

成果報告書<概要>

施設・所属: Meakins-Christie Laboratories 氏名 阿野 哲士

1. 概要の構成は自由ですが、留学の成果報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。
2. 研究目的、研究手法、研究成果など、一般の方にもわかりやすくしてください。
3. A4 1 ページでまとめてください。(図表、写真などの添付を含む 日本語)

研究目的

近年の研究にて酸化ストレスが人体に及ぼす影響が明らかになり、呼吸器疾患に限らずあらゆる疾患において重要な増悪因子の一つであることが既に多くの研究で報告されている。片や塩素は漂白剤やプールの消毒、化学兵器などで使用され広く知られている化合物であり、この塩素ガスをたまたま吸入することで気道障害や急性肺障害が惹起される。喘息に関してもその例外ではなく、塩素ガス吸入が刺激物誘導性喘息の原因となり、マウスにおいては塩素ガスにより産生された活性酸素種が気道炎症の増悪と気道過敏性の亢進を引き起こしたと報告されている。

塩素ガスは刺激物誘導性喘息を引き起こす強力な活性酸素種誘導化学物質であるも、その機序は不明のままである。私は、体内の酸化ストレス反応の程度が喘息重症度に影響を与えると仮定して、酸化ストレス応答における重要な役割を担う転写因子 NF-E2-related factor 2 (Nrf2)の役割を確認するため、Nrf2 を欠失させたマウス(Nrf2KO マウス)を使用し、塩素ガス誘導性喘息モデルを作成し、気道炎症と気道過敏性の亢進について実験を行い、そのメカニズムを解明することで喘息治療への応用が期待できるかどうかを検討した。

研究手法

Nrf2KO マウスと野生型マウスを使用し、以下の実験を行った。

- A) 各マウスに 100ppm の塩素ガスを実験 1 日目に吸入曝露し、24, 48 時間後にメサコリン吸入に対する気道過敏性測定及び気管支肺胞洗浄を行った。その後の肺は一部を病理組織学的検討のため、10%ホルマリンに保存し、その他は-80°Cで保管した。
- B) 肺組織の病理標本作製し、気道炎症の程度を観察した。
- C) 気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、細胞分画を計測し、気道炎症の定量および炎症フェノタイプを解析した。
- D) 肺組織及び気管支肺胞洗浄液遠心後上清中の酸化ストレス酵素や炎症性サイトカインレベルを定量 PCR 法、ELISA 法を用いて解析した。
- E) 肺病理標本を用いて、気道上皮細胞の増殖細胞核抗原(PCNA)染色を行い、気道障害後の気道上皮修復過程について評価した。
- F) 塩素ガス曝露後マウスにグルタチオン合成阻害剤の腹腔内投与を行い、塩素ガス曝露後 48 時間の時点で気道過敏性測定を行った後、肺組織、気管支肺胞洗浄液を採取し、気道炎症の程度、炎症のフェノタイプ、およびグルタチオン合成阻害剤がマウス肺に及ぼす影響を評価した。
- G) 酸化酵素誘導天然化学物質の一つであるスルフォラファンに関して、培養した気道上皮細胞に次亜塩素酸とスルフォラファンを添加して酸化ストレス応答が誘導されることを確認した。
- H) 続いて、塩素ガス曝露後マウスにスルフォラファンの腹腔内投与を行い、塩素ガス曝露後 48 時間の時点で気道過敏性測定を行った後、肺組織、気管支肺胞洗浄液を採取し、気道炎症の程度、炎症のフェノタイプ、およびスルフォラファンがマウス肺に及ぼす影響を評価した。
- I) 塩素ガス曝露後の肺内の酸化酵素群の測定をマウス肺組織よりRNA抽出を行い、定量PCRにて行うことでスルフォラファンの影響を評価した。
- J) 塩素ガス曝露後の肺内のグルタチオン合成をグルタチオン合成阻害剤投与群やスルフォラファン投与群を用いて解析した。

研究成果

塩素ガス曝露 24 時間後では、気道過敏性の亢進や気道炎症の程度に Nrf2KO マウスと野生型マウスで差はみられなかったが、塩素ガス曝露 48 時間後では、Nrf2KO マウスの方が、気道過敏性の亢進と気道炎症のどちらも持続していたのに対し、野生型マウスではいずれも回復傾向が見られた。このことから、Nrf2 が欠損している場合、気道過敏性の亢進や気道炎症は遷延することがわかった。また、その際の酸化ストレス酵素の発現が、Nrf2 依存的なものと非依存的なものとで発現に差があり、それらが気道障害の遷延に関与している可能性が示唆された。次に、この塩素ガス誘導性酸化ストレス反応において、この反応に深く関わるグルタチオン合成経路をグルタチオン合成阻害剤にて抑制したり、逆に Nrf2 の核内移行を促進し、酸化酵素をより多く誘導するスルフォラファンにてグルタチオン合成を促進したりすることで Nrf2KO マウスにおいて酸化ストレス惹起後の気道障害が遷延するメカニズムを解明しようと試みるも、それぞれの系で気道炎症には影響を与える一方、気道過敏性の亢進には影響を与えられなかったことから、気道炎症と気道過敏性亢進の治療反応閾値には相違があることが示唆され、その解明は今後の課題となった。