

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510035

研究課題名(和文) 妊娠中の大気汚染曝露が次世代アレルギー疾患発症におよぼす環境影響評価と制御機構

研究課題名(英文) Effect and risk evaluation of the exposure to air pollution during pregnancy for increasing prevalence of allergic diseases in future generation

研究代表者

濱田 薫 (Hamada, Kaoru)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患は世界的に増加している。妊娠中の大気汚染曝露が次世代の小児アレルギー疾患発症の危険因子となることをマウスモデルで検討した。妊娠中にタバコ煙を曝露することで仔マウスは容易に喘息を発症することが示された。曝露により新生児期にTh2優位な免疫状態が遷延し、また2週齢での脾細胞CD4+ヘルパーT細胞の遺伝子発現の網羅的解析により喫煙群ではヒストン脱アセチル化酵素およびヒストン特異的メチル化酵素各1種類の発現亢進を認め、すなわちエピジェネティクス変異の関与が示唆された。また同時に制御性T細胞の抑制が示唆され、サイトカイン産生の推移とともに、妊娠中の曝露が次世代以降に影響することが示された。

研究成果の概要(英文)：Prevalence of allergic disease is increasing. Tobacco smoking during pregnancy can contribute to development of asthma in the offspring. Actually neonatal mice from mothers exposed to pollutants before delivery could express asthma manifestation easily. As the mechanism(s), these mice showed the persistent Th2-dominant immune profile after birth. RT-PCR study with neonatal splenic cells revealed reduced immunoeexpression of regulatory T cell suggesting activated immune systems by prenatal exposure. In addition, increased gene expression of a histone-deacetylase and a histone methyltransferase in splenic lymphocytes indicated contribution of epigenetics mechanism.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 大気汚染粉塵 喫煙 次世代影響評価 エピジェネティクス Th2サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患は世界的な増加傾向にあり、とりわけ小児アレルギーの増加は顕著である。アレルギー疾患の発症、進展には遺伝・環境因子が複雑に関与していると考えられるが、近年の急激な罹患率の上昇は、環境因子の関与を強く疑わせる。その中でも、大気汚染は疫学的研究において気管支喘息の発症、増悪に関与する重要な環境因子の一つとされている。妊娠中の母親の喫煙が小児の喘息発症の危険因子の一つであるとされ、出生後のみではなく胎児期の環境の重要性が広く認識されている。しかし、妊娠中の大気汚染曝露が胎児に及ぼす影響についての報告は乏しく、小児のアレルギー疾患発症の危険因子となり得るか否かについて、その機序も含めた詳細は不明である。これまでに妊娠マウスに対する遊粒子状大気汚染（例えば PM2.5）の主因の一つである石油燃焼灰燼の曝露が、出生後の乳幼児の抗原感作、喘息発症に促進的な作用を示すことを証明し (Hamada K et al J Environ Health A 2007)、母親の要因以上に大気汚染粉塵が胎児に影響する可能性を示してきた。

2. 研究の目的

妊娠中の大気汚染曝露の次世代への影響について、より広く社会に対して発信するための基礎的事象の集積と、その予防あるいは治療的介入を目標とした応用について研究することを目的とする。対象として最も身近な室内気汚染物であるタバコ煙を中心に研究する。

3. 研究の方法

1) タバコ煙曝露モデル (腹腔内感作モデル)

正常妊娠 Balb/c マウスへの大気汚染物質曝露：妊娠後期の出生 1, 3, 5 日前にたばこ 2 本分の主流煙溶出液をエロソール曝露した。出生した仔マウスに対し 3 日齢で卵白アルブミン (OVA) 5 μ g + alum 1mg を腹腔内投与、2 および 5 週齢で 3 日間抗原溶液 1% OVA 溶液をエロソール曝露し、その後に喘息病態を評価した。

2) 喘息病態の評価

喘息病態の評価は 気道過敏性 (非侵襲的 BUXCO プレチスモグラフィシステムを用いて、メサコリン濃度上昇に伴う気道抵抗を測定し気道過敏性の指標とした) アレルギー性気道炎症 (気管支肺胞洗浄液 (BALF) を解析し、好酸球数を

測定。その後、肺組織を用いて気道や血管周囲の好酸球浸潤の程度および杯細胞の過形成等を評価) 血清中の抗原特異的 IgE 産生 (ELISA 法にて測定) を評価した。

3) タバコ煙曝露モデル (経気道感作モデル)

出生した仔マウスの生後 4 日齢から 10 日間 1% 卵白アルブミン (OVA) を 1 日 10 分間ずつエロソール曝露し抗原感作を行った。Adjuvant を用いない新生児期の経気道的反復曝露 (経気道感作) では感作が十分に成立せず、その後の抗原曝露によっても喘息病態を呈さないことはすでに報告している (Hamada K et al 1999 Am J Respir Crit Care Med)。これらの仔マウスに対し 5 週齢で 0.1% OVA 溶液を 3 日間 (10 分間/日) エロソール曝露 (気道チャレンジ) し、その後に喘息病態を評価した。

4) 機序へのアプローチ：

機序の解明のために生後 2 週齢の脾細胞から CD4T 細胞を取り出しそこから mRNA を抽出し superarray 法により遺伝子の発現の差異を網羅的に検討した。また同時に RT-PCR によって FoxP3 の mRNA の発現をみることで制御性 T 細胞の動向について検討した。

5) さらに次世代 (F1) への影響について

母親の妊娠中のタバコ煙曝露の後出生した仔マウス (= 経胎盤的に曝露を受けている：F0 世代) を出生後から全く無処置で哺育し、成熟後正常雄マウスと交配し、出生した次の世代 (F1) の新生児マウスに対し上記のように抗原感作し、5 週齢で 3 日間の抗原溶液によるチャレンジの後に喘息病態を評価した。

4. 研究成果

1) 腹腔内感作モデル

妊娠中にタバコ主流煙溶出液に曝露された母親マウスから出生した仔マウス (CSE 群) は、3 日齢での 1 回の感作によってもその後の 3 日間の抗原溶液の気道チャレンジによって著しい喘息病態を呈した。

2) 経気道感作モデル

出生した仔マウスに 4 日齢から 13 日齢まで連続して 1% 抗原溶液のエロソール曝露を行うと (アジュバントを用いない局所感作 = 経気道感作) 反応はやや弱いもの

の CSE 群でのみ喘息病態を呈した。

3) 機序に対するアプローチ

機序の解明のためのアプローチとして生後 2 週齢の脾臓から得た CD4+ヘルパー T 細胞の遺伝子発現をヒストン修飾酵素に焦点を当てた網羅的解析したところ、CSE 群において HDAC11 (ヒストン脱アセチル化酵素の 1 つ) の発現上昇が見られ、遺伝子発現の抑制に関与していることが示唆された。一方、ヒストン H3K36 特異的なメチル化酵素 (WHSC1 (Wolf-Hirschhorn syndrome candidate -1)) の発現増強もあり、エピジェネティクス変異の関与が示唆された。さらに mRNA レベルでの Foxp3 の発現抑制が CSE 群の幼若マウスで認められ、これは制御性 T 細胞の抑制を意味し、抗体産生をともなう炎症機序の活性化、すなわちアレルギー性炎症疾患の発症感受性亢進状態を示しているものと考えられる。先に施行したサイトカイン産生の検討について、出生後にいわゆる Th2 サイトカイン産生亢進状態が遷延していることを認めており、また生後 2 日齢の脾細胞を培養し、CD3 で刺激すると CSE 群では IL-4 と IFN- γ の産生比が増大することから Th2 優位な免疫状態が示唆されることをこれまでに認めている。

4) さらに次世代へのリスク伝達

F-1 世代のマウスに対する喘息感受性の評価では抗原溶液とアジュバントを 1 回腹腔内投与する全身感作モデルでは CSE 群で有意に喘息病態を呈しやすく、妊娠中の母親の喫煙がエピジェネティクス変異を介して次々世代の疾患発症感受性を亢進させたものと考えている。一方、経気道感作モデルでは結果に大きな変動があり、二群間にいちじるしい差異を安定して示すことができなかった。これは抗原感作の強さの問題やその他種々の原因が考えられるが、現実社会の現象を確実にモデル動物に再現することが、容易ではないということと考えられる。

いまだ研究途中の段階であり、経時的な変化を慎重に検討する必要があるが、妊娠中の大気汚染曝露の次世代以降へのリスク評価につながる成果が得られたものと考えます。

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 5 件)

1. Tanaka T, Sho M, Takayama T, Wakatsuki K, Matsumoto S, Migita K, Ito M, Hamada K, Nakajima Y. Endothelin B receptor expression correlates with tumour angiogenesis and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014 Feb 18;110(4):1027-33. (査読あり)
2. Nakamura A, Nagaya N, Obata H, Sakai K, Sakai Y, Yoshikawa M, Hamada K, Matsumoto K, Kimura H. Oral administration of a novel long-acting prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity for pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2013; 77(8):2127-33. (査読あり)
3. 津田 陽、濱田 薫 【新技術の呼吸器への応用を考える】ナノテクノロジーと肺. *THE LUNG perspectives* 22(4): 418 -422 2014. (査読なし)
4. Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, Kinoshita S, Nagai M, Konishi N, Nakajima Y. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res*. 2015 Apr;35(4):2287-97. (査読あり)
5. Nakamura S, Sho M, Koyama F, Ueda T, Nishigori N, Inoue T, Nakamoto T, Fujii H, Yoshikawa S, Inatsugi N, Nakajima Y. Erythropoietin attenuates intestinal inflammation and promotes tissue regeneration. *Scand J Gastroenterol*. 2015 Apr 10:1-9. (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

1. 濱田 薫, 須崎康恵, 友田恒一, 吉川雅則, 木村 弘 妊娠中の喫煙は次世代の喘息発症を促進する. 日本アレルギー学会秋季大会 2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日 (大阪市)
2. Hamada K, Ito T, Suzaki Y, Sho M. Over-generation effects of the cigarette smoking during pregnancy promotes allergic susceptibility. *Experimental Biology* 2015. 2015 年 3 月 28 日 - 4 月 1 日 (米国マサチューセッツ州ボストン市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 薫 (HAMADA KAORU)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228535

(2)研究分担者

庄 雅之 (SHO MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号 50364063

須崎康恵 (SUZAKI YASUE)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 30382302

(3)連携研究者

なし