

令和元年6月10日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19608

研究課題名(和文)女性の喘息重症化を規定する気道上皮細胞の役割と個別化治療へ向けた基盤的研究

研究課題名(英文) Involvement of airway epithelial cells in increased asthma severity in females

研究代表者

宮坂 智充 (MIYASAKA, Tomomitsu)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50709912

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)：成人喘息における重症度は男性患者より女性患者において高いが、その機序は不明である。本研究では、性依存的な気道上皮細胞の機能的変化が樹状細胞活性化に及ぼす影響を明らかにするために、卵白アルブミン誘導喘息モデルマウスを用いて研究を行った。アレルゲン吸入後のメスマウスより採取した気道上皮細胞はオスマウスのそれと比べて、IL-33ならびにCCL2 mRNA発現が亢進していた。気道上皮細胞より産生が増加したIL-33は樹状細胞上のCD86発現を亢進させる可能性が明らかとなった。これらの結果から、女性における気道上皮細胞の活性化は樹状細胞の活性化亢進を介して喘息の増悪に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息の増悪による救急外来受診後の再発率や入院治療にかかる医療費は男性患者より女性患者において高く、病態重症化および医療経済的視点から女性における喘息重症化の問題の解決は社会的要請が高い。本研究は、喘息における免疫学的メカニズムの性差に着目し、炎症の起点である気道上皮細胞におけるサイトカインとケモカイン産生の増加が女性における喘息病態の増悪に関与している可能性を明らかにした。本研究の成果は、女性における喘息の増悪において、気道上皮細胞が主要な治療標的になり得る可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：To address the pathways mediating sex disparities in the severity of adult asthma, in the present study we examined the sex-related influence of airway epithelial cells on lung DC activation using an ovalbumin (OVA)-induced asthma mouse model. Airway epithelial cells (CD31- CD45- Ep-CAM+ cells), regulators of airway inflammation, from asthmatic female mice expressed higher levels of IL-33 and Ccl2 at 1 and 4 h after OVA inhalation, respectively, compared with those in male mice. The enhanced IL-33 production from airway epithelial cells in female mice may be associated with enhanced CD86 expression on DCs. These results suggest that airway epithelial cells may contribute to female-predominant Th2 cytokine production through activation of DCs in asthma.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：気道上皮細胞 喘息 性差医学 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 医学において性は最も重要な生物学的特徴の一つであり、細胞、免疫および分子生物学的な違いによって定義される。性は、疾患発症との関連において男性や女性特有の解剖学的な特徴に起因する疾患だけでなく、心血管疾患や自己免疫疾患、アレルギー疾患などの発症ならびに増悪リスクにも影響している。

(2) 本邦における成人の喘息有症率は6~10%であると推計され、1980年代の調査以来、ほぼ10年ごとに1.5倍程度の増加傾向にあるとされる。気管支喘息において性は、有病率、重症度、治療効果、並びに副作用発現と関連している。小児期の喘息有病率は女兒より男児において高いが、思春期以降の喘息有病率は、男性患者より女性患者において高い。喘息の死亡率や、喘息発作による救急外来受診後の再発率からみた重症度は、男性患者より女性患者において高い。さらに、喘息の入院治療に伴う医療費も男性患者に比べて女性患者において高く、喘息病態の悪化は、医療経済的側面においても性による違いをうむ。

(3) 思春期以降の成人患者において、喘息病態に関わる疫学的な性差が生まれる原因については十分に明らかとなっていない。しかしながら、このような性差は、年齢に関係した性成熟と関係している可能性が示唆されており、特に女性ホルモンまたは男性ホルモン量の変化との関連が報告されている。思春期以降閉経前までの性成熟に伴って増加する女性ホルモンとそれらの代謝環境の変化が、喘息病態の悪化に関与していると考えられる。特に、閉経後の女性に対するホルモン補充療法では、非投与群と比較して、エストロゲンを単独で投与した群における喘息の発症リスクが有意に上昇することや、閉経前の女性患者では、生理周期と関連した喘息病態の増悪が観察されている。

(4) 気管支喘息は、好酸球や肥満細胞などの炎症性細胞の浸潤と活性化に起因する慢性の気道炎症を特徴とする疾患である。気道炎症は、気道腔の狭窄や過敏性亢進、リモデリングを引き起こし、喘鳴、咳、息切れなどの喘息症状を惹起する。臨床症例における免疫学的検討では、喘息患者と健常者の末梢血中リンパ球をIL-2で刺激したところ、IL-13産生T細胞の割合が男性患者や健常な男女と比べて女性患者において有意に増加していたことから、女性で重症化する喘息病態の形成には、Th2型免疫応答が関与している可能性が示唆されている。

(5) 喘息モデルマウスを用いた申請者のこれまでの研究において、喘息病態の形成に対する性の影響が確認されており、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数やTh2細胞数、気道過敏性、抗原特異的IgE産生、肺内Th2サイトカイン産生量、ならびに気管支リンパ節におけるTh2サイトカン産生量はいずれも雄マウスより雌マウスで有意に増加または亢進していた。

(6) このような喘息病態におけるTh2型免疫応答の性差に関与する樹状細胞の性差を明らかにするために申請者は、喘息モデルマウスを用いた解析を行った。アレルギー吸入16時間後から20時間後の肺において、雄より雌マウスにおいて有意な樹状細胞数の増加が観察された。さらに、主要なサブセットであるCD11b陽性樹状細胞とCD103陽性樹状細胞のいずれも雄より雌マウスの気管支リンパ節において増加していることが明らかとなった。樹状細胞の機能的性差の比較では、雄マウス由来のCD103陽性樹状細胞と比較して、雌マウス由来のCD103陽性樹状細胞では、CD86やMHC-IIの発現、抗原取り込み能が亢進していた。

(7) 気道上皮細胞は、アレルギーの侵入を防ぐ物理的バリアとしての役割のみならず、樹状細胞の分化と活性化に深く関与し、気管支喘息の病態形成の最も始まりにおける免疫応答を担っている。アレルギーに曝露後の気道上皮細胞が、樹状細胞の前駆細胞を肺へ誘導し、サイトカインを介して樹状細胞をTh2細胞誘導型樹状細胞へ分化させる。アレルギー性免疫応答における樹状細胞の分化の方向(Th2誘導型か炎症抑制型)は、気道上皮細胞によるプライミングが決定している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

研究の背景、ならびにこれまでの申請者らによる研究の成果を踏まえて、樹状細胞の数や機能を制御する気道上皮細胞の機能的性差に注目し、以下の点を明らかにすることを目的として研究を行った。

(1) 喘息モデルメスマウスの樹状細胞が喘息病態の悪化に関与する可能性を明らかにし、メスマウスにおいて亢進している樹状細胞上のTh2分化誘導関連責任分子を同定する。

(2) 樹状細胞の機能的変化の性差を誘導する気道上皮細胞における責任分子を同定する。

(3) 気道上皮細胞の分子発現の制御に対する性ホルモンの影響を明らかにする。

3. 研究の方法

卵白アルブミン Ovalbumin (OVA)と水酸化アルミニウムの混合液を0日目と5日目に腹腔内投与して感作し、12日後にエアロゾル化したOVAを吸入させ喘息モデルマウスを作製した。6週齢の雌性マウスならびに雄性マウスを実験に用いた。

(1) OVA吸入後のマウス気管支リンパ節よりCD11b陽性樹状細胞とCD103陽性樹状細胞をフローサイトメトリー法を用いて分離した。次に、MHCに提示されたOVA323-339エピトープを特異的に認識するTCRのトランスジェニックマウス(OT-IIマウス)の脾臓よりCD4陽性T細胞を、MHCに提示されたOVA257-264エピトープを特異的に認識するTCRのトランスジェニックマウス(OT-Iマウス)の脾臓よりCD8陽性T細胞を、それぞれ採取した。樹状細胞とT細胞を共に培養し、培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。一方、エストラジオール存在下または非存在下でCD103陽性骨髄由来樹状細胞を作成し、CD4陽性T細胞との共培養系において、エストロゲン受容体完全拮抗薬または抗CD86抗体存在下でCD4陽性T細胞上のST2発現または培養上清中のIL-5産生量を測定した。

(2) OVA吸入前およびOVA吸入1時間後、4時間後、16時間後のマウス肺より気道上皮細胞を分離し、定量PCR法にて、樹状細胞の誘引、分化、活性化に関わるサイトカインならびにケモカイン量を測定した。次に、OVA吸入後のマウス気管支肺胞洗浄液を採取し、ナイーブマウスの脾臓より採取したCD11c陽性細胞または骨髄由来樹状細胞と共に培養し、樹状細胞における分子発現を定量PCR法で解析した。

(3) ヒト気道上皮細胞株(BEAS-2B)をエストラジオールの存在下または非存在下でTNF- α で刺激し、培養上清中のCCL2、GM-CSF産生量をELISA法を用いて測定した。同様の培養系にて採取された気道上皮細胞培養液を用いて、健常者末梢血より採取した単球とともに培養し、樹状細胞上のCD86発現をフローサイトメトリー法にて測定した。

4. 研究成果

(1) CD4陽性T細胞から産生されるIL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ の量は、雄マウス雌マウスともCD11b陽性樹状細胞と培養した群に比べて、CD103陽性樹状細胞と培養した群において増加していた。加えて、雌マウスより採取したCD103陽性樹状細胞は、雄のそれと比べて、多くのIL-4、IL-5、IL-13産生を誘導した。一方で、CD11b陽性樹状細胞と培養したT細胞から産生されるTh2サイトカイン量に性差は認められなかった。IFN- γ 産生量はTh2サイトカインと比べて10倍~100倍多く産生されたが、CD11b陽性樹状細胞ならびにCD103陽性樹状細胞と培養したいずれの群においても性差は認められなかった。CD8陽性T細胞によるサイトカイン産生において、雌マウスより採取されたCD103陽性樹状細胞は、雄マウスより採取されたそれと比べて多くのIL-5産生を誘導した一方で、産生されたIFN- γ 量には性差を認めなかった。エストラジオール存在下で作成したCD103陽性樹状細胞は、エストラジオール非存在下で作成したそれと比べて、CD4陽性T細胞上のST2発現を亢進させ、多くのIL-5産生を誘導した。このような亢進や増加は、エストロゲン受容体完全拮抗薬または抗CD86抗体存在下で消失した。

(2) OVA吸入4時間後の気道上皮細胞におけるCCL2 mRNA発現は雄より雌で増加していた。さらに、OVA吸入1時間後および4時間後において気道上皮細胞から産生されるIL-33 mRNAは雄より雌の気道上皮細胞において増加していた。さらにOVA吸入16時間後の気道上皮細胞においてGM-CSF mRNA産生量は雄より雌において増加していた。雌マウスより採取された気管支肺胞洗浄液と培養したCD11c陽性細胞または骨髄由来樹状細胞は、雄マウスより採取された気管支肺胞洗浄液と培養したそれらと比べて、CD86 mRNA発現が亢進していた。

(3) ヒト気道上皮細胞株をエストラジオールの存在下または非存在下でTNF- α で刺激し、培養上清中のCCL2、GM-CSF産生量をELISA法を用いて測定したところ、エストラジオールの濃度依存的に産生量は増加した。同様の培養系にて採取された気道上皮細胞培養液を用いて、健常者末梢血より採取した単球を刺激し、樹状細胞上のCD86発現をフローサイトメトリー法にて測定したところ、CD11c陽性細胞に占めるCD86発現細胞の割合が増加するデータを得た。これらの点については、結果を確かなものとするためさらに解析を加える必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. Masuda C, Miyasaka T, Kawakami K, Inokuchi JI, Kawano T, Dobashi-Okuyama K, Takahashi T, Takayanagi M, Ohno I, Sex-based differences in CD103+ dendritic cells promote female-predominant Th2 cytokine production during allergic asthma, *Clin Exp Allergy*, 査読有, 48(4), 2018, 379-393.
DOI: 10.1111/cea.13081.

2. Miyasaka T, Dobashi-Okuyama K, Takahashi T, Takayanagi M, Ohno I, The interplay between neuroendocrine activity and psychological stress-induced exacerbation of allergic asthma,

Allergol Int, 査読有, 67(1), 2018, 32-42.
DOI: 10.1016/j.alit.2017.04.013.

3. 宮坂智充, 増田千愛, 川上佳織, 高橋知子, 大野勲, 女性における喘息重症化メカニズムの解明に向けた基礎研究: 樹状細胞の性差, アレルギーの臨床, 査読有, Vol.38(4), No.512, 2018, pp. 51(351)-55(355).

http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/book_category/z/

4. 宮坂智充, 増田千愛, 川上佳織, 高橋知子, 大野勲, 成人女性における喘息重症化病態を基礎研究から考える: 性特異的 Th2 型免疫応答を担う CD103+ 樹状細胞の役割, アレルギーの臨床, 査読有, Vol.38(6), No.514, 2018, pp. 55(563)-59(567).

http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/book_category/z/

5. Miyasaka T, Okuyama-Dobashi K, Masuda C, Iwami S, Sato M, Mizoguchi H, Kawano T, Ohkawara Y, Sakurada S, Takayanagi M, Ohno I, The involvement of central nervous system histamine receptors in psychological stress-induced exacerbation of allergic airway inflammation in mice, Allergol Int, 査読有, 65, 2016, S38-S44.

DOI: 10.1016/j.alit.2016.05.015.

6. Miyasaka T, Watanabe, Y., Akahori, Y., Miyamura, N., Ishii, K., Kinjo, Y., Miyazaki, Y., Liu, T.-Y., Uemura, Y. and Kawakami, K, Human CD4⁺ CD8⁻ Invariant Natural Killer T Cells Promote IgG Secretion from B Cells Stimulated by Cross-Linking of Their Antigen Receptors, World Journal of Vaccines, 査読有, 6, 2016, 34-41.

DOI: 10.4236/wjv.2016.62005

[学会発表](計 11 件)

1. 川上佳織, 宮坂智充, 増田千愛, 立崎史歩, 中村豊, 河野資, 山内広平, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲, 喘息気道炎症における樹状細胞の活性化に關与する気道上皮細胞の性差, 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会, 2019 年.

2. 宮坂智充, 川上佳織, 増田千愛, 鹿野さくら, 河野資, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲, 気管支喘息における樹状細胞活性化の性差に關与する気道上皮細胞の役割, 第 1 回日本アレルギー学会東北地方会, 2019 年.

3. 宮坂智充, 増田千愛, 川上佳織, 河野資, 井ノ口仁一, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲, 女性ホルモン依存的 IL-5 産生の亢進に關与する CD103+ 樹状細胞の役割, 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会, 2018 年.

4. 川上佳織, 宮坂智充, 増田千愛, 河野資, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲, 気管支喘息重症化の性差に關与する気道上皮細胞の Estradiol 依存的機能変化, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年.

5. MIYASAKA Tomomitsu, MASUDA Chiaki, KAWAKAMI Kaori, INOKUCHI Jin-ichi, KAWANO Tasuku, TAKAYANAGI Motoaki, TAKAHASHI Tomoko, OHNO Isao, Possible involvement of CD103+ dendritic cells in female-predominant Th2 priming in asthma, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017 年.

6. Tomomitsu Miyasaka, Chiaki Masuda, Kaori Kawakami, Jin-ichi Inokuchi, Tasuku Kawano, Motoaki Takayanagi, Tomoko Takahashi, Isao Ohno, Sex-related differences in allergic asthma: possible involvement of CD103+ dendritic cells in enhanced Th2 cytokine production in females, The 8th Congress of the International Society for Gender Medicine (IGM), 2017.

7. Tomomitsu Miyasaka, Chihiro Ito, Kaori Dobashi-Okuyama, Chiaki Masuda, Toshiaki Kikuchi, Tasuku Kawano, Tomoko Takahashi, Motoaki Takayanagi, Isao Ohno, Male-dominant suppressive activity of CD8⁺ T cells on CD4⁺ T cells: assessing female-dominant allergic airway inflammation, The 11th International Conference on Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2017.

8. Tomomitsu Miyasaka, Chiaki Masuda, Kaori Kawakami, Tasuku Kawano, Jin-ichi Inokuchi, Tomoko Takahashi, Motoaki Takayanagi, Isao Ohno, Influence of sex-related difference in dendritic cells on female-predominant Th2 cytokine production in asthma, The 27th Congress of Interasma Japan / North Asia, 2017.

9. Tomomitsu Miyasaka, Chihiro Ito, Kaori Dobashi-Okuyama, Chiaki Masuda, Tasuku Kawano, Yuichi Ohkawara, Toshiaki Kikuchi, Motoaki Takayanagi, Isao Ohno, Sex-related differences in the interaction of CD4+ T cells with CD8+ T cells lead to female-dominant allergic airway inflammation, International Congress of Immunology 2016, 2016.

10. 宮坂智充、伊藤ちひろ、増田千愛、佐藤美希、河野資、大河原雄一、菊地利明、高柳元明、大野勲、アレルギー性気道炎症の性差における IFN- の役割、第 65 回日本アレルギー学会学術大会、2016.

11. 宮坂智充、伊藤ちひろ、増田千愛、奥山香織、佐藤美希、河野資、大河原雄一、菊地利明、高柳元明、大野勲、気管支喘息における女性優位な IL-4 産生における IFN- の関与、第 56 回呼吸器学会学術講演会、2016 年.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

東北医科薬科大学薬学部病態生理学教室ホームページ
http://www.tohoku-mpu.ac.jp/pharmacy/lab/lp_c03/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。