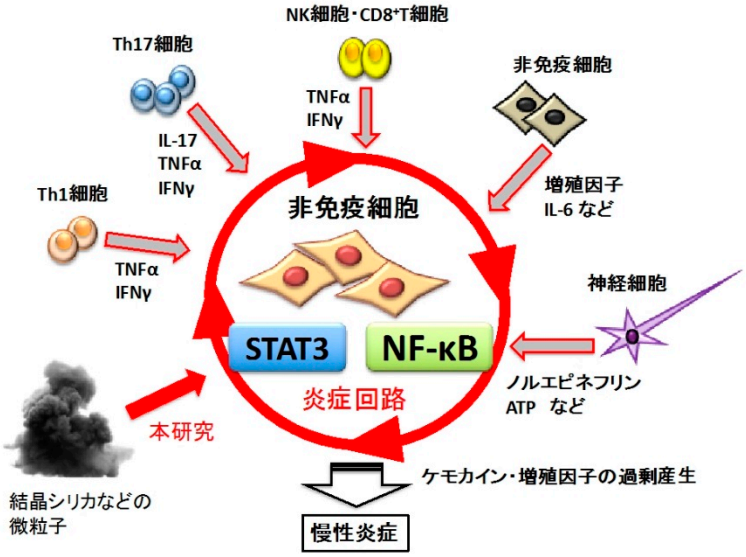
33　外来微粒子による呼吸器炎症・発がん機構の解明	上村　大輔

【目的】大気汚染が深刻化する現代社会において、PM2.5 や結晶性シリカなどの外来微粒子による健康被害は重要な課題である。本提案では、これら微粒子による影響が大きい呼吸器を研究対象として、炎症回路およびゲートウェイ反射という独自の視点から疾患モデルを利用した研究を行い、微粒子による呼吸器炎症・発がん機構を解明することを目的とする。

【方法】炎症回路の活性化が増強している F759 マウスに結晶性シリカを暴露し、呼吸器炎症を誘導する。現在はシリカ懸濁液を点鼻しているが、鼻部エアロゾル暴露装置を研究室で導入し、導入後はシリカ懸濁液をエアロゾル化してより暴露条件をヒトの状況と類似させて実験を行う。さらに、タバコに含まれる有毒物質である NNK を結晶性シリカと同時に暴露させることによって発がんに対する促進効果を検討する。また、体内に取り込まれた微粒子がどのように分布し、また除去されていくのか、蛍光標識微粒子をマウスに暴露し、その蛍光シグナルを追跡することによって明らかにする。

【結果】ヒト気管支上皮細胞に結晶シリカを添加することによって炎症応答（IL-6 の発現）が誘導された。マウスにおいて、結晶シリカの点鼻もしくはエアロゾル暴露によって肺に炎症を誘導することができた。炎症応答が遷延化している F759 マウスを用い、タバコ有毒物質 NNK とともに結晶シリカをエアロゾル暴露しているが、炎症像は認められるものの、現時点で腫瘍形成には至っておらず、腫瘍化にはより長期の時間経過や遺伝子変異などの因子が必要と考えられる。本研究は、第 37 回札幌国際がんシンポジウムにおいて発表した。

本研究の仮説：外来微粒子による炎症回路の活性化



33. 外来微粒子による呼吸器炎症・発がん機構の解明

上村　大輔

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学分野

Key words：炎症回路，シリカ，肺疾患，微粒子

緒　言

大気汚染が深刻化する現代社会において、PM2.5 は、結晶性シリカなどと同様の発がん性リスクが最も高いグループ 1 に分類された。ディーゼル排気微粒子や黄砂などについても同様の懸念がある。特に日本では、自国のみならず近隣国からの有害微粒子の飛来がニュースにも取り上げられ、微粒子による健康被害は国民の関心事項になっている。このような微粒子の体内への取り込みの主な経路は、吸入による呼吸器への暴露である。実際に、結晶性シリカによるじん肺、肺がんのリスクは以前より指摘されている。しかし、微粒子の吸入からじん肺や肺がんなどの呼吸器疾患の発症までは長期間を要すること、そして臓器・細胞レベルでの微粒子認識機構などがあまり理解されていないことが、微粒子による肺疾患の効果的な治療法開発の妨げとなっていると考えられる。

我々の研究室では、慢性炎症性疾患の根底にある炎症誘導機構として「炎症回路」を、そして固有の神経活性化によって局所炎症応答が制御されるという「ゲートウェイ反射」を発見している［1〜3］。炎症回路は、活性化した免疫細胞から産生される IL-17、IFNγや TNFα といったサイトカインなどが、血管内皮細胞や気管支上皮細胞などの非免疫細胞に作用して生じる転写因子 NF-κB と STAT3 の同時活性化によって、非免疫細胞から IL-6、ケモカイン、増殖因子を局所に大量発現させる機構である（図 1）。炎症回路は、関節リウマチモデル、多発性硬化症モデルなど数多くの疾患動物モデルの慢性炎症病態の誘導に不可欠であり、また臨床検体においても炎症回路の活性化の証拠が得られている［1，2，4，5］。一方でゲートウェイ反射は、特異的な神経回路活性化が、特異的な血管の状態を炎症回路の活性化を介して機能的に変化させ、免疫細胞を臓器へ侵入させる機構である。神経細胞による炎症回路への増強効果は、神経伝達物質であるノルエピネフリンや ATP による非免疫細胞内の NF-κB 活性化増強作用が深く関連している（図 1）［6］。

このような背景のもと、吸入によって呼吸器に深刻なダメージをもたらす微粒子が、炎症回路活性化を介して肺に炎症病態やその後の線維化や腫瘍形成を促すのではないかと仮定し、これを検証した。

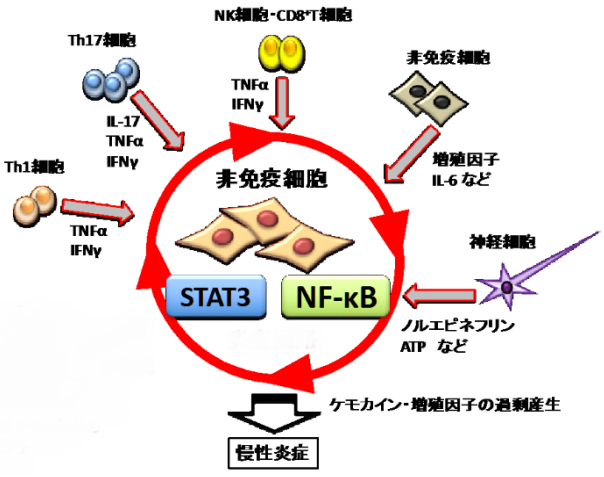


図 1. 炎症回路の模式図

血管内皮細胞などの非免疫細胞において、転写因子 NF-κB と STAT3 が同時活性化することで、大量のケモカインや増殖因子が産生され、慢性炎症を引き起こす。

方 法

1. マウス

C57BL/6 マウスは日本エスエルシーから入手した。F759 マウスは、IL-6 受容体 gp130 の 759 番目のチロシン残基がフェニルアラニンに置換されたノックインマウスであり、以前の研究によって作出された［7］。C57BL/6 背景に戻し交配されている F759 マウスを使用した。マウスは北海道大学遺伝子病制御研究所 SPF 動物飼育室および P2 動物飼育室で飼育され、本研究に含まれる動物実験は北海道大学の当該委員会によって承認されている。

2. シリカ暴露

結晶シリカ（MIN-U-SIL5、US Silica）を 1 mg/ml で生理食塩水（大塚生食）に懸濁し、18G 注射針をはめたシリンジを 10 回通すことによって、懸濁液を均一にした。麻酔下でマウスにシリカ懸濁液を 20 μl 点鼻することで肺炎症を誘導した。小型鼻部ばく露吸入実験装置（柴田科学、SIS-M6MT）を使用した場合には、100 mg/ml 結晶シリカを 30 分暴露した。実験によっては、4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK、Toronto Research Chemicals）を 100 μg/ml で結晶シリカ懸濁液に混合して噴霧した。結晶シリカまたは結晶シリカと NNK の混合液の噴霧は、2～4 週間毎に局所排気装置内で行い、暴露後はディスポーザブルケージ内でマウスを飼育し、床敷や糞が外部に飛散しないように配慮した。

3. 組織染色および免疫組織化学染色

マウスを安楽死後に摘出した肺は、10%中性ホルマリンで固定し、パラフィンブロックに包埋した。薄切、脱パラフィン後、ヘマトキシリンエオシン染色を常法に従って行った。免疫組織化学染色のために、切片はクエン酸バッファー内で抗原活性化を行った。抗リン酸化 STAT3 抗体、コントロール IgG（Cell Signaling Technology）もしくは抗リン酸化 NF-κB p65 抗体（Sigma Aldrich）を一次抗体として、ブロッキングした切片と反応させ、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体を 2 次抗体と HRP 標識アビジン-ビオチン複合体（DAKO）を介して発色させた。ヘマトキシリンで核染色後、カバーガラスで封入し、BioRevo 蛍光顕微鏡（キーエンス）で観察した。

4. 定量的 PCR

マウスを安楽死後に摘出した肺もしくは培養細胞から RNA を抽出（ISOSPIN、ニッポンジーン）し、cDNA を合成後、定量的 PCR を ABI 7300 を用いて行った。発現量は、ハウスキーピング遺伝子である HPRT もしくは GAPDH 遺伝子の発現量で補正した。

5. QUBIC 透明化

マウスに蛍光標識シリカ（Sicastar、COREFRONT）を噴霧後、安楽死させて摘出した肺を 4% PFA で固定後に QUBIC 透明化を行った。QUBIC 透明化は、以前の報告に準じて行った［8］。シート型蛍光顕微鏡によるデータ取得は、田井中博士（新潟大学）にご協力いただいた。

6. 統計解析

群間の差は Student's t-test を用いて解析した。P 値が 0.05 未満を統計的有意とした。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 とした。

結果および考察

1. 結晶シリカは気管支上皮細胞株において炎症回路を活性化する

これまでに我々は、血管内皮細胞や線維芽細胞といった非免疫細胞が炎症回路を介して慢性炎症に重要な役割を果たしていることを複数の動物モデルおよび臨床検体を利用して報告してきた［1，2，4，5］。空気中の微粒子は、呼吸によって取り込まれた後、肺胞マクロファージによって主に感知されると考えられているが、肺の上皮細胞など非免疫細胞の役割を検討するために、ヒト肺気管支上皮細胞株を用いて、結晶シリカが直接炎症応答を惹起するかどうか実験を行った。その結果、結晶シリカは濃度依存的にヒト肺気管支上皮細胞株から IL-6 産生を誘導し、そして TNFα存在下では、その量がさらに増大した（図 2）。この結果は、肺胞マクロファージのみならず、気管支上皮細胞を含む肺の非免疫細胞が肺の炎症に関与する可能性、そして TNFα などの炎症性サイトカイン存在下ではさらに炎症応答を増強する可能性を示唆している。

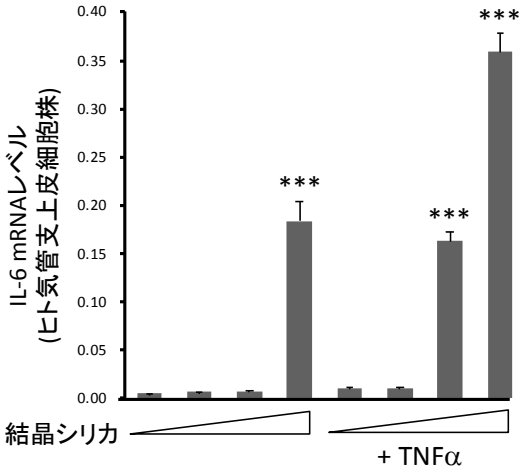


図 2. 結晶シリカによるヒト肺気管支上皮細胞株からの IL-6 産生

ヒト肺気管支上皮細胞株を、結晶シリカ懸濁液もしくは結晶シリカと TNFα の組み合わせの懸濁液で刺激した。刺激後の IL-6 mRNA レベルを示す。データは、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量を表し、平均値＋標準偏差を示す。*** $P < 0.001$

2. 結晶シリカの点鼻は F759 マウスに強い肺炎症をもたらす

次に、マウスにおいて、結晶シリカの暴露が肺の炎症から腫瘍化を誘導するのか検討した。我々は、IL-6 シグナル伝達のネガティブフィードバック機構が欠損することで炎症回路が増強し炎症が強く誘導される F759 マウス［7］を用いることで、肺の炎症から線維化や腫瘍化までをより早期に観察できるのではないかと考えた。F759 マウスに結晶シリカを点鼻することによって、肺に強い炎症を誘導することができた（図 3）。点鼻によってどのように結晶シリカが肺内部に分布しているか、組織透明化法 CUBIC［8］を用いて検討した。蛍光標識シリカを点鼻後、肺を透明化して、シート型蛍光顕微鏡によって観察した。その結果、点鼻によるシリカ暴露は、比較的大きな気管支までに限局することがわかった。これは液体の点鼻による暴露のためと考えられ、そして汚染大気や粉塵は吸入によってより遠位の気管支まで到達することから、結晶シリカ懸濁液をエアロゾル化して噴霧暴露することを次に検討した。

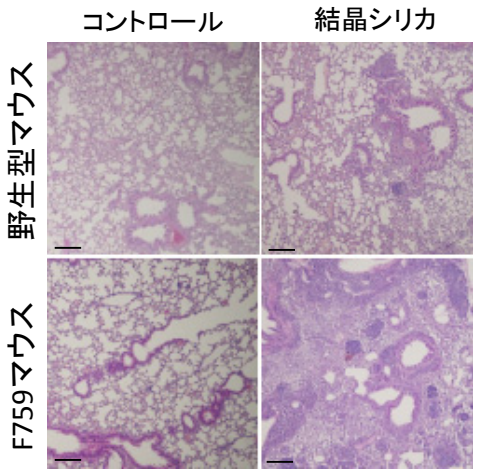


図 3. 結晶シリカ点鼻による肺の炎症像

野生型マウスおよび F759 マウスに結晶シリカもしくは生理食塩水（コントロール）を点鼻した。肺の切片をヘマトキシリンエオシン染色した代表的な像を示す。スケールバーは 50 μm を示す。

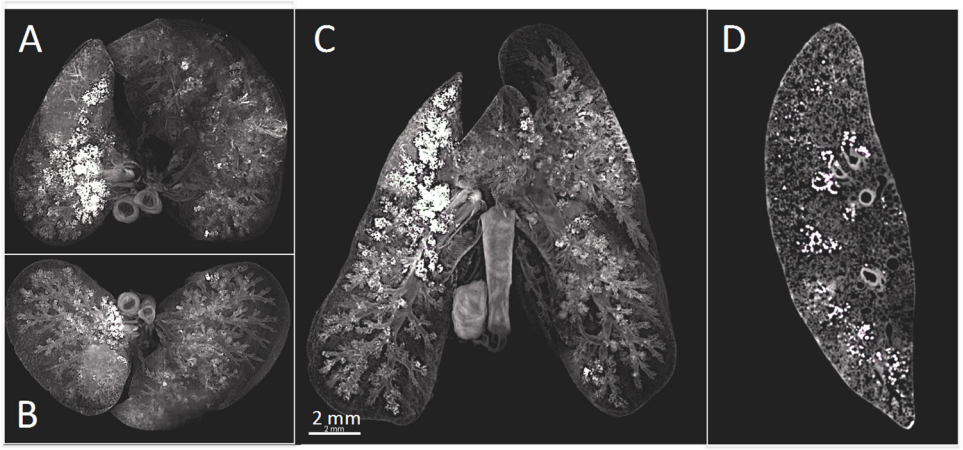


図 4. 点鼻による蛍光標識結晶シリカの分布

F759 マウスに蛍光標識結晶シリカを点鼻した。肺を CUBIC によって透明化して、観察した代表的な像（A 上部から見た像、B 下部から見た像、C 前面から見た像、D 右肺の断面）を示す。

3. 結晶シリカのエアロゾル暴露による炎症回路活性化

小型鼻部ばく露吸入実験装置（図 5）を導入し、結晶シリカ懸濁液もしくはタバコ有害物質 NNK と結晶シリカの混合懸濁液をエアロゾル化して F759 マウスに吸入暴露した。吸入暴露 1 日後に、肺の RNA を抽出し、定量的 PCR によって炎症回路の活性化状態を IL-6 およびケモカイン CCL2 の発現を指標に検討した。結晶シリカ噴霧によって IL-6 および CCL2 レベルが有意に増加した。NNK との混合暴露では、IL-6 および CCL2 レベルの発現上昇がやや減少した（図 6）。これは、NNK が肺胞マクロファージにおいてサイトカイン発現を減少させるという過去の報告［9］と同様の効果と考えられる。これまでに 8 ヶ月にわたり、2〜4 週間に 1 度の暴露を繰り返したが、現時点では、炎症像は認められるものの、腫瘍形成にまでは至っていない。腫瘍化にはより長期の時間経過やさらなる遺伝子変異などの因子が必要と考えられる。本研究は、第 37 回札幌国際がんシンポジウムにおいて発表した。



図 5. 小型鼻部ばく露吸入実験装置
小型鼻部ばく露吸入実験装置（コンプレッサー部分を除く）。
マウスへの噴霧は、吸引装置付きキャビネット内で行った。

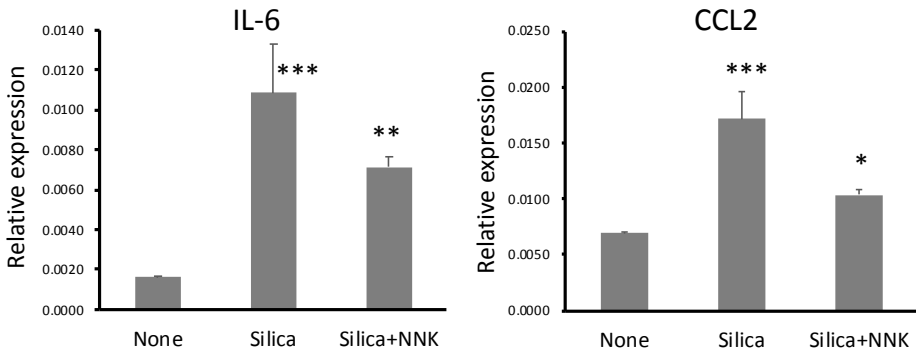


図 6. 結晶シリカもしくは NNK との混合暴露後の肺の IL-6 および CCL2 の発現
F759 マウスに結晶シリカもしくは NNK と結晶シリカの混合液を小型鼻部ばく露吸入実験装置を用いて噴霧した。1 日後の肺の IL-6 および CCL2 mRNA レベルを定量的 PCR で測定した。ハウスキーピング遺伝子 HPRT の発現量に対する相対量を表す。データは平均値＋標準誤差を示す。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001

謝　辞

本研究は、北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野村上教授のご指導のもと、研究室員の協力を得て実施したものであり、ここに感謝いたします。結晶シリカの取扱い、ヒト気管支上皮細胞株および培養方法について、北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野腫瘍内科学教室の秋田弘俊先生、木下一郎先生、方波見基雄先生より分与・アドバイスをいただき、また QUBIC 透明化法については新潟大学脳研究所システム脳病態学分野の田井中一貴先生にご協力をいただきました。ここに深謝いたします。

文 献

1) Atsumi T, Singh R, Sabharwal L, Bando H, Jie M, Arima Y, et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. Cancer research. 2014;74:8-14. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2322.

2) Nakagawa I, Kamimura D, Atsumi T, Arima Y, Murakami M. Role of Inflammation Amplifier-Induced Growth Factor Expression in the Development of Inflammatory Diseases. Critical reviews in immunology. 2015;35(5):365-78. PubMed PMID: 26853849.

3) Kamimura D, Ohki T, Arima Y, Murakami M. Gateway reflex: neural activation-mediated immune cell gateways in the central nervous system. Int Immunol. 2018;30(7):281-9. Epub 2018/05/17. doi: 10.1093/intimm/dxy034. PubMed PMID: 29767741.

4) Murakami M, Harada M, Kamimura D, Ogura H, Okuyama Y, Kumai N, et al. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. Cell reports. 2013;3(3):946-59. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.028. PubMed PMID: 23434511.

5) Lee J, Nakagiri T, Kamimura D, Harada M, Oto T, Susaki Y, et al. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. Int Immunol. 2013;25(5):319-32. doi: 10.1093/intimm/dxs158. PubMed PMID: 23396843.

6) Arima Y, Harada M, Kamimura D, Park JH, Kawano F, Yull FE, et al. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. Cell. 2012;148(3):447-57. Epub 2012/02/07. doi: S0092-8674(12)00088-8 [pii]
10.1016/j.cell.2012.01.022. PubMed PMID: 22304915.

7) Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, et al. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. The Journal of experimental medicine. 2002;196(7):979-90. Epub 2002/10/09. PubMed PMID: 12370259; PubMed Central PMCID: PMC2194024.

8) Tainaka K, Kuno A, Kubota SI, Murakami T, Ueda HR. Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling. Annual review of cell and developmental biology. 2016;32:713-41. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125001. PubMed PMID: 27298088.

9) Therriault MJ, Proulx LI, Castonguay A, Bissonnette EY. Immunomodulatory effects of the tobacco-specific carcinogen, NNK, on alveolar macrophages. Clin Exp Immunol. 2003;132(2):232-8. Epub 2003/04/18. PubMed PMID: 12699410; PubMed Central PMCID: PMCPMC1808690.