

分担研究報告書

ダイオキシン類による気道上皮傷害における 肺サーファクタント蛋白に関する検討

研究分担者 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 ヒト Club 細胞株 NCI-H441 細胞に対して Benzo[a]pyrene (BaP) を投与すると、ムチンコア蛋白 (MUC5AC) の遺伝子発現が亢進し、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) におよび杯細胞への分化に対す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: 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 (RT-PCR 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。次にこの実験系を用いて、AhR の蛍光免疫染色をおこない、細胞内の AhR の局在性を確認した。更に、CYP1A1 の遺伝子発現を RT-PCR で解析した。次に、BaP により誘導される NCI-H441 細胞の傷害に対するヒトリコンビナント SP-D の抑制効果を RT-PCR による解析を行った。

C. 研究結果

前回の実験同様、H441 細胞を 24well プレートに培養し、BaP を投与 24 時間後に、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 10mM に設定した。抗 AhR 抗体 (F ITC) を用い蛍光免疫染色を用いて観察したところ、溶媒 (DMSO) 投与群では、細胞質中に AhR の局在が確認されたが、BaP 刺激により AhR が核内に移行することが確認された (図 1)。次に、RT-PCR により、CYP1A1 の発現を確認したところ、BaP 刺激により NHI-H441 細胞で CYP1A1 の遺伝子発現が上昇を確認した (図 2)。更に、ROS の産生を CellROX® Oxidative Stress Reagent にて観察したところ、溶媒 (DMSO) 刺激で ROS の産生は確認されなかったが、BaP 刺激により ROS の産生が確認された。(図 3)

次に、以前の報告同様⁸⁾リコンビナント SP-D を同時投与による効果について検討した。NCI-H441 細胞に BaP10mM を投与すると、MUC5AC の遺伝子発現の亢進を認めた。リコンビナント SP-D を同時投与すると、MUC5AC の遺伝子発現の抑制を確認した。(図 4)

D. 考察

我々は以前の報告で、BaP の投与により、NHI-H441 細胞の apoptosis の誘導を確認した⁸⁾。Club 細胞株に BaP を投与したところ、AhR の核内移行 (図 1) および CYP1A1 の遺伝子発現の増強 (図 2) を認め、更には ROS の産生 (図 3) を確認した。即ち、細胞傷害の一部を担うと思われる、AhR-CYP1A1-ROS 経路が *in vitro* でも確認された。このように、BaP による Club 細胞傷害が、油症による呼吸器障害の病態解明に重要だが、その一方で、我々の作成した油症マウスモデルにおいても、BaP 投与により、マウスの気管支に杯細胞が増加する現象を認めている。杯細胞の産生する分泌型ムチンコア蛋白に、MUC5AC (Mucin 5 subtype AC) が知られている。MUC5AC は、主に杯細胞に発現しており、多くの呼吸器疾

患に関与していると考えられており、喘息や COPD での過剰発現が報告されている。今回我々は、MUC5AC に着目し、解析を行ったところ、BaP を投与すると、Club 細胞株の MUC5AC の遺伝子発現が亢進した。更にリコンビナント SP-D でこの遺伝子発現が抑制されることが確認された。SP-D は Club 細胞株の goblet cell differentiation を抑制する可能性が考えられた。また、我々は以前にリコンビナント SP-D は BaP による Club 細胞株の apoptosis 抑制作用をもつことを報告したが、その事象との関連性は不明である。今後、AhR-CYP1A1-ROS による細胞傷害の経路およびそれ以外の経路にも着目し実験を進めていく予定である。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用い、SP-D-Collectin receptor の経路などにも解析を進めていく方針である。

E. 結論

SP-D は BaP 刺激による club 細胞株の goblet cell differentiation を抑制する。

F. 研究発表

第 57 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会

令和 4 年 (2022 年) 1 月 15 日

ヒト Club 細胞株 (NCI-H441 細胞) を用いた多環芳香族炭化水素に対する Surfactant protein D (SP-D) の保護作用の検討 秦 兼太郎, 鈴木 邦裕, 柳原 豊史, 濱田 直樹

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) Podgehard 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 ce
lls and C57BL/6 mice: possible mech
anisms for lung dysfunction. Am J R
espir Cell Mol Biol. 2010;42(2):210
-7.

4) N' Diaye M, et al. Aryl hydrocar
bon receptor-and calcium-dependent
induction of the chemokine CCL1 by
the environmental contaminant benzo
(a)pyrene. J Biol Chem. 2006;281(2
9): 19906-15.

5) Nishikiori et al. Distinct compa
rtmentalization of SP-A and SP-D in
the vasculature and lungs of patie
nts with idiopathic pulmonary fibro
sis. BMC Pulmonary Medicine 2014, 1
4:196

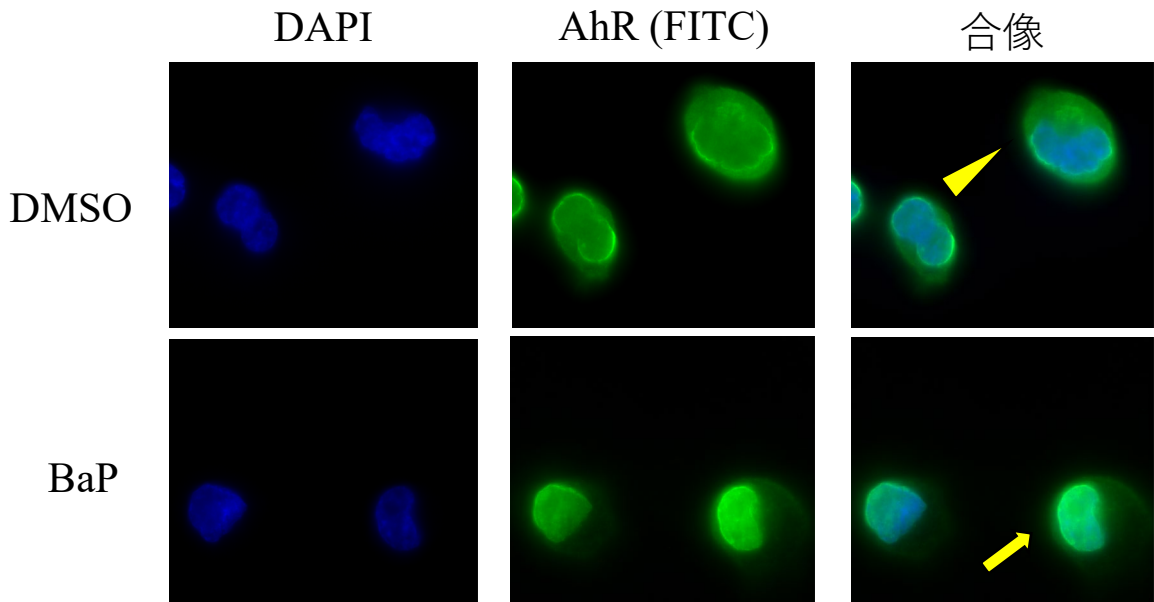
6) 中西洋一、他、(2014). 食品を介し
たダイオキシン類等の人体への影響の
把握とその治療法の開発等に関する研
究「油症患者における血中 Surfactant
protein に関する検討」、平成 25 年度
分担者報告書

7) Knudsen L et al. Truncated reco
mbinant human SP-D attenuates emphy
sema and type II cell changes in SP
-D deficient mice. Respir Res 8: 70

8) 中西洋一、他、(2018). 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「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

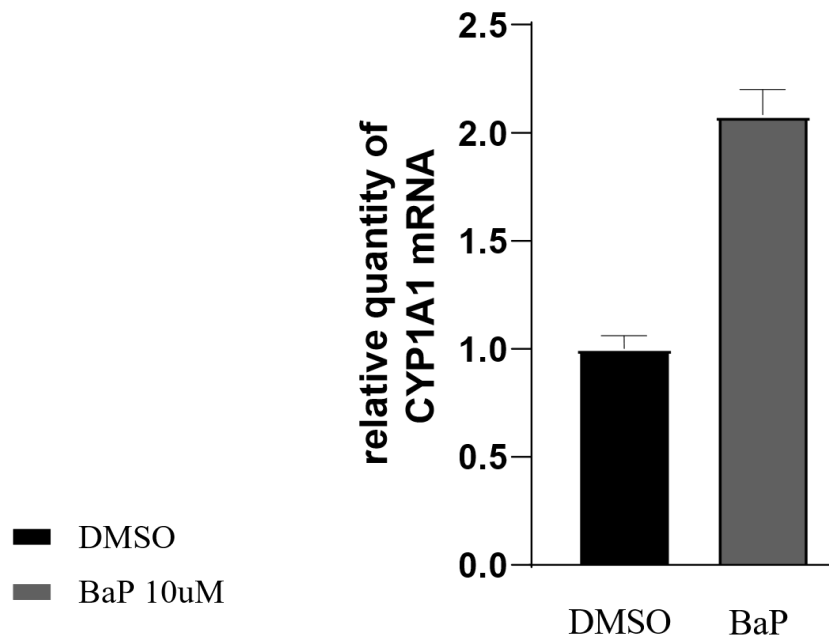
白に関する検討」、平成 30 年度 分担者
報告書

図1. AhR 蛍光免疫染色



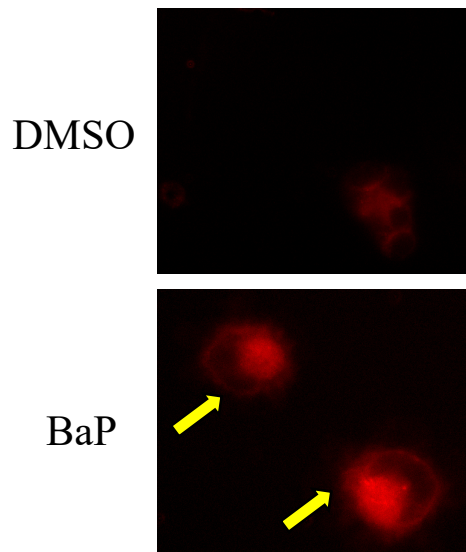
NHI-H441細胞 (Club細胞株) で溶媒(DMSO)刺激では細胞質内にAhRの発現が確認された。(△)
BaP 刺激によりAhR 核内移行が確認された。(↑)

図2. Club細胞株でのCYP1A1のPT-PCR



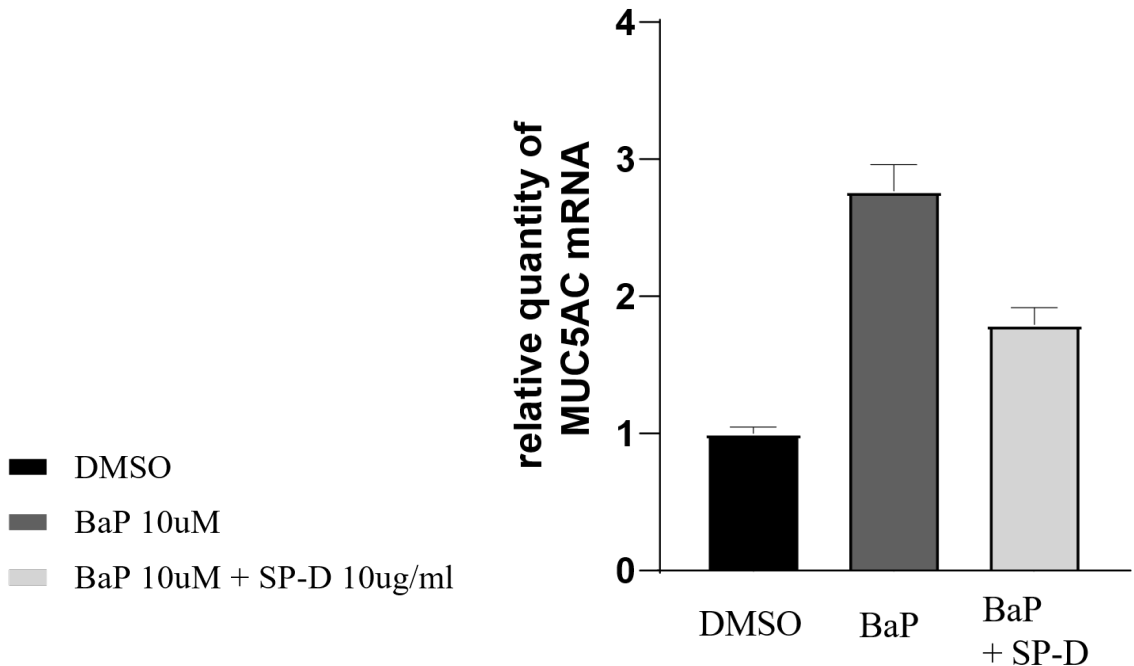
BaP 刺激によりNHI-H441細胞 (Club細胞株) でCYP1A1 の遺伝子発現が上昇した。

図3. Measurement of total ROS



NHI-H441細胞（Club細胞株）で溶媒(DMSO)刺激ではROSの産生は確認されなかった。BaP 刺激によりROSが確認された。（↑）

図4. Club細胞株でのMUC5ACのPT-PCR



BaP 刺激によりNHI-H441細胞（Club細胞株）で MUC 5 ACの遺伝子発現が上昇した。rhSP-D は BaP 刺激による MUC5AC 発現を抑制した。