

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350852

研究課題名(和文)喫煙による肺胞マクロファージへの影響とアレルギー発症の関連について

研究課題名(英文)Effect of smoking on alveolar macrophage and pathogenesis of allergy

研究代表者

竹内 実 (TAKEUCHI, Minoru)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：70257773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギーのCJp投与による肺の初期免疫反応として認められた好中球誘導機構については、CJp自身の好中球に対する走化活性とAMがTLR4ではなくTLR2を介してCJpを認識し、IL-1 mRNA発現の増強を生じ、IL-1によりAM自身が活性化され、好中球走化性因子であるCXCL1とCXCL2mRNA発現の増強を誘導し、その結果末梢血から好中球が肺へ誘導された。一方、喫煙はAMのCJpに対する認識機能を低下させ、AMのIL-1とCXCL2産生を抑制し、肺胞腔への好中球の遊走を抑制し、その結果好中球を肺間質にとどまらせることになり、アレルギー性肺炎症を更に増悪する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cryptomeria Japonica pollen (CJp) is known as an allergen but not cleared to innate immunity in the lung. We reported that cigarette smoke (CS) inhibited immune functions of alveolar macrophage (AM). CJp and CS are inhaled into the lung and contact with AM. However, it is not fully understood whether CJp and CS affect to AM and neutrophils (Neu) infiltration to the lung. Therefore, we investigated the effect of CJp and CS on AM and Neu in the lung. The induced Neu to the lung by the both of increased mRNA expressions of these cytokines and chemotactic activity of CJp caused lung inflammation, and CS inhibited the influx to alveolar space in the lung of Neu and Neu stay to interstitial tissue in the lung by these functional suppressions of Neu and AM. These results suggest that CS may inhibit secondly immune response in the lung and exacerbate allergy inflammation in the lung.

研究分野：応用健康科学

キーワード：喫煙 肺胞マクロファージ アレルギー スギ花粉

### 1. 研究開始当初の背景

喫煙が健康に対し、悪影響を及ぼすことは知られているが、実験データをもとにした科学研究は少ない。喫煙防止教育を行う上でも、喫煙に対する科学的データを基にして教育する必要がある。喫煙に関する研究は、慢性閉塞性肺疾患、肺ガン発症についての研究が多く、喫煙とアレルギー発症による健康への影響についての遺伝子レベルでの科学的な研究は、国内・国外ともに殆どされていない。これまで、タバコ主流煙喫煙により肺の免疫細胞である肺胞マクロファージ、NK細胞の表面抗原、サイトカインの遺伝子発現及び細胞傷害活性の低下、癌の肺転移と活性酸素の産生が促進されることをマウス、ヒトについて報告してきた (Respiration,68:262-267,2001, 臨床免疫 44 : 546-550,2005, Respiration 77:91-95,2009)。また、マウスに一定量のタバコ主流煙を喫煙させ、タバコ喫煙により肺胞マクロファージから活性酸素の産生が促進され、喫煙による過剰な活性酸素により肺上皮組織及び免疫細胞のDNA損傷が誘導され、肺胞マクロファージに異常が引き起こされることを解明し、タバコ喫煙が健康に及ぼす影響を明らかにした (Inhal Toxicol 21:1229-35, 2009, Advances in Bioscience and Biotechnology,4:1-7,2013)。肺に免疫細胞が移動する速度も可視化できる系により測定した (Journal of ApiProduct and ApiMedical Science 2:149-154,2010, )。喫煙による健康への影響については、肺免疫系に影響を及ぼし炎症を引き起こすことを報告した (Inhal Toxicol 20:623-633,2008)。タバコ主流煙には多くの有害物質が含まれており、健康なヒトへの影響が社会的にも大きな問題となっている (FEMS Microbiology Letters 317:109-116,2011)。喫煙とアレルギーの関係は疫学的な報告はされているが、実験科学的な研究が進んでいないのが現状である (臨床免疫 48:673-681, 2007)。喫煙による健康への影響については肺免疫系への影響を報告してきた (International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics 3:125-128,2013)。しかし、喫煙による肺胞マクロファージのアレルギー発症への影響については国内・国外ともに科学的な詳細な分子レベルでの解明はされていない。そこで、これまでの研究成果を踏まえて、喫煙による健康への影響を解明することは大変意義があると考え、喫煙すなわちタバコ主流煙の肺の初期免疫で重要な肺胞マクロファージへの影響とアレルギー発症との関係について着目した。既にレーザー粒子測定装置を装着させ、タバコ主流煙の粒子量、粒子サイズ、粒子濃度をリアルタイムでモニター出来るタバコ主流煙自動喫煙設備を作成し、マウスにタバコ主流煙を、一定量、一定濃度、一定期間、均一に暴露させることが出来、主流煙喫煙の影響を正確に客観的に

評価できる系を確立している。喫煙が肺免疫系の初期免疫応答で重要な肺胞マクロファージに影響を及ぼすことを認め、影響を受けた肺胞マクロファージが、今回スギ花粉に対するアレルギー発症にどのような影響を及ぼしているかについて、細胞、遺伝子レベルで殆ど解明されていない。そこで本研究では、これまでの主流煙の喫煙研究を進展させ、タバコ主流煙による肺免疫の重要な役割を担っている肺胞マクロファージへの影響がスギ花粉に対してどのような免疫応答をするのかについて、これまで研究を行ってきたタバコ主流煙の研究をもとにアレルギー発症との関連への影響を解明することは、健康科学上大変意義がある。

### 2. 研究の目的

喫煙による健康への影響は重要な社会問題である。しかし、喫煙とアレルギー発症の関係についての実験科学的な研究は非常に少ない。特に、肺の初期免疫で重要な役割をしている肺胞マクロファージに着目し、喫煙の影響とアレルギー発症の關係に焦点を絞った研究は国内、国外ともにされていない。本研究は、リアルタイムでタバコ主流煙の粒子数、濃度を測定できる自動喫煙設備を作成し、マウスにタバコ主流煙を一定量均一に吸入させ、喫煙による影響を正確に客観的に評価出来る系を用いて、喫煙による肺胞マクロファージへの影響とアレルギー発症の連について研究し、喫煙による肺胞マクロファージの遺伝子変異への影響とアレルギー発症の關係を分子免疫学的に解明し、喫煙によるアレルギー疾患発症の予防に役立てることが目的である。

### 3. 研究の方法

主要設備である自主製作したタバコ自動喫煙装置にレーザー粒子測定装置を装着させ、副流煙の粒子量、粒子サイズ、粒子濃度をリアルタイムでモニター出来るタバコ煙自動喫煙設備を作成し、C57BL/6、雌、8週齢マウスに一定量、一定期間(10日間)モニターNo.2リファレンスタバコ煙を喫煙させ、喫煙マウスを作製した。喫煙後、マウスにCJp 600 µgを気管支内投与後、マウスを麻酔死させ、主気管支を露出後注射器で主気管支内にPBSを1ml注入し回収する操作(気管支肺胞洗浄法)により気管支肺胞洗浄液を回収した。回収した気管支肺胞洗浄液を1000rpm、10分遠心し、上清を除去後、RPMI1640で懸濁し肺胞マクロファージ細胞浮遊液を調製した。

### 4. 研究成果

AMのTLR4とCD14陽性細胞比率はCJp投与による有意な差は認められなかったが、TLR2陽性細胞比率は有意に減少し、CD11b陽性細胞比率は有意に増加した。好中球のIL-1、CXCL1、CXCL2及びMMP-9mRNAは、CJp投与により有意に増加した。またAMのIL-1、

CXCL2mRNA 発現は、CJp 刺激により有意に増加した。好中球の走化活性の指標である Direction(平均移動方向)と Velocity(平均移動速度)は、CJp 及び Cryj1 で有意に増強した。病理組織学所見において、CJp により肺胞腔と間質に好中球の浸潤による炎症変化が認められた。また、TLR4 遺伝子欠損マウスでも、CJp による好中球の肺への誘導が認められた。CJp により初期免疫反応として肺への好中球誘導が認められたことから、マウスにタバコ主流煙を 10 日間曝露後、CJp 気管支

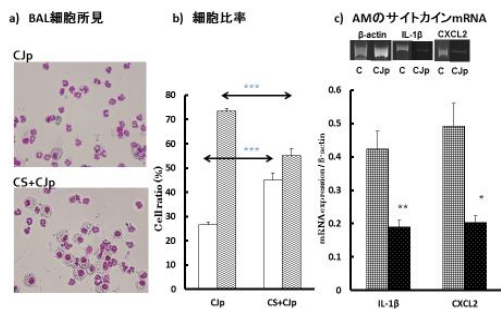


図1 喫煙のCjp吸入による肺免疫応答への影響

□:肺胞マクロファージ(AM) ▨:好中球 ▩:非喫煙-Cjp刺激 ■:喫煙-Cjp刺激 ○:Cjp非刺激  
\*:p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*:p<0.001 mean±S.E.

内投与を行い、タバコ主流煙曝露による影響を検討した。喫煙により、AMのTLR4, CD14, TLR2, CD11b 陽性細胞比率、CJp刺激によるIL-1 及びCXCL2mRNA発現が減少し、好中球の肺への誘導が抑制された。また、好中球機能のMMP-9mRNA発現とCryj1に対する走化活性が減少した。また肺組織所見では、喫煙によりCJp粒子の周囲と肺間質により強い好中球の浸潤が認められた。

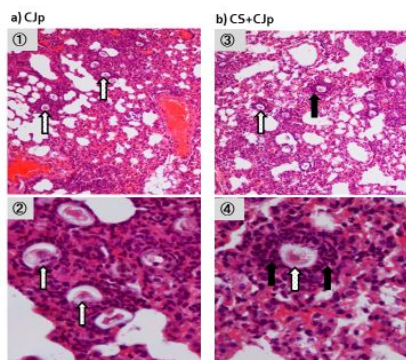


図2 喫煙のCjp吸入による肺組織への影響

①○:非喫煙-Cjp ②○:喫煙-Cjp ↑:好中球の集積 ↑:Cjp粒子

以上の結果より、Cjp 投与による肺の初期免疫反応として認められた好中球誘導機構については、Cjp 自身の好中球に対する走化活性とAMがTLR4ではなくTLR2を介してCjpを認識し、IL-1 mRNA発現の増強を生じ、IL-1によりAM自身が活性化され、好中球走化性因子であるCXCL1, CXCL2及びエラスチン分解酵素であるMMP-9mRNA発現の増強を誘導し、その結果末梢血から好中球が肺へ誘導されたことが示された。一方、喫煙はAMのCjpに対する認識機能を低下させ、AMのIL-1とCXCL2産生を抑制し、誘導された好中球のMMP-9産生及びCjpに対する走化活性を抑制することで、肺への好中球誘導を減少

させた。また、喫煙による肺胞腔への好中球の遊走抑制は、好中球を間質にとどまらせることにより肺組織を傷害し、肺炎症を更に増悪する可能性が示唆された。

## 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15件)

Yi-Hsin Shen, Alexa K. P. Pham, Minoru Takeuchi, Kent E. Pinkerton. Sex and strain-based inflammatory response to repeated tobacco smoke exposure in Spontaneously Hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Inhalation Toxicology*, 28:677-685, 2016. 査読有

M Takeuchi, M Takasaki, N Miwa, Y Tanaka, K.E. Pinkerton. Immunotoxic Effect of Cigarette Smoke as Environmental Factor on Immune Functions and DNA damage in Alveolar Macrophages. *Toxicology Letters*, 259:150, 2016. 査読有

木村沙也加、宇野真由奈、田中美子、竹内実 蜂蜜による好中球の抗腫瘍作用と食食機能への影響 京都産業大学先端科学技術研究所所報 第15号、1-11, 2016. 査読無

竹内実 スギ花粉アレルギー吸入による免疫応答に対する喫煙の影響 アレルギーの臨床 36:70-73,2016. 査読有  
野瀬雅仁、竹内実 スギ花粉の肺胞マクロファージと好中球への影響と喫煙アレルギーの臨床 36:41-45,2016. 査読有

野瀬雅仁、竹内実 喫煙のアレルギー吸入による肺胞マクロファージへの影響とアレルギー アレルギーの臨床 35:49-53,2015. 査読有

Xueting Lia, Min Xue, Otto G. Raabe, Holly L. Aaron, Ellen A. Eisen, James E. Evans, Fred A. Hayes, Sumire Inaga, Abderrahmane Tagmout, Minoru Takeuchi, Chris Vulpe, Jeffrey I. Zink, Subhash H. Risbud, Kent E. Pinkerton. Aerosol droplet delivery of mesoporous silica nanoparticles: A strategy for respiratory-based therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11:1377-1385, 2015. 査読有

小池博嗣、山本理沙、富岡関子、中野美穂、西川由美、林清音、松本真弓、駒由佳、中村嘉宏、脇本栄子、竹内実、藤野裕司 顕微授精法において精子濃度が胚発育成績に及ぼす影響 顕微授精法に関する検討 日本受精着床学会雑誌、32(1); 20-23,2015. 査読有  
田中美子、高崎摩依子、三輪奈緒子、高

橋純一、竹内実 日本国産蜂蜜による好中球の走化活性に及ぼす影響 京都産業大学先端科学技術研究所所報 第 14 号、1-12, 2015. 査読無

小池博嗣、山本理沙、富岡閲子、中野美穂、西川由美、林清音、松本真弓、駒由佳、中村嘉宏、脇本栄子、竹内実、藤野裕司 体外受精胚移植におけるアネキシン磁気細胞分離システムを用いた精子選別法の成績 日本受精着床学会雑誌、31(2) ; 200 - 203, 2014. 査読有

Masaaki Sakura, Yoichi Chiba, Emi Kamiya, Ayako Furukawa, Noriko Kawamura, Masanao Niwa, Minoru Takeuchi, Yasushi Enokido, Masanori Hosokawa. Differences in the Histopathology and Cytokine Expression Pattern between Chronological Aging and Photoaging of Hairless Mice Skin. Modern Research in Inflammation, 3: 82-89, 2014. 査読有

川添彩香、竹内実 Lipopolysaccharide (LPS) による肺炎の誘導機構と喫煙の影響 京都産業大学論集 自然科学系列 第 43 号、39-73, 2014. 査読有

田中美子、高崎摩依子、瀧谷崇大、高橋純一、廣野由里子、竹内実 日本国産蜂蜜によるマクロファージと好中球の免疫機能に及ぼす影響 京都産業大学先端科学技術研究所所報 第 13 号、1-16、2014. 査読無

高橋純一、竹内実、松卒耕三、野村哲郎 日本で飼養されているセイヨウミツバチの系統 京都産業大学先端科学技術研究所所報 第 13 号、25-37、2014. 査読無

棚橋靖行、川原瑞穂、遠藤英輔、竹内実 喫煙によるマウス気管支平滑筋の収縮および弛緩活性への影響 京都産業大学総合学術研究所所報 第 9 号 227-234, 2014. 査読無

[学会発表](計 18 件)

M. Takeuchi, A. Kawazoe, N. Miwa, M. Uno, C. Kanamori, Y. Tanaka, K.E. Pinkerton. Effect of honey on neutrophil function and antibody production. Clinical Nutrition Week 2017. Orland, USA, 18-21 February, 2017.

M. Takeuchi, A. Kawazoe, Y. Tanaka, K. E. Pinkerton. Effect of cigarette smoke and honey on lung inflammation by Lipopolysaccharides (LPS) in mice. The 11th PVRI Annual World Conference 2017. Miami, USA, 26-29 January, 2017  
M. Uno, C. Kanamori, N. Miwa, Y. Tanaka, M. Takeuchi. Anti-inflammatory effect of honey on pulmonary inflammation induced by Lipopolysaccharide (LPS)

in mice. 45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Okinawa, 5-7 December, 2016.

C. Kanamori, M. Uno, N. Miwa, Y. Tanaka, M. Takeuchi. Effects of Cryptomeria Japonica pollen and cigarette smoke on immune cells. 45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Okinawa, 5-7 December, 2016.

N. Miwa, M. Uno, C. Kanamori, Y. Tanaka, M. Takeuchi. Anti-tumor activity of neutrophil induced by Lipopolysaccharide (LPS). 45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Okinawa, 5-7 December, 2016.

M. Takeuchi, M Takasaki, N Miwa, Y Tanaka, K.E. Pinkerton. Immunotoxic effect of cigarette smoke as environmental factor on immune functions and DNA damage in alveolar macrophages. XIV International Congress of Toxicology, Merida, Mexico, 2-6 October, 2016.

M. Takeuchi, A. Kawazoe, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Tanaka, K. E. Pinkerton. Immunological Mechanism of Lung Inflammation by Lipopolysaccharides (LPS). ATS 2016, San Francisco, USA, 13-18 May, 2016

M. Takeuchi, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Tanaka. Effect of Cigarette Smoke Exposure on Anti-Cancer Activity of Alveolar Macrophage to Lewis Lung Carcinoma in Mice. European Lung Cancer Conference (ELCC2016), Geneva, Swiss, 13-16 April, 2016

Naoko Miwa, Maiko Takasaki, Yoshiko Tanaka, Ayaka Kawazoe, Kazuma Sasaki and Minoru Takeuchi. Anti-tumor Activity of Neutrophil induced by Lipopolysaccharide (LPS). The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, 8-10 October, 2015

Maiko Takasaki, Yuriko Hirono, Yoshiko Tanaka, Naoko Miwa, Masaaki Sakura and Minoru Takeuchi. Effect of Cigarette Smoke Exposure on Anti-Tumor Activity in Alveolar Macrophage. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, 8-10 October, 2015

Minoru Takeuchi, Yuriko Hirono, Maiko Takasaki, Yoshiko Tanaka. Immunological pathogenesis of pulmonary inflammation by lipopolysaccharide (LPS) and anti-inflammation effect of honey in animals. 32nd World Veterinary

Congress (WVC), Istanbul, Turkey, 13-17 September, 2015.

M. Takeuchi, Y. Hirono, M. Takasaki, Y. Tanaka, Y. Tanahashi, M. Sakura. Cigarette smoke induces inhibition of immune functions and alteration of internal cell structure through the DNA damage in alveolar macrophage. 23rd European Conference on General Thoracic Surgery, Lisbon, Portugal, 31 May - 3 June, 2015

Minoru Takeuchi, Yoshiko Tanaka, Eri Shigeyosi, Maiko Takasaki, Sakura Masaaki and Kent E Pinkerton. Anti-aging effect of honey mediated with activation of immune functions. 13th AMWC 2015, Monaco, Monaco, 25-28 March, 2015,

Minoru Takeuchi, Yoshiko Tanaka, Eri Shigeyosi, Maiko Takasaki, Sakura Masaaki. Effect of Honey on Antibody Production and ITS Mechanism in Mice. APCCN 2015, Kuala Lumpur, Malaysia, 26-29 January, 2015,

M. Takeuchi, Y. Hirono, Y. Tanaka, S. Inoue, Y. Tanahashi, M. Sakura. Tobacco Smoke Exposure Alters Immune Functions Mediated With DNA Damage In Alveolar Macrophage (AM). 19th Congress of the APSR, Bali, Indonesia, 13-16 November, 2014

Maiko Takasaki, Yuriko Hirono, Masaaki Sakura and Minoru Takeuchi. Effect of Cigarette Smoke Exposure on Ant-tumor activity of Alveolar Macrophages. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 25-27 September, 2014

M. Takeuchi, A. Kawazoe, Y. Hirono, K. Sasaki, Y. Tanahashi, M. Sakura. Effect of Cigarette Smoking on Lipopolysaccharides (LPS)-Induced Lung Inflammation Mediated by Neutrophils European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2014, Copenhagen, Denmark, 7-11 June, 2014.

M. Takeuchi, Y. Hirono, Y. Tanaka, K.E. Pinkerton. Effect of Honey on Immunological Functions of Alveolar Macrophages in Mice ATS 2014 International Conference (ATS 2014), San Diego, USA, 16-21 May, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~mtakex/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 実 (TAKEUCHI, Minoru)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：70257773