

氏名	櫻井 啓文		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9235 号		
学位授与年月	平成31年4月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	転写因子 Nrf2 活性化を介した難治性喘息へのアプローチ		
主査	筑波大学教授	博士（薬学）	本間 真人
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	和田 哲郎
副査	筑波大学講師	博士（医学）	近藤 裕也
副査	筑波大学助教	博士（医学）	小田ちぐさ

## 論文の内容の要旨

櫻井啓文氏の博士学位論文は、喫煙による難治性喘息の病態形成に、抗酸化因子の転写調節にかかわる Nrf2 の関与を明らかにし、その活性化が新たな治療標的になり得ることを示したものである。その要旨は以下のとおりである。

喘息の難治化には様々な因子の関与が指摘されており、酸化ストレスはその一つである。タバコ煙中には、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いることから、喫煙は喘息の難治化にかかわる要因の一つと考えられている。

著者はタバコ煙を用いて難治性喘息マウスモデルを作成し、喘息の新規治療標的の探索を目的に本研究を行っている。酸化ストレスに由来する炎症に対して抗酸化因子の転写調節にかかわる Nrf2 が重要な働きを担っていることから、著者は、まず OVA 感作・曝露によって作成した喘息モデルマウス(野生型・Nrf2 欠損)へのタバコ煙曝露の影響を評価し、続いて Nrf2 活性化剤のスルフォラフェンを用いて、難治性喘息において Nrf2 が治療標的となり得るかを検証している。また、ステロイド抵抗性に関わっているとされる HDAC2 の関与についても検討を行っている。

### 【対象・方法】

著者は8～12週齢の野生型 BALB/c 系マウス、Nrf2 欠損型 BALB/c 系マウスの雌を用いて実験を行っている。喘息モデルは、day 0 と 14 に 100  $\mu$ g の OVA を皮下感作し、day 28 に 10  $\mu$ g の OVA を経鼻曝露して作成している。タバコ煙曝露群では、この OVA 感作・曝露マウスに1日10本の喫煙曝露を day 26 から4日間連続で行っている。ステロイド治療群では 2.5 mg/kg のデキサメサゾンを経口投与し、スルフォラフェン治療群では 12.5 mg/kg のスルフォラフェンを day 26 から4日間腹腔内投与している。種々の測定項目は、OVA 曝露 48 時間後のマウスを用いて実験を行っている。

### 【結果】

1. 著者は野生型喘息モデルマウスにタバコ煙曝露を行い気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞と気道過敏性を評価している。タバコ煙曝露群では非曝露群と比較して細胞数や細胞分画に変化はないが、デキサメサゾン投与による好酸球性気道炎症や気道過敏性の改善効果が抑制され、タバコ煙曝露によってステロイド抵抗性が誘導される可能性を明らかにしている。

2. 著者は野生型喘息モデルマウスにタバコ煙曝露を行い酸化ストレスと抗酸化ストレスのバランスについて評価している。タバコ煙曝露群では非曝露群と比較して肺組織における DNA 損傷の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の発現および Nrf2 やその標的遺伝子である HO-1、GCLM の mRNA 発現が増強し、肺胞マクロファージを中心に Nrf2 の核内移行が増加することを明らかにしている。さらに、肺組織での GSH/GSSG 比も有意に低下しており、タバコ煙曝露によって抗酸化よりも酸化ストレスが上回っていた可能性を明らかにしている。

3. 著者はタバコ煙曝露した野生型喘息モデルマウスに、デキサメサゾンとスルフォラフェンを併用投与すると好酸球性気道炎症や気道過敏性の改善が認められ、タバコ煙曝露によって抑制されたステロイド反応性が回復することを明らかにしている。このような現象は *Nrf2* 欠損型マウスでは認められないことから、タバコ煙曝露により誘導されたステロイド抵抗性は Nrf2 活性化を介して改善すると考えている。

4. 著者はタバコ煙曝露野生型喘息モデルマウスにスルフォラフェンを投与した群では、非投与群と比較して Nrf2 と HO-1、GCLC の mRNA 発現が増強し、肺胞マクロファージを中心に Nrf2 の核内移行が増加するとともに GSH/GSSG 比が増加することを明らかにしている。このような現象は *Nrf2* 欠損型マウスでは見られないことから、著者はスルフォラフェンが Nrf2 と Nrf2 依存性抗酸化ストレス遺伝子を誘導し、酸化/抗酸化ストレスのバランスを是正すると考えている。

5. 著者はタバコ煙曝露した *Nrf2* 欠損型喘息モデルマウスでは、野生型マウスと比較して肺組織の HDAC2 の発現量・活性が低下していることを明らかにしている。また、野生型マウスではタバコ煙曝露によって HDAC2 発現量・活性が有意に低下するものの、スルフォラフェン投与によって回復するが、*Nrf2* 欠損型マウスではスルフォラフェンによる回復効果は認められないことから、タバコ煙曝露により誘導された HDAC2 の発現や活性の低下は Nrf2 活性化を介して改善すると考えている。

#### 【考察】

喘息は有病率の高い慢性気道炎症疾患であり、多くは軽症から中等症であり良好にコントロールされるが、患者の 5-10%は吸入ステロイドなどの標準治療に抵抗を示す難治例であり、これらに対する新たな治療法の確立が期待されている。

喫煙は喘息のリスク因子とされていることから、著者はまず、喘息モデルマウスをタバコ煙に曝露させることで、喫煙が喘息の病態に及ぼす影響を検証し、さらに抗酸化反応の調節に深く関与する転写因子 Nrf2 が新たな治療標的となり得るかを検討している。本研究で、著者は喘息モデルマウスでは、タバコ煙曝露によって酸化ストレス状態となり、HDAC2 の発現や活性が減弱することでステロイド抵抗性の気道炎症が誘導され、喘息が難治化することを明らかにしている。また、この酸化ストレスに対する応答を誘導するために Nrf2 の活性化剤であるスルフォラフェンを投与すると、Nrf2 や抗酸化ストレス遺伝子の発現が増強し、酸化/抗酸化ストレスのバランスが是正されること、さらにタバコ煙曝露によって低下した HDAC2 の発現や活性も回復し、気道炎症のステロイド反応性が回復することも明らかにしている。このような現象は *Nrf2* 欠損型喘息モデルマウスではみられないことも確認しており、ステロイド反応性の改善には Nrf2 が重要な役割を担っているとの仮説を検証している。

以上のことから著者は、喫煙は、それに起因した酸化ストレスが気道炎症のステロイド抵抗性を誘導して難治性喘息の病態形成に寄与すること、このステロイド抵抗性はスルフォラフェン投与によって回復することから、Nrf2 は喫煙に関連する難治性喘息の新たな治療標的になり得ると結論づけている。

## 審査の結果の要旨

#### (批評)

櫻井啓文氏の論文は、喫煙が抗酸化因子の転写調節にかかわる Nrf2 を介して難治性喘息の病態形成にかかわることを実験動物で初めて明らかにしたものである。特に喫煙がステロイド抵抗性を誘導すること、このステロイド抵抗性は Nrf2 の活性化によって回復することを見出した点は、Nrf2 が難治性喘息の創薬ターゲットになり得る可能性を指摘するものであり、高く評価される。

平成 31 年 3 月 1 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。