

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：32728

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07166

研究課題名(和文) Prx2の2つの過酸化型の定量による慢性閉塞性肺疾患COPD診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a diagnostic method for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by quantification of two hyperoxidised forms of Prx2

研究代表者

石田 洋一 (Ishida, Yo-ichi)

湘南医療大学・薬学部医療薬学科・准教授

研究者番号：90510454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシレドキシン2 (Prx2) は、赤血球内の酸化ストレスに対する防御に働く酸化還元酵素である。これまで、Prx2の51番目のシステイン残基がスルホン酸(-SO₃H)にまで過酸化されることを示してきたが、その臨床的意義は不明であった。そこで、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や睡眠時無呼吸症候群(OSAS)などの酸化ストレス疾患を対象にして、Prx2の過酸化が診断のバイオマーカーになりうるのかどうかを検討した(検体の収集状況から、OSASの解析を進めた)。その結果、OSAS患者(コントロールとして健常者)において、Prx2の過酸化が著しく亢進していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、これまであまり機能解析が進んでいなかったPrx2に着目して、その臨床的な有用性を示した点にあると考えられる。今後、Prx2の過酸化型だけを検出するような免疫アッセイ系を構築して、診断マーカーとしての有用性を示すことができれば、医療現場にも活用されることが期待されることから、その基礎段階となる本研究は、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Peroxiredoxin 2 (Prx2) is a redox enzyme that acts in defence against oxidative stress in erythrocytes. It has been shown that the 51-cysteine of Prx2 is hyperoxidized to a sulphonic acid (-SO₃H), but its clinical significance is unknown. Therefore, we investigated whether Prx2 hyperoxidation could be a biomarker for diagnosis in oxidative stress diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and sleep apnoea syndrome (OSAS) (based on the collection of specimens, we proceeded to analyze OSAS). The results showed that Prx2 hyperoxidation was markedly increased in OSAS patients (healthy subjects as controls).

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：細胞生物学

キーワード：Prx2 過酸化 赤血球 睡眠時無呼吸症候群 過酸化

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシレドキシシン (Peroxiredoxin; Prx) は、種々の酸化ストレスに対する防御にはたらく酸化還元酵素群である。Prxはヒトでは6種類のメンバー (Prx1-6) が存在するが、そのうち、ペルオキシレドキシシン2 (Prx2) は、赤血球に豊富に発現し (赤血球タンパク質では3番目) し、生体内を循環して酸素運搬を担う赤血球において、酸化ストレスの原因となる活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) を消去する役割を担っていると考えられている。しかし、その役割や疾患との関わりに関する研究はそれほど進んでいない。また、酸素を用いるさまざまな生体反応 (呼吸やエネルギー産生系など) においては、反応の副産物として恒常的に ROS が発生し、タンパク質や核酸を酸化修飾して疾患の原因となることや、細胞自身が積極的に ROS を活用して、生体内に侵入した病原体の排除などに利用することが近年明らかにされてきている。さらに近年、多くの疾患で酸化ストレスが関わっていることも明らかにされ、今や「酸化ストレスが関わっていない疾患はない」といわれるほど酸化ストレスの重要性が認識されつつある。従って、酸化ストレスと疾患との関係を調べることは、医学薬学的に非常に重要であると考えられる。

Prx2 の酸化ストレス防御を担っているのは、アミノ酸配列中に存在する複数のシステイン残基である。中でも、51番目のシステイン残基 (Cys-51) が重要な役割を担う (図1)。Prx2 は細胞内の過酸化水素や過酸化物を還元・無毒化する一方、自身のシステイン残基は酸化される。通常、生体内での反応では分子間ジスルフィド結合を形成した後、チオレドキシシン系によって再活性化されて、次の酸化・還元サイクルに入るが、深刻な (過剰な) 酸化ストレスが負荷されると、スルフィン酸やスルホン酸にまで過酸化される。これまで、過酸化型は再活性化されることはないと考えられてきたが、スルフィン酸を再活性化する酵素が存在することが明らかとなり、過酸化型の生理学意義が注目されている。

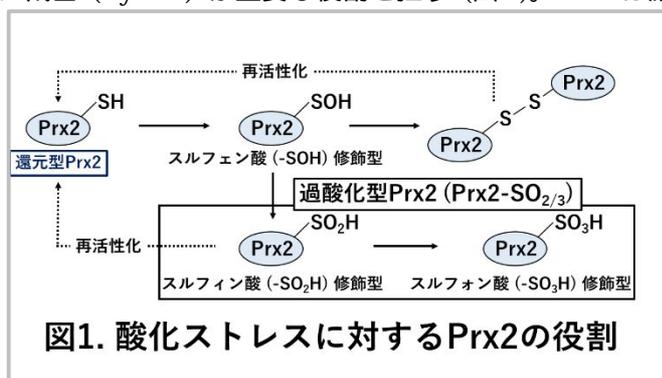


図1. 酸化ストレスに対するPrx2の役割

研究代表者は、研究開始前まで、ヒト赤血球を用いて、*in vitro* で酸化剤を負荷することによって、Prx2 の過酸化がどのように影響されるのかを調べてきた。その結果、Prx2 は過酸化水素のような水溶性の過酸化物よりも、*t*-ブチルペルオキシドのような有機過酸化物の還元にはたらくといった、他の Prx ファミリーメンバーとは異なる性質を明らかにしてきた。また、赤血球タンパク質を逆相 HPLC により分析すると、Prx2 が SO₂ 型に過酸化されると還元型よりも溶離時間が延長し、さらに SO₃ 型になると逆に溶離時間が短縮するなどの現象を見出した。さらに、質量分析計を用いて、Prx2 の Cys-51 の過酸化度を定量する方法の開発にも取り組んできた。

次の課題は、疾患状態 (酸化ストレス性疾患) において、赤血球 Prx2 が生体内でどのような影響を受けるのか、さらにその臨床的意義を明らかにすることである。

2. 研究の目的

以上の研究背景により、本研究では、慢性閉塞性肺疾患 (Chronic obstructive pulmonary disease; COPD) や閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (Obstructive sleep apnea syndrome; OSAS) など、病態の進展に酸化ストレスが重要な役割を果たす疾患を対象にして、赤血球 Prx2 の酸化状態がどのような影響を受けるのかを調べるとともに、その臨床的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、湘南医療大学、共同研究機関の明治薬科大学および複十字病院、各施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

健常者または疾患患者から採血し、調製した赤血球画分から全タンパク質を抽出した。タンパク質を SDS-PAGE により分離し、抗 Prx2 抗体または抗 Prx2-SO_{2/3} 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより過酸化型 Prx2 を検出した。同様に、抽出タンパク質を HPLC 分離して、Prx2 ピークを検出することにより過酸化度を調べた。

4. 研究成果

まず、COPD 患者の赤血球の解析を行ったが、コロナ禍だったことや呼吸器系の病棟が逼迫していた状況があり、また、COPD の病態に伴って必要な検査では、採血を必要とする検査が少ないといった理由から、COPD の検体の収集が進まなかった。そのため、検体の収集が順調に進捗

した OSAS の分析を進めることにした。

OSAS は、寝ている間に気道が閉塞することにより無呼吸・低呼吸状態になる疾患と定義される。肺において赤血球への酸素の受け渡しがうまくいかないことが原因で、生体が酸素不足に陥り、酸化ストレスを起因とする様々な病態が現れる全身疾患である。赤血球は全身を循環している細胞であるため、病態が Prx2 の過酸化度として反映されることが考えられる。現在の OSAS の検査には、費用や時間がかかり、それに用いる技術も熟練した技術が必要であるなど、よい診断マーカーが求められている。そこでまず、OSAS 患者における Prx2 の過酸化度をウェスタンブロッティングにより調べた。その結果、健常者赤血球では、Prx2 の過酸化はほとんど検出できなかったのに対し、OSAS 患者赤血球では、Prx2 の著しい過酸化が見られた (図 2)。

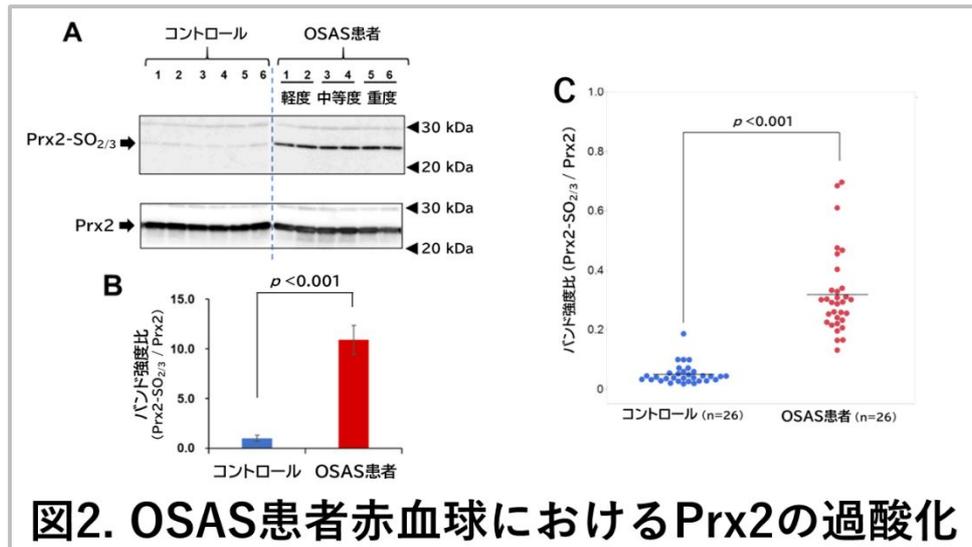


図2. OSAS患者赤血球におけるPrx2の過酸化

OSAS の重症度の指標として、無呼吸低呼吸指数 (Apnea hypopnea index; AHI) が臨床的に用いられており、AHI は 1 時間あたりの無呼吸と低呼吸を合わせた回数と定義されている。OSAS においては、AHI が 5~10 を軽度、15~30 を中等度、>30 を重度と重症度が決められる。そこで次に Prx2 の過酸化が重症度と関連しているのかどうかを調べるため、患者ごとの Prx2 の過酸化度と AHI の相関分析を行った (図 3)。その結果、Prx2 過酸化のバンド強度と AHI の間に正の相関 (相関係数 $r=0.6491$) が見られた。以上の結果、Prx2 の過酸化は、OSAS の重症度を示すバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

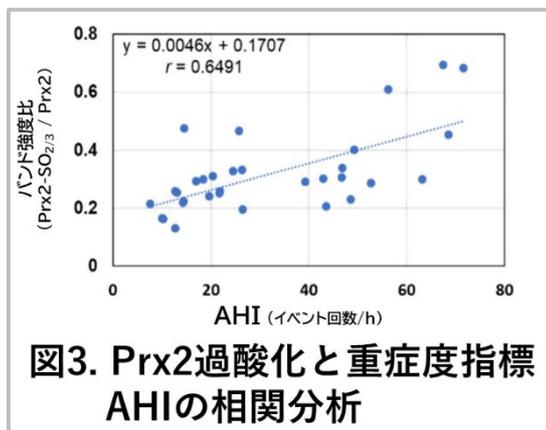


図3. Prx2過酸化と重症度指標 AHIの相関分析

最後に、OSAS 患者における Prx2 の過酸化の亢進について、別の方法として HPLC によって確かめた (図 3)。コントロールの健常者赤血球の全タンパク質を HPLC 分離したところ、これまでの報告と同様、Prx2 のピークが溶離時間約 42 分の位置に検出された。これに対し、OSAS 患者においては、Prx2 のピークは同じ位置からは消失して、より早い溶離時間に検出された (37~39 分頃)。さらに、過酸化型 Prx2 も検出された。以上の結果、OSAS 患者赤血球においては、Prx2 が強く過酸化されることが示された。

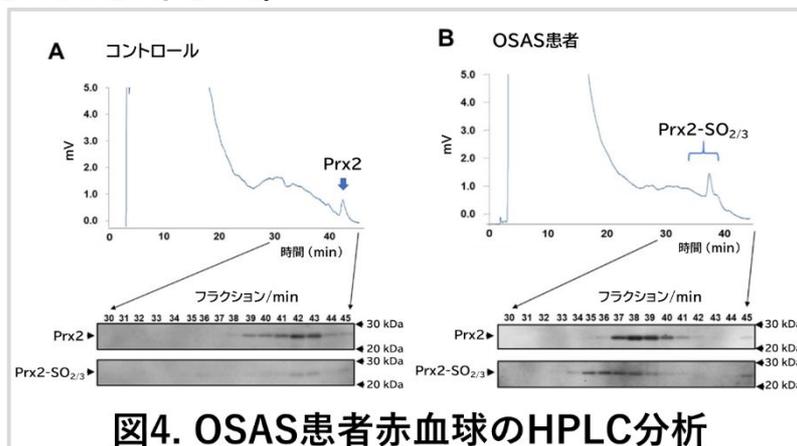


図4. OSAS患者赤血球のHPLC分析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Shin Koike, Haruka Sudo, Satori Turudome, Masako Ueyama, Yoshiaki Tanaka, Hiroshi Kimura, Yo- Ichi Ishida, Yuki Ogasawara | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Hyperoxidized Peroxiredoxin 2 Is a Possible Biomarker for the Diagnosis of Obstructive Sleep Apnea | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Antioxidants | 6. 最初と最後の頁 2486 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11122486. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 須藤遥、殿山泰弘、小池伸、小笠原裕樹、石田洋一 |
| 2. 発表標題 酸化ストレス性疾患への臨床応用を目指した過酸化型Prx2定量法の開発 |
| 3. 学会等名 第39回日本ヒト細胞学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 須藤遥、小池伸、上山雅子、田中良明、木村弘、小笠原裕樹、石田洋一 |
| 2. 発表標題 閉塞性睡眠時無呼吸症候群における過酸化型Prx2のバイオマーカーとしての可能性 |
| 3. 学会等名 第41回日本ヒト細胞学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上山雅子、小池伸、須藤遥、田中良明、石田洋一、木村弘 |
| 2. 発表標題 閉塞性睡眠時無呼吸症候群における赤血球中Peroxiredoxin 2の酸化状態の解析 |
| 3. 学会等名 第45回日本睡眠学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 須藤遥、小池伸、上山雅子、田中良明、木村弘、小笠原裕樹、石田洋一 |
| 2. 発表標題 閉塞性睡眠時無呼吸症候群における過酸化型Prx2のバイオマーカーの解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会144年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |