

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
山岡 繁夫	主査 教授 玉 井 浩 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 勝 間 田 敬 弘 副査 教授 朝 日 通 雄 副査 教授 花 房 俊 昭
主論文題名 Severe Vitamin E deficiency exacerbates acute hyperoxic lung injury associated with increased oxidative stress and inflammation (重度のビタミン E 欠乏は高濃度酸素負荷時の急性肺傷害を悪化させるとともに肺における酸化ストレス及び炎症を増強する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒 言》</p> <p>高濃度酸素吸入は急性肺傷害を惹起し、その結果、生体は呼吸障害から死に至ることが知られている。酸素負荷時に生体内で産生される活性酸素種(ROS)は肺傷害の発症に関与し、<i>in vitro</i> ではアポトーシスによる細胞死を惹起すると考えられている。ROS は肺組織への炎症細胞浸潤及び炎症性サイトカイン産生を惹起、増悪させる可能性が示唆されており、また逆に、浸潤炎症細胞はROSの産生源ともなりうる。すなわち、高濃度酸素負荷時の急性肺傷害においては酸化ストレスと炎症は相互に関連し悪循環を形成する。</p> <p>一方、ビタミン E(E)は代表的な脂溶性抗酸化物質であり、生体においては、細胞膜及びリポ蛋白中脂質過酸化を防いでいる。E のうち最も活性が高く、生体中に最も多く存在する異性体がα-トコフェロール(α-T)であり、近年の研究において、α-T は抗酸化能非依存的に抗炎症反応を示すことが示唆されている。また、E はII型肺胞上皮細胞によりサーファクタントとともに分泌され肺胞表面に分布することが知られている。このため、E は肺の最前線において、吸入される様々な起炎物質及び酸化物質から肺を防御している可能性がある。</p> <p>しかし、高濃度酸素負荷時におけるE欠乏の肺への影響に関して行われた研究はほとんどなく、その詳細に関しても不明な点が多い。</p> <p>以上より、我々はビタミンE欠乏により高濃度酸素負荷時の急性肺傷害は増悪するという仮説をたて、ビタミンE欠乏モデルマウスとしてその血中及び組織中α-T濃度が著明な低値を示すα-tocopherol transfer protein knockout(α-TTP KO)マウスを用い、高濃度酸素負荷による急性肺傷害及び肺での酸化ストレス・炎症に対するビタミンE欠乏の影響を検証した。</p> <p>《方 法》</p> <p>対象は、3-4か月齢の雄性α-TTP KOマウス及び同月齢のC57/BL6マウスを用いた。①C57/BL6マウスに普通食を与えた群(WT群)、②C57/BL6マウスに酸素負荷1ヶ月前よりE欠乏食を与えた群(WT E(-)群)、③α-TTP KOマウスに普通食を与えた群(KO群)、④α-TTP KOマウスに酸素負荷1ヶ月前よりE欠乏食を与えた群(KO E(-)群)の4群で血漿及び肺組織中α-T濃度を測定した。</p> <p>さらに、①KO群と④KO E(-)群の2群で高濃度酸素負荷時の生存率、酸素負荷前、72時間後に</p>	

血漿、肺組織及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、肺組織像による肺損傷の比較及び検体中 α -T 濃度、炎症及び酸化ストレスに関する各種項目を測定、比較検討した。

《結果》

血漿及び肺組織中 α -T の基礎値は他の3群に比し KO E(-)群で有意に低値であった。

高濃度酸素負荷時の生存率は酸素負荷72時間後において WT 群に比し、KO E(-)群で有意に低下していた。

酸素負荷72時間後の肺組織像では細胞間質への炎症細胞浸潤、間質の浮腫及び無気肺がみられ、上記の項目を数値化した lung injury score では WT 群に比し KO E(-)群において有意に高値であった。BALF 中細胞数及び蛋白も酸素負荷後、WT 群に比し KO E(-)群において有意に増加していた。これらより、酸素負荷による肺胞腔への炎症細胞浸潤及び肺血管透過性亢進は KO E(-)群においてより顕著であることが分かった。

肺組織中 IL-6 mRNA レベルは酸素負荷 72 時間後、WT 群に比し KO E(-)群において有意に上昇していた。酸素負荷後の IL-1 β mRNA レベルも WT 群に比し KO E(-)群において有意に高値であったが、両群とも負荷前に比し有意に低下していた。IL-1 β は生体の様々な侵襲にたいして最も早期に産生される炎症性サイトカインであり、IL-1 β mRNA のピークは酸素負荷のごく早期にあり以後 72 時間までに減少した可能性が考えられた。

高濃度酸素負荷時の酸化ストレスマーカーとして、肺組織及び BALF 中 8-iso-prostaglandin F_{2 α} (8-iso-PGF_{2 α}) 及び 9-及び 13-(*E, E*)-hydroxyoctadecadienoic acid (9/13-(*E, E*)-HODE) を測定した。酸素負荷 72 時間後、肺組織及び BALF 中 8-iso-PGF_{2 α} は、WT 群に比し KO E(-)群において有意に増加していた。9/13-(*E, E*)-HODE に関しては両群間で有意差は見られなかった。8-iso-PGF_{2 α} 及び 9/13-(*E, E*)-HODE は、各々アラキドン酸及びリノール酸のフリーラジカル特異的過酸化物であり、peroxyl radical に対するアラキドン酸の反応性はリノール酸のおよそ3倍との報告がある。また、細胞内ROS産生は酸素負荷後数時間より始まるため両マーカーの代謝速度の違いも今回の結果に影響している可能性が考えられた。

《考察》

実験結果より、重度のビタミン E 欠乏は高濃度酸素負荷時の急性肺傷害を悪化させるとともに肺における酸化ストレス及び炎症を増強すると結論づけられた。

今回の実験においては、異なる遺伝子型を持つ2群 (WT 群, KO E(-)群) を用いており、純粋な E 欠乏の影響を検証するためには同種間での比較が必要と考えられる。また、今回の実験結果の詳細なメカニズムの解明のためには、今後、培養細胞を用いる *in vitro* study 等を含め更なる検討が必要と思われる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	山岡繁夫
論文審査担当者		主査 教授 玉 井 浩	
		副査 教授 林 秀 行	
		副査 教授 勝 間 田 敬 弘	
		副査 教授 朝 日 通 雄	
		副査 教授 花 房 俊 昭	
主論文題名			
<p>Severe Vitamin E deficiency exacerbates acute hyperoxic lung injury associated with increased oxidative stress and inflammation (重度のビタミン E 欠乏は高濃度酸素負荷時の急性肺傷害を悪化させるとともに肺における酸化ストレス及び炎症を増強する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>高濃度酸素吸入は急性肺傷害を惹起し、その発症、増悪には酸化ストレス及び炎症が関与する。ビタミン E は代表的な脂溶性抗酸化物質であり、II 型肺胞上皮細胞により分泌され肺胞表面に分布することが知られている。また、その異性体である α-トコフェロールは、近年の研究により抗酸化能非依存的に抗炎症反応を示すことが示唆されている。</p> <p>これらの事実より申請者は、ビタミン E 欠乏により高濃度酸素負荷時の急性肺傷害は増悪するという仮説をたて、ビタミン E 欠乏モデルマウスとして α-tocopherol transfer protein knockout (α-TTP KO) マウスを用い、高濃度酸素負荷による急性肺傷害及び肺での酸化ストレス・炎症に対するビタミン E 欠乏の影響を検証した。</p> <p>本実験の結果として、以下のような結果が得られた。</p> <p>ビタミン E 欠乏食を与えた α-TTP KO マウスでは、高濃度酸素負荷時の</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 生存率は低下していた。 2) 組織学的肺損傷は増悪していた。 3) 肺胞腔への炎症細胞浸潤及び肺血管透過性亢進は増悪していた。 4) 肺での炎症性サイトカイン (IL-6) 遺伝子発現は増加していた。 5) 肺及び肺胞中で産生される酸化ストレスマーカーは増加していた。 <p>これらの結果より、重度のビタミン E 欠乏は高濃度酸素負荷時の急性肺傷害を悪化させるとともに肺における酸化ストレス及び炎症を増強すると結論づけられた。</p> <p>本実験は、肺での酸素毒性に対するビタミン E 欠乏の効果に対する新たな知見を提供するものであるが、その詳細なメカニズムの解明のためには、今後、培養細胞を用いる <i>in vitro</i> study 等を含め更なる検討を行っていくことが肝要である。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
Free Radical Research 42(6): 602-612, 2008			