

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590764

研究課題名(和文)ディーゼル排気粒子によるマウス肺線維症病態への増悪作用の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of exacerbation effects on mouse lung fibrosis induced by diesel exhaust particles

研究代表者

李 英姬 (LI, YINGJI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：60350039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、気道上皮細胞を用い、ディーゼル排気粒子(DEP)のEpithelial-mesenchymal transition (EMT)への誘発作用、細胞遊走への影響について検討した。DEP曝露により、気道上皮細胞のE-cadherinの発現が減少し、N-cadherinの発現が増加した。また、DEP曝露によりEMT細胞の遊走能が亢進し、抗酸化酵素のmRNA発現は亢進した。DEPによる変化は抗酸化 N-アセチルシステインによりブロックされた。DEPは酸化ストレス作用により肺線維症のリモデリング病態を増悪する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of fibroblasts plays a critical role in the development of pulmonary fibrosis. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) process is related with pulmonary fibrosis progression. The current study was designed to explore the role of Diesel exhaust particle (DEP) whether or not induce EMT process in airway epithelial cells by oxidative stress. In the bronchial epithelial cell line, E-cadherin expression was down-regulated and N-cadherin expression was up-regulated by DEP exposure. The EMT cells migration was significantly increased and the antioxidant enzymes mRNA expression was up-regulated by DEP. These changes by DEP exposure were blocked by N-acetylcysteine pretreatment. Our results suggest that DEP may exacerbate the tissue remodeling processes of pulmonary fibrosis by oxidative stress.

研究分野：環境医学

キーワード：EMT DEP oxidative stress

1. 研究開始当初の背景

肺線維化のリモデリング病態において、線維芽細胞の遊走は重要な役割を果たしており、その起源として Epithelial-mesenchymal transition (EMT)が注目されている。ディーゼル排気粒子 (DEP)の酸化ストレス作用による肺線維症病態における EMT プロセス、線維芽細胞遊走への影響に関する研究は国内・国外において報告はない。

2. 研究の目的

DEPの酸化ストレス作用の EMT プロセス、EMT細胞遊走への影響について検討し、DEPの肺線維症病態を増悪する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

気道上皮細胞 BET-1 を用い、DEP は Standard Reference Material (SRM) 2975 を用いた。実験 (1): 24well plate に細胞を  $5 \times 10^4$  /ml/well にまいて約 90%confluent になるまで培養し、各濃度に調整した DEP 曝露後、蛋白、RNA を抽出し、EMT マーカーの発現、および抗酸化酵素の発現について検討した。実験 (2): 実験 (1) と同じ方法にて DEP 曝露を行い、wound assay 法により細胞遊走能について評価した。実験 (3): 実験 (1) X (2) において、DEP 曝露 6 時間前に、抗酸化物である N-acetylcysteine (NAC) を添加し、各項目について検討した。

4. 研究成果

DEP 曝露により、気道上皮細胞のマーカーである E-cadherin の発現が減少し、間葉系細胞のマーカーである N-cadherin の発現が増加した。また、DEP 曝露により EMT 細胞の遊走能が亢進し、抗酸化酵素の mRNA 発現は亢進した。DEP によるいずれの変化は抗酸化 N-アセチルシステインによりブロックされた。DEP は酸化ストレス作用により肺線維症のリモデリング病態を増悪する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Li YJ, Kanaji N, Wang XQ, Sato T, Nakanishi M, Kim M, Michalski J, Nelson AJ, Farid M, Basma H, Patil A, Toews ML, Liu X, Rennard SI. Prostaglandin E2 switches from a stimulator to an inhibitor of cell migration after epithelial-to-mesenchymal transition. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 査読有、Vol. 116-117, No. 1, 2015, pp. 1-9.

doi:10.1016/j.prostaglandins.2014.10.003.

2. Kanaji N, Basma H, Nelson AJ, Farid M, Sato T, Nakanishi M, Wang X, Michalski J, Li Y, Gunji Y, Feghali-Bostwick CA, Liu X, Rennard SI. Fibroblasts That Resist Cigarette Smoke-induced Senescence Acquire Pro-fibrotic Phenotypes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 査読有、Vol.307, No.5, 2014, pp.L364-L373. doi: 10.1152/ajplung.00041.2014.
3. 李英姬, 川田智之, 滝澤始. 大気汚染における遺伝子環境相互影響. 呼吸器内科. Vol.23, No.5, 2013, pp. 516-520. (総説)
4. Li YJ, Kawada T, Azuma A. Nrf2 is a protective factor against oxidative stresses induced by diesel exhaust particle in allergic asthma. Oxid Med Cell Longev. 査読有、Vol. 323607, 2013, pp 1-5. doi: 10.1155/2013/323607. (Review)
5. Li YJ, Shimizu T, Hirata Y, Inagaki H, Takizawa H, Azuma A, Kawada T, Sugawara I, Kudoh S, Sunazuka T, Omura S. EM, EM703 inhibit NF- $\kappa$ B activation induced by oxidative stress from diesel exhaust particle in human bronchial epithelial cells: Importance in IL-8 transcription, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 査読有、Vol. 26, No.6, 2013, pp.318-324.
6. Kanaji N, Nelson A, Allen-Gipson DS, Sato T, Nakanishi M, Wang X, Li Y, Basma H, Michalski J, Farid M, Rennard SI, Liu X. The p38 mitogen-activated protein kinases modulate endothelial cell survival and tissue repair. Inflamm Res. 査読有、Vol.61, No.3, 2012, pp.233-244.

[学会発表](計 9 件)

- 1) Li YJ, Shimizu T, Hirata Y, Inagaki H, Shinkai Y, Takeda K, Azuma A, Takizawa H, Yamamoto M, Kawada T, Kudoh S. Nrf2 is closely related to enhance bleomycin induced airway inflammatory responses caused by diesel exhaust particles in mice. European Respiratory Society ( 22nd ) (Vienna, Austria), 2012. 9.
- 2) 李英姬, 清水孝子, 平田幸代, 稲垣弘文, 新海雄介, 武田健, 吾妻安良太, 滝澤始, 山

本雅之, 川田智之, 工藤翔二. Nrf2 欠損マウスにおけるディーゼル排気粒子曝露のブレオマイシン気道炎症病態への影響. 日本衛生学会学術総会 (第 83 回)(金沢), 2013.

3) 李英姫, 清水孝子, 平田幸代, 稲垣弘文, 新海雄介, 武田健, 吾妻安良太, 滝澤始, 山本雅之, 川田智之, 工藤翔二. Nrf2 欠損マウスにおけるディーゼル排気粒子曝露のブレオマイシン気道炎症病態への影響. 日本呼吸器学会学術講演会(第 53 回)(東京), 2013. 4.

4) Li YJ, Shimizu T, Hirata Y, Inagaki H, Shinkai Y, Takeda K, Azuma A, Takizawa H, Liu X, Kawada T, Kudoh S. Diesel exhaust particle induce epithelial-to-mesenchymal transition by oxidative stress in human bronchial epithelial cell. European Respiratory Society Annual Congress(23rd)(Barcelona, Spain), 2013. 9.

5) Li YJ, Shimizu T, Hirata Y, Inagaki H, Kawada T, Azuma A, Takizawa H, Kudoh S. ヒト気道上皮細胞におけるディーゼル排気粒子の酸化ストレスによる上皮間葉移行(EMT)の誘発. 日本呼吸器学会学術講演会(第 54 回)(大阪), 2014. 4.

6) 李英姫, 清水孝子, 加藤活人, 菅又昌雄, 武田健, 山本雅之, 川田智之. Nrf2 欠損マウスにおけるディーゼル排気粒子の気道・肺への影響. 日本衛生学会学術総会(第 84 回)(岡山), 2014. 5.

7) 李英姫, 吾妻安良太. マクロライドと Oxidative stress. シンポジウム「COPD とマクロライド」マクロライド新作用研究会(第 21 回)(東京) 2014. 7.

8) Li YJ, Shimizu T, Kato K, Sugamata M, Takeda K, Yamamoto M, Kawada T. Nrf2 lowers risk for lung injury induced by diesel exhaust. European Respiratory Society Annual Congress(24rd)(Munich, Germany), 2014. 9.

9) 李英姫, 清水孝子, 滝澤始, 吾妻安良太, 山本雅之, 川田智之. OVA 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. 日本衛生学会学術総会(第 85 回)(和歌山), 2015. 3.

〔図書〕(計 2 件)

1. Li YJ, Umezawa M, Takizawa H, Takeda K, and Kawada T (Editors). PM2.5: Role of Oxidative Stress in Health Effects and Prevention Strategy. Nova Science

Publishers, Inc. Hauppauge, NY, 2015. ISBN: 978-1-63482-453-8.

2. Li YJ, Takizawa H, Azuma A, Kawada T. Antioxidant Interventions as Potential Protective Strategies for Populations Susceptible to Diesel Exhaust Particles (Chapter 16), pp.211-225. In: PM2.5: Role of Oxidative Stress in Health Effects and Prevention Strategy (Editors: Li YJ, et al). Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, NY, 2015. ISBN: 978-1-63482-453-8.

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.nms.ac.jp/nms/dhph/index.htm>  
↓

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 英姫 (LI YINGJI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60350039

(2) 研究分担者

川田 智之 (KAWADA TOMOYUKI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00224791

吾妻 安良太 (AZUMA ARATA)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10184194

稲垣 弘文 (INAGAKI HIROFUMI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号:50213111

平田 幸代 (HIRATA YUKIYO)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号:40322515

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: