

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21278

研究課題名(和文) AhRを介したアレルギー増悪に関わる多環芳香族化合物の探索とその作用機序の追跡

研究課題名(英文) The search for polycyclic aromatic compounds related to AhR-mediated exacerbation activity of allergy and the trace for their mode of action

研究代表者

三崎 健太郎 (Misaki, Kentaro)

静岡県立大学・看護学部・助教

研究者番号：40468591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大気汚染物質のアレルギー増悪作用に寄与する多環芳香族化合物の探索とその機構解明を目指し、タニ抗原との共曝露を、ヒト肺胞上皮細胞を用いて計34種の化合物に対して実施し、抗原単独曝露と比較して9,10-phenanthrenequinone、5,12-naphthacenequinone、3-nitrobenzanthroneにおけるIL-8の有意な増加、benzopyrenoneにおける有意な減少が認められ、これらの物質からAhRよりは活性酸素種との関連が強く予想された。血球T細胞におけるサイトカイン産生に対しても化合物曝露影響を検討してきたがアッセイ系の安定性も含めて今後の課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで DEP や大気浮遊粒子中のどの成分がアレルギー増悪効果により強く影響を与えるのか評価するような知見はほとんど明らかにされていない。今回は肺上皮細胞に対する実験を中心に実施したが、化学構造からアレルギー増悪物質に対する酸化ストレスなどの活性経路が予想され、生体防御システム解明への一助となりうる。さらに肺上皮細胞および他の免疫細胞に対する知見を蓄積することによって、国内外における大気環境汚染に伴うアレルギー疾患発症リスクの予測と低減に将来的につながっていくものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Aiming to elucidate polycyclic aromatic compounds contributing to the exacerbation activity of allergy in atmospheric pollutants and their mechanisms, IL-8 generation was examined in the co-exposure of each chemical with mite antigen to human alveolar epithelial cells for 34 compounds in total. The significant amplifying actions in IL-8 generation induced by mite antigen were found for 9,10-phenanthrenequinone, 5,12-naphthacenequinone and 3-nitrobenzanthrone, while the significant suppression action in IL-8 generation were observed for benzopyrenone. The chemical structures of these active compounds implicate the participation of reactive oxygen species rather than AhR in these actions. The exposure effect of compounds on cytokine generation in T lymphocytes has been also considered, however it became a future issue including assay system stability.

研究分野：環境毒性学

キーワード：多環芳香族化合物 アレルギー 上皮細胞 免疫応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 大都市圏の児童における喘息罹患数は年々増加する傾向があり、ディーゼル排気微粒子 (DEP) のアレルギー増悪作用への影響が指摘されており、昨今では中国の黄砂に含まれる内燃機関由来の大気浮遊粒子の寄与も懸念され始めている。本作用と、多環芳香族化合物類をリガンドとした芳香族炭化水素レセプター (AhR) や抗酸化応答等との関連性が示唆されており、AhR 活性の Th17 細胞、Treg 細胞等の生体防御反応への影響なども報告されている (N. Hao et al. *Biochem. Pharmacol.* 2013)。一方、DEP 中に含まれる含酸素多環芳香族炭化水素 (oxy-PAHs) である 1,2-naphthoquinone (NphQ) や 9,10-phenanthrenequinone (PhQ) がマウスにおいて、p38MAPK 等の酸化ストレス応答等を介して、抗原応答としての気道炎症を強く増悪することも指摘されている (K. Inoue et al. *Arch. Toxicol.* 2007)。しかし DEP 中の免疫系に強く影響する寄与物質は特定できておらず、またそれらの作用機序に対する詳細は未解明である。

(2) 本研究者は AhR 活性として、benzo[a]fluorenone (B[a]FO) 等の複数の oxy-PAHs が代表的な多環芳香族炭化水素 (PAHs) である benzo[a]pyrene (B[a]P) より少し弱い程度の活性をもつことを初めて見出し (K. Misaki et al. *Environ. Toxicol. Chem.* 2007)、ヒト肝臓ガン (HepG2) 細胞において AhR 経路や抗酸化剤応答配列を介して誘導される代謝酵素類 (CYPs, NQO1, AKR1C1) の mRNA 発現パターンが PAHs や oxy-PAHs の種類により異なることを見出した (K. Misaki et al. *Chem. Res. Toxicol.* 2007)。

### 2. 研究の目的

(1) 当初の目的では、特に AhR との関連が指摘されている T 細胞 (Th17、Treg 細胞等) に注目して、アレルギー増悪作用に大きく影響する多環芳香族化合物類と責任構造式の探索を目指したが、肺胞上皮ガン細胞 (A549 細胞) における探索に関する研究を中心に実施した。

(2) アレルギー増悪作用に関する遺伝子発現の経時変化を調べ、大きく影響する作用機序の追跡を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) アレルギー増悪作用物質の *in vitro* 系での探索と作用機序に対する考察

ヒト肺胞上皮細胞 (A549 細胞) を用いて、ディーゼル排気微粒子や大気浮遊粒子中に多く存在することが知られている PAHs や oxy-PAHs、nitro-PAHs に対しダニ抗原 (10 µg/mL) との共曝露における培養液上清中の IL-8 産生量に対する修飾作用 (増減) を ELISA 法によって調べた。これらの化合物に対して MTS assay を用いた細胞毒性試験も実施した。得られた活性化化合物に対して作用機序に対する考察を行った。

PAHs は 4 環の chrysene (Chr)、benzo[c]fluorene (B[c]Fl)、5 環の B[a]P、benzo[e]pyrene (B[e]P)、benzo[b]fluoranthene (B[b]FA)、benzo[k]fluoranthene (B[k]FA)、dibenz[a,h]anthracene (DB[a,h]A) の 7 種、oxy-PAHs はキノン類 (NphQ、PhQ、7,12-benz[a]anthracenequinone (BAQ)、5,12-naphthacenequinone (NCQ) と単環の benzoquinone (BQ))、ケトン類 (phenalenone (PhO)、benzanthrone (BAO)、B[a]FO、benzo[b]fluorenone (B[b]FO)、benzopyrenone (BPO)) に加え酸無水物 (naphthalic anhydride (NA) と単環の phthalic anhydride (PhA))、アルデヒド化合物 (2-fluorenealdehyde (2-FIAld)、9-anthracenealdehyde (9-AntAld)、9-phenanthrenealdehyde (9-PheAld)、1-pyrenealdehyde (1-PyAld))、カルボン酸 (1-fluorene-carboxylic acid (1-FICA)、9-anthracene-carboxylic acid (9-AntCA)、1-pyrene-carboxylic acid (1-PyCA)) の計 19 種類、nitro-PAHs は 3-nitrofluoranthene (3-NFA)、8-nitrofluoranthene (8-NFA)、1-nitropyrene (1-NPy)、1,3-dinitropyrene (1,3-DNPy)、1,6-dinitropyrene (1,6-DNPy)、1,8-dinitropyrene (1,8-DNPy)、6-nitrochrysene (6-NChr)、3-nitrobenzanthrone (3-NBAO) の 8 種を対象とした。

#### (2) アレルギー増悪作用に関する遺伝子発現の経時変化と作用機序に関する考察

A549 細胞において抗原単独曝露に対し、IL-8 のタンパク質レベル産生 (48 h) の増減が顕著であった物質 (NCQ、BPO) に対して 24 h での IL-8 の mRNA 発現を RT-PCR によって調べた。また比較として B[a]P に対しても測定し、IL-8 産生における発現機序を考察した。B[a]P では IL-6 についても mRNA 発現を調べ、IL-8 の発現と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) アレルギー増悪作用物質の *in vitro* 系での探索と作用機序に対する考察

A549 細胞を用いて IL-8 産生を強く誘導する化合物のスクリーニングを実施したが、系の再現性や細胞の接着性などにおいて安定性が得られなかったため、安定な検出系を得るため検出条件の検討を実施し、ペニシリン、ストレプトマイシンの抗生物質入りの DMEM 培地 (FBS10%入り) で継代培養後、穏やかな転倒混和によって抗生物質入り DMEM 培地 (FBS 不含) 中に細胞を分散させてから、24 ウェルコラーゲンコーティングプレート上に播種、1 日後にダニ抗原 (10 µg/mL) と各物質を細胞毒性の影響が少ない濃度で同時曝露させてから、48 h 後のタンパク質を測定する条件が最適であることが確認された。

代表的な 4、5 環の PAHs、7 種類、oxy-PAHs の中でも存在量の多いキノン類、ケトン類に加えて酸無水物、アルデヒド化合物、カルボン酸 (計 21 種類)、また nitro-PAHs、8 種を

対象としたが、抗原単独曝露と比較して再現性が良く有意差が認められたのは、PhQ (500 nM)、NCQ (5 μM) における増加、BPO (5 μM) における減少であった。3-NBAO (2 μM など) で有意に顕著な増加が新たに認められたが、3-NBAO 単独でも増加傾向がありそれをさらに増加させる結果となった (図 1、図 2)。

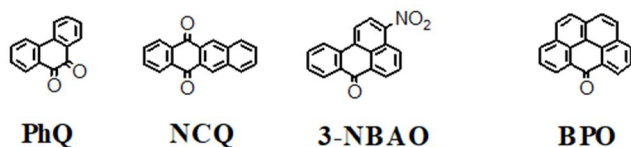


図1. IL-8産生増悪および抑制活性が認められた多環芳香族化合物 (BPOは抑制活性、それ以外は増悪活性が認められた。)

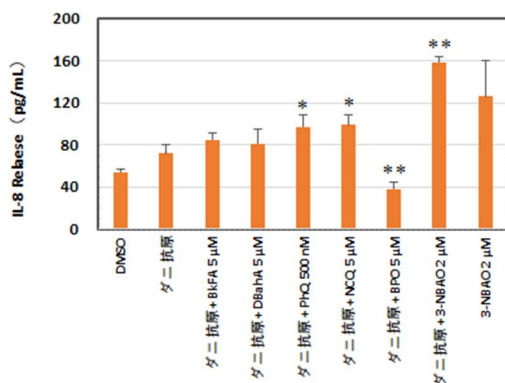


図2. 多環芳香族化合物によるIL-8産生修飾作用 (\*\*  $p < 0.01$ 、\*は  $p < 0.05$ で抗原単独と比較してt検定において有意差が認められた。)

ヒト肺上皮細胞における構成成分の単独曝露の報告は限られているが、IL-8などの炎症性サイトカインのタンパク質レベルの24 hでの産生について、controlと比較してB[a]Pが抑制、nitro-PAHsが誘導するなどの報告がされている(Øvrevik et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010; Øvrevik et al., *Toxicology* 2009)。ヒト肺胞上皮ガン細胞(A549細胞)は感度の低い細胞であることが指摘されているが、本研究において活性の変動が顕著に見られた物質は他の上皮細胞に対してより大きな影響を与えることが予想された。AhR活性物質として知られているChr、B[b]FA、B[k]FA、DB[a,h]A、BAQ、B[a]FO、B[b]FOに対しては顕著な変動が認められず、NCQでは変動が見られた。PhQ、NCQ、3-NBAOは様々な細胞における既知研究から活性酸素種(ROS)や酸化ストレスとの関連性が予想された。BPOでは他の*in vitro*研究において抗AhR活性(CYP誘導の阻害)なども報告されているため(K. Misaki et al. *Chem. Res. Toxicol.* 2007)、本研究で見られたIL-8産生抑制と共通する遺伝子発現抑制機構があるかもしれない。

また、CCL5 (RANTES: regulated on activation, normally T-cell expressed and secreted)、他のサイトカイン(IL-6、IL-4、IL-5、IL-13、ICAM-1 (intercellular adhesion 1))についてもELISA法による評価を検討したが、いずれも検出限界以下であった。

免疫系の血球細胞(Foxp3を組み込んだTreg細胞様Jurkat細胞)に対する影響などについても、化合物曝露による影響を検討してきたが、細胞状態、再現性などアッセイ系の安定性も含めて途上の段階となった。AhRによるTreg細胞活性化も指摘されているため、抗AhR活性によるTreg細胞抑制などを介したアレルギー影響などの可能性について調べていくことが課題である。

#### (2) アレルギー増悪作用に関する遺伝子発現の経時変化と作用機序に関する考察

さらにIL-8のRNAレベルでの変動を調べたところ、NCQとの抗原同時曝露24 h後で、5 μMで抗原単独よりも約1.5倍増大、また500 nMで抗原単独よりも約2倍増大する傾向が認められた。一方、BPOについては抗原同時曝露24 h後で、5 μM、500 nM共に抗原単独よりも半分よりも少なく減少する傾向が認められた(図3)。またB[a]PについてはIL-8、IL-6どちらも12 h、24 hいずれも抗原単独曝露と比べて変動が少ない傾向が認められた。

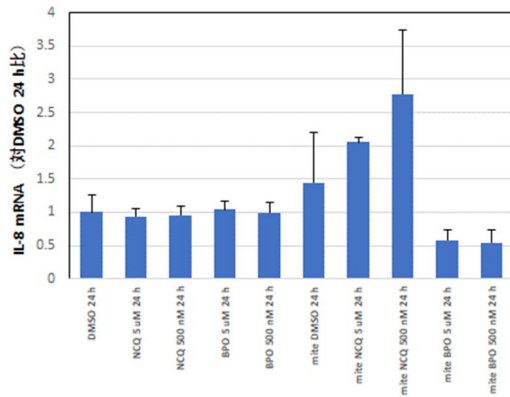


図3. 多環芳香族化合物によるIL-8 mRNA産生への影響

曝露 24 h 後の IL-8 mRNA と 48 h 後の IL-8 タンパク質誘導について、今回調べた物質については同じような傾向を認めたが、他の物質も含めて、mRNA 産生における最適曝露時間やタンパク質レベルでの誘導との関連性について、今後さらに調べる必要がある。IL-8 産生への修飾作用に関わる物質そのものが酸化ストレスや NF- $\kappa$ B などを経ることが予想されるが、今後、各種阻害剤による効果などを調べて作用機構を明らかにしていきたい。

今回、*in vitro* 系で見出した活性物質に対する *in vivo* での影響評価については未実施となったが、上皮系細胞において複数の多環芳香族化合物がアレルギー応答に対して活性を増加させることを IL-8 のタンパク質および RNA 発現の増減によって認めることができたので、その作用機構、また血球細胞を使った知見を蓄積して、アレルギー増悪活性に関わる化合物のさらなる探索および各化合物の活性プロファイルを明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三崎健太郎, 高野裕久, 金澤寛明, 井上健一郎	4. 巻 19
2. 論文標題 DEP、ナノマテリアルによる細菌毒素誘発性肺傷害への悪影響	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 エンドトキシン・自然免疫研究	6. 最初と最後の頁 46-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三崎健太郎, 高野裕久, 金澤寛明, 井上健一郎
2. 発表標題 多環芳香族化合物の抗原応答修飾作用
3. 学会等名 第47回日本環境変異原学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三崎健太郎, 高野裕久, 大竹里沙, 土屋安那, 長谷川梓, 金澤寛明, 井上健一郎
2. 発表標題 肺胞上皮細胞におけるダニ抗原応答修飾に関わる多環芳香族化合物の探索
3. 学会等名 第26回環境化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 K. Misaki, H. Takano, H. Kanazawa, K. Inoue
2. 発表標題 Adverse Effects of DEP and Nanomaterials on Bacteria-Induced Pulmonary Disorder
3. 学会等名 The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----