

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06848

研究課題名(和文)浮遊粒子状物質によるインフラマソーム活性化におけるレドックス制御の仕組みの解明

研究課題名(英文)Elucidation of redox control in inflammasome activation by suspended particulate matter

研究代表者

小野寺 章 (Onodera, Akira)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：40598380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大気中の浮遊粒子状物質(SPM)は、様々な疾患の発症・悪化との関連が危惧されている。本研究では、SPMの細胞内・生体内での蓄積性に着目した研究を進め、リソソームでのSPMの蓄積を原因とするリソソームのpH恒常性の低下、リソソームに局在するToll様受容体を介するインターフェロン産生の阻害をヒトの気道上皮細胞や樹状細胞を用いた解析で明らかとした。さらに、皮下に投与したSPMがリンパ節へ運ばれ、半年経過してもリンパ節に蓄積し続けることを動物実験から明らかとした。以上は、免疫力の要となるリソソームとリンパ節の機能阻害を意味するものであり、免疫力低下との関連を強く示唆する成果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内に取込まれる大気中の浮遊粒子状物質(SPM)は、免疫の力で対処する必要があり、どのような影響の原因となるかの分子機序の解明が求められる。本研究では、これまで明らかでない蓄積性と免疫力との関連を見出し、さらにリソソームがその中心となることを明らかとした。近年、リソソームの恒常性の維持がCOVID-19を含めた複数の疾患治療の標的として注目されており、本研究成果はこれら創薬開発の一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Suspended particulate matter (SPM) in the air is a matter of great concern as it is associated with various disease incidences/exacerbations. This study focused on the intracellular and in vivo SPM accumulation in the lysosomes of human airway epithelial cells and dendritic cells to understand its role in the deterioration of lysosomal pH homeostasis and inhibition of interferon production via Toll-like receptors localized in the lysosomes. Additionally, animal experiments showed that subcutaneous SPM administration transported it to the lymph node, and it was associated with continuous accumulation in the lymph node even after 6 months. The above finding indicates that SPM inhibits the function of lysosomes and lymph nodes, which are the cornerstones of immunity, suggesting a relationship between SPM and a weak immune system.

研究分野：免疫毒性学

キーワード：PM2.5 インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト健康の脅威と考えられている大気中の浮遊粒子状物質 (SPM) は、免疫の活性化因子 (LPS・アジュバント分子) やアレルゲン (OVA や花粉) と共に曝露することで、IL-8 や IL-10 などの炎症性サイトカインの増加、好酸球・好中球の曝露部位への浸潤など、炎症性疾患の原因または増悪との関連が危惧されている。一方、これらの原因となる炎症の慢性化を無菌性の SPM がどのように引き起こすか明らかでない。

2. 研究の目的

生体内外を由来とする様々な無菌性物質は慢性炎症性疾患の原因として知られている。痛風では、尿酸結晶のリソソームへの蓄積によって NLRP3 インフラマソームが活性化し、炎症性サイトカインが過剰に産生される。本機序は、SPM による種々炎症性疾患の悪化との関連が示唆されており、これらの関連について研究を進めた。

SPM は環境を由来とする微小な粒子であり、炭素を主な構成因子とする。細胞内・生体内には SPM を分解する酵素や器官は存在せず、一度取込んだ SPM はそのまま残存すると想定された。粒子の蓄積はインフラマソーム活性化の強力な原因と考えられ、その機序としてラジカル産生を伴うレドックス制御との関連が強く示唆された。一方、SPM を蓄積した細胞は、リソソームの pH 安定性が低下し、さらに細胞性免疫に関わる機能が低下していた。本報告では、SPM の蓄積による細胞・生体レベルでの新知見を以下にまとめる。

3. 研究の方法

(1) ヒト気道上皮細胞における SPM の蓄積とリソソーム内の酸性 pH の恒常性への影響

ヒト気道上皮細胞株の BEAS-2B 細胞へ SPM の一種である自動車排出粒子 (VEP) を 24 時間処置した。培養上清に残った VEP を洗浄・除去し、新しい培地で 1 日または 3 日間培養した。リソソーム内への VEP の移行・蓄積性を透過型電子顕微鏡で観察した。

BEAS-2B 細胞へ VEP を 48 時間処置した。リソソーム内の酸性環境が維持されるか否かを明らかにするため、酸性環境に取込まれ、かつ酸性環境特有の蛍光を発する Acridine Orange で染色し、共焦点走査型レーザー顕微鏡で撮影・画像化した。

(2) ヒト形質細胞様樹状細胞の貪食能への SPM の蓄積の影響

ヒト形質細胞様樹状細胞株の PMDC05 細胞へ SPM の一種であるディーゼル排気微粒子 (DEP) または横浜市の大気から採取した微小粒子状物質 (PM_{2.5}) を 48 時間処置した。培養上清に残った DEP または PM_{2.5} を洗浄・除去し、赤色蛍光で標識された直径 300 nm の非晶質シリカ微粒子、または黄緑色蛍光で標識された直径 750 nm のポリスチレン微粒子を含有した培地で 24 時間培養した。蛍光標識微粒子を取込んだ細胞の数と取込み量をフローサイトメーターで測定した。

(3) ヒト形質細胞様樹状細胞における Toll 様受容体 (TLR) を介するサイトカイン酸性応答への SPM の蓄積の影響

PMDC05 細胞へ DEP または PM_{2.5} を 48 時間処置した。培養上清に残った DEP または PM_{2.5} を洗浄・除去し、細胞膜上で細菌を認識する TLR4 のアゴニスト (Lipid A) またはリソソーム内で一本鎖 RNA ウイルスを認識する TLR7 のアゴニスト (Gardiquimod: GDQ) を 6 時間処置した。これら細胞から抽出した RNA から cDNA を合成し、SYBR Green 色素を用いて Interferon (INF)-alpha1/13、INF-alpha2、INF-beta の mRNA 発現量を Ct 法に基づく定量的 RT-PCR により評価した。

(4) マウスのリンパ節への SPM の移行性と蓄積性

4 週齢の雌性 ICR マウスの背部皮下へ 1 週間おきに 2 回、DEP を投与した。最終投与から 1、3、6 カ月後、投与部位近傍のリンパ節 (腋窩リンパ節) を摘出した。4% Paraformaldehyde (4% PFA) で一晩浸漬固定し、リンパ節全体のデジタル写真を撮影した。次に、パラフィン包埋切片を作成し、PAS 染色を実施した。黒色の DEP が観察される領域のデジタル写真を顕微鏡下で撮影した。

4. 研究成果

(1) SPM はリソソームの酸性 pH の恒常性を低下させる

リソソームは、細胞内に取込まれた異物や細胞内の不要物を分解する唯一の細胞小器官である。内腔は pH5 前後になっており、この環境を至適 pH とする数十種類の加水分解酵素が含まれている。分解基質は、タンパク質・脂質・核酸などの生体成分であり、ウイルスの分解も担っている。SPM の細胞内取込み・輸送経路は明らかでないが、エンドサイトーシス経路によってリソソームへと運ばれると考えられる。

そこで本研究は、ヒト気道上皮細胞株の BEAS-2B を用い、単純な曝露実験によって SPM の一

種である VEP のリソソーム移行性・蓄積性を明らかにすると共に、リソソームの pH 恒常性への影響を追求した。VEP は黒色の粉体であり、水溶液中では溶解することなく分散した状態で維持される。この VEP 分散液を細胞に処置すると、数時間程度で細胞への VEP の取込みが肉眼でも容易に観察され、24 時間後においては細胞質全体が真っ黒な状態となった（データ未掲載）。次に、VEP を蓄積した細胞をさらに 1 日または 3 日間培養し、リソソーム内の VEP の蓄積性を観察すると、多数の VEP が残存することが透過型電子顕微鏡観察により明らかとなった（Fig. 1 a）。

リソソーム酵素は酸性環境で活性をもち、pH7 前後の細胞質ではほとんど活性を示さないと考えられている。痛風の原因物質の一つと考えられている尿酸結晶は、関節腔内のマクロファージ・樹状細胞または滑膜細胞により取込まれ、過剰な炎症性物質を産生すると考えられている。これら細胞内では、尿酸結晶の蓄積したリソソームで傷害が起こり、これを起点とする炎症反応が惹起されると考えられている。SPM においても類似の影響が考えられ、本研究ではリソソームの酸性 pH の恒常性への VEP の影響を検討した。VEP を蓄積させた BEAS-2B 細胞へ酸性環境で蛍光を発する AO を処置すると、細胞質に点在するリソソーム由来の蛍光の減弱が観察された（Fig. 1 b）。

以上は、VEP は細胞内に容易に取込まれ、またリソソーム内で分解されることなく蓄積し、リソソームの酸性 pH の恒常性を低下させることが明らかとなった。

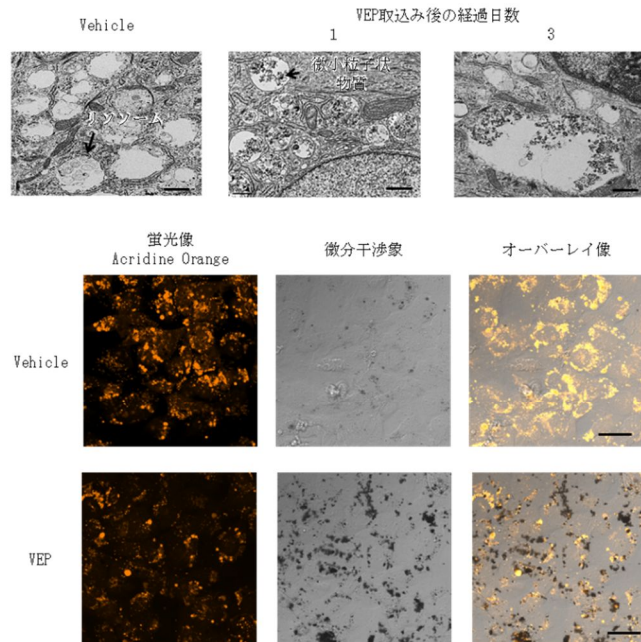


Figure 1. 微小粒子状物質のリソソーム内への蓄積と酸性pH安定性への影響
(a) ヒト気道上皮細胞株のBEAS-2B細胞へ微小粒子状物質(VEP)またはVehicleを24時間処置した。培養液を入れ換え、さらに1日または3日間培養した。これら細胞のリソソームの構造を透過型電子顕微鏡で観察した。(b) BEAS-2B細胞へ微小粒子状物質またはVehicle (D-PBS)を48時間処置した。Acridine Orangeで染色し、酸性領域での特異的な蛍光像を共焦点走査型レーザー顕微鏡で撮影し画像化した(Ex/Em max = 480/650 nm)。Scalebars: (a) = 500 nm; (b) = 30 μ m。

(2) SPMの蓄積により貪食能が低下する。

生体内に侵入した細菌やウイルスは、自然免疫の第一関門であるマクロファージや樹状細胞により貪食される。この反応はファゴサイトーシスと呼ばれ、細胞と同程度の大きさの異物を取込むことが知られている。これら貪食細胞は、生体内で数週間から数カ月間生存すると考えられており、日々繰り返される異物の侵入を監視している。様々な経路から侵入した SPM においても、これら細胞により認識され、細胞内ではリソソーム分解系へ運ばれると考えられる。一方、SPM の細胞内での分解は不可能であり、SPM の蓄積によってリソソームでの消化不良が発生し、貪食能が低下すると考えられた。

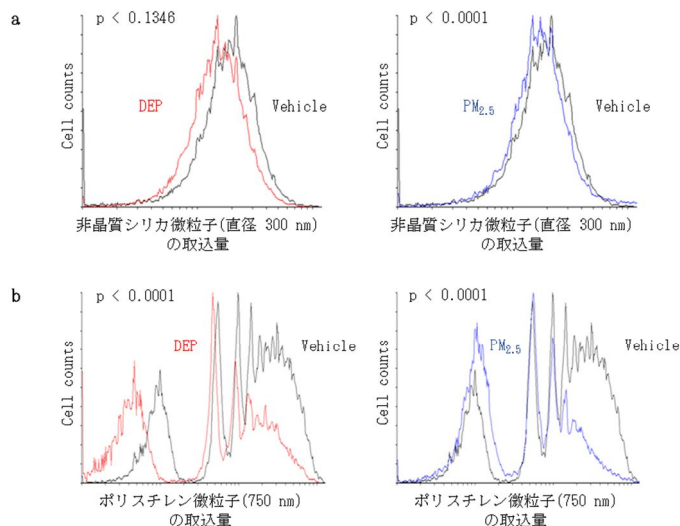


Figure 2. 微小粒子状物質を蓄積した樹状細胞における貪食能の評価
ヒト形質細胞様樹状細胞株のPMDC05細胞へ微小粒子状物質 (DEP、またはPM_{2.5}) またはVehicle (D-PBS)を48時間処置した。培養液を入れ換え、(a)赤色蛍光で標識された直径300 nmの非晶質ナノシリカ微粒子、または(b)黄緑色蛍光で標識された直径750 nmのポリスチレン微粒子を処置した。24時間後、縦軸をCell counts、横軸を各蛍光標識微粒子の取込み量((a) = PE、(b) = FITC)とするデータをフローサイトメーターで取得した。これらデータは、Kaleida Graphソフトウェアを用いWilcoxon rank sum testで統計的有意差を算出した。

そこで本研究は、ヒト形質細胞様樹状細胞の PMDC05 細胞へ SPM の一種 DEP または PM_{2.5} を予め曝露し、その後、2 種類の蛍光物質で標識された粒子をどの程度貪食するか検討した。本解析で用いた蛍光標識の粒子は、300 nm と 750 nm の異なるサイズを用いており、この大きさによって取込み機序が異なる。大まかには、500 nm が境界線となり、500 nm 以下であればクラスリンやカベオリンの関与するエンドサイトーシス、500 nm 以上であればアクチンの関与するファゴサイトーシスと考えられている。DEP の前曝露においては、ファゴサイトーシスが有意に低下し、PM_{2.5} であればエンドサイトーシス・ファゴサイトーシス共に有意に低下した（Figure 2 a, b）。

以上は、DEP や PM_{2.5} がリソソームに蓄積することで、自然免疫に基づく抵抗力が低下すると考えられた。

(3) SPMの蓄積によりTLR7を介するインターフェロン産生が低下する。

細胞には細菌やウイルスの特異的な構造を認識する受容体がセンサー分子として発現している。ヒトのマクロファージや樹状細胞には、この役割を担うToll様受容体(TLR)が細胞膜または細胞内に局在・分布している。TLRは異物を認識すると共に様々な感染防御システムを活性化・成立させ、その一つにI型インターフェロン(INF)産生が挙げられる。INFはウイルス感染に対する初期防御反応で重要な役割を果たす生理活性物質であり、一般化言語化されている免疫力の指標の一つともいえる。前項の貪食能も免疫力の指標の一つであり、INF産生においてもSPMに蓄積による低下が想定される。

そこで本研究は、細胞膜上での細菌の感染を監視するTLR4、リソソーム内でのウイルス(一本鎖RNA)の感染を監視するTLR7を介するINF産生へのSPMの蓄積の影響を検討した。また本解析では、TLR4とTLR7のアゴニストを用いており、前者はグラム陰性菌の細胞壁の外側に局在するLipopolysaccharideにおいてTLR4の活性中心となるLipid Aを用い、後者はイミダゾキノリン類似体のGardiquimod(GDQ)を用いた。INF産生においては、INF-alpha1/13とINF-alpha2及びINF-betaのmRNA発現量を指標に評価した。

PMDC05細胞におけるINF-alpha1/13とINF-alpha2のmRNA発現は、Lipid AまたはGDQにより1.5~2倍程度有意に増加し、INF-betaはGDQにより数千倍の有意な増加が確認される(Fig. 3)。一方で、DEPまたはPM_{2.5}を蓄積したPMDC05細胞においては、GDQによるINF-alpha2とINF-betaのmRNA発現が有意に抑制された(Fig. 3)。

以上は、DEPやPM_{2.5}による影響がリソソームへのSPMの蓄積が原因であることを強く示唆するものであり、SPMの細胞内での蓄積によって免疫力・抵抗力が低下すると強く示唆された。

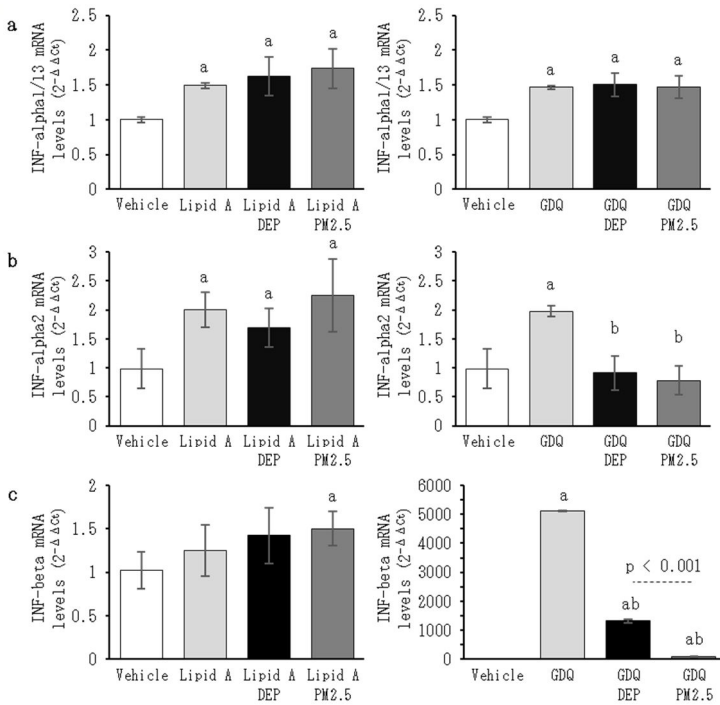


Figure 3. 微小粒子状物質を蓄積した樹状細胞におけるINF mRNA発現応答への影響
ヒト形質細胞様樹状細胞株のPMDC05細胞へ微小粒子状物質 (DEP、またはPM_{2.5})またはVehicle (D-PBS)を48時間処置した。培養液を入れ換えLipid A、GDQまたはVehicle(D-PBS)で8時間処置した。これら細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成した。ΔΔCt法に基づく定量的RT-PCRにより、(a)INF-alpha1/13、(b)INF-alpha2、(c)INF-betaのmRNA発現量を定量評価した。これらデータは、Kaleida Graphソフトウェアを用いANOVA & Tukey's honestly significant difference testで統計的有意差を算出した。*p < 0.001 vs. Vehicle; *p < 0.001 vs. GDQ.

(4) 生体内に曝露された SPM はリンパ節へと運ばれ蓄積し続ける。

生体内に取込まれた異物はマクロファージや樹状細胞により取り込まれ、免疫応答の場であるリンパ節へ運ばれる。細菌やウイルスであればこれらの過程でペプチド抗原に分解され、T 細胞・B 細胞へ提示され、細胞性免疫・液性免疫を活性化する。一方で、SPM の分解は不可能であり、構造を維持した状態でリンパ節に集積すると考えられる。

そこで本研究は、ICR マウスの背部皮下へ DEP を 1 週間に 2 回 (Day 0 と Day 7) 投与し、その 2 週間後に外科的に投与部位から DEP を除去、さらに 1、3、6 カ月後に投与部位近傍のリンパ節 (腋窩リンパ節) を摘出し、DEP の蓄積の状態を観察した。DEP は VEP と同様に黒色の粉体であり、水溶液中では溶解することなく分散した状態で

維持される。摘出したリンパ節は、肉眼で容易に確認できるほど内部での DEP の蓄積が観察され、蓄積期間は最長で 6 カ月 (本実験での最長の条件) であった (Fig. 4 a)。リンパ節内部での DEP の蓄積部位やこれらに関わる細胞を明らかにするため、パラフィン包埋切片を作成し PAS 染色標本を作製した。リンパ節内には、DEP と考えられる大量の黒色顆粒が蓄積しており、これらを貪食したマクロファージや樹状細胞と思われる多角形または突起構造を有する細胞が、B 細胞領域、T 細胞領域に見られた (Fig. 4 b)。また、DEP の蓄積は髄洞に近い髄索で顕著であった。また、顕微鏡で見られる PAS 染色標本の範囲においては、DEP 投与後の期間が長くなっても DEP の蓄積の程度は変わっていなかった (Fig. 4 b)。

以上は、生体内に取込まれた SPM は貪食細胞により取込まれ、リンパ節へと運ばれることを示している。一方で、リンパ節では SPM の分解や排泄は機能しておらず、SPM が蓄積し続けることが明らかとなった。

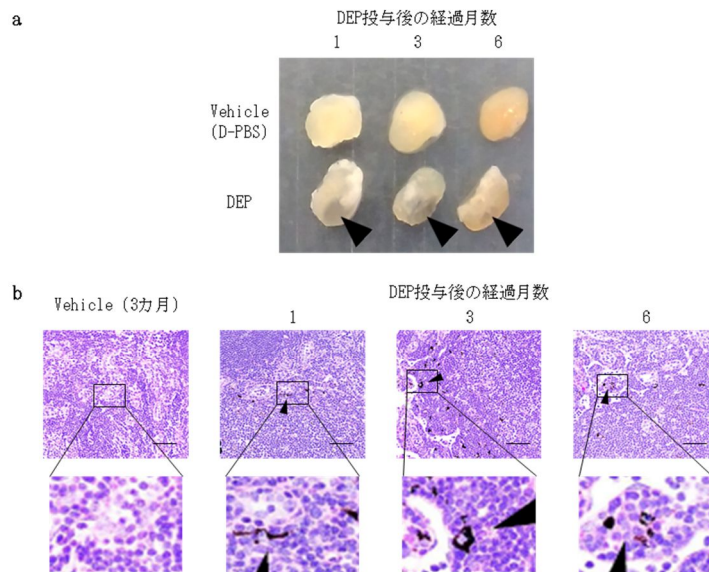


Figure 3. 微小粒子状物質のマウスリンパ節での蓄積性の評価

4週齢の雌性マウスの背部皮下へ1週間おきに2回、DEPまたはVehicle (D-PBS)を投与した。最終投与から1、3、6カ月後、腋窩リンパ節を摘出した。(a) 4%PFAで固定し、リンパ節全体のデジタル写真を撮影した。次に、(b) PAS染色標本を作製し、黒色のDEPが観察される領域、及びその類似部位 (Vehicleマウスのリンパ節) のデジタル写真を顕微鏡下で撮影した。Scalebars = 50 μ m。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akira Onodera, Eiko Fukutomi, Takuya Shimomura, Hirohisa Ochi, Ryuto Sunada, Yuichi Kawai.
2. 発表標題 Role of lysosome as intracellular degradation system for cytotoxicity by traffic related air pollution in bronchial epithelial cells.
3. 学会等名 第28回 免疫毒性学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野寺 章, 福富 瑛子, 下村 拓也, 越智 博久, 砂田 りゅうと, 河合 裕一.
2. 発表標題 Traffic related air pollution による細胞傷害性に対する気道上皮細胞の細胞内分解系としてのリソソームの役割.
3. 学会等名 第62回 日本大気環境学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野寺章, 下村拓也, 小早川遙香, 越智博久, 河合裕一.
2. 発表標題 ディーゼル排気粒子のリンパ節への移行・蓄積に関する樹状細胞の役割
3. 学会等名 第63回 日本大気環境学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智博久, 小野寺章, 日高興士, 荒尾大地, 水野遥菜, 下村拓也, 福富瑛子, 砂田りゅうと, 井上雅己, 奥田知明, 角田慎一.
2. 発表標題 オボアルブミン感作マウスにおけるリンパ球の分化への大気粉塵の影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村拓也, 小野寺章, 日高興士, 荒尾大地, 水野遥菜, 越智博久, 福富瑛子, 砂田りゅうと, 井上雅己, 奥田知明, 角田慎一.
2. 発表標題 Traffic related air pollutionによる細胞傷害性に対する気道上皮細胞の細胞内分解系としてのリソソームの役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河合 裕一 (Kawai Yuichi) (00102921)	神戸学院大学・薬学部・名誉教授 (34509)	
研究分担者	角田 慎一 (Tunoda Shinichi) (90357533)	神戸学院大学・薬学部・教授 (34509)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------