

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 AhR 発現への影響

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 Benzo[a]pyrene (BaP) を経気道的に投与すると、気管支上皮細胞中で、Arylhydrocarbon receptor (AhR) の核内移行が観察され、SP-D ノックアウトマウスに BaP を投与すると、野生型マウスに比してこの所見は増強した。SP-D の有無が AhR の動態に関与する可能性が考えられた。

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。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、AhR に対する免疫染色 (蛍光および DAB 基質) を施行した。

C. 研究結果

前回の報告で、BaP 経気管投与後、投与 7 日後に肺を取り出して HE 染色、免疫染色 (CC10、SP-A) にて検討した結果、SP-D (-/-) マウスに BaP を投与すると、気道の傷害が増強される可能性が考えられた。今回、AhR に対する免疫染色を施行し、終末細気管支付近 (Club 細胞主体の気管

支上皮)の観察を行った。

まず、anti-AhR-antibody-FITC を用いた蛍光免疫染色で、各群の AhR の蛋白発現レベルを確認した。WT-TR 群(control 群)において、気管支上皮(主に Club 細胞)での AhR の発現が確認された(Fig. 1a)。WT-BaP 群では刺激により、AhR の発現が増強した。また、一部の肺胞上皮(I 型、II 型でも AhR の発現を認めた(Fig. 1b)。SP-D(-/-)-TR 群において、WT-TR 群と比すると気管支上皮での AhR の発現は若干増強していた(Fig. 1c)。SP-D(-/-)-BaP 群において、AhR の発現は著明に増強しており、前回の報告でみとめた、SP-D の欠損による BaP による気管支上皮傷害の増強と矛盾しない結果だった。(Fig. 1d)。

次に、DAB 基質を用いた免疫染色を行った。WT-TR 群において、気管支上皮が淡く染色され、(Fig. 2a)。強拡大すると、気管支上皮細胞の細胞質全体が淡く染色されていることがわかる(Fig. 3a)。WT-BaP 群においては、BaP の投与による刺激により、気管支上皮の細胞内の染色部位が変化し、部分的に濃染された(Fig. 2b)。強拡大で観察すると、核が染色されていることが分かる(Fig. 3b)。これは、我々が作成した油症マウスモデル群(WT-BaP 群)において、BaP 投与により細胞質中であつた AhR がリガンドである BaP の結合により、核内移行を起していることと合致する。SP-D(-/-)マウスにおいて、溶媒のみ投与した群：SP-D(-/-)-TR 群においても、核の染色が確認された(Fig. 2c、Fig. 3c)。SP-D(-/-)-BaP 群において、WT-TR および SP-D(-/-)-TR 群よりも、核がより強く染色された(Fig. 2d、Fig. 3d)。

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られた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⁾。我々は前回の報告で、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、気道傷害が増強されたことから、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を考えたが、その機序は明らかにできなかった。今回、ダイオキシン類のレセプターである、芳香族炭化水素受容体(AhR:Arylhydrocarbon Receptor)に着目して、研究を行ったところ、我々の作成した、BaP 投与油症マウスモデルにおいて、AhR の核内移行が観察され、BaP の経気道投与による肺内の細胞への影響が動物実験レベルで確認された。また、SP-D ノックアウトにおいても、核内の AhR が染色されることが観察された。これは、SP-D が生体内での AhR の動態に関与することを示唆した。更に、BaP を投与することにより、核内の AhR は著明に増強した。このことから、AhR 系に、ポジティブフィードバ

ックが作用し、かつ、SP-D の欠損がこれを強めている可能性が考えられた。

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。令和元年および今年度の報告で示したとおり、動物実験で得られた着目点を元に、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、今後は、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SP-DがAhRの体内動態に関与している可能性が考えられた。

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

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一経過ならびに発症機序について. 福岡医誌. 1985; 76:196-203

2) Podeschard 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.

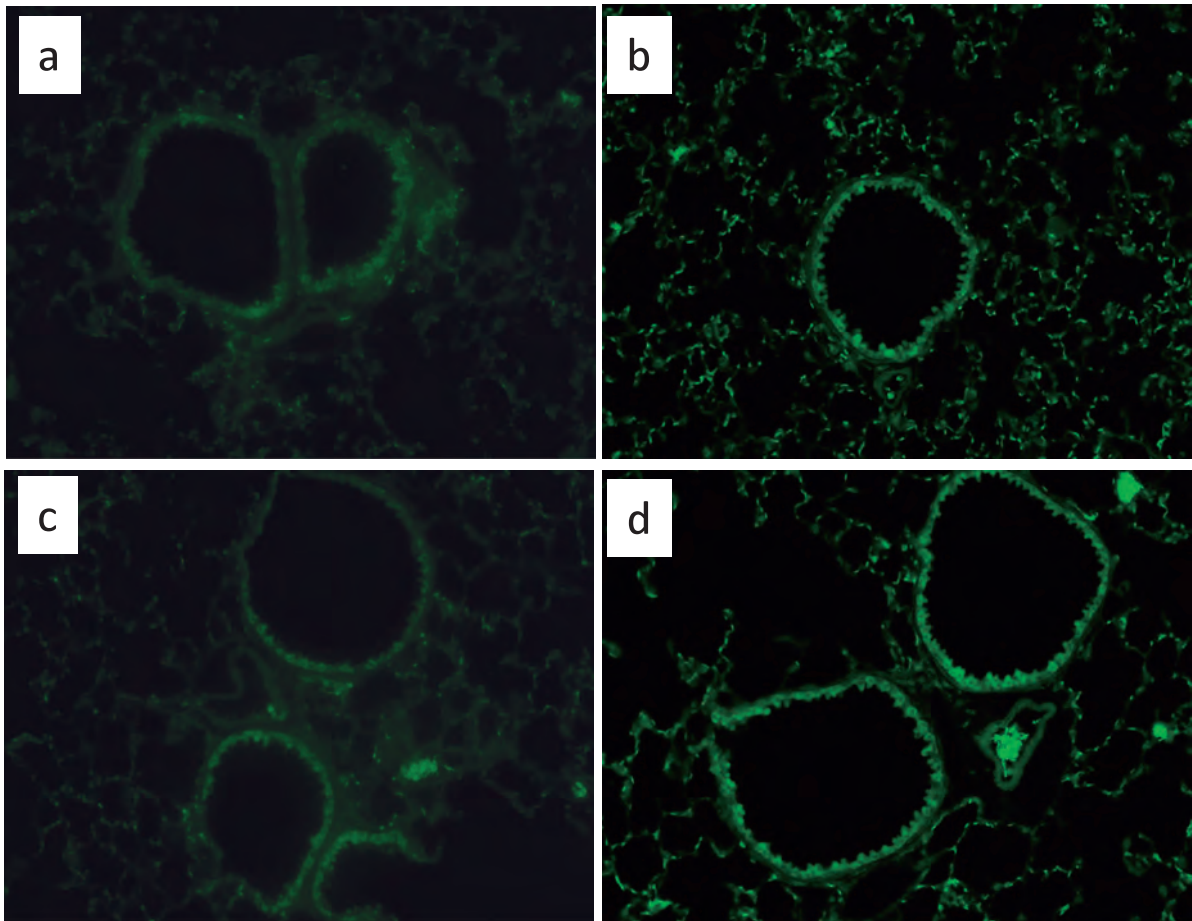
4) N' Diaye M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. J Biol Chem. 2006;281(29):19906-19915.

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.

Fig1 AhR蛍光免疫染色

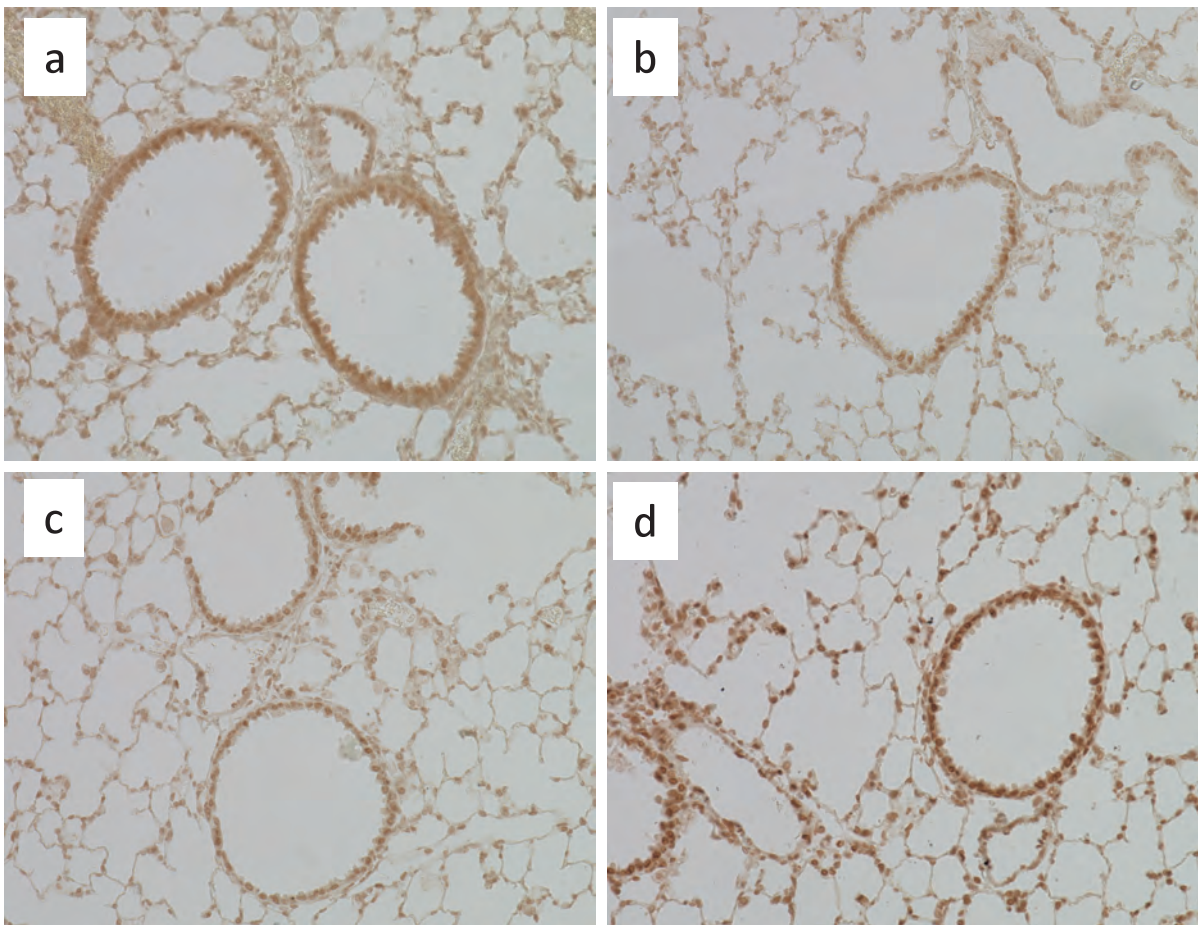


100µm

- a. Wild type-Tricaprylin群(WT-TR)
- b. Wild type-Benzo[a]pyrene群(WT-BaP)
- c. SP-D knockout-Tricaprylin群(SP-D(-/-)-TR)
- d. SP-D knockout-Benzo[a]pyrene群(SP-D(-/-)-BaP)

anti-AhR-antibody-FITCで蛍光免疫染色を行うと、WT-TR群において、気管支上皮でのAhRの発現している。(a) WT-BaP群では刺激により、AhRが発現が増強している。また、一部の肺胞上皮(I型、II型でもAhRの発現を認る(b)。SP-D(-/-)-TR群において、WT-TR群と比すると気管支上皮でのAhRの発現は若干強く見える(c)。SP-D(-/-)-BaP群において、AhRの発現は著明に増強している(d)。

Fig2 AhR免疫染色 (DAB基質)

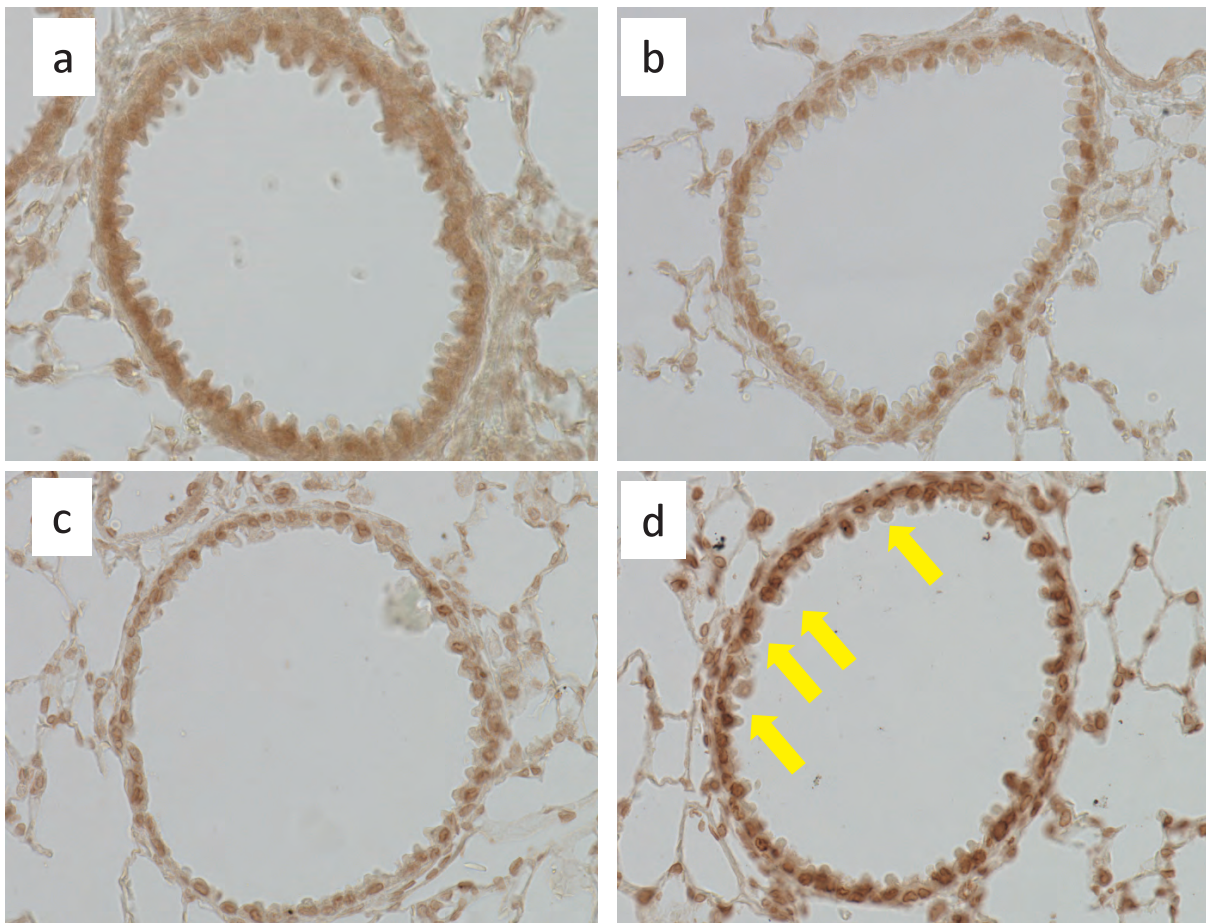


- a. Wild type-Tricaprylin群(WT-TR)
- b. Wild type-Benzo[a]pyrene群(WT-BaP)
- c. SP-D knockout-Tricaprylin群(SP-D(-/-)-TR)
- d. SP-D knockout-Benzo[a]pyrene群(SP-D(-/-)-BaP)

100µm

control群(WT-TR)において、気管支上皮が淡く染色される。(a)
Bap投与により気管支上皮の細胞内の染色部位が変化し、部分的に濃染される。(b)
SP-D(-/-)-TRにおいても、染色部位の変化を認める。(c)
SP-D(-/-)-BaP群では、より強く濃染される。(d)

Fig3 AhR免疫染色 (DAB基質 強拡大)



- a. Wild type-Tricaprylin群(WT-TR)
- b. Wild type-Benzo[a]pyrene群(WT-BaP)
- c. SP-D knockout-Tricaprylin群(SP-D(-/-)-TR)
- d. SP-D knockout-Benzo[a]pyrene群(SP-D(-/-)-BaP)

40µm

強拡大すると、control群(WT-TR)において、気管支上皮細胞の細胞質全体が淡く染色される。(a)

Bap投与により細胞内の染色部位が変化し、核が染色される。(b)

SP-D(-/-)-TRにおいても、淡く核が染色される。(c)

SP-D(-/-)-BaP群では、核が強く染色される(↑)。(d)