

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591998

研究課題名（和文） 内分泌攪乱物質のアレルギー性鼻炎への影響

研究課題名（英文） Influence on allergic rhinitis of the endocrine disruptor

研究代表者

山本 英之（YAMAMOTO HIDEYUKI）

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50345691

研究成果の概要（和文）：内分泌攪乱物質のアレルギー性鼻炎への関与につき IgE 産生系を用い検討した。物質により差はあるものの、内分泌攪乱物質には低用量効果として IgE 産生亢進に関与することが判明した。また、その反応には個体差があることが分かった。環境化学物質代謝に関わる遺伝子 CYP1A1 の遺伝子多型と成人スギ花粉症発症との有意な相関を認めた。血管新生因子(PD-ECGF)が IgE 産生を増強することがわかった。PD-ECGF の阻害剤である TPI が、IgE に関わるアレルギー疾患に対する有力な治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：I examined it with IgE production culture system of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) about the influence on allergic rhinitis of the endocrine disruptor. It became clear, although there is the difference by a material, that the endocrine disruptor was proved IgE production enhancement as a low-dose effect. In addition, I understood that there was individual difference in the reaction. I accepted a meaningful correlation of SNP and adult cedar pollinosis onset of gene CYP1A1 about environmental chemical substance metabolism. Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), also known as thymidine phosphorylase (TP) is a potent angiogenic factor. Our results suggest TP involvement in the enhancement of IgE production and suggest that Thymidine phosphorylase inhibitor (TPI) might be a novel strategy against IgE-related allergic disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻科学

## 1. 研究開始当初の背景

(1)我々人類を取り巻く生活・自然環境は、

この1世紀で劇的に変化してきており、そのスピードは加速度的に進行している。近い将

来、気候変動が制御不能となる危機的事態も十分に予想され、環境因子が我々の健康に及ぼす影響を知り、対策をたてることは人類の生存という観点からも急務であるといえる。

生体に影響を及ぼす環境因子として、温暖化に伴う動植物相の変化や病原体の流行時期の変化、清潔概念の普及に伴う無菌的環境、化学工業の発達に伴う内分泌攪乱物質の生活環境への流出などがあげられる。そして、これらの因子はヒトの免疫系にも作用すると考えられる。

一方、耳鼻咽喉科領域に目をむけると、近年アレルギー性鼻炎の罹患率は増加の一途をたどっている。10年前までは国民の5人に1人の割合で罹患しているといわれていたが、最近では都市部の若年者にいたっては5人に4人は抗原感作している状況になっている。アレルギー疾患の成立において、遺伝的素因に加え環境(外的)因子が大きく影響することが知られており、近年の環境の変化がアレルギー性鼻炎の罹患率の増加に関係している可能性は大きい。

(2)アレルギー性鼻炎の病態成立には感染による自然免疫の獲得の有無が大きな役割を果たすことが近年明らかになった。しかし、それ以外の環境因子として我々は、ここ数十年で大量に環境に放出された内分泌攪乱物質の暴露が関係するのではないかと考え研究を行ってきた。その結果ビスフェノール A など数種類の内分泌攪乱物質がヒト末梢血単核球からの IgE 産生を亢進させる可能性が示唆された。また DDT やポリ塩化ビフェニール (PCB) などの内分泌攪乱作用を持つ有害化学物質が、喘息発作や花粉症を起こすアレルギー反応を強めるとの報告も肥満細胞を用いた系で報告されており、アレルギー性鼻炎の病態に内分泌攪乱物質が影響を及ぼすことは間違いないところである。そこで我々はどの内分泌攪乱物質がアレルギー症状を増悪させるのか。その遺伝的素因との関係はどうかにつき調べる。

(3)アレルギー疾患の増悪因子として最近注目されているのが黄砂である。黄砂は特にスギ花粉飛散時期に一致して飛散し、アジュバ

ンド効果としてアレルギー症状を増悪させる可能性がある。中国における最近の爆発的な経済発展の影響や砂漠化の拡大もあり、単なる自然現象を超えて黄砂が近隣諸国に健康被害をもたらすことが懸念されている。黄砂粒子の分析からは、土壌起源ではないと考えられるアンモニウムイオン、硫酸イオン、硝酸イオンなども検出され、輸送途中で人為起源の大気汚染物質を取り込んでいる可能性も示唆されている。

黄砂の構成成分の中の有害成分としてはミネラル粒子中の SiO<sub>2</sub>、β-glucan (カビの菌糸体成分)、LPS、前述の大気汚染物質と黄砂との反応生成物である硝酸イオンや硫酸イオンが指摘されている。すでに報告のあるマウスを用いた実験では、黄砂にダニ抗原あるいは卵白抗原をミックスして投与すると、抗原を単独投与した場合よりも遥かにアレルギー炎症の悪化が見られ、抗原特異的-IgE や IgG1 抗体にも増加が見られたとのことである。これは黄砂の構成成分のいずれかがアジュバンド効果を持つためと考えられる。黄砂の構成成分の何がアジュバンド効果を持つのかを突き止める。

## 2. 研究の目的

(1) 内分泌攪乱物質に関する検討では、これまでビスフェノール A、ノニルフェノール、スチレンモノマー、ベンゾフェノンなど、代表的な内分泌攪乱物質につきヒト末梢血単核球からの IgE 産生への影響を調べてきた。しかし我々の実験では、すべてのケースで IgE 産生が亢進するわけではない。IgE 産生群と非産生群において遺伝的素因につき解析を行い遺伝子多型との相関を調べる。相関する遺伝子多型がどのような蛋白の発現に関与するかを同定し、その機能解析を行う。

(2) 黄砂に関する検討では、黄砂のアレルギー症状への影響をマウスを用い、スギ花粉抗原感作に黄砂による刺激を加えた環境モデルを作製し、気道からの IgE 産生への影響を検討する。さらに、ヒト末梢血単核球を用いた IgE 産生系に黄砂の構成成分である SiO<sub>2</sub>、β-glucan、LPS、硝酸イオンや硫酸イオンを加え、そのアジュバンド効果につき検討する。

(3)環境因子、特に内分泌攪乱物質のアレルギー性鼻炎への影響について分子生物学的・遺伝子学的解析を行い、その制御につき検討する。黄砂のアレルギー性鼻炎への影響についても、そのアジュバンド効果につき解明する。

しいては、近年の環境変化が及ぼすアレルギー疾患の増加への影響につき究明し、ヒトが今後環境の変化にどう対応していくべきであるかを考察する。将来的に地球環境の変化に耐えうる体質獲得のための遺伝子治療の基盤となる研究を目指す。また、黄砂の飛散を含めた環境問題への免疫学からのアプローチにより、その健康への影響において科学的根拠を示す。

### 3. 研究の方法

(1) 内分泌攪乱物質による IgE 産生亢進細胞のスクリーニング 健常者の末梢血から単核球を分離し、IL-4 と抗 CD40 抗体を加え培養した IgE 産生系にビスフェノール A、ノニルフェノール、スチレンモノマー、ベンゾフェノンなどの内分泌攪乱物質を各濃度で添加し培養した。2 週間後に上清を回収し、細胞外に放出された IgE を ELISA 法にて測定、IgE 産生量の変化を観察した。IgE 産生が 30% 以上亢進したものを内分泌攪乱物質による IgE 産生亢進陽性群、亢進しなかったものを陰性群とした。

(2) 内分泌攪乱物質によるアレルギーへの影響に関する遺伝子多型の解析 Ah (芳香族化合物) によって誘導される酸化ストレス関連遺伝子 CYP1A1 (Cytochrom P450 1A1) の多型について症例対照相関解析を行った。

スギ花粉症患者約 600 人、対照群役 300 人において genotyping を行い相関解析を行った。

(3) アレルギー性鼻炎と血管新生因子の相関 PBMC に IL-4 と抗 CD40 抗体を加え培養した IgE 産生系に VEGF、PD-ECGF を加え IgE 量を ELISA 法で測定した。B 細胞でも同様の検討を行った。PBMC、B 細胞を IL-4 と抗 CD40 抗体で刺激し PD-ECGF mRNA 発現、PD-ECGF たんぱく発現を観察した。次に、この IgE 産生

系に強力な PD-ECGF 阻害剤である TPI を加え、PD-ECGF 発現と IgE 産生量の変化を調べた。IL-4 シグナル伝達の転写制御因子である STAT6 のリン酸化への影響についても調べた。

### 4. 研究成果

(1) 内分泌攪乱物質のアレルギー性鼻炎への関与につき IgE 産生系を用い検討した。健常者の末梢血から単核球を分離し、IL-4 と抗 CD40 抗体を加え培養した IgE 産生系に内分泌攪乱物質を各濃度で添加し培養した。上清を回収し、細胞外に放出された IgE を ELISA 法にて測定、IgE 産生量の変化を観察した。内分泌攪乱物質は我が国におけるリスクアセスメント対象品目からビスフェノール A、ノニルフェノール、スチレンモノマー、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、ジシクロヘキサフルタル酸、ジブチルフェノールの 7 品目を選定した。ビスフェノール A は約 31% で 20% 以上の IgE 産生亢進を認めた。IgE 産生は  $1 \times 10^{-8}$  M から  $10^{-9}$  M の低濃度で有意に亢進し、低用量効果としての内分泌攪乱物質の免疫系への関与が確認された。同様にノニルフェノールでは約 33% で IgE 産生亢進を認め、その用量は  $1 \times 10^{-8}$  M であった。スチレンモノマーでも約 40% で低濃度で IgE 産生亢進を認めた。4-ニトロトルエン、ジシクロヘキサフルタル酸、ジブチルフェノールでも約 20 から 30% で IgE 産生亢進を認めたが、ベンゾフェノンでは IgE 産生亢進は認めなかった。

物質により差はあるものの、内分泌攪乱物質には低用量効果として IgE 産生亢進に関与することが判明した。また、その反応には個体差があることが分かった。

(2) 自動車からの排気ガスなどに含まれるディーゼル排出粒子：DEP s (diesel exhaust particles) は酸化ストレスの惹起に関与し、IgE 産生の促進やアレルギー炎症の増強に働くことが報告されている。DEP s には多種の Ah (芳香族化合物) が吸収されている。Ah によって誘導される酸化ストレス関連遺伝子 CYP1A1 (Cytochrom P450 1A1) の多型について症例対照相関解析を行った。

日本人 12 人のゲノムスクリーニングによ

り、CYP1A1 領域に 9 つの SNPs を同定した。連鎖不平衡マップを作成し、3 つの Tag SNPs を選出した。スギ花粉症患者約 600 人、対照群 300 人において genotyping を行い相関解析を行った。

環境化学物質代謝に関わる CYP1A1 の Intron 1 における SNP と成人スギ花粉症発症との有意な相関を認めた。

(3) 内分泌攪乱物質はそのエストロゲン様作用により免疫系に影響を及ぼすことが知られている。エストロゲンは子宮内膜における生理的血管新生を誘導する。また、喫煙は内分泌攪乱物質による血管内皮の非生理的血管新生を誘導する。このように内分泌攪乱物質と血管新生因子は深い相関があるが、アレルギー性鼻炎と血管新生因子の相関については明らかではない。そこで、血管新生因子(PD-ECGF)の PBMC (ヒト末梢血単核球)からの IgE 産生への影響につき検討した。

PBMC における IgE 産生系において、PD-ECGF は IgE 産生を有意に亢進した。VEGF、2DDR の刺激は IgE 産生に影響を与えなかった。PD-ECGF は B 細胞からの IgE 産生をわずかに亢進したが有意ではなかった。IL-4 と抗 CD40 抗体による刺激は、PBMC における PD-ECGF 発現を mRNA、蛋白共に誘導した。強力な PD-ECGF 阻害剤である TPI は IL-4 と抗 CD40 抗体刺激によって誘導される PD-ECGF 発現を抑制した。また、PBMC からの IgE 産生も濃度依存性に抑制した。TPI は B 細胞における STAT6 のリン酸化を抑制した。しかし、STAT6 活性化を阻害するとされる SOCS5、SOCS1 は誘導しなかった。

PD-ECGF、TP 活性は、PD-ECGF は IL-4 と抗 CD40 抗体のシグナルを増強すると考えられた。PD-ECGF/TP は IgE 産生を増強する。そしてその阻害剤である TPI が、IgE に関わるアレルギー疾患に対する有力な治療戦略となる可能性が示唆された。

## 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 3 件)

- ① Hideyuki Yamamoto, Takechiyo Yamada, Tetsuji Takabayashi, Hiroshi Sunaga, Myungmi Oh, Norihiko Narita, Akihiro Kojima, Shigeharu Fujieda, Platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase enhanced human IgE production, Allergology International, 査読有、60-1、2011、79-85.
- ② Hideyuki Yamamoto, Takechiyo Yamada, Seita Kubo, Yoko Osawa, Yuichi Kimura, Myonmi Oh, Dai Susuki, Tetsuji Takabayashi, Masayuki Okamoto, Shigeharu Fujieda. Efficacy of oral olopatadine hydrochloride for the treatment of seasonal allergic rhinitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. 査読有 31(4), 2010, 296-303
- ③ 山本英之、藤枝重治 :スギ花粉症患者の睡眠障害と QOL. アレルギーの臨床. 査読無、393 号、966-971、2009

[学会発表] (計 7 件)

- ① 山本英之、藤枝重治、窪誠太、坂下雅史、山田武千代: スギ花粉症におけるモンテルカスト初期療法の有用性の検討 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010.11.26 東京
- ② 山本英之、藤枝重治、山田武千代、窪誠太、坂下雅史: アレルギー性鼻炎における鼻噴霧用ステロイド薬モメタゾンフランカルボン酸の有効性と QOL に関する検討 第 49 回日本鼻科学会 2010.8.27 札幌
- ③ Hideyuki Yamamoto, Shigeharu Fujieda, Takechiyo Yamada, Seita Kubo, Yumi Ito. Efficacy of Mometasone Furoate Hydrate Nasal

Spray (MFNS) for the treatment of perennial allergic rhinitis. the 23rd ERS and the 29th ISIAN 2010.6.22 Geneva

- ④ Hideyuki Yamamoto, Shigeharu Fujieda, Takechiyo Yamada, Takehito Yamamoto, Yuchi Kimura, Hiroshi Sunaga, Yoko Osawa, Masayuki Okamoto, Seita Kubo, Myongmi Oh, Dai Susuki, Kazuhiro Ogi, Akihiro Kojima.  
Clinical efficacy and QOL assessment of olopatadine hydrochloride in the Japanese cedar pollinosis (JCP) Treatment. XIX WORLD CONGRESS OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 2009.6.3 São Paulo
- ⑤ 山本英之、藤枝重治、山田武千代、木村有二、大澤陽子、呉明美、窪誠太: スギ花粉症患者における第2世代抗ヒスタミン薬の鼻閉に対する効果と QOL 評価.  
日本耳鼻咽喉科学会第 110 回学術講演会 2009.5.16 東京
- ⑥ 山本英之、藤枝重治: 第2世代抗ヒスタミン薬の鼻閉に対する効果. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008.11.28 東京
- ⑦ 山本英之、藤枝重治、山田武千代、木村有二、大澤陽子、呉明美、窪誠太: スギ花粉症患者における第2世代抗ヒスタミン薬の鼻閉に対する効果. 第 47 回日本鼻科学会, 2008.9.26 名古屋

木村 有一 (KIMURA YUICHI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 50281035  
岡本 昌之 (OKAMOTO MASAYUKI)  
福井大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 90464057

#### 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 英之 (YAMAMOTO HIDEYUKI)  
福井大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50345691

##### (2) 研究分担者

藤枝 重治 (FUJIEDA SHIGEHARU)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 30238539  
山田 武千代 (YAMADA TAKECHIYO)  
福井大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 70283182  
山本 健人 (YAMAMOTO TAKEHITO)  
福井大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 80303379