

## 【40】

氏 名	佐 藤 陽 子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	乙第819号
学位授与の日付	令和4年2月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Comparison of inducible nitric oxide synthase mRNA expression in different airway portions and association with nitric oxide parameters from patients with asthma (喘息患者から得られた異なった気道部位におけるiNOS mRNA発現とNO値との関連の比較)
論文審査委員	(主査) 教授 矢 澤 卓 也 (副査) 教授 吉 原 重 美 教授 春 名 眞 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

呼気一酸化窒素濃度 (FeNO) は気管支喘息 (BA) の診断の補助やモニタリングに広く使われている。コントロールされていない喘息では、気管支組織と肺胞組織の両方の誘導型一酸化窒素 (iNOS) レベルが上昇している事が知られている。しかし末梢気道炎症を評価することは臨床的には困難であり、いくつかの末梢気道炎症を推定する方法が報告された。TsoukiasとGeorgeらは一酸化窒素 (NO) の肺胞濃度の評価のため2コンパートメントモデルCANO (2CM) を提唱した。一方Condorelliらはairway treeと軸索方向の拡散を考慮したトランペット様形状に基づいたモデルをCANO (TMAD) とした。加えて、Högmanらはnon-linearモデルCANO (non-linear) を提唱した。

#### 【目 的】

気管支鏡にて肺胞、末梢気道、中枢気道の各部位から得られた気道細胞 (Airway cells : ACs) におけるiNOS mRNA発現と、3つの算出法で末梢気道NOを算出し、どの方法が最も相関するか検討することを目的とした。

#### 【対象と方法】

後方視的に10例のステロイド未治療 (snBA) を含む安定した軽症から中等症の喘息患者18例のデータを解析した。サンプルは気道のブラッシングと肺胞洗浄 (BAL) を使用した。組織サンプルのiNOS蛋白の発現については免疫染色にて評価した。気道細胞 (ACs) におけるiNOS mRNAは定

量的PCRにて測定した。中枢気道（気管第2分岐部）、末梢気道（10-15番分岐部）の気管支、細気管支と肺胞領域から得られた気道細胞におけるiNOS mRNAと3つの算出方法によって得た末梢気道NOとの相関を評価した。尚、本研究は獨協医科大学病院生命倫理審査委員会の承認に基づき施行した（hop-m22095）。

#### 【結 果】

ステロイド未治療群では免疫染色において、iNOS蛋白は主に気道上皮に発現しており、肺胞領域では肺胞マクロファージに発現していた。iNOS mRNAの発現は、ステロイド治療群に比してステロイド未治療群において、中枢気道と末梢気道の双方で増加していた。CANO（2CM）は一秒量と負の相関を示し、特に末梢の気道細胞のiNOS mRNAと相関を認めた。しかしTMAD及びnon-linearで計算されたCANOは肺機能及びどの部位のiNOS mRNAとも相関が見られなかった。

#### 【考 察】

今回の検討は喘息末梢気道に発現するiNOS mRNAと3つの算出法で得た末梢気道NOの相関を直接検討した初めての報告である。3つの算出法の中で、CANO（TMAD）は末梢気流制限との相関があり、喘息の末梢気道病態を示すことがすでに報告されていたため、我々はCANO（TMAD）が喘息患者の遠位気道の炎症のより良い指標であるという仮説に基づき本研究を実施した。その結果、CANO（2CM）は末梢気道のiNOS mRNA発現と有意に相関した。CANO（2CM）は末梢気道NOの推定に有用であることが示された。

#### 【結 論】

CANO（2CM）は未治療喘息患者において末梢気道炎症を反映する。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

呼気一酸化窒素濃度（FeNO）は気管支喘息（BA）の診断の補助やモニタリングに広く使われている。コントロールされていない、もしくは不十分な喘息では、気管支組織と肺胞組織の両方の誘導型一酸化窒素（iNOS）レベルが上昇している事が知られている。しかし喘息の重症化や難治化、喘息死にも関与する末梢気道炎症を評価することは臨床的には困難であり、呼気NOを利用したいくつもの末梢気道炎症を推定する方法が報告されている。TsoukiasとGeorgeらは気道を中枢気道と末梢気道を含む肺胞領域という2つのコンパートメントに分けて考える2コンパートメントモデルCANO（2CM）を提唱した。一方Condorelliらは2CMで考慮されていないairway treeと軸索方向の拡散を考慮したトランペット様形状に基づいたモデルをCANO（TMAD）とし、2CMの修正モデルと位置づけられた。加えて、Högmanらはnon-linearモデルCANO（non-linear）を提唱した。いずれの方法も呼吸機能や気道抵抗との関連を見た報告があるものの、実際の炎症状況を反映しているかを検討した報告はない。そこで気管支鏡にて肺胞、末梢気道、中枢気道の各部位から得られた気道細胞（Airway cells：ACs）におけるiNOS mRNA発現と、3つの算出法で末梢気道NOを算出し、どの方法が最も相関するか検討することを目的とした。結果、2CMで算出したCANOが末梢気道のiNOS

mRNA発現と有意に相関したため、CANO (2CM) は末梢気道NO (末梢気道炎症) の推定に有用であると結論づけている。

#### **【研究方法の妥当性】**

申請論文では、後方視的にステロイド未治療喘息10例、ステロイド既治療喘息8例の安定した軽症から中等症の喘息患者18例のデータを解析している。サンプルは気道のブラッシングと肺胞洗浄 (BAL) を使用した。組織サンプルのiNOS蛋白の発現については免疫染色にて評価し、気道細胞 (ACs) におけるiNOS mRNAは定量的PCRにて測定された。中枢気道 (気管第2分岐部)、末梢気道 (10-15番分岐部) の気管、気管支と肺胞領域から得られた気道細胞におけるiNOS mRNAが3つの算出方法によって得た末梢気道NOとの相関を評価しており、研究方法は妥当と考える。なお、この研究は獨協医科大学病院倫理審査委員会の承認を得て行われている (hop-m22095)。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

ステロイド未治療群では免疫染色において、iNOS蛋白は主に気道上皮に発現しており、肺胞領域では肺胞マクロファージに発現していることを明らかにし、iNOS mRNAの発現は、ステロイド治療群に比してステロイド未治療群において、中枢気道と末梢気道の双方で増加していることが示されている。CANO (2CM) は一秒量と負の相関を示し、特に末梢の気道細胞のiNOS mRNAと相関を認めしたが、TMAD及びnon-linearで計算されたCANOは肺機能及び、どの部位のiNOS mRNAとも相関が見られていない。申請論文では過去に報告のない実際の末梢気道細胞におけるiNOS mRNAの発現と前述3方法との関連を初めて明らかにしている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

#### **【結論の妥当性】**

申請論文は、喘息末梢気道に発現するiNOS mRNAと3つの算出法で得た末梢気道NOの相関を直接検討した初めての報告である。3つの算出法の中で、CANO (TMAD) は末梢気流制限との相関があり、喘息の末梢気道病態を示すことがすでに報告されていたため、CANO (TMAD) が喘息患者の遠位気道の炎症のより良い指標であるという仮説に基づき本研究が実施されているが、CANO (2CM) が末梢気道のiNOS mRNA発現と有意に相関したことを明らかに示している。この結論は論理的に矛盾するものではなく、CANO (2CM) は末梢気道NOの推定に有用であることは結論として妥当なものである。

#### **【当該分野における位置付け】**

申請論文では、喘息の重症化や難治化に関与する末梢気道の炎症を3つの算出法のうち、どの方法が最も炎症を正しく判断できているかを、実際の末梢気道細胞を用いて研究を行っており、2CM法が最も末梢気道炎症を反映していることを明らかにしている。末梢気道炎症の非侵襲的評価法として喘息領域においては、大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者はiNOS蛋白が喘息の中枢及び末梢気道に発現していることを免疫染色で確認後、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当

該領域の国際誌に掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

**【学位授与の可否】**

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

**（主論文公表誌）**

Clinical & Experimental Allergy

（49：582-590, 2019）