

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461497

研究課題名(和文) T細胞依存性、IgE非依存性の新規気管支閉塞機序の解明

研究課題名(英文) Investigation on T cell-dependent, IgE-independent bronchoconstriction mechanism

研究代表者

森 晶夫 (MORI, AKIO)

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・部長

研究者番号：80251247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IgE抗体の認められない非アトピー型喘息において、可逆性の気管支収縮が生じるメカニズムについて研究した。ヒト培養気管支平滑筋細胞封入ゲルを用いた平滑筋収縮アッセイ系を樹立し、患者由来の抗原特異的T細胞クローン培養上清に含まれる平滑筋収縮活性を測定した。免疫学的機序についてより詳細に解析する目的に、マウスT細胞クローン、T細胞移入気流閉塞モデルを樹立した(in vivo系)。幼若マウスの気管支平滑筋primary培養細胞を用いたゲル内収縮アッセイ系を確立した(in vitro系)。既知の気管支収縮物質に対するアンタゴニストにより、阻害されなかった。

研究成果の概要(英文)：T cell-induced bronchoconstriction in asthma is studied in the present study. Antigen-specific T cell clones were established from PBMC obtained from asthmatic donors, and the culture supernatants of T cell clones were analyzed in terms of human bronchial smooth muscle cells-embedded collagen gels. In addition, murine antigen-specific T cell clones and murine asthma model was established to clarify immunological mechanisms of T cell-induced bronchoconstriction. Lastly, we tried to analyze guinea pig bronchial ring for pharmacological characterization of this response.

研究分野：アレルギー学

キーワード：喘息 T細胞 平滑筋 遅発型反応 喘息モデル

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、IgE抗体を特徴とするアトピー型とIgE抗体の認められない非アトピー型とに分類される。喘息の特徴である可逆性の気流閉塞は、従来、IgE-マスト細胞を介する即時型アレルギー反応として認識され、数多くのマスト細胞脱顆粒抑制薬が臨床に供されてきたものの、効果は限定的である。アトピー型と非アトピー型の両病型は、IgE抗体の有無以外では、臨床症状、検査データ、病理所見上区別しえないことから、IgE以外に喘息共通の病因が存在するとの仮説も提唱されてきた。1990年以降の吸入ステロイドの普及は喘息治療に大きな福音をもたらしたが、喘息患者全体の約1~2割を占める重症喘息群においては、高用量吸入ステロイド投与、抗ロイコトリエン薬、長時間作動型2刺激薬などの多剤併用療法を行っても、なおQOLに著しい障害を残している。吸入ステロイドで完治し得ない患者群に対していかにbetterな治療オプションを提供するかは、近未来的な大課題である。喘息病態に関わる責任分子としては、IgE、ヒスタミン、ロイコトリエンおよびそれらの受容体など数多くの分子が遺伝子クローニングされ、それらの阻害剤が臨床に供されてきたが、作用機序が未だpinpointには特定できないステロイド薬の臨床効果に遠く及ばない。そこで、喘息を最も特徴付ける可逆的気流閉塞の原因が何なのか、治療介入すべき病的プロセスを解明する努力が必要と考えた。

2. 研究の目的

重症喘息の臨床研究からは、重症喘息の大部分は非アトピー型喘息であることが明らかになっている(米国SARP研究、欧州ENFUMOSA研究、厚生労働科学研究重症喘息班)。アトピー型喘息では、いわゆるTh2型免疫応答を司るT細胞が、慢性炎症の引き金を担っていると考えられているが、非アトピー型喘息においても、CD4⁺T細胞の活性化が認められるなど、外来抗原の関与を窺わせるエビデンスが数多く報告されている。そこで、われわれは、末梢血中T細胞のIL-5産生を指標とすることにより、アトピー型喘息、非アトピー型喘息の両病型において、T細胞応答抗原を同定した。次いで、インフォームドコンセントの得られた症例を対象に、吸入負荷試験を実施し、非アトピー型喘息においても、T細胞応答抗原の吸入に引き続いて、遅発型喘息反応(気流閉塞)が生じることを突き止めた。そこで、IgE抗体が認められない非アトピー型喘息において認められた気流閉塞のメカニズムを分子レベルで解明することを目指す。アトピー型喘息の症例を対象とする吸入負荷試験では、抗ヒスタミン剤と抗ロイコトリエン剤の併用によって、即時型喘息反応は完全に、遅発型喘息反応も部分的に抑制されることが知られている。非アトピー型喘息の遅発型喘息反応に対しては、抗ヒ

スタミン剤、抗ロイコトリエン剤ともに効果はみられないことを観察している。すなわち、未知の気流閉塞メディエータの存在が強く示唆される。

海外の動向として、近年、英国のA. B. Kayらは、ネコ喘息の症例に、主要アレルゲンFel d 1のT細胞エピトープペプチドを負荷し、即時型喘息反応を欠く遅発型喘息反応が起きることを報告している(Haselden BM, et al. Immunoglobulin E-independent major histocompatibility complex-restricted T cell peptide epitope-induced late asthmatic reactions. J Exp Med. 189:1885, 1999)。これまでは、遅発型喘息反応は即時型喘息反応に依存して生じるものと考えられてきたが、IgE抗体依存性の即時型反応なくとも、喘息反応が生じることが、アトピー型喘息で証明された。非アトピー型喘息において、「T細胞アレルゲン」を見つけ出し、遅発型喘息反応(*in vivo*)でその役割(アレルギー学的意義)を確認したのはわれわれが世界最初である。

アトピー型喘息においては、アレルゲンの吸入負荷に引き続いて即時型喘息反応と遅発型喘息反応が惹起される。即時型アレルギー反応の機序は石坂公成先生によって解明され、マスト細胞由来のヒスタミン、ロイコトリエン等のケミカルメディエータが重要とされている。遅発型喘息反応の一部は抗ロイコトリエン薬で阻害されるが、残りの部分についてはまったく見当も付いていない。ヒスタミン、PGD₂の産生が認められないとの知見からマスト細胞の関与は否定的である。一方、遅発型喘息反応が、シクロスポリン、抗CD4抗体の投与で抑制されることから、T細胞依存性であるとの報告もみられる(Khan LN, et al. Am J Respir Crit Care Med. 162:1377, 2000等)。われわれが見出した、IgE抗体の認められない抗原の吸入負荷に反応した遅発型喘息反応においても、T細胞依存性の反応であるか否か、気管支平滑筋の収縮をきたすメディエータはT細胞に由来するのか等について明らかにしたい。ロイコトリエン、ヒスタミン、アセチルコリン等の既知の平滑筋収縮物質と異なる新規物質が同定できれば、新たな抗喘息創薬のターゲットを提供する一方、喘息病因論を書き換える画期的な新理論となることが期待される。

3. 研究の方法

1)アトピー型、非アトピー型気管支喘息症例における家塵ダニ、真菌アレルゲン応答性のT細胞増殖・サイトカイン産生の測定

国立病院機構相模原病院アレルギー科に通院中の喘息症例を対象とした。インフォームドコンセントを得た後、ヘパリン採血を実施、Ficoll-paque比重遠心法により末梢血単核球を分離し、無血清培地AIM-V mediumに懸濁した。抗原非特異的活性化刺激(phorbol ester + Ca²⁺ ionophore)や、抗原特異的刺

激(ダニアレルゲン、カンジダ、アスペルギルス、アルテルナリア等の真菌抗原)と培養することによって活性化し、上清中に産生されるサイトカイン、特に IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ を、特異的サンドイッチ ELISA で測定した。また、T 細胞の増殖応答を、 ^3H -thymidine パルスにより測定した。

当院では、33 種のアレルゲンの皮内反応テストおよび陽性アレルゲンの CAP-RAST 検査をルーチンに施行しているため、抗ダニ IgE 値、血中総 IgE 値とサイトカイン産生との関連を解析した。

2) 皮膚反応、吸入負荷試験におけるダニ、真菌アレルゲンの解析

ダニ、真菌抗原が、T 細胞 IL-5、IL-13 産生を誘導する場合、皮膚反応、吸入負荷試験を実施して、*in vivo* での好酸球性炎症惹起能があるか否かを検討した。皮膚反応は皮内注射により、吸入負荷試験は日本アレルギー学会標準法により実施し、遅発型反応は1時間ごとに Vitalograph で呼吸機能を測定、皮膚反応は24、48時間後にゲージで計測した。通常臨床における血液検査、皮膚アレルゲン検査で陰性の症例でも、末梢血 T 細胞のダニアレルゲン、真菌アレルゲン反応性を示す症例では、十分な説明とインフォームドコンセントを得た後、これらのアレルゲンの皮膚反応、吸入負荷試験を施行した。即時型、遅発型喘息反応を測定した。

3) 喘息症例末梢血からの抗原特異的 T 細胞クローンの樹立

粗製ダニ抗原、粗製カンジダ抗原、精製カンジダ SAP2 に応答し、T 細胞 IL-5 産生が誘導され、吸入チャレンジに際して遅発型喘息反応が認められる症例の末梢血単核球を、当該抗原で刺激し、さらに限界希釈法により、T 細胞クローンを樹立した。T 細胞クローン培養上清を、上記の気管支平滑筋細胞封入ゲルに作用させ、収縮活性を産生するクローンを選択した。

4) 非 IgE 機序による気管支平滑筋収縮反応の解析 ゲル内平滑筋収縮反応系の確立

コンフルエントな培養ヒト気管支平滑筋細胞を、24 well plate 内でコラーゲンゲルに封入し、収縮活性のアッセイに用いた (Kitamura, N., et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 146:36, 2008, Kitamura, N., et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149:83, 2009)。培養液を Tyrode buffer に置換し、T 細胞の培養上清を加えて、ゲルの収縮を経時的にデジタル式記録カメラで撮影し、収縮活性を測定した。

5) T 細胞依存性気管支閉塞モデルの樹立

既に、T 細胞クローンを無処理マウスに移入、抗原チャレンジを行うことにより、気道過敏性、肺好酸球浸潤を惹起する T 細胞依存性喘息モデルを報告してきた (Kaminuma O., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:448, 1997, Nakata A., et al. *Int Immunol.* 13:329, 2001, Kaminuma O., et al. *Eur J Immunol.*

31:2669, 2001)。卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞クローンを樹立し、*in vitro* で増殖させ、無処理 BALB/c マウスに経静脈的に移入した。24 時間後に OVA を経気道的にチャレンジし、経時的に気道抵抗を測定した。無拘束呼吸機能解析装置 (BUXCO) を用いて Penh (enhanced pause) 値を、また麻酔下、レスピレータ装着下に呼吸機能測定装置 (BUXCO 社) を用いて、呼吸抵抗 (R_L) を測定した。BALF 好酸球の解析は、チャレンジ 48 時間後に BAL を施行、総細胞数をカウントし、サイトスピンを用いてスライドガラスに接着させ、ギムザ染色を行い、好酸球数をカウントした。

6) マウス気管支平滑筋細胞封入ゲルアッセイ系の確立

Balb/c マウスより気管支を採取し、コラーゲン処理後、DMEM/F-12 培地に懸濁して、マウス気管支平滑筋細胞の初代培養を行った。継代後に、4) と同様に、マウス気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルの作成を行った。

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 4 1 5 号) を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って各研究者の施設ごとに倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守するとともに、院内の実験動物委員会の承認を得た上で、実施した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論しうる最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

4. 研究成果

1) ヒト T 細胞由来の気管支平滑筋収縮活性の解析モデル確立

末梢血 T 細胞の SAP2 (*Candida albicans* 由来の精製抗原) に反応した IL-5 産生、SAP2 吸入誘発時に isolated LAR が認められる症例から、PBMC を分離し、SAP2 と培養 48 時間後の上清を、濃縮、透析後に、培養ヒト気管支平滑筋細胞封入ゲルにアプライした。

SAP2 反応症例の T 細胞培養上清には、平

滑筋ゲルの収縮活性が明らかに認められた。われわれは、アトピー型喘息症例の末梢血からダニアレルゲン特異的 T 細胞クローンを樹立している。これらのクローンの 1-2 割のクローンも、培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルの収縮活性を産生した。この活性は、抗ヒスタミン薬、抗ロイコトリエン薬、抗コリン薬で阻害されない特徴を有する。

2) マウス T 細胞由来の気管支平滑筋収縮活性の解析モデル確立

既報の如く Th クローンを樹立し、無処置マウスに移入し、24 hr 後に OVA または抗原エピソードの p323-339 を経鼻的にチャレンジし、40 hr 後まで Penh 値を測定した (図 1)。計 20 個のクローンを解析し、T6-2、T6-4、T6-7 の 3 個のクローンで、Penh 上昇を認めた。p323-339 の場合は、1 hr 後から、OVA の場合には 2 hr 後から、Penh 値が上昇し、40 hr 後まで持続した (図 2)。

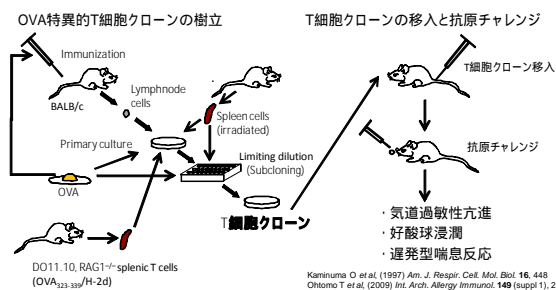


図 1 . T 細胞クローン移入喘息モデル

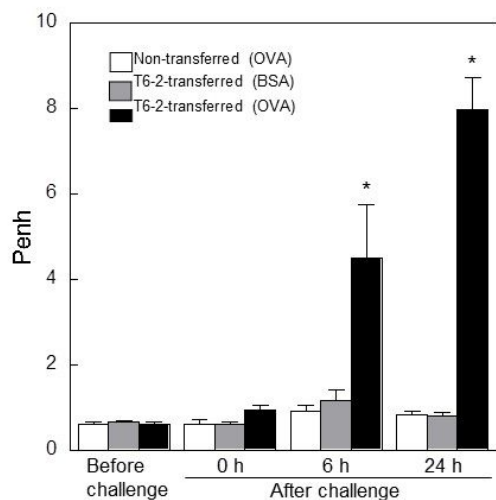


図 2 . T 細胞クローン移入喘息モデルにおける Penh の上昇

次いで、麻酔下にレスピレータを装着、拘束下にダイレクトに気道抵抗値を計測した。約 6 時間後から気道抵抗値 (R_L) の上昇を認めた (data not shown)。可逆性の気流閉塞は、喘息を特徴付ける重要な病態で

あり、従来は、IgE を介したマスト細胞の活性化によって化学伝達物質が放出されて気道抵抗が上昇する機序だけが知られていたが、今回のわれわれの研究成果から、液性免疫以外に、気流閉塞を生じさせる機構が存在し、Th 細胞がエフェクター細胞であることが、はじめて *in vivo* のレベルで明らかになった

IgE 非依存性、T 細胞依存性喘息反応の分子基盤の解明の資するため、*in vitro* アッセイ系を作成した。若年マウスの気管支組織をコラゲナーゼ処理し、マウス気管支平滑筋細胞の初代培養を行った。2 継代目でコラーゲンゲルに封入し、ゲルを平滑筋に見立てて、収縮アッセイに用いた。T 細胞クローンを固相化抗 CD3 抗体で活性化し、24 時間後に上清を回収、透析し、収縮アッセイのサンプルとした。サンプルをアプラインした後、マウス平滑筋ゲルの収縮を経時的に記録、解析した。実験の流れを図 3 に示す。

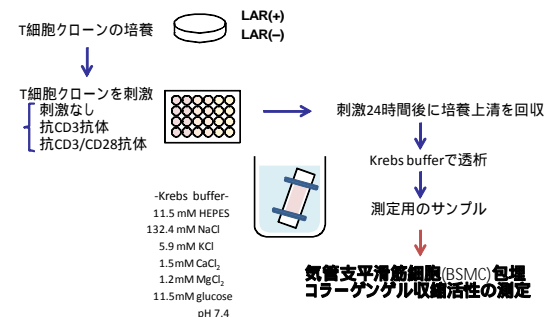


図 3 . *in vitro* における T 細胞クローン由来気管支平滑筋収縮活性の測定実験の流れ

この結果から、T 細胞が気管支平滑筋収縮活性を産生していることがはじめて明らかになった。既知のアンタゴニストの効果を検討した。H1 アンタゴニストの pyrilamine (1 μ M)、ロイコトリエンアンタゴニストの montelukast (1 μ M)、M1 アンタゴニストの atropine (1 μ) と 30 分 preincubation した後に、それぞれ histamine 1 μ M、LTD4 1 μ M、methacholine 1 μ M で収縮反応を惹起した場合には、90% 以上抑制されたが、T 細胞上清による収縮反応は抑制されなかった。

3) マグナス管牽引モルモット気管支収縮系の解析

細胞レベルの解析に留まらず、生体組織を用いたアッセイ系を立ち上げる目的に、Magnus 管に牽引したモルモット気管リング収縮アッセイ系を立ち上げた。ロイコトリエン、ヒスタミン、メサコリンといった既知の

収縮物質をアプライし、収縮反応を経時的に記録した。反応は得られたものの、サイズ、再現性が低いため、試行錯誤が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- 1) Nishimura, T., Kaminuma, O., Saeki, M., Kitamura, N., Matsuoka, K., Yoneyama, H., Mori, A., and Hiroi, T. 2016. Essential contribution of CD4+ T cells to antigen-induced nasal hyperresponsiveness in experimental allergic rhinitis. *Plos One*. 11:e0146686
DOI:10.1371/journal.pone.0146686
- 2) Hasegawa, T., Uga, H., Mori, A., and Kurata, H. 2017. Increased serum IL-17A and Th2 cytokine levels in patients with severe uncontrolled asthma. *Eur. Cytokine Netw.* In press

〔学会発表〕(計88件)

- 1) Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Ohtomo-Abe, Kamide, Y., Hayashi, H., Watai, K., Mitsui, C., Sekiya, K., Tsuburai, T., Fukutomi, Y., Taniguchi, M., Ohtomo, T., and Kaminuma, O. T cell-induced bronchoconstriction in the mice - a model for late asthmatic response. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2016, Program p. 125 (Vienna) 2016/6/11-15
- 2) Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Ohtomo-Abe, A., Nakamura, Y., Tomita, Y., Hamada, Y., Kamide, Y., Hayashi, H., Watai, K., Mitsui, C., Sekiya, K., Tsuburai, T., Fukutomi, Y., Taniguchi, M., Ohtomo, T., Kaminuma, O. T Cell-Induced bronchoconstriction in mice and human. X World Asthma, Allergy & COPD Forum. (New York) 2017/4/28-5/1

〔図書〕(計7件)

- 1) 森 晶夫: 連載アレルギー検査法(29) II. 検査の実際 *in vitro* 抗原負荷とサイトカイン、アレルギー・免疫;22(9):134-143, 2015
- 2) Mori, A., Kouyama, S., Abe, A., Ohtomo, T., and Kaminuma, O. 2016. T cell induced-bronchoconstriction *in vitro* and *in vivo*. In Allergies: Current challenges and solutions, proceedings of the 30th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (M. Maurer, and H. Behrendt eds.) Pancini Editore S.r.l., Pisa, Italy, p.169-171.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 晶夫 (MORI, Akio)

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長

研究者番号: 80251247