

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12271

研究課題名（和文）大気粉塵の炎症反応誘発性と喘息発作の関係の解明

研究課題名（英文）Relationship between inflammatory response of airborne particles and asthma

研究代表者

渡辺 徹志（Watanabe, Tetsushi）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90182930

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：佐世保市において1年間にわたって捕集した大気中のPM2.5がインターロイキン-33遺伝子プロモーター活性を示し、その活性がPM2.5中のエンドトキシン濃度と有意な正の相関関係にあることを明らかにした。一方、プロモーター活性と救急外来を受診した喘息発作患者の数の間に有意な関連性は見られなかった。胸腺間質性リンパ球新生因子（TSLP）遺伝子のプロモーター活性を測定する気道上皮細胞を作製し、京都市および佐世保市において、それぞれ1年間にわたって捕集した大気中のPM10の全抽出物が同遺伝子プロモーター活性を示し、それらの活性がPM10中のタンパク質濃度などと有意な正の相関関係にあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、健康影響が懸念される大気粉塵の炎症反応誘発性に関する新たな測定法と炎症反応誘発性に関する情報を社会に提供することができた。また、本測定法により、大気粉塵の喘息発作誘発に関するメカニズムについて新たな知見を得ることができると考えられる。今後、大気中のエンドトキシン、真菌、酸化ストレス誘発物質と喘息発作の関連性について新たな知見が得られ、喘息発作の予防のための貴重な情報を社会に提供できると期待される。

研究成果の概要（英文）：We clarified that airborne fine particulate matter (PM2.5) collected for one-year period in Sasebo City showed interleukin-33 gene promoter activity, and that this activity was significantly positively correlated with the concentration of endotoxin in PM2.5. On the other hand, no significant association was found between the gene promoter activity and the number of asthma attack patients who visited the emergency department during the same period. We generated airway epithelial cells to measure the promoter activity of the thymic stromal lymphopoietin (TSLP) gene, and found that all extracts of airborne particulate matter (PM10) collected for one-year period in Kyoto and Sasebo showed the promoter activity, and these promoter activities were significantly positively correlated with the concentrations of protein and other parameters in the PM10.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：PM2.5 PM10 上皮サイトカイン IL-33 TSLP

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息(喘息)患者は、気道に慢性的な炎症症状を有しており、環境要因により炎症症状が悪化することで発作性の気道狭窄(呼吸困難)などを起こすと考えられている。エンドトキシンは、炎症性サイトカイン誘導能を有することが知られており、吸入により気道の炎症症状を悪化させることで喘息発作を誘発すると推測され、研究代表者らは、大気中のエンドトキシン濃度が喘息発作により救急外来を受診した患者数と有意な正の関連性を示すことを初めて明らかにした^{1, 2)}。一方、大気粉塵中には、硫酸塩、硝酸塩やタンパク質なども含まれているが、それらと炎症性サイトカイン誘導との関係についてはほとんど明らかにされていなかった。また、喘息発作に関連する炎症性サイトカインとしてヒト腫瘍壊死因子- (TNF-) やインターロイキン(IL)-6 が報告されていたが、それらに加え、気道上皮細胞において産生される上皮サイトカインである IL-33 や胸腺間質性リンパ球新生因子(thymic stromal lymphopoietin (TSLP)) なども喘息発作に関与することが近年明らかにされ、喘息患者の気道における TSLP の発現レベルと喘息の重症度が相関することが報告された³⁾。

(2) 研究代表者らは、近年、TNF-、IL-6、IL-33 の遺伝子のプロモーター遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミドをラット気道上皮由来細胞に導入した 3 種類の高感度な遺伝子プロモーター活性試験細胞を作製した⁴⁾。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らが作製した IL-33 等の遺伝子発現を検出するレポーター遺伝子を導入した細胞を用いて大気粉塵のそれらの遺伝子プロモーター活性を明らかにするとともに、それらの活性と大気粉塵の成分ならびに喘息発作との関連性を明らかにする。

(2) 喘息の重症度と喘息患者の気道における発現レベルが相関することが報告されている TSLP の気道上皮細胞における大気粉塵による誘導を測定する細胞を作製し、その細胞を用いて、大気粉塵の TSLP 誘導能を明らかにする。また、TSLP 誘導能と大気粉塵成分の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者らが作製した IL-33 遺伝子プロモーター活性試験細胞(IL-33 試験細胞)⁴⁾を用いて、長崎県佐世保市において捕集した大気 14~72 m³ に相当する微小粒子状物質(PM_{2.5})の抽出物について IL33 遺伝子プロモーター活性を測定した。また、PM_{2.5}抽出物によるプロモーター活性に対するポリミキシン B 添加の影響を調べた。さらに、佐世保市において1年間にわたって1週間分ずつ捕集した PM_{2.5} (47 試料)の抽出物について IL33 遺伝子プロモーター活性を測定した。また、同試料について含まれるエンドトキシン量を limulus amoebocyte lysate (LAL) カイネティック法により測定した。

(2) ヒト TSLP 遺伝子のプロモーター領域とホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミドを作製し、本プラスミドをラット気道上皮 EGV-4T 細胞に導入して TSLP 遺伝子プロモーター活性試験細胞(TSLP 試験細胞)を作製し、本 TSLP 試験細胞の 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) とエンドトキシンに対する TSLP 遺伝子プロモーター活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより測定した。また、福岡県太宰府市において捕集した大気中の浮遊粒子状物質(PM₁₀)の抽出物(8.8~35.0 m³/ml)で TSLP 試験細胞を処置した時の発光強度を測定した。また、エンドトキシンと PM₁₀抽出物による TSLP プロモーター活性の誘導に対するポリミキシン B 添加の影響について試験した。さらに、京都市及び佐世保市において1年間にわたり1週間分ずつ捕集した PM₁₀の抽出物について、本試験系を用いて TSLP プロモーター活性を測定した。さらに、同試料についてエンドトキシン、タンパク質および水溶性イオンの定量分析を行い、各成分の濃度と PM₁₀抽出物の TSLP 遺伝子プロモーター活性の関係を解析した。佐世保市において捕集した PM₁₀については、エンドトキシン、タンパク質および(1-3)-β-D-グルカンの定量分析およびジチオスレイトール(DTT)アッセイを用いた酸化能の測定を行い、各成分の濃度ならびに酸化能と PM₁₀抽出物の TSLP 遺伝子プロモーター活性の関係を解析した。

4. 研究成果

(1) 佐世保市において捕集した大気 14~72 m³ に相当する PM_{2.5} の抽出物について IL-33 遺伝子プロモーター活性を測定した結果、プロモーター活性は PM_{2.5} 抽出物の用量に依存して陰性対照と比較して有意に上昇した。また、PM_{2.5} 抽出物によるプロモーター活性がポリミキシン B 添加により有意に抑制されたことから、本活性の上昇が試料中のエンドトキシンによるものであることが示唆された。1年間にわたって捕集した大気 72 m³ 相当の PM_{2.5} の抽出物では、すべての試料が陰性対照と比較して有意に高いプロモーター活性を示し、28 m³ 相当抽出物では、一部の試

料において有意なプロモーター活性の上昇はみられなかった。大気 72 m³ 相当の PM_{2.5} の抽出物による IL-33 遺伝子プロモーター活性は、エンドトキシン濃度と有意な正の相関関係にあることがわかった。一方、同遺伝子プロモーター活性は同期間における救急外来を受診した喘息発作患者の数と有意な関連性は見られなかった。

(2) TSLP 遺伝子プロモーター活性を TPA とエンドトキシンを用いて試験した結果、いずれの物質による処置においても、処置 2 時間後から TSLP 遺伝子プロモーター活性が上昇し、処置 6~8 時間で最大となり、TPA では 1~10 ng/mL、エンドトキシンでは 1~10 EU/mL の範囲で用量依存的に上昇した。また、TSLP 遺伝子プロモーター活性を太宰府市において異なる 2 つの時期に捕集した PM₁₀ を用いて試験した結果、プロモーター活性は、いずれの PM₁₀ についても大気 8.8~35.0 m³ に相当する PM₁₀ の抽出物により用量依存的に上昇し、活性の上昇は陰性対照と比較して有意であった。また、エンドトキシンと PM₁₀ 抽出物によるプロモーター活性の上昇がポリミキシン B の添加により有意に抑制された。いずれの PM₁₀ からもエンドトキシンが検出され、TSLP プロモーター活性にエンドトキシンが関与することが示唆された。以上の結果から本細胞を用いることにより微量の PM₁₀ からの抽出物による TSLP 遺伝子の発現誘導を検出することが可能であると考えられた。

(3) 京都市において異なる 2 つの時期に捕集した PM₁₀ の抽出物を用いて細胞を処理し、TSLP 遺伝子プロモーター活性を測定した。その結果、いずれの抽出物でも 14.4 m³/ml 以上で用量依存的に遺伝子プロモーター活性が上昇することが確認できた。そこで、2018 年 6 月から 2019 年 5 月までの 1 年間にわたり捕集した PM₁₀ (50 検体) について TSLP 遺伝子プロモーター活性を測定した。その結果、すべての週の PM₁₀ において、陰性対象と比較して有意に高いプロモーター活性が確認され、2019 年 2 月第 1 週に捕集した PM₁₀ の抽出物において最も高いプロモーター活性がみられた。また、PM₁₀ 中の成分として、エンドトキシン、タンパク質、各種水溶性イオンの濃度を測定したところ、エンドトキシン濃度は、2019 年 5 月第 3 週に捕集した PM₁₀ で最も高く、2018 年 6 月第 1 週に最も低かった。タンパク質濃度は 2019 年 2 月第 4 週に最も高く、2018 年 10 月第 2 週に捕集した PM₁₀ で最も低かった。硫酸イオンとアンモニウムイオンは、いずれも 2018 年 7 月第 3 週に捕集した PM₁₀ において濃度が最も高かった。一方、硝酸イオン、カリウムイオンおよびカルシウムイオンは、いずれも冬季に捕集した PM₁₀ において高濃度であった。PM₁₀ の TSLP 遺伝子プロモーター活性と PM₁₀ 中の成分の濃度との関係を解析したところ、PM₁₀ のプロモーター活性と PM₁₀ 中のタンパク質、硝酸イオン、アンモニウムイオンの各濃度の間に有意な正の相関関係がみられた。

(4) 佐世保市において異なる 2 つの時期に捕集した PM₁₀ の抽出物で細胞を処理し、TSLP 遺伝子プロモーター活性を測定した。その結果、いずれの抽出物でも 14.4~57.6 m³/ml において用量依存的に有意に遺伝子プロモーター活性が上昇した。また、両試料によるプロモーター活性の上昇はポリミキシン B による処理で有意に抑制されたことから、PM₁₀ 抽出物による TSLP の誘導にエンドトキシンが関与していると考えられた。そこで、2020 年 4 月から 2021 年 3 月までの 1 年間にわたり捕集した PM₁₀ (48 検体) について TSLP 遺伝子プロモーター活性を測定した。2020 年 8 月第 1 週に捕集した PM₁₀ 以外の PM₁₀ の抽出物による処置群において陰性対照と比較して有意に高いプロモーター活性が確認された。TSLP プロモーター活性は、2020 年 11 月第 1 週に捕集した試料において最も高く、2020 年 8 月第 1 週に捕集した試料において最も低かった。エンドトキシン濃度は 2020 年 4 月第 3 週に捕集した PM₁₀ で最も高く、2020 年 8 月第 1 週に捕集した PM₁₀ で最も低かった。(1-3)- β -グルカン濃度は 2020 年 6 月第 1 週に捕集した PM₁₀ で最も高く、2021 年 3 月第 4 週に捕集した PM₁₀ で最も低かった。タンパク質濃度は 2020 年 8 月第 3 週に捕集した PM₁₀ で最も高く、2020 年 9 月第 2 週に捕集した PM₁₀ で最も低かった。DTT 消費速度は 2020 年 8 月第 3 週に捕集した PM₁₀ で最も高く、2020 年 8 月第 1 週に捕集した PM₁₀ で最も低かった。PM₁₀ 抽出物の TSLP 遺伝子プロモーター活性は、タンパク質濃度、DTT 消費速度と弱い正の相関があることが確認された。以上の結果から、佐世保市内における大気粉塵が 1 年間を通じて TSLP 誘導能を有し、その強度がタンパク質濃度及び酸化能と相関することを明らかにすることができた。

<引用文献>

- 1) Khan MS, Coulibaly S, Matsumoto T, Yano Y, Miura M, Nagasaka Y, Shima M, Yamagishi N, Wakabayashi K, Watanabe T, Association of airborne particles, protein, and endotoxin with emergency department visits for asthma in Kyoto, Japan, *Environ. Health Prev. Med.*, 23, 2018, 41.
- 2) Ishida T, Khan MS, Kodama H, Uejima Y, Kawase Y, Matsumoto T, Yamamura Y, Sera N, Gotou T, Hirakawa M, Yano Y, Shima M, Yamagishi N, Honda N, Wakabayashi K, Watanabe T. Association of protein and endotoxin in outdoor air with emergency department visits for children and adults with asthma in Fukuoka, Japan, *Biol. Pharm. Bull.*, 43, 2020, 1361-1366.

- 3) Li Y, Wang W, Lv Z, Li Y, Chen Y, Huang K, Corrigan CJ, Ying S, Elevated Expression of IL-33 and TSLP in the Airways of Human Asthmatics In Vivo: A Potential Biomarker of Severe Refractory Disease, *J. Immunol.*, 200, 2018, 2253-2262.
- 4) Yamagishi N, Yamaguchi T, Kuga T, Taniguchi M, Khan MS, Matsumoto T, Deguchi Y, Nagaoka H, Wakabayashi K, Watanabe T, Development of a system for the detection of the inflammatory response induced by airborne fine particulate matter in rat tracheal epithelial cells, *Toxicol. Rep.*, 7, 2020, 900-908.

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 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡辺徹志、川上大輔、林真由、信清依央、矢野ふみか、松本崇宏、山岸伸行 |
| 2. 発表標題 大気浮遊粉塵（PM10）による上皮・炎症性サイトカインの誘導 |
| 3. 学会等名 日本環境変異ゲノム学会第52回大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 林真由、山岸伸行、山村由貴、岡市彩里、西田圭佑、廣川大雅、松本崇宏、渡辺徹志 |
| 2. 発表標題 上皮サイトカインTSLP遺伝子の発現誘導能評価系の作製及び大気粉塵抽出物による評価 |
| 3. 学会等名 第72回 日本薬学会関西支部総会・大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西田圭佑、山岸伸行、松本崇宏、渡辺徹志ほか |
| 2. 発表標題 佐世保市大気中のPM2.5による炎症性サイトカインIL-33の発現 |
| 3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部総会・大会 |
| 4. 発表年 2021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 | 松本 崇宏 (Matsumoto Takahiro) (30780431) | 京都薬科大学・薬学部・助教 (34306) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|