



Title	Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)/CD5Lの慢性閉塞性肺疾患における役割に関する研究
Author(s)	佐藤, 理子
Description	配架番号 : 2806
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15646号
Issue Date	2023-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15646
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90971
Type	doctoral thesis
File Information	SATO_Michiko.pdf



学位論文

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)/CD5L の
慢性閉塞性肺疾患における役割に関する研究
(Studies on the role of Apoptosis inhibitor of
macrophage (AIM)/CD5L in the pathogenesis of
chronic obstructive pulmonary disease)

2023年9月

北海道大学

佐藤理子

Michiko Takimoto-Sato

学位論文

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)/CD5L の
慢性閉塞性肺疾患における役割に関する研究
(Studies on the role of Apoptosis inhibitor of
macrophage (AIM)/CD5L in the pathogenesis of
chronic obstructive pulmonary disease)

2023年9月

北海道大学

佐藤理子

Michiko Takimoto-Sato

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	4 頁
略語表	7 頁
緒言	9 頁
方法	11 頁
結果	20 頁
考察	39 頁
結論	43 頁
謝辞	45 頁
利益相反	46 頁
引用文献	47 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

1. Michiko Takimoto-Sato, Masaru Suzuki, Hiroki Kimura, Haiyan Ge, Munehiro Matsumoto, Hironi Makita, Satoko Arai, Toru Miyazaki, Masaharu Nishimura, Satoshi Konno

Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)/CD5L in Involved in the Pathogenesis of Emphysema

Respiratory Research

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Michiko Takimoto-Sato, Masaru Suzuki, Hiroki Kimura, Haiyan Ge, Munehiro Matsumoto, Satoshi Konno

Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)/CD5L in Involved in the Pathogenesis of Emphysema

The 63rd Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society, April 28th, 2023 (Tokyo, Japan)

2. Michiko Takimoto-Sato, Masaru Suzuki, Hiroki Kimura, Haiyan Ge, Munehiro Matsumoto, Satoshi Konno

Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)/CD5L in Involved in the Pathogenesis of Emphysema

American Thoracic Society International Conference 2023, May 20th and 28th, 2023 (Washington D.C., United States of America)

また博士課程在学中に行った別研究・臨床経験（①，②）について，以下の学会及び雑誌に発表した．

①サルコイドーシス患者における肺門縦隔リンパ節の画像検討

1. 佐藤理子，木村孔一，服部健史，清水薫子，鈴木雅，澤幡美千瑠，四十坊典晴，山口哲生，今野哲

当科のサルコイドーシス患者 145 例における肺門縦隔リンパ節腫大の画像的検討

第 40 回日本サルコイドーシス／肉芽腫性疾患学会総会，2020 年 10 月 16 日(online)

2. Michiko Takimoto Sato, Hirokazu Kimura, Takeshi Hattori, Kaoruko Shimizu, Masaru Suzuki, Michiru Sawahata, Noriharu Shijubo, Tetsuo Yamaguchi, Satoshi Konno

Radiological Study of Hilar and Mediastinal Lymphadenopathy in 145 Patients with Sarcoidosis

The 61st Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society, April 2021 (online)

②ステロイド治療が奏功した Hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contractures, myopathy, and pulmonary fibrosis (POIKTMP)の症例報告

1. Michiko Takimoto Sato, Masaru Suzuki, Tomoo Ikari, Tomohiko Nakamura, Kei Takahashi, Machiko Sasaki, Hirokazu Kimura, Hiroki Kimura, Kentaro Nagaoka, Toshinari Miyauchi, Toshifumi Nomura, Hiroshi Shimizu, Takashi Kitagataya, Ren Yamada, Kazuharu Suzuki, Akihisa Nakamura, Masato Nakai, Takuya Sho, Koji Ogawa, Naoko Yamaguchi, Noriyuki Otsuka, Utano Tomaru, Satoshi Konno

The First Case of Hereditary Fibrosing Poikiloderma with Tendon Contractures, Myopathy, and Pulmonary Fibrosis (POIKTMP) Who Showed Efficacy of Corticosteroids for Pulmonary Involvement

American Thoracic Society International Conference 2020, May 2020 (online)

2. 佐藤理子, 鈴木雅, 猪狩智生, 中村友彦, 高橋桂, 佐々木真知子, 木村孔一, 木村裕樹, 宮内俊成, 乃村俊史, 氏家英之, 山口直子, 大塚紀幸, 外丸詩野, 今野哲

肺病変にステロイドが奏功した hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contractures, myopathy, and pulmonary fibrosis (POIKTMP) の 1 例

第 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022 年 4 月 24 日 (京都, 日本)

3. Michiko Takimoto-Sato, Toshinari Miyauchi, Masaru Suzuki, Hideyuki Ujiie, Toshifumi Nomura, Tomoo Ikari, Tomohiko Nakamura, Kei Takahashi, Machiko Matsumoto-Sasaki, Hirokazu Kimura, Hiroki Kimura, Yuichiro Matsui, Takashi Kitagataya, Ren Yamada, Kazuharu Suzuki, Akihisa Nakamura, Masato Nakai, Takuya Sho, Koji Ogawa, Naoya Sakamoto, Naoko Yamaguchi, Noriyuki Otsuka, Utano Tomaru, Satoshi Konno

Case Report; Hereditary Fibrosing Poikiloderma With Tendon Contractures, Myopathy, and Pulmonary Fibrosis (POIKTMP) Presenting With Liver Cirrhosis and Steroid-Responsive Interstitial Pneumonia

Frontiers in Genetics 13: 870192, (2022)

要旨

【背景と目的】

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) はタバコ煙を主とする有害物質の長期吸入曝露などにより発症し、末梢気道病変や気腫性病変が生じることにより呼吸機能検査で気流閉塞を示す。世界保健機関の調査では世界の死因第 3 位であり、公衆衛生上の多大な負荷となっている。本邦においても有病率 8.6%、患者数約 530 万人と推定され、今後高齢化が加速する社会において益々大きな問題となることが予想される。気管支拡張薬吸入、呼吸不全に対しては酸素投与などの対症療法が行われているが抜本的な治療はなく、病態の解明および新規治療開発が切実に望まれる。

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)/CD5 molecule-like (CD5L) は血清に 5 $\mu\text{g/ml}$ 程度存在する分泌タンパクである。血中では主に immunoglobulin (Ig)M の 5 量体と結合して存在し、その濃度は IgM と相関する。AIM は各種細胞のアポトーシス抑制のほか腎尿細管での老廃物排泄、脂肪酸分解、T helper 17 (Th17) 細胞の病態制御スイッチなどの様々な機能が判明している。生体内において病態促進的・抑制的の両者の作用が知られているが、当教室の過去の研究では、呼吸器疾患において促進的に作用していた。現時点で COPD の病態における AIM の役割に関しては報告が少ないが、既報では COPD 患者で肺胞マクロファージの生存維持に関与し、マウスモデルにおいては AIM の過剰発現で肺気腫が誘導された。この度 AIM が COPD の病態に促進的に作用すると仮説を立て実験を行った。

【材料と方法】

1. 豚膵臓由来エラスターゼ (porcine pancreas elastase: PPE) 誘導肺気腫モデルマウス

野生型または AIM 欠損の雄 C57BL/6J マウスに 0, 7, 14 日目に PPE を気管内投与して 21 日目に安楽死させ、気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) 液を採取して BAL 液の炎症細胞数、Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) 法にてタンパク量を評価した。肺組織中の遺伝子発現は real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で評価した。さらに肺組織の mean linear intercept (MLI) 算出により肺気腫形成、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色と cleaved caspase-3 染色により細胞死を評価した。

2. 喫煙 (cigarette smoke: CS) 誘導肺気腫モデルマウス
野生型または AIM 欠損の雄 C57BL/6J マウスに 1 日 1 回, 週 5 回喫煙曝露装置にてタバコの主流煙を曝露し, 16 週後に安楽死させて肺気腫形成, 細胞死を評価した.
3. タバコ抽出液 (cigarette smoke extract: CSE) によるマウス肺胞マクロファージ刺激
野生型または AIM 欠損の雄 C57BL/6J マウスに BAL を行い, BAL 液中から肺胞マクロファージを採取した. またタバコの主流煙から CSE を精製し, 肺胞マクロファージを CSE で刺激し培養した. AIM 欠損マウスから得た肺胞マクロファージの一部はマウスリコンビナント AIM も添加した. 6, 12, 24 時間後に細胞と培地を回収し, matrix metalloproteinase (MMP)-12 の遺伝子とタンパクの発現量を評価した.
4. 非喫煙者, 健常喫煙者, COPD 患者における血漿 AIM/IgM 比の評価
北海道大学病院に通院する患者のうち非喫煙者, 健常喫煙者, COPD 患者の 3 群計 50 人において血漿 AIM/IgM 比を評価した.
5. 北海道 COPD コホート研究に参加した患者における血清 AIM/IgM 比の評価
北海道 COPD コホート研究の参入患者のうち, データ利用可能であった 133 人の血清 AIM/IgM 比および重症度, 予後を解析した.

【結果】

PPE 誘導肺気腫マウスでは, AIM 欠損マウスにおいて BAL 液で評価した肺内の炎症と肺気腫形成, TUNEL 染色で評価した細胞死が野生型マウスより抑制された. cleaved caspase-3 で評価したアポトーシスについては AIM 欠損マウスにおいてやや減少傾向にあったものの有意差に至らなかった. また MMP-12 と interleukin (IL)-33 について, BAL 液中のタンパクと肺内の遺伝子発現が両方 AIM 欠損マウスにおいて抑制されていた. CS 誘導肺気腫マウスにおいても AIM 欠損マウスにおいて肺気腫形成と細胞死が抑制された. またマウス肺胞マクロファージを CSE で刺激すると, AIM 欠損マウスから採取した肺胞マクロファージでは, MMP-12 発現が遺伝子・タンパクレベルの両方で抑制されていた. この抑制は, リコンビナント AIM の添加により

改善した。

臨床研究検体の解析においては、COPD 患者では健常喫煙者より血漿 AIM/IgM 比が高値であった。また COPD 患者においては、GOLD 分類で評価した重症度が高い患者ほど血清 AIM/IgM 比が高値となった。さらに血清 AIM/IgM 比が高値である程初回増悪までの期間が短く、全死亡率と呼吸器疾患による死亡率も高かった。

【考察】

MMP-12 は以前より COPD の病態への促進的な関与が報告されているが、PPE により誘導された MMP-12 上昇が AIM 欠損マウスで野生型マウスより抑制されており、この結果は肺胞マクロファージを用いた細胞実験でも裏付けられた。よって、AIM は肺胞マクロファージの MMP-12 の発現亢進を介して COPD の病態を促進することが示唆された。また PPE 投与マウスにおいて BAL 液中の好酸球、肺内 IL-33 遺伝子・タンパク発現上昇が AIM 欠損マウスで抑制され、有意差に至らないものの IL-5 の遺伝子発現上昇も抑制される傾向にあった。当教室の過去の研究では気管支喘息モデルマウスで 2 型炎症が AIM 欠損マウスで抑制されており、AIM が好酸球性炎症に促進的に関与する可能性が考えられる。

細胞死も COPD の病態を促進すると考えられている。今回 PPE 及び CS 誘導マウスモデルの両者において、AIM 欠損マウスで肺内の細胞死が抑制された。AIM は COPD 患者において肺胞マクロファージのアポトーシスを抑制することが報告されている。以上より、AIM は肺胞マクロファージのアポトーシス抑制を介して肺内の炎症を遷延させ、肺胞壁を構成する細胞の細胞死を誘導し、それが肺気腫形成に繋がる可能性がある。また COPD 患者において、非喫煙者ではなく健常喫煙者と比較して血漿 AIM/IgM 比が高値であった。これは、健常喫煙者における血漿 AIM/IgM 比低値が COPD に対する防御的な素因を反映している可能性がある。

【結論】

COPD において、AIM が MMP-12 遺伝子発現亢進を介して病態に促進的に関与することが示唆された。

略語表

AIM	apoptosis inhibitor of macrophage
AIM ^{-/-}	AIM-deficient
BAL	bronchoalveolar lavage
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
CCL	C-C motif chemokine
CD5L	CD5 molecule-like
CI	confidence interval
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CO ₂	carbon dioxide
CS	cigarette smoke
CSE	cigarette smoke extract
CT	computed tomography
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DAMPs	damage-associated molecular patterns
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HR	hazards ratio
HE	hematoxylin and eosin
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
ILC2	group 2 innate lymphoid cell
K _{co}	carbon monoxide transfer coefficient
LPS	lipopolysaccharide
NK	natural killer
MRC	medical research council
MIP	macrophage inflammatory protein
MLI	mean linear intercept
MRC	medical research council
MMP	matrix metalloprotease
SGRQ	St. George's Respiratory Questionnaire

SRCR	scavenger receptor cysteine-rich
Th17	T helper 17
TNF	tumor necrosis factor
TPM	total particulate matter
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
PBS	phosphate-buffered saline
PPE	porcine pancreas elastase
rAIM	recombinant apoptosis inhibitor of macrophage
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	wild-type

諸言

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD) は「タバコを主とする有害物質を長期吸入曝露することなどにより生ずる肺疾患」と定義され (日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第 6 版作成委員会 (2022), 2022), 末梢気道病変や気腫性病変が生じることにより呼吸機能検査で気流閉塞を示す. 世界保健機関の調査では現在世界の死因第 3 位であり, 公衆衛生上の多大な負荷となっている (World Health Organization, 2020). 本邦においては, 厚生労働省の患者調査では患者数約 20 万人前後であったが (厚生労働省, 2019), 一般住民を対象とした大規模疫学調査の Nippon COPD Epidemiology (NICE) Study では COPD は有病率 8.6%, 患者数約 530 万人と推定され (Fukuchi et al, 2004), 多数の未診断患者の存在が示唆された. COPD は今後高齢化が加速する社会において益々大きな問題となることが予想される. 気管支拡張薬吸入, 呼吸不全に対しては酸素投与などの対症療法が行われているが抜本的な治療法はなく, 病態の解明および新規治療開発が切に望まれる.

COPD の肺では肺胞マクロファージと好中球が様々なプロテアーゼ, サイトカイン, ケモカインを放出することにより肺胞壁を破壊し, 気腔拡大をもたらすとされている (Barnes, 2004; Brusselle et al, 2011). 特に肺胞マクロファージは matrix metalloproteinase (MMP)-12 を産生・放出し, それが肺気腫を促進する (Hautamaki et al, 1997). しかし MMP-12 による肺気腫促進の詳細な機序は十分に明らかになっていない. さらに COPD 患者には好酸球性炎症が関与するフェノタイプが存在し (Bafadhel et al, 2011), 好酸球性の急性増悪は非好酸球性の増悪より入院期間が短く, 1 年生存率は高いと報告されている (MacDonald et al, 2019). また肺気腫モデルマウスでの報告では気道上皮細胞の interleukin (IL)-33 発現が亢進する (Wu et al, 2014).

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM, 別名 CD5 molecule-like (CD5L) または Sp α) は scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) superfamily に属する分泌タンパクで, 血清に 5 μ g/ml 程度存在する. 血中では主に immunoglobulin (Ig)M の 5 量体と結合して存在し, その濃度は IgM と相関する (Yamazaki et al, 2014; Arai et al, 2013). AIM は当初マクロファージのアポトーシス抑制因子として発見されたが (Miyazaki et al, 1999), そのほか様々な役割が発見された. 急性腎障害において腎尿細管での老廃物排泄 (Arai et al, 2016), 脳梗塞では damage-associated molecular patterns (DAMPs) 除去 (Maehara et al, 2021) によりそれぞれ病態からの回復を促進する. ほかに動脈硬化促進 (Arai et al,

2005), 脂肪酸分解(Miyazaki et al, 2011), T helper (Th)17 細胞の病態制御スイッチ(Wang et al, 2015)など多数の機能が判明している。炎症性疾患については促進的関与を示唆する報告が多い(Nishikido et al, 2016; Kim et al, 2021; Tanoue et al, 2022)。

このように生体内において病態促進的・抑制的の両者の作用が知られているが、肺疾患については促進的作用を示す報告が主である。当教室の肺疾患における過去の研究でも促進的に作用しており、lipopolysaccharide (LPS) 誘導肺障害モデルにおいて AIM 欠損マウスで肺内炎症の収束が亢進し(Kimura et al, 2017), 気管支喘息モデルを用いた検討では AIM 欠損マウスで好酸球性炎症が抑制された (未発表)。また外傷による急性肺障害／急性呼吸促迫症候群の患者では血清 AIM 値高値が予後不良と関連していた(Cheng et al, 2021)。さらに AIM は肺癌の細胞外小胞由来バイオマーカー候補の可能性を持つと報告されている(Choi et al, 2021)。また AIM は肺内のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌誘導肺炎(Gao et al, 2019), *Mycobacterium avium* 慢性感染(Kajiwara et al, 2023)の病態に関与する。

現時点で COPD の病態における AIM の役割に関しては報告が少ないが、既報は全て促進的関与を示唆している。AIM は COPD 患者で肺泡マクロファージの生存維持に関与し(Kojima et al, 2013), ラットモデルで溶接煙曝露により AIM 発現が上昇した(Oh et al, 2009)。またトランスジェニックマウスモデルでは AIM の過剰発現により肺内で発癌に伴って肺気腫が誘導されたが、詳細な機序については解明されていない(Li et al, 2011)。これらより、AIM が COPD の病態に促進的に作用すると仮説を立て実験を行った。

方法

実験使用動物

AIM 欠損マウスは既報の通り作製された後(Miyazaki et al, 1999), 前東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター分子病態医科学部門・現一般社団法人 AIM 医学研究所の宮崎徹先生と新井郷子先生のご厚意により提供され, C57BL/6J マウスと 13 世代戻して交配したものを飼育した. 野生型 C57BL/6J マウスは AIM 欠損マウスと週数を揃えたものを日本クレア株式会社より購入し飼育した. いずれのマウスも 7-9 週齢の時点で実験を開始した. 本研究に関する実験プロトコルは北海道大学動物実験委員会により承認された. 動物の取扱いは「北海道大学動物実験に関する規定」に従った.

ブタ膵臓由来エラスターゼ (porcine pancreas elastase: PPE) 誘導肺気腫モデルマウス

0, 7, 14 日目にマウスをイソフルラン吸入器にて麻酔し, ブタ膵臓由来エラスターゼ (Sigma-Aldrich) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)(gibco) 40 μ l に溶解したものを気管内投与した (図 1). コントロール群は PBS 40 μ l を投与した. 気管内投与についてはまずマウスを背臥位で斜台に載せ, 前歯と四肢を台に固定した. マウス用喉頭鏡 (Welch) で喉頭展開し, ウェスタンブロット用のローディングチップの先端を気管内に挿入した. その後マイクロピペットでローディングチップ内に溶液を注入し, マウスの吸気によりチップから気管へと溶液が全量吸収されるのを目視で確認した.

21 日目にマウスを carbon dioxide (CO₂) ナルコーシスで安楽死させた後, 腹膜に横切開を入れて開腹した. 次に肺を損傷しないように心臓と接する部位で横隔膜に小切開を入れ, 胸腔を外気と交通させ胸腔内圧を低下させた. その後腹部大静脈から採血を行った. さらに胸郭を左右と胸骨左縁で切開して肺を露出し, 気管前面から 22 ゲージの静脈留置針を留置して気管挿管し, 絹糸で結紮して固定した.

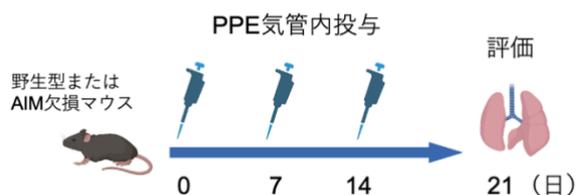


図 1 PPE 誘導肺気腫モデルマウスの実験プロトコル

喫煙曝露誘導肺気腫モデルマウス

タバコ煙 (cigarette smoke: CS) 発生装置 SG-200 (柴田科学) にて市販タバコ (Marlboro, ニコチン 1.0 mg, タール 12 mg, フィリップモリス・ジャパン) の主流煙を発生させマウスに曝露させた (図 A-C). 具体的には装置内の 50 ml シリンジで 15 ml の主流煙を毎分 12 回自動吸引し, それを圧縮空気と混合し 5% の濃度まで希釈したものを鼻部曝露吸入チャンバー (柴田科学) にてマウスに経鼻的に曝露させた. コントロールは空気のみを曝露させた. 曝露は 1 日 60 分, 週 5 回, 最大 16 週間行った. 曝露期間中は混合タバコ煙の総粒子 (TPM: total particulate matter) 濃度の測定を週 1 回以上行った. 期間中の TPM 濃度は $1255 \pm 26 \text{ mg/m}^3$ で大きな変動はなく, 適切な範囲に維持されたと判断した. 短期曝露群は 4 週後に BAL 液を評価し, 長期曝露群は 16 週後にホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックを作製し, MLI にて肺気腫形成を評価した.

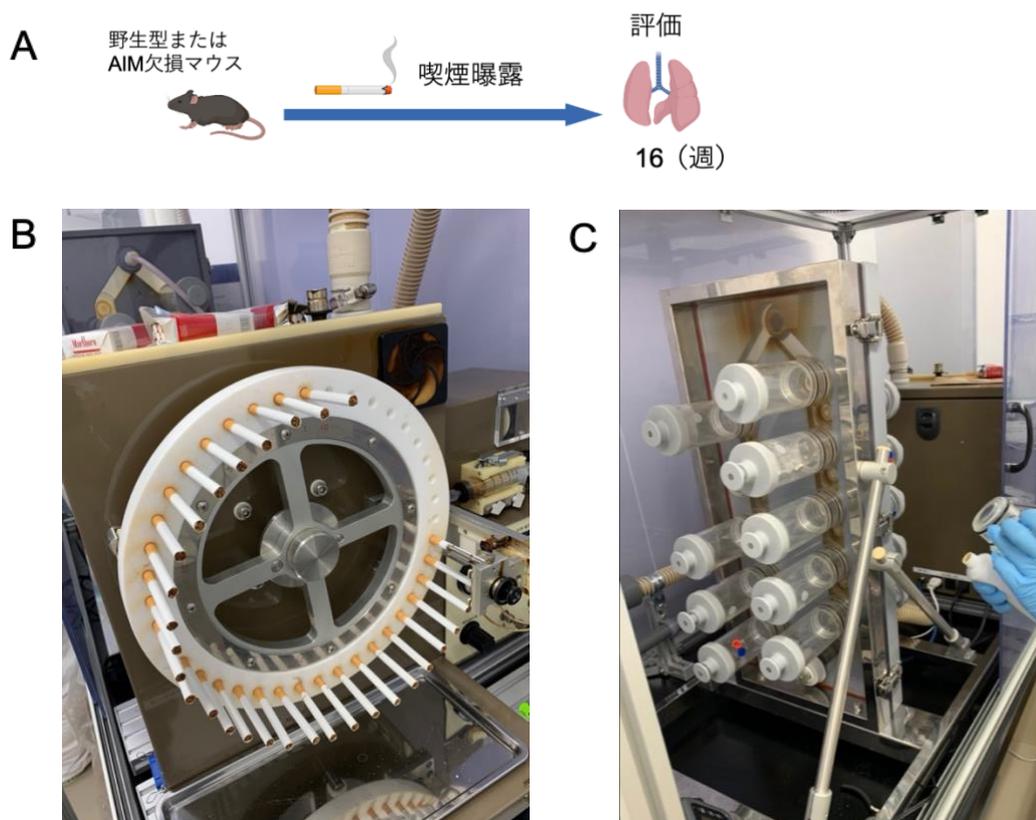


図 2 CS 曝露誘導肺気腫モデルマウスの実験

(A) 実験フロー. (B) タバコ煙発生装置. (C) 喫煙曝露装置 (白い蓋のカ)

プセルはマウスへの曝露吸入チャンバー).

気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage: BAL) 液の回収と処理

生理食塩水 0.6 ml を 1.0 ml シリンジにて先述の通り留置した静脈留置針からマウスの肺内へ注入し, 次に吸引した. これを 3 回行って得られた液を BAL 液とした. BAL 液は氷上で保存後 250 xg, 5 分間, 4°C で遠心分離し, 上清を -80°C で凍結保存した. BAL 液が目視で赤色調だった場合に出血があると判断し, RBC Lysing Buffer Hybri-Max (Sigma-Aldrich) 500 μ l を加えて懸濁し 1 分整置, その後再度同条件で遠心して上清を除去することで赤血球を除去した. ペレットは PBS 100 μ l に懸濁した. 懸濁液 13.5 μ l と Acridine Orange/Propidium Iodide (AO/PI) Stain (エル・エム・エス) 1.5 μ l を混和してセルカウントスライド (Logos Biosystems) に注入し, 自動セルカウンターの Luna (Logos Biosystems) に挿入して 1 個体当たりの生細胞数を測定した. 残りの懸濁液は細胞数が約 3×10^4 個となるようにスライドガラス上に滴下し, 70 xg, 10 分間, 室温で遠心し細胞塗沫した後乾燥させて細胞標本を作成した. その後 Diff-Quik 染色液 (シスメックス) を用いて染色, 封入した後 1000 倍で鏡検し, 1 個体当たり計 400 個以上の細胞をカウントし, 細胞分画の割合を算出した. 各細胞分画の生細胞の絶対数は, 細胞分画の割合と 1 個体当たりの生細胞数との積により算出した.

肺凍結標本の作成

Tissue-Tek O.C.T. compound (サクラファインテック) と PBS を 1:1 の割合で混合し 5% スクロースを加えた溶液を, 留置した静脈留置針から気管内へ肺が完全に膨張するまで注入し, 絹糸で気管を結紮した. 肺組織から気管などの縦隔組織を分離し, 肺を肺葉ごとに切離した状態で, ドライアイス上で冷却したクリオモルド 3 号に載せ, Tissue-Tek O.C.T. compound で包埋し凍結標本を作成した. これは使用するまで -80°C で保存した. 使用時には, ミクロトーム LEICA 2000 (LEICA) で薄切した.

ホルマリン標本の作成

10% 中性緩衝ホルマリン (マイルドホルム 10N, 和光富士フィルム) を留置した静脈留置針から 25 cmH₂O の圧で 5 分間肺内へ注入し, その後絹糸で結紮した. その後上記のホルマリンを満たした容器内へ肺を入れ, ローテーターにて肺組織に物理的刺戟がないように緩徐な速度で約 48 時間回転さ

せながらホルマリン固定を行った。その後外部委託にて FFPE を作製した。使用時にはミクロトーム LEICA RM2235 (LEICA) で 5 μm の厚さに薄切した。

肺気腫形成の評価

肺気腫定量の指標である平均肺胞間距離 (mean linear intercept: MLI)を用いて評価した(Thurlbeck, 1967)。肺気腫が強ク形成されるほど気腔が拡大し、MLI が高値となる。まず BZ-9000 オールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス) を用い、上記の FFPE から作製したヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本から各個体の肺葉が全て含まれるような連結画像を作成した。さらにその連結画像を長軸方向が水平になるような角度とし、画像処理ソフト Image-Pro Plus version 7.0 (Media Cybernetics) にて長さ 100 μm 、間隔 100 μm 、平行する線分の距離 200 μm の水平方向のグリッド線を設定した。線分のうち、胸膜から 600 μm 以上離れた線分群のうち最も多く直線上に並んだものを特定した。さらにそのうち明らかに血管や気管支と交わるまたは重なる線分を除外した線分を有効線分と定義し、有効線分の肺胞壁との交点の数をカウントした。有効線分の長さの総和を肺胞壁との交点の数で除することにより、各肺葉の MLI を算出した。これを全ての肺葉に対して行い、各個体の平均 MLI を求めた。

マウス肺胞マクロファージの分離

生理食塩水 1.0 ml を 1.0 ml シリンジにて先述の通り留置した静脈留置針からマウスの肺内へ注入し、次に吸引し BAL 液を回収した。この作業を 1 個体当たり 15 回、野生型マウスと AIM 欠損マウスで各 4 匹ずつ行った。BAL 液は氷上で保存後、250 μg 、5 分間、4°C で遠心分離し、上清を除去して計 4 匹分のペレットを懸濁・混和し 1 つの懸濁液とした。懸濁液 13.5 μl と Acroclin Orange 1.5 μl を混和してセルカウントスライド (Logos Biosystems) に注入し、自動セルカウンター Luna に挿入して 1 サンプル当たりの生細胞数を計算した。各ウェル当たりの細胞数が 2×10^4 個となるように 24 ウェルプレートに懸濁液を注入し、RPMI 1640 (gibco) 培地、10% ウシ胎児血清 (Biosera)、100 U/ml ペニシリン・ストレプトマイシン (gibco) を添加して 1 時間、37°C にてインキュベートした。その後培地を吸引し PBS で洗浄し、ウェルに残存した細胞を肺胞マクロファージとした。

タバコ抽出液 (cigarette smoke extract: CSE) の精製とマウス肺胞マクロフ

アージ刺激

市販タバコ (Marlboro, ニコチン 0.9 mg, タール 12 mg, フィリップモリス・ジャパン) 2本の主流煙を RPMI 1640 15 ml の中に吹き込み回収した。具体的な手法としてはタバコのフィルター側に接続部品としてバイオパイプ (TOKAI) を装着し、透明チューブを接続した。タバコに点火後チューブを通して 50 ml シリンジで陰圧をかけ主流煙を 1 秒あたり 10 ml の速度で 60 ml 吸引した。次に、3 方活栓を回すことによりさらに別の透明チューブを介して、吸引した主流煙を RPMI 1640 15 ml を入れた 50 ml チューブ内に 1 秒あたり 1 ml の速度で送気した。この吸引と送気のサイクルを繰り返し行った。タバコがフィルター手前まで燃焼すると終了とし、1 本あたり 5, 6 サイクル行った。タバコ 2 本分の主流煙の送気終了に 0.22 μm フィルター (東洋濾紙) を通して濾過滅菌し、これを「100% CSE」とした。100% CSE は pH 試験紙 (MACHEREY-NAGEL) にて pH 7.0-7.4 の範囲であることを確認後、目的の濃度となるように RPMI 1640 で希釈した。作製後は室温で保存し、30 分以内に細胞実験に使用した。

上記により希釈した 1% CSE を、先述の通り分離・培養開始した肺胞マクロファージに 1 ウェル当たり 500 μl 添加し、6, 12, 24 時間後に細胞と培養上清を回収した。また AIM 欠損マウスから得られた肺胞マクロファージの一部ではリコンビナント AIM 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を培養開始時と 6, 12, 18 時間後に添加した (図 3)。マウスリコンビナント AIM は宮崎徹先生と新井郷子先生が自家精製し (Miyazaki et al, 1999), ご厚意により提供された。細胞は ribonucleic acid (RNA) 抽出キット RNeasy Mini Kit (Qiagen) の RLT buffer を添加して細胞ライセートとし、回収して -80°C で保存した。

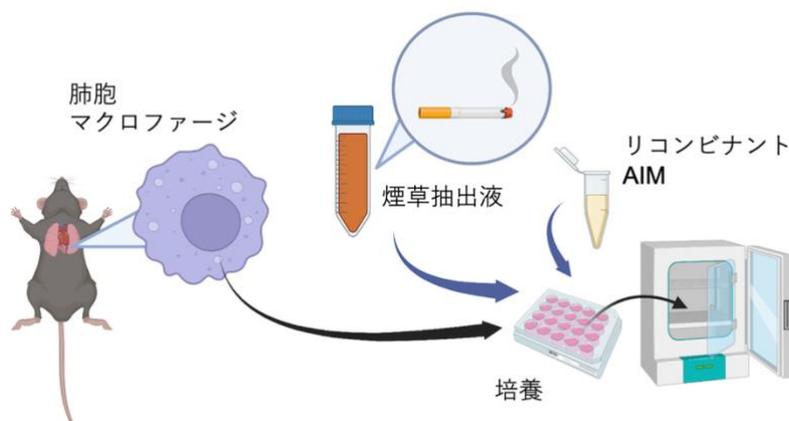


図 3 CSE 刺激マウス肺胞マクロファージの実験

RNA 抽出と定量 real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

マウス肺や細胞ライセートより, RNeasy Mini Kit を用いてプロトコル通りに RNA を抽出した. High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用い, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) にて cDNA 合成を行った. StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) にて PCR 反応を行った. PCR プローブは TaqMan Gene Expression Assays probes (Applied Biosystems) を用いた. 全ての値は内在性コントロールとして用いた β_2 -microglobulin との比で算出した. 使用した PCR プローブは下記の通りである.

MMP-12 (Mm00500554_m1), MMP-9 (Mm00442991_m1), IL-1 β (Mm00434228_m1), IL-4 (Mm00445259_m1), IL-5 (Mm00439646_m1), IL-6 (Mm00446190_m1), IL-13 (Mm00434204_m1), IL-33 (Mm0050403_m1), thymic stromal lymphopoietin (TSLP) (Mm00442991_m1), tumor-necrosis factor (TNF)- α (Mm00443258_m1), interferon (IFN)- γ (Mm01168134_m1), C-C motif chemokine ligand (CCL)2 (Mm00441242_m1), C-X-C motif chemokine ligand (CXCL)5 (Mm00436451_g1), Cd51 (Mm00437566_m1), and β_2 -microglobulin (Mm00437764_m1)

タンパク質解析

Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) 法については, 下記のキットを用いてプロトコル通りに測定を行った.

IL-33 (Mouse IL-33 DuoSet ELISA; R&D Systems, Minneapolis, CA, USA), MMP-12 (Mouse MMP-12 Kit Price PicoKine; BOSTER Biological Technology, Pleasanton, CA, USA), IL-1 β (Quantikine ELISA Mouse IL-1 β /IL-1F2 Immunoassay; R&D Systems), AIM (Human Apoptosis Inhibitor of Macrophage ELISA kit; Trans Genic Inc, Kobe, Japan), IgM (Human IgM ELISA Quantitation Set; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA). 基質の反応後は Varioskan Flash (ThermoScientific) を用いて吸光度を測定し, 4 パラメーターロジスティック回帰で検量線を作成・解析した.

外部委託での BAL 液中のタンパク質多項目解析は, Luminex Discovery Assay (10-Plex) LXSAMSM-10 のパネル (Luminex) を用いた.

TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色

In situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (Roche) のキットを用いた。マウス肺 FFPE 未染スライドを脱パラフィン・再水和した後、プロテインナーゼ K で 15 分、室温にて反応させ抗原賦活化した。その後キットの TUNEL reaction mixture 50 μ l をマウントして 60 分、37°C で反応させた。その後 1000 分の 1 の濃度の Hoechst (同仁化学) で 1 分核染色し、封入した。BZ-X810 オールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス) にて 40 倍で各個体あたりランダムに 12 視野を観察し、陽性細胞数をカウントした。

cleaved caspase-3 免疫組織化学染色

21 日目のマウス肺組織の FFPE 未染スライドを脱パラフィン・再水和した後に 0.01 mol/l クエン酸緩衝液で 30 分、95°C で加熱し抗原賦活化を行った。冷却後に 3% 過酸化水素/メタノールに 10 分室温で浸透し内因性酵素を除去した。次に 5% ヤギ血清 (Sigma-Aldrich) で 40 分、室温でブロッキングを行った後、1 次抗体の Cleaved caspase-3 Rabbit antibody (Cell Signaling Technology) をシグナル増幅のため CanGetSignal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution B (TOYOBO) で希釈して 1:1000 の濃度として 4°C で一晩反応させた。その後 2 次抗体である anti-rabbit IgG-HRP (DAKO) を 1:100 の濃度で 60 分、室温で反応させた。その後 Dako liquid DAB+ substrate Chromogen System (Agilent Technologies) で発色させ、マイヤーヘマトキシリン (武藤化学) で 1 分対比染色をした後脱水・封入した。顕微鏡にて対物 40 倍で観察し、各個体あたりランダムに 12 視野を観察し、陽性細胞数をカウントした。

当科外来患者における血漿 AIM/IgM 比の測定

北海道大学病院内科 I (現・呼吸器内科) に通院する非喫煙者、COPD を有しない健常喫煙者、COPD を有する喫煙者の計 3 群が研究に参入し、末梢血を採取した。参加者は全員 40 歳以上とした。各群の喫煙状況の定義としては、非喫煙者は喫煙歴が 10 pack-year 以下で、かつ参入時点で 10 年以上禁煙していること、健常喫煙者は 20 pack-year 以上、COPD 患者については 40 pack-year 以上とした。また気管支拡張薬吸入後の 1 秒率が 70% 未満であり、かつ computed tomography (CT) で肺気腫を認める患者を COPD ありと定義した。年齢、性別、肺機能を含む患者情報は医療記録から収集した。除外基準は気管支喘息や慢性下気道感染などの他の慢性呼吸器疾患や血液悪性腫瘍を有する患者、悪性腫瘍に対して殺細胞性抗癌剤での加療中である患者、好中球機能不全を有する患者、1 ヶ月以内に COPD の増悪または気道感染を

発症した患者, その他研究責任者により不適格と判断された患者とした. この度は 16 人の非喫煙者, 15 人の健常喫煙者, 19 人の COPD 患者の計 50 人のデータを解析した. この研究は北海道大学病院倫理委員会の承認を受け (承認番号 012-0075), ヘルシンキ宣言に則って行われた. また全参加者から同意書を取得した. 血中 AIM 値は血中 IgM 値と相関することが知られており, IgM 値変動による影響を小さくするために AIM を IgM との比で評価した. 血漿 AIM, IgM は前述の ELISA キットを用いプロトコル通りに測定し, 3 群間の血漿 AIM/IgM 比を解析・比較した.

北海道 COPD コホート研究に参加した患者での血清 AIM/IgM 比の測定

北海道 COPD コホート研究の患者は北海道大学病院内科 I (現・呼吸器内科) および 9 つの関連施設から参入した (Makita et al, 2007; Nishimura et al, 2012; Suzuki et al, 2016). 全員参加取得時に 40 歳以上で 10 pack-year 以上の喫煙歴を有し, 気管支拡張薬投与後の 1 秒率が 70%未満であった. 臨床的に明らかな気管支喘息や肺機能の経年変化に影響を及ぼすと考えられる肺疾患 (肺癌, 肺結核, 間質性肺炎など) や肺切除歴を有する患者は除外された.

観察開始から最初の 5 年間は増悪に関する情報を記録し, 5 年目から 10 年目にかけての次の 5 年間は予後調査を行った. 死因は呼吸器疾患 (呼吸不全, 肺炎, 肺膿瘍を含む), 悪性腫瘍, 心血管疾患, その他の 4 つに分類された. ベースラインで胸部 CT を撮影し, 肺気腫の重症度を肺野全体の低吸収域面積の割合でスコア化した (Goddard et al, 1982). 研究プロトコルは北海道大学医学部倫理委員会に承認され (承認番号: 医 02-001), 患者全員より同意書を取得した. 研究はヘルシンキ宣言に則って行われた.

フォローアップを開始した COPD 患者 300 人のうち除外基準に該当した 21 人, 検体不足のため測定不可であった 152 人が除外され, 最終的に 133 人の血清 AIM 値と IgM 値を先述のキットを用いて測定した. ベースラインでの Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) 分類での重症度別に血清 AIM/IgM 比を比較した. 血清 AIM/IgM 比の四分位で患者を 1. 第一四分位数未満, 2. 第一四分位数以上第三四分位数未満, 3. 第三四分位数以上の計 3 群に分類し, 各群の 5 年以内の予後を解析した. 予後の具体的な評価項目は, 呼吸器疾患関連の処方変更で定義した COPD の初回増悪までの期間, 10 年以内の全死亡率と呼吸器関連死亡率とした. さらに年齢 (1 才増加あたり), 現喫煙, 血清 AIM/IgM 比 (自然対数の 1 上昇あたり) を共変量として多変量解析を行った.

統計解析

動物実験のデータについては、平均 ± 標準誤差で数値を表した。2 群間のデータ比較には Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors の検定で正規性を評価し (Lilliefors, 1967), Welch の t 検定 (多重解析した場合はさらに Holm 補正を行った) または Mann-Whitney の U 検定のうち適する方を用いた。コントロール群を有しない 3 群間の比較には Tukey-Kramer 検定, コントロール群を有する 3 群以上の比較には Dunnett 検定を用いた。臨床研究のデータについては、グループ間の差は Kruskal-Wallis 検定, chi 二乗検定, Tukey-Kramer 検定を用いた。重症度毎の血清 AIM/IgM 比の解析には Jonckheere-Terpstra 検定, 血清 AIM/IgM 比毎の予後解析には Kaplan-Meier 法, 多変量解析では Cox 比例ハザードモデルを用いた。統計解析は GraphPadPrism version 8.4.3 (GraphPad Software), または統計ソフトウェア R (The R Foundation for Statistical Computing) の改変版である EZR version 1.61 (自治医科大学埼玉医療センター) を使用した。p<0.05 を有意差ありと判定した。

結果

PPE 誘導 (porcine pancreas elastase) 肺気腫マウスの実験モデル確立

まず予備実験にて PPE 投与条件を検討した。7 週齢・雄の野生型マウスに PPE を投与し、21 日後の mean linear intercept (MLI) を算出して肺気腫形成の程度を評価した。PPE 投与は 1. 0.1 単位 3 回, 2. 0.2 単位 3 回, 3. 0.3 単位 3 回の計 3 群とし、投与は 0, 7, 14 日目とし、コントロール群と比較した (図 4)。

PPE 0.1 単位群ではコントロール群と比較して有意に MLI が高値であり、気腫は軽度だが形成された。PPE 0.2 単位群ではさらに強く肺気腫が形成された。PPE 0.3 単位群は肺内の炎症細胞浸潤が強く肺胞壁の肥厚が目立ち、MLI がカウントできない領域が多かった。MLI 値も増加せず、コントロール群との差もなかった。いずれの群でも死亡はなかったが、PPE 0.3 単位投与群では多くのマウスで投与数日間ほど、強く衰弱した様子が見られたため、単回投与とした。PPE 0.2 単位群はマウスの衰弱は軽度で強い肺気腫形成がされたため、これを今回の実験の条件として用いることにした。また雌の同週齢野生型マウスに 0.1 単位 3 回で PPE を投与したところ、死亡マウスはなく肺気腫が形成され、雌についてはこの量が適切と考えられた。

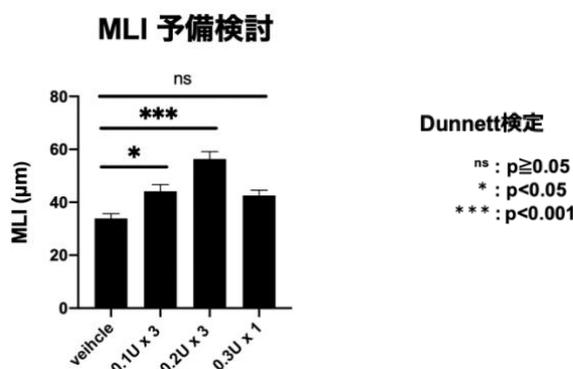


図 4 肺気腫評価による PPE 投与用量の予備検討 (n=4-6)

PPE 誘導肺気腫マウスでの肺気腫、肺内炎症、細胞死の評価

雄の野生型及び AIM 欠損マウスにて 0.2 単位 3 回投与にて PPE 投与実験を行い MLI にて肺気腫形成を評価した (図 5A, B)。PPE 投与群では AIM 欠損マウスで野生型より有意に MLI が低く、肺気腫形成が抑制されていた。

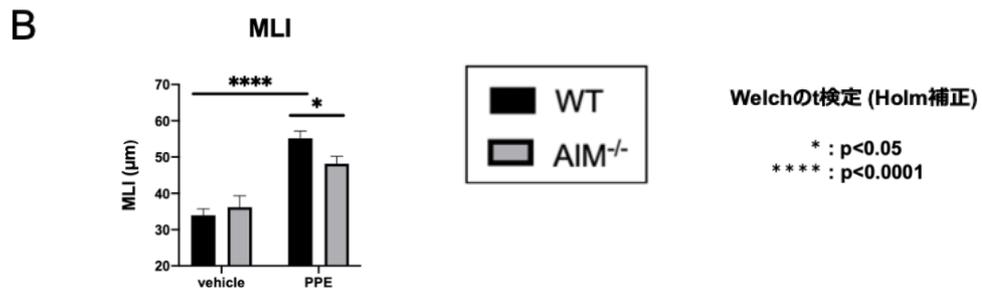
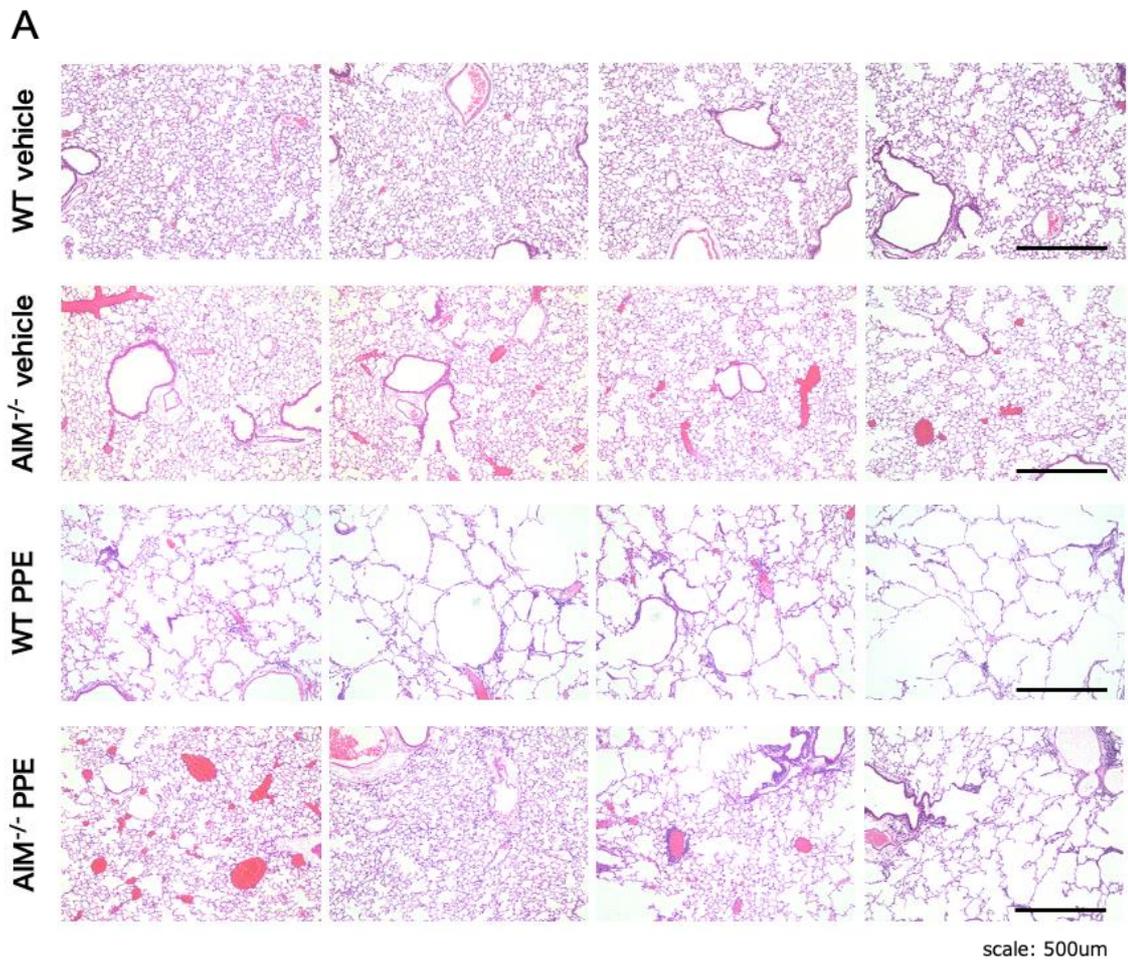


図5 雄 PPE 投与肺気腫マウスでの肺気腫形成 (n=4-6)

(A) HE 染色標本の写真. Scale: 500 μm. (B) MLI による肺気腫形成の評価.

また、補足実験として雌の同週齢野生型マウスでも PPE 0.1 単位 3 回投与にて類似実験を行ったところ、雄と同様に AIM 欠損マウスで肺気腫形成が抑制された (図 6).

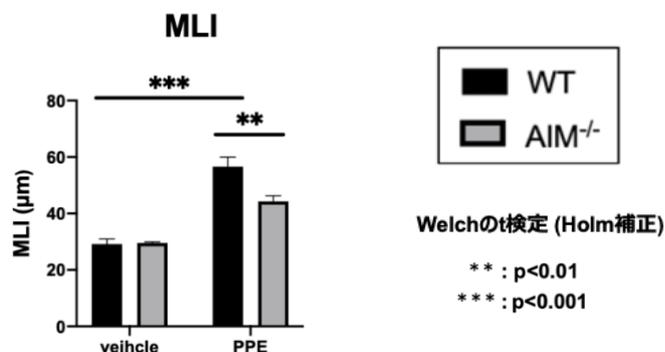
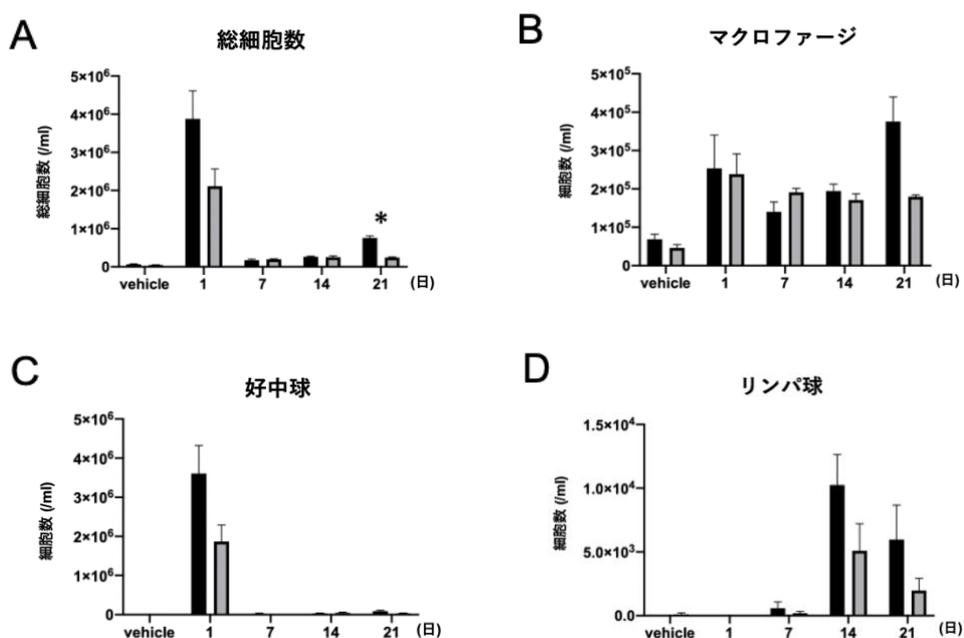


図 6 補足実験：雌 PPE 投与肺気腫マウスでの肺気腫評価 (n=5-6)

以降は雄マウスにて実験を行った。野生型及び AIM 欠損マウスにて 0.2 単位 3 回投与にて PPE 投与実験を行ったところ、AIM 欠損マウスで野生型より有意に BAL 液中の総細胞数、好酸球数が抑制された (図 7)。マクロファージ、好中球、リンパ球についても、有意差に至らないものの同様の傾向が見られた。



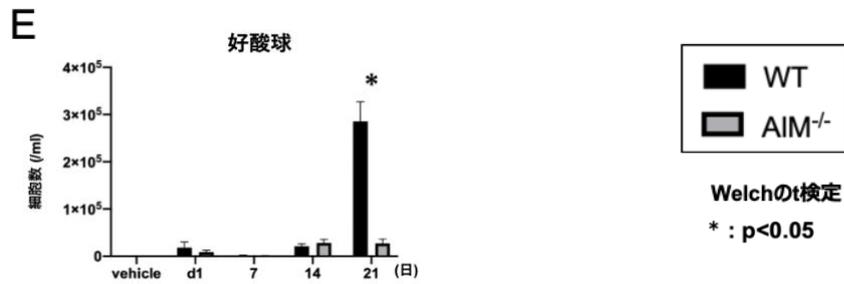


図7 PPE投与肺気腫マウスにおけるBAL液中の炎症細胞数 (n=4-6)

(A) 総細胞数. (B) マクロファージ. (C) 好中球. (D) リンパ球. (E) 好酸球.

次にTUNEL染色により0, 7, 14, 21日目での細胞死を評価した(図8). PPE投与群において21日目での陽性細胞数が増加傾向にあり, 細胞死の増加が示唆された. この増加は野生型マウスと比較するとAIM欠損マウスにおいて有意に抑制されていた. また7, 14日目においても同様の傾向が見られた.

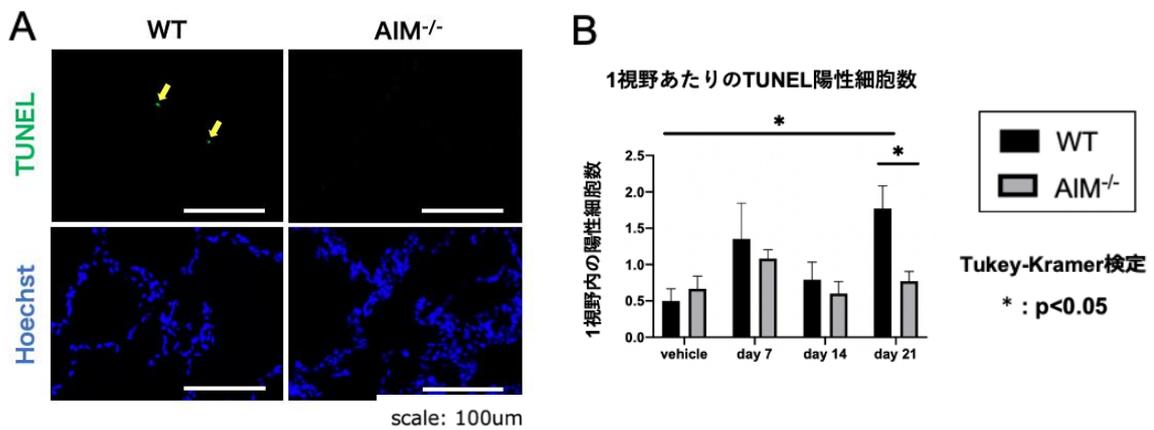


図8 PPE投与肺気腫マウス肺における細胞死 (n=3-6)

(A) 21日目におけるTUNEL染色標本の写真. Scale: 100 μm. (B) 7, 14, 21日目での1視野あたりのTUNEL陽性細胞数.

次に cleaved caspase-3 染色により 21 日目でのアポトーシス細胞死を評価した (図 9). PPE 投与群においてコントロール群より陽性細胞数が増加しており, アポトーシスの増加が示唆された. この増加は AIM 欠損マウスにおいてわずかに抑制されているように見られたが, 有意差に至らなかった.

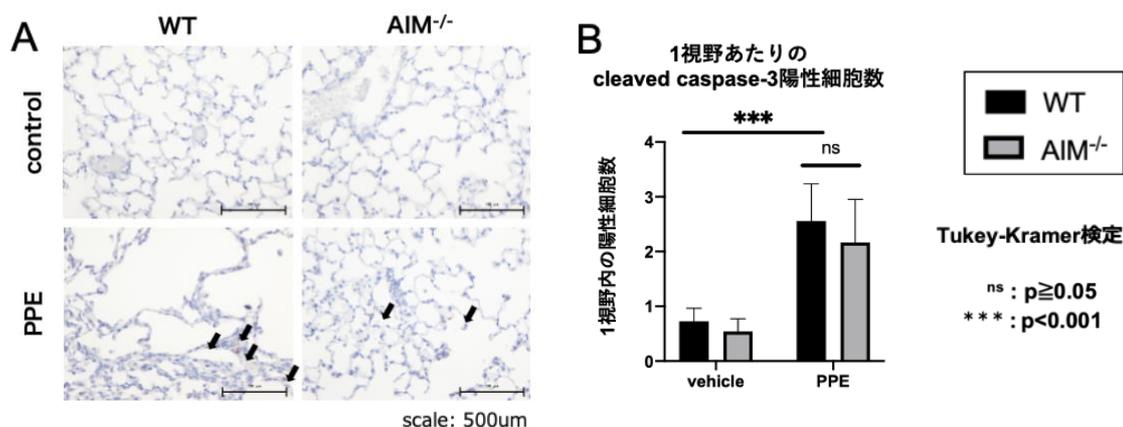


図 9 PPE 投与肺気腫マウス肺におけるアポトーシス (n=5-6)

(A) cleaved caspase-3 染色標本の写真. Scale: 100 μ m. (B) 1 視野あたりの cleaved caspase-3 陽性細胞数.

PPE 誘導肺気腫マウスでの遺伝子発現・タンパクの評価

肺内の遺伝子発現を RT-PCR 法にて評価した. 14 日目の MMP-12 と IL-33 の上昇が AIM 欠損マウスで抑制されていた (図 10B, F). MMP-12 については 21 日目でも抑制傾向であったが有意差に至らなかった. ほか, 有意差に至らなかったが 14, 21 日目の IL-5, 1 日目の TNF α で同様の傾向が見られた (図 10D, G). 他のタンパクは一定の傾向は見られなかった (図 10A, C, E, H, I). IL-5 に傾向差を認めたため他の 2 型炎症サイトカインである IL-4, IL-13 も測定したが, ほぼ全て感度以下であり, 発現が見られなかった. TSLP も同様であった.

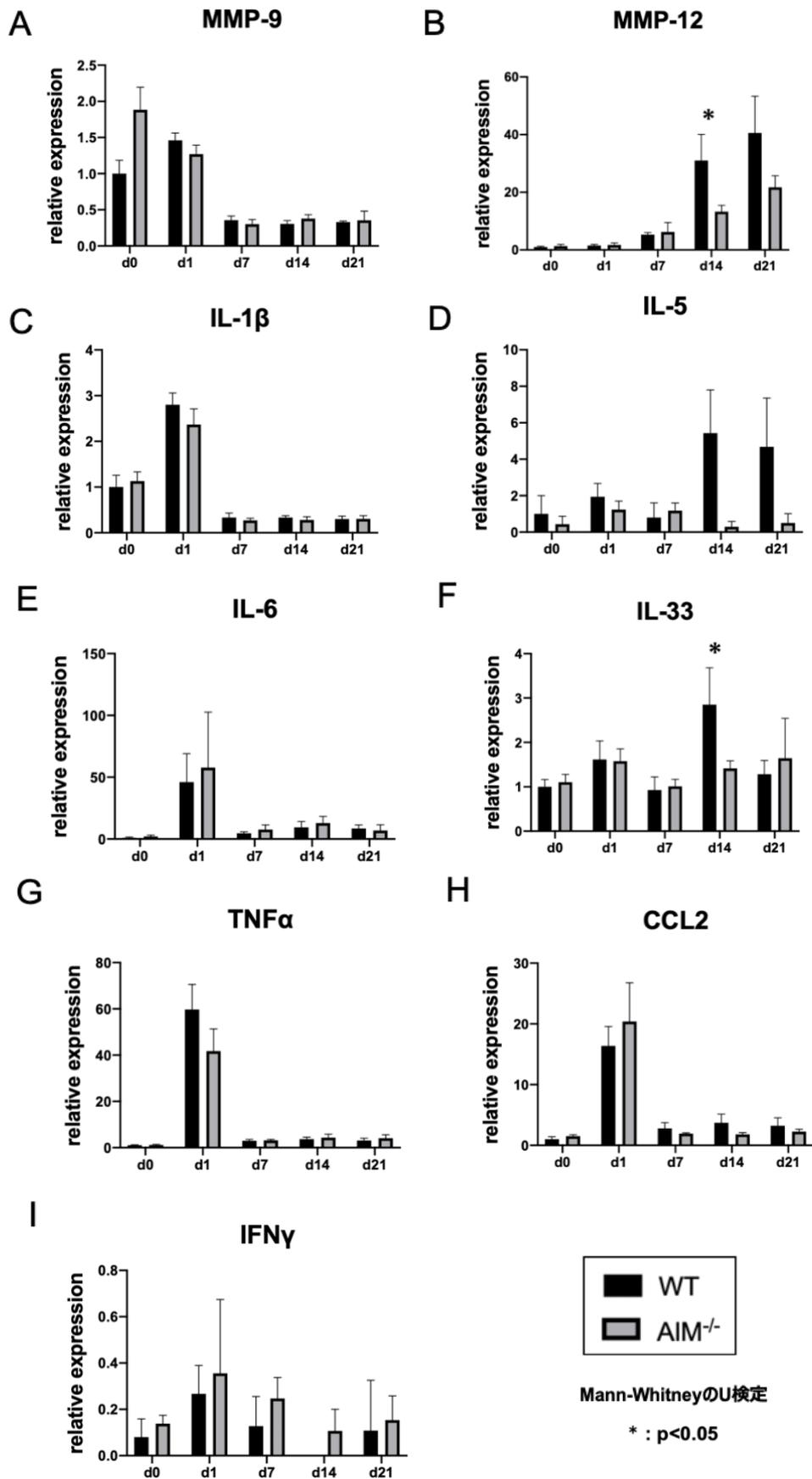


図 10 PPE 投与肺気腫マウス肺における遺伝子発現 (n=3-4)

(A) MMP-9. (B) MMP-12. (C) IL-1 β . (D) IL-5. (E) IL-6. (F) IL-33. (G) TNF α .
(H) CCL2. (I) IFN- γ .

次に野生型マウス肺での AIM 遺伝子発現を評価した (図 11). 21 日目に
おいて 0 日目よりやや増加する傾向は見られたものの有意差に至らず, 個
体間のばらつきもかなり大きかった.

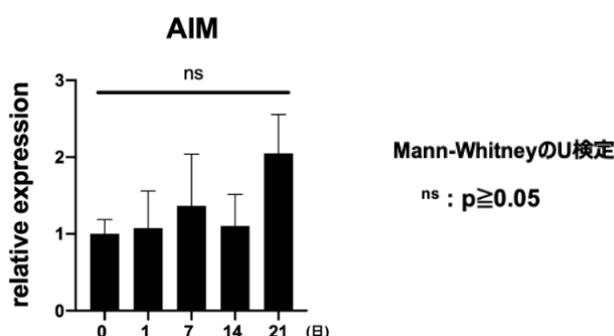
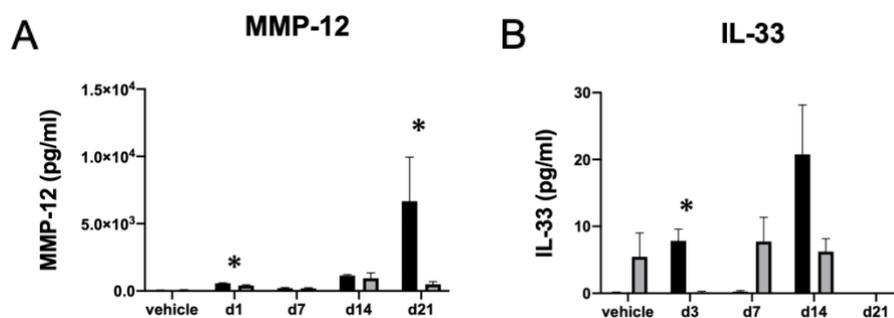


図 11 PPE 投与肺気腫マウス肺における AIM 遺伝子発現 (n=3-4)

次に遺伝子発現に有意差が見られた MMP-12 および IL-33, 傾向差を認め
た IL-1 β について BAL 液中のタンパク量を ELISA 法にて評価した. 1, 21 日
目の MMP-12 発現上昇は AIM 欠損マウスで野生型マウスより有意に抑制
された (図 12A). IL-33 でも同様に 3 日目で有意に抑制され, 有意差に至ら
ないものの 14 日目でも同様の傾向を認めた (図 12B). また IL-1 β につい
ては 1, 14 日目で AIM 欠損マウスにおいて上昇が抑制される傾向であった
(図 12C).



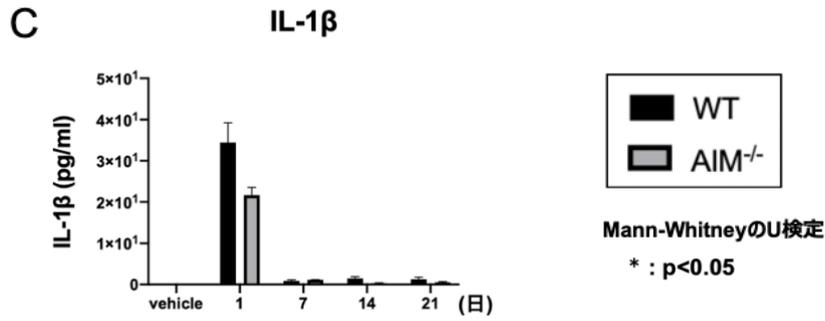


図 12 PPE 投与肺気腫マウス BAL 液におけるタンパク発現 (n=3-4)
 (A) MMP-12. (B) IL-33. (C) IL-1 β .

また, 0, 7 日目の BAL 液中の他のサイトカインやケモカインなどを外部委託にてマルチプレックスで測定した. しかし全体的に測定感度以下が多く, 解析には不適切と考えられた. コントロール群と比較して PPE 群で野生型・AIM 欠損マウス共に CXCL1/KC, CXCL2/macrophage inflammatory protein (MIP)-2 が 21 日目に上昇していたが, vascular endothelial growth factor (VEGF) は逆に低下した (図 13A-E). IFN- γ , TNF α , IL-5 については全て測定感度以下であった. いずれにおいても野生型・AIM 欠損マウス間の差は見られなかった.

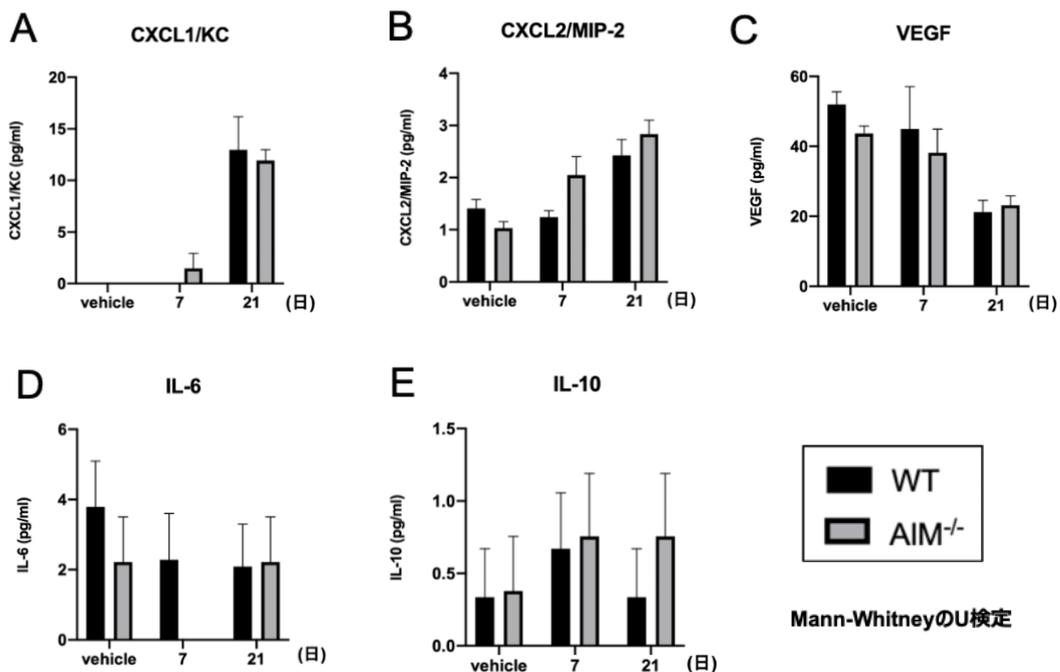


図 13 PPE 投与肺気腫マウス BAL 液におけるタンパク発現 (外部委託, n=4)

(A) CXCL1/KC. (B) CXCL2/MIP-2. (C) VEGF. (D) IL-6. (E) IL-10.

CS (cigarette smoke)誘導肺気腫マウスでの肺内炎症, 肺気腫, 細胞死の評価

野生型及び AIM 欠損マウスに CS 曝露を行ったところ, 有意差に至らないものの AIM 欠損マウスで野生型より 4 週後の BAL 液中の総細胞数, マクロファージ, 好中球, リンパ球が減少する傾向にあった (図 14A-D). 中でも曝露後全ての時点において好中球の抑制傾向が強かった. 好酸球は全てのマウスにおいて観察されなかった.

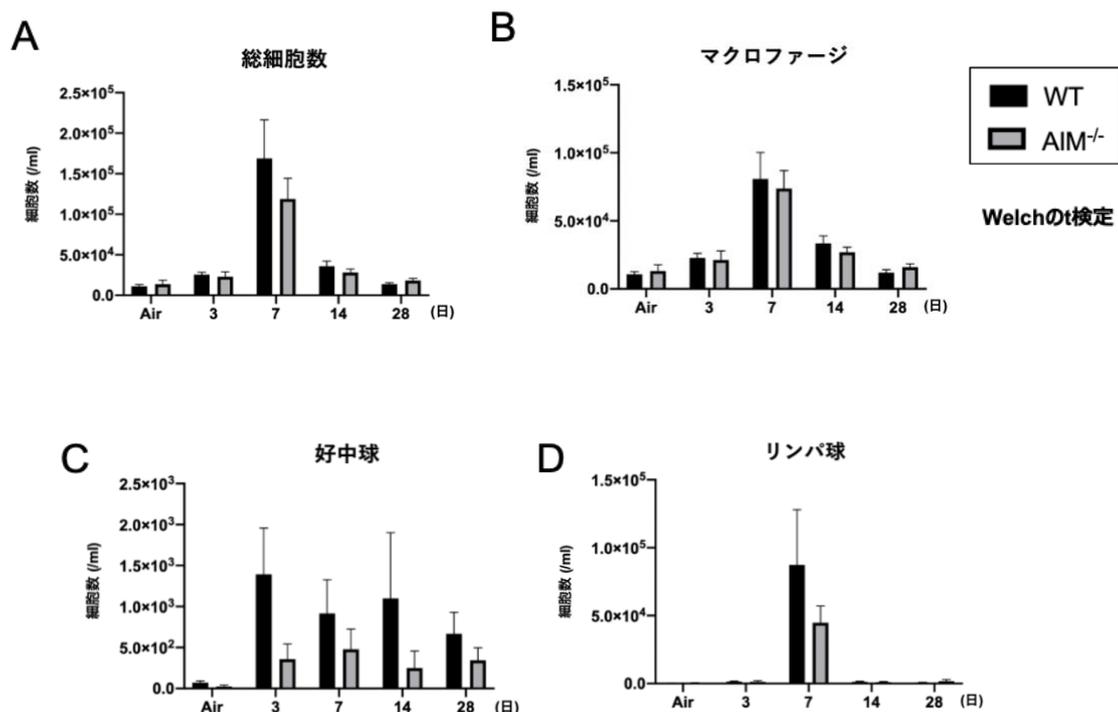


図 14 CS 誘導肺気腫マウス BAL 液中の細胞数 (n=4-8)

(A) 総細胞数. (B)マクロファージ. (C) 好中球. (D) リンパ球.

次に MLI にて肺気腫を評価したところ、PPE マウスモデルと同様に、CS 曝露群で AIM 欠損マウスにおいて有意に肺気腫形成が抑制されていた (図 15A, B).

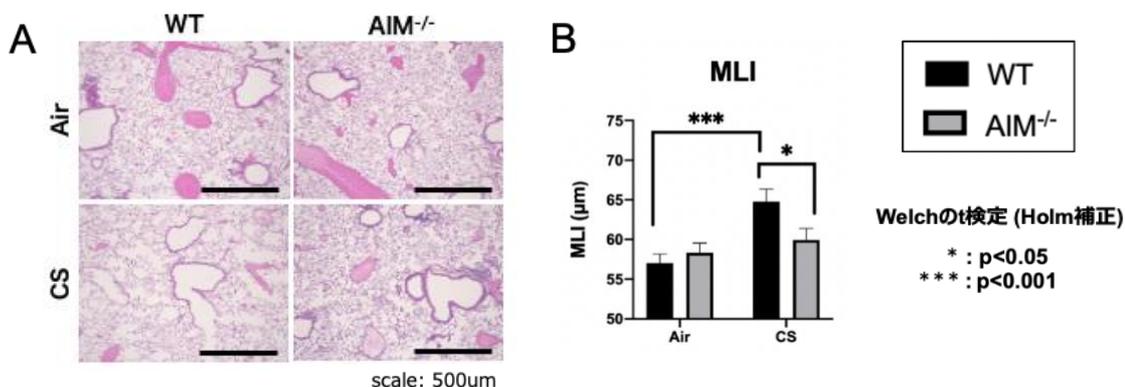


図 15 CS 誘導肺気腫マウスでの肺気腫形成 (n=4-8)

(A) HE 染色標本の写真. Scale: 500 μm. (B) MLI による肺気腫形成の評価.

また、TUNEL 染色で評価した 21 日目の肺内の細胞死を評価した。PPE マウスモデルと同様に、CS 曝露群では AIM 欠損マウスにおいて有意に陽性細胞数が少なく、細胞死が抑制されていた (図 16A, B).

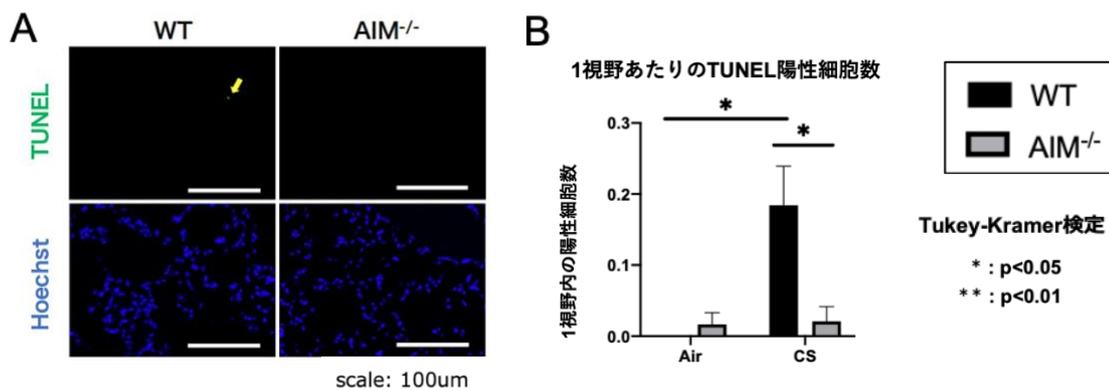


図 16 CS 誘導肺気腫マウス肺における細胞死 (n=4-8)

(A) TUNEL 染色標本の写真. Scale: 100 μm. (B) 1 視野あたりの TUNEL 陽性細胞数.

CS 誘導肺気腫マウス肺での遺伝子発現の評価

CS 短期曝露群において、4 週までの各時点で肺内の遺伝子発現を評価した。また 3 日目の IL-1 β , 3, 28 日目の IL-6, 7 日目の CCL2, 28 日目の CXCL5 が AIM 欠損マウスで抑制されていた (図 17A-D)。MMP-12 発現は 28 日目で野生型より AIM 欠損マウスで抑制される傾向が見られたものの、他の時点ではむしろ上昇する傾向にあった。いずれも有意差には至らなかった (図 17E)。

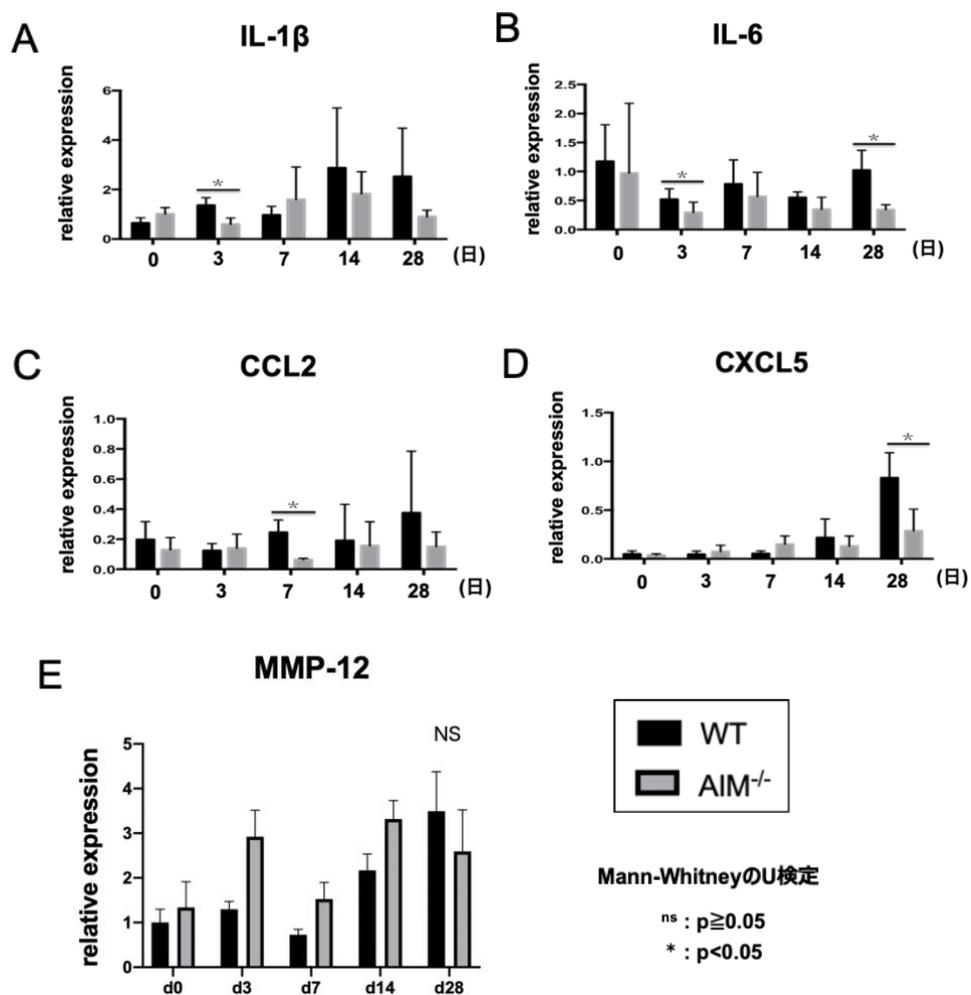


図 17 PPE 投与肺気腫マウス肺における遺伝子発現 (n=4-8)

(A) IL-1 β . (B) IL-6. (C) CCL2. (D) CXCL5. (E) MMP-12.

マウス肺胞マクロファージの CSE (cigarette smoke extract) 刺激条件の検討

次にマウス肺胞マクロファージに CSE を添加して MMP-12 の発現評価を行うこととした。CSE の濃度検討を行うため、0.5%、1%、2.5%、5% CSE を作製して雄野生型マウス 4 匹から得た肺胞マクロファージを刺激し、6、24 時間後に回収して細胞中の MMP-12 遺伝子発現を評価した (図 18A, B)。

0.5% CSE 群では CSE を添加しないコントロール群と比較して 6、24 時間での MMP-12 発現上昇が見られたが、6 時間での上昇が不十分であった。1% CSE 群では 6、24 時間ともに上昇が見られた。2.5% CSE 群は 6 時間での発現上昇は最大であったが細胞死が増加し、24 時間後の発現も大きく低下する細胞が見られた。5% CSE では細胞死がさらに増加して 6 時間後の発現上昇も見られず、CSE の毒性が高すぎると判断した。以上より 1% CSE が MMP-12 発現評価を行うのに適すると判断し、本実験に用いることとした。

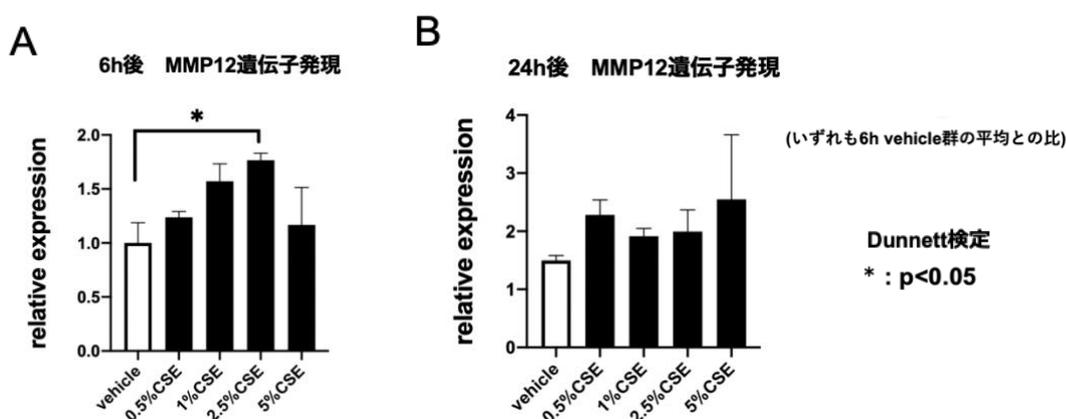


図 18 CSE 濃度検討 (CSE 刺激肺胞マクロファージでの MMP-12 遺伝子発現評価, n=3-4)

(A) 6 時間後. (B) 24 時間後.

マウス肺胞マクロファージの CSE 刺激による MMP-12 発現量の検討

次に本実験として、肺胞マクロファージを 1% CSE で刺激し MMP-12 遺伝子発現を評価した (図 19). 6、12、24 時間後全てにおいて、AIM 欠損マウスにおいて野生型より MMP-12 遺伝子発現が抑制されていた。AIM 欠損マウスにおけるこの抑制は 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ リコンビナント AIM 添加により大きく改善し、むしろ野生型マウスを上回った。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ リコンビナント AIM 添加 AIM 欠損マウス群でも同様であったが、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加群よりその上昇の程度は低かった。野生型へリコンビナント AIM を添加すると 6 時間後では AIM 欠

損マウスと同様に発現が上昇したが 12 時間後では変化は見られず, 24 時間後では逆に低下した.

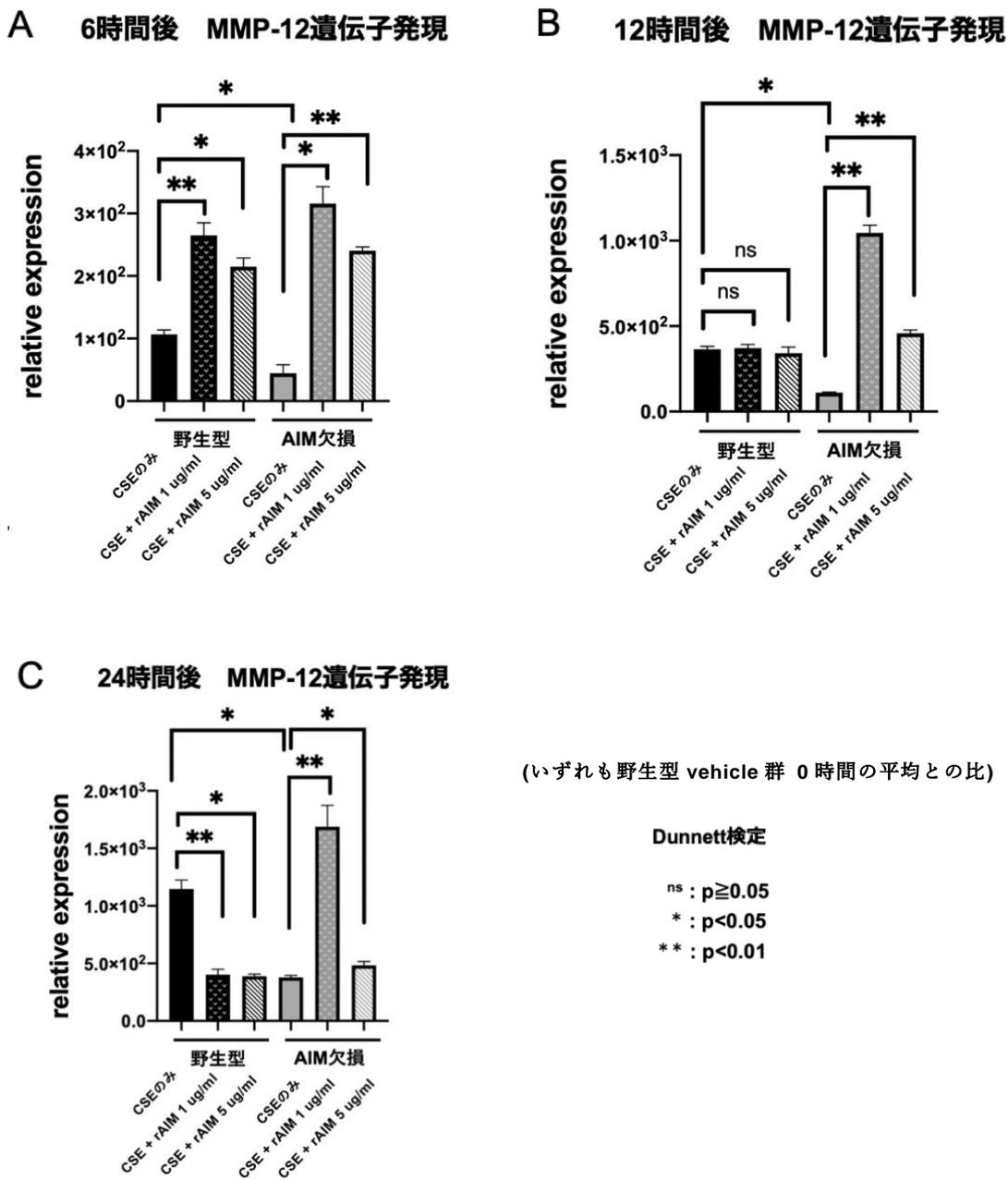


図 19 CSE 刺激肺胞マクロファージでの MMP-12 遺伝子発現 (n=3-5)
 (A) 6 時間後. (B) 24 時間後.

次に培養上清中の MMP-12 タンパク量を評価した (図 20). 12 時間後で

AIM 欠損群が野生型群より低い傾向が見られたが、この差は 1 $\mu\text{g/ml}$ リコンビナント AIM 添加により認められなくなり、野生型を上回るほど発現が増加した。24 時間後の 3 群間では差が見られなかったが、いずれの群も ELISA キットの測定上限値に近く、飽和している可能性が考えられた。

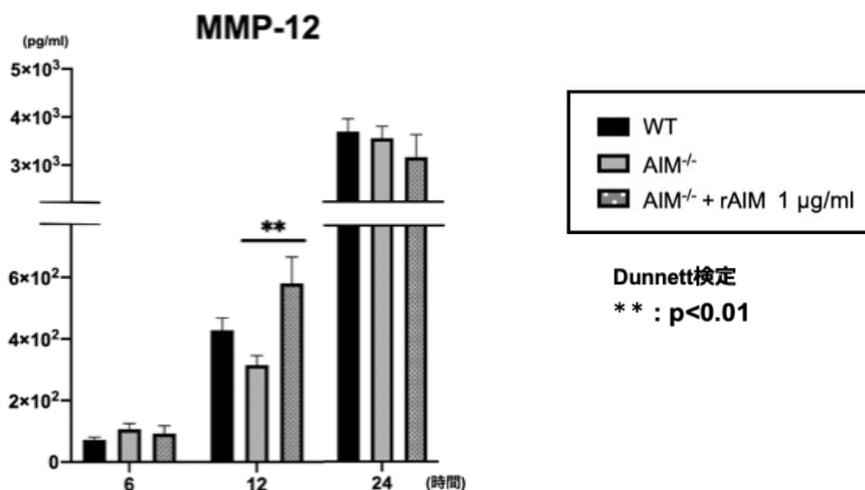


図 20 CSE 刺激肺胞マクロファージでの MMP-12 タンパク発現 (n=3-5)

また、上記の実験群を通して野生型マウスおよび AIM 欠損マウス各 4 匹の BAL 液からの細胞を複数回採取したが、採取された生細胞数は AIM 欠損マウスにおいて有意に低下していた (図 21)。この細胞群は PBS で洗浄する前であるため、気道上皮細胞や他の免疫細胞を少量含有するが、肺気腫モデルマウスでのコントロール群の BAL 液細胞分画データより 9 割以上は肺胞マクロファージであると推測された。

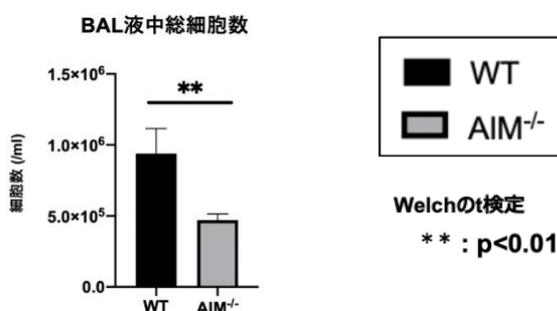


図 21 マウス BAL 液から得られた細胞数比較 (n=5-7)

非喫煙者, 健常喫煙者, COPD 患者における血漿 AIM/IgM 比の検討

研究に参加した患者のうち非喫煙者 16 人, 健常喫煙者 15 人, COPD 患者 19 人の計 50 人の血漿 AIM/IgM 比が測定可能であった. 各群での患者の特徴は下記の通りであった (表 1). COPD 患者群は非喫煙者より喫煙本数が多く, 現喫煙者が多く, 予測 1 秒量と 1 秒率が低かった.

表 1 非喫煙者, 健常喫煙者, COPD 患者における患者特徴

非喫煙者, 健常喫煙者, COPD患者の臨床研究における患者特徴 (n=50)

	非喫煙者 (n=16)	健常喫煙者 (n=15)	COPD患者 (n=19)	p値
年齢, 才	70.7 ± 10.5	64.5 ± 8.3	65.6 ± 8.7	0.21
男性, n (%)	15 (93.8)	11 (73.3)	17 (89.5)	0.22
Pack-years	1.7 ± 3.3	45.9 ± 26.3	53.8 ± 19.9	<0.0001
現喫煙者, n (%)	0 (0)	7 (43.8)	9 (47.4)	0.0039
1秒量, %予測値	125.2 ± 16.5	104.5 ± 17.7	65.0 ± 19.5	<0.0001
1秒率, %	77.2 ± 3.7	76.7 ± 4.4	45.8 ± 11.3	<0.0001

注釈: 数値は平均 ± 標準偏差または数 (%). 統計学的解析はKruskal-Wallis検定またはカイ二乗検定.

略語: COPD, 慢性閉塞性肺疾患

非喫煙者, 健常喫煙者, COPD 患者の 3 群間で血漿 AIM/IgM 比を比較した (図 22). COPD 患者は非喫煙者とは差がなかったが, むしろ健常喫煙者と比較して有意に血漿 AIM/IgM 比が高かった. 健常喫煙者では非喫煙者より血漿 AIM/IgM 比が低い傾向にあったが, 有意差はなかった.

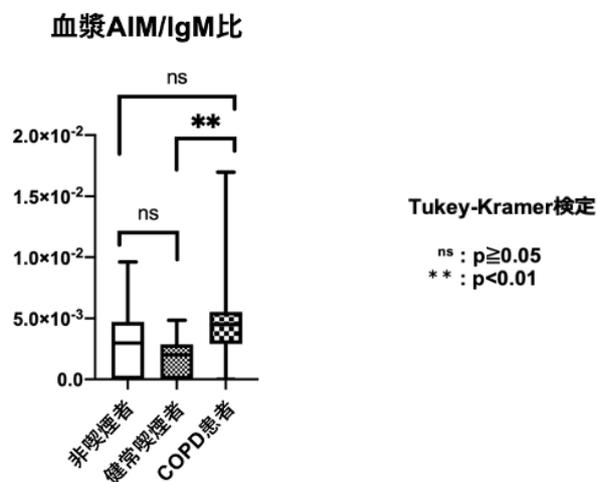


図 22 非喫煙者 (n=16), 健常喫煙者 (n=15), COPD 患者 (n=19)での血漿 AIM/IgM 比

次に北海道 COPD コホート研究に参加した患者のうち、血清が利用できた計 133 人の血清 AIM/IgM 比を測定した。血清 AIM/IgM 比の四分位数により患者を低値、中間値、高値の 3 群に分類すると低値群 33 人、中間値群 67 人、高値群 33 人となった。患者のベースラインの特徴は下記の通りであった (表 2)。現喫煙者の割合は中間値群で他の群より有意に低値であった。また修正 medical research council (MRC)息切れスケール 2 以上の患者の割合は、高値群で他の群より有意に高かった。その他の性別、体型、呼吸機能、肺気腫スコアなどの因子とは関連がなかった。

表 2 北海道 COPD コホート研究に参加し、血清が利用可能であった患者の臨床的特徴

北海道COPDコホート研究における患者特徴 (n=133)				
	AIM/IgM 低値群 (Quartile 1) (n=33)	AIM/IgM 中間値群 (Quartile 2-3) (n=67)	AIM/IgM 高値群 (Quartile 4) (n=33)	p値
年齢, 才	67.1 ± 9.3	70.2 ± 8.2	72.6 ± 6.1	0.046
男性, n (%)	29 (87.9)	61 (91.0)	32 (97.0)	0.39
Body mass index, kg/m ²	21.6 ± 3.2	22.3 ± 3.4	21.8 ± 3.1	0.64
GOLD stage I / II / III / IV	12 / 14 / 5 / 2	19 / 32 / 15 / 1	7 / 12 / 10 / 4	0.21
Pack-years	61.9 ± 28.4	63.3 ± 32.5	62.0 ± 25.9	0.96
現喫煙者, n (%)	13 (39.4)	11 (16.4)	11 (33.3)	0.028
1秒量, % 予測値	69.0 ± 25.4	66.4 ± 20.4	60.5 ± 25.7	0.26
1秒率, %	53.2 ± 11.1	52.0 ± 12.8	48.5 ± 13.1	0.37
気管支拡張薬反応後の1秒量, %*	15.2 ± 15.5	12.0 ± 11.6	12.6 ± 13.5	0.90
肺拡散能, % 予測値	81.7 ± 22.5	78.1 ± 24.0	73.5 ± 18.8	0.42
K _{CO} , % 予測値	62.8 ± 19.5	67.3 ± 25.0	61.9 ± 20.6	0.37
1年あたりの1秒量低下, mL/年 [†]	-6.2 ± 4.7	-6.6 ± 4.1	-6.2 ± 4.4	0.85
CT肺気腫スコア	1.3 ± 1.0	1.5 ± 0.9	1.7 ± 4.3	0.19
修正MRC息切れスケール ≥2, n (%)	16 (48.5)	36 (53.7)	32 (97.0)	<0.001
SGRQ合計スコア	30.8 ± 15.8	29.5 ± 15.1	30.2 ± 20.0	0.93
増悪, イベント/年 [‡]	0.11 ± 0.29	0.12 ± 0.30	0.18 ± 0.33	0.32

注釈: 数値は平均 ± 標準偏差または数 (%). 統計学的解析はKruskal-Wallis検定またはカイニ乗検定.

* n=132; [†]n=124; [‡]n=130.

略語: COPD, 慢性閉塞性肺疾患; GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; K_{CO}, carbon monoxide transfer coefficient; CT, computed tomography; MRC, medical research council; SGRQ, St. George's respiratory questionnaire.

血清 AIM/IgM 比中等度群・高値群は両者とも低値群より年齢が高かった (表 2, 図 23).

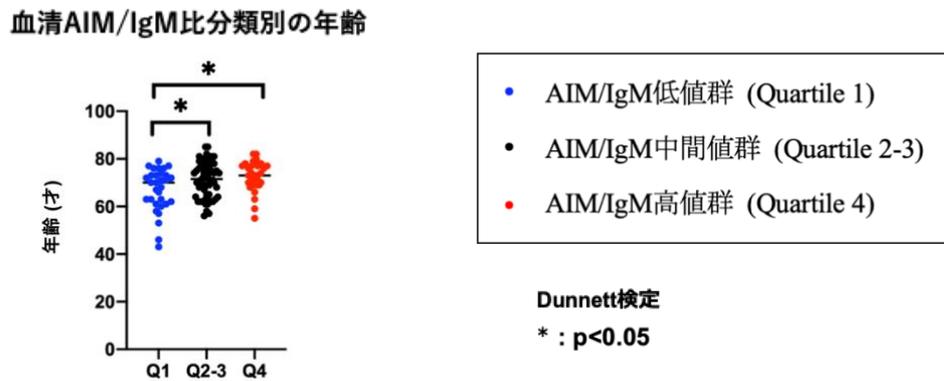


図 23 血清 AIM/IgM 比分類別の患者年齢 (Quartile 1: 33 人, Quartile 2-3: 67 人, Quartile 4: 33 人)

次に Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) 分類で評価した呼吸機能の重症度別に血清 AIM/IgM 比を評価した (図 24). GOLD I 期 (軽度: %1 秒量 80%以上) が 38 人, GOLD II 期 (中等度: %1 秒量 50%以上 80%未満) が 58 人, GOLD III 期 (重度: %1 秒量 30%以上 50%未満) が 30 人, GOLD IV 期 (最重度: %1 秒量 30%未満) が 7 人であった. 重症度と血清 AIM/IgM 比の間には有意な相関関係があり, 重症度が高くなるほど血清 AIM/IgM 比が有意に高値となる傾向が見られた.

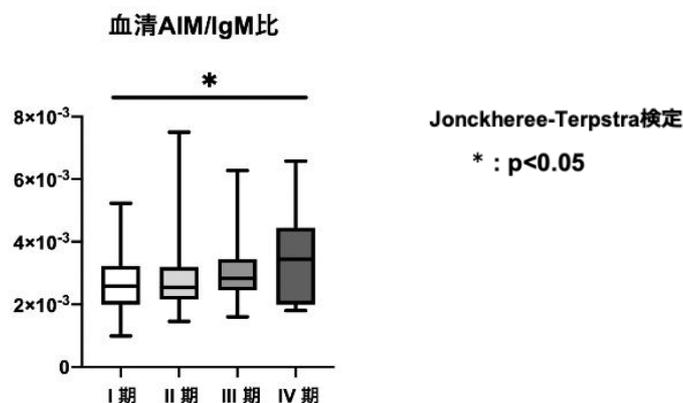


図 24 呼吸機能の重症度別の血清 AIM/IgM 比 (GOLD I 期: 38 人, II 期: 58 人, III 期: 30 人, IV 期: 7 人)

次に血清 AIM/IgM 比で分類した各群の予後を評価した. 血清 AIM/IgM 比と予後の間には有意な相関関係が見られた. 血清 AIM/IgM 比がより高い群は, より低い群と比較して 5 年以内の COPD の初回増悪までの期間が有意に短かった (図 25A). また 10 年以内の全死亡率・呼吸器疾患による死亡率も高かった (図 25B, C).

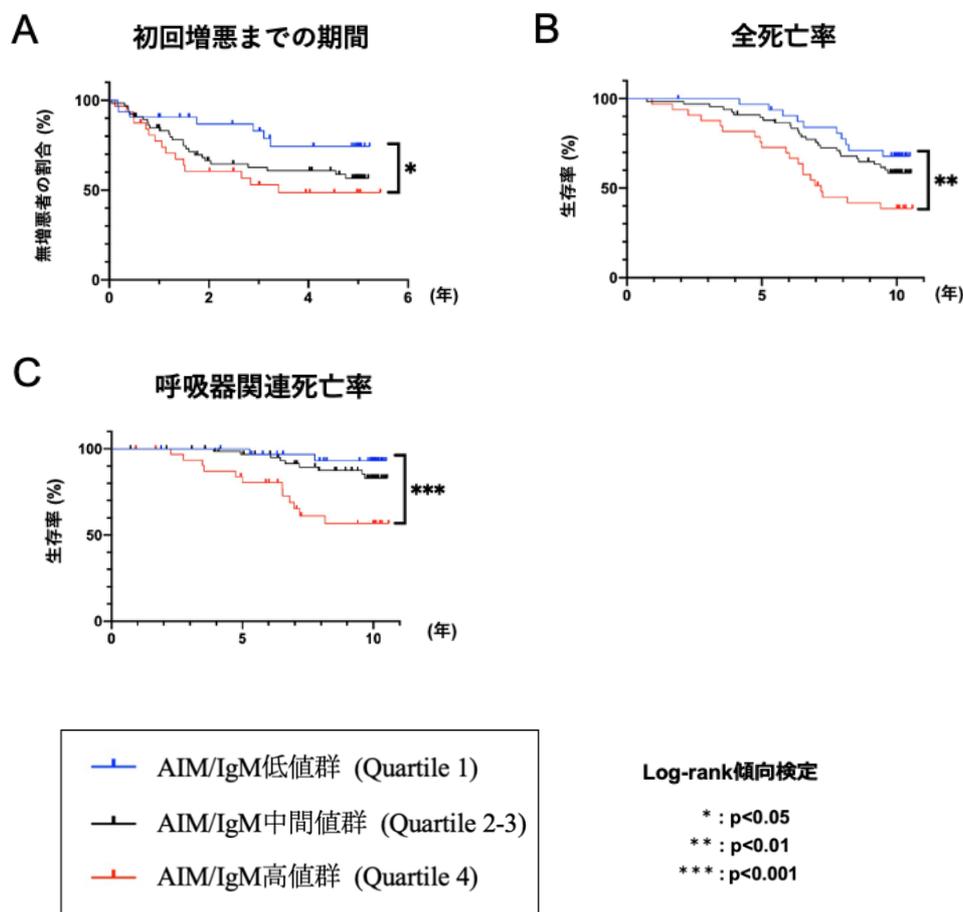


図 25 血清 AIM/IgM 比で分類した各群の予後 (Quartile 1: 33 人, Quartile 2-3: 67 人, Quartile 4: 33 人)

(A) 無増悪患者の割合. (B) 全死亡率. (C) 呼吸器関連死亡率.

さらに年齢，現喫煙，血清 AIM/IgM 比を共変量として多変量解析を行ったところ，血清 AIM/IgM 比上昇は全死亡率・呼吸器関連死亡率上昇の独立したリスク因子であった．初回増悪までの期間短縮については有意差がなかったものの，リスクとなる傾向が見られた (表 3)．

表 3 北海道 COPD コホート研究での予後リスク因子

	初回増悪までの期間		全死亡率		呼吸器関連死亡率	
	HR (95% CI)	p 値	HR (95% CI)	p 値	HR (95% CI)	p 値
血清 AIM/IgM 比 (自然対数の 1 増加当たり)	2.27 (0.92-5.57)	0.07	2.40 (1.11-5.17)	0.03	5.41 (1.73-16.85)	0.004
年齢 (1 才増加当たり)	1.03 (0.99-1.07)	0.17	1.11 (1.06-1.16)	<0.001	1.13 (1.05-1.21)	0.001
現喫煙	0.91 (0.46-1.81)	0.80	0.88 (0.61-2.09)	0.69	0.81 (0.27-2.44)	0.71

注釈: 統計学的解析は多変量 Cox 比例ハザードモデル.

略語: COPD, chronic obstructive lung disease; HR, hazards ratio; CI, confidence interval.

考察

今回の研究では、PPE および CS 誘導肺気腫マウスモデルの両方で肺内の炎症、肺気腫が AIM 欠損マウスにおいて減弱することを示した。細胞死も AIM 欠損マウスにおいて抑制された。さらに PPE モデルでは MMP-12 のアップレギュレーションがタンパクと mRNA レベルの両方で見られた。CSE 刺激肺胞マクロファージを用いた *in vitro* の研究でも MMP-12 値発現は AIM 欠損マウスからの肺胞マクロファージにおいて抑制されたが、その抑制はリコンビナント AIM 添加により認められなくなった。野生型マウスからの肺胞マクロファージへのリコンビナント AIM でも早期では MMP-12 発現上昇が見られたが、時間経過すると見られなくなった。本研究は AIM と MMP-12 の関連を示した初の報告である。

MMP-12 は COPD の病態に促進的に関与することが知られている。COPD 患者では非喫煙者や健常喫煙者より喀痰中 MMP-12 値が高く (Demedts et al, 2006), 喫煙者での MMP-12 遺伝子発現は亢進していた (Woodruff et al, 2005)。動物モデルの研究では、MMP-12 は CS 曝露誘導マウスモデルにおいて肺気腫形成と (Hautamaki et al, 1997), 喫煙曝露された肺内でマクロファージの活性に必須であった (Houghton et al, 2006)。さらに MMP-12 阻害剤は肺気腫形成と肺内の炎症を減弱させた (Churg et al, 2007; Li et al, 2009; Baggio et al, 2020)。本研究は AIM が MMP-12 のアップレギュレーションを介して COPD 病態に促進的に関与することを示唆する。

MMP-12 産生は様々な経路を介して促進される。過去の研究では、マクロファージにおける CS 誘導の MMP-12 上昇は PAR-1 (Churg et al, 2007), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Botelho et al, 2011), TNF α (Vuilleminot et al, 2004) を介して促進される。また TNF α 自身も PPE による肺気腫形成に関与する (Lucey et al, 2002)。本研究の PPE モデルでは肺内の TNF α の遺伝子発現は AIM 欠損マウスにおいてやや抑制される傾向にあった。TNF α が AIM の作用に部分的に関与する可能性が示唆されるが、AIM による MMP-12 発現亢進の機序解明にはさらなる研究が必要である。

今回 PPE モデルにおいて、IL-33 上昇が AIM 欠損マウスで抑制された。当教室の別研究では、リコンビナント IL-33 気管内投与による喘息マウスモデルにおいて、AIM 欠損マウスで気道好酸球性炎症が抑制され、AIM が IL-33 を介して肺内の炎症に促進的に関与することが示唆された (未発表)。IL-

IL-33 は気道上皮細胞から分泌され通常は 2 型自然リンパ球(ILC2) を介して 2 型炎症を惹起するが(Yoshimoto and Matsushita, 2014), CS 曝露は ILC2 上の IL-33 受容体である ST2 発現を減少させ, マクロファージや natural killer (NK) 細胞での発現を上昇させる. よって COPD においては, IL-33 は ILC2 でなく主にマクロファージや NK 細胞を介して炎症を起こす可能性が考えられている(Kearley et al, 2015; Morichika et al, 2021). IL-33 の肺気腫における役割については, 過去研究の多くは促進的作用を示唆している(Xia et al, 2015; Tworek et al, 2018; Zou et al, 2018). しかし最近の報告では, IL-33 は肺気腫に促進的に作用するものの, ノックアウトによる完全な欠失は PPE および CSE 気管内投与モデルマウスの両方において逆に肺気腫形成を促進した(Morichika et al, 2021). これに対して我々の別の研究では IL-33 欠損マウスでは PPE による肺気腫形成は抑制される傾向にあり, さらに気道好酸球性炎症低下を伴った (未発表).

本研究より, IL-33 も AIM の肺気腫形成促進に部分的に関与する可能性が示唆される. また PPE モデルにおいて AIM 欠損マウスで好酸球性炎症が抑制されたが, この理由は①AIM により発現亢進した IL-33 が惹起する炎症が抑制されたため, ②好酸球は創傷治癒に関与するので(Krishack et al, 2021), 肺胞壁破壊が抑制された結果好酸球数が減少した, のいずれかあるいは両者が考えられる.

さらに, PPE モデルでは肺内の IL-5 遺伝子発現上昇も AIM 欠損マウスで抑制される傾向が見られたが, IL-4 や IL-13 についてはほぼ発現が見られなかった. AIM が好酸球性気道炎症や気管支喘息において促進的に関与すると示唆した報告が複数存在する(Wu et al, 2005; Rossios et al, 2018). また当教室の過去の研究でも, 卵白アルブミン誘導喘息マウスモデルにおいて AIM 欠損マウスで好酸球性気道炎症や 2 型サイトカインが抑制され, さらに ILC2 の増加抑制を伴っていた (未発表). しかし反対に, 最近マウスモデルで AIM が CD11c^{high} 肺胞マクロファージを介して喘息の病態に抑制的に作用したとする報告もされている(Weng et al, 2022).

また Doyle らは, 好酸球由来の IL-13 が MMP-12 産生を介して肺胞壁の破壊に関与すると報告した(Doyle et al, 2019). しかし本研究では, PPE モデルでの IL-13 の遺伝子発現はほとんど見られなかった. もし我々のモデルで MMP-12 発現と好酸球性炎症亢進の機序に関連があるのであれば, 異なる経路が存在すると考えられる.

今回、PPE モデルと CS モデルの 2 つの肺気腫モデルマウスにおいて、肺気腫形成や細胞死については類似した結果が得られたが、一部に差異も認められた。まず、PPE モデルでは BAL 液中の炎症細胞数、特に好酸球数増加が AIM 欠損マウスで抑制された。それに対し CS モデルでは炎症細胞数、特に好中球数増加が AIM 欠損マウスで低下する傾向を示したが、好酸球は全てのマウスにおいて認めなかった。また CS モデルにおいて、AIM 欠損マウスの肺では好中球機能活性化作用を持つ IL-1 β と CXCL5 の遺伝子発現が抑制され、PPE モデルでも BAL 液中の IL-1 β タンパク発現に同様の傾向があった。これらより、AIM は好酸球炎症の他に好中球性炎症を介しても肺気腫形成に寄与している可能性が考えられ、特に CS モデルではこの機序が好酸球性炎症より顕著である可能性が推測された。

細胞死も COPD の病態に関与することが知られている (Segra-Valdez et al, 2000)。COPD 患者の肺では健常者よりアポトーシスが増加していた (Kasahara et al, 2001)。動物モデルを用いた過去研究では、CS 誘導肺気腫マウスにおいてアポトーシスが増加していた (Bartalesi et al, 2005)。さらに COPD 患者の肺では、喫煙により誘導されたマクロファージおよび好中球性炎症がアポトーシスを起こしていた (Majo et al, 2001)。本研究では PPE と CS 両者のモデルにおいて AIM 欠損マウスで気道炎症細胞数の減少が見られ、細胞死も抑制されていた。Kojima らの報告では AIM は肺泡マクロファージに存在し、CSE 刺激による肺泡マクロファージのアポトーシスを阻害する。これはアポトーシス阻害因子である B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) 遺伝子発現亢進を介するが、それは機序の一部分に過ぎないとしている (Kojima et al, 2013)。これらより、AIM は肺泡マクロファージを含む炎症細胞のアポトーシスを阻害することで肺泡壁の構成細胞の細胞死を促進し、それが肺構造の破壊、さらには肺気腫形成につながるという仮説が立つ。

また PPE モデルにおいて、肺内 cleaved caspase-3 発現で評価したアポトーシスは AIM 欠損マウスでわずかに抑制される傾向が見られたものの、有意差に至らなかった。よって AIM による肺泡構造破壊に他の細胞死が関与する可能性が考えられる。具体的には COPD の病態への関与が知られるネクロトーシスや (Lu et al, 2021)、あるいは本研究では好酸球性炎症の関与も示唆されるため、好酸球の特殊な細胞死である ETosis などが候補として挙げられる。

さらに我々は COPD 患者が健常喫煙者より血中 AIM/IgM 比が高いこと

を示した。しかし、非喫煙者と COPD 患者、あるいは非喫煙者と健常喫煙者の間には差はなかった。また、COPD 患者と健常喫煙者の 2 群間で喫煙本数の差はなかった。これは健常喫煙者での低い血中 AIM/IgM 比が COPD 抵抗性の素因を表している可能性がある。また北海道 COPD コホート研究では、COPD 患者の血中 AIM/IgM 比は GOLD 分類での呼吸機能の重症度と有意に関連していた。さらに血中 AIM/IgM 比が高い患者群はより低い群より初回増悪までの期間が短く、全死亡率・呼吸器関連死亡率が高かった。また多変量解析でも血中 AIM/IgM 比上昇は全死亡率・呼吸器関連死亡率上昇の独立したリスク因子であり、初回増悪までの期間短縮においてもリスクとなる傾向があった。これらの結果は、COPD の病態における AIM の促進的役割を支持する。下図に本研究結果から得られた仮説を示す (図 26)。

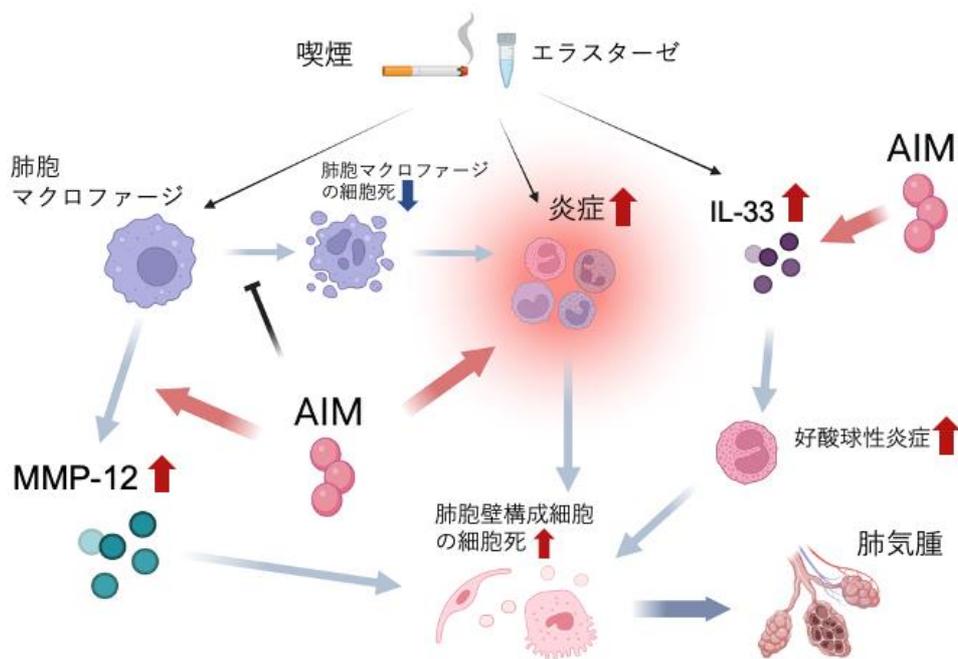


図 26 本研究から推測される肺気腫形成における AIM の作用機序

結論

① 本研究から得られた知見

- ・ PPE 誘導肺気腫モデルマウスにおいて, AIM 欠損マウスで野生型マウスより肺内の炎症・細胞死・肺気腫形成が減弱する.
- ・ 同モデルにおいて, AIM 欠損マウスで肺内の MMP-12 と IL-33 の発現が抑制され, IL-1 β でも同様の傾向がある.
- ・ CS 誘導肺気腫モデルマウスにおいて, AIM 欠損マウスで野生型マウスより細胞死・肺気腫形成が減弱する.
- ・ AIM 欠損マウスから得られた肺胞マクロファージでは, 野生型と比較して CSE 刺激による MMP-12 発現が抑制される. またこの抑制はリコンビナント AIM 添加により認められなくなる.
- ・ 様々な喫煙ステータスの患者での臨床研究において, COPD 患者の血漿 AIM/IgM 比は健常喫煙者より有意に高値である.
- ・ 北海道 COPD コホート研究において, 呼吸機能の重症度が高い群はより低い群より血清 AIM/IgM 比が高値である.
- ・ 北海道 COPD コホート研究において, 血清 AIM/IgM 比が高値の群はより低い群より疾患の初回増悪までの期間が短く, 全死亡率・呼吸器関連死亡率が高い.

② 新知見の意義

AIM が COPD の病態において促進的に関与し, その作用は MMP-12 の発現亢進を介することが示唆される. AIM が COPD の新規治療標的候補となりうる可能性が期待できる.

③ 本研究で得られた新知見から今後展開される研究

抗 AIM 抗体が COPD の治療薬候補となりうるかについて, 今後の研究が望まれる.

④ 今後の課題

AIM がどのように MMP-12 の発現を亢進させるのかの解明はできておらず, 細胞実験などで検討を行いたい. 次にマウス実験においてリコンビナント AIM の添加による肺気腫・肺内炎症・細胞死などの評価を検討したい. また IL-33 や 2 型炎症も肺気腫形成に部分的に関与した可

能性の検討も必要である。また AIM はマクロファージを含む種々の細胞におけるアポトーシス抑制作用が知られているが、肺胞上皮細胞への作用も検討が必要と考えられる。最後に AIM 欠損マウスにおいて細胞死が抑制されていたが、アポトーシスの抑制は有意差に至らなかったため、他の細胞死の関与の有無も評価する必要がある。

謝辞

本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室今野哲教授，直接の研究指導を賜りました同教室鈴木雅准教授に深く感謝申し上げます。また今回の研究に多大なるご尽力を頂戴しましたマウントサイナイ医科大学内科学部門呼吸・集中治療・睡眠医学分野の木村裕樹助教に感謝申し上げます。さらに復旦大学病院呼吸器内科の葛海燕先生，臨床研究の立案にご尽力いただきました北海道大学名誉教授の西村正治先生および憲仁会牧田病院の牧田比呂仁先生，さらに前東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター分子病態医科学部門・現一般社団法人 AIM 医学研究所の宮崎徹先生，新井郷子先生にも感謝いたします。また北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室員の皆様，臨床研究にご協力いただきました患者様にも感謝の意を表します。

利益相反

北海道 COPD コホート研究は、厚生労働省及び文部科学省の科学研究費およびファイザー株式会社、ベーリンガーインゲルハイム株式会社、アストラゼネカ株式会社から研究費を受託し施行した。AIM 欠損マウスおよびリコンビナント AIM を提供してくださった前東京大学医科学研究所・現 AIM 医学研究所の宮崎徹先生は AMED-LEAP より研究費を受託した。

引用文献

Arai S, Kitada K, Yamazaki T, Takai R, Zhang X, Tsugawa Y, Sugisawa R, Matsumoto A, Mori M, Yoshihara Y, et al (2016) Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nat Med* 22, 183-193.

Arai S, Maehara N, Iwamura Y, Honda S, Nakashima K, Kai T, Ogishi M, Morita K, Kurokawa J, Mori M, et al (2013) Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells. *Cell Rep* 3, 1187-1198.

Arai S, Shelton JM, Chen M, Bradley MN, Castrillo A, Bookout AL, Mak PA, Edwards PA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, et al (2005) A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Ap16 in atherosclerosis development. *Cell Metab* 1, 201-213.

Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, McCormick M, Haldar K, Kebabdz T, Duvoix A, et al (2011) Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 662-671.

Baggio C, Velazquez JV, Fragai M, Nordgren TM and Pellecchia M (2020) Therapeutic Targeting of MMP-12 for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Med Chem* 63, 12911-12920.

Barnes PJ (2004) Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* 1, 59-70.

Bartalesi B, Cavarra E, Fineschi S, Lucattelli M, Lunghi B, Martorana PA and Lungarella G (2005) Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. *Eur Respir J* 25, 15-22.

Botelho FM, Nikota JK, Bauer C, Davis NH, Cohen ES, Anderson IK, Coyle AJ, Kolbeck R, Humbles AA, Stampfli MR, et al (2011) A mouse GM-CSF receptor antibody attenuates neutrophilia in mice exposed to cigarette smoke. *Eur Respir J*

38, 285-294.

Brusselle GG, Joos GF and Bracke KR (2011) New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 378, 1015-1026.

Cheng Q, Lai X, Yang L, Yang H and Luo Y (2021) Serum CD5L predicts acute lung parenchymal injury and acute respiratory distress syndrome in trauma patients. *Medicine (Baltimore)* 100, e27219.

Choi ES, Faruque HA, Kim JH, Kim KJ, Choi JE, Kim BA, Kim B, Kim YJ, Woo MH, Park JY, et al (2021) CD5L as an Extracellular Vesicle-Derived Biomarker for Liquid Biopsy of Lung Cancer. *Diagnostics (Basel)* 11, 620.

Churg A, Wang X, Wang RD, Meixner SC, Pryzdial EL and Wright JL (2007) Alpha1-antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 144-151.

Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, Pacheco Y, Cataldo D, Joos GF, Pauwels RA and Brusselle GG (2006) Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax* 61, 196-201.

Doyle AD, Mukherjee M, LeSuer WE, Bittner TB, Pasha SM, Frere JJ, Neely JL, Kloeber JA, Shim KP, Ochkur SI, et al (2019) Eosinophil-derived IL-13 promotes emphysema. *Eur Respir J* 53, 1801291.

Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, Adachi M, Nagai A, Kuriyama T, Takahashi K, Nishimura K, Ishioka S, Aizawa H, et al (2004) COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology* 9, 458-465.

Gao X, Yan X, Zhang Q, Yin Y and Cao J (2019) CD5L contributes to the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Int Immunopharmacol* 72, 40-47.

Goddard PR, Nicholson EM, Laszlo G and Watt I (1982) Computed Tomography in Pulmonary Emphysema. *Clin Radiol* 33, 379-387.

Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM and Shapiro SD (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277, 2002-2004.

Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, Mecham RP, Senior RM and Shapiro SD (2006) Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 116, 753-759.

Kajiwara C, Shiozawa A, Urabe N, Yamaguchi T, Kimura S, Akasaka Y, Ishii Y and Tateda K (2023) Apoptosis Inhibitor of Macrophages Contributes to the Chronicity of *Mycobacterium avium* Infection by Promoting Foamy Macrophage Formation. *J Immunol* 210, 431-441.

Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC and Voelkel NF (2001) Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 737-744.

Kearley J, Silver JS, Sanden C, Liu Z, Berlin AA, White N, Mori M, Pham TH, Ward CK, Criner GJ, et al (2015) Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity* 42, 566-579.

Kim TH, Yang K, Kim M, Kim HS and Kang JL (2021) Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) contributes to IL-10-induced anti-inflammatory response through inhibition of inflammasome activation. *Cell Death Dis* 12, 19.

Kimura H, Suzuki M, Konno S, Shindou H, Shimizu T, Nagase T, Miyazaki T and Nishimura M (2017) Orchestrating Role of Apoptosis Inhibitor of Macrophage in the Resolution of Acute Lung Injury. *J Immunol* 199, 3870-3882.

Kojima J, Araya H, Hara H, Ito S, Takasaka N, Kobayashi K, Fujii S, Tsurushige C, Numata T, Ishikawa T, et al (2013) Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression in alveolar macrophages in COPD. *Respir Res* 14, 30.

Krishack PA, Hollinger MK, Kuzel TG, Decker TS, Louviere TJ, Hrusch CL, Sperling AI and Verhoef PA (2021) IL-33-mediated Eosinophilia Protects against Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 64, 569-578.

Li W, Li J, Wu Y, Wu J, Hotchandani R, Cunningham K, McFadyen I, Bard J, Morgan P, Schlerman F, et al (2009) A Selective Matrix Metalloprotease 12 Inhibitor for Potential Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Discovery of (S)-2-(8-(Methoxycarbonylamino)dibenzo[b,d]furan-3-sulfonamido)-3-methylbutanoic acid (MMP408). *J Med Chem* 52195203, 1799-1802.

Li Y, Qu P, Wu L, Li B, Du H and Yan C (2011) Api6/AIM/Spalpha/CD5L overexpression in alveolar type II epithelial cells induces spontaneous lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 71, 5488-5499.

Lilliefors HW (1967) On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. *J Am Stat Assoc* 62.

Lu Z, Van Eeckhoutte HP, Liu G, Nair PM, Jones B, Gillis CM, Nalkurthi BC, Verhamme F, Buyle-Huybrecht T, Vandenabeele P, et al (2021) Necroptosis Signaling Promotes Inflammation, Airway Remodeling, and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 204, 667-681.

Lucey EC, Keane J, Kuang P-P, Snider GL and Goldstein RH (2002) Severity of Elastase-Induced Emphysema Is Decreased in Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β Receptor-Deficient Mice. *Lab Invest* 82, 79-95.

MacDonald MI, Osadnik CR, Bulfin L, Hamza K, Leong P, Wong A, King PT and Bardin PG (2019) Low and High Blood Eosinophil Counts as Biomarkers in Hospitalized Acute Exacerbations of COPD. *Chest* 156, 92-100.

Maehara N, Taniguchi K, Okuno A, Ando H, Hirota A, Li Z, Wang CT, Arai S and Miyazaki T (2021) AIM/CD5L attenuates DAMPs in the injured brain and thereby ameliorates ischemic stroke. *Cell Rep* 36, 109693.

Majo J, Ghezzi H and Cosio MG (2001) Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 17, 946-953.

Makita H, Nasuhara Y, Nagai K, Ito Y, Hasegawa M, Betsuyaku T, Onodera Y, Hizawa N, Nishimura M and Hokkaido COPD Cohort Study Group (2007) Characterisation of phenotypes based on severity of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 62, 932-937.

Miyazaki T, Hirokami Y, Matsushashi N, Takatsuka H and Naito M (1999) Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *J Exp Med* 189, 413-422.

Miyazaki T, Kurokawa J and Arai S (2011) AIMing at metabolic syndrome. - Towards the development of novel therapies for metabolic diseases via apoptosis inhibitor of macrophage (AIM). *Circ J* 75, 2522-2531.

Morichika D, Taniguchi A, Oda N, Fujii U, Senoo S, Itano J, Kanehiro A, Kitaguchi Y, Yasuo M, Hanaoka M, et al (2021) Loss of IL-33 enhances elastase-induced and cigarette smoke extract-induced emphysema in mice. *Respir Res* 22, 150.

Nishikido T, Oyama J, Shiraki A, Komoda H and Node K (2016) Deletion of Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)/CD5L Attenuates the Inflammatory Response and Infarct Size in Acute Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc* 5, e002863.

Nishimura M, Makita H, Nagai K, Konno S, Nasuhara Y, Hasegawa M, Shimizu K, Betsuyaku T, Ito YM, Fuke S, et al (2012) Annual Change in Pulmonary Function and Clinical Phenotype in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 185, 44-52.

Oh JH, Yang MJ, Yang YS, Park HJ, Heo SH, Lee EH, Song CW and Yoon S (2009) Microarray-based analysis of the lung recovery process after stainless-steel welding fume exposure in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 21, 347-373.

Rossios C, Pavlidis S, Hoda U, Kuo CH, Wiegman C, Russell K, Sun K, Loza MJ, Baribaud F, Durham AL, et al (2018) Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 141, 560-570.

Segra-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C and Selman M (2000) Upregulation of Gelatinases A and B, Collagenases 1 and 2, and Increased Parenchymal Cell Death in COPD. *Chest* 117, 684-694.

Suzuki M, Makita H, Konno S, Shimizu K, Kimura H, Kimura H, Masaharu Nishimura and the Hokkaido COPD Cohort Study Investigators (2016) Asthma-like Features and Clinical Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 194, 1358-1365.

Tanoue S, Kanmura S, Hinokuchi M, Arima S, Sasaki F, Hashimoto S and Ido A (2022) Role of apoptosis inhibitor of macrophages in patients with IgG4-related disease/autoimmune pancreatitis and the clinical characteristics associated with this condition. *Biomed Rep* 17, 82.

Thurlbeck WM (1967) Internal surface area and other measurements in emphysema. *Thorax* 22, 483-496.

Tworek D, Majewski S, Szewczyk K, Kiszalkiewicz J, Kurmanowska Z, Gorski P, Brzezińska-Lasota E, Kuna P and Antczak A (2018) The association between airway eosinophilic inflammation and IL-33 in stable non-atopic COPD. *Respir Res* 19, 108.

Vuilleminot BR, Rodriguez JF and Hoyle GW (2004) Lymphoid tissue and emphysema in the lungs of transgenic mice inducibly expressing tumor necrosis factor- α . *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 438-448.

Wang C, Yosef N, Gaublotte J, Wu C, Lee Y, Clish CB, Kaminski J, Xiao S, Meyer Zu Horste G, Pawlak M, et al (2015) CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* 163, 1413-1427.

Weng D, Gao S, Shen H, Yao S, Huang Q, Zhang Y, Huang W, Wang Y, Zhang X, Yin Y, et al (2022) CD5L attenuates allergic airway inflammation by expanding CD11c(high) alveolar macrophages and inhibiting NLRP3 inflammasome activation via HDAC2. *Immunology* 167, 384-397.

Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodriguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, Paquet AC and Erle DJ (2005) A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1383-1392.

World Health Organization (2020) The top 10 causes of death. In World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (2023 年 5 月 11 日参照)

Wu H, Yang S, Wu X, Zhao J, Zhao J, Ning Q, Xu Y and Xie J (2014) Interleukin-33/ST2 signaling promotes production of interleukin-6 and interleukin-8 in systemic inflammation in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease mice. *Biochem Biophys Res Commun* 450, 110-116.

Wu J, Kobayashi M, Sousa EA, Liu W, Cai J, Goldman SJ, Dorner AJ, Projan SJ, Kavuru MS, Qiu Y, et al (2005) Differential proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in asthmatics following segmental antigen challenge. *Mol Cell Proteomics* 4, 1251-1264.

Xia J, Zhao J, Shang J, Li M, Zeng Z, Zhao J, Wang J, Xu Y and Xie J (2015) Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308, L619-627.

Yamazaki T, Mori M, Arai S, Tateishi R, Abe M, Ban M, Nishijima A, Maeda M, Asano T, Kai T, et al (2014) Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans. *PLoS One* 9, e109123.

Yoshimoto T and Matsushita K (2014) Innate-type and acquired-type allergy regulated by IL-33. *Allergol Int* 63 Suppl 1, 3-11.

Zou SC, Jian J and Song J (2018) IL-33 induced inflammation exacerbated the development of COPD through oxidative stress. Eur Rev Med Pharmacol Sci 22, 1758-1764.

厚生労働省 (2019) 患者調査-患者調査 上巻 (全国). 総患者数. 性・年齢階級 × 傷病小分類別 . 各年次 . In e-Stat, https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?stat_infid=000031790685 (2023 年 5 月 11 日参照)

日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第 6 版作成委員会 (2022) COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と診療のためのガイドライン 第 6 版 2022, (日本呼吸器学会 : 東京) 10