

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10025

研究課題名（和文）ナノ粒子の表面特性がアレルギー疾患に及ぼす影響とその早期分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effects of surface properties of nanoparticles on allergic diseases and their early molecular events

研究代表者

本田 晶子（Akiko, Honda）

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号：20454324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、表面特性の異なるナノ粒子によるアレルギー性疾患に対する作用とそのメカニズムを、生体・免疫応答の早期分子機構に焦点を当てて解明することである。ある種のナノ粒子の表面修飾は、アレルゲン存在下、あるいは、非存在下において、ナノ粒子の特性を変化させ、気道上皮細胞のIL-6を介した催炎症性反応、抗原提示細胞による卵白アルブミンのプロセッシングや細胞表面分子の増加、並びに2型自然リンパ球の機能調節を行うことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、環境汚染物質の健康影響が様々存在する中で、先進国や都市部、若年層を中心に増加し、罹患患者が多いアレルギー疾患に共通するアレルギー反応を対象とし、環境汚染物質の中でも、ナノ粒子の表面特性の健康影響に注目した点、近年、その仕組みが明らかとなった生体・免疫応答の早期における分子機構に及ぼす影響を解明した点に学術的意義がある。アレルギー応答に寄与する表面特性を有したナノ粒子を見出し、ナノ粒子の新たな利用・規制・管理システムの構築の重要性を社会に提言できる点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the effects of nanoparticles with different surface properties on allergic diseases and their mechanisms, focusing on the early molecular events of biological and immune responses. Surface modification of certain nanoparticles altered their properties in the presence or absence of allergens, leading to IL-6-mediated pro-inflammatory responses in airway epithelial cells and increasing processing of ovalbumin by antigen-presenting cells and the expression of cell surface molecules, and regulating the function of type 2 innate lymphocytes.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ナノ粒子 アレルギー 表面修飾

### 1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子は、100 nm 以下の極微小な粒子状の物質である。化粧品、家電製品、電子機器、塗料・インク等、身近な生活用品にもしばしば使用されるようになり、一般環境における呼吸や皮膚を介した曝露機会が増加している。ナノ粒子は、その粒径の小ささから、気管支、肺や皮膚に沈着した後、体内へ侵入し、呼吸器系や免疫系、特に、気管支喘息やアトピー性皮膚炎に影響を及ぼす可能性が指摘されている。これまでに、カーボンブラック、酸化チタン、ポリスチレンをはじめとするナノ粒子が、アレルギー性気管支喘息やアトピー性皮膚炎の病態を悪化させることが報告されている。しかし、ナノ粒子の小ささや、粒子そのものの材質に注目した研究が多く、未だに一部のナノ粒子のアレルギー悪化作用が検討されているに過ぎない。近年、ナノ粒子の分散制御や耐候性の向上等のため、ナノ粒子の表面を修飾し、その機能を向上させる技術が飛躍的に発展しているが、その健康影響は不明である。また、一部のナノ粒子が、好酸球性炎症や肥満細胞脱顆粒、抗体産生の増加等、免疫応答の下流のイベントを、悪化させることは明らかにされているが、ナノ粒子との物理化学的接点である上皮細胞、免疫応答の開始細胞である樹状細胞(抗原提示細胞)や2型自然リンパ球など、ナノ粒子が、生体・免疫応答のより上流、あるいは、より早期に起こるイベント及ぼす影響については、十分に明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、表面特性の異なるナノ粒子によるアレルギー性疾患に対する作用とそのメカニズムを、生体・免疫応答の早期分子機構に焦点を当てて解明することである。具体的には、表面特性の異なる数種類のナノ粒子を、経気道的に侵入するナノ粒子と最初の物理化学的接点である気道上皮細胞と免疫応答の上流に位置する免疫担当細胞に注目した。具体的には、(1) 表面特性の異なるナノ粒子の粒径分布、(2) 表面特性の異なるナノ粒子が上皮細胞に及ぼす影響、(3) 表面特性の異なるナノ粒子が抗原提示細胞に及ぼす影響、(4) 表面特性の異なるナノ粒子が、2型自然リンパ球に及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 表面特性の異なるナノ粒子の粒径分布

りん酸緩衝液中、アレルゲンである卵白アルブミン不含培地中、卵白アルブミン含有培地中において、各種ナノ粒子の粒径分布を動的光散乱法により測定した。

#### (2) 表面特性の異なるナノ粒子が、上皮細胞に及ぼす影響

表面修飾の異なる2種類のナノ粒子と無処理のナノ粒子を、呼吸器との最初の接点である気道上皮細胞に、アレルゲンである卵白アルブミンの存在下および非存在下に曝露し、細胞活性、サイトカイン産生等に及ぼす影響を WST-1 アッセイおよび Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay により、それぞれ検討した。

#### (3) 表面特性の異なるナノ粒子が、抗原提示細胞に及ぼす影響

表面修飾の異なる2種類のナノ粒子を免疫応答の開始細胞である抗原提示細胞に、アレルゲンである卵白アルブミンの存在下および非存在下に曝露した。各種ナノ粒子が抗原提示細胞の細胞表面分子の発現に及ぼす影響をフローサイトメトリーを用いて測定した。また、卵白アルブミンのプロセッシングに及ぼす影響を、プロセッシング時に酸性化する細胞内 pH 環境を検出する蛍光プローブと卵白アルブミンとを結合させ、蛍光プレートリーダー並びにタイムラプス観察により測定した。

#### (4) 表面特性の異なるナノ粒子が、2型自然リンパ球に及ぼす影響

マウス腸間膜リンパ節より2型自然リンパ球(Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>)をセルソーターを用いて単離し、各種ナノ粒子を、2型自然リンパ球活性化因子 IL-33 存在下および非存在下において曝露した。その後、2型自然リンパ球より産生される IL-5、IL-13 等の Th2 サイトカインの産生を、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay により、細胞内エラスターゼ活性を、蛍光プレートリーダーによりそれぞれ測定した。

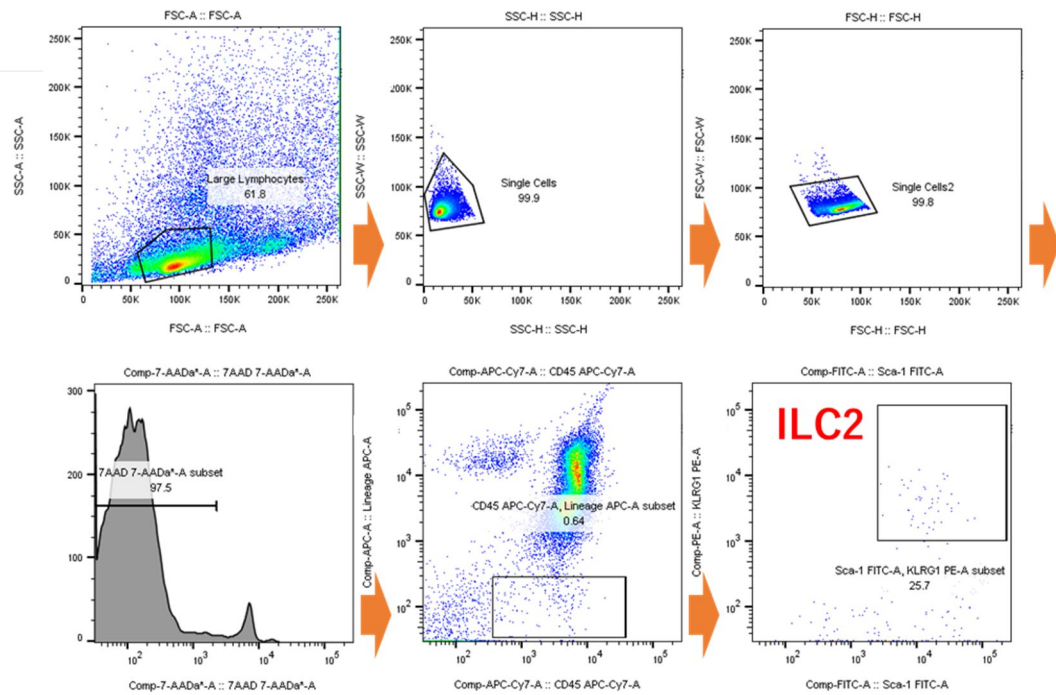


図1. 2型自然リンパ球 (ILC2) 単離のためのゲーティングストラテジー

#### 4. 研究成果

##### (1) 表面特性の異なるナノ粒子の粒径分布

各種ナノ粒子の粒径分布を調べたところ、リン酸緩衝液中と培地中とで粒径の傾向が異なった。

##### (2) 表面特性の異なるナノ粒子が、上皮細胞に及ぼす影響

卵白アルブミンの存在下および非存在下、何れの曝露濃度 (5, 15, 45, 135  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) においても、気道上皮細胞に対する細胞活性の低下は認められなかった。また、ある種の表面修飾をしたナノ粒子が、卵白アルブミンの非存在下において、気道上皮細胞の IL-6 産生を誘導し、無処理のナノ粒子と比較すると、有意に高値を示した。一方、卵白アルブミンの存在下では、卵白アルブミン単独曝露によって、IL-6 の増大が確認されたが、何れのナノ粒子の影響も認められなかった。上皮由来サイトカインの産生変動は、認められなかった。

##### (3) 表面特性の異なるナノ粒子が、抗原提示細胞に及ぼす影響

卵白アルブミンの存在下および非存在下、何れの曝露濃度 (5, 15, 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) においても、細胞活性の低下は認められなかった。また、卵白アルブミンの非存在下では、無処理および表面修飾したナノ粒子の何れも、軽微に細胞表面分子の発現が上昇した。一方、卵白アルブミン存在下では、卵白アルブミン単独曝露によって、細胞表面分子の発現が増加し、表面修飾したナノ粒子が加わることによって、さらに増加した。

卵白アルブミンの存在下および非存在下において、何れの曝露濃度においても、抗原提示細胞に各種ナノ粒子を曝露すると、一部、卵白アルブミンのプロセッシングの増加が認められた。

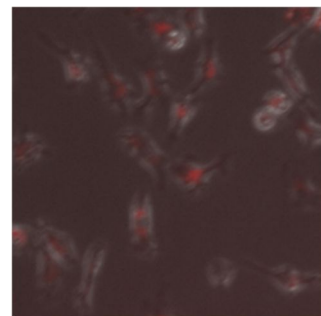


図2. 抗原提示細胞による卵白アルブミンのプロセッシング (赤)

##### (4) 表面特性の異なるナノ粒子が、2型自然リンパ球に及ぼす影響

腸管膜リンパ節より単離した2型自然リンパ球に、IL-33 と表面修飾の異なるナノ粒子を複合曝露したところ、表面修飾したナノ粒子は、表面修飾していないものに比較して、IL-5 や IL-13 が上昇傾向にあった。また、細胞活性においても、IL-33 とナノ粒子との複合曝露では、IL-33 単独曝露と比較して、その活性が上昇する傾向にあった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 本田晶子、長尾慧	4. 巻 36
2. 論文標題 パーソナルケア製品がアレルギーを悪化させるメカニズムの解明ー2型自然リンパ球の役割ー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 環境衛生工学研究	6. 最初と最後の頁 -
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田晶子、高野裕久
2. 発表標題 粒子含有パーソナルケア製品はアレルギー反応を増強する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田晶子、高野裕久
2. 発表標題 環境汚染物質による免疫担当細胞活性化機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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