

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591145

研究課題名(和文) 吸入性粒子状物質によるアレルギー性炎症の発症機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of particulate-induced allergic responses

研究代表者

黒田 悦史 (Kuroda, Etsushi)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：10299604

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)：アレルギー性疾患の増加は社会問題の一つとなっており、その原因の解明と効果的な治療法の開発が急務とされている。アレルギー性疾患の要因として、微小粒子状物質の関与が示唆されており、PM2.5などが健康被害を引き起こすとしてその影響が懸念されている。

我々は粒子状物質としてアルミニウム塩やシリカを肺に注入することによって引き起こされるアレルギー性炎症モデルを作成した。このモデルでは抗原特異的なIgEが誘導されるが、その反応はMyD88依存性であり、さらにIL-1受容体やIL-1aの欠損マウスではIgEの誘導が低いことを認めた。IL-1aは主に肺胞マクロファージの細胞死によって誘導されていた。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of patients suffering from allergic diseases has increased especially in developed countries, and many studies have demonstrated that particle pollutants and environmental particles such as diesel exhaust, sand dust and PM2.5 may exacerbate allergic responses mediated by type 2 immune responses. However, the mechanisms by which particulates elicit type 2 responses remain poorly understood.

Intratracheal instillation of particulates and OVA induced antigen-specific IgE responses. These responses were regulated by a MyD88 dependent and IL-1 signaling pathway. Particulates stimulated alveolar macrophages to induce cell death and IL-1 release both in vitro and in vivo. Our results suggest that DAMPs released by particulate exposure play an important role in IgE induction and inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：粒子状物質 アラム シリカ IgE ダメージ関連分子パターン

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性疾患の増加は社会問題の一つとなっており、その原因の解明と効果的な治療法の開発が急務とされている。アレルギー性疾患の増加の要因としては、アレルゲンの増加、感染症の減少(衛生仮説)、食生活の変化、生活環境における化学物質の増加などが考えられている。化学物質の増加に関しては、産業の発達とともに産出されてきた様々な微小粒子状物質(工場からの煤塵やディーゼル粒子、砂塵、ナノ粒子など)のアレルギー性疾患への関与が示唆されており、特定の仕事に関連した職業性喘息のみならず一般の人への影響も懸念されている。粒子状物質はアレルゲンとは異なり、それ自身は抗原にはならない。しかしながら、粒子状物質を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を増強させるアジュバント効果を有することが知られている。興味深いことに、粒子状物質の多くがIgEの誘導をはじめとするTh2型免疫反応を増強するTh2アジュバントであることが報告されており、**粒子状物質によるTh2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。粒子状物質がどのような機構で免疫系を活性化し、Th2型免疫反応を誘導するかについては明らかにされていない

### 2. 研究の目的

本研究では、アレルギー性炎症を惹起する代表的な粒子状物質であるアルミニウム塩、シリカ、酸化ニッケル粒子を用い、粒子によって誘発されるアレルギー性炎症について肺への影響を中心に解析を行う。まずは、肺胞マクロファージ用いた粒子状物質の認識機構、シグナル伝達経路、液性因子の産生に着目し解析を行う。次に、マウスを用いた粒子によるアレルギー性炎症モデルを確立し、その病態形成を解析するとともに、種々の遺伝子欠損マウスを用い、炎症に関与する因子の同定を試みる。これにより、粒子による炎症発症機構を明らかにし、新規治療法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 粒子状物質の肺胞マクロファージへの影響についての解析

吸入された粒子状物質は主に肺胞に存在するマクロファージに貪食されることから、肺胞マクロファージの関与が重要であると考えられる。そこで、肺から回収した肺胞マクロファージを *in vitro* において種々の粒子状物質にて刺激し、刺激後の培養上清中のサイトカインを測定する。さらに種々のシグナル伝達阻害剤を用いて、粒子によって誘導されるサイトカイン産生に関与するシグナル伝達体について解析する。

#### (2) *in vivo* における粒子状物質による Th2 アジュバント活性のメカニズムの解析

従来のアレルギー喘息モデルマウスの作成法は、アルミニウム塩(アラム)と抗原(アレルゲンや卵白アルブミン:OVA)を腹腔内投与した後に抗原を曝露するという手法が用いられてきた。しかしながらこの方法では吸入性粒子状物質の生体影響を正確に反映したことはない。そこで、申請者らは腹腔内投与の代わりに、粒子状物質を気管内に投与した後に抗原を曝露する系を確立した。

粒子状物質を 50~100 µg/マウスで、マイクロシリンジを用いて非外科的に気管内に注入する。その後、1% OVA 溶液をネブライザーにて気化することで OVA 曝露を行う。数回の抗原曝露後に血清中の抗原特異的な IgG および IgE の測定、気管洗浄液中の炎症性細胞の解析、肺組織の HE および免疫染色、Q-PCR を用いた遺伝子発現を行う。

この実験系は、大気中の粒子状物質を吸入した後でアレルゲンに曝露される状況をモデル化している。

また、同様の実験を種々の遺伝子欠損マウスを用いて行い、粒子によるアレルギー性炎症イン関与する因子について解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) 肺胞マクロファージは粒子の刺激により IL-1 を産生する

マウスより肺胞マクロファージを回収し、*in vitro* にてアレルギーを起こしやすい粒子であるアラム(alum)、シリカ(silica)、およびアレルギーを起こしにくい粒子である酸化アルミニウム(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、ハイドロキシアパタイト(HA)にて刺激した。図1に示すようにアレルギーを起こしやすい粒子であるアラムやシリカでの刺激により肺胞マクロファージからの IL-1 の誘導を認めた。一方で、アレルギーを起こしにくい粒子での刺激では IL-1 の誘導は認められなかった。また興味深いことに、IL-1 の誘導には粒子による肺胞マクロファージの細胞死が関与することが明らかとなった。

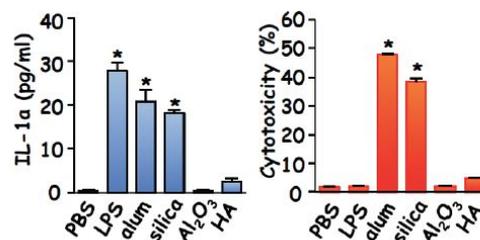


図1 肺胞マクロファージからの IL-1 の誘導と細胞死

次に、IL-1 以外の種々のサイトカイン産生について調べたところ、粒子の刺激により肺胞マクロファージから誘導されるのは

IL-1 のみであり、その他の炎症性サイトカインに関しては産生が認められなかった。

さらに、肺胞マクロファージ以外の組織マクロファージや肺胞上皮細胞への影響についても *in vitro* にて評価したところ、粒子の刺激により IL-1 が産生されるのは肺胞マクロファージのみであり、その他の組織マクロファージや肺胞上皮細胞からは粒子刺激による IL-1 の産生は認められなかった (図 2)。

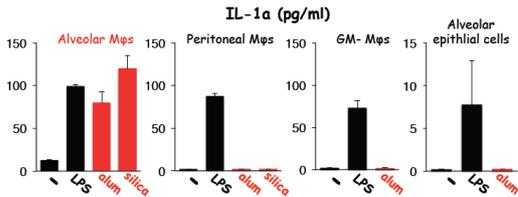


図 2 粒子による IL-1 の産生は肺胞マクロファージ特異的な現象である

また、*in vivo* における IL-1 産生細胞を同定する目的で、アラムを気管内に注入し、3日後の肺の凍結切片を免疫染色したところ、肺胞マクロファージ (CD11c 陽性細胞) において IL-1 の産生が認められた。

以上の結果より、アレルギーを起こしやすい粒子は肺胞マクロファージを刺激し細胞死を誘導するとともに、IL-1 産生を引き起こすことが明らかとなった。さらにこの現象は肺胞マクロファージ特異的な現象であることが明らかとなった。

## (2) 粒子により誘導されるアレルギー性炎症モデルの作成と IL-1 の関与

粒子 (アラム) を投与後の肺胞洗浄液 (BALF) 中の IL-1 の産生について評価した。

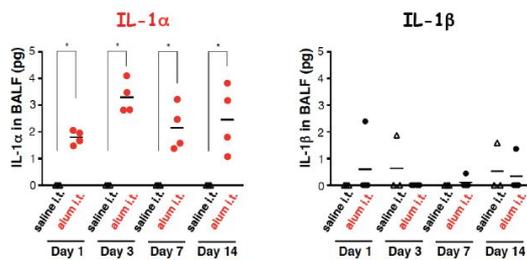


図 3 アラム投与後の BALF 中の IL-1 の産生

アラム投与後、14日間にわたって IL-1 は産生されていることが明らかになった。一方で、IL-1 の産生はほとんど認められなかった (図 3)。

次に、アラム投与後、1、3、7、14日後に抗原 (OVA) を曝露したところ、アラム投与14日後からの OVA 投与でも OVA 特異的な IgE が検出された (図 4)。

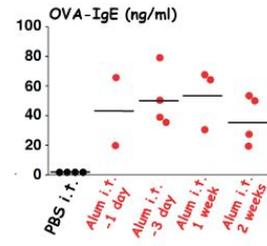


図 4 アラム投与後、数日経って OVA を曝露しても IgE は誘導される

同様の実験をシリカでも行ったが、シリカ気管内投与7日後に OVA を曝露しても IgE の誘導が認められた。この結果は、粒子投与後に長期間 IL-1 が誘導され続ける結果と一致していた。

そこで、IL-1 のシグナルが伝わらない IL-1 受容体欠損マウス (IL1r<sup>-/-</sup>) を用いて同様の実験 (アラムの投与) を行ったところ、欠損マウスでは IgE の誘導が認められなかった (図 5)。同様な結果がシリカの気管内投与でも認められた。

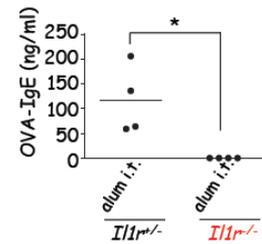


図 5 粒子の気管内投与による IgE の誘導には IL-1 シグナルが必要である

以上の結果より、シリカやアラムのようなアレルギーを起こしやすい粒子が肺に入ると、肺胞マクロファージが活性化し、長期間 IL-1 を誘導する。そのため、粒子の曝露後もしばらくの間アレルギーになりやすい (IgE が誘導されやすい) 状況が続き、その期間中にアレルゲン曝露を受けることでアレルゲン特異的な IgE が誘導されると考えられた。

## 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13件)

(1) Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenberg A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ.

- Hydroxypropyl-β-cyclodextrin spikes local inflammation that induces Th2 cell and T follicular helper cell responses to the coadministered antigen. *J Immunol*, 査読有、194, 2015, 2673-2682. doi: 10.4049/jimmunol.1402027.
- ( 2 ) Temizoz B, Kuroda E, Ohata K, Jounai N, Ozasa K, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type-II IFN. *Eur J Immunol*, 査読有、45, 2015, 1159-1169. doi: 10.1002/eji.201445132.
- ( 3 ) Morimoto Y, Izumi H, Kuroda E. Significance of persistent inflammation in respiratory disorders induced by nanoparticles. *J Immunol Res*, 査読有、2014,2014, 962871. doi: 10.1155/2014/962871.
- ( 4 ) Yasukawa S, Miyazaki Y, Yoshii C, Nakaya M, Ozaki N, Toda S, Kuroda E, Ishibashi K, Yasuda T, Natsuaki Y, Mi-ichi F, Iizasa E, Nakahara T, Yamazaki M, Kabashima K, Iwakura Y, Takai T, Saito T, Kurosaki T, Malissen B, Ohno N, Furue M, Yoshida H, Hara H. An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat Commun*, 査読有、5, 2014, 3755. doi: 10.1038/ncomms4755.
- ( 5 ) Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, Kuroda E, Hayashi M, Tetsutani K, Koyama S, Mochizuki S, Sakurai K, Katakai Y, Yasutomi Y, Saijo S, Iwakura Y, Akira S, Coban C, Ishii KJ. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有、111, 2014, 3086-91. doi: 10.1073/pnas.1319268111.
- ( 6 ) Morimoto Y, Oyabu T, Horie M, Kambara T, Izumi H, Kuroda E, Creutzenberg O, Bellmann B, Pohlmann G, Schuchardt S, Hansen T, Ernst H. Pulmonary toxicity of printer toner following inhalation and intratracheal instillation. *Inhal Toxicol*, 査読有、25, 2013, 679-90. doi: 10.3109/08958378.2013.835010.
- ( 7 ) 黒田悦史, 石井健. ワクチンアジュバントの功罪と開発感染・炎症・免疫、査読無、43, 2013, 74-77.
- ( 8 ) 黒田悦史. 粒子アジュバントの生体への影響 ワクチンアジュバントから DAMPs、大気汚染物質まで 実験医学、査読無、31, 2013, 34-40.
- ( 9 ) Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int Rev Immunol*, 査読有、32, 2013, 209-20. doi: 10.3109/08830185.2013.773326.
- ( 10 ) 黒田悦史, 堀江祐範, 森本泰夫. 吸入性粒子状物質によるマクロファージの活性化とシグナル伝達経路の解析 分子呼吸器病、査読無、17, 2013, 149-151.
- ( 11 ) 黒田悦史. 粒子アジュバントのメカニズム 実験医学(増刊) 査読無、30, 2012, 203-208.
- ( 12 ) 黒田悦史. 粒子状物質による Th2 アジュバント効果 臨床免疫・アレルギー科、査読無、58, 2012, 171-177.
- ( 13 ) 黒田悦史. アジュバントとしてのアルミニウム塩の Th2 細胞誘導機構 臨床免疫・アレルギー科、査読無、58, 2012, 204-209.
- [学会発表](計6件)
- ( 1 ) 黒田悦史, 石井健. 外来物質によるアレルギー性炎症のメカニズム 日本衛生学会(招待講演) 2015年3月27日、和歌山
- ( 2 ) Kuroda E. Molecular mechanisms of

particulate-induced pulmonary inflammation ~intrinsic adjuvant and allergy~  
Society of Toxicology (invited),  
2015年3月24日、San Diego,  
USA

(3) 黒田悦史  
粒子状物質の生体への影響 ~内因性アジュバント(DAMPs)とアレルギー~  
日本毒性学会(招待講演) 2014年7月4日、神戸

(4) 黒田悦史  
粒子状物質の生体への影響 ~内因性アジュバント(DAMPs)とアレルギー~  
肺分子病態研究会(招待講演) 2014年1月11日、福岡

(5) 黒田悦史  
粒子(アラム)アジュバント  
感染研シンポジウム(招待講演) 2013年5月21日、東京

(6) Kuroda, E  
Particulates control immune responses via the production of lipid mediators.  
日本生化学会大会(招待講演) 2012年12月14日、福岡

[産業財産権]  
出願状況(計4件)

名称:異なる核酸アジュバントの組み合わせによる、新規 Th1 誘導性アジュバントおよびその用途  
発明者:石井健、黒田悦史、Burcu Temizoz  
権利者:同上  
種類:特許  
番号:特願 2014-235934  
出願年月日:2014年11月20日  
国内外の別:国内

名称:異なる核酸アジュバントの組み合わせによる、新規 Th1 誘導性アジュバントおよびその用途  
発明者:石井健、黒田悦史、Burcu Temizoz  
権利者:同上  
種類:特許  
番号:PCT/JP2015/001564  
出願年月日:2015年3月20日  
国内外の別:国外

名称:アレルギー誘発物質の検査、アレルギーの診断および治療

発明者:石井健、黒田悦史  
権利者:同上  
種類:特許  
番号:特願 2014-111576  
出願年月日:2014年5月29日  
国内外の別:国内

名称:アレルギー誘発物質の検査、アレルギーの診断および治療  
発明者:石井健、黒田悦史  
権利者:同上  
種類:特許  
番号:PCT/JP2015/002648  
出願年月日:2015年5月26日  
国内外の別:国外

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
黒田 悦史 (KURODA Etsushi)  
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授  
研究者番号:10299604

(2)研究分担者  
森本 泰夫 (MORIMOTO Yasuo)  
産業医科大学・産業生態科学研究所・教授  
研究者番号:30258628

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: