

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03936

研究課題名(和文)環境化学物質による眼免疫活性化を介した新規アレルギー性炎症発症機構の解析

研究課題名(英文)The effects of environmental chemicals on ocular immune systems

研究代表者

黒田 悦史(Kuroda, Etsushi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10299604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性疾患増加の要因として環境化学物質の関与が示唆されている。しかしながら環境化学物質がどのように作用しアレルギー性炎症を誘導するのかについての詳細な機序は明らかにされていない。本研究ではアレルゲンの感作部位として「眼」に着目し、準揮発性化学物質であるビルフェノールAとアレルゲンの眼曝露がアレルギー性炎症発症の起点となることを見出した。さらに眼のリンパ組織である涙道関連リンパ組織(tear duct associated lymphoid tissue: TALT)が重要な役割を担っていることを明らかにするとともに、遺伝子改変マウスを用いた実験により眼免疫活性化に重要な因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、環境化学物質とアレルゲンが「眼」に曝露されることでアレルギーの感作が成立し、その後アレルゲンに曝露されることでアレルギー性喘息が誘導されることを明らかにした。この結果は眼免疫システム的重要性や環境化学物質曝露の影響に関する新しい知見であると言える。また、いまだ明らかにされていないアレルギー性疾患発症のメカニズム解明に大きく寄与すると考えられる。さらにメカニズムの解明は新しいアレルギー性疾患の予防法および治療法の探索・開発につながる重要な成果であり、基礎医学のみならず臨床医学的にも重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Environmental chemical exposures are thought to be involved in the increase of allergic diseases. However, the detailed mechanism of how environmental chemicals induce allergic inflammation has not been clarified. In this study, we focused on ocular immune systems as a site of allergen sensitization and found that ocular exposure to bisphenol A (BPA), a widely used environmental chemical, with allergens caused allergic inflammation through the activation of ocular immune systems. We found that exposure of allergen and BPA stimulated tear duct associated lymphoid tissue (TALT). In addition, studies using gene-deficient mice revealed the factor involved in the activation of TALT.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー 環境化学物質 眼免疫

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の患者数は増加している。その要因として環境化学物質によるアレルギー増悪効果が挙げられる。しかしながら化学物質がどのような機序でアレルギー性炎症を惹起しているのかについては未だ不明な点が多い。また、アレルギー性炎症では最初のアレルゲンの曝露を受ける「アレルギー感作」のステップが重要であるが、アレルゲン感作の詳細な機序についても十分には明らかにされていないのが現状である。我々は以前に行った萌芽的研究(17K19656)において、アレルゲンの感作では「眼」が重要であることを見出し、点眼により眼へアレルゲン感作を行い、その後アレルゲンを吸入曝露することで抗原特異的な IgE が強力に誘導されることを見出した。

このような現象が実生活のどのような場面に重要であるかを考えた場合、環境化学物質とアレルゲンが存在する環境下において、両者が眼を介して免疫系を活性化する経路が示唆された。そこで準揮発性化学物質でありシックハウス症候群の要因の一つと考えられているビスフェノール類に注目し、環境化学物質とアレルゲンの眼曝露による眼免疫活性化とアレルギー性炎症増悪効果について検討する。これにより現代社会で問題になっているアレルギーの増加の要因について明らかにできるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

前述したように我々は以前に行った萌芽的研究(17K19656)においてアレルゲンの感作では「眼」が重要であることを見出し、さらにその作用機序解析を進めてきた。その結果眼免疫の活性化にはある種の受容体のアダプタータンパク質である「遺伝子 X」が重要であることを見出した。また本研究の研究分担者らが行なっているビスフェノール類曝露によるアレルギー性炎症増悪効果に注目し、揮発性の環境化学物質とアレルゲンが「眼」に作用することで、アレルギー性炎症が増悪するのではないかと仮説を立てた。

そこで本研究ではアレルゲンおよび環境化学物質による眼免疫活性化について、好酸球性炎症や血清 IgE の誘導機構や「遺伝子 X」の役割の免疫学的機序について分子および細胞レベルで明らかにするとともに、それを基盤としたアレルギー性炎症の予防法および治療法を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験 1 抗原の点眼あるいは点鼻による抗原特異的 T 細胞の動態解析

アレルゲンとして卵白アルブミン(OVA)を用いた。OVA 特異的 T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスである OT-II マウスから T 細胞を回収し、CFSE にて標識した。標識後に T 細胞をマウスに移入し、OVA を点眼あるいは点鼻にて 4 回曝露した。最終曝露から 24 時間後に眼のリンパ節である tear duct-associated lymphoid tissue (TALT) あるいは鼻腔のリンパ節である nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) を回収し、FACS にて標識 T 細胞の動態を評価した。(図 1)

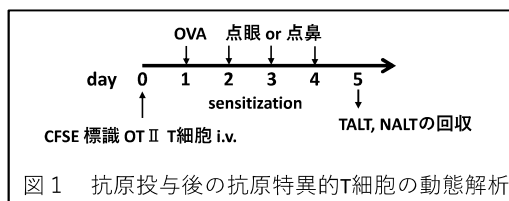


図 1 抗原投与後の抗原特異的 T 細胞の動態解析

(2) 実験 2 環境化学物質とアレルゲンの点眼により誘導されるアレルギー性喘息モデルの解析

アレルゲンとして OVA を使い、図 1 に示すように環境化学物質(ビスフェノール類)とアレルゲンを点眼により眼への抗原感作を 4 回行い、その後気道へアレルゲンを曝露した。アレルギー性炎症の評価項目として血清中のアレルゲン特異的 IgE、好酸球浸潤、肺組織の炎症像(HE および PAS 染色)、TALT あるいは NALT の免疫染色および胚中心形成の評価(FACS)を行い、アレルゲンおよび環境化学物質の免疫系への影響を評価した(図 2)。

同様の実験について種々の遺伝子改変マウスを用いて行い、アレルゲンと環境化学物質によるアレルギー性炎症増悪効果に関与する因子についての評価を行った。

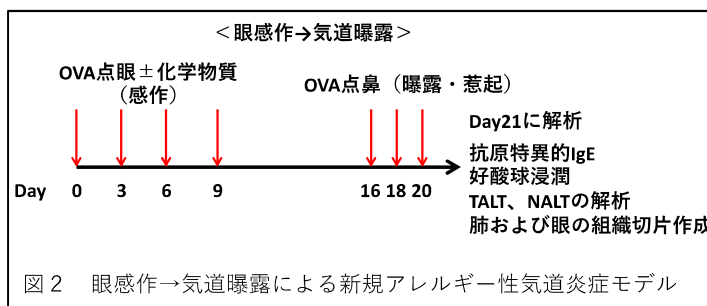


図 2 眼感作→気道曝露による新規アレルギー性気道炎症モデル

(3) 実験3 アレルゲンと環境化学物質の点眼あるいは点鼻曝露による樹状細胞の抗原取り込みについての解析

蛍光標識した OVA をビスフェノール類存在下あるいは非存在下に点眼あるいは点鼻にて曝露した。24 時間後に TALT および NALT を回収し、FACS にて抗原を取り込んだ細胞を検出した。

(4) 実験4 環境化学物質を点眼した TALT のシングルセル RNA 解析

無処置の TALT およびビスフェノール類を曝露した TALT を回収し、シングルセル RNA 解析を行った。

4. 研究成果

実験1 抗原の点眼あるいは点鼻による抗原特異的 T 細胞の動態解析

眼と鼻は鼻涙管によりつながっているため、点眼による免疫系の活性化が NALT を経由する可能性が考えられた。そこで OVA 特異的 T 細胞受容体を発現する OT-II マウスから T 細胞を回収し、CFSE により標識し、それらをマウスに移入した。移入後に OVA を 4 日間連続して点眼あるいは点鼻にて投与することで *in vivo* において OVA 特異的 T 細胞を刺激した。最後の OVA 投与から 24 時間後に TALT および NALT を回収し、CFSE にて標識された OT-II の T 細胞がどのリンパ組織で観察されるかを検討した。OVA を投与しないマウスでは TALT、NALT とともに標識 T 細胞はほとんど認められなかった。一方、OVA を点眼投与した際には TALT に、経鼻投与した際には NALT にて標識 T 細胞が検出された。以上の結果から、アレルゲンや環境化学物質の点眼では TALT が中心的な役割を演じていることが示された。

実験2 環境化学物質とアレルゲンの点眼により誘導されるアレルギー性喘息モデルの解析

これまでの研究から、OVA を点眼により眼へ感作を 4 回行い、その後に気道への抗原曝露を行うことで強い抗原特異的な IgE 応答が誘導され、Th2 細胞の誘導や好酸球炎症が生じることを認めている (図 2)。そこで、感作時 (day0~day9) に環境化学物質としてビスフェノール A を眼曝露することにより、アレルギー性炎症発症への影響を評価した。

ビスフェノール A はプラスチックの可塑剤、ポリ塩化ビニルの添加剤、建材など世界中で広く使用されている。いわゆる「環境ホルモン」として内分泌攪乱作用など有害性を示すことが明らかにされており、各国で規制されている。しかしながら含有製品の残存や環境中の残留からいまだに環境中に存在するとされている。

OVA 単独あるいは OVA をビスフェノール A とともに点眼にて感作し、その後 OVA を吸入曝露することでアレルギー性喘息モデルを作製した。血清中の OVA 特異的 IgE 抗体について評価したところ、OVA 単独に比して OVA とビスフェノール A を同時に点眼した群では顕著な IgE 抗体産生の亢進が認められた。OVA 特異的 IgG1 抗体についても同様の傾向が認められた。次に肺の炎症について解析した。肺に浸潤する好酸球数は IgE 応答と同様に OVA とビスフェノール A を同時に点眼した群において顕著に増加していた。また肺の病理学的解析により OVA+ビスフェノール A 点眼群では炎症細胞の浸潤、細気管支上皮の肥厚、杯細胞の過形成が認められた。以上の結果より眼へのアレルゲンとビスフェノール A の同時感作により、アレルギー性喘息が増悪することが明らかとなった。

前述したように眼感作では主に TALT が活性化することから、TALT の活性化について胚中心 (germinal center: GC) B 細胞の誘導を指標に評価した。OVA 単独あるいは OVA をビスフェノール A とともに点眼にて感作し、その後 OVA を吸入曝露したマウスから TALT および NALT を回収し、FACS にて GCB 細胞 (CD45⁺ B220⁺ GL7⁺ Fas⁺) を解析した。IgE 応答や好酸球浸潤と同様に TALT において OVA+ビスフェノール A 点眼群では顕著な GCB 細胞の増加が認められた。一方 NALT については GCB 細胞の増加は認められず、リンパ節の活性化は TALT において生じていることが明らかとなった。

同様の実験について遺伝子改変マウスを用いて検討した。種々の遺伝子改変マウスを用い IgE 誘導を指標に評価したが野生型マウスとの間に大きな差は認められなかった。一方、受容体のアダプタータンパク質である「遺伝子 X」を欠損したマウスでは IgE の誘導や好酸球浸潤が有意に低下しており、「遺伝子 X」は眼免疫活性化において重要な役割を演じていると考えられた。また IL-4 欠損マウスにおいても同様に IgE の誘導や好酸球浸潤が消失したことから、OVA+ビスフェノール A 点眼による炎症反応では Th2 細胞の活性化が重要であると考えられた。

実験3 アレルゲンと環境化学物質の点眼あるいは点鼻曝露による樹状細胞の抗原取り込みについての解析

これまでの実験から点眼した抗原や環境化学物質は主に TALT に作用することを明らかにした。そこで点眼した抗原が TALT に取り込まれるのか否かについて評価した。蛍光標識した OVA を使用し、OVA 単独あるいは OVA をビスフェノール A とともに点眼あるいは点鼻にて感作した。24 時間後に TALT および NALT を回収し、標識 OVA を取り込んだ樹状細胞 (CD11c⁺ MHC ClassII⁺) を FACS にて解析した。OVA+ビスフェノール A の点眼により TALT 中に標識 OVA を取り込んだ樹状細胞が検出された。一方、NALT では検出されなかった。逆に OVA+ビスフェノール A の点鼻では NALT にのみ標識 OVA を取り込んだ樹状細胞が検出された。さらに同様の実験を「遺伝子 X」を欠損したマウスでおこなったところ標識 OVA を取り込んだ樹状細胞数が有意に低下した。これらの結果より点眼された抗原は TALT の樹状細胞に取り込まれており、「遺伝子 X」は樹状細胞の抗原の取り込みに関与する因子であることが示唆された。

実験 4 環境化学物質を点眼した TALT のシングルセル RNA 解析

OVA+ビスフェノール A の点眼により誘導されるアレルギー性炎症の責任細胞を同定する目的で無刺激あるいはビスフェノール A を点眼した TALT を回収し、シングルセル RNA 解析を行った。TALT は遺伝子発現パターンから T 細胞、B 細胞、NK 細胞および抗原提示細胞分画に分けられ、抗原提示細胞 (樹状細胞 / マクロファージ) 分画において「遺伝子 X」の発現が認められた。現在、シングルセル RNA 解析の情報をもとにビスフェノール A により活性化する責任細胞の道程を進めている。

以上の結果より、環境化学物質であるビスフェノール A はアレルゲンとともに眼に作用することでアレルギー性の免疫応答を増強する効果があることが明らかとなった。本研究で使用したビスフェノール A の用量は一般環境大気中の 1 日の最大曝露量の 10 倍量に設定している。過去の報告から、住居やオフィスなどの室内の方が外気に比してビスフェノール類の濃度が有意に高いことが報告されていることから、用量としては実環境に近いと考えている。すなわち実環境では「眼」に対してアレルゲンとビスフェノール類の複合的な曝露が起こり得ると考えられる。現在は KO マウスの実験とシングルセル RNA 解析から詳細な作用機序の解明を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tatsuo Ueda, Takumi Adachi, Eiko Koike, Rie Yanagisawa, Kenzo Tsuzuki, Etsushi Kuroda
2. 発表標題 Bisphenol A induces allergic airway inflammation through the activation of ocular immune systems
3. 学会等名 第29回日本免疫毒性学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田 龍生, 黒田 悦史, 都築 建三
2. 発表標題 環境化学物質（Bisphenol A）の眼曝露は涙道関連リンパ組織（TALT）の活性化を介したアレルギー性気道炎症を惹起する
3. 学会等名 第3回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ueda Tatsuo, Adachi Takumi, Tsuzuki Kenzo, Kuroda Etsushi
2. 発表標題 Bisphenol A induces allergic airway inflammation through the activation of ocular immune systems
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2023 合同シンポジウム
4. 発表年 2023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
研究分担者	小池 英子 (Koike Eiko) (60353538)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・室長 (82101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	柳澤 利枝 (Yanagisawa Rie) (70391167)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・主幹研究員 (82101)	
研究分担者	長竹 貴広 (Nagatake Takahiro) (80608737)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・主任研究員 (84420)	

	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
研究協力者	足立 匠 (Adachi Takumi) (30736757)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関