

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 SP-D の役割

研究分担者 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
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
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 肺サーファクタント蛋白 (SP-D) ノックアウトマウスに Benzo[a]pyrene (BaP) を経気道的に投与すると、細気管支領域で PAS 陽性細胞の著明な増加が観察され、BaP による気道傷害が野生型マウスに比して増悪しており、油症肺傷害における SP-D の保護的役割が考察された。

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]pyrene (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-A, SP-D) に役割に着目して研究を行った。

B . 研究方法

BaP をマウスに経気道的に投与し、7 日後に組織学的評価を行った。具体的には C57BL/6 マウス (雄) 10 週齢の SP-D ノックアウトマウスもしくは、野生型のマウスに Tricaprylin (TR) で溶解した BaP を 1 匹あたり 500 μ g (50 μ l) を気管切開の上、経気管的に投与した¹⁾²⁾。対照群には溶媒のみを 50 μ l 投与した。投与 7 日後に肺を取り、パラフィン固定を行った。その後、薄切スライドを作成し、WT-TR、WT-BaP、SP-D (-/-)-TR、SP-D (-/-)-BaP の 4 群に対して、HE 染色にて病変を評価した。次に、PAS 染色、Alcian blue (AB) 染色、Surfactant Protein (SP)-A、SP-C、CC10 による免疫染色を施行した。

C . 研究結果

BaP 経気管投与後、投与 7 日後に肺を取り出して HE 染色にて検討した結果、WT-TR、WT-BaP、SP-D (-/-)-TR、SP-D (-/-)-BaP の 4 つの群の炎症所見などに差は認めなかった。細気管支領域を中心に観察すると、SP-D (-/-)-BaP の群で、細気管支上皮の肥厚と、配列の乱れが観察された。(Figure

1)

PAS 染色では、WT-BaP 群において比較的領域支に近い終末細気管支領域で、PAS 陽性細胞が認められた。SP-D(-/-)-TR 群においてもわずかな PAS 陽性細胞を認めた。しかし、SP-D(-/-)-BaP 群で著明な PAS 陽性細胞の増加を認めた。(Figure 2)

AB 染色で、塩基性のムコ多糖類を染色すると、同様の傾向がみられ、SP-D(-/-)-BaP 群の気道上皮で多数、濃染する細胞を認めた。(Figure 3)

Club 細胞特異的タンパク質 CC10 に対する抗体で免疫染色を行うと、終末細気管支上皮の大部分が濃染され、ほとんどが Club 細胞であると考えられた。SP-D(-/-)-BaP 群で区域気管支に近い細気管支領域(PAS 染色で陽性細胞が多数認められていた部位)を観察すると、上皮の配列中に、CC10 で染まらない細胞が観察され、Club 細胞以外の細胞の増加、すなわち杯細胞の過形成が推測された。(Figure 4)

SP-A で免疫染色を行うと、終末細気管支付近、Club 細胞主体の気管支上皮での SP-A の発現は、WT-TR 群と比して WT-BaP 群で抑制されて見えた。同様の傾向は SP-D(-/-)の 2 つの群においても観察された。(Figure 5)

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 SP-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。一般に、SP-D ノックアウトマウスは肺気腫モデルとして研究に用いられ、病理像としては、肺胞腔の拡大が確認される⁷⁾。今回の検討で、SP-D ノックアウトマウスに BaP を経気道的に投与することにより PAS 染色陽性の気道上皮細胞の増加を認めたが、これらは杯細胞の過形成によるムチン類の増加、つまり気道分泌物の増加を表していると考えられる。SP-A 染色では、BaP を投与された群で、比較的末梢の終末細気管支領域での気道上皮の SP-A の発現に抑制があるようであり、これは Club 細胞傷害による結果と推測できる。これらの結果から、SP-D がダイオキシン類(BaP)に対する気道保護作用を有している可能性があると考えられる。平成 30 年度の報告書で示す通り、我々はリコンビナント SP-D が club 細胞を保護する所見を *in vitro* で観察している。今後、どのようにして SP-D がダイオキシン類に対する気道保護作用を呈するのかを、引き続きリコンビナント SP-D や、ドメイン欠損した SP-D を強制発現させた Club 細胞の cell line を用いて機序解明を行う予定である。

E . 結論

SP-D ノックアウトマウスに BaP を経気道的に投与することによって気道分泌物増加が確認された。

F . 研究発表

第 54 回日本肺サーファクタント・界面医学学会学術研究会

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, Koichiro Matsumoto, Yoichi Nakanishi

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, 2007.

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). 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握