

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19599015  
 研究課題名 (和文)  
 気管支喘息におけるロイコトリエン B4 およびエフェクター T 細胞の役割の検討  
 研究課題名 (英文)  
 Role of leukotriene B4 and effector T cells in allergen-induced airway responses  
 研究代表者  
 宮原 信明 (MIYAHARA NOBUAKI)  
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
 研究者番号：70335610

## 研究成果の概要：

ロイコトリエン B4 (LTB4) は、アラキドン酸に由来する 生理活性脂質であり、様々な炎症性疾患における重要な役割が示唆されてきた。LTB4 がアレルギー性の気道反応に必須であるかどうかを直接証明するために、LTB4 を全く産生しない LTA4 hydrolase knock out (LTA4HK0) マウスを用いて喘息モデルを作成し、コントロールの野生型マウスとの比較検討をおこなった。野生型マウスに比べ、LTA4HK0 マウスは有意に低い気道過敏性を示し、肺内の好酸球の数、杯細胞の過形成の程度も低下していたことより、LTB4 はアレルギー性気道反応においても反応惹起に必須であることが示唆された

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：呼吸器・アレルギー内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：気管支喘息、ロイコトリエン、LTB4-BLT1-肥満細胞、リンパ球、T細胞、サイトカイン、気道過敏性

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、気道過敏性を有する慢性的な気道の炎症が疾患の特徴であり、IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカインを分泌する抗原特異的 CD4T 細胞がその中心的役割を担っていると考えられている。近年申請者らは CD4T 細胞だけでなく、CD8T 細胞が IL-13

を産生し、アレルギー性気道反応に促進的に働くことを報告した (Miyahara N, et al. J Immunol. 2004;172:2549-58)。さらに、エフェクター CD8T 細胞が気道過敏性と好酸球性炎症に深くかかわっていることを報告した (Miyahara N et al. Nature Med. 2004;10:865-9)。

ロイコトリエン B4 (LTB4) は、アラキドン酸に由来する 生理活性脂質であり、様々な炎症性疾患における重要な役割が示唆されてきた。近年、LTB4 に特異的な細胞膜 7 回貫通型の受容体である BLT1 が 同定された。申請者は BLT1 受容体欠損マウスを用いた喘息モデルの検討により、申請者らは LTB4 の受容体である BLT1 が気管支喘息において重要な役割を担っていることを報告した (Miyahara N et al, Am J Respir Crit Care Med. 2005;172:161-7, J Immunol. 2005;174:4979-84. Taube C, Miyahara N et al. J Immunol. 2006;176:3157-64)。

申請者らは LTB4 の受容体が重要な役割を担っていることは報告したが、受容体である BLT1 の ligand である LTB4 そのものの、アレルギー性気道炎症への役割は未だ証明されていない

## 2. 研究の目的

本研究において、LTB4 がアレルギー性気道反応に必要な不可欠であるかを直接検討する。また、LTB4 は生体内で、さまざまな細胞から生成されることが知られており、マクロファージ、マスト細胞、リンパ球などの白血球が主体と考えられているが、どの細胞から産生される LTB4 がアレルギー性気道反応に関与しているかについても全く明らかにされていない。本研究において、アレルギー性気道反応における LTB4 産生の責任細胞の検索を行う。

## 3. 研究の方法

LTB4 がアレルギー性の気道反応に必須であるかどうかを詳細に調べるため、LTB4 を全く産生しない LTA4 hydrolase knock out (LTA4HK0) を用いる。

### (a) IgE-マスト細胞依存性喘息モデルの作成

既に申請者らのグループにより確立された喘息モデル (J Clin Invest 1996;97:1398-1408.) であり、卵白アルブミン (OVA) 特異的 IgE 抗体の受動感作を行った後に OVA を 2 日間吸入暴露し、48 時間後に気道反応を評価する。

### (b) IgE-マスト細胞非依存性喘息モデルの作成

既に申請者らのグループにより確立された

喘息モデル (J Exp Med 1997;186:449-454) であり、OVA の 2 回にわたる腹腔内感作の後、OVA を 3 日間吸入し、48 時間後に気道反応を評価する。気道過敏性の評価および肺内の好酸球性炎症、杯細胞の過形成、気管支肺胞洗浄液中のサイトカインレベルを評価する。

### (c) 骨髄由来マスト細胞の樹立と移植

申請者らのグループが確立した方法を用い (J Immunol. 2004;172:6398-406)、野生型マウスから骨髄細胞を分離し、IL-3 の存在下でマスト細胞を樹立し、LTA4HK0 マウスに移植する。上記の IgE 依存性、非依存性のそれぞれの喘息モデルにおいて、移植した野生型のマスト細胞から分泌される LTB4 により、レシピエント LTA4HK0 マウスのアレルギー性気道反応が回復するかどうかを検討する。

### d) リンパ球および T 細胞の移植

野生型マウスの肺を摘出し、申請者らが用いている lung digestion の手法 (Miyahara N et al, Am J Respir Crit Care Med. 2005;172:161-7) を用いて肺の T 細胞を分離し、LTA4HK0 マウスに移植し、LTA4HK0 マウスのアレルギー性気道反応が回復するかどうかを検討する。

## 4. 研究成果

LTB4 がアレルギー性の気道反応に必須であるかどうかを詳細に調べるため、LTB4 を全く産生しない LTA4 hydrolase knock out (LTA4HK0) マウスに対し、抗原感作、吸入後に気道過敏性や気道炎症、気管支肺胞洗浄液中のサイトカインレベルを測定し、コントロールの野生型マウスと比較検討をおこなった。既に申請者らのグループにより確立された IgE-マスト細胞依存性喘息モデル (J Clin Invest 1996;97:1398-1408.) を用い、卵白アルブミン (OVA) 特異的 IgE 抗体の受動感作を行った後に OVA を吸入暴露し、48 時間後に気道反応を評価した。OVA 抗原特異的 IgE 抗体の受動感作後に OVA 抗原を吸入させたところ、野生型マウスに比べ、LTA4HK0 マウスは有意に低い気道過敏性を示し、肺内の好酸球の数、杯細胞の過形成の程度も低下していた。

次に申請者らのグループにより確立された

IgE-マスト細胞非依存性喘息モデル (J Exp Med 1997;186:449-454) を用い、OVAの腹腔内感作の後、吸入暴露を行い、気道反応を評価した。気道過敏性は吸入メサコリンに対する気道抵抗の上昇をdose-dependentに測定した。野生型マウスに比べ、LTA4HK0マウスは明らかに低い気道過敏性を示し、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数およびIL-4, IL-5, IL-13などのサイトカインも低値を示し、気道周囲の好酸球性炎症および杯細胞の過形成も低下していた。

以上より、LTB4はIgE依存性、非依存性のいずれのアレルギー性気道反応においても反応惹起に必須であることが示唆された。

骨髓由来マスト細胞の樹立と移植。申請者らのグループが確立した方法を用い (J Immunol. 2004;172:6398-406)、野生型マウスから骨髓細胞を分離し、IL-3の存在下で培養することにより、マスト細胞を樹立した。LTA4HK0マウスに野生型マウスから樹立したマスト細胞を移植した後、OVA特異的IgE抗体の受動感作とOVAの暴露を行い、IgE-マスト細胞依存性喘息モデルにおいて、移植した野生型マスト細胞から分泌されるLTB4によりアレルギー性気道反応が野生型と同程度まで回復するかどうかを検討した。野生型マスト細胞を移植したLTA4HK0マウスは、IgE抗体の受動感作とOVAの吸入暴露の後に、野生型マウスと同程度の気道過敏性を示した。以上より、マスト細胞-IgE依存性アレルギー性気道反応においてはマスト細胞からのLTB4分泌がアレルギー反応に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### 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5件)

1. Miyahara N, Ohnishi H, Miyahara S, Takeda K, Matsubara S, Matsuda H, Okamoto M, Loader JE, Joetham A, Tanimoto M, Dakhama A, Gelfand EW. Leukotriene B4 Release from Mast Cells in IgE-Mediated Airway Hyperresponsiveness and Inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. in press. 査読有
2. Ohnishi H, Takeda K, Domenico J, Lucas JJ, Miyahara N, Swasy CH, Dakhama A, Gelfand EW Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinases 1/2-dependent pathways are essential for CD8+ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2009;123:249-57 査読有
3. Miyahara N, Ohnishi H, Matsuda H, Miyahara S, Takeda K, Koya T, Matsubara S, Okamoto M, Dakhama A, Haribabu B, Gelfand EW. Leukotriene B4 receptor-1 (BLT1) expression on dendritic cells is required for the development of Th2 responses and allergen-induced airway hyperresponsiveness. J Immunol. 2008;181:1170-8 査読有
4. Cook L, Miyahara N, Jin N, Wands JM, Taube C, Roark CL, Potter TA, Gelfand EW, O'Brien RL, Born WK. Evidence That CD8+ Dendritic Cells Enable the Development of  $\gamma\delta$  T Cells That Modulate Airway Hyperresponsiveness. J Immunol. 2008;181:309-19. 査読有

5. 宮原信明：アレルギー性気道炎症における樹状細胞および脂質メディエーターの役割の検討。アレルギー  
2007;36:65-67 査読無し

[学会発表] (計 6 件)

1. N. Miyahara, Requirement for Leukotriene B4 Release from Mast Cells in the Development of IgE-Mediated Airway Hyperresponsiveness, 104th Annual Meeting of American Thoracic Society. 2008. 5.18, Totonto, Canada.
2. N. Miyahara, Confirmation of the Essential Role of Leukotriene B4 in the Development of Airway Hyperresponsiveness Using Leukotriene A4 Hydrolase-Deficient Mice. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008. 11. 27 東京
3. 宮原信明 他 13 名 樹状細胞およびロイコトリエン B4 受容体のアレルギー性気道反応における役割の検討. 日本アレルギー学会秋季学術大会. 2007/11/1. 横浜
4. 宮原信明、他 9 名. CD8T 細胞およびロイコトリエン B4 受容体の気道過敏性における役割の検討. 日本アレルギー学会春季臨床大会 2007/6/11 横浜
5. N. Miyahara, Requirement for the Leukotriene B4 Receptor-1 (BLT1) on Dendritic Cells in the Development of Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness. 103th Annual Meeting of American Thoracic Society. 2007. 5.22 San Francisco.
6. H. Ohnishi, N. Miyahara. Memory CD8+ T Cell-Mediated Airway Hyperresponsiveness and Allergic Airway Inflammation by Upregulating the Leukotriene B4 Receptor, BLT1. 103th Annual Meeting of American Thoracic Society. 2007. 5.20 San Francisco.

[図書] (計 1 件)

1. Miyahara N, Gelfand EW. Springer. Allergy frontiers: Classification and Pathomechanisms. 2009. 167-178

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮原 信明 (MIYAHARA NOBUAKI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：70335610

### (2) 研究分担者

金廣 有彦 (KANEHIRO ARIHIKO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：20243503

### (3) 研究協力者

Erwin W. Gelfand, MD.  
Professor and Chairman,  
Division of Cell Biology,  
Department of Pediatrics,  
National Jewish Medical and Research  
Center, Denver, CO, USA