

博士論文要旨

論文題目 :アレルギー増悪化因子としての酸化植物油脂の免疫毒性学的研究

申請者 荻野 泰史 印

研究分野 公衆衛生学

紹介教授 上野 仁

近年、気管支喘息や花粉症をはじめとするアレルギー疾患の患者が急速に増加している。我が国では、過去 30 年間で本疾患の罹患率が増加し、国民の 2 人に 1 人が罹患していることが推定されている。この罹患率増加の要因を解明することは、本疾患の発症とその増悪化を予防するための対策を講じるうえで極めて重要であると考えられる。

アレルギー疾患の病態では、ヘルパー T 細胞の Th1/Th2 バランスが破綻した状態であると考えられる。遅延型アレルギー反応の一つである接触性過敏反応 (CHS) は細胞性免疫によって引き起こされるため、Th1 優位に傾いていることが考えられる。そのため、CHS の増悪化機構を解明するためには、細胞障害活性を亢進する IFN- γ 、Th1 細胞の分化・増殖や IFN- γ 産生を促進する IL-12、IL-18 などのサイトカイン発現量を解析することが重要となる。一方、気管支喘息やアレルギー性鼻炎は体液性免疫によって引き起こされる即時型アレルギーに分類される。さらに、アトピー性皮膚炎のように即時型および遅延型の両方のアレルギー反応を示す疾患も知られている。

アレルギー疾患の発症に関連する遺伝的要因と環境要因のうち、その罹患率増加は前者よりもむしろ後者の方が深く関与している。その中でも食事環境は急変した環境要因の一つである。厚生労働省の「国民健康・栄養調査報告」によると、食事から摂取する脂質の割合が増加している。食事から摂取する脂質のうち、コーン油やゴマ油などの植物性油脂が頻繁に使用されており、その中でもオリーブ油は加熱調理だけでなく生食用にも用いられ、最も身近な油脂の一つである。これらの植物油脂の主な組成は、いずれも不飽和脂肪酸を多く含むトリグリセリドであり、不飽和脂肪酸のアリル水素の反応性が高いために熱や光などの反応促進因子の存在下で容易に酸化される。ラジカル反応の連鎖によ

って油脂自動酸化の第一次生成物であるヒドロペルオキシドが生成して蓄積されると過酸化物質 (POV) が増加する。さらに酸化反応が進行すると、マロンジアルデヒドやアルケナール類などの第二次生成物が生成し、チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) が増加する。また、脂肪酸エステルの加水分解によって脂肪酸が遊離し、酸価 (AV) が増加する。これらの酸化変敗した油脂の摂取が肝障害や脂肪肝を引き起こすことだけでなく、肝臓中 8-isoprostane や血漿中の酸化型 glutathione の上昇、血漿中の α -tocopherol の減少など、酸化ストレスを亢進することが数多く報告されているが、酸化植物油の摂取とアレルギー疾患との関連性については疫学的調査も含めて全く検討されていないのが現状である。

そこで本研究では、食事から摂取されうる酸化植物油のアレルギー反応に及ぼす影響とその作用機序を解明する目的で、各種アレルギーマウスモデルを用いた検討を行うとともに、アレルギー反応増悪化に寄与する酸化油脂中の酸化生成物の影響について調べた。また、酸化油脂による増悪化が認められた CHS について、アレルギー反応の感作相および惹起相の炎症性サイトカイン発現と T 細胞亜集団分布について解析を行った。

第 1 章 即時型、遅延型およびそれら二相性アレルギー反応に対する酸化油脂の影響

植物油は、最も使用頻度の高い油脂の一つであるオリーブ油を開封後室温で 3 か月以上静置することにより自然酸化させて POV が高値を示すものを酸化油脂として用いた。この酸化オリーブ油の摂取が各種アレルギー反応を増悪化させるかどうかを明らかにするために検討を行った。すなわち、遅延型アレルギー反応を示す CHS、即時型アレルギー反応を示す能動皮膚アナフィラキシー (ACA) および即時型と遅延型の二相性アレルギー反応を示す dinitrofluorobenzene (DNFB) 誘発性皮膚炎のマウスモデルを用いて検討を行った。その結果、新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で CHS による耳介腫脹の増大、ACA による血管外色素漏出量の増大、および DNFB 誘発性皮膚炎による即時相および遅発相の耳介腫脹の増大が認められ、いずれのアレルギー反応も酸化オリーブ油の投与によって増悪化することが明らかになった。そこでつぎに、酸化植物油中のどのような酸化生成物がアレルギー反応の増悪化に寄与するのかを明らかにするために、POV 以外にも AV または TBARS 値のみが高いオリーブ油および UV 照射によって酸化して POV 高値のオリーブ油以外の植物油を作製し、これらが CHS に及ぼす影響を検討した。その結果、酸化植物油による CHS の増悪化は AV や TBARS 値および油脂の脂肪酸組成に関係なく、POV 依存的であることが明らかとなった。

以上の結果から、酸化オリーブ油は即時型および遅延型のいずれのアレルギー

反応も増悪化することが確認された。また、酸化オリブ油による CHS の増悪化は、遊離脂肪酸やアルデヒド類などの酸化生成物は関与せず、植物性油脂一般に含まれる不飽和脂肪酸の過酸化物であるヒドロペルオキシドに依存して引き起こされることが考えられた。

第 2 章 酸化オリブ油による CHS 増悪化と炎症性サイトカイン発現との関連性

酸化オリブ油による CHS 増悪化の作用機序を明らかにするために、CHS の増悪化と感作相および惹起相の炎症性サイトカイン発現との関連性について検討した。まず、CHS の感作相における炎症性サイトカイン発現に及ぼす酸化オリブ油の影響を明らかにするために、感作から 7 日後までの耳介組織中の炎症性サイトカイン mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。その結果、Th1 分化に必須である IL-12 の mRNA 発現量は経日的に増加したが、新鮮オリブ油投与群と酸化オリブ油投与群との間に差異は認められなかった。一方、IL-12 存在下で Th1 分化を促進する IL-18 の mRNA 発現量は経日的に増加し、感作 7 日後において新鮮オリブ油投与群に比べて酸化オリブ油投与群で有意な増大が認められた。つぎに、CHS 惹起後の耳介中における炎症性サイトカイン mRNA 発現量を測定した結果、酸化オリブ油投与によって惹起 6~24 時間後の耳介腫脹が増大することが確認され、惹起直前の IL-18 mRNA 発現量は感作 7 日後と同様に酸化オリブ油投与による有意な増大が認められた。また、惹起 6 時間後において IFN- γ mRNA 発現量が酸化オリブ油投与群で顕著に増大することが明らかになった。

以上の結果から、酸化オリブ油は CHS の感作段階において、IL-18 の発現を増大させ、CHS 惹起後の IFN- γ 発現を促進することによって耳介腫脹を増悪化させることが考えられた。

第 3 章 酸化オリブ油による CHS 増悪化時における IL-18 増大機序と T 細胞分化に及ぼす影響

IL-18 は転写因子による転写調節と切断酵素によるプロセッシング制御によって分泌が調節される。そこで、CHS の感作段階において、酸化オリブ油による IL-18 の発現量増大がどのような作用機序によるのかを明らかにするために、IL-18 の転写因子である AP-1 および IL-18 のプロセッシング酵素である caspase-1 の活性化に及ぼす酸化オリブ油の影響について感作 7 日後のマウスから分離した脾臓細胞を用いて検討した。その結果、脾臓細胞中における AP-1 活性は酸化オリブ油投与群で有意に増大し、caspase-1 活性も酸化オリブ油投与群で新鮮オリブ油投与群に比べて高かった。このことから、酸化オリブ油は AP-1 転写活性を促進することにより IL-18 mRNA 発現を増大させるとともに、caspase-1 活性を上昇させることによって IL-18 のプロセッシングを促進してその細胞外へ

の分泌量を増大させることが示唆された。IL-18 は細胞性免疫応答において Th1 の分化・増殖を促進するため、つぎに、酸化オリブ油による CHS 惹起時における耳介中 IFN- γ の増大が感作段階での T 細胞亜集団分布の変動に起因するかどうかを検討した。すなわち、感作 7 日後における脾臓細胞中の T 細胞亜集団分布をフローサイトメトリーを用いて解析した結果、ヘルパー T 細胞 (CD3⁺CD4⁺ cells) の割合は新鮮オリブ油投与群に比べて酸化オリブ油投与群で有意に増加した。また、細胞障害性 T 細胞 (CD3⁺CD8⁺ cells) の割合も酸化オリブ油投与群で同様に増加することが確認された。CHS による Th1 への偏向が、酸化オリブ油投与による IL-18 発現量の増加によってさらに促進されていることが考えられた。そこでつぎに、Th1/Th2 バランスに及ぼす酸化オリブ油の影響を明らかにするために、脾臓細胞から単離した CD3⁺CD4⁺細胞または CD3⁺CD8⁺細胞を抗原提示細胞 (APC) との共培養下で抗原刺激し、それぞれの IL-4 および IFN- γ 産生量を測定した。その結果、CD3⁺CD4⁺細胞と APC の共培養時では新鮮オリブ油投与群に比べて酸化オリブ油投与群で CD3⁺CD4⁺細胞による抗原特異的な IL-4 産生量が低い傾向を示した。また、CD3⁺CD4⁺細胞と APC の共培養時の抗原刺激による IFN- γ 産生量は、新鮮オリブ油投与群に比べて酸化オリブ油投与群で有意に増大した。一方、APC と共培養時の CD3⁺CD8⁺細胞では、抗原刺激によって顕著な IFN- γ 産生を認めたが、新鮮オリブ油投与群と酸化オリブ油投与群の間で有意な差異は見られなかった。

以上のことから、酸化オリブ油の投与は CHS の感作時において、IL-18 発現の増大を介して Th1 の分化・増殖を促進し、惹起時における抗原特異的な IFN- γ の産生を促進することが考えられた。

以上の結果を総合すると、酸化オリブ油は即時型および遅延型のいずれのアレルギー反応も増悪化すること、その増悪化には酸化オリブ油中に含まれる不飽和脂肪酸エステルの過酸化物であるヒドロペルオキシド依存的であることが明らかとなった。また、酸化オリブ油による CHS の増悪化は感作段階における IL-18 産生の増大によって Th1 分化および増殖が促進された結果、炎症惹起時における抗原特異的な IFN- γ 産生が増大することによると考えられた。これら結果から、酸化植物油脂がアレルギー反応を増悪化するとともに酸化オリブ油の CHS 増悪化の作用機序の一端を明らかにしたと考えられる。本研究成果はアレルギー疾患の発症および増悪化の原因解明に貢献するとともに、将来 IL-18 を標的としたアレルギー疾患の予防対策および治療に繋がることが期待される。