

[別紙1]

論文内容の要旨

論文題目 喫煙による肺障害における Glutathione
S-transferase P1 の役割

指導教官 大内 尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 石井 健男

(1) Glutathione S-transferase P1 の遺伝子多型と慢性閉塞性肺疾患(COPD)の
Association Study

肺胞及び末梢気管支における局所解毒作用に寄与する酵素は、喫煙に対する防御機構において重要な役割を果たしていると考えられる。喫煙により肺組織が障害を受けやすいか否かは遺伝的に決定されている部分があると考えられており、一定の genotype が慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease: 以下 COPD と略)の病態形成のリスクの一部を担っていると推察される。これまでも microsomal epoxide hydrolase (mEPHX) を含む複数の遺伝子について association study にて COPD との関連が報告されている。本研究においては、mEPHX 同様 xenobiotic metabolizing enzyme の一つでありかつ肺胞や呼吸細気管支などの末梢気道における発現の報告されている glutathione S-transferase P1 (GSTP1)の遺伝子多型と COPD について association study を行った。

GSTP1 における 2 箇所の遺伝子多型、すなわち exon-5 に位置する Ile105Val と exon-6 における Ala114Val について、polymerase chain reaction (PCR) 及び restriction fragment length polymorphism (RFLP)を行い genotype を決定した。

検体は、東京大学医学部附属病院、順天堂大学医学部附属病院、及び東京顕微鏡院より、COPD 患者より 53 検体、対照群として 50 検体を収集した。性差をなくしかつ喫煙の影響を均一化するため、2 群とも男性のみを選択し、対照群については喫煙歴のマッチした現喫煙者のみとした。

GSTP1/Ile105 homozygote の割合は対照群に比較し COPD 患者群において有意に高率であった(COPD 群 79%, 対照群 52%。P=0.009)。他の genotype と比較しての GSTP1/Ile105 homozygote の COPD 罹患についての odds ratio は 3.5 (95% CI 2.7~4.6)であった。GSTP1 の 114 座位の遺伝子多型については、2 群間に差は認められなかった。

以上より、GSTP1/Ile105 homozygote が COPD 患者群において有意に高い割合で見られたことから、GSTP1 の exon 5 の遺伝子多型は COPD と関連のある可能性のあることが示唆された。GSTP1/Ile105 の homozygote は喫煙に対する解毒による防御能が他の genotype に比べ低いと考えられた。GSTP1 の 105 番目のアミノ酸は、疎水性基質結合部位に属し、この部分の遺伝子多型に対応するアミノ酸の置換により酵素活性の変化が見られることが報告されており、上記の association study の結果と合わせ、GSTP1 の機能が喫煙による肺障害の防御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) ヒト肺由来細胞における喫煙防御能と GSTP1 との関わり

喫煙は、肺癌や肺気腫を含む複数の肺関連疾患における主な危険因子と考えられている。しかしながら、肺由来細胞の生存能における喫煙障害の直接的影響に関しては、十分な検討がなされているとはいえない。本研究において、ヒト肺線維芽細胞由来の cell line である HFL-1 を用いて、異なった濃度の cigarette smoke extract (CSE)を培地より調整し希釈系列を作成、各濃度の CSE 下における生存能を経時的に検討し、その過程における apoptosis, necrosis の関与について検討した。また、先述の association study により COPD の病態と関連があると考えられた解毒酵素の一つである GSTP1 について、喫煙障害への防御に関する寄与について検討を行った。

方法について順に記載する。CSE は DMEM 培地を市販タバコ及び pump-smoke machine を用いて bubbling し、その後 0.22 μ m pore filter にてフィルタをかけ末梢気道に到達し得ないと考えられる粗大粒子を除外、この液体を 100% CSE と定義した。これを無血清の DMEM に加えて希釈系列を作成、異なる濃度の CSE における HFL-1 の生存能について検討を行った。

Apoptosis についてはその早期変化として細胞膜外表面に出現する phosphatidyl serine をこれに特異的に結合する Annexin V に蛍光物質である phycoerythrin (PE)を結合させることにより認識、necrosis は 7-amino-actinomycin D の細胞内へ

の取り込みにて細胞膜の障害を検討、この双方の蛍光を flow cytometry により別々の波長を認識する fluorescence channel を用いて検出し検討した。すなわち annexin-V (-) かつ 7-AAD (-) の細胞を viable, annexin-V (+) かつ 7-AAD (-) の細胞を apoptotic、そして 7-AAD (+) の細胞を necrotic と認識した。

次に GSTP1 の発現量の操作について述べる。人工的に internal ribosomal entry site (IRES) 及び enhanced green fluorescent protein (EGFP) の配列を導入された eukaryotic bicistronic vector を基礎骨格とし、GSTP1 の発現量を同時に発現する EGFP の蛍光強度でモニターできるように sense 及び antisense expression vector を作成した。これらのベクターについて HFL-1 への transient transfection を行い、この transfectant への CSE の影響を先述の方法により認識、GSTP1 の役割について検討を行うこととした。

結果につき記載する。HFL1 について、CSE は 10-25% の低濃度においては優位に apoptosis を、また 50-100% の高濃度においては necrosis を引き起こした。10-25% CSE においては時間依存性に necrosis の細胞の割合が増加した。

次に GSTP1 の sense 及び antisense vector について、EGFP の蛍光強度に従って GSTP1 の発現量が亢進及び抑制していることについての確認を行った。各 transfectant について、細胞膜を透過性にしてから抗 GSTP1 抗体を一次抗体とし、また PE の結合している二次抗体を用いて immunofluorescent flow cytometry の方法を用い、細胞内 GSTP1 濃度を蛍光強度にて間接的に検討した。その結果、GSTP1 発現量が sense 及び antisense vector の transfectant において、それぞれ優位に増加及び減少していることが確認された。

その後、CSE による細胞障害に対する GSTP1 の防御能に関して検討を行った。Apoptosis, necrosis 双方について検討するために 25% CSE を用いた。HFL-1 の necrosis は GSTP-1 の高発現により減少し、逆に antisense vector の transfection により増加した。Apoptosis については、各 transfectant 間にて有意な差は認められなかった。

GSTP1 の発現量を亢進、及び抑制させることにより、HFL-1 に対する CSE の細胞毒性がそれぞれ抑制、及び増強された。この結果より、気道細胞において、GSTP1 は喫煙に対する防御効果を有していることが示された。

(3) 考察

本研究において、まず GSTP1 と COPD との association study により 105 Ile homozygote の genotype にて COPD 発症のリスクが高いことが示唆された。GSTP1 の 105 番目のアミノ酸は疎水性基質結合部位に属しそのアミノ酸の種類及びそれをコードする遺伝子配列により酵素活性が変化することが報告されており、上記研究結果とあわせ GSTP1 の喫煙に対する防御能及びその重要性が強く示唆

された。

そこで *in vitro* の系にて喫煙による細胞障害に対する GSTP1 の防御能について検討を行ったところ、喫煙により肺線維芽細胞に apoptosis 及び necrosis が誘導され、この細胞毒性の効果が necrosis の減少を介して GSTP1 により抑制されることが見出された。これらの結果より、xenobiotic enzyme の一つであり肺胞、呼吸細気管支を含む末梢気道に強く発現している GSTP1 が喫煙による肺障害に対する防御の能力を有し、肺気腫を含む喫煙関連肺疾患の発症を防ぐ上で重要な役割を果たしていることが示唆された。