

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19272

研究課題名(和文)PM2.5成分の複合曝露が生体・免疫応答の始動細胞とそのネットワークに及ぼす影響

研究課題名(英文)Combined effects of components of PM2.5 on early stage of biological and immune responses.

研究代表者

本田 晶子(Honda, Akiko)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：20454324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小粒子状物質(PM2.5)の成分の複合曝露が、生体・免疫応答の始動イベントに関わる細胞である気道上皮細胞、抗原提示細胞等に及ぼす複合的影響を明らかにすることを目的とした。PM2.5成分の作用点は様々で、成分によって、単独で影響を示す場合と、複合曝露によって、相加相乗的な影響を示す場合があった。PM2.5成分は、気道上皮細胞や抗原提示細胞に対して単独あるいは複合的に影響を示し、呼吸器疾患の悪化に関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We investigated combined effects of components of PM2.5 on respiratory and immune cells to elucidate the underlying mechanisms by which PM2.5 lead to the development and/or exacerbation of allergic diseases such as asthma. This study indicates components of PM2.5 can contribute to the development and/or exacerbation of asthma by disruption of respiratory and immune systems independently or synergistically.

研究分野：環境毒性学

キーワード：PM2.5 アレルギー 気管支喘息 複合影響

1. 研究開始当初の背景

- (1) アトピー性皮膚炎、花粉症、気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患は増加し、健康や社会経済に大きな損失をもたらしている。故に、この増加・悪化要因を解明し、適切な対策を講ずることが急がれている。アレルギー性疾患患者は、環境汚染物質の影響を受けやすい高感受性・脆弱性集団とも考えられており、アレルギー疾患の増加、悪化に関連する要因として、環境汚染の重要性が挙げられている。
- (2) 本邦をはじめ多くの国々で、アレルギー疾患を増加・悪化させる環境汚染物質として、粒径 2.5 μm 以下の大気中微小粒子状物質 (PM2.5) がクローズアップされている。PM2.5 は、一般に、元素状炭素粒子より成る核の周囲や内部に、有機炭化水素とその誘導体 (多環芳香族炭化水素、キノン等) 金属、塩類等、非常に多くの物質が存在する。多様な成分には有害物質も含まれていること、大きな粒子と比較して吸気により肺深部へと達しやすいことから、PM2.5 の健康影響は呼吸器系に出現しやすく、気管支喘息等の呼吸器系のアレルギー疾患はその代表である。しかし、その構成の複雑さ、さらに、それらが複合的に曝露される故に、PM2.5 によるアレルギーや気管支喘息の増悪機構、及び、健康影響を決定する諸成分やその組み合わせは明らかにされていない。
- (3) 種々の環境汚染物質が、好酸球性炎症や肥満細胞脱顆粒、抗体産生の増加等、免疫応答の下流のイベントを、T helper (Th) 2 細胞の活性化やそれに由来するサイトカインの産生増加を介して増悪することは明らかにされているが、生体・免疫応答のより上流、あるいは、より早期に起こるイベントにいかなる影響を与えているかは、十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、PM2.5 成分の複合曝露が、生体・免疫応答の始動イベントに関わる細胞である気道上皮細胞、抗原提示細胞等に及ぼす複合的影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

PM2.5 の Core として、元素状炭素粒子 (カーボンブラック: CB) 有機炭化水素化合物として、9,10-Phenanthrenequinone (9,10-PQ)、金属として、カドミウム (Cd) とした。

- (1) 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が気道上皮細胞に及ぼす影響に関する検討

正常ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B 細胞を使用した。コラーゲン I コートされたプレートに気道上皮細胞を播種し、無血清 LHC-9 培地を用いて培養した。semi-confluent な状態まで培養後、CB、有機炭化水素化合物及び金属を、単独、あるいは、複合的に曝露した。以下の 2 項目について検討した。

細胞生存能: Water soluble tetrazolium-1 (WST-1) を用いた比色法によりプレートリーダーを用いて測定を行った。具体的には、96 穴プレートに BEAS-2B 細胞を播種した。その 3 日後に CB、有機炭化水素化合物及び金属を、単独、あるいは、複合的に曝露し、37 °C で 24 時間インキュベートした。Premix WST-1 試薬を培地量の 10 分の 1 になるように添加した後、450 nm (参照波長 630 nm) で吸光度測定を行い、CB、有機炭化水素化合物及び金属の、単独、あるいは、複合的曝露が細胞活性に及ぼす影響を評価した。

サイトカインの産生: 免疫担当細胞の活性化に關与するサイトカイン等 (IL-6、IL-8 等) の測定を Enzyme linked immunosorbent assay (以下 ELISA) 法により行った。具体的には、12 穴プレートに BEAS-2B 細胞を播種し、そこに CB、有機炭化水素化合物及び金属を含む培地を添加し、単独、あるいは、複合的に曝露した。その 24 時間後に上清を回収し、5 分遠心 (4 °C、300 g) した後、製造元のプロトコルに従い、吸光度測定 (450 nm、参照波長は 550 nm) を行った。

- (2) 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が抗原提示細胞に及ぼす影響に関する検討

アトピー素因を有する NC/NgaTndCrJ 雄性マウスから大腿骨を摘出し、リコンビナントマウス顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子を含む培地で 8 日間培養することにより、抗原提示細胞を分化誘導した。得られた抗原提示細胞に、CB、有機炭化水素化合物及び金属を、単独、あるいは、複合的に曝露した。以下の 2 項目について、検討した。

異物の取り込み: 異物の取り込みに關与する細胞表面分子 DEC205 の発現をフローサイトメトリーにて測定した。具体的には、12 穴プレートにマウス抗原提示細胞を播種し、そこに CB、有機炭化水素化合物及び金属を含む培地を添加し、単独、

あるいは、複合的に曝露した。その24時間後、細胞を回収した。5分遠心(4、400g)した後、上清をアスピレーターで廃棄し、FACS Bufferに懸濁した。至適濃度に調製した蛍光標識モノクローナル抗体を加えて遮光し、4で45分放置した。細胞は、遠心洗浄した後、FACS Bufferに再懸濁し、蛍光をFACS Calibur(Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)により測定した。測定に先立ち、7AAD染色による解析結果を用いて、生細胞領域でゲートを作成した。生細胞領域において約1万個の細胞の蛍光データを用いて、陽性細胞率を指標にそれぞれの発現量を解析した。

サイトカインの産生：免疫担当細胞の活性化に關与するサイトカイン(IL-6)の測定をELISA法により行った。具体的には、12穴プレートにマウス抗原提示細胞懸濁液を播種し、そこにCB、有機炭化水素化合物及び金属を含む培地を添加し、単独、あるいは、複合的に曝露した。その24時間後に上清を回収し、5分遠心(4、300g)した後、製造元のプロトコルに従い、吸光度測定(450nm、参照波長は550nm)を行った。

### (3) 生体・免疫応答のネットワークに及ぼす影響の検討

マウス気道上皮細胞とマウス抗原提示細胞間のネットワーク解析のため、マウス気道上皮細胞の単離・培養を試みた。セルソーターを用いPE anti-mouse CD326(Ep-CAM) Antibody(+), APC Rat anti-Mouse CD31(-), PE/Cy7 anti-mouse CD45(30-F11)(-), 7-AAD(-)の細胞を単離後、カルチャーインサートに播種した。約280時間培養後、免疫染色を行った。具体的には、培養フィルター上の細胞をホルマリン固定しTritonX-100で透過処理した。1次抗体はZO-1 polyclonal antibody、2次抗体としてGoat anti-Rabbit IgG(H+L) Alexa Fluor® 488を使用した。その後Hoechst 33342 dyeで核染色を行った後、蛍光顕微鏡観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が気道上皮細胞に及ぼす影響に関する検討

#### 細胞生存能

CB非存在下では、Controlと比較すると、10µM Cd単独曝露、9,10-PQ単独曝露、1,10µM Cdと9,10-PQの複合曝露において、細胞活性の増加が認められた(\*\*p<0.01 versus control)。1,10µM Cd単独曝

露と比較すると、1,10µM Cdと9,10-PQの複合曝露は、相加的な細胞活性の増加を示した(§§p<0.01 each other)。CB存在下では、Controlと比較すると、CB単独曝露および1µM Cd単独曝露において、細胞活性の低下が認められた(\*\*p<0.01 versus control)。CB単独曝露および9,10-PQ単独曝露を比較したところ、細胞活性に差は認められなかった。同様に1,10µM Cd単独曝露および1,10µM Cdと9,10-PQの複合曝露を比較したところ、細胞活性に差は認められなかった。また、CB非存在下と存在下の間を比較すると、1,10µM Cd単独曝露、9,10-PQ単独曝露、1,10µM Cdと9,10-PQの複合曝露の全てにおいて、CBにより、細胞活性の低下を示した(##p<0.01 versus Cd and/or 9,10-PQ-exposed group at the same concentration in the absence of CB)(図1)。

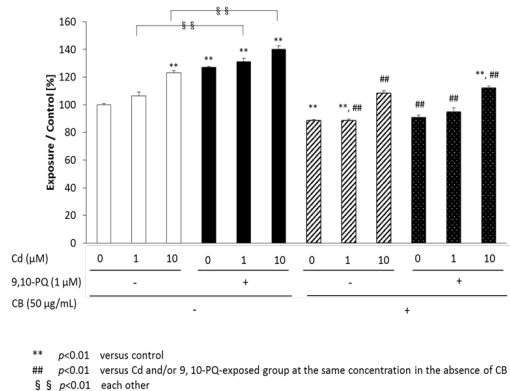


図1 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が気道上皮細胞の細胞活性に及ぼす影響

#### サイトカインの産生

##### <IL-6産生に及ぼす影響>

CB非存在下では、Controlと比較すると、10µM Cd単独曝露および10µM Cdと9,10-PQの複合曝露において、IL-6産生量の増加が認められた。10µM Cd単独曝露と比較すると、10µM Cdと9,10-PQの複合曝露は、IL-6産生量の増加を示した(§§p<0.01 each other)。CB存在下では、Controlと比較すると、CB単独曝露、1,10µM Cd単独曝露、9,10-PQ単独曝露、1,10µM Cdと9,10-PQの複合曝露において、IL-6産生量の増加が認められた。CB単独曝露および9,10-PQ単独曝露を比較したところ、IL-6産生量に差は認められなかった。同様に1,10µM Cd単独曝露および1,10µM Cdと9,10-PQの複合曝露を比較したところ、IL-6産生量に差は認められなかった。また、CB非存在下と存在下の間を比較すると、1,10µM Cd単独曝露において、CBによるIL-6産生量の増加が認められた(図2)。

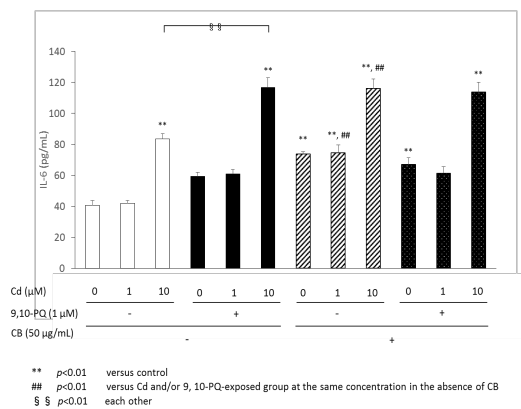


図 2 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が気道上皮細胞のIL-6産生に及ぼす影響

<IL-8産生に及ぼす影響>

CB非存在下では、Controlと比較すると、10 μM Cd 単独曝露および10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露において、IL-8 産生量の増加が認められた (\*\*  $p < 0.01$  versus control)。10 μM Cd 単独曝露と比較すると、10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露は、IL-8 産生量の増加を示した (§§  $p < 0.01$  each other)。CB 存在下では、Controlと比較すると、10 μM Cd 単独曝露および10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露において、IL-8 産生量の増加が認められた (\*\*  $p < 0.01$  versus control)。CB 単独曝露および9, 10-PQ 単独曝露を比較したところ、IL-8 産生量に差は認められなかった。同様に1, 10 μM Cd 単独曝露および1, 10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露を比較したところ、IL-8 産生量に差は認められなかった。また、CB 非存在下と存在下の間を比較すると、10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露において、CB により、IL-8 産生量の低下が認められた (###  $p < 0.01$  versus Cd and/or 9,10-PQ-exposed group at the same concentration in the absence of CB) (図3)。

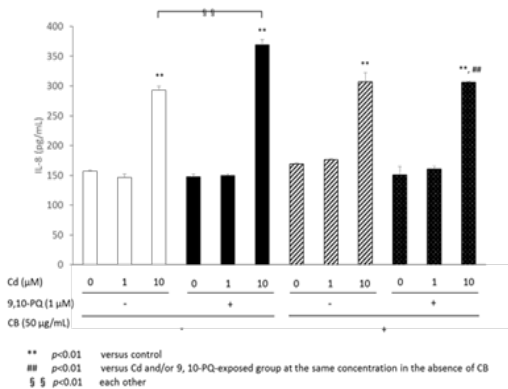


図 3 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が気道上皮細胞のIL-8産生に及ぼす影響

(2) 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が抗原提示細胞に及ぼす影響に関する検討

異物の取り込み

CB 非存在下では、Controlと比較すると、1, 10 μM Cd 単独曝露、9, 10-PQ 単独曝露、1, 10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露の全てにおいて、陽性細胞率の増加に有意な差は認められなかった。一方、CB 存在下では、Controlと比較すると、10 μM Cd 単独曝露、10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露において、陽性細胞率の増加が認められた (\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  versus control)。10 μM Cd 単独曝露および10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露を比較したところ、陽性細胞率に有意な差は認められなかった。また、CB 非存在下と存在下の間を比較すると、10 μM Cd 単独曝露において、CB により、陽性細胞率の増加を示した (#  $p < 0.05$  versus Cd and/or 9,10-PQ-exposed group at the same concentration in the absence of CB)。また、10 μM  $SO_4^{2-}$  単独曝露は、Controlと比較すると、陽性細胞率の増加に有意な差は認められなかった(図4)。

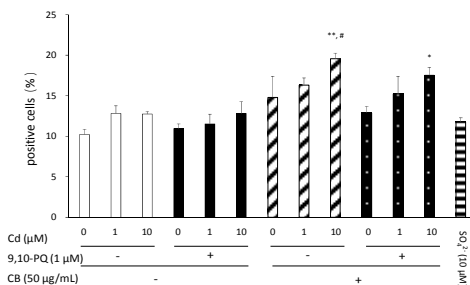


図 4 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が抗原提示細胞のDEC205発現に及ぼす影響

サイトカインの産生

CB 非存在下では、Controlと比較すると、10 μM Cd 単独曝露および10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露において、IL-6 産生量の増加が認められた (\*\*  $p < 0.01$  versus control)。10 μM Cd 単独曝露および10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露を比較したところ、IL-6 産生量に有意な差は認められなかった。一方、CB 存在下では、Controlと比較すると、CB 単独曝露、1, 10 μM Cd 単独曝露、9, 10-PQ 単独曝露、1, 10 μM Cd と9, 10-PQ の複合曝露の全てにおいて、IL-6 産生量に有意な差は認められなかった。また、CB 非存在下と存在下の間を比較すると、有意な差は認められなかった。また、10 μM  $SO_4^{2-}$  単独曝露は、Controlと

比較すると、IL-6 産生量の増加に有意な差は認められなかった (図 5)。

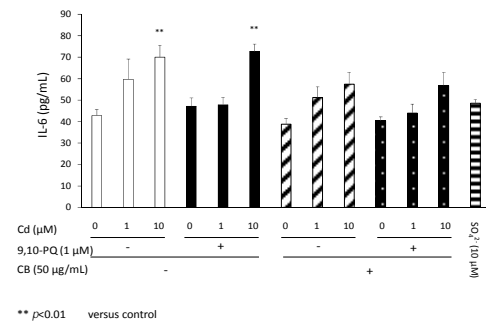


図 5 元素状炭素粒子と有機炭化水素化合物、金属等の複合曝露が抗原提示細胞の IL-6 産生に及ぼす影響

### (3) 生体・免疫応答のネットワークに及ぼす影響の検討

ZO-1 蛍光抗体を指標に、気道上皮細胞の適切な単離・培養がなされているかどうかの確認を行ったが、十分な蛍光を確認できなかった。単離・培養法の改良が必要であることが示された。

### (4) まとめ

Cd 単独では、気道上皮細胞に対しては、細胞活性の上昇、IL-6, IL-8 の上昇を、抗原提示細胞に対しては、IL-6 の上昇を示した。Cd+PQ 複合曝露では、気道上皮細胞に対して、相加・相乗的な細胞活性の上昇、IL-6, IL-8 の上昇を示した。一方、CB 単独では、細胞活性の低下を示し、Cd+CB 複合曝露では、抗原提示細胞の異物取り込みに関与する細胞表面分子の発現を増加させた。このように、PM2.5 成分の作用点は様々で、単独で影響を示す場合と、複合曝露によって、相加相乗的な影響を示す場合があった。

PM2.5 成分は、気道上皮細胞や抗原提示細胞に対して単独あるいは複合的に影響を示し、呼吸器疾患の悪化に関与していることを見出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Honda A, Chowdhury PH, Ito S, Okano H, Onishi T, Kawaryu Y, Ueda K, Takano H. Synergic effects of 9,10-phenanthrenequinone and cadmium on pro-inflammatory responses in airway epithelial cells. Environ Toxicol Pharmacol. 査読有, 52, 2017, 276 - 279.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]  
 特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本田 晶子 (Honda, Akiko)  
 京都大学大学院工学研究科・助教  
 研究者番号： 20454324

### (2) 研究分担者 なし

### (5) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者 なし