

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15373

研究課題名(和文) 同定したPM2.5中タンパク質(PM蛋白1、PM蛋白2)の生体作用

研究課題名(英文) PM protein 1 may be one of transboundary environmental factor.

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): PM蛋白1は、PM2.5の気道炎症惹起作用を増強し、PM蛋白2は、それ自身が気管支喘息を誘発することが分かった。PM蛋白1は、PM2.5より粒径の小さいに粒径0.1mm以下のPMに細胞内移行に關与する可能性が示唆された。PM2.5のPM蛋白1は、免疫ブロットで確認され、大氣中濃度は1-2 ng/m<sup>3</sup>であった。PM2.5中のPM蛋白1は、ELISAで1月から3月にかけてピークを形成した。重回帰分析で、PM蛋白1は、湿度と負の關連性があり、大氣汚染物質から独立していた。すなわち、PM蛋白1は、PM2.5中に存在し、湿度、気温の低い冬場に大氣中に上昇し、越境性環境因子の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): PM protein1 augmented PM2.5-induced airway inflammation, and PM protein2 lonely induced airway inflammation. It was suggested that PM protein might have a role in entry of PM, diameter below 0.1 mm. PM protein1 was detected in PM2.5 by immunoblotting, and approximate atmospheric concentration of PM protein1 was to be 1-2 ng/m<sup>3</sup>. An ELISA of PM protien1 in PM2.5 showed one peak from Jan. to Mar. Regression analysis showed PM protein1 was negatively associated with humidity, and the association of PM protein with humidity was independent. Taken together, PM protein1 exists in PM2.5, and PM protein1 elevated in winter season with low humidity and low temperature, and PM protein1 may be independent transboundary environmental factor.

研究分野：環境保健

キーワード：PM protein1 PM protein 2 PM2.5 transboundary factor

### 1. 研究開始当初の背景

大気中に存在する径 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、マウスに総浮遊状粒子 (total suspended particulate; TSP) を経鼻投与し、気道抵抗の上昇、気道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* 2012)。さらに、平成 25 年、1-3 月に収集した PM<sub>2.5</sub> 単独で、気道抵抗、気道炎症を認め、喘息様病態の発症に、世界的に 2 番目に成功した (Ogino K et al., *PLoS one* 2014)。同時に、喘息発症マウスから得た血清に、PM<sub>2.5</sub> タンパク質に対する抗体を認め、抗体と反応する PM<sub>2.5</sub> タンパク質のプロテオミクス解析による同定に、世界で最初に成功し、特許の都合上、PM 蛋白 1 及び PM 蛋白 2 と命名し、現在雑誌に投稿中である。

### 2. 研究の目的

大気汚染物質の一つである浮遊粒子状物質 (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  $\mu\text{m}$  の微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) の暴露と、呼吸器・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。中国からの越境が問題になった 2013 年冬期の PM<sub>2.5</sub> を用い、PM<sub>2.5</sub> 単独で、マウスに気道抵抗の増強と気道炎症を認める喘息様病変の作成に、世界的に、2 番目に成功した。この喘息様病態マウスの血清から PM<sub>2.5</sub> 中のタンパク質に対する抗体を認め、この抗体から、免疫沈降法、プロテオーム解析及びアミノ酸分析法により PM<sub>2.5</sub> 中のタンパク質を 2 つ同定した。そこで、同定されたタンパク質の PM<sub>2.5</sub> の生体作用における役割を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) PM<sub>2.5</sub> による喘息様気道炎症発症における PM 蛋白 1 及び蛋白 2 の関与を、動物実験を用いて行う。
- (2) PM<sub>2.5</sub> の細胞内移行における PM 蛋白 1 及び蛋白 2 の役割を、気管支上皮培養細胞を用いて検討する。
- (3) PM<sub>2.5</sub> タンパク質に対する抗体の作成による新しい PM 蛋白の同定を、免疫沈降の SDS-PAGE 上のタンパク質バンドのプロテオーム解析により行う。
- (4) PM 蛋白 1 及び PM 蛋白 2 の PM<sub>2.5</sub> 及

び TSP における存在の確認は、PM 蛋白 1 に対する特異蛍光物質や蛍光標識した抗 PM 蛋白 1 抗体及び抗 PM 蛋白抗体を用いて行う。

(5) PM<sub>2.5</sub> タンパク質、PM 蛋白 1、PM 蛋白 2 と、大気環境物質との年間を通じた関連を、アンダーソン型集塵機及び PM<sub>2.5</sub> 用フィルターを用いた計測により測定した大気中 PM<sub>2.5</sub> タンパク質濃度、PM 蛋白 1 濃度、PM 蛋白 2 濃度と岡山県環境保健センターから出ている岡山市の大気中環境汚染物質濃度を用いて統計的に解析する。

### 4. 研究成果

(1) PM<sub>2.5</sub> による喘息様気管支炎発症における PM 蛋白 1 及び PM 蛋白 2 の関与。PM 蛋白 1 は、単独では作用を呈さないが、PM<sub>2.5</sub> と共に投与すると PM<sub>2.5</sub> 単独によるアレルギー性気道炎症作用を増強することが判明した。さらに、PM 蛋白 2 は、それ自身がアレルギー性気管支喘息を誘発することがわかり論文として報告した (Nagaoka K et al. 2017)。

(2) PM<sub>2.5</sub> の細胞内移行における PM 蛋白 1 及び蛋白 2 の役割。

PM 蛋白 1 の受容体が気管支上皮細胞にあり、その受容体を介した PM の細胞内侵入は、粒径 0.1 $\mu\text{m}$  以下の superfine PM が主に関与することが証明され、論文報告予定である。

(3) PM<sub>2.5</sub> タンパク質に対する抗体の作成による新しい PM 蛋白の同定。

50kDa 以外の 250kDa、30kDa、10kDa のタンパク質は、抗 PM<sub>2.5</sub> 抗体の免疫沈降により SDS-PAGE では検出されているが、プロテオーム解析で有意なタンパク質の情報は得られなかった。

(4) PM 蛋白 1 及び蛋白 2 の PM<sub>2.5</sub> 及び TSP における存在の確認。

PM 蛋白 1 に特異的に反応する蛍光物質を用い、PM<sub>2.5</sub> に PM 蛋白 1 が存在することが確認された。さらに、PM<sub>2.5</sub> を直接、SDS-PAGE で泳動し、その後の免疫プロットで、抗 PM 蛋白 1 抗体 (ポリクローナル、モノクローナル) で確認され、大気中濃度を概算すると 1~2 ng/m<sup>3</sup> であった。PM 蛋白 2 の抗体による免疫プロット法では、PM 蛋白 2 の存在は、TSP、PM<sub>2.5</sub> 中には確認されていない。また、PM<sub>2.5</sub> は、タンパク質が非特異的に結合しやすく蛍光標識抗体を用いて PM<sub>2.5</sub> に結合した PM 蛋白 1 を顕微鏡的に観察することは困難であった。

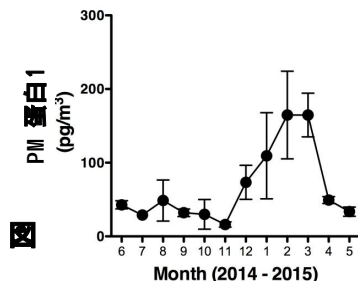
(5) PM<sub>2.5</sub> タンパク質、PM 蛋白 1、PM 蛋白 2 と、大気環境物質との年間を通じた関連性。

PM<sub>2.5</sub> タンパク質は、二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) と正の相関が、湿度、気温と負の相関が認められた。一方、PM 蛋白 1 は、湿度及び気温と負の相関が認められた。重回帰分

析を行うと、PM 蛋白 1 は、湿度と負の関連性があり、その関連性は他の環境汚染物質から独立していた。さらに年間を通じて PM2.5 中の PM 蛋白 1 を ELISA で測定し、大気中濃度を算出すると、1 月から 3 月にかけてピークとなり、最大は 400

pg/m<sup>3</sup> ま  
で達する  
ことが分  
かり(図)、  
重回帰分  
析結果と  
一致する  
内容とな  
った。す  
なわち、  
PM 蛋白  
1 は、湿

度、気温の低い冬場に大気中に上昇し、これまでの大気環境汚染物質とは関連性がなく、新たな越境性環境因子である可能性が示唆された。



#### 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 3 件)

Ito T, Ogino K, Nagaoka K, Takemoto K, Relationship of particulate matter and ozone with 3-nitrotyrosine in the atmosphere, *Environ Pollut*, 査読有, 236C, 2018, 948-952 doi: 10.1016/j.envpol.2017.10.069.

Ogino K, Nagaoka K, Okuda T, Oka A, Kubo M, Eguchi E, Fujikura Y, PM2.5-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in NC/Nga mice, *Environ Toxicol*, 査読有, 32, 2017, 1047-1054, doi: 10.1002/tox.22303.

Nagaoka K, Ito T, Ogino K, Eguchi E, Fujikura Y, Human lactoferrin induces asthmatic symptoms in NC/Nga mice, *Physiol Rep*, 査読有, 5, 2017, e13365, doi: 10.14814/phy2.13365.

〔学会発表〕(計 5 件)

伊藤達男, 長岡憲次郎, 竹本圭, 荻野景規, 大気中 PM タンパク質の 3- ニトロチロシン生成と大気汚染物質の関連性. 第 88 回日本衛生学会学術総会、2018 年 3 月 24 日、東京工科大学蒲田キャンパス (東京都大田区)

長岡憲次郎, 伊藤達男, 竹本圭, 江口依里, 荻野景規, 気道上皮細胞における PM2.5 曝露に対する粘液産生の影響. 第 88 回日本衛生学会学術総会、2018 年 3 月 24 日、東京工科大学蒲田キャンパス (東京都大田区)

竹本圭, 長岡憲次郎, 伊藤達男, 荻野景規, 浮遊粒子状物質とニトロ化タンパクの共曝露によるマウス気道炎症の発症. 第 88 回日

本衛生学会学術総会、2018 年 3 月 24 日、東京工科大学蒲田キャンパス (東京都大田区)  
荻野景規, 伊藤達男, 長岡憲次郎, 江口依里, 竹本圭, 藤倉義久, タンパク質による PM2.5 のアレルギー性気道炎症の増強作用. 第 58 回大気環境学会年会、2017 年 9 月 8 日、兵庫医療大学 (兵庫県神戸市)

長岡憲次郎, 荻野景規, 伊藤達男, 本邦初の PM2.5 による喘息実験の成功とそのメカニズム-PM2.5 組成との関連性. 第 87 回日本衛生学会学術集会、2017 年 3 月 27 日、フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県宮崎市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

#### 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

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

江口 依里 (EGUCHI, Eri)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：60635118

伊藤 達男 (ITO, Tatsuo)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：80789123

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )