

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01807

研究課題名(和文) 受動喫煙による肺胞マクロファージへの影響とアレルギー発症の関連について

研究課題名(英文) Effect of smoking on alveolar macrophage and pathogenesis of allergy

研究代表者

竹内 実 (TAKEUCHI, Minoru)

京都産業大学・生命科学部・教授

研究者番号：70257773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙群では、非喫煙群に比較して、肺炎症の程度がより強く認められ、喫煙によるスギ花粉吸入によるアレルギー炎症の増悪が認められた。この喫煙によるアレルギー炎症増悪には、喫煙によるAMのIL-4発現の有意な増加とIL-4産生の機構に関わる因子であるIL-12とTGF- $\beta$  mRNA発現が喫煙により影響されたことが関連していることが考えられる。また、ヘルパーT細胞型(Th2)への分化を誘導する転写因子であるGATA3の発現が、喫煙により増加したことが、IL-4産生増強に関連し、喫煙により肺胞マクロファージを介し、スギ花粉アレルギーに対する肺でのアレルギー反応が増悪された可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タバコ副流煙を含む受動喫煙による健康への影響は重要な社会問題である。しかし、受動喫煙とアレルギー発症の関係についての実験科学的な研究は殆どない。特に、肺の初期免疫で重要な役割をしている肺胞マクロファージに着目し、受動喫煙の影響とアレルギー発症の関係を絞った研究は国内、国外ともにされていない。本研究は、受動喫煙による影響を正確に客観的に評価出来る系を用いて、受動喫煙による肺胞マクロファージの遺伝子変異への影響とアレルギー発症の関連について研究し、受動喫煙の影響を分子免疫学的に解明した。本研究により、受動喫煙とアレルギー肺炎症発症への影響を示すことは学術的や社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary inflammation was stronger in the smoking group compared with non-smoking, and allergy inflammation of the cedar pollen inhalation was exacerbated by the smoking. This exacerbation by the smoking is thought that IL-12 and TGF- $\beta$  that are factors related with mechanism of increase of the IL-4 expression of AM were influenced by smoking. In addition, the expression of GATA3 which is a transcription factor inducing differentiation to helper T cell type II (Th2) was increased by smoking. These results are suggested the possibility that the allergic reaction in the lungs for the cedar pollen allergen was exacerbated through alveolar macrophage by smoking.

研究分野：応用健康科学

キーワード：喫煙 肺胞マクロファージ アレルギー スギ花粉

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

喫煙が健康に対し、悪影響を及ぼすことは知られているが、実験データをもとにした科学研究は少ない。喫煙防止教育を行う上でも、喫煙に対する科学的データを基にして教育する必要がある。喫煙に関する研究は、能動喫煙すなわちタバコ主流煙を用いた研究が多く、受動喫煙すなわち副流煙による健康への影響についての研究は少なく、特に受動喫煙とアレルギー発症による健康への影響についての遺伝子レベルでの科学的な研究は、国内・国外ともに殆どされていない。これまで、タバコ主流煙喫煙により肺の免疫細胞である肺胞マクロファージ、NK細胞の表面抗原、サイトカインの遺伝子発現及び細胞傷害活性の低下、癌の肺転移と活性酸素の産生が促進されることをマウス、ヒトについて報告してきた (Respiration,68:262-267,2001, 臨床免疫 44:546-550,2005, Respiration 77:91-95,2009)。また、マウスに一定量のタバコ主流煙を喫煙させ、タバコ喫煙により肺胞マクロファージから活性酸素の産生が促進され、喫煙による過剰な活性酸素により肺上皮組織及び免疫細胞のDNA損傷が誘導され、肺胞マクロファージに異常が引き起こされることを解明し、タバコ喫煙が健康に及ぼす影響を明らかにした (Inhal Toxicol 21:1229-35, 2009, Advances in Bioscience and Biotechnology,4:1-7,2013)。肺に免疫細胞が移動する速度も可視化できる系により測定した (Evid Based Complement Alternat Med 1:1-7,2011)。喫煙が肺免疫系に影響を及ぼし炎症を引き起こすことも報告した (Inhal Toxicol 20:623-633,2008)。喫煙が肺免疫系に影響し健康に影響を及ぼすことを報告してきた (Inter J Biosc Biochem Bioinf 3:125-128,2013, Inhal Toxicol in press)。タバコ副流煙と主流煙には多くの有害物質が含まれており、健康なヒトへの影響が社会的にも大きな問題となっている (FEMS Microbiology Letters 317:109-116,2011)。タバコ主流煙喫煙とアレルギーの関係については報告したが (アレルギーの臨床 36:70-73,2016)、受動喫煙による肺胞マクロファージのアレルギー発症への影響については、まだ国内・国外ともに科学的な解明はされていない。そこで、これまでの喫煙の研究成果を踏まえて、受動喫煙による健康への影響を解明することは大変意義があると考え、受動喫煙すなわちタバコ副流煙の肺の初期免疫で重要な肺胞マクロファージへの影響とアレルギー発症との関係について着目した。既にレーザー粒子測定装置を装着させ、タバコ副流煙の粒子量、粒子サイズ、粒子濃度をリアルタイムでモニター出来るタバコ副流煙自動喫煙設備を作成し、マウスにタバコ副流煙を、一定量、一定濃度、一定期間、均一に暴露させることが出来、副流煙の影響を正確に客観的に評価できる系を確立している。喫煙が肺免疫系の初期免疫応答で重要な肺胞マクロファージに影響を及ぼすことを認めたが、影響を受けた肺胞マクロファージが、今回スギ花粉に対するアレルギー発症にどのような影響を及ぼしているかについて、細胞、遺伝子レベルで殆ど解明されていない。そこで本研究では、これまでの主流煙の喫煙研究を進展させ、タバコ副流煙による肺免疫の重要な役割を担っている肺胞マクロファージへの影響がスギ花粉に対してどのような免疫応答をするのかについて、これまで行ってきた喫煙研究をもとに受動喫煙による肺胞マクロファージがアレルギー発症にどのように関連するかを解明することは、健康科学上大変意義がある。

### 2. 研究の目的

タバコ副流煙を含む受動喫煙による健康への影響は重要な社会問題である。しかし、受動喫煙とアレルギー発症の関係についての実験科学的な研究は殆どない。特に、肺の初期免疫で重要な役割をしている肺胞マクロファージに着目し、受動喫煙の影響とアレルギー発症の関係に焦点を絞った研究は国内、国外ともにされていない。本研究は、リアルタイムでタバコ副流煙の粒子数、濃度を測定できる受動喫煙自動装置を作成し、マウスにタバコ副流煙を一定量均一に吸入させ、受動喫煙による影響を正確に客観的に評価出来る系を用いて、受動喫煙による肺胞マクロファージの遺伝子変異への影響とアレルギー発症の関連について研究し、受動喫煙の影響を分子免疫学的に解明し、受動喫煙によるアレルギー疾患発症の予防に役立てることが目的である。

### 3. 研究の方法

主要設備である自主製作したタバコ自動受動喫煙・副流煙喫煙装置にレーザー粒子測定装置を装着させ、副流煙の粒子量、粒子サイズ、粒子濃度をリアルタイムでモニター出来る受動喫煙・タバコ副流煙自動喫煙設備を作成し、C57BL/6、雌、8週齢マウスに一定量、一定期間(10日間)、モニターNo.2 リファレンスタバコの副流煙を喫煙させ、受動喫煙マウスを作製した。受動喫煙後、日本スギ花粉粒子(100%)を麻醉下で、マウスに噴霧器を用いて一定濃度噴霧して吸入させた。スギ花粉を噴霧後、マウスを麻醉死させ、主気管支を露出後注射器で主気管支内にPBSを1ml注入し回収する操作(気管支肺胞洗浄法)により肺胞マクロファージを採取し、気管支肺胞洗浄液を回収した。同時に肺組織を採取した。回収した気管支肺胞洗浄液を1000rpm、10分遠心し、上清を除去後、RPMI1640で懸濁し肺胞マクロファージ細胞浮遊液を調製した。懸濁した肺胞マクロファージを一定濃度に調整後、サイトスピン標本を作製し、メイ・ギムザ染色を行い、細胞分画成分を測定した。調整した肺胞マクロファージ浮遊液の一定濃度をFACSでDot plot解析し、細胞サイズ(FSH)と細胞内構造の緻密さ(SSC)により、肺胞マクロファージがタバコ副流煙に曝露されているか否かを正確に評価した。その後、異物認識レセプターに対する肺胞マクロファージの細胞表面抗原の発現についても、それらの抗原に対するモノクローナル抗体を使用し、受動喫煙による影響を検討した。また、脾臓のTリンパ球を用いて、Th1とTh2分化への影響について、Th2の分化を誘導する転写因子であるGATA3のmRNA発現をRT-PCRで検出し、Th2

サイトカインである IL-4 の産生について、FACS により測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Cjp による肺胞マクロファージの IL-4 産生とサイトカイン mRNA 発現に対する喫煙の影響

7~8 週齢の BALB/c 雌の非喫煙 (Non smoke : NS) 群と自動喫煙装置 (M.I.P.S.) を用いて、10 日間喫煙をさせた喫煙 (Cigarette smoke : CS) 群のマウスに、スギ花粉 (Cjp) を 500  $\mu$ g 気管支内投与し、NS+Cjp、CS+Cjp 群とし、気管支肺胞洗浄 (Broncho Alveolar Lavage: BAL) により、肺免疫細胞を回収した。IL-4 は IgE 抗体産生促進により、アレルギー発症を促進するサイトカインである。Cjp による AM の IL-4 産生は、CS により有意に ( $p < 0.05$ ) 増強された (図 1)。Th1 の分化を誘導する IL-12 と Th1 の分化を抑制する TGF- $\beta$  について検討した。IL-12 mRNA 発現は、CS により有意な ( $p < 0.01$ ) 減少が認められ、TGF- $\beta$  mRNA 発現は、CS により有意な ( $p < 0.001$ ) 増加が認められた (図 1)。CS による IL-12、TGF- $\beta$  への影響について、タバコ煙抽出物によるヒト樹状細胞の IL-12 産生の抑制と喫煙によりラットの BALF 中の TGF- $\beta$  が増加する報告があり、今回の結果と同様であった。これらの結果から、CS は Cjp 投与による AM の IL-4 産生を増加させ、Th2 の分化誘導をすることで、アレルギー発症を促進する可能性が示唆された。

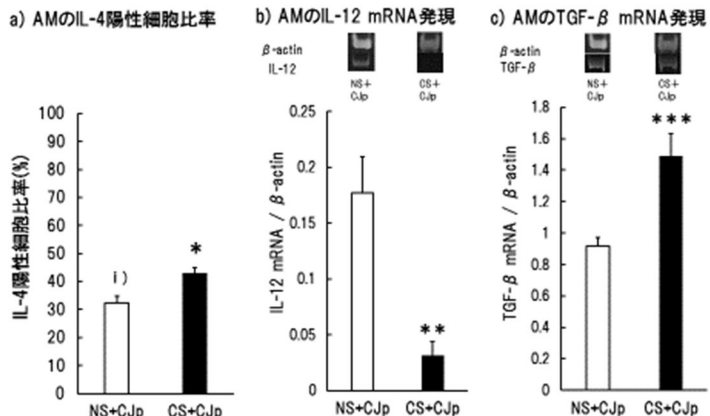


図1 CjpによるAMのサイトカイン産生・mRNA発現に及ぼすCSの影響

NS:非喫煙, CS:喫煙, Cjp:スギ花粉, i):mean $\pm$ S.E., \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

##### (2) 喫煙によるTリンパ球への影響

AM が Th2 を誘導していることが示された結果から、脾臓の Tリンパ球を用いて、Th1 と Th2 分化への影響について検討した。Th2 の分化を誘導する転写因子である GATA3 は、CS により有意な ( $p < 0.001$ ) 増加が認められた (図 2)。また、Th2 サイトカインである IL-4 の産生増加の傾向が認められた (図 2)。これらの結果から、CS は Tリンパ球に対して、転写因子 GATA3 の発現を増加し、Th2 を誘導している可能性が示唆された。以上より、Cjp による免疫応答に対して、CS は AM の IL-12 の産生を抑制させ、その結果 AM の IL-4、TGF- $\beta$  の産生が増加し、Tリンパ球の転写因子 GATA3 を介して、Th2 を誘導する可能性が示され、CS が Cjp によるアレルギー発症を促進する可能性が示唆された。

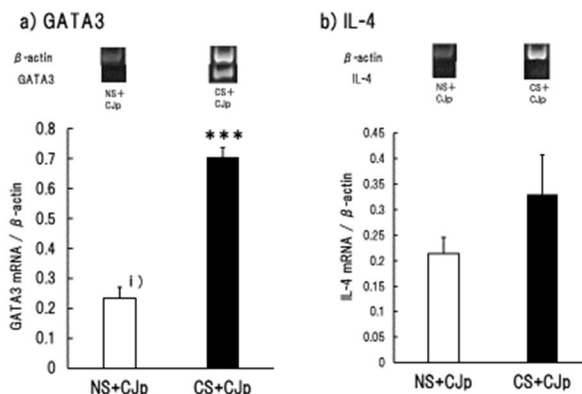


図2 Tリンパ球のサイトカインmRNA発現

NS:非喫煙, CS:喫煙, Cjp:スギ花粉, i): mean $\pm$ S.E., \*\*\*:  $p < 0.001$

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chika Kanamori, Minoru Takeuchi	4. 巻 2
2. 論文標題 Smoking, Cryptomeria Japonica Pollen and Immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 287-290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金森千香、竹内実	4. 巻 38
2. 論文標題 スギ花粉による肺マクロファージ、T細胞の免疫応答と喫煙の影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 83-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金森千香、竹内実	4. 巻 38
2. 論文標題 タバコ喫煙とスギ花粉アレルギーの関係	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 72-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 竹内実	4. 巻 37
2. 論文標題 タバコ煙とスギ花粉アレルギー吸入による肺免疫応答	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 70-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 竹内実	4. 巻 70
2. 論文標題 蜂蜜の秘密を探る	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 化学と工業	6. 最初と最後の頁 1280-1283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 湯浅愛里、田中美子、宇野真由奈、金森千香、竹内実	4. 巻 16
2. 論文標題 日本国産ハチミツの免疫細胞とLipopolysaccharide (LPS) 誘導性肺炎症に及ぼす影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 京都産業大学先端科学技術研究所所報	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 竹内実	4. 巻 37
2. 論文標題 喫煙のスギ花粉吸入に及ぼす影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 69 - 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 竹内実	4. 巻 37
2. 論文標題 喫煙とスギ花粉アレルギーの吸入	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 64 - 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Honami Nakata, Saki Hamada, Yuki Hirano, Minoru Takeuchi
2. 発表標題 Honami Nakata, Saki Hamada, Yuki Hirano, Minoru Takeuchi Effect of cigarette smoking on M1/M2 type Alveolar Macrophage (AM) and the restore of AM by smoking cessation
3. 学会等名 48th Annual meeting of Japanese Society for immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Hirano, Saki Hamada, Honami Nakata, Minoru Takeuchi
2. 発表標題 Cigarette smoke inhibit expression of CD11c surface antigen of lung neutrophils induced by LPS in mice
3. 学会等名 48th Annual meeting of Japanese Society for immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saki Hamada, Yuki Hirano, Honami Nakata, Hiroki Takakuwa, Minoru Takeuchi
2. 発表標題 Effect of cigarette smoke on influenza virus infection in mice
3. 学会等名 48th Annual meeting of Japanese Society for immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Takeuchi, M. Uno, Y. Hirano, S. Hamada, H. Nakata, A. Kawazoe, K.E. Pinkerton
2. 発表標題 Effect of honey with associated antioxidant on Lipopolysaccharide (LPS) induced lung inflammation in mice
3. 学会等名 2019 EMGS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 M. Takeuchi, M. Uno, Y. Hirano, S. Hamada, H. Nakata, A. Kawazoe, K.E. Pinkerton
2 . 発表標題 Anti-inflammatory effect of honey on pulmonary inflammation associated with neutrophil by lipopolysaccharide (LPS) in mice
3 . 学会等名 FOCIS 2019 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Minoru Takeuchi, Chika Kanamori, Yuki Hirano, Saki Hamada, Mauna Uno, Honami Nakata, Kent E Pinkerton
2 . 発表標題 Effects of cigarette smoke on the immunological mechanisms of development of pulmonary pollen allergy
3 . 学会等名 ATS 2019 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 M. Takeuchi, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Hirono, Y. Tanaka, K. Koike, N. Ishida, KE. Pinkerton
2 . 発表標題 SECONDHAND TOBACCO SMOKE INDUCE INHIBITION OF IMMUNE FUNCTIONS AND DNA DAMAGE OF ALVEOLAR MACROPHAGE IN MICE
3 . 学会等名 2019 SRNT 25th Annual Meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yuki Hirano, Saki Hamada, Mayuna Uno, Minoru Takeuchi
2 . 発表標題 Effect of cigarette smoking on functions of LPS-induced lung neutrophil in mice
3 . 学会等名 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Saki Hamada, Yuki Hirano, Mayuna Uno, Shinichi Inoue, Hiroki Takakuwa, Minoru Takeuchi
2 . 発表標題 Effect of cigarette smoke extract on expressions of cell surface receptors and DNA damage in macrophage
3 . 学会等名 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Uno Mayuna, Hirano Yuki, Hamada Saki, Takeuchi Minoru
2 . 発表標題 Anti-inflammatory effect of Japanese honey on Lipopolysaccharide (LPS) induced lung inflammation in mice
3 . 学会等名 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 M. Takeuchi, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Hirono, Y. Tanaka, K. Koike, N. Ishida, KE. Pinkerton
2 . 発表標題 Toxicity of Secondhand Tobacco Smoke on Immune Functions of Alveolar Macrophages in Mice
3 . 学会等名 STP Annual Symposium 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Minoru Takeuchi, Masahito Nose, Chika Kanamori, Yoshiko Tanaka, Kent E Pinkerton
2 . 発表標題 Effect of cigarette smoke on immune response to pollen allergen in the lung
3 . 学会等名 ATS 2018 International Conference ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年



1 . 発表者名 M. Takeuchi, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Hirono, Y. Tanaka, K. Koike, N. Ishida, KE. Pinkerton
2 . 発表標題 Immuno-toxicity of Cigarette Smoke on Immune Functions and DNA damage in Alveolar Macrophages
3 . 学会等名 ACMT 15th Annual Scientific Meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 M. Takeuchi, Y. Tanaka, C. Kanamori, M. Uno, M. Takasaki, Y. Hirono
2 . 発表標題 Cigarette smoke induced alteration of cell structure and immune function via DNA damage in alveolar macrophage
3 . 学会等名 BPS 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Chika Kanamori, Mayuna Uno, Yuki Hirano, Nose Masahito, Minoru Takeuchi
2 . 発表標題 Effects of Cryptomeria Japonica Pollen and Cigarette Smoke on Immune Response
3 . 学会等名 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Minoru Takeuchi, Chika Kanamori, Yoshiko Tanaka, Ayaka Kawazoe, Naoko Miwa
2 . 発表標題 Effect of Hot Water Extract from Agaricus Blazei Murill on Lipopolysaccharide (LPS)-induced Lung Inflammation and the Immunological Mechanism
3 . 学会等名 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Takeuchi, Y. Tanaka, C. Kanamori, M. Uno, M. Takasaki, Y. Hirono
2. 発表標題 Evaluation of Effect of Cigarette Smoking on Immune Functions and Alteration of Cell Internal Structure in Alveolar Macrophage by Using Flow Cytometry
3. 学会等名 ICCS 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Minoru Takeuchi, Ayaka Kawazoe, Naoko Miwa, Mayuna Uno, Chika Kanamori, Yoshiko Tanaka and Kent E Pinkerton
2. 発表標題 Effect of Cigarette Smoking and Hot Water Extract from Agaricus blazei Murill on Lipopolysaccharide (LPS)-induced Lung Inflammation in Mice
3. 学会等名 ATS 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Takeuchi, A. Kawazoe, Y. Tanaka, K. E. Pinkerton
2. 発表標題 Effect of Cigarette Smoke and Honey on Lung Inflammation by Lipopolysaccharides (LPS) in Mice
3. 学会等名 The 11th PVRI Annual World Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹内実	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 103
3. 書名 喫煙を科学する	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都産業大学先端科学技術研究所所報

[https://ksu.repo.nii.ac.jp/?action=pages\\_view\\_main&active\\_action=repository\\_view\\_main\\_item\\_detail&item\\_id=9943&item\\_no=1&page\\_id=13&block\\_id=21](https://ksu.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=9943&item_no=1&page_id=13&block_id=21)

京都産業大学生命科学研究科竹内研究室ホームページ

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~mtakex/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----