

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08538

研究課題名（和文）金属による職業性喘息の新たな発症機序に関する探索的研究

研究課題名（英文）Research on a new mechanism of metal-induced occupational asthma

研究代表者

門脇 麻衣子（Kadowaki, Maiko）

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：20401979

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）：気管支喘息のうち、金属を取り扱う業務に従事している人に見られる職業性喘息があるが、その発症機序を探索する研究を行った。

ヒト気管支平滑筋細胞を培養し、ニッケル、コバルト、鉄、マンガン、亜鉛、クロムの低濃度～高濃度で刺激をすることにより、気管支平滑筋細胞からの、難治性喘息に關与する気道炎症を惹起させる因子であるIL-6の産生が亢進したことを発見した。IL-6の産生亢進は、IL-6の転写レベルで調節されていた。ニッケル、コバルトの刺激の感知には、酸を感知するレセプターであるOGR1が関与していた。デキサメサゾン投与すると、IL-6産生亢進を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息の本態は、慢性の気道炎症であるが、アレルギー疾患に關与する2型免疫反応を介する炎症においては、吸入ステロイド薬や抗体製剤に奏功する。治療抵抗性の難治性喘息は、喘息患者全体の4～5%を占めるとされているが、2型炎症以外の機序が示唆されている。アレルギー反応を介さずに直接炎症を惹起する機序を解明したことは、これまで有効な治療がなく、症状をコントロールできなかった難治性喘息患者に対して、新たな有効な治療方法が開発される一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Research was conducted to explore the pathogenesis of occupational asthma, a form of bronchial asthma that is seen in people who work with metals.

They found that stimulation of human bronchial smooth muscle cells with low to high concentrations of nickel, cobalt, iron, manganese, zinc, and chromium enhanced the production of IL-6, a factor that induces airway inflammation involved in refractory asthma. IL-6 production was regulated at the transcriptional level of IL-6. OGR1, an acid-sensing receptor, was involved in the sensing of nickel and cobalt stimulation. Dexamethasone treatment inhibited the increased IL-6 production.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：気道平滑筋細胞 気管支喘息 ニッケル コバルト インターロイキン6 OGR1

1. 研究開始当初の背景

特定の労働環境で特定の職業性物質に曝露されることによる喘息が職業性喘息であり、成人喘息の約 15%いるとされている。あらゆる職種で職業性喘息の報告があるが、金属メッキ取り扱い業者などではニッケル (Ni)、超合金製造業者でコバルト (Co) による職業性喘息がみられている。

気管支喘息では気道平滑筋細胞は収縮や増生で気道を狭窄する他に、炎症に関わる因子を分泌することにより気道炎症を引き起こしている。

我々はこれまでに、プロトン刺激により OGR1 を介し気道平滑筋細胞から IL-8 の産生が亢進され、その産生亢進はデキサメサゾンにより抑制されることを発見した。ヒト以外の動物でニッケル、コバルトが OGR1 のリガンドとして作用する報告があり、ニッケル、コバルト刺激のヒト気道平滑筋細胞の OGR1 を介した作用を、難治性喘息の炎症惹起因子とされる IL-6、IL-8 に注目して検討した。

2. 研究の目的

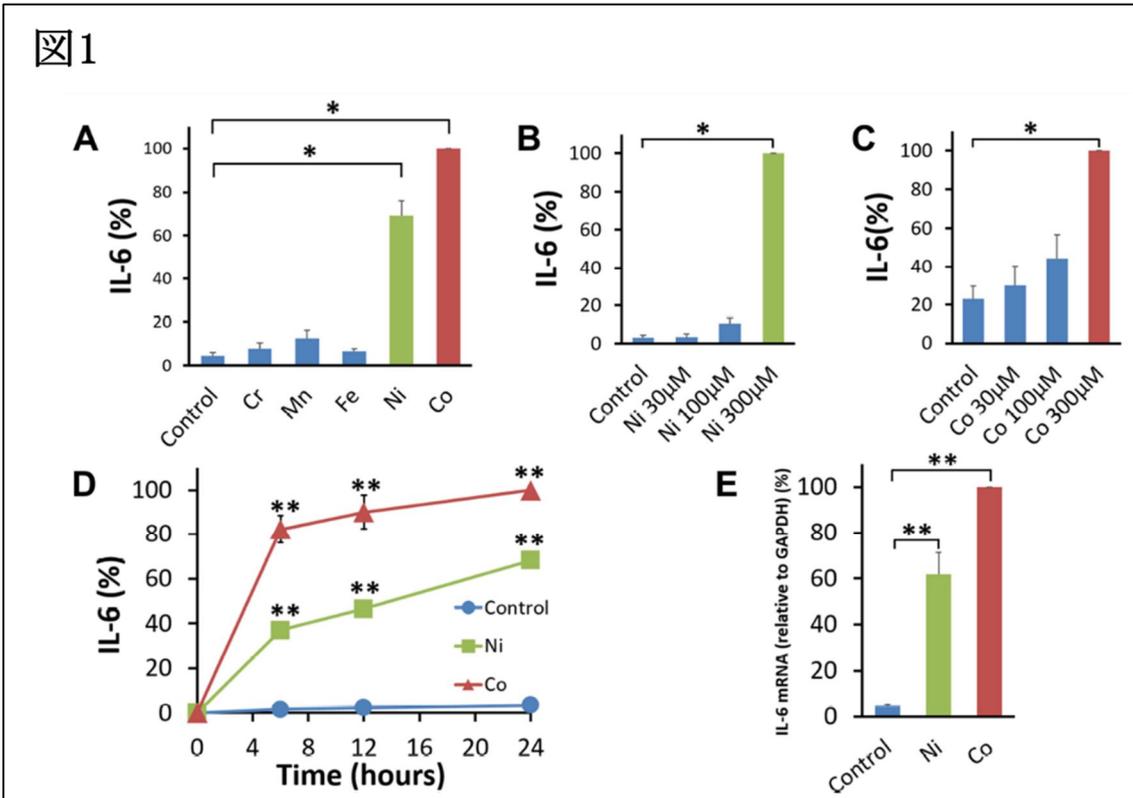
職業性喘息の原因物質として知られるニッケルやコバルトなどの金属刺激によるヒト気道平滑筋細胞の IL-6、IL-8 産生とその機序、デキサメサゾンによる効果を明らかにする。

3. 研究の方法

気道平滑筋細胞は、市販されている正常ヒト気管支平滑筋細胞を使用した。IL-6、IL-8 のタンパクは、各種条件で培養した細胞の培養液中の IL-6、IL-8 を、ELISA 法で測定した。IL-6、IL-8 の mRNA 発現は、Taqman プローブ法によるリアルタイム RT-PCR で検討した。プロトンを感じするレセプターの OGR1 の関与は、OGR1 に特異的な siRNA を気管支平滑筋細胞にトランスフェクションすることにより作成した、OGR1 をノックダウンさせた気管支平滑筋細胞を用いて検討した。ニッケル、コバルトの細胞毒性は、トリパンブルー染色で生細胞を計測し検討した。細胞増殖は、標識された BrdU を用いて ELISA 法で測定した。細胞内 Ca イオン濃度は、Fra-2 を用いて測定した。細胞内のシグナル伝達は、ウェスタンブロッティング法で検討した。

4. 研究成果

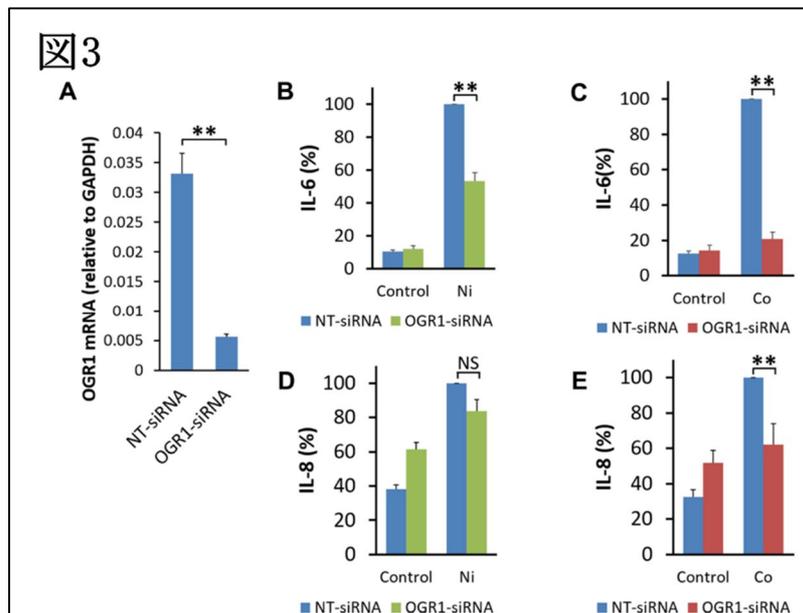
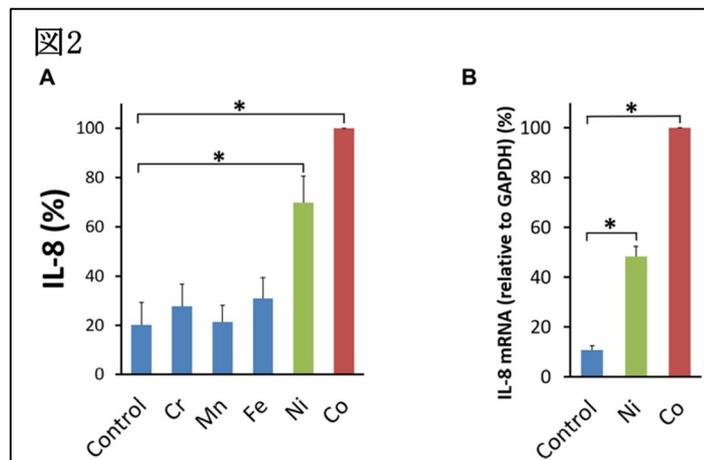
(1) 培養液に様々な金属イオンクロム (Cr)、マンガン (Mn)、鉄 (Fe)、ニッケル (Ni)、コバルト (Co) を添加して気管支平滑筋細胞を培養したところ、ニッケル、コバルトを添加した培養液で培養した場合に IL-6 の産生が有意に亢進された (図 1-A)。ニッケル、コバルトの濃度依存性に IL-6 の産生が亢進した (図 1-B,C)。細胞培養液上清中の IL-6 のタンパクの濃度は、時間とともに上昇した (図 1-D)。ニッケル、コバルト刺激後 5 時間後において、IL-6 の mRNA の発現亢進を有意に認めた (図 1-E)。



(2) IL-8でも同様に、ニッケル、コバルト刺激でIL-8のタンパク産生(図2-A) mRNAの発現が亢進した(図2-B)

(3) OGR1に特異的なsiRNAをトランスフェクションした気管支平滑筋細胞では、OGR1 mRNAの発現が十分に抑制されていたのを確認した(図3-A)。OGR1をノックダウンした気管支平滑筋細胞では、

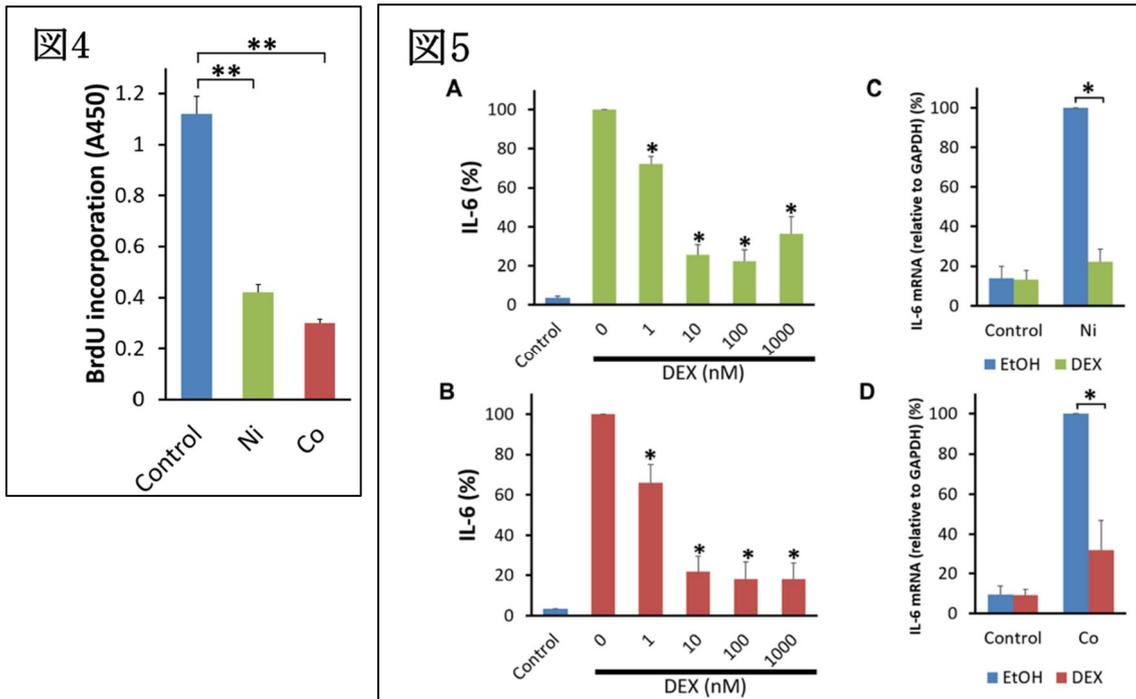
ニッケル、コバルト刺激によるIL-6産生亢進が抑制された(図3-B,C)。IL-8について、コバルト刺激による産生増加の抑制効果は見られたが、ニッケル刺激による産生増加の抑制効果は有為に認めなかった(図3-D,E)。



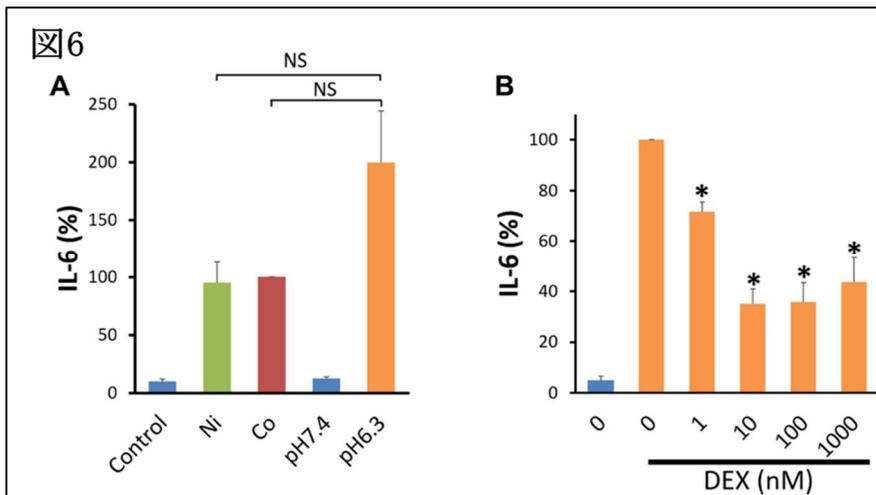
(4) ニッケル、コバルト刺激により、平滑筋細胞の増殖が抑制された(図4)

トリパンブルーによりニッケル、コバルトの毒性を調べたが、刺激後24時間でも98%の細胞が生存していた。

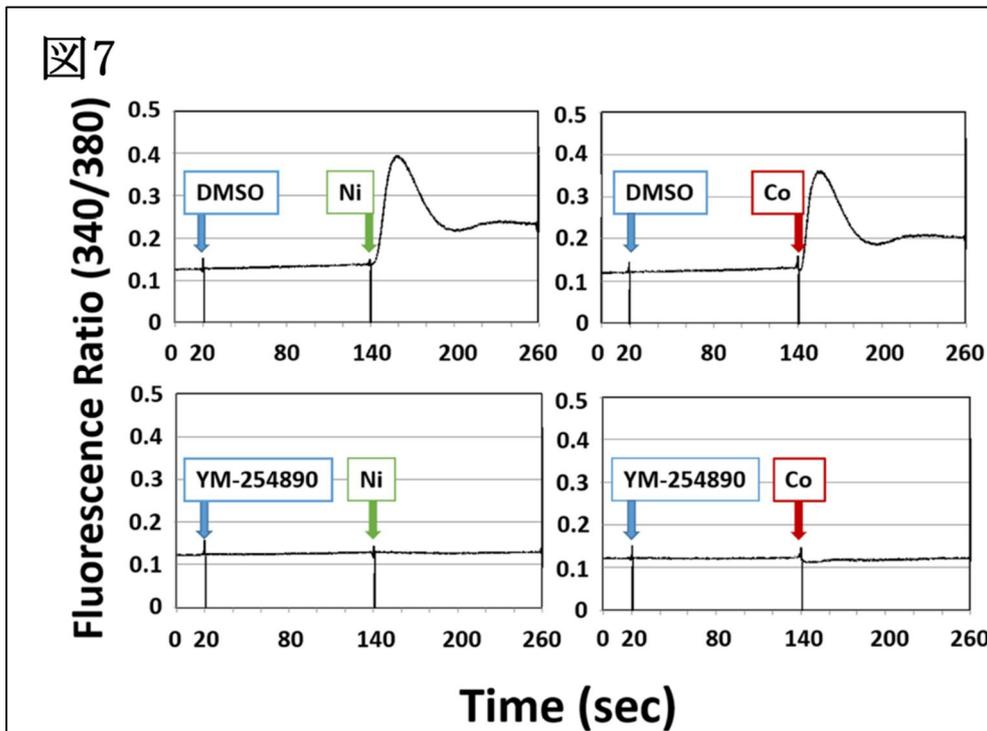
(5) デキサメサゾン濃度依存性にニッケル、コバルト刺激によるIL-6の産生亢進を抑制した(図5-A,B)。ニッケル、コバルト刺激によるIL-6のmRNAの発現亢進も抑制した(図5-C,D)。



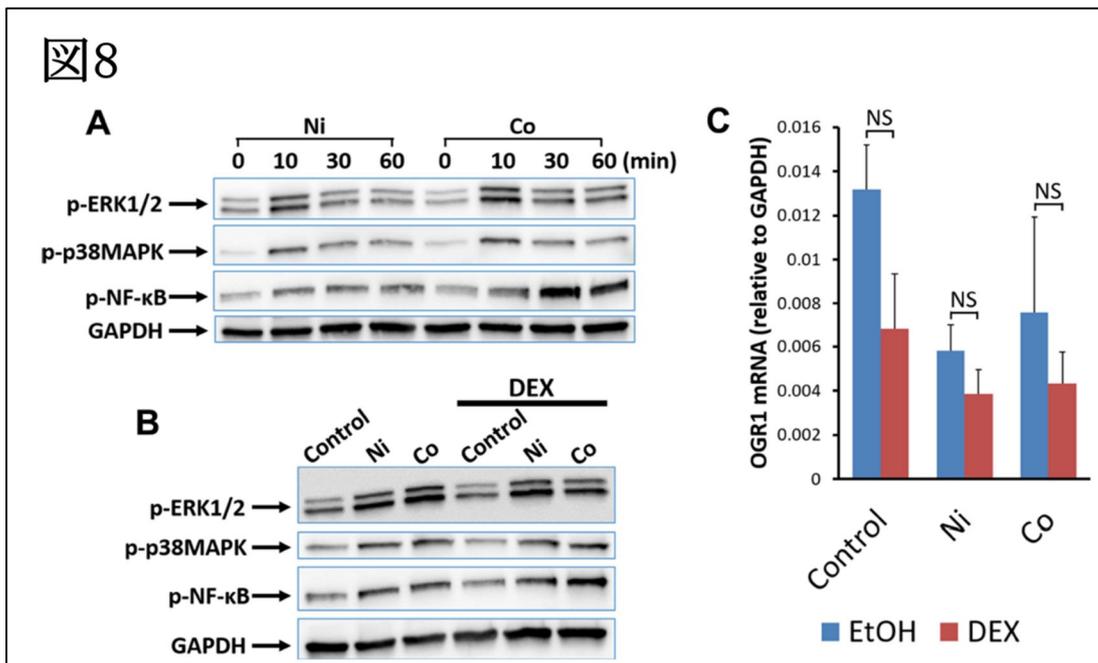
(6) プロトン刺激と比較したが、ニッケル、コバルト刺激でも十分にIL-6の産生が見られた(図6-A)。プロトン刺激によるIL-6産生亢進も、デキサメサゾンにより濃度依存性に抑制された(図6-B)。



(7) ニッケル、コバルト刺激では細胞内 Ca イオン濃度の上昇がみられ、OGR1 の Gq /11 を特異的に阻害する YM-254890 を添加すると細胞内 Ca イオン濃度の上昇は見られなかった (図 7)。



(8) ニッケル、コバルト刺激で ERK1/2、p38-MAPK、NF- κ B の活性化を認めた (図 8-A) が、それらは、デキサメサゾンにより抑制されなかった (図 8-B)。ニッケル、コバルト刺激による OGR1 の発現は、有意差は認めないものの、むしろ低下傾向だった (図 8-C)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kadowaki M, Sato K, Kamio H, Kumagai M, Sato R, Nyui T, Umeda Y, Waseda Y, Anzai M, Aoki-Saito H, Koga Y, Hisada T, Tomura H, Okajima F, Ishizuka T.	4. 巻 Dec 18;14
2. 論文標題 Metal-Stimulated Interleukin-6 Production Through a Proton-Sensing Receptor, Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1, in Human Bronchial Smooth Muscle Cells: A Response Inhibited by Dexamethasone.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inflamm Research	6. 最初と最後の頁 7021-7034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/JIR.S326964. eCollection 2021.	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門脇麻衣子
2. 発表標題 ニッケル、コバルト刺激によるヒト気道平滑筋細胞のIL-6産生機序とステロイドの効果
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇麻衣子
2. 発表標題 金属刺激が気道平滑筋細胞に及ぼす影響とその機序について
3. 学会等名 第52回日本職業・環境アレルギー学会 総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇麻衣子
2. 発表標題 金属刺激が酸を感知するレセプターを介し気道平滑筋細胞から炎症惹起因子を産生する機序について
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤幸市
2. 発表標題 金属刺激によるヒト気道平滑筋細胞のIL-6産生とプロトン感知性OGR1受容体の関与
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇麻衣子
2. 発表標題 ニッケル、コバルト刺激によるヒト気道平滑筋細胞のIL-6産生機序とステロイドの効果
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇麻衣子
2. 発表標題 金属刺激が気道平滑筋細胞に及ぼす影響とその機序について
3. 学会等名 第52回日本職業・環境アレルギー学会 総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇麻衣子
2. 発表標題 金属刺激が酸を感知するレセプターを介し気道平滑筋細胞から炎症惹起因子を産生する機序について
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤幸市
2. 発表標題 金属刺激によるヒト気道平滑筋細胞のIL-6産生とプロトン感知性OGR1受容体の関与
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇麻衣子
2. 発表標題 金属刺激によるヒト気道平滑筋細胞のIL-6産生とステロイドの抑制効果
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020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