

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670480

研究課題名(和文) 環境微粒因子のアレルギー性鼻炎に対する影響

研究課題名(英文) Effect of airborne fine particles for allergic rhinitis

研究代表者

善本 知広 (Yoshimoto, Tomohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60241171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境微粒因子PM2.5の大部分を占めるディーゼル排気微粒子(DEP)のアレルギー性鼻炎に対する影響が社会的問題となっている。しかし、その増悪機構は全く不明である。我々は花粉特異的アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて、DEPのアレルギー性鼻炎に対する影響を検討した。その結果、DEPは鼻粘膜上皮細胞のバリア機能(タイトジャンクション)を破壊する結果、アレルゲンの上皮細胞透過性が亢進することで、アレルギー性鼻炎を悪化させた。更に、抗酸化剤(N-アセチル-L-システイン)を点鼻するとDEPによるタイトジャンクションの破壊を抑制し、それに伴い鼻炎症状の悪化を抑制した。

研究成果の概要(英文)：environmental factors that affect allergic diseases adversely. However, the exact effect of DEP on allergic rhinitis (AR) is unclear. We thought to investigate the effect of DEP on seasonal AR using a mouse model, and found that mice challenged with ragweed pollen plus DEP showed increased frequency of sneezing compared with mice challenged with pollen alone. Interestingly, intranasal DEP pretreatment before ragweed pollen challenge increased ragweed-pollen-induced sneezing to levels comparable with the co-administration group. Intranasal administration of DEP, but not ragweed pollen, disrupted nasal mucosal tight junction (TJ) protein, zonula occludens-1 (ZO-1) in vivo. The effect of a single DEP treatment on ragweed-induced sneezing and ZO-1 expression persisted for at least 4 days, and was inversely correlated. Finally, an antioxidant substance, N-acetyl-L-cysteine, inhibited DEP-mediated TJ disruption and exacerbation of sneezing in AR.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー性鼻炎 環境微粒因子

## 1. 研究開始当初の背景

従来からのアレルゲンに加え、大気汚染の原因物質とされている浮遊粒子状物質で、直径が 2.5 $\mu\text{m}$  以下の微粒子状物質 (Particulate Matter, PM; PM2.5) のアレルギー性鼻炎への影響が社会的に問題視されていた。この環境微粒因子は、工場での燃焼による煤塵などからなるが、ディーゼル排気微粒子 (ディーゼルエンジンの排気ガスに含まれる微粒子: diesel exhaust particles; DEP) が PM2.5 の大部分を占める。

本邦では 2013 年、中国大陸から高濃度の PM2.5 が飛来した時期と春のスギ花粉飛散時期が一致し、以前に比較してアレルギー性鼻炎患者数は急激に増加し、症状の悪化を訴える患者が増加した。さらに、国内の自動車からのディーゼル排気微粒子が原因で、喘息やアレルギー性鼻炎患者はその症状の悪化に悩まされていた。

しかし、ディーゼル排気微粒子のアレルギー性鼻炎を悪化させるメカニズムは不明であり、それに対する治療・予防方法は全く確立されていなかった。このような背景から、ディーゼル排気微粒子によるアレルギー性鼻炎増悪メカニズムを明らかにし、その影響の評価法と治療・予防薬のスクリーニング法を開発することが喫緊の課題であった。

## 2. 研究の目的

ブタクサ花粉特異的アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて、ディーゼル排気微粒子のアレルギー性鼻炎に対する影響を検討した。

## 3. 研究の方法

ブタクサ花粉症モデルマウスに、ブタクサ花粉またはブタクサ花粉とディーゼル排気微粒子 (DEP) の点鼻を 4 日間行った。点鼻直後 10 分間のくしゃみ回数の測定と、最終点鼻から 24 時間後の頸部リンパ節細胞の Th2 サイトカイン産生および鼻粘膜組織への好酸球浸潤を解析した。また、DEP の鼻粘膜上皮バリアへの影響を解析する目的で、DEP 点鼻後、鼻粘膜上皮細胞のタイトジャンクションの構成タンパク質の発現を免疫組織学的に解析した。更に、マウスに抗酸化剤 N-アセチル L-システインを点鼻し、DEP による上皮細胞間接着構造 (タイ

トジャンクション) の破壊およびくしゃみ回数の増加に対する影響を解析した。

## 4. 研究成果

(1) DEP のアレルギー性鼻炎モデルマウスに対する影響の検討 ;  
ブタクサ花粉 (RW) 特異的アレルギー性鼻炎モデルマウスに、アレルゲンと共に DEP の点鼻によって鼻炎が増悪するか検討した。その結果、通常 RW 免疫マウスに RW 点鼻で鼻炎症状 (くしゃみ回数の増加) が認められない RW (0.1 $\mu\text{g}$ ) を DEP (1, 3, 10 $\mu\text{g}$ ) と同時点鼻すると、DEP の濃度依存的にくしゃみ回数は点鼻日数と共に著明に増加した。一方、鼻粘膜への好酸球浸潤と頸部リンパ節細胞からの Th2 サイトカイン産生は RW 単独群と RW+DEP 群で有意差は認められなかった。

(2) DEP の鼻粘膜曝露時期によるアレルギー性鼻炎増悪に対する影響の検討 ;  
通常、PM2.5 と花粉の飛散時期が同時に発生するとは限らない。そこで、DEP による鼻炎症状 (くしゃみ回数) 増悪による影響を更に検討する目的で、RW で免疫したマウスに DEP (10 $\mu\text{g}$ ) を 4 日間連日点鼻し、さらに当該マウスに RW (0.1 $\mu\text{g}$ ) を 4 日間点鼻した。その結果、あらかじめ DEP に曝露されたマウスは RW 点鼻初日から RW 単独点鼻マウスに比較して著明にくしゃみ回数が増加した。以上の結果は、DEP は鼻粘膜 (上皮細胞または、上皮細胞下の免疫担当細胞) に対して何らかの影響を及ぼすものと推測された。

(3) DEP の鼻粘膜上皮細胞に対する影響の検討 ;  
DEP の鼻粘膜上皮細胞に対する影響を検討する目的で、ヒト鼻粘膜上皮細胞株に DEP (0 ~ 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) を添加・培養し、24 時間後のタイトジャンクション蛋白質 (ZO-1) の免疫染色、細胞膜の電気抵抗と FITC 標識したデキストランの上皮細胞透過性を測定した。その結果、タイトジャンクションは DEP 濃度依存的に破壊され、細胞膜の電気抵抗は著明に低下し、FITC 標識したデキストランの上皮細胞透過性は著しく亢進していた。さらに、DEP を 4 日間単独点鼻したアレルギー性鼻炎モデルマウ

スでは鼻粘膜上皮細胞のタイトジャンクションは完全に破壊されていた。

(4) DEP による鼻粘膜のバリア破壊を予防する薬剤の検討：

従来から、DEP はその構成成分による酸化ストレスを介して気道上皮細胞のバリア機能を低下させることが知られている。そこで、ヒト鼻粘膜上皮細胞株に DEP と同時に抗酸化剤 N-アセチルシステインを添加した。その結果、N-アセチルシステイン添加群ではタイトジャンクションは保護され、FITC 標識したデキストランの上皮細胞透過性は抑制された。さらに、RW で免疫したマウスに RW を点鼻する 2 日前にディーゼル排気微粒子と同時に N-アセチルシステインを点鼻して前処置すると、マウス鼻粘膜上皮細胞のタイトジャンクションは完全に保護され、花粉を点鼻してもくしゃみ回数の増加は全く認められなかった。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)  
〔雑誌論文〕(計 18 件)

### 欧文原著

1. Iwasaki N, Matsushita K, Fukuoka A, Nakahira M, Matsumoto M, Akasaki S, Yasuda K, Shimizu T, Yoshimoto T. Allergen endotoxins induce T cell-dependent and non-IgE-mediated nasal hypersensitivity in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* Published online: June 7 2016. (査読有) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.023>
2. Akasaki S, Matsushita K, Kato Y, Fukuoka A, Iwasaki N, Nakahira M, Fujieda S, Yasuda K, Yoshimoto T. Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways. *Int. Immunol.* 28:65-76, 2016. (査読有) DOI:10.1093/intimm/dvx055.
3. Fukuoka A, Matsushita K, Morikawa T, Takano H, Yoshimoto T. Diesel exhaust particles exacerbate allergic rhinitis in mice by disrupting the nasal epithelial barrier. *Clin. Exp. Allergy.* 46:142-152, 2016. (査読有) DOI:10.1111/cea.12587.
4. Matsushita K, and Yoshimoto T. B cell-intrinsic MyD88 signaling is essential for IgE responses in lungs exposed to pollen allergens. *J. Immunol.* 193:5791-800, 2014. (査読有) DOI:10.4049/jimmunol.1401768.
5. Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, Fujieda S, Matsushita K, and Yoshimoto T. Nasal sensitization with ragweed pollen induces local-allergic-rhinitis-like symptoms in mice. *PLOS ONE.* 9(8):e103949. 1-11, 2014. (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0103540.
6. Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Futatsugi-Yumikura S, Yoshimoto T, Nakanishi K, and Yamanishi K. Immediate-type contact hypersensitivity is reduced in interleukin-33 knockout mice. *J. Dermatol. Sci.* 74:159-61, 2014. (査読有) DOI:10.1016/j.jdermsci.2014.01.009.
7. Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita K, and Yoshimoto T. The role of basophils and pro-allergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously-sensitized food allergy. *Int. Immunol.* 26:539-49, 2014. (査読有) DOI:10.1093/intimm/dxu058.
8. Yoshimoto T, and Matsushita K. Innate-type and acquired-type allergy regulated by IL-33. *Allergol Int.* 63 Suppl 1:3-11, 2014. (査読有) DOI:10.2332/allergolint.13-RA-0657.

### 和文総説

1. 岩崎成仁, 善本知広. アレルギー用語解説シリーズ 自然リンパ球 2016;65(2):141-142. (査読無)
2. 福岡あゆみ, 善本知広. アレルギー用語解説シリーズ Toll-like receptors. アレルギー 2015;64(5):737-738. (査読無)
3. 赤崎晶子, 善本知広. アレルギーをめぐるトレンド ILC2.皮膚アレルギーフロンティア 2015;13(2):104-105. (査読無)
4. 福岡あゆみ, 善本知広. 専門医のためのアレルギー学講座:バリア機能の破綻とアレルギー:バリア機能とアレルギー性鼻炎. アレルギー 2015;64(9):1196-1203. (査読無)
5. 岩崎成仁, 善本知広. アレルギー用語解説シリーズ Local allergic rhinitis.アレルギー 2015;64(10):1354-1356. (査読無)
6. 赤崎晶子, 加藤幸宣, 松下一史, 善本知広. アラーミン. *Respiratory Medical Research* 2014;2(3):59-62. (査読無)

7. 加藤幸宣, 赤崎晶子, 松下一史, 善本知広, IL-33. Respiratory Medical Research 2014;2(3):26-32. (査読無)
8. 岩崎成仁, 善本知広. アレルギー用語解説シリーズ PAMPs. アレルギー 2014;63(7): 958-60. (査読無)
9. 善本知広. アレルギー性鼻炎における IL-33 と好塩基球の役割. 医学のあゆみ 2014; 250(12): 41097-41102. (査読無)
10. 岩崎成仁, 善本知広. アレルギー用語解説シリーズ 樹状細胞. アレルギー 2014; 63(10): 1368-1369. (査読無)

[学会発表](計 25 件)

#### 招待講演

1. 善本知広. 基礎医学から見たアレルギーのトピックス.(特別講演) 第 73 回 関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会 2015.12.8 大阪
2. 善本知広. 環境微粒因子とアレルギー性鼻炎:モデルマウスも用いた増悪メカニズムの解明と治療技術の開発.(特別講演) 第 22 回日本免疫毒性学術年回 2015.9.11 京都市
3. Yoshimoto T. Innate-type and acquired-type allergy regulated by IL33. (Guest Speaker) East Asia Allergy Symposium 2015.5.8 Seoul, South Korea

#### 国際学会

4. Fukuoka A, Matsushita K, Takano H, Yoshimoto T. Diesel Exhaust Particles Exacerbate Allergic Rhinitis in Mice By Disrupting the Nasal Epithelial Barrier. (General Lecture) American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 2015. 2015.2 24 Houston, USA
5. Akasaki S, Yoshimoto T. The Role of TSLP in Experimental Allergic Rhinitis. (General Lecture) American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 2015. 2015.2 22 Houston, USA
6. Matsushita K, Yoshimoto T. Essential Role of B-cell-intrinsic MyD88-signaling in IgE responses in lungs. (General Lecture) American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 2015. 2015.2 21 Houston, USA
7. Matsushita K, Yoshimoto T. Essential role of

B-cell-intrinsic MyD88-signaling in IgE responses in lungs. (General Lecture) Cell Symposia: Type 2 Immunity 2014.12.11 Bruges, Belgium

8. Yoshimoto T, Muto T, Fukuoka A, Nakanishi K, Matsushita K. The roles of basophils, TSLP and IL-33 in food allergy following epicutaneous sensitization. (General Lecture) 3rd Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2014.10.10 Dublin, Island

#### シンポジウム、ワークショップ

計 11 件

#### 一般講演

計 6 件

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 微粒子状物質によるアレルギー性鼻炎増悪の予防又は抑制剤.

発明者: 善本知広, 福岡あゆみ, 松下一史

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2015-026712

出願年月日: 2015.2.13

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

善本 知広 (YOSHIMOTO, TOMOHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60241171

##### (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

##### (3) 連携研究者

高野 裕久 (TAKANO, HIROHISA)

京都大学・工学部・教授

研究者番号: 60281698