

学 位 論 文 題 名

Long-term smoking with age builds up excessive oxidative stress in bronchoalveolar lavage fluid

(加齢と長期喫煙に伴う気管支肺胞洗浄液中の
酸化ストレスマーカーの上昇)

学位論文内容の要旨

【背景】肺は常に外気と接触しており、外来物質に対する防御機構が発達した臓器である。特に肺胞上皮細胞を覆う肺胞被覆液は、喫煙をはじめとする有害物質の解毒や消去を担う最初であり、多くの抗酸化物質が含まれている。それゆえに肺胞被覆液は上皮細胞の機能維持、さらには生体防御機構において重要な役割を果たしている。中高年喫煙者に多くみられる肺気腫は、加齢あるいは慢性喫煙による過剰な酸化ストレスと生体の抗酸化機構の不均衡が疾患の発症に関与するという仮説がある。蛋白のカルボニル化は、酸化ストレスの指標として知られているが、肺胞被覆液中においてカルボニル化修飾を受ける蛋白の同定やその疾患特異性については明らかにされていない。一方、グルタチオンは肺における主要なアンチオキシダントのひとつであり、健常喫煙者では、肺内のグルタチオン産生が増加するが、その 95% 以上が抗酸化能を有する還元型として存在すると報告されている。しかし、加齢と喫煙が肺胞被覆液中の酸化・還元に関与する分子に対しそれぞれどのような影響を及ぼしているのかを厳密に検討した研究はない。気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar lavage: BAL)は、生体の肺胞被覆液を採取する唯一の手段であり、その上清は、肺胞被覆液中に存在する蛋白を反映する。

【目的】BAL 液中のカルボニル蛋白、およびグルタチオン量とその酸化・還元様式を、若年・老年の喫煙者・非喫煙者間で比較することによって加齢と喫煙の影響を個別に評価し、両者の相互作用である経年喫煙の影響について検討する。さらに、中高年者の中で、軽度あるいは早期肺気腫患者と、健常喫煙者間の比較を行う。

【方法】健常若年男性ボランティア 39 名(平均年齢 23 歳:非喫煙者群 16 名、喫煙者群 23 名)と無症状中高年ボランティア 70 名(平均年齢 58 歳:非喫煙者群 7 名、過去喫煙者 17 名、現在喫煙者 46 名)の計 109 名を対象に BAL を施行した。喫煙者については、少なくとも 2 年以上一日 20 本以上の喫煙歴を持つことを条件とした。全員に問診、診察、血液検査、呼吸機能検査を施行した。中高年喫煙者は肺高分解能 CT で気腫病変の有無を呼吸器科内科医 3 名で判定した。急性喫煙の効果を除くため喫煙者は BAL 施行前 12 時間の禁煙を行い、全例呼気一酸化炭素濃度を測定した。BAL は 50 cc の生理的食塩水で 4 回繰り返し洗浄し、初回の回収液を別にして 2~4 回目の回収液のみを検体として用いる方法(sequential BAL 法)を用いた。それぞれの成分から遠沈により細胞成分を分離し、総細胞数、分画を算出し、液性成分を -70℃ にて保存した。液体成分については、OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Chemicon International, CA, USA)を用い、dinitrophenylhydrazine (DNP)によって処理した後、SDS-PAGE を行い抗 DNP 抗体で免疫染色した。各バンドの強さを NIH Image software を用いて定量化した。BAL 液中の総グルタチオン量、および酸化型グルタチオン量(GSSG)は Glutathione assay kit (Cayman Chemicals co., MI)を用いて測定

した。統計学的処理については、若年者2群間の比較には対応のない Student's *t*-test を、中高年者3群間の比較には ANOVA を行い post hoc test として Games-Howell 法を用いた。

【結果】中高年喫煙者では若年喫煙者と比較して累積喫煙量を示す Pack-year は当然多いが、一日平均の吸入本数については有意差を認めなかった。BAL 液中の細胞分画は若年・中高年とも非喫煙者に比べ現在喫煙者の総細胞数およびマクロファージ数が増加していた。BAL 液中の主要なカルボニル蛋白は 68kD の蛋白であり、若年者は喫煙の有無に関わらずほぼ全員が 68kD の単一バンドであったが、中高年者では複数のカルボニル蛋白のバンドがみられた。68kD のカルボニル化蛋白はアルブミンと推測され、そのバンドの強度を個々の BAL 液中のアルブミン濃度で補正し、アルブミンのカルボニル化されている割合を求めた。

若年喫煙者では非喫煙者と比べ、BAL 液中総グルタチオン量の有意な増加を認めたが (3.11 ± 0.4 vs. $1.17 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ [$p=0.006$])、総カルボニル蛋白量、カルボニル化アルブミン量には差異を認めなかった。若年では喫煙者の BAL 液中 GSSG はほとんど検出されず、GSSG 量、総グルタチオンに対する GSSG の比も喫煙の有無で差がなかった。それに対し中高年現在喫煙者や過去喫煙者では同年齢の非喫煙者と比べ BAL 液中総カルボニル蛋白量、カルボニル化アルブミン量の有意な増加を認めた。BAL 液中のカルボニル化アルブミン量は同年齢の非喫煙者と比べ中高年現在喫煙者では約 4 倍、過去喫煙者で約 3 倍に増加していた。若年と同様に、中高年現在喫煙者は同年齢の非喫煙者や過去喫煙者と比べ BAL 液中総グルタチオン量の有意な増加を認めたが (2.64 ± 0.34 vs. 0.89 ± 0.19 and $0.88 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$ [$p=0.0003$, $p=0.0014$, respectively]), GSSG は中高年現在喫煙者のみで有意に増加し、総グルタチオンに対する GSSG の比は 0.72 であった。

CT 上の肺気腫病変の有無では、総カルボニル蛋白量、カルボニル化アルブミン量、総グルタチオン量、GSSG 量および総グルタチオンに対する GSSG 比は有意差を認めなかった。

【考案】肺胞被覆液はグルタチオン等の豊富なアンチオキシダントの存在により還元状態が維持されていると考えられている。本研究の結果は、加齢と長年の喫煙刺激の蓄積によって肺胞被覆液中のオキシダントがアンチオキシダントを凌駕し酸化ストレスが生じることを示唆している。同液中の主要なカルボニル化蛋白はアルブミンであることを示したが、アルブミンのカルボニル化は、アンチオキシダントとしての機能低下を推測させる。カルボニル蛋白の増加は一年以上禁煙している過去喫煙者群でも同様にみられたことは注目すべきである。年齢にかかわらず、喫煙者では、非喫煙者に比べ、総グルタチオン量は有意に増加していたが、中高年喫煙者ではグルタチオンの約 7 割が還元能を失った酸化型グルタチオンであった。BAL 液中の酸化型グルタチオンの増加は喘息、cystic fibrosis、ARDS で増加するという報告がある。肺細胞内・外におけるグルタチオンの酸化・還元の調節機構は不明であるが、GSSG が肺胞被覆液に増加するメカニズムとしては、1) extracellular glutathione peroxidase による細胞外でのグルタチオン代謝亢進、2) 細胞内酸化ストレス増加に伴う GSSG の細胞外への排出機構の亢進、3) 細胞外 GSSG 分解の一部を担っている γ -glutamyl transpeptidase 活性の低下、4) 肺胞被覆液中の蛋白のチオール基の低下が挙げられる。今回の検討では、中高年喫煙者の中で、軽度肺気腫病変がある群とない群との間に、カルボニル蛋白、総グルタチオン、GSSG 量に有意差が認められなかったが、進行した肺気腫患者においてはより強い酸化ストレスが認められる可能性は否定できない。一方若年と中高年で、同じ程度の一日常喫煙量でありながら後者においてのみ肺胞被覆液中の酸化ストレスが高いことは、中高年喫煙者に高頻度に発症する他の炎症性、腫瘍性肺疾患の発症との関係をも示唆する。しかし、肺胞被覆液中の酸化ストレスの増加がその中に浮遊する細胞や肺胞上皮の機能にどのような影響を及ぼしているかを明らかにすることは今後の課題である。

【結語】BAL 液中の総グルタチオンは若年でも中高年でも喫煙者で増加する。しかし、カルボニル蛋白や酸化型グルタチオンは中高年においてのみ喫煙者で増加しており、加齢と長期喫煙の両者が BAL 液中の過剰な酸化ストレスの蓄積に重要である。しかし、軽度肺気腫患者では健常喫煙者と比べ、BAL 液中のカルボニル蛋白、グルタチオンとその酸化・還元様式に有意な差異を認めなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

Long-term smoking with age builds up excessive oxidative stress in bronchoalveolar lavage fluid

(加齢と長期喫煙に伴う気管支肺胞洗浄液中の
酸化ストレスマーカーの上昇)

中高年喫煙者に多くみられる肺気腫は、加齢あるいは慢性喫煙による過剰な酸化ストレスと生体の抗酸化機構の不均衡が関与するという仮説がある。本研究では有害物質の解毒や消去を担う肺胞被覆液に注目し、気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar lavage: BAL)液を用いて中高年喫煙者のBAL液中酸化ストレスの増加の有無、肺気腫病変でのさらなる増加の有無について検討を行った。酸化ストレスの指標としてカルボニル化蛋白と、主要なアンチオキシダントのひとつであるグルタチオンをBAL液で測定し、若年・中高年の喫煙者・非喫煙者間で比較することによって加齢と喫煙の影響を個別に評価し、両者の相互作用である経年喫煙の影響について検討した。さらに、中高年者の中で、CT上軽度あるいは早期肺気腫患者と、健常喫煙者間の比較を行った。健常若年男性ボランティア39名(平均年齢23歳:非喫煙者群16名、喫煙者群23名)と無症状中高年ボランティア70名(平均年齢58歳:非喫煙者群7名、過去喫煙者17名、現在喫煙者46名)の計109名を対象にBALを施行した。BALは50ccの生理的食塩水で4回繰り返し洗浄し、初回の回収液を別にして2~4回目の回収液のみを検体として用いる方法(sequential BAL法)を用いた。液体成分は、SDS-PAGEを行い抗dinitrophenylhydrazine (DNPH)抗体で免疫染色し、各バンドのシグナル強度を定量化した。BAL液中の総グルタチオン量、および酸化型グルタチオン量(GSSG)はGlutathione assay kit (Cayman Chemicals co., MI)を用いて測定した。BAL液中の主要なカルボニル蛋白は68kDの蛋白であった。68kDのカルボニル化蛋白はアルブミンと推測され、そのバンドの強度を個々のBAL液中のアルブミン濃度で補正し、アルブミンのカルボニル化されている割合を求めた。

若年喫煙者では非喫煙者と比べ、BAL液中総グルタチオン量の有意な増加を認めたが(3.11 ± 0.4 vs. $1.17 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ [$p=0.006$]), 総カルボニル蛋白量、カルボニル化アルブミン量には差異を認めなかった。若年者では喫煙者のBAL液中GSSGはほとんど検出されず、GSSG量、総グルタチオンに対するGSSGの比も喫煙の有無で差がなかった。それに対し中高年現在喫煙者や過去喫煙者では同年齢の非喫煙者と比べBAL液中総カルボニル蛋白量、カルボニル化アルブミン量の有意な増加を認めた。BAL液中のカルボニル化アルブミン量は同年齢の非喫煙者と比べ中高年現在喫煙者では約4倍、過去喫煙者で約3倍に増加していた。若年者と同様に、中高年現在喫煙者は同年齢の非喫煙者や過去喫煙者と比べBAL液中総グルタチオン量の有意な増加を

認めたが (2.64 ± 0.34 vs 0.89 ± 0.19 and $0.88 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$ [$p=0.0003$, $p=0.0014$, respectively]), GSSGは中高年現在喫煙者のみで有意に増加し、総グルタチオンに対するGSSGの比は0.72であった。CT上の肺気腫病変の有無では、総カルボニル蛋白量、カルボニル化アルブミン量、総グルタチオン量、GSSG量および総グルタチオンに対するGSSG比は有意差を認めなかった

審査にあたり、副査筒井教授から1)BAL液中で増加している活性酸素ラジカル(ROS)を産生している細胞について、2)肺胞マクロファージのROS産生能について、3)ROSが肺胞構築を破壊する機序について質問があった。また主査吉岡教授から、1)カルボニル蛋白蓄積の機序について、2)喫煙でのBAL液グルタチオン増加の機序について質問があった。最後に副査西村教授から1)長期喫煙で酸化ストレスが増加する際に主体と考えられる機序について、2)肺胞被覆液中酸化ストレス増加と肺気腫以外の呼吸器疾患との関連について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自験データや過去の論文を引用し、概ね適切に答えた。質疑応答の時間は約15分であった。

この論文は若年者と中高年者で、同じ程度の日喫煙量でありながら後者においてのみ BAL液中の酸化ストレスが高いことを示し、加齢と長期喫煙の両者が肺胞被覆液中の過剰な酸化ストレスの蓄積に重要であることを示唆した。その結果は中高年喫煙者に高頻度に発症する様々な炎症性、腫瘍性肺疾患の発症と酸化ストレスとの関連を推測させる。今後抗酸化剤の補充療法への発展も期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受け取るのに十分な資格を有するものと判定した。