

機関番号：82710

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790792

研究課題名 (和文) 非アトピー型喘息患者における  
T 細胞産生性の新規気管支収縮活性の同定研究課題名 (英文) Identification of new bronchoconstrictive activity  
produced by T cells in non-atopic asthmatics

研究代表者

北村 紀子 (KITAMURA NORIKO)

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター・先端技術開発研究部・研究員

研究者番号：80415603

研究成果の概要 (和文)：非アトピー型喘息患者末梢血リンパ球の培養上清中に、喘息悪化の要因である気道過敏性亢進を助長する“遅発型喘息反応”に類似した、遅発型・持続型の気管支平滑筋細胞収縮活性を検出した。このリンパ球より樹立した Th 細胞クローンをを用いて詳細に調べたところ、この活性は、分子量や拮抗剤/免疫抑制剤での収縮抑制可否の点で既知収縮物質と大きく性質が異なっており、新規の気管支収縮活性であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We detected a bronchoconstrictive activity produced by T cells in non-atopic asthmatics. The gels embedded normal human bronchial smooth muscle cells contracted gradually and continuously by the culture supernatant of T cells, like the contraction induced by leukotrienes which play critical role in the late asthmatic reaction. It was suggested that this bronchoconstrictive activity is novel one, because the molecular weight and the response of antagonist/immunosuppressant were different from well-known bronchoconstrictors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

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：非アトピー型喘息・遅発型喘息反応・T 細胞・気管支平滑筋細胞収縮

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息において、気道過敏性は最も重要な病態生理の異常とされ、気道過敏性の亢進と喘息重症度には相関が認められている。気道過敏性を亢進させる要因として、気道炎

症や気道リモデリングの他、特に著明な亢進を引き起こすものとして、アレルゲン吸入後数時間より誘発される喘息発作 (遅発型喘息反応: LAR) がある。非アトピー型喘息では、あらゆる検査において IgE が検出されないため、従来考えられている肥満細胞を介した発

作に至るセオリーだけでは説明がつかず、原因アレルゲンや病態、関与しているファクターについて不明な点が多い。LAR のみが認められるケースも多く、また、難治性喘息患者の多くは成人発症の非アトピー型喘息であるとの報告からも、喘息における LAR の抑制とコントロールは非常に重要であると考えられる。LAR で大きな役割を果たしていると考えられている cysLT の受容体拮抗剤での LAR 抑制効果が部分的であるとの臨床試験報告など、LAR にかかわる他のファクターの存在が示唆される。

Th2 細胞は喘息病態に深く関与している細胞のひとつであり、アレルギーや喘息反応は Th2 反応優位で生じると考えられている。Th2 細胞から分泌される Th2 サイトカインは、好酸球や肥満細胞などの炎症性細胞に作用して、それらの機能を助長し、喘息を悪化させる。抗原特異的 Th2 細胞を正常マウスに直接移入すると、喘息症状をきたすことや、ヒトでアレルゲン由来 T 細胞ペプチドエピートプを皮内投与することにより LAR のみが誘発されることなどから、LAR は T 細胞、特に Th2 細胞を主とした細胞性免疫により生じる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、非アトピー型喘息症例の T 細胞より産生され、遅発型喘息反応を誘発する新規気管支収縮活性を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト気管支平滑筋細胞収縮実験

培養正常ヒト気管支平滑筋細胞を type I コラーゲンゲルに包埋して 3 次元的に培養した平滑筋細胞ゲルによる収縮実験を行った。まず、プレート底面への細胞の付着を防ぐため、24 ウェルプレートでコラーゲンゲル (basal gel) を作製し、その上に気管支平滑筋細胞を懸濁したコラーゲンゲル (hBSMCs gel:  $4.0 \times 10^5$  cells/ml) を 1 well あたり 0.5 ml 注入して 37°C で固め、培養液を加えた。6 日間培養後、ゲル周囲をくり抜いて Krebs 液に溶解した収縮物質を作用させ、経時的に収縮を観察した。収縮はデジタルカメラに取り込み、取り込んだ画像は画像解析ソフト Image J を用いてゲル面積を測定した。{hBSMCs gel 面積 (図 1・内側紫線) / basal gel 面積 (図 1・外側青線)} から面積変化を算出し、Krebs 液によるコントロール収縮との差から収縮率を求めた。

### (2) 喘息患者末梢血/Th 細胞クローン培養上清での収縮実験

国立病院機構相模原病院アレルギー科にて、インフォームドコンセントで了承を得た非アトピー型喘息患者より末梢血を採取し、密度勾配遠心法で末梢血単核球 (PBMC) 層を分離した。呼吸機能検査の結果から患者毎に遅発型喘息反応を誘発する抗原を選び、PBMC と共培養した。48 時間後、上清を回収して Krebs 液に透析し、これをヒト気管支平滑筋細胞ゲルに作用させて、収縮パターンについて解析した。また、抗原と共培養 2 週間後の PBMC を限界希釈法にて培養し、増殖してきた細胞の中から、性状を確認して抗原特異的な Th 細胞クローンを樹立した。Th 細胞クローンは抗 CD3 抗体 (OKT3) で刺激し、48 時間後の培養上清を回収して Krebs 液に透析し、ゲル収縮実験にて収縮パターンの解析を行った。

### (3) 陰イオン交換カラム・ゲルろ過カラム

刺激培養上清中の平滑筋細胞収縮活性について詳細な情報を得るため、培養上清の陰イオン交換カラム分画を行った。Th 細胞クローン培養上清を結合バッファーで透析して陰イオン交換カラムに通し、NaCl 濃度を増加させて、カラムに結合したタンパクを段階的に溶出した。これらを Krebs 液に透析し、収縮活性がどの分画に見られるかをゲル収縮実験にて確認した。収縮活性が認められた分画は、さらにゲルろ過カラムにかけ、おおよその分子量を確かめた。

## 4. 研究成果

はじめに気管支平滑筋収縮を評価するための方法として、平滑筋細胞ゲルを用いた収縮実験系の確立を行った。気管支平滑筋収縮を評価する方法は、手術での摘出気管支などを用いた張力測定による評価法が主であるが、日本では入手が困難であることや、反応の個人差が大きいなどの問題点が指摘されている。また、ラットやウシなどの動物の気管を用いた場合、動物種間での反応性の違いから、ヒトへの適応には正しい評価が出来ないと考えられる。喘息の本態は気管支平滑筋細胞の収縮なので、この細胞を Type I コラーゲンゲルに包埋して 3 次元的に培養し、コンスタントに供給可能な収縮実験系を作製した。まず、この気管支平滑筋細胞ゲル実験系の有用性を確かめるため、既知収縮物質に対する反応性について検討した。収縮物質を 6 日間培養後の気管支平滑筋細胞ゲルに作用させると、コントロールゲルに比べて、収縮物質添加ゲルでは収縮が大きくなることが

確認できた (図 1)。

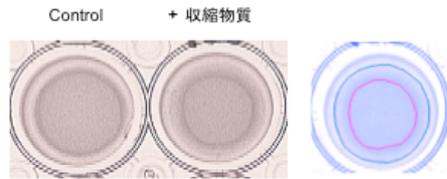


図 1

アレルギー吸入後、数分~数十分で誘発される即時型反応に関与しているヒスタミン (His) やアセチルコリンのアナログであるメサコリン (Mch) をゲルに作用させたところ、添加後 30 分で収縮が最大になったのに対して、遅発型喘息反応で大きな役割を持つと考えられているロイコトリエン (LT) では、時間経過に伴って収縮が増大し、観察を続けた 120 分まで持続した (図 2a-c)。各種受容体拮抗剤を 30 分間ゲルに作用させた後、収縮物質を添加すると、ヒスタミン収縮はヒスタミン受容体拮抗剤 (HRA) で、メサコリン収縮は M2 受容体拮抗剤 (MRA) で、ロイコトリエン収縮は、cysLT1 受容体拮抗剤 (LTRA) でのみ、それぞれ特異的な収縮抑制が認められた (図 2d)。また、一度収縮した平滑筋ゲルに気管支拡張薬である  $\beta_2$  作動薬を作用させたところ、ゲルの弛緩が観察された。これらの反応は、ヒト気管を用いた収縮実験系での反応と同様の結果であり、気管支平滑筋細胞ゲルを用いた収縮実験系の有用性が確認できた。

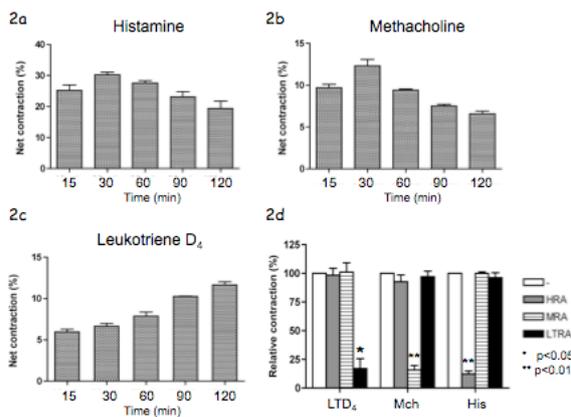


図 2

非アトピー型喘息患者 PBMC 培養上清による気管支平滑筋細胞ゲルの収縮について観察した。呼吸機能検査での LAR 誘発抗原と PBMC を共培養し、48 時間後の培養上清を Krebs 液に透析して気管支平滑筋細胞ゲルに作用させたところ、ロイコトリエンと同様の遅発型・持続型の反応が観察された (図 3)。

この収縮は各種気管支収縮物質受容体拮抗剤では抑制されなかった。さらに、PBMC と抗原に加えて免疫抑制剤 FK506 を共培養し、多くのタンパク質産生の抑制を確認した上清を用いた収縮実験においても、ゲルの有意な収縮抑制は認められなかった (図 3)。これらの LAR 誘発抗原は喘息患者 PBMC で IL-5 産生を増強するが、IL-5 を直接平滑筋細胞ゲルに作用させても収縮しなかった。さらに、他の Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13)・Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) や、収縮活性があるとされている IL-8、Calcitonin related peptide などでの直接的な収縮も認められなかった。また、IL-5 産生と気管支平滑筋収縮率との間には正の相関が認められた (図 3)。

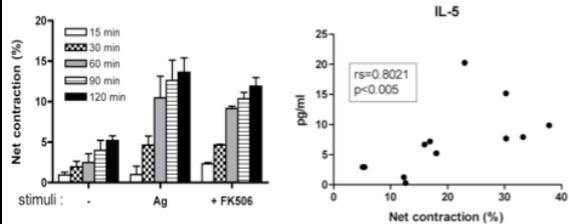


図 3

遅発型喘息反応誘発抗原と共培養した喘息患者 PBMC より Th 細胞クローンを作製し、患者 PBMC 培養上清で認められたロイコトリエン様の遅発型・持続型の収縮パターンを持ち、各種拮抗剤での収縮抑制も認められないようなクローンを樹立した。この Th 細胞クローンを抗 CD3 抗体 (OKT3) で刺激して培養上清を採取し、収縮活性についてのより詳細な性状を調べるため、各種カラムにかけて解析を行った。培養上清の陰イオン交換カラム溶出分画をゲルに作用させたところ、溶出液中 NaCl=25% (250 mM) 分画に収縮活性を有意に検出した (図 4)。

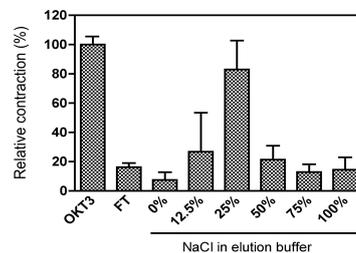


図 4

さらに、この分画で溶出された収縮活性をゲルろ過カラムにかけて分子量を調べたところ、50 kDa 以上と、既知収縮物質よりもかな

り高分子量分画で活性を認めた。

今回検出した気管支平滑筋細胞収縮活性は、分子量や、既知収縮物質受容体拮抗剤／免疫抑制剤での抑制が効かない点などから、新規の活性である可能性が示唆された。さらに、IL-5 そのものでは平滑筋細胞ゲルは収縮しないものの、IL-5 産生と収縮率とに正の相関を認めることから、IL-5 が産生される Th2 反応活性化に伴って、T 細胞から産生される活性であると考えられた。この活性について、さらに詳細な解析を行っており、性状を明らかにすることで、新規喘息薬の開発および、喘息患者の治療の層別化や QOL 改善に貢献できることが期待される。

## 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 1 件)

① Kitamura N., Kaminuma O., Ohtomo T., Kiyokawa N., Kobayashi N., Suko M. and Mori A. Evaluation of cysteinyl leukotriene-induced contraction of human cultured bronchial smooth muscle cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 2009; 149: 83-86

[学会発表] (計 7 件)

- ① Mori A., Kitamura N. et al. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009.05.26, Tokyo (JAPAN)
- ② 森晶夫、北村紀子 他、第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2009.06.05、岐阜
- ③ Mori A., Kitamura N. et al. XXI World Allergy Congress, 2009.12.09, Argentine
- ④ Mori A., Kitamura N. et al. 28<sup>th</sup> Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum 2010, 2010.04.25, Italy
- ⑤ Mori A., Kitamura N. et al. 29<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2010, 2010.06.08, U.K.
- ⑥ Mori A., Kitamura N. et al. The 8<sup>th</sup> Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology 2010, 2010.11.07, Shingapore
- ⑦ 森晶夫、北村紀子 他、第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010.11.27、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 紀子 (KITAMURA NORIKO)

独立行政法人国立病院機構相模原病院

臨床研究センター・研究員

研究者番号：80415603