

学位論文題名

喫煙誘導肺気腫の病態におけるカタラーゼの役割に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】慢性閉塞性肺疾患(Chronic obstructive pulmonary disease, 以下 COPD)は、主に慢性喫煙によって引き起こされる肺での慢性炎症反応と関連する、持続性の気流閉塞を特徴とする疾患である。COPD は全世界での主要な死因の一つであり、また世界的にも有病率や死亡率が現時点のみならず、将来的にも上昇し続けると予測されている疾患である。日本では、疾病による死因としては男性で第 5 位、全体でも第 7 位であり、年間約 1 万 6 千人が COPD によって死亡しており、さらに年余にわたり増加傾向であり日本社会の負担となる事が予想されている。日本での COPD の有病率は 40 歳以上では 8.6%とされており、患者数は約 530 万人と推計されている。

COPD 患者肺の病理学的な特徴として、末梢気道病変と肺泡破壊である肺気腫が種々の程度に混在していることが知られている。しかし、その病態に関しては完全には解明されていない。これまでの報告では、好中球やマクロファージより放出される好中球エラスターゼやマトリックスメタロプロテアーゼに加え、喫煙によって産生される過剰なオキシダントと生体に存在するアンチオキシダントとの不均衡によって生じる酸化ストレスが、肺気腫形成に重要な役割を演じているとされる。

カタラーゼは 240kD の 4 量体蛋白であり、生体内での主要なオキシダントである過酸化水素(H_2O_2)を水へと分解する抗酸化酵素の一つである。カタラーゼは肺においては気道上皮細胞や肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージなどに存在し、細胞内ではペルオキシソームに分布しているが、好中球の細胞質内にも存在する。カタラーゼと COPD/肺気腫の関連に関する知見は乏しく、その病態における役割に関しては不明である。

そこで、喫煙誘導肺気腫の病態における抗酸化酵素カタラーゼの役割を明らかにする事を目的として本研究を企画した。

【対象と方法】動物実験としてカタラーゼ活性のない C3H/AnL Cs^bCs^b(アカタラセミアマウス)と C3H/AnL Cs^aCs^a(野生型マウス)、並びに C57BL/6J マウスを使用した。その取り扱いとすべての実験手技及びプロトコールは、北海道大学動物実験に関する規定及び北海道大学動物実験実施マニュアルに基づき、北海道大学動物実験委員会の承認を経て施行した。また臨床研究においては、北海道大学病院へ通院中の COPD 患者を対象群として、COPD のない喫煙者、COPD のない非喫煙者を対照群として登録し、ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針に基づき、文書として記載された説明同意書を用いて説明し、本人の自由意思に基づき参加された。

マウスへの喫煙曝露は SIS-CS system を用いて喫煙チャンバー内で主流煙を鼻より吸入させた。10 日間の喫煙曝露を短期喫煙曝露、16 週間を長期喫煙曝露と定義した。肺の形態学的評価はパラフィン包埋肺固定標本をヘマトキシリン・エオジン染色し光学顕微鏡で観

察して行った。RNA抽出は凍結肺標本より RNase Mini Kit を使用して行い、TaqMan Gene Expression Assays probe を用いて RT-PCR を施行した。好中球走化性は Boyden chamber を用いて評価した。凍結肺組織、パラフィン包埋肺固定標本は、酸化ストレスやアポトーシスを評価するため、それぞれ免疫組織化学的検討の為に使用した。同肺組織の抽出液はカタラーゼ活性、グルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定に使用した。マウス骨髄由来好中球は Percoll 液を、ヒト好中球は Ficoll Paque 液を用いてそれぞれ分離し、好中球からの H_2O_2 放出、ROS 放出、カタラーゼ活性、カタラーゼ発現に関して評価した。抗酸化酵素として PEG-カタラーゼ、N-アセチルシステインを用いた。好中球膜からの $\alpha 1$ アンチトリプシン放出とその酸化に関しては、ウエスタンブロッティング法によって評価した。

【結果】16 週間長期喫煙曝露モデルにおいて、アカタラセミアマウス肺では野生型マウス肺と比較して有意に肺気腫が増悪していた。同モデルにおいては、アカタラセミアマウス肺において、野生型マウス肺と比較して、優位に酸化ストレスが亢進し、肺胞上皮細胞のアポトーシスも増加していた。10 日間短期喫煙曝露モデルにおいては、アカタラセミアマウス肺からの気管支肺胞洗浄液中の総炎症細胞数、中でも好中球数が野生型マウス肺と比較して有意に増加していた。同モデルでは酸化ストレスに関して両群で有意差を検出する事は出来なかったが、抗酸化酵素に関しては野生型マウス肺でグルタチオンペルオキシダーゼ活性が喫煙曝露後に上昇したのに対して、アカタラセミアマウス肺ではこの代償の上昇が認められなかった。両群における肺での喫煙誘導好中球炎症の違いは、好中球ケモカインの違いではなく、好中球走化性の違いによって生じていた。またカタラーゼ活性の低下したマウス骨髄由来好中球は走化性が亢進しており、この亢進効果は PEG-カタラーゼ、N-アセチルシステイン投与により相殺された。またカタラーゼ活性の低下した好中球からの H_2O_2 や ROS 放出は有意に亢進し、それによって好中球膜から放出される $\alpha 1$ アンチトリプシンの酸化が有意に増加していた。カタラーゼ経静脈投与は 10 日間短期喫煙曝露によって生じる肺好中球炎症を有意に低下させた。ヒト COPD 患者好中球のカタラーゼ活性は COPD のない喫煙者並びに COPD のない非喫煙者より採取した好中球と比較して有意に低下し、 H_2O_2 放出は有意に増加していた。この効果は COPD 病期判定の指標である対予測 1 秒量と相関していた。

【考察】本研究により、カタラーゼ活性の欠損は反復喫煙曝露によって生じる肺好中球炎症を増悪させ、それに引き続き生じる肺気腫形成を促進することが明らかとなった。またこの喫煙誘導肺好中球炎症は好中球カタラーゼ活性が低下する事によって生じる、好中球走化性によって生じていた。これは我々が知り得る限り最初の報告であるが、抗酸化酵素であるカタラーゼ活性の好中球での低下が、直接的に好中球走化性の亢進を介して好中球炎症に寄与している点で意義深い発見と考える。またその機序として好中球膜の $\alpha 1$ アンチトリプシンの酸化が関与しており、酸化ストレスが好中球走化性に関与している傍証となると考える。更に COPD 患者好中球においては、COPD のない喫煙者や COPD のない非喫煙者と比較してカタラーゼ活性が有意に低下し、 H_2O_2 放出が亢進しており、マウスでの検討をヒトに当てはめる事が出来るならば、好中球カタラーゼ活性の低下している個体は COPD 発症感受性が高いと推察される。さらにマウスへのカタラーゼ投与実験において喫煙誘導肺好中球炎症を有意に抑制した点からは、酸化ストレスによる好中球集積が病態に関係している疾患におけるカタラーゼの治療潜在性についても期待しうると考える。

【結論】好中球カタラーゼ活性の低下は、好中球走化性の亢進とそれに伴う肺好中球炎症の増悪によって喫煙誘導肺気腫を増悪させる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	秋田弘俊
副査	教授	西村正治
副査	教授	三輪聡一
副査	准教授	濱田淳一

学位論文題名

喫煙誘導肺気腫の病態におけるカタラーゼの役割に関する研究

最初に秋田教授より猪又崇志君について紹介があった後、喫煙誘導肺気腫の病態におけるカタラーゼの役割に関する研究について、約30分間にわたって発表があった。内容は研究の背景となる慢性閉塞性肺疾患(COPD)/肺気腫の病態及び抗酸化酵素カタラーゼについて紹介があった後、カタラーゼ活性の欠損したアカタラセミアマウスを用いた短期、長期の喫煙曝露実験によって、カタラーゼ活性の低下は肺での上皮細胞アポトーシス増加や酸化ストレス亢進を生じ、肺好中球炎症を増強させること、更には肺気腫をより増悪させることを示した。また好中球を用いた *in vitro*, *ex vivo* の実験によって、好中球におけるカタラーゼ活性の低下は、好中球からの活性酸素種や過酸化水素 H_2O_2 産生を増加させ、好中球走化性を亢進させることを明らかとした。最後にヒト COPD 患者を対象とした観察研究において、ヒト COPD 患者の好中球では、COPD を発症していない喫煙者及び健常非喫煙者と比較して、カタラーゼ活性が低下し H_2O_2 産生が亢進していることを明らかにした。最後にマウス及びヒトにおけるデータを総括し、カタラーゼ活性の低下は肺においてアポトーシスの増加、酸化ストレスの増強に加え、好中球走化性の亢進によって生じる肺好中球炎症の増悪などを介して、喫煙誘導肺気腫の病態を増悪させることが示された。

質疑応答では、最初に濱田准教授より、アカタラセミアマウスでのカタラーゼ活性低下に関する機序に関して質問があり、カタラーゼ遺伝子発現は正常であるが、mRNA の翻訳や蛋白代謝の段階における遺伝子変異があるためにカタラーゼ活性が低下すると返答があった。またカタラーゼ活性の低下した高原病患者において、喫煙者では肺気腫を発症しやすいとのデータがあるかどうかに関して質問があり、現時点では高原病患者における肺気腫感受性に関するデータは報告されていないが、今回の研究結果を踏まえると、高原病患者は健常正常人と比較して、慢性喫煙により肺気腫を発症しやすいことが予想されると返答があった。

次に三輪教授から、ヒト COPD 患者においてカタラーゼ活性が低下している機序に関して質問

があり、今回の結果からは mRNA 発現に関しては各群で有意差はないので、カタラーゼ遺伝子の翻訳や蛋白の代謝などに関して異常が起こっている可能性があり、エピジェネティックな因子の関与も想定される。しかし、現段階では何故 COPD 患者において好中球のカタラーゼ活性が低下しているかに関しては不明であると返答があった。また喫煙によって生じる H_2O_2 に関して、基本的には直接産生される系は主要ではなく、NADPH オキシダーゼを介して産生されるスーパーオキシドが SOD によって代謝される経路が主要であるとコメントがあった。更に PEG-カタラーゼ投与実験において、そもそも好中球内に PEG-catalase が入っているのかどうか、どこに作用しているのかについて質問があり、PEG-catalase は分子量が大きく細胞内に取り込まれる事は、何らかの能動輸送系がなければならず、作用点としては細胞外の H_2O_2 が想定される。他のデータは細胞内のカタラーゼ活性が低下した場合に、好中球の走化性が亢進することを証明しており、今回の PEG-catalase のデータはカタラーゼの作用点という意味では異なる。データの意味付けが異なるため、カタラーゼが関与する別の実験と考えている旨返答があった。

秋田教授からは、ヒト COPD 患者対象の結果に関して、カタラーゼ遺伝子多型の関与について質問があり、本研究の対象群を用いた別の遺伝子多型に関する検討を第一内科で行ったが、カタラーゼ活性に遺伝子多型が関わっていることは確認出来なかったと返答があった。しかし、カタラーゼ発現に関わる遺伝子多型の違いによって、カタラーゼ活性の個体差が生じ、結果としてタバコ感受性に高低の差が生じる可能性は考慮されると返答があった。

最後に西村教授より、本研究は結果の関連性や内容に不十分な点も散見されるが、COPD/肺気腫の病態におけるカタラーゼの役割に関して明らかにした最初の研究であり、今後の発展も期待される旨総括があった。

この論文は現在、Journal of Clinical Investigation 誌において要修正と判断されており、追加実験を行ったうえでの掲載も期待され、今後の治療薬としてのカタラーゼ利用に関して発展も期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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）の学位を授けるのに十分な資格を有するものと判定した。