

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03039

研究課題名（和文）越境性大気中PM2.5結合ヒトアルブミンの生体影響とその予防法の開発

研究課題名（英文）Biological effect and preventive method for human serum albumin binding to transboundary air borne PM2.5.

研究代表者

荻野 景規 (Ogino, Keiki)

高知大学・医学部・特任教授

研究者番号：70204104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,900,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトアルブミン（hAlb）が、大気中微小粒子状物質（PM2.5）に結合していることを、世界で最初に発見し、その由来や生体影響を検討した。ヒトから排泄されたhAlbが、PMと結合し分解されずに地表上に残存し、湿度が低くなる冬季に大気中に飛散する可能性を見出した。PM2.5は、hAlbと結合し、clathrin依存性のエンドサイトーシスにより細胞内に侵入し、酸化ストレスを誘導し、さらに、PM2.5と結合したhAlbは、大気中のO<sub>3</sub>やNO<sub>2</sub>と反応し、ニトロ化hAlbとなりIL-5及びeotaxin-1を介して気管支の好酸球増多を引き起こすことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気中のPM2.5からヒトアルブミンを世界で最初に同定し、その一部が修飾されアレルゲンになる可能性を見出したことは、大気環境の新しいマーカーを見つけたことになる可能性があり、学術的価値は大きい。このことは、PM2.5の生体影響の研究に重要な情報となるばかりか、大気環境の指標としてさらなる研究の発展に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We discovered for the first time in the world that human albumin (hAlb) is bound to atmospheric fine particulate matter (PM2.5), and investigated its origin and biological effects. We found that hAlb, which is excreted from humans, binds to PM2.5, remains on the surface of the earth without being degraded, and may be dispersed into the atmosphere during winter when humidity is low. hAlb binds to PM2.5, enters cells through clathrin-dependent endocytosis, and induces oxidative stress. Furthermore, hAlb bound to PM2.5 reacted with O<sub>3</sub> and NO<sub>2</sub> in the air to form nitrated hAlb, which caused eosinophilia in bronchi via IL-5 and eotaxin-1.

研究分野：衛生学

キーワード：PM2.5 ヒトアルブミン チロシンニトロ化 好酸球炎症 大気環境

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) PM2.5 のマウスへの投与により喘息が発症することを認め、その原因として PM2.5 に含まれるタンパク質が関与している可能性を報告してきた。

(2) PM2.5 投与により喘息を発症したマウスの血漿を検討したところ PM2.5 と免疫学的に反応することがわかり、血漿中に PM2.5 に含まれるタンパク質の抗体があることが判明した。そこで、この抗体を用いて PM2.5 に含まれるタンパク質を同定すると、ヒトアルブミン(hAIb)であること、hAIb の一部がニトロ化修飾を受けていることが判明し、予備実験でマウスにチロシンニトロ化ヒトアルブミン(N02-Tyr-hAIb)を投与すると気道中に好酸球の増加が認められることから、N02-Ty-AIb が PM2.5 の関与のもとにアレルギーに関与している可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

(1) PM2.5 にヒトアルブミン(hAIb)が結合していることを世界で最初に発見した。そこで hAIb が日本各地どの程度大気中に存在しているのかを検討し、地域を限定し、経時的な大気中 hAIb 量を測定し、気候条件や大気汚染物質との関連性を検討し、その発生源及び発生機序を明らかにする。

(2) PM2.5 の生体影響に hAIb がどのように関わっているかを、気管支培養細胞に暴露しその毒性及び細胞侵入経路を明らかにする。

(3) PM2.5 に結合した hAIb の存在が当初、実験的コンタミではないかと疑われたので、それに対する反論の目的で、チロシンにニトロ化という化学修飾が起きていることを証明した。タンパク質のチロシンニトロ化は、タンパク質のアレルギー性を増すことが知られているので、予備実験で N02-Tyr-hAIb をマウスに点鼻投与した。その結果、気道の好酸球性炎症に関与していることが判明したので、臨床現場で呼吸器、耳鼻科、消化器領域で問題となっている好酸球性炎症との関係性を考え、その詳細な機序を明らかにする。

(4) 当初にはなかったが、昨年度より世界的に健康被害が問題となっている新型コロナウイルス(SARS-COV-2)が PM2.5 に結合する可能性が指摘され、hAIb がタンパク質に結合しやすいことから SARS-COV-2 の S1 タンパク質と PM2.5 の結合を確認したので、COVID-19 患者の病室に小型 PM 集塵機を設置し、SARS-COV-2 が PM フィルターに検出可能かを検証し、SARS-COV-2 を居室空間でモニターできる卓上空気清浄機の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 大気中 hAIb の発生源(越境性)の検討

日本各地の PM 及び土壌、岡山市の経時的に収集した PM2.5、岡山市と長崎県福江島において同時期に採取した PM2.5、中国北京及びインドデリーの PM2.5 から hAIb を免疫学的方法で検出する。

#### (2) N02-Ty タンパク質による好酸球性上気道炎症の機序

花粉タンパク質又はそれぞれの N02-Tyr タンパク質を PM2.5 と混合し、マウスに点鼻投与し、気道抵抗、肺胞洗浄液の細胞分画、鼻腔粘膜、気管支及び肺の eotaxin 1、eotaxin 2 を中心としたサイトカイン、ケモカインの mRNA の抽出と real time PCR で測定する。

#### (3) PM 粒子の気管支上皮細胞への侵入・排泄機序における hAIb の関与

PM2.5 及び PM2.5 + hAIb の細胞影響は、LDH の遊離で毒性や酸化ストレスの関与を抗酸化酵素の mRNA 発現で観察し、endocytosis (細胞内取り込み現象) に関与する因子の mRNA 発現で細胞内移行を検討する。細胞は、hAIb と結合した PM2.5 を、caveolin 又は clathrin 依存性 endocytosis により細胞内へ取り込むことが知られている。PM2.5 の細胞内移行を、蛍光標識した hAIb をマーカーとして顕微鏡で観察し、さらに、caveolin 又は clathrin の siRNA を作成し、細胞内に導入し、PM2.5 の細胞内移行を抑制し、endocytosis の関与を検討する。

#### (4) NO<sub>2</sub>-Ty-hAlb 又は hAlb に対する抗体とアレルギー性疾患の関連性

PM<sub>2.5</sub> に結合した hAlb がチロシンのニトロ化やその他の化学修飾を受けている可能性があるので、暴露した人間は hAlb 又は NO<sub>2</sub>-Tyr-hAlb に対する抗体を有しているであろうという仮設のもと、すでに企業検診で NO<sub>2</sub>-Tyr-hAlb、hAlb、NO<sub>2</sub>-Tyr-bovine serum albumin (BSA) に対する抗体価を測定していたのでこのデータを用い、これら抗体価と一般的検診項目、一酸化窒素(NO) 関連因子(呼気 NO、NO<sub>x</sub>、L-arginine、L-citrulline、L-ornithine)、IgE、アトピー、アレルギー及び生活習慣との関連性を横断研究として統計解析を行った。

#### (5) PM<sub>2.5</sub> の磁性を利用した研究

我々は、PM<sub>2.5</sub> が磁性を有していることを発見した。そこで、磁性 PM<sub>2.5</sub> と非磁性 PM<sub>2.5</sub> のタンパク質量を測定したところ、明らかに磁性 PM<sub>2.5</sub> にタンパク質の結合が認められたので、磁性 PM<sub>2.5</sub> の hAlb の検出をおこなった。

(6) SARS-COV-2 の S1 タンパク質と PM<sub>2.5</sub> の結合を確認し、COVID-19 患者の病室に設置した小型 PM 集塵機で、SARS-COV-2 がフィルターに検出可能かを検証した。

### 4. 研究成果

(1) PM<sub>2.5</sub> に hAlb が結合していることを、世界で最初に発見し、国際誌に掲載した(Ogino N, 2021)。日本各地の PM 中に hAlb の存在が明らかとなり、同時期に人口の少ない長崎県福江島と岡山市の PM<sub>2.5</sub> 中の hAlb 量を比較すると、福江島の方が PM<sub>2.5</sub> 中の hAlb の含有量が多かった。

さらに岡山市の PM<sub>2.5</sub> 中の含有量から大気中の hAlb を、年間を通して測定すると、1-3 月に高くなる傾向が示された。さらに、気温、湿度、環境汚染物質との関連性を統計解析すると、低温で、低湿度の条件で大気中に存在しやすいことが判明した。日本各地の土壌から、hAlb が検出された。その特徴として、西日本に含有量が高い傾向を認めた。中国の PM<sub>2.5</sub> の取得は、分担研究者に依頼していた中国からの PM は、収集が困難であった。しかしながら、金沢大学の好意で送られた

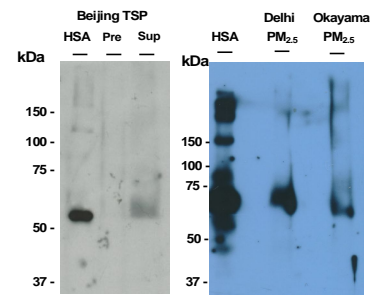


図1 中国北京及びインドデリー市の PM 中の hAlb

北京の total suspended particulate matter (TSP) から、hAlb が検出されている。また、聖路加国際大学の好意で送っていただいたインドのデリーの PM<sub>2.5</sub> から hAlb が検出された(図1)。本研究により、大気中の hAlb は、ヒトから排泄され、一部は PM に結合し、一部は結合してないで、大気中に一定期間存在する。PM に結合した hAlb は、土壌表層に堆積し、冬季の乾燥した条件で大気中に飛散する。また PM<sub>2.5</sub> に結合した hAlb の存在が日本の都市だけの現象でないことが明らかとなり、今後の地球レベルでの環境汚染物質としての可能性の研究の土台となるという意味で、重要な成果である。

(2) 従来、hAlb は、卵白アルブミンのようにアレルギー性はないと言われてきた。しかしながら、我々は、hAlb が、PM<sub>2.5</sub> のアレルギー性を増強するハプテンとなることを証明した(Nagaoka K, 2019)。そこで、hAlb と ONOO<sup>-</sup> を反応させチロシンニトロ化 hAlb (NO<sub>2</sub>-Tyr-hAlb) を作成した。NO<sub>2</sub>-Tyr-hAlb と PM<sub>2.5</sub> とを同時にマウスに点鼻投与すると、個別投与と比較し、気道中の好酸球数は、相乗的に増加した。好酸球増加に関与する可能性のある肺の mRNA の発現を検討すると、IL-5 だけが好酸球数の増加と同じ相乗効果を示した。驚いたことに、NO<sub>2</sub>-Tyr-hAlb 単独投与でも IL-5、eotaxin 1、MUC5ac 及び MUC5b は、有意な発現増加を認めた。このことから、NO<sub>2</sub>-Tyr-hAlb はそれ自体が気道の好酸球増多作用があり、PM<sub>2.5</sub> は、NO<sub>2</sub>-Tyr-hAlb 効果を増強させるアジュバント作用があることを認めた。大気中に NO<sub>2</sub>-Tyr-hAlb が、PM<sub>2.5</sub> に結合し飛散していることが判明し、臨床的に原因不明で問題となっている好酸球性気道炎症、好酸球性鼻咽頭炎、好酸

球性食道炎等の疾患との関連性を示唆する発見である。

3) PM 粒子の気管支上皮細胞への侵入・排泄機序における hAlb の関与を検討した。PM2.5 で、細胞内侵入機序を検討した。まず、PM2.5 と hALB の生体影響を細胞毒性で検討した。PM2.5(200 mg/ml) と hAlb(5.0 mg/ml) を気管支上皮細胞(BEAS-2B)に暴露し、その毒性を LDH 及び WST-8 で検討すると、PM2.5 に活性抑制及び WST-8 の抑制が認められた(図2)。そこで、バイアル内で LDH 活性の再現性実験を行い NADH の産生量を蛍光で測定すると、PM2.5 は用量依存性に直接活性を阻害した。すなわち、PM2.5 は、LHD 活性における電子伝達を直接阻害している可能性が示唆された。

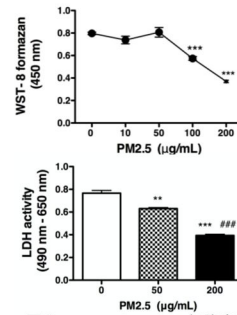


図2 PM2.5のBEAS-2B細胞毒性  
\*\* P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs control; ###P < 0.001 vs 50 µg/ml

気管支上皮培細胞(BEAS-2B)を用い、PM2.5 (100 mg/ml) に対して hAlb を 0.05 mg/ml、0.5 mg/ml、5.0 mg/ml と量を変えて添加したところ、抗酸化酵素 SOD2 の mRNA レベルは、hAlb (5.0 mg/ml) で 6 倍以上上昇した(図3)。そこで、PM2.5 (200 mg/ml) と hAlb(5.0 mg/ml) の添加で抗酸化関連酵素群(SOD1, SOD2, catalase, GPx, TRX1, TRX2, ARG1, ARG2, NRF2-a)の mRNA 発現レベルを検討し、PM2.5 と hAlb で相乗効果が認められたのは、SOD2, catalase, ARG2 であった。そのことから、PM2.5 は、肺泡レベルのアルブミン濃度があるとミトコンドリアの酸化ストレスを誘引する可能性があることが判明し、ミトコンドリアの障害が蛍光顕微鏡及び電子顕微鏡でも証明された。

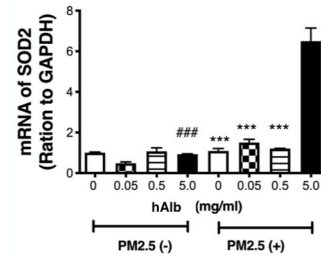


図3 PM2.5とhAlbの用量と SOD2mRNAの誘導  
\*\*\*P < 0.001 or ###P < 0.001 vs PM2.5 + hAlb5.0 mg/ml

アルブミンは、caveolin 依存性エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる事がわかっているため、ローダミン蛍光標識 hAlb が BEAS-2B 培養細胞に取り込まれる現象に、PM2.5 と hAlb がどのように影響するかを検討した。PM2.5 暴露でローダミン蛍光標識 hAlb の取り込みが減少し、hAlb 単独では、何ら影響が認められないのに、PM2.5 に hAlb を加えるとほぼ rhodamin 蛍光標識 hAlb の取り込みは抑制された。PM2.5 は、caveolin 依存性 endocytosis を抑制し、PM2.5 に hAlb を添加するとその抑制作用は更に強くなった。すなわち、PM2.5+ hAlb 投与では、caveolin 依存性 endocytosis は、機能が低いと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagaoka K, Ogino K, Ogino N, Ito T, Takemoto K, Ogino S, Seki Y, Hamada H, Fujikura Y	4. 巻 34
2. 論文標題 Human albumin augmented airway inflammation induced by PM2.5 in NC/Nga mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environ Toxicol	6. 最初と最後の頁 836-843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tox.22751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito T, Ogino K, Nagaoka K, Takemoto K, Nishiyama R, Shimizu Y	4. 巻 143
2. 論文標題 Detection of 3-Nitrotyrosine in Atmospheric Environments via a High-performance Liquid Chromatography-electrochemical Detector System.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JoVE.	6. 最初と最後の頁 e58371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/58371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito T, Ogino K, Nagaoka K, Takemoto K	4. 巻 236
2. 論文標題 Relationship of particulate matter and ozone with 3-nitrotyrosine in the atmosphere.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environ Pollut.	6. 最初と最後の頁 948-952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envpol.2017.10.069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ogino K., Nagaoka, K., Ito, T., Takemoto, K., Okuda, T., Nakayama, S., Ogino, N., Seki, Y., Hamada, H., Takashiba, S., Fujikura, Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Involvement of PM2.5-bound protein and metals in PM2.5-induced allergic airway inflammation in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inhal Toxicol.	6. 最初と最後の頁 498-508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08958378.2018.1561769.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogino N, Ogino K, Eitoku M, Suganuma N, Nagaoka K, Kuramitsu Y	4. 巻 12
2. 論文標題 The identification of tyrosine-nitrated human serum albumin in airborne particulate matter from Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Atmospheric pollution Research	6. 最初と最後の頁 101050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apr.2021.03.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長岡憲次郎、荻野学芳、竹本圭、伊藤達男、笹岡香織、荻野景規
2. 発表標題 PM2.5 曝露による気道上皮細胞の粘液発現.
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野 景規、長岡 憲次郎、伊藤 達男、松浦 有希
2. 発表標題 PM2.5のタンパク質を介した生体影響
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤達男、長岡憲次郎、竹本圭、荻野景規
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 第88回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長岡憲次郎、伊藤達男、竹本圭、江口依里、荻野景規
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第88回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹本圭、長岡憲次郎、伊藤達男、荻野景規
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 第88回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長岡憲次郎、伊藤達男、竹本圭、江口依里、荻野景規
2. 発表標題 PM2.5の培養細胞における毒性学的評価
3. 学会等名 第16回日本予防医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荻野景規、荻野学芳、長岡憲二郎、栄徳勝光、菅沼成文
2. 発表標題 大気中のparticulate matter (PM)に含有されるタンパク質の同定
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021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	尾長谷 靖 (Obase Yasushi)  (40399762)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授  (17301)	
研究分担者	菅沼 成文 (Suganuma Narufumi)  (50313747)	高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・教授  (16401)	
研究分担者	栄徳 勝光 (Eitoku Masamitsu)  (50552733)	高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・講師  (16401)	
研究分担者	荻野 学芳 (Ogino Noriyoshi)  (70614204)	高知大学・医学部・客員助教  (16401)	
研究分担者	荻野 志穂奈 (Ogino Shihona)  (70746685)	高知大学・医学部・客員助教  (16401)	
研究分担者	市村 宏 (Ichimura Hiroshi)  (10264756)	金沢大学・医学系・教授  (13301)	
研究分担者	長岡 憲次郎 (Nagaoka Kenjiro)  (40752374)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  (15301)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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	高柴 正悟 (Takashiba Shogo)  (50226768)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  (15301)	
研究分担者	伊藤 達男 (Ito Tatsuo)  (80789123)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  (15301)	
研究分担者	早川 和一 (Hayakawa Kazuichi)  (40115267)	金沢大学・その他部局等・名誉教授  (13301)	削除：2019年9月17日
研究分担者	中村 裕之 (Nakamura Hiroyuki)  (30231476)	金沢大学・医学系・教授  (13301)	削除：2019年9月17日
研究分担者	上原 孝 (Uehara Takashi)  (00261321)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  (15301)	
研究分担者	浜田 博喜 (Hamada Hiroki)  (10164914)	岡山理科大学・理学部・教授  (35302)	
研究分担者	岡野 光博 (Okano Mitsuhiro)  (60304359)	国際医療福祉大学・医学部・教授  (32206)	
研究分担者	江口 依里 (Eguchi Eri)  (60635118)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  (15301)	削除：2018年7月9日

6. 研究組織（つづき）

	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	竹本 圭  (Takemoto Kei)  (60723252)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教    (15301)	削除：2018年7月9日

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