

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860438

研究課題名(和文) 生体応答の早期イベントに注目したナノマテリアルによるアレルギー増悪機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the underlying mechanisms by which nanomaterial lead to the development and/or exacerbation of allergic diseases

研究代表者

本田 晶子 (Honda, Akiko)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20454324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノマテリアルを対象とし、気道上皮細胞と免疫担当細胞に注目し、生体・免疫応答の早期において、ナノマテリアルによるアレルギー増悪機構を明らかにすることを目的とした。ナノマテリアルが、気道上皮細胞の細胞活性やサイトカイン産生に及ぼす影響、抗原提示細胞に及ぼす影響を検討した。その結果、ナノマテリアルは、アレルゲン存在下において、気道上皮細胞に対しては、細胞障害性を、抗原提示細胞に対しては、異物取り込みや抗原提示に関わる分子の発現を誘導した。従って、ナノマテリアルによるアレルギーの増悪には、呼吸器系や免疫系が、特に、異物取り込み能や抗原提示能の亢進が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of nanomaterial on respiratory and immune cells to elucidate the underlying mechanisms by which nanomaterial lead to the development and/or exacerbation of allergic diseases such as asthma. Nanomaterial decreased cell viability of airway epithelial cells and increased expression of cell surface molecules on antigen presenting cells in the presence of allergen. This study indicates nanomaterial can contribute to the development and/or exacerbation of asthma by disruption of respiratory and immune systems, especially by the activation of antigen presenting cells.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ナノマテリアル アレルギー 気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

- (1) ナノマテリアルは、100 nm 以下の極微小な粒子状や構造体を有する物質である。化粧品、家電製品、電子機器、塗料・インク等、身近な生活用品にもしばしば使用されるようになり、一般環境における皮膚や呼吸を介した曝露機会の増加が危惧されている。ナノマテリアルは、その粒径から、呼吸により気管支や肺に沈着した後、容易に体内へ侵入し、呼吸器系や免疫系、特に、アレルギー性呼吸器疾患に影響を及ぼす可能性が示唆されている。
- (2) アトピー性皮膚炎、花粉症、気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患は先進国や都市部を中心に増加し、健康や社会経済に大きな損失をもたらしている。故に、この増加・増悪要因を解明し、適切な対策を講ずることが急がれている。アレルギー性疾患患者は、環境汚染物質の影響を受けやすい高感受性・脆弱性集団とも考えられており、アレルギー疾患の増加、増悪に関連する要因として、環境汚染の重要性が挙げられている。近年のナノマテリアルの生産、使用、そして、曝露機会の増加も、その例外ではない。
- (3) これまでに、当研究室と共同研究者らの研究グループは、ナノマテリアルが、アレルギー性気管支喘息やアトピー性皮膚炎を増悪することを実験的に明らかにしてきた。また、世界の複数の研究グループも、亜鉛や銀等のナノ粒子の免疫影響を検討しつつある。しかし、未だに一部のナノマテリアルのアレルギー増悪影響が検討されているに過ぎない。
- (4) 種々のナノマテリアルが、好酸球性炎症や肥満細胞脱顆粒、抗体産生の増加等、免疫応答の下流のイベントを、T helper (Th) 2 細胞の活性化やそれに由来するサイトカインの産生増加を介して増悪することは明らかにされているが、生体・免疫応答のより上流、あるいは、より早期に起こるイベントにいかなる影響を与えているかは、十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

このような背景から、本研究では、下記を研究目的とした。

- (1) ナノマテリアルを対象とし、経気道的に侵入する環境汚染物質と呼吸器の最初の接点である気道上皮細胞と生体・免疫応答の上流に位置する免疫担当細胞(抗原提示細胞等)に注目し、ナノマテリアル

ルによるアレルギー性気管支喘息増悪機構を、生体・免疫応答の早期イベントに焦点を当てて解明する。

- (2) 特に、ナノマテリアルが「気道上皮細胞のアレルギー発症に関与するサイトカイン産生に及ぼす影響」、「抗原提示細胞の抗原取り込みから抗原提示までの各プロセスに及ぼす影響」等に注目し、アレルギー性気管支喘息増悪機構を解明する。

3. 研究の方法

検討対象は、代表的なナノマテリアルであるカーボンブラックとした。カーボンブラックは、Degussa (Dusseldorf, Germany) より購入した Printex 90 (14 nm) を 360 で 30 分間加熱して使用した。粒子を分散させるため、TOMY (Tokyo, Japan) UD-100 を用いて 3 分間超音波処理したのち、目的濃度 (0、5、15、45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のサンプルを調製した。

- (1) ナノマテリアルが気道上皮細胞に及ぼす影響に関する検討

正常ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B 細胞を使用した。コラーゲン I コートされたプレートに気道上皮細胞を播種し、無血清 LHC-9 培地を用いて培養した。semi-confluent な状態まで培養後、アレルギー性気管支喘息モデルマウスの作成に使用されるアレルゲンである卵白アルブミン (OVA) の存在下及び非存在下に、カーボンブラックを曝露した。以下の 2 項目について検討した。

細胞生存能 : Water soluble tetrazolium-1 (WST-1) を用いた比色法によりプレートリーダーを用いて測定を行った。

具体的には、96 穴プレートに 7.5×10^4 cells/mL の BEAS-2B 細胞懸濁液を 70 $\mu\text{L}/\text{well}$ 播種した。その 3 日後にカーボンブラック及び OVA を曝露し、37 で 24 時間インキュベートした。曝露終了前に Premix WST-1 試薬を培地量の 10 分の 1 になるように添加した後、450 nm (参照波長 630 nm) で吸光度測定を行い、カーボンブラック及び OVA 非曝露群の吸光度を 100% として、カーボンブラック及び OVA が細胞活性に及ぼす影響を評価した。

サイトカインの産生 : 免疫担当細胞の活性化に関与するサイトカイン等 (IL-6、IL-8、IL-33 等) の測定を Enzyme linked immuno sorbent assay (以下 ELISA) 法により行った。

具体的には、12 穴プレートに 7.5×10^4 cells/mL の BEAS-2B 細胞懸濁液を 700 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ播種し、その 3 日後にカー

ボンブラック及び OVA を曝露した。その 24 時間後に上清を回収し、5 分遠心(4、300 g)した後、製造元のプロトコルに従い、吸光度測定(450 nm、参照波長は 550 nm)を行った。

(2) ナノマテリアルが抗原提示細胞に及ぼす影響に関する検討

アトピー素因を有する NC/NgaTndCr1j 雄性マウスから大腿骨を摘出し、リコンビナントマウス顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子を含む培地で 8 日間培養することにより、抗原提示細胞を分化誘導した。得られた抗原提示細胞に、OVA の存在下及び非存在下に、カーボンブラックを曝露し、以下の 4 項目について、解析した。

異物(アレルゲン)の取り込み: 異物の取り込みに関与する細胞表面分子 DEC205 の発現をフローサイトメトリーにて測定した。

リンパ節への遊走: リンパ節への遊走に関与する細胞表面分子 CCR7 の発現を、フローサイトメトリーを用いて測定した。

抗原提示: 抗原提示に関与する細胞表面分子 CD86 をフローサイトメトリーにて測定した。

具体的には、12 穴プレートに 2×10^6 cells/mL のマウス抗原提示細胞懸濁液を 600 μ L/well ずつ播種し、そこにカーボンブラック及び OVA を含む培地を 600 μ L/well 添加し、曝露した(終濃度: 1×10^6 cells/mL)。その 24 時間後、細胞を回収した。5 分遠心(4、400 g)した後、上清をアスピレーターで廃棄し、FACS Buffer に懸濁した。至適濃度に調製した蛍光標識モノクローナル抗体を加えて遮光し、4 で 45 分放置した。細胞は、遠心洗浄した後、FACS Buffer に再懸濁し、蛍光を FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) により測定した。測定に先立ち、7AAD 染色による解析結果を用いて、生細胞領域でゲートを作成した。生細胞領域において約 1 万個の細胞の蛍光データを用いて、陽性細胞率を指標にそれぞれの発現量を解析した。

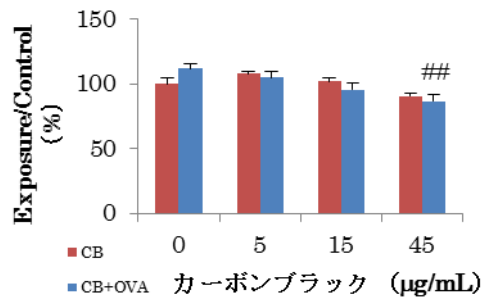
4. 研究成果

(1) ナノマテリアルが気道上皮細胞に及ぼす影響に関する検討

細胞生存能

カーボンブラック単独曝露による有意な変化は、何れの曝露濃度についても確認されなかった。OVA 単独曝露でも、細

胞活性の変化は確認されなかった。一方、45 μ g/mL カーボンブラックと OVA の複合曝露により、細胞活性が有意に減少した。複合曝露群と、同濃度のカーボンブラック単独曝露群との間には、有意な変化は確認されなかった(図 1)。

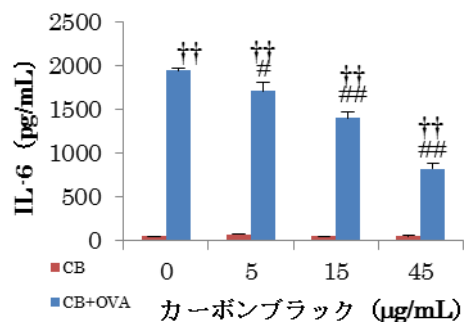


$P < 0.01$ vs カーボンブラック 0 μ g/mL+OVA

図 1 カーボンブラック及び OVA 曝露が気道上皮細胞の活性に及ぼす影響

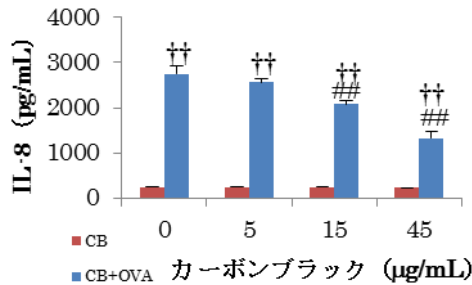
サイトカインの産生

カーボンブラック単独曝露による IL-6 産生量の変化は、何れの曝露濃度においても確認されなかったが、OVA 単独曝露により IL-6 産生量が有意に増加した。一方、カーボンブラックと OVA の複合曝露により、カーボンブラック濃度依存的に IL-6 産生量が減少した。複合曝露群は、同濃度のカーボンブラック単独曝露群と比較して、IL-6 産生量が有意に増加していた(図 2)。IL-8 でも IL-6 と同様の変化が認められた(図 3)。IL-33 ではいかなる変化も確認されなかった(図 4)。



$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CB 0 μ g/mL+OVA
†† $P < 0.01$ vs 同濃度の CB 単独曝露群

図 2 カーボンブラック及び OVA 曝露が気道上皮細胞の IL-6 産生に及ぼす影響



$P < 0.01$ vs CB 0 $\mu\text{g/mL} + \text{OVA}$
 †† $P < 0.01$ vs 同濃度の CB 単独曝露群

図 3 カーボンブラック及び OVA 曝露が気道上皮細胞の IL-8 産生に及ぼす影響

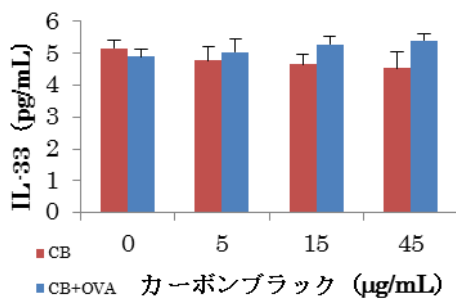


図 4 カーボンブラック及び OVA 曝露が気道上皮細胞の IL-33 産生に及ぼす影響

(2) ナノマテリアルが抗原提示細胞に及ぼす影響に関する検討

異物（アレルゲン）の取り込み

抗原提示細胞の表面に発現する DEC205 を測定したところ、カーボンブラック単独曝露、OVA 単独曝露により、DEC205 陽性細胞率が有意に増加した。さらに、カーボンブラックと OVA の複合曝露により、DEC205 陽性細胞率が有意に増加した。複合曝露群は、同濃度のカーボンブラック単独曝露群と比較して、DEC205 陽性細胞率が有意に増加していた。

リンパ節への遊走

抗原提示細胞の表面に発現する CCR7 を測定したところ、何れの曝露も有意な変化は認められなかった。

抗原提示

抗原提示細胞の表面に発現する CD86 を測定したところ、カーボンブラック単独曝露、OVA 単独曝露により、CD86 平均蛍光強度が有意に増加した。さらに、カーボンブラックと OVA の複合曝露により、CD86 平均蛍光強度が有意に増加した。複合曝露群は、同濃度のカーボンブラック

単独曝露群と比較して、CD86 平均蛍光強度が有意に増加していた。

以上より、気道上皮細胞に対する細胞活性は、カーボンブラックまたは OVA 単独曝露による変化は確認されなかったが、カーボンブラックと OVA の複合曝露により、減少した。複合曝露群と、同濃度のカーボンブラック単独曝露群との間には、有意な変化は確認されなかった。サイトカイン産生に関しては、カーボンブラック単独曝露による IL-6 産生量の変化はなかったが、OVA 単独曝露により産生量が増加した。一方、カーボンブラックと OVA の複合曝露によりカーボンブラック濃度依存的に産生量が減少した。複合曝露群は、同濃度のカーボンブラック単独曝露群と比較して、産生量が増加した。IL-8 でも IL-6 と同様の変化が認められ、IL-33 では有意な変化は確認されなかった。

抗原提示細胞の表面に発現する DEC205 については、カーボンブラックまたは OVA 単独曝露、カーボンブラックと OVA の複合曝露により、DEC205 陽性細胞率が増加した。複合曝露群も、同濃度のカーボンブラック単独曝露群と比較して、陽性細胞率が増加していた。CD86 の平均蛍光強度についても同様の変化が認められ、CCR7 陽性細胞率については、有意な変化は確認されなかった。

以上の結果より、カーボンブラックと OVA の複合曝露によって、気道上皮細胞に対する細胞活性が減少した。気道上皮細胞における炎症性サイトカインの産生は、複合曝露により有意に増加したが、カーボンブラックによる影響ではなく、OVA による影響が大部分であると考えられた。また、抗原提示細胞においては、複合曝露による相加的な抗原取り込み能や抗原提示能の活性化が認められ、免疫反応を促進している可能性が示唆された。従って、カーボンブラックによるアレルギーの増悪には、呼吸器系や免疫系が、特に抗原取り込み能や抗原提示能の亢進が関与してい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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 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 0 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 晶子 (Honda, Akiko)
京都大学大学院工学研究科・助教
研究者番号： 20454324

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし