

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 寺川 貴裕

ヒト気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar Lavage Fluid: BALF) は、肺に挿入した気管支ファイバースコープを通じて生理食塩水を肺内部に注入し、洗浄後回収したもので、肺内部の生理状態を反映した細胞や物質を多く含んでいる。

これまではその細胞成分のみが解析の対象とされており、タンパク質成分については組成が複雑で分離精製が難しいため解析した報告は少ない。本論文は、難易度のきわめて高い試料である BALF をプロテオーム解析するための前処理法を確立し、分析上の問題点を克服し、剥離性間質性肺炎 (Desquamative Interstitial Pneumonia: DIP) 疾患特異的に増減するタンパク質を検出した生化学的研究をまとめたもので、7 章からなっている。

第 1 章の緒言では、プロテオーム解析の歴史と現状、BALF に関する研究開始時までの知見、解析上の問題点が述べられている。

第 2 章では、BALF プロテオーム解析のための最適泳動法の確立を目的とした。各種有機溶媒を用いたタンパク質沈殿による BALF 前処理法の検討を行ったところ、アセトンによって BALF のタンパク質を沈殿させたものがスポット分離が最も良好であった。次に最適な泳動バッファの選択を行った結果、尿素とチオ尿素を含む泳動バッファがスポット分離能が高かった。これらの最適条件を組み合わせることで、2 次元電気泳動を用いた BALF タンパク質のプロテオーム解析が可能となった。

第 3 章では、健常者 5 例の血漿と BALF の 2 次元電気泳動像での相同性比較を行った。画像解析ソフトによって解析した結果、同一人の BALF と血漿の 2 次元電気泳動像のマッチ率は平均で 45 %、最大でも 49 %で、BALF 中には肺固有のタンパク質が存在していることが判明した。

第 4 章では健常者 5 例の BALF 2 次元電気泳動像の相同性比較を行った。その結果、BALF タンパク質のスポットは pI 5-8 の範囲に集中していた。また、これら 5 例の 2 次元電気泳動像のマッチング率が低かったことから、健常者 BALF 構成タンパク質の組成には個体差があることが示された。さらに、マッピング率が低い原因として BALF 個体差のほかに、2 次元電気泳動の再現性と染色による誤差が関係していることが判明したのでその改善が課題となった。

第 5 章では、健常ならびに DIP 疾患 BALF の 2 次元電気泳動による比較を行い、疾患特異的に増減するタンパク質を明らかにした。ここから、2 次元電気泳動による泳動誤差を補正するために同じタンパク質ならば泳動位置のずれが生じない 2D-DIGE (Two Dimensional

Differential Gel Electrophoresis)法を新たに用いた。患者 BALF 泳動像では、標準健常者 BALF と比較して、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -アンチキモトリプシン、イムノグロブリン G (IgG)、 α_2 -マクログロブリンが増加しており、肺サーファクタントプロテイン A (SP-A)、SP-D、ハプトグロビン、アポリポプロテイン A1 が減少していた。

さらに、より微量で増減しているタンパク質スポットを検出するために、モノクローナル抗体アフィニティカラムを用いて BALF タンパク質の半分以上を占めるタンパク質であるアルブミン、IgG の除去を行った結果、これまで検出できなかった微量タンパク質スポットの分離、検出が可能となり、マトリックスメタロプロテアーゼ-12 (MMP-12)、補体 3 (C3)、ヘモペキシン、ビタミン D 結合タンパク質、アネキシン V、ラミニン、フィブリリンなどを新たに検出した。

第 6 章では、健常者ならびに患者 BALF の生化学的、免疫組織化学的解析を行った。総タンパク質と総リン脂質濃度は両者の間に有意差がなかったが、SP-A、-B、-D 濃度、表面張力は DIP 患者 BALF ですべて低下していた。一方、総過酸化脂質濃度は、健常者 BALF と比較して、DIP 疾患 BALF で増加していた。これら一連の変化は、DIP 肺の症状である肺泡虚脱によって引き起こされていると考えられた。以上の生化学的解析結果は、2D-DIGE の解析結果を支持しており、患者 BALF の組成が健常者 BALF と明らかに変化していることを示した。さらに、DIP で増減したタンパク質が実際に病変肺、健常肺でどのように分布しているかを知るために、健常者と DIP 患者の肺を免疫組織化学的に解析したところ、DIP 肺組織において II 型上皮細胞の過形成と、肺泡マクロファージへの SP-A、 α_1 -アンチトリプシンの局在が観察された。肺泡マクロファージは SP-A を産生しないため、SP-A の局在は、肺泡マクロファージによって吸収された結果と考えられ、 α_1 -アンチトリプシンの場合は炎症時に好中球から産生されるセリンプロテアーゼから肺を防御しているためと考えられた。

第 7 章では、本研究の総合考察と今後の展望が述べられている。

以上、本論文では、不明な点が多かった気管支肺胞洗浄液中のタンパク質について、その分離抽出法と分析法を確立し、2 次元電気泳動による方法を用いて、健常者 BALF と DIP 患者 BALF 中のタンパク質を比較して、患者特異的に増加、減少するタンパクを多数検出し得たことにより、2 次元電気泳動が BALF 解析に有用であることを示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。