

博士（医学）竹藪公洋

学位論文題名

Cysteine proteinases and cystatin C  
in bronchoalveolar lavage fluid from subjects  
with subclinical emphysema

（早期肺気腫患者の気管支肺胞洗浄液中のシステインプロテアーゼと  
シスタチンC）

学位論文内容の要旨

研究目的

肺気腫は殆どが中高年の喫煙者に発症し、その成因として肺内のプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説が提唱されてきた。しかし、喫煙者の一部しか肺気腫を発症しない理由や肺内で気腫化に主たる役割を担っているプロテアーゼは何かという問題は未解決である。これは従来の殆どの研究が単に喫煙者と非喫煙者、あるいは肺気腫患者と健常者の比較にとどまっていることによる。そこで本研究では呼吸器自覚症状のない中高年者の中で肺高解像能CTにより気腫病変を認める喫煙者を抽出し、気腫病変のない喫煙者、非喫煙者を対照に気管支肺胞洗浄（BAL）液中のプロテアーゼの免疫学的酵素量、酵素活性、肺胞マクロファージからのプロテアーゼ放出能を検討した。今回着目したのはシステインプロテアーゼに属し強力なエラスチン分解能を有するカテプシンLである。さらに同じシステインプロテアーゼだがエラスチン分解能に乏しいカテプシンBとその両者のインヒビターであるシスタチンCについても検討した。最後に我々が同様の手法で検討し以前に報告した好中球エラスター（セリンプロテアーゼの一種）の成績と今回の成績を比較し気腫病変形成における各プロテアーゼの役割の違いを考案した。

対象と方法

中高年ボランティア39名（男36名、女3名；平均年齢60±11SD歳）に問診、血液検査、呼吸機能検査、肺高解像能CT検査を行い非喫煙者8名、気腫病変のない喫煙者14名、気腫病変のある喫煙者17名の3群に分けた。BALは気管支鏡を右中葉区域枝に楔入りし、生理的食塩水を50mlずつ4回に分けて注入し肺胞領域の情報をより反映するとされる後半150mlからの回収液を測定に用いた。細胞を遠沈分離し総細胞数、細胞分画を算定し、上清は希釈の補正のためアルブミン濃度を測定した後-70°Cで保存した。

BAL液上清についてはカテプシンL、カテプシンB、シスタチンC及び好中球エラスター・ $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体の酵素量をELISA法で、またカテプシンLの活性を合成基質のZ-Phe-Arg-MCAとカテプシンBの特異的阻害剤のCA-074を用いて蛍光吸光光度計で測定した。次に、肺胞マクロファージの培養上清中のカテプシンLの酵素量を測定し、喫煙や気腫病変の有無との関係を検討した。さらにカテプシンLと好中球エ

ラスターの気腫病変形成における役割の違いを明らかにするため同一被験者でBAL液中両酵素量の相関をみるとともに、被験者を60歳未満と60歳以上の2群に分けて再検討した。これは60歳未満で気腫病変を有する被験者はより早期の病変を有し、かつ将来肺気腫患者となる可能性がより高いと判断したからである。統計は3群間の差を Kruskal-Wallis testで、2群の差をMann-Whitney U-testで検定し $p < 0.05$ で有意と判定した。

## 結果

喫煙指数は気腫病変のある喫煙者と気腫病変のない喫煙者の2群で差はなかった。呼吸機能検査で一秒率は気腫病変のある喫煙者で気腫病変のない喫煙者より有意に低値であったが、閉塞性障害はごく軽度で臨床的に明らかな肺気腫患者は含まれていなかった。BAL液中肺胞マクロファージの比率は喫煙者の2群で非喫煙者より有意に高値であったが喫煙者2群間では差はなかった。またBAL液中好中球比率は3群間で差はなかった。

BAL液中のカテプシンLとシスタチンCの酵素量はいずれも気腫病変のある喫煙者で気腫病変のない喫煙者より有意に高かったが ( $0.54 \pm 0.10$  vs.  $0.29 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{mg}$  albumin,  $p < 0.05$ ;  $0.54 \pm 0.07$  vs.  $0.31 \pm 0.64 \mu\text{g}/\text{mg}$  albumin,  $p < 0.05$ ) 、カテプシンLの酵素活性は3群間で差がなく、肺胞マクロファージ培養液のカテプシンLの酵素量も気腫病変の有無で差はなかった。BAL液中カテプシンBの酵素量も3群間で差がなかった。

同一被験者の検体のカテプシンLと好中球エラスター・ $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体の酵素量には全く相関がなかった。さらに60歳未満の被験者だけで気腫病変の有無による喫煙者2群間の比較をすると、好中球エラスターはなお気腫病変のある喫煙者で有意に高値を示したが、カテプシンLでは両群間の差異が完全に消失した。

## 考案

本研究の特徴は臨床的に明らかな肺気腫患者を除外し、肺CT検査のみで気腫病変を診断したことである。これにより進行した肺気腫に伴う結果よりは早期の気腫病変に伴う変化を検出しうる。その結果、気腫病変のある喫煙者のBAL液中のカテプシンLの酵素量は非喫煙者のみならず同等の喫煙歴をもちながら気腫病変のない喫煙者よりも有意に高いことを示した。ただし、そのインヒビターであるシスタチンCの酵素量も気腫病変のある喫煙者のBAL液中で気腫病変のない喫煙者より有意に高く、カテプシンLのBAL液中酵素活性に気腫病変の有無による差がないことからプロテアーゼ・アンチプロテアーゼの不均衡が肺気腫の成因に重要であるとする仮説には必ずしも合致しなかった。一方、肺胞マクロファージからのカテプシンL放出量も気腫病変の有無で差がなかった。

これまでに我々は早期肺気腫病変における好中球エラスターの関与を主張してきたが、今回の検討で同一被験者からの検体で好中球エラスター・ $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体とカテプシンLの酵素量は全く相関しないこと、60歳未満の喫煙者の比較では気腫病変の有無による有意差は前者でのみ認めることから、これら2つのプロテアーゼの早期肺気腫病変における役割は年齢や患者間で異なることも明らかにした。

カテプシンLはシステインプロテアーゼに属し、肺内では主として肺胞マクロファージのライソゾームに存在するが、細胞外にも放出され酸性条件で強力なエラスチン分解能を有する一方、好中球エラスターのインヒビターの $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビターを不活性化する作用もあり気腫化との関係が注目されてきた。しかしこの酵素についてBAL液中の活性や肺胞マクロファージのmRNA発現量が喫煙者で非喫煙者より高いという報告はあるが肺気腫との関係を明らかにした研究はない。本研究はBAL液中カテプシン

ンLの酵素量が気腫病変のある喫煙者で確かに高いということを初めて示した点で意義がある。しかし、好中球エラスター $\cdot \alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体の成績との比較は、肺気腫の成因に関与すると推定されている酵素が被験者の年齢、病変の進行、喫煙暴露の期間や程度により個体間でさまざまに働く可能性を示していると考えられる。

### 結論

カテプシンLとそのインヒビターであるシスタチンCの酵素量は早期肺気腫患者の気管支肺胞洗浄液中で上昇している。ただし、カテプシンLの早期肺気腫病変形成における役割は患者の年齢や病期により好中球エラスター $\cdot \alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体と競合する可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 西 信 三

副査 教授 加 藤 紘 之

副査 教授 川 上 義 和

## 学位論文題名

### Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema

(早期肺気腫患者の気管支肺胞洗浄液中のシステインプロテアーゼと  
シスタチンC)

肺気腫は喫煙によりプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡が生じ、肺弾性線維の破壊をきたし発症するとされる。しかし、実際に発症するのは喫煙者の一部であり喫煙に関する感受性が注目される。われわれはかつて気管支肺胞洗浄(BAL)液や肺胞マクロファージ培養上清の好中球エラスターーゼ・ $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体の蛋白量が早期肺気腫群では気腫病変のない喫煙者より有意に高いことを報告した。一方、カテーテンLはシステインプロテアーゼの一種で強力なエラスチン分解能を有することから肺気腫発症との関係が注目されている。本研究は喫煙に伴う肺気腫形成に関してシステインプロテアーゼとそのインヒビターが喫煙感受性を反映するか否かを検討し、さらに好中球エラスターーゼ・ $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体の役割と比較した。呼吸器自覚症状のない中高年者39名から肺高解像能CTにより気腫病変を認める喫煙者を抽出し、非喫煙者、気腫病変のない喫煙者、気腫病変のある喫煙者の3群に分け、問診、呼吸機能検査、血液検査、BALを行った。BAL液上清のカテーテンL、カテーテンB(エラスチン分解能に乏しいシステインプロテアーゼ)、シスタチンC(システインプロテアーゼインヒビター)及び好中球エラスターーゼ・ $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体の蛋白量をELISA法で、またカテーテンLの活性をZ-Phe-Arg-MCAとCA-074を用いて蛍光吸光光度計で測定した。次に、肺胞マクロファージの培養上清のカテーテンLの蛋白量を測定した。結果は、対象の特徴では気腫病変のある喫煙者と気腫病変のない喫煙者の2群で喫煙指数、コチニン濃度に差がなかった。BAL液では喫煙者は非喫煙者より肺胞マクロファージの比率が高値であったが気腫病変の有無による差はなかった。BAL液中のカテーテンLとシスタチンCの蛋白量はいずれも気腫病変のある喫煙者で気腫病変のない喫煙者より有意に高値であった。しかし、カテーテンLの酵素活性、肺胞マク

ロファージ培養液のカテプシンLの蛋白量は気腫病変の有無で差はなかった。BAL液中カテプシンBの蛋白量は喫煙者全体では非喫煙者より高値であったが気腫病変の有無による差はなかった。同一被験者のBAL液中のカテプシンLと好中球エラスターの蛋白量には相関はなかった。そこで気腫病変形成における役割の違いを明らかにするため、被験者を60歳未満と60歳以上の2群に分けて再検討した。これは60歳未満で気腫病変を有する被験者はより早期の病変を有し、かつ将来臨床的な肺気腫患者となる可能性がより高いと判断したからである。60歳未満の被験者では好中球エラスターはなお気腫病変のある喫煙者で有意に高値を示したが、カテプシンLでは両群間の差異が消失した。以上より、BAL液のカテプシンLとシスタチンCの蛋白量は、カテプシンBとは対照的に肺の気腫化に関する喫煙感受性を反映するひとつの因子である。これらのプロテアーゼの肺気腫形成における意義は不明だが、肺気腫の成因に関与するとされている各酵素の役割は被験者の年齢、病変の進行、喫煙暴露の期間により個体間で異なる可能性がある。

口頭発表後、副査加藤教授から肺CT検査により抽出した今回の早期肺気腫群と臨床的肺気腫との関係などについて、副査川上教授から好中球エラスター・ $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体の意味づけや各種プロテアーゼの疾患特異性などについて、主査西教授よりシスティンプロテアーゼインヒビターとしてシスタチンC以外のものを想定しなくてよいかどうかについて、また、今後対象数を増やしたり追跡調査を行うことによる展望、肺気腫の成因として最も重要なプロテアーゼが何であるかという考案について質疑があった。これらの質疑に対し申請者は、今回の対象は必ずしも将来臨床的肺気腫になる群ではないが、呼吸機能検査での一秒量の経年的な低下と関連するBAL液中の指標を追跡調査で明らかにできる可能性があると回答した。さらに、好中球エラスター・ $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター複合体がelastin derived peptidesとよく相関するというデーターを紹介し間接的ではあるが肺胞破壊を反映するとの考案を述べた。また、シスタチンCは細胞外で働くシスタチン族でカテプシンLの抑制因子として最も重要であると回答した。加えて、他の質疑においても申請者は、質問者を納得させる妥当な回答を行った。審査員一同は、これらの結果を認め、博士（医学）の学位に値するものと判定した。