

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22406004
 研究課題名（和文）南カリフォルニアでの大気中反応性有害物質の検出と生体応答評価系の開発
 研究課題名（英文）Development of an assay to evaluate the reactivity at chemicals contaminated in the atmosphere, South California
 研究代表者
 熊谷 嘉人（KUMAGAI YOSHITO）
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号：00250100

研究成果の概要（和文）：大気汚染物質は粒子状物質と揮発性成分に大別できる。これまで粒子状物質が生体に及ぼす影響については数多く報告されているが、揮発性成分が生体に与える影響についての知見は非常に乏しい。ヒト気道上皮細胞を南カリフォルニア地域にて採取した大気中揮発性成分に曝露し、網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、主に生体防御に関わる遺伝子群の発現誘導が生じた。これと一致して、転写因子 Nrf2 の活性化およびその下流遺伝子群の発現亢進が見られ、その要因として、揮発性成分中の親電子物質が関与していることが示唆された。一方、気管支炎や喘息の罹患には大気中微小粒子による炎症性サイトカインの発現上昇が関与することが示唆されているが、揮発性成分は炎症性遺伝子群の発現誘導を引き起こさないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We describe here results of studies investigating the actions of the vapor phase of ambient air samples collected in the midtown area of Los Angeles on human bronchial epithelial BEAS-2B cells using DNA microarray analysis. Among 26 genes whose expression increased 4 fold or more, 4 genes were associated with detoxifying genes regulated by the transcription factor Nrf2. Consistent with these results, the vapor samples activate the Nrf2-ARE pathway, resulting in up-regulation of heme oxygenase-1 (HO-1), glutamate cysteine ligase modifier subunit, and cystine transporter (xCT) mRNA and proteins. No appreciable increases in pro-inflammatory genes were observed. These results suggest that ambient vapor samples activate the Nrf2-ARE pathway but not an inflammatory response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：環境医学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：大気中揮発物質、親電子物質、Keap1/Nrf2、グルタチオン

1. 研究開始当初の背景

近年の深刻な環境問題の一つが大気汚染

である。大気汚染物質の個体レベルへの影響としては、発ガン、アレルギー疾患、呼吸器系疾患、循環器系疾患などの健康影響が懸念されている。ところで、自動車等から排出される大気汚染物質は揮発性成分と粒子状成分に大別される。これまで、多くの大気汚染物質の生体影響評価は、ディーゼル排気微粒子のような大気中微小粒子に着目されてきた。近年、我々は揮発性成分と粒子状成分を分別して採取するシステムを構築し、大気中揮発成分に親電子物質が存在することを明らかにした。さらに、大気中揮発成分が親電子物質のセンサータンパク質である PTP1B に結合し、その制御下にあるシグナル伝達系を活性化することを明らかにした。しかしながら、大気中揮発成分に対する生体影響の全容は不明のままである。大気中揮発成分による生体影響を解明・評価していくことは、我々が健康に生活していくためにも必要な研究であるといえる。

2. 研究の目的

本研究では、カリフォルニア大学ロサンゼルス校及び南カリフォルニア粒子センターとの共同研究により、交通量が多く、自動車による大気汚染が進行している南カリフォルニア大学付近の大気中揮発成分のサンプリングを行い、当該大気中揮発成分を用いて、生体の防御応答を明らかにすることを目指した。細胞は標的組織の1つであるヒト気管支上皮細胞 BEAS-2B を使用した。

3. 研究の方法

大気中揮発成分の収集は、ロサンゼルス州カリフォルニア、南カリフォルニア大学付近にてハイボリュームエアサンプラーの XAD-2 樹脂を用いて行った。1回の採集は、1日あたり5時間にわたって揮発性成分 (VPs) を6日間連続で行い、流速 113 L/min の条件とした。VPs サンプルは、ジクロロメタンで超音波処理によって抽出した成分を DMSO 溶媒に溶かして実験に用いた。培養細胞は、ヒト気管支上皮細胞 BEAS-2B を使用し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変動を網羅的に解析した。Nrf2 の活性化およびその下流遺伝子群の発現誘導はリアルタイム PCR およびウエスタンブロットにて評価した。親電子物質応答配列 (EpRE) の転写活性化はルシフェラーゼ法にて測定した。

4. 研究成果

大気中揮発成分に対する細胞応答を調べるため、BEAS-2B 細胞において大気中揮発成

分を曝露し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変動を網羅的に解析した。BEAS-2B 細胞を大気中揮発成分 VP1 (2.68 m^3/m^3) に6時間曝露したところ、発現が2倍以上増加した遺伝子を81個、1/2以下に減少した遺伝子を42個検出した。増加及び減少した遺伝子群はエネルギー代謝やシグナル伝達に関わる遺伝子などあったが、中でも4倍以上発現が上昇した26個の遺伝子のうち、4個が解毒代謝酵素及び抗酸化酵素であった。これらの遺伝子は転写因子 Nrf2 の下流遺伝子であることが報告されており、大気中揮発成分に対する主要な細胞応答系の1つとして転写因子 Nrf2 を介した経路の活性化が考えられた。実際、大気中揮発成分が BEAS-2B 細胞において転写因子 Nrf2 を活性化して EpRE の転写活性を促進させ、下流タンパク質であるヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1)、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCLM) 及びシスチントランスポーター (xCT) を誘導することを明らかにした。更に、グルタチオンのチオール基が持つ求核性を利用して Nrf2 の活性化及び HO-1 の誘導が親電子物質によるものかを検討したところ、グルタチオン前処理により大気中揮発成分による Nrf2 の活性化及び HO-1 の発現誘導が抑えられた。一連の結果は、大気中揮発成分に含まれる親電子物質が Keap1/Nrf2 システムを介した生体防御能の上昇に起因している可能性を示唆している。本研究では当該親電子物質の同定までには至っていないが、大気中に含まれる親電子物質の候補としては、 α 、 β -不飽和カルボニル基を持つキノン系化合物などが挙げられる。

通常、大気汚染による呼吸器疾患においては、NF- κ B や炎症性サイトカイン、ケモカインなどの発現が亢進し、肺の炎症が引き起こされることが問題となる。実際、ディーゼル排出微粒子は NF- κ B の活性化を介してインターロイキン-8 (IL-8) 等の炎症性サイトカインの発現を亢進することは数多くの報告から明白である。しかし、本研究のマイクロアレイの結果から、大気中揮発成分による IL-8 のような炎症作用を持つ因子の誘導は認められなかった。今回の条件において大気中揮発成分は有害性が低く、良好な Nrf2 活性化因子であることを示唆している。大気中揮発成分により誘導される HO-1 は、抗酸化作用や抗アポトーシス作用、抗炎症作用を有している。そのため、大気中揮発成分は、HO-1 の誘導を介して粒子成分の有害性を抑制すると考えられる。つまり、通常生体は大気中揮発成分と粒子成分の両方に曝露されてい

るが、その毒性の収支バランス（解毒応答作用と毒性発現作用）が釣り合い、排気ガスによる健康障害が抑えられている可能性がある。以上より、大気中揮発成分に含まれる親電子物質が生体防御遺伝子群を誘導することが明らかとなった。本成果により、生体が不可避な大気汚染の中で、どのように恒常性を維持しているかを解明する一助となることが期待される。

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9件）

- 1) Koizumi R, Taguchi K, Hisamori M, Kumagai Y. Interaction of 9,10-phenanthraquinone with dithiol causes oxidative modification of Cu,Znsuperoxide dismutase (SOD) through redox cycling. *Journal of Toxicological Sciences*, 38: 317-324, 2013. 査読有.
DOI: org/10.2131/jts.38.317
- 2) Hirose R, Miura T, Sha R, Shinkai Y, Tanaka-Kagawa T, Kumagai Y. A method for detecting covalent modification of sensor proteins associated with 1,4-naphthoquinone-induced activation of electrophilic signal transduction pathways. *Journal of Toxicological Sciences*, 37: 891-898, 2012. 査読有.
DOI: 10.2131/jts.37.891
- 3) Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52: 221-247, 2012. 査読有.
DOI:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517.
- 4) Takayama N, Iwamoto N, Sumi D, Shinkai Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Kumagai Y. Peroxiredoxin 6 is a molecular target for 1,2-naphthoquinone, an atmospheric electrophile, in human pulmonary epithelial A549 cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 36: 817-821, 2011. 査読有.
DOI: 10.2131/jts.36.817
- 5) Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, Kumagai Y. Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chemical Research in Toxicology*, 24: 559-567, 2011. 査読有.
DOI: 10.1021/tx100427p.
- 6) Inoue K, Koike E, Endo A, Sumi D, Kumagai Y, Hayakawa K, Kiyono M, Tanaka M, Takano H. Diesel exhaust particles induce a Th2 phenotype in mouse naive mononuclear cells in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1: 761-767, 2010. 査読有.
DOI: 10.3892/etm.2010.129
- 7) Eiguren-Fernandez A, Shinyashiki M, Schmitz DA, Distefano E, Hinds W, Kumagai Y, Cho AK, Froines JR. Redox and electrophilic properties of vapor- and particle-phase components of ambient aerosols. *Environmental Research*, 110: 207-212, 2010. 査読有.
DOI: 10.1016/j.envres.2010.01.009.
- 8) Iwamoto N, Nishiyama A, Eiguren-Fernandez A, Hinds W, Kumagai Y, Froines JR, Cho AK, Shinyashiki M. Biochemical and cellular effects of electrophiles present in ambient air samples. *Atmospheric Environment*, 44: 1483-1489, 2010. 査読有.
DOI: 10.1016/j.atmosenv.2010.01.045
- 9) Teles AM, Kumagai Y, Brain SD, Teixeira SA, Varriano AA, Barreto MA, de Lima WT, Antunes E, Muscará MN, Costa SK. Involvement of sensory nerves and TRPV1 receptors in the rat airway inflammatory response to two environment pollutants: diesel exhaust particles (DEP) and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). *Archives of Toxicology*, 84: 109-117, 2010. 査読有.
DOI: 10.1007/s00204-009-0427-x.

〔学会発表〕（計5件）

- 1) Sha R, Shinkai Y, Kumagai Y. Activation of Heat Shock Response during exposure of human epithelial A431 cells to an environmental

- electrophile, 1,4-naphthoquinone. 第12回分子予防環境医学研究会, 2013年2月2日, つくば
- 2) 熊谷嘉人. 環境中親電子物質によるタンパク質の化学修飾とそれに対する応答戦略. 第39回日本毒性学会学術年会シンポジウム, 2012年07月19日, 仙台 (招待講演)
 - 3) Kumagai Y. Invasion of environmental electrophiles into cells, resulting in a modulation of cellular signal transduction pathways. UK-Japan Research Symposium. Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, 2012年4月7日, つくば (招待講演)
 - 4) 熊谷嘉人. 大気中親電子物質:タンパク質の化学修飾を介した有害反応とそれに対する生体側の防御戦略. 日本自動車研究所講演会, 2011年11月25日, 東京 (招待講演)
 - 5) 熊谷嘉人. 環境中親電子物質に対する生体応答およびリスク軽減戦略. 第4回エコファーマシンポジウム, 2011年2月8日, 熊本 (招待講演)

[図書] (計1件)

- 1) 熊谷嘉人. 本の泉社, 改定版分子予防環境医学, 576 - 583, 2010

[その他]

ホームページ等

http://www.md.tsukuba.ac.jp/environmental_medicine/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 嘉人 (KUMAGAI YOSHITO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 00250100

(2) 研究分担者

新開 泰弘 (SHINKAI YASUHIRO)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号: 10454240