

氏名	江場 俊介
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	肺高血圧病態における抗酸化ストレス転写因子 Nrf2 の役割の検討
論文審査委員	主査 教授 近藤 丘 教授 海野 倫明 教授 鈴木 貴

論文内容要旨

背景:特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) は、肺細動脈における血管内皮細胞増殖、いわゆる plexiform lesion 形成と血管平滑筋細胞増殖による血管壁肥厚を特徴とする難治性疾患である。IPAH 患者肺血管病変では非常に強い酸化ストレス蓄積が生じていることから病態への酸化ストレスの関与が示唆される。一方、低酸素曝露や低酸素血症によりヒトや種々の動物で肺血管壁肥厚を伴う肺高血圧が惹起されるが、この肺高血圧合併が慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や特発性肺線維症などの呼吸器疾患の予後不良因子であることが明らかにされている。近年、低酸素性肺高血圧動物モデルにおいても病態進展に酸化ストレスが強く関与することが示されている。Nuclear erythroid 2 p45 related factor-2 (Nrf2) は、ほ乳類における酸化-抗酸化バランス調節の中心的役割を果たす転写因子である。本研究では、Nrf2 が肺高血圧病態進展において重要な役割を果たすとの仮説のもと、マウス低酸素性肺高血圧モデルにおける Nrf2 活性化の効果と肺高血圧患者肺における Nrf2 標的遺伝子発現について検討した。

方法と結果: Nrf2 活性化剤、oltipraz の胃内投与により野生型 (WT) マウス肺組織核分画への Nrf2 タンパクの集積と Nrf2 標的抗酸化遺伝子 NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1) および glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) の肺組織中発現亢進を認めた。長期低酸素曝露による WT マウス肺血管リモデリング (肺胞管レベルの肺細動脈筋性化および終末細気管支レベルの肺動脈壁肥厚) と右心室肥大は oltipraz 投与により有意に抑制された。Nrf2 欠損 (*Nrf2*^{-/-}, KO) マウスでは、低酸素曝露により WT マウスと同程度の肺血管リモデリングとより強い右心室肥大が招来されたが、これらの変化に対して oltipraz は全く抑制効果を示さなかった。このことは、WT における oltipraz の肺血管リモデリング、右心室肥大抑制効果が Nrf2 依存性であることを示す。Nrf2 が恒常的に活性化されている Kelch-like ECH associating protein 1 (Keap 1) 条件付き欠損 (*Keap1*^{fl/fl}) マウスに

おける低酸素性肺血管リモデリング、右心室肥大は WT マウスに比し有意に軽度であった。低酸素曝露 WT マウス肺 NQO1 および GCLC 遺伝子発現は、曝露開始 2 日後には室内飼育マウスに比し有意に低値であり、7 日後及び 2 1 日後にも同様の傾向を認めた。Oltipraz の慢性投与により、肺 NQO1 遺伝子の発現低下は有意に抑制され、肺 GCLC 遺伝子発現低下も抑制される傾向を認めた。WT マウス肺の免疫組織染色では、低酸素曝露による NQO1 シグナル低下を主に肺動脈中膜層で、GCLC シグナル低下を細気管支レベルの肺動脈内皮層で認め、それらの変化は oltipraz 投与により抑制される傾向を認めた。WT マウス肺より単離した CD31 陽性肺血管内皮細胞内 ROS 蓄積は 2 日間の低酸素曝露により亢進した。CD31 陽性細胞における Nrf2 標的遺伝子発現は、室内飼育マウスに比し低酸素曝露マウスで NQO1 がやや高い傾向を認めたが、GCLC は低い傾向を認め、HO-1 は有意に低値であった。肺動脈平滑筋細胞の強力な増殖促進作用を有する細胞外マトリックス、tenascin-C (TN-C) 遺伝子発現は、低酸素曝露開始 2、7 日後に室内飼育 WT に比し低酸素曝露 WT マウス肺で高値であった。この発現亢進は oltipraz により有意に抑制された。免疫組織染色の結果、低酸素による TN-C シグナル増強は細気管支レベルの肺動脈外弾性板で観察された。IPAH 患者肺における NQO1 および GCLC 遺伝子発現は、Control 肺に比しいずれも有意に高値であった。免疫組織染色上、IPAH 患者肺の閉塞性肺動脈病変 (plexiform lesion) 内に GCLC の強いシグナルを認めた。反対に、肺高血圧合併 COPD 患者剖検肺では、肥厚肺動脈にほとんど GCLC のシグナルを認めなかった。

結語： Nrf2 は、マウス低酸素性肺高血圧モデルにおける肺血管リモデリング、右心室肥大に対して抑制的な作用を有する。低酸素曝露により肺血管に酸化ストレスが蓄積するにもかかわらず、いくつかの Nrf2 標的遺伝子発現が低下していることが示された。この結果は肺高血圧合併 COPD 患者剖検肺における GCLC 低発現と矛盾しない。低酸素血症を伴う慢性呼吸器疾患の最も重要な予後不良因子の 1 つである肺高血圧予防の観点から、Nrf2 活性化剤の臨床応用が期待される。一方、IPAH 肺では Nrf2 標的遺伝子の発現亢進を認め、その病態において Nrf2 が重要な役割を演ずる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

博士論文題名.....肺高血圧病態における抗酸化ストレス転写因子 Nrf2 の役割の検討.....

所属専攻・分野名医科学.....専攻.....呼吸器外科学分野.....

学籍番号.....氏名江場俊介.....

特発性肺動脈性肺高血圧症（IPAH）は、肺細動脈における血管内皮細胞増殖と血管平滑筋細胞増殖による血管壁肥厚を病的特徴とする難治性疾患であり、予後は不良である。その治療成績はプロスタサイクリン（PGI₂）持続静注療法の出現以後飛躍的に改善されたが、依然として肺移植の適応となる症例も少なくないのが現状である。臓器移植法改正後も依然として肺移植ドナー不足は深刻であり、新たな治療法開発が急務である。本論文は、ヒトおよびマウスを用いて、肺高血圧病態において酸化抗酸化のバランスに働く転写因子である Nrf2 の役割について検討したものである。近年、IPAH 患者肺血管病変では非常に強い酸化ストレス蓄積が生じていることが示され、病態への酸化ストレスの関与が示唆されている。肺においては、肺癌や慢性閉塞性肺疾患（COPD）などにおいて Nrf2 の関与を検討した研究は散見されるが、肺高血圧病態に関して検討した報告は未だ見られない。筆者は、病態進展に酸化ストレスが強く関与することが示されている低酸素性肺高血圧動物モデルを採用し、Nrf2 活性化剤 oltipraz 投与、Nrf2 欠損(*Nrf2*^{-/-})マウスおよび Nrf2 が恒常的に活性化されている Keap1 条件付き欠損(*Keap1*^{fl/fl})マウスも用いて実験を行い、以下の成績が得られている。

- 1) oltipraz の胃内投与により野生型(WT)マウス肺組織において Nrf2 経路が活性化される。
 - 2) WT マウスにおいては、長期低酸素曝露により肺血管リモデリングと右心室肥大は oltipraz 投与により有意に抑制される。
 - 3) *Nrf2*^{-/-}マウスにおいては、低酸素曝露により WT マウスと同程度の肺血管リモデリングとより強い右心室肥大が招来されたが、これらの変化に対して oltipraz は全く抑制効果を示さなかったことから、WT における oltipraz の肺血管リモデリング、右心室肥大抑制効果が Nrf2 依存性である。
 - 4) *Keap1*^{fl/fl}マウスにおいては、低酸素性肺血管リモデリング、右心室肥大ともに WT マウスに比し有意に軽度である。
 - 5) WT マウス肺において低酸素曝露による Nrf2 標的遺伝子(NQO1,GCLC)発現が低値となる。この結果は免疫組織染色でも同様の傾向が得られた。
 - 6) ヒト検体においても、免疫組織染色上は、IPAH 患者肺の閉塞性肺動脈病変内に GCLC の強いシグナルを認めるが、肺高血圧合併 COPD 患者剖検肺では肥厚肺動脈にほとんど GCLC のシグナルを認めない。
- 以上の結果から、低酸素血症を伴う慢性呼吸器疾患の最も重要な予後不良因子の1つである肺高血圧予防の観点から、Nrf2 活性化剤の臨床応用が期待される。

本論文において研究は詳細に行われ、論文の論理構成、考察も優れており、十分に学位に値する。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。