

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590909
 研究課題名 (和文)
 ストレス誘発性喘息におけるオピオイドネットワークの役割に関する基礎的研究
 研究課題名 (英文)
 The role of opioid network in asthma exacerbations evoked by psychological stress
 研究代表者
 大野 勲 (OHNO ISA0)
 東北薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：00250762

研究成果の概要：

気管支喘息発作の引き金として精神的ストレス（学校、職場などの生活環境に由来するストレスや人生の様々な出来事）が知られている。近年我が国では喘息患者が増加傾向にあるが、この背景として、増大する精神的環境ストレスによる喘息の増悪、すなわちストレス誘発性喘息患者の増加が指摘されている。我々は、ストレス喘息モデルマウスを用いて、ストレスの脳刺激により分泌されたホルモンがアレルギー免疫反応を悪化させ喘息発作を引き起こすことを世界に先駆けて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：呼吸器病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：アレルギー、気管支喘息、精神的ストレス、グルココルチコイド、Th2 サイトカイン、 μ オピオイド受容体

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、慢性気道炎症と気道過敏性を基本病態とする慢性気道疾患である。気道過敏性は気道炎症の増悪により亢進する。喘息気道炎症は、抗原特異的 IgE 抗体を介する I 型アレルギー反応を中心に、気道の炎症細胞（好酸球や肥満細胞）から遊離されるロイコトリエンなどの炎症性化学伝達物質により惹起される粘膜炎症と理解

されている。この一連の炎症反応を促進的に制御しているのが Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) ネットワークである。申請者はこれまで、この喘息気道炎症の成立過程において、サイトカイン (GM-CSF、IL-4 など)、増殖因子 (TGF、PDGF など) さらに接着分子やマトリックス蛋白分解酵素が重要な役割を演じる事を明らかにしてきた (*J Clin Invest* 1992;89:1662, *J Immunol*

1994;153:2278, *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:639, 1996;15:404, 1997;16:212, *J Immunol* 1999;162:4212, *Clin Exp Allergy* 2002;32:1527, *Eur J Pharmacol* 2005;521:21 など)。このアレルギー性炎症の分子機構は申請者を含め国内外の多くの研究者により明らかにされてきている (*Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-45. review)。喘息患者では、サイトカインなどの炎症分子発現/機能の遺伝的素因を背景に、環境因子(ダニやハウスダストなどのアレルゲン、気道感染、大気汚染など)が重なり発症/増悪するものと理解されている(喘息予防・管理ガイドライン 2006;日本アレルギー学会監修)。しかし、病態の解明さらに抗喘息薬の開発・使用にも拘わらず喘息患者は我が国を含め先進国では増加傾向にある。この背景として、増大する精神的環境ストレスによる喘息の増悪、すなわちストレス誘発性喘息患者の増加が指摘されている (*J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1301-6. review)。少子・高齢化や複雑な情報化社会の進展により精神的ストレスは今後も増加する傾向にあることから、ストレス誘発性喘息に対する対策の確立は重要かつ急務である。しかしながら、ストレス誘発性喘息が古くから疫学的に検証されてきたにも関わらず、その喘息増悪に至る生体内メカニズムの研究は緒についたばかりである。具体的には、喘息患者やマウスモデルにおいて、ストレス負荷による喘息増悪は好酸球や Th2 サイトカインの増加を伴うことが漸く確認された (*Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1062, *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:220)。また、近年、喘息患者で、ストレス負荷時に気道炎症増悪と平行して大脳(前頭葉および側頭葉)の活動性が亢進していることが初めて観察された (*Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:13319)。脳の興奮と喘息増悪の相互作用を示すものであるが、ストレス誘発性喘息において、脳へのインプット(精神的ストレス)が気道でのアウトプット(アレルギー性喘息応答)へと至る細胞分子生物学的経路は全くのブラックボックスである。

一方、精神的ストレスに対する生体防御反応のひとつとして、神経細胞由来オピオイドと神経線維局在性受容体との相互作用による鎮痛・鎮静反応が知られている。オピオイドにはエンドルフィンやエンケファリン、ダイノルフィンなど12種類のペプチドが、受容体としては μ 、 κ 、 δ の3つのタイプが報告されている。このオピオイドと

オピオイド受容体、特に μ 受容体、の相互作用が免疫応答を Th2 優位へとシフトさせる経路が二つ報告されている。(1) 代表的な生体環境調節系である視床下部—下垂体—副腎皮質系は、脳中枢の μ 受容体にオピオイドが結合すると活性化され、副腎皮質ホルモンを分泌する。副腎皮質ホルモン、特にグルココルチコイド、はアレルギー性気道炎症を抑制し喘息治療の中心となっている。しかし、一方で、グルココルチコイドは免疫応答を、その成立過程において Th2 へと誘導することも知られている (*J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: S275, 2005; 116: 1301, review)。また(2) Th 細胞にも μ 受容体が発現しており、オピオイドの結合は Th2 への分化を誘導し Th2 サイトカイン発現増強へと機能する (*J Neuroimmunol* 2004;147:78)。

そこで、申請者らは、このような背景から、ストレス誘発性喘息の病態解明としてオピオイド/オピオイド受容体の関与を検討した。その結果、慢性のストレス(ここでは拘束ストレス)が抗原誘発性のアレルギー性気道反応を悪化させるマウスモデルを確立し、 μ 受容体欠損マウスではこの慢性ストレスによる悪化が消失することを確認した (*Allergol Int* in press) (平成16~17年度科学研究費基盤C『オピオイドネットワークによるアレルギー性喘息応答制御の基礎的研究』)。すなわち、ストレス誘発性喘息の病態に μ 受容体が関与することを明らかにした。しかし、 μ 受容体がどのように関与しているのかは不明である。そこで本研究では、これまでの気管支喘息病態解析の実績を活かしながら、脳中枢の μ 受容体および視床下部—下垂体—副腎皮質系の活性化に着目し、ストレスから喘息増悪に至る神経—内分泌—免疫経路を明らかにすることを着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) ストレス誘発性喘息において脳中枢の μ 受容体が病態形成の起点になっていること: ストレスによる脳中枢の μ 受容体の活性化(神経)を起点として、副腎皮質ホルモンの遊離(内分泌)、そのホルモンによる抗原特異的 Th2 型免疫応答の増強が観察される。すなわち、アレルギー性免疫では Th1/Th2 の免疫応答のバランスが Th2 優位になっているが、そのバランスがさらに Th2 へとシフトすることを Th2 細胞および Th2 サイトカイン発現の増加で確認される(免疫)。そしてその結果としての抗原誘発性ア

アレルギー性気道反応の悪化という神経—内分泌—免疫経路によりストレス誘発性喘息が発症する

(2) ストレス喘息における脳中枢の μ 受容体の関与は、抗原特異的 Th2 型免疫応答の促進過程であり、抗原誘発性アレルギー性気道反応の悪化そのものには直接関与しないこと

を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ストレス喘息モデルマウス

① 卵白アルブミンを抗原として感作し、アレルギー性気管支喘息マウスを作成した。

② マウスには、野生型マウスおよび μ -オピオイド受容体欠損型マウスを用いた。

③ 精神的ストレスとしては、7日間連続拘束ストレス (RS) と3日間連続拘束ストレス+4日間連続強制水泳ストレス (RS+FSS) の2種類を用いた。オピオイド受容体拮抗薬やグルココルチコイド受容体拮抗薬はストレス負荷直前に投与した。

④ 7日間のストレス負荷および非負荷の後に、抗原を吸入させ、肺洗浄液中の Th2 サイトカイン量を ELISA にて測定し、炎症細胞数を算定することにより抗原誘発性気道炎症を評価した。血液中の抗原特異的 IgE 抗体は ELISA にて測定した。

(2) ストレス負荷による視床下部—下垂体—副腎皮質 (HPA) 系活性化の評価

① HPA 系活性化の指標として、主たるグルココルチコイドであるコルチコステロンの血液中の量を ELISA にて測定した。

(3) ストレス負荷による免疫応答の修飾

① 免疫応答はストレス負荷後に採取した気管支リンパ節細胞を用いて評価した。

② 気管支リンパ節細胞を抗原刺激し、培養上清中のサイトカインを ELISA にて測定し、細胞分画 (Th 細胞、Th 2 細胞、制御性 T 細胞) は FACS にて解析した。

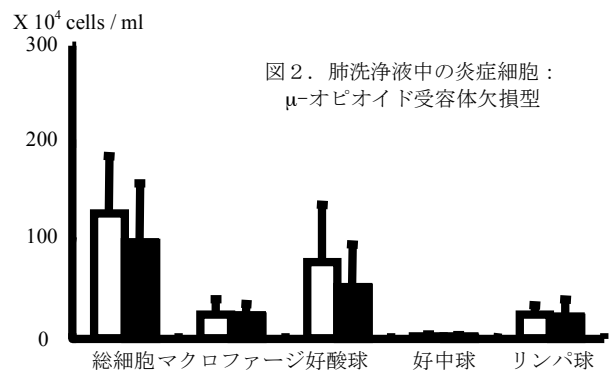
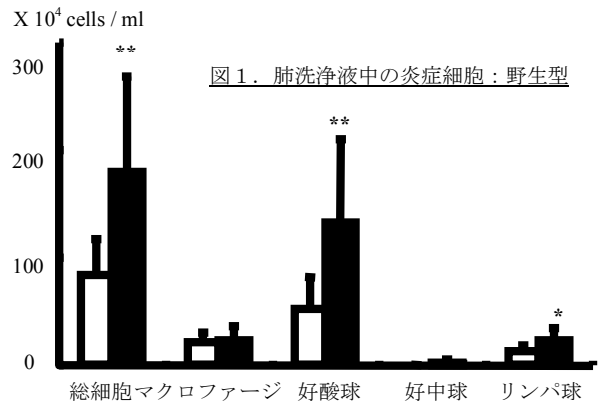
4. 研究成果

(1) ストレスによる喘息悪化の経路として、中枢神経 μ -オピオイド受容体—HPA 系—アレルギー性気道反応経路の存在が示唆された。

① RS、RS+FSS いずれの負荷でも血液中のコルチコステロン量は増加したが、その増加は野生型マウスに比べ μ -オピオイド受容体欠損型マウスでは小さかった。

② 抗原特異的 IgE 抗体価には、ストレス負荷群と非負荷群の間に有意差はみられなかった。

③ 野生型 (図1) では、RS、RS+FSS いずれの負荷 (黒) でも、抗原誘発性気道炎症 (Th2 サイトカイン発現、炎症細胞集積) は非負荷 (白) に比べ悪化した。その悪化は中枢神経選択的オピオイド受容体拮抗薬を投与された野生型マウスや μ -オピオイド受容体欠損型マウス (図2) では観察されなかった。



④ 負荷前にグルココルチコイド受容体拮抗薬が投与された野生型マウスでは、RS、RS+FSS いずれの負荷でも、抗原誘発性気道炎症の悪化はみられなかった。

(2) ストレスは μ -オピオイド受容体を介して、制御性 T 細胞による Th2 反応抑制の低下を引き起こすことが示唆された。

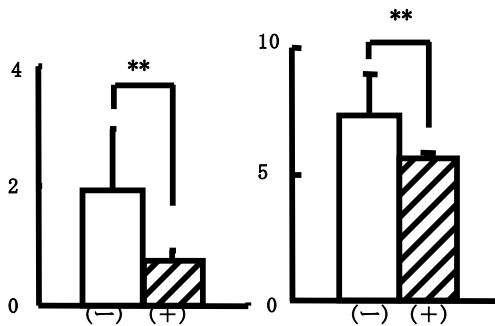
① 野生型マウス (図3A) では、RS 負荷 (+) マウスの気管支リンパ節細胞は、非負荷 (-) マウスに比べ、 $IFN\gamma/IL-4$ 比でみると、Th2 サイトカイン発現が

増強していた。

- ② 同様に (図 3 B)、RS 負荷 (+) マウスの気管支リンパ節細胞は、非負荷 (-) マウスに比べ、Th2 反応を抑制的に制御する制御性 T 細胞 (CD5⁺CD25⁺細胞) の誘導が低下していた。しかし、Th2 細胞の誘導には有意な差はみられなかった。

図 3. 気管支リンパ節細胞：野生型

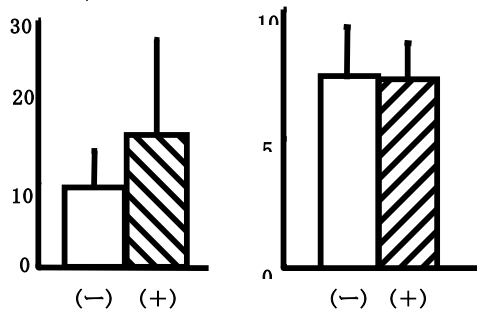
A. IFN- γ /IL-4 ratio B. % of CD4⁺CD25⁺ cells



- ③ RS 負荷による上記のごとき気管支リンパ節細胞の変化は、 μ -オピオイド受容体欠損型マウス (図 4) では観察されなかった。

図 4. 気管支リンパ節細胞：
 μ -オピオイド受容体欠損型

A. IFN- γ /IL-4 ratio B. % of CD4⁺CD25⁺ cells



- (3) 精神的ストレスによる喘息増悪すなわち抗原誘発性気道反応の悪化のメカニズムとして、中枢神経系 μ -オピオイド受容体およびその活性化に引き続き遊離されるグルココルチコイドが関与すること、また精神的ストレスが μ -オピオイド受容体を介して制御性 T 細胞による Th2 反応抑制の低下を引き起こすことを世界で初めて明らかにした。呼吸器病学の分野に神経—内分泌—免疫学の概念を導入する契機となる画期的研究成果であり、増加しつつあるストレス誘発性喘息の対策立案に大きく寄与すると思われる。
- (4) 本研究成果の臨床応用には、下記のごとき検討が必要である。

① ストレスによる免疫応答の変化が実際に抗原誘発性気道反応の悪化に関与することをマウスで確認する。

② 喘息患者におけるストレス感受性 (ストレスにより喘息発作を起こし易い体質) と μ -オピオイド受容体 SNP の相関から、ストレス誘発性喘息患者における μ -オピオイド受容体の関与を明らかにする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Okuyama K, Ohwada K, Sakurada S, Sato N, Sora I, Tamura G, Takayanagi M, Ohno I. The distinctive effects of acute and chronic psychological stress on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Allergol Int* 56:29-35, 2007 [査読：有]
- ② Nishimaki K, Okuyama K, Okada S, Hattori T, Takayanagi M, Ohno I. Prolongation of neutrophil survival by the culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Respirology* 12:664-9, 2007 [査読：有]
- ③ Ohwada K, Watanabe K, Okuyama K, Ohkawara Y, Sugaya T, Takayanagi M, Ohno I. The involvement of type 1a angiotensin II receptors in the regulation of airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 37:1720-7, 2007 [査読：有]
- ④ 安達寛成、鈴木雄太、林恵美子、森山啓輔、安田衣理、奥山香織、和田佳奈、高柳元明、大野勲. 中枢性 μ -オピオイド受容体とグルココルチコイド受容体を介した慢性ストレスによる喘息悪化. *東北薬科大学研究誌* 54:75-82, 2007 [査読：有]
- ⑤ Okuyama K, Wada K, Chihara J, Takayanagi M, Ohno I. Sex-related splenocyte function in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 38:1212-9, 2008 [査読：有]
- ⑥ 齋藤彩、栗山愛、和田佳奈、奥山香織、大河原雄一、高柳元明、大野勲. アレルギー性気道炎症の性差の加齢変化—サイトカイン産生とプロゲステロンの影響に関する検討. *東北薬科大学研究誌* 55:69-78, 2008 [査読：有]

- ⑦ 奥山香織、大野勲. 精神的ストレスによる Th2 反応の誘導機序. 臨床免疫・アレルギー科 49:626-632、2008 [査読:無]
- ⑧ 大野勲、奥山香織、溝口宏一. オピオイド/オピオイド受容体と呼吸器疾患. 呼吸 27:1138-1145、2008 [査読:無]
- ⑨ Takeda M, Ito W, Tanabe M, Ueki S, Kato H, Kihara J, Tanigai T, Chiba T, Yamaguchi K, Kayaba H, Imai Y, Okuyama K, Ohno I, Sasaki T, Chihara J. Allergic airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice. J Allergy Clin Immunol. 123:805-12, 2009 [査読:有]
- ⑩ 大野勲. 精神的ストレスと気管支喘息. 職業・環境アレルギー誌 16:7-14、2009 [査読:無]

[学会発表] (計15件)

- ① 奥山香織、成瀬茉耶、田村弦、櫻田忍、曾良一郎、高柳元明、大野勲. 中枢神経μ-オピオイド受容体を介した精神的ストレスによるアレルギー性気道炎症の増悪. 第41回東北アレルギー懇話会(福島) 2007年4月7日
- ② 奥山香織、和田佳奈、櫻田忍、田村弦、曾良一郎、高柳元明、大野勲. 精神的ストレス誘発性喘息における中枢神経系μ-オピオイド受容体の関与と免疫応答修飾. 第2回東北薬科大学ハイテク・リサーチシンポジウム(仙台) 2007年5月25日
- ③ 奥山香織、梶川聡子、和田佳奈、田村弦、櫻田忍、曾良一郎、高柳元明、大野勲. 精神的ストレス誘発性喘息におけるμ-オピオイド受容体の関与. 第19回日本アレルギー学会春期臨床大会(横浜) 2007年6月10日
- ④ 奥山香織、和田佳奈、櫻田忍、田村弦、曾良一郎、高柳元明、大野勲. 精神的ストレス誘発性喘息における中枢神経系μ-オピオイド受容体の関与と免疫応答修飾. アレルギー・好酸球研究会 2007(東京) 2007年6月30日
- ⑤ 土橋和久、奥山香織、和田佳奈、高柳元明、大野勲. 精神的ストレスは視床下部-下垂体-副腎皮質系を介して喘息を悪化させる. 第46回日本薬学会東北支部大会(仙台) 2007年10月28日
- ⑥ 奥山香織、和田佳奈、土橋和久、櫻田

- 忍、曾良一郎、高柳元明、大野勲. 精神的ストレスによる喘息悪化の機序-中枢性μ-オピオイド受容体活性化を介した制御性T細胞誘導の抑制-. 第46回日本薬学会東北支部大会(仙台) 2007年10月28日
- ⑦ 奥山香織、和田佳奈、土橋和久、櫻田忍、曾良一郎、高柳元明、大野勲. 精神的ストレスはμ-オピオイド受容体活性化を介して制御性T細胞を抑制することにより喘息を悪化させる. 第57回日本アレルギー学会(横浜) 2007年11月1日
- ⑧ 奥山香織、土橋和久、和田佳奈、高柳元明、大野勲. 精神的ストレスはコルチコステロイドを介して喘息を悪化させる. 日本薬学会第128年会(横浜) 2008年3月28日
- ⑨ 奥山香織、和田佳奈、櫻田忍、曾良一郎、大河原雄一、高柳元明、大野勲. ストレス誘発性喘息における糖質コルチコイドの関与. 第3回東北薬科大学ハイテク・リサーチシンポジウム(仙台) 2008年6月13日
- ⑩ 奥山香織、和田佳奈、櫻田忍、曾良一郎、高柳元明、大野勲. ストレス誘発性喘息の機序~μ-オピオイド受容体活性化を介した制御性T細胞誘導の抑制~. 第48回日本呼吸器学会(神戸) 2008年6月16日
- ⑪ 奥山香織、和田佳奈、大河原雄一、高柳元明、大野勲. ストレス誘発性喘息における糖質コルチコイドの関与. アレルギー・好酸球研究会 2008(東京) 2008年6月21日
- ⑫ 大野勲. シンポジウム The Brain in Allergy 6. アレルギーとオピオイド: 喘息モデル. 第39回日本職業・環境アレルギー学会学術大会(東京) 2008年7月18日
- ⑬ 奥山香織、和田佳奈、大河原雄一、高柳元明、大野勲. ストレス誘発性喘息における糖質コルチコイドの関与. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京) 2008年11月27日
- ⑭ 大野勲. ストレス喘息とμ-オピオイド受容体. 第16回ニューロペプチド研究会(横浜) 2008年12月12日
- ⑮ 奥山香織、和田佳奈、大河原雄一、高柳元明、大野勲. 精神的ストレスによるグルココルチコイド分泌は抗原誘発性気道炎症を悪化させる. 日本薬学会第129年会(京都) 2009年3月27日

[その他]

- ① 大野勲. ストレス誘発性気管支喘息の神経—免疫学的解析. オホーツク臨床免疫フォーラム (北見) 2007年6月29日
- ② 大野勲. 埼玉医科大学卒後教育プログラム: ストレスのアレルギー疾患への影響 (埼玉県入間郡毛呂山町) 2007年10月25日
- ③ 大野勲. ストレスと呼吸器疾患. 仙台市医師会報 526:57、2008
- ④ 大野勲. ストレスによる喘息増悪: 中枢性 μ オピオイド受容体が関与. Medical Tribune 41:20、2008
- ⑤ ホームページ <http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/byotai/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 勲 (OHNO ISAO)
東北薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 00250762

(2)研究分担者

櫻田 忍 (SAKURADA SHINOBU)
東北薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 30075816
曾良 一郎 (SORA ICHIRO)
東北大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40322713

(3)研究協力者

奥山 香織 (OKUYAMA KAORI)
東北薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 10347908