

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791817

研究課題名(和文)新規CD4陽性T細胞サブセットTh9細胞のアレルギー性鼻炎における役割の解明

研究課題名(英文)The role of Th9 cells in the airway inflammation

研究代表者

佐伯 真弓(SAEKI, Mayumi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：00462771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性気道炎症における上・下気道におけるTh9細胞の効果をT細胞移入モデルを用いて解析した。気管支喘息モデル、アレルギー性鼻炎モデルいずれの場合も、Th9細胞を移入したマウスでは、Th2細胞移入マウスと同様の好酸球浸潤が認められた。また、気管支喘息モデルでは気道過敏性の亢進が、アレルギー性鼻炎モデルではくしゃみの増加が認められた。また、気管支喘息モデルにおいては、Th2細胞移入マウスとは異なりTh9細胞移入マウスによるAHRには好酸球の関与は比較的小さいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of Th9 cells in upper and lower airway inflammation using adoptive transfer models. Both Th2 cells and Th9 cells induce eosinophil accumulation in the lung and airway hyperresponsiveness (AHR) to the inhaled methacholine in bronchial asthma model, and also induce eosinophil accumulation in the nasal cavity and sneezing responses in allergic rhinitis model. Th2-induced AHR was abolished by eosinophil deficiency. In contrast, Th9-induced AHR is hardly affected by eosinophil deficiency.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー アレルギー性鼻炎 気管支喘息 Th2細胞 Th9細胞

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患は、わが国の3人に1人が罹患していると推定され、今後も患者数は増加するものと予測されていることから、深刻な国民病のひとつである。しかし、その病態メカニズムは十分に理解されていない。

中でもアレルギー性鼻炎は、鼻炎そのものが致命的な予後をもたらすことはないことも相まって、下気道のアレルギーである気管支喘息と比べるとあまり研究は進んでいなかった。しかしながら、アレルギー性鼻炎の三主徴による就労の作業効率の低下や、これら疾患に対する医療費の高騰は大きな社会問題でもあり、さらに上気道におけるアレルギー性鼻炎の存在は気管支喘息の病態に悪影響を及ぼすことが報告されていることから、その病態メカニズムの解明と新たな治療法の開発が急務であると考えられた。アレルギー性鼻炎は、抗原とIgEの結合により肥満細胞から遊離されるケミカルメディエーターが誘発する、典型的なI型アレルギーと考えられているが、症状が慢性化した患者においては、抗原との接触から数時間を経過して粘膜腫脹による鼻閉が誘起される(遅発相)ことから、単なるI型アレルギーと一括できないものと考えられた。

近年、CD4陽性T細胞はTh1細胞、Th2細胞のほかにも、Th17細胞、Treg細胞など新たなサブセットが報告されており、2008年にはIL-9を産生するTh9細胞が同定された。しかしながら、アレルギー性疾患におけるTh9細胞の役割や生理学的意義はほとんど解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

気管支喘息モデルとアレルギー性鼻炎モデル、あるいはTh2細胞移入マウスとTh9細胞移入マウスの病態を比較検討することにより、Th9細胞の上/下気道における役割を明らかとする。

## 3. 研究の方法

### (1) Th9細胞の培養

OVA特異的T細胞レセプターを強制的に発現し、遺伝子再構成活性化遺伝子2を欠損しているDO11.10 Rag2<sup>-/-</sup>マウスの脾臓から、CD4陽性細胞と抗原提示細胞をMACS(磁気ビーズ)を用いて精製し、抗原、IL-4、TGF-βと共にin vitroで培養し、Th9細胞に分化誘導した。細胞の分化状態は、リアルタイムPCR、FACS、ならびにELISA法にて確認した。

### (2) アレルギー病態の評価系構築

上気道アレルギーモデル(アレルギー性鼻炎モデル)は、抗原暴露後のくしゃみ数な

らびに鼻腔洗浄液(NALF)中の炎症細胞数を用いて評価した。下気道アレルギーモデル(気管支喘息モデル)は、肺胞洗浄液(BALF)中の炎症細胞数、ならびにフレキシベントを用いた、メサコリンに対する気道過敏性亢進(AHR)を用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) T細胞の分化

まずはじめに、DO11.10 Rag2<sup>-/-</sup>マウスの脾臓からCD4陽性細胞と抗原提示細胞を採取し、in vitroで分化誘導したT細胞の分化状態を確認した。Th9細胞はIL-9を特異的に発現していた。一方、Th2細胞、Th9細胞どちらもIL-10を発現していた。また、Th2細胞の培養上清中にはIL-4とIL-5が、ほぼ特異的に産生しており、樹立したT細胞は両サブセットに特徴的なフェノタイプを発現していることが示された(図1)。

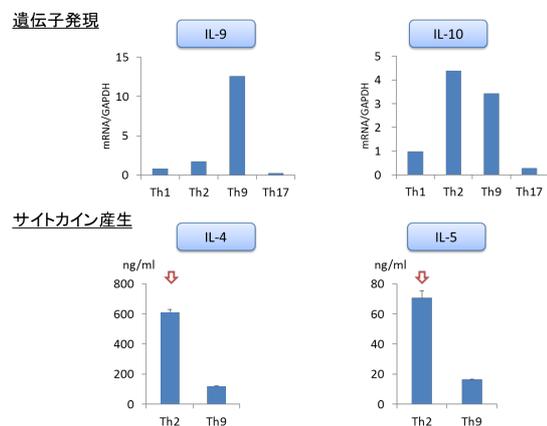


図1 樹立したT細胞のフェノタイプ  
Th9細胞ではIL-9とIL-10が、Th2細胞ではIL-4、IL-5、IL-10が発現しており、両サブセットはそれぞれ特徴的なフェノタイプを発現していることが示された。

### (2) アレルギー病態の評価系構築

上気道および下気道における反応を別個に検討するために、鼻粘膜および気管支肺胞領域特異的にアレルギー性炎症を誘発するモデルを作成した。OVA/Alumで4回感作後、抗原を一気に高用量で点鼻する高用量点鼻群、低量を4回に分けて点鼻する低用量点鼻群、気管内に直接投与する気管内投与群、3つに分けて抗原をチャレンジし、最終チャレンジ直後にくしゃみの回数を計測した。その6時間後には鼻腔洗浄、ならびに気管支肺胞洗浄を行った(図2)。

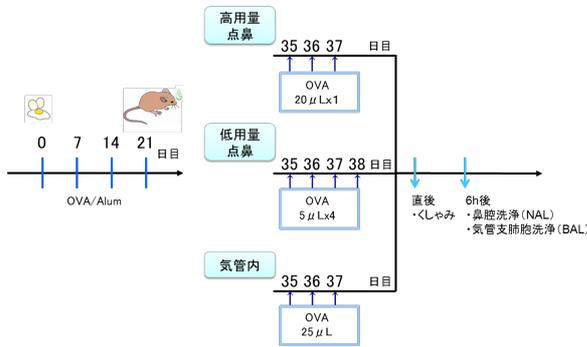


図 2. アレルギー病態の評価系構築

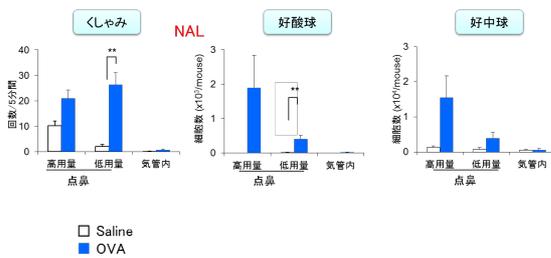


図 3. 投与方法による鼻粘膜におけるアレルギー性炎症の違い

OVA/Alum 感作マウスに、抗原を一気に高用量で点鼻する高用量点鼻群、低量を4回に分けて点鼻する低用量点鼻群、気管内に直接投与する気管内投与群、3つに分けて抗原をチャレンジし、最終チャレンジ直後にくしゃみの回数を計測した。その6時間後には鼻腔洗浄を行った。<sup>\*\*</sup> P < 0.01

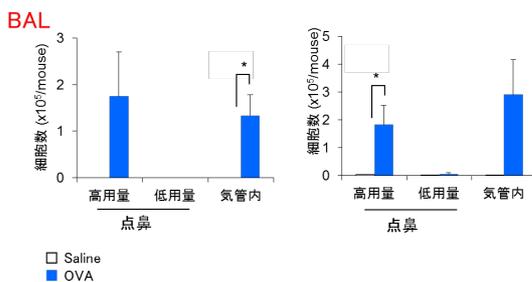


図 4. 投与方法による下気道におけるアレルギー性炎症細胞浸潤の違い

OVA/Alum 感作マウスに、高用量点鼻群、低用量点鼻群、気管内投与群に分けて抗原をチャレンジし、最終チャレンジの6時間後に気管支肺胞洗浄を行った。<sup>\*</sup> P < 0.05

### 好酸球

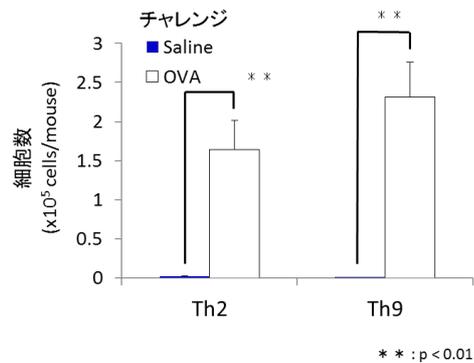


図 5. 気管支肺胞領域特異的アレルギー性炎症反応

Th2 細胞移入マウス、ならびに Th9 細胞移入マウスにおいて、生食チャレンジと比べて抗原チャレンジにより好酸球数が増加していた。

は、NALF 中でのみ好酸球、好中球が増加していた。一方、気管内に抗原投与したマウスでは、BALF 中でのみ好酸球、好中球の浸潤がみられた。

以上の結果から、OVA のチャレンジ方法を低用量の点鼻、あるいは気管内投与を行うことにより、鼻粘膜(上気道アレルギーモデル・アレルギー性鼻炎モデル)、あるいは気管支肺胞領域特異的(下気道アレルギーモデル・気管支喘息モデル)に炎症を誘発するモデルを樹立できた。

### (3)アレルギー病態の評価

in vitro で分化した Th2 細胞と Th9 細胞をマウスに移入し、その病態を比較した。

まず気管支喘息モデルマウスを用いて、BALF 中の細胞浸潤、ならびに気道過敏性亢進を測定したところ、生食投与と比較し、抗原を投与することにより、Th2 細胞移入マウス、Th9 細胞移入マウスのいずれにおいても BALF 中への好酸球浸潤(図 5)、ならびに気道過敏性亢進がみられた。従って、Th9 細胞を移入して抗原を暴露するだけで、Th2 細胞と同様に気管支喘息病態が起こることが示された。

そこで次に、アレルギー性鼻炎モデルを用いて、NALF 中の細胞浸潤、ならびにくしゃみ数を測定した。Th2 細胞移入マウス、Th9 細胞移入マウスのいずれにおいても、生食投与と比較し、抗原を投与することにより、鼻腔への好酸球浸潤ならびにくしゃみ数の増加が認められた。従って、気管支喘息と同様に、Th2 細胞だけではなく Th9 細胞もアレルギー

ギー性鼻炎の病態にも関与しうることが示された。

そこで、次に Th2 細胞による気道炎症反応と Th9 細胞による気道炎症反応との相違点を明らかとするため、好酸球欠損マウスを用いて、気道炎症と好酸球との関係を検討した。すると、気管支喘息マウスにおいて、Th2 細胞が誘発する AHR は好酸球依存的であったが、Th9 細胞が誘発する AHR は Th2 細胞によるものとは異なり好酸球の関与は比較的小さいことが示された。

そこで次に、Th9 細胞が産生するサイトカインの一つである IL-10 の AHR に対する影響を調べるため、IL-10 欠損マウスと DO11.10 Rag2<sup>-/-</sup>マウスを交配し、そのマウスから Th9 細胞 (DO11.10 Rag2<sup>-/-</sup> IL-10<sup>-/-</sup> Th9 細胞) を分化誘導した。作製した IL-10 欠損マウス由来の Th9 細胞は、通常の Th9 細胞と同程度の IL-9 を産生していたが、IL-10 は産生していなかった。そこで、この細胞を正常マウスと好酸球欠損マウスに移入して抗原暴露したところ、好酸球数以外の浸潤細胞数や AHR に差は見られなかったことから、Th9 細胞による気道過敏性亢進には IL-10 以外の因子が関与していることが示された。従って、Th9 細胞による気道過敏性亢進には好酸球、IL10 以外の因子が関与していることが示唆された。

今後、引き続き Th9 細胞が引き起こす好酸球非依存性の AHR に関与する因子を詳細に検討することにより、本機構をターゲットとした新たな気道炎症抑制法の開発できると期待される。

## 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 2 件)

Saeki M, Nishimura T, Mori A, Kaminuma O and Hiroi T. Antigen-induced mixed and separated inflammation in murine upper and lower airways. *Allergol Int*. doi: 10.2332/allergolint.13-LE-0634. 63: S59-61, 2014. (査読有)

Nishimura T, Saeki M, Kaminuma O, Takaiwa F, Hiroi T. Transgenic plants for allergen-specific immunotherapy. *World J Immunol*. doi: 10.5411/wji.v4.i3.141. 4: 141-148, 2014. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

佐伯真弓、西村友枝、神沼修、大友隆之、森晶夫、廣井隆親: マウスにおける抗原誘発気道閉塞反応に対する各 T 細胞サブセットの役割 第 62 回日本アレルギー学会

秋季学術大会、2012.11.29.大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

佐伯真弓、西村友枝、神沼修、森晶夫、廣井隆親: アレルギー性鼻炎における鼻粘膜過敏性亢進に対する T 細胞の関与 アレルギー・好酸球研究会 2013、2013.6.15. 慈恵医大(東京都・港区)

佐伯真弓、西村友枝、渡辺伸昌、森晶夫、神沼修、廣井隆親: TGF-β 誘導性 T 細胞サブセットのアレルギー性気道炎症における役割 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013.11.28. ホテルニューオータニ(東京都・千代田区)

西村友枝、佐伯真弓、松岡邦枝、米川博通、森晶夫、後藤穰、大久保公裕、神沼修、廣井隆親: マウスアレルギー性鼻炎モデルにおける IgE-肥満細胞系および T 細胞の関与. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013.11.28. ホテルニューオータニ(東京都・千代田区).

佐伯真弓、西村友枝、渡辺伸昌、森晶夫、神沼修、廣井隆親: Th9 細胞による気道過敏性亢進における好酸球の役割. アレルギー好酸球研究会 2014、2014.10.4. 学術総合センター(東京都・千代田区)

佐伯真弓、西村友枝、渡辺伸昌、森晶夫、神沼修、廣井隆親: Th2 および Th9 細胞による気道過敏性亢進発症機構の相違. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会、2015.5.26. 高輪プリンスホテル(東京都・港区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐伯真弓 (SAEKI, Mayumi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号: 00462771