

[第4回日本アレルギー学会学術大会賞受賞論文]

原 著

## 活性化トロンビンによる気道リモデリング誘導機序に関する検討

大阪市立大学大学院医学研究科呼吸器病態制御内科学

金澤 博 姜 成勲 栩野 吉弘  
児玉 豊城 浅井 一久 平田 一人

【背景・目的】近年、トロンビンは気道リモデリング誘導因子の一つとして注目されている。今回、活性化トロンビンによる気道リモデリング誘導機序を明らかにすることを試みた。

【方法】21例の喘息患者、11例の健常者を対象に誘発喀痰を採取し、喀痰上清中のトロンビン活性、basic fibroblast growth factor (bFGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、procollagen type III peptide (P-III-P)濃度を測定した。

【結果】喘息群の誘発喀痰中トロンビン活性は、健常群に比較し、有意に高値であった。そして、気道内トロンビン活性とVEGF濃度は有意な相関関係を示した。同様に、トロンビン活性とbFGF濃度との間においても有意な相関関係を認めた。さらに、喘息患者においては、bFGFとP-III-P濃度の間に有意な相関関係を認めた。

【結語】喘息気道において、トロンビンによりbFGFが活性化される可能性が示唆された。今後、喘息気道におけるトロンビン活性の制御が、気道リモデリング進展抑制に対する一つの治療標的となりうる可能性が示唆された。

**Key words:** airway remodeling — basic fibroblast growth factor — thrombin — vascular endothelial growth factor

### 緒 言

気管支喘息の基本病態は、好酸球・Tリンパ球・肥満細胞・気道上皮細胞など種々の炎症細胞と肺の構成細胞が織り成す気道の慢性炎症性疾患であり、それに起因すると考えられている組織学的変化として“気道リモデリング”と総称される基底膜の肥厚・気管支平滑筋の肥大と増生・杯細胞の過形成・新生血管の形成等が認められる<sup>1)</sup>。

気道リモデリングは不可逆的な気道閉塞をもたらす、気道過敏性を慢性的に亢進させ、喘息の重症・難治化の要因と考えられている。特に、基底膜網状層の線維性肥厚と気道過敏性・気道閉塞性障害の程度との間には有意な相関関係が存在し、さらに、喘息の重症度に応じて基底膜肥厚が増強することも明らかにされている<sup>2)</sup>。一方、これまで喘息死の剖検所見から気道における血管数の増加が指摘されていたが、近年、喘息患者の気管支生検所

Received: October 8, 2007, Accepted: March 6, 2008

利益相反 (conflict of interest) に関する開示: 著者全員は本論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

**Abbreviations:** bFGF “basic fibroblast growth factor”, P-III-P “procollagen type III peptide”, VEGF “vascular endothelial growth factor”

金澤 博: 大阪市立大学大学院医学研究科呼吸器病態制御内科学 [〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3]

E-mail: kanazawa-h@med.osaka-cu.ac.jp

**Table 1** Clinical characteristics of study subjects

	Normal controls	Asthmatic patients
Subject number (male/female)	11 (7/4)	21 (14/7)
Age (years)	29.8 (4.8)	33.7 (5.9)
FEV1 (% predicted)	102.3 (6.7)	89.0 (3.6)*
FEV1/FVC (%)	89.0 (2.1)	82.1 (3.1)*
PC20 methacholine (mg/mL)	> 10	2.6 (1.2)*

Definition of abbreviations:

FEV1 = forced expiratory volume in one second; FVC = forced vital capacity; PC20 methacholine = provoking concentration of methacholine causing a 20 % fall in FEV1.

All values are mean (SD).

† Geometric mean with log SEM shown in parentheses.

\* $p < 0.01$  compared with normal controls.

**Table 2** Results of induced sputum analysis in study subjects

	Normal controls	Asthmatic patients
% Eosinophils (%)	0.6 [0.1-1.3]	12.0 [4.0-22.0]*
VEGF (pg/mL)	900 [0-3200]	4300 [3500-7600]*
bFGF (pg/mL)	4.1 [1.7-10.2]	47.0 [23.2-82.9]*
P-III-P (U/mL)	0.5 [0-1.0]	2.8 [1.5-4.6]*

Definition of abbreviations:

VEGF = vascular endothelial growth factor; bFGF = basic fibroblast growth factor; P-III-P = procollagen type III peptide.

All values are median [range].

\* $p < 0.01$  compared with normal controls.

見から気道粘膜下の活発な新生血管の存在が明らかにされ、喘息の病態生理への深い関わりが注目されている<sup>3)</sup>。実際、血管の気道粘膜に対する占拠率と気道過敏性・気道の閉塞性障害との間には有意な相関関係が示されており、血管数の増加は粘膜下浮腫の増強を惹起し、気道閉塞に深く関わっているものと考えられる<sup>4)</sup>。我々は、これまで喘息気道の血管新生における血管内皮増殖性因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の病態生理学的役割を検討してきた。つまり、VEGFにより誘導された新生血管の内皮細胞機能異常や過剰な血管透過性亢進能が、喘息の病態メカニズムに深く関与していることを明らかにしてきたのである<sup>5)</sup>。しかしながら、極めて興味深いことに、血管内皮細胞に特異的に作用するとされてきた

VEGFの過剰発現と基底膜肥厚の形成・進展の過程の間に深く介在する相互関係を示唆する複数の報告がなされたのである<sup>6)7)</sup>。そこで、我々は、喘息気道における新生血管形成を引き金とする基底膜肥厚進展の分子機構を明らかにするために、本研究を計画した。すなわち、第一に、新生血管の内皮細胞の生理学的特性がもたらす気道内におけるトロンビン活性化機序を明らかにし、第二に、活性化トロンビンが誘導する基底膜組織肥厚の多段階成立経路を明らかにするというものである。

## 対象と方法

### 1. 対象

21例のステロイド未治療の喘息患者と年齢・性別を適合させた11例の健常者を対象とした(Table 1)。

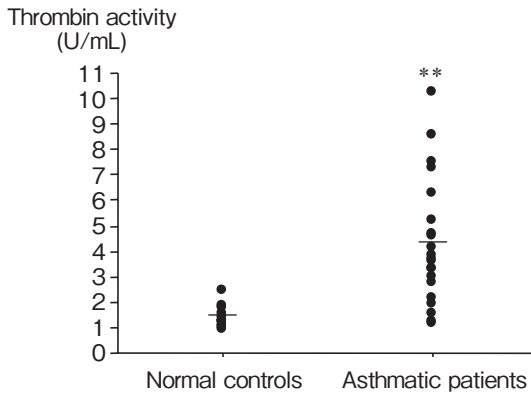


Fig. 1. Comparison of thrombin activity in induced sputum from normal controls and asthmatic patients.

Each bar represents the mean value.

\*\*  $p < 0.0001$  compared with normal controls.

## 2. 方法

すべての対象者に対して、3% 高張食塩水を吸入させ、誘発喀痰を採取した。誘発喀痰は既報の方法を用いて処理し<sup>8)</sup>、喀痰上清中の basic fibroblast growth factor (bFGF)、VEGF、Procollagen type III peptide (P-III-P) を ELISA kit (R & D Systems ; Minneapolis, MN) を用いて測定した。また、トロンビン活性は、合成基質である H-D-hexahydrotyrosol-alanyl-arginine-para-nitroanilide diacetate (American Diagnostica ; Greenwich, CT) を用いて測定した<sup>9)</sup>。

## 3. 統計

群間比較は、Student t test あるいは Mann-Whitney U test を用いた。また、相関関係の検定には、Spearman rank coefficient を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結 果

誘発喀痰の細胞成分の解析から、喘息群においては、健常群に比較し好酸球比率が有意に高値であると共に、上清中の VEGF・bFGF・P-III-P 濃度も有意に高値であった (Table 2)。さらに、喘息群の誘発喀痰中トロンビン活性も健常群に比較し有意に高値であった (median [range] : 健常群 1.26 [0.93~2.42] U/ml ; 喘息群 3.67 [1.15~10.2] U/ml,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1)。今回の研究の全対象者

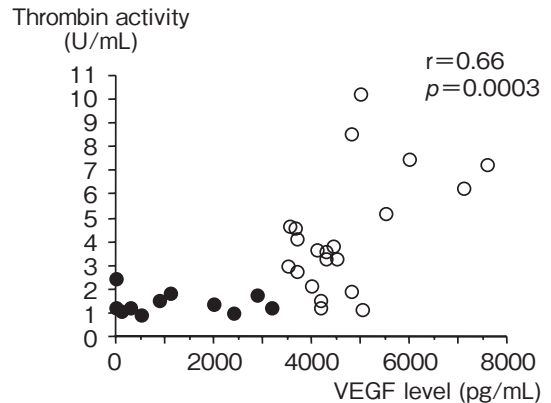


Fig. 2. Correlation between VEGF level and thrombin activity in induced sputum from all study subjects (open circle; asthmatic patients, closed circle; normal controls).

において、気道内トロンビン活性と VEGF は有意な正の相関関係を示した ( $r=0.66, p=0.0003$ ) (Fig. 2)。同様に、トロンビン活性と bFGF との間においても有意な相関関係を示した ( $r=0.84, p < 0.0001$ ) (Fig. 3)。さらに、喘息患者においては、bFGF と P-III-P の間においても有意な正の相関関係が存在した ( $r=0.79, p=0.0004$ ) (Fig. 4)。

## 考 察

今回の研究結果を基にして、我々は活性化トロンビンによる気道リモデリング形成・進展のメカニズムの病態仮説を考案した (Fig. 5)。我々は既に、喘息気道において VEGF の過剰発現により、豊富な新生血管が形成されること、さらに、このような新生血管の内皮細胞は shear stress 等の刺激に反応して、容易に内皮細胞上に発現するトロンボモデュリンの剝離という現象を呈することを報告している<sup>10)</sup>。これは喘息気道の新生血管内皮細胞の生理学的機能異常という特性を反映する一つの知見であると思われる。このようなメカニズムを介して、喘息気道の血管内皮細胞表面においては、トロンビンの不活性化を担うとされているトロンボモデュリンの発現が著明に減弱している可能性が強く示唆される。加えて、今回の検討における喘息気道でのトロンビン活性の亢進、およ

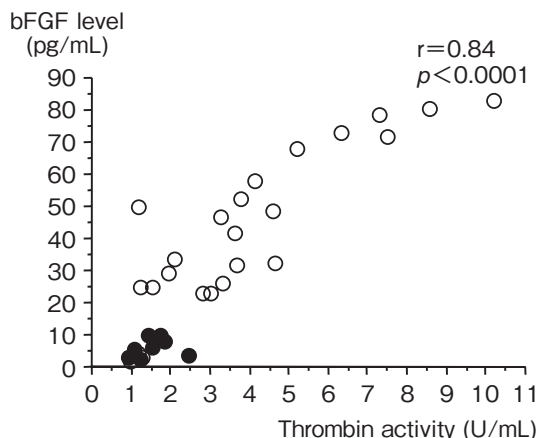


Fig. 3. Correlation between bFGF level and thrombin activity in induced sputum from all study subjects (open circle; asthmatic patients, closed circle; normal controls).

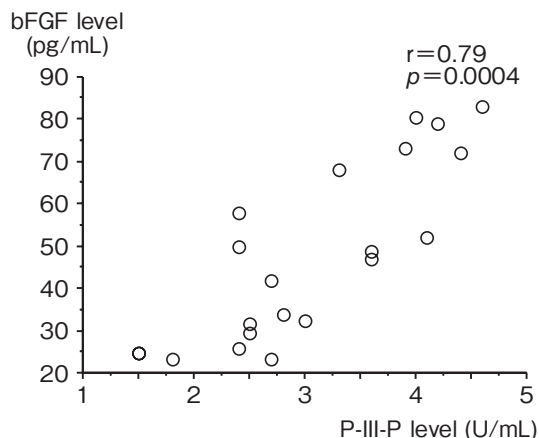


Fig. 4. Correlation between bFGF level and P-III-P level in induced sputum from asthmatic patients.

び、トロンビン活性と VEGF 濃度との間の有意な正の相関関係の存在は、我々の仮説を論理的に強く支持するものである。即ち、これらの知見から、喘息気道におけるトロンビン活性の上昇は、気道の血管内皮細胞上のトロンボモデュリン発現低下に伴うトロンビンの不活性化の減弱に起因しているものと考えられる。

我々は、今回の検討において喘息患者の誘発喀痰中 bFGF 濃度は、健常者に比較し有意に高値であるという事実を明らかにした。bFGF に関しては、既に、喘息気道において過剰発現していること、さらに、抗原負荷により、その産生が有意に促進されるという事実が明らかにされている<sup>11)</sup>。bFGF は、線維芽細胞をはじめ、多くの肺の構成細胞に対して、強力な増殖活性を有するものの、その産生細胞からの遊離に必須とされる cytoplasmic sequences を欠いているために、気道リモデリングへの直接的な関与については疑問視されてきた。しかしながら、近年、その気道内での存在部位として、気道上皮下の基底膜内に豊富に局在していること、そして、その貯蔵庫ともいえる細胞外マトリックスから放出される可能性が報告され<sup>12)</sup>、気道リモデリング形成・進展の重要な因子として注目されつつある。このような背景から、

bFGF の気道内での活性化メカニズムの解明は極めて重要な臨床的意義を有する研究課題であると想定される。今回我々は、気道内トロンビン活性が、bFGF 濃度と有意な相関関係を有することを明らかにし、気道における bFGF 活性化機構の一端を初めて明らかなものとしたのである。つまり、bFGF は細胞外マトリックスの構成成分であるペプチドグリカンの一種であるパルカンと結合し、不活性化状態で存在しているが、活性化トロンビンは、この結合を選択的に切断することにより、bFGF の活性化に関与していると考えられる<sup>13)</sup>。さらに、bFGF と基底膜網状層の線維化の程度を反映する分子マーカーである P-III-P<sup>14)</sup>濃度との間に有意な相関関係が存在することから、bFGF の気道リモデリングに対する直接的関与の可能性を明快に示したのである。

今回の結果より、気道の VEGF 過剰発現を介する新生血管形成亢進から、トロンビン活性化、及び bFGF の活性化体への変換と基底膜肥厚進展にいたる一連の分子機構の仮説を提示した。さらに、トロンビンは、多くの肺構成細胞に存在する protease activated receptor-1 を直接的に刺激することにより、bFGF を介さずに、線維芽細胞の増殖・コラーゲン産生を促進する経路の存在も明らかにされており<sup>15)</sup>、今後、トロンビン生成・活性化を

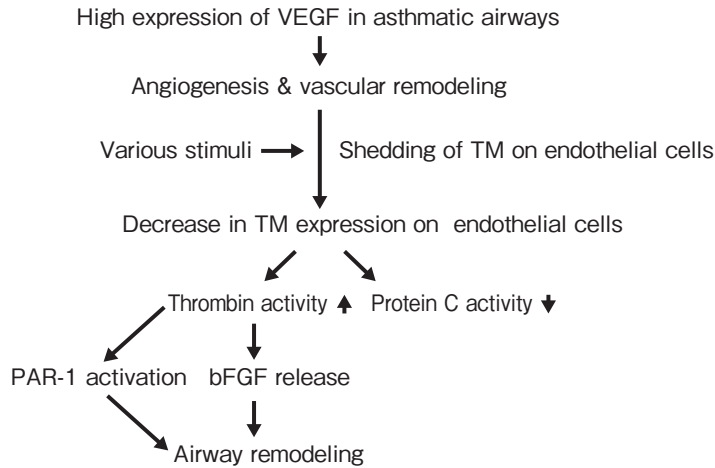


Fig. 5. A hypothesis of up-regulation of thrombin activity via VEGF-dependent pathway. VEGF = vascular endothelial growth factor, TM = thrombomodulin, bFGF = basic fibroblast growth factor, PAR-1 = protease activated receptor-1.

制御するという観点からの気道リモデリングの治療戦略が注目されるものと思われる。そして、今回の研究結果を通して、今日の喘息治療において極めて重要な課題である気道リモデリングの制御に対する新たな治療戦略構築の可能性が示されることを期待したい。

本論文の要旨は、第57回日本アレルギー学会秋季学術大会(2007年10月開催)にて発表されたものである。

## 文 献

- 1) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnston M, Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1720-45.
- 2) Laitinen A, Altraja A, Kämpe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 951-8.
- 3) Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax* 2001; 56: 902-6.
- 4) Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 295-301.
- 5) Kanazawa H, Nomura S, Yoshikawa J. Role of microvascular permeability on physiologic differences in asthma and eosinophilic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 1125-30.
- 6) Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 2004; 10: 1095-103.
- 7) Chetta A, Zanini A, Foresi A, D'Ippolito R, Tupa A, Castagnaro A, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodeling in asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 1437-42.
- 8) Kanazawa H, Hirata K, Yoshikawa J. Role of endogenous nitric oxide in exercise-induced airway narrowing in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:

- 1081-7.
- 9) Terada M, Kelly EAB, Jarjour NN. Increased thrombin activity after allergen challenge. A potential link to airway remodeling? *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 373-7.
  - 10) Kanazawa H, Tochino Y, Ichimaru Y, Kodama T, Kyoh S, Umeda N. Role of vascular endothelial growth factor in pulmonary endothelial cell injury by exercise challenge in asthmatic patients. *J Asthma* 2006; 43: 267-71.
  - 11) Redington AE, Roche WR, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Holgate ST, et al. Basic fibroblast growth factor in asthma: Measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 384-7.
  - 12) Shute JK, Solic N, Shimizu J, McConnell W, Redington AE, Howarth PH. Epithelial expression and release of FGF-2 from heparan sulphate binding sites in bronchial tissue in asthma. *Thorax* 2004; 59: 557-62.
  - 13) Benezra BM, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Neufeld G, Bar-Shavit R. Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* 1993; 12: 3324-31.
  - 14) Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- $\beta$ , IL-11, IL-17 and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1293-8.
  - 15) Bar-Shavit R, Benezra M, Sabbah V, Bode W, Vlodavsky I. Thrombin as a multifunctional protein; induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 123-30.

#### POTENTIAL MECHANISMS OF AIRWAY REMODELING INITIATED BY ACTIVATED THROMBIN IN ASTHMA

Hiroshi Kanazawa, Shigenori Kyoh, Yoshihiro Tochino,  
Toyoki Kodama, Kazuhisa Asai and Kazuto Hirata

*Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka City University*

**Background:** High expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) induces subepithelial fibrosis associated with angiogenesis in asthma. Thrombin is recognized as a new candidate mediating airway remodeling. Therefore, this study was designed to determine the potential mechanisms of airway remodeling initiated by activated thrombin in asthma.

**Methods:** Levels of biochemical parameters in induced sputum were examined in 21 asthmatic patients and 11 normal controls.

**Results:** Thrombin activity in induced sputum was significantly higher in asthmatic patients than in normal controls (normal controls: median [range] 1.26 (0.93-2.42) U/mL; asthmatic patients: 3.67 (1.15-10.2) U/mL,  $p < 0.0001$ ). VEGF level in induced sputum was positively correlated with thrombin activity in all study subjects. Levels of basic fibroblast growth factor (bFGF), which is a major profibrotic factor, were also significantly higher in asthmatic patients than in normal controls. Moreover, thrombin activity was significantly correlated with bFGF level in all study subjects. We also observed a significant correlation between bFGF and procollagen type III peptide level.

**Conclusion:** Increase in VEGF level leads to up-regulation of thrombin activity in asthmatic airways, and this elevated thrombin activity induces elevation of bFGF level. It will become to be a new strategy of asthma therapy to attenuate thrombin activity for the regulation of airway remodeling.