

令和 元年 6 月 11 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08034

研究課題名(和文) 黄砂・PM2.5の細胞傷害機序：オートファジーの関与

研究課題名(英文) Pathology of the cytotoxicity of Asian sand dust (Kosa) and PM2.5: association of the autophagy with the toxicity

研究代表者

島田 章則 (Shimada, Akinori)

麻布大学・生命・環境科学部・教授

研究者番号：20216055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：地球温暖化・砂漠化亢進に伴い、黄砂・PM2.5の発生頻度が増加し、黄砂・PM2.5粒子の生体への影響が懸念されている。マウス・ラットの肺に黄砂・PM2.5粒子を投与したところ、1. 炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ )・活性酸素種の放出に基づく急性化膿性肺炎が引き起こされ、2. 低亜鉛状態では、さらに、粒子の生体防御系であるオートファジーがマクロファージ内で阻害され、炎症持続・修復遅延が起こること、3. 結晶シリカ粒子(珪肺症の原因の代表的PM2.5)による肺組織の線維化に、サイトカインTGF- $\beta$ を介した上皮間葉転換が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気汚染物質としての黄砂・PM(浮遊粒子状物質)2.5の細胞・組織傷害の機序として、1. 肺胞壁の異物処理細胞であるマクロファージ内での「オートファジー・エンドサイトーシス・リソソーム系」による粒子処理過程にサイトカイン(TNF- $\alpha$ )・活性酸素種が放出され傷害をもたらすこと、2. 低亜鉛の状態では、オートファジー系の停滞による炎症の持続・修復遅延が起こること、3. シリカ粒子による肺組織の重度の線維化に、サイトカイン(TGF- $\beta$ )・肺胞上皮の線維芽細胞への変化(上皮間葉転換)が関与すること、が示された。これらの結果は、大気環境の保全や黄砂・PM2.5のモニタリングの必要性を支持するものである。

研究成果の概要(英文)：The frequency and volume of Asian sand dust (ASD) (Kosa) and PM2.5 are increasing in Japan, and it has been reported these particulate matters may cause adverse respiratory effects. Exposure of these particles to mice and rat induced inflammatory lesions of the lung tissues associated with increased expression of inflammatory cytokines and oxidative stress. Exposure of ASD particles to mice that were fed diets containing low level of Zn showed decreased autophagy function and persistent inflammatory changes, suggesting that low serum zinc concentration may induce the autophagy malfunction, and may result in delayed repair from the lung injury by the particles. Rats, instilled with crystalline silica (Min-U-Sil-5), showed increased expression of TGF- $\beta$  and epithelial-mesenchymal transition of hyperplastic type II epithelial cells in the development process of progressive massive pulmonary fibrosis during silicosis.

研究分野：毒性病理学

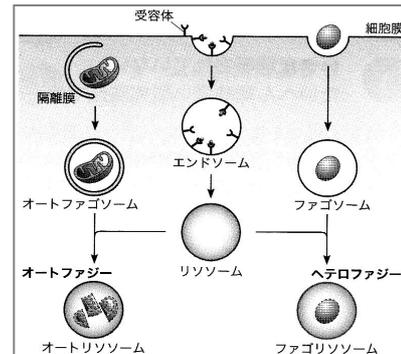
キーワード：黄砂 PM2.5 シリカ オートファジー TGF- $\beta$  上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化・砂漠化亢進に伴い、黄砂・PM2.5の発生頻度が増加し、黄砂・PM2.5粒子の生体への影響が懸念されている。また、化石燃料の燃焼産物である微細粒子(大気汚染物質のいわゆるPM2.5: 2.5µmより小さい粒子。その50%以上は0.1µm以下のいわゆるナノ粒子)と虚血性心疾患・発癌との強い関連性が報告された(WHO 2013)。さらに、自然災害後のがれき処理に伴う微小粒子の発生が公衆衛生上の問題となっている(国立環境研究所 2013)。申請者は、黄砂・ナノ粒子曝露後のマウスの肺に、急性・慢性炎症が誘発され、組織傷害への活性酸素種・サイトカインの関与をこれまでに報告してきたが、微細粒子曝露後の活性酸素種・サイトカイン放出機序の詳細は不明なまま残されている。

細胞は病原性微生物や環境中の微粒子を細胞内部に取り込み、自然免疫機構としての排除機構である「オートファジー・エンドサイトーシス・リソソーム系」(図)を活用して粒子を消化・分解することにより生体を守っている。申請者は、曝露された粒子が肺胞上皮細胞・マクロファージ内の小空胞構造に取り込まれる像(ファゴサイトーシス/カベオラエンドサイトーシス)を報告し、生体防御機構として注目されている



図：オートファジー、エンドサイトーシス、リソソーム系

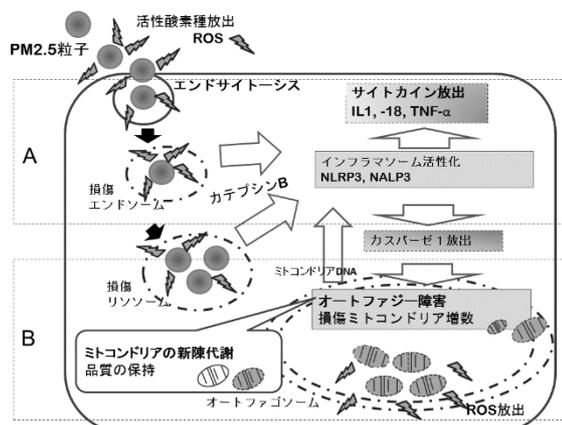
「オートファジー」との関連が強く示唆されたが、微細粒子の細胞内での挙動、特にエンドサイトーシスにより肺組織内のマクロファージに取り込まれた微細粒子のオートファジー・リソソーム系による異物処理とそれに伴うサイトカイン・活性酸素種産生および肺組織傷害との関連は不明である。黄砂・PM2.5粒子の細胞レベルでの傷害機序の詳細を明らかにすることの必要性が増している。オートファジー機能に及ぼす亜鉛の役割に関する知見が得られ、また、低亜鉛状態の高齢者が増えていることから、低亜鉛状態での黄砂粒子の生体影響も懸念されている。

2. 研究の目的

(1) 粒子による組織傷害へのオートファジーの関与

そこで、本研究では、微細粒子による細胞傷害の仮説として、肺胞マクロファージ内のオートファジーを介しての炎症性サイトカイン・活性酸素種放出の機序として、以下の2つの仮説(A)(B)を立てた(図)。

(A) オートファジー・エンドサイトーシス・リソソーム系での粒子の処理の過程で産生された活性酸素種 ROS によるカテプシン・NALP3 インフラマソーム由来の炎症性サイトカイン産生・放出



図：微細粒子による細胞傷害の仮説

(B) オートファジー不全により蓄積された傷害ミトコンドリア由来活性酸素種・mtDNA による NALP3 インフラマソーム活性化の細胞傷害への関与

黄砂・PM2.5のマウス・ラットへの曝露実験を行い、「オートファジー・エンドサイトーシス・リソソーム系内での粒子の挙動」に焦点を当て、微細粒子による細胞傷害発生機序(A)(B)を明らかにすることを第1番目の目的とした。

## (2) 低亜鉛状態の粒子の組織傷害への影響

高齢化に伴う低亜鉛状態の高齢者数の増加が報告されている。亜鉛欠乏は、味覚障害及び免疫低下（マクロファージ・好中球の貪食能低下、リンパ球数減少）に基づく易感染性や組織損傷後の修復遅延をもたらすことが知られている。低亜鉛により、マクロファージ機能低下（異物貪食・処理）、炎症経過の遅延（急性炎症＝滲出反応・サイトカイン放出の変動）が起こり、慢性炎症が持続することが背景として考えられる。低亜鉛飼料給餌マウスの肺における黄砂による炎症病巣の特徴を病理学的に解析し、黄砂を吸入した低亜鉛状態のヒトにおける肺傷害のリスクを検討することを第2番目の目的とした。

## (3) 結晶シリカによる肺の線維化への TGF- $\beta$ ・上皮間葉転換の関与

PM2.5 の代表例であり、また、黄砂の主成分の鉱物である結晶シリカの気道曝露は、顕著な線維化を伴う珪肺結節を誘発する。一般に、分化した粘膜や皮膚の上皮は骨や線維などの間葉系には分化しない。しかし、癌や慢性炎症の病態下ではサイトカイン TGF- $\beta$  を誘因とする分化した上皮の間葉系細胞への変化（上皮間葉転換）が起こることが示唆されている。肺胞壁の線維化は、呼吸困難な状態を示す慢性閉塞性肺疾患 COPD や特発性肺線維症罹患患者に見られ、有効な治療法が無いのが現状である。線維化に関わる要因を解明することは、新たな治療法を開発することにつながる。最終年度において、結晶シリカの気管内投与後のラットの肺における線維化の機序、特に、TGF- $\beta$ ・上皮間葉転換の関与を明らかにすることを第3番目の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 粒子による組織傷害へのオートファジーの関与

#### 急性毒性

6週齢のメス、F344 ラット（日本 CLEA）に黄砂標準粒子（CJ-1）・結晶シリカ粒子（Min-U-Sil 5：粒径 1.8 $\mu$ m）（20mg/200 $\mu$ l）を気管内投与した。6、24 時間後に、気管支肺胞洗浄液および肺組織を採取した。肺組織の傷害・炎症像、マクロファージによる粒子処理像、インフラマソーム活性化（インフラマソームマーカー NLRP3、インフラマソーム活性化因子 カテプシン B）、炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6）および活性酸素種（SOD、8-ニトログアノシン）の関与を、形態学的（HE 染色、免疫染色、電子顕微鏡）並びに生化学的（ELISA キット、ウェスタンブロット）に解析した。

#### 慢性毒性

F344 ラットを用いて、シリカおよび黄砂の慢性曝露（12 か月）を実施した。6週齢のメス、F344 ラット（日本 CLEA）に黄砂標準粒子（CJ-1）・結晶シリカ粒子（Min-U-Sil 5：粒径 1.8 $\mu$ m）（20mg/200 $\mu$ l）を気管内投与した。6、24 時間後に、気管支肺胞洗浄液および肺組織を採取した。肺組織の炎症・傷害像、マクロファージによる粒子処理像（オートファジーマーカー LC3、リソソームマーカー Lamp1、電子顕微鏡解析）、インフラマソーム活性化（インフラマソームマーカー NLRP3、インフラマソーム活性化因子 カテプシン B）、炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6）および活性酸素種（SOD、8-ニトログアノシン）の関与を病理学的に解析した。

### (2) 低亜鉛状態の粒子の組織傷害への影響

5週齢のオスの ICR マウス（日本 CLEA）を1週間予備飼育した後、通常飼料及び低亜鉛飼料給餌群に分け3週間飼育した。低亜鉛状態であることを確認後、肺に黄砂標準粒子（CJ-2）を気

管内投与した。1日後、2週間後、1、2、3ヵ月後に殺処分し気管支肺胞洗浄液・肺材料を用い、肺組織の傷害像、黄砂粒子処理像、白血球及び炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6）の関与を病理学的に解析した。マクロファージ内の黄砂粒子および貪食像についての電顕解析を行った。

### (3) 結晶シリカによる肺の線維化への TGF- $\beta$ ・上皮間葉転換の関与

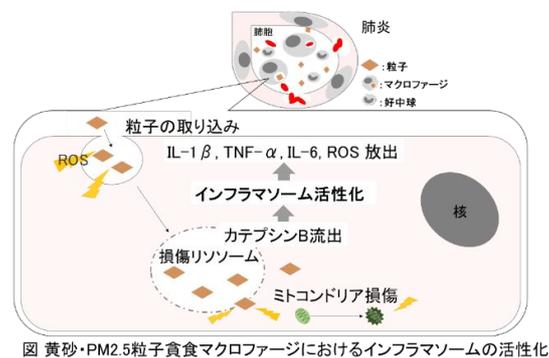
6週齢雌の F344 ラット（日本クレア）に結晶シリカ（Min-U-Sil 5、粒径 1.8  $\mu$ m）50mg/200 $\mu$ l を気管内に4回投与後、1、3、6、12ヵ月後の肺を用いて HE 染色、マッソン・トリクローム染色、免疫組織学的解析（TGF- $\beta$ 、Cytokeratin K8/K18、Vimentin、SP-D、 $\alpha$ -SMA、Factor  $\alpha$ 1）およびウエスタンブロット解析（TGF- $\beta$ ）を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 粒子による組織傷害へのオートファジーの関与

#### 急性毒性

投与 24 時間後の肺組織に、黄砂粒子では化膿性の、結晶シリカ粒子では出血性線維素性の重度の炎症像が認められた。いずれも、気管支肺胞洗浄液における IL-1 $\beta$ ・蛋白濃度の上昇および好中球増数を示した。また、粒子貪食肺胞マクロファージの細胞質におけるオートファジー亢進、カテプシンの一過性の上昇後のインフラソーム活性化および炎症性サイトカイン陽性像が認められ、黄砂・PM2.5 による肺組織傷害への自然免疫応答の関与が示唆された（図）。

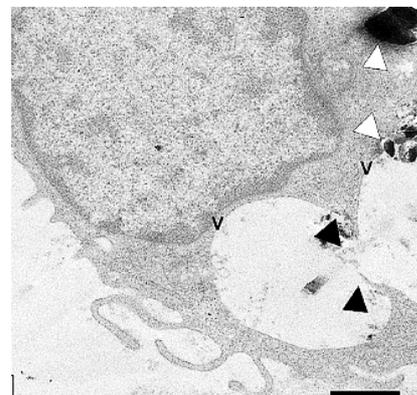


#### 慢性毒性

黄砂投与 3、6ヵ月後剖検群では、肺胞壁の線維性肥厚が見られ、それは、マッソン・トリクローム（線維染色）陽性所見を示した。シリカ投与 1、3、6ヵ月後剖検群において、線維化を伴った結節性肉芽腫（珪肺結節）が認められ、肉芽腫内の類上皮細胞にシリカ粒子の集積が認められた。6ヵ月後剖検群では、結節は顕著な線維化を伴っていた。Ⅱ型肺胞上皮細胞の過形成および筋線維芽細胞様の紡錘形細胞の増生が結節内に認められ、前者は3ヵ月後剖検群で、後者は6ヵ月後剖検群でより多く認められた。これらの所見から、黄砂投与による肺胞壁の肥厚・気腫は、ヒトの肺線維症の発生機序を、また、シリカ投与による顕著な線維性結節は、ヒトの珪肺症における珪肺結節形成機序を解析する上で有用であることが示唆された。

### (2) 低亜鉛状態の粒子の組織傷害への影響

黄砂投与 1日後、2週間後、1、2、3ヵ月後の全ての肺において、好中球およびマクロファージの浸潤を伴う間質性の肺炎像が見られた。これらの炎症の程度は低亜鉛マウス群で強かった。また、低亜鉛飼料給餌マウスでは、サイトカイン IL-1 $\beta$  の陽性所見が強くみられた。また、粒子貪食マクロファージ内の空胞形成像（電顕）（図）およびオートファジーマーカー LC3 の陽性像



図：粒子貪食マクロファージ内の空胞形成・オートファジー停滞像（電顕）

減弱が見られた。以上の結果から、低亜鉛により、マクロファージ機能低下(異物貪食・処理、オートファジー停滞) 炎症経過の遅延(急性炎症=浸出反応・サイトカイン放出の変動)が起こり、慢性炎症が持続する、すなわち、修復遅延が起こることが示唆された。

### (3) 結晶シリカによる肺の線維化への TGF-β・上皮間葉転換の関与

シリカ投与 6, 12 カ月後剖検群では、顕著な線維化を伴う珪肺結節が認められ、結節内には Ⅱ型肺胞上皮細胞の過形成および筋線維芽細胞様の紡錘形細胞の増生が認められた。投与 3 か月後からの強い TGF-β 陽性所見が認められた(免疫染色:シリカ貪食マクロファージおよび紡錘形細胞, ウエスタンブロット:図)また、連続切片の免疫染色により、結節内の同一の紡錘形細胞の細胞質内に、上皮系マーカー(Cytokeratin K8/K18)および間葉系マーカー(Vimentin)の局在が示され、シリカ粒子による珪肺症の進行に、TGF-β を介した上皮間葉転換の関与が示唆された(図)。

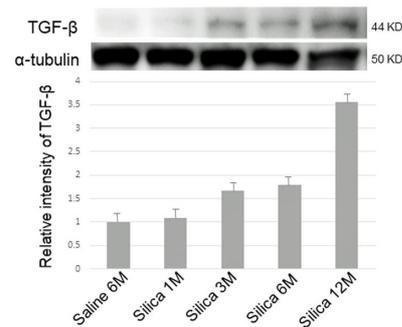


図: 肺の TGF-β 陽性所見(ウエスタンブロット)

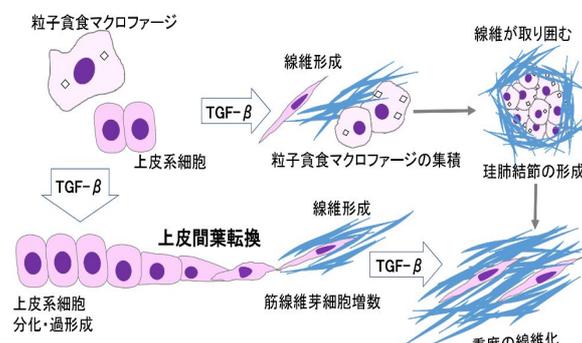


図: 珪肺結節形成における TGF-β を介した上皮間葉転換の関与

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Shimada A, Miyake K, Kenmotsu Y, Ogihara K, Naya Y, Naota M, Morita T, Inoue K, Takano H. Pathological study of pulmonary toxicity induced by intratracheally instilled Asian sand dust (Kosa): Effects of lowered serum zinc level on the toxicity. *Folia Histochem Cytobiol* 2018 56 (1) 38-48, doi: 10.5603/FHC.a2018.0006.
- (2) Kobayashi Y, Shimada A, Morita T, Inoue K, Takano H. A pathological study of acute pulmonary toxicity induced by inhaled Kanto loam powder. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 31;19 (2). pii: E416. doi: 10.3390/ijms19020416.

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 三平果林、駒井舞生、宮本郁美、荻原喜久美、納谷裕子、島田章則  
結晶シリカによる珪肺結節形成への TGF-β・上皮間葉転換の関与  
第 13 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2018 年
- (2) 片倉加奈子、荻原喜久美、納谷裕子、島田章則  
黄砂・PM2.5 による急性肺毒性: 自然免疫(インフラマソーム)の関与  
第 13 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2018 年

- (3) 片倉加奈子、駒井舞生、三平果林、溝口裕依子、荻原喜久美、納谷裕子、島田章則  
黄砂・PM2.5の急性肺毒性：自然免疫（インフラマソーム）の関与  
第5回日本獣医病理学専門家協会学術集会、盛岡市，2018
- (4) 駒井舞生、三平果林、溝口裕依子、片倉加奈子、荻原喜久美、納谷裕子、島田章則  
黄砂・PM2.5の慢性肺毒性：線維化における上皮間葉転換の関与  
第5回日本獣医病理学専門家協会学術集会、盛岡市
- (5) Shimada A. Pathological study of pulmonary toxicity of Asian sand dust (Kosa):  
effects of lowered serum zinc level on the toxicity. 3rd Joint European Congress  
of the European society of toxicology, Lyon France, 2017

〔その他〕

ホームページ等

麻布大学生命・環境科学部病理学研究室

<https://sites.google.com/site/azabuenvironmentalpathology/home>

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、研究者個人に帰属されます。