

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 眞木 賀奈子

学 位 論 文 題 名

アレルギー性気道炎症における蛋白のグルタチオン化とグルタレドキシン 1 に関する研究
(Studies on protein S-glutathionylation and glutaredoxin 1 in allergic airway inflammation)

【背景と目的】 気管支喘息における気道炎症にはオキシダントとアンチオキシダントのバランス不均衡による酸化ストレスが深く関わっており、トリペプチドであるグルタチオンは、肺において酸化還元状態の恒常性を維持する重要なアンチオキシダントである。

蛋白のグルタチオン化は、酸化ストレス下でグルタチオンが蛋白中の反応性システイン残基と結合する翻訳後酸化修飾である。一方、転移酵素のチオレドキシンファミリーに属するグルタレドキシン 1 (glutaredoxin 1: Glrx1) は脱グルタチオン化を媒介し、グルタチオン化された蛋白を還元状態へ回復させる。グルタチオン化により蛋白は構造や機能が変化するが、脱グルタチオン化により元に戻ることが可能であるため、グルタチオン化は蛋白の不可逆的酸化を防ぐ働きがあると考えられている。

アレルギー性気道炎症モデルマウスにおいて、抗原曝露後 48 時間の肺では、Glrx1 mRNA および蛋白量の発現が増加するという既報があるが、肺組織における蛋白のグルタチオン化および Glrx1 の抗原曝露後の経時的変化については明らかにされていない。また気管支喘息患者の喀痰における蛋白のグルタチオン化と Glrx1 に関して、喘息症状安定時と発作時の差異についての報告はない。

今回我々は、アレルギー性気道炎症モデルマウスを用いて、肺組織における蛋白のグルタチオン化、Glrx1、グルタチオンの抗原曝露後の経時的変化と気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 中の Glrx1、グルタチオン、サイトカイン、ケモカインの抗原曝露後の経時的変化を調べた。また気管支喘息患者の喀痰における蛋白のグルタチオン化および Glrx1 に関して、喘息症状安定時と発作時との差異を検討した。さらに *in vitro* にて、グルタレドキシン (glutaredoxin: Glrx) の small interfering RNA (siRNA) 導入によりヒト気道上皮細胞の Glrx をノックダウンし、アレルギー性気道炎症における Glrx1 の一役割を検討した。

【材料と方法】 BALB/c マウス (メス、6-7 週齢) を用い、ovalbumin (OVA) 腹腔内感作を day0、7 に、OVA 吸入曝露を day21、22、23 に施行しアレルギー性気道炎症モデルマウスを作成した。OVA 最終曝露後、6 時間、24 時間、48 時間、72 時間、8 日後に各群 5 匹にて、BALF および肺組織を採取した。コントロールは OVA 腹腔内感作後、PBS 吸入を施行し、PBS 最終吸入より 48 時間後に検体を採取した。蛋白のグルタチオン化は Glrx1 による脱グルタチオン化を利用し、肺組織の蛍光染色を施行した。Glrx1 は Western blot および免疫染色、グルタチオンは酵素リサイクル法、BALF 中のサイトカインとケモカイン (25 種類) は enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) で測定した。また北海道大学病院の自主臨床試験に登録し、気管支喘息患者の発作時と症状安定時の喀痰を採取し、蛋白のグルタチオン化と Glrx1 を Western blot にて測定した。In vitro 実験では、ヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞を用い、Lipofectamin 2000 で Glrx siRNA (コントロールは control siRNA) を 48 時間導入後、IL-4 と TNF- α 、もしくは IL-13 と TNF- α にて 24 時間刺激後に細胞上清を回収し、ELISA にて好酸球走化性ケモカインである eotaxin-1、eotaxin-2、eotaxin-3 の濃度を測定した。統計は、マウスモデルでの多群間の比較は Dunnett 検定を、in vitro 実験での 2 群間の比較は対応なしの Student's t 検定を用いた。相関についてはピアソンの順位相関係数を用いた。すべての解析には Stat View (Version5.0) を用い、p 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

【結果】 アレルギー性気道炎症モデルマウスにおいて、抗原曝露 6 時間後に気道上皮細胞の蛋白のグルタチオン化が一過性に上昇した。肺組織の Glrx1 は曝露後 48 時間と 72 時間に上昇したのに対し、BALF の Glrx1 は曝露後 6 時間と 48 時間に上昇を認めた。免疫染色では気道上皮細胞に Glrx1 の発現の有意な上昇を認めた。肺組織の酸化型グルタチオンは曝露後 24 時間から 72 時間にかけて上昇したのに対し、BALF では総グルタチオンおよび酸化型グルタチオンは曝露後 6 時間に上昇した。経時的に得られた BALF 中の Glrx1 と IL-4、IL-13、eotaxin-1、TNF- α 、IL-6、KC、RANTES の間に有意な相関を認めた。気管支喘息患者 6 症例の喀痰に関しては、喘息症状安定時と比較し発作時では蛋白のグルタチオン化に関して変化は認めるが一定の傾向を認めず、Glrx1 は 4 症例にて増加を認めた。In vitro 実験において、ヒト気道上皮細胞に siRNA を導入し Glrx をノックダウンすると、IL-13 と TNF- α 刺激後の細胞上清中の eotaxin-1 および eotaxin-3 の濃度はコントロールと比較し低下を認めた。

【考察】 アレルギー性気道炎症モデルマウスでは、抗原曝露後、気道上皮細胞において蛋白のグルタチオン化がおこること、抗原曝露後の Glrx1 やグルタチオンの上昇時期が肺組織と BALF では異なることを初めて明らかにした。気道上皮細胞における早期の蛋白のグルタチオン化は Glrx1 による脱グルタチオン化によって速やかに消失したと考えられた。気道上皮被覆液を反映する BALF では、総グルタチオンおよび酸化型グルタチオンが早期に一過性に上昇しており、酸化ストレスの迅速な動態を反映していると考えられた。ヒト喀痰中の蛋白のグルタチオン化と Glrx1 の増減に関して、喘息症状安定時と発作時において一定の方向性が認められなかった原因として発作の発症から喀痰採取までの時間が均一でなかったことが考えられた。動物モデルに認められたダイナミックな経時的变化を鑑みると、ヒトの喘息発作の評価時期に注意を払う必要性が示唆された。動物モデルにおいて経時的に得られた BALF 中の Glrx1 が、Th2 もしくは NF- κ B 関連のサイトカインやケモカインと相関を認めたことより Glrx1 とアレルギー性気道炎症との関与が考えられた。Glrx siRNA を導入されたヒト気道上皮細胞における Th2 サイトカインおよび TNF- α 刺激後のサイトカインやケモカインの産生をみた報告はこれまでに無く、Glrx1 が好酸球走化性ケモカインである eotaxin を介して好酸球性炎症に関与していることが示唆された。

【結論】 アレルギー性気道炎症モデルマウスにおいて、蛋白のグルタチオン化、Glrx1、グルタチオンは、肺組織および BALF において抗原曝露後ダイナミックな経時的变化を示した。Glrx1 はサイトカイン、ケモカインを介してアレルギー性気道炎症に関わっている可能性がある。