

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18035

研究課題名（和文）細胞外小胞の構成分子に着目した環境中微粒子の疾患誘発メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of disease-inducing mechanisms of environmental particulates focusing on the constituent molecules of extracellular vesicles

研究代表者

石川 良賀（Ishikawa, Raga）

京都大学・地球環境学堂・特定助教

研究者番号：10914161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞間の情報伝達の担い手であり、近年様々な生命現象や疾患との関連が明らかになってきた細胞外小胞（EV）に着目し、黄砂などの環境中微粒子による呼吸器・免疫アレルギー系疾患の誘発、増悪メカニズムの解明を目指した。ヒト肺胞上細胞や喘息モデルマウスなどに対して、種々の環境中微粒子を曝露した際に放出されるEVを回収し特性評価を行ったところ、黄砂やディーゼル排気微粒子のような細胞毒性や炎症誘導能の高い粒子の曝露において、特にEVの産生量が増加することが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体免疫応答において重要な役割を果たすEVに焦点を当て、環境中微粒子が呼吸器・免疫アレルギー系に与える影響との関連というこれまで未解明であった領域に新たな知見をもたらした点において学術的意義がある。また、疾患バイオマーカーとしても注目されているEVを用いることで、環境中微粒子が関連する疾患（喘息、肺がんなど）に対する新規バイオマーカーの探索に貢献し得る点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on extracellular vesicles (EVs), which are carriers of intercellular communication and have recently been linked to various biological phenomena and diseases. We aimed to elucidate the mechanisms by which environmental particulates, such as Asian sand dust, induce and exacerbate respiratory and allergic diseases. We collected and characterized EVs released from human alveolar epithelial cells and asthma model mice upon exposure to various environmental particulates. It was found that exposure to environmental particulates with high cytotoxicity and inflammatory potential, such as Asian sand dust and diesel exhaust particles, notably increased the production of EVs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：環境中微粒子 PM2.5 細胞外小胞 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

現代社会における都市化や産業化に伴う大気汚染が世界的に深刻化しつつあり、人間社会あるいは生態系に甚大な被害を与えている。特に PM2.5 や黄砂、ディーゼル排気微粒子、金属ナノ粒子、マイクロプラスチックなどに代表される環境中微粒子が呼吸器系や免疫系、循環器系などの生体システムに影響を及ぼすことで、様々な疾患(肺がん、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、アレルギー性鼻炎など)を誘発あるいは悪化させていることが近年問題視されている。しかし、環境中微粒子と呼吸器・免疫系疾患の関連については、疫学的な知見は蓄積されている一方で、環境中微粒子が疾患を誘発もしくは悪化させる詳細な分子メカニズムに関しては、ほとんど明らかになっていないのが現状である。

一方で、細胞外小胞 ( Extracellular vesicle; EV ) とは、あらゆる細胞から放出されるナノサイズの脂質膜ベシクルであり、血液などの体液を介して体内を循環している。EV 内にはタンパク質や核酸などの機能性の生体分子が保持されており、EV はこれらを遠隔の細胞にまで送達することで細胞間情報伝達の中心的役割を担っていることが知られている。EV を受け取った細胞は、親細胞特異的な生体分子に依存した生体応答を示すことから、様々な生命現象や疾患との関連が近年明らかになりつつある。例えば、がん細胞は転移先の臓器に EV に内包された micro RNA を送達することで前転移ニッチを形成することが知られており、EV は様々な疾患における新規バイオマーカーとして注目を集めている。同様に考えると、環境中微粒子が誘発あるいは悪化させる種々の疾患においても EV による細胞間コミュニケーションが関与しているのではないかと予想されるが、そのような報告例は非常に少なく、さらに環境中微粒子の発生源や物性、成分などの環境分析学的特性に基づく EV との関連についての知見はほとんど得られていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、環境中微粒子の曝露が EV の産生や性質に与える影響を評価することで、環境中微粒子による呼吸器・免疫アレルギー系疾患の誘発・増悪機構を解明することである(図1)。具体的には、*in vitro* および *in vivo* の環境中微粒子の曝露系において EV を単離精製し、EV 産生量の変動やマーカー分子発現等を評価した。また、細胞毒性評価やアレルギー炎症応答誘導と EV 産生の変動との相関を評価するとともに、プロテオーム解析による EV タンパク質の発現プロファイルの解析を試みた。

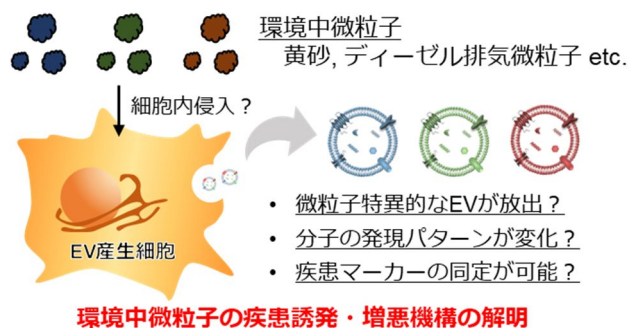


図 1. 本研究の概略図

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト肺胞上皮細胞由来 EV の単離と特性評価

発生源、化学的成分の異なる種々の環境中微粒子(酸化チタン粒子、ディーゼル排気微粒子、黄砂)をヒト肺胞上皮細胞株 A549 に曝露し、24 時間後に WST-1 assay による細胞活性評価を行った。また、曝露 24 時間後に EV フリー培地に置換し、48 時間後に培養上清を回収し、EV 回収キットにより EV を単離精製した。ナノ粒子トラッキング解析 ( Nanoparticle tracking analysis; NTA ) により、回収した EV の粒子濃度および粒径分布を測定し、ウエスタンブロットにより EV マーカーである CD63 および CD81 の発現量を評価した。

### (2) 喘息モデルマウス由来 EV の単離と特性評価

9 週齢の雄性 Balb/c マウスに、酸化チタン粒子、ディーゼル排気微粒子、黄砂、一般大気中より捕集した PM2.5、アレルギー性気道炎症の誘発物質としてアレルギーであるオボアルブミン (Ovalbumin; OVA) を 2 週間ごとに 4 回気管内投与した。投与群としては各粒子に対して、未投与群、OVA 投与群、粒子投与群、OVA+粒子投与群の 4 群である。安楽死後、気管支肺胞洗浄液 ( Bronchoalveolar lavage fluid; BALF ) および血清を回収した。EV 回収キットを用いて、BALF および血清から EV を回収し、NTA により EV 粒子濃度および粒径分布を測定した。またウエスタンブロットやイメージングフローサイトメトリーを用いた解析により、EV マーカーである CD9 および CD81 の発現を単粒子レベルで評価した。

### (3) LC-MS/MS による EV プロテオーム解析

(2) で単離精製した喘息モデルマウスの BALF および血清由来の EV に対して、タンパク質の抽出、消化酵素による分解等を経た後、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 ( LC-MS/MS )

により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト肺胞上皮細胞由来 EV の単離と特性評価

各環境中微粒子を曝露した際の A549 細胞における細胞活性評価 (WST-1 assay) の結果、黄砂、ディーゼル排気微粒子、酸化チタン粒子の順で顕著な細胞活性の低下が認められた。また回収した EV の粒子濃度を NTA により測定した結果、各種環境中微粒子の曝露により EV の産生量が増加する傾向にあることが分かり、黄砂、ディーゼル排気微粒子、酸化チタン粒子の順で産生増加の傾向が顕著であった。またウエスタンブロットにより EV マーカー CD63 および CD81 の発現を確認した。この結果は、上記の細胞活性評価の結果と一致しており、細胞毒性の強い粒子を A549 細胞に曝露した際に、EV 産生も促進されることが明らかとなった。また NTA 測定により単離した EV の粒子径は 130 nm 程度であり、環境中微粒子の曝露による EV 粒子径の変化は見られなかった。またディーゼル排気微粒子曝露群においては、曝露濃度依存的な EV 産生の増加が確認された。

##### (2) 喘息モデルマウス由来 EV の単離と特性評価

喘息モデルマウスの BALF および血清から単離した EV について NTA による粒子径測定および粒子濃度測定を行ったところ、全てのサンプルにおいて約 150 nm 程度の粒子径の微粒子が確認され、さらにウエスタンブロットやフローサイトメトリーにより CD9 や CD81 の発現等が確認されたことから、喘息モデルマウス由来 EV の回収が確認された。BALF サンプルにおいては、ディーゼル排気微粒子と OVA の複合投与群が他の投与形態 (未投与、OVA 単独投与、粒子単独投与) と比べて有意に EV 濃度が高いことが分かった。また黄砂投与群については、黄砂単独投与群および黄砂と OVA の複合投与群において EV 濃度が有意に高かった。酸化チタン粒子あるいは PM2.5 投与群については、増加傾向は認められたものの、有意な増加は認められなかった。また、これらの粒子あるいは粒子とアレルゲンの投与による BALF への EV 産生促進は、BALF 中の炎症性細胞数 (好中球数、好酸球数など) の増加や、炎症性サイトカインおよびケモカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-5、エオタキシンなど) の増加傾向と概ね一致しており、環境中微粒子によるアレルギー炎症増悪時において、BALF 中の EV が何らかのメディエーターとして機能している可能性が示唆された。また、血清中の EV については、粒子あるいは粒子とアレルゲンの投与による EV 産生の促進は認められなかった。

##### (3) LC-MS/MS による EV プロテオーム解析

LC-MS/MS による測定、解析を行った結果、BALF および血清サンプルにおける EV の濃度が少ない、もしくは抽出されたタンパク質濃度が少なかったため、LC-MS/MS によるタンパク質の同定数が少なく、喘息に対する新規 EV バイオマーカーの発見には至らなかった。EV タンパク質の抽出方法の検討や、抽出サンプルのスケールアップ等を検討する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川良賀, 下畑佑太, 玉台亮太, 本田晶子, 定金香里, 三上剛和, 市瀬孝道, 高野裕久
2. 発表標題 粒子状物質の肺炎症・アレルギー増悪における細胞外小胞の役割
3. 学会等名 第29回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川良賀, 高野裕久
2. 発表標題 環境中微粒子が生体分子の発現および細胞外小胞の産生に与える影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉台亮太, 石川良賀, 本田晶子, 市瀬孝道, 松田知成, 高野裕久
2. 発表標題 粒子状物質による肺アレルギー炎症増悪における細胞外小胞の産生及び物性評価
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会 第52回大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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