

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590843

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受容体—アレルギー性免疫応答軸の基礎的研究

研究課題名（英文） The role of opioid receptors-allergic immune responses axis in stress-induced asthma

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（和文）：精神的ストレスは気管支喘息の増悪因子として知られているが、脳で受け入れられたストレスが気管支という離れた臓器の疾患の悪化に至る経路については不明である。本研究は、ストレスにより喘息気道反応が悪化する喘息モデルマウスを用いて、この機序の解明を目指した。結果として、「ストレス⇒脳 μ -オピオイド受容体刺激⇒ストレスホルモン増加⇒アレルギー免疫応答の悪化⇒喘息気道反応が悪化」に至る神経-内分泌-免疫経路を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Psychological stress has been well characterized as one of risk factors for asthma exacerbations. However, pathways linking the stress perceived in the central nervous system to asthma exacerbations still remain unclear. In this project, we analyzed mechanisms underlying stress-related asthma exacerbations using a murine model of stress-induced asthma exacerbations that we previously published. We demonstrated the involvement of μ -opioid receptors in the central nervous system and the increase of corticosterone levels in blood following the activation of the μ -opioid receptors in stress-related asthma exacerbations, and further skewing of antigen-specific immune responses to Th2 predominance associated with the failure of regulatory T cell development. These findings suggest the neuro-endocrino-immune axis as a possible pathway in stress-induced asthma exacerbations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、 μ -オピオイド受容体、グルココルチコイド、Th2 サイトカイン、制御性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

（1）気管支喘息は、好酸球や肥満細胞などの集積・活性化を特徴とする慢性炎症性気道

疾患である。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において、サイトカインや増殖因子さらに接着分子、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。

(2) 喘息は、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(アレルゲン、気道感染など)が重なり、発症/増悪するものと理解されている。しかし、病態の解明さらに抗喘息薬の開発・使用にも関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。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。

(3) 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。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の活動性が亢進していることが観察された。脳の興奮と喘息増悪の相互作用を示しているが、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)から気道へのアウトプット(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。

(4) 精神的ストレスに対する生体防御反応のひとつとして、オピオイドと神経局在性受容体との相互作用を契機とした内分泌・免疫応答が知られている。オピオイド受容体としては μ 、 κ 、 δ の3つのタイプがあるが、脳中枢の μ 受容体(MOR)にオピオイドが結合すると代表的な生体環境調節系である視床下部-下垂体-副腎皮質系が活性化され、副腎皮質ホルモンが分泌される。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。

(5) 申請者らは、このような背景から、オピオイド/オピオイド受容体相互作用に着目しながらストレス誘発性喘息の病態を解析してきた。

- ① 慢性のストレス(ここでは拘束ストレス)が抗原吸入後のTh2免疫応答および喘息気道反応を悪化させるマウスモデルを確立し、MOR欠損マウス(MORKO)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。
- ② 慢性ストレスによる悪化は中枢性MORを介することを明らかにした。

(6) そこで、脳中枢MORの活性化がどのような経路で喘息悪化に至るのかを明らかに

するために本研究を着想するに至った。

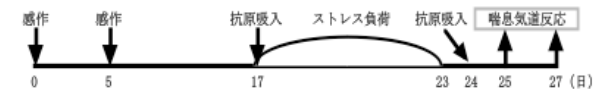
2. 研究の目的

(1) ストレス誘発性喘息における神経-内分泌-免疫経路: ストレスによる脳中枢MORの活性化(神経)に引き続いて、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アレルギー免疫応答の増強、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へと増強すること(免疫)、そしてその結果として抗原誘発性喘息気道反応が悪化することを明らかにする。

(2) ストレス誘発性喘息における精神的ストレスとそれに引き続く脳中枢MORの活性化の関与は、抗原特異的Th2型免疫応答の増強までであり、抗原誘発性喘息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) ストレス喘息マウスは、申請者らが確立した方法で、卵白アルブミンを抗原として感作したマウスに、精神的ストレスとして拘束および強制水泳ストレスを7日間連続で負荷することにより作成した(図)。



(2) ストレス→[神経] 脳中枢MOR活性化→[内分泌] コルチコステロン遊離増加の確認: 野生型マウス(WT)、MOR欠損マウス(MORKO)および脳選択的MOR発現マウス(μ 受容体欠損マウスの脳にのみMORを発現させたマウス)(MORKO/Tg)にストレスを負荷し、血中コルチコステロン濃度を比較した。

(3) ストレス→[神経] 脳中枢MOR活性化→抗原誘発性喘息気道反応の増悪の確認: WT、MORKOおよびMORKO/Tgにおいて、ストレス負荷による抗原吸入後の気道炎症増強の有無を検討した。

(4) ストレス→[内分泌] コルチコステロン遊離増加→抗原誘発性喘息気道反応の増悪の確認: WTにおいて、ストレス負荷による抗原吸入後の気道炎症、サイトカイン発現、気道過敏性および気道上皮細胞による粘液産生の増強が、ストレス負荷時にコルチコステロン受容体拮抗薬およびコルチコステロン合成阻害薬を投与されることにより軽快~消失することを検討した。

(5) ストレス→[神経] MOR活性化→[免疫]Th2免疫応答の増強の経路確認: 気管支リンパ節細胞をin vitroで抗原とともに培養し、Th1およびTh2サイトカイン産生および細胞分画(Th2、制御性T細胞)に対するストレスの影響をWTおよびMORKOで検討した。

4. 研究成果

(1) ストレス→[神経]中枢神経系 MOR の活性化→[内分泌]コルチコステロン遊離増加: ストレスとして、拘束ストレスと強制水泳ストレスを用いた。いずれのストレスにおいても、1回のストレス負荷による血中コルチコステロンの増加は MORKO では WT に比べ低下した。しかし、中枢神経系選択的に MOR を発現させた MORKO/Tg では、ストレス負荷による血中コルチコステロンの増加は、WT と同程度であった (図1)。

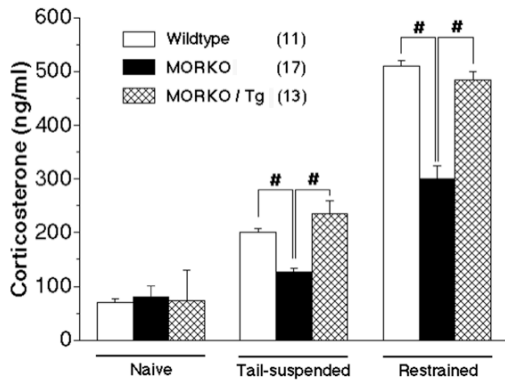


図1 ストレス負荷による血中corticosteroneの変化

(2) ストレス→[神経]中枢神経系 MOR の活性化→抗原誘発性喘息気道反応の増悪: WT では、ストレス負荷により抗原誘発性気道炎症の悪化 (気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞 (好酸球、リンパ球) および肺組織中の Th2 細胞の増加) とその背景となる Th2 サイトカインの増加 (気管支肺胞洗浄液、肺組織) が観察された。ストレス単独では、気道炎症を誘発することはできなかった。MORKO およびストレス負荷時に MOR 拮抗薬を全身投与された WT では、ストレスによる悪化はみられなかった。しかし、MORKO/Tg では、ストレス負荷による悪化は、WT と同程度であった (図2)。

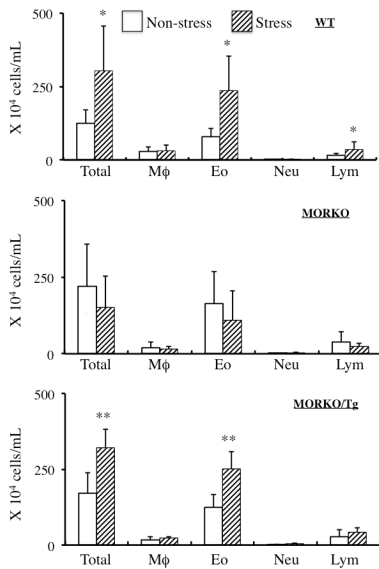


図2 気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞

(3) ストレス→[内分泌]コルチコステロン遊離増加→抗原誘発性喘息気道反応の増悪: WTにおいて、ストレスによる抗原誘発性アレルギー性気道反応の悪化 (気道炎症細胞の増加、肺組織における Th2 サイトカインの増加、気道粘液分泌の増加、気道過敏性の亢進) は、ストレス負荷時にコルチコステロン受容体拮抗薬 (RU-486) およびコルチコステロン合成阻害薬 (metyrapone) を投与することにより、軽減した (図3)。

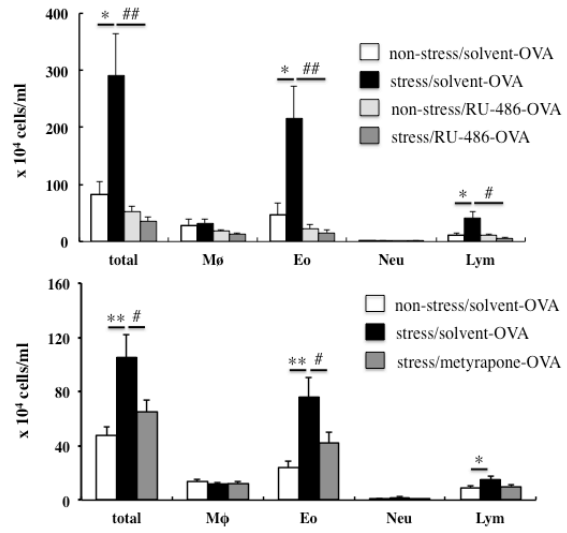


図3 気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞

(4) ストレス→[神経] MOR の活性化→[免疫]Th2 免疫応答の増強: ストレス負荷 WT 由来の気管支リンパ節細胞を抗原添加培養すると、非負荷マウスに比べ、Th2 サイトカイン産生がより増強していた。この Th2 サイトカイン産生増強は、Th2 サイトカイン産生を抑制する Treg の分化誘導低下を伴っていた (図4)。

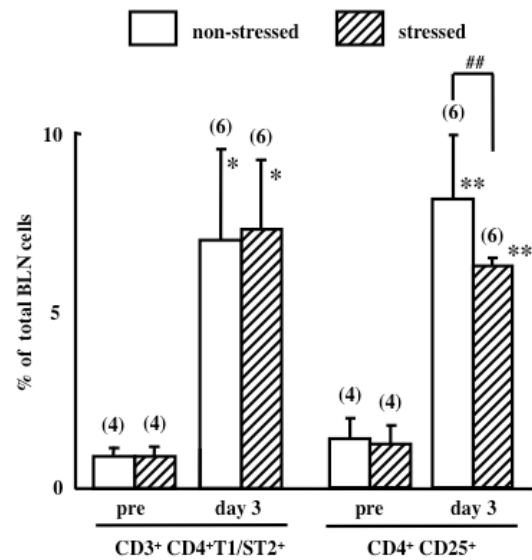


図4 WT気管支リンパ節細胞のT細胞分画

WT で観察されたストレス負荷による気管支リンパ節細胞の免疫応答の変化 (Th2 サイトカイン産生の増強と Treg の分化誘導低下) は、MORKO では観察されなかった (図 5)。

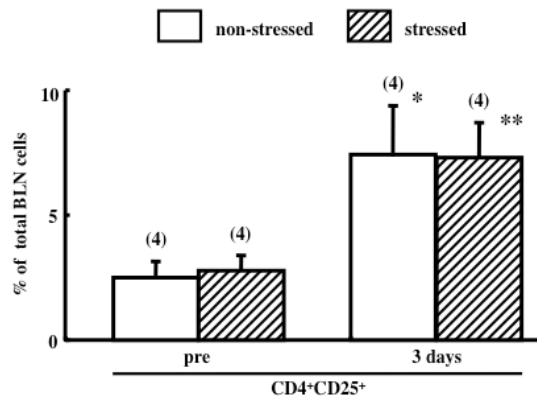


図5 MORKO気管支リンパ節細胞のT細胞分画

(5) 以上より、ストレスが抗原誘発性喘息気道反応を悪化させる機序として、[神経]MOR の活性化⇒[内分泌]コルチコステロン分泌増加⇒喘息気道反応の悪化が考えられる。また、喘息気道反応悪化の直接の要因として、制御性T細胞の誘導抑制による局所免疫応答としてのTh2免疫応答の増強が示唆された。

(6) 喘息は環境要因と遺伝要因の複雑な相互作用により増悪・発症し、多様なフェノタイプの存在が指摘されている。精神的ストレスという環境要因が増悪に及ぼす機序を明らかにする本研究の結果は、中枢神経系が関わる新たな喘息フェノタイプの存在を示唆する。今後は、ストレスによるTh2免疫応答増強の詳細なメカニズムとこの免疫応答の変化が喘息気道反応に直接関わることを検証するとともに、病態因子としてのMORの関与を喘息患者で確認していく。

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17件)

- ① Inokuchi JI, Nagafuku M, Ohno I, Suzuki A. Heterogeneity of gangliosides among T cell subsets. Cell Mol Life Sci. 査読有、in press (<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-012-1208-x>)
- ② Okuyama K, Ide S, Sakurada S, Sasaki K, Sora I, Tamura G, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. μ -opioid receptor-mediated alterations of allergen-induced immune responses of bronchial lymph node cells in a murine model of stress asthma. Allergol Int.

査読有、2012;61:245-258. doi:10.2332/allergolint.11-0A-0304

- ③ Nagafuku M, Okuyama K, Onimaru Y, Suzuki A, Odagiri Y, Yamashita T, Iwasaki K, Fujiwara M, Takayanagi M, Ohno I, Inokuchi J. CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、2012;109:E336-E342. doi:10.1073/pnas.1114965109
- ④ Okuyama K, Hamanaka Y, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. T cell subsets related with a sex difference in IL-5 production. Int Arch Allergy Immunol. 査読有、2011;155:21-6. doi:10.1159/000327261
- ⑤ Okuyama K, Wada K, Sakurada S, Mizoguchi H, Komatsu H, Sora I, Tamura G, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. The involvement of micro-opioid receptors in the central nervous system in the worsening of allergic airway inflammation by psychological stress in mice. Int Arch Allergy Immunol. 査読有、2010;152:342-52. doi:10.1159/000288287

[学会発表] (計36件)

- ① Kaori Okuyama、The involvement of glucocorticoids in asthma exacerbations induced by psychological stress、International Symposium for Neuroscience 2013、2013年02月26日、Sendai
- ② 奥山香織、中枢性1型ヒスタミン受容体を介した精神的ストレス誘発性気管支喘息悪化、第16回日本ヒスタミン学会、2012年10月20日、岡山
- ③ 奥山香織、グルココルチコイド受容体を介した精神的ストレスによる喘息病態の悪化、第15回日本ヒスタミン学会、2011年10月21日、盛岡
- ④ 大野勲、神経-内分泌-免疫軸からみたアレルギーの分子病態:神経-内分泌-免疫軸からみたストレス喘息、第60回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010年11月27日、東京
- ⑤ 奥山香織、ストレス誘発性喘息における μ -オピオイド受容体による病態修飾の解析、第21回日本生体防御学会、2010年7月22日、仙台

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: ヘルパーT細胞の選択的機能制御法
発明者: 井ノ口仁一、永福正和、大野勲、奥

山香織

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 5232241 号

取得年月日：25年3月29日

国内外の別：国内

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

曾良 一郎 (SORA ICHIRO)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40322713

菊地 利明 (KIKUCHI TOSHIAKI)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：10280926

(3) 連携研究者

櫻田 忍 (SAKURADA SHINOBU)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30075816