

## 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 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790768

研究課題名（和文）喘息に特異的な肺胞マクロファージのポピュレーションにおける補助シグナル分子の役割

研究課題名（英文）the role of costimulatory molecules in alveolar macrophages from a murine model of asthma

研究代表者

原田 紀宏（HARADA NORIHIRO）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10465065

研究成果の概要（和文）：喘息における肺胞マクロファージ（AM）のポピュレーションの詳細については明らかではない。本研究では、喘息モデルマウスとコントロールの AM の比較を実施し、喘息モデルマウスの AM は、より選択的活性化マクロファージ（M2）よりもシフトしている可能性を示した。また、コントロールマウスの AM では認められない補助シグナル分子 B7-DC の発現が喘息モデルマウスの AM で有意に亢進していること、及び、AM は T 細胞増殖を抑制する可能性を見出した。これらの現象は、AM が喘息病態を抑制している可能性を示唆しており、AM が新たな治療標的となり得ることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Little is known about the population of alveolar macrophages (AM) from asthmatics. In the present study, we suggested that AM from a murine model of asthma transit towards an alternatively activated macrophages (M2) as compared with AM from control mice. Moreover, we found that AM from a murine model of asthma, but not from control mice, express the costimulatory molecule B7-DC, and AM might inhibit antigen-specific CD4 T cell proliferation. These findings suggest that AM can suppress the pathogenesis of asthma, and may be a novel therapeutic target in asthma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：肺胞マクロファージ、喘息、補助シグナル分子

## 1. 研究開始当初の背景

喘息においては、気道構成細胞、T 細胞、好酸球などの浸潤細胞が複雑に関与し合う。気管支肺胞洗浄液中の大多数を占める肺胞

マクロファージ（AM）も含まれるが、その解析は十分ではない。マクロファージには、複数のポピュレーションが報告されており、細菌や死細胞を貪食する古典的活性化マクロ

ファージ (M1) や IL-4、IL-13 刺激下に誘導される選択的活性化マクロファージ (M2) などが該当するが、喘息における AM のポピュレーションの詳細については明らかではない。

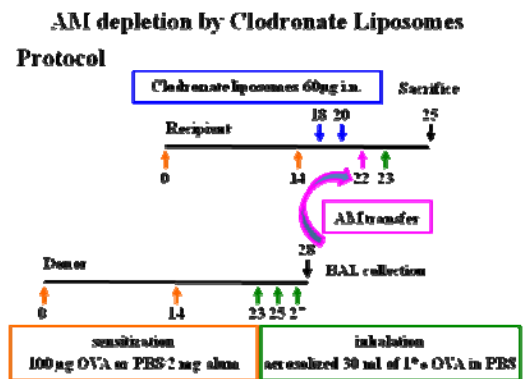
## 2. 研究の目的

ヒトにおける喘息では、遺伝因子や環境因子による修飾が多岐にわたるため、実験条件を統一することは困難である。このため、条件を均一化することが可能である喘息モデルマウスを用いて AM のポピュレーションを網羅的に解析した。

## 3. 研究の方法

初回免疫日と Day 14 に、抗原である Ovalbumin (OVA) 溶液とアジュバントである水酸化アルミニウムゲルを混合して作製した懸濁液を BALB/c マウスに腹腔内投与。続いて Day 22、24、26 に OVA 溶液を吸入させることで喘息モデルマウスを作製した。これらの気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の AM のポピュレーションを、Flow Cytometry (FCM) と qPCR を用いて解析し、コントロールマウスと喘息モデルマウスの比較を行った。また、AM を培養し、培養上清中のサイトカイン・ケモカインを測定した。さらに、OVA 特異的 T 細胞抗原レセプター (TCR) を発現する DO11.10 TCR トランスジェニックマウスを OVA で免疫し、所属リンパ節細胞を回収。BALF 中の AM とリンパ節細胞中の CD4 T 細胞を OVA ペプチド添加下に共培養し、T 細胞増殖、サイトカイン産生を *ex vivo* で解析した。*in vivo* においては、リポソーム化した clodronate disodium を気道に投与することで、AM を欠失させた喘息モデルマウスを作製。コントロールマウス、喘息モデルマウスの AM を経気道的に移入し、比較を行った (図 1)。

図 1 ; AM 欠失喘息モデルマウスのプロトコール



## 4. 研究成果

FCM、qPCR、培養上清中のサイトカイン・ケモカインの測定の結果、AM には、M1 マーカーである  $Fc\gamma RIII$ , NOS2, RANTES, TLR2, IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  を認めたが、一方で、M2 マーカーである Arginase1, YM-1, AMCase, Fizz1, B7-H1, Eotaxin, MCP-1, TARC, MDC 分子の発現を認めた。さらには、喘息モデルマウスの AM はコントロールと比べ、M2 マーカーである SR-A1, CD206 の発現増強を認め、より M2 よりシフトしている可能性が示唆された。一方、T 細胞活性化には抗原提示細胞からの補助シグナルが必須であり、T 細胞が持つ多様な機能は、多種の補助シグナル分子の介在により制御される。本研究においては、DO11.10 TCR トランスジェニックマウスの CD4 T 細胞と AM を共培養した結果、AM は T 細胞増殖を細胞密度依存性に抑制している可能性を見出した。しかし、これに反して、同実験の培養上清中の種々のサイトカイン、ケモカインは増加しているため、現在、AM が T 細胞に与える影響を詳細に解析中である。また、AM を欠失させたマウスに OVA を吸入させると、欠失させなかったコントロールと比べて、好酸球性気道炎症の増悪を認めるが、そこに AM を経気道的に移入すると、その現

象は抑制された。

さらに、本研究では、AM 上の補助シグナル分子の発現を解析し、コントロールマウスの AM では認められない補助シグナル分子 B7-DC の発現が喘息モデルマウスの AM で有意に亢進していることを見出した。B7-DC は、寄生虫感染や喘息における Th2 反応に対して抑制的に働くと考えられている。AM の T 細胞への影響と B7-DC 発現の関与について解析中である。また、我々は、補助シグナル分子 TIM4 が喘息の病態形成に関与する可能性を既に見出しているが、TIM4 の Fc 融合蛋白が AM 上に結合することを新たに見出し、さらなる解析を実施している。

これらの現象は、AM が喘息病態を抑制している可能性を示唆しており、AM が新たな治療標的となり得ることを示唆していると考えられる。

#### 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 3 件)

1. Makino F, Ito J, Abe Y, Harada N, Kamachi F, Yagita H, Takahashi K, Okumura K, and Akiba H. Blockade of CD70-CD27 Interaction Inhibits Induction of Allergic Lung Inflammation in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. in press. 査読有
2. Ito J, Harada N, Nagashima O, Makino F, Usui Y, Yagita H, Okumura K, Dorscheid D. R., Atsuta R, Akiba H, and Takahashi K. Wound-induced TGF-beta1 and TGF-beta2 enhance airway epithelial repair via HB-EGF and TGF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 412:109-114. 査読有
3. Ma J, Usui Y, Takeda K, Harada N, Yagita H, Okumura K, and Akiba H. TIM-1 signaling in B cells regulates antibody production. *Biochem Biophys Res Commun* 406:223-228. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. Fumihiko Makino, XXII World Allergy Congress, CD70-CD27 Interaction Regulates Asthmatic Response in a Murine Model of Asthma, 2011 年 12 月 5 日 Cancun, Mexico
2. 牧野文彦, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 抗 CD70 抗体投与による OVA 誘発性喘息マウスの発症抑制とそのメカニズムの解析, 2011 年 11 月 10 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
3. 原田紀宏, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 軽症持続型喘息の治療ステップダウンにおけるプラズマカストの有用性に関する臨床的検討, 2011 年 11 月 12 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
4. 原田園子, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 最重症持続型喘息に対するオマリズマブの長期臨床効果の検討, 2011 年 11 月 11 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
5. 桂蓉子, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 成人喘息における心理社会的背景の検討, 2011 年 11 月 12 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
6. 石森絢子, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 呼気一酸化窒素濃度 (FeNO) からみた気管支喘息の自然寛解, 2011 年 11 月 11 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
7. 熱田了, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 喘息患者における ACT score 変動の背景因子の検討, 2011 年 11 月 10 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
8. 牧野文彦, 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 運動選手における運動誘発性喘息の検討, 2011 年 5 月 14 日, 幕張メッセ (千葉)
9. 原田園子, 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 最重症持続型喘息に対するオマリズマブの効果, 2011 年 5 月 14 日, 幕張メッセ (千葉)
10. 牧野文彦, 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 抗 CD70 抗体投与による OVA 誘発性マウス喘息疾患の発症抑制とそのメカニズムの解明, 2011 年 4 月 24 日, 東京国際フォーラム (東京)
11. 桂蓉子, 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 成人気管支喘息における心理社会的背景の検討, 2011 年 4 月 22 日, 東京国際フォーラム (東京)
12. Atsuta R, European Respiratory Society Annual Congress, Barcelona 2010, An investigation of

- exercise-induced asthma in athletes, 2010年9月19日, Barcelona, Spain
13. Ishimori A, European Respiratory Society Annual Congress, Barcelona 2010, Pulmonary function test and fraction of exhaled nitric oxide of asthma in remission, 2010年9月19日, Barcelona, Spain
  14. Ito J, European Respiratory Society Annual Congress, Barcelona 2010, Secretion of wound-induced TGF- $\beta$  1 and TGF- $\beta$  2 enhance airway epithelial wound repair via HB-EGF and TGF- $\alpha$ , 2010年9月19日, Barcelona, Spain
  15. Ito J, 14th International Congress of Immunology, TIM4 regulates asthmatic response in a murine model of asthma, 2010年8月26日, 神戸コンベンションセンター (兵庫)
  16. Makino F, 14th International Congress of Immunology, CD70-CD27 interaction regulates asthmatic response in a murine model of asthma, 2010年8月25日, 神戸コンベンションセンター (兵庫)
  17. Harada N, 14th International Congress of Immunology, Secretion of wound-induced TGF- $\beta$  1 and TGF- $\beta$  2 enhance airway epithelial wound repair via HB-EGF and TGF- $\alpha$ , 2010年8月24日, 神戸コンベンションセンター (兵庫)
  18. 桂蓉子, 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会, Master Screen IOS-J と MostGraph-01 の比較検討, 2010年5月8日, 国立京都国際会館 (京都)
  19. 伊藤潤, 第50回日本呼吸器学会学術講演会, TIM-4 の喘息モデルマウスにおける役割の検討, 2010年4月24日, 国立京都国際会館 (京都)
  20. 石森絢子, 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 呼吸機能検査・呼気一酸化窒素濃度からみた out-grow 群, 2010年4月23日, 国立京都国際会館 (京都)
  21. 梶山雄一郎, 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 中等度持続型気管支喘息患者における Suplatast tosilate の気道炎症に対する長期検討, 2010年4月23日, 国立京都国際会館 (京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 紀宏 (HARADA NORIHIRO)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 10465065

### (2) 研究分担者; なし

(3) 連携研究者; なし