

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460180

研究課題名(和文)非晶質ナノシリカのアレルギー性気管支喘息および自己免疫疾患に与える影響

研究課題名(英文)Effects of amorphous nanoparticles on allergic asthma and autoimmune diseases

研究代表者

吉野 伸 (Yoshino, Shin)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00260729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非晶質ナノシリカのアレルギー性気管支喘息を含むアレルギー疾患および自己免疫疾患に対する影響について検討するため、本ナノ粒子のアジュバント作用および経口免疫寛容誘導阻害効果の有無について調べた。マウスにANを卵白アルブミン(OVA)とともに皮下投与すると、OVAに対するTh1、Th2およびTh17免疫応答は促進された。また、非晶質ナノシリカをOVAとともに免疫前に経口投与すると、OVA特異的経口免疫寛容誘導は阻害され、またTh1、Th2およびTh17サイトカイン産生抑制も阻害された。したがって、非晶質ナノシリカの暴露によって、アレルギー疾患および自己免疫疾患は誘導あるいは増悪する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of amorphous nanoparticles (AN) on allergic and autoimmune diseases, the nanoparticles were s.c. injected with the antigen ovalbumin (OVA). The results showed that OVA-specific immune responses including Th1, Th2 and Th17 were facilitated by AN. When AN was orally given with OVA before immunization with OVA, induction of OVA-specific oral tolerance was blocked. The blockade of the oral tolerance by AN was associated with the blockade of the suppression of production of Th1, Th2, and Th17 cytokines. Therefore, there is a possibility that the exposure to AN might induce or exacerbate allergic and autoimmune diseases.

研究分野：免疫毒性学

キーワード：非晶質ナノシリカ アレルギー 自己免疫疾患 アジュバント 経口免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーは情報、通信、バイオ、医療等の多くの分野で応用されており、次世代産業の基盤テクノロジーとして大きな期待がもたれている。このテクノロジーの根幹を支えているのが、いわゆるナノ粒子と呼ばれる非常に細かな粒子状物質である。今後、急激な需要の高まりからナノ粒子の生産量はさらに飛躍的に増加すると予想されている。一方、ある種のナノ粒子はその特徴的な粒子形状や粒子サイズに起因していると考えられる細胞毒性を有することが指摘されている。

たとえば、ナノ粒子の中でもファンデーション等の化粧品基剤、食品添加物として最も汎用されているものに非晶質ナノシリカ(amorphous nanoparticle, AN)があるが、ANはその暴露後、全身血流に移行し、リンパ節、脾臓等の免疫組織へ移行することが報告されている。したがって、体内に吸収されたANは免疫系に対し何らかの影響を与える可能性がある。

2. 研究の目的

ANのアレルギー性気管支喘息を含むアレルギー疾患および自己免疫疾患に対する影響について検討した。まず、アレルギー疾患や自己免疫疾患は、アレルゲンあるいは自己抗原に対する免疫応答が促進されている疾患であるため、ANの免疫促進効果(アジュバント作用)の有無について検討することを目的とした。次に、食物アレルギーおよび自己免疫疾患はそれぞれ食物抗原および自己抗原に対する免疫寛容が破綻することによって発症するため、ANの免疫寛容破綻効果の有無について検討した。さらに、I型アレルギー反応に重要な役割を果たしているTh2サイトカインIL-4およびIV型アレルギーに関与しているTh1サイトカインIFN- γ 、自己免疫疾患発症に大きな役割を果たしているTh17サイトカインIL-17を測定し、ANのアジュバント効果および免疫破綻効果のメカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

ANのアジュバント作用の有無について検討するため、実験動物としてBALB/cマウス、抗原として卵白アルブミン(OVA)を用いた。ANは、その粒子サイズが30 nm (nSP30)および100 nm (nSP100)を使用し、従来型シリカとして1000 nm (nSP1000)を用いた。種々の用量(3, 30, 300 μ g)のANをOVAとともに皮下注射した(day 0)。陽性対照アジュバントとしてAlumを用いた。Day 21に血清中の抗OVA IgG, IgG1, IgG2a, IgEをELISAによって測定した。また、免疫脾臓細胞をOVA存在下培養し、本細胞の抗原特異的増殖反応について調べた。さらに、脾臓細胞によって産生分泌されるIFN- γ , IL-4, IL-17をELISAによって測定した。

また、ANの経口免疫寛容誘導に対する影響について検討するため、OVA/フロイント完全アジュバント(CFA)免疫(day 0)前、すなわちday -5~day -1に20 mgOVAをPBSに溶解後経口投与し(経口免疫寛容誘導)、AN(0.1, 1, 10 mg, nSP30)はOVAの経口投与直前に経口投与した。対照経口抗原としてhen egg lysozyme (HEL)を用いた。Day 21に血清中抗OVA抗体、OVA特異的脾臓細胞増殖反応、Th1、Th2およびTh17サイトカインを測定した。

4. 研究成果

(1) 非晶質ナノシリカ(NA)のアジュバント作用

OVAとANとを併用投与することによって、抗OVA IgG抗体産生はAN用量依存的に促進された(図1)。また、OVA特異的増殖反応もANとの併用投与によって用量依存的に促進された。これらの結果はANがアジュバント作用を有していることを示唆している。次に、アジュバント効果のメカニズムについて検討するため、Th1およびTh2細胞依存性である抗OVA IgG2aおよびIgG1・IgE産生を調べた。その結果、これらの抗体産生はすべてAN用量依存的に促進され、ANはTh1およびTh2免疫応答の両方を増強することが明らかになった。これらのアジュバント作用は、ANによるTh1(IFN- γ)及びTh2(IL-4)サイトカイン産生促進によっても支持された。

さらに、自己免疫疾患の発症及び増悪に重要な役割を果たしているIL-17産生に対するANの効果について同様に検討した。その結果、ANは用量依存的にIL-17産生を促進した。したがって、ANはTh1、Th2免疫応答のみならずTh17免疫系も増強すると考えられる。

粒子径が異なるANのアジュバント作用に及ぼす影響について検討するため、OVAと本ナノ粒子(粒子径: 30, 100, 1000 nm)とをマウスに併用投与(day 0)後、day 21に抗OVA IgGおよびOVA特異的脾臓増殖反応を測定したところ、これらはANの粒子径が小さいほど促進された。これらの結果は、AN粒子の微小化に伴い、ANはより強いアジュバント作用を発現することが示唆された。

(2) 非晶質ナノシリカ(AN)の経口免疫寛容誘導に対する効果

ANをOVAとともにOVA免疫(day 0)前に1日1回5日間(day -5~day -1)経口投与したところ、抗OVA IgG抗体産生は有意に抑制された(経口免疫寛容誘導)。対照抗原HEL経口投与群における抗OVA IgG産生はPBS投与群と同様であったことから、得られた経口免疫寛容誘導は抗原特異的であった。本免疫寛容誘導による抗OVA産生抑制は、ANを各OVA経口投与と併用して経口投与することによって有意に阻害された。これらの結果は、ANは経口免疫寛容誘導に対し阻害作用を有していることが明らかになった。

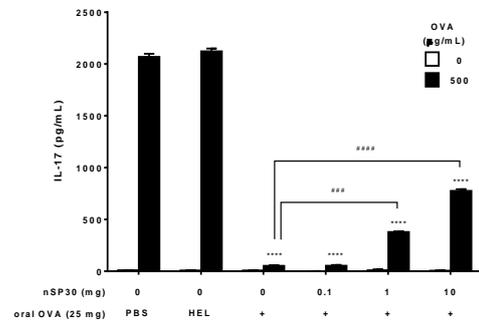
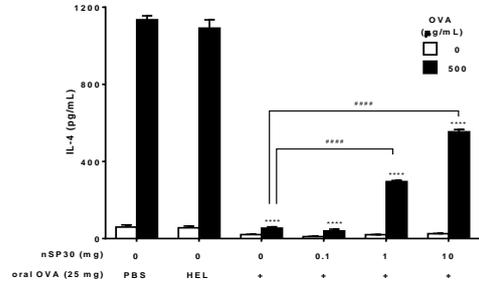
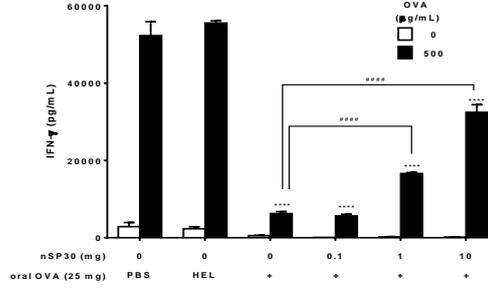
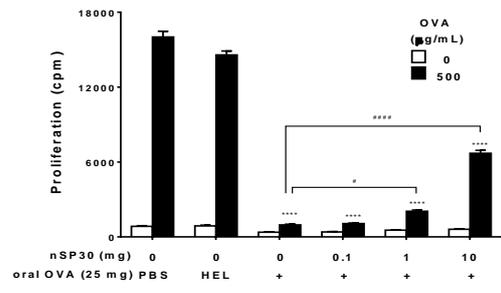
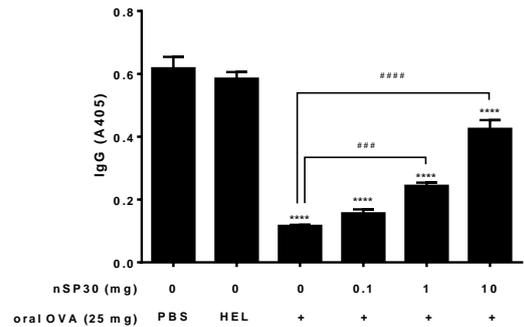
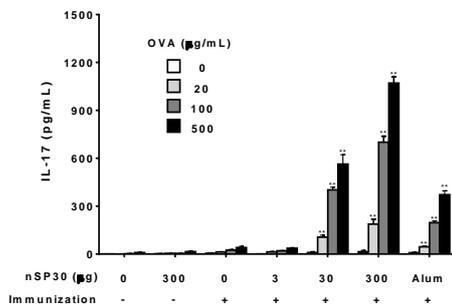
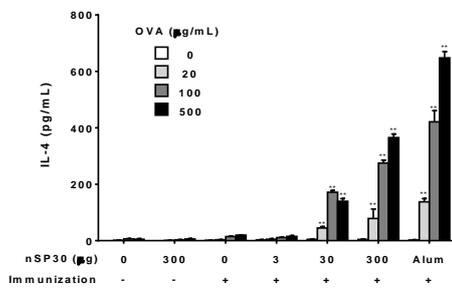
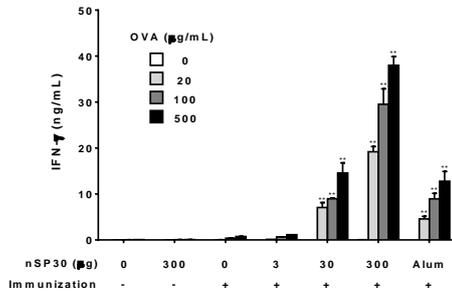
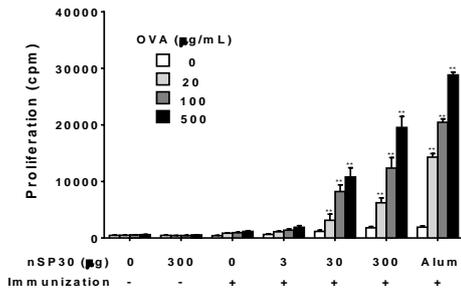
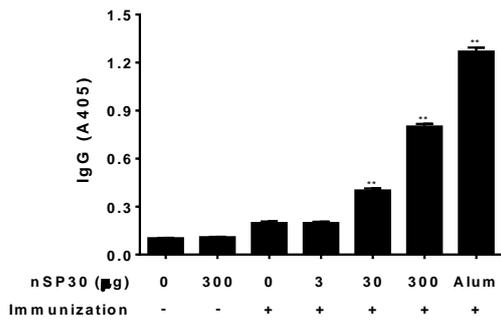


図1. 非晶質ナノシリカによる抗OVAIgG抗体産生、OVA 特異的脾臓細胞増殖反応および Th1、Th2、Th17 サイトカイン産生の促進作用(アジュバント作用)

図2. 非晶質ナノシリカによる Th1、Th2 および Th17 を含む経口免疫寛容誘導の阻害作用

次に、AN の Th1 および Th2 経口免疫寛容に対する効果について検討するため、IgG2a および IgG1 を測定したところ、経口免疫寛容誘導によるこれらの抗体産生抑制は AN によって有意に阻害された。したがって、AN は Th1 および Th2 両方の経口免疫寛容誘導を阻害すると思われる。これらの結果は、経口免疫寛容による脾臓細胞由来の IFN- γ および IL-4 産生抑制の阻害によって支持された。

脾臓細胞によって産生される IL-17 を測定したところ、本サイトカインは OVA の経口投与によって抑制され、本抑制は AN と OVA との併用経口投与によって阻害された。このところは、AN は Th1 および Th2 経口免疫寛容誘導阻止効果のみならず、Th17 経口免疫寛容誘導阻止効果も有することが示唆された。

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 12 件)

- ① Toda, T., Yoshino, S.: Enhancement of ovalbumin-specific Th1, Th2, and Th17 immune responses by amorphous silica nanoparticles. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 29: 408-420, 2016. 査読有。DOI: 10.1177/0394632016656192.
- ② Toda, T., Yoshino, S.: Amorphous nanoparticles block induction of oral tolerance in mice. *J. Immunotoxicol.*, 13: 723-728, 2016. 査読有。DOI: 10.3109/1547691X.2016.1171266.
- ③ Yoshino, S., Mizutani, N.: Intranasal exposure to monoclonal antibody Fab fragments to Japanese cedar pollen Cry j1 suppresses Japanese cedar pollen-induced allergic rhinitis. *Br. J. Pharmacol.*, 173: 1629-1638, 2016. 査読有。DOI: 10.1111/bph.13463.

[学会発表] (計 9 件)

- ① Yoshino, S.: Production of an anti-type II collagen IgG2a monoclonal antibody capable of inducing destructive polyarthritis in mice. European League Against Rheumatism (EULAR) Congress 2016. 2016 年 6 月 9 日. London, UK.
- ② Yoshino, S.: Roles of cytokines in the suppression of asthmatic responses in mice by allergen-specific monoclonal antibody Fab fragments. European Academy of Allergy & Clinical Immunology (EAACI) 2016. 2016 年 6 月 14 日. Wien, Austria.
- ③ 吉野 伸、水谷暢明: アレルゲンに対するモノクローナル抗体 IgG1 Fab の局所暴

露によるアレルギー性鼻炎のアレルゲン特異的制御。第 64 回日本アレルギー学会学術大会。2015 年 5 月 27 日。東京。

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.kobepharma-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 伸 (YOSHINO SHIN)
神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00260729

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()