

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16212

研究課題名(和文) 精神的ストレスによる免疫寛容破綻とアレルギー性疾患発症機序の解明

研究課題名(英文) Development of allergic asthma with the impairment of immune tolerance caused by psychological stress

研究代表者

河野 資 (KAWANO, TASUKU)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20584452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：喘息をはじめとするアレルギー性疾患の発症には、アレルゲンに対する寛容性の破綻すなわち免疫寛容の破綻が大きく関与すること指摘されている。本研究では、免疫寛容の破綻が精神的ストレスで引き起こされること、それによりアレルギー疾患である喘息が発症することを検証する。喘息モデルマウスを用いて精神的ストレスが、免疫寛容を維持・誘導するのに重要な働きをしている制御性T細胞(Treg)を抑制し、抗原に対してアレルギー応答を起こすようになり喘息を発症することを明らかにした。この結果、精神的ストレスによるアレルギー性疾患の病態形成機序の解明と新規治療法の発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性疾患は、遺伝的要因と環境要因の相互作用を背景として、複雑かつ多様な病態を示すことから「症候群」の概念が提唱され、発症年齢や重症度、炎症タイプ、治療反応性などから、様々なフェノタイプが報告されている。従って、精神的ストレスから喘息発症への機序を明らかにする本研究は、ストレス誘発性の新たなフェノタイプ『psychiatry phenotype』として確立するための基盤となる。また、本研究によるストレス性免疫寛容破綻機構の解明は、免疫寛容の回復・誘導を目的として現在汎用されている免疫療法を補強するシステムの創生、および免疫寛容破綻を予防する方法の確立に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is the elucidate whether psychological stress increases susceptibility to allergic asthma by downregulating immune tolerance. Asthma was examined using OVA-sensitized model mice. The effects of stress exposure on the numbers and functions of regulatory T (Treg) cells in bronchial lymph nodes were evaluated. To investigate the role of endogenous glucocorticoid in inhibiting immune tolerance after stress exposure. Asthmatic responses and Th2-biased sensitization, which were suppressed in tolerized mice, re-emerged in tolerized mice stressed during tolerance induction in association with decreased Treg cell numbers. The effects of stress exposure on tolerized mice were abolished by administering a glucocorticoid-receptor antagonist. These findings suggested that psychological stress can potentially increase allergic asthma susceptibility by inhibiting immune tolerance.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー 喘息 精神的ストレス 免疫寛容 幼少期 成人期 Treg Th2

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫寛容の低下 アレルギー疾患発症 (喘息・花粉症・アトピー性皮膚炎)

アレルギー疾患は、2型ヘルパーT (Th2) 細胞優位な獲得免疫応答により惹起される。このTh2免疫応答亢進の原因として、制御性T細胞 (Treg) の不調 (機能および数) による免疫寛容の機能低下が指摘されている。しかし、なぜ免疫寛容が破綻や不調を来すのか、その原因はまだ未解明である。

(2) 精神的ストレス 喘息発症

近年、我が国を始め先進国での気管支喘息患者の増加が問題となっている。喘息は環境要因と遺伝要因の相互作用により発症すると考えられている。環境要因の一つである精神的ストレスは、現代世相を反映し喘息患者の増加の背景として、注目されている。しかしながら、精神的ストレスより喘息発症に至るまでの詳細なメカニズムは不明である。

(3) グルココルチコイド 免疫寛容抑制 アレルゲン感作 喘息反応誘発

グルココルチコイド (GC) は、強力かつ幅広い抗炎症作用により、各国のガイドラインにおいて、喘息治療のファーストラインと位置付けられている (日本アレルギー学会 喘息予防・管理ガイドライン)。しかしながら、喘息治療薬としてGCが広く使用されているにも関わらず喘息患者は増加傾向にある。喘息マウスモデル実験で、無害抗原の繰返し曝露は、抗原特異的Treg産生による免疫寛容を誘導し、抗原誘発性の気道炎症を抑制することが報告されている (Nat Immunol 2001;2:725)。しかし、抗原の繰返し曝露と同じ時期に全身性にGCを投与すると、抗原特異的Tregの誘導が抑制され免疫寛容が成立せず、その結果、抗原誘発性の気道炎症が惹起されることが報告されている。

(4) 精神的ストレス 制御性T細胞 (Treg) 産生抑制

精神的ストレス負荷は健常男性の末梢血中のTreg数を減少させる (Psychoneuroendocrinology 2010;35:663)、また、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の患者は末梢血中のTregの割合がPTSDを持たない人に比べ減少する (Brain Behav Immun 2009;23:117) などの報告から、精神的ストレスがTreg分化誘導の抑制に関与することが示唆されている。

これらの背景から、精神的ストレスが引き起こす喘息発症の機序に、免疫寛容の抑制が大きく関与するのではないかと考え研究を行った。

2. 研究の目的

精神的ストレスは、アレルギー疾患 (喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎) 増加の背景として重要な因子である。しかし、精神的ストレスの曝露からアレルギー疾患発症に至るメカニズムは不明である。また、免疫寛容の低下がアレルギー疾患の基本病態である事が報告され、免疫寛容の誘導・回復を目的とした舌下免疫治療法が臨床でも応用され注目されている。これらのことより、申請者はアレルギー疾患モデルとして、喘息マウスモデルを用いて、精神的ストレス負荷により分泌されるグルココルチコイドが、制御性T細胞分化誘導の抑制を介する免疫寛容を破綻させる。その結果、抗原特異的Th2免疫応答が獲得され、抗原曝露による喘息気道反応が惹起されることを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 喘息モデルマウス

雌性6週齢BALB/cマウスの腹腔に水酸化アルミニウムをアジュバントとして抗原 (卵白アルブミン) を2回、5日間隔で投与して感作した。2回目の投与12日目に抗原をネブライザーで吸入させて喘息反応を惹起した。寛容誘導は抗原のみを吸入させることで誘導した。精神的ストレスは寛容誘導期に拘束ストレスにより負荷した (図1)。喘息気道反応を評価した。すべての実験は東北医科薬科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。さらに、すべての実験は実験動物の苦痛や疼痛の緩和に充分配慮した。

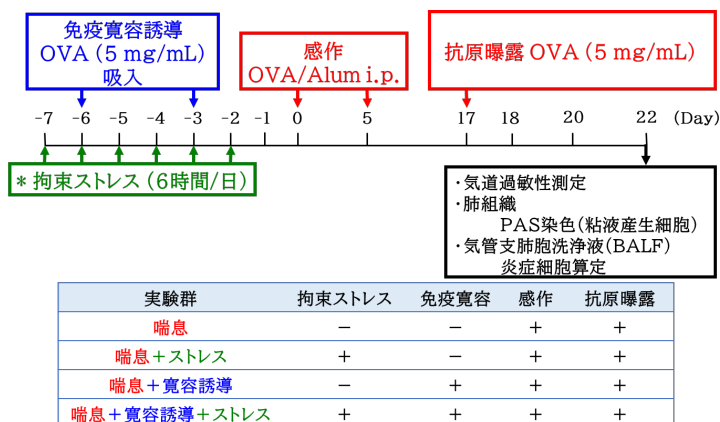


図1 喘息マウスモデルとタイムコース

## (2) 喘息症候評価

喘息モデルマウスに気管支肺洗浄を行い、洗浄液中の炎症細胞（マクローファージ・好酸球・好中球・リンパ球）およびサイトカインを算定した。気道過敏性は FinePointe RC (DSI 社) にて測定し、血清 IgE、肺組織切片を PAS 染色し粘液産生細胞を測定し、喘息による気道反応を評価した。

## (3) フローサイトメトリー (FCM)

マウス肺および気管支リンパ節中の樹状細胞および CD4 陽性 T 細胞はフローサイトメトリーにて解析した。

## (4) ストレスホルモングルココルチコイド測定と受容体拮抗薬

ストレス負荷時に遊離されるグルココルチコイドは、ELISA にて測定し確認した。グルココルチコイド受容体拮抗薬 RU-485 をストレス負荷 1 時間前に投与し、ストレスの影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 喘息気道反応は免疫寛容により減弱されるが精神的ストレス負荷で再び増加する

喘息モデルマウスに免疫寛容を誘導すると有意に喘息気道反応は抑制された。この免疫寛容誘導期に精神的ストレスを負荷すると、好酸球浸潤の増加を惹き起した(図2)。また、精神的ストレス負荷は気道過敏性の亢進、粘液産生細胞の増加、Th2 サイトカイン産生の増加も惹起することが明らかになった。精神的ストレスは、免疫寛容誘導で減弱した喘息反応を再度増強することがわかり、精神的ストレスが免疫寛容の誘導を抑制することが示唆された。

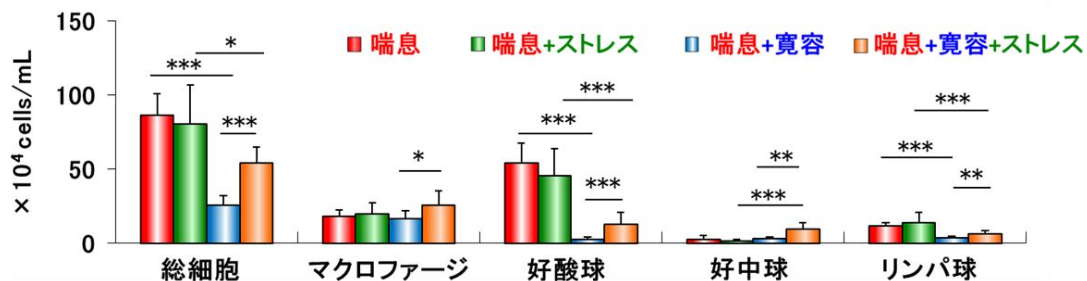


図2 気道における炎症細胞浸潤

### (2) 精神的ストレスは免疫寛容の誘導による Treg 分化を妨げ感作による Th2 免疫応答を獲得させる

次に、精神的ストレスによる免疫寛容の誘導を妨げるメカニズム解明のために、T 細胞に占める Treg 細胞と Th2 細胞の存在比率をフローサイトメトリー (FCM) で解析した。免疫寛容の誘導でおこる Treg の増加は、精神的ストレスにより抑制されることが明らかになり、さらに Th2 細胞は精神的ストレスにより増加することが明らかになった。精神的ストレスは、免疫寛容の抑制、すなわち Treg の分化誘導を低下させ抗原感作が起きやすい状況を作り出し、Th2 免疫応答を増強させて喘息気道反を惹起することが明らかになった。

### (3) 精神的ストレスによるグルココルチコイドの遊離が免疫寛容を抑制する

精神的ストレスが、Treg 誘導の抑制を起点とし Th2 免疫応答による喘息を惹起することが示されたことから、この精神的ストレスによる Treg の抑制機序を解明するために、ストレスに対する生体反応として起きる、グルココルチコイド (GC) の分泌増加に着目した。

まず、我々が負荷している拘束ストレスが血漿中の GC (コルチコステロン) を増加させること確認した (図3)。次に、このストレスによる GC の増加と Treg 誘導抑制の関係を検討するために、ストレス負荷前に GC 受容体拮抗薬 (RU486) を投与し、GC の効果を抑

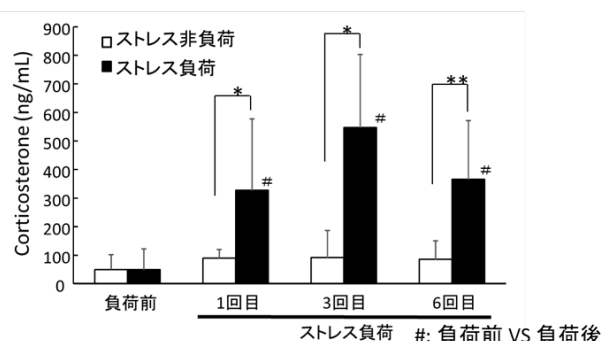


図3 ストレスによる血漿グルココルチコイド上昇

制した。その結果、Treg の分化誘導が回復し、精神的ストレスの効果が消失した(図4)。さらに、喘息気道応答を検討したところ、ストレスが起こしていた気道過敏性の亢進、粘液産生細胞の増加、Th2 サイトカイン産生の増加、好酸球浸潤の増加(図5)が消失することが明らかになった。

また、ストレス負荷の代わりに、外因性のグルココルチコイド(デキサメタゾン)を投与することで血中GCの上昇を再現した結果、デキサメタゾンの投与は、免疫寛容の誘導抑制し、喘息気道応答を引き起こした。

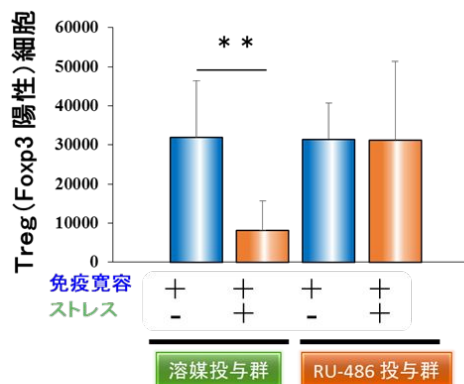


図4 ストレスのTreg誘導の抑制効果とGC受容体拮抗薬による効果消失

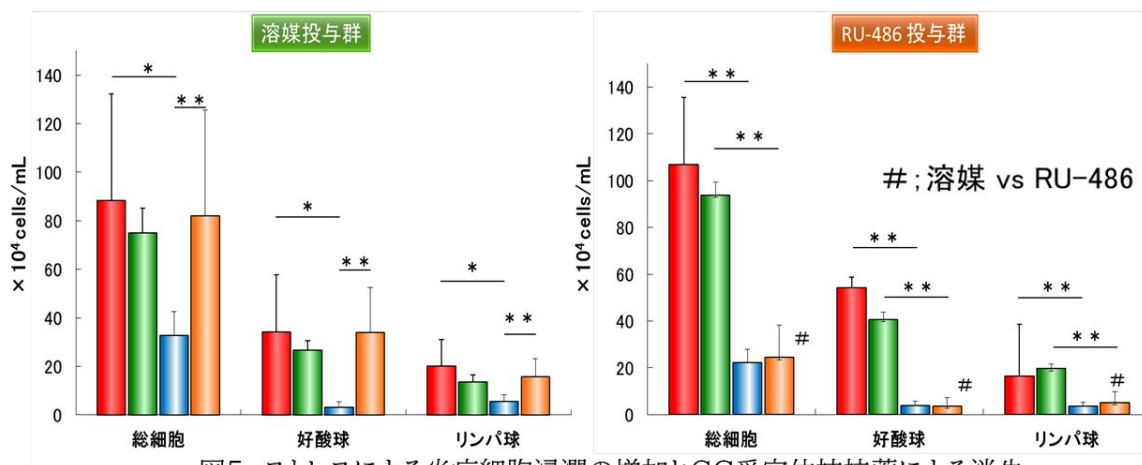


図5 ストレスによる炎症細胞浸潤の増加とGC受容体拮抗薬による消失

本研究の結果から、精神的ストレスによる喘息の発症には、免疫寛容の抑制が関与することが明らかとなった。その機序として、精神的ストレスに対する生体応答であるGC遊離が、Tregの誘導を抑制すること、それに引き続く免疫寛容の獲得を妨げること、その結果抗原感作を助長させ喘息の発症リスクを増大させることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawano Tasuku, Ouchi Ryusuke, Ishigaki Takahiro, Masuda Chiaki, Miyasaka Tomomitsu, Ohkawara Yuichi, Ohta Nobuo, Takayanagi Motoaki, Takahashi Tomoko, Ohno Isao	4. 巻 177
2. 論文標題 Increased Susceptibility to Allergic Asthma with the Impairment of Respiratory Tolerance Caused by Psychological Stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Archives of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 1～15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1159/000488289">https://doi.org/10.1159/000488289</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ouchi Ryusuke, Kawano Tasuku, Yoshida Hitomi, Ishii Masato, Miyasaka Tomomitsu, Ohkawara Yuichi, Takayanagi Motoaki, Takahashi Tomoko, Ohno Isao	4. 巻 246
2. 論文標題 Maternal Separation as Early-Life Stress Causes Enhanced Allergic Airway Responses by Inhibiting Respiratory Tolerance in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 155～165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1620/tjem.246.155">https://doi.org/10.1620/tjem.246.155</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大内竜介, 河野資, 宮坂智充, 大河原雄一, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲
2. 発表標題 幼少期ストレスによる免疫寛容の抑制を介した喘息発症モデル
3. 学会等名 第1回日本アレルギー学会東北地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野資, 大内竜介, 石井聖人, 宮坂智充, 大河原雄一, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲
2. 発表標題 精神的ストレスが免疫寛容に及ぼす影響と喘息発症
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野資, 石井聖人, 萩庭幹太, 山口祐式, 宮坂智充, 大河原雄一, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲
2. 発表標題 好中球・好酸球混合型喘息における精神的ストレスの関与～精神的ストレスによる免疫寛容の抑制とT細胞分化誘導～
3. 学会等名 令和元年度東北医科薬科大学創薬研究センターシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野資, 石井聖人, 宮坂智充, 大河原雄一, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲
2. 発表標題 好中球・好酸球混合型喘息における精神的ストレスの関与～精神的ストレスによる免疫寛容の抑制とTh17細胞の分化誘導～
3. 学会等名 第53回東北アレルギー懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野資, 大内竜介, 宮坂智充, 大河原雄一, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲
2. 発表標題 幼少期ストレスによる喘息発症モデル 幼少期ストレス免疫寛容の抑制
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野資, 大内竜介, 宮坂智充, 大河原雄一, 高柳元明, 高橋知子, 大野勲
2. 発表標題 免疫寛容誘導に対する精神的ストレスの影響と喘息発症
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内竜介、河野資、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野勲
2. 発表標題 幼少期ストレスによる免疫寛容の抑制を介した喘息発症モデル
3. 学会等名 第1回日本アレルギー学会東北地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野資、大内竜介、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野勲
2. 発表標題 幼少期ストレスによる喘息発症モデル 幼少期ストレスによる免疫寛容抑制
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野資、大内竜介、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野勲
2. 発表標題 精神的ストレスによる喘息発症モデル ストレス曝露による免疫寛容の抑制
3. 学会等名 第51回東北アレルギー懇話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野資、大内竜介、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野勲
2. 発表標題 精神的ストレスによる喘息発症モデル 精神的ストレスによる免疫寛容の抑制
3. 学会等名 第66回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野資、大内竜介、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野勲
2. 発表標題 幼少期ストレスによる成人喘息発症モデル 幼少期ストレスによる免疫寛容の抑制
3. 学会等名 第57回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tasuku Kawano, Ryusuke Ouchi, Tomomitsu Miyasaka, Yuichi Ohkawara, Motoaki Takayanagi, Tomoko Takahashi, Isao Ohno.
2. 発表標題 Early life stress increased the risk of adult-onset asthma through the inhibition of the development of respiratory tolerance in a murine model.
3. 学会等名 The 27th Congress of Interasma Japan / North Asia (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tasuku Kawano, Ryusuke Ouchi, Tomomitsu Miyasaka, Yuichi Ohkawara, Motoaki Takayanagi, Tomoko Takahashi, Isao Ohno
2. 発表標題 The increased susceptibility to adult-onset asthma through the inhibition of the development of respiratory tolerance by early life stress.
3. 学会等名 11th International Conference on Allergy, Asthma & Clinical Immunology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考