

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、その後に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。本研究では、ナノ粒子がマウス肺で引き起こす炎症応答の発生や肺線維症への進行に関わる生体分子を同定するため、昨年度に引き続きプロテオーム解析を行う。

[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。昨年度の時点で、これらをC57BL/6マウスに経気管投与し、投与して1日後に回収した肺胞洗浄液の上清をLC-MS/MS解

析に供したところ、粒子による肺組織傷害に伴う血液中タンパク質の混入が認められた。

その後の検証により、微粒子を投与してから数日すれば血液の混入はかなり収まることが分かった。また、共同研究者から、血液からの過剰なアルブミンの混入を市販のキットで除く方法も提案して頂いた。炎症が慢性化して肺の線維化が見られるのは微粒子の投与から数週間後であることを踏まえ、サンプルの回収条件の検討を進めている。

実験2；実験で用いる市販品の微粒子とは違い、大気中を漂う実際の微粒子の表面には、種々の微生物やその成分が付着しており、微粒子を吸引した際の肺の炎症応答を直接的あるいは間接的に増幅することが知られている。著名な例として、グラム陰性菌の膜成分であるリポ多糖が挙げられ、継続的な刺激が肺線維症をもたらすことが知られている。肺に侵入した微粒子や、その表面に付着した微生物由来の成分に反応する細胞の代表はマクロファージであり、刺激に応じてタンパク質や脂質から構成される種々の炎症性メディエーターを放出しながら細胞死するパイロトーシスを起こす。そこで、マウスマクロファージに対して同状況を模した刺激を与え、培養液中に放出されたタンパク質を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；プロテオーム解析に至れていないので無し。

実験2；線維化との関連が期待される炎症性メディエーターを含めたタンパク質の情報を網羅的に得ることが出来た。また、本稿では遺伝子名の公表は控えるが、微粒子による炎症応答の制御に関わる分子の遺伝子欠損マウスから調製したマクロファージを野生型の細胞と並べて同条件で解析した。野生型と比べて、遺伝子欠損マウスのマクロファージでは、上記解析で検出されたタンパク質の一部について、その放出が数倍～数十倍に上がっていた。

[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について解析条件を最適化し、再解析を図る必要はあるものの、実験2で得た成果と照らし合わせながら、ナノ粒子によって誘導される肺線維症の発症や増悪に関わるタンパク質の解析候補を定めた暁には、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、その関与を確認していく。また、実験2で触れた遺伝子が特定のタンパク質の放出を制御することが示唆されたことから、当該遺伝子産物の機能を人為的に制御することで肺線維症の抑制を図れるかについても検討していく。これらの解析は肺線維症の病態形成に関わる分子機序の理解や予防・治療法の開発に大きく資するものと期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) Ikoma K, Takahama M, Kimishima A, Pan Y, Taura M, Nakayama A, Arai M, Takemura N, Saitoh T. Oridonin suppresses particulate-induced NLRP3-independent IL-1 α release to prevent crystallopathy in the lung. *Int Immunol*. 2022;34(10):493-504. (前年度の共同利用の成果に関連する)

2) 武村直紀, 齊藤達哉. パイロトーシスによる自然炎症とその制御—オルガネラを標的とする新たな抗炎症薬の開発. *医学のあゆみ*. 2022;283(5):455-462

3) 武村直紀, 齊藤達哉. 細胞死と自然炎症: 細胞外微粒子によるパイロトーシスと疾患病態への影響について. *臨床免疫・アレルギー科*. 2023;80(1):印刷中

[3-2]学会発表

1) 生駒健太, 武村直紀, 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. 第21回・次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム2022, 一般学術発表(口頭), 名古屋, 2022年9月3日

2) 武村直紀. 環境中微粒子がもたらす炎症性疾患とその制御. 第29回日本免疫毒性学会学術年会, シンポジウム招待講演, 札幌, 2022年9月12日

3) 武村直紀, 生駒健太, 松井裕大, 齊藤達哉. パイロトーシスを標的とする新たな機序で働く抗炎症薬の開発. 第72回日本薬学会関西支部総会・大会, 一般学術発表(口頭), 枚方, 2022年10月8日

4) 武村直紀. インフラマソーム非依存的パイロトーシスに起因する微粒子疾患とその制御. 日本薬学会 第143年会, シンポジウム招待講演, 札幌, 2023年3月28日

5) 齊藤達哉. 刺激性微粒子による免疫毒性の理解とその制御. 日本薬学会 第143年会, シンポジウム招待講演, 札幌, 2023年3月28日

[3-3]成果資料等

[3-1]論文発表の1)について、別添の通り。

【4】今後の課題等

今後の課題は[2-2]の通りである。また、間質性肺炎について、線維症と同様に高い確率で併発する肺癌を解析するためのマウスモデルの作製も進めており、こちらについても疾患に深く関わるタンパク質とその働きを明らかにしていきたい。