsuka Y, Nagai S, Izumi T, Mishima M. A toll-like receptor 3 single nucleotide polymorphism in Japanese patients with sarcoidosis. Tissue Antigens. 2015; 85(3): 204-8.
 8. Ikezoe K, Handa T, Tanizawa K, Kubo T, Oguma T, Hamada S, Watanabe K, Aihara K, Sokai A, Nakatsuka Y, Muro S, Nagai S, Uno K, Chin K, Fukui M, Hirai T, Mishima M. Bone mineral density in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Med. 2015; 109(9): 1181-7.

[学会発表] (計 8 件)

1. Tomohiro Handa, Shoko Matsui, Hajime Yoshifuji, Kiminobu Tanizawa, Yuza Kodama, Hiroshi Yamamoto, Seiji Minamoto, Yuko Waseda, Kohei Ikezoe, Kazuo Chin, Toyohiro Hirai, Keishi Kubo, Tsuneyo Mimori, Tsutomu Chiba, Michiaki Mishima. Serum Soluble IL-2 Receptor as a Biomarker in IgG4 Related Disease. International symposium on IgG4-RD & Associated Conditions, Lahaina, USA, 2017.2.15.
2. 半田知宏：間質性肺疾患患者の肺移植における予後評価と管理の実際 第56回日本呼吸器学会学術講演会 京都市 2016年4月10日
3. 半田知宏：呼吸器疾患と血管病変 シンポジウム：血管不全と健康 第一回日本血管不全学会学術集会 東京 2016年4月17日
4. 池添浩平、半田知宏、谷澤公伸、祖開暁彦、中塚賀也、久保武、平井豊博、田口善夫、長井苑子、陳和夫、三嶋理晃：特発性肺線維症患者における慢性腎臓病と予後の関連 第56回日本呼吸器学会学術講演会 京都市 2016年4月8日
5. 池添浩平、半田知宏、谷澤公伸、久保武、徳田深作、中塚賀也、山本裕子、陳豊史、青山晃博、本山秀樹、土屋恭子、長井苑子、平井豊博、伊達洋至、陳和夫 脳死肺移植登録を行なった間質性肺疾患患者の臨床像と予後の検討 第9回呼吸機能イメージング研究会学術集会 京都 2017年1月27日
6. Akihiko Sokai, Tomohiro Handa, Kiminobu Tanizawa, Kazuko Uno, Toru Oga, Kohei Ikezoe, Yoshinari Nakatsuka, Toyohiro Hirai, Sonoko Nagai, Kazuo Chin, Michiaki Mishima. A comprehensive evaluation of serum matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis American Thoracic Society International Conference. Denver, USA, 2015.5.17
7. Kohei Ikezoe, Tomohiro Handa, Kizuku Watanabe, Kiminobu Tanizawa, Kensaku Aihara, Akihiko Sokai, Yoshinari

- Nakatsuka, Tsuyoshi Oguma, Takeshi Kubo, Shigeo Muro, Sonoko Nagai, Toyohiro Hirai, Kazuo Chin, Michiaki Mishima. Bone mineral density assessed by computed tomography in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. American Thoracic Society International Conference San Diego, USA, 2014.5.18
8. Akihiko Sokai, Kiminobu Tanizawa, Tomohiro Handa, Takeshi Kubo, Kohei Ikezoe, Yoshinari Nakatsuka, Kensaku Aihara, Sonoko Nagai, Toyohiro Hirai, Kazuo Chin, Michiaki Mishima. Prognostic significance of asymmetrical distribution in acute exacerbation of interstitial pneumonia. European Respiratory Society Annual Congress, Munich, Germany, 2014.9.10.

[図書] (計 2 件)

1. Handa T, Yonezawa A, Azuma A: Epidemiology of and Risk Factors for Drug-Induced Lung Disease. In: Nakamura H, Aoshiba K, Hanaoka M eds. Drug-Induced Lung Injury. Springer Press, 2016.
2. Handa T, Azuma A: Pharmacotherapy of idiopathic pulmonary fibrosis. In: Nakamura H, Aoshiba K eds. Idiopathic Pulmonary Fibrosis-Advances in Diagnostic Tools and Disease Management. Springer Press, 2014.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

半田知宏 (Tomohiro Handa)

京都大学・大学院医学研究科呼吸器内科学・助教

研究者番号：10432395

(2)研究分担者

伊達洋至 (Hiroshi Date)

京都大学・大学院医学研究科呼吸器外科学・教授

研究者番号：60252962

佐藤史顕 (Fumiaki Sato)

京都大学・大学院医学研究科乳腺外科学・准教授

研究者番号：20467426