

令和元年6月19日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05256

研究課題名(和文) 微細粒子による肺胞マクロファージ細胞死がアレルギー性炎症発症に与えるインパクト

研究課題名(英文) The impact of alveolar macrophage death by fine particle on allergic inflammation

研究代表者

黒田 悦史 (Kuroda, Etsushi)

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・上級研究員

研究者番号：10299604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年アレルギー性疾患の患者数は増加一途をたどっているが、その要因の一つとして、PM2.5などの大気中の微粒子の関与が報告されている。このような微粒子は免疫応答を増強する「アジュバント」として機能し、アレルギー性炎症の発症と増悪に関与すると考えられている。本研究ではアレルギー性炎症を起こしやすい微粒子を吸入した際、それを貪食した肺胞マクロファージの細胞死が誘導されること、その結果として死細胞由来因子であるインターロイキン1アルファ(IL-1a)が放出されること、さらに放出されたIL-1aが肺の異所性リンパ節の形成とアレルギー性炎症のメディエーターであるIgEの誘導に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PM2.5をはじめとする大気中の微粒子がアレルギー性炎症の発症と増悪に関与することは疫学的解析からも明らかにされているが、微粒子がどのように免疫細胞を活性化し、そのような機序でアレルギー性炎症を誘導するのかについては未だ明らかにされていない。本研究では微粒子が引き起こす細胞死とその結果生じる死細胞因子がIgEをはじめとしたアレルギー性炎症のメディエータの誘導に重要であることを明らかにした。微粒子によるアレルギー性炎症発症のメカニズムの一端を明らかにしたことにより、このようなタイプのアレルギー性炎症に対する予防法や治療法への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of patients with allergic diseases have increased in the developed countries. Several reports have described that particulates in the air function as adjuvant to enhance allergic immune responses. However, the underlying mechanisms by which particulates induce and exacerbate allergic inflammation are still unclear. In this study, we found that inhaled particulates that induce allergic inflammation stimulate alveolar macrophages to induce cell death. Interleukin-1alpha (IL-1a) is released as one of dead cell factors and plays an important role for the induction of ectopic lymphoid tissue and IgE secretion in the lungs, suggesting that dead cell derived factors might be involved in allergic inflammation in the lungs.

研究分野：免疫学

キーワード：微粒子 アレルギー性炎症 IgE 肺胞マクロファージ 細胞死 DAMP iBALT IL-1

1. 研究開始当初の背景

近年アレルギー性疾患の患者数は増加一途をたどっており、その原因の解明と効果的な治療法の開発が急務である。多くの報告からその要因として、アレルゲンの増加、感染症の減少(衛生仮説)、食生活の変化、化学物質の増加などが考えられている。特にPM2.5をはじめとする大気中の微粒子に関してはアレルギー性疾患の発症および増悪との関係が示唆されている。このような微粒子はアレルゲンとは異なり、それ自身が抗原(アレルゲン)として作用するわけではない。微粒子は免疫応答を増強する作用を有しており、抗原とともに感作することで、その抗原に対する免疫応答が増強されると考えられている。このような効果はアジュバント効果と呼ばれる。これまでの報告から微粒子の多くがアジュバント効果を有していることが報告されているが、その多くがIgEの誘導や好酸球の活性化をはじめとするアレルギー反応を増強することが示されている。このような背景から、微粒子によるアジュバント効果と近年のアレルギー性疾患の増加との関連が示唆されているが、微粒子がどのような機序で免疫系を活性化し、アレルギー性炎症を誘導するのかについては明らかにされていない。微粒子の免疫学的な特性を明らかにすることは、微粒子によって誘発されるアレルギー性炎症の予防や治療法を開発する上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

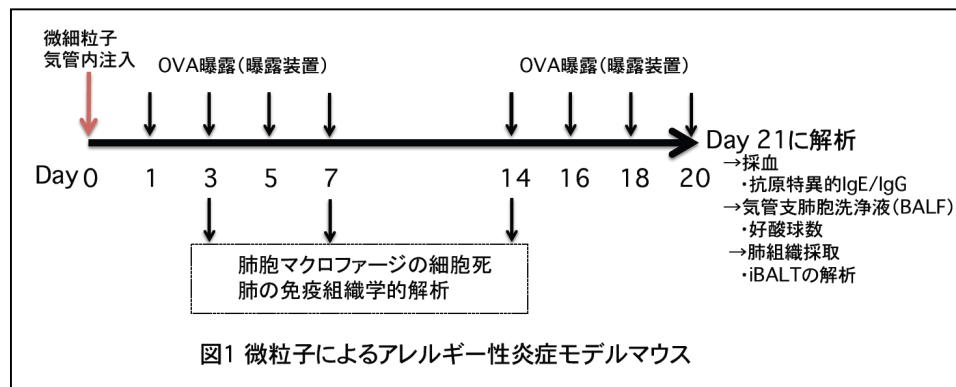
前述したようにアレルギー性疾患の増加は社会問題の一つとなっているが、その要因の一つと考えられている微粒子の免疫学的なメカニズム、すなわち微粒子がどのように免疫系を刺激し、アレルギー性炎症を発症・増悪するのかについては未だ明らかにされていない。

我々はこれまでの研究から、アレルギーを引き起こしやすい微粒子と引き起こしにくい微粒子が存在すること、さらにアレルギーを引き起こしやすい微粒子は肺胞マクロファージの細胞死を誘導し、死細胞因子(ダメージ関連分子パターン(damage-associated molecular patterns):DAMPs)を放出し、それがアレルギー性炎症発症に重要であることを見いだした。本研究では微粒子によって誘導されるアレルギー性炎症発症の免疫学的機序をさらに明らかにすることによって、アレルギー性炎症の包括的な理解を目指すとともに、その知見を新しい治療法および予防法へ応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 微粒子によるアレルギー性炎症発症のメカニズムの解析

本研究では図1に示すように、微粒子を気管内投与した後に抗原(卵白アルブミン:OVA)を曝露することで、微粒子誘発アレルギー性炎症モデルを作成した。この手法により、血清中のOVA特異的IgEの誘導、肺への炎症細胞浸潤など、アレルギー性炎症特有の病態の誘導を認めた。



この実験系を用いて以下の項目を検討した。

- ・ 微細粒子の気管内投与とOVA曝露による抗原特異的IgEの誘導、BALF中の好酸球の浸潤、HEおよびPAS染色による組織学的解析。(一般的なアレルギー病態の解析)
- ・ 微細粒子の気管内投与後の肺胞マクロファージの細胞死を免疫染色およびフローサイトメトリー解析にて検討。同時にDAMPsであるIL-33やIL-1 α 産生についてELISA法、免疫染色にて評価。
- ・ 微細粒子の気管内投与後の肺を摘出し免疫染色にて肺の炎症を評価。微粒子の投与とOVAの曝露により肺に異所性リンパ節である誘導性気管支関連リンパ組織(inducible bronchus-associated lymphoid tissue: iBALT)が誘導されるので、免疫染色により確

を行った。

さらに同様の実験を種々の遺伝子欠損マウスを用いて病態を解析することにより、微粒子によるアレルギー性炎症発症にどのような因子が、どのようなステップで関与しているのかを明らかにすることができる。

(2) 微粒子により誘導されるアレルギー性炎症の制御

微細粒子によるマクロファージ細胞死と DAMPs の放出がアレルギー性炎症発症の原因の一つであると考えている。そこで細胞死を誘導しない微粒子、あるいは DAMPs を放出しない微粒子を用いることで、アレルギー性炎症発症における肺胞マクロファージの細胞死のインパクトについて解析した。また、CpG ODN は抗アレルギー作用を持つアジュバントであることが知られている。そこで、CpG ODN を投与することによってアレルギー性炎症の治療が可能か否かを検討した。

4. 研究成果

微粒子投与とアレルゲン曝露によるアレルギー性炎症発症の機序を解析した。アレルギー性炎症を引き起こしやすい微粒子であるアラムやシリカを気管内注入によりマウスに投与し、その後アレルゲンとして OVA を数回曝露した。これにより、血清および肺胞洗浄液 (BALF) において抗原特異的な IgE の上昇が確認され、肺の炎症が組織の解析から確認された。

種々の遺伝子欠損マウスを用いて同様の実験を行ったところ、IL-1 受容体欠損マウスにおいて抗原特異的 IgE の誘導の低下が観察された。さらに、微粒子の注入と抗原の曝露により異所性リンパ組織である iBALT の形成が認められるが、IL-1 受容体欠損ではこの iBALT 形成が減少していた。また、肺の樹状細胞の除去により IgE 誘導と iBALT 形成が消失したが、濾胞性ヘルパー T 細胞欠損マウスにおいても同様に IgE 誘導と iBALT 形成が消失した。これらの結果より、IL-1 により誘導される樹状細胞や濾胞ヘルパー T 細胞の活性化が iBALT 形成に重要であり、また iBALT 形成が IgE 誘導に関与する可能性が示唆された。

次に、微粒子の性質と IgE の誘導との関係について検討した。微粒子にはアレルギー性炎症を誘導しやすい (IgE を誘導しやすい) ものと、アレルギー性炎症を誘導しにくい (IgE を誘導しにくい) 微粒子が存在するが、IgE の誘導が認められる微粒子は肺胞マクロファージの細胞死を誘導する特性を有していた。さらに肺胞マクロファージの細胞死により死細胞由来因子である IL-1 α の放出が観察された。IgE を誘導しにくい微粒子では肺胞マクロファージの細胞死も IL-1 α の放出も認められなかった。

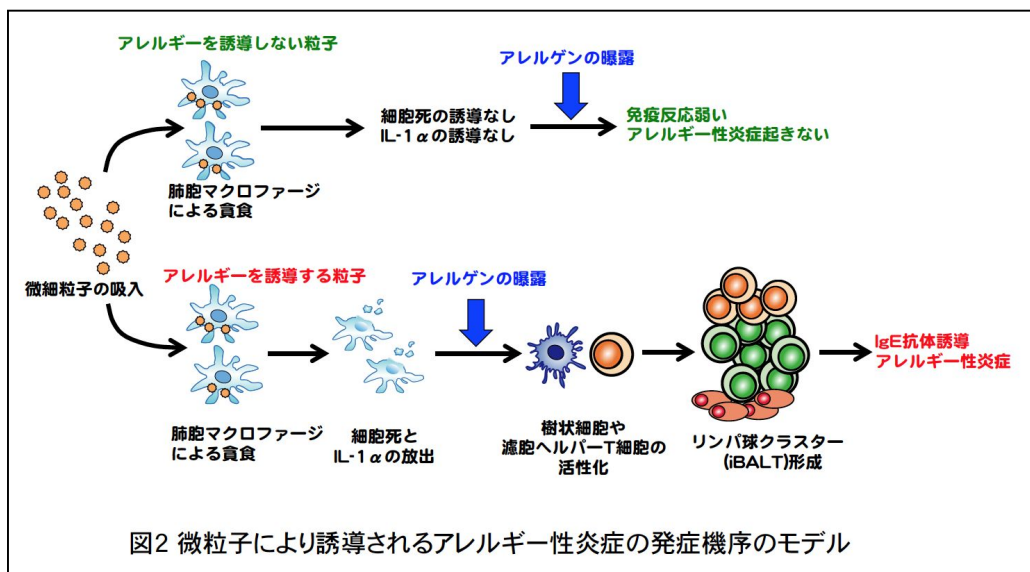
さらに *in vivo* における効果として、微粒子を気管内注入した後の肺の組織を解析したところ、アレルギー性炎症を引き起こしやすい微粒子の気管内注入では、肺胞マクロファージの減少と細胞死の指標である DNA の放出および IL-1 の誘導が認められた。一方、アレルギー性炎症を引き起こしにくい微粒子を投与しても肺胞マクロファージの細胞死は認められず、DNA の放出および IL-1 の誘導も認められなかった。これらの結果から、*in vivo* においても *in vitro* と同様に肺胞マクロファージの細胞死が IL-1 α の放出を介してアレルギー性炎症発症の引き金になっていると考えられた。

以上の結果から、微細粒子を貪食した肺胞マクロファージによる細胞死と死細胞由来因子である IL-1 α がアレルギー性炎症の誘導に深く関与すると考えられた。以上の結果を図 2 に示す。

微粒子の気管内注入と OVA の曝露により形成される肺の異所性リンパ節である iBALT がアレルギー性炎症と IgE の誘導に重要であると考えられたので、iBALT の性質について詳細に解析した。微粒子の投与と OVA の曝露により誘導された iBALT は、OVA 曝露の 3 ヶ月後も消失することなく存在していた。このときのマウスの血清中では抗原特異的 IgE が認められた。このことから iBALT 形成が慢性的なアレルギー性炎症と IgE の誘導に関与すると推察された。また、アレルゲンとして OVA に代わりダニ抗原を用いて同様の実験を行った。微粒子のアジュバント効果により OVA と同様にダニ抗原に対しても抗原特異的 IgE 誘導の増強が認められ、さらに肺組織においては多量の iBALT 形成が認められた。この iBALT 形成が実際に IgE 誘導に関与するかを検討する目的で、IgE リポーターマウスを用いて IgE 産生細胞の分布を調べたところ、iBALT 周辺において IgE 産生細胞が認められた。これらの結果より、iBALT は微粒子とアレルゲンの吸入により引き起こされる IgE 産生細胞の誘導の場として機能することが示唆された。

最後に IgE 誘導における CpG ODN の効果について検討した。微粒子であるアラムを気管内注入する際に同時に CpG ODN を投与し、その後 OVA の曝露を数回行った。血清中の抗原特異的 IgE を測定したところ、CpG ODN 投与群において IgE 量の有意な低下が認められた。これらの結果は微粒子に曝露される際に CpG ODN を予防的に投与することでアレルギー性炎症が抑えられることを示している。現在は継続して、OVA 曝露の前後でも CpG ODN が効果的に IgE を抑えるか

否かを検討し、予防のみならず治療への応用が可能かを検討している。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

- 1) Pulmonary phagocyte-derived NPY controls the pathology of severe influenza virus infection.
Fujiwara S, Hoshizaki M, Ichida Y, Lex D, Kuroda E, Ishii KJ, Magi S, Okada M, Takao H, Gandou M, Imai H, Hara R, Herzog H, Yoshimura A, Okamura H, Penninger JM, Slutsky AS, Uhlig S, Kuba K, Imai Y
Nature microbiology 4(2) 258-268 2019年 査読あり
doi: 10.1038/s41564-018-0289-1.
- 2) Immunological association of inducible bronchus-associated lymphoid tissue organogenesis in Ag85B-rHPIV2 vaccine-induced anti-tuberculosis mucosal immune responses in mice.
Nagatake T, Suzuki H, Hirata SI, Matsumoto N, Wada Y, Morimoto S, Nasu A, Shimojou M, Kawano M, Ogami K, Tsujimura Y, Kuroda E, Iijima N, Hosomi K, Ishii KJ, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J
International immunology 30(10) 471-481 2018年 査読あり
doi: 10.1093/intimm/dxy046.
- 3) Combination and inducible adjuvants targeting nucleic acid sensors.
Temizoz B, Kuroda E, Ishii KJ
Current opinion in pharmacology 41 104-113 2018年 査読あり
doi: 10.1016/j.coph.2018.05.003.
- 4) アレルギー研究最前線 基礎研究の最前線 II:上皮細胞,炎症細胞など 微細粒子吸入とアレルギー性炎症
黒田悦史,石井健
医学のあゆみ 265(9) 779 784 2018年 査読なし
- 5) Unravelling how adjuvants work, and what their roles are in vaccination and allergy.
黒田悦史
IMPACT 2018(3) 44-46 2018年 査読なし
doi: 10.21820/23987073.2018.3.44
- 6) 血管炎とアレルギー疾患 内因性・外因性アジュバントの関わり I.微細粒子による IL 1 誘導とアレルギー性炎症
黒田悦史,小張真吾, 日下部峻斗,石井健
アレルギー・免疫 25(6) 740 747 2018年 査読なし
- 7) 微細粒子吸入によるアレルギー性炎症発症機序の解析-肺胞マクロファージの細胞死と三次リンパ節(iBALT)形成-
黒田悦史,森本泰夫,石井健
分子呼吸器病 22(1) 88 91,viii 2018年査読なし
- 8) Carbonate Apatite Nanoparticles Act as Potent Vaccine Adjuvant Delivery Vehicles by Enhancing Cytokine Production Induced by Encapsulated Cytosine-Phosphate-Guanine

- Oligodeoxynucleotides.
Takahashi H, Misato K, Aoshi T, Yamamoto Y, Kubota Y, Wu X, Kuroda E, Ishii KJ, Yamamoto H, Yoshioka Y
Frontiers in immunology 9 783 2018 年 査読あり
doi: 10.3389/fimmu.2018.00783.
- 9) DAMP-Inducing Adjuvant and PAMP Adjuvants Parallely Enhance Protective Type-2 and Type-1 Immune Responses to Influenza Split Vaccination.
Hayashi T, Momota M, Kuroda E, Kusakabe T, Kobari S, Makisaka K, Ohno Y, Suzuki Y, Nakagawa F, Lee MSJ, Coban C, Onodera R, Higashi T, Motoyama K, Ishii KJ, Arima H
Frontiers in immunology 9 2619 2018 年 査読あり
doi: 10.3389/fimmu.2018.02619.
- 10) Particulates Induce Type-2 Immune Responses.
Kuroda E, Ishii KJ
Nihon eiseigaku zasshi. Japanese journal of hygiene 72(1) 27-31 2017 年 査読なし
- 11) Allergic Responses Induced by the Immunomodulatory Effects of Nanomaterials upon Skin Exposure.
Yoshioka Y, Kuroda E, Hirai T, Tsutsumi Y, Ishii KJ
Frontiers in immunology 8 169 2017 年 査読あり
doi: 10.3389/fimmu.2017.00169.
- 12) Instillation of Particulate Suspensions to the Lungs
Kuroda E, Morimoto Y, Ishii KJ
Bio-protocol 7(22) 1-6 2017 年 査読あり
doi: 10.21769/BioProtoc.2618
- 13) 職業・環境アレルギーの最前線 I. 微細粒子吸入によるアレルギー性炎症発症のメカニズム
黒田悦史, 小張真吾, 日下部峻斗, 石井健
アレルギー・免疫 24(11) 1448-1454, 1435 2017 年 査読なし
- 14) 自然免疫に関する新規知見と発展 微細粒子吸入によるアレルギー性炎症における IL-1 と異所性リンパ組織の役割
黒田悦史, 小張真吾, 日下部峻斗, 石井健
月刊臨床免疫・アレルギー科 68(4) 409-415 2017 年 査読なし
- 15) Basic Science 細胞死のシグナルと内因性アジュバント 細胞ダメージによる核酸の認識機構とアジュバント活性
日下部峻斗, 黒田悦史, 石井健
炎症と免疫 25(5) 363-371 2017 年 査読なし
- 16) Inhaled Fine Particles Induce Alveolar Macrophage Death and Interleukin-1 Release to Promote Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation.
Kuroda E, Ozasa K, Temizoz B, Ohata K, Koo CX, Kanuma T, Kusakabe T, Kobari S, Horie M, Morimoto Y, Nakajima S, Kabashima K, Ziegler SF, Iwakura Y, Ise W, Kurosaki T, Nagatake T, Kunisawa J, Takemura N, Uematsu S, Hayashi M, Aoshi T, Kobiyama K, Coban C, Ishii KJ
Immunity 45(6) 1299-1310 2016 年 査読あり
doi: 10.1016/j.immuni.2016.11.010.
- 17) Evaluation of Pulmonary Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles Following Inhalation and Intratracheal Instillation.
Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Oyabu T, Myojo T, Kawai K, Yatera K, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Kitajima S, Kuroda E, Kawaguchi K, Sasaki T
International journal of molecular sciences 17(8) 2016 年 査読あり
doi: 10.3390/ijms17081241.
- 18) Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics.
Temizoz B, Kuroda E, Ishii KJ
International immunology 28(7) 329-338 2016 年 査読あり
doi: 10.1093/intimm/dxw015.
- 19) RNA is an Adjuvanticity Mediator for the Lipid-Based Mucosal Adjuvant, Endocine.
Hayashi M, Aoshi T, Ozasa K, Kusakabe T, Momota M, Haseda Y, Kobari S, Kuroda E, Kobiyama K, Coban C, Ishii KJ
Scientific reports 6 29165 2016 年 査読あり
doi: 10.1038/srep29165.
- 20) Intranasal hydroxypropyl- β -cyclodextrin-adjuvanted influenza vaccine protects against sub-heterologous virus infection.
Kusakabe T, Ozasa K, Kobari S, Momota M, Kishishita N, Kobiyama K, Kuroda E, Ishii KJ
Vaccine 34(27) 3191-3198 2016 年 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

- 1) 免疫学者の dirty little secret に挑む ～アジュバントの作用機序解析～ (招待講演)
黒田悦史
第18回遺伝子・デリバリー研究会 夏季セミナー 平成30年、福岡
- 2) Inhaled fine particles induce allergic inflammation in the lungs (シンポジウム講演)
Kuroda E and Ishii KJ
ICOH International Congress 平成30年、アイルランド(ダブリン)
- 3) Mechanisms of allergic inflammation induced by inhaled fine particles (シンポジウム講演)
Kuroda E
The 9th International Symposium of IFRc 平成30年、大阪
- 4) アジュバントによる免疫活性化のメカニズム ～免疫制御因子としてのデンジャーシグナル～ (教育講演)
黒田悦史、石井健
第44回日本毒性学会学術年会 平成29年、神奈川
- 5) 微細粒子による肺の炎症とアレルギー (シンポジウム講演)
黒田悦史、石井健
第23回日本免疫毒性学会学術年会 平成28年、福岡
- 6) 微細粒子によるアレルギー性炎症発症のメカニズム (シンポジウム講演)
黒田悦史
第86回日本衛生学会学術総会 平成28年、北海道

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ライフサイエンス新着論文レビュー

「微細粒子の吸入は肺胞マクロファージの細胞死およびインターロイキン1 の放出を引き起こし肺において誘導性気管支関連リンパ組織の形成を促進する」

黒田悦史、石井健

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/15072>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森本 泰夫

ローマ字氏名：Morimoto Yasuo

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：産業生態科学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁): 30258628

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。