慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	呼吸器外科疾患の早期診断を目指した気道上皮被覆液の生化学的およびプロテオーム解析
Sub Title	Biochemical and proteomic analysis of epithelial lining fluid for early diagnosis of respiratory diseases
Author	渡辺, 真純(Watanabe, Masazumi) 河野, 光智(Kono, Mitsutomo) 長谷川, 直樹(Hasegawa, Naoki) 神谷, 一徳(Kamiya, Kazunori) 石坂, 彰敏(Ishizaka, Akitoshi) 小林, 紘一(Kobayashi, Koichi)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	マイクロサンプリング法は独自に開発した気管支鏡用新型プローブを用いた検査法である。各種肺疾患から気道上皮被覆液を採取し生化学的およびプロテオーム解析を行った。肺癌、非結核性抗酸菌症の診断や治療効果予測に有効であった。肺腺癌または肺扁平上皮癌で共通に動く癌マーカー候補タンパク質として35種を抽出することができた。またラット肺障害モデルにおいても各種サイトカインの測定、プロテオーム解析を行うことができた。従来の気管支肺胞洗浄と比べ簡便で侵襲がほとんどないこと、高濃度の気道上皮被覆液を採取できるといった長所を有している。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2008～2010 課題番号：20591677 研究分野：呼吸器外科学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20591677seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20591677
研究課題名（和文）
呼吸器外科疾患の早期診断を目指した気道上皮被覆液の生化学的およびプロテオーム解析
研究課題名（英文）
Biochemical and proteomic analysis of epithelial lining fluid for early diagnosis of respiratory diseases
研究代表者
渡辺　真純　(WATANABE MASAZUMI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90201227

研究成果の概要（和文）：マイクロサンプリング法は独自に開発した気管支鏡用新型プローブを用いた検査法である。各種肺疾患から気道上皮被覆液を採取し生化学的およびプロテオーム解析を行った。肺癌、非結核性抗酸菌症の診断や治療効果予測に有効であった。肺腺癌または肺扁平上皮癌で共通に動く癌マーカー候補タンパク質として 35 種を抽出することができた。またラット肺障害モデルにおいても各種サイトカインの測定、プロテオーム解析を行うことができた。従来の気管支肺胞洗浄と比べ簡便で侵襲がほとんどないこと、高濃度の気道上皮被覆液を採取できるといった長所を有している。

研究成果の概要（英文）：Bronchoscopic microsampling method (BMS) is a unique procedure using a newly developed probe. Bronchial epithelial lining fluid (ELF) was obtained using this method and biochemical and proteomic analyses were performed in various lung diseases. BMS was effective for the diagnosis and the prediction of therapeutic effect of lung cancer and non-tuberculous mycobacterial lung disease. 35 proteins as a candidate of tumor marker were extracted from ELF of both lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients. Measurement of cytokines and proteomic analysis could be performed in rat lung injury model. BMS has some advantages compared to conventional broncho-alveolar lavage method, because it is less invasive and can obtain highly-concentrated ELF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：呼吸器外科学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学
キーワード：呼吸器外科、気道上皮被覆液、気管支鏡、マイクロサンプリング法、プロテオーム解析、腫瘍マーカー、肺癌、非結核性抗酸菌症

１．研究開始当初の背景

本研究で用いたマイクロサンプリング法はわれわれが独自に開発した気管支鏡用新型プローブを用いたユニークな方法である。気道上皮被覆液を採取し生化学的・遺伝的情報などを定量的に解析する。本法は従来から行われている気管支肺胞洗浄と比べ簡便であり、患者に対する侵襲がほとんどないこと、肺組織からの高濃度の気道上皮被覆液を採取できるといった長所を有している。これまでの報告では肺胞洗浄液中のサイトカイン、腫瘍マーカーや腫瘍関連遺伝子の測定について報告があるが、診断的に有効であったとの充分なデータは示されていない。本法が確立されれば、小型肺癌、非結核性抗酸菌症の診断などに大変有用と考えられる。

２．研究の目的

われわれの研究グループでは気管支鏡的気管支肺胞洗浄よりも低い侵襲で行うことのできる気管支鏡下細気管支領域マイクロサンプリング法（BMS）を開発した。これは独自に開発した外套内套よりなるプローブを気管支鏡のチャンネルより挿入し、終末気管支から細気管支領域の気道上皮被覆液(Epithelial lining fluid: ELF)を内套のチップに吸収させ採取する方法である。この検体から各種生化学的マーカーの測定、プロテオーム解析、PCR 法による DNA 解析、などが可能である。侵襲が低く反復して施行できるため重症呼吸不全例でも経時的な観察ができる。急性肺損傷においてELF中のサイトカインがその病態をよく反映することが判明している（Ishizaka A, Watatanabe M, et al. Crit Care Med. 2001）。

本研究は呼吸器外科領域で主に手術の対象となる肺癌、非結核性抗酸菌症ならびにラット肺障害モデルに対してBMS法によりELF を採取し各種分析を行い、各々の病態の早期診断を目指すものである。また、プロテオーム解析を通じて各病態に関連する諸因子の発見を目指す。

３．研究の方法

（１）BMS 法の肺癌に対する応用

①原発性肺癌症例に対して BMS 法によりELF を採取しプロテオーム解析を行う。従来のサンプリングでは気管支鏡操作に伴う出血のため、混入した血液がプロテオーム解析の際に問題になることがあった。フィルター（孔径 0.45μm）付きの試験管にプローブ先端を入れて遠心分離する方法を考案した。この方法により ELF の電気泳動を行うと、ヘモグロビンおよびアルブミンのバンドが低下することが判明した。血液成分混入の影響を最小限にするため本法を採用した。5 名の肺腫瘤患者(肺腺癌 2 名、肺扁平上皮癌 2 名、結核 1 名）から BMS 法により腫瘤から採取した ELF を用いて、ショットガンプロテオーム解析を実施し、肺癌マーカータンパク質の探索研究を行った。検体は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離後、ゲルスライスを作成し、各スライスについてゲル内トリプシン消化を実施した。測定は、Thermo のリニアイオントラップ質量分析装置 LTQ を用いた LC-MS/MS ショットガン分析にて行った。得られたデータを、MASCOT MS/MS ion search で同定後、スペクトルカウントの手法で各検体中のタンパク質存在量を比較した。

②ゲフィチニブ（商品名イレッサ）使用肺癌症例に対して投与前と投与 2 週後に BMS 法によりELF を採取して腫瘍マーカーや各種因子の検討を行った。24 例に対して本法を行い、治療効果あり群（n=14）と治療効果なし群（n=10）を比較した。

（２）非結核性抗酸菌症に対する応用

①Mycobacterium *avium* complex(MAC)症の患者に対してBMS法によるELF採取を行い患側と健常側での各種サイトカインを測定した。
②MAC 症患者ではクラリスロマイシン(CAM)がkey drugであるが、CAM内服中の本疾患患者でELFを採取しCAM濃度を測定した。

（３）LPS 投与ラット肺障害モデルにおける実験的検討

ラット気管内にLPSを投与し、経時的にラット用BMSプローブでELFを採取した。ELF中の各種サイトカイン（Bio-Rad 社製 BioPlex システムを使用）を測定した。また Protein Chip システムによるプロテオーム解析を行い小動物モデルにおけるBMS法の有効性を検討した。

４．研究成果

（１）BMS法の肺癌に対する応用

①肺癌プロテオーム解析の結果、4 名の肺癌患者のいずれかで2倍以上の変化を示した候補タンパク質として 93 種を、その内肺腺癌または肺扁平上皮癌の2名に共通に動く各癌マーカー候補タンパク質として 35 種を抽出することができた。
また本プロテオーム解析の妥当性を確認するために8例の肺癌患者で採取したELFを用いてウエスタンブロット解析を行い肺癌における新規腫瘍マーカーとしての可能性を検討する予定である。
②ゲフィチニブ投与例において治療効果あり群（n=14）ではELF中のCEA、KL-6、SP-Dなどが投与前より有意に低下した。一方、治療効果なし群（n=10）でこれらは上昇傾向を示した。一般に KL-6、SP-D などは肺障害マーカーとして用いられるが、イレッサによる病勢の変化を反映している可能性が示唆された。また治療効果あり群の治療前患側のCEA、KL-6 は健側よりも高値を示しゲフィチニブによる治療効果予測における有用性が示唆された。

（２）非結核性抗酸菌症に対する応用

①肺病巣から得られたELFでは健常部や対照症例と比較して KL-6、IFNγが有意に上昇していた。
②CAM 高用量（800mg/day n=4)では低用量(400mg/day n=4))に比べてELF中の濃度は高値を示し、ブレークポイントを超えた。本法は呼吸器疾患における局所薬剤濃度測定にも有用であった。

（３）LPS 投与ラット肺障害モデルにおける実験的検討

LPS 投与群では生食を投与したコントロール群と比較してIL-1β、IL-6、IFNγ、TNFαなどの上昇が認められている。プロテオーム解析ではTNFに関連した分子量を有するタンパクの存在が示唆され TNFαを抑制する TACE inhibitor を投与したラットではこのタンパクの減少が示された。またラットモデルにおけるBMS法は経時的に各個体でのELF中の緒因子を測定・解析することができるため、各タイムポイントで個体を犠牲死させる必要がなかった。
本研究ではこれら（１）（２）（３）の成果を通じて呼吸器外科関連疾患の臨床および動物実験におけるBMS法の有効性を示すことができた。BMS 法による成果発表は世界的にもほとんど見られない。今後は肺癌プロテオーム解析の結果を発展させて臨床的に有用な新規腫瘍マーカーの特定が重要と考える。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計10件）

(1)Kamiya K, Watanabe M, Kohno M, Izumi Y, Horinouchi H, Kawamura M, Shimada N, Nomori H. KL-6 and CEA levels in intrabronchial epithelial lining fluid can predict the tumor response in advanced

non-small lung cancer patients treated with gefitinib. Respirology, 2011 in press. 査読有

(2)Takada Y, Gresh L, Bozec A, Ikeda E, Kamiya K, Watanabe M, Kobayashi K, Asano K, Toyama Y, Wagner EF, Matsuo K. Interstitial lung disease induced by gefitinib and Toll-like receptor ligands is mediated by Fra-1. Oncogene, 2011 in press. 査読有

(3)Tasaka S, Kobayashi S, Kamata H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Funatsu Y, Mizokuchi K, Ishii M, Takeuci T, Hasegawa N. Cytokine profiles of bronchoalveolar lavage fluid in patients with pneumocystis pneumonia. Microbiol Immunol 2010; 54: 425-433. 査読有

(4)Hasegawa N, Nishimura T, Watanabe M, Tasaka S, Nakano Y, Yamazaki K, Hashimoto S, Nishimura M, Ishizaka A. Concentrations of clarithromycin and active metabolite in the epithelial lining fluid of patients with Mycobacterium *avium* complex pulmonary disease. Pulm Pharmacol Ther 2009; 22: 190-193. 査読有

(5)Nishimura T, Hasegawa N, Watanabe M, Takebayashi T, Tasaka S, Ishizaka A. Bronchoscopic microsampling to analyse the epithelial lining fluid of patients with Mycobacterium *avium* complex disease. Respiration 2008; 76: 338-343. 査読有

(6)渡辺真純、仲村秀俊、石坂彰敏. 先端医学講座　気管支鏡を用いたマイクロサンプリング法.アレルギーの臨床 2008; 28: 298-302. 査読無

(7)仲村秀俊、中村美穂、渡辺真純、石坂彰敏、他. マイクロサンプリング. 呼吸器科 2008; 13: 366-372. 査読無

〔学会発表〕(計3件)

(1)藤原宏、長谷川直樹、他. 気管支鏡にて初めて診断に至った肺非結核性抗酸菌症の臨床的検討. 第33回日本呼吸器内視鏡学会学術集会. 2010年6月10日、横浜市、パシフィコ横浜

(2) 長谷川直樹. Mycobacterium *avium* complex による呼吸器感染症の基礎と臨床. 第49回日本呼吸器学会学術講演会. 2009年6月12日、東京都、東京フォーラム

(3)Watanabe M. Analysis of epithelial lining fluid using bronchoscopic microsampling methods for various diseases including lung cancer, invited lecture. 15th World congress for bronchology and 15th World congress for Bronchoesophagology. April 2,2008, Tokyo, Keio Plaza Hotel.

６．研究組織

(1)研究代表者

渡辺　真純　(WATANABE MASAZUMI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90201227

(2)研究分担者

河野　光智　(KOHNO MITSUTOMO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10276272

長谷川　直樹（HASEGAWA NAOKI）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：20198724

神谷　一徳（KAMIYA KAZUNORI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80365270

石坂　彰敏（ISHIZAKA AKITOSHI）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90176181

小林　紘一（KOBAYASHI KOICHI）
慶應義塾大学・医学部・名誉教授
研究者番号：80051704

(3)連携研究者

なし