

分担研究報告書

ダイオキシン類による気道傷害に対する肺サーファクタント蛋白(SP-D)の 上皮保護作用の研究

研究分担者 岡本 勇 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
坪内 和哉 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教

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 や goblet cell differentiation を認める。これらの変化はヒトリコンビナント SP-D の投与により抑制されるため、油症肺傷害において SP-D の保護的役割が考察されるが、CYP1A1-ROS 経路の抑制効果は認めなかった。そのため、他の機序が推測された。

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⁸⁾。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、6well プレートに培養した。細胞への刺激には、DMSO で溶解した BaP 10 μ M を用いた。ヒトリコンビナント SP-D 1 μ g/ml を同時投与して効果を解析した。

C. 研究結果

前回の報告同様⁹⁾ BaP を投与 24 時間後に解析を行った。RT-PCR により、CYP1A1 の発現を確認したところ、BaP 刺激により NCI-H441 細胞で CYP1A1 の遺伝子発現の上昇が確認されたが、リコンビナント SP-D を同時投与しても、CYP1A1 の抑制効果は認めなかった (図 1)。更に、ROS の産生を CellROX[®] Oxidative Stre

ss Reagentにて観察したところ、BaP刺激により Reactive Oxygen Species: ROSの産生が確認された。しかしながら、リコンビナント SP-Dを同時投与による ROSの産生の抑制効果は認めなかった(図2)。

D. 考察

これまでの文献や実験結果から¹⁾²⁾⁸⁾、我々は、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ている。また、in vitroの実験で、BaP刺激により、Club 細胞株 (NCI-H441 細胞)の apoptosis 誘導や、MUC5ACの遺伝子発現亢進を認めたことから、油症患者において Club 細胞の細胞傷害や、goblet 細胞への分化による粘液産生亢進が、咳嗽や喀痰といった症状に関与していることを推測している。

以前の実験⁹⁾で、Club 細胞株 (NCI-H441 細胞)に対して BaPによる刺激を行うと、細胞質局在の AhRの核内移行は確認されており、また、CYP1A1の遺伝子発現の亢進、ROSの産生亢進を認めることから、BaP投与により、AhR-CYP1A1-ROS経路が作用することは確認されている。

一方で、我々は、気道上皮傷害(クラブ細胞傷害)と免疫応答をつなぐ因子として、肺サーファクタント蛋白に着目しており、前述の、BaP刺激により、Club 細胞株 (NCI-H441 細胞)の apoptosis 誘導や、MUC5ACの遺伝子発現亢進をリコンビナント SP-Dが抑制した結果を得ている。そのため、SP-Dが、AhR-CYP1A1-ROS経路を抑制すると仮説を立てて実験を行った。そのため、BaPによる誘導タンパクで細胞障害を示す CYP1A1のメッセンジャーRNA発現レベル、その下流の誘導産物の ROSの産生レベルで解析を行った。しかしながら、SP-Dによる AhR-CYP1A1-ROS経路の明らかな抑制効果は認めなかった。そのため、別

の機序が働いている可能性について検討中である。具体的には、SP-D-Collectin receptorの経路などにも解析を進めていく方針である(図3)。

E. 結論

SP-Dは BaP刺激による club 細胞株の apoptosis や goblet cell differentiation を抑制するが、AhR-CYP1A1-ROSは抑制せず、他の機序を介した作用が示唆された。

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 兼太朗, 鈴木 邦裕, 柳原 豊史, 濱田 直樹

第 58 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) 9 月 24 日

多環芳香族炭化水素による気道粘液産生亢進に対する肺サーファクタント蛋白の保護作用の検討 秦 兼太朗, 坪内 和哉, 衛藤 大祐, 安藤 裕之, 柳原 豊史, 鈴木 邦裕, 岡本 勇

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 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

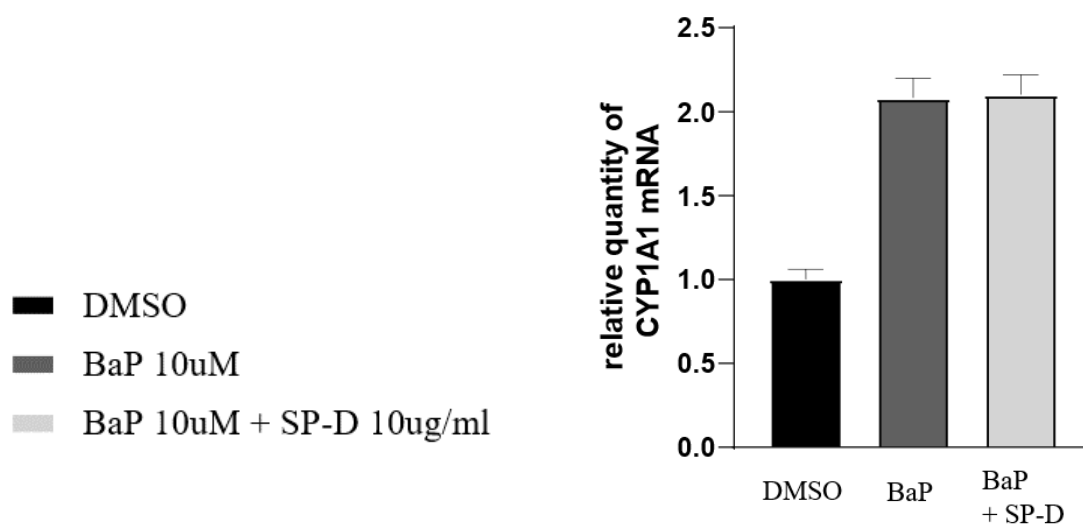
7) Knudsen L et al. Truncated recombinant human SP-D attenuates emphysema and type II cell changes in SP-D deficient mice. *Respir Res* 8: 70

8) 中西洋一、他、(2017). 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 29 年度 分担者報告書

9) 濱田直樹、他、(2022). 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

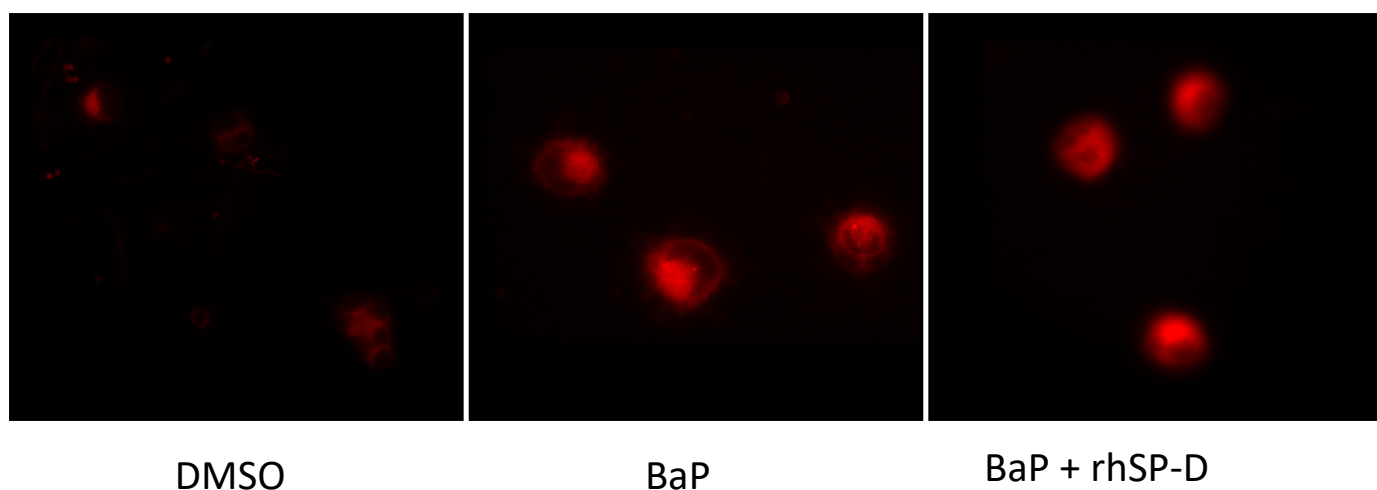
究「ダイオキシン類による気道上皮傷害における肺サーファクタント蛋白に関する検討」、令和 3 年度年度 分担者報告書

図1. Club細胞株でのCYP1A1のRT-PCR



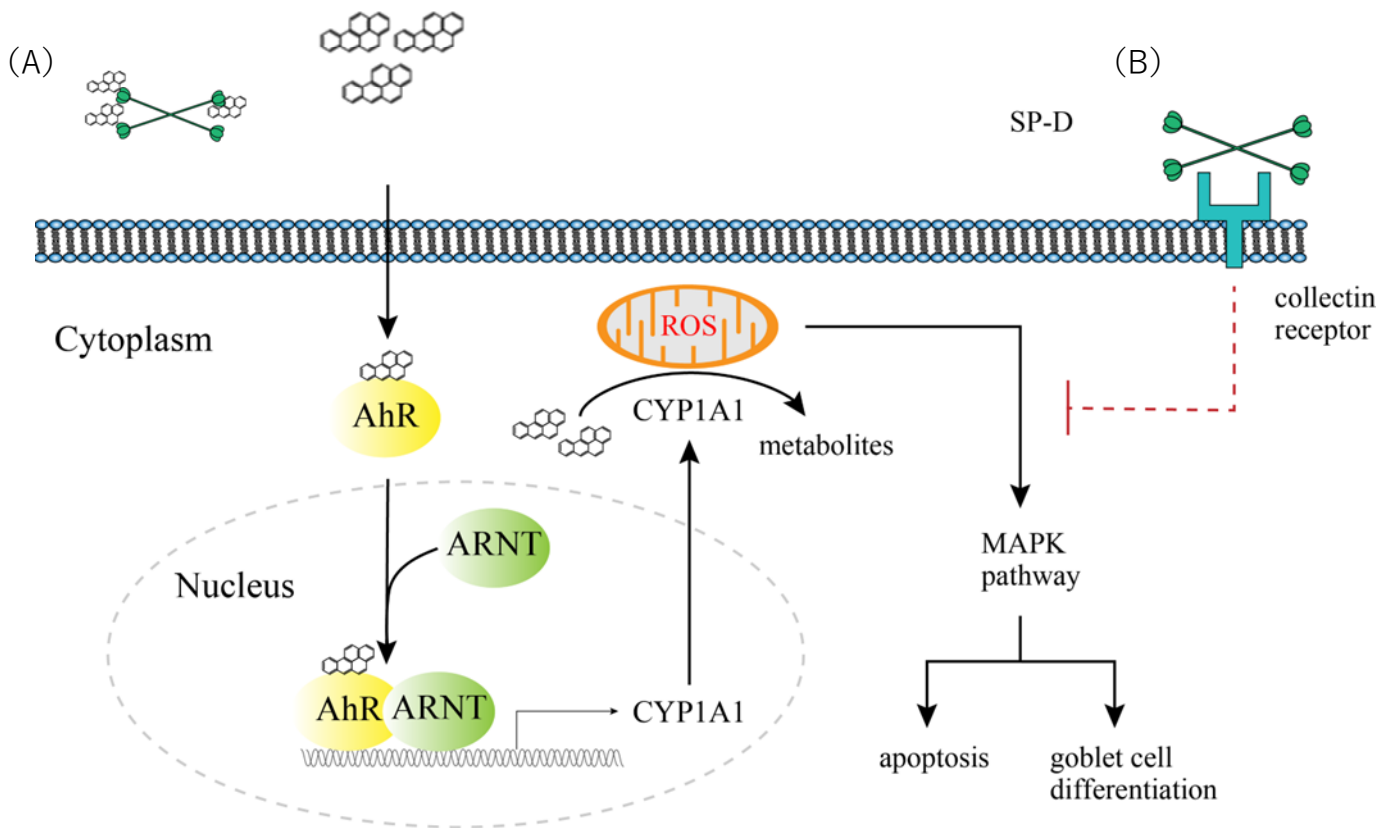
NCI-H441細胞において、BaP刺激により、CYP1A1の誘導が確認されたが、rhSP-Dによる抑制効果は認めなかった。

図2. Club細胞株でのROSの測定



NCI-H441細胞において、BaP刺激により、ROSの誘導が確認されたが、rhSP-Dによる抑制効果は認めなかった。

図3. 仮説図



当初の仮説では、SP-Dによるダイオキシン類のArylhydrocarbon receptor(AhR)への結合阻害などによりAhR-CYP1A1-ROS経路の抑制を想定していたが (A)、しかしながら、BaPによる代替検討では、同経路の明らかな抑制効果は認めなかった。SP-D-Collectin receptorの経路などの別の機序について検討中である (B)。