

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790758

研究課題名(和文) 炎症性肺疾患における加齢と酸化ストレス

研究課題名(英文) Aging and oxidative stress in inflammatory lung disease

研究代表者

長井 桂 (NAGAI KATSURA)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40374293

研究成果の概要(和文)：1) 喘息における気道被覆液中蛋白のグルタチオン化修飾について。Ovalbumin(OVA)による好酸球性炎症モデルにて、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の可逆的な蛋白酸化の一つであるグルタチオン化蛋白は、OVA曝露後8時間後の早期のみ出現し、その酸化修飾を還元するグルタレドキシン(GRx)は24～48時間後に増加した。2) 加齢と喫煙による抗酸化転写因子NF-E2-Related Factor 2(Nrf2)とグルタチオン産生律速段階酵素の発現について。無症状の若年者と中高年者に気管支鏡を行い、気道上皮を採取した(n=30)。中高年では非喫煙者と比較し喫煙者でNrf2 mRNAおよびγ-GCS mRNA発現が低下していたが、若年者では差がなかった。免疫染色にて若年者での核でのNrf2陽性細胞の比率は増強していたが、中高年者は低下していた。

研究成果の概要(英文)：1) Protein S-glutathionylation in the epithelial lining fluid during allergic airway inflammation. The S-glutathionylated protein in bronchoalveolar fluid (BALF) was temporally present only at 8 h in ovalbumin(OVA) stimulated eosinophilic inflammation model. The level of glutaredoxin1 (GRx1) was significantly higher at 24 and 48 h. 2) Aging affects the airway expression of NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2) and γ-glutamyl cysteine synthetase regulatory subunit (GCLm) in response to cigarette smoke. Airway epithelial cells from the subsegmental bronchus were harvested by brushing through a flexible bronchoscope (n=30). The levels of Nrf2 mRNA and GCLm mRNA were significantly decreased in current smokers compared to never-smokers in the old subjects, but not in the young subjects. The ratio of nuclear Nrf2-positive cells tended to be increased (p=0.008) in current smokers compared to never-smokers in the young subjects, but not in old subjects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患癌、肺線維症、呼吸器感染症、加齢、喫煙

### 1. 研究開始当初の背景

加齢や長期喫煙により肺内酸化ストレスマーカーの上昇やアンチオキシダントの低下が報告されている。申請者らは気管支肺胞洗浄液中のカルボニル化アルブミンの比率、酸化型グルタチオン濃度が若年喫煙者に比べ中高年喫煙者では有意に高く、肺胞被覆液中の酸化ストレス状態を間接的に反映していること (Nagai, Thorax 2006)、肺胞マクロファージの抗酸化物質の誘導に重要な転写因子である NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2) の mRNA 発現は中高年喫煙者では同年齢の非喫煙者と比べ低下しており、カルボニル化アルブミンや酸化型グルタチオン濃度と逆相関すること (Suzuki, AJRCMB, 2009) を報告した。一般的に加齢では酸化蛋白が増加することから、中高年喫煙者は同年齢の非喫煙者に比べ実年齢以上の加齢性変化を有しているのではないかと推測される。

蛋白酸化には可逆的及び不可逆的な反応があり、不可逆的な酸化蛋白は通常は分解・再利用されるが酸化蛋白の産生と除去のバランスの崩れは酸化蛋白の蓄積につながる。可逆的酸化反応の一つにグルタチオン化があり、強い酸化ストレスが加わった際に不可逆的蛋白酸化から蛋白を守る役割も示唆されている。酸化型グルタチオンが肺胞洗浄液中で高値と報告されている長期喫煙者や肺気腫病変を伴う喫煙者、喘息患者では可逆的酸化反応の一つであるグルタチオン化蛋白の増加が推測される。不可逆的酸化反応の一つにカルボニル化があり、これは代表的な蛋白の酸化マーカーとして知られている。

これらの酸化蛋白が気道上皮や被覆液中にどの程度含まれ、また存在することによりもたらされる肺の障害については未だよく分かっていない。

### 2. 研究の目的

肺は外界と常時接する臓器であり、気道被覆液や気道上皮は特殊な生体防御機構が存在する。OVA刺激モデルで、チャレンジ後の気管支肺胞洗浄液中のグルタチオン化蛋白、グルタチオン及びグルタレドキシンの変化を調べる。また、ヒト気道上皮での抗酸化

遺伝子である Nrf2 やその関連遺伝子の発現変化を加齢と喫煙により群分けし検討する。

### 3. 研究の方法

C57BL/6 マウスを ovalbumin (OVA) にて感作し経気道的に OVA 曝露した後、8, 24, 48, 72, 96 時間後に肺胞洗浄液 (BALF) を採取した (各群 5~8 匹)。これまで体液中のグルタチオン化蛋白の検出は容易ではなかったが、長崎大学教授近藤宇史博士らのグループは血清グルタチオン化蛋白の検出に成功し、閉塞性動脈硬化症のリスクマーカーになることを示した (Nonaka K, Circ J 2007)。抗グルタチオン化抗体を用い、初の試みとして喀痰・気管支肺胞洗浄液などの呼吸器領域の液性成分のグルタチオン化蛋白の検出を行う。気管支肺胞洗浄液中の抗グルタチオン化抗体 (長崎大学より供与) 及びグルタレドキシニン抗体 (R&D) を用いてウエスタンブロット法でグルタチオン化蛋白、グルタレドキシニンを検出した。各バンドの強さを NIH Image software を用いて数量化し、ある被験者のバンドの数値を基準として各検体はその何倍になるかを Arbitrary Unit (AU) で示した。総グルタチオン及び酸化型グルタチオンは既報に基づき測定した。コントロールと各タイムポイントとの差を Dunnet 検定にて評価した。

ヒト気道上皮に関する研究については、無症状の若年者 (平均年齢 23 ± 3 歳、生涯非喫煙者 7 名、現在喫煙者 7 名)、中高年者 (平均年齢 63 ± 5 歳、生涯非喫煙者 6 名、現在喫煙者 10 名) に気管支鏡を行った。気管支鏡で気管部分と下葉第 4~5 次気管支の上皮を擦過し細胞を採取した。赤血球を除去し洗浄後遠沈により細胞成分を分離し、総細胞数、分画を算出した。細胞分画で炎症細胞比率が 5% 以下のサンプルのみを解析に用いた。細胞成分は  $1 \times 10^6$ /ml に調整し RNA 抽出用とし、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) で総 RNA を抽出し、cDNA とした後 ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にて RT-PCR を行った。プローブとプライマーは TaqMan Gene Expression Assays probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

を用いた。気道上皮の Nrf2 および Nrf2 の標的遺伝子の一つである Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (Gclm) の mRNA 発現を RT-PCR 法で比較した。内因性コントロールとしては GAPDH を用いた。

免疫染色用に、採取した気道上皮細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで固定したプレパラートを作成した。また、Nrf2 の免疫染色は anti-Nrf2 antibody (sc-13032; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) にて行った。細胞質は染色強度により 0-3 の 4 段階でスコア化、核は全細胞中における陽性細胞の割合を求め Nrf2 の発現を比較検討した。2 群間の検定に関しては Mann-Whitney U test を用いた。

#### 4. 研究成果

アレルギー性気道炎症において被覆液中のグルタチオン化蛋白を初めて検出した。BALF 中グルタチオン化蛋白は OVA 曝露後 8 時間後の早期のみ出現した。OVA 曝露前に比べ GRx は 24~48 時間後に、総グルタチオンは 8~72 時間後に増加した。酸化型グルタチオンは有意な増加を示さなかった。グルタチオン産生律速段階酵素である  $\gamma$ -GCS の mRNA 発現は、BALF 中のグルタチオンに先立ち 8 時間後がピークの増加を示した。グルタチオン化蛋白は OVA 曝露後早期に発現するが、グルタチオン/GRx システムにより速やかに消失することを示した。

ヒト気道上皮における、抗酸化遺伝子と加齢に関する研究に関しては、若年・中高年とも喫煙者と非喫煙者間に有意な年齢及び呼吸機能の差異を認めなかった。また、一日の喫煙本数は若年喫煙者と中高年喫煙者で有意差を認めなかった。中高年では非喫煙者と比較し喫煙者で Nrf2 mRNA 発現が低下していたが ( $p=0.023$ )、若年者では差がなかった ( $p=0.153$ )。同様に  $\gamma$ -GCS mRNA 発現も中高年喫煙者で低下していたが ( $p=0.017$ )、若年者では差を認めなかった ( $p=0.406$ )。若年者での細胞質の Nrf2 発現強度は、非喫煙者と比較し喫煙者では低下していたが ( $p=0.045$ )、核での Nrf2 陽性細胞の比率は逆に増強していた ( $p=0.008$ )。中高年者の Nrf2 発現は非喫煙と比較し喫煙者では細胞質 ( $p=0.050$ ) 及び核 ( $p=0.014$ ) どちらも低下していた。喫煙における気道の Nrf2 発現は加齢で影響を受ける。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Odajima N, Betsuyaku T, Nagai K, Moriyama C, Wang DH, Takigawa T, Ogino K, Nishimura M. The role of catalase in pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 11:183, 2010. (査読あり)

2. Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Odajima N, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M. Curcumin attenuates elastase-and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009, 296, L614-L623. (査読あり)

3. Hasegawa M, Makita H, Nasuhara Y, Odajima N, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M. Relationship between improved airflow limitation and changes in airway caliber induced by inhaled anticholinergic agents in COPD. *Thorax*. 2009, 64, 332-338. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. Nagai K, Betsuyaku T, Nishimura M. Aging affects the airway expression of Nrf2 in response to cigarette smoke. The 106th American Thoracic Society International Conference. 2010 May 15<sup>th</sup>. New Orleans, USA.

2. 長井 桂, 喫煙と加齢および慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の中枢気道における抗酸化酵素発現の検討. 日本呼吸器学会学術講演会. H. 22. 4. 25. 京都、国立京都国際会館.

3. Inomata T, Betsuyaku T, Odajima N, Nagai K, Yoshida T, Moriyama C, Maki K, Nishimura M. The role of catalase in cigarette smoke (CS) -induced pulmonary inflammation and emphysema in murine model. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会. 2010 年 4 月 23 日. 国立京都国際会館 (京都).

4. 牧田比呂仁, 長井 桂, 南須原康行, 長谷川 大, 守山千夏, 別役智子, 西村正治. 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の自然歴に関する研究—北海道 COPD コホート研究 4 年後の追跡調査—第 107 回日本内科学会総会. 2010 年 4 月 9 日. 東京国際フォーラム (東京) .

5. Hasegawa M, Nasuhara Y, akita H, Odajima N, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M. Relationship between improved airflow limitation and changes in airway caliber induced by inhaled anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. 第 49 回日本呼吸器学会 2009 年 6 月 1 4 日. 東京: 東京国際フォーラム.

6. Yoshida T, Betsuyaku T, Nagai K, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M. Kinetics of various oxidative stress markers in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in lipopolysaccharide (LPS) induced lung injury. 第 49 回日本呼吸器学会. 2009 年 6 月 1 3 日. 東京: 東京国際フォーラム.

7. 長井 桂, アレルギー性気道炎症モデルにおける気道被覆液中のグルタチオン化蛋白の検討. 日本呼吸器学会学術講演会. H21. 6. 13. 東京: 東京国際フォーラム

8. Nagai K, Protein S-glutathionylation in the Epithelial Lining Fluid during Allergic Airway Inflammation. 米国胸部疾患学会. H21. 5. 19. The San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA.

9. Odajima N, Betsuyaku T, Inomata T, Yoshida T, Moriyama C, Suzuki K, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M. Duration of cigarette smoke (CS) exposure affects the resolution of lung inflammation after cessation in mice. 2009 May 17<sup>th</sup> The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States.

10. Yoshida T, Betsuyaku T, Nagai K, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M. Kinetics of various oxidative stress markers in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in lipopolysaccharide (LPS) induced lung

injury. 2009 May 17<sup>th</sup> The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 長井 桂 (NAGAI KATSURA)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 40374293

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし