

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670331

研究課題名(和文)PM2.5による喘息様気道炎症におけるPM2.5付着蛋白質の関与

研究課題名(英文)Effect of proteins in PM2.5 on PM2.5-induced airway inflammation.

## 研究代表者

荻野 景規(OGINO, KEIKI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70204104

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):PM2.5による喘息の機序に蛋白質が関与していることを研究目的とした。粒径 $2.5\mu\text{m}$ から $0.1\mu\text{m}$ までのPM2.5には、喘息に關する蛋白質は存在しないことが分かり、 $0.1\mu\text{m}$ 以下のPM2.5に存在する蛋白質に、喘息誘発の蛋白質が存在する可能性が示唆された。PM2.5による喘息時に作成された抗体から、ヒト由来蛋白質を同定し、PM蛋白質1及びPM蛋白質2とした。PM蛋白質1は、PM2.5と共に投与すると、PM蛋白質2は、単独投与で、喘息を誘発した。チロシンニトロ化PM蛋白質1を作成し、健常者及び喘息患者の血清に反応する抗体があるかドットプロット法で検討すると、喘息患者に有意に高い抗体価を認めた。

研究成果の概要(英文):The aim of research is to clear the contribution of protein in the mechanism of PM2.5-induced asthma in mice. In particle size of PM2.5 from 2.5 micro m to 0.1 micro m, there was no protein to evoke asthma. PM2.5, particular size below 0.1 micro m, may contain some protein to evoke asthma. PM2.5, eluted from filter of Anderson-type high volume air sampler, induced asthma and generated specific antibody against PM2.5 proteins. After elution of PM2.5 specific proteins by antibody sedimentation technique, two human origin proteins were determined. We decided the name of proteins, PM protein 1 and PM protein 2. Pure PM protein 1 could evoke asthma when PM protein 1 was administered with PM2.5, and pure PM protein 2 alone could evoke asthma. Significant high antibody titers against tyrosine nitrated-PM protein 1 were demonstrated in the serum of asthmatic patients compared to healthy control.

研究分野：環境医学

キーワード：PM2.5 PM2.5蛋白 喘息

## 1. 研究開始当初の背景

大気中に存在する PM の径 10  $\mu\text{m}$  以下の粒子が、気管支より肺に侵入するとされ、特に 2.5  $\mu\text{m}$  の粒子が約半量存在する PM<sub>2.5</sub> は、肺胞深部へ侵入し肺組織へ沈着することが知られている。環境中 PM<sub>2.5</sub> 量と、呼吸器疾患や心臓血管系疾患による死亡率との関係が疫学的に多く報告されている。これまで、PM の呼吸器障害には、PM 中の diesel exhaust particles (DEP)、重金属、有機溶剤、エンドトキシンの関与が重要であると考えられてきた。我々は、マウスに total suspended particulate matter (TSP) を経鼻投与し、気道抵抗の上昇、肺組織の炎症等の喘息様病変を認め、蛋白質分解酵素で処理した TSP で、喘息病態の抑制を認めた。これまで PM 実験で注目されなかった蛋白質の重要性を世界に先駆けて報告した (Ogino K et al. *Environ Toxicol* 2014)。さらに、平成 25 年、1-3 月に収集した PM<sub>2.5</sub> の可溶性分画と非可溶性分画を同時に投与して、気道抵抗、肺胞洗浄液中の好酸球増加、肺組織の Th<sub>2</sub> サイトカインの発現増強、肺組織の炎症細胞浸潤を認め、喘息様病態の発症に成功した。同時に、喘息発症マウスの血清に、PM<sub>2.5</sub> 蛋白質中の分子量 55kDa と反応する IgG の存在を認め、この血清を用いて、各月の PM<sub>2.5</sub> の蛋白質と western blot で反応性を検討したところ、1 月、6 月、11 月の 3 峰性のピークが認められた。

## 2. 研究の目的

大気汚染物質として知られている浮遊粒子状物質 (particulate matter (PM)) の中国からの越境が問題視されている。粒子径 2.5  $\mu\text{m}$  の PM<sub>2.5</sub> の暴露と、呼吸器疾患や循環器疾患に関連性があることが疫学的に知られている。我々は、PM<sub>2.5</sub> を用い、マウスに気道抵抗の増強、肺胞洗浄液中の好酸球上昇、肺組織の Th<sub>2</sub> サイトカイン (IL-13) とケモカイン (eotaxin1) さらには炎症前駆サイトカイン (IL-1) の mRNA の発現増大、肺組織の炎症細胞浸潤を認める喘息様病変の作成に成功した。そこで、本研究は、PM<sub>2.5</sub> に含まれる蛋白質に注目して、喘息様病変の機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 喘息様気道炎症に PM<sub>2.5</sub> 含有蛋白質が関与することの証明  
アンダーセントタイプの高ボリュームエアースンプラーのフィルターから水溶液中に回収した PM<sub>2.5</sub> は、可溶性分画と不溶性沈殿分画に分離する。蛋白質は、可溶性分画と不溶性沈殿分画 (粒子に付着) に存在する。可溶性分画からの蛋白除去は、5 kDa のミリポア限外濾過膜で処理し (Sup)、不溶性

沈殿分画に付着した蛋白質は、1% Triton X-100 で、可溶化処理により除去する (Pre)。Pre の残存 Triton X-100 は、detergent 除去剤で処理する。これらの処理で、蛋白質をほぼ可溶性分画から除去できる。又、蛋白質を除去する方法として、可溶性分画を pronase で 50°C で 14 時間処理し、5 kDa ミリポア限外濾過膜を通したのも、別の Sup2 として Sup の代わりとして使用する。実験動物への投与は、50  $\mu\text{g}$  蛋白質相当量の 25  $\mu\text{l}$  Sup、200  $\mu\text{g}$  Pre/100  $\mu\text{l}$  を 4 mg/100  $\mu\text{l}$  の水酸化アルミニウムと混合させ、NC/Nga マウスに腹腔内投与し、6 日目から control saline 25  $\mu\text{l}$ 、Sup (25  $\mu\text{l}$ )、Pre (200  $\mu\text{g}$ /25  $\mu\text{l}$ )、Sup (10  $\mu\text{l}$ ) + Pre 200  $\mu\text{g}$ /15  $\mu\text{l}$ ) を経鼻的に投与し (6~10 日)、16 日目にブースター投与を行う。17 日目に、以下の測定実験を行う。気道抵抗 (AHR) 測定、肺胞洗浄液 (BALF) 細胞分画、肺組織の real time PCR (Th<sub>1</sub> 及び Th<sub>2</sub> サイトカイン、eotaxin-1、eotaxin-2、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6) 及び western blot (活性化 IL-1 $\beta$ 、活性化 caspase-1) の組織学的分析。

### (2) PM<sub>2.5</sub> 粒子の肺内蓄積及び他臓器への移行に関する分子イメージング

PM<sub>2.5</sub> の非可溶性粒子には、Zn、Mn 等多くの重金属が結合している。そこで、<sup>65</sup>ZnCl<sub>2</sub>、<sup>54</sup>MnCl<sub>2</sub>、<sup>85</sup>SrCl<sub>2</sub> を PM<sub>2.5</sub> の非可溶性粒子と反応させる。非結合の放射性金属は、遠沈洗浄により除去し、放射性金属が結合した PM<sub>2.5</sub> 粒子が作成される。この、PM<sub>2.5</sub> 粒子 200  $\mu\text{g}$  と可溶性分画 50  $\mu\text{g}$  蛋白質相当を 25  $\mu\text{l}$  緩衝液に溶解し、同量の PM<sub>2.5</sub> 粒子と同量の蛋白質を水酸化アルミニウムとの混合液として既に感作しておいたマウスに経鼻的に 5 日間投与し、16 日目にブースター投与し 17 日目に屠殺する。経時的に高純度ゲルマニウム (Ge) 半導体検出器を用いた複数の半導体コンプトンカメラ GREI (Gamma-Ray Emission Imaging) で、分子イメージング技術により、PM<sub>2.5</sub> 粒子の集積状態の変化を画像化する。

### (3) 喘息様気道炎症を惹起する PM<sub>2.5</sub> 蛋白質の同定

背景で既に述べたように、PM<sub>2.5</sub> から抽出した可溶性分画蛋白質 50  $\mu\text{g}$  を水酸化アルミニウムと混合し感作投与した後、可溶性分画蛋白質 50  $\mu\text{g}$  と非可溶性沈殿物 200  $\mu\text{g}$  を点鼻投与した結果、両方投与した群で、気道抵抗が上昇し、肺胞洗浄液中の好酸球の上昇、IL-13 及び eotaxin-1 の mRNA 上昇、気管支周囲の炎症病態を示す喘息様気道炎症を認め論文投稿中である。喘息様気道炎を発症した数匹のマウス血漿と、western blot で反応する 55 kDa の PM<sub>2.5</sub> 蛋白質を認めた (図 1)。この 55 kDa の蛋白質のフィルター総蛋白当たりの月別割合を見ると、1 月、6 月、11 月の 3 峰性のピークを示した。

しかしながら、残存血漿が殆どないので、再度動物実験でこの蛋白質を認識する抗体を作成し、免疫沈降により、蛋白質の同定をプロテオミクス解析で行う。

(4) PM2.5 蛋白質に対する喘息及び慢性閉塞性肺疾患患者血清の抗体感作状況の検討による疾病との関連性

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者の約 30% に自己免疫の病態が認められることが知られている。PM2.5 の蛋白質に関しては、その由来に関して、殆ど明らかでない。PM2.5 の蛋白質の中にヒト蛋白質と構造が近い蛋白質が存在する可能性がある。また、大気中の窒素酸化物や硫黄酸化物と蛋白質が反応してニトロ化蛋白質やスルホン化蛋白質が産生される。ニューロ蛋白質として知られている synuclein は、ニトロ化されると抗体が作られやすくなることが知られている (Science, 290, 984, 200)。また、systemic lupus erythematosus (SLE) と呼ばれる自己免疫疾患で、チロシンニトロ蛋白に対する自己抗体が見ついている (Human Immunol, 74, 1392, 2013)。よって、PM2.5 に含まれる、ヒトの生体内蛋白質と構造的に似たもの、又は修飾された蛋白質が感作されやすくなることで、喘息や COPD の病態に関与する可能性がある。そこで、川崎医科大学呼吸器内科との共同研究で、喘息患者 100 名、COPD 患者 100 名の血清を集め、PM2.5 蛋白質を 1 年間集め、高濃度液を作成し、ELISA 用のマイクロプレートにコートし、患者血清中の反応抗体価を測定し、その症状との関連性を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 喘息様気道炎症に PM2.5 含有蛋白質が関与することの証明

サイクロン型の集塵機で集めた PM2.5 含有蛋白質が、喘息様気道炎症に関与している可能性を検討するために、PM2.5 を塩酸グアニジン又は高濃度の尿素で処理し、蛋白質を分解又は可溶化した PM2.5 の気道炎症誘発作用を検討した。その結果、PM2.5 誘発の喘息様気道炎症には蛋白質が関与していないことが判明した。しかしながら、サイクロン型の集塵機は、0.1  $\mu\text{m}$  以下の粒子は含まれていないので、0.1  $\mu\text{m}$  以下の PM2.5 粒子に含まれる蛋白質について喘息誘発作用について検討する必要がある。

(2) PM2.5 粒子の肺内蓄積及び他臓器への移行に関する分子イメージング

研究協力者が急遽退職したことで、昨年度約半年、動物実験施設の立て替え工事で使用できなかったことで、この実験計画は事実上不可能となった。

(3) 喘息様気道炎症を惹起する PM2.5 蛋白質の同定

PM2.5 の可溶性分画と非可用性分画を同時にマウスに投与して喘息用病態を認め、このときのマウスが作成した血清中に投与 PM2.5 蛋白質を認識する抗体があることが分かり、この抗体を用いて、免疫沈降後の電気泳動、プロテオーム解析により 2 つのヒト由来生体蛋白質 (PM 蛋白 1、PM 蛋白 2) を同定した。2 種類の同定蛋白質の精製標品を用いて、マウスで喘息の発症実験を行ったところ、PM 蛋白 1 は、PM2.5 非可用性分画と相乗的に喘息様病態を示し、PM 蛋白 2 は、単独で喘息様病態を示した。

(4) PM2.5 蛋白質に対する喘息及び慢性閉塞性肺疾患患者血清の抗体感作状況の検討による疾病との関連性

PM2.5 に含まれるヒト由来同定蛋白 PM 蛋白 1 のニトロ化したものに対する感作状況をドットプロット法で喘息患者及び健常者で検討したところ、健常者血清と比較し喘息患者の血清に優位の高い抗体化を認めた (図 1)。

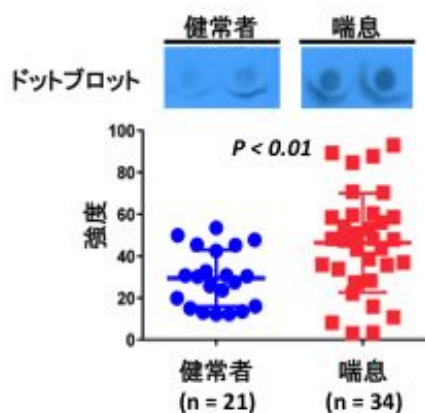


図 1 修飾PM蛋白1に対する抗体化

#### 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 4 件)

Ogino K, Takahashi N, Kubo M, Takeuchi A, Nakagiri M, Fujikura Y, Inflammatory airway responses by nasal inoculation of suspended particulate matter in NC/Nga mice, Environ Toxicol, 査読有, Vol.29, 2014, pp.642-654  
DOI : 10.1002/tox.21791. Epub 2012 Jul 10.

Ogino K, Zhang R, Takahashi H, Takemoto K, Kubo M, Murakami I, Wang DH, Fujikura Y, Allergic airway inflammation by nasal inoculation of particulate matter (PM2.5) in NC/Nga mice, PLoS One, 査読有, Vol.9,

2014, pp. e92710  
DOI : 10.1371/journal.pone.0092710.  
eCollection 2014.

Zhang R, Kubo M, Murakami I, Setiawan H, Takemoto K, Inoue K, Fujikura Y, Ogino K, L-Arginine administration attenuates airway inflammation by altering L-arginine metabolism in an NC/Nga mouse model of asthma, J. Clin. Biochem. Nutr, 査読有, Vol.56, 2015, pp. 201-207  
DOI : org/10.3164/jcfn.14-140

Murakami I, Zhang R, Kubo K, Nagaoka K, Eguchi E, Ogino K, Rebamipide suppresses mite-induced asthmatic responses in NC/Nga mice, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 査読有, Vol.309, 2015, pp. 872-878  
DOI : 10.1152/ajplung.00194.2015

〔学会発表〕(計5件)

荻野 景規, 長岡 憲次郎, 久保 正幸, 岡 瑛良, 江口 依里, 藏光 保宏, PM2.5 のタンパク質を介した生体影響、第 13 回日本予防医学会学術総会、金沢市フレンドパーク石川(石川県勤労者福祉文化会館)(石川県 金沢市) 2015年6月21日

荻野 景規, 張 燃, 竹本 圭, 坊垣 知佳, ヘリ セティアワン, 久保 正幸, 岡 瑛良, 藤倉 義久, 浮遊粒子状物質(PM)による実験的喘息発症の成功とタンパク質の関与、第 85 回日本衛生学会学術総会、和歌山市ホテルアバローム紀の国(和歌山県 和歌山市) 2015年3月28日

岡 瑛良, 張 燃, 竹本 圭, 坊垣 知佳, ヘリ セティアワン, 久保 正幸, 長岡 憲次郎, 荻野 景規, PM中のニトロ化タンパク質を利用した大気環境測定法の開発、第 85 回日本衛生学会学術総会、和歌山市和歌山県民文化会館(和歌山県 和歌山市) 2015年3月27日

村上 育郎, 張 燃, 久保 正幸, 荻野 景規, ダニ誘発マウス喘息モデルに対する rebamipide の効果、第 85 回日本衛生学会学術総会、和歌山市和歌山県民文化会館(和歌山県 和歌山市) 2015年3月27日

荻野 景規, 長岡 憲次郎, 久保 正幸, 岡 瑛良, 江口 依里, 尾長谷 靖, 藏満 保宏, PM2.5 とタンパク質、第 25 回日本産業衛生学会 産業医・産業看護全国協議会 合同開催 第 24 回産業衛生技術部会大会、周南市周南市文化会館(山口県 周南市) 2015年9月18日

〔図書〕(計2件)

荻野 景規 他、メディカルレビュー社、

THE LUNG perspectives, 2015, 4(387-390)

荻野 景規 他、(株)シーエムシー出版、非侵襲的検体検査の最前線 唾液検査・呼吸気検査を中心に、2015, 6(214-219)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: 大気窒素酸化物測定法及び大気窒素酸化物測定キット

発明者: 荻野 景規

権利者: 国立大学法人岡山大学

種類: 特許

番号: 特許第 5877472 号

出願年月日: 2014年4月25日

取得年月日: 2016年2月5日

国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荻野 景規 (OGINO, KEIKI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 70204104

### (2) 研究分担者

竹本 圭 (TAKEMOTO, KEI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 60723252

久保 正幸 (KUBO, MASAYUKI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 60420519

長岡 憲次郎 (NAGAOKA, KENJIRO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 40752374

尾長谷 靖 (OBASE, YASUSHI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

准教授

研究者番号: 40399762

中山 祥嗣 (NAKAYAMA, SHOJI)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研

究センター 総合影響評価研究室・室長

研究者番号: 00368705

### (3) 連携研究者

榎本 秀一 (ENOMOTO, SHUICHI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 10271553