学位論文題名

加齢マウスにおける喫煙曝露および その後の禁煙に対する細気管支上皮細胞の ケモカイン発現と肺内炎症に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】

加齢と喫煙は慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) をはじめとした種々の呼吸器疾患の危険因子である。マウスの短期喫煙曝露モデルにおいて、細気管支上皮細胞は好中球ケモカインである keratinocyte-derived chemokine (KC) /CXCL1 および macrophage inflammatory protein (MIP-2) /CXCL2 を産生し、肺内に好中球性炎症反応をもたらすことが確認されているが、喫煙による肺障害に加齢による差があるか否かは明らかでない。一方、禁煙により多くの若年成人は呼吸器症状や経年的一秒率低下は非喫煙者と同等程度まで回復するが、一部の長期喫煙者において禁煙後も気道の炎症細胞浸潤が継続し、T 細胞、B 細胞が関わる免疫反応や抗原提示が長期に残存することが確認されている。しかし、長期喫煙は加齢を伴うため、加齢そのものが喫煙による免疫応答反応を禁煙後も継続させる原因となりうるかは不明である。

【目的】

研究1 マウスモデルを用いて、加齢により喫煙による好中球性炎症が増強されるか否かを検討する。
研究2 同様のモデルを用いて喫煙曝露終了後の肺炎症変化に加齢による差があるか否かを検討する。

【対象と方法】

研究1 では、9週齢 (若齢) および69週齢 (高齢) のC57BL/6J マウスを用いて1日90分間の全身喫煙曝露を9日間行い、BAL液中炎症細胞数算定、好中球化学走性の測定、KCおよびMIP-2の濃度測定を行った。また、細気管支上皮細胞を laser capture microdissection (LCM)を用いて採取し、KCおよびMIP-2の mRNA 発現を検討した。単回喫煙曝露においても同様にBAL液中KC、MIP-2濃度を測定し、細気管支上皮細胞におけるKC、MIP-2、NF-E2-related factor 2 (Nrf2)関連遺伝子の mRNA の発現変化を検討した。また、nuclear factor- κ B (NF- κ B)の核内移行を免疫組織学的に検討した。研究2では、両週齢のマウスに対し10日間連続喫煙曝露後20日間観察し、BAL液中炎症細胞算定、肺内炎症細胞浸潤の免疫組織学的検討を行った。さらにリンパ球ケモカインである Macrophage inflammatory protein-3 α /CC chemokine ligand 20 (MIP-3 α /CCL20)のBAL液中濃度測定、産生細胞の免疫組織学的手段による検討を行い、さらに細気管支上皮細胞における mRNA 発現を比較した。

【結果】

研究1 高齢マウスでは、9日間喫煙曝露後若齢マウスと比較してより多くの好中球がBAL液中に認められた。高齢マウスではBAL液中好中球化学走性、KC、MIP-2濃度はより上昇しており、細気管支上皮細胞におけるmRNA発現もより亢進していた。さらに、単回喫煙曝露においては、曝露1時間後に高齢マウスではNF- κ Bの核内移行を伴って、若齢マウスより高度に細気管支上皮細胞でのKC、MIP-2発現が亢進していた。対照的に、Nr2関連遺伝子の発現は週齢による差を認めなかった。

研究2 高齢マウスにおいてのみ、喫煙曝露終了20日目までBAL液中のリンパ球数は上昇を続けた。CD4⁺リンパ球を主体としたリンパ球の集積が喫煙曝露終了20日後の高齢マウスの気道周囲に認められた。BAL液中MIP-3 α /CCL20は高齢マウスにおいて喫煙曝露後上昇し、曝露終了10日後においても上昇していた。免疫組織学的から細気管支上皮がMIP-3 α /CCL20の産生細胞と考えられ、同部位におけるmRNA発現は喫煙曝露後高齢マウスでより亢進していた。また、単回喫煙曝露においても1時間後に高齢マウスにおいてMIP-3 α /CCL20のmRNA発現上昇、BAL液中濃度上昇を認めた。mRNAの上昇は3時間後には曝露前の水準に低下したが、BAL液中濃度は24時間後まで上昇していた。

【考察】

本研究では喫煙により引き起こされた急性期の炎症反応の加齢による違いとその機序を分子細胞レベルで検討した。本研究により、高齢マウスにおいては、喫煙曝露により細気管支上皮細胞におけるKCおよびMIP-2の発現上昇が亢進し、肺への好中球浸潤が増強されることが示された。KCとMIP-2は主な好中球ケモカインであり、喫煙刺激による好中球浸潤を引き起こすが、NF- κ Bの活性化により産生されることが知られている。NF- κ Bは高齢マウスにおいてより活性化されることが報告されているが、本研究の結果は喫煙曝露においても同様であることを示している。喫煙刺激はNF- κ B以外にもNr2などの転写因子の活性化を引き起こし、抗酸化や解毒に関わる遺伝子発現を引き起こすが、本研究での喫煙曝露による転写因子の活性化はNF- κ Bに特徴的であった。研究2では、禁煙後、BAL液中好中球数は高齢マウスにおいて若齢マウスと同様に速やかに減少したが、一方リンパ球数の上昇は継続した。過去にマウスモデルにおいて長期喫煙後の禁煙では肺内にリンパ球の浸潤を認めたという報告があるが、10日間の喫煙曝露は若齢マウスにおいてはリンパ球浸潤を引き起こさなかったため、本研究の10日間の喫煙および禁煙実験により加齢におけるリンパ球浸潤の差が劇的に示される結果となった。本研究では高齢マウスのBAL液中MIP-3 α /CCL20濃度は喫煙曝露終了10日目においても上昇しており、また単回曝露後急激に発現亢進した細気管支上皮細胞のMIP-3 α /CCL20の発現は一過性で3時間後には曝露前の水準にまで低下するにも関わらず、高齢マウスのみにおいてBAL液中のMIP-3 α /CCL20蛋白濃度は24時間後まで上昇が続いていた。このことは、MIP-3 α /CCL20の蛋白産生が遺伝子の転写のみでなく、転写後調整の違いにも依存している可能性を示唆している。

【結語】

加齢により、喫煙曝露後、細気管支上皮細胞におけるNF- κ Bの活性化とNF- κ Bにより調整されるケモカインの発現亢進が増強され、肺内好中球浸潤がより亢進した。また、高齢マウスでは、喫煙曝露終了後も遷延するMIP-3 α /CCL20の産生とリンパ球浸潤が認められた。本研究は加齢肺の炎症と修復に関して分子学的側面から理解することに寄与すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	秋田	弘俊
副査	教授	石田	晋
副査	教授	高田	賢藏
副査	教授	笠原	正典
副査	教授	佐邊	壽孝

学位論文題名

加齢マウスにおける喫煙曝露および その後の禁煙に対する細気管支上皮細胞の ケモカイン発現と肺内炎症に関する研究

加齢と喫煙は慢性閉塞性肺疾患(COPD)をはじめとした種々の呼吸器疾患の危険因子であり、健康上の大きな問題である。喫煙により細気管支領域に好中球浸潤を伴う炎症が惹起される。マウスの喫煙モデルでも好中球の肺内への浸潤が発生し、細気管支上皮細胞により産生される好中球ケモカインである keratinocyte-derived chemokine (KC) /CXCL1 および macrophage inflammatory protein (MIP-2) /CXCL2 が関与している。しかし加齢によってこれらの反応が変化するかどうかは明らかではない。

そこでまず、9週齢(若齢)と69週齢(加齢)のマウスに単回あるいは9日間の喫煙曝露を行い肺内炎症を比較した。すると、肺内好中球浸潤は加齢マウスにおいてより亢進し、気管支肺胞洗液(BAL)液中のKC、MIP-2濃度もより高値であった。また、加齢マウスにおいてのみ単回喫煙曝露後細気管支上皮細胞でNF- κ Bの核内への移行が認められ、KC、MIP-2のmRNA発現の顕著な亢進を認めた。本研究では、短期喫煙曝露モデルを用いることにより加齢が肺好中球性炎症反応に与える直接的な影響を明らかにした。また、今までLPSなど他の刺激における研究から主張されてきた「加齢マウスにおいてNF- κ Bは外的刺激に対してより活性化されやすい」とする説を、細気管支上皮細胞における喫煙曝露刺激に対する反応についても支持するものである。

一方、禁煙は喫煙による呼吸器疾患を予防する最大の手段であるが、一部の長期喫煙者において禁煙後も肺内リンパ球浸潤が継続している。しかし、長期の喫煙は加齢を伴うため、禁煙後の肺内炎症に対する加齢の影響は明らかでない。そこで両週齢のマウスに対し10日間喫煙曝露後20日間経過を追った。すると喫煙曝露終了後、肺内好中球数は両週齢とも速やかに減少したが、リンパ球数の上昇は加齢マウスにおいて継続した。免疫組織学的検討では浸潤したリンパ球は主にCD4⁺リンパ球であった。また、加齢マウスでは禁煙後気道周囲にはCD4⁺リンパ球主体のリンパ球の集合が認められたが、若齢マウスではほとんど認めなかった。高齢マウスでは若齢マウスと比較して細気管支上皮でのリンパ球ケモカインであるMIP-3 α /CCL20のmRNA、BAL液中濃度が

上昇しており、リンパ球浸潤に関与したと考えられた。本研究は加齢に伴い喫煙刺激終了後の肺内のリンパ球を伴う免疫反応に変化が存在することを示したはじめての報告である。COPD 患者の過去喫煙者の肺にはリンパ球が存在し、非常に重篤な COPD 患者では気道周囲のリンパ濾胞数が上昇していることが報告されているが、本研究により短期間の喫煙曝露でこれらの病態に近似した病態が作成された可能性がある。このことは加齢肺における炎症と修復に関して分子学的側面から理解することに寄与し、さらにヒトにおける禁煙後のリンパ球の肺内浸潤の機序の解明の一助となると考えられた。

審査にあたり、副査の佐邊教授から、1) 老化により一般に免疫反応は低下するといわれているにもかかわらず本研究で反応が亢進していることの機序について、2) LPS 刺激との相違点について質問があった。次いで副査の高田教授から1) 長期喫煙刺激と短期喫煙刺激の相違点について、2) タバコ成分の中の何が肺内炎症に関与しているのかについて質問があった。また副査の笠原教授から、1) マウスの系統の違いによる喫煙刺激に対する反応の違いについて、2) 肺内に浸潤したリンパ球の作用について、さらに副査の石田教授から、1) 加齢によりNF- κ B が活性化される機序について、2) 細気管支局所における加齢による喫煙曝露量の差異について、3) MIP-3 α の発現調整の機序について、4) 浸潤したリンパ球が対象とする肺内抗原、免疫メカニズムについて質問があった。最後に主査の秋田教授から、1) NF- κ B 以外の転写因子の関与について、2) 人のCOPD患者や健常者での研究と本研究との関係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文献を引用し、概ね適切に回答した。質疑応答の時間は約30分であった。

この論文は、加齢による喫煙刺激に対する細気管支上皮細胞の反応性の違いと炎症細胞浸潤の違いを初めて明らかにした点で高く評価され、今後のさらなる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、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(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。