

喫煙者および慢性閉塞性肺疾患患者における 転写因子 Nrf2に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は完全には可逆的ではない気流制限を特徴とする疾患であり、末梢気道病変と肺気腫が気流制限に関与する。COPD の発症に対する主な危険因子は喫煙であり、オキシダント・アンチオキシダントの不均衡が発症に関与する一因とされるが、そのメカニズムは十分に解明されていない。

NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は様々な抗酸化酵素と解毒酵素の発現を制御する転写因子である。これまでに、Nrf2 欠損マウスは酸化ストレスに高感受性であり、喫煙曝露およびエラストーゼ気管内投与により野生型マウスよりも重症の肺気腫が形成されることが報告されている。特に、エラストーゼ気管内投与により主に肺内マクロファージに Nrf2 の標的抗酸化酵素が誘導され、さらに Nrf2 欠損マウスに野生型の骨髄を移植すると Nrf2 陽性マクロファージが出現し、エラストーゼ気管内投与に伴う肺気腫形成が抑制されることが報告された。これらの結果は、肺内マクロファージが Nrf2 を通して肺気腫形成に対して防御的に働いていることを示唆するものである。そこで我々はヒト COPD 肺では肺内マクロファージの Nrf2 発現が低下していると仮説を立てた。

一方、Nrf2 を薬理的に活性化させ抗酸化能を高めることで COPD・肺気腫に対する有効な予防・治療戦略となり得るのではないかと考えた。そこで我々は Nrf2 活性化作用と抗炎症効果を有するクルクミンに注目し、クルクミンの経口投与が肺気腫モデルマウスにおいて肺気腫形成を抑制すると仮説を立てた。

【目的】

研究1 「肺内マクロファージにおける Nrf2 発現と喫煙・COPD との関連の検討」

ヒトおよびマウス肺マクロファージの Nrf2 およびその標的遺伝子発現に対する喫煙と加齢の影響、ならびにヒト COPD 患者肺における Nrf2 遺伝子発現を部位特異的に検討する。

研究2 「肺気腫モデルマウスにおけるクルクミン投与効果の検討」

エラストーゼ誘導性肺気腫モデル、喫煙誘導性肺気腫モデルを作成し、各々に対してクルクミン経口投与の肺気腫形成に対する効果を検討する。

【対象と方法】

研究1 では、*in vitro* でヒトおよびマウス肺マクロファージにタバコ煙抽出液 (CSE) を曝露し、Nrf2 発現を免疫染色、ウェスタンブロットティングや RT-PCR で検討し、Nrf2 標的遺伝子発現を RT-PCR で定量した。また、37 名の健常ボランティアに気管支肺泡洗浄 (BAL) を行い、採取した肺マクロファージの Nrf2 とその標的遺伝子の発現を RT-PCR で定量した (ヒト BAL 研究)。また 20 名の手術摘出肺組織より laser capture microdissection で肺内マクロファージと細気管支上皮細胞を、顕微鏡下で用手的に肺泡領域を各々採取し、Nrf2 遺伝子発現を RT-PCR で定量した (ヒト肺組織研究)。一部の症例に対してはパラフィン包埋切片を用いて Nrf2 免疫染色を行った。

研究2ではマウス肺胞マクロファージに *in vitro* でクルクミンを曝露し、抗酸化酵素遺伝子発現を RT-PCR で定量した。また、9週齢の C57BL/6J 雄マウスに対し5 U のブタアスタチン誘導性肺気腫モデルを作成した。クルクミン (100 mg/kg) をアスタチン投与の24時間前と1時間前に胃ゾンデを用いて経口投与し、その後21日間1日1回投与した。BALで炎症細胞数を評価し、肺組織中の抗酸化酵素ならびに炎症性サイトカイン遺伝子発現を RT-PCR で評価した。アスタチン投与21日後に気腫形成を平均肺胞間距離で評価した。さらに、同マウスに対して5%タバコ煙60分曝露/日を10日間連続または週5日12週間施行し、短期間喫煙曝露モデルおよび喫煙誘導性肺気腫モデルを作成した。各々に対してクルクミン (100 mg/kg) を各喫煙曝露の1時間前に経口投与し、短期間喫煙曝露モデルでは BAL で炎症細胞数を評価し、喫煙誘導性肺気腫モデルマウスで気腫形成を評価した。

【結果】

研究1：CSE 曝露でヒト肺胞マクロファージの Nrf2 は核内に集積し Nrf2 標的遺伝子発現 (HO-1, NQO1, GCLM, GSR) は増加したが、Nrf2 mRNA 発現に大きな変化は認めなかった。ヒト BAL 研究では肺胞マクロファージの Nrf2 mRNA 発現は中高年現在喫煙者でのみ低下しており、Nrf2 標的遺伝子発現も鈍化していた。また、マウス肺胞マクロファージにおける CSE 曝露に対する Nrf2 とその標的遺伝子の発現は老齢マウスで抑制されていた。ヒト肺組織研究では Nrf2 mRNA 発現は COPD 患者の肺内マクロファージで有意に低下しており、免疫染色でも Nrf2 蛋白発現は COPD 患者で低下していた。

研究2：マウス肺胞マクロファージにクルクミンを曝露させたところ、濃度依存性に抗酸化酵素遺伝子発現 (HO-1, GCLC, GCLM, GSR) が増加した。また、クルクミン経口投与はアスタチン誘導性肺気腫モデルにおいて肺内の抗酸化酵素遺伝子発現を有意に増加させ、炎症性サイトカイン (KC, MIP-2) 遺伝子発現を低下させる傾向にあり、BAL 液中の炎症細胞数と肺気腫形成を有意に抑制した。クルクミン経口投与は短期間喫煙曝露モデルにおける BAL 液中の炎症細胞数を有意に抑制し、喫煙誘導性肺気腫モデルにおける肺気腫形成も有意に抑制した。

【考察】

研究1でマクロファージの Nrf2 が喫煙曝露に対するヒトの防御反応において役割を担っていることを示した。一方で、Nrf2 とその標的遺伝子発現は中高年現在喫煙者と CSE 曝露された老齢マウスの肺胞マクロファージで低下しており、加齢が喫煙曝露に対する Nrf2 発現を抑制すると考えられ、肺胞マクロファージでの Nrf2 発現低下が中高年現在喫煙者の肺内抗酸化能の低下に寄与すると考えられた。また、COPD 患者肺の肺内マクロファージの Nrf2 発現も低下していた。これは Nrf2 欠損が肺気腫形成に高感受性で、Nrf2 を介してマクロファージが肺気腫形成に対して防御的役割を担うとする報告を支持する初めてのヒトでの結果である。本研究の結果より、肺内マクロファージの Nrf2 発現低下が COPD におけるオキシダント・アンチオキシダントの不均衡に寄与していると考えられる。一方で肺内マクロファージにおける Nrf2 発現低下のメカニズムについては今後の研究を要する。

Nrf2 を活性化させ抗酸化能を高めることで COPD・肺気腫に対する予防・治療戦略となる可能性が示唆された。研究2では Nrf2 の活性化作用と抗炎症効果を持つクルクミンに注目し、クルクミンの経口投与によりアスタチンおよび喫煙誘導性の肺気腫形成が有意に抑制された。そのメカニズムとして抗酸化酵素の誘導や抗炎症効果が考えられたが、経口投与されたクルクミンの生物学的利用能は極めて低く、さらなる検討を要する。一方で、生物学的利用能を改善することで、クルクミンの薬理効果をより高めることができる可能性がある。

【結語】

中高年現在喫煙者および COPD 患者の肺内マクロファージで Nrf2 発現は低下している。また、クルクミンの経口投与によりアスタチンならびに喫煙誘導性の肺気腫形成は有意に抑制される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治

副 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

喫煙者および慢性閉塞性肺疾患患者における 転写因子 Nrf2に関する研究

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は完全には可逆的ではない気流制限を特徴とする疾患であり、末梢気道病変と肺気腫が気流制限に関与する。COPD の発症に対する主な危険因子は喫煙であり、オキシダント・アンチオキシダントの不均衡が発症に関与する一因とされるが、そのメカニズムは十分に解明されていない。NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は様々な抗酸化酵素と解毒酵素の発現を制御する転写因子である。これまでに、Nrf2 欠損マウスは酸化ストレスに高感受性であり、喫煙曝露およびエラスターゼ気管内投与により野生型マウスよりも重症の肺気腫が形成されることが報告されている。特に、エラスターゼ気管内投与により主に肺内マクロファージに Nrf2 の標的抗酸化酵素が誘導され、さらに Nrf2 欠損マウスに野生型の骨髄を移植すると Nrf2 陽性マクロファージが出現し、エラスターゼ気管内投与に伴う肺気腫形成が抑制されることが報告された。これらの結果は、肺内マクロファージが Nrf2 を通して肺気腫形成に対して防御的に働いていることを示唆するものである。そこでヒト COPD 肺では肺内マクロファージの Nrf2 発現が低下していると仮説を立てた。始めにタバコ煙抽出液 (CSE) 曝露でヒト肺胞マクロファージの Nrf2 は核内に集積し Nrf2 標的遺伝子発現 (HO-1, NQO1, GCLM, GSR) が増加することを示した。次いでヒト気管支肺胞洗浄 (BAL) 研究で、肺胞マクロファージの Nrf2 mRNA 発現は中高年現在喫煙者でのみ低下しており、Nrf2 標的遺伝子発現も鈍化していることを示し、また、マウス肺胞マクロファージにおける CSE 曝露に対する Nrf2 とその標的遺伝子の発現は老齢マウスで抑制されていることを示した。さらにヒト肺組織研究で、Nrf2 mRNA 発現は COPD 患者の肺内マクロファージで有意に低下しており、免疫染色でも Nrf2 蛋白発現は COPD 患者で低下していることを示した。この結果を受けて、Nrf2 を薬理的に活性化させ抗酸化能を高めることで COPD・肺気腫に対する有効な予防・治療戦略となり得るのではないかと考えた。そこで Nrf2 活性化作用と抗炎症効果を有するクルクミンに注目し、クルクミンの経口投与が肺気腫モデルマウスにおいて肺気腫形成を抑制すると仮説を立てた。マウス肺胞マクロファージにクルクミンを曝露させたところ、濃度依存性に抗酸化酵素遺伝子発現 (HO-1, GCLC, GCLM, GSR) が増加した。また、クルクミン経口投与はエラスターゼ誘導性肺気腫モデルにおいて肺内の抗酸化酵素遺伝子発現の増加と炎症性サイトカイン (KC, MIP-2) 遺伝子発現の低下を伴って BAL 液中の炎症細胞数と肺気腫形成を有意に抑制することを示し、さらにクルクミン経口投与は短期間喫煙曝露モデルにおける BAL 液中の炎症細胞数を有意に抑制し、

喫煙誘導性肺気腫モデルにおける肺気腫形成も有意に抑制することを示した。

審査にあたり、副査近藤教授から、1) 中高年喫煙者で肺マクロファージの Nrf2 を介した抗酸化能が低下している理由、2) ヒト BAL 研究で肺胞マクロファージの Nrf2 標的遺伝子の中で HO-1 だけが他の遺伝子と異なる挙動を示した理由、3) クルクミン摂取と COPD 発症の関係に関する疫学的データの有無について質問があった。次いで副査秋田教授から、1) Nrf2 が酸化ストレスで Keap1 から遊離するメカニズム、2) Nrf2 の転写レベル低下以外に Nrf2 活性化を阻害するメカニズムの有無、3) Nrf2 以外のクルクミンの標的分子について質問があった。最後に主査西村教授から、申請者が発表した論文とほぼ同時期に発表された他グループの二編の論文との相違点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発表・文献を引用し、概ね適切に解答した。質疑応答の時間は約 12 分であった。

この論文は、Nrf2 発現が COPD 患者の肺マクロファージで低下していることと、マウスの肺気腫モデルにおいてクルクミン投与が肺気腫形成を抑制することを初めて示した点で高く評価され、今後のさらなる病態解明や臨床応用への可能性が期待される。

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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。