

分担研究報告書

ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける 肺サーファクタント蛋白に関する検討

研究分担者 中西 洋一 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 教授
研究協力者 鈴木 邦裕 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教
濱田 直樹 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教
柳原 豊史 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野

研究要旨 ヒト Club 細胞株 NCI-H441 細胞に対して Benzo[a]pyrene(BaP)を投与すると、Apoptosis が誘導され、ヒトリコンビナント SP-D の投与により抑制された。油症肺傷害において SP-D が保護的役割を担っていることが考察された。

A . 研究目的

油症の主な原因物質と考えられる PCDFs をげっ歯類に経気道的に投与すると、電子顕微鏡にて Club 細胞の壊死が認められると報告されている¹⁾。油症患者における肺病変の主座は Club 細胞を中心とした細気管支領域と考えられおり、Club 細胞は肺において Arylhydrocarbon receptor(AhR)を発現している数少ない細胞のひとつであるため、ダイオキシン類の AhR を介し CYP1A1 の経路を通じた細胞傷害作用から推測される病態生理とも合致する²⁾³⁾。これまで我々は、ダイオキシン類による肺傷害のメカニズムを解明するために AhR-CYP1A1 を介した油症動物実験モデルの作成を目指してきた。現在のところ、マウスの肺に経気管的に AhR 作動性物質である Benzo[a]pyren(BaP)を投与することにより⁴⁾、気道分泌物の増加を示すモデルを作成している。我々が着目している Club 細胞は、肺サーファクタント蛋白などの肺の恒常性を維持する因子を産生している。肺サーファクタント蛋白は肺胞構造の維持のみならず肺の初期免疫に関わっており、細菌感染防御や免疫細胞の調節など、肺疾患において重要な役割を担

っている。今回、我々は、ダイオキシン類による気道上皮傷害(Club 細胞傷害)における肺サーファクタント蛋白(SP-D)に役割に着目して in vitro での研究を行った。

B . 研究方法

Club 細胞株 : HCl-H441 細胞を Roswell Park Memorial Institute(RPMI)培地(10% ウシ胎児血清、1% ストレプトマイシン/ペニシリン)を用いて、24well プレート(観察用)および、6well プレート(フローサイトメトリー用)に培養した。DMSO で溶解した BaP の濃度を 0~50mM に設定し、細胞傷害誘導の試適濃度を決定した。細胞傷害としてアポトーシスが誘導されることを確認した。次に、BaP により誘導される NHI-H441 細胞のアポトーシスに対するヒトリコンビナント SP-D の抑制効果を検討した。ギムザ染色を行い形態の観察を行い、さらに培養細胞を、Trypsin EDTA を用いて回収し、FBS 入り培地で中和したのち、4 1500rpm で遠沈・洗浄後、Annexin V-PI 染色を行い、フローサイトメトリー法を用いてアポトーシスに対する解析を行った。

C. 研究結果

HCl-H441 細胞を 24well プレートに培養し、BaP を投与 24 時間後に観察し、細胞傷害を確認した。Aneexin V - PI による染色を行い、アポトーシスを確認し、BaP の試適濃度を 12.5mM に設定した。次に、リコンビナント SP-D を同時投与することによる効果について検討した。NCI-H441 細胞に BaP12.5mM を投与し、同時にリコンビナント SP-D を 1.0 μ g/ml の濃度で投与した。24 時間後にギムザ染色を行ったところ、BaP の投与により培養 Club 細胞株の傷害が認められ(図 1B)、SP-D の投与で傷害は軽減された(図 1D)、また、SP-D 投与単独群における細胞毒性は肉眼では確認されなかった(図 1B)。更に Annexin V-PI 染色を行い、フローサイトメトリー法を用いてアポトーシスに対する解析を行った。図 2A に示すように、X 軸に FITC-AnnexinV、Y 軸を PI とした。アポトーシス細胞は 4 分割図の右下に検出されるように設定した。24 時間後の代表的な dot-plot を図 2B に示す。各群 n=3 で解析を行うと、24 時間後(図 3A)、36 時間後(図 3B)ともに有意差をもって、抑制結果が得られた。更に、SP-D 0、0.5、1.0、2.0 μ g/ml の濃度で投与し、濃度依存性の抑制効果の有無を観察したが、有意な増強効果は認めなかった(図 4)。

D. 考察

肺サーファクタントプロテインは界面活性剤として、肺の表面張力を低下させ、肺胞が構造を保持するのに役にたっている。肺サーファクタントプロテインには SP-A、SP-B、SP-C、SP-D の 4 種類があり、そのうち、SP-A と SP-D は水溶性であり、SP - B、SP-C は疎水性である。実臨床では、肺が傷害を受けた際のバイオマーカーとして活用されている。びまん性肺疾患、間質性肺炎では、血清の S

P-D 値が SP-A 値よりもより病態を反映するという報告がある⁵⁾。この報告では血清 SP-D 値が上昇した患者群では気管支肺胞洗浄液の SP-D 濃度が低下しており、間質性肺炎の組織破壊に伴い、SP-D が血中へ漏出していることが考察されている。油症患者においては、平成 25 年に我々が報告した通り、SP-D の血中濃度上昇と咳嗽、喀痰といった呼吸器症状に相関を認めた⁶⁾。SP-D の血中濃度変化が油症による直接的な影響というよりも、呼吸器疾患の合併を反映している可能性はあるが、SP-D が何らかの病態生理に関与している可能性が考察される。今回の実験で、ダイオキシン類の AhR を介し CYP1A1 の経路を通じた Club 細胞傷害作用を、AhR 作動性物質である Benzo[a]pyren(BaP)を用いることにより in vitro で再現した。さらに、過去の動物実験より我々が着目している肺サーファクタント蛋白(SP-D) の投与により、傷害の抑制効果が認められた。今回の研究結果は、現象論を認めているに過ぎないが、この実験系を用いて分子レベルでの解析を現在検討中である。具体的にはドメイン欠損した SP-D を強制発現させた Club 細胞の cell line を用いた実験系などを計画している。また、我々が報告した AhR-CYP1A1 を介した油症動物実験モデルを SP-D ノックアウトマウス⁷⁾で作成する動物実験計画書を準備し、本学の動物実験倫理委員会に申請予定である。

E. 結論

in vitro でクラブ細胞株に対する BaP の傷害性をリコンビナント SP-D が抑制した。

F. 研究発表

医学会学術研究会

平成30年(2018年)10月27日

Role of pulmonary surfactant protein in mouse lung injury model with dioxins

Kunihiro Suzuki, Toyoshi Yanagihara, Naoki Hamada, Eiji Harada, Koichi Matsumoto, Yoichi Nakanishi

たダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究「油症患者における血中 Surfactant protein に関する検討」、平成25年度分担者報告書

7) Knudsen L et al. Truncated recombinant human SP-D attenuates emphysema and type II cell changes in SP-D deficient mice. *Respir Res* 8: 70

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1) 中西洋一、他、(1985). 油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害—経過ならびに発症機序について. *福岡医誌*. 1985;76:196-203
- 2) Podechard N, et al. Interleukin-8 Induction by the environmental Contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett*. 2008;177(2):130-7
- 3) Wong PS, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42(2):210-7.
- 4) N'Diaye M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *J Biol Chem*. 2006;281(29): 19906-15.
- 5) Nishikiori et al. Distinct compartmentalization of SP-A and SP-D in the vasculature and lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine* 2014, 14:196
- 6) 中西洋一、他、(2014). 食品を介し