

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「環境中微粒子の体内、細胞内動態、生
体・免疫応答機序の解明と外因的、内因的健康影
響決定要因、分子の同定」

研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：高野 裕久
(京都大学 大学院地球環境学堂
名誉教授)

§1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究の目標は、『呼吸器・アレルギー疾患、生活習慣病を悪化させる環境中微粒子を対象に、生体侵入経路や影響発現メカニズムを明らかにする。』ことにある。

三上 G は、これまでに開発した組織 3 次元画像構築技術をさらに高度化させ、これまでの半分以下の時間で、より精細な広視野高解像度 3 次元画像を構築することを可能にした。さらに、当該技術が、肺以外の組織(肝臓や腎臓)の 3 次元画像構築にも応用可能であることを示した。当該技術を用いた環境微粒子曝露マウスの解析から、アレルゲン(OVA)と、黄砂(ASD)や酸化チタンの同時曝露では、肺組織内に大量にマクロファージが浸潤し、血管や気管支を鞘状に覆うこと、その浸潤には濾胞性ヘルパー T 細胞が必要なことなどを見出した。加えて、西安や福岡、横浜など、それぞれの地域由来の PM2.5 では、マクロファージ等の浸潤レベルが異なることを示した。

高野・市瀬・井上 G は、微粒子の局在と生体応答の同視野観察を深化させ、分子メカニズムの空間的解明とともに、粒子種による生体応答の相違の検討を継続した。各粒子曝露に対する NF- κ B や C5aR、IL-1 α 、 γ H2AX、IgA などの分子の発現や細胞外小胞の産生変動などについて、粒子種による応答の相違を明らかにした。肺線維化の誘導は ASD で強く、炎症応答と粒子蓄積性の相違が線維化に寄与している可能性を示した。空間オミクス解析では、ASD 曝露の気道や肺胞において、特徴的に変動する炎症関連遺伝子群および粒子の局在を明らかにした。環境中微粒子を内因的特性から食食細胞死誘起型、ニトロ化・酸化ストレス誘起型、炎症誘起型に類型化してきたが、この類型化を基に、国内外三地点で採取した一般環境中 PM2.5 の健康影響決定要因の同定を進めた。これらの粒子は急性炎症や DNA 損傷、喘息病態の悪化等を誘導し、主として炎症誘起型と類似した傾向を示したが、ニトロ化・酸化ストレス誘起型の特徴も有し、発生源によって生体応答が異なることが示された。PM2.5 を曝露した粒子成分と生体応答の相関解析では、好酸球の増加や IL-5 産生と高い正相関を示す成分を見出した。また、MP の経気道曝露により、気管支関連リンパ組織(BALT)の発達を伴う喘息病態の悪化が確認され、気道や血管周囲、BALT、肺門リンパ節で MP が検出された。さらに、ヒト気道上皮細胞における Pyrene (Py), 1-Hydroxypyrene (1-OHPy)の定量と可視化を進め、Py 曝露群からその代謝物である 1-OHPy の検出に成功した。

奥田 G は、独自開発サイクロン装置により複数地点/季節で環境中微粒子を採取し、微粒子の化学組成と酸化能が地域により異なることを示した。これに加えて、環境中微粒子がもつ酸化能には、Mn や Cu などの遷移金属や有機炭素および元素炭素成分が寄与している可能性を示した。さらに気流解析と化学成分解析、および毒性解析を組み合わせ、日本においては都市のローカルな発生源を持つ微粒子の方が越境汚染よりも酸化能が高い可能性を示した。また、採取した環境中微粒子を他のグループやチームに供与した。

黒田 G は、炎症を引き起こす微粒子の化学的特性を解析し、微粒子のイオン化の特性が肺胞マクロファージの細胞死と IL-1 α 放出を引き起こすことを明らかにした。また放出された IL-1 α は肺の炎症を惹起する因子であるが、微粒子に反応して IL-1 α を放出する肺胞マクロファージは全体の 10%以下であることを明らかにし、さらに IL-1 α のリポーターマウスを作製することにより、この minor subset を生きたまま単離することを可能とした。また、微粒子の有害性の評価に有用な新しい肺胞マクロファージの細胞株を作製した。さらに微粒子が引き起こす細胞死の現象から、ネクロトーシスを誘導するアジュバントを見出し、新規粘膜アジュバントとして有効であることを確認した。

濱口 G は、マイクロプラスチック (MP) の経口曝露が生活習慣病を悪化させることを指摘した。また、100 nm 以上の粒径では、粒径による健康影響の違いは明らかでなく、MP 経口曝露の健康影響は腸内環境の障害による可能性を指摘した。

木村 G では、マウスの気道に微粒子を取り込む M 細胞が存在することを明らかにし、分化機構の解明を行った。さらに、インフルエンザ感染により気道の M 細胞が増加すること、M 細胞欠損によりインフルエンザ特異的 T 細胞応答が減弱することを見出した。また、RANKL の投与により強制的に M 細胞を誘導することで、肺炎球菌に対する抵抗性が減弱することを発見した。

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:高度化した三次元解析により、環境中微粒子曝露後に肺組織に浸潤する F4/80 陽性マクロファージが脈管外通液路を移動している可能性を見出した。また、マクロファージには、血管や気管支を鞘状に覆うタイプと肺の間質や肺胞に集塊を形成するタイプの2種類のサブセットが存在することを示した。加えて、前者は iBALT と同様に濾胞性ヘルパーT 細胞 (Tfh) 欠損マウスでは消失することより、環境中微粒子曝露による iBALT 形成に関与すると考えられる (三上 G:投稿準備中)。

2.

概要:微粒子のイオン化の特性が肺胞マクロファージの活性化に関与することを確認し、さらにカルシウムシグナルの誘導が引き起こされることを明らかにした。自然免疫、獲得免疫の両者に影響を与えていると考えられ、微粒子による炎症誘導機構の解明のみならず、新しいワクチンアジュバントの理論構築に資する知見であると考えられる (黒田 G:投稿準備中)。また、ネクロトーシスによる IL-1 α の誘導機構について遺伝子改変マウスを用いて評価し、ネクロトーシスが獲得免疫の誘導にも重要であることを明らかにした (黒田 G:Cell Death & Disease へ投稿中)。

3.

概要:MP 経口曝露の健康影響は腸内環境の障害によるものである可能性を指摘し、MP が食物アレルギーを悪化させる可能性を指摘した。食物アレルギーの一因として憂慮されている現代の食事は脂質が過剰であることが指摘されているが、本研究では、高脂肪食に MP が加わることで顕著な食物アレルギーの悪化が認められた。これらの知見は、欧米化生活下での食物アレルギー急増に MP 汚染が関与している可能性を示す先導的かつ独創的成果であり、MP による環境汚染に対する全球規模の対策の必要性を示している (濱口 G:Chemosphere, 2025)。

参考

概要:ASD を経気道曝露 2 時間後に肺胞マクロファージが ASD を貪食し、4-6 時間後には BALF 中の好中球数増加や、IL-1 α を含むサイトカイン・ケモカイン濃度の上昇、および肺胞マクロファージの necroptosis が認められた。抗 IL-1 α 抗体によって、BALF 中のケモカインと好中球数増加が抑制され、さらに ASD の加熱やポリミキシン B の添加により、初代培養肺胞マクロファージからの IL-1 α 放出が減弱したことから、ASD に付着するエンドキシンなどの微生物由来成分が一連の反応に重要であることが分かった。本研究結果が ASD に起因する疾病増悪への予防策や、治療法の開発に繋がることが期待される (高野 G:Environment International, 2024)。

概要:TiO₂、DEP、ASD、PM2.5 を経気道曝露し、偏光顕微鏡を用いて、肺の線維化を可視化した。さらに、粒子の局在をラマン顕微鏡と暗視野顕微鏡を用いて同定し、生体応答と粒子の同視野可視化を実現した。その結果、特に、肺線維化は ASD で強く、粒子を取り囲むようにコラーゲンが形成されることを見出した。DEP や TiO₂ でも線維化は誘導されたが、PM2.5 では、ほとんど線維化を認めなかった。炎症応答と粒子蓄積性の相違が肺線維化に寄与している可能性を指摘した (高野 G:投稿中)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要:これまで開発済みのサイクロン式粒子採取装置 (特許 6596041) に加え、複数チャンネルのホルダーに定流量で通気可能な多連型の環境中微粒子採取装置を開発した (特許

7397428)。さらに、環境中微粒子の毒性試験に利用可能な、従来化学分析に用いられてきたフィルターの特徴である高強度・高耐候性と高い粒子捕集効率を維持しながら、ある条件では水に溶けて動物・生物曝露といった毒性学的実験や微生物検出にも使用することができる、新規フィルターを開発した(特開 2024-174594)(奥田 G)。

2.

概要: ラマン顕微鏡を用いた肺組織中の環境中微粒子局在と周囲の生体イベントの同視野可視化技術を、暗視野観察に加え、偏光、蛍光観察、空間オミクス解析と組み合わせで進展させた(高野 G: 投稿中)。また、対物レンズや封入剤等の調整によって、高感度ラマン測定を実現した。さらに、本技術を用いたヒト臨床検体の疾患鑑別への応用展開も検討している(高野 G)。これまでに開発した広視野高解像度 3 次元再構築法(三上 G: 特願 2022-161670)を AI 技術を応用してさらに高度化した。これによって、従来法と比較して、大幅に作業時間が短縮され(半分以下)、かつより高精細な 3 次元再構築が可能になった。本技術は、肺以外の組織にも適用可能で、組織の全体像〜1 細胞までを観察できる。したがって、様々な疾患モデルの病態解析に貢献しうる新技術である。

3.

概要: 肺泡マクロファージは他の組織マクロファージとは分化や維持の機構が異なっている。また微粒子に応答し細胞死を引き起こすとともに IL-1 α を放出する特性も肺泡マクロファージが有する性質の一つである。しかし肺泡マクロファージはマウスなどの小動物から得られる数が少ないため多種多様の微粒子の評価に用いるのは困難である。そこで、マウスから回収した肺泡マクロファージから肺泡マクロファージの特性を維持した新しい細胞株、ALV3.7 を作製した。ALV3.7 は肺泡マクロファージのマーカーである CD11c および siglec F を発現し、アラムや TiO₂、黄砂などの微粒子に応答して細胞死と IL-1 α を放出する特性を有していた。この結果から、ALV3.7 は肺泡マクロファージの性質を維持した細胞株であり、多種多様の微粒子を *in vitro* にて評価するのに有用かつ強力なツールとなる(黒田 G: 投稿準備中)。

< 代表的な論文 >

1.

概要: MP の経口曝露により腸内環境が障害され、小腸のバリア機能の低下・リーキーガット症候群により腸管内の炎症惹起物質が体内に浸透することにより小腸の慢性炎症が発症し、インスリン抵抗性が亢進することで糖尿病が増悪することを指摘した。これにより MP の経口曝露が健康影響をきたし得ることを指摘した(濱口 G: Environ Health Perspect, 2023)。

2.

概要: 本研究で開発した組織 3 次元画像構築技術の応用範囲を広げるため、肺組織以外の組織の 3 次元画像構築を試みた。解析モデルとして肝臓とその線維化の抽出を行った。肺に特化したプログラムの一部を改変することによって、肝臓内の血管、線維化組織、および肝臓内に浸潤したマクロファージを抽出した広視野高解像度な 3 次元画像構築に成功した(三上 G: Sci Rep, 2024)。これによって当該技術が様々な臓器の 3 次元画像構築へ応用可能であることが示された。

3.

概要: 特許取得技術であるサイクロン式粒子採取装置(特許 6596041)をさらに改良し、より微小な粒子までを採取して細胞・動物曝露実験に供することを可能にした。具体的には、従来技術では 50%分粒径が約 0.7 μm だったものが、サイクロンを小型化することにより 50%分粒径を約 0.2 μm まで下げ、さらにサイクロン本体を開閉可能にすることにより内壁に付着した粒子まで回収することに成功した。これにより、これまで困難であった微小粒子の曝露実験による毒性評価が実施できるようになった(奥田 G: Aerosol Science and Technology, 2024)。

参考

概要: PM2.5 や ASD の粒子と化学物質、特にキノン化合物との相互作用が呼吸器系に及ぼす影響を明らかにするため、1,2-ナフトキノン(NQ)と 9,10-フェナントレンキノン(PQ)を、加熱 PM(h-PM2.5 および h-ASD)と共に気道上皮細胞に複合的に曝露した。9,10-PQ + h-PM2.5 曝露では、9,10-PQ + h-ASD または 9,10-PQ + h-PM2.5 + h-ASD よりも、細胞死が増加し、1,2-NQ でも同様の結果が得られた。キノンは h-PM2.5 の存在下で最も ROS を産生した。キノンは、ASD よりも PM2.5 成分の存在下で、ROS 生成の増加を伴う細胞死を誘導することが明らかとなった(高野 G: International Journal of Molecular Sciences, 2023)。

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

①高野グループ(高野 G)

研究項目

- 1 各種環境中微粒子の生体・免疫応答へのエンタリー経路とその相違
- 2 各種環境中微粒子の体内動態、生体・免疫応答機序とその相違
- 3 環境中微粒子(外因性細胞外微粒子)の医学・生物学的(内因的)類型化
- 4 PM2.5 の外因的、内因的健康影響決定要因、分子の同定
- 5 環境中微粒子が新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の体内、細胞内侵入に及ぼす影響とその制御法の開発
- 6 表面プラズモン共鳴イメージングによる新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)細胞内侵入抑制分子スクリーニング法の開発
- 7 環境中微粒子が生活習慣病に及ぼす影響メカニズムの解明に関する研究

②井上グループ(井上 G)

研究項目

- 1 各種環境中微粒子の生体・免疫応答へのエンタリー経路とその相違
- 2 各種環境中微粒子の体内動態、生体・免疫応答機序とその相違
- 5 環境中微粒子が新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の体内、細胞内侵入に及ぼす影響とその制御法の開発

③奥田グループ(奥田 G)

研究項目

- 4 PM2.5 の外因的、内因的健康影響決定要因、分子の同定

④三上グループ(三上 G)

研究項目

- 1 各種環境中微粒子の生体・免疫応答へのエンタリー経路とその相違
- 2 各種環境中微粒子の体内動態、生体・免疫応答機序とその相違

⑤黒田グループ(黒田 G)

研究項目

- 1 各種環境中微粒子の生体・免疫応答へのエンタリー経路とその相違
- 2 各種環境中微粒子の体内動態、生体・免疫応答機序とその相違

⑥濱口グループ(濱口 G)

研究項目

- 7 環境中微粒子が生活習慣病に及ぼす影響メカニズムの解明に関する研究

⑦木村グループ(木村 G)

研究項目

1 各種環境中微粒子の生体・免疫応答へのエントリー経路とその相違

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

三上 G では、望月和樹教授(山梨大学生命環境学部)との共同研究として、本研究で開発した 3 次元解析画像構築技術の肝臓および腎臓解析への応用を検討している。また、領域内のネットワーク支援を受け、グループ内の高野、黒田、木村、奥田との共同研究として 2024 年度科研費基盤 B(代表:三上)に採択されている。今後、さらに大型の研究費への応募を予定している。

高野・市瀬・井上 G では、領域内共同研究として、秋田英万教授(東北大学)に、環境中微粒子として、DEP を提供したほか、DEP がリンパ管内皮細胞に及ぼす影響について共同研究を進め、The stress-responsive cytotoxic effect of diesel exhaust particles on lymphatic endothelial cells(Sci rep, 2024)と題する論文を共同発表した。さらに、本研究にて得られたラマン技術を用いて、タイ・マヒドン大と共同研究を行い、タイ国で問題となっている電気電子機器廃棄物処理地域の空気質の分析に用いた。また、臨床医、ラマン装置販売業者と共同し、ヒト検体を用いた疾患鑑別、臨床応用や医療機器としての実用化に向けた基礎研究を試みている。ヒト居住空間の微粒子にも着目し、民間空調整備業者らと共同研究を行っているほか、民間企業も含めたメンバーと、異分野融合交流を進めている。

奥田 G は、領域内共同研究として、豊國伸哉教授(名古屋大学)に、横浜にて採取された環境中微粒子サンプルと、加熱により人為的に化学組成を変化させた微粒子を、合計 3 回提供し、合わせて詳細な微粒子中の化学成分データも提供した。また、サイクロンにより採取した環境中微粒子を 10 以上の他機関の研究者に提供し共同研究を進めているほか、環境中微粒子採取技術に興味をもった民間財団法人(3 社)との共同研究を開始し継続中である。今後も、開発したサイクロン技術を研究者ネットワークや産学連携を通じて市場に広く普及していく。

黒田 G では、さがけ研究者の白崎善隆博士と肺胞マクロファージによる微粒子応答のライブイメージングを進めている。また、兵庫医科大学医学部遺伝学講座の大村谷昌樹博士とともに微粒子応答の解析に有効な種々の遺伝子欠損マウスおよび IL-1 α リポーターマウスの作製をおこなった。企業との共同研究により、酸化亜鉛内包型 LNP の作製を行った。微粒子のゼータ電位の測定は大阪大学微生物病研究所の吉岡靖雄教授との共同研究にて行なった。マウス肺胞マクロファージ細胞株の作製は産業医科大学産業生態科学研究所の和泉弘人博士との共同研究にて行なった。

濱口 G では、民間企業とガスクロマトグラフィ質量分析法によるメタボローム解析について共同研究開発を開始した。この共同研究開発は令和 4 年度成長型中小企業等研究開発支援事業「オンライン固相誘導体化 SPE-GC/MS システムを用いた 生体試料中代謝物の分析法の開発」に採択された。この新手法は、今後の MP による腸内環境障害の評価に貢献しうる新技術である。今後も開発したメタボローム解析技術を研究者ネットワークや産学連携を通じて市場に広く普及していく。

木村 G では、グループ内共同研究として奥田 G から分与された環境中微粒子が M 細胞へと取り込まれるかの解析を、独自に開発した培養系を用いて実施している。また、太田禎生准教授(東京大学)の長谷 G は同一研究室であり、領域内共同研究としてバクテリア由来の細胞外小胞が M 細胞へと取り込まれるかの検証を同様に進めている。