

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22241015

研究課題名(和文)細胞間・細胞内ネットワークに注目した環境汚染物質によるアレルギー増悪機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the aggravation mechanism of allergy by the environmental pollutants with emphasis on the cell-to-cell interaction and the intracellular signal network

研究代表者

高野 裕久 (Takano, Hirohisa)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60281698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円、(間接経費) 10,860,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境汚染物質(ベンゾ[a]ピレンやフタル酸エステル等)がアレルギーを増悪する作用機序の解明を目的とし、種々の免疫担当細胞の活性化および細胞間・細胞内ネットワークに及ぼす影響とその役割について検討した。当該環境汚染物質は脾細胞中のT細胞と抗原提示細胞(マクロファージ、樹状細胞、B細胞)を活性化したが、T細胞に対する直接的な作用は認められず、抗原提示細胞とT細胞の相互作用が重要であることが示された。特に、T細胞上のCD3/CD28を介した細胞間ネットワーク、その後の細胞内シグナル伝達(細胞内ネットワーク)とTh2サイトカイン産生の増加等が、アレルギー増悪作用に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of environmental pollutants (benzo[a]pyrene or phthalate esters) on the activation of various immune cells, the cell-to-cell interaction, and the intracellular signal network to elucidate the aggravation mechanism of allergy by the environmental pollutants. These environmental pollutants activated T-cells and antigen-presenting cells (macrophages, dendritic cells, B cells) in splenocytes, however the direct activation was not observed for T-cells, which suggested that the interaction between antigen-presenting cells and T-cells, especially via CD3/CD28, was responsible for the activation. This study indicates that the environmental pollutants can induce T-cell activation including increase of Th2 cytokine production particularly mediated by promotion of antigen-presenting cell signal through CD3/CD28 on the T cells and by their intracellular signal network, which can be responsible for the aggravation mechanism of allergy by the environmental pollutants.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境汚染物質 大気汚染物質 アレルギー 免疫応答 メカニズム 細胞間ネットワーク 細胞内ネットワーク シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、アトピー性皮膚炎、気管支喘息等のアレルギー疾患が急増し、公衆衛生や社会経済に多大な損失を与えている。アレルギー疾患急増の主因は環境要因の急変に求められており、衛生環境、食環境、住環境の変化とともに、急速な工業化、都市化に伴う環境汚染の問題が指摘されてきた。我々は、近年の代表的な環境汚染物質であるディーゼル排気微粒子 (DEP) がアレルギー性気管支喘息を増悪することを *in vivo* で明らかにし、疫学的既報に実験的論拠を与えた。その後、DEP に含まれる有機化学物質、可塑剤として汎用されるフタル酸エステル等の化学物質、ナノテクノロジーの発展とともに激増しているナノ材料が、アレルギー性喘息やアトピー性皮膚炎を増悪することも報告した。このように、いくつかの環境汚染物質がアレルギー疾患を増悪しうることが示されていたが、そのメカニズムは十分に解明されていなかった。

(2) 一般に、アレルギー疾患・反応に内在する免疫応答は、種々の免疫担当細胞がネットワークを形成することにより成立する。特に、樹状細胞等の抗原提示細胞を始点として T 細胞をはじめとするリンパ球を介する免疫応答は、免疫担当細胞の分化を制御し、アレルギー疾患・反応の成立において中心的役割を演じていると考えられている。

(3) 我々は、先行研究において、*in vivo* の研究に続き、*in vitro* でもある種の環境汚染物質が抗原提示細胞やリンパ球の機能に影響を及ぼすことを見いだした。特に、*in vivo* でアレルギー増悪作用が示されているいくつかの環境汚染物質が、*in vitro* でも、抗原提示細胞の CD86 の発現や抗原提示機能を促進すること、リンパ球の増殖やアレルギー反応に重要役割を担う Th2 サイトカインである IL-4 の産生を促進することなどを明らかにした。驚くべきことに、これらの影響指標は、*in vivo* でアレルギー増悪影響を示さない環境汚染物質にはほとんど影響されなかった。これらのことから、アレルギーを増悪する環境汚染物質は、抗原提示細胞-リンパ球を中心とした細胞間・細胞内ネットワークをかく乱する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

このような背景から、本研究では、下記を研究目的とした。

(1) 環境汚染物質がアレルギーを増悪する作用機序として、種々の免疫担当細胞の活性化に及ぼす影響について検討する。

(2) 特に、環境汚染物質が、抗原提示細胞-リンパ球を中心とする免疫担当細胞の細胞間ネットワークや、個々の細胞種における細

胞内ネットワークに及ぼす影響について検討し、増悪メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 動物は、アトピー素因を有する雄性 NC/Nga マウスを使用し、脾細胞と骨髄細胞を採取した。脾細胞は抗原提示細胞、リンパ球 (T 細胞、B 細胞)、細網内皮系細胞等の複数の種類の免疫担当細胞からなり、複数細胞による免疫応答を再現することが容易である。脾細胞は、MACS 磁気細胞分離法を用いて、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞を単離または除去した。骨髄細胞は、培養により、骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を分化誘導した。樹状細胞は、主要な抗原提示細胞であり、免疫応答の initiator として重要な役割を演じている。

(2) 実験に用いる環境汚染物質としては、*in vivo* の研究においてアレルギー増悪影響の存在が既に示されている DEP の有機抽出成分 (DEP-OC) と大気中微小粒子等に含有されるベンゾ[a]ピレン (BaP)、プラスチックの可塑剤であるフタル酸エステルのフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) とフタル酸ジイソノニル (DINP) を主たる評価対象とした。

それぞれの細胞群に、アレルゲンの存在下あるいは非存在下で当該環境汚染物質に曝露した後、各細胞の活性化に及ぼす影響を検討した。

脾細胞については、当該環境汚染物質に 24-72 時間曝露した後、T 細胞の活性化マーカー分子 (TCR, CD3, CD69 等) および抗原提示細胞の活性化マーカー分子 (MHC class II, CD86 等) の発現や、サイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5) の産生、細胞増殖を解析した。さらに、MACS により分離した各細胞群における当該環境汚染物質の影響を脾細胞全体に対する影響と比較検討した。細胞表面分子の発現はフローサイトメトリーにより、サイトカインの産生は ELISA 法により、細胞増殖は、BrdU の取り込みを指標とした ELISA 法または WST-1 アッセイにより測定した。

BMDC については、24 時間または分化誘導過程 6 日間の曝露後に、成熟・活性化に関わる細胞表面分子 (MHC class II, CD86, CD11c 等) の発現とサブセットについて、フローサイトメトリーで解析した。

(3) 当該環境汚染物質の細胞内における作用点・機序についても検討した。リン酸化タンパク質 (p38 MAPK, ERK) の発現は、15-60 分間の曝露後に Cell-based ELISA 法により測定した。また、リン酸化酵素や転写因子、核内受容体の寄与については、細胞をそれらの阻害剤で前処理した後、各阻害剤の存在下で当該環境汚染物質に曝露し、活性化マーカー分子の発現の変化を解析した。

また、当該環境汚染物質による抗原提示細

胞の活性化を介したT細胞の活性化亢進を検証するため、MACS磁気細胞分離法により脾細胞からT細胞を単離し、抗CD3/CD28抗体を用いて、抗原提示細胞からの一定の刺激を模擬した条件下で、当該環境汚染物質に曝露し、活性化マーカー分子の発現の変化を解析した。T細胞表面に発現するTCR/CD3複合体とCD28は、それぞれ抗原提示細胞表面に発現するMHC class IIと補助刺激分子(CD80/CD86)を認識し、抗原提示細胞からの刺激を受ける分子である。

#### 4. 研究成果

(1) これまでに、当該環境汚染物質は、脾細胞のTCRやCD69、MHC class II、CD86等の発現を増強し、T細胞と抗原提示細胞いずれをも活性化することを明らかにした。そこで、脾細胞からT細胞や抗原提示細胞(B細胞、マクロファージ、樹状細胞)を単離または除去した細胞群を用いて、全細胞との影響を比較検討した。

その結果、DEP-OCの曝露は、単離したT細胞およびB細胞、マクロファージを活性化するが、樹状細胞には影響を及ぼさなかった。一方、BaPとDEHPの曝露は、単離したB細胞およびマクロファージ、樹状細胞を活性化したが、単離したT細胞に対する顕著な活性化作用は認められなかった。また、マクロファージの除去により、T細胞の活性化が低減される傾向がみられた。DINPの曝露は、単離したB細胞およびマクロファージを活性化したが、単離した樹状細胞およびT細胞に対する顕著な活性化作用は認められなかった。また、B細胞の除去により、T細胞の活性化が低減される傾向がみられた。これらことから、BaPとフタル酸エステル類の曝露は、抗原提示細胞には直接的に作用し活性化するが、T細胞の活性化に対しては、直接的な作用ではなく、抗原提示細胞との相互作用を介した反応が重要である可能性が示唆された。

代表例として、図1にBaP曝露が脾臓の全細胞と単離したT細胞、マクロファージを除去した細胞群におけるT細胞の活性化に及ぼす影響を示した。全細胞を用いた場合は、BaP曝露によりTCR<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>細胞(活性化T細胞)が顕著に増加したが、単離したT細胞に対する影響は観察されなかった。一方、マクロファージのみを除去した脾細胞では、TCR<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>細胞が顕著に増加したが、全細胞と比べると、その増加影響は低減される傾向であった。

(2) 当該環境汚染物質が樹状細胞の活性化に及ぼす影響について、BMDCを用いて検討した。その結果、当該環境汚染物質の曝露により、CD86等の活性化マーカー分子の発現増加が認められた。また、少数ではあるが、樹状細胞サブセット(pDCとcDC)の割合の変化も認められた。

樹状細胞は、免疫-炎症反応の調節に重要な役割を担っていることから、環境汚染物質

によるそのサブセット構成の変化は、その後の生体影響に係る要因と考えられる。

(3) BaPとフタル酸エステル類を対象とし、脾細胞の活性化に寄与するシグナル伝達系について検討した。その結果、リン酸化MAPKの発現レベルに顕著な変化は認められなかった。しかし、軽微な変化ではあったが、脾細胞中の活性化分子の増加が、p38 MAPK、NFATの阻害剤や甲状腺ホルモン受容体の拮抗剤で軽減される傾向がみられたことから、これらが、影響に関わる複数の経路の一因であることが示唆された。

次に、これまでに、当該環境汚染物質による抗原提示細胞の活性化を介したT細胞の活性化亢進の可能性を見出していることから、それを詳細に検証した。その結果、BaPの単独曝露では、単離したT細胞に影響を及ぼさなかったが、抗CD3/CD28抗体による刺激下ではCD69の発現(図2)や、T細胞の増殖や活性化に関わるサイトカインであるIL-2の産生(図3)、Th2サイトカインであるIL-4の産生、細胞増殖を促進した。一方、CD3/CD28刺激によるIFN- $\gamma$ 産生の増加は、BaP曝露により抑制された。これより、当該環境汚染物質は、T細胞上のCD3/CD28を介した抗原提示細胞からのシグナルを増強することにより、T細胞を活性化する可能性が示唆された。また、これには、抗原提示細胞由来の液性因子やCD40Lなど他の分子を介した抗原提示細胞との相互作用は必須ではなかったが、抗原提示細胞の存在によって、よりT細胞の活性化が促されることも示された。

以上より、アレルギー増悪影響を示す環境汚染物質の作用機序として、抗原提示細胞-T細胞の細胞間ネットワーク、特に、CD3/CD28を介したシグナル伝達、および、タンパクリン酸化や核内受容体を介した細胞内ネットワークに対する修飾、その後のT細胞等の活性化、Th2サイトカイン等の産生増加が重要であることが示唆された。

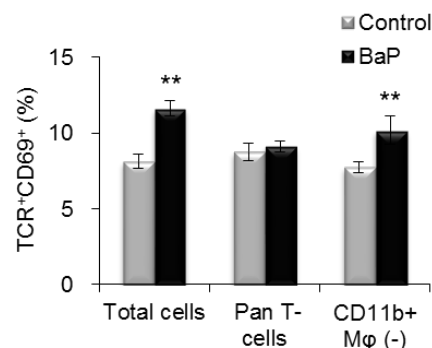


図1. BaP曝露が脾臓T細胞の活性化に及ぼす影響  
Total cells, 全脾細胞群; Pan T-cells, T細胞群;  
CD11b<sup>+</sup> Mφ (-), マクロファージ除去細胞群,  
\*\*p<0.01 vs. Control

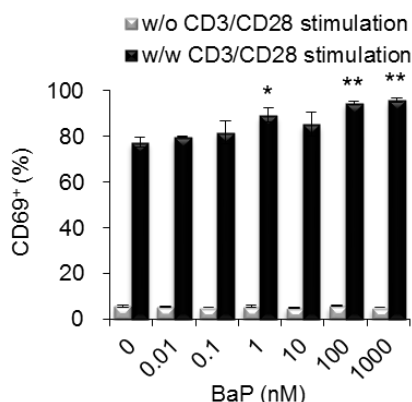


図 2. BaP 曝露が CD3/CD28 刺激による T 細胞の CD69 発現に及ぼす影響

\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Control

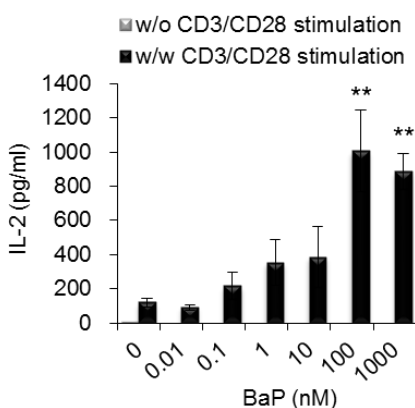


図 3. BaP 曝露が CD3/CD28 刺激により誘導される T 細胞の IL-2 産生に及ぼす影響

\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Control

## 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 11 件)

Inoue K, Tanaka M, Takano H: DEP-induced Th17 response in asthmatic subjects. J Allergy Clin Immunol 査読有り (in press)

高野裕久: 環境汚染による生活環境病、生活習慣病の増悪・増加. 環境衛生工学研究 査読無し (in press)

高野裕久: 環境ストレスとアレルギー・アレルギー 査読あり 62: 548-554, 2013.

本田晶子, 柳澤利枝, 小池英子, 井上健一郎, 高野裕久: 環境化学物質とアレルギー. アレルギーの臨床 査読無し 33: 706-710, 2013.

高野裕久, 小池英子, 柳澤利枝: 環境化学物質とアレルギー疾患. チャイルドヘルス 査読無し 15: 850-854, 2012.

高野裕久: アレルギーと室内環境. クリーンテクノロジー 査読無し 20:5-9,

〔学会発表〕(計 16 件)

小池英子, 柳澤利枝, 高野裕久: 環境化学物質による免疫応答の修飾 - アレルギーに及ぼす影響機序の解明に向けて -, 第 41 回日本毒性学会学術年会, 2014 年 7 月, 神戸 (アブストラクト提出済み)

小池英子: フタル酸エステル等の生活用品に含有される化学物質が免疫応答に与える影響, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, 横浜

高野裕久: 環境汚染物質による生活環境病、生活習慣病の増悪とその軽減対策, 愛知学院大学薬学部附属医療生命薬学研究所第 1 回サイエンスフォーラム, 2013 年 3 月 26 日, 名古屋

高野裕久: 室内、室外の環境汚染物質とアレルギー, 第 83 回日本衛生学会学術総会, 2013 年 3 月 24 日, 金沢

高野裕久: 環境ストレスとアレルギー, 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2012 年 12 月 1 日, 大阪

Hirohisa Takano: Environmental pollution and allergic diseases, First Malaysian congress of toxicology, 2-3 October, 2012, Kuala Lumpur

高野裕久: 室内、室外の環境汚染物質による生活環境病、生活習慣病の増悪とその軽減対策, 2012 年室内環境学会第 1 回講演会, 2012 年 9 月 27 日, 東京

小池英子: 環境化学物質によるアレルギー増悪機構に関する検討, 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会, 2012 年 9 月 15 日, 東京

柳澤利枝, 小池英子, Tin Tin Win Shwe, 市瀬孝道, 高野裕久: フタル酸エステル類の経気道曝露がアレルギー性喘息に及ぼす影響, 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会, 2012 年 9 月 15 日, 東京

Koike E, Yanagisawa R, Takano H: Immunological effects of phthalates and other chemicals in consumer products, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012 年 7 月 19 日, 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 裕久 (Takano, Hirohisa)  
京都大学・工学研究科・教授  
研究者番号：60281698

(2) 研究分担者

小池 英子 (KOIKE, Eiko)  
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研  
究センター・主任研究員  
研究者番号：60353538

柳澤 利枝 (YANAGISAWA, Rie)  
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研  
究センター・主任研究員  
研究者番号：70391167

井上健一郎 (Inoue, Kenichirou)  
国際医療福祉大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：20373219

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：