

筑波大学

博士（医学）学位论文

転写因子 Nrf2 活性化を介した
難治性喘息へのアプローチ

2019

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

櫻井 啓文

| | |
|--|----|
| 略語 | 3 |
| 第一章 序論 | 5 |
| 1. 喘息の疾患概念 | |
| 2. 喘息の病態 | |
| 3. 喘息治療の主軸を担うステロイド | |
| 4. 難治性喘息の定義、治療 | |
| 5. 喫煙と喘息 | |
| 6. 酸化ストレス防御機構における Nrf2 | |
| 7. 酸化ストレスとステロイド抵抗性 | |
| 8. 慢性気道炎症の動物モデル | |
| 第二章 目的 | 13 |
| 第三章 研究方法 | 14 |
| 第四章 結果 | 20 |
| 1. アレルギー性気道炎症モデルマウスでは、タバコ煙曝露によりステロイド反応性が低下する | |
| 2. アレルギー性気道炎症モデルマウスでは、タバコ煙曝露により酸化ストレスと抗酸化ストレス因子が誘導される | |
| 3. タバコ煙曝露したアレルギー性気道炎症モデルマウスでは、スルフォラフェンによりステロイド抵抗性が改善する | |
| 4. タバコ煙曝露したアレルギー性気道炎症モデルマウスでは、スルフォラフェンにより Nrf2 と | |

Nrf2 依存性抗酸化ストレス遺伝子が誘導され、酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスが是正される

5. アレルギー性気道炎症モデルマウスでは、タバコ煙曝露により低下した HDAC2 発現量、活性はスルフォラフェン投与で回復する

| | |
|--------|----|
| 第五章 考察 | 25 |
| 謝辞 | 30 |
| 参考文献 | 31 |
| 図 | 37 |
| 出典 | 57 |
| 参考論文 | 58 |

略語

本論文において用いた略語を以下に示す。

8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

AP-1: activator protein-1

ARE: antioxidant response element

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GCLC: glutamate-cysteine ligase catalytic subunit

GCLM: glutamate-cysteine ligase modifier subunit

GLIZ: glucocorticoid-inducer leucine zipper

GR: glucocorticoid receptor

GRE: glucocorticoid response element

GSH: glutathione

GSSG: oxidized glutathione

HDAC2: histone deacetylase 2

HDM: house dust mite

HO-1: heme oxygenase-1

I κ B α : inhibitor of nuclear factor- κ B α

NF- κ B: nuclear factor- κ B

NQO1: NAD(P)H: quinone-oxidoreductase-1

Nrf2^{+/+}: wild-type

Nrf2^{-/-}: *Nrf2*-deficient

OVA: ovalbumin

p38MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase

qRT-PCR: quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

第一章 序論

1. 喘息の疾患概念

喘息の主病態は慢性気道炎症であり、臨床症状として反復する呼吸困難、咳や喘鳴で特徴づけられる疾患である。好酸球を主体とする炎症細胞、気道上皮細胞、平滑筋細胞などが遊離する炎症性メディエーター・サイトカインが気道炎症を惹起し、気道過敏性の亢進と気道狭窄をもたらされる。さらに持続する気道炎症によって、気道粘膜の線維化、平滑筋肥厚、粘膜下腺過形成などの気道リモデリングが誘導され、不可逆的な気流制限が生じる。

喘息の発症原因や増悪因子は多岐にわたり、その病像は実に多様である。したがって、喘息は、発作性の呼吸困難・喘鳴や咳、可逆性の気流制限、気道過敏性の亢進、アトピー素因、気道炎症の存在など、複合的な視点から診断される“疾患群”といえる。

2. 喘息の病態

喘息におけるアレルギー性気道炎症の成立には、活性化した好酸球やリンパ球など様々な炎症細胞が関与していると考えられている。アトピー型喘息では、マスト細胞、好酸球、マクロファージに結合した特異的 IgE 抗体とアレルゲンとが結合して架橋形成を生じ、細胞の活性化を介してヒスタミン、ロイコトリエン、各種サイトカインが遊離され、即時型喘息反応が起きる。さらに喘息の気道では IL-4、IL-5、IL-13 が増加しており[1]、これら Th2 サイトカインもアレルギー性気道炎症を惹起する。IL-5 は好酸球の骨髄での分化・増殖・気道への集簇・活性化、IL-4 は Th2 細胞の分化増殖、IgE 産生、血管内皮細胞の vascular cell adhesion

molecule-1 (VCAM-1)発現増強による好酸球の気道への遊走[2]、IL-13 は気道上皮の粘液細胞増生に関与することが知られている。また、喀痰中の好酸球比率は気流制限の程度や気道過敏性に関与し[3]、喀痰中の好酸球増加を伴う重症喘息では肺組織中の炎症細胞浸潤が好酸球増加を伴わない群よりも顕著で、上皮基底膜層も厚いことが報告されている[4]。つまり、喘息における気流制限や気道過敏性の亢進、気道モデリングには好酸球性気道炎症が大きく寄与していると考えられる。

一方、near-fatal 発作の症例や夜間喘息、難治性喘息患者の一部では誘発喀痰や気管支生検において好中球の増加を認め[5, 6]、好酸球だけでなく、好中球も気道炎症の成立に関与していることが報告されている。つまり、喘息は好酸球性気道炎症を特徴としているものの、リンパ球、好中球や各種サイトカインなど様々な因子が複合的に関与する heterogeneous な疾患である。病態生理学的表現型(エンドタイプ)が異なれば、臨床的表現型(フェノタイプ)も異なり、適切な治療・管理の方向性を決定するうえで、個々の喘息患者の病態を把握することが重要である。

3. 喘息治療の主軸を担うステロイド

喘息治療の目標は、気道炎症を誘導する因子の回避・除去や吸入ステロイド薬を中心とする治療によって、気道炎症の抑制、気流制限の改善、気道リモデリングの抑制を図り、喘息の症状を緩和し、重症化を防ぐことである。

喘息症状の軽減・消失、および呼吸機能の正常化とそれらの維持を図る薬剤が長期管理

薬(コントローラー)であり、長期管理薬使用中、または未治療の喘息患者が急性増悪、発作を発症した際に使用する薬剤が発作治療薬(リリーバー)である。喘息の長期管理薬としては、抗炎症作用を持つ吸入ステロイド薬、気管支拡張作用を持つ長時間作用性吸入 β_2 刺激薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬、発作治療薬としては短時間作用性吸入 β_2 刺激薬、副腎皮質ステロイドの静注薬、または経口薬などが用いられる。喘息は重症度によって4つの治療ステップに分類され、それらを参考にして患者への治療薬の種類、用量が決定される。

吸入ステロイドはすべての治療ステップにおける長期管理の主軸を担う薬剤である。ステロイドは糖質コルチコイド受容体(glucocorticoid receptor: GR)と複合体を形成し、核内へ移行することで抗炎症作用を発揮する。核内に移行したステロイド・GR 複合体は糖質コルチコイド応答配列(glucocorticoid response element: GRE)に結合し、アネキシン-1、inhibitor of nuclear factor- κ B α (I κ B α)、glucocorticoid-inducer leucine zipper (GLIZ)といった抗炎症性蛋白を誘導する。アネキシン-1 はリン脂質からのアラキドン酸遊離の抑制によってプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンの誘導を抑制し[7]、I κ B α 、GLIZ は炎症誘導に参与する転写因子である nuclear factor- κ B (NF- κ B)[8]や activator protein-1 (AP-1)[8, 9]を抑制することによって、抗炎症効果を発揮するといわれている[10-12]。また、ステロイド・GR 複合体は、DNA 上の GRE への結合を介してだけでなく、炎症性転写因子への直接的な結合、共通するコアクチベーターに対する競合、mRNA 合成に重要な RNA ポリメラーゼ II のリン酸化抑制[13]、histone deacetylase 2 (HDAC2)のリクルートによるクロマチン構造の凝縮[14]などによって、NF- κ B や AP-1 などの炎症性遺伝子の転写活性を抑制することが示唆されている。

4. 難治性喘息の定義、治療

多くの喘息患者は、吸入ステロイド薬や長時間作用性吸入 β_2 刺激薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬などの標準治療に対し良好な反応を示すが、5～10%程度の喘息患者ではこれらの治療に対し抵抗性を示すことが知られている[15, 16]。難治性喘息とは、高用量吸入ステロイド薬や長時間作用性 β_2 刺激薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬、テオフィリン徐放製剤といった複数のコントローラーに加え経口ステロイド薬の投与を要する喘息、またはこれらの治療でもコントロール不能な喘息と定義されている[17]。

重症・難治性喘息の危険因子としては、増悪の病歴[18]、血中・喀痰中の好酸球増多[19]、治療薬のアドヒアランス低下[20, 21]、肥満[22]、鼻炎の合併[23]、大気汚染[24]、ウイルス感染[25]などが報告されている。大気汚染物質としては、オゾンやディーゼル排気粒子、喫煙などが知られ、これらの物質から生じた活性酸素種[26, 27]が喘息の難治化に寄与すると考えられている[28, 29]。

高用量吸入ステロイド薬に加えて複数の吸入薬、内服薬を用いた治療によっても良好なコントロールが得られない重症例では、まず診断の正確性や吸入手技・アドヒアランスの確認を行い、喘息を悪化させる合併症や、喫煙やアレルゲンなどの増悪因子の管理を行う必要がある。しかし、それでも病勢コントロール不十分な状況では、経口ステロイド薬をリリーバーとして使用せざるをえない場合もある。最近では重症・難治性喘息に対する新たな治療として分子標的薬が開発され、抗 IgE 抗体や抗 IL-5 抗体の有用性が示されている[30-32]。

しかし、経口ステロイドの長期使用は副作用の問題もあり、また抗体製剤は高額なうえに効果が限定的であるなど、重症・難治性喘息に対する治療に関しては多くの課題が残されている。

5. 喫煙と喘息

欧米の報告によると、喘息患者の喫煙率は 17～35%といわれており、一般の喫煙率と同程度であることが報告されている[33]。タバコ煙には数千種類の化学物質や酸化ストレスの原因となる活性酸素種が含まれており、喫煙は喘息を重症化させることが指摘されている[28, 29]。成人患者では、喘息の悪化による入院や救急受診率は喫煙者に多くみられ[33]、なかには喘息死や致命的な経過を辿る例もあり[34]、喫煙は喘息患者の死亡率にも悪影響をもたらすとされる[35]。禁煙は喫煙喘息患者にとって重要な管理の1つであるが[36, 37]、禁煙することは簡単なことではない[38, 39]。喫煙喘息患者ではステロイドの効果が減弱することが報告され[40-42]、治療に難渋する例が多く、適切な治療法も確立していない[37, 43]。喫煙は増悪因子として多数の喘息患者に影響を与えている可能性があり、適切な対処、また治療の検証が必要である。

6. 酸化ストレス防御機構における Nrf2

Nrf2 はロイシンジッパー構造を伴った転写因子であり、マクロファージ中に多く含まれる[44]。Nrf2 は酸化ストレスの刺激を受けて核内に移行し、antioxidant response element

(ARE)に結合し、抗酸化ストレス遺伝子の発現を誘導することで酸化ストレスに対する防御機構の調節に関与している[45-47]。これまでの報告では、肺気腫[48, 49]、肺線維症[50, 51]、喫煙環境下でのインフルエンザ感染症悪化[52]など酸化ストレスが関与する病態において、Nrf2 がそれらの病態制御機構に重要な働きを担っていることが示唆されている。また Nrf2 が欠失した喘息モデルマウスでは、肺組織中の好酸球浸潤の増強や気管支肺胞洗浄液中の Th2 サイトカインの誘導が報告されており[53]、喘息の病態形成においても Nrf2 は重要な転写因子である可能性がある。

7. 酸化ストレスとステロイド抵抗性

酸化ストレス状態とは、内因性、外因性に生じた活性酸素種による生体への障害作用と処理・修復にはたらく抗酸化反応のバランスが崩れ、前者に傾いた状態のことを指す。活性酸素種は、喘息気道に浸潤した炎症細胞や[54, 55]、オゾンやディーゼル排気粒子などの大気汚染物質、タバコ煙などから発生することが報告されており[26, 27]、酸化ストレスは喘息の重症度や治療経過に多大な影響を及ぼすと推測される。

喘息はステロイドに対して良好な反応性を示す疾患ではあるが、一部の喘息患者は高用量の吸入ステロイドを用いても治療に難渋することが報告されており[56]、治療抵抗性のメカニズムを検証することは適切な治療を提供するために重要である。ステロイドへの治療抵抗性機序としては、GR の発現低下、GR のステロイドに対する親和性低下[57]、炎症性サイトカインによる GR β 発現の誘導、p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)による GRリ

ン酸化に伴う GR の核内移行の阻害、GRE に対する結合能抑制[13, 58-62]、HDAC2 活性の低下[63]、炎症性転写因子(NF- κ B、AP-1)の過剰発現[64]などがいわれている。GR は、GR α と GR β の 2 種類のアイソフォームが存在し、GR α は GRE に結合し抗炎症性遺伝子の誘導を活性化するが、GR β は GR α に対して抑制的に作用するといわれている[13, 59]。

酸化ストレスによるステロイド抵抗性獲得機序の一つに、タバコ煙曝露によって誘導される好中球性気道炎症、GR β 増加が指摘されており[33, 65-67]、好中球性炎症を誘導する IL-17 も GR β 増加に関与していることが示唆されている[68]。また、酸化ストレスによって生じた peroxynitrite が HDAC2 活性を低下させ、HDAC2 による炎症性標的遺伝子の転写活性抑制作用を阻害することも重要な機序として指摘されている[63, 69] (Fig. 1)。さらに、GR β は GR α に対して抑制的に作用するだけでなく、HDAC2 のプロモーター活性を抑制し、HDAC2 の発現レベルをコントロールすることも報告されている[70]。

8. 慢性気道炎症の動物モデル

病態の理解や新規薬剤の効果を評価するためには動物を用いた実験が必要である。喘息の実験動物としては主にマウスが用いられ、Th2 系免疫反応を誘導しやすい BALB/c マウスを用いた報告が多い。鶏卵から抽出された ovalbumin (OVA)や house dust mite (HDM) でマウスを感作・曝露すると、アレルギー性気道炎症が誘導されることが分かっている[71, 72]。1 か月程度の期間で感作、曝露を行うと、マウスの気道に好酸球性炎症が誘導され、気道過敏性や気流制限がみられるようになる[73]。また、長期にわたって曝露を継続すると、

喘息患者の気道で見られる気道上皮下の線維化、粘膜下腺過形成、平滑筋肥厚など気道リモデリングと呼ばれる組織学的変化[74]も再現することが可能である[75-77]。

タバコ煙曝露モデルについても国内外で多くの報告があるが、我々の研究室では、タバコ煙を一定期間曝露することで、慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease ; COPD)の患者で見られる肺気腫が誘導されることを確認している[49, 52]。本研究では、過去の報告[52]を参考にタバコ煙曝露を行った。

第二章 目的

酸化ストレスは喘息の重症・難治化に関与する可能性が指摘されているが、詳細なメカニズムは不明である。酸化ストレスに起因する炎症に対し、抗酸化因子の転写調節因子である Nrf2 は重要な働きを担っている可能性が推察されることから、アレルギー性気道炎症モデルマウスを用い、喘息への喫煙の影響を評価するとともに Nrf2 の役割について解析する。また、Nrf2 活性化剤として知られるスルフォラフェンを用いて、難治性喘息に対して Nrf2 が治療標的となり得るかを検証する。

第三章 研究方法

マウスと実験計画

野生型(*Nrf2*^{+/+}) BALB/c 系マウスを日本チャールズ・リバー(Kanagawa, Japan)より購入し、*Nrf2* 欠損(*Nrf2*^{-/-}) BALB/c 系マウスは過去の文献をもとに作製した[46, 78]。本研究には、特定病原体除去環境下で飼育した8~12週齢の雌マウスを用いた。本研究は、筑波大学の動物実験倫理規定を遵守して行った。

抗原特異的気道炎症を誘導するため、*Nrf2*^{+/+}、*Nrf2*^{-/-}マウスに対して、アルミニウムをアジュバントとして用いて day 0 と day 14 に 100 µg の OVA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を皮下感作し、day 28 に 10 µg の OVA を経鼻曝露した。OVA 感作・曝露マウスに対して、タバコ煙曝露群には 1 日 10 本(Hi-lite; Japan Tobacco Inc., Tokyo, Japan)のタバコ煙曝露を day 26 から 4 日間連続で行った。タバコ煙曝露は密閉可能なプラスチック容器(7.5L)を用い、タバコ 1 本あたり 7 分を 1 サイクルとし(3.5 分; タバコ煙曝露 + 酸素 3 L/min 併用, 2.0 分; タバコ煙曝露のみ, 1.5 分; 容器内換気)、10 サイクル曝露した(Fig. 2)。ステロイド治療群には 2.5 mg/kg のデキサメサゾン を day 29 に腹腔投与し、スルフォラフェン治療群には 12.5 mg/kg のスルフォラフェン(LKT Laboratories Inc., St. Paul, MN)を day 26 から 4 日間連続で腹腔投与した。OVA 曝露 48 時間後のマウスを用いて実験を行った(Fig. 3)。

気管支肺胞洗淨液による評価

OVA 曝露 48 時間後のマウスに対して麻酔を行い、気管挿管後、1 ml の生理食塩水を注入、回収し、これを 5 回繰り返した。血球計算盤を用いて全細胞数を計測し、サイトスピン標本を Diff-Quik (American Scientific Products, McGaw Park, IL) で染色し細胞分画の比率を算定した。

気道過敏性試験

OVA 曝露 48 時間後のマウスに麻酔を行い、気管挿管を行った後に呼吸・肺機能評価システム(Fine-Pointe; Buxco, Wilmington, NC)に接続した。さまざまな濃度 (0, 3.1, 6.3, 12.5, 25 mg/ml) のメサコリンを段階的に噴霧化して投与し、各濃度における最大気道抵抗値を記録した。

免疫組織学的評価

OVA 曝露 48 時間後に肺を摘出し、ホルマリン固定後にパラフィン包埋した。免疫組織学的検討のため、切片を脱パラフィン処理・再水和し、DNA 酸化損傷マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) について Universal Immuno-enzyme Polymer method (Histofine Simple Stain Kit; Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて染色を行った。8-OHdG 抗体(Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan)は 100 μ g/ml の濃度で用いた。3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride で発色し、Myer's hematoxylin で対比染色した。ネガティブコントロールとしては nonimmune mouse IgG を用いた。

定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(Quantitative reverse transcription-Polymerase Chain

Reaction; qRT-PCR)による評価

OVA 曝露 48 時間後のマウスより抽出した肺組織から RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)を用いて total RNA を抽出した。total RNA については、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)にて逆転写反応を行い、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Tokyo, Japan)および及び各種プライマーを用いて Nrf2、NAD(P)H: quinone-oxidoreductase-1 (NQO1)、glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)、glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM)、heme oxygenase-1 (HO-1)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の mRNA 発現レベルを評価した (ABI 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystems, Foster City, CA)。結果の解析は比較 Ct 法による相対定量により行った。コントロール遺伝子として GAPDH を用いて、得られた結果を標準化した。

本研究に用いた PCR primer を以下に示す。

Nrf2: 5'-CTTCCATTTACGGAGACCC-3', 5'-GAGCACTGTGCCCTTGAGC-3'

NQO1: 5'-AGCCAATCAGCGTTCGGTA-3', 5'-GAATGGGCCAGTACAATCAGG-3'

GCLC: 5'-GCACATCTACCACGCAGTCA-3', 5'-GAACATCGCCTCCATTTCAGT-3'

GCLM: 5'-ACCGGGAACCTGCTCAACT-3', 5'-GCTGATTTGGGAACTCCATT-3'

HO-1: 5'-GAATGAACACTCTGGAGATGACAC-3',

5'-TGTGAGGGACTCTGGTCTTTG-3'

GAPDH: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3', 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'

ウエスタンブロット

OVA 曝露 48 時間後のマウスより摘出した肺組織を COMPLETE solution (Roche, Basel, Switzerland)に浸し、ホモジェナイザーを用いて破碎した。破碎した肺組織の上清を肺破碎抽出液とした。また、nuclear extraction kit (Invent Biotechnologies, Inc., Plymouth City, MN)を用いて核抽出を行った。Nrf2 は核抽出液を、HDAC2 は肺組織の肺破碎抽出液を用いて検出を行った。核抽出液、肺破碎抽出液はそれぞれ 30 μ g 相当を用いて SDS-PAGE 後、polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane に転写した。PVDF membrane はブロッキングした後、一次抗体である anti-Nrf2 抗体(H-300; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、または anti-HDAC2 抗体(C-8; Santa Cruz Biotechnology)と 4 °C 下 overnight でインキュベートし、IRDye[®] 680RD donkey anti-rabbit IgG (LICOR Biosciences, Lincoln, NE)、または IRDye[®] 680RD donkey anti-mouse IgG (LI-COR Biosciences)で蛍光標識した。Nrf2 と HDAC2 の発現量はそれぞれ Lamin B、 β -actin で補正し、LI-COR Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences)を用いて解析した。

蛍光免疫染色

気管支肺胞洗浄液のサイトスピン標本を、4 %パラホルムアルデヒドを用いて15分間固定、0.3 %過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、抗ヤギ血清 (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)を用いてブロッキングした。一次抗体である抗 Nrf2 抗体 (H-300, 1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) と4 °C 下 overnight でインキュベートし、goat anti-Rabbit DyLight® 488-conjugated secondary antibody (ab96883, 1:100 dilution; Abcam, Cambridge, England) で蛍光標識した。さらに ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (P36941, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)で核染色し、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence, Osaka, Japan)を用いて解析した。10~20 視野 (10~25 細胞/視野) を観察し、核内の平均蛍光染色濃度を算出した。

還元型グルタチオン(*glutathione*; GSH)/酸化型グルタチオン(*oxidized glutathione*; GSSG)比 定量化

GSH と GSSG の比は酸化ストレスの指標としてしばしば用いられるため[79]、肺組織中の GSH と GSSG の濃度を GSSG/GSH Quantification Kit (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto) を用いて測定した。

***Histone deacetylase (HDAC)2* 活性評価**

肺破碎抽出液(500 µg protein)を Dynabeads® (Thermo Fisher Scientific)、抗 HDAC2 抗体 (sc-9959, Santa Cruz Biotechnology)とともに培養し、免疫沈降法で HDAC2 を抽出した。抽

出した HDAC2 の活性は Color de Lys[®] HDAC colorimetric activity assay kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY)を用いて測定した。

統計学的評価

IBM Statistical Package for Social Science (SPSS) version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY)を用いて統計学的評価を行った。データは平均値と標準誤差を用いて表示した。各群の比較は one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて評価した。二群間検討として t 検定を行った。データが正規分布に従わない場合、ノンパラメトリック検定として Kruskal-Wallis、Mann-Whitney U 検定をそれぞれに行った。気道過敏性試験は repeated-measures ANOVA を用いて検討した。 $p < 0.05$ を統計学的な有意差と判定した。

第四章 結果

1. アレルギー性気道炎症モデルマウスでは、タバコ煙曝露によりステロイド反応性が低下する

ステロイドは喘息治療にとって重要な役割を担っている。そこで、アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるデキサメサゾンの効果を評価した(Fig. 4)。まず、OVA で感作・曝露した *Nrf2*^{+/+}マウスの気道炎症の程度と気道過敏性を解析した。OVA 曝露によって気管支肺胞洗浄液中の好酸球数の増加、気道過敏性の亢進を認めたが、OVA 曝露 24 時間後にデキサメサゾンを投与すると洗浄液中の好酸球数、気道過敏性ともに抑制された。

次に、タバコ煙曝露が OVA で感作・曝露した *Nrf2*^{+/+}マウスの気道炎症に対してどのような影響があるか評価した。OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウスにタバコ煙を曝露すると、ステロイドによる気管支肺胞洗浄液中の好酸球数、気道過敏性の抑制効果はみられなくなった。

2. アレルギー性気道炎症モデルマウスでは、タバコ煙曝露により酸化ストレスと抗酸化ストレス因子が誘導される

アレルギー性気道炎症モデルマウスにおいて、タバコ煙曝露が酸化ストレスと抗酸化反応に与える影響を評価した。OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウスに対してタバコ煙を曝露することにより、DNA 損傷の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の発現が肺胞マクロファージを中心に増強した(Fig. 5A)。また、*Nrf2* やその標的遺伝子である HO-1、GCLM の mRNA の発現レベルも、タバコ煙曝露によって有意に上昇した(Fig. 5B)。

次に、タバコ煙曝露による Nrf2 の核内移行への影響を評価した。OVA 感作・曝露マウスにタバコ煙を曝露した群と曝露しない群の肺組織の核抽出液を用いたウエスタンブロットでは、タバコ煙曝露群で Nrf2 の核内移行が増加している様子がみられた(Fig. 6A, B)。気管支肺胞洗浄液を用いた蛍光免疫染色でも、タバコ煙を曝露することにより、肺胞マクロファージを中心に Nrf2 の核内発現が増強していた(Fig. 6C, D)。

タバコ煙曝露によって酸化ストレス反応、抗酸化ストレス反応の両者が誘導されたため、酸化ストレスと抗酸化ストレスのバランスについても解析した。GSH は活性酸素に対する酸化物質として働き、そのプロセスにおいて酸化型グルタチオンである GSSG に変換される。そのため GSH/GSSG 比は酸化ストレスの評価指標として使用されている。OVA 感作・曝露マウスにタバコ煙を曝露した群と曝露しない群とを比較すると、タバコ煙曝露群において GSH/GSSG 比の有意な低下が認められたことより、タバコ煙曝露群では酸化ストレスが上回っていることが示唆された(Fig. 7)。

3. タバコ煙曝露したアレルギー性気道炎症モデルマウスでは、スルフォラフェンによりステロイド抵抗性が改善する

タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウスのステロイド反応性が低下していたことから、酸化ストレス/抗酸化ストレス不均衡がステロイド抵抗性の要因ではないかと考えた。この仮説を検証するため、タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウスに対し、Nrf2 活性化剤として知られるスルフォラフェンを投与し、その効果を評価した。スルフォラフェン単

独投与では、同マウスにおける好酸球性気道炎症と気道過敏性亢進の改善は認められなかったが、スルフォラフェンとデキサメサゾンとを併用することにより、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数の有意な減少、気道過敏性の有意な改善がみられた(Fig. 8A, B)。

一方、タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{-/-} マウスでは、スルフォラフェンとデキサメサゾンを併用しても好酸球性気道炎症、気道過敏性は改善しなかった(Fig. 8A, C)。これらの結果より、タバコ煙曝露により誘導されたアレルギー性気道炎症のステロイド抵抗性はスルフォラフェンによる *Nrf2* 活性化を介して改善することが示唆された。

4. タバコ煙曝露したアレルギー性気道炎症モデルマウスでは、スルフォラフェンにより *Nrf2* と *Nrf2* 依存性抗酸化ストレス遺伝子が誘導され、酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスが是正される

Nrf2 活性に対するスルフォラフェンの効果を検証するため、*Nrf2* と *Nrf2* の下流遺伝子の発現を評価した。Fig. 9 に示すように、タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+} マウスでは、スルフォラフェンの投与によって *Nrf2* と HO-1、GCLC の mRNA 発現レベルの増加がみられたが、*Nrf2*^{-/-} マウスではそれらの変化は認められなかった。

次に、スルフォラフェンによる *Nrf2* の核内移行への影響について評価した。タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露マウスにスルフォラフェンを投与する群と投与しない群の肺組織の核抽出液を用いたウエスタンブロットでは、スルフォラフェン投与群で *Nrf2* の核内移行が増加している様子がみられた(Fig. 10A, B)。気管支肺胞洗浄液を用いた蛍光免疫染色でも、スル

フオラフェンを投与することにより、肺胞マクロファージを中心に Nrf2 の核内発現が増強していた(Fig. 10C, D)。

さらに、酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスに対するスルフォラフェンの効果に関して検証した。タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウス、*Nrf2*^{-/-}マウスにおいて、スルフォラフェンを投与する群と投与しない群とで GSH、GSSG、GSH/GSSG 比を解析した。*Nrf2*^{+/+}マウスで両群を比較すると、スルフォラフェン投与群において GSH/GSSG 比の有意な増加が認められたが(Fig. 11A)、*Nrf2*^{-/-}マウスではそのような変化は認められなかった(Fig. 11B)。以上より、*Nrf2*^{+/+}アレルギー性気道炎症モデルマウスではタバコ煙曝露により酸化ストレスが誘導されるものの、スルフォラフェンの投与によって酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスが是正され、酸化ストレス状態が緩和することが示唆された。

5. アレルギー性気道炎症モデルマウスでは、タバコ煙曝露により低下した HDAC2 発現量、活性はスルフォラフェン投与で回復する

ヒストンアセチル化の修飾を通して酸化ストレスはステロイド反応性を低下させることが最近の報告で示されている[63]。そこで、ヒストンアセチル化を抑制する HDAC2 の発現量、HDAC2 活性に対するスルフォラフェンの効果を検証した。OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{-/-}マウスの肺組織中の HDAC2 発現量、HDAC2 活性は、*Nrf2*^{+/+}マウスと比較し低下していた。また、OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウスでは、タバコ煙曝露によって肺組織中の HDAC2 発現量、

HDAC2 活性は有意に低下したものの、スルフォラフェン投与によって回復した。一方、*Nrf2*^{-/-}マウスにおいてはそれらの変化は認められなかった(Fig. 12A-C)。

第五章 考察

喘息のなかには、治療に難渋する患者が頻度は多くないものの確かに存在し[15, 16]、仕事や学業をはじめとする日常生活に制限を生じるほか、多額の喘息関連医療費がかかるなど大きな問題を抱えている[80]。吸入ステロイドによって多くの喘息患者の症状がコントロールされるようになった今、残された課題はいかにステロイド抵抗性の気道炎症病態を制御するかである。序論で述べたように、喘息では、好酸球、リンパ球、好中球、マクロファージ、肥満細胞などの炎症細胞のほか、気道構成細胞やそれらの細胞から放出される各種メディエーター、さらには外界からの様々な刺激が関与し、気道炎症が成立している。つまり、個々の病態によって様々な症状、重症度、治療反応性もたらされ、その多様な表現型の存在が治療を複雑にしている。重症喘息に対しては、ステロイドによって非特異的に炎症全般を抑制するだけでなく、個々の重症化要因を明らかにしたうえで、それに対する標的治療を模索する必要がある。喘息の重症・難治化には様々な原因が関与していると報告されているが[17, 81]、我々はその中でとくに喫煙による影響に着目した。

喫煙が喘息の重症・難治化の一要因であることは数多くの臨床研究から明らかであるが[17, 28, 29, 33, 82, 83]、喫煙がどのように気道炎症を修飾するか詳細に検討した研究は多くない。気道炎症のフェノタイプを解析した研究では、喫煙喘息患者では非喫煙喘息患者と比較して喀痰中の総細胞数[65]や好中球数は多く[38, 39, 65, 84, 85]、好酸球数は少ない[41, 65, 82, 84]という報告がある一方で、好酸球数は変化しないとする報告[85]もある。また、喘息の生理学的指標である気道過敏性についても、喫煙喘息患者では非喫煙喘息患者と比

較して亢進している[84]という報告や、変化がないとする報告[41, 65]など様々である。

そこで今回、我々はアレルギー性気道炎症モデルマウスを用いて、喫煙が気道炎症の増悪にどのように寄与するか検証した。*Nrf2*^{+/+}アレルギー性気道炎症モデルマウスでは、タバコ煙曝露によって気道炎症や気道過敏性試験に変化は認めなかった。次に、アレルギー性気道炎症モデルマウスにおける酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスを検証したところ、*Nrf2*^{+/+}マウスでは、タバコ煙曝露によりDNA損傷の酸化ストレスマーカーである8-OHdGの発現が増強し、酸化ストレスが誘導され、さらには*Nrf2*やその標的遺伝子であるHO-1、GCLMのmRNA発現が増強し、抗酸化ストレス反応も誘導されていることがわかった。さらに肺組織を用いて酸化ストレスマーカーであるGSH/GSSG比を解析すると、タバコ煙曝露によりGSH/GSSG比の低下がみられた。これらの結果から、喫煙は酸化ストレス、抗酸化ストレスの両者を誘導し、酸化ストレス/抗酸化ストレスの不均衡を促すことが示唆された。

喘息の難治化には、気道炎症の増悪のほか、ステロイドをはじめとする治療薬への不応性も大きく関与することが指摘されている。事実、これまでの臨床研究で、喫煙している喘息患者ではステロイドへの反応性が低下していることが報告されている[33, 41, 84, 86]。我々は、喫煙によるステロイド抵抗性獲得機序を検討するため、アレルギー性気道炎症モデルマウスを用いて、タバコ煙曝露によってステロイド抵抗性気道炎症が誘導されるか検証した。OVA感作・曝露*Nrf2*^{+/+}マウスでは気道炎症や気道過敏性はステロイドによって抑制されたが、タバコ煙曝露下ではステロイドによる抗炎症効果はみられなかった。このことより、タバコ煙曝露によってステロイド反応性の低下が誘導されることが確認された。

喫煙によるステロイド抵抗性獲得には様々な要因が推察されているが、なかでも好中球性気道炎症の誘導[33, 66]、GR β の発現増加[67]、HDAC2活性の低下[69]などが重要である。HDAC2活性の低下には酸化ストレスが寄与しており、酸化ストレスによって生じたperoxynitriteが、HDAC2のチロシン残基をニトロ化修飾し、さらにニトロ化されたHDAC2がユビキチン化を誘導しプロテアソームによって分解されることによって、HDAC2の活性や発現が低下するとされている[63, 69, 87]。我々の検討では、*Nrf2*^{+/+}タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスでは好中球性気道炎症は顕著ではなく、またGR β の発現増加もみられなかった(unpublished data)。一方で、ステロイド抵抗性気道炎症が誘導されたことから、ステロイド抵抗性の獲得機序として酸化ストレス/抗酸化ストレスの不均衡、それに引き続くHDAC2活性の低下が重要だと考えた。

これまでの検討では、ヒト単球細胞株にタバコ抽出液あるいは活性酸素種を作用させると、同細胞におけるHDAC2活性は低下するものの、ポリフェノールの一種であるクルクミンを投与することでHDAC2活性およびステロイド反応性が回復することが報告されている[88, 89]。同様に、COPD患者の肺胞マクロファージでも、酸化ストレスによってHDAC2活性が低下しているが、テオフィリン投与によりHDAC2活性とともにステロイド反応性が回復することが示されている[88, 89]。また、動物モデルにおいても、タバコ煙を曝露したラットの肺組織ではHDAC2活性の低下がみられるが、カルボシステイン投与によりHDAC2活性が亢進し、ステロイド反応性が誘導されることがわかっている[90]。これらのいずれの検討も喫煙に起因する酸化ストレスとHDAC活性低下、ステロイド不応性炎症との関連を検証したものである

が、興味深いのは、クルクミンやカルボシステインによる抗酸化ストレス作用は Nrf2 の活性化を介する可能性が他の研究グループによって指摘されている点である[91, 92]。Nrf2 活性化とステロイド抵抗性気道炎症との直接的な関連を示した報告がこれまでにないことから、我々は、タバコ煙曝露によって誘導されたステロイド抵抗性気道炎症が、Nrf2 活性化によって改善し得るか検討した。スルフォラフェンはブロッコリースプラウトなどに多く含まれているイソチオシアネートの一種であり、自然界に存在する Nrf2 活性化剤である[93]。過去の検討では、喘息モデルマウスにスルフォラフェンを投与すると好酸球性気道炎症、気道過敏性の改善、Th2 サイトカインの減少がみられたと報告されている[94]。ところが、我々の検討では *Nrf2*^{+/+}タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにスルフォラフェンを単独投与しても、気道炎症の抑制効果はみられなかった。しかし、同マウスにスルフォラフェンとステロイドを併用したところ、気道炎症と気道過敏性は改善した。さらに、Nrf2 と Nrf2 依存性抗酸化ストレス遺伝子を誘導し、GSH/GSSG 比を増加させたことから、スルフォラフェンは Nrf2 活性化を介して酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスを是正し気道炎症のステロイド感受性を上げることで抗炎症作用を発揮したと考えられた。HDAC2 活性についての解析でも、*Nrf2*^{+/+}アレルギー性気道炎症モデルマウスにタバコ煙を曝露すると、肺組織での HDAC2 活性は低下し、スルフォラフェンの投与によってその活性が回復することが確認されたが、*Nrf2*^{-/-}マウスではこのような変化は認められなかった。つまり、HDAC2 活性化によるステロイド反応性回復機序には Nrf2 活性化が寄与することが推察される。

今回我々は、喫煙によって酸化ストレス/抗酸化ストレスの不均衡が生じ酸化ストレスが優位になると、アレルギー性気道炎症は増強し、肺組織での HDAC2 の発現や活性低下を介してステロイド抵抗性が誘導されることを明らかにした。さらに、スルフォラフェンは Nrf2 活性化を介して HDAC2 の発現や活性を高め、ステロイド反応性を回復させることを示した。これらの成果は、抗酸化反応を調節するとされる転写因子 Nrf2 が難治性喘息に対する新たな治療標的分子となり得る可能性があることを示唆している。

謝辞

本研究にあたり終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学大学院呼吸器内科
檜澤伸之教授に深い謝意を表します。

適切な御指導と御示唆をいただきました筑波大学医学医療系森島祐子准教授に深く感謝
いたします。

研究その他多方面にわたり御指導いただきました筑波大学附属病院土浦市地域臨床教
育ステーション石井幸雄教授に深く感謝いたします。

日々の研究において様々な御協力、御教示をいただきました、佐藤浩昭教授、坂本透病
院教授、川口未央講師、松野洋輔講師、際本拓未講師、小川良子講師、増子裕典講師、中
澤健介講師、塩澤利博病院講師、松山政史病院講師、角田義弥医学士、金澤潤医学士、
中嶋真之医学士、吉田和史医学士、中村明代技官に深く感謝いたします。

最後に、日々の研究、診療を続けていく上で、常に心の支えとなり、温かく励まし続けてく
れた家族に感謝したいと思います。

参考文献

1. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. New England Journal of Medicine, 1992. **326**(5): p. 298-304.
2. Fukuda, T., et al., *Role of interleukin-4 and vascular cell adhesion molecule-1 in selective eosinophil migration into the airways in allergic asthma*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 1996. **14**(1): p. 84-94.
3. Woodruff, P.G., et al., *Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001. **108**(5): p. 753-758.
4. Wenzel, S.E., et al., *Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics*. American journal of respiratory and critical care medicine, 1999. **160**(3): p. 1001-1008.
5. Sur, S., et al., *Sudden-onset fatal asthma: a distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa?* American Review of Respiratory Disease, 1993. **148**(3): p. 713-719.
6. Jatakanon, A., et al., *Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma*. American journal of respiratory and critical care medicine, 1999. **160**(5): p. 1532-1539.
7. Lim, L.H. and S. Pervaiz, *Annexin 1: the new face of an old molecule*. Faseb j, 2007. **21**(4): p. 968-75.
8. Barnes, P.J., *Transcription factors in airway diseases*. Laboratory Investigation, 2006. **86**(9): p. 867.
9. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, *The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression*. Endocr Rev, 2003. **24**(4): p. 488-522.
10. Scheinman, R.I., et al., *Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids*. Science, 1995. **270**(5234): p. 283-6.
11. Auphan, N., et al., *Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis*. Science, 1995. **270**(5234): p. 286-90.
12. Mittelstadt, P.R. and J.D. Ashwell, *Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29603-10.
13. Ito, K., K.F. Chung, and I.M. Adcock, *Update on glucocorticoid action and resistance*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006. **117**(3): p. 522-543.
14. Ito, K., et al., *Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression*. J Exp Med, 2006. **203**(1): p. 7-13.
15. Antonicelli, L., et al., *Asthma severity and medical resource utilisation*. European Respiratory Journal, 2004. **23**(5): p. 723-729.
16. Godard, P., et al., *Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study*.

- European Respiratory Journal, 2002. **19**(1): p. 61-67.
17. Chung, K.F., et al., *International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma*. Eur Respir J, 2014. **43**(2): p. 343-73.
 18. Miller, M.K., et al., *Recent asthma exacerbations: a key predictor of future exacerbations*. Respiratory medicine, 2007. **101**(3): p. 481-489.
 19. Belda, J., et al., *Mild exacerbations and eosinophilic inflammation in patients with stable, well-controlled asthma after 1 year of follow-up*. CHEST Journal, 2001. **119**(4): p. 1011-1017.
 20. Jentzsch, N.S., et al., *Adherence rate to beclomethasone dipropionate and the level of asthma control*. Respiratory medicine, 2012. **106**(3): p. 338-343.
 21. Marceau, C., et al., *Persistence, adherence, and effectiveness of combination therapy among adult patients with asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006. **118**(3): p. 574-581.
 22. Fitzpatrick, S., R. Joks, and J. Silverberg, *Obesity is associated with increased asthma severity and exacerbations, and increased serum immunoglobulin E in inner - city adults*. Clinical & Experimental Allergy, 2012. **42**(5): p. 747-759.
 23. Ohta, K., et al., *Prevalence and impact of rhinitis in asthma. SACRA, a cross - sectional nation - wide study in Japan*. Allergy, 2011. **66**(10): p. 1287-1295.
 24. Nel, A.E., et al., *Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1998. **102**(4): p. 539-554.
 25. Jackson, D.J., et al., *Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011. **128**(6): p. 1165-1174.
 26. Pryor, W.A., D.G. Prier, and D.F. Church, *Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar*. Environmental health perspectives, 1983. **47**: p. 345.
 27. Comhair, S.A. and S.C. Erzurum, *Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities*. Antioxidants & redox signaling, 2010. **12**(1): p. 93-124.
 28. Althuis, M.D., M. Sexton, and D. Prybylski, *Cigarette smoking and asthma symptom severity among adult asthmatics*. Journal of Asthma, 1999. **36**(3): p. 257-264.
 29. Siroux, V., et al., *Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma*. European Respiratory Journal, 2000. **15**(3): p. 470-477.
 30. Busse, W., et al., *Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma*. Journal of allergy and clinical immunology, 2001. **108**(2): p. 184-190.
 31. Ortega, H.G., et al., *Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(13): p. 1198-1207.
 32. Bel, E.H., et al., *Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma*. New

- England journal of medicine, 2014. **371**(13): p. 1189-1197.
33. Thomson, N., R. Chaudhuri, and E. Livingston, *Asthma and cigarette smoking*. European respiratory journal, 2004. **24**(5): p. 822-833.
 34. Mitchell, I., et al., *Near-fatal asthma: a population-based study of risk factors*. Chest, 2002. **121**(5): p. 1407-1413.
 35. Marquette, C.H., et al., *Long-term prognosis of near-fatal asthma: a 6-year follow-up study of 145 asthmatic patients who underwent mechanical ventilation for a near-fatal attack of asthma*. American Review of Respiratory Disease, 1992. **146**(1): p. 76-81.
 36. Chaudhuri, R., et al., *Effects of smoking cessation on lung function and airway inflammation in smokers with asthma*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2006. **174**(2): p. 127-133.
 37. Polosa, R., P. Caponnetto, and M.F. Sands, *Caring for the smoking asthmatic patient*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012. **130**(5): p. 1221-1224.
 38. Avallone, K.M., et al., *Asthma and its relation to smoking behavior and cessation motives among adult daily smokers*. Journal of health psychology, 2013. **18**(6): p. 788-799.
 39. Spears, M., et al., *Challenges of treating asthma in people who smoke*. Expert review of clinical immunology, 2010. **6**(2): p. 257-268.
 40. Kerstjens, H., et al., *Airways hyperresponsiveness, bronchodilator response, allergy and smoking predict improvement in FEV1 during long-term inhaled corticosteroid treatment. Dutch CNSLD Study Group*. European Respiratory Journal, 1993. **6**(6): p. 868-876.
 41. Chalmers, G., et al., *Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma*. Thorax, 2002. **57**(3): p. 226-230.
 42. Chaudhuri, R., et al., *Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2003. **168**(11): p. 1308-1311.
 43. Polosa, R. and N.C. Thomson, *Smoking and asthma: dangerous liaisons*. European respiratory journal, 2013. **41**(3): p. 716-726.
 44. Ishii, Y., et al., *Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(10): p. 6968-6975.
 45. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes & development, 1999. **13**(1): p. 76-86.
 46. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochemical and biophysical research communications, 1997. **236**(2): p. 313-322.
 47. Ishii, T., et al., *Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(21): p.

- 16023-16029.
48. Rangasamy, T., et al., *Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(9): p. 1248.
 49. Iizuka, T., et al., *Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema*. Genes Cells, 2005. **10**(12): p. 1113-25.
 50. Cho, H.-Y., et al., *The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis*. The FASEB journal, 2004. **18**(11): p. 1258-1260.
 51. Kikuchi, N., et al., *Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance*. Respiratory research, 2010. **11**(1): p. 31.
 52. Yageta, Y., et al., *Role of Nrf2 in host defense against influenza virus in cigarette smoke-exposed mice*. Journal of virology, 2011. **85**(10): p. 4679-4690.
 53. Rangasamy, T., et al., *Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **202**(1): p. 47-59.
 54. Barnes, P.J., *Reactive oxygen species and airway inflammation*. Free Radical Biology and Medicine, 1990. **9**(3): p. 235-243.
 55. Frigas, E. and G. Gleich, *The eosinophil and the pathophysiology of asthma*. Journal of allergy and clinical immunology, 1986. **77**(4): p. 527-537.
 56. Barnes, P.J. and A.J. Woolcock, *Difficult asthma*. Eur Respir J, 1998. **12**(5): p. 1209-18.
 57. Sher, E.R., et al., *Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 33-9.
 58. Leung, D.Y., et al., *Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1567-74.
 59. Tliba, O., J.A. Cidlowski, and Y. Amrani, *CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by a mechanism involving the up-regulation of the glucocorticoid receptor beta isoform*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(2): p. 588-96.
 60. Vazquez-Tello, A., et al., *Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(9): p. 1312-22.
 61. Goleva, E., et al., *Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(6): p. 607-16.
 62. Adcock, I.M., et al., *Overcoming steroid unresponsiveness in airways disease*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 4): p. 824-9.
 63. Barnes, P.J., *Histone deacetylase-2 and airway disease*. Ther Adv Respir Dis, 2009. **3**(5): p. 235-43.
 64. Van Bogaert, T., K. De Bosscher, and C. Libert, *Crosstalk between TNF and glucocorticoid receptor signaling pathways*. Cytokine & growth factor reviews, 2010. **21**(4): p. 275-286.
 65. Chalmers, G.W., et al., *Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma*. Chest, 2001. **120**(6): p. 1917-22.

66. Green, R., et al., *Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids*. Thorax, 2002. **57**(10): p. 875-879.
67. Sousa, A.R., et al., *Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor β -isoform*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2000. **105**(5): p. 943-950.
68. Chesne, J., et al., *IL-17 in severe asthma. Where do we stand?* Am J Respir Crit Care Med, 2014. **190**(10): p. 1094-101.
69. Ito, K., et al., *Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. **315**(1): p. 240-245.
70. Li, L.B., et al., *Inhibition of histone deacetylase 2 expression by elevated glucocorticoid receptor beta in steroid-resistant asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(7): p. 877-83.
71. Kumar, R.K., C. Herbert, and P.S. Foster, *The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice*. Current drug targets, 2008. **9**(6): p. 485-494.
72. Johnson, J.R., et al., *Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2004. **169**(3): p. 378-385.
73. Tomkinson, A., et al., *A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4-and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(9): p. 5792-5800.
74. Bousquet, J., et al., *Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2000. **161**(5): p. 1720-1745.
75. Temelkovski, J., et al., *An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen*. Thorax, 1998. **53**(10): p. 849-856.
76. Leigh, R., et al., *Dysfunction and remodeling of the mouse airway persist after resolution of acute allergen-induced airway inflammation*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2002. **27**(5): p. 526-535.
77. Kiwamoto, T., et al., *Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2006. **174**(2): p. 142-151.
78. Mochizuki, M., et al., *Role of 15-deoxy delta (12, 14) prostaglandin J2 and Nrf2 pathways in protection against acute lung injury.(2005)*. American journal of respiratory and critical care medicine. **171**: p. 1260-1266.
79. Asensi, M., et al., *Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage*. Methods Enzymol, 1999. **299**: p. 267-76.
80. Nunes, C., A.M. Pereira, and M. Morais-Almeida, *Asthma costs and social impact*. Asthma Res

- Pract, 2017. **3**: p. 1.
81. Liu, A.H., et al., *Pathways through which asthma risk factors contribute to asthma severity in inner-city children*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(4): p. 1042-1050.
 82. Thomson, N.C., et al., *Clinical outcomes and inflammatory biomarkers in current smokers and exsmokers with severe asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 1008-16.
 83. Comhair, S.A., et al., *Detrimental effects of environmental tobacco smoke in relation to asthma severity*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e18574.
 84. Shimoda, T., et al., *Influence of cigarette smoking on airway inflammation and inhaled corticosteroid treatment in patients with asthma*. Allergy Asthma Proc, 2016. **37**(4): p. 50-8.
 85. Boulet, L.P., et al., *Smoking and asthma: clinical and radiologic features, lung function, and airway inflammation*. Chest, 2006. **129**(3): p. 661-8.
 86. Pedersen, B., et al., *Eosinophil and neutrophil activity in asthma in a one-year trial with inhaled budesonide. The impact of smoking*. American journal of respiratory and critical care medicine, 1996. **153**(5): p. 1519-1529.
 87. Barnes, P.J., K. Ito, and I.M. Adcock, *Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase*. Lancet, 2004. **363**(9410): p. 731-3.
 88. Cosio, B.G., et al., *Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages*. Journal of Experimental Medicine, 2004. **200**(5): p. 689-695.
 89. Meja, K.K., et al., *Curcumin restores corticosteroid function in monocytes exposed to oxidants by maintaining HDAC2*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2008. **39**(3): p. 312-323.
 90. Song, Y., et al., *Carbocysteine restores steroid sensitivity by targeting histone deacetylase 2 in a thiol/GSH-dependent manner*. Pharmacological research, 2015. **91**: p. 88-98.
 91. Balogun, E., et al., *Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 3): p. 887-95.
 92. Yageta, Y., et al., *Carbocysteine reduces virus-induced pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(5): p. 963-73.
 93. Fahey, J.W., et al., *Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of Helicobacter pylori and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7610-5.
 94. Park, J.-H., et al., *Sulforaphane inhibits the Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma*. BMB reports, 2012. **45**(5): p. 311-316.



Figure 1. 酸化ストレスによる histone deacetylase 2 (HDAC2)活性・発現低下の機序

喫煙による酸化ストレスによって生じた peroxynitrite は HDAC2 の活性を低下させ、HDAC2 による炎症性標的遺伝子の転写活性抑制作用を阻害する([63]より改変)。GR: glucocorticoid receptor.

Figure 2. タバコ煙曝露方法

Day 26 から 4 日間連続で、7.5L の密閉可能なプラスチック容器を用いてタバコ煙曝露を行った。タバコ 1 本あたり 7 分を 1 サイクルとし(3.5 分; タバコ煙曝露+酸素 3 L/min 併用, 2.0 分; タバコ煙曝露のみ, 1.5 分; 容器内換気)、10 サイクル曝露した。

Figure 3. 実験プロトコール

8~12 週齢の野生型($Nrf2^{+/+}$) BALB/c 系、 $Nrf2$ 欠損($Nrf2^{-/-}$)BALB/c 系雌マウスに対して、day 0 と day 14 に 100 μ g の ovalbumin (OVA)を皮下感作し、day 28 に 10 μ g の OVA を経鼻曝露した。OVA 感作・曝露マウスに対して、タバコ煙曝露群には 1 日 10 本のタバコ煙曝露を day 26 から 4 日間連続で行った。ステロイド治療群には 2.5 mg/kg のデキサメサゾンを経口投与し、day 29 に腹腔投与し、スルフォラフェン治療群には 12.5 mg/kg のスルフォラフェンを day 26 から 4

日間連続で腹腔投与した。OVA 曝露 48 時間後のマウスを用いて実験を行った。i.n.:

intranasal administration, i.p.: intraperitoneal administration, s.c.: subcutaneous injection.

Figure 4. アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるタバコ煙曝露によるステロイド抵抗性の獲得

(A) Ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型(*Nrf2*^{+/+})マウスにおいて、OVA 曝露 48 時間後に気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の評価を行った。OVA 曝露によって好酸球数の有意な増加を認めた。Day 29 に 2.5 mg/kg のデキサメサゾン投与した群では、好酸球数の有意な減少を認めた。タバコ煙曝露によって全細胞数、細胞分画に変化は認められなかったが、デキサメサゾンによる改善は認められず、ステロイド反応性の低下を認めた(n = 3-6)。 (B) OVA 曝露 48 時間後にメサコリン誘導気道過敏性試験を行った。各メサコリン濃度(0, 3.1, 6.3, 12.5, 25 mg/ml)における最大気道抵抗値を測定した。デキサメサゾン投与により、OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウスでは気道過敏性の改善が認められたが、タバコ煙曝露した同マウスではそのような改善は認められなかった(n = 6)。結果は平均±標準誤差で示す。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 。CS, cigarette smoke; DEX, dexamethasone; RI, airway resistance index.

Figure 5. アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるタバコ煙曝露による酸化ストレスと抗酸化ストレス因子の誘導

(A) Ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型(*Nrf2*^{+/+})マウスにおいて、OVA 曝露 48 時間後に摘出した肺組織を用いて 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)染色を行い、タバコ煙曝露による影響を評価した。タバコ煙曝露下では、肺胞マクロファージを中心に 8-OHdG の発現増加が認められた。Scale bar, 50 μ m. (B) OVA 曝露 48 時間後の肺組織より RNA を抽出し、*Nrf2* や標的遺伝子である heme oxygenase-1 (HO-1)、NAD(P)H:quinone-oxidoreductase-1 (NQO1)、glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)、glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM)の mRNA 発現レベルを評価した。定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(quantitative reverse transcription-Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR)を用いて遺伝子発現量を評価し、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法によって解析した。OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウスにおいてタバコ煙曝露は *Nrf2*、HO-1 と GCLM の mRNA 発現レベルを有意に増加させた(n = 3)。結果は平均 \pm 標準誤差で示す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。CS, cigarette smoke.

Figure 6. アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるタバコ煙曝露による *Nrf2* 核内移行の誘導

Ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型 (*Nrf2*^{+/+})マウスにおいて、タバコ煙曝露による *Nrf2* の核内移行に対する影響に関して評価を行った。(A, B) OVA 曝露 48 時間後に摘出した肺組織から核タンパク質を抽出し、ウエスタンブロットを行った。OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+}マウスにおいて、タバコ煙曝露は *Nrf2* の核内移行を有意に増加させた(n = 5)。結果は Lamin B で標準化し、平均 \pm 標準誤差で示す。** $p < 0.01$ 。(C, D) OVA 曝露 48 時間後に採取した気管支

肺胞洗浄液のサイトスピン標本を用いて、核内の Nrf2 の発現を蛍光顕微鏡で解析した。

OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+} マウスにおいて、タバコ煙曝露は肺胞マクロファージを中心に Nrf2 の核内移行を有意に増加させた(1 検体あたり 100-500cells, n = 3-4)。結果は平均±標準誤差で示す。** $p < 0.01$. CS, cigarette smoke. Scale bars, 50 μ m.

Figure 7. アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるタバコ煙曝露による酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスに対する影響

Ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型(*Nrf2*^{+/+})マウスにおいて、還元型グルタチオン (glutathione; GSH)濃度、酸化型グルタチオン(oxidized glutathione; GSSG)濃度、GSH/GSSG 比を測定し、酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスに対するタバコ煙曝露の影響を検証した。タバコ煙を曝露した群と曝露しない群とを比較すると、タバコ煙曝露群において GSH/GSSG 比の有意な低下が認められた(n = 5-8)。結果は平均±標準誤差で示す。* $p < 0.05$ 。CS, cigarette smoke.

Figure 8. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによるステロイド反応性の改善

(A) タバコ煙曝露によって誘導されたステロイド抵抗性アレルギー性気道炎症に対するスルフォラフェンの影響を評価するため、タバコ煙を曝露した ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型(*Nrf2*^{+/+})マウス、同 *Nrf2* 欠損(*Nrf2*^{-/-})マウスに対して、スルフォラフェン単独、あるいはス

ルフォラフェンとデキサメサゾンの両者を投与し、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数の算定を行った。*Nrf2*^{+/+} マウスにおいて、スルフォラフェン単独では気道炎症の改善は認められなかったが、スルフォラフェンとデキサメサゾンを併用することにより気管支肺胞洗浄液中の好酸球数の減少がみられた(n=3-4)。一方、*Nrf2*^{-/-} マウスでは、スルフォラフェンとデキサメサゾンを併用しても好酸球性気道炎症の改善は認められなかった(n = 3-4)。(B) 気道過敏性については、タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{+/+} マウスにおいて、スルフォラフェン単独投与では改善は認められなかったが、スルフォラフェンとデキサメサゾンの併用では改善がみられた(n = 5-6)。(C) 一方、タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 *Nrf2*^{-/-} マウスでは、スルフォラフェンとデキサメサゾンを併用しても気道過敏性の改善は認められなかった(n = 5-6)。結果は平均±標準誤差で示す。** *p* < 0.01。CS, cigarette smoke; DEX, dexamethasone; RI, airway resistance index; SFN, sulforaphane.

Figure 9. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによる Nrf2 発現の増強と Nrf2 依存性抗酸化ストレス反応の誘導

タバコ煙を曝露した ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型(*Nrf2*^{+/+})マウス、同 *Nrf2* 欠損(*Nrf2*^{-/-})マウスにおいて、Nrf2 活性に対するスルフォラフェンの効果を検証するため、Nrf2 と Nrf2 の下流遺伝子の発現を評価した。RNA を肺組織から抽出し、Nrf2 や標的遺伝子である heme oxygenase-1 (HO-1)、NAD(P)H:quinone-oxidoreductase-1 (NQO1)、glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)、glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM)の mRNA

発現を検証した。定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(quantitative reverse transcription-Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR)を用いて遺伝子発現量を評価し、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法によって解析した。タバコ煙を曝露したOVA感作・曝露 $Nrf2^{+/+}$ マウスにおいてスルフォラフェン投与は $Nrf2$ 、HO-1、GCLC の mRNA 発現レベルを有意に増加させたが、同 $Nrf2^{-/-}$ マウスではこれらの変化は認められなかった (n=3-6)。結果は平均±標準誤差で示す。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 。CS, cigarette smoke; SFN, sulforaphane.

Figure 10. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによる $Nrf2$ 核内移行の誘導

タバコ煙を曝露した ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型($Nrf2^{+/+}$)マウスにおいて、スルフォラフェンによる $Nrf2$ の核内移行に対する影響に関して評価を行った。(A, B) OVA 曝露 48 時間後に摘出した肺組織から核タンパク質を抽出し、ウエスタンブロットを行った。タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 $Nrf2^{+/+}$ マウスにおいて、スルフォラフェン投与は $Nrf2$ の核内移行を有意に増加させた(n = 4-5)。結果は Lamin B で標準化し、平均±標準誤差で示す。 $**p < 0.01$ 。(C, D) OVA 曝露 48 時間後に採取した気管支肺胞洗浄液のサイトスピン標本を用いて、核内の $Nrf2$ の発現を蛍光顕微鏡で解析した。タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 $Nrf2^{+/+}$ マウスにおいて、スルフォラフェン投与は肺胞マクロファージを中心に $Nrf2$ の核内移行を有意に増加させた(1 検体あたり 100-500cells, n = 3-4)。結果は平均±標準誤差で示す。 $**p < 0.01$ 。CS, cigarette smoke; SFN, sulforaphane. Scale bars, 50 μm .

Figure 11. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによる酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスに対する影響

タバコ煙を曝露した ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型($Nrf2^{+/+}$)マウス、同 $Nrf2$ 欠損 ($Nrf2^{-/-}$)マウスにおいて、還元型グルタチオン(glutathione; GSH)濃度、酸化型グルタチオン (oxidized glutathione; GSSG)濃度、GSH/GSSG 比を測定し、酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスに対するスルフォラフェンの影響を検証した。タバコ煙を曝露した OVA 感作・曝露 $Nrf2^{+/+}$ マウスと同 $Nrf2^{-/-}$ マウスとを比較すると、 $Nrf2^{+/+}$ マウスにおいてスルフォラフェンは有意に GSH/GSSG 比を増加させたが(A)、 $Nrf2^{-/-}$ マウスにおいては同様の変化は認められなかった(B) (n = 3-5)。結果は平均±標準誤差で示す。** $p < 0.01$ 。CS, cigarette smoke; SFN, sulforaphane.

Figure 12. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによる histone deacetylase (HDAC)2 発現・活性に対する影響

Ovalbumin (OVA)感作・曝露野生型($Nrf2^{+/+}$)マウス、同 $Nrf2^{-/-}$ マウスにおいて、タバコ煙曝露およびスルフォラフェン投与による histone deacetylase (HDAC)2 の発現および活性に対する影響に関して評価を行った。(A, B) OVA 曝露 48 時間後に摘出した肺組織から破碎抽出液を作製し、ウエスタンブロットを行った。OVA 感作・曝露 $Nrf2^{+/+}$ マウスでは、タバコ煙曝露により HDAC2 発現量は有意に低下したが、スルフォラフェンを投与したところその発現量は

回復した。OVA 感作・曝露 $Nrf2^{-/-}$ マウスでは、同 $Nrf2^{+/+}$ マウスと比較してタバコ煙非曝露下においてすでに HDAC2 発現量が有意に低下していたが、スルフォラフェンを投与してもその発現量は回復しなかった ($n = 4-6$)。結果は β -actin で標準化し、平均 \pm 標準誤差で示す。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 。(C) OVA 感作・曝露 $Nrf2^{+/+}$ マウス、同 $Nrf2^{-/-}$ の肺組織より得られた破碎抽出液を用いて免疫沈降法によって HDAC2 を抽出し、その酵素活性を評価した。OVA 感作・曝露 $Nrf2^{+/+}$ マウスでは、タバコ煙曝露により HDAC2 活性は有意に低下したが、スルフォラフェンを投与したところその活性は回復した。OVA 感作・曝露 $Nrf2^{-/-}$ マウスでは、同 $Nrf2^{+/+}$ マウスと比較してタバコ煙非曝露下においてすでに HDAC2 活性が有意に低下していたが、スルフォラフェンを投与してもその活性は回復しなかった ($n=3$)。結果は平均 \pm 標準誤差で示す。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 。CS, cigarette smoke; SFN, sulforaphane.

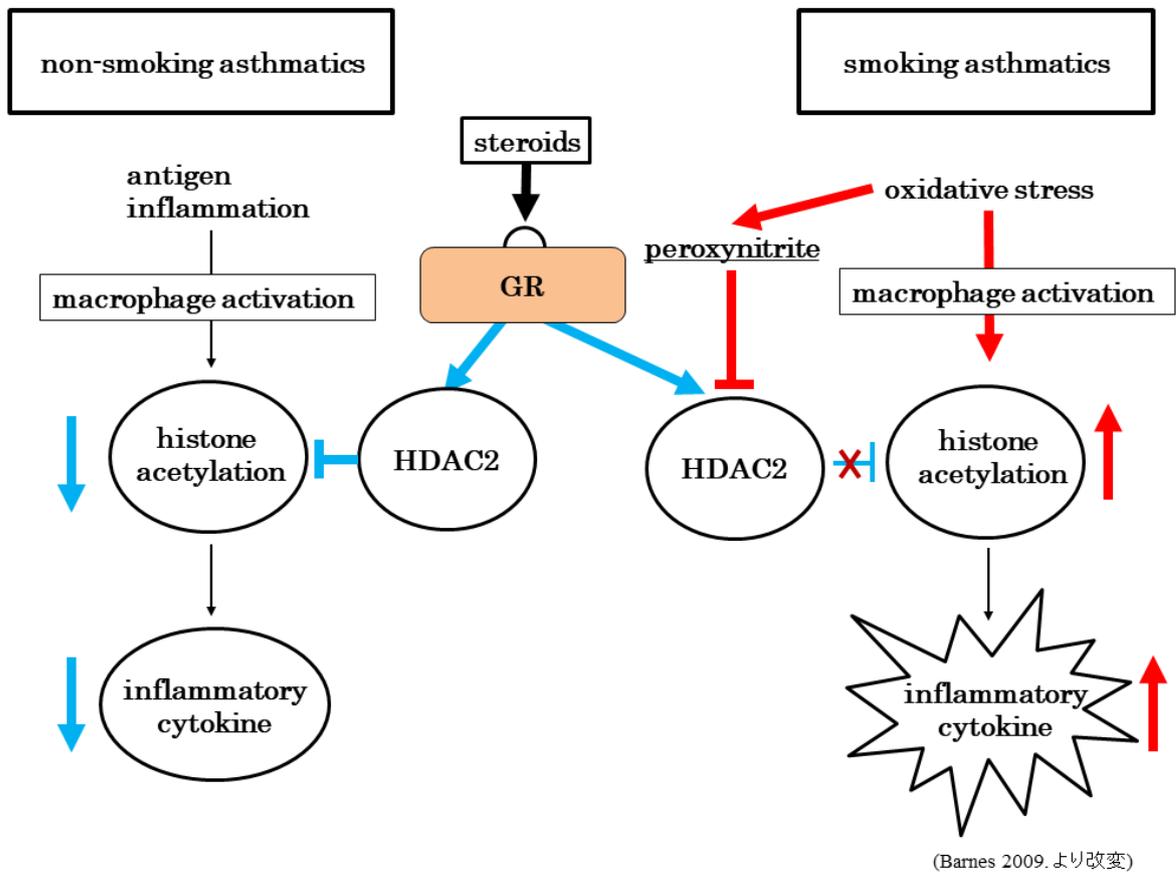


Figure 1. 酸化ストレスによる histone deacetylase 2 (HDAC2)活性・発現低下の機序

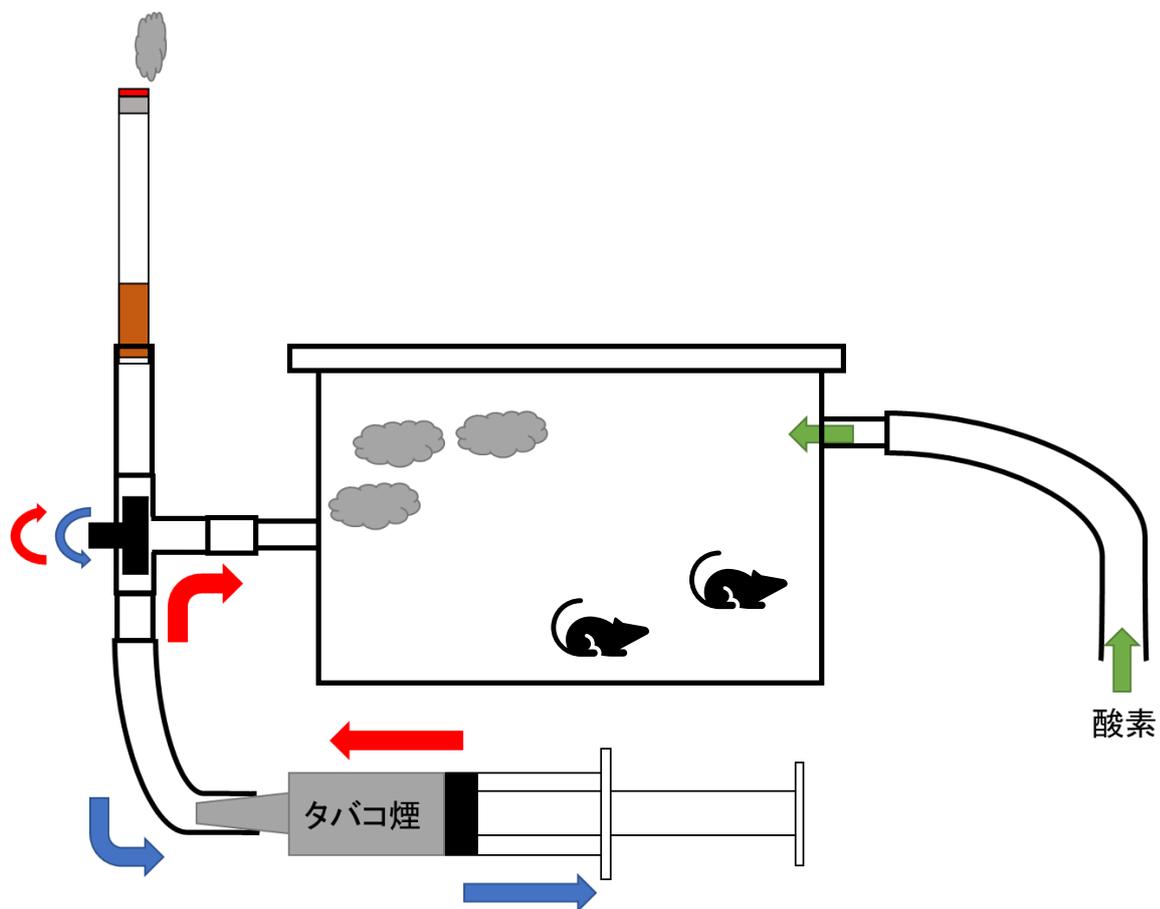


Figure 2. タバコ煙曝露方法

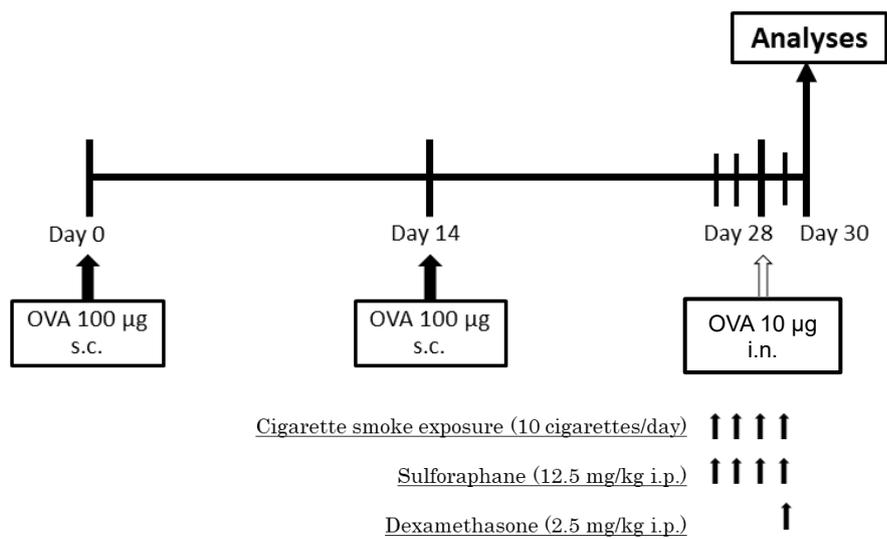


Figure 3. 実験プロトコール

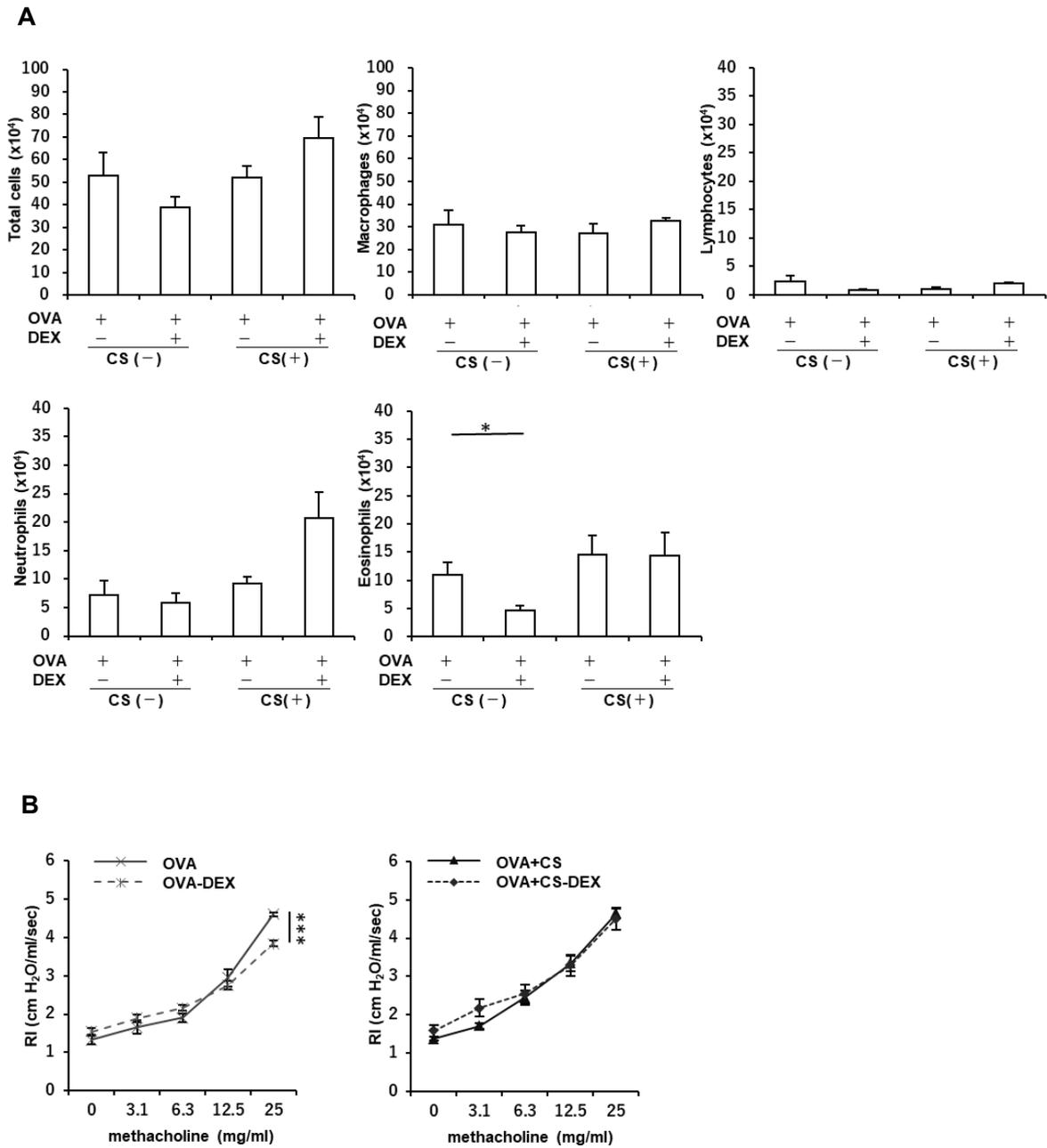


Figure 4. アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるタバコ煙曝露によるステロイド抵抗性の獲得

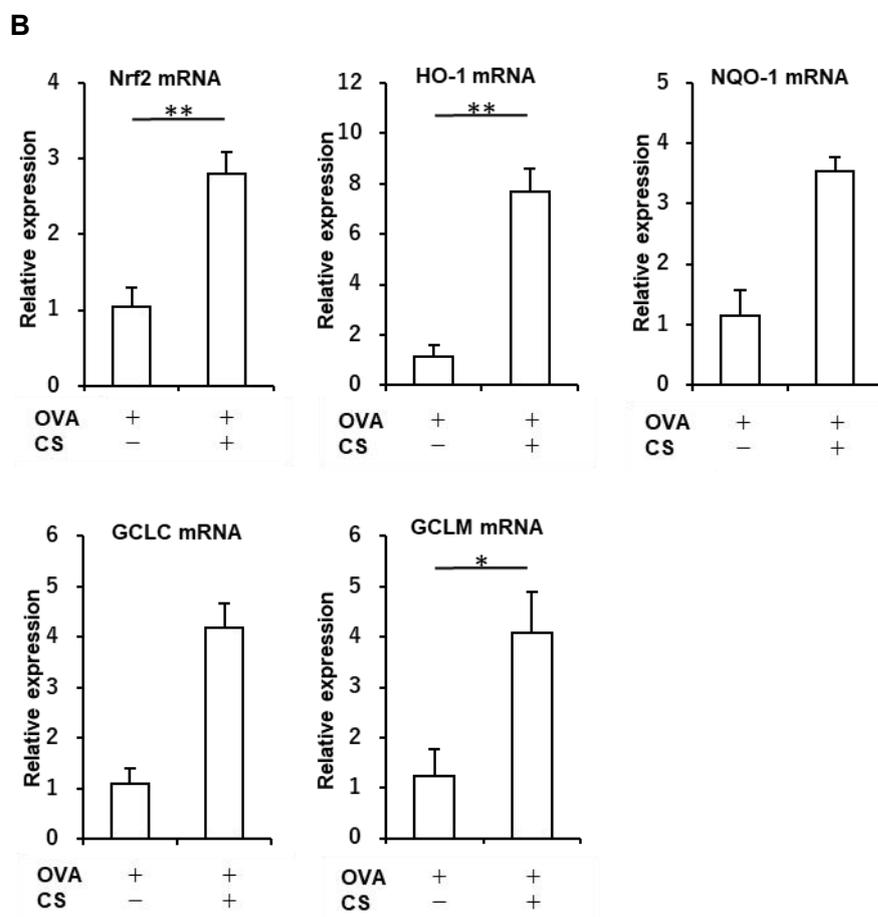
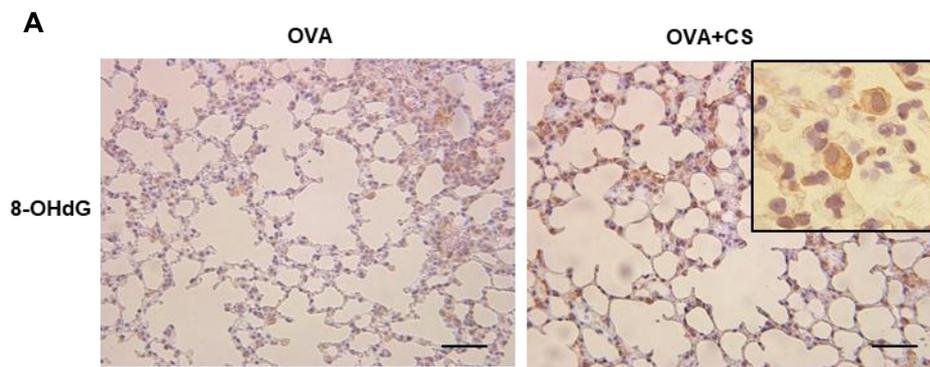


Figure 5. アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるタバコ煙曝露による酸化ストレスと抗酸化ストレス因子の誘導

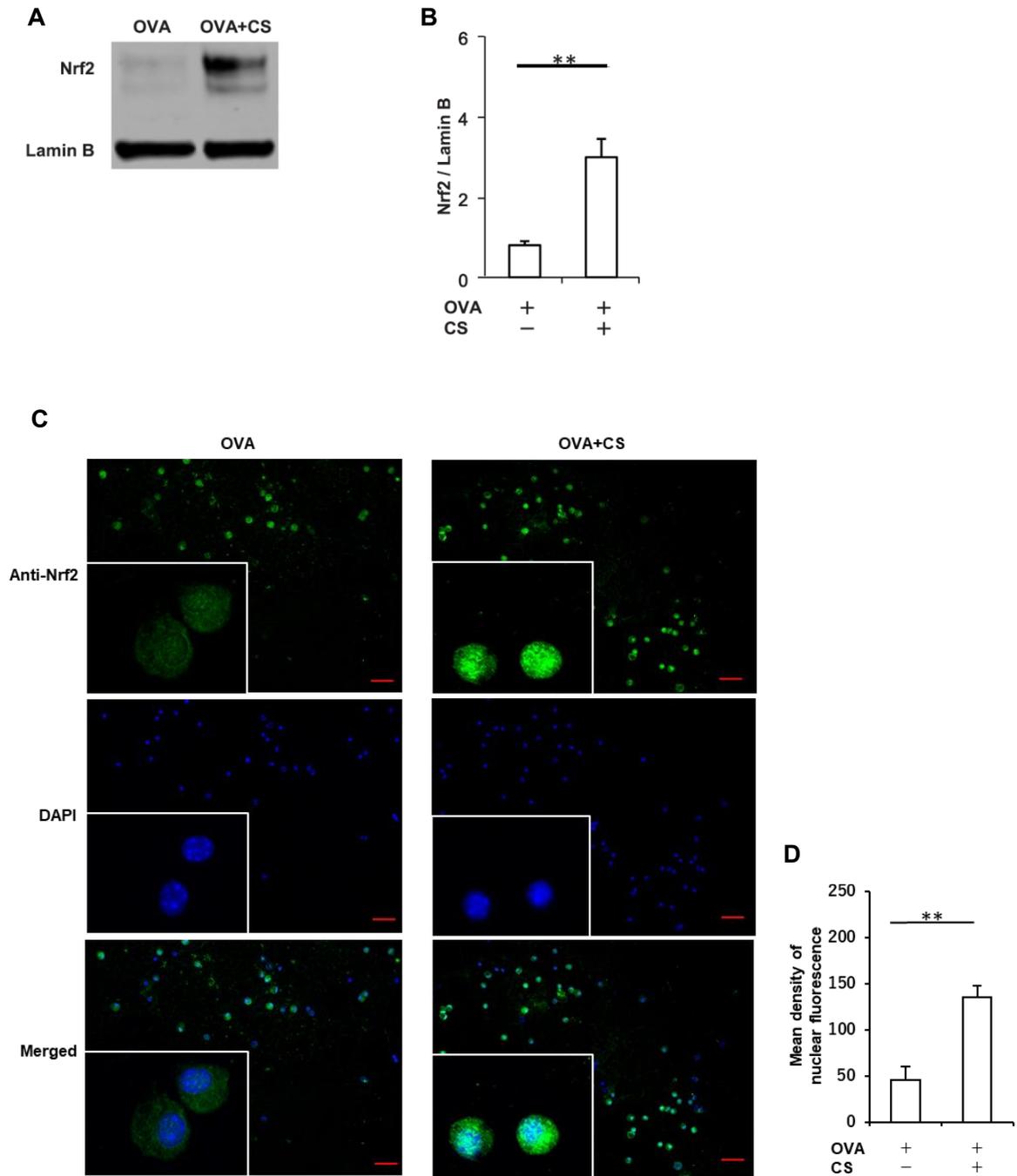


Figure 6. アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるタバコ煙曝露による Nrf2 核内移行の誘導

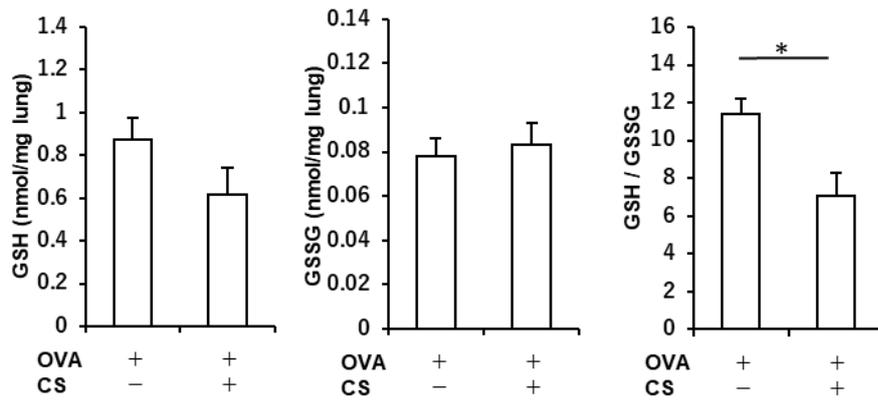
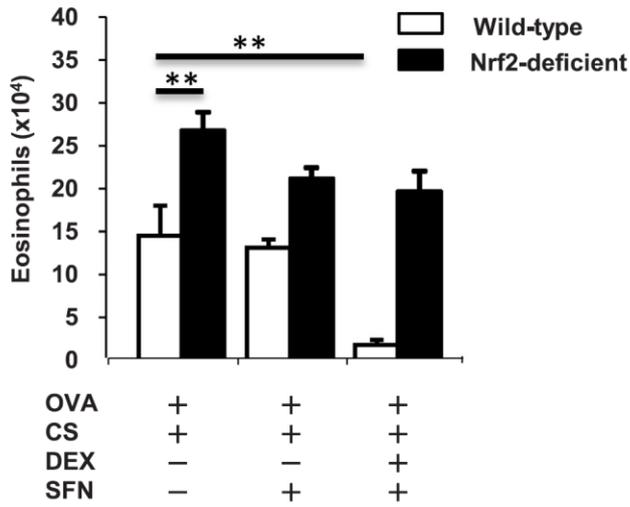
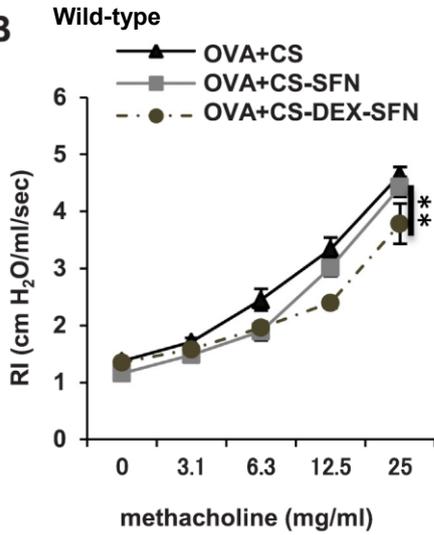


Figure 7. アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるタバコ煙曝露による酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスに対する影響

A



B



C

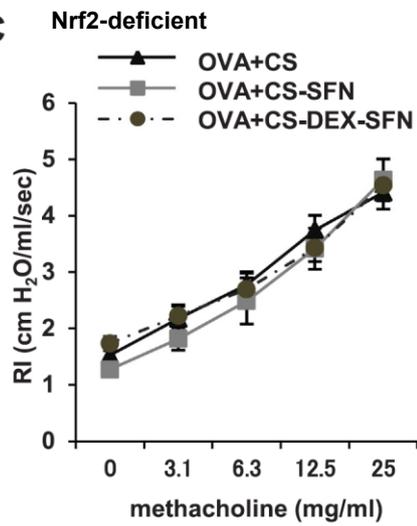


Figure 8. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによるステロイド反応性の改善

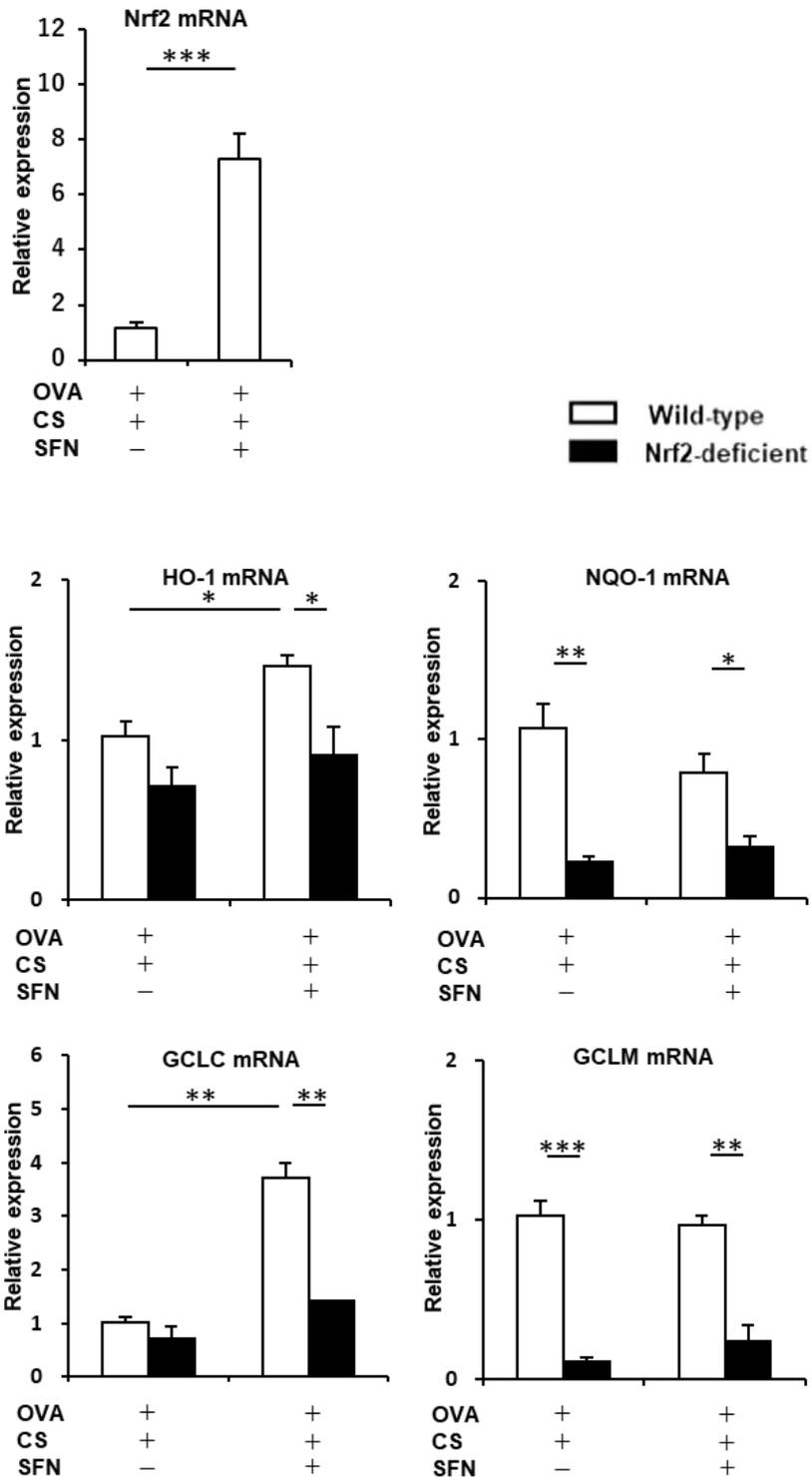


Figure 9. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによる Nrf2 発現の増強と Nrf2 依存性抗酸化ストレス反応の誘導

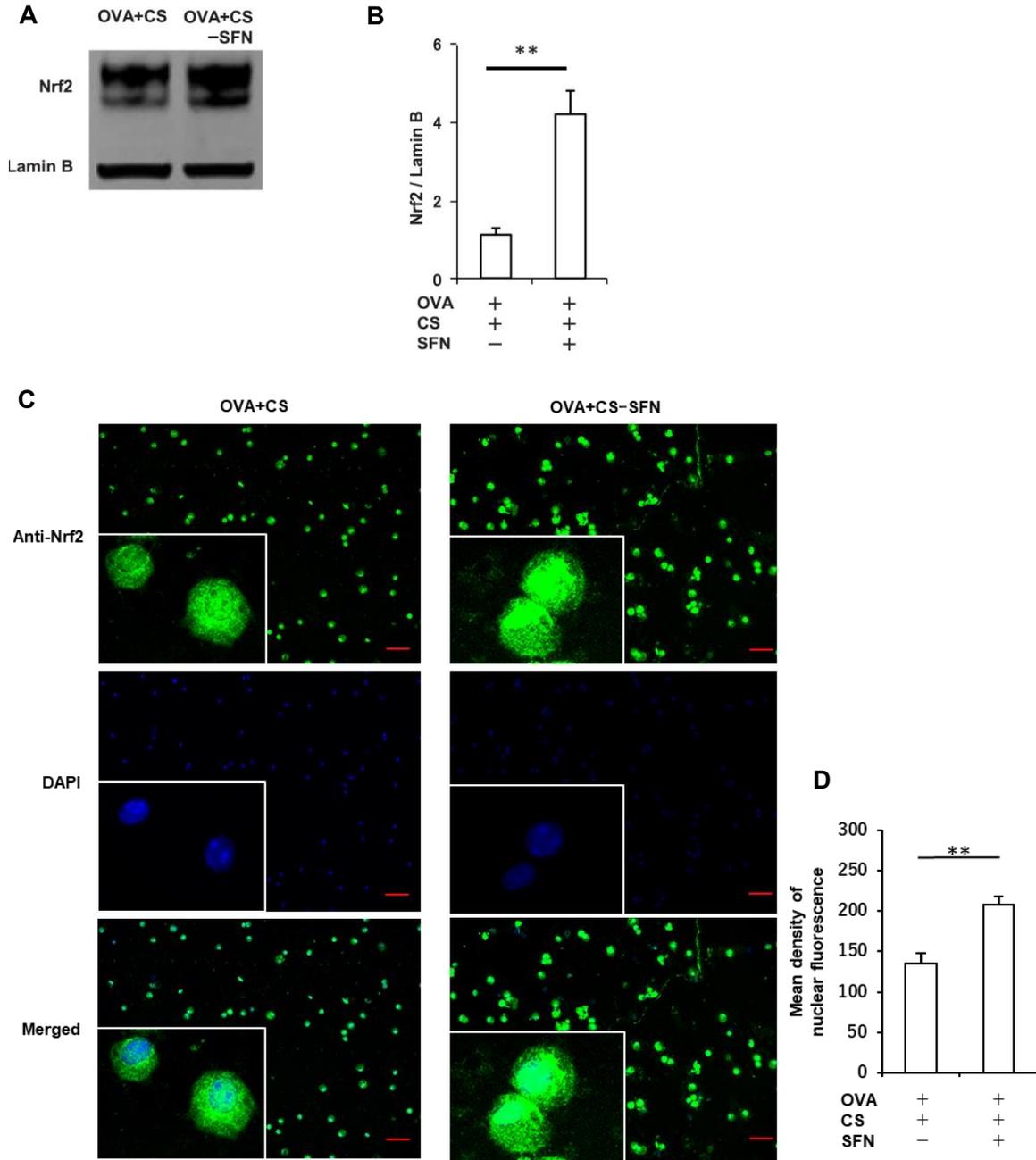


Figure 10. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによる Nrf2 核内移行の誘導

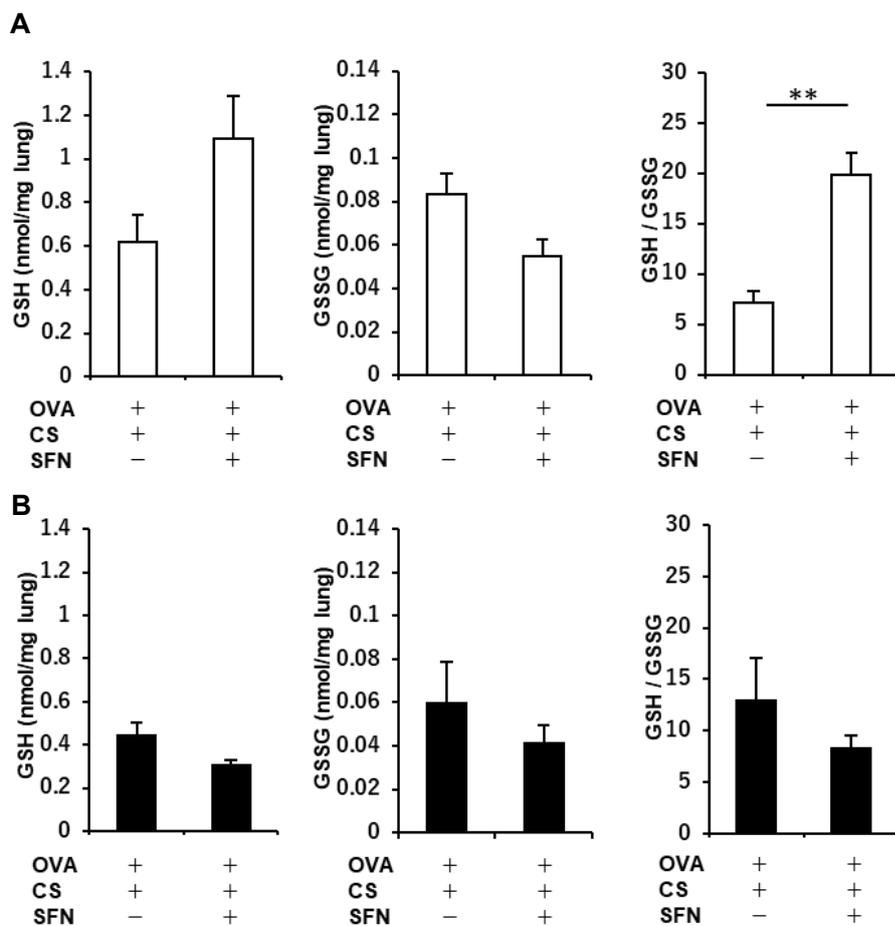


Figure 11. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによる酸化ストレス/抗酸化ストレスバランスに対する影響

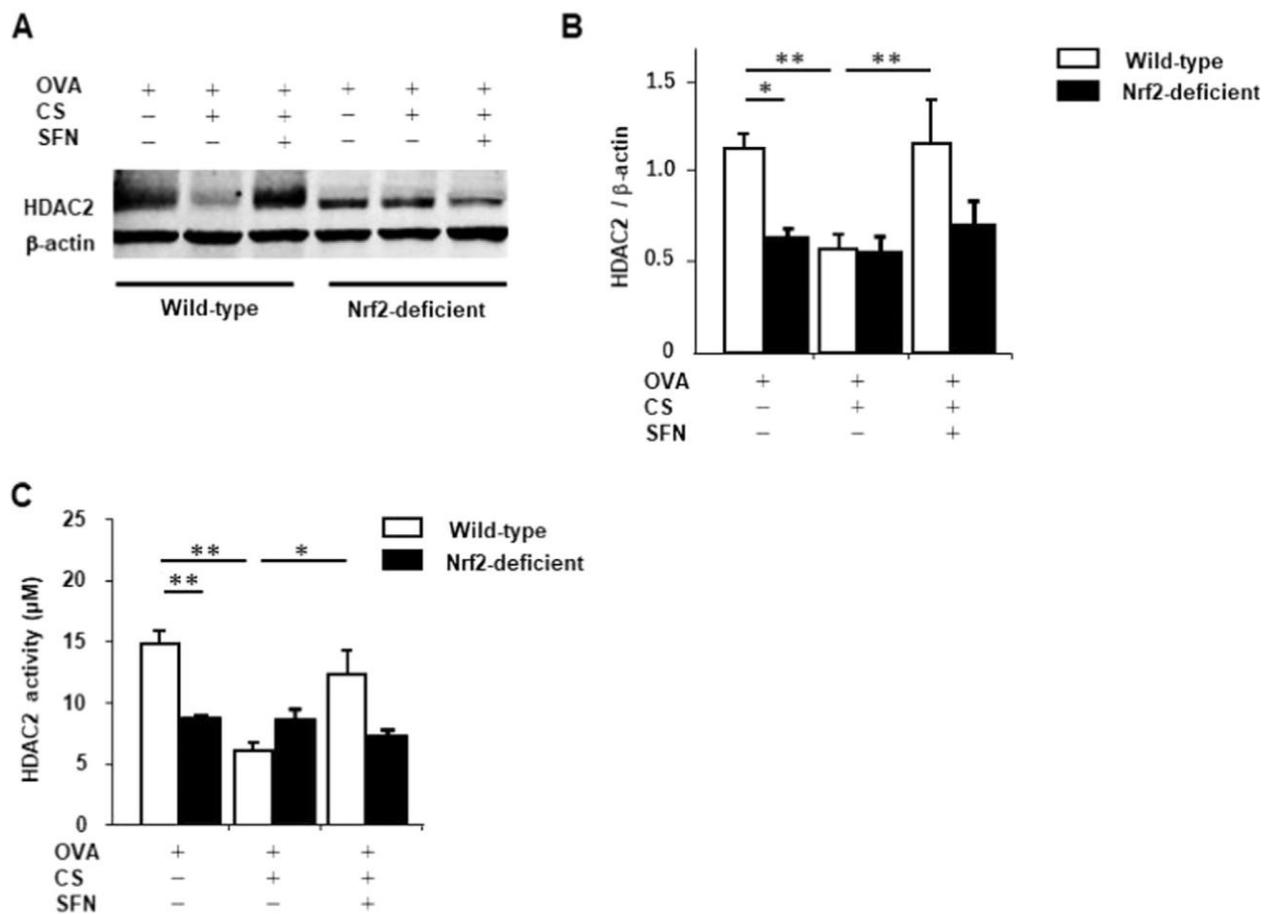


Figure 12. タバコ煙曝露アレルギー性気道炎症モデルマウスにおけるスルフォラフェンによる histone deacetylase 2 (HDAC2)発現・活性に対する影響

出典

本学位論文では Free Radical Biology and Medicine. 129;473-485, 2018 (doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.400) に掲載された論文の内容を、Elsevier B.V.社の規定にしたがって再利用している。