

【アジュバントワークショップ 講演③】

「アラムアジュバントをふくむ粒子状物質の新規免疫学的メカニズム」

産業医科大学医学部免疫学寄生虫学教室講師 黒田悦史

よろしく申し上げます。産業医科大学の免疫学寄生虫学の黒田と申します。

本日は、このような発表の機会を与えていただき、大変感謝しております。

本日は、アラムアジュバントを含む粒子状物質の免疫学的メカニズムということですが、私、最初はアジュバントの研究をしていたわけではありませんで、産業医科大学という大学の性質上、産業界で産出されるさまざまな化学物質、特に粒子状の物質のリスク評価や健康障害を調べておりまして、その中で多くの粒子状物質というのが免疫反応を活性化して、炎症を引き起こすということに興味を持っております。現在は、そういった粒子状物質がどのようなメカニズムで免疫反応を活性化するのかということについて研究しております。

粒子状化学物質という、非常に堅苦しい言い方ですが、実際どういったものがあるかと申しますと、医薬品として使われておりますアラム、それ以外にはシリカやアスベスト、こういったケイ素由来の化合物というものも粒子状化学物質に分類されます。さらに、酸化ニッケルや二酸化チタン、こういった工場などで触媒として用いられるような粒子状物質についても、労働者に対する安全性という意味で評価を行っております。

さらに、最近、特に注目されております炭素骨格のナノ粒子と呼ばれているもの、カーボンナノチューブやフラーレン、いわゆる非常に小さい粒子状化学物質ですが、こういったものに対しても評価を行っております。

そういった粒子状化学物質の多くは、免疫を活性化する感作性、いわゆるアジュバント効果というものを有しておりまして、それについて何点か特徴があります。

一つは、その形状でありまして、それが粒子状なのか、繊維状なのかということが、まず一つ重要になってきます。

繊維状の化学物質で一番有名なのがアスベストであります。こういった繊維状の化学物質は粒子状と比べまして、貪食されにくく、また貪食細胞にストレスを与えます。粒子状物質のクリアランスには基本的にマクロファージが重要なんですけども、こういった感じでマクロファージが繊維状のものを貪食す

ると、非常に強いストレスになります。そのため粒子状の物質に比べて、繊維状のものは、クリアランスが非常に悪いということが知られております。すなわち、繊維状ではマクロファージによるクリアランスが低下しまして、永続的な局所の炎症反応の結果、慢性炎症や腫瘍化というのが起こされるというのも一つの特徴だと考えられております。そのため、アジュバントを考える上では、繊維状よりも粒子状のほうが比較的安全じゃないかと考えられます。

次に、サイズですけれども、マクロファージや樹状細胞が粒子を貪食する際に、適切な大きさというのが一般的には5 μ mから数百nm、200~300nmぐらいだというふうに言われております。実際これより大きいものは貪食されにくく、10ナノとか1ナノ程度の非常に小さいナノ粒子は、免疫系を活性化するという事は知られておりますけれども、マクロファージや樹状細胞の貪食を介するわけではなく、別の機構で細胞内に入って、シグナルを伝えているということが報告されていますけれども、現在のところ、それについては詳しいことはまだよくわかっておりません。

最後は、本日、中心的に話をする粒子自体が有する刺激活性というのもありまして、粒子状で、適切な大きさだったら、どんな粒子も免疫系を活性化するかといいますと、そうではありませんで、粒子自体が免疫系を活性化する何らかの要因を有しております。

こういった粒子状の化学物質により免疫反応も、基本的には病原体の感染と同様の経路で活性化されると思われまます。

免疫反応には自然免疫と獲得免疫がありまして、自然免疫はマクロファージや樹状細胞、獲得免疫はT細胞、B細胞のような抗原特異的な反応になりますけれども、病原体に関しましては、基本的にはPattern-recognition receptorsを介しまして、マクロファージや樹状細胞が活性化しまして、サイトカインや液性因子の産生や抗原の情報を獲得免疫に伝達しまして、抗原特異的な反応が惹起されます。

それに対しまして、粒子状の物質は、こういったマクロファージや樹状細胞に貪食されて、その後一体どういうシグナルが伝えられて、どういう液性因子が産生されて、どのようなメカニズムで獲得免疫が活性化されるのか、それにつきましてはまだ明らかにされない点が多く残されております。

その中で、最近注目されておりましたのが、NALP3インフラマソームと言われます細胞内の炎症シグナルの複合体であります。

例として2つの論文を挙げさせていただきましたが、マクロファージや樹状細胞がアスベストやシリカ、アラムというものを貪食しますと、このインフラマソームが活性化され、その結果、炎症反応と獲得免疫が誘導されるという論文が紹介されております。

インフラマソームですけれども、そもそもは細菌やウイルスに感染した際に活性化する炎症シグナル複合体でありまして、センサーたんぱくのNALP3、システインプロテアーゼのcaspase-1、この2つをつなぐアダプターたんぱくのASCの3種類のタンパクから形成されておりまして、通常は病原体の膜構造や核酸などを認識して活性化されまして、caspase-1の活性化に伴って、IL-1 β やIL-18を誘導するということが知られておりましたが、最近では、死んだ細胞から出てくるATPなどでも活性化され、さらに今回、メーンでお話しします粒子状の化学物質をマクロファージや樹状細胞が貪食することで活性化され、IL-1 β やIL-18を産生するということが報告されております。

そこで、本日お話ししたいこととしましては、シリカやアラムというものがインフラマソームを活性化するということが報告されていますけれども、そういったインフラマソームがさまざまな粒子状物質によって同様に活性化されるのかどうかということ。さらに、インフラマソーム依存性の炎症性サイトカイン以外には、液性因子は産生するのか、しないのかという点。さらに、そういった液性因子でこういった免疫反応が誘導されるのか。最終的には、そういった粒子状化学物質によって、こういったシグナル伝達体が活性化されるのかということについてお話ししたいと思います。

まずは、マウスの腹腔マクロファージを用いまして、既に報告されておりますシリカで刺激しまして、実際にインフラマソームが活性化するかどうかというのを調べました。微量のLPSでプライミングしたマクロファージをシリカで刺激しますと、シリカの刺激でIL-1 β 、すなわちインフラマソームが活性化されるという結果が認められました。

この実験系を用いまして、さまざまなサイトカインの液性因子について調べました。調べましたのはTNF- α 、IL-6、IL-10、IL-12、ケモカインでありますMCP-1、RANTESですが、シリカの刺激によって、このようなサイトカイン、ケモカインは誘導されませんでした。

そこで、サイトカインのようタンパク質のみでなく、さまざまな液性因子を

幅広く調べてみましたところ、リピッドメディエーターでありますプロスタグランジンE2、これがIL-1 β と同様に、LPSをプライミングしたマクロファージからドーズディペンデント、タイムディペンデントに誘導されてくるということがわかりました。

これまでの実験では、マクロファージを用いていましたけれども、樹状細胞ではどうかということ調べました。樹状細胞をシリカやアラムで刺激しますと、マクロファージと同様に、非常に高いレベルのIL-1 β が産生されるんですけれども、一般的に樹状細胞はプロスタグランジンE2の産生というのが非常に低いということが知られておりまして、プロスタグランジンE2の産生に関しましては、主にマクロファージがメインのソースになっていると考えております。

そこで、さまざまな粒子状化学物質を用いまして、IL-1 β 、プロスタグランジンE2、この両因子の産生がどのようになっているのかということ調べました。

用いましたのは、結晶シリカとアラム、それと酸化ニッケル、二酸化チタン、多層カーボンナノチューブ、それと非晶質シリカです。

結果から申しますと、この非晶質シリカ、この非晶質シリカというのは、シリカでありますけれども、毒性、がんの誘導性はないと言われている安全なシリカと言われておりますけれども、こういった非晶質シリカも結晶シリカやアラムと同様に、IL-1 β やプロスタグランジンE2の産生を誘導しました。

一方で、カーボンナノチューブや二酸化チタン、こういったものはマクロファージ刺激活性を有しておりませんでした。非常に興味深いことですが、酸化ニッケルはIL-1 β を誘導せずに、プロスタグランジンE2のみを誘導するという、非常に変わった特性を有しておりました。これに関しましては、後ほどまた紹介いたします。

そこで、シリカやアラムに注目しまして、以下の実験を行いました。

こういった物質がNALP3インフラマソームを介して、IL-1 β やIL-18を誘導するということは報告されていますけれども、プロスタグランジンE2の産生に関しましても、同じ経路を通して産生されるのか、それとも別の経路を通して産生されるのかを調べました。

用いた実験ですが、NALP3、ASC、caspase-1という、このNALP3インフラマソームの構成成分の欠損マウスです。このうちの一つでも欠損し

ますと、NALP3インフラマソームが活性化されません。この欠損マウス由来のマクロファージを用いて実験を行いましたところ、シリカのデータが一番きれいに出ていますけれども、ワイルドタイプのマクロファージはシリカに反応して、IL-1 β を産生しますけれども、ノックアウトマウスではそれが低下しています。

一方で、プロスタグランジンE2ですけれども、実はインフラマソームの欠損マウスでも、ワイルドタイプと同等か、それ以上に高いレベルでプロスタグランジンE2が産生されました。

このことから、粒子状化学物質はインフラマソーム依存性のIL-1 β と、インフラマソーム非依存性のプロスタグランジンE2を誘導するということがわかりました。

その中で、IL-1 β ですけれども、これは主に急性炎症、すなわち好中球を誘導し、局所的に急性炎症を誘導する非常に重要な因子であることが報告されております。

そこで、プロスタグランジンE2はどういった役割を持っているのかということに関しまして、mPGES-1の欠損マウスを用いて解析しました。これはプロスタグランジンE2の最終合成酵素でありまして、これが欠損しますと、シリカによるプロスタグランジンE2の合成が全くなくなります。一方で、IL-1 β の産生は通常どおり認められます。

このマウスを用いまして、まずはOVAとアラムでマウスを2回、腹腔投与で免疫しまして、抗原特異的な抗体産生を見ましたところ、OVA特異的なIgEが低下するという傾向が認められました。一方で、IgG1やIgG2cの産生は大きな差は認められませんでした。

全く同じ実験をOVAとシリカを用いまして行ったところ、やはりOVAとアラムと同様に、OVA特異的なIgEの産生が低下するという現象が認められました。

このプロスタグランジンE2によるIgEの産生増強がどのようなメカニズムで誘導されるかですが、脾細胞をLPSとIL-4、もしくは抗CD40抗体とIL-4で刺激いたしますと、B細胞が活性化され、インビトロにおいて培養上清にIgEが産生されてきます。そこにプロスタグランジンE2を添加いたしますと、IgE産生が増強されるという現象が認められます。すなわち、マクロファージから産生されたプロスタグランジンE2は、B細胞に作用して、

直接的に I g E の産生を増強するという機能を有しているのではないかと考えられます。

これらの結果から、粒子状物質はインフラマソームディペンデントの I L - 1 β 、インディペンデントのプロスタグランジン E 2 を産生しまして、その両方が炎症反応や I g E の産生に関与すると考えられます。

そこで、最初のほうの図に戻りますけれども、実は酸化ニッケルというのが、プロスタグランジン E 2 のみを誘導する粒子であることを先ほど紹介しましたが、この粒子を用いまして同様にマウスを免疫しましたところ、実は O V A / アラムと同等か、それ以上の非常に高い抗原特異的な I g E 産生誘導能を有していることがわかりました。

これらの結果から、このプロスタグランジン E 2 というのが B 細胞に作用して、I g E の産生増強に関与する、いわゆるレギュレーターとして働いていると考えられました。

これは最後の実験になりますけれども、シリカで刺激しますと、インフラマソーム依存性の I L - 1 β 、I L - 1 8、インディペンデントなプロスタグランジン E 2 を誘導しますけれども、どういったシグナル伝達体に関与しているのかということについて、いろいろなシグナル伝達阻害剤を添加しまして調べましたところ、非常に興味深いことに、S y K と呼ばれるシグナル伝達体、これが非常に重要であることがわかりました。すなわち、マクロファージをシリカで刺激する際、このとき同時に、S y K のインヒビターを入れることで、I L - 1 β 、プロスタグランジン E 2 の産生が有意に低下するという現象が認められました。

この S y K ですが、先ほど山崎先生のほうでお話がありましたように、真菌のレセプター、バクテリアのレセプターに対しまして、F c レセプター γ チェーンがアダプタータンパクとしてくっつきましても、その I T A M にくっついて、下流にシグナルを伝達する非常に重要なシグナル伝達体でありまして、この活性化がファゴサイトーシスや N F - κ B の活性化に関与するとともに、最近ではインフラマソームの活性化にも関与するということが報告されております。

こういったことから、粒子状物質が何らかのレセプターを介しまして、恐らくこの S y K を活性化すると考えられ、この S y K の活性化というのが、実はマスターレギュレーターとなって、粒子状化学物質による免疫反応の活性化と

いうものに寄与していると考えて思います。

本日は、このプロスタグランジンE₂や、IL-1 β の産生を中心にお話しさせていただきましたけれども、このプロスタグランジンE₂も結局、エスタブリッシュされた免疫反応をレギュレートする一因子であるということで。実際に粒子状化学物質がこういった機序でアジュバンティシティー、アジュバント効果を有しているのかということに関しましては、まだ今回の私の実験でも明らかにされておりません。

そこで現在は、一番最初に活性化されるこのSykというシグナル伝達体に注目しまして、粒子状化学物質がこういった機序で免疫原性を有しているのかということについて、今後も調べていきたいと考えております。

以上の研究ですが、粒子状化学物質に関しましては、産業医科大学の産業生態科学研究所で、粒子の健康障害とか、リスク評価を行っている研究チームの森本（泰夫）先生のもとで行っております。

さらに、インフラマソームや各種ノックアウトマウスに関しましては、石井（健）先生、審良（静男）先生、植松（智）先生のご協力をいただいております。この場をかりて感謝したいと思います。

以上です。（拍手）