

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670313

研究課題名(和文) 微小粒子状物質による炎症反応におけるエンドソーム・リソソームの役割の解明

研究課題名(英文) Role of endosomes and lysosomes in inflammatory responses induced by fine particulate matters

研究代表者

平工 雄介 (Hiraku, Yusuke)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30324510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：粒子状物質は呼吸器で慢性炎症を惹起し、発がんや線維化を起こす。本課題では、粒子状物質がエンドソームやリソソームに存在する分子を介して炎症反応と疾患をもたらす機構を解析した。多層カーボンナノチューブで処理した肺上皮細胞を用いた実験では、細胞傷害に伴い核蛋白HMGB1とDNAが放出され、近傍の細胞のリソソーム内のToll様受容体9を活性化して炎症反応とDNA損傷を起こす新規発がん機構を解明した。カーボンブラックや酸化インジウムのナノ粒子も同様の機構で炎症反応と遺伝毒性を起こす可能性を示した。粒子状物質を気管内投与したラットの肺組織では、多数の炎症およびリソソーム関連分子の発現上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：Inhalation exposure to fine particulate matters induces chronic inflammation, leading to carcinogenesis and fibrosis in respiratory systems. We examined the mechanism of inflammatory responses caused by these materials by focusing on molecules that reside in endosomes and lysosomes. Multi-walled carbon nanotube induced inflammatory responses and DNA damage in lung epithelial cells via the release of the nuclear protein HMGB1 and DNA and the activation of Toll-like receptor 9 in lysosomes of neighboring cells. This is a new mechanism of carcinogenesis induced by multi-walled carbon nanotube. Carbon black and indium oxide nanoparticles induced inflammatory responses and DNA damage in cultured cells via a similar mechanism. In lung tissues of rats exposed to indium compounds, numerous inflammation- and lysosome-related genes were significantly upregulated.

研究分野：衛生学

キーワード：粒子状物質 エンドサイトーシス リソソーム 炎症 発がん カーボンナノチューブ HMGB1 Toll-like receptor

1. 研究開始当初の背景

労働現場や一般環境の大気中に浮遊する石綿、シリカ、ナノ素材などの微小粒子状物質は吸入曝露により呼吸器に蓄積し、発がんや線維化をもたらす。その機構には慢性炎症が重要な役割を果たすと考えられる。粒子状物質はマクロファージなどの炎症細胞に貪食され、サイトカインや活性酸素・窒素種などを産生して炎症を惹起する。しかし、詳細な分子機構には不明な点が多い。

近年では、カーボンナノチューブ (CNT) や金属ナノ粒子などの微粒子が種々の産業で使用されている。しかし、CNT を実験動物に腹腔内投与すると悪性中皮腫を起こすことが報告され、ヒトへの健康影響が強く懸念されている。我々は多層 CNT(MWCNT) がエンドサイトーシスにより肺胞上皮細胞に取り込まれ、エンドソームやリソソームが粒子状物質による炎症反応に重要な役割を果たす可能性を世界に先駆けて報告した(*Toxicol Appl Pharmacol* 2012)。しかし、これらの細胞内小器官が炎症反応を誘導する分子機構は未だ解明されていない(図 1)。インジウム化合物は携帯電話、テレビ、コンピューターの液晶画面などに使用されている。インジウム化合物の曝露を受けた労働者では間質性肺炎をもたらす。実験動物ではリン化インジウムやインジウム・スズ化合物(ITO)の吸入曝露により肺癌を起こす。その分子機構については未だ不明な点が多い。

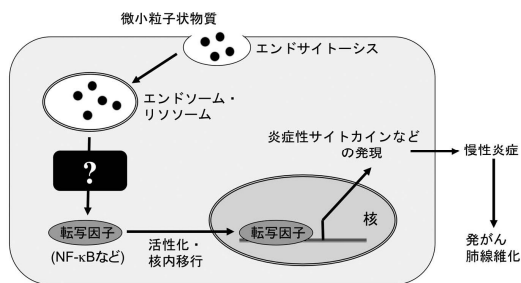


図 1 微小粒子状物質による炎症反応

2. 研究の目的

本課題では、微小粒子状物質(炭素ナノ材料、インジウム化合物など)に曝露したマクロファージや肺上皮細胞などの培養細胞や実験動物を用いて、エンドソームやリソソームに存在し、かつ炎症関連分子の発現を誘導する鍵となる分子を見いだす。さらにその分子の機能を抑制した実験系を構築し、炎症反応への影響について解析する。上記の結果から、粒子状物質による炎症反応の分子機構を解明し、呼吸器疾患の発症におけるエンドソームやリソソームの役割を明らかにする。

本課題の学術的な特色は、粒子状物質による疾患発症の分子機構を解明する上で、環境医学分野では研究が進んでいないエンドソームやリソソームに着目した点である。本課

題の成果により、一般環境や労働環境中の粒子状物質に起因する疾病の予防や治療に資する標的分子を明らかにするとともに、住民や労働者の疾病のリスク評価や予防に寄与することが出来る。

3. 研究の方法

(1) 微小粒子状物質の調製: 培養細胞を用いた実験では以下の方法で粒子状物質を調製した。炭素ナノ材料である MWCNT (長さ 1-2 μm あるいは 5-15 μm、幅 20-40 nm) やカーボンブラック(CB、一次粒径 56 nm あるいは 95 nm)、および酸化インジウム(In_2O_3)のナノ粒子(一次粒径 30-50 nm)を細胞培地(5%胎児ウシ血清含有 DMEM)に懸濁した。その後、超音波洗浄機あるいは超音波ホモジナイザー(Branson 製)で凝集体を分散して実験に用いた。

(2) 微小粒子状物質に曝露した培養細胞における炎症反応と DNA 損傷の解析: ヒト肺上皮細胞(A549)、ヒト気道上皮細胞(HBEpC)、マウスマクロファージ(RAW264.7)などの培養細胞に(1)で分散した粒子状物質を添加し、一定時間培養した。細胞をスライドガラスに載せて乾燥させ、4%ホルムアルデヒドで固定した。炎症条件下では炎症細胞などから一酸化窒素(NO)やスーパーオキシド(O_2^-)が産生され、グアニンと反応して DNA 損傷塩基 8-ニトログアニン(8-nitroG)が生成される。我々は独自にウサギポリクローナル抗体を作成して免疫細胞染色を行い、8-nitroG の生成について解析した。また、リソソームに存在し炎症シグナルに関わる Toll-like receptor (TLR) 9 やその関連分子の発現については、市販の抗体を用いて免疫細胞染色で解析した。

(3) インジウム化合物に曝露したラット肺における遺伝子発現の網羅的解析: インジウム化合物(In_2O_3 あるいは ITO)の微粒子を蒸留水で懸濁し、10 mg/kg/回(インジウム量に換算)を週 2 回、計 5 回 Wistar ラット(オス、8 週齢)に気管内投与した。12 週間後に肺組織を摘出し、mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion 製)を用いて全 RNA を抽出した。RNA を蛍光色素 Cy3 でラベルし、遺伝子発現マイクロアレイと一晚ハイブリダイズした。現有のスキャナー(Agilent Technology 製)を用いてアレイの画像を読み取り、ソフトウェア Feature Extraction で各遺伝子の発現量を定量化した。さらにソフトウェア GeneSpring を用いて、インジウム化合物により統計学的に有意に発現量が変動する遺伝子を列挙した。

(4) ヒト肺における石綿繊維量と DNA 損傷との関連の解析: 非石綿関連疾患患者の肺組織(n=21)の剖検あるいは手術標本を得て、ホルマリン固定した。石綿繊維については透過型分析電顕法により、乾燥組織重量あたりの繊維数を計数した。またパラフィン包埋切片を作成して 8-nitroG の生成を免疫組織染色

で解析し、染色強度と石綿繊維量との相関を統計学的に解析した。本研究は、三重大学医学部研究倫理審査委員会の承認のもとで行った。

4. 研究成果

(1) MWCNTに曝露したヒト肺上皮細胞における炎症反応とDNA損傷の分子機構：ヒト肺胞上皮由来のA549細胞および気管支上皮由来のHBEpC細胞をMWCNTで処理し、8-nitroGの生成を蛍光免疫染色で解析した。MWCNTはA549細胞(図2)とHBEpC細胞の両方で8-nitroG生成を誘導した。8-NitroG生成は、繊維長の長いMWCNT(長さ5-15 μm)の方が短いMWCNT(長さ1-2 μm)より強く生成する傾向があった。

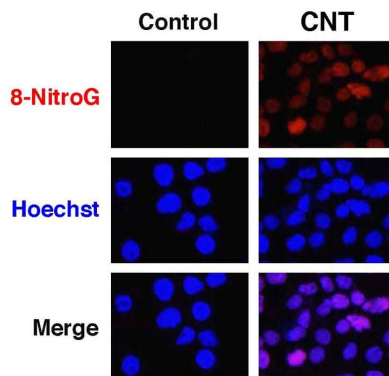


図2 MWCNTで処理したA549細胞における8-NitroG生成

8-NitroG生成はエンドサイトーシス阻害剤、核蛋白 high-mobility group box-1 (HMGB1)とその受容体 receptor for advanced glycation end-products (RAGE)に対する抗体、およびTLR9のsiRNAにより抑制された。MWCNTで処理した細胞の培養上清にはHMGB1と二本鎖DNAの放出を認めた。免疫細胞染色および免疫沈降法により、MWCNTに曝露した細胞内では、TLR9がリソソーム内でHMGB1およびRAGEと相互作用することが明らかになった(図3)。

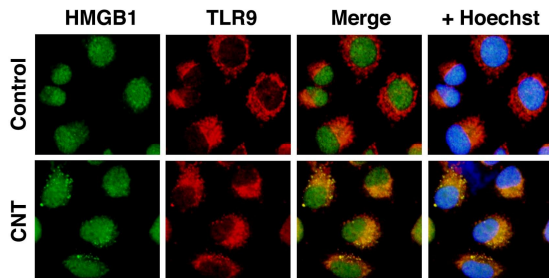


図3 MWCNTで処理したA549細胞におけるHMGB1とTLR9の共局在(細胞質内の黄色の輝点が共局在を示す)

以上の結果から、MWCNTが肺上皮細胞で

炎症反応とDNA損傷を起こす機構は以下のように考えられる。MWCNTは細胞を傷害してHMGB1とDNAを放出させ、その複合体が近傍の細胞表面のRAGEに認識される。HMGB1-DNA複合体はRAGEを介してリソソームに取り込まれ、TLR9がCpG DNAを認識して活性化され、NO産生などの炎症反応とDNA損傷を起こす(図4)。本研究により、MWCNTによる炎症反応と遺伝毒性にTLR9が関わる可能性を初めて明らかにした(*Part Fibre Toxicol* 2016)。この機構はMWCNTによる新規発がん機構と考えられる。

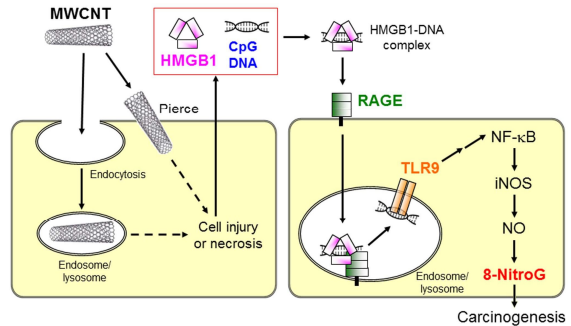


図4 MWCNTによるDNA損傷機構

(2) カーボンブラック(CB)に曝露した培養細胞におけるDNA損傷の解析：粒径の異なるCB(一次粒径56 nmおよび95 nm、それぞれCB56、CB95とする)をRAW264.7マウスマクロファージ培養細胞とA549細胞に添加して8-nitroGの生成を検討した。その結果、CB56よりCB95の方が強いNO産生と8-nitroG生成を起こす傾向があった。またCB95の方がCB56より有意に多く細胞内に取り込まれ、その過程にはクラスリン依存性のエンドサイトーシスが関わる考えられた。以上の結果から、CBによる炎症反応にはリソソームが関与し、毒性発現には適当な粒径や形状が存在する可能性が考えられる(論文投稿中)。

(3) 酸化インジウム(In₂O₃)に曝露した培養細胞におけるDNA損傷の解析：RAW264.7細胞にIn₂O₃のナノ粒子を添加すると8-nitroGの生成が認められた。8-NitroGの生成は誘導性NO合成酵素(iNOS)およびエンドサイトーシスの阻害剤で抑制された。8-NitroG生成は*Tlr9*および*Hmgbl*に対するsiRNAでも抑制された。以上の結果から、インジウム化合物による炎症反応と遺伝毒性はMWCNTと類似の機構によって起こると考えられ、呼吸器の発がんや線維化に寄与する可能性が示唆された。

(4) インジウム化合物に曝露したラット肺における遺伝子発現の解析：インジウム化合物(In₂O₃およびITO)を気管内投与したラットの肺組織における遺伝子の発現をマイクロアレイで網羅的に解析した。In₂O₃およびITOにより有意に発現が2倍以上変動した遺伝子はそれぞれ420種(281種増加、139種減少)

および 1368 種(784 種増加、584 種減少)であった。特にリソソームに存在する分子として、プロトンポンプのサブユニット、カテプシン、DNA 分解酵素、リパーゼなどの遺伝子発現が有意に増加していた。また、多数のサイトカインやケモカイン類の発現量も増加していた。前述の培養細胞の実験結果と合わせて、インジウム化合物による毒性発現には、リソソームが重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

(5) ヒト肺における石綿繊維量と DNA 損傷との関連：ヒト肺組織における乾燥組織重量あたりの石綿繊維数と DNA 損傷との関連について解析した。その結果、8-nitroG の染色強度が総石綿量($R=0.560$, $p=0.008$)および角閃石系石綿量($R=0.534$, $p=0.013$)と有意に相関した。以上の結果から、8-nitroG などの DNA 損傷塩基は、石綿の曝露量および発がんリスクの評価指標として応用できる可能性が考えられた(*J Occup Health* 2014)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

- Hiraku Y, Guo F, Ma N, Yamada T, Wang S, Kawanishi S, Murata M. Multi-walled carbon nanotube induces nitrative DNA damage in human lung epithelial cells via HMGB1-RAGE interaction and Toll-like receptor 9 activation. *Part. Fibre Toxicol.* **13**: 16 (2016) (査読有) doi:10.1186/s12989-016-0127-7
- Ichihara S, Li W, Omura S, Fujitani Y, Liu Y, Wang Q, Hiraku Y, Hisanaga N, Wakai K, Ding X, Kobayashi T, Ichihara G. Exposure assessment and heart rate variability monitoring in workers handling titanium dioxide particles- a pilot study. *J. Nanopart. Res.* **18**: 52 (2016) (査読有) doi:10.1007/s11051-016-3340-2
- Thanan R, Ma N, Hiraku Y, Iijima K, Koike T, Shimosegawa T, Murata M, Kawanishi S. DNA damage in CD133-positive cells in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mediators Inflamm.* **2016**: 7937814 (2016) (査読有) doi:10.1155/2016/7937814
- Wang S, Mo Y, Midorikawa K, Zhang Z, Huang G, Ma N, Zhao W, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. The potent tumor suppressor miR-497 inhibits cancer phenotypes in nasopharyngeal carcinoma by targeting ANLN and HSPA4L. *Oncotarget* **6**: 35893-35907 (2015) (査読有) doi:10.18632/oncotarget.5651
- Hou B, Ishinaga H, Midorikawa K, Shah SA, Nakamura S, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Takeuchi K. Circulating microRNAs as novel prognosis biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **16**: 1042-1046 (2015) (査読有) doi:10.1080/15384047.2015.1045692
- Laothong U, Hiraku Y, Oikawa S, Intuyod K, Murata M, Pinlaor S. Melatonin induces apoptosis in cholangiocarcinoma cell lines by activating the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Oncol. Rep.* **33**: 1443-1449 (2015) (査読有) doi:10.3892/or.2015.3738
- Wang S, Ma N, Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S, Xie Y, Zhang Z, Huang G, Murata M. Relationships of alpha-SMA-positive fibroblasts and SDF-1-positive tumor cells with neoangiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Biomed. Res. Int.* **2014**: 507353 (2014) (査読有) doi:10.1155/2014/507353
- Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 193-217 (2014) (査読有) doi:10.3390/ijms16010193
- Hiraku Y, Sakai K, Shibata E, Kamijima M, Hisanaga N, Ma N, Kawanishi S, Murata M. Formation of the nitrative DNA lesion 8-nitroguanine is associated with asbestos contents in human lung tissues: a pilot study. *J. Occup. Health* **56**: 186-196 (2014) (査読有) doi: 10.1539/joh.13-0231-OA
- Hiraku Y, Goto H, Kohno M, Kawanishi S, Murata M. Metal-mediated oxidative DNA damage induced by methylene blue. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**: 2776-2782 (2014) (査読有) doi:10.1016/j.bbagen.2014.04.020
- 平工雄介、環境因子による酸化・ニトロ化 DNA 損傷と発がんリスク評価、福岡医学雑誌、**105**: 33-41 (2014) (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24908906>
- Thanan R, Pairojkul C, Pinlaor S, Khuntikeo N, Wongkham C, Sripa B, Ma N, Vaeteewoottacharn K, Furukawa A, Kobayashi H, Hiraku Y, Oikawa S, Kawanishi S, Yongvanit P, Murata M. Inflammation-related DNA damage and expression of CD133 and Oct3/4 in cholangiocarcinoma patients with poor prognosis. *Free Radic. Biol. Med.* **65**: 1464-1472 (2013) (査読有) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.034
- Laothong U, Pinlaor P, Boonsiri P, Hiraku Y, Khoontawad J, Hongsrirachan N, Charoensuk L, Pinlaor S. α -Tocopherol and lipid profiles in plasma and the expression of α -tocopherol-related molecules in the liver of *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters. *Parasitol. Int.* **62**: 127-133 (2013) (査読有) doi:10.1016/j.parint.2012.11.00210.

[学会発表](計 18 件)

- 平工雄介、黒澤長之、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺

- におけるマイクロ RNA 発現の解析と標的遺伝子の探索、日本産業衛生学会東海地方会、名古屋大学医学部、愛知県名古屋市、2015 年 11 月 14 日
2. 平工雄介、馬寧、王淑民、川西正祐、村田真理子、多層カーボンナノチューブで処理した肺上皮細胞におけるニトロ化 DNA 損傷：Toll 様受容体 9 の役割、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市、2015 年 10 月 8~10 日
 3. 平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロ RNA 発現の網羅的解析、第 88 回日本産業衛生学会、グランフロント大阪、大阪府大阪市、2015 年 5 月 13~16 日
 4. 平工雄介、山田達彦、馬寧、川西正祐、村田真理子、多層カーボンナノチューブによる細胞内ニトロ化 DNA 損傷：Toll 様受容体の関与、第 85 回日本衛生学会総会、和歌山県民文化会館・ホテルアパローム紀の国、和歌山県和歌山市、2015 年 3 月 26~28 日
 5. 平工雄介、山田達彦、馬寧、川西正祐、村田真理子、多層カーボンナノチューブによるニトロ化 DNA 損傷と Toll 様受容体の役割、第 14 回分子予防環境医学研究会、大阪市立大学、大阪府大阪市、2015 年 2 月 13~14 日
 6. 平工雄介、山田達彦、馬寧、村田真理子、多層カーボンナノチューブによる細胞内 DNA 損傷の解析(第 3 報): リソソーム内 Toll 様受容体の役割、日本産業衛生学会東海地方会、三重大学、三重県津市、2014 年 11 月 22 日
 7. 渡辺純、金子晟、市瀬孝道、村田真理子、平工雄介、アスベスト曝露マウスの肺組織におけるマイクロ RNA 発現の解析(第 2 報): 発がんへの関与の可能性、日本産業衛生学会東海地方会、三重大学、三重県津市、2014 年 11 月 22 日
 8. 平工雄介、市瀬孝道、村田真理子、アスベスト曝露マウスの肺組織におけるマイクロ RNA の発現変動、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014 年 9 月 25~27 日
 9. 平工雄介、市瀬孝道、村田真理子、アスベスト気管内投与マウスの肺組織におけるマイクロ RNA 発現の解析、第 84 回日本衛生学会総会、岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市、2014 年 5 月 25~27 日
 10. 平工雄介、酒井潔、柴田英治、上島通浩、久永直見、村田真理子、ヒト肺組織におけるニトロ化 DNA 損傷と石綿繊維量の関連および繊維長の影響、第 87 回日本産業衛生学会、岡山コンベンションセンター・岡山シティミュージアム、岡山県岡山市、2014 年 5 月 21~24 日
 11. Yusuke Hiraku, Feiye Guo, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Nitrate DNA damage in lung epithelial cells

- exposed to multi-walled carbon nanotube, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, 名古屋国際会議場、愛知県名古屋市、2013 年 10 月 28~31 日
12. 平工雄介、市瀬孝道、吉田成一、定金香里、村田真理子、アスベスト曝露マウスの肺組織におけるマイクロ RNA 発現の解析、日本産業衛生学会東海地方会、愛知医科大学、愛知県長久手市、2013 年 10 月 26 日
 13. 平工雄介、環境因子による酸化・ニトロ化 DNA 損傷と発がんリスク評価、新学術領域研究「プラズマ・ナノマテリアル動態学の創成と安全安心医療科学の構築」第 11 回医工連携ゼミ、九州大学、福岡県福岡市、2013 年 7 月 30 日 (招待講演)
 14. 平工雄介、Feiye Guo、馬寧、川西正祐、村田真理子、多層カーボンナノチューブによる細胞内 8-ニトログアニン生成(第 2 報): 繊維長の DNA 損傷能への影響、第 13 回日本 NO 学会学術集会、沖縄県医師会館、沖縄県南風原町、2013 年 6 月 28~29 日
 15. 平工雄介、村田真理子、ナノ素材のリスク評価に関する基礎的研究(第 3 報): 多層カーボンナノチューブによる細胞内ニトロ化 DNA 損傷の解析、第 86 回日本産業衛生学会、ひめぎんホール、愛媛県松山市、2013 年 5 月 14~17 日

〔図書〕(計 1 件)

1. Hiraku Y, Kawanishi S. Role of nitrate DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. In: *Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects*. Hiraku Y, Kawanishi S, Ohshima H (ed.). Wiley, 41-59 (総ページ数 400) (2014)

〔その他〕

ホームページ: 三重大学大学院医学系研究科環境分子医学分野

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平工 雄介 (HIRAKU YUSUKE)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30324510