

研究題目 プロテオミクスを用いた微粒子誘導性間質性肺炎の分子メカニ

ズムの解明

研究組織

研究代表者：武村 直紀（大阪大学 大学院薬学研究科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：齊藤 達哉（大阪大学 大学院薬学研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

間質性肺炎は線維症に発展しうる重篤な疾患であり、病態形成に関わる分子機構の理解が強く求められている。大気中に漂う微粒子は間質性肺炎の原因の1つとして知られている。間質性肺炎を適切に予防・治療するには、肺に侵入した微粒子が誘発する急性期の炎症応答や、その後続く慢性炎症に関わる生体分子を、各段階において果たす役割とともに理解する必要がある。重要なことに、微粒子は同じ材質でも粒径の違いによって細胞に対する動作原理、誘導する炎症応答、さらには組織障害の形態に大きな違いが出る。これまでの研究で、マイクロレベルの微粒子がもたらす炎症応答については一定の解析が進んでいるものの、十分な理解は得られておらず、ナノレベルの微粒子による炎症応答についてはほとんど分かっていない。とりわけ後者については、ナノマテリアルの工業利用が進み、ナノレベルの微粒子に暴露される機会が増加している近年の状況を鑑みると、急務であると考えられる。そこで本研究では、ナノレベルおよびマイクロレベルの微粒子が引き起こす間質性肺炎について、それぞれの炎症応答に深く関わる分子を探索するため、マウス組織や細胞由来の試料をプロテオーム解析する。

[1-2]研究の方法・経過

実験1；ナノ粒子とマイクロ粒子のモデルとして、それぞれ平均径30 nmと1500 nmのシリカ粒子を用いた。これらをC57BL/6マウスに経気管投与し、投与して1日後に肺胞洗浄液を回

収した。肺胞洗浄液を遠心分離して細胞を除去し、上清をLC-MS/MS解析に供した。

実験2；肺組織に侵入した微粒子に反応して炎症応答を惹起するのは主にマクロファージである。C57BL/6マウスにチオグリコレートを腹腔投与して3日後に腹腔からマクロファージを回収し、未刺激あるいは1500 nmシリカ粒子で刺激した状態で培養した。一定時間後に細胞を溶解バッファーで処理した。当研究室で同定したシリカ粒子誘導性間質性肺炎を抑える化合物Oridonin、さらにその抑制活性を失った還元体にそれぞれビオチン標識を施し、前文の細胞溶解液と混合した。ストレプトアビジンビーズを用いてそれぞれの化合物が結合しているタンパク質を回収し、LC-MS/MS解析に供した。

実験3；過去にシリカ粒子に吸着するタンパク質をプロテオーム解析している。シリカとは別の材質である水酸化アルミニウムの微粒子を、C57BL/6マウスから得た組織洗浄液と混合し、タンパク質を吸着させた。生理食塩水によって微粒子に対する吸着が弱いタンパク質を洗浄・除去した後、Guanidin-TCEPにより吸着タンパク質を回収した。回収した溶液をLC-MS/MS解析に供した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

実験1；30 nmと1500 nmのシリカ粒子をそれぞれ投与した肺の洗浄液には、粒子による肺組織傷害に伴う血液の混入により、血液中タン

パク質の混入が認められたものの、刺激に用いたシリカ粒子によってそれぞれ大きく異なるタンパク質増加パターンが認められた。

実験2 ; Oridonin に対して結合するタンパク質の情報を網羅的に得ることが出来た。

実験3 ; 水酸化アルミニウムの粒子に結合するタンパク質の情報を網羅的に得ることが出来た。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

実験1 ; 解析条件について今後も最適化を図る必要はあるものの、粒径の違う微粒子によって誘導されるそれぞれの炎症応答に関わるタンパク質の解析候補について、貴重な情報を得ることが出来た。今後、候補タンパク質の働きを遺伝学的手法や阻害化合物で失わせることで、間質性肺炎への関与を確認していく。

実験2 ; 今回の解析で得られた情報をもとに、Oridonin の標的タンパク質を今後解析することで、ひいては間質性肺炎の要因となるタンパク質の発現や放出を制御している分子機構の理解が深まることが期待される。

実験3 ; 今回の解析で得られた情報をもとに、シリカ粒子や水酸化アルミニウム粒子に吸着したタンパク質をそれぞれ比較し、微粒子に共通して結合して炎症応答を惹起するようなタンパク質の同定を試みる。間質性肺炎に加え、微粒子が体内に侵入することで惹起される炎症応答の理解に広く応用されると期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表
該当なし

[3-2] 学会発表

1) 生駒健太, 武村直紀, 田浦学, 小迫英尊, 齊藤達哉. 刺激性微粒子により誘導される細胞死の解析. 第71回日本薬学会関西支部大会, オンライン開催, 2021年10月9日.

2) 生駒健太, 武村直紀. 微粒子による現代病を防ぐ延命草茶成分 Oridonin の解析. 日本食品免疫学会 第17回学術大会, オンライン開催, 2021年11月16日.

3) Naoki Takemura, Manabu Taura, Tatsuya Saitoh. Oridonin as a potential therapeutic agent for microparticle-induced inflammatory diseases. 第50回日本免疫学会学術集会, 奈良, 2021年12月8日.

4) 生駒健太, 武村直紀, 田浦学, 君嶋敦, 荒井雅吉, 齊藤達哉. 刺激性微粒子による炎症応答を阻害する生薬由来化合物の解析. 日本薬学会 第142年会, オンライン開催, 2022年3月26日.

[3-3] 成果資料等

共同利用のため該当なし

【4】今後の課題等

今回の解析では急性炎症に関わるタンパク質候補の情報を得たが、粒子を投与してより時間が経過した時点の肺胞洗浄液についても同様に解析し、線維化をもたらす慢性炎症に関わるタンパク質の同定を図りたい。また、肺の細胞を培養し、微粒子で刺激した際に放出されるタンパク質も解析していきたい。