

研究終了報告書

「吸入性微細粒子による免疫活性化機構の解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：黒田悦史

1. 研究のねらい

日本をはじめとする先進国においてアレルギー疾患は増加傾向がある。これには様々な要因が関与するが、最近では大気中に浮遊する微細粒子がアレルギー性炎症の増悪に関与することが報告されている。特に排ガスに含まれるディーゼル粒子、黄砂などの砂塵、大気汚染物質であるPM2.5などの微細粒子の吸入がアレルギー性炎症の発症および増悪に関与することが示唆されている。

アレルギー性炎症はアレルゲン(抗原)に対する免疫細胞の過剰な応答によって生じる炎症性疾患であり、ダニや花粉などの曝露により生じる免疫応答が原因となっている。主にアレルゲンを認識したヘルパーT細胞が活性化することが知られているが、特に2型ヘルパーT細胞(Th2細胞)とよばれるヘルパーT細胞集団の偏向的な活性化が生じることにより、B細胞からのIgEの誘導や好酸球の活性化が引き起こされる。このようなTh2細胞の活性化やアレルギー性炎症の発症・増悪において大気中の微細粒子がどのように働いているのかは未だ不明な点が多い。

これまでの報告から、微細粒子は免疫応答を活性化させる免疫増強物質として働いていると考えられている。このような物質は「アジュバント」とよばれている。興味深いことに、微細粒子の多くがアレルギー性炎症を誘導するようなアジュバント効果を有しており、IgEの誘導や好酸球の活性化を促進することが報告されている。このことは、微細粒子に共通した何らかの免疫活性化機構が存在することを示唆している。

一般に、吸入された微細粒子は肺の掃除屋である肺胞マクロファージによって取り込まれ、体外に排出されると考えられている。また我々の過去の成果より、アレルギー性炎症を引き起こしやすい微粒子は肺胞マクロファージに貪食されると免疫刺激因子であるサイトカインを放出すること認めている。そこで本研究では微細粒子の免疫系への影響、主にアレルギー性炎症の発症機序について、肺胞マクロファージの機能という点から解析を行う。特にどのような因子を介してIgE誘導をはじめとするアレルギー性の獲得免疫を惹起するのか？そして、どのような性質をもつ微粒子がアレルギー性炎症を誘導しやすいのか？に着目する。これらを包括的に解析し、理解することで、免疫学的学術基盤の構築のみならず、微細粒子によるアレルギー性炎症の予防や治療への応用も期待できると考えている。

2. 研究成果

(1) 概要

大気中の微細粒子は吸入により肺の深部に到達し、アレルギー性炎症を引き起こす。このような微細粒子は肺の掃除屋である肺胞マクロファージによって貪食され、体外へ排出される。本研究では吸入性微細粒子の肺胞マクロファージへの作用に着目し解析している。特に生体側の解析と微粒子の化学的側面からの解析を行った。

生体側の解析として微細粒子による肺胞マクロファージの活性化機構およびアレルギー性炎症の誘導機構を解析した。これまでの研究成果より、肺胞マクロファージから放出されるIL-1 α が重要であることを見出しているため、IL-1 α が誘導される免疫学的機序について、細胞死やシグナル伝達の観点から解析を進めた。さらに微細粒子によって誘導されるIL-1 α 以外の新規因子についても探索し、アレルギー性炎症に関与する新規液性因子 X を見いだした。これらの因子をマウスに投与することで、IgEの上昇や肺の炎症が認められた。

また、微粒子にはアレルギー性炎症を引き起こしやすい炎症性微細粒子と引き起こしにくい非炎症性微細粒子とが存在する。炎症性微細粒子は肺胞マクロファージの細胞死を引き起こすとともにIL-1 α と液性因子 X を放出するが、非炎症性微細粒子ではそれらの反応は認められない。そのような微粒子の性質の違いに、微粒子のイオン化が関与することを見出した。

このような免疫学的特性と微粒子の化学的性質をもとに、微粒子によって誘導されるアレルギー性炎症発症機構の詳細を明らかにするとともに、炎症性微粒子を評価する試験法の確立を目指した。

(2) 詳細

「実験1-1 微細粒子による肺胞マクロファージの細胞死とIL-1 α の放出メカニズム」

「実験1-2 微細粒子による獲得免疫誘導のメカニズムの解析」

本実験は本さがけ研究の主軸であり、微細粒子による肺胞マクロファージの活性化、IL-1 α の放出とそのメカニズムの解析。微細粒子により誘導される新規免疫活性化因子の探索および獲得免疫活性化への関与。遺伝子欠損マウスを用いた解析を行なった。

まず、マクロファージ細胞株(RAW264細胞)を用い、微粒子によって誘導される遺伝子をRNAシーケンス法により検討したところ、IL-1 α 以外に候補遺伝子が見出された。しかしながら肺胞マクロファージを用いて同じ遺伝子について発現を検討したところ、細胞株とは同じ遺伝子発現パターンを示さなかった。この結果より、肺胞マクロファージはマクロファージ細胞株や他の組織マクロファージとは異なる性質を持つことが示唆された。

マウスのような小動物から、実験に十分な肺胞マクロファージを得るのは難しい。我々はマウスの肺から単離した細胞をin vitroで培養することで肺胞マクロファージを大量に誘導する手法を確立した。

次に培養肺胞マクロファージを用いて、アレルギー性炎症を起こしやすい粒子と起こしにくい粒子の分類を行なった。これまでの研究より水酸化アルミニウム(アラム)を経気道投与した後にアレルゲン(卵白アルブミン:OVA)を曝露することでアレルギーの指標であるIgEが誘導されることを認めている。一方で同じアルミニウムでも酸化アルミニウムの経気道投与では

アレルギー性炎症は生じない。肺胞マクロファージをアラムあるいは酸化アルミニウムにて刺激したところ、アラムによる刺激では肺胞マクロファージの細胞死が生じるとともに IL-1 α が放出されるが、酸化アルミニウムによる刺激では細胞死も IL-1 α 放出も生じなかった(図1)。さらに、さきがけ内での共同研究において肺胞マクロファージのライブイメージングを行ったところ、アラムの刺激により細胞死が生じ、その後に多量の IL-1 α の放出が観察された。

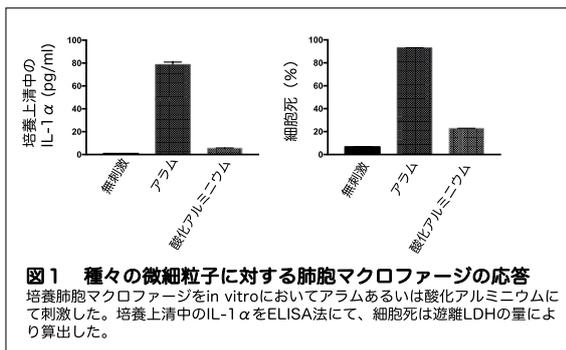


図1 種々の微細粒子に対する肺胞マクロファージの応答
培養肺胞マクロファージを in vitro においてアラムあるいは酸化アルミニウムにて刺激した。培養上清中の IL-1 α を ELISA 法にて、細胞死は遊離 LDH の量により算出した。

これまでの研究から、IL-1 α は獲得免疫の活性化を介して IgE を誘導することを見出している。本研究ではさらに、微細粒子により誘導される新規免疫活性化因子の探索を行い、アレルギー性炎症に関与する因子として「液性因子 X」を見出した。液性因子 X は IL-1 α と同じく、アラムで刺激された肺胞マクロファージから誘導されるが、酸化アルミニウムでは誘導されなかった。さらに液性因子 X をアレルゲンとともにマウスの気道に投与することで、IL-1 α と同様にアレルゲン特異的な IgE が誘導され(図2)、肺の異所性リンパ組織(inducible bronchus associated lymphoid tissue: iBALT)が認められた。また、IL-1 α と液性因子 X を誘導する共通のシグナル伝達経路を見出し、現在も解析を進めている。

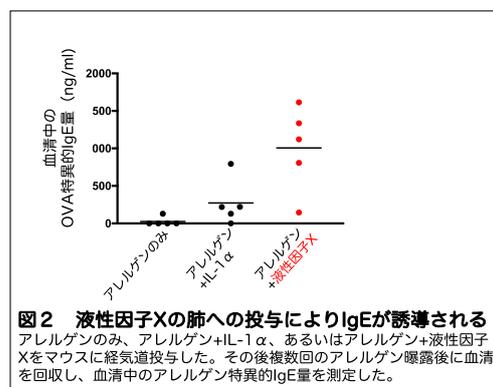


図2 液性因子Xの肺への投与によりIgEが誘導される
アレルゲンのみ、アレルゲン+IL-1 α 、あるいはアレルゲン+液性因子 X をマウスに経気道投与した。その後複数回のアレルゲン曝露後に血清を回収し、血清中のアレルゲン特異的 IgE 量を測定した。

これまでの結果より、アラムのように細胞死を誘導する微細粒子では IL-1 α と液性因子 X の放出が認められ、獲得免疫応答を介して IgE を誘導するが、酸化アルミニウムでは細胞死の誘導も液性因子の放出も見られず、獲得免疫の活性化も認められない。そのため肺胞マクロファージに貪食された際に、細胞死を引き起こす微細粒子がアレルギー性炎症を誘導し、細胞死が生じない微細粒子は免疫応答を誘導しないと考えられた。しなしながら、細胞死を引き起こすが液性因子を誘導しないタイプの微細粒子 Y を見いだした。図3に示すように微細粒子 Y (ピンク色:細胞死は起こすが炎症は低い粒子)はマクロファージの細胞死を誘導するが、IL-1 α および液性因子 X を誘導しない。この微粒子を経気道的にマウスに投与した後にアレルゲンを曝露したところ、IgE の誘導も低く(図4)、異所性リンパ組織の誘導もアラムに比して弱かった。

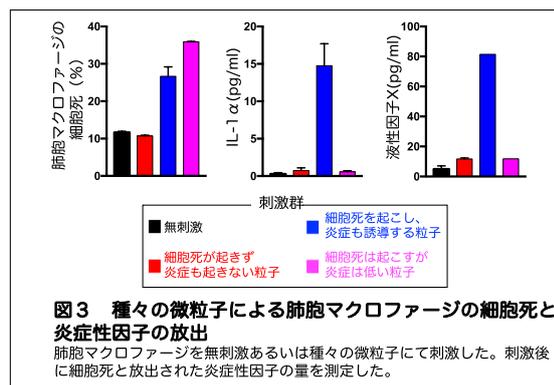


図3 種々の微粒子による肺胞マクロファージの細胞死と炎症性因子の放出
肺胞マクロファージを無刺激あるいは種々の微粒子にて刺激した。刺激後に細胞死と放出された炎症性因子の量を測定した。

以上の結果より、微粒子により誘導される細胞死とともに、IL-1 α と液性因子 X を放出することが、アレルギー性炎症において重要であることが示された。このような現象には微細粒子のイオン化が重要であることを見出し、現在微粒子のイオン化による肺胞マクロファージの活性化機構について解析を進めている。

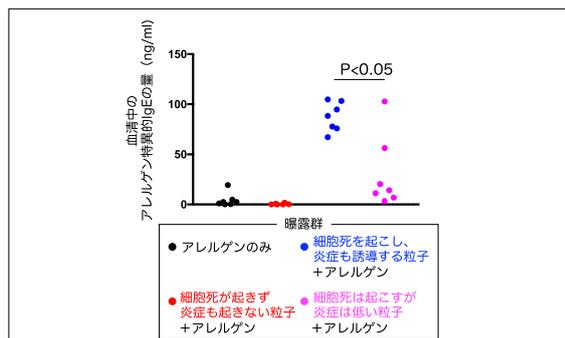


図4 種々の微粒子によるアレルギー特異的IgE誘導の増強効果
種々の微粒子をアレルギーとともにマウスに曝露し、血清中のIgE量を測定した。

「実験2 微細粒子のアレルギー性炎症の制御法と治療および予防法の開発」

アレルギー性炎症に対して核酸由来のアジュバントが効果的であることが知られている。中でも特に CpG オリゴヌクレオチドは Th2 細胞の活性化を抑制することが報告されている。そこで、微細粒子の経気道投与の際に CpG オリゴヌクレオチドを同時に投与し、アレルギー性炎症が抑えられるか否かを検討した。図5に示すように、有意差は認められなかったが IgE 誘導については抑制傾向が認められた。一方で、IgG の誘導は CpG 投与なしのコントロール群と同程度であったことから、CpG オリゴヌクレオチドが選択的に IgE の産生抑制に作用していることが示唆された。本実験は予防モデルになるが、今後はアレルギー性炎症を発症した後に CpG オリゴヌクレオチドを投与する治療モデルも検討予定である。

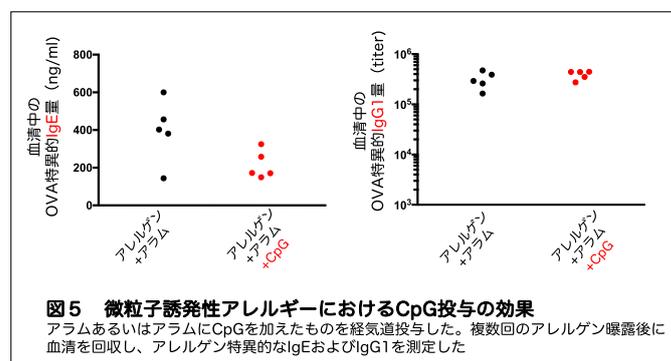


図5 微粒子誘発性アレルギーにおけるCpG投与の効果
アラムあるいはアラムにCpGを加えたものを経気道投与した。複数回のアレルギー曝露後に血清を回収し、アレルギー特異的なIgEおよびIgG1を測定した

「実験3 アレルギー性炎症誘発微細粒子の評価法の開発」

本研究では当初はマクロファージ細胞株あるいはヒトの末梢血の免疫細胞(末梢血単核球)を用いて微細粒子の評価を行う計画であったが、前述したように微細粒子に対する肺胞マクロファージの応答が非常に特徴的であり、IL-1 α のみならず新たに見出した液性因子 X の産生についても細胞株や他の組織マクロファージでは観察されない現象であった。これらの結果より、肺胞マクロファージを用いてアレルギー性炎症誘発微細粒子を評価する必要があると考えている。IL-1 α や液性因子 X に加え、新たな評価因子を探索しながら、肺胞マクロファージを用いた評価法の開発を検討している。

3. 今後の展開

本研究は広義の意味において微粒子がどのような機序で免疫応答を誘導するかを明らかにすることを目的としている。大気中に存在する微粒子は吸入によりアレルギー性炎症の発症や増悪に関与することも明らかにされているが、その免疫学的機序に関しては不明な点が多く残されている。また、現在日本で使用されているワクチンに含まれている免疫増強剤であるアジュバントはアルミニウムの微粒子である。これも同様にどのような機序で免疫を活性化するのは未だに明らかにされていない。本研究では主に吸入性微細粒子に対する肺胞マクロファージの活性化機構について研究を行い、その結果として①微細粒子により誘導される新規免疫活性化液性因子 X の同定、②液性因子放出のシグナル伝達機構の解明、③炎症を引き起こす微粒子の化学的特性について明らかにすることができた。これらの知見は微粒子免疫学の理論基盤になるとともに、微粒子の免疫毒性を評価する試験法の開発にも応用できると考えており、現在その準備を進めている。

さらに微粒子に対する詳細な免疫応答はワクチンアジュバントの開発研究にも応用できると考えておる。現在アルミニウムの微粒子と類似の免疫刺激活性を有する低分子化合物を見出し、本さがけ研究で見出した微細粒子の免疫学的機序解析を基盤とした新規アジュバント開発を進めている。

4. 自己評価

本さがけ研究ではアレルギー性炎症を誘導する微細粒子による免疫活性化機構の解明として、肺胞マクロファージに対する微細粒子の作用機序の解明を主な目的として進めた。本研究を進めるにあたりマイルストーンを設定していたが、当初の想定とは異なる様々な発見があったため、マイルストーンの変更を余儀なくされた。しかしながら目的である作用機序の解明という点では想定以上の達成度であると考えている。さがけ研究中の論文化までは進められていないが、本研究成果はインパクトの高い論文になると考えている。

研究体制に関しては、さがけ内の共同研究として微粒子応答のライブセルイメージングが可能となり、それを起点として新たな発見も見出された。また CREST「細胞外微粒子」での私自身の研究紹介がきっかけとなり、CREST のアドバイザーの先生からのご助言とご支援をいただくことができた。特に私が不得意としていた微粒子の化学的性質からのアプローチが可能となり、微粒子による免疫活性化機構の新しい側面を明らかにすることができたと考えている。

社会・経済への波及効果については、まず本研究の成果を利用した炎症性微粒子の免疫毒性（アレルギー賦活作用）を評価する試験法の開発が挙げられる。試験法の開発自体はさがけ研究の計画に含めていたが、本研究成果により多方面・多要素による評価が可能になることが明らかになり、改めて新しい試験法の開発を進める計画である。新規の試験法は肺胞マクロファージを用いた *in vitro* 試験法であり、これが可能になれば短時間で、簡便で、動物実験の3Rにも貢献できる試験法になると考えている。また新しく開発された化学物質の評価に利用できれば化学物質による健康被害を事前に防ぐことも可能になると期待している。

また、微粒子の免疫活性化機構の解明はワクチンアジュバントの研究開発につながると考え

ている。現在日本で使用されているワクチンアジュバントはアルミニウムの微粒子である。安全かつ有効なアジュバントとして 100 年近く使用されているが、その免疫学的機序の多くは明らかにされていない。また微粒子であることがアルミニウムアジュバントの応用への妨げにもなっている。本研究での微粒子の作用機序研究は新しいワクチンアジュバントの開発にも応用できると考えており、実際に安全かつ有効なアルミニウムアジュバントと同様の作用機序を有しながら微粒子ではなく低分子化合物のアジュバントを見出し、現在は実用化を目指して研究を進めている。この発見もさきがけ研究に見出されたものであり、まさに研究成果の科学技術への波及効果であると言える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Kobari S, Kusakabe T, Momota M, Shibahara T, Hayashi T, Ozasa K, Morita H, Matsumoto K, Saito H, Ito S, Kuroda E, Ishii KJ. IL-33 Is Essential for Adjuvant Effect of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on the Protective Intranasal Influenza Vaccination. *Front Immunol.* 2020, 11:360-371.

呼吸器系に有効なアジュバントの開発研究に関する論文。現在安全かつ有効なアジュバントとしてアルミニウム粒子が使用されているが、主に皮下あるいは筋注用のアジュバントであり、経鼻・呼吸器系のアジュバントは存在しない。本研究ではアルミニウム粒子と作用機序が類似しているハイドロキシ- β -シクロデキストリンの経鼻・呼吸器系アジュバントとしての有効性について、アルミニウム粒子との対比により検証した論文となる。

2. Ozasa K, Temizoz B, Kusakabe T, Kobari S, Momota M, Coban C, Ito S, Kobiyama K, Kuroda E, Ishii KJ. Cyclic GMP-AMP Triggers Asthma in an IL-33-Dependent Manner That Is Blocked by Amlexanox, a TBK1 Inhibitor. *Front Immunol.* 2019, 10:2212-2221.

アジュバントによるアレルギー性喘息モデルの病態解析についての論文。RS ウイルスなどのウイルス感染もアレルギー性喘息の要因であるが、その要因の一つとして核酸由来アジュバントである cGAMP の経気道投与によってアレルギー性炎症が生じることを見出した。本研究では微細粒子の経気道投与によるアレルギー性炎症モデルを進展させた論文であり、さががけ研究での実験手法のノウハウが用いられている。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<著作物>

・Kuroda E. Mechanisms of action of inhaled particulates on allergic lung inflammation. *Allergy and Immunotoxicology in Occupational Health -The Next Step* (Springer press), 2020, 1-16.

(DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-15-4735-5_1)

・Kuroda E., Ishii KJ. Unravelling how adjuvants work, and what their roles are in vaccination and allergy. *IMPACT* (Science Impact Ltd), 2018, 3:44-46.

(DOI: <https://doi.org/10.21820/23987073.2018.3.44>)

<学会発表>

・黒田悦史 アジュバント研究から学ぶ、アレルギー性炎症発症のメカニズム
金沢大学薬学シンポジウム(日本、石川) 2019年11月(招待講演)



・黒田悦史 吸入性微粒子による免疫系の活性化とアレルギー性炎症の誘導
第42回日本分子生物学会年会(日本、福岡) 2019年12月(シンポジウム講演)

・黒田悦史 ライブセルイメージングの免疫毒性研究応用への可能性
第27回免疫毒性学会学術集会(WEB) 2020年9月(ワークショップ講演)