

●ファイザーフェローシップ報告

肺胞マクロファージにおけるプロテアーゼおよびアンチプロテアーゼの発現と慢性閉塞性肺疾患との関係

石井 健男

要旨：【背景】肺胞マクロファージは、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease：COPD）の病態において、matrix metalloproteinases（MMPs）や cathepsins といったプロテアーゼの発現を介して重要な役割を果たしていると考えられている。肺胞マクロファージは同時に、MMPs の阻害因子である tissue inhibitors of metalloproteinases（TIMPs）および cathepsins の阻害因子である cystatin C も発現している。これらプロテアーゼおよびアンチプロテアーゼのバランスの悪化が、肺気腫の原因となっている可能性がある。【目的】肺胞マクロファージにおける MMPs, cathepsins およびその阻害因子の発現量とその遺伝子型との関連、また発現量と COPD の表現型との関連について検討する。【方法】末梢肺に限局した肺腫瘍患者 109 人について、外科切除時に得られた肺標本の正常な部分を選び気管支肺洗浄を行い、肺胞マクロファージを採取した。この肺胞マクロファージを用い、quantitative real-time PCR により MMPs, cathepsins, TIMPs および cystatin C の発現量を調べた。これら遺伝子のベースラインでの発現量とその遺伝子型の関連について調べた。遺伝子発現量と、肺機能検査および computed tomography（CT）-scan の結果との関連についても検討を行った。【結果】肺胞マクロファージにおける cystatin C のベースラインでの発現量は FEV1% predicted と正の相関にあり、MMP12 のベースライン発現量は FEV1% predicted および DLco/VA% predicted と負の相関にあった。cystatin C および MMP1 の遺伝子型は、それぞれの遺伝子のベースライン発現量と優位に相関していた。【結語】MMP12 の肺胞マクロファージにおける発現が COPD と関連することが確認され、また cystatin C と COPD との関連が新たに見いだされた。

緒 言

慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease：COPD）は、可逆性が完全にはみられない慢性気道閉塞によって特徴づけられる疾患である¹⁾。COPD は世界の慢性疾患のなかで罹患率および死亡率ともに高い疾患であり、2020 年には全世界における死亡原因の第 3 位に位置するであろうと推定されている²⁾。COPD の最も重要なリスクファクターは喫煙であるが、慢性の重度の喫煙者のうち 10~20%のみが COPD を発症する³⁾。また、COPD の家族集積性はその遺伝的な因子を示唆している⁴⁾。ゆえに、喫煙による気道障害への感受性の相違が存在し、この喫煙感受性が $\alpha 1$ antitrypsin（A1-AT）以外の遺伝因子と関連していると考えられる³⁾。

COPD の病態については 2 大仮説、すなわちプロテアー

ゼ・アンチプロテアーゼ仮説とオキシダント・アンチオキシダント仮説が存在する。また、肺胞マクロファージ、主に CD8⁺ の T リンパ球、および好中球がその病態において鍵となる役割を果たしていると考えられている¹⁾。ゆえに、肺胞マクロファージから分泌されるプロテアーゼおよびアンチプロテアーゼが COPD の病態に重要であると考えられる。

matrix metalloproteinases（MMPs）はコラーゲンおよびエラスチンを分解する酵素のファミリーを形成しており、炎症に伴う組織の再形成や修復に大きな役割を果たしている⁵⁾。MMP1（interstitial collagenase）、MMP9（gelatinase B）、および MMP12（human macrophage elastase）は肺胞マクロファージにより生成され、動物および人間に関する複数の研究にて、気道炎症および肺気腫の形成においてこれらの MMPs が重要であると報告されている⁶⁾。

cathepsin L と S は肺胞マクロファージにより生成される lysosomal cysteine proteases であり⁶⁾、やはりエラスチンの分解を介して COPD に関与している可能性がある⁷⁾。しかしながら、COPD の病態における役割はこ

れまでのところ不明である。

肺胞マクロファージは MMPs の阻害因子である tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) や, cathepsin L や S を阻害する作用のある cystatin C も生成する。肺気腫はプロテアーゼ・アンチプロテアーゼバランスが崩れるために生じると考えられることから, これら阻害因子の発現量も病態を考えるうえで重要と思われる。

当研究において, 我々は COPD および肺気腫の重症度を呼吸機能検査および CT-scan にて評価し, この重症度と肺胞マクロファージにおけるプロテアーゼ (MMP1, 9, 12, cathepsin L と S) およびアンチプロテアーゼ (TIMP1, 2, 3, および cystatin C) の発現量との関連を検討した。同時に, 発現量とその遺伝子型との関連も検討した。

方 法

1. 母集団

2001 年 7 月から 2004 年 11 月に Vancouver General Hospital にてステージ I または II の末梢の小型腫瘍 (<3 cm) で肺切除を行った 109 人 (白人 87 人, アジア人 17 人, 不明 5 人) を対象とした。平均年齢は 67 ± 10 歳であり, 49 名 (45%) が男性であった。喫煙歴については current smokers が 43 名 (39%), former smokers が 59 名 (54%) であり, pack years は 46 ± 25 であった。

術前の呼吸機能テスト (pulmonary function tests : PFT) は ATS のガイドラインに基づき, forced expiratory volume in one second (FEV1), forced vital capacity (FVC), および single breath diffusing capacity (DLCO)/the alveolar volume (VA) について行われた⁹⁾。CT-scan は対象者のうち 75 名について施行された。平均値は FEV1% predicted 83, FVC% predicted 92, FEV1/FVC 70%, および DLco/VA% predicted 75% であった。

A1-AT の遺伝子型は MM, MZ, ZZ, genotype はそれぞれ 97%, 3%, および 0% であった。

当研究は University of British Columbia/Providence Health Care および Vancouver Hospital and Health Sciences Research Ethics Boards によって認可されたものである。すべての対象者は書面となったインフォームド・コンセントを受けている。

2. 気管支肺胞洗浄

切除肺または肺葉について手術後 1 時間以内に無菌的に気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage : BAL) が行われた。Foley catheter (14 gauge) が腫瘍を含まない肺区画または肺葉への気道に挿入され, 60 ml の冷生

理食塩液が注入されたのちに BAL 液が回収された。回収を助けるために組織は穏やかにマッサージされた。BAL は 1 検体について 6~7 回行われて 240~480 ml が回収され, 無菌的なプラスチック瓶に集められた。BAL は debris や粘液を除去すべく無菌ガーゼにてろ過され, 遠心された ($250 \times g$, 10 min)。細胞の生存率は trypan blue exclusion にて調べ, 常に 90% 以上であった。細胞の分画を調べるため, Shandon® II cytocentrifuge を用い室温で 1 時間空気乾燥させ Cytospin® preparations を行った。

3. 肺胞マクロファージの分離

肺胞マクロファージは Ficoll-Hypaque® density centrifugation にて分離された⁹⁾。細胞は RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて 2 度洗浄され, 10^6 肺胞マクロファージ/ml の濃度で RPMI 1640 に再浮遊された。

4. RNA 抽出および cDNA 合成

Total RNA は, 肺胞マクロファージから RNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用いて抽出され, さらにゲノム DNA を除去 RNase-free DNase (Qiagen) にて処理された。RNA 量は Quant-iT™ Ribogreen® RNA reagent (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) により測定された。0.5~1 μ g の RNA について, 200 U SuperScript® RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen), 40 U RNaseOUT® Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen), および 0.5 μ g Oligo (dT) Primer (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い, 20 μ l の cDNA 溶液が得られた。

5. 定量的 real-time PCR

RNA の発現の定量については, 肺胞マクロファージにおける MMP1, MMP9, MMP12, cathepsin L, cathepsin S, TIMP1, TIMP2, TIMP3, および cystatin C の発現量について, TaqMan® システムにより ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて 384 well plates にて行った。プライマーおよびプローブのセットは Applied Biosystems より購入した (Hs00272002_m1, Hs00233958_m1, Hs00234579_m1, Hs00159178_m1, Hs00266474_m1, Hs00175403_m1, Hs00171558_m1, Hs00234278_m1, Hs00165949_m1, Hs00264679_m1)。

すべての PCR は, 2 ng mRNA 相当の cDNA, 0.5 μ l の TaqMan Gene Expression Assay (20 \times) (プライマーおよびプローブが含まれている), 5 μ l の TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて, 最終容量が 10 μ l となるようにした。サイクルの条件は, 95°C for 10 min で Taq DNA polymerase を活性化し, そのあと増幅および定量のサイクルを反復して

Table 1 Characteristics of SNPs and CA repeats in this study

Gene	Name of the SNP	Accession number for SNPs or repeats	SNP location from TSS (bp)
MMP1	MMP1_-1607	rs1799750	-1607
	MMP1_-822	rs498186	-822
MMP9	MMP9_-2997	rs4810482	-2997
	MMP9_-1812	rs3918241	-1812
	MMP9_-1562	rs3918242	-1562
	MMP9_CA repeat	D20S838	between -130 and -90
MMP12	MMP12_-124	rs2276109	-124
Cathepsin L	CTSL_-7231	rs3128507	-7231
	CTSL_-1656	rs3118869	-1656
	CTSL_157	rs2274611	157
Cathepsin S	CTSS_-12674	rs10888394	-12674
	CTSS_-958	rs1136774	-958
TIMP2	TIMP2_-2803	rs4789932	-2803
	TIMP2_3040	rs7212662	3040
	TIMP2_54154	rs2277698	54154
TIMP3	TIMP3_-4083	rs1962223	-4083
	TIMP3_-1295	rs9619311	-1295
Cystatin C	CST3_7141	rs6036478	7141

TSS, transcription start site.

行った (95°C for 15 s, 60°C for 60 s with a single fluorescence measurement). 各サンプルについて3回の計測を行った。

threshold cycleはSDS 2.1 software (Applied Biosystems)を用いて決定した。Mullerら¹⁰⁾の方法に従い、遺伝子発現量はcalibrator sample (当研究の対象ではない、肺胞マクロファージからのcDNAサンプル)により標準化され、同時にreference geneであるguanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1) (COPDの疾患程度にかかわらず肺胞マクロファージの中で最も量的に安定して発現されていると我々が報告¹¹⁾)の発現量により、標準化されている。

6. genotyping

1) SNPなど遺伝子多型の選択

論文などによる既報告に基づき、あるいはHapMap (<http://www.hapmap.org/>)においてプロモーター領域を含むハプロタイプブロックを調べそのブロックに含まれる遺伝子多型 [single nucleotide polymorphism (SNP) など] を、MMPs, cathepsins, TIMPs, およびcystatin Cについて選択した (Table 1)。

まず、COPDと関連があるとされたSNPを選択した。すなわち、MMP1のrs1799750, MMP9のD20S838およびrs3918242, MMP12のrs2276109, およびTIMP2のrs2277698である^{12)~14)}。

他のすべてのSNPsはHapMapのデータをもとにHaploview 3.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) (Copyright© 2003-2005 Whitehead Institute for Biomedical Research)を用いてtagging algo-

rithmにて選択した。ハプロタイプブロックの定義はGabrielら¹⁵⁾の報告に従い、tag SNPsはLD thresholdを $r^2 \geq 0.8$ およびminor allele frequency ≥ 0.10 として選択した。MMP1およびMMP12については適切なハプロタイプブロックを見いだすことができなかったため、プロモーター領域が存在すると考えられる転写開始位置から2,000塩基上流までの領域についてHapMap dataからSNPsを、すなわちMMP1についてrs498186を、MMP12についてrs2276109を選択した。

TIMP1については上記の方法で適切な遺伝子多型を選択できなかったため、10人の対象についてプロモーター領域と転写制御因子を含むとされるイントロン1を含む転写開始場所から-1783 bpより+857 bpまでについて、シーケンシングを行った^{16)~18)}。しかしながら、minor allele frequency ≥ 0.10 であるSNPsを見いだすことはできなかった。

2) genotyping

ゲノムDNAは肺胞マクロファージからDNeasy Blood & Tissue Kitを用いて抽出した。

上述のSNPsのうち15個とA1-AT Z allele¹⁹⁾については5' to 3' exonuclease TaqMan assays (Applied Biosystems)²⁰⁾にて、ABI TaqMan Assays-on-Demand (Table 1)をプライマーおよびプローブとして用いて遺伝子型を決定した。

MMP1のrs1799750およびMMP9のrs3918242の遺伝子型については、以前の報告に準拠してrestriction fragment length polymorphismを行った¹²⁾²¹⁾。rs1799750のPCRプライマーはforward: 5'-TGACTTTTAAAA-

CATAGTCTATGTTCA-3' および reverse : 5'-TCTT-GGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC-3' である。PCR 産物を制限酵素 *AluI* (New England BioLabs Inc., Beverly, MA) にて分解し電気泳動を行い, homozygous 2G/2G alleles は 269 bp, 一方 homozygous 1G/1G alleles は 241 と 28 bp のバンドがみられ, heterozygotes はこれらのバンドの組み合わせとなった (269, 241, 28 bp)。rs3918242 については sense primer : 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC および antisense primer : 5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC を用い, アニリング温度を 60°C として PCR を行った。435 bp の PCR 産物について 5 U の制限酵素 *SphI* (New England BioLabs Inc.) にて処理し電気泳動した。homozygous C の遺伝子型 (CC) では 435 bp のバンドのみみられ, homozygous T 遺伝子型 (TT) では 188 bp と 247 bp の 2 本のバンド, heterozygous の遺伝子型 (CT) ではこれらすべてのバンドがみられた。

MMP9 遺伝子における CA repeats の数の決定は GeneScan 解析を用いて行った。ラベルしていない forward primer : 5'-GAGGTGGTGTAAAGCCCTTCT-CATGC および TAMRA で蛍光ラベルした primer : 5'-ATGGTGAGGGCAGAGGTGTCTGACT, 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Qiagen) を用いてアニリング温度 62°C とし 35 サイクルの PCR を行った。その後 PCR 産物は internal standard (GeneScan-400 ROX, Applied Biosystems) と混合して, アレルは ABI PRISM 377 slab-gel sequencer (Applied Biosystems) にて分離, Genotyper 3.7 software (Applied Biosystems) にてアレルの決定を行った。CA repeats を含んでいる DNA standards は直接シーケンシングにてリピート数を決定し positive controls として各実験に用いた。アレルは short (16 CA repeats 以下) および long (17 CA repeats 以上)¹²⁾ と定義した。

template なしのコントロールと遺伝子型のわかっているコントロールは, すべてのアッセイにて用いられた。

7. CT-scan morphometry

半定量的肺気腫スコアは, 2 人の独立した読影者にて 75 の対象について決められた。読影者は肺気腫を 6 段階にスコア化した (0 : no emphysema, 5 : >75% emphysema)²²⁾。肺実質の定量的解析は以前報告されている方法を用いて行われた²³⁾²⁴⁾。肺実質は胸壁および大血管から contour-following algorithm にて分離および分画化された。肺容量はすべてのスライスにおける voxel の数を合計して voxel の容量で乗じ合計を計算した。肺の CT 濃度 (g/ml) は各 voxel の X-ray の減衰度から推定された²⁵⁾²⁶⁾。肺の重量および空気の容量は, 肺の容量と濃度の測定値から計算された²³⁾²⁴⁾。肺気腫は mild/mod-

erate emphysema を -855 Hounsfield units をカットオフ値とし, また severe emphysema については -950 Hounsfield units をカットオフ値とした²¹⁾。定量的解析は 45 人の対象について行われた。

8. 統計解析

Hardy-Weinberg equilibrium については, R-genetics package (<http://cran.r-project.org>: authors of the package are Gregory Warnes and Friedrich Leisch) を用いて計算した。他のすべての統計処理は SPSS software version 13.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行われた。結果は mean [standard deviation (SD)] にて示した。直線回帰解析は, mRNA expression と PFT あるいは定量的 CT-scan データとの相関について調べるうえで用いられた。直線回帰は遺伝子型と mRNA expression の相関, また遺伝子型と PFT あるいは定量的 CT-scan データとの相関を調べるためにも用いられ, この際遺伝子型については additive model を用い, p-value は Wald test statistic に基づいて計算された。半定量的肺気腫スコアと gene expression levels あるいは遺伝子型の相関については ordinal regression を用いた。年齢, 性別, 人種および喫煙歴 (pack year) にて補正を行った。

各対象のハプロタイプは PHASE version 2.0²⁷⁾²⁸⁾ を用いて推定を行った。ハプロタイプと他の因子の相関についての直線回帰解析は, Hapassoc program for the R package を用いて行った。ハプロタイプと mRNA expression, PFT または定量的 CT-scan データとの相関は直線回帰にて評価した。confounding および adjustment variables としては年齢, 性別, 人種, および喫煙歴 (pack years) を用いた。

$p < 0.05$ を有意とした。多重解析となることから, Bonferroni correction を行った。Bonferroni-corrected p-values を適時表示した。当研究デザインのパワーについては PASS 2005 (Hintze J. NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical Systems. 2004; Utah: Kaysville. www.ncss.com) を用いて評価した。

結 果

1. プロテアーゼおよびアンチプロテアーゼの遺伝子発現と COPD 形質との関連

プロテアーゼ (MMPs と cathepsins) およびアンチプロテアーゼ (TIMPs と cystatin C) の mRNA 発現量と COPD 形質, すなわち呼吸機能検査と CT-scan データの関連について解析を行った。呼吸機能検査としては FEV1% predicted, carbon monoxide diffusing capacity (DLco)/alveolar volume (VA) % predicted, および residual volume (RV)/total lung capacity (TLC) につ

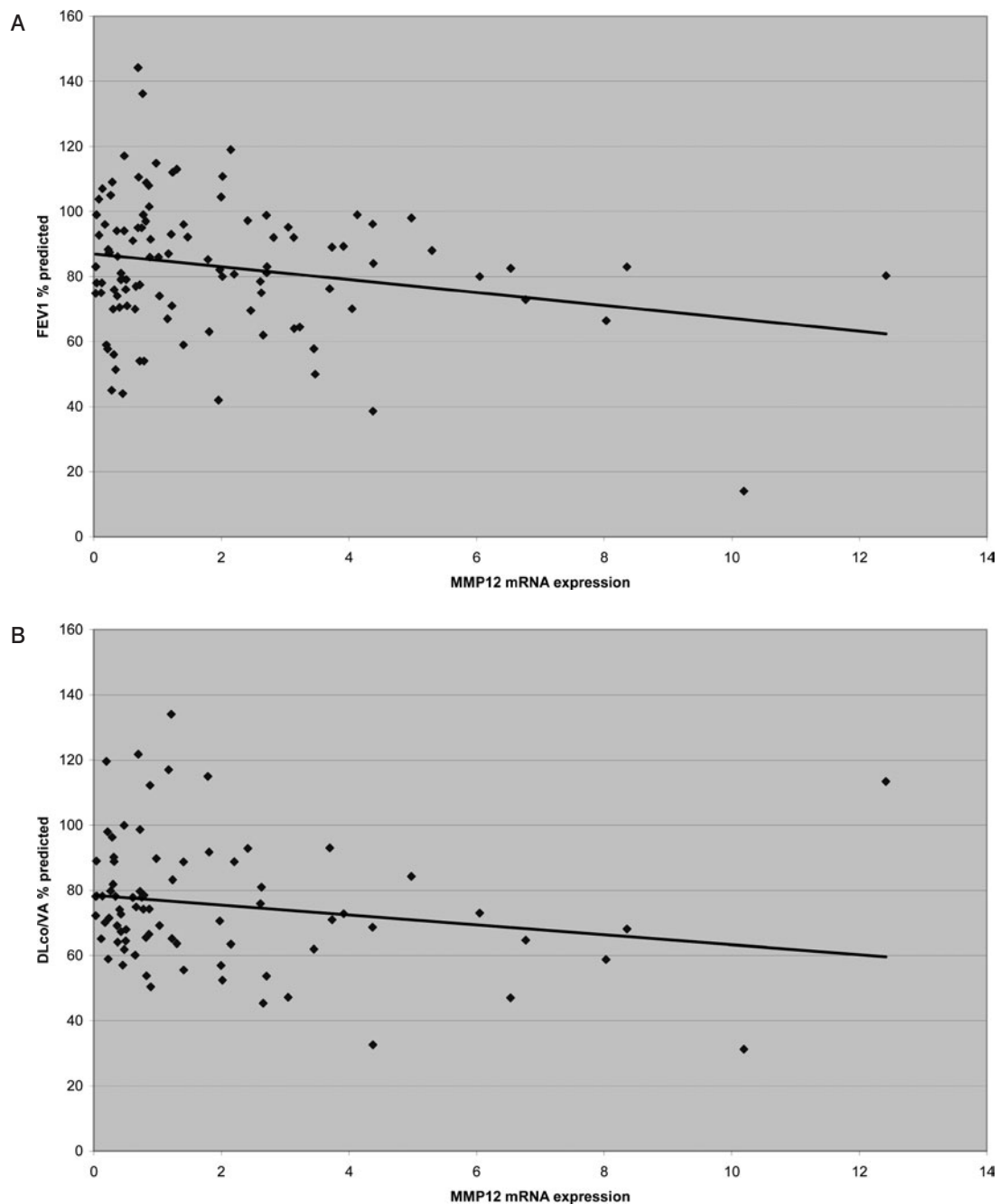


Fig. 1 Relationship between MMP12 mRNA expression level in alveolar macrophages and FEV1% predicted (A) and DLco/VA% predicted (B) without any adjustment in a whole population. Regression lines are also shown. The expression level of MMP12 showed a significant inverse association with all of these PFT data.

いて、それぞれ慢性気道閉塞、diffusion capacity および air trapping または hyperinflation を評価するために解析することとした。CT-scan データは半定量肺気腫スコアおよび2種類（肺気腫の存在、および重度の肺気腫の存在について）の定量的な肺気腫評価を行った²⁴⁾²⁹⁾。

肺胞マクロファージにおける MMP12 のベースライン発現量は FEV1% predicted および DLco/VA% predicted との有意な負の相関を示し (Fig. 1A, B),

DLco/VA% predicted との相関は Bonferroni correction 後も有意であった (データなし)。

肺胞マクロファージにおける cystatin C のベースライン発現量は FEV1% predicted (Fig. 2A) および RV/TLC% (Fig. 2B) と有意な正の相関を示した。Bonferroni correction 後は、白人においてのみ有意であった (データなし)。

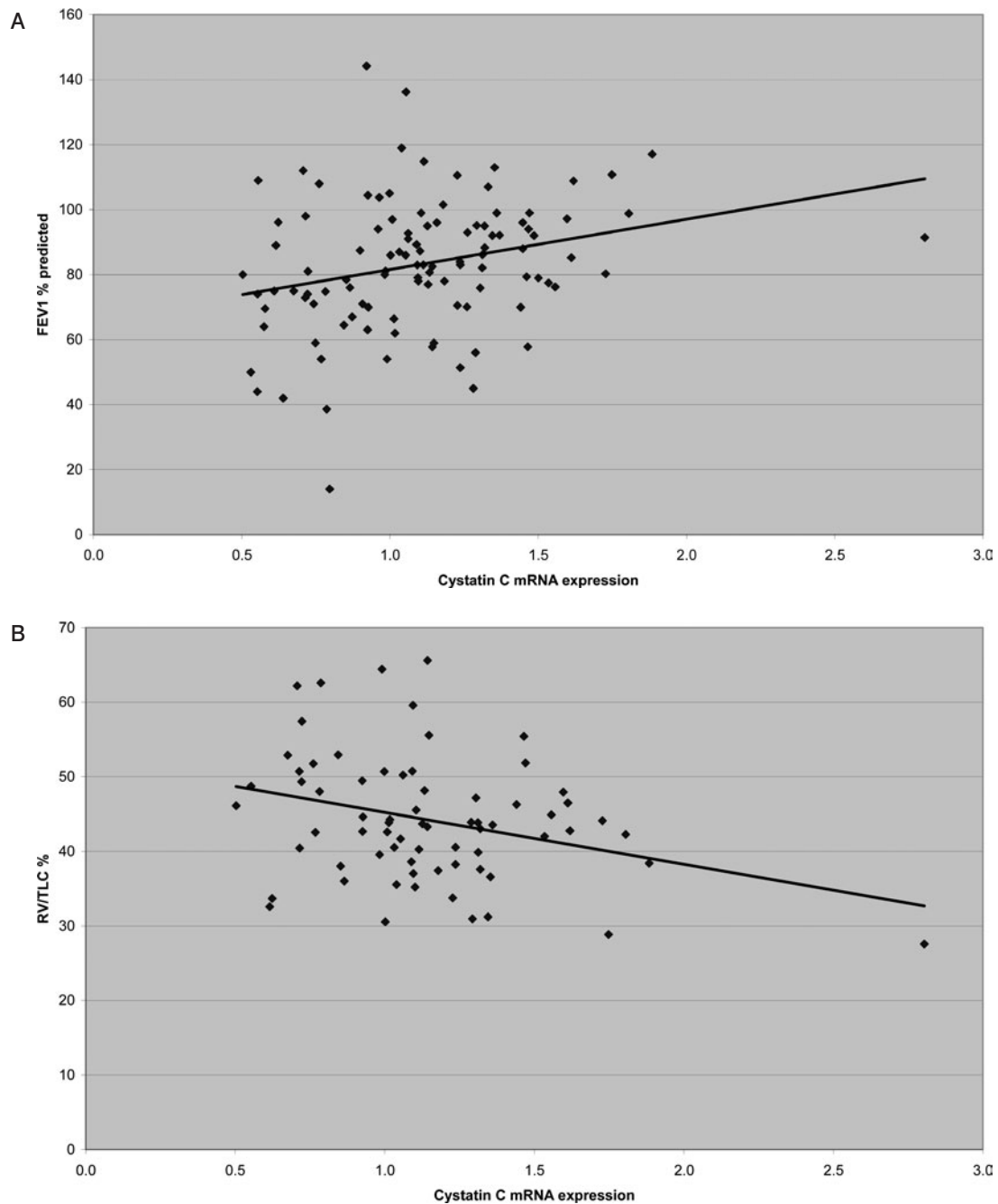


Fig. 2 Relationship between cystatin C mRNA expression level in alveolar macrophages and FEV1% predicted (A) and RV/TLC % (B) without any adjustment in a whole population. Regression lines are also shown. The expression level of cystatin C showed a significant positive association with all of these PFT data.

2. プロテアーゼとアンチプロテアーゼの遺伝子型およびハプロタイプと、その発現量またはその変化との関連

次に、これらの遺伝子の多型が遺伝子発現量を変化させ、ひいては喫煙者の COPD 感受性を変化させるかどうかについて検討を行った。

まず、肺癌患者からサンプルを集めたことを含め selection bias の可能性を調べるため、遺伝子型の頻度が

Hardy-Weinberg equilibriumから期待されるものとなっているかどうかについて検討した。最大多数である白人の母集団においてすべての遺伝子多型は Hardy-Weinberg equilibrium にあった (データなし)。

MMP1 mRNA のベースライン発現量は MMP1_1607 の 1G アレルの数の増加と正の相関を示した (Fig. 3A)。この相関はハプロタイプ解析でも示された。LPS または TNF による MMP1 の発現量変化もこのアレルとの

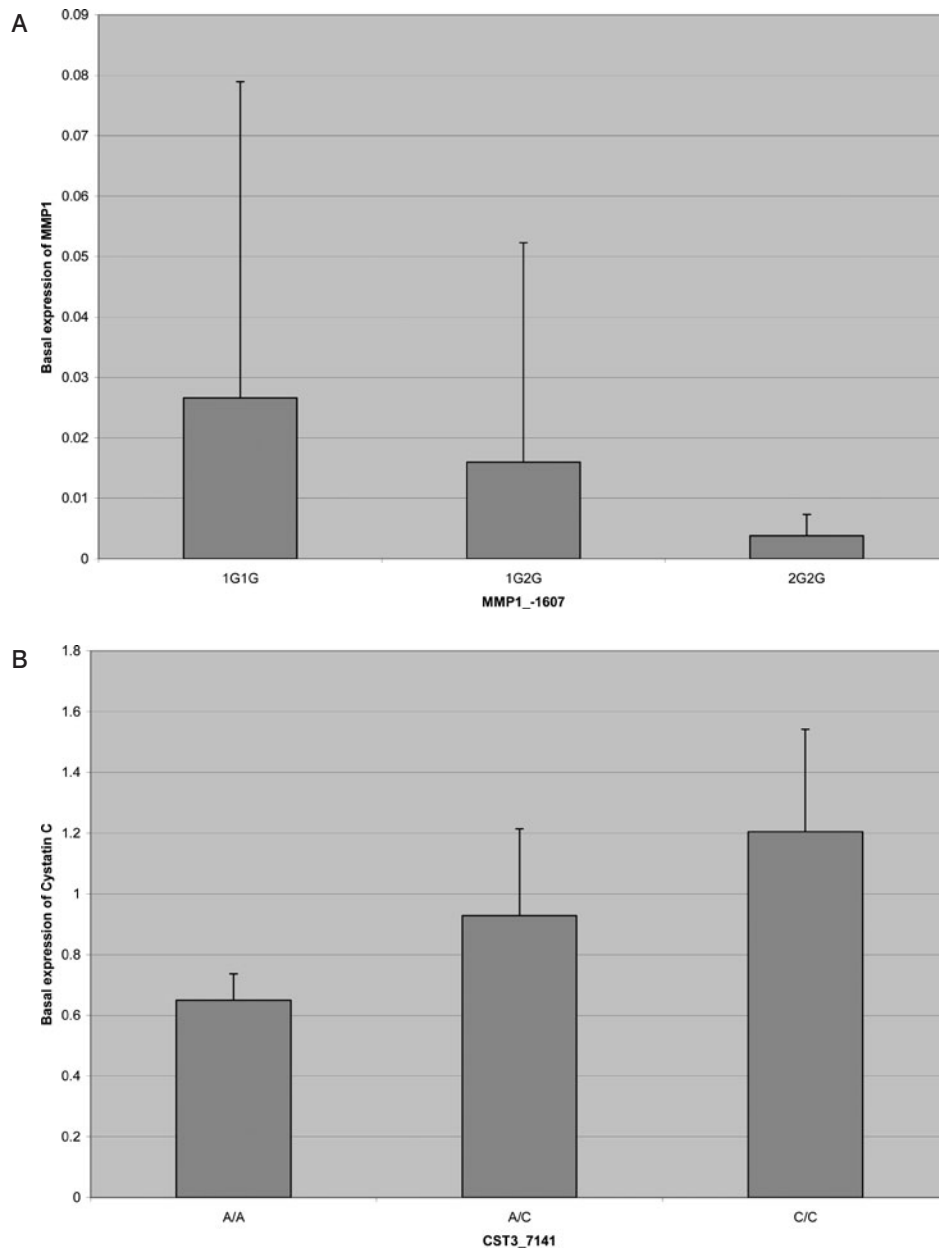


Fig. 3 Some genotypes affected their gene expression levels in alveolar macrophages. (A) MMP1 mRNA basal expression was positively associated with increasing number of 1G alleles of MMP1_1607. (B) Cystatin C mRNA basal expression was positively associated with increasing number of C alleles of CST3_7141.

関連がみられ、これらの関連はハプロタイプ解析でも示された。

cystatin C mRNA のベースライン発現量は、CST3_7141 の C アレルの増加と正の相関を示した (Fig. 3B)。TNF- α による cystatin C の発現量の変化も CST3_7141 の C アレルの増加と正の相関を示した。

3. プロテアーゼおよびアンチプロテアーゼの遺伝子型およびハプロタイプと COPD 形質との関連
cystatin C mRNA のベースラインの発現量は

CST3_7141 の C アレルの数の増加と正に相関しており (Fig. 3B) 肺胞マクロファージにおける cystatin C mRNA のベースライン発現量は FEV1% predicted と有意な正の相関を示していたことから (Fig. 2A), CST3_7141 の C アレルの数の増加が FEV1% predicted と関連していることが期待された。しかしながら、これらのアレルと FEV1% predicted の直接的な関係は、母集団全体においても白人のみにおいてもみられなかった。

考 察

当研究において、肺胞マクロファージにおける cystatin C のベースライン発現量が FEV1% predicted と正の相関を示し、また MMP12 のベースライン発現量が FEV1% predicted および DLco/VA predicted と負の相関を示した。cystatin C および MMP1 の遺伝子型はそのベースライン発現量と相関を示した。

喫煙および他の空気中の刺激物質は肺胞マクロファージを刺激して MMPs および cathepsins の産生を促す^{30)~32)}。MMP1 はコラーゲンを分解し、また MMP9, 12, cathepsin L および S はエラスチンを分解する³³⁾。コラーゲンとエラスチンの分解は、肺気腫および気道のリモデリングに導く。さらに、MMP12 は TNF- α の活性化を介して好中球をも刺激し、活性化された好中球は MMP9, neutrophil elastase および cathepsin G の産生によりエラスチンの分解および肺気腫を導きうると考えられる³⁴⁾。tissue inhibitor of metalloproteinases および cystatin C はアンチプロテアーゼとして働き、肺気腫の進行を防ぐ可能性がある³⁵⁾。

COPD の病態においてプロテアーゼおよびアンチプロテアーゼが役割を果たしているとする報告は、多く存在する。気道閉塞を伴う喫煙者は、COPD でない喫煙者や非喫煙者と比較して肺における MMP1 および MMP9 の発現が多いとされ³⁶⁾、MMP12 についても同様の報告がみられる³⁷⁾。MMP1, 9 および 12 の遺伝子多型と、COPD あるいはその関連形質との間に相関がみられるとする報告が複数あげられている^{12)14)38)~40)}。ヒト MMP1 を過剰発現するトランスジェニックマウスは、ヒトの肺気腫と同様の形態上の変化がその肺にみられた⁴¹⁾。MMP12 ノックアウトマウスは喫煙曝露しても肺気腫を形成せず⁴²⁾、喫煙刺激による肺傷害に MMP12 の存在が重要であることが示唆された。TIMPs と COPD 病態の相関についても、TIMP2 の +853 G/A SNP のアレル頻度が日本人において COPD と関連していると報告されており¹³⁾、その遺伝子型頻度がエジプト人において COPD と関与しているとも報告されている⁴³⁾。MMP9/TIMP1 比率は慢性気管支炎にて気道閉塞と相関しているとの報告もある⁴⁴⁾。気腫肺における MMP を介した細胞外器質の分解および組織のリモデリングにおいて MT1-MMP/MMP2/TIMP2 が重要な役割を果たしているとされる⁴⁵⁾。TIMP3 ノックアウトマウスは進行性の気腫の拡大とコラーゲンの分解がみられた⁴⁶⁾。sub-clinical な肺気腫患者の気管支肺胞洗浄液において cathepsin L および cystatin C の濃度が上昇していたとの報告もあるが⁴⁷⁾、これらの遺伝子の多型と COPD との関係についての報告はみられない。

MMP12 の増加は細胞外器質の分解を直接的にあるいは TNF の活性化を介して進めると考えられることから³⁴⁾、MMP12 の発現量の変化は FEV1% predicted だけでなく DLco/VA% predicted とも相関したと考えられる。

cystatin C 発現量の増加は、エラスチンの分解能を有する cathepsin L および S の活性を減少させると考えられ、ゆえに、細胞外器質の安定および肺気腫の病態進行の阻害につながると想定される。cystatin C の発現量と PFT データとの相関は白人集団のみにてより強いものであったことから、cystatin C は白人における COPD の病態にて重要な役割を果たす可能性がある。cystatin C の発現量は FEV1% predicted および RV/TLC % と相関していたが DLco/VA との相関はみられなかった。よって、cystatin C は肺気腫よりも気道のリモデリングに関与している可能性がある。

当研究の遺伝子発現量とそのほかの因子の相関の解析においては、いくつかの問題点も存在する。PASS 2005 software を用いて推定すると、109 人の対象を用いて遺伝子発現量と COPD 形質の間の相関をみる場合、相関が 0.3 以上の場合のみ 80% の検出力が得られる。RV/TLC および DLco/VA% predicted および CT-scan データについてはより対象数が少ないことから、遺伝子発現と COPD 形質の相関の検出力はより弱いと考えられる。さらに、母集団の 58.7% は GOLD 0 と重症の肺気腫は少ないことから、CT-scan による肺気腫の計測が困難となり、遺伝子発現と CT-scan データとの相関を検出できなかった原因の一つとなった可能性がある。

遺伝子発現における遺伝子多型の役割についても多くの報告がみられる。卵巣癌の癌組織における MMP1 の発現は、MMP1_-1607 において 2G アレルを有している場合に、より高いとする報告がみられる⁴⁸⁾。transfection による実験で、また DNA-protein interaction assays にて、MMP9_-1562 において T アレルを有する場合に、より高いプロモーター活性が MMP9 にて得られるとする報告もある⁴⁹⁾。MMP12_-124 の A アレルは AP1 の結合を強め MMP12 のプロモーター活性を上げることが *in vitro* にて観察されている⁵⁰⁾。cystatin C の主なハプロタイプである -82G/-5G/+4A が血清 cystatin C 濃度と関連し、その homozygous にて血清濃度が最高と報告されている⁵¹⁾。cathepsin L, S および TIMPs について遺伝子多型と発現量との相関に関する報告はみられない。

当研究において、MMP1 mRNA のベースライン発現量は MMP1_-1607 の 1G アレルの増加と正の相関を示した。この結果は他の組織における報告と正反対のものである⁴⁸⁾。よって、1G アレルと MMP1 発現量について本

研究にて観察された結果は、肺胞マクロファージに特異的なものである可能性がある。ハプロタイプ G₋₅₁₉-C₋₃₄₀ がより強いプロモーター活性を持つという報告が近年なされ⁵²⁾ また MMP1 のプロモーター領域は HapMap データによるハプロタイプブロックをプロモーター領域に有さないことから、MMP1 のプロモーター制御についてはより多くの SNP を用いた検討が必要であると考えられる。

MMP12₋₁₂₄ は MMP12 のベースラインでの発現量および発現の変化と相関しておらず、COPD 形質とも相関していなかった。MMP12 のベースラインでの発現量は COPD 形質と有意に相関していたことから、その発現および mRNA の安定性を制御する遺伝子領域を特定することは重要であり、MMP12₋₁₂₄ を含むハプロタイプブロック（プロモーター領域を含んでいた）の上流および下流にわたり検索の必要があると思われる。

肺胞マクロファージにおける cystatin C mRNA のベースライン発現量は、CST3₇₁₄₁ の C アレルの増加と正の相関を示した。プロモーターおよびエクソン 1 における cystatin C のハプロタイプが cystatin C の血清濃度と関連していることが報告されており⁵¹⁾、このハプロタイプブロックは本研究の CST3₇₁₄₁ の属するハプロタイプブロックに含まれることから、肺胞マクロファージにおける cystatin C mRNA のベースライン発現量もこの既報告のプロモーターハプロタイプにより制御されている可能性がある。CST3₇₁₄₁ の C homozygotes が最も高い FEV1.0% predicted を有していたが、この結果は統計学的には有意でなかった。

当研究において、遺伝子多型とそのほかの因子の相関の解析においても、いくつかの問題点も存在する。PASS 2005 software を用いた推定より、遺伝子多型と遺伝子発現量との相関の検出力は、遺伝子型におけるサンプルサイズ、遺伝子発現量におけるグループ内の SD のため、ほとんどの SNP について低いと考えられた。遺伝子型と COPD 形質との相関についても、検出力にばらつきがみられ、80% を下回ることが多かった。ゆえに、遺伝子型と発現量あるいは COPD 形質との相関を検出するために、より大きな母集団を用いる必要があると考えられた。

さらに、肺癌患者からの肺胞マクロファージを用いたことから、母集団についてバイアスがかかっている可能性がある。母集団中の白人集団について Hardy-Weinberg equilibrium がなりたっていることはすべての SNP について確認したが、いくつかの SNP が COPD 同様肺癌集団に偏っている可能性がある。MMP の多型と肺癌との相関を認める報告もみられる²¹⁾。この疑問を解消するため、我々は現在肺癌患者でない喫煙者および既喫煙

者についての同様の研究を進めており、本研究での結果を確認できるものと考えている。

本研究にて、我々は MMP12 が COPD における気道閉塞に寄与することを確認した。また、cystatin C の発現量と COPD 形質の相関を新たに見だし、このアンチプロテアーゼが cathepsins による障害から肺を防御していることを示唆した。cystatin C は発現量と遺伝子型に有意な相関がみられたことから、同遺伝子についての SNP も COPD 形質に影響を及ぼす可能性があり association studies における候補 SNP となると考えられる。MMP とその阻害因子だけでなく cathepsins とその阻害因子についても、COPD の病態における役割について、より大きな母集団を用いての検討が必要と考えられる。

※本論文に記述した内容を含む拡大研究結果について、European Respiratory Journal にて掲載予定である。

引用文献

- 1) Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-76.
- 2) Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1498-504.
- 3) Anto JM, Vermeire P, Vestbo J, et al. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 17: 982-94.
- 4) McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, et al. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1419-24.
- 5) Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.
- 6) Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S29-32.
- 7) Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 63-88.
- 8) American Thoracic Society. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). Recommendations for a standard technique—1995 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 185-98.

- 9) Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97: 77-89.
- 10) Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, et al. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2002; 32: 1372-4, 1376, 1378-9.
- 11) Ishii T, Wallace AM, Zhang X, et al. Stability of housekeeping genes in alveolar macrophages from COPD patients. *Eur Respir J* 2006; 27: 300-6.
- 12) Joos L, He JQ, Shepherdson MB, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 569-76.
- 13) Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 18: 748-52.
- 14) Hersh CP, Demeo DL, Lange C, et al. Attempted replication of reported chronic obstructive pulmonary disease candidate gene associations. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 71-8.
- 15) Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296: 2225-9.
- 16) Clark IM, Rowan AD, Edwards DR, et al. Transcriptional activity of the human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) gene in fibroblasts involves elements in the promoter, exon 1 and intron 1. *Biochem J* 1997; 324: 611-7.
- 17) Dean G, Young DA, Edwards DR, et al. The human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) -1 gene contains repressive elements within the promoter and intron 1. *J Biol Chem* 2000; 275: 32664-71.
- 18) Lee M, Song SU, Ryu JK, et al. Sp1-dependent regulation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter. *J Cell Biochem* 2004; 91: 1260-8.
- 19) Chappell S, Guetta-Baranes T, Batowski K, et al. 2004. Haplotypes of the α -1 antitrypsin gene in healthy controls and Z deficiency patients. *Hum Mutat* 24: 535-6.
- 20) Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' \rightarrow 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7276-80.
- 21) Zhu Y, Spitz MR, Lei L, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 2001; 61: 7825-9.
- 22) Goddard PR, Nicholson EM, Laszlo G, et al. Computed tomography in pulmonary emphysema. *Clin Radiol* 1982; 33: 379-87.
- 23) Coxson HO, Rogers RM, Whittall KP, et al. A quantification of the lung surface area in emphysema using computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 851-6.
- 24) Rogers RM, Coxson HO, Sciruba FC, et al. Preoperative severity of emphysema predictive of improvement after lung volume reduction surgery: use of CT morphometry. 2000; *Chest* 118: 1240-7.
- 25) Hedlund LW, Vock P, Effmann EL. Computed tomography of the lung. Densitometric studies. *Radiol Clin North Am* 1983; 21: 775-88.
- 26) Coxson HO, Mayo JR, Behzad H, et al. Measurement of lung expansion with computed tomography and comparison with quantitative histology. *J Appl Physiol* 1995; 79: 1525-30.
- 27) Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978-89.
- 28) Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1162-9.
- 29) Gevenois PA, deMaertelaer V, De Vuyst P, et al. Comparison of computed density and macroscopic morphometry in pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 653-7.
- 30) Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 602-9.
- 31) Bracke K, Cataldo D, Maes T, et al. Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138: 169-79.
- 32) Reilly JJ, Chen P, Sailor LZ, et al. Cigarette smoking induces an elastolytic cysteine proteinase in macrophages distinct from cathepsin L. *Am J Physiol* 1991; 261: L41-8.
- 33) Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2001; 2: 10-9.
- 34) Churg A, Wang RD, Tai H, et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-in-

- duced inflammation via tumor necrosis factor- α release. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1083-9.
- 35) Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672-88.
- 36) Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117: 684-94.
- 37) Molet S, Belleguic C, Lena H, et al. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res* 2005; 54: 31-6.
- 38) Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, et al. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 116-9.
- 39) Zhou M, Huang SG, Wan HY, et al. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and the susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Han population of south China. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1481-4.
- 40) Ito I, Nagai S, Handa T, et al. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1378-82.
- 41) D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, et al. 1992; Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* 71: 955-61.
- 42) Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, et al. 1997. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277: 2002-4.
- 43) Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, et al. Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians. *Respir Med* 2005; 99: 107-10.
- 44) Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1945-50.
- 45) Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, et al. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 1998; 78: 1077-87.
- 46) Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, et al. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 2001; 108: 817-29.
- 47) Takeyabu K, T Betsuyaku, M Nishimura, et al. Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J* 1998; 12: 1033-9.
- 48) Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, et al. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Res* 1999; 59: 4225-7.
- 49) Zhang B, Ye S, Herrmann SM, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1788-94.
- 50) Jormsjö S, Ye S, Moritz J, et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res* 2000; 12; 86: 998-1003.
- 51) Loew M, Hoffmann MM, Koenig W, et al. Genotype and plasma concentration of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1470-4.
- 52) Pearce E, Tregouet DA, Samnegard A, et al. Haplotype effect of the matrix metalloproteinase-1 gene on risk of myocardial infarction. *Circ Res* 2005; 97: 1070-6.