

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17077

研究課題名(和文)好中球のダイニングメッセージに着目した粒子状物質誘導炎症の解析

研究課題名(英文) Analysis of particulate matter induced-inflammation that was focused on neutrophil endocytosis

研究代表者

三宅 伸完 (Miyake, Tadaihiro)

産業医科大学・大学病院・助教

研究者番号：10644023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：粒径の違うシリカ粒子で好中球を刺激後、フローサイトメーターで解析した所、1  $\mu$ mの粒子が最もエンドサイトーシス(食)されることが示され、ダイナミンのPHドメイン阻害剤はエンドサイトーシスを抑制した。TLR4KOマウス、MyD88 KOマウス由来の好中球では粒子のエンドサイトーシスが減少し、エンドサイトーシスにより酸化ストレスが誘発されたが、抗酸化剤NACの存在下では促進された。HO-1、p62の発現量はエンドサイトーシスにより増強され、ダイナミン阻害剤で減弱した。好中球はエンドサイトーシスによりIL-6やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生した。これらの産生もダイナミン阻害剤で抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、粒子状物質の粒子径の相違が好中球のエンドサイトーシスや活性酸素種の産生にどのように影響するかを解明した。好中球の粒子状物質のエンドサイトーシス能は粒径により異なり、特に1  $\mu$ mの粒子は効率よくエンドサイトーシスすることが明らかになった。抗酸化剤NACがエンドサイトーシスを促進することから、活性化した或いは炎症部位に浸潤した好中球では、エンドサイトーシスがROS産生の第一歩となっているのかもしれない。

生活環境下では、色々な粒子に曝露されていることが予想され、それらを予防する際に、標的細胞、或いは標的分子を絞るなど、上記の成果が応用できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of PM particle size on neutrophils, including their endocytosis activity and reactive oxygen species (ROS) production. Flow cytometry analysis indicated that 1  $\mu$ m particles are readily endocytosed by neutrophils. Inhibitors of the pleckstrin homology domain of dynamin repressed this process; however, GTPase and clathrin inhibitors did not affect endocytosis. Endocytosis by neutrophils in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and MyD88-knockout mice was reduced compared with that in wild-type mice. Neutrophil-mediated endocytosis caused oxidative stress, and expression levels of the oxidative stress markers, heme oxygenase-1 and p62 protein, were increased in an endocytosis-dependent manner. We observed that infiltrated CD11b-positive cells in bronchoalveolar lavage fluid endocytose PMs. Overall, these results indicate that endocytosis and ROS production via TLR4 are important for the initiation of immune responses by neutrophils.

研究分野：免疫学

キーワード：好中球 ダイナミン 酸化ストレス TLR4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

日本をはじめ多くのアジアの国で微小粒子状物質(PM2.5)による大気汚染が深刻化している。中国では大都市部の死亡原因における32%がPM2.5に関連していると報告され(Fang D., et al. Sci Total Environ 569-570; 1545-1552, 2016)。また日本国内のコホート研究ではPM2.5が10 µg/m<sup>3</sup>上昇すると呼吸器疾患による死亡は16%、肺癌による死亡は24%上昇すると報告されている(Katanoda K., et al. J Epidemiol 21; 132-143, 2011)。

これまでに申請者のグループは、越境汚染物質である黄砂やPM2.5の生体影響について、動物実験を通して解析し報告してきた。PM10に属する黄砂の影響に関しては、オボアルブミン(OVA)由来の肺の好酸球増加を増悪させること(Ichinose T., et al. Arch Environ Contam Toxicol 55;348-357, 2008)、またその増悪機構には免疫細胞の自然免疫を司る細胞表面上の受容体TLR2/TLR4が関与していること(He M., et al. Toxicol Appl Pharmacol 296;61-72, 2016)を証明した。加えて、肺以外の炎症に関しても、脾臓における転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化を介した免疫修飾反応を誘導し、それは肺の炎症とは違うタイミング(遅発的に)で起こること(Song Y., et al. Environ Toxicol 30;549-558, 2013)などを証明した。またPM2.5については、肺の好中球浸潤を引き起こし、炎症やアレルギー性疾患のリスクファクターとなること(He M., et al. Inhal Toxicol 27;287-299, 2015)、マクロファージの炎症と酸化ストレス反応を引き起こすこと(Bekki K., et al. Environ Toxicol Pharmacol 45;362-369, 2016)などを報告してきた。

これらのことから、粒子のサイズにより炎症反応に違いがあり、特にPM2.5に関しては一過性の肺の炎症は引き起こすものの全身性には負に免疫応答が制御される傾向があり、それは粒子が直接、全身に対して影響を及ぼす可能性の他に、取り込んだ場所、肺で起きた現象の続きが負の制御として観察されているのでは、という作業仮説を立案した。即ち粒子を吸い込んだ際、好中球の浸潤が見られ、その好中球による粒子の貪食が、引き続き起こる負の制御に何らかの関連があるのではないかと考えた。しかしながら現在まで粒径の相違、PM2.5の構成成分の違いと、生体影響との関連性についての解析は十分には行われていない。更には肺の炎症初期に重要である好中球に焦点を当てた研究も見当たらない。

## 2. 研究の目的

上記1の背景のもと、本研究課題では肺での初期炎症を模倣するため、炎症誘導性好中球を調整し、それらに対し異なる粒径の粒子状物質の作用を、細胞内シグナル伝達の観点から解析する課題を提案した。この炎症誘導性マウス好中球を用い、(1)粒径の違う粒子を準備し、in vitroで好中球への影響を解析する。実際に採取されるPM2.5には種々の免疫修飾物質が付着している。そこで、(2)それら免疫修飾物質のin vitroでの好中球への影響を解析する。これらから好中球炎症の観点から、粒子状物質による炎症惹起メカニズムについて解析する。生体影響に関しては、申請者のグループが報告してきたメカニズムにも考慮し、種々の(3)ノックアウトマウスを用いた解析を行い、粒子状物質が取り込まれる際に重要な細胞表面受容体のサイトカイン産生や分子活性化における役割を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) <細胞調製>

#### 好中球の調製

6週齢雌のBALB/cマウス、および各種KOマウス(TLR2-KO、TLR4-KO、MyD88-KO)の腹腔内に4%チオグリコレート2mlを注射し、4時間後にHANKsで腹腔内を洗浄して腹腔内洗浄液を採取

する。遠心して得られた細胞に RPMI を加えて細胞懸濁液を作成する。

フローサイトメトリーによる好中球表面マーカーの解析

細胞を  $2 \times 10^5$  個エッペンチューブにとり、抗 CD4/violet、抗 CD11b/cy5.5、抗 Gr1/FITC、抗 F4/80/PE の 4 種の蛍光抗体で細胞を染色後、フローサイトメトリーで細胞を解析する。

細胞培養上清・細胞溶解液の調整

24 ウェルプレートに  $5 \times 10^5$  個の好中球をまき、粒径の異なる蛍光シリカ粒子による刺激を行い、3 時間後に回収する。遠心をかけて細胞上清を回収し、細胞は RIPA バッファーを加えて細胞溶解液を作成する。

(2) < 解析項目 >

粒子貪食能の解析

好中球を異なる粒径 ( $0.1 \mu\text{m}$ 、 $0.3 \mu\text{m}$ 、 $1 \mu\text{m}$ 、 $3 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m}$ ) の蛍光標識シリカ粒子 (コアフロント社より購入) で刺激し、3 時間後の様子を蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス社) 共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターで観察・解析する。

炎症性サイトカイン産生の検出

常法のサンドイッチ ELISA 法を用い、細胞上清中のサイトカイン量 (IL-6, TNF- $\alpha$ ) を測定する。

タンパクの検出: ウェスタンブロット法

細胞溶解液より等量のタンパク ( $10 \mu\text{g}$ ) を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写する。分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) や酸化ストレス関連分子等の標的タンパクに特異的な抗体を用い、イムノプロットする。バンドの発色は ImmunoStar LD detection system で行い、シグナル強度は ImageJ software で定量する。標的タンパクの発現レベルは  $\beta$ -actin で標準化する。

#### 4. 研究成果

調製した腹腔内浸潤細胞をフローサイトメトリーによりを用いて解析した結果、細胞が好中球 (CD11b 陽性) であることを確かめた (図 1)。以降の研究ではチオグリコレート誘導腹腔滲出細胞を好中球として使用した。この好中球の蛍光標識粒子のエンドサイトーシスを顕微鏡下で観察したところ、確かに複数の粒子が細胞内に取り込まれている様子が観察された (図 2)。

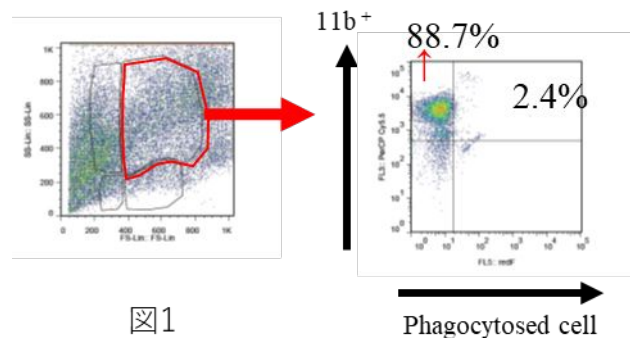


図1

フローサイトメーターで定量的にエンド

サイトーシスを評価できることが分かったので、次に種々の粒径の蛍光標識粒子でエンドサイトーシスを解析した。図 3 に示すように、好中球は  $1 \mu\text{m}$  の大きさの粒子を好んでエンドサイトーシスし、このエンドサイトーシスは、低温 ( $4^\circ\text{C}$ ) で実験を行うと既報にあるように減弱した。

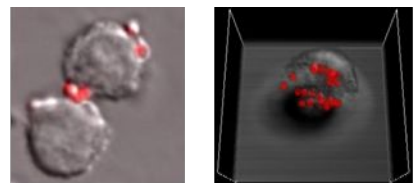


図2 好中球が粒子を貪食している様子

次にどのように粒子がエンドサイトーシスされるかを調べるために、阻害剤を用いた実験を行った。標的としてエンドサイトーシスの初期のイベントに重要である、ダイナミンとクラスリンに着目し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

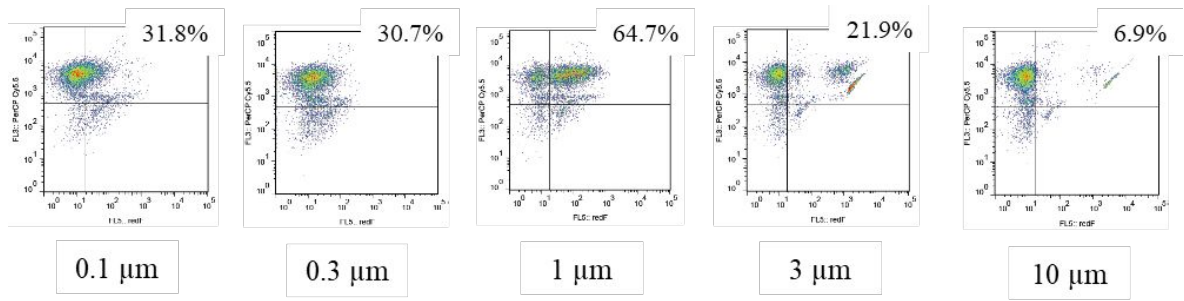


図3 好中球は1 μmの粒子をより好んで貪食する

ダイナミンの PH  
ドメイン阻害剤は  
エンドサイトーシ  
スを抑制するが、  
ダイナミンの  
GTPase 阻害剤およ  
びクラスリン阻害  
剤の効果は認めら  
れなかった(図4)。  
更に、LPS の受容体  
である TLR4KO マウ  
ス、その下流分子  
である MyD88 KO マ

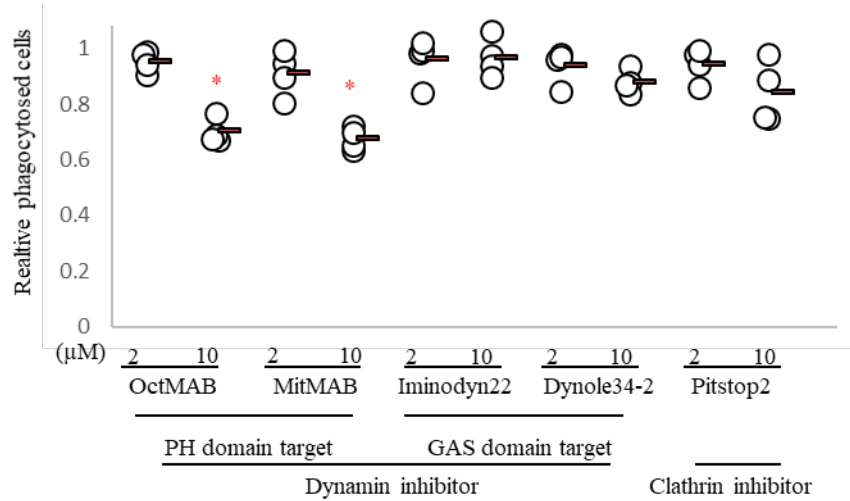


図4 ダイナミン阻害剤は好中球の貪食を阻害する

ウス由来の好中球では、粒子のエンドサイトーシスが減少した。NF- $\kappa$ B を活性化する TNF- $\alpha$  による前処理はエンドサイトーシスを若干増強させ、NF- $\kappa$ B を活性化させる IKK に対する阻害剤存在下では有意にエンドサイトーシスを抑制した。またエンドサイトーシスの際、TLR の発現は減弱した。粒子のエンドサイトーシスをする際、酸化ストレスが誘発されたが、TLR4 KO マウスでは減弱していた(図5)。加えて抗酸化剤 NAC の存在下ではエンドサイトーシスは促進された。また ROS の産生はダイナミン阻害剤により減弱し、酸化ストレス反応のマーカである H0-1、p62 の発現量はエンドサイトーシスにより増強された。好中球はエンドサイトーシス

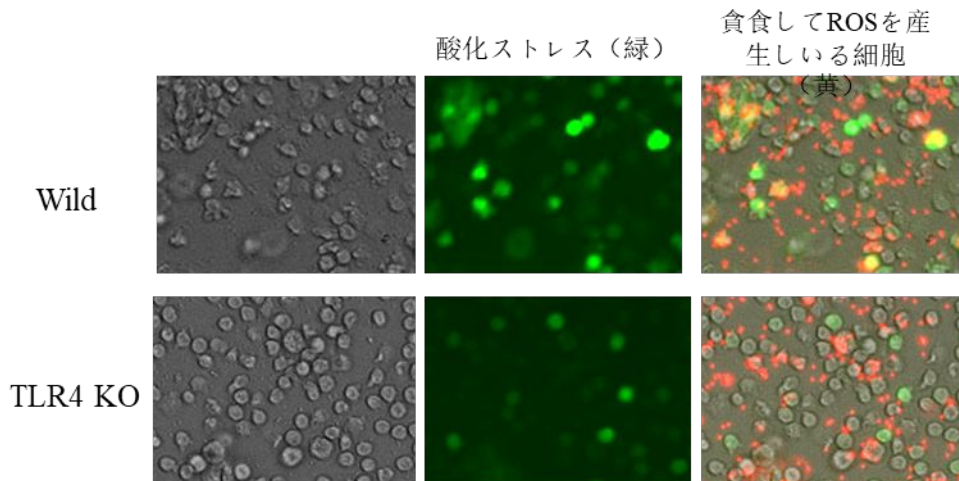


図5 ダイナミン阻害剤は好中球の貪食を阻害する

により IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを産生した。これらの産生もダイナミン阻害剤で抑制された。

以上より、活性化した或いは炎症部位に浸潤した好中球は、PM 誘導性炎症事象の鍵となる細胞であり、ダイナミンの PH ドメインを介したエンドサイトーシスにより酸化ストレスを含む炎症が引き起こされることがわかった。

## 5 . 主な発表論文等

### (1)〔雑誌論文〕(計 1 件)

Endocytosis of particulate matter induces cytokine production by neutrophil via Toll-like receptor 4.

Miyake T, Wang D, Matsuoka H, Morita K, Yasuda H, Yatera K, Kanazawa T, Yoshida Y.  
Int Immunopharmacol. 2018 Apr;57:190-199. doi: 10.1016/j.intimp.2018.02.020. Epub 2018 Mar 6. 査読有

### (2)〔学会発表〕(計 5 件)

Duo Wang, Kentaro Morita, Mengyue Shen, Tadahiro Miyake, Yasuhiro Yoshida

Inhibition of p38 regulate endocytosis of neutrophil

第 49 回日本免疫学会学術集会 (福岡) 2018 年

Yasuhiro Yoshida, Tadahiro Miyake, Duo Wang, Mengyue Shen, Kentaro Morita

Endocytosis of particulate matter of neutrophils induced oxidative stress through dynamin

EIC2018 (国際学会) 2018 年

Yoshida Y, Yuan Song, Cuiying He, Duo Wang, Tadahiro Miyake, Mengyue Shen, Kentaro Morita

Particulate matters (PM10 and PM2.5) complicatedly modulate immune responses with organic compounds

Symposium Annual seminar in Hebei medical school (国際学会) 2017 年

Yasuhiro Yoshida, Tadahiro Miyake, Duo Wang, Kentaro Morita

Endocytosis of particulate matter and cytokine production of neutrophils induced oxidative stress

フォーラム 2017 : 衛生薬学・環境トキシコロジー 2017 年

Yasuhiro Yoshida, Tadahiro Miyake, Wang Duo, Kentaro Morita

Endocytosis and cytokine production by neutrophils is mediated through TLR4 and dynamin proteins and inhibited by ROS Production

2017 年度生命科学系学会合同年次大会、シンポジウム 2017 年

## 6 . 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名 : 王 铎

ローマ字氏名 : Wang Duo

研究協力者氏名：吉田 安宏

ローマ字氏名：Yoshida Yasuhiro