

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10032

研究課題名（和文）ディーゼル排気粒子の肺線維症病態への増悪作用、およびその分子機構の解明

研究課題名（英文）Exacerbation effects and molecular mechanism of diesel exhaust particles in pulmonary fibrosis

研究代表者

李 英姬（LI, YINGJI）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60350039

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺線維芽細胞遊走におけるディーゼル排気粒子（DEP）の細胞遊走に及ぼす影響、および細胞内シグナル伝達経路について検討した。ヒト胎児由来の肺線維芽細胞株HFL1を用い、DEPはStandard Reference Material 2975を使用した。細胞遊走能はChemotaxis Assay法にてを評価した。肺線維芽細胞において、DEPによる酸化ストレスのシグナルはGTP結合タンパク質のシグナル伝達経路を介して細胞遊走を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

都市部においてDEPはPM2.5の主たる成分であり、DEPの酸化ストレス作用の健康影響が懸念されている。一方、肺疾患のリモデリング病態において肺線維芽細胞の遊走は重要な役割を果たしている。本研究では、DEPは酸化ストレス作用により肺線維芽細胞遊走を促進し、肺疾患のリモデリング病態へ影響する可能性が示唆された。大気汚染地域において、抗酸化介入により肺線維症増悪の予防対策に寄与できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of diesel exhaust particles (DEP) on lung fibroblast migration, and their intracellular signaling pathways. Human fetal lung fibroblast (HFL)1 was used, and DEP used Standard Reference Material 2975. Our results suggested that oxidative stress signals by DEP might promote migration of lung fibroblasts through the signaling pathway of GTP-binding proteins.

研究分野：環境医学

キーワード：肺線維芽細胞 細胞遊走 ディーゼル排気粒子 酸化ストレス

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。

1. 研究開始当初の背景

都市部において、ディーゼル排気粒子 (DEP) は PM2.5 の主たる成分であり、呼吸器疾患の発症や増悪に関与することが疫学研究により報告されている (1, 2)。そのメカニズムとして酸化ストレス作用が注目されている (3~5)。気道上皮は生体のバリアであり、大気汚染物質の影響を最も受けやすい。一方、特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) は原因不明で、急性増悪を伴う予後不良な疾患であり、その病態には酸化ストレスが関わっていることが報告されている (6)。IPF におけるリモデリング病態は不可逆的であり、肺線維芽細胞の遊走は肺線維症リモデリング病態において重要な役割を果たしている (7)。われわれは、抗酸化酵素の発現を制御する転写因子 Nrf2 欠損マウスを用いた研究により、DEP の吸入曝露が酸化ストレス作用により肺線維症の急性増悪、線維化病態を増悪させる可能性について報告しており (8)、その分子メカニズムの解明が求められる。

DEP の気道炎症病態への作用、およびアレルギー性気管支喘息の増悪ないし発作誘発因子として作用に関しては多くの研究が報告されているが、DEP の気道リモデリング病態、および肺線維症病態への作用についての知見は乏しい。大気汚染地域で曝されている高感受性の集団において、抗酸化介入を実施可能な科学的裏付けを探ることが求められている。

2. 研究の目的

肺線維芽細胞遊走におけるディーゼル排気粒子 (DEP) の細胞遊走に及ぼす影響、および細胞内シグナル伝達経路について検討する。

3. 研究の方法

ヒト胎児由来の肺線維芽細胞株 HFL1 を用い、DEP は Standard Reference Material 2975 を使用した。細胞遊走能は Chemotaxis Assay 法にて評価した。DEP を無血清培地に 1mg/mL になるよう溶解し、フィルター (5 μ m) をかけた。48well Chemotaxis Assay Chamber を用い、下層のチャンパーには 2.5 μ g/mL Fibronectin を 28 μ L/well を加え、ウェルの上にメンブレンフィルター (8 μ m) をカバーし、その上に上層のチャンパーをセッティングした。各種濃度の DEP、N-acetylcysteine (NAC)、Y-27632、Pertussis Toxin (PT) を添加し、無血清培地で調整した 1×10^6 /mL 細胞懸濁液 50 μ L/well を上層のチャンパーに加えた。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベーターで 6 時間培養後、メンブレンのポアを通り抜けた細胞をカウントし、遊走能を評価し、比較検討を行った。NAC: N-acetylcysteine, グルタチオンの抗酸化前駆体; Y-27632: ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase: Rho 結合キナーゼ) 阻害剤; PT: Pertussis Toxin (百日咳毒素), Gi シグナル伝達をブロックする。

4. 研究成果

HFL1 細胞遊走において DEP は濃度依存的に肺線維芽細胞の遊走を促進した。

DEP により促進された肺線維芽細胞の遊走は抗酸化物質 NAC によりブロックされた。

DEP により促進された肺線維芽細胞の遊走は Rho 結合キナーゼ阻害剤 Y-27632 によりブロックされた。

DEP により促進された肺線維芽細胞の遊走は Gi シグナル伝達抑制剤 PT によりブロックされた。

肺線維芽細胞において、DEP による酸化ストレスのシグナルは GTP 結合タンパク質のシグナル伝達経路を介して細胞遊走を促進する可能性が示唆された。大気汚染地域において、抗酸化介入により肺線維症増悪の予防対策に寄与できることが期待される。

< 引用文献 >

1. Dockery DW, et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 1993, 329, 1753-1759.
2. Hoek G, et al. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: A cohort study. *Lancet* 2002, 360, 1203-1209.
3. Xiao GG, et al. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem.* 2003;278:50781-50790.

4. Gilliland FD, et al. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet*.2004;363:119-125.
5. Takizawa H, et al. Diesel exhaust particles induce NF-kappa B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription. *J Immunol*. 1999;162:4705-1711.
6. Cantin AM, et al. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 1987;79:1665-1673.
7. Sugiura H, et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits TGF-beta1-induced profibrotic responses in fibroblasts. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009;22:487-491.
8. Li YJ, et al. Nrf2 Regulates the Risk of a Diesel Exhaust Inhalation-Induced Immune Response during Bleomycin Lung Injury and Fibrosis in Mice. *Int J Mol Sci* 2017; 18: E649.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li YJ, Takeda K, Yamamoto M, Kawada T	4. 巻 3
2. 論文標題 Potential of NRF2 Pathway in Preventing Developmental and Reproductive Toxicity of Fine Particles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/ftox.2021.710225	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 Li YJ, Shimizu T, Shinkai Y, Ihara T, Sugamata T, Kato K, Kobayashi M, Hirata Y, Inagaki H, Uzuki M, Akimoto T, Umezawa M, Takeda K, Azuma A, Yamamoto M, Kawada T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Nrf2 Lowers the Risk of Lung Injury via Modulating the Airway Innate Immune Response Induced by Diesel Exhaust in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 443 ~ 443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines8100443	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 李 英姫、菅又昌雄、武田健、川田智之	4. 巻 15
2. 論文標題 ディーゼル排ガス吸入曝露によるマウス肺胞上皮細胞の変化を示す電顕写真	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日医大医学会誌	6. 最初と最後の頁 94-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 李 英姫	4. 巻 14
2. 論文標題 PM2.5の健康影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日医大医学会誌	6. 最初と最後の頁 152-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 李英姫、清水孝子、小林麻衣子、平田幸代、稲垣弘文、川田智之
2. 発表標題 肺線維芽細胞遊走におけるディーゼル排気粒子の促進作用とそのメカニズム
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 李英姫、清水孝子、小林麻衣子、平田幸代、稲垣弘文、川田智之
2. 発表標題 ディーゼル排気粒子のヒト肺線維芽細胞遊走に及ぼす影響
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李英姫、清水孝子、小林麻衣子、平田幸代、稲垣弘文、川田智之
2. 発表標題 ディーゼル排気粒子のヒト肺線維芽細胞活性化に及ぼす影響
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李英姫、清水孝子、小林麻衣子、平田幸代、稲垣弘文、川田智之
2. 発表標題 アレルギー性気道炎症病態のマウス系統差におけるNrf2の役割
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林麻衣子、李英姫、清水孝子、平田幸代、稲垣弘文、川田智之
2. 発表標題 ディーゼル排気粒子のヒト肺線維芽細胞増殖に及ぼす影響
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 英姫, 加藤 活人, 稲垣 弘文, 川田 智之, 吾妻 安良太
2. 発表標題 ディーゼル排気ガス曝露による気道炎症病態におけるNrf2の役割
3. 学会等名 第87 回日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口文雄、李英姫
2. 発表標題 スマホアプリ「医療記録」によるクラウド非依存型PHRシステムの構築
3. 学会等名 第87 回日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ying-Ji Li, Takako Shimizu, Maiko Kobayashi, Yukiyo Hirata, Hirofumi Inagaki, Tomoyuki Kawada, Arata Azuma, Ken Takeda
2. 発表標題 Effects of Diesel Exhaust Particle in Human Bronchial Epithelial Cell Migration and the Intracellular Signaling Pathway
3. 学会等名 World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders (WASOG) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ying-Ji Li, Takako Shimizu, Maiko Kobayashi, Yukiyo Hirata, Hirofumi Inagaki, Arata Azuma, Tomoyuki Kawada
2. 発表標題 ROLE OF NRF2 IN THE ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION DIFFER BETWEEN BALB/C AND C57BL/6 MICE
3. 学会等名 24th Congress of Asian Pacific Society of Respirology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李英姬, 清水孝子, 小林麻衣子, 加藤活人, 武田健, 山本雅之, 川田智之
2. 発表標題 ディーゼル排気ガス曝露による気道炎症病態におけるIL-17の発現
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 小林麻衣子, 李英姬, 清水孝子, 平田幸代, 稲垣弘文, 川田智之
2. 発表標題 DEP曝露によるヒト気道上皮細胞遊走に及ぼすEM/EM703/EM900の影響
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 Ying-Ji Li, Takako Shimizu, Kobayashi Maiko, Ken Takeda, Masayuki Yamamoto, Arata Azuma, Tomoyuki Kawada
2. 発表標題 Role of Nrf2 in lung injury induced by diesel exhaust
3. 学会等名 23rd Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (APSR) (国際学会)
4. 発表年 2018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	川田 智之 (Kawada Tomoyuki) (00224791)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	
研究分担者	吾妻 安良太 (Azuma Arata) (10184194)	日本医科大学・医学部・教授 (32666)	
研究分担者	平田 幸代 (Hirata Yukiyo) (40322515)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	
研究分担者	稲垣 弘文 (Inagaki Hirofumi) (50213111)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	
研究分担者	臼田 実男 (Usuda Jitsuo) (60338803)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	
研究分担者	野呂 林太郎 (Noro Rintaro) (50366738)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	
研究分担者	神尾 孝一郎 (Kamio Koichiro) (20465305)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	

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
研究協力者	清水 孝子 (Shimizu Takako)		
研究協力者	佐藤 麻衣子 (Sato Maiko)		

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