

## 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 5 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790783

研究課題名（和文）難治性喘息におけるヘルパーT17型免疫応答の意義に関する研究

研究課題名（英文）Role of T helper 17-mediated immune responses in the pathogenesis of refractory asthma.

## 研究代表者

中込 一之（NAKAGOME KAZUYUKI）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60401113

## 研究成果の概要（和文）：

好中球性炎症及び Th17 型免疫応答は、難治性喘息での気道炎症の特徴である。ドーパミン D1 受容体拮抗薬は Th17 分化を抑制する。本研究では、ドーパミン D1 受容体拮抗薬が、ovalbumin で誘導される好中球性気道炎症を抑制するかについて検討した。ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、好中球性気道炎症を抑制し、肺における IL-17 の産生及び Th17 細胞の肺への浸潤を抑制した。さらに肺 CD11c 陽性抗原提示細胞からの IL-23 産生を抑制した。従って、ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、重症喘息の有望な治療戦略となりえることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Neutrophilic inflammation and Th17-type immune responses are characteristics of airway inflammation in severe asthma. Dopamine D1-like receptor (D1-like-R) antagonist suppresses Th17 differentiation. In this study, we clarified that D1-like-R antagonist significantly suppressed ovalbumin (OVA)-induced neutrophilic airway inflammation. It also inhibited the production of IL-17 and infiltration of Th17 cells in the lung. Further, it suppressed the production of IL-23 by lung CD11c<sup>+</sup> antigen-presenting cells. These findings suggest the possibility that antagonizing D1-like-R serves as a promising new strategy for controlling neutrophil-dominant severe asthma.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22 年度	900,000	270,000	1,170,000
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：閉塞性肺疾患

### 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は好酸球性気道炎症、粘液分泌亢進、気道過敏性亢進を特徴とする慢性疾患であり、気道炎症の過程で特に Th2 細胞が中心的な役割を果たすと考えられてきた。しかし最近では、Th1 細胞や Th17 細胞も喘息病態形成に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。例えばマウスモデルでは、抗原特異的 Th1 細胞の移入は抗原特異的好酸球性気道炎症を悪化させる。また、重症患者の気道では Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  の発現が亢進している。一方で抗原特異的 Th17 細胞の移入は、マウスモデルにおいて、ステロイド抵抗性の気道炎症や気道過敏性亢進を誘導する。Th17 型免疫応答の中で、Th17 細胞から産生される interleukin (IL)-17 は IL-8 などの産生を介して好中球性炎症を誘導することが知られている。好中球性炎症は難治性喘息の一つの特徴とされており、IL-17 は難治性喘息の病態形成に関与する可能性が考えられる。例えば Barczyk らは、喀痰 IL-17 濃度は喘息の重症度と相関することを報告した。また Al-Ramli らは、IL-17 の気道における発現は重症喘息でのみ亢進していることを報告した。すなわち、Th1/Th17 型免疫応答の制御は難治性喘息の重要な治療戦略である可能性がある。

### 2. 研究の目的

本申請研究は、難治性喘息の病態形成における、Th1/Th17 型免疫応答の役割について、喘息患者の誘発喀痰・呼気凝縮液 健常人好酸球・好中球 マウス喘息モデル(アレルギー性気道炎症モデル・好中球性気道炎症モデル)を用いて、解析することを目的とした。

#### (1) 誘発喀痰・呼気凝縮液の解析

健常人、非難治性喘息、難治性喘息患者において、誘発喀痰・呼気凝縮液の採取を行い、それぞれにおける Th1/Th17 サイトカイン・ケモカインの発現を検討した。

#### (2) IL-17 の健常人好酸球機能に対する影響

健常人好酸球・好中球の組織浸潤・活性化に対するシステムを用いて、IL-17 の好酸球機能に対する直接的影響や好中球を介した間接的影響について検討した。

#### (3) IL-17 遺伝子導入の好酸球性気道炎症に対する影響

マウスアレルギー性気道炎症モデル(喘息モデル)を用い、IL-17 遺伝子導入の好酸球性気道炎症に対する効果を検討した。

#### (4) ドーパミン D1 受容体拮抗薬の好中球性気道炎症に対する効果

マウス好中球性気道炎症モデルを用い、ドーパミン D1 受容体拮抗薬の好中球性気道炎症に対する効果を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 誘発喀痰・呼気凝縮液の解析

難治性喘息は、ATS Workshop 2000 における refractory asthma で、定義した。喀痰は、以前に報告した方法に従って採取した。はじめに、唾液混入を最小限とするためにうがいをし、サルタノールを吸入した。その後、超音波ネブライザーを用いて 4.5%生理食塩水吸入を行い、5 分間隔で合計 30 分間、痰の喀出を行った。得られた喀痰は、1%DTT 含有 HBSS を加え、全体が均一になるまで攪拌し、HBSS 5ml で希釈後、遠心し、上清を保存した。呼気凝縮液は、EcoScreen (Jaeger, Hochberg, Germany)を用いて、ノーズクリップ着用下に 15 分の安静呼吸を行い、呼気を連続的に機器内で -20℃ に冷却し、析出した液を採取した。Th1/Th17 サイトカインまたはケモカイン濃度は、ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN)または Bio-plex assay kits (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada)を用いて測定し、各群で比較した。一部の患者では気道過敏性や呼気 NO も測定し、サイトカイン・ケモカイン濃度との関連を検討した。

#### (2) IL-17 の健常人好酸球機能に対する影響

好酸球・好中球は、以前に報告した方法に従い、健常人末梢血より分離した。はじめに、ヘパリン処理した末梢血を、1.090 g/ml Percoll を用いて比重遠心分離を行った。血漿、単核球バンド、Percoll を除去し、ペレットを蒸留水による溶血処理を行い、残存する顆粒球を好中球として用いた。好酸球は、顆粒球から、抗 CD16 抗体 beads を用いた negative selection で分離した。好酸球・好中球の分離純度は 98%以上であり、viability は 99%以上であった。

好酸球の接着は以前に報告した方法に従って、残存 eosinophil peroxidase (EPO)法を用いて検討した。Rh-VCAM-1 または rh-ICAM-1 で pre-coat した 96 well-plate を用い、はじめに 0.1% gelatin 含有 HBSS で非特異反応をブロックした。その後、IL-17 で刺激した好酸球を well に加え、37℃ 20 分 incubate した。HBSS で wash した後、-phenylenediamine (OPD) を加え、反応させ、490 nm の吸光度を測定した。細胞数既知の好酸球に対する反応と比較することで、好酸球の plate への接着を評価した。また活性酸素測定は、以前に報告した方法に従って、チトクローム C 還元法を用いて検討した。はじめに、コントロール well に superoxide dismutase (SOD; 0.2 mg/mL in HBSS/gel) を 20  $\mu$ l ずつ加え、各 well に IL-17 を入れたのち 100  $\mu$ l となるよう HBSS/gel を加えた。好酸球浮遊液とチトクローム C (12 mg/ml) を体積比 4 対 1 で混合し、これを各 well に 100  $\mu$ l ずつ加えた。550 nm の吸光度を経時的に測定し、SOD を含んだ反応と比較した。

活性酸素産生量は分子吸光度計数  $21.1 \times 10^3$  M/L-1cm-1 から、nmoles cytochrome C reduced/ $10^6$  cells · SOD control とし算出した。

(3) IL-17 遺伝子導入の好酸球性気道炎症に対する影響

Plasmid pCAGGS-IL-17 は大腸菌内で増幅させ、Qiagen Endo Free plasmid Giga kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を使用して精製した。空の pCAGGS plasmid を control として使用した。水力学に基づく plasmid DNA の遺伝子導入は以前に報告した方法に従った。すなわちマウス一匹あたり plasmid DNA (100  $\mu$ g) を 2.5 ml の乳酸リンゲル液に溶解し、全量を 5 秒以内で静脈注射した。

第 0 日及び第 11 日に BALB/c マウスを卵白アルブミン (ovalbumin; OVA)/alum 2  $\mu$ g/body または生理食塩水で全身感作し、第 18 日から第 20 日にかけて 3%OVA で吸入感作した。OVA 感作マウスの一部は第-3 日または第 17 日に水力学に基づく plasmid DNA の遺伝子導入を受けた。第 21 日に気管支肺胞洗浄及び肺病理所見を解析した。

(4) ドーパミン D1 受容体拮抗薬の好中球性気道炎症に対する効果

好中球性炎症は OVA を認識する T 細胞抗原レセプターのトランスジェニックマウスである D011.10 マウスに、OVA を吸入させることで誘導する。KLH などの他の抗原吸入では誘導されず、IL-17 遺伝子欠損マウスでは好中球性炎症は誘導されない。すなわち IL-17 に依存した OVA 特異的好中球性炎症モデルと想定することができる。また、ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、Th17 型免疫応答を抑制することが報告されている。

第-2 日及び第 0 日に D011.10 マウスを 3%OVA または PBS で吸入した。マウスの一部は、第-6 週-0 週の間、週 3 回ドーパミン D1 受容体拮抗薬 (SCH23390 (0.3 mg/kg; Sigma-Aldrich) in PBS) の経胃管投与を受けた。第 1 日に気管支肺胞洗浄及び肺病理所見を解析した。肺抽出液における IL-17 濃度を測定、また肺における IL-23 受容体陽性 Th17 細胞の免疫染色を行った。さらに抗 CD11c 抗体 beads を用いて、肺 CD11c 抗原提示細胞を positive selection し、LPS または LPS/anti-CD40 Ab で刺激し、肺 CD11c 抗原提示細胞からの IL-23 産生について検討した。肺細胞における細胞内染色 (IL-17, Foxp3, IL-23) も同時に行った。

#### 4. 研究成果

(1) 誘発喀痰・呼気凝縮液の解析

喀痰 Th17 サイトカイン・ケモカイン (IL-17A, IL-17F, IL-22, CXCL13) 濃度については、健康人、非難治性喘息、難治性喘息患者において、いずれも検出感度以下であった。一方、

喀痰 Th1 サイトカイン・ケモカイン (IFN- $\gamma$ , IP-10, Mig, I-TAC) 濃度は、難治性喘息患者で上昇傾向であった。

(2) IL-17 の健康人好酸球機能に対する影響  
IL-17 は好酸球の接着反応に対して直接影響を与えなかった。また好中球からの活性酸素産生に対しても直接影響を与えなかった。

(3) IL-17 遺伝子導入の好酸球性気道炎症に対する影響

IL-17 遺伝子導入は、マウスアレルギー炎症モデルにおいて、好中球気道炎症だけでなく好酸球性気道炎症も増悪させる傾向にあった。全身感作前の遺伝子導入だけでなく、全身感作後吸入感作前の遺伝子導入でも同様の傾向であった。今後再現性の確認と、機序の検討を行う予定である

(4) ドーパミン D1 受容体拮抗薬の好中球性気道炎症に対する効果

ドーパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 は D011.10 マウスにおける OVA 吸入で誘導される好中球性気道炎症を抑制した。他のドーパミン D1 受容体拮抗薬 (SKF83566 及び LE300) も同様に好中球性気道炎症を抑制した。SCH23390 は、肺における IL-17 濃度を抑制し、IL-23R 陽性 Th17 細胞の肺への浸潤を抑制した。細胞内染色での検討では、SCH23390 は、肺における IL-17 産生 CD4 陽性細胞 (Th17 細胞) 数を減少させたが、Foxp3 陽性 CD4 陽性調節性 T 細胞の数は変化させなかった。さらに SCH23390 は肺 CD11c 陽性抗原提示細胞からの IL-23 産生を抑制した。細胞内サイトカイン染色の検討でも SCH23390 は肺における IL-23 陽性 CD11c 陽性細胞数を減少させた

(5) 考察

今回我々は、マウス好中球性気道炎症モデルにおいて、ドーパミン D1 受容体拮抗薬が OVA 特異的好中球性気道炎症を抑制することを明らかにした。ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、肺における Th17 型免疫応答を抑制し、肺 CD11c 陽性抗原提示細胞における IL-23 発現を抑制した。好中球性気道炎症は難治性喘息の一つの特徴とされており、ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、好中球性炎症主体の難治性喘息における有効な治療となりえると考えられた。また我々は、マウスアレルギー性気道炎症モデルでの検討においても、IL-17 遺伝子導入は好中球性気道炎症だけでなく好酸球性気道炎症を悪化させる事を確認した。従って、Th17 型免疫応答または IL-17 の抑制は、難治性喘息における重要な治療戦略と考えられた。

ドーパミンは樹状細胞から産生され、Th17 細胞分化を誘導する。一方、ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、Th17 細胞分化を抑制する。In vivo では実験的自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性糖尿病などの Th17-mediated (or involved) disease モデルで治療活性がある。

今回の検討では、ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、肺 CD11c 陽性抗原提示細胞からの IL-23 産生を抑制することで、Th17 型免疫応答及び好中球性気道炎症を抑制すると考えられた。一方で、ドーパミン D1 受容体拮抗薬は Foxp3 陽性調節性 T 細胞の発現には影響を与えなかった。しかし Kipnis らは、ドーパミンは調節性 T 細胞の機能を抑制し、ドーパミン D1 受容体拮抗薬はその抑制を解除することを報告しており、調節性 T 細胞の機能亢進がドーパミン D1 受容体拮抗薬による好中球性気道炎症の制御に関与している可能性は残る。

IL-17 は、主に気道上皮細胞からの IL-8 産生を介して、好中球性炎症を誘導する。一方、好酸球にも IL-17 受容体があることは報告されているが、IL-17 の好酸球に対する直接効果についてはよく知られていない。今回の検討では、IL-17 は好酸球の接着反応に影響を与えなかった。また IL-17 は好中球からの活性酸素産生も直接増加させなかった。Cheung らは、IL-17 が好酸球からの IL-8 または GRO- $\alpha$  産生を亢進させることを報告しており、好酸球からのサイトカイン・ケモカイン産生に影響を与える可能性はある。しかし今回の検討からは、IL-17 の好酸球に対する直接的効果や好中球活性化を介した好酸球に対する間接的効果は、あるとしてもわずかと考えられた。

一方、喘息患者の誘発痰では、非難治性・難治性に関わらず、Th17 サイトカイン・ケモカインの検出はできなかった。Al-Ramli らの重症喘息における IL-17 発現亢進の報告は、痰ではなく肺組織による検討である。D011.10 マウスを用いた OVA 特異的好中球性気道炎症モデルにおいても IL-17 発現は肺では亢進するが、気管支肺胞洗浄液では亢進しない(data not shown)。従って、痰においては、Th17 サイトカインの評価が難しい可能性が考えられる。このことは、Th17 サイトカインの難治性喘息の病態形成における重要性を否定するものではないと考えられた。

#### 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 5 件)(すべて査読有)

1. Nakagome K, Nagata M. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. *Auris Nasus Larynx*. 2011;38:555-563. 査読有
2. Nakagome K, Imamura M, Okada H, Kawahata K, Inoue T, Hashimoto K, Harada H, Higashi T, Takagi R, Nakano K, Hagiwara K, Kanazawa M, Dohi M, Nagata M, Matsushita S. Dopamine D1-Like Receptor Antagonist Attenuates Th17-Mediated Immune Response and Ovalbumin Antigen-Induced Neutrophilic

Airway Inflammation. *J Immunol*.

2011;186:5975-5982. 査読有

3. Takaku Y, Nakagome K, Kobayashi T, Yamaguchi T, Nishihara F, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Changes in airway inflammation and hyperresponsiveness after inhaled corticosteroid cessation in allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152 S(1):41-46. 査読有
4. Yamaguchi T, Soma T, Takaku Y, Nakagome K, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Salbutamol modulates the balance of Th1 and Th2 cytokines by mononuclear cells from allergic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152 S(1):32-40. 査読有
5. Nakagome K, Okunishi K, Imamura M, Harada H, Matsumoto T, Tanaka R, Miyazaki J, Yamamoto K, Dohi M. IFN- $\gamma$  attenuates antigen-induced overall immune response in the airway as a Th1-type immune-regulatory cytokine. *J Immunol*. 2009;183:209-220. 査読有

[学会発表](計 29 件)

1. 中込一之、他. ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、Th17 型免疫応答を制御することで、OVA 惹起好中球性気道炎症を抑制する。第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日幕張市
2. 中込一之、他. ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、Th17 型免疫応答を制御することで、OVA 惹起好中球性気道炎症を抑制する。第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011 年 11 月 10 日東京都
3. 中込一之、他. 重症喘息における好中球性炎症。第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム 重症喘息/COPD の病態と治療 2011 年 5 月 14 日幕張市
4. 中込一之、他. アレルゲン免疫療法の現状と近未来の展望。第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会ランチョンセミナー 2011 年 5 月 14 日幕張市
5. 中込一之、他. 喘息。第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム 免疫療法 2011 年 5 月 14 日幕張市
6. 中込一之、他. 好酸球性副鼻腔炎・中耳炎に好酸球性細気管支炎・肺炎を合併したと考えられた 1 例。第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011 年 5 月 14 日幕張市
7. 中込一之、他. 炎症細胞。第 51 回日本呼吸器学会シンポジウム 難治性喘息の病態 2011 年 4 月 22 日東京都
8. 中込一之、他. 喘息の末梢気道病変は本当に重要か? 第 51 回日本呼吸器学会ランチョンセミナー. 2010 年 4 月 23 日東京都
9. 中込一之、他. ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、Th17 型免疫応答を制御することで、OVA

惹起好中球性気道炎症を抑制する。第 51 回日本呼吸器学会 2010 年 4 月 22 日東京都

10. 中込一之、他．IL-22 は、抗原特異的免疫応答及びアレルギー性気道炎症を、IL-10 を介した機序で抑制する。第 51 回日本呼吸器学会 2010 年 4 月 22 日東京都

11. 中込一之、他．急性好酸球性肺炎の気管支肺胞洗浄液は、好酸球の血管内皮細胞間隙遊走反応を誘導する。第 51 回日本呼吸器学会 2010 年 4 月 22 日東京都

12. Nakagome K, et al. Dopamine D1-like Receptor Antagonist Attenuates TH17-mediated Immune Response and Ovalbumin-antigen Induced Neutrophilic Airway Inflammation. American Academy of Allergy Asthma & Immunology 2011 Annual Meeting. 19th Mar 2011, San Francisco, USA

13. 中込一之、他．気管支喘息モデルにおける、IL-22 遺伝子導入による好酸球性気道炎症の抑制効果。第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会。2010 年 11 月 26 日、東京都。

14. 中込一之、他．OVA 惹起好中球性気道炎症モデルにおける、ドーパミン D1 受容体拮抗薬の抑制効果。第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会。2010 年 11 月 25 日東京都。

15. 中込一之、他．急性好酸球性肺炎の気管支肺胞洗浄液におけるサイトカイン・ケモカイン濃度の解析。第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会。2010 年 11 月 25 日東京都。

16. 高久洋太郎、他．成人重症喘息患者における好中球性気道炎症に対する喘息教育効果の検討。第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会。2010 年 11 月 25 日東京都。

17. 高久洋太郎、他．気管支喘息患者における吸入ステロイド中止の好中球性炎症関連分子への影響。第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会。2010 年 11 月 25 日東京都。

18. 中込一之．IL-10 及び IFN- $\gamma$  による呼吸器疾患の制御機構の解明。学会奨励賞受賞講演。第 50 回日本呼吸器学会学術講演会、2010 年 4 月 25 日京都。

19. 中込一之、他．気管支喘息モデルにおける、IFN- $\gamma$  遺伝子導入による好酸球性気道炎症の抑制機序について。第 50 回日本呼吸器学会 2010 年 4 月 24 日京都

20. 高久洋太郎、他．ダニ・アレルギー患者由来単核球における好中球性炎症関連分子の検討。第 50 回日本呼吸器学会 2010 年 4 月 23 日京都

21. 中込一之、他．急性好酸球性肺炎の気管支肺胞洗浄(BAL)液による病態解析。第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 30 日秋田市

22. 中込一之、他．気管支喘息モデルにおける、IFN- $\gamma$  遺伝子導入による好酸球性気道炎症の抑制機序について。第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 30 日秋

田市

23. 高久洋太郎、他．気管支喘息患者における呼気凝縮液中エイコサノイドの検討。第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 30 日秋田市

24. 高久洋太郎、他．ダニ・アレルギー患者由来単核球における好中球性炎症関連分子の検討。第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 29 日秋田市

25. 中込一之、他．新しい喘息治療のアプローチ。第 49 回日本呼吸器学会学術講演会教育イブニングシンポジウム「喘息治療に残された課題は？」。2009 年 6 月 13 日東京都

26. 中込一之、他．抗原全身感作後のマウス脾細胞の移入による気道過敏性亢進は、IL-10 によって抑制される。第 49 回日本呼吸器学会学術講演会。2009 年 6 月 13 日東京都

27. 中込一之、他．実験的肺線維症モデルにおける、IL-10 の治療効果及びその機序について。第 49 回日本呼吸器学会学術講演会。2009 年 6 月 13 日東京都

28. 中込一之、他．気管支喘息モデルにおける、IFN- $\gamma$  遺伝子導入による好酸球性気道炎症の抑制効果。第 49 回日本呼吸器学会学術講演会。2009 年 6 月 13 日東京都

29. 高久洋太郎、他．気管支喘息患者における呼気凝縮液中エイコサノイドの検討。第 50 回日本呼吸器学会学術講演会。2009 年 6 月 12 日東京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中込 一之 (NAKAGOME KAZUYUKI)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60401113