

大気汚染肺傷害の予防法確立を目指した
納豆ポリペプチドの機能解析

武藏野大学薬学部 生命分析化学研究室
田中 健一郎

1. 研究背景、目的

本研究は、世界中で拡大する大気汚染による健康被害の予防法確立を目指して、 γ -ポリグルタミン酸 (PGA) の機能解析を実施する研究である。大気中に存在する PM2.5 などの大気汚染物質は、酸化ストレス (活性酸素: ROS) を介した肺胞上皮細胞傷害や炎症反応を惹起することにより肺傷害を誘発する (1, 2)。また、大気汚染が他の呼吸器疾患 [慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) など] を増悪させることも大きな問題となっているため (3, 4)、予防法の確立が急務である。一方、PGA は、納豆のネバネバの主成分である。PGA は、保湿作用・ミネラル吸収促進作用・血糖値降下作用など様々な生理活性作用を有する事が報告されているが、大気汚染肺傷害に対する有効性を示した研究はこれまでにない。

そこで、本研究では、納豆のネバネバの主成分である PGA を用いて、大気汚染肺傷害の新たな予防法を提唱する事を目的として実施した。具体的には、①大気汚染肺傷害モデルに対する PGA の有効性、及び②活性酸素、好中球炎症、線維化に着目して、PGA が有効性を発揮する分子機構を解明する事を当初の目的として研究を実施した。

2. 研究の特色・意義

世界の大気汚染による年間死者数 (約 880 万人) が喫煙による死者数を上回ったことが報告され、大気汚染による健康被害 (特に呼吸器や循環器) に対する注目が上昇している (5, 6)。また、大気汚染による健康被害を減らすことは、持続可能な開発目標 (SDGs) にも掲げられているが、大気汚染による健康被害を予防する方法は確立されていないため、解決策を提案することは急務である。

上述の通り、大気汚染による健康被害の予防法確立は急務であるが、大気汚染による健康被害を評価する方法が確立されていなかった。そこで、研究代表者は、大気汚染物質により最初に傷害を受ける肺に着目し、*in vivo*、及び *in vitro* の大気汚染肺傷害モデルを確立した (2, 7)。その結果、国内大手の食品企業から高い評価を受け、本モデルを用いて、種々の食品成分を用いた共同研究を進めている (2, 7)。したがって、本研究目的が達成できれば、「大気汚染の健康被害を予防できるサプリメントの開発」、あるいは「納豆の新たな機能性提唱」に繋がる可能性が高いと考えた。

3. 方法

(1) 実験材料

都市大気粉塵は国立環境研究所より購入した (8)。PGA、及び ROS を測定するための化学発光試薬 (L-012) は

Fujifilm Wako Pure Chemical 社から購入した。RNA 合成キットは Nippon Genetics 社、PrimeScriptTM RT master mix (Perfect Real Time) は Takara Bio 社、THUNDERBIRD[®] Next SYBR[®] qPCR mix は Toyobo 社から購入した。その他の試薬の入手先の詳細は、以下の引用文献に記載した (9)。

(2) 使用動物

ICR 系統マウス (雄性 6-7 週齢) は Charles River Japan より購入した。マウスは、制御された部屋 (温度、22°C; 湿度、55%±5%) で 12 時間の明暗サイクルの下で飼育し、飼料 (MF、オリエンタル酵母工業、東京、日本) を与え、水を自由飲水させた。実験には 8-10 週齢のマウスを使用した。動物実験は武藏野大学動物実験委員会の承認のもと実施した。

(3) 大気汚染肺傷害モデルの作成

イソフルラン麻酔下で、都市大気粉塵 (1 mg/mouse) を P200 マイクロピペットを用いて経気道投与した。24 時間後、気管から金属管を挿入し、50 units/mL ヘパリンを含む 1 mL 減菌生理食塩水で肺を 2 回洗浄することにより気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取した。各マウスから約 1.8 mL の BALF を回収し、BALF 中の総細胞数を血球計数板で計数した。Cytospin4[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で遠心分離後、Diff-Quik 試薬で染色し、全細胞数に対する好中球の比率を測定した。BALF 中に存在するタンパク質の量は、Bradford 法 (Takara Bio 社) を用いて評価した。

(4) マウスでの ROS 測定

マウスにおける ROS の *in vivo* イメージングは、既報の通り行った (2, 10, 11)。FUSION 化学発光イメージングシステム (Vilber Lourmat, Collégien, France) を使用した。L-012 を減菌生理食塩水 (75 mg/kg) に溶解し、大気粉塵投与 24 時間後にマウスに皮下投与した。L-012 投与 15 分後にマウスを安楽死させ、速やかに肺を摘出して撮影した。

化学発光強度は、FUSION 化学発光イメージングシステムに付属のソフトウェアを使用して解析した。

(5) リアルタイム PCR 法

Total RNA は、RNeasy キット (Qiagen 社) を用いて、肺組織から抽出した。PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis kit、THUNDERBIRD® Next SYBR qPCR Mix、CFX96™ Real-time system (Bio-Rad 社) を用いてリアルタイム RT-PCR を実施した。内部標準として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を使用した。プライマーは Primer3、あるいは Primer-BLAST を使用して設計した。

(6) 統計学的解析

すべての値は平均値±S.E.M.で表した。統計解析には、Mac 統計解析 Ver.3.0 (エスミ社) を用い、Dunnett's test、あるいは Student's unpaired t-test を適応した。P < 0.05 の時、有意であると判定した。

3. 結果

3.1. 大気汚染肺傷害に対する PGA の効果

ICR マウスに大気粉塵 (UA) を経気道投与する事により、BALF 中の炎症性細胞数の著しい増加が見られた。一

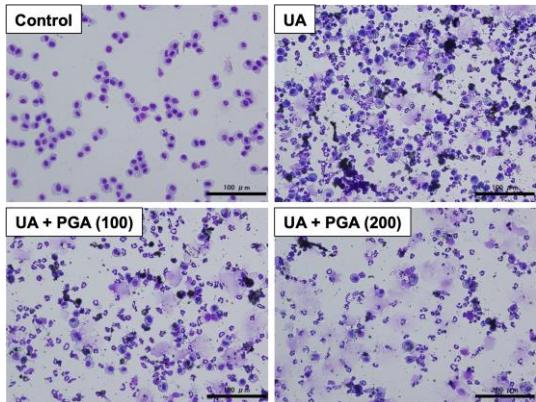


図 1 大気汚染肺傷害に対する PGA の効果 (BALF 写真)

ICR マウスに PGA (0-200 mg/kg) を腹腔内投与した 1 時間後に、大気粉塵 (UA, 1 mg/mouse) 経気道投与した。24 時間後に BALF を回収し、スライドガラスに貼り付け、ディフクイック染色を行い、顕微鏡で撮影した。

方、PGA 前投与により、PGA の用量依存的に炎症性細胞数の増加が顕著に抑制された (図 1)。また、血球計数板を用いて、BALF 中の炎症性細胞数を測定した場合においても、Control 群 (生理食塩水投与) よりも大気粉塵を投与した群において、全炎症性細胞数が有意に増加した。一方、PGA はこの増加を有意に抑制した (図 2)。

さらに、ディフクイック染色を行なった結果、大気粉塵投与依存に急性炎症の指標である好中球が有意に増加し、その増加が PGA 前投与によって、顕著に抑制されることを見出した (図 2)。

BALF 中のタンパク量、及び dsDNA 量の増加は、炎症

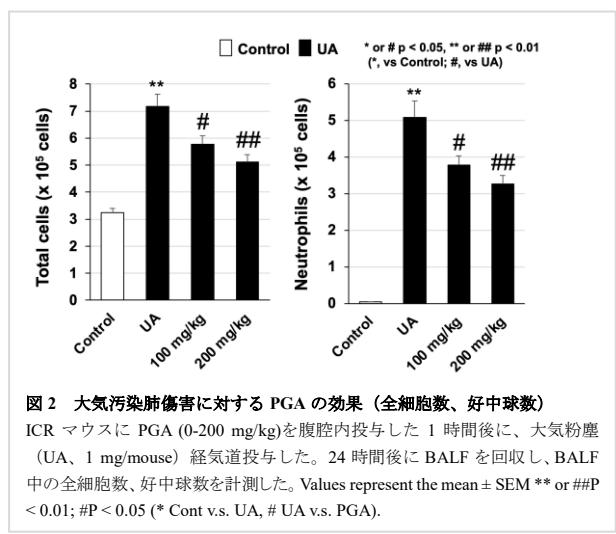


図 2 大気汚染肺傷害に対する PGA の効果 (全細胞数、好中球数)

ICR マウスに PGA (0-200 mg/kg) を腹腔内投与した 1 時間後に、大気粉塵 (UA, 1 mg/mouse) 経気道投与した。24 時間後に BALF を回収し、BALF 中の全細胞数、好中球数を計測した。Values represent the mean \pm SEM ** or #P < 0.05 (* Cont v.s. UA, # UA v.s. PGA).

程度を示す指標として知られている。そこで、これらの量を解析した結果、大気粉塵依存に BALF 中のタンパク量、及び dsDNA 量が有意に増加したが、PGA を前投与する事により、この増加が顕著に抑制された (図 3)。以上の結果 (図 1-3) から、PGA は大気汚染肺傷害に対して有効性を発揮する事が示唆された。

3.2 大気粉塵による ROS 産生に対する PGA の効果

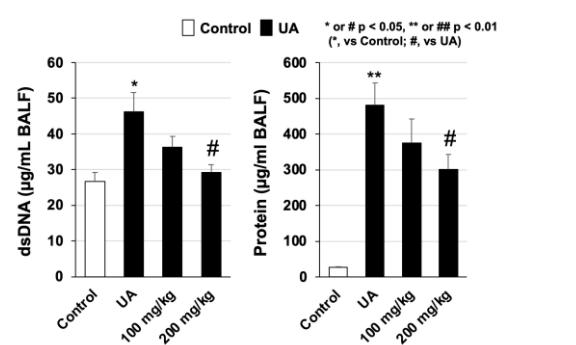


図 3 大気汚染肺傷害に対する PGA の効果 (タンパク量、dsDNA 量)

ICR マウスに PGA (0-200 mg/kg) を腹腔内投与した 1 時間後に、大気粉塵 (UA, 1 mg/mouse) 経気道投与した。24 時間後に BALF を回収した。Bradford 試薬を用いて、BALF 中のタンパク定量を行った。dsDNA は Thermo Scientific™ NanoDrop Lite を用いて行った。Values represent the mean \pm SEM **P < 0.01; * or #P < 0.05 (* Cont v.s. UA, # UA v.s. PGA).

これまでの解析から、大気中に存在する PM2.5 などの大気汚染物質は、ROS を介した肺胞上皮細胞傷害や炎症反応を惹起することにより肺傷害を誘発する事が報告されている (12, 13)。そこで、本モデルでの肺組織における ROS 産生を、*in vivo imaging system* を用いて解析した。大気粉塵の投与により肺組織における ROS 産生が見られたが、PGA (200 mg/kg) を前投与した場合でもその ROS 産生

に対する顕著な抑制効果は見られなかった。次に、RAW 細胞を用いて細胞実験系での ROS 産生を解析した(図 4A)。大気粉塵の処置によって、RAW 細胞における ROS 産生は 1 時間後、24 時間後のいずれの場合も見られたが、PGA 前処置による抑制効果はほとんど見られなかった(図 4B)。以上の結果から、PGA は ROS 産生抑制効果(抗酸化作用)とは異なる機構を介して、大気汚染肺傷害を抑制する可能性が示唆された。

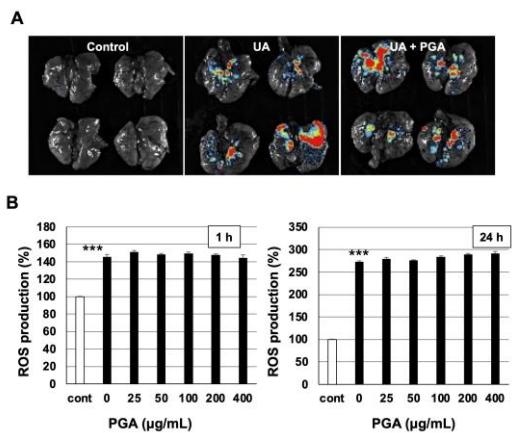


図 4. 大気粉塵依存の ROS 産生に対する PGA の効果

(A) ICR マウスに PGA (200 mg/kg)を腹腔内投与した 1 時間後に、大気粉塵 (UA, 1 mg/mouse) 経気道投与した。24 時間後に、L-012 (化学発光試薬) を皮下投与し、15 分後に肺を摘出した。摘出した肺を FUSION 化学発光イメージングシステムで撮影した。(B) RAW264 細胞に PGA (25-400 μg/mL) を処置した直後に、大気粉塵 (30 μg/cm²) を処置し、1h 後、24h 後の ROS 産生を測定した。Values represent the mean ± SEM ***P < 0.001 (* Cont v.s. UA).

3.3. 大気粉塵による炎症反応に対する PGA の効果

大気中に存在する PM2.5 などの大気汚染物質は、炎症反応において中心的な役割を担う nuclear factor kappa-B (NF- κ B)の活性化を介して、種々の炎症性サイトカイン産生を亢進する事が報告されている (14, 15)。そこで、大気粉塵依存の種々の炎症性サイトカイン発現上昇に対する PGA の有効性をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。その結果、主要なサイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6、及び好中球遊走を促進するケモカインである keratinocyte-derived chemokines (KC), macrophage inflammatory protein 2 (MIP2) の発現は、大気粉塵の投与により有意に上昇した。一方、PGA (200 mg/kg) を前投与した群では、それらの炎症性サイトカイン、ケモカインの発現上昇が抑制される傾向が見られた(図 5)。本研究の解析のみでは完全に証明することは出来ていないため、PGA が大気粉塵による炎症反応を抑制する作用を介して、大気汚染肺傷害を抑制している可能性について更に解析したい。また、その抑制機構についても NF- κ B の活性化に焦点を当てて、解析を行いたい。

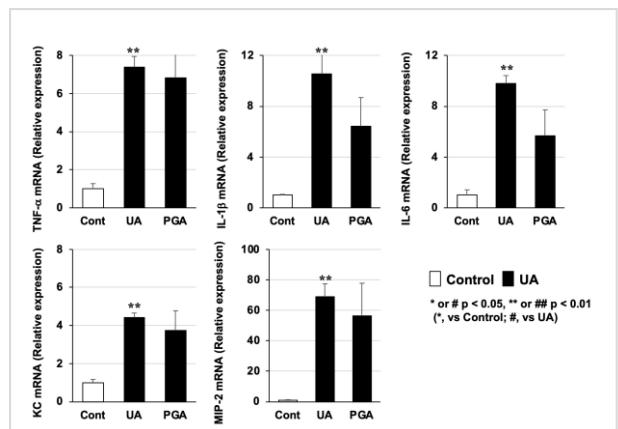


図 5. 大気汚染肺傷害に対する PGA の効果 (炎症性サイトカイン発現)

ICR マウスに PGA (0-200 mg/kg)を腹腔内投与した 1 時間後に、大気粉塵 (UA, 1 mg/mouse) 経気道投与した。5 時間後に肺組織を回収し、Total RNA を抽出し、各遺伝子の特異的プライマーを用いてリアルタイム RT-PCR を行なった。GAPDH 遺伝子発現を内部標準として用いた。Values represent the mean ± SEM **P < 0.01 (* Cont v.s. UA).

4. まとめと考察

本研究では、独自の大気汚染肺傷害モデルを用いた解析から、納豆のネバネバの主成分である PGA が大気粉塵依存の BALF 中炎症性細胞の増加を顕著に抑制することを明らかにした。さらに、リアルタイム RT-PCR 法での解析から、PGA がマウス肺において大気粉塵依存の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現上昇を抑制する事を明らかにした。本研究は、大気汚染肺傷害に対して PGA が保護作用を有する事を証明した初めての研究である。

前述の通り、2023 年度の解析においては、大気粉塵の単回投与での急性肺傷害に対して、PGA が有効性を示す可能性を見出した。一方、大気汚染肺傷害の予防法としての臨床応用を想定すると、大気粉塵に長期間暴露された場合の肺傷害や大気汚染による他の呼吸器疾患の重症化を想定した場合の肺傷害に対する PGA の機能解析が重要である。これまでに代表者は、大気粉塵を長時間暴露した時に呼吸機能が低下するモデルや、大気粉塵の前処置によりリポ多糖 (LPS) 依存の急性肺傷害が増悪するモデルを確立しているので、今後はこれらのモデルを用いて PGA の有効性検討を実施したいと考えている。

また、PGA が大気粉塵依存の大気粉塵依存の好中球数の増加を抑制する事を見出した。一方、好中球炎症の増悪は種々の疾患の発症に寄与する事が知られており、好中球が自身の DNA を細胞外へ放出して好中球細胞外トラップ (NETs) を形成する事も報告されている (16, 17)。また、大気粉塵が肺胞上皮細胞の細胞死を誘導する事により、肺傷害を誘発する事なども知られている (18)。そこで、今後は、好中球炎症や肺胞上皮細胞の細胞死誘導に着目した *in vivo*、及び *in vitro* の解析を実施したい。

また、今回の解析では、納豆のネバネバの主成分である

PGA に着目した解析を行なったが、納豆には種々のビタミン、ナットウキナーゼ、イソフラボンなどの他の成分も含まれている。また、これらの成分の中には、抗酸化作用や抗炎症作用など、大気汚染による健康被害を予防するとのできる可能性があるものが多く存在する。そのため、今後は、PGA だけではなく、その他の成分に関しても、大気汚染肺傷害モデルに対する有効性解析を実施したいと考えている。また、種々の成分を組み合わせた場合の有効性を解析することも、納豆の新たな機能性を提唱することに繋がると考えている。最終的に、本研究成果を元に「大気汚染による健康被害を予防できる食品・サプリメントの開発」という目標を達成し、多くの人の命を救うことに貢献したい。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 タカノ農芸化学研究助成財団より 2023 年度 研究助成のご支援を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

1. Li J, Li H, Li H, Guo W, An Z, Zeng X, et al. Amelioration of PM2.5-induced lung toxicity in rats by nutritional supplementation with fish oil and Vitamin E. *Respir Res.* 2019;20(1):76.
2. Tanaka KI, Kubota M, Shimoda M, Hayase T, Miyaguchi M, Kobayashi N, et al. Thioredoxin-albumin fusion protein prevents urban aerosol-induced lung injury via suppressing oxidative stress-related neutrophil extracellular trap formation. *Environ Pollut.* 2021;268(Pt A):115787.
3. Li J, Sun S, Tang R, Qiu H, Huang Q, Mason TG, et al. Major air pollutants and risk of COPD exacerbations: a systematic review and meta-analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;11:3079-91.
4. Scibor M, Balcerzak B, Galbacyk A, Jasienska G. Associations between Daily Ambient Air Pollution and Pulmonary Function, Asthma Symptom Occurrence, and Quick-Relief Inhaler Use among Asthma Patients. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(8).
5. Lelieveld J, Klimm K, Pozzer A, Poschl U, Fnais M, Daiber A, et al. Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions. *Eur Heart J.* 2019;40(20):1590-6.
6. Losacco C, Perillo A. Particulate matter air pollution and respiratory impact on humans and animals. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25(34):33901-10.
7. Tanaka KI, Nakaguchi S, Shiota S, Nakada Y, Oyama K, Sakakibara O, et al. Preventive Effect of Epigallocatechin Gallate, the Main Component of Green Tea, on Acute Lung Injury Caused by Air Pollutants. *Biomolecules.* 2022;12(9).
8. Mori I, Sun Z, Ukachi M, Nagano K, McLeod CW, Cox AG, et al. Development and certification of the new NIES CRM 28: urban aerosols for the determination of multielements. *Anal Bioanal Chem.* 2008;391(6):1997-2003.
9. Tanaka KI, Shimoda M, Sugizaki T, Ikeda M, Takafuji A, Kawahara M, et al. Therapeutic effects of eperisone on pulmonary fibrosis via preferential suppression of fibroblast activity. *Cell Death Discov.* 2022;8(1):52.
10. Tanaka KI, Shiota S, Sakakibara O, Shimoda M, Takafuji A, Takabatake M, et al. Exacerbation of Elastase-Induced Emphysema via Increased Oxidative Stress in Metallothionein-Knockout Mice. *Biomolecules.* 2022;12(4).
11. Tanaka KI, Shimoda M, Kubota M, Takafuji A, Kawahara M, Mizushima T. Novel pharmacological effects of lecithinized superoxide dismutase on ischemia/reperfusion injury in the kidneys of mice. *Life Sci.* 2022;288:120164.
12. Zhang H, Xue L, Li B, Tian H, Zhang Z, Tao S. Therapeutic potential of bixin in PM2.5 particles-induced lung injury in an Nrf2-dependent manner. *Free Radic Biol Med.* 2018;126:166-76.
13. Li R, Kou X, Xie L, Cheng F, Geng H. Effects of ambient PM2.5 on pathological injury, inflammation, oxidative stress, metabolic enzyme activity, and expression of c-fos and c-jun in lungs of rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015;22(24):20167-76.
14. Fu H, Liu X, Li W, Zu Y, Zhou F, Shou Q, et al. PM2.5 Exposure Induces Inflammatory Response in Macrophages via the TLR4/COX-2/NF-κB Pathway. *Inflammation.* 2020;43(5):1948-58.
15. He M, Ichinose T, Yoshida S, Ito T, He C, Yoshida Y, et al. PM2.5-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells. *J Appl Toxicol.* 2017;37(10):1203-18.
16. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules.* 2015;5(2):702-23.
17. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hyperacetylation mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009;184(2):205-13.
18. Li J, Zhou Q, Liang Y, Pan W, Bei Y, Zhang Y, et al. miR-486 inhibits PM2.5-induced apoptosis and oxidative stress in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Ann Transl Med.* 2018;6(11):209.