

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：82736

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12190

研究課題名（和文）有害粒子状物質による肺線維症の発症機序におけるリン脂質リモデリングの寄与

研究課題名（英文）Role of phospholipid remodeling in lung fibrosis caused by the harmful particulate matters

研究代表者

武田 知起（Takeda, Tomoki）

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター（試験管理部、病理検査部）・その他部局等・室長補佐

研究者番号：60596831

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）：有害粒子状物質による肺疾患として知られるじん肺は、現在も毎年100名以上が罹患する代表的な職業性肺疾患であるが、確立された動物モデルは殆ど存在せず、メカニズムや病態マーカー・治療法に関する知見は充分には得られていない。本研究では、ヒトで肺疾患事例が多数報告されている結晶質シリカと酸化インジウムスズ(ITO)を用いて、実験的なじん肺モデル動物を作出することに成功し、この動物より採取した肺および血漿成分を網羅的に分析することによってシリカおよびITOそれぞれの病態に関わる可能性のあるリン脂質（肺の機能維持に必須の栄養成分として注目）の変動を精査することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで病理組織学的解析と共に汎用性の高いじん肺モデル動物を提示した研究例はわずかであるため、本研究成果はじん肺を含む毒性学的研究の発展に寄与できると期待される。とりわけ、ITOは比較的最近の素材であるため、ヒトでの疾患事例や研究も今後によるところが大きく、動物モデルと知見を提示できたことは毒性学的研究を加速させる点で意義が大きい。さらに、肺の機能に必須であるリン脂質に着目してその変化を網羅的に分析した例はこれまで存在せず、本研究成果の発展により、じん肺をはじめとする粒子毒性におけるメカニズム解明や病態マーカー・治療法の開発に向けた基礎知見を提供できる点でも意義が大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：Rats were intratracheally administered crystalline silica (Min-U-Sil5) or sintered indium tin oxide (ITO), and sacrificed at 3 days, 4 weeks and 26 weeks after the administration. Histopathological examination revealed that ITO caused alveolar proteinosis via potent macrophage injury, while silica increased perivascular lymphocytic infiltration and Min-U-Sil5-phagocytosed macrophages in the alveolar interstitium during the acute phase. In the chronic phase, Min-U-Sil5-treated rats were suffered from multifocal lesions including fibrosis and hyperplasia. In agreement with this, metabolomics analyses showed that ITO accumulated a large amount of phospholipids in the alveolar region. Furthermore, sphingomyelins and ceramides levels in BALF are also suggested to be increased by ITO and Min-U-sil5. In the plasma 4 weeks after intratracheal instillation of ITO and/or Min-U-Sil5, an increase in fatty acid amides, such as oleamide, and lysophosphatidylcholines were suggested.

研究分野：衛生薬学

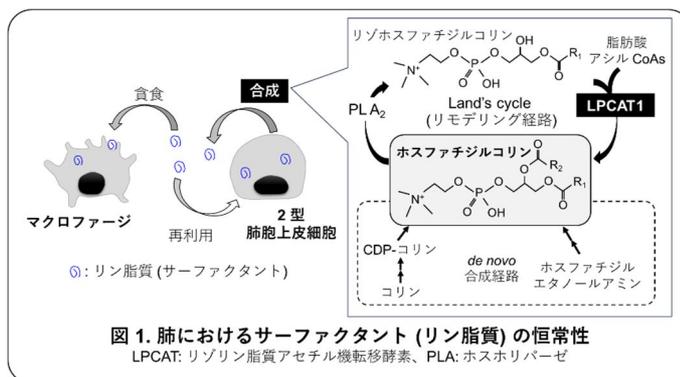
キーワード：酸化インジウムスズ 結晶質シリカ 職業性肺疾患 じん肺 メタボロミクス リン脂質

1. 研究開始当初の背景

職業性肺疾患は、労働作業中に有害粉じんや化学物質を吸入することで生じる呼吸器疾患の総称である。中でも、じん肺は「粉じんの吸入によって肺に生じた線維増殖性変化を主体とする疾病」と定義される我が国最大の職業性肺疾患である。アスベスト、シリカ及びインジウム等多数の原因物質が知られており、現在も毎年 100 名以上の労働者が新たに罹患している [1]。じん肺は初期の段階では殆ど症状がみられないが、10 年単位で慢性的に進行し、かつ進行すると不可逆性であるため、一生にわたって労働者の健康を脅かす労働安全衛生上重大な問題である。しかし、病態形成メカニズムや治療法や診断法に関する知見は充分には得られていない。これら研究が十分に進まない要因として、肺の構造や反応性、ならびに吸入後の肺内での粉じんの挙動 [2] 等の点において動物種間で違いがあることに加えて、じん肺自体が慢性進行性の特殊な病態であるため、動物実験で再現することが容易ではないことが挙げられる。これらの問題から、確立された疾患モデル動物とその研究例は結晶質シリカばく露動物を除いては充分とは言えない。このことから、これまでのじん肺研究は、希少な臨床材料を用いた疫学的研究に委ねられており、一部の基礎研究に関しては炎症細胞とそれに関連する病理学的影響に着目した限定的な解析に止まっている。以上の背景から、じん肺に関わる責任因子やメカニズムの同定、治療法や診断法の確立にはまだ多くの研究が待たれる状況である。

2. 研究の目的

肺は、肺サーファクタントと呼ばれる生理活性物質によって呼吸や感染防御等の恒常性が維持されている。肺サーファクタントは、リン脂質を主成分として脂肪酸やコレステロール等の脂質とサーファクタントたんぱく質で構成されている。このリン脂質は、2 型肺胞上皮細胞での「リン脂質リモデリング」と *de novo* 合成を通して生成され、肺胞マクロファージで貪食・分解されて



肺内でのバランスが保たれている (図 1)。しかし、肺胞マクロファージや 2 型肺胞上皮細胞の機能異常等によりこれら脂質の量的・質的な異常が生じると肺線維症等に繋がること [3, 4]、ならびにリン脂質リモデリング酵素の発現変化が結果として疾患に繋がること [5, 6] 等が多くの疾患研究によって明らかにされている。従って、粉じんばく露によって「リン脂質リモデリング」等のリン脂質生成や肺胞マクロファージに影響が生じることで脂質の量的・質的な変化が起こり、結果としてじん肺に繋がることの一連の仮説が想起される。そこで本研究では、この仮説を検証することでじん肺のメカニズムに資するデータを作出することを目的とした。本研究では、古くからじん肺を引き起こすことが知られている結晶質シリカ (Min-U-sil5; シリカ)、ならびに近年我が国で肺疾患事例が報告されている酸化インジウムスズ (ITO) [7] の 2 種の有害性粉じんを対象とした。まず、これらをラットに単回気管内投与したのち、急性期から慢性期にかけての病態の変遷について比較検討し、じん肺病態の形成を評価した。さらに、気管支肺胞洗浄液 (BALF) および血漿を対象としたメタボロミクス実験を行うことで、各病態時に変化する生体内成分を網羅的に解析した。

3. 研究の方法

動物実験: 雌性 F344 ラット (6 週齢) は、日本エスエルシー (株) より購入した。約 2 週間の検疫・馴化ののち、8 週齢時に ITO (10 mg/匹) または Min-U-Sil5 (20 mg/匹) 投与液を単回気管内投与した。ITO は、あらかじめ焼結 ITO 板 (高純度化学研究所) を微粉碎したのちに粒径 4 μm 以下のもののみを分級して使用した。Min-U-Sil5 (US Silica 社) および ITO 投与液は、滅菌 PBS にて所定濃度 (シリカ: 100 mg/mL、ITO: 50 mg/mL) となるように懸濁させて 20 分間超音波分散処理を行うことで調製した。気管内投与は、イソフルラン吸入麻酔下で実施し、投与容量は 0.2 mL/匹とした。Control 群には PBS のみを投与した。投与 3 日後、4 週後、26 週後および 52 週後に以下の要領に従って生体試料を採取した。すなわち、各解剖動物について、イソフルラン麻酔下で採血を行ったのちに放血により安楽死させた。その後、気管より全肺に生理食塩液を注入して BALF を回収した。さらに、BALF 回収後の肺を採取して病理組織学的解析に用いた。本動物実験は、「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」を遵守し、日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査・承認された。

BALF 解析: 回収した BALF は、サイトスピン 4 を用いてサイトスピン標本を作製し、メイグリュンワルド・ギムザ染色を行ったのち、目視法にて白血球分類を行った。さらに、1,960 rpm で 10 分間遠心分離して得られた上清について、自動分析装置 (日立ハイテック社) を用いて lactate dehydrogenase (LDH) 活性を測定した。

病理解析: 摘出した肺は、10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定した。パラフィン包

埋・薄切後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色に供した。

メタボロミクス：血液は 3,000 rpm で 20 分間遠心分離して血漿とした。血漿および BALF 上清からの脂質成分の抽出は、既報 [8] を参考にした。すなわち、血漿または BALF 上清 0.25 mL に対して、methyl tert-butyl ether (MTBE) 3 mL およびメタノール 0.9 mL を加えて 4°C で 10 分間 vortex したのち室温にて 60 分間振とうした。0.4 mL 蒸留水を加えて室温にて 10 分間振とうしたのち、1,000 x g 10 分間遠心分離した。上層を回収したのち、下層にさらに MTBE : メタノール : 蒸留水 = 10 : 3 : 1.5 の混液を 1 mL 加えて 10 分間 vortex した。10 分間室温にて攪拌したのちに 1,000 x g 10 分間遠心分離した。この上層を一回目の回収分と混合したのち、遠心エバポレーターを用いて溶媒留去した。得られた残渣をクロロホルム : メタノール (2:1) 混液にて再懸濁させてフィルターろ過したのち、UPLC-TOF/MS 装置に付して分析を行った。

<LC 条件>

UPLC: Acquity UPLC H-Class (Waters 社)

カラム: Acquity UPLC BEH C18 column (100 × 2.1 mm, 1.7µm i.d.; Waters 社)

カラムオープン: 55

移動相 A: acetonitrile/water (60/40), 10 mM ammonium formate, 0.1% formic acid

移動相 B: 2-propanol/acetonitrile (90:10), 10 mM ammonium formate, 0.1% formic acid

グラジエント [% B in A (min)]: 40-43% (0-2), 43-50% (2-2.1), 50-54% (2.1-12), 54-70% (12-12.1), 70-99% (12.1-18), 99-40% (18-18.1), 40% (18.1-25)

流速: 0.4 mL/min

<MS 条件>

TOF/MS : tims-TOF fleX system (Bruker 社)

Ionization : エレクトロスプレーイオン化

End Plate Offset : 500V

Capillary : 4,500V (ポジティブイオンモード)、3,600V (ネガティブイオンモード)

Dry Gas : 10L/min

Dry Temp : 220°C

また、上記抽出後の下層については、水溶性成分の変動を検討するために別途解析を行った。具体的には、下層に 1 mL メタノールを加えて 10 分間常温で激しく攪拌し、-30°C に 1 時間以上静置した。10,000 x g で 5 分間遠心分離したのち、上清を回収した。残渣にさらに 1 mL メタノールを加えて常温で 10 分間激しく攪拌したのち、10,000 x g で 5 分間遠心分離して上清を回収した。この 2 回分の上清を混合して遠心エバポレーターにて溶媒留去した。得られた残渣は、10% メタノールで再溶解させて、フィルターろ過をしたのちに UPLC-TOF/MS 解析を行った。

<LC 条件>

カラムオープン: 35

移動相 A: water with 0.1% formic acid

移動相 B: acetonitrile with 0.1% formic acid

グラジエント [% B in A (min)]: 1% (0-2), 1-99% (2-17), 99% (17-20), 99-1% (20-20.1), 1% (20.1-23)

流速: 0.25 mL/min

各データは、Metaboscape 5.0 (Bruker 社) にて多変量解析を行った。検出されたイオンのマス情報を既存データベースと照合することで化合物の推定を行った。

4. 研究成果

シリカおよび ITO のラットへの単回気管内投与により、シリカ群は体重の低下傾向が投与 35 週後以降で観察され、ITO 群では投与 3 週後以降で有意な体重増加抑制を認めた。また、投与後の 52 週間の回復期間を通してシリカ群では軽度の呼吸異常を認め、ITO 群では時間経過と共に呼吸異常が増悪傾向を示した。

解剖時の肺の肉眼所見として、シリカ群および ITO 群共に広範囲にわたって白色斑を認めると共に、肺の肥大化が観察された (図 2A)。さら

に、BALF の細胞学的解析の結果、シリカおよび ITO 投与群共に投与 3 日後から持続的に好中球の増加がみられた (図 2B)。さらに、ITO 群では投与 3 日後では茶色の ITO 粒子が多くみられたが、4 週後以降は細胞の死骸が散見され、正常なマクロファージは殆ど存在しなかった (図 2B、ITO)。シリカ群では、投与直後からシリカを貪食したマクロファージが存在した一方で、26 週後には大型マクロファージや死んだものも多数存在した (図 2B、シリカ)。このように、両物質

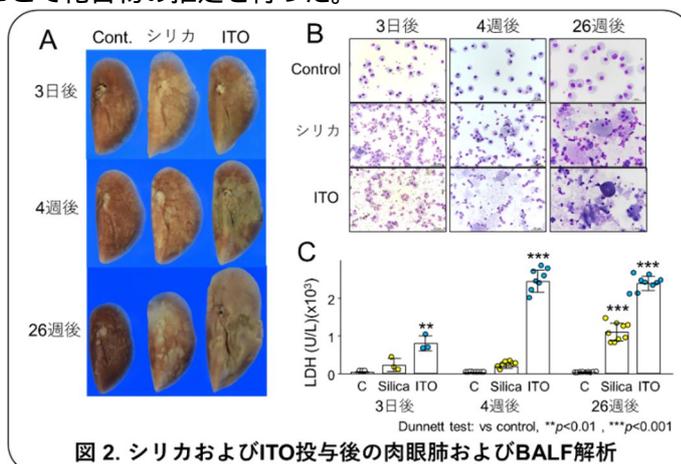


図 2. シリカおよび ITO 投与後の肉眼肺および BALF 解析

共に肺胞腔内で好中球を主体とする炎症を持続的に引き起こすこと、特に ITO は投与後早期より強いマクロファージ障害性を示すことが明らかになった。さらに、細胞障害マーカーである LDH 活性を測定した結果、ITO 群では時間経過に伴った劇的な上昇がみられ、先の強いマクロファージ障害と符合した (図 2C)。一方、シリカ群は投与4週後までは増加傾向にとどまったものの、26 週後には顕著に上昇し障害の進行が示唆された (図 2C)。

病理組織学的解析の結果を図3および図4に示す。シリカ群では、投与4週後には濃い紫や紫のフォーカスからなる病変がびまん性に多数確認された (図 3A)。これらの実態は、脈管周囲のリンパ球集簇と間質での粒子貪食マクロファージ集簇像であった (図 3B)。さらに、26 週後には太い膠原繊維や上皮過形成からなる結節性病変がみられた (図 3C)。加えて、4 週後にはみられなかった肺胞蛋白症や前がん病変である細気管支肺胞上皮過形成もみられた (図 3C)。52 週後も、26 週後でみられた結節性病変を主体とした病変の進展がみられたが、本実験においては有意な腫瘍性病変の増加は検出されなかった。ITO 群は、投与4週後では全体的にうすい

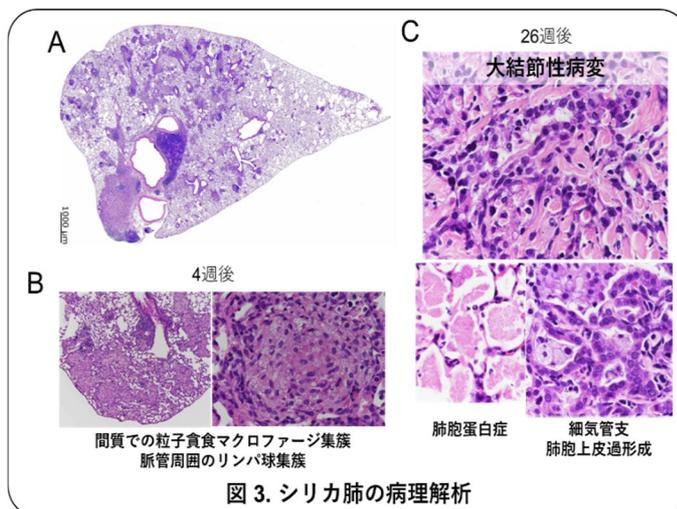


図 3. シリカ肺の病理解析

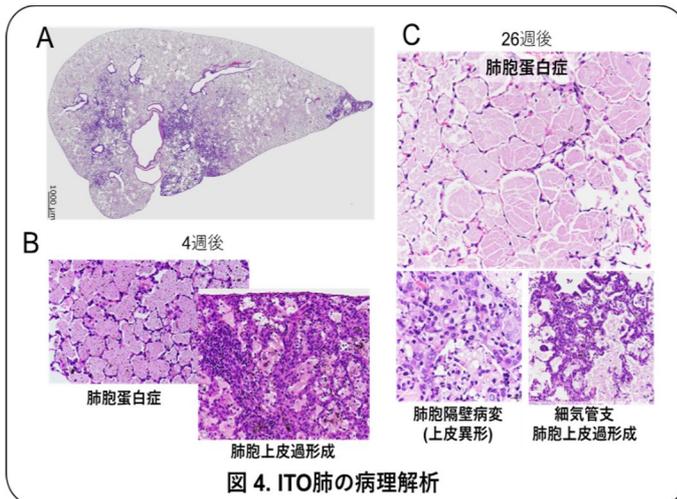


図 4. ITO 肺の病理解析

ピンク色を呈しており一部紫のフォーカスがみられる病態像が観察された (図 4A)。このピンクがかった病変は肺胞蛋白症であり (図 4B)、BALF 解析において認めた強いマクロファージ障害性を支持する結果であった。また、紫のフォーカスは肺胞上皮過形成であった (図 4B)。投与 26 週後も、4 週後と同様に肺胞蛋白症が主要な病変であったが (図 4C)、時間経過に伴って明らかな程度の悪化がみられた。さらに、26 週後には線維化を含む肺胞隔壁病変や前がん病変である細気管支肺胞上皮過形成もみられ、特に上皮異形が顕著であった (図 4C)。52 週後には、さらに肺胞蛋白症の悪化がみられたが、多くの動物で腫瘍性病変も散見され、26 週後に認めた上皮異形性の強さや前がん病変の出現を支持するものと考えられた。ITO は、2 年間の全身吸入ばく露により、ラットに肺発がん性を示すことが報告されており [9]、本知見はこれと符合するものと思われた。以上のように、本研究での単回気管内投与実験により、シリカおよび ITO 共に時間経過に伴って進行性かつ多彩な病変を引き起こし、投与 26 週後には線維化を伴うじん肺病態が形成されていることが明らかになった。一方で、両者によって引き起こされる肺病変の進展については、既に投与後早期から明確に異なっていることも確認できた。

シリカおよび ITO の投与によって肺胞腔内で変化する生体内成分の変動パターンを明らかにするため、BALF サンプルを用いたメタボロミクスを行った。主成分分析の結果、ITO 群では他の 2 群に対してプロットが乖離しており、メタボロームプロフィールが大きく異なることが示唆された (図 5A)。ボルケーノプロット (図 5B) にて有意に変化がみられたイオンを抽出して変

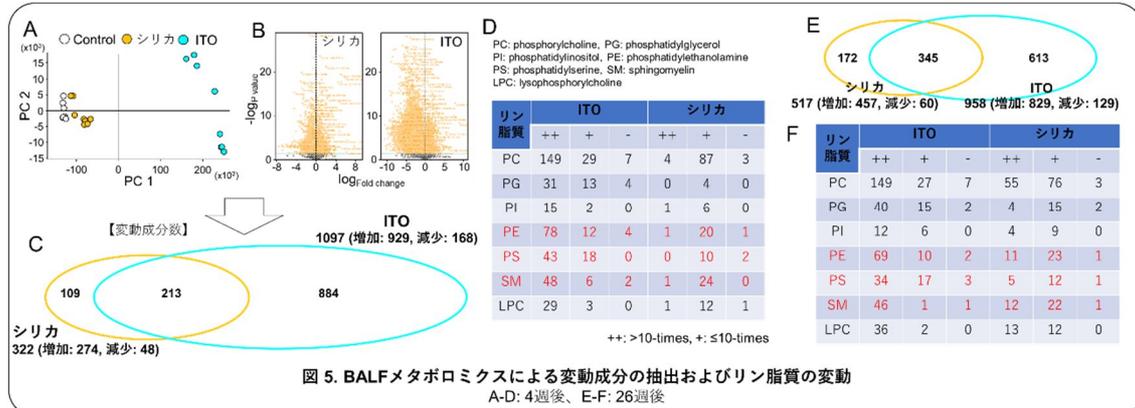


図 5. BALFメタボロミクスによる変動成分の抽出およびリン脂質の変動

A-D: 4週後、E-F: 26週後

動化合物を推定した結果、投与 4 週後においてはシリカ群では 322 成分、ITO 群では 1,097 成分もの変動が示唆された (図 5C)。これらの変動のうち、主なリン脂質の変動について整理した結果を図 5D に示す。シリカ群および ITO 群共に、主要なサーファクタントリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) のみならず、ホスファチジルエタノールアミン (PE) やホスファチジルセリン (PS)、スフィンゴミエリン (SM) の多くが増加しており (図 5D)、ITO 群では肺胞蛋白症を支持して変動数ならびに変動の程度が非常に大きいことが明らかになった (図 5D)。さらに、投与 26 週後サンプルについても同様に解析した結果、シリカ群では病態の進展と符合して変動数および変化率が 4 週後よりも明らかに増大していることが確認された (図 5E および F)。図 6 には、変動が推定されたリン脂質の中で特に上昇の程度が大きかったものについて、各々に特徴的なものと共通のものを示した。シリカ群に特徴的な脂質としては、PC 以外の PE 等のリン脂質が多い傾向であった (図 6、シリカ優位)。一方、ITO 群では LPC が複数種類で特徴的に上昇を認めた (図 6、ITO 優位)。また、一部の SM や PC 等は両者に共通して増加がみられ (図 6、シリカ・ITO 共通)、各物質の投与によって変化するリン脂質の特異性や共通性には何らかのパターンが存在する可能性が浮上した。LPC は、リモデリング経路によって調節されるため (図 1)、ITO はこの経路への影響によって LPC を過剰に蓄積させる可能性が推定された。

血漿メタボロミクスの結果を図 7 に示す。投与 4 週後では、シリカ群で 42 の増加と 20 の減少、ITO 群で 74 の増加と 63 の減少が推定された (図 7 左)。共通してみられた成分も 27 成分存在したが、各粉じんに特徴的な成分の方が多く、病変のパターンが異なる事実を支持すると思われる。シリカ優位な変化としてはセラミドや LPC の増加、ITO 群では PC や複数の脂肪酸アミドが特徴的に変化していることが確認された (図 7)。また、両者に共通して変動した 27 成分のうち、オレアミドとステアロイルグリセロホスホコリンは、血漿中において高濃度で存在することから、粉じんばく露に伴って出現する共通の急性肺毒性マーカー候補となりうることを示唆された。投与 26 週後では、4 週後に比較して変動数は両者共に多い傾向であったが、共通成分の比率は減少しており (図 7 右)、時間経過に伴い粉じん間での相違性が高まっていると考えられた。ITO 群では、多様な脂質成分の増加がみられ、C20 以上の長鎖脂肪酸を持つものが多い傾向であった。シリカ群では、投与 4 週後でも特徴的にみられたセラミドの増加が、より多くの種類で顕著にみられた。本研究では、これらの変化の定量分析や意義付けの検討には至らなかったが、急性期 (投与 4 週後) および進行期 (投与 26 週後) 共に粉じん間での特徴的な変化を捉えることができたものとする。今後、これらの特徴に着目して研究を展開し、新規メカニズムや病態マーカーの創出につなげていくことが重要と考える。

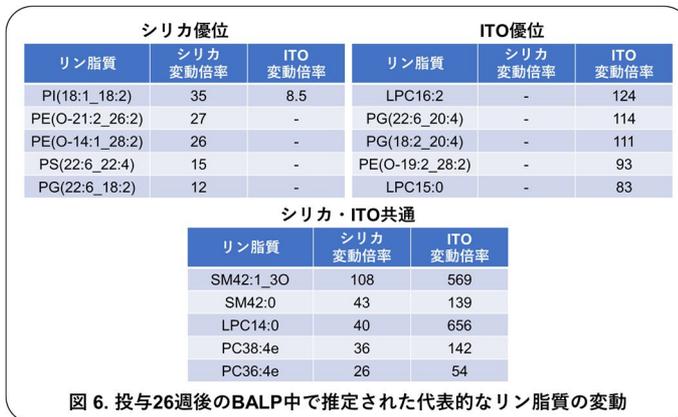


図 6. 投与26週後のBALP中で推定された代表的なリン脂質の変動

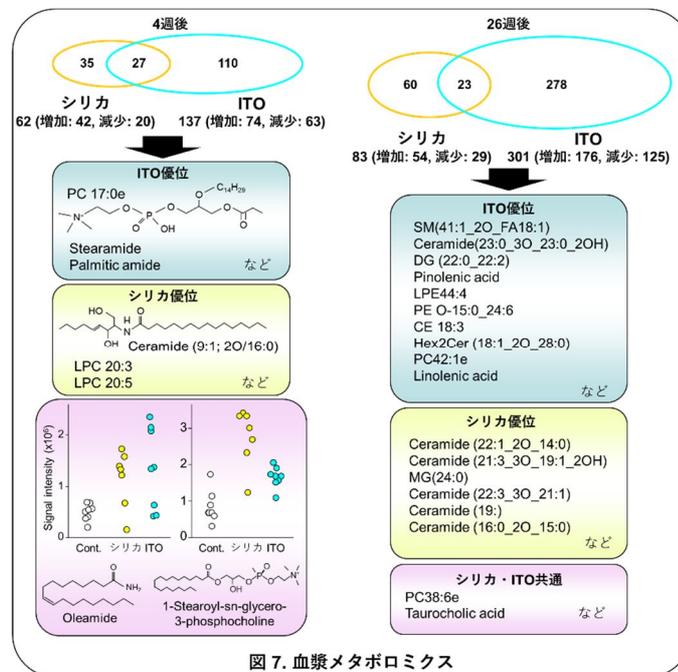


図 7. 血漿メタボロミクス

【引用文献】1) 相澤好治. じん肺有所見者の推移. 産業保健 21, 93: pp.28 (2018), 2) Bevan BJ, et al. Toxicity testing of poorly soluble particles, lung overload and lung cancer. Regul Toxicol Pharmacol, 100: 80-91 (2018), 3) Agudelo CW, et al. Alveolar lipids in pulmonary disease. A review. Lipids Health Dis, 19: 122 (2020), 4) Lopez-Rodriguez E, et al. Lung surfactant metabolism: early in life, early in disease and target in cell therapy. Cell Tissue Res, 367: 721-735 (2017), 5) Bridges JP, et al. LPCAT1 regulates surfactant phospholipid synthesis and is required for transitioning to air breathing in mice. J Clin Invest, 120: 1736-1748 (2010), 6) Morita Y, et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. J Hepatol, 59: 292-299 (2013), 7) 大前和幸ら. 産業医学レビュー, 36: pp. 50-77 (2023), 8) Matyash V, et al., Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. J Lipid Res, 49: 1137-1146 (2008), 9) Nagano K, et al. Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of indium-tin oxide in rats and mice. J Occup Health 53: 175-187 (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田知起、山野 荘太郎、鈴木正明
2. 発表標題 有害粒子状物質の単回気管内投与による急性肺毒性の比較解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田知起、山野 荘太郎、後藤裕子、鈴木正明
2. 発表標題 有害粒子状物質による肺障害のマーカー探索：メタボロミクスに基づくアプローチ
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
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
研究協力者	山野 荘太郎 (Yamano Shotaro)		病理組織学的解析
研究協力者	鈴木 正明 (Suzuki Masaaki)		動物実験

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
---------	---------