
研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790431

研究課題名 (和文) 樹状細胞による環境化学物質のアレルギー増悪メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Study on the effects of environmental chemicals on dendritic cells to elucidate the mechanisms of aggravation of allergy by the chemicals

研究代表者

小池 英子 (KOIKE EIKO)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・主任研究員

研究者番号：60353538

研究成果の概要 (和文)：ある種の環境化学物質(大気汚染物質や可塑剤等)は、アレルギー疾患の発症・増悪を誘導する可能性が示唆されているが、その詳細なメカニズムは明らかでない。本研究では、アレルギー増悪のメカニズムを明らかにすることを目的とし、環境化学物質が、免疫応答に中心的な役割を果たしている樹状細胞に及ぼす影響について検討した。本研究結果より、ディーゼル排気微粒子 (DEP) 中の脂溶性化学物質 (DEP-OC) とその含有成分の1つであるベンゾ[a]ピレン (BaP)、可塑剤であるフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) やフタル酸ジisononil (DINP) は、アトピー素因を有するマウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の抗原提示に関わる細胞表面分子やリンパ節への遊走に関わるケモカインレセプターの発現等の活性化マーカーを増加させることを明らかにした。また、当該環境化学物質は、リンパ節で発現しているケモカインに対する BMDC の遊走活性も増加させる傾向がみられ、その増加は関連分子の発現増加に対応することも明らかにした。さらに、DEHP および DINP は、BMDC のダニ抗原特異的な抗原提示機能と Th2 サイトカインの産生誘導を亢進することも明らかにした。本研究で対象とした環境化学物質はそれぞれ特異性が存在するものの、いずれも BMDC の活性化と所属リンパ節への遊走、それに続く抗原提示機能のいずれかあるいは全てを亢進することが明らかとなった。環境化学物質によるアレルギー疾患増悪の一要因には、BMDC の活性化とそれによる Th2 反応の亢進が寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：It has been suggested that some environmental chemicals such as air pollutants and plasticizers can induce and/or exacerbate allergic diseases. However the mechanisms have not been fully elucidated. We investigated the effects of environmental chemicals, diesel exhaust particles (DEP) and their organic chemicals (DEP-OC), benzo[a]pyrene (BaP), and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and diisononyl phthalate (DINP) as principal plasticizers on immune responses. To examine whether these chemicals stimulate antigen-presenting cells in atopic prone mice, we cultured bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and measured their phenotypes and function after exposure to the chemicals. The present study demonstrated that DEP, DEP-OC, BaP, DEHP, and DINP enhanced the expression of activation markers associated with antigen presentation and migration into local lymph nodes on BMDC. Migration activity of BMDC was enhanced by exposure to these chemicals. Furthermore, mite antigen-specific antigen-presenting activity and stimulation of Th2 cytokine production of BMDC were also enhanced by exposure to DEHP and DINP. The mechanisms of the environmental chemical-induced aggravation of allergy might be, at least partly, mediated through the activation of dendritic cells and Th2 responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健、環境免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年のアレルギー疾患の増加には、遺伝的要因に加え、様々な環境要因の変化による影響が懸念されている。これまでの我々等の研究から、環境中に存在する大気汚染物質や微小粒子状物質、可塑剤、添加物等の環境化学物質がアレルギー疾患の病態を増悪する作用を持つことが明らかにされつつある。アレルギー反応/疾患の過程には様々なステップがあるが、中でも抗原提示細胞の炎症部位および所属リンパ節への遊走、抗原の捕食、プロセッシング、T細胞への抗原提示とその後のTh1/Th2分化誘導は初期のステップとして重要である。

(2) 環境化学物質によるアレルギー増悪のメカニズムとして、これまでに、オゾンの吸入曝露やカーボンブラックナノ粒子の経気道曝露が肺の抗原提示細胞数の増加や抗原提示に関わる分子の発現および機能の亢進を誘導すること、ディーゼル排気微粒子 (DEP) に含まれる化学物質の曝露が末梢血単球の抗原提示機能を亢進させることを明らかにしてきた。しかしながら、これらの環境化学物質が抗原提示細胞の分化・成熟・活性化のどのステップにどのように関与しているのかについてはほとんど不明である。

(3) 抗原提示細胞の中で中心的な役割を担う樹状細胞 (DC) は、異なる分化段階のものが生体内に広く分布しており、phenotypeにより機能が異なることも報告されている。DCをはじめとする抗原提示細胞は、炎症部位に遊走し、異物抗原を捕食した後、T細胞に抗原を提示するため所属リンパ節へ遊走する。これらの細胞遊走には、局所の器官・組織における細胞を誘引するケモカインの産生とそれに反応する細胞側におけるケモカイン

レセプターの発現が必要である。また、未熟DCは病原体や異物との相互作用の過程で、Th1/Th2を誘導するように適応するが、アレルギー反応の誘導においてはTh2細胞を活性化する抗原提示細胞としてその分化・成熟が重要な作用を持つと考えられている。DCは世界的にも注目されているが、ほとんどが癌等へのワクチン療法をはじめとする治療を目的とした研究であり、「陰」にあたる毒性評価に関する研究でDCを扱ったものは非常に少ない。特に、アレルギー疾患の病態成立の過程で環境化学物質がDCにどのような影響を及ぼすのかについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) DCの起源は骨髄であり、血中で前駆細胞へと分化し、各組織に移行していく。これより、本研究ではマウス骨髄細胞を培養することにより分化誘導したDCを使用し、実験的にアレルギー疾患を増悪させる作用を持つ環境化学物質 (DEP やそこに含まれる化学物質、可塑剤であるフタル酸エステル類など) が骨髄由来DCの活性化およびその過程における遊走能やT細胞との相互作用に与える影響について検討する。

(2) さらに対象とする物質が、DCの炎症部位および局所リンパ節への遊走、異物抗原の捕食、プロセッシング、T細胞への抗原提示、Th1/Th2バランスの変化に至るどのステップをどのように修飾するかを詳細に検討し、各物質の作用点の相違も明らかにする。影響指標としては、DCの分化・成熟・活性化に関連する分子の発現を解析すると同時に外来抗原の捕食や提示に重要な分子の発現や炎症部位および所属リンパ節への遊走に必要なケモカインレセプターの発現、T細胞との相

相互作用に焦点をあてて検討する。これらの検討により、環境化学物質によるアレルギー増悪メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 雄性NC/Nga マウスの大腿骨より骨髓細胞を採取し、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を添加した培地で培養することにより、骨髓由来 DC (BMDC) を誘導した。環境化学物質は、DEP およびその有機抽出化学物質 (DEP-OC) と残渣粒子、DEP-OC に含有される化学物質のベンゾ[a]ピレン (BaP)、可塑剤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) を対象とした。それぞれ環境化学物質を懸濁する溶媒としては、0.1% DMSO (DEP の場合は、0.1% DMSO/0.05% Tween80) を添加した培地を使用した。

(2) BMDC は、当該環境化学物質に 24 時間曝露した後、活性化マーカーやリンパ節への遊走に関わるケモカインレセプター、抗原の捕食や提示に関わる細胞表面分子等の発現をフローサイトメーターにより、培養上清中のサイトカイン産生は ELISA 法により、抗原提示機能はダニ抗原特異的な T 細胞増殖を指標とし、BrdU の取り込みを ELISA 法で測定することにより検討した。遊走活性はトランスウェルチャンバーを用いて、BMDC を上層、ケモカインを下層に加えて培養し、下層に遊走した細胞を蛍光色素で検出した。

4. 研究成果

(1) DEP および DEP-OC とその含有成分である BaP は、BMDC のリンパ節への遊走に関わるケモカインレセプターの CCR7 と CXCR4 や、抗原の捕食と細胞内濃縮に関わる CD206、抗原のプロセッシングと提示に関わる CD208、抗原提示に関わる MHC class II 分子と補助刺激分子の CD83、CD86 といった分子の発現を増加させることが明らかとなった。一方、これらの分子の発現に対する DEP 残渣粒子の影響は観察されなかった。これより、DEP 中の脂溶性化学物質が BMDC のリンパ節への遊走と抗原提示を促進する可能性が示唆された。DEHP と DINP もまた、BMDC の CCR7 と CXCR4、CD206、MHC class II、CD83、CD86 の分子の発現を増加させることが明らかとなったことから、BMDC のリンパ節への遊走と抗原提示を促進する可能性が示唆された。図 1 に代表例として、DINP 曝露が BMDC のリンパ節への遊走に関わる CCR7 と CXCR4 および抗原提示に関わる MHC class II と CD86 の発現に及ぼす影響の結果を示した。

(2) 次に、これらの環境化学物質が BMDC の機能に及ぼす影響について検討した。その結果、リンパ節で発現しているケモカインである

MIP-3 β と SDF-1 (CCR7 と CXCR4 のリガンド) に対する BMDC の遊走活性は、DEP-OC および BaP、DEHP、DINP いずれの環境化学物質の曝露でも、コントロールに比べて増加する傾向が観察された。また、その増加は関連分子の CCR7 と CXCR4 の発現増加に対応することも明らかにした。さらに、DEHP および DINP に曝露した BMDC のダニ抗原特異的な抗原提示機能は、有意に増強され、主要な Th2 サイトカインである IL-4 の産生誘導能も促進された。しかしながら、DEP-OC と BaP の曝露では、これらの明確な変化は認められなかった。図 2 に代表例として、DINP 曝露が MIP-3 β と SDF-1 に対する BMDC の遊走活性とダニ抗原特異的な抗原提示機能に及ぼす影響の結果を示した。

(3) 結論として、本研究で対象とした環境化学物質はそれぞれ特異性が存在するものの、いずれも BMDC の活性化と所属リンパ節への遊走、それに続く抗原提示機能のいずれかあるいは全てを亢進することが明らかとなった。環境化学物質によるアレルギー疾患増悪の一要因には、BMDC の活性化とそれによる Th2 反応の亢進が寄与している可能性が示唆された。これらの成果は、病態に関連する分子をターゲットとした疾患の予防や治療への応用の面でも有用である。

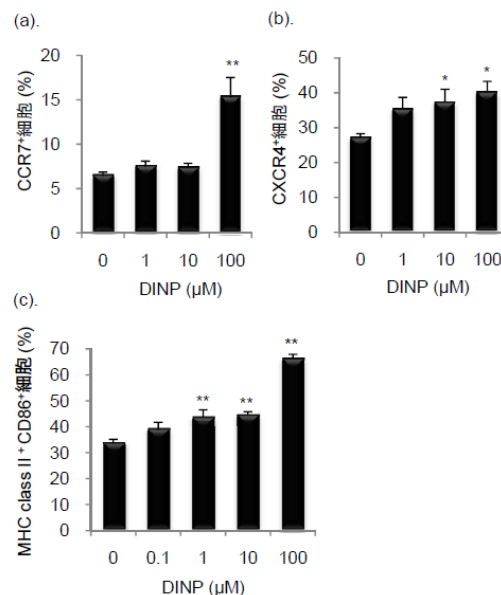


図1. DINPがBMDCの活性化マーカーの発現に及ぼす影響 (a, b) リンパ節への遊走に関わるケモカインレセプター、(c) 抗原提示に関わる分子 *p<0.05, **p<0.01; DINP曝露対コントロール

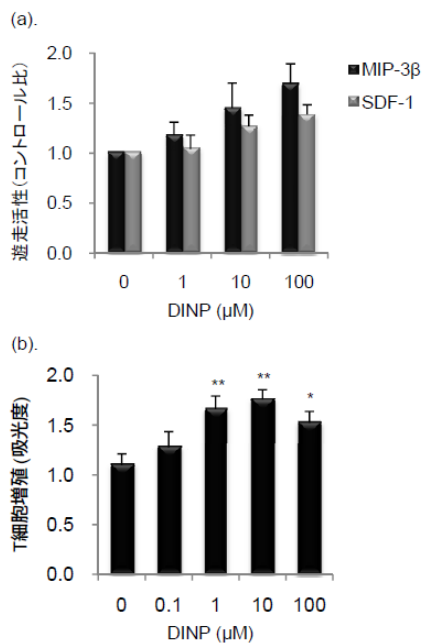


図2. DINPがBMDCの機能に及ぼす影響
(a)遊走活性、(b) 抗原提示機能
*p<0.05, **p<0.01; DINP曝露対コントロール

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2件)

- ① Koike E, Yanagisawa R, Sadakane K, Inoue K, Ichinose T, Takano H. Effects of diisononyl phthalate on atopic dermatitis *in vivo* and immunological responses *in vitro*. *Environmental Health Perspectives*, 118, 2010, 472-478
- ② Koike E, Inoue K, Yanagisawa R, Takano H. Di-(2-ethylhexyl) phthalate affects immune cells from atopic prone mice *in vitro*. *Toxicology*, 259, 2009, 54-60

[学会発表] (計3件)

- ① 小池英子、ベンゾ[a]ピレンによるマウス免疫担当細胞の活性化、第16回日本免疫毒性学会学術大会、2009年8月27日、旭川市民文化会館(北海道)
- ② 小池英子、フタル酸ジイソノニルがNC/Ngaマウス骨髄由来樹状細胞に及ぼす影響、第58回アレルギー学会秋季学術大会、2008年11月27日、東京国際フォーラム(東京)
- ③ 小池英子、フタル酸ジエチルヘキシルは*in vitro*においてNC/Ngaマウスの免疫担当細胞を活性化させる、第15回日本免疫毒性学会、2008年9月12日、タワーホール船堀(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 英子 (KOIKE EIKO)
独立行政法人国立環境研究所・
環境健康研究領域・主任研究員
研究者番号：60353538

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし