

慢性閉塞性肺疾患における Receptor for Advanced Glycation End Products 蛋白の発現

田 中 良

要 約：目的：慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) はタバコ煙等の有害物質を長期間吸入暴露することで生じる肺の慢性炎症性疾患で、進行性の不可逆的閉塞性換気障害で定義される。Receptor for advanced glycation end products (RAGE) は、糖尿病性血管傷害における最終糖化産物の細胞膜受容体として発見され、炎症を惹起・増幅する。肺では恒常的に RAGE が高発現しているが、その機能は未だ不明で、肺疾患における意義も知られてない。今回、ヒト肺組織における RAGE 蛋白の発現解析により、その COPD の発症と進展における関与の解明を目指した。

対象と方法：COPD 群 38 症例と対照群 37 症例の外科的切除肺組織を対象とした。抗 RAGE 抗体による免疫染色を施し、I 型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージにおける発現を半定量解析し、年齢・閉塞性換気障害、1 秒率、% 肺活量、喫煙指数との関係を検討した。

結果：I 型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおける RAGE の発現は、対照群と比較し COPD 群で有意に高く、1 秒率と負の相関を認めた。細気管支粘膜上皮細胞では両群間に有意な差異は認めず、さらに RAGE 発現と喫煙指数、% 肺活量との関連はいずれの細胞群でもみられなかった。

結論：以上の研究成績から肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージで発現される RAGE が COPD の発症と進行に関わる可能性が示された。さらにこれら RAGE の発現亢進は喫煙による直接作用ではなく別経路の可能性も示唆され、RAGE は COPD 進行の制御に向けた新たな標的分子となる可能性が示唆された。

キーワード：慢性閉塞性肺疾患、RAGE、喫煙、I 型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ

緒 言

Receptor for advanced glycation end products (RAGE) は、糖尿病性血管傷害で重要な役割を演じる最終糖化産物 advanced glycation end products (AGEs) の細胞膜受容体として発見された (1)。RAGE は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜受容体分子の一つで、332 個のアミノ酸から構成される分子量約 55kDa のポリペプチドである。細胞外領域は 1 つの V タイプドメインと 2 つの C タイプドメインからなり、疎水性の膜貫通領域が続く (2)。RAGE は炎症を惹起・増幅するマルチリガンド受容体として機能することが明らかとなり (3,4)、慢性炎症や関連する様々な疾患の病態への関与が注目されている (5)。

多くの健常なヒトの組織では RAGE の発現は低いレベルで、動脈硬化やアルツハイマー病などの病的状態で発現が亢進する (5)。一方、肺では正常状態でも RAGE が恒常的に高発現していることが知られている (6)。しかし、正常肺での RAGE の機能をはじめ、肺疾患、特に慢性肺疾患の病態発生における RAGE の役割は未だ解明されていない (5)。

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を長期間吸入暴露することで生じる肺の慢性炎症性疾患で、進行性の不可逆的な閉塞性換気障害で定義される (7)。厚生労働省の統計によると 2012 年の COPD による死亡者数は 16,402 人で、死亡原因の全体で 9 位、男性では 8 位に位置し、今なお増加傾向にある。2000 年の疫学調査では日本人の 40 歳以上の COPD 有病率は少なくとも 8.69%、患者数は 530 万人と推定されている (8)。Cerami らは喫煙者の AGEs の血中濃度が上昇すると報告しており (9)、RAGE を介する肺組織での炎症の惹起・増幅の可能性が考えられる。

金沢医科大学大学院医学研究科先進呼吸器外科学
石川県河北郡内灘町大学 1-1
平成 26 年 1 月 27 日受理

COPD肺におけるRAGEの発現

COPDの病態におけるRAGEの役割に関して、可溶性RAGE (soluble form of RAGE, sRAGE) がデコイレセプターとして働く可能性が報告されている(10-12)。ヒトCOPD肺組織におけるRAGE発現に関しては小規模な研究報告があるのみで、COPD肺におけるRAGEの発現細胞と発症・進展における役割に関する情報は未だ乏しい(13-16)。さらに、喫煙と肺におけるRAGE発現の関係に関しては、実験動物レベルで喫煙のRAGE発現亢進作用が報告されたが、ヒト肺では気管支粘膜での発現解析のみで、肺胞組織における情報はこれまで得られていない(14,17)。

今回、COPDの発症と進展におけるRAGEの役割を明らかにすることを目的に、外科的切除されたヒトCOPD肺組織におけるRAGEの蛋白発現を免疫染色により描出し、I型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージにおける発現を形態計測により半定量し、年齢・性、COPDの有無、1秒率、%肺活量、喫煙指数との関係を統計学的に解析した。

実験方法

1. 研究対象

2010 - 2012年に金沢医科大学呼吸器外科で肺切除術を施行した1秒率<70%の閉塞性換気障害を有する38症例および1秒率 \geq 70%の閉塞性換気障害を有さない37症例を研究対象とした。気管支喘息および耐糖能異常を有する患者は除外した。外科的切除された非腫瘍部肺組織の10%中性緩衝ホルマリン固定・パラフィン包埋切片(4 μ m)を用いた。一部の症例では新鮮凍結組織も採取し、使用まで-70℃で保存した。本研究計画に関しては金沢医科大学倫理委員会の承認を受けるとともに、切除肺組織の研究への利用に関し患者から文書で承諾を得た。

2. Western blot法

今回の検討では、一次抗体としてヒトRAGE蛋白のアミノ酸配列42-59に相当するペプチド(PKKPPQRLEWKLNTGRTE)を抗原として作製されたヤギ抗RAGEポリクローナル抗体(RAGE 001-050, Biologo社, Roma, Italy)を使用した。抗体の特異性の確認のため、下記の免疫染色で陽性発現が確認された正常肺ならびに肺癌新鮮凍結組織を検体としWestern blot法を行った。摘出後lysis buffer (50mM tris hydroxymethyl aminomethane-HCl, pH 7.6, 10% glycerol, 5mM 酢酸マグネシウム, 0.2mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% sodium dodecyl sulfate)を用い蛋白を抽出した。ブラッドフォード法(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で定量した蛋白10 μ gを10% polyacrylamide gelで電気泳動後、セミドライ法でニトロセルロース膜に転写した。5%スキムミルクによるブロッキング後、ニトロセルロース膜を抗RAGE抗体(2,000倍希釈)と4℃、18時間反応させた。0.05% Tween 20-phosphate buffered saline (PBS)で十分に洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgG抗体(Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA)と室温で1時間反応後、蛍光色素であるImmunoStar LD (Wako, 東京)と反応させ、ImageQuantLAS4000(富士フイルム, 東京)を用い

デジタル計測した。検体の蛋白量は、抗 β -actinマウスモノクローナル抗体(Sigma, St-Louis, MO, USA)を用い検出した β -actinの発現で標準化した。

3. 免疫組織学的検討

免疫染色にはストレプトアビジン・ビオチン法(Histofine SAB-PO kit, Nichirei, 東京)を用いた。一次抗体としてヤギ抗RAGEポリクローナル抗体(Biologo社, 1,600倍希釈)を使用した。実験は室温で行い、すべての切片を同じプロトコールで染色した。抗原賦活にはマイクロウェーブ(500W, 10分間)を用い、3%過酸化水素添加メタノール、室温、10分間の内因性ペルオキシダーゼ阻止と10%正常ウサギ血清、室温、30分間の処理後、一次抗体を4℃で16時間反応させた。PBSによる十分な洗浄後、ビオチン化二次抗体、ストレプトアビジン・ビオチン複合体との反応の後、diaminobenzidine溶液(Nichirei)による呈色反応とMeyer hematoxylinによる核染色を行った。陰性対照には一次抗体の代わりにPBSあるいは適切な濃度の非免疫ヤギIgGと反応させた。RAGEは正常肺組織においてI型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞と肺胞マクロファージに多く発現することがこれまで報告されている(13,14,16)。これら3種の細胞に関し、1症例に対し代表的部位各々3視野、計9視野を対物レンズ40倍で撮影した。撮影は、患者の背景因子を知らされていない病理医が行った。

4. RAGEの半定量解析

Wuら(16)の方法に修正を加えRAGEの発現を半定量解析した。撮影したI型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージの各視野につき、画像処理ソフトImage Jソフトウェア(version 1.37c, National Institutes of Health, Bethesda, WA, USA)を用いて各々5ヶ所ずつ領域を設定し輝度を測定した。細胞群毎に5ヶ所 \times 3視野 \times 75症例=1,125ヶ所、総計3,375ヶ所の領域を測定した。Image JではRed-Green-Blue画像の輝度は暗い方から0~255に分割して表される。染色は濃度が高いほど暗く映るため、(255-輝度)の値を用いて、RAGEの染色濃度RAGE-Signal Intensity (RAGE-SI)と定義した。各症例の各細胞群について1症例あたり各3視野5領域、計15領域のRAGE-SIを平均し、各々の症例の各細胞群のRAGE-SIとした。計測は、患者の背景因子を知らされない状態で行った。

5. 解析方法

RAGE-SIに対する患者の背景因子の影響を評価するために、性別・年齢とRAGE-SIとの関係を解析した。閉塞性換気障害の有無別の評価では、1秒率<70%の障害あり群と1秒率 \geq 70%の障害なし群に分けてRAGE-SIを比較した。RAGE-SIと喫煙指数、%肺活量および1秒率との相関の有無を検討した。

統計学的解析にはStatMate software program (Version 3.18, ATMS社, 東京)を用いた。平均値の差の検定にはt検定を、相関の有無の評価にはスピアマン順位相関係数(Spearman correlation coefficient)を、比率の差の検定に χ^2 検定を用い、 $p<0.05$ を統計学的に有意とした。

結 果

1. 対象患者背景

全症例の平均年齢は 68.0 ± 8.3 才、性別は男性55例、女性20例と男性が多く、喫煙指数は 830 ± 671 であった。閉塞性換気障害を有する群では、平均年齢が 70.2 ± 7.1 才、男女比は34/4、喫煙指数は 986 ± 617 と、閉塞性換気障害を有しない群の平均年齢 65.3 ± 8.9 才、男女比21/16、喫煙指数 669 ± 702 に比較して、年齢は高く、男性が多く、喫煙指数が高かった(表1)。

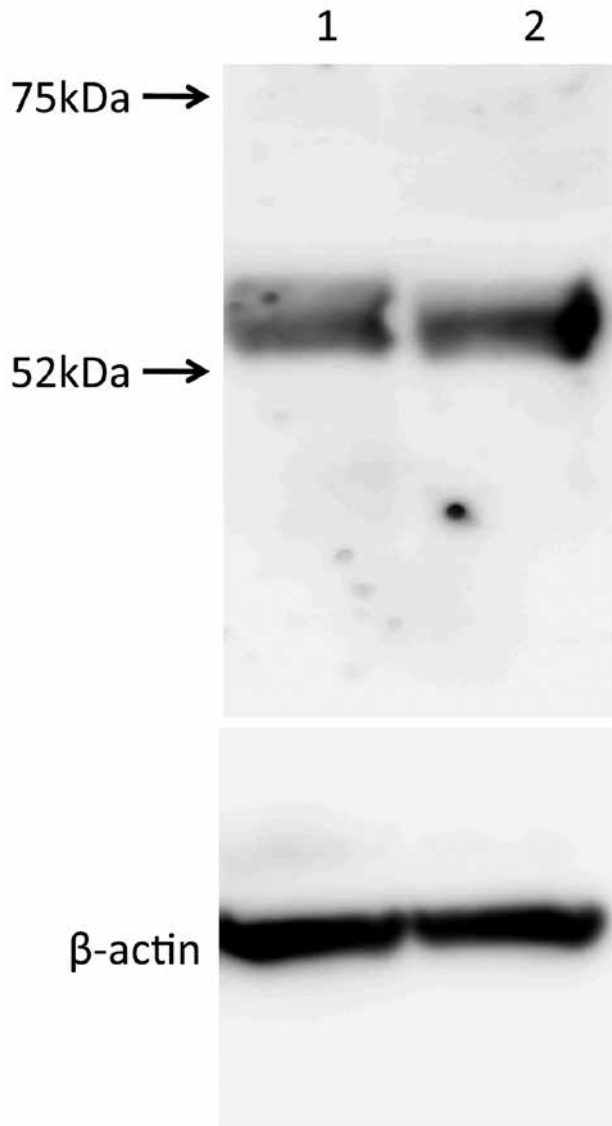


図1. 肺組織における Western blot法による RAGE 蛋白の発現
Lane 1 肺癌組織, lane 2 非癌部肺組織 (どちらも免疫染色で RAGE 発現陽性)
正常肺組織ならびに肺癌組織で分子量約 55kDa に単一バンドを認める。
下段は標準化のための β -アクチンの発現。

2. Western blot法による抗体の特異性

正常肺と肺癌組織の両者で、分子量55kDaのRAGEに相当する位置に単一の陽性バンドが検出され、抗体の特異性が確認された(図1)。

3. 免疫染色による RAGE の発現

閉塞性換気障害を有する群と有さない群の両者の肺組織の、I型肺胞上皮細胞、細気管支上皮粘膜細胞および肺胞マクロファージにRAGEの恒常的発現を認めた(図2)。その他、II型肺胞上皮細胞やリンパ球の一部にもRAGEの発現が観察された。

4. 患者の性・年齢と RAGE-SI の関係

患者の性別とRAGE-SIの関係は、I型肺胞上皮細胞では男性 91.3 ± 22.6 vs 女性 89.8 ± 20.0 、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージでも各々 164.2 ± 32.4 vs 152.0 ± 36.7 、 144.5 ± 29.2 vs 150.9 ± 25.6 と、いずれの細胞群においても統計学的な有意差は認めなかった(表2)。患者の年齢とRAGE-SIの相関の有無

表1. 対象患者背景

	全症例	閉塞性障害あり	閉塞性障害なし	p値
症例数	75	38	37	
年齢 (平均 \pm 標準偏差)	68.0 ± 8.3	70.2 ± 7.1	65.3 ± 8.9	0.010
性別 (M/F)	55 / 20	34 / 4	21 / 16	0.001
喫煙指数	830 ± 671	986 ± 617	669 ± 702	0.041

Abbreviation: M, male ; F, female

表2. 性別とRAGE-SIの関係

	RAGE-SI(平均 \pm 標準偏差)		p値
	男性	女性	
I型肺胞上皮細胞	91.3 ± 22.6	89.8 ± 20.0	0.804
細気管支粘膜上皮細胞	164.2 ± 32.4	152.0 ± 36.7	0.167
肺胞マクロファージ	144.5 ± 29.2	150.9 ± 25.6	0.389

Abbreviation: RAGE-SI, receptor for advanced glycation end products-signal intensity

表3. 閉塞性換気障害の有無とRAGE-SIの関係

	RAGE-SI(平均 \pm 標準偏差)		p値
	閉塞性障害あり	閉塞性障害なし	
I型肺胞上皮細胞	96.4 ± 21.2	85.2 ± 21.3	0.026
細気管支粘膜上皮細胞	146.2 ± 29.8	146.2 ± 27.0	0.998
肺胞マクロファージ	168.6 ± 29.3	153.0 ± 36.5	0.044

Abbreviation: RAGE-SI, receptor for advanced glycation end products-signal intensity

COPD肺におけるRAGEの発現

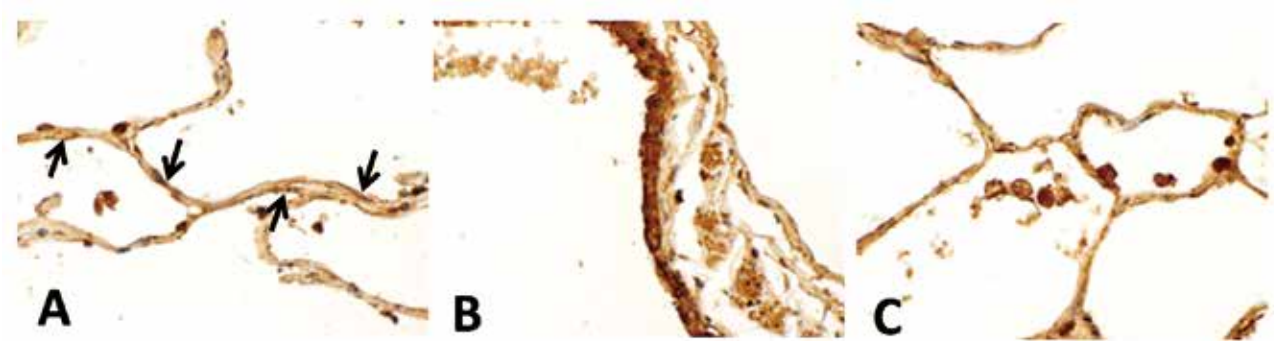


図2. COPD肺組織におけるRAGEの発現
 A. I型肺胞上皮細胞, B. 細気管支粘膜上皮細胞, C. 肺胞マクロファージにおけるRAGEの代表的発現。
 A. 矢印はRAGE陽性I型肺胞上皮細胞を示す。

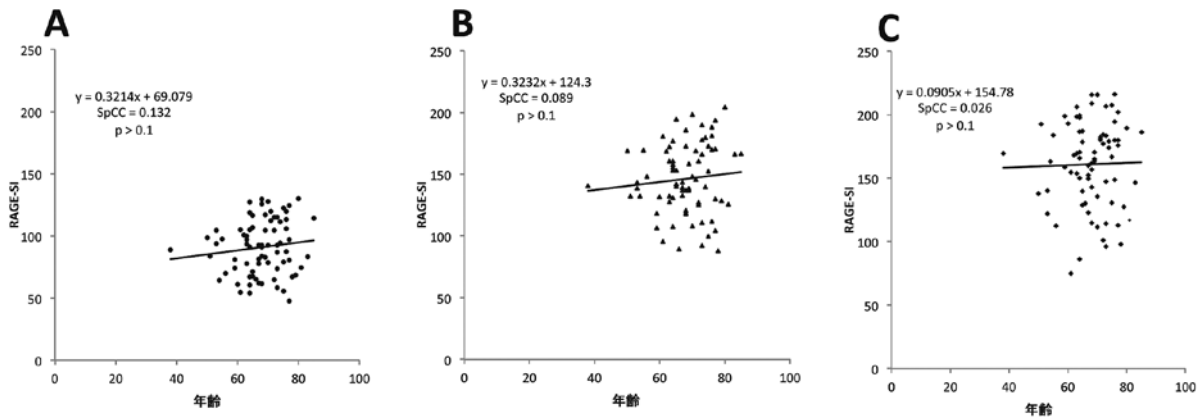


図3. 肺組織におけるRAGE発現と年齢との関係
 A. I型肺胞上皮細胞, B. 細気管支粘膜上皮細胞, C. 肺胞マクロファージにおけるRAGE-SIと年齢との関係
 A~Cいずれでも, 年齢とRAGE-SIに有意な相関関係を認めない。
 Abbreviation: SpCC, Spearman correlation coefficient

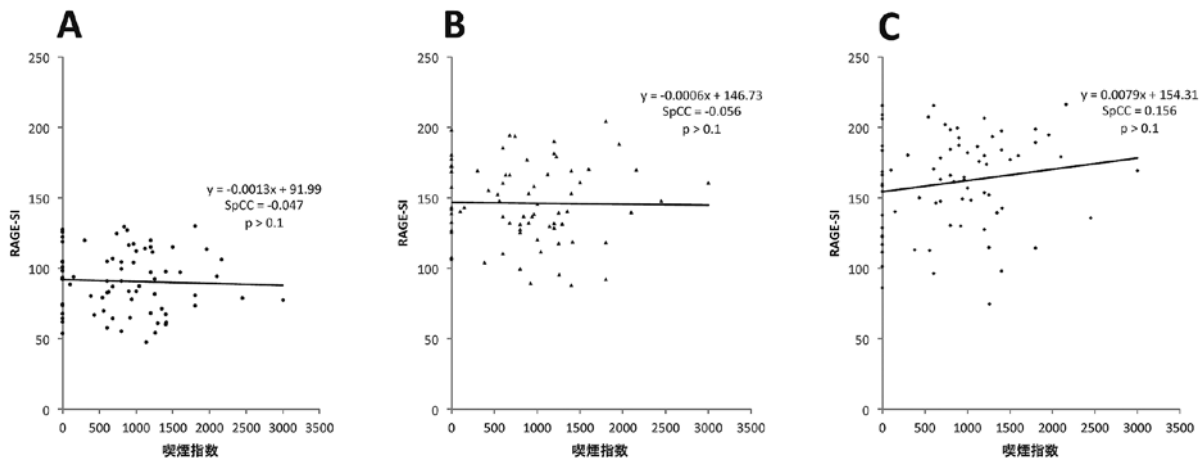


図4. 肺組織におけるRAGE発現と喫煙指数との関係
 A. I型肺胞上皮細胞, B. 細気管支粘膜上皮細胞, C. 肺胞マクロファージにおけるRAGE-SIと喫煙指数との関係
 A~Cいずれでも, 年齢とRAGE-SIに有意な相関関係を認めない。
 Abbreviation: SpCC, Spearman correlation coefficient

を検討したが、相関係数は、I型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージ各々、0.132, 0.089, 0.026といずれの細胞群でも有意な相関を認めなかった(図3)。

5. 喫煙指数とRAGE-SIの関連性

喫煙指数とRAGE-SIの相関の有無を検討した。I型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージにおける相関係数は、各々、-0.047, -0.056, 0.156といずれの細胞群においても喫煙指数とRAGE-SI間には有意な相関を認めなかった(図4)。

6. 閉塞性換気障害とRAGE-SIの関連性

閉塞性換気障害を有する群と有さない群間でRAGE-SIを比較した。I型肺胞上皮細胞では閉塞性障害を有する群 96.4 ± 21.2 vs 有さない群 85.2 ± 21.3 , 肺胞マクロファージでも 168.6 ± 29.3 vs 153.0 ± 36.5 と両細胞種で閉塞性障害を有する群のRAGE-SIの有意な増加を認めた($p=0.026, 0.044$)。一方、細気管支粘膜上皮細胞の両群のRAGE-SIは 146.2 ± 29.8 vs 146.2 ± 27.0 と有意差は認めなかった(表3)。

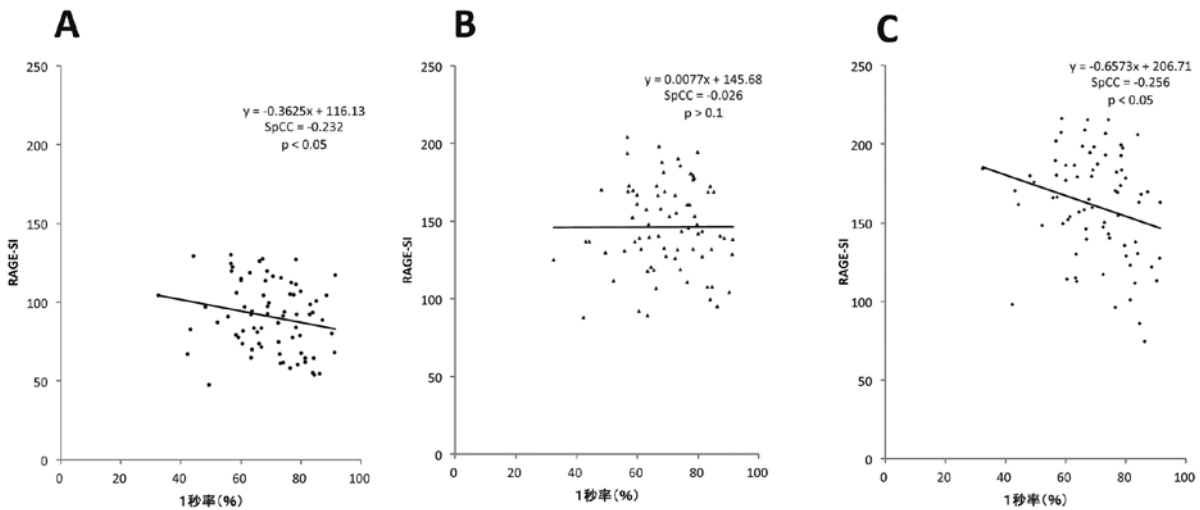


図5. 肺組織におけるRAGE発現と1秒率との関係

A. I型肺胞上皮細胞, B. 細気管支粘膜上皮細胞, C. 肺胞マクロファージにおけるRAGE-SIと喫煙指数との関係
I型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージのRAGE-SIと1秒率間に有意な負の相関を認めた。

Abbreviation: SpCC, Spearman correlation coefficient

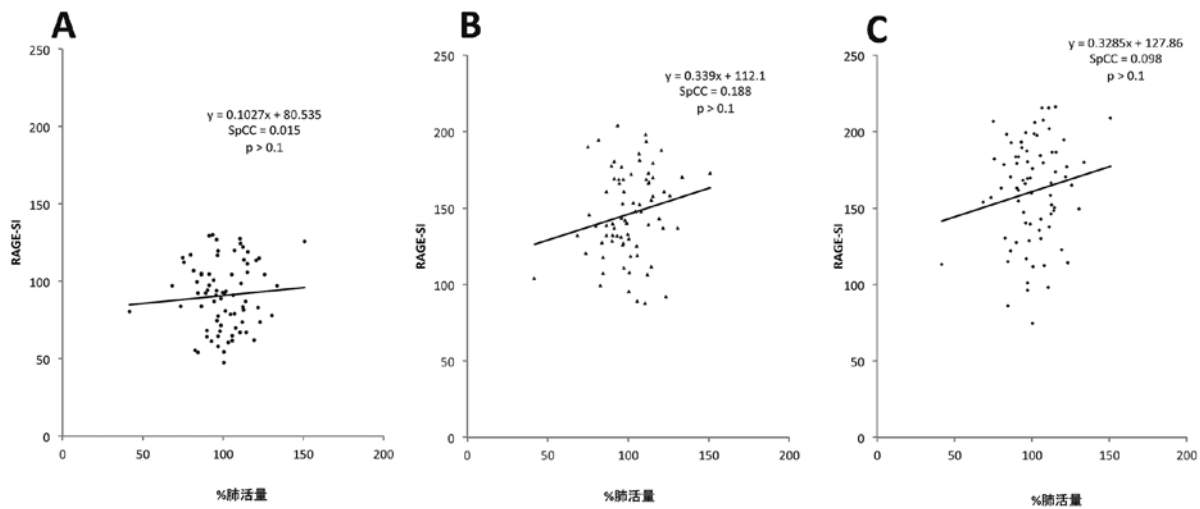


図6. 肺組織におけるRAGE発現と%肺活量との関係

A. I型肺胞上皮細胞, B. 細気管支粘膜上皮細胞, C. 肺胞マクロファージにおけるRAGE-SIと%肺活量との関係
A~Cいずれでも、%肺活量とRAGE-SI間に有意な相関関係を認めない。

Abbreviation: SpCC, Spearman correlation coefficient

COPD肺におけるRAGEの発現

7. 1秒率とRAGE-SIの相関

1秒率とRAGE-SIの相関係数は、I型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージでは、各々、 -0.232 、 -0.256 と有意な負の相関を認められた(図5、各々 $p < 0.05$)。細気管支粘膜上皮細胞では -0.026 と相関を認めなかった。

8. %肺活量とRAGE-SI

%肺活量とRAGE-SIの相関関数は、I型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞、肺胞マクロファージで、各々、 0.015 、 0.188 、 0.098 といずれの細胞群でも有意な相関は認めなかった(図6)。

考 察

COPD肺のI型肺胞上皮細胞、細気管支粘膜上皮細胞および肺胞マクロファージにおけるRAGE発現の半定量解析により、COPD肺のI型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおけるRAGEの発現亢進と1秒率との負の相関が示された。RAGEの発現はCOPDの主要な原因である喫煙指数との有意な関係は認めなかった。

これまで、COPDとヒト肺組織のRAGE発現の関係についてはいくつかの報告がある(13-16)。MorbiniらはCOPDや肺気腫を含む喫煙関連疾患肺組織の検討で、気管支上皮、気管支上皮化肺胞(alveolar bronchiolization)と肺胞マクロファージにおけるRAGEの発現を初めて報告した(13)。Ferhaniらは、非喫煙者、閉塞性換気障害を有さない喫煙者とCOPD患者の生検気管支粘膜組織を用い、免疫染色により気管支組織 1mm^2 当たりのRAGE陽性の気管支上皮細胞、気管支平滑筋およびマクロファージの比率を解析し、非喫煙者と比較し喫煙者とCOPD患者ではRAGE陽性細胞の比率が増加することを示した(14)。また、Wuらはヒト閉塞性換気障害の肺組織におけるRAGEの発現の免疫染色による検討から、細気管支粘膜上皮細胞では非病変群と差異はないが、I型肺胞上皮細胞での染色性が亢進することを報告した(16)。しかし、Morbiniらの報告は定性的な観察にとどまり、Ferhaniらの報告は3群5症例ずつの、Wuらの報告も両群20例以下の小規模な研究にとどまり、COPDにおけるRAGE発現の増減に関する確定的な情報はこれまでなかった。本研究では、閉塞性肺疾患群38症例と対照群37症例の計75症例の多数例を用いた。形態計測により閉塞性換気障害肺におけるRAGEの正確な動態の把握と年齢、喫煙指数、1秒率などの臨床病理学的因子との相関の解析を試みた。

計測に関しては、計測部位による影響を抑えるために、1症例の各細胞群に対し、3視野で5か所ずつ、計15点を計測点としてプロットしており、計測点の選択の偏りによる影響は最小限に抑えられたものと思われる。本研究では、閉塞性換気障害肺のI型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおけるRAGEの発現亢進が明らかとなった。細気管支粘膜上皮細胞では対照群との間に有意差は認めなかった。今回のI型肺胞上皮細胞と細気管支粘膜上皮細胞における結果はWuら(16)の報告を支持するものであった。FerhaniらのCOPD患者の気管支粘膜組織内

マクロファージでのRAGEの発現亢進に加え(14)、今回の検討では肺胞マクロファージでのRAGE発現の有意な亢進が今回の検討において初めて明らかとなった。さらに、I型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおけるRAGE発現と1秒率との有意な負の相関も初めて示された。この関係は、年齢・性の背景因子や%肺活量で示される拘束性換気障害の影響は否定され、閉塞性換気障害の進行にRAGEが寄与している可能性を示唆する所見と考えられた。

喫煙はCOPDの主要な原因である。喫煙による肺組織でのRAGE発現亢進がマウスを用いた動物実験で報告されている(17)。ヒト肺では、気管支生検組織を用いた検討により気管支上皮細胞、気管支平滑筋およびマクロファージでの喫煙によるRAGE発現率の増加が報告されている(14)。本研究はヒトCOPD肺組織におけるRAGE発現への喫煙の関与を明らかにする初めての試みであったが、喫煙指数とRAGE発現間には有意な関連は認めなかった。RAGEと閉塞性換気障害との関連が示されたにも拘わらず、その主要な原因である喫煙との関係がみられなかったことは興味深い。マウスへの喫煙暴露による研究結果と異なるデータが今回得られたが、実験動物での薬理的な煙流曝露とヒトの喫煙様式との差異に起因する可能性が考えられた。また、Ferhaniら(14)の報告とも異なったが、生検組織と外科的切除肺組織の違い、特に手術前1週間以上の禁煙が、今回の検討で関連性が示されなかったことに影響している可能性が推測された。さらに、中枢性の気管支と末梢性の肺胞組織という解剖的差異が喫煙によるRAGE発現作用に影響していることも考えられる。日本の喫煙者のうちCOPDを発症するのは15.4%、過去喫煙者で15.8%と報告されており(8)、喫煙曝露によるCOPDの発症には個体差があることがわかっている。COPD肺でのI型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおけるRAGEの発現亢進は、喫煙による直接作用ではなく、喫煙の結果生じる個人の体質が影響する慢性炎症病態が重要な役割を演じている可能性が示唆され、その詳細な機序の解明は重要な研究課題と考えられた。

今回の研究により、COPD肺でのI型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおけるRAGE発現の亢進が明らかとなり、それらの閉塞性換気障害の進行への寄与を支持する所見が得られた。しかし、形態計測による半定量的解析に留まり、今後、新鮮凍結肺組織でのreal time reverse transcription PCR(real time RT-PCR)やWestern blot法を用いたRAGE遺伝子や蛋白発現の定量解析による検証が必要と考えられた。発現亢進するRAGEがどのような細胞内シグナルを經由して、COPD発症において機能的に如何なる関与をしているかの検討も必須である。RAGEはアミノ酸配列とは関係しない複数のリガンドを有する細胞膜受容体である。今回の検討では発現亢進したRAGEがどのようなリガンドと反応するかを示唆する所見は得られなかった。Ceramiらは喫煙により血中AGEs濃度が上昇すると報告している(9)。AGEs含めた閉塞性換気障害の発生と進行に関わるRAGEのリガンドの解明も今後の重要な研究課題と考えられた。

閉塞性換気障害は、I型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージにおけるRAGE発現亢進を介して慢性炎症が惹起・維持され、発症ならびに進行する可能性が示唆された。これらRAGEの発現亢進は喫煙による直接作用ではない慢性炎症病態の関与の可能性が示唆された。

利益相反の開示

著者の本論文の内容に関する利益相反はない。

本稿を終えるにあたり、終始指導・校閲を受けました金沢医科大学先進呼吸器外科学 佐久間勉教授・佐川元保教授をはじめ教室員の各位、金沢医科大学病理学Ⅱ 上田善道教授に深謝いたします。また、実験の遂行に当たり御指導・御協力を受けました病理学Ⅱ 島崎都先生・谷口綾佳技術員に感謝いたします。

本研究は学術研究助成基金助成金(基盤研究(C)、課題番号23592076)の助成を受け遂行された。

文 献

- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M et al: Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14987-97.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J et al: Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14998-5004.
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF et al: The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; **108**: 949-55.
- Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N et al: The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 2003; **198**: 1507-15.
- Chuah YK, Basir R, Talib H et al: Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int J Inflamm* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/403460>.
- Demling N, Ehrhardt C, Kasper M et al: Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* 2006; **323**: 475-88.
- 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第3版作成委員会編: COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン, 第3版, 東京, メディカルレビュー社, 2009.
- Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M et al: COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology* 2004; **9**: 458-65.
- Cerami C, Founds H, Nicholl I et al: Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13915-20.
- Miniati M, Monti S, Basta G et al: Soluble receptor for advanced glycation end products in COPD: relationship with emphysema and chronic cor pulmonale: a case-control study. *Respir Res* 2011; **12**: 37. doi: 10.1186/1465-9921-12-37.
- Sukkar MB, Wood LG, Toozee M et al: Soluble RAGE is deficient in neutrophilic asthma and COPD. *Eur Respir J* 2012; **39**: 721-9.
- Cheng DT, Kim DK, Cockayne DA et al: Systemic soluble receptor for advanced glycation endproducts is a biomarker of emphysema and associated with AGER genetic variants in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; **188**: 948-57.
- Morbini P, Villa C, Campo I et al: The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? *Mod Pathol* 2006; **19**: 1437-45.
- Ferhani N, Letuve S, Kozhich A et al: Expression of high-mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; **181**: 917-27.
- Ohlmeier S, Mazur W, Salmenkivi K et al: Proteomic studies on receptor for advanced glycation end product variants in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Proteomics Clin Appl* 2010; **4**: 97-105.
- Wu L, Ma L, Nicholson LF et al: Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. *Respir Med* 2011; **105**: 329-36.
- Reynolds PR, Kasteler SD, Cosio MG et al: RAGE: developmental expression and positive feedback regulation by Egr-1 during cigarette smoke exposure in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; **294**: L1094-101.

Increased Expression of Receptor for Advanced Glycation End Products in Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Makoto Tanaka

*Department of Thoracic Surgery, Kanazawa Medical University Graduate School of Medical Science,
Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan*

Objective: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a smoking-induced chronic inflammatory disease characterized by irreversible airway obstruction. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) has been identified as a membranous receptor of advanced glycation end products in diabetic vasculopathy, and has been implicated in the initiation and amplification of chronic inflammation by binding multiple ligands. Lung is one of the organs with constitutive high expression of RAGE. However, the pathological as well as physiological functions of RAGE in the lung have not been fully understood. Expression of RAGE in the lung of COPD was analyzed semi-quantitatively in order to elucidate its role in the pathogenesis and progression of COPD.

Materials and methods: Formalin-fixed paraffin sections of lung tissues of 38 COPD and 37 non-COPD patients, obtained from the lung resection samples for lung cancer, were

immunostained with anti-RAGE antibody. The signal intensity of RAGE in type 1 alveolar cells, bronchiolar cells and alveolar macrophages was analyzed morphometrically as related with various clinic-pathologic factors.

Results: Signal intensities of RAGE of type 1 alveolar cells and alveolar macrophages were significantly increased in COPD group compared with those in non-COPD group. Those signal intensities of RAGE correlated negatively with forced expiratory volume in one second. RAGE expression was not associated with smoking index.

Conclusion: These results showed the enhanced expression of RAGE in COPD lung and involvement of RAGE in the progression of obstructive gas exchange, suggesting that RAGE may be a promising target for the control of COPD. Expression of RAGE in alveoli of COPD lung is stimulated not directly by smoking but indirectly through chronic inflammation-related pathways.

Key Words: receptor for advanced glycation end products (RAGE), chronic obstructive lung disease (COPD), chronic inflammation, type 1 alveolar cell, alveolar macrophage