

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03880

研究課題名(和文) 環境性肺疾患におけるスカベンジャー受容体ファミリーの協調的役割

研究課題名(英文) Pathological role of scavenger receptor family molecules in lung diseases associated with environmental particles

研究代表者

中山 勝文(Masafumi, Nakayama)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：20453582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：環境性肺炎は、大気中汚染物質の曝露により引き起こされる慢性炎症疾患であり、その患者数は年々増加している。その病態には様々な免疫細胞が深く関与していると考えられているが、その病態は複雑であり詳細については未だに多くのことが判っていない。本研究では、PM2.5などの大気中微粒子の主成分の一つであるシリカ(二酸化珪素)による肺炎モデルマウスを用いて、肺胞内免疫細胞上に発現するスカベンジャー受容体(scavenger receptor: SR)ファミリー分子の病理的役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日常生活において私たちは常に多かれ少なかれPM2.5や粉塵といった大気中微粒子を吸い込んでいる。肺疾患の患者数は年々増加傾向にあり、その一因としてこのような環境微粒子曝露の可能性が考えられる。本研究では、環境微粒子の主成分の一つであるシリカ(二酸化珪素)の焦点を当て、その免疫細胞による認識機構を明らかにした。その成果は環境性肺疾患の病態の一端を明らかにするものであり、その新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The inhalation of environmental particles is associated with pulmonary diseases, which are triggered by various immune cells; however, the detail mechanisms still remain largely unknown. We have previously reported that the class B scavenger receptor SR-B1 recognizes silica, one of major components of environmental particles. In this study, we have revealed that SR-A1, SR-A6, and SR-B2 also recognize silica and are all expressed on inflammatory macrophages infiltrating into alveolar spaces. These results suggest that the class A and class B SRs are involved in lung diseases associated with environmental pollutants.

研究分野：衛生化学・免疫学

キーワード：スカベンジャー受容体 シリカ 粉塵 肺炎

1. 研究開始当初の背景

環境性肺疾患は、大気汚染物質の曝露により引き起こされる慢性炎症疾患であり、その患者数は世界的に年々増加している。その病態には様々な免疫細胞が関与していると考えられているが、その病態は複雑であり詳細については未だに多くのことが判っていない。

大気中に浮遊する粒子状物質の PM2.5 や多くの粉塵にはシリカ（二酸化ケイ素 SiO₂）が含まれ、実際に純品シリカ粒子を気管内投与したマウスでは珪肺様病態が発症することが古くから知られている。肺胞に到達したシリカ微粒子は肺胞マクロファージに効率良く貪食されて Nlrp3 インフラマソームの活性化を介して炎症を惹起することも比較的最近明らかにされた。しかしながらマウスを用いた *in vivo* 実験において Nlrp3 の慢性肺炎への関与は小さく、さらにマクロファージがなぜシリカを貪食するのかも判っていなかった。そのためマクロファージによるシリカ認識機構を明らかにすることが、珪肺の病態を理解する上で重要だと考えられる。我々はこれまでにシリカ受容体としてクラス B スカベンジャー受容体 SR-B1 を同定し、肺炎の発症に SR-B1 が関与することを報告してきた (Tsugita et al., *Cell Rep.*, 2017)。しかしながら SR-B1 に依存しないシリカ認識経路が存在することも新たに判明した。

2. 研究の目的

マクロファージによるシリカ認識機構を解明する一環として、我々はマウス骨髄由来マクロファージ(BMDMs)の cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングにより、シリカ受容体として SR-B1 を同定してきた。しかしながらその継続研究により SR-B1 と同じクラス B スカベンジャー受容体の SR-B2 もシリカを認識することが明らかとなった。そこで本研究はスカベンジャー受容体ファミリー分子によるシリカ認識の協調的役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 炎症実験

BMDMs によるシリカの認識の形態は走査型電子顕微鏡 (JEM-2100, JEOL) および透過型電子顕微鏡 (JSM-7800F, JEOL) で観察した。BMDMs の炎症応答については、IL-1 β 分泌、細胞死、およびインフラマソーム活性を各々 ELISA、LDH 遊離試験、およびイムノブロットにより解析した。スカベンジャー受容体ファミリー分子の関与を調べるために抗マウス SR-B1 中和モノクローナル抗体、抗マウス SR-B2 中和モノクローナル抗体、抗マウス SR-A1 中和モノクローナル抗体、および抗マウス SR-A6 中和モノクローナル抗体を樹立し、それらを細胞に加えて同様の実験を行った。

(2) *in vivo* 炎症実験

急性肺炎モデルとして、C57BL/6 マウス気管内に結晶シリカ粒子を投与し、経時的に肺胞洗浄液中のサイトカイン量および細胞数を測定した。肺胞洗浄液中細胞を抗 Gr-1 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 SR-A1 抗体、抗 SR-A6 抗体、抗 SR-B1 抗体、および抗 SR-B2 抗体で染色して FACS 解析した。またシリカ認識能は FACS の側方散乱光強度を指標に解析した。病理解析として肺組織をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、病理解析を行った。

4. 研究成果

結晶シリカ粒子を取り込んだマクロファージは、Nlrp3 インフラマソーム活性化依存的に IL-1 β を分泌し、炎症性細胞死パイロトーシスを起こすことが知られており、本研究において BMDMs を用いてその炎症応答を確認した (データ未掲載)。その初期状態を調べるために、結晶シリカ粒子を加えた BMDMs を電子顕微鏡観察した。走査型電子顕微鏡解析では、BMDMs はシリ

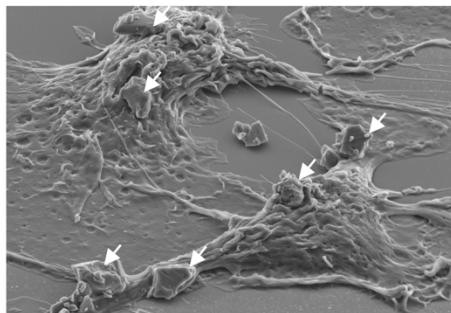


図1. シリカ粒子 (白矢印) を認識しているマクロファージの走査型電子顕微鏡写真

カ粒子を細胞表面に引きつけている様子が観察され (図 1)、透過型電子顕微鏡解析から、シリカ粒子が BMDMs の細胞内に取り込まれていることを確認した (図 2)。その細胞内において多くのシリカ粒子は食胞から細胞質に漏出しており、またその細胞質には複数の空胞形成が観察された (図 2)。一方で、炎症応答を誘発しない粒子を取り込んだマクロファージ内ではそれら粒子は食胞内に留まっており、食胞の損傷も空胞形成も観察されなかった (データ未掲載)。これらの結果から、結晶シリカは食胞を損傷させ、その細胞ストレスが Nlrp3 インフラマソームの活性化およびパイロトーシスを誘導することが示唆された。

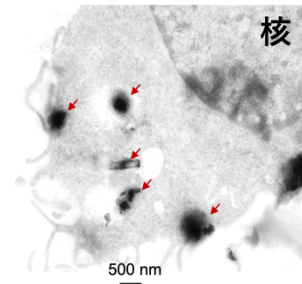


図 2. シリカ粒子 (赤矢印) を取り込んだマクロファージの透過型電子顕微鏡写真

BMDMs に発現する SR-B1、SR-B2、および SR-A1 のシリカ炎症応答への関与を調べるため、これらの中和抗体を BMDMs に前処置した後にシリカを加えた。その結果、anti-SR-B1 と anti-SR-B2 のいずれも部分的に IL-1 β 分泌を抑制したが、両抗体の相加的な抑制効果は認められなかった。そこでさらに SR-A1 を加えたところ、更なる抑制効果が認められた (図 3)。一方で P2X7 受容体に作用する ATP による IL-1 β 分泌に対してはいずれの抗体も作用せず、これら抗体の非特異的な阻害作用の可能性は排除された。以上の結果から、SR-B1 と SR-B2 はシリカを sequential に認識し、SR-A1 はこれら受容体とは独立してシリカを認識する可能性が考えられた。

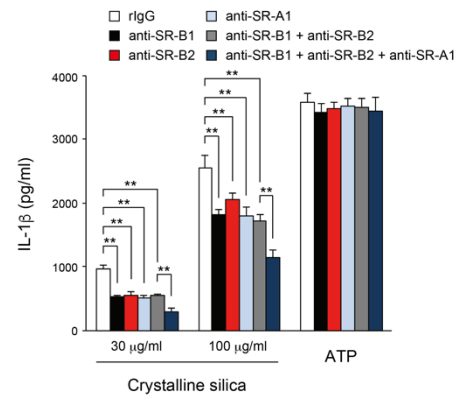


図 3. シリカに対するマクロファージ炎症応答におけるスカベンジャー受容体ファミリー分子の関与

次に我々は、シリカ粒子をマウス気管内に投与し、その肺炎を経時的に観察した。HE 染色による病理解析によりシリカ投与翌日には肺胞内に多くの細胞が浸潤しており、それは 1 ヶ月後まで続くことが観察された (データ未掲載)。次に FACS により肺胞浸潤細胞を解析した結果、シリカ投与翌日に一旦 F4/80 陽性肺胞マクロファージは消失し、投与 1 週間後に戻ることが判明した。一方、Ly6G 陽性好中球の浸潤はシリカ投与翌日から 1 ヶ月後まで持続的に認められた (図 4)。これら細胞上のスカベンジャー受容体ファミリー分子の発現パターンを FACS で解析した結果、肺胞浸潤マクロファージ上には SR-A1、SR-A2、SR-B1、および SR-B2 の全ての発現が認められ、一方、肺胞浸潤好中球には SR-B2 の発現しか認められなかった。さらにこれら細胞のシリカ認識細胞を解析した結果、シリカ投与翌日から 1 ヶ月後に渡るまでシリカは常に肺胞浸潤マクロファージにのみ認識されることが判明した。珪肺におけるスカベンジャー受容体ファミリー分子の病理的役割について解析を進めている。

本研究により、マクロファージ上のスカベンジャー受容体ファミリー分子の協調的作用によってシリカ粒子を認識し、炎症を惹起する可能性が示唆された。マクロファージはシリカ粒子を取り込むが、その後に誘発されるパイロトーシスに伴い、シリカ粒子が再び細胞外に漏出すると考えられる。続いて他のマクロファージがそれを認識して炎症応答を引き起こす、といった連鎖反応が慢性炎症および珪肺を引き起こす一因であると考えられる。したがってシリカ認識機構の制御により珪肺の発症をコントロールできる可能性を探るため更なる研究が必要である。

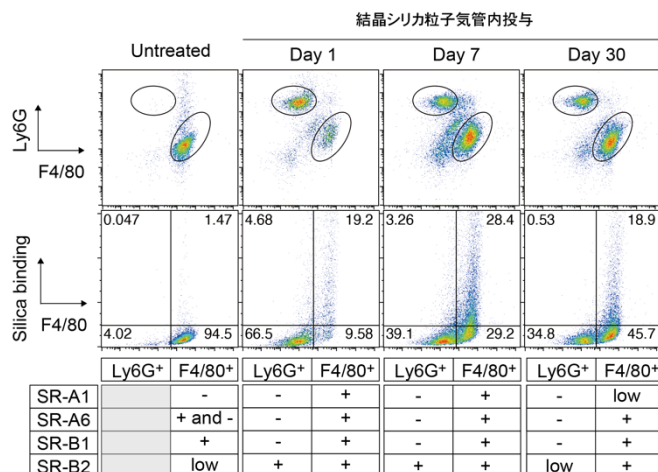


図 4. 結晶シリカ粒子をマウス気管内投与し、投与 1 日、7 日、および 30 日後の肺胞細胞を回収し、細胞集団およびシリカ粒子取り込み細胞を FACS により解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Omori S, Tsugita M, Hoshikawa Y, Morita M, Ito F, Yamaguchi SI, Xie Q, Noyori O, Yamaguchi T, Takada A, Saitoh T, Toyokuni S, Akiba H, Nagata S, Kinoshita K, and Nakayama M	4. 巻 34
2. 論文標題 Tim4 recognizes carbon nanotubes and mediates phagocytosis leading to granuloma formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.108734	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 Kawashima M, Carreras J, Higuchi H, Kotaki R, Hoshina T, Okuyama K, Suzuki N, Kakizaki M, Miyatake Y, Ando K, Nakayama M, Umezu S, Horie R, Higuchi Y, Katagiri K, Goyama S, Kitamura T, Chamoto K, Yano S, Nakamura N, and Kotani A	4. 巻 34
2. 論文標題 PD-L1/L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2405-2417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-020-0737-9	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8件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masafumi Nakayama
2. 発表標題 Antigen Presentation by MHC-dressed Cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 謝祺琳、笠原浩太、中山勝文、高橋卓也
2. 発表標題 PC4天然変性領域における転写活性制御メカニズムに関する計算科学的検討
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 謝祺琳、笠原浩太、中山勝文、高橋卓也
2. 発表標題 PC4天然変性領域のVP16結合の制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山勝文
2. 発表標題 マクロファージによる無機微粒子の認識機構
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山勝文
2. 発表標題 マクロファージによる粒子状化学物質の認識機構
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会（悪天候のため誌上開催）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山勝文
2. 発表標題 結晶微粒子に対する炎症応答とその関連疾患
3. 学会等名 東邦大学第11回生体防御基盤研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山勝文
2. 発表標題 結晶微粒子に対する炎症応答とその関連疾患
3. 学会等名 順天堂大学アトピー疾患研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山勝文
2. 発表標題 結晶微粒子が引き起こすマクロファージ活性化と疾患
3. 学会等名 第19回関西バイオ創薬研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中山勝文	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エルゼビアジャパン	5. 総ページ数 45-65
3. 書名 基礎免疫学 免疫系の機能とその異常	

〔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	森本 展行 (Morimoto Nobuyuki) (00313263)	東北大学・工学研究科・准教授 (11301)	

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	守田 匡伸 (Morita Masanobu) (10519094)	東北大学・医学系研究科・講師 (11301)	

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