

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 猪 又 崇 志

### 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

【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、末梢気道病変と肺胞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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)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<sup>b</sup>Cs<sup>b</sup>(アカタラセミアマウス)と C3H/AnL Cs<sup>a</sup>Cs<sup>a</sup>(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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。