

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390159

研究課題名(和文)細胞運命決定機構を利用した環境汚染物質の曝露評価とその簡便検出法の開発

研究課題名(英文)An evaluation of environmental pollutant exposure using cell survival signaling and development of simple detection system

研究代表者

吉田 安宏(YOSHIDA, Yasuhiro)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10309958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,100,000円

研究成果の概要(和文)：現在、日本は多くの環境汚染物質に悩まされている。その例として黄砂やPM2.5といった粒子状物質があり、それらには、細菌などの微生物をはじめ、鉱物、化学物質などが付着している。本研究課題では、モデルマウスを用いた解析から、実際に日本に飛来してきた粒子群、それに付着していた成分、また室内で検出される物質に、免疫反応を修飾する働きがあることを明らかにした。粒子に関してはそのサイズの違いにより影響に差異があることもわかった。これらを応用し、環境汚染物質影響速報といった、情報提供に繋げていくことを考えている。

研究成果の概要(英文)：Exposure to elevated concentrations of particulate matter (PM), air pollution has been implicated as a risk factor for our health. These pollutants include a mineral, a chemical substance and microbes such as bacteria. In this communication, we showed that administration of PM or exposure of chemicals to mice modified immune responses. Furthermore, different size of particles showed different modification in immune responses. It will open the door for new assessment for detection of exposure of air pollutants.

研究分野：免疫学

キーワード：環境汚染物質 粒子サイズ NF- B LPS

1. 研究開始当初の背景

申請者が居住する地域では、早朝には光化学スモッグの層が、また春先になれば大陸から飛来する黄砂が空を一変する。一方、周辺の工場地域などの作業環境においては非常に多くの化学物質に取り囲まれている。これらの環境汚染物質が私どもの健康に影響があるのだろうか、というスタンスに立ち、申請者は種々の研究費において多方面から研究してきた。これらの課題の中で、最終的には何を観察すれば、シンプルに且つ明確に健康影響評価できるのか、という更なる課題にも直面してきた。一方、申請者は細胞レベル、特に細胞内イベントに着目し、サイトカインなどの刺激により活性化される分子の役割について解析し報告してきた。最近では細胞が何らかの影響を受けた際、その細胞があるサインを出すことが知られてきている (Nagata ら、Nature. 2002,417:182. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. 後に eat me シグナルと呼ばれる)。このような現象は、正常な細胞が何らかの刺激を受けて、活性化あるいは抑制される場合にも起こることを観察している。分子生物学的な手法を用いると、環境汚染物質、細胞別にそれらのサインを分子プロファイルすることが可能になると考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

細胞が何らかの影響を受けた際に出すサインに注目し、その後たどる運命を暗示する形態的变化と、細胞内タンパク質の変化を調べることで、環境汚染物質により影響を受けた細胞の同定を行うことを目的としている。特徴的なサイン (分子マーカー) を用いて、分子プロファイルすることで環境汚染物質に対する曝露評価を行えるものと考えている。また更なる技術開発が必要ではあるものの、簡便な検査キットへの応用も可能であり、過度な汚染物質への曝露を避けるなど、予防医学への発展も期待できると考えている。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄由来分化細胞と脾臓細胞を用いた *in vitro* アッセイ

細胞調製方法

マウスの脾臓より脾臓細胞を調製した。方法は赤血球をトリス・アンモニウムで溶血させ、常法により行った。

マウス骨髄細胞を調製し、*in vitro* で GM-CSF 存在下で培養し、マクロファージを分化誘導した。4 日目にさらに GM-CSF を添加し、7 日目のプレート接着細胞をマクロファージとして使用した。

これらの細胞を用いて、以下の実験を行った。

(2) 環境汚染物質の細胞への影響解析

細胞を種々の環境汚染物質 (粒子状物質を中心に) で処理し、その細胞、細胞溶解液、

および培養上清を用いて (a) ~ (c) の実験を行った。環境汚染物質として粒子として黄砂粒子を、また標準粒子としてシリカを使用した。室内汚染物質として 2 - エチルヘキサノールを使用した。環境汚染物質には微生物が付着している場合もあるので、刺激としてリポポリサッカライド (LPS、グラム陰性細菌由来物質) やペプチドグリカン (グラム陽性細菌由来物質) との共刺激も行った。

(a) 細胞培養上清中のサイトカイン量を ELISA により定量

(b) 細胞溶解液を用い、ウエスタンブロット法にて、また転写因子 (例えば NF- κ B) の場合はその活性化を EMSA (ゲルシフト) 法にて解析

(c) 細胞増殖反応は細胞内 ATP 量を測定し、評価

(3) 環境汚染物質曝露モデルマウスを用いた解析

環境汚染物質 (粒子状物質) に関しては気管内投与と点鼻システムにより行った。気管内投与は八口タン麻醉科で、0.1 mL 量の物質を投与した。また 2 - エチルヘキサノールを点鼻し (10 μ L) 曝露マウスを準備した。

上記で作成したマウスから細胞を調製し (方法は前記と同様) (2) の方法に従い、解析した。急性曝露は 1 回投与により、また亜慢性曝露を想定した場合、1 週間おきに 4 回投与を行なった。

4. 研究成果

初年度はマウスの初代培養細胞を用いた *in vitro* アッセイを中心に行った。サインとしては eat me シグナル、danger シグナル、オートファジーシグナルに着目し、多くはそれらの細胞溶解液を用いたウエスタンブロット法と EMSA (ゲルシフト) 法により、サインの誘導を解析した。

マウスの脾臓より脾臓細胞を調製し、初代培養細胞として用いた。またマウス骨髄細胞からマクロファージを分化誘導し、貪食細胞の例として用いた。環境汚染物質としては例年、春先に飛来してくる黄砂を想定し、PM10 の粒子状物質を用いた。

刺激後、12 時間で、脾臓細胞においてオートファジーの特徴的なサインである p62 と LC3II の発現誘導が認められた (図 1)。また誘導マクロファージにおいては刺激後 12 時間で、danger シグナルに深く関与する NF- κ B の活性化誘導が認められた (図 2)。また LPS で誘導される NF- κ B に対して、PM10 の粒子状物質は増強させる作用があることが示された。

以上より、初代培養細胞が環境汚染物質により影響を受け、シグナル・サインを誘導することが示唆された。

次年度は特に粒子状物質の代表でもあり、

健康影響が懸念されている黄砂について、亜急性の影響をリンパ組織に関して解析した。マウスの気管内にハロタン麻酔下で、0.1 mL量(100 µg)の黄砂を投与後すばやく蘇生しケージに戻す。気管内投与後、1日目および3日目にマウスを解剖し、脾臓細胞を調製した。肺での炎症は洗浄液中のサイトカイン(TNF-)を測定することで評価した。1日目では肺での炎症が確認されたが、脾臓では変化が認められなかった。対照的に、3日目では肺での炎症は低下していたが、脾臓では細胞の活性化が認められた(図3)。特に転写因子であるNF- κ Bの活性化が脾臓細胞中で観察された(図4)。これらの結果は環境汚染物質による生体影響があり、更にはアレルギーなどを引き起こす際に重要な役割を果たす免疫担当細胞の活性化を伴っていることを示している。また環境汚染物質のうちガス状化学物質であり、シックハウス(ビルディング)症候群の原因物質として疑われている2-エチル-1ヘキサノールについて解析をした。BALB/cマウスに2-エチル-1ヘキサノールを10 µL点鼻し、曝露モデルマウスを作成した。曝露後、24時間でマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。その増殖能を測定したが、対照群と曝露群に有意な差は認められなかった。

これらの結果から、粒子状物質の生体影響が懸念されるエビデンスが得られた。

最終年度では粒子のサイズの違いによる免疫応答の差異を検討した。粒子サイズを一定に保つため、サイズの違う(0.3 µm、1 µm、3 µm)球状の粒子を用いた。粒子をマウスに10 µL点鼻投与し、曝露モデルマウスを作成した。曝露後、24時間後にマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。その脾臓細胞を細胞分裂誘発剤の一つであるLPSで刺激し、増殖反応と液性因子の一つであるTNF- α の産生量を検討した。興味深いことに1 µm、3 µmの群において増殖反応(図5)、TNF- α 産生量(図6)が対照群に比べ増強されており、それは3 µmの群でより顕著であった。続いて、付着物質としてTar(タール)成分が確認されていたので、その影響を調べた。マウスの気管内にハロタン麻酔下で、0.1 mL量(100 µg)のTar成分を2週間おきに4回投与し、最終投与後、24時間後にマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。その脾臓細胞の増殖能を調べたところ、対照群に比べ、有意に高値を示した(図7)。更には細胞分裂誘発剤の一つであるコンカナバリンA(ConA)で刺激後の培養上清中の液性因子IL-2の量を調べたところ、投与群で高かった(図8)。これらの結果から、粒子状物質自身とそれに付着している物質が生体に影響を及ぼすこ

とが示された。その修飾作用は多岐に渡り、組成に伴う生体影響の違いが示唆された。

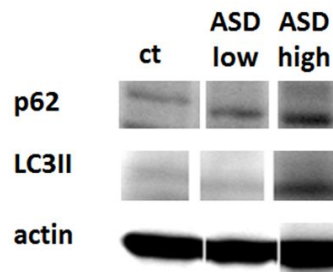


図1

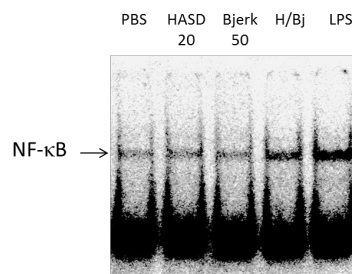


図2

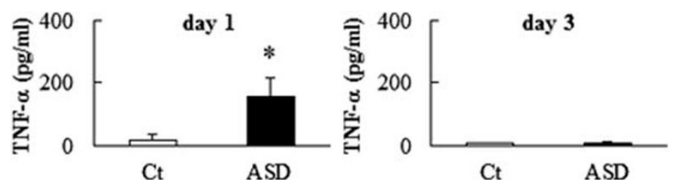


図3

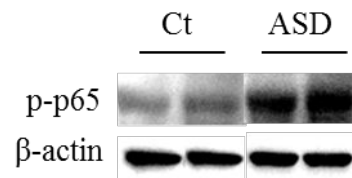


図4

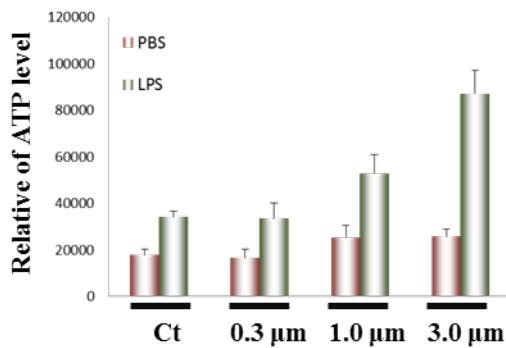


図 5

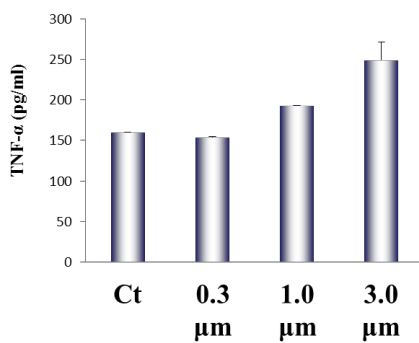


図 6

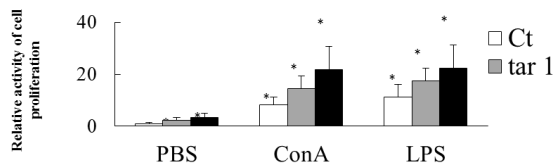


図 7

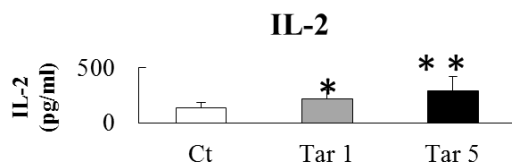


図 8

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 8 件)

- Liu B, Ichinose T, He M, Kobayashi F, Maki T, Yoshida S, Yoshida Y, Arashidani K, Takano H, Nishikawa M, Sun G, Shibamoto T.: Lung inflammation by fungus, *Bjerkandera adusta* isolated from Asian sand dust (ASD) aerosol and enhancement of ovalbumin -induced lung eosinophilia by ASD and the fungus in mice. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014 Feb 5;10(1):10. doi: 10.1186/1710-1492-10-10. 査読有り
- Ren Y, Ichinose T, He M, Song Y, Yoshida Y, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G, Shibamoto T.: Enhancement of OVA-induced murine lung eosinophilia by co-exposure to contamination levels of LPS in Asian sand dust and heated dust. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014 Jun 9;10(1):30. doi: 10.1186/1710-1492-10-30. eCollection 2014. 査読有り
- He M, Ichinose T, Liu B, Song Y, Yoshida Y, Kobayashi F, Maki T, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G.: Silica-carrying particulate matter enhances *Bjerkandera adusta*-induced murine lung eosinophilia. *Environ Toxicol*. 2014 Jul 21. doi: 10.1002/tox.22025. 査読有り
- Ren Y, Ichinose T, He M, Arashidani K, Yoshida Y, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G, Shibamoto T.: Aggravation of ovalbumin-induced murine asthma by co-exposure to desert-dust and organic chemicals: an animal model study. *Environ Health*. 2014 Oct 18;13(1):83. 査読有り
- Kil HN, Eom SY, Park JD, Kawamoto T, Kim YD, Kim H.: A rapid method for estimating the levels of urinary thiobarbituric Acid reactive substances for environmental epidemiologic survey. *Toxicol Res*. 2014 Mar;30(1):7-11. doi: 10.5487/TR.2014.30.1.007. 査読有り
- Song Y, Ichinose T, Morita K, Nakanishi T, Kanazawa T, Yoshida Y: Asian sand dust causes subacute peripheral immune modification with NF- B activation. *Environ Toxicol*. 2013 Dec 5. doi: 10.1002/tox.21931. 査読有り
- He M, Ichinose T, Song Y, Yoshida Y, Arashidani K, Yoshida S, Liu B, Nishikawa M, Takano H, Sun G.: Effects of two Asian

sand dusts transported from the dust source regions of Inner Mongolia and northeast China on murine lung eosinophilia. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Nov 1;272(3):647-55. doi: 10.1016/j.taap.2013.07.010. 査読有り

8. Yu HS, Oyama T, Matsuda T, Isse T, Yamaguchi T, Tanaka M, Tsuji M, Kawamoto T.:The effect of ethanol on the formation of N2-ethylidene-dG adducts in mice: implications for alcohol-related carcinogenicity of the oral cavity and esophagus. *Biomarkers.* 2012 May;17(3):269-74. doi: 10.3109/1354750X.2012.666675. 査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 吉田 安宏, 宋 媛, 何 翠穎, 嵐谷 奎一, 市瀬 孝道: 黄砂とPM2.5免疫応答の差異と微生物成分の関与に関する研究、「ピーコンプラザ(大分県・別府市)」2015-Jan 28,29、第9回大気バイオエアロゾルシンポジウム

2. Song Yuan, Ichinose Takamichi, Morita Kentaro, Nakanishi Tsukasa, He Cuiying, Kanazawa Tamotsu, Yoshida Yasuhiro: Particulate matter influenced immune responses through TLR4 in vivo. 「京都国際会館(京都府・京都市)」2014-Dec 10-12、第43回日本免疫学会総会

3. Yasuhiro Yoshida, Yuan Song, Takamichi Ichinose: Asian sand dust causes acute lung inflammation and subacute peripheral events. 「New York (USA)」2014-Apr 26-29、World asthma

4. Song Yuan, Ichinose Takamichi, Morita Kentaro, Nakanishi Tsukasa, Kanazawa Tamotsu, Yoshida Yasuhiro: TLR4 is involved in Asian sand dust-induced peripheral inflammation. 「幕張メッセ(千葉県・千葉市)」2013-Dec 13、第42回日本免疫学会総会

5. Song Yuan, Ichinose Takamichi, Kanazawa Tamotsu, Yoshida Yasuhiro.: Intratracheally administration of Asian sand dust activates NF- B in immune cells 「Milan (Italy)」2013-Aug 23、15th International congress of Immunology

6. Song Yuan, Ichinose Takamichi, Kanazawa Tamotsu, Yoshida Yasuhiro.:Asian sand dust induces autophagic markers and activates NF- B in immune cells.

「Honolulu (USA)」2013-May 6、100th American association of Immunology annual meeting

7. 中西 司, 宋 媛, 金澤 保, 吉田 安宏: Z36 induces cell death on human T-cell leukemia cell lines 「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」2012-Dec 13、第35回日本分子生物学会

8. 余旭 勝, 辻 真弓, 吉田 安宏, 柴田 英治, 田中 政幸, 川本 俊弘: 化学物質曝露による特異的抗体の検出に関する研究、「産業医科大学ラマツツイーニホール(福岡県・北九州市)」2012-Oct 20、第30回産業医科大学学大会

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 安宏 (YOSHIDA, Yasuhiro)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10309958

(2)研究分担者

川本 俊弘 (KAWAMOTO, Toshihiro)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60177748

(3)研究協力者

森田 健太郎 (MORITA, Kentaro)
宋 媛 (SONG, yuan)
中西 司 (NAKANISHI, Tsukasa)
何 翠穎 (HE, Cuiying)