

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893222

研究課題名(和文)喘息の性特異的な免疫応答における樹状細胞の役割と病態の解析

研究課題名(英文) Involvement of dendritic cells in the enhanced asthmatic immune responses in females

研究代表者

宮坂 智充 (MIYASAKA, TOMOMITSU)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50709912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：成人喘息の有病率と重症度は男性に比べて女性において高い。本研究では、女性において増悪する喘息免疫応答における樹状細胞の役割について、卵白アルブミン(OVA)による気管支喘息マウスモデルを用いて検討した。雄マウスと比較して雌マウスにおいて喘息病態の有意な悪化を認めた。OVA吸入後の樹状細胞の動態に関する検討では、樹状細胞の誘導と活性化に関わるケモカインやサイトカイン産生が雌マウスの肺において増加していた。これらの結果と一致して、雌マウスの肺における活性化樹状細胞数の増加が認められた。これらの結果から、女性における喘息病態悪化において樹状細胞が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gender-specific mortality rate in asthma is still female-preponderant. In the present study, we examined the role of dendritic cells (DCs) in the enhanced asthmatic immune responses in females using a mouse model. In WT mice, the allergic airway inflammation was significantly aggravated in females than in males. The expression levels of Ccl19, Ccl20, Il1b and Csf2 mRNA in the lung were significantly higher in female mice than in male mice. In line with these findings, the activated DC counts in the lung at 16 h after OVA inhalation were significantly greater in female mice than in male mice. These results suggest that DCs may contribute to the female predominance of Th2 immune responses in allergic asthma.

研究分野：アレルギー内科学

キーワード：気管支喘息 樹状細胞 性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息は、吸入した抗原により誘発される気道の炎症性疾患であり、咳、喘鳴、呼吸困難、気道狭窄などを特徴とする。これまで、発作治療薬や長期管理薬を用いた薬物療法が行われてきたものの、喘息死を含めた重症化例が報告されている。

(2) 性は喘息の増悪、ならびに喘息による死亡において、普遍的かつ重要な危険因子である。成人喘息における罹患率や重症度は、男性より女性において高いことが報告されており、救急外来受診後の喘息発作再発率も女性において高い。

(3) これまでに、喘息病態における性特異的な免疫応答の存在を示唆する研究結果が報告されている。喘息患者より採取した末梢血単核球を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を用いて刺激した実験では IL-13 産生細胞数が男性に比べ女性において増加していた。喘息モデルマウスを用いた我々の先行研究においても、気管支肺胞洗浄液中の IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカイン産生量は雄マウスより雌マウスにおいて増加していた。加えて、喘息発症後の精神的ストレスの受容とそれに引き続く病態の悪化にも性の関与が認められ、雄マウスよりも雌マウスにおいて重症化しやすい。

(4) 樹状細胞は、CD4 陽性 naive T 細胞の Th2 分化に関与し、喘息の病態形成において重要な役割を果たしている。肺における主要なサブセットである CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞と CD103<sup>+</sup> 樹状細胞は、GM-CSF、FLT3L などのサイトカインにより前駆細胞からの分化・増殖が制御されている。抗原の吸入に伴って、肺における樹状細胞数の増加および活性化が認められ、OX40L の発現は所属リンパ節における Th2 細胞の分化に、CCL17 の産生は肺における Th2 細胞の誘導にそれぞれ関与している。

(5) 以上の学術的背景から、女性において増悪する喘息病態の形成には、性と関連した樹状細胞のフェノタイプの変化が関与している可能性が推測される。

## 2. 研究の目的

Th2 型免疫応答の司令塔として中心的な役割を担う樹状細胞の性特異的なフェノタイプの存在を明らかにし、女性において悪化する喘息病態への関与を解明することを目的とする。このような性特異的な免疫応答の仕組みが解明されることにより、喘息病態の性差を形成する免疫応答が解明されるとともに女性特有の病状に即した治療や予防法の確立を模索できる。

## 3. 研究の方法

(1) 研究支援者である東北薬科大学薬学部病態生理学教室の大野らとともに作成した卵白アルブミン (OVA) を抗原とする喘息モデルマウスを用いた。C57BL/6 マウスに OVA/水酸化アルミニウム混合液を 2 回腹腔内投与することにより感作し、その後 OVA を 2 回吸入させて喘息モデルマウスとした。

(2) OVA 吸入後の炎症細胞の浸潤、肺における Th2 サイトカイン産生、気道上皮における胚細胞過形成における性差を比較検討する。

(3) OVA 吸入後の肺内白血球数の経時的変化とともに、樹状細胞数の経時的変化を解析する。その際に、CD11c、MHC-II、CD11b、CD103 の発現をもとに樹状細胞のサブセットを解析する。活性化マーカーの発現、Th1/Th2 関連分子の発現における性差を比較検討する。また、それらのフェノタイプの性差に関与するサイトカイン、ケモカインの発現の性差を肺において検討する。

(4) 樹状細胞の免疫応答性における性差の解析として、Th2 型免疫応答性の性差を比較解析する。雄マウスと雌マウスより採取した骨髄細胞から作製した骨髄由来樹状細胞を用いて、*in vitro* において OVA に対する免疫応答の性差を解析する。

(5) OVA ペプチドに対する特異的 TCR を発現したトランスジェニックマウスを用いて、樹状細胞の T 細胞応答誘導能における性差を比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) OVA 吸入 5 日後の気管支肺胞洗浄液を採取したところ、総細胞数、好酸球数、リンパ球数はいずれも雄マウスと比較して雌マウスにおいて有意に増加していた。肺内 Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) 産生量は雄マウスと比較して雌マウスにおいて有意に増加していた。さらに、顕微鏡下で気道上皮細胞に占める粘液産生細胞数の割合を測定したところ、雄マウスと比較して雌マウスにおいて有意に増加していた。これらの結果から、雄マウスと比較して雌マウスにおいて喘息に関連した兆候の悪化が確認された。本研究では、これらの喘息病態の性差における樹状細胞の関与を解析することとした。

(2) C57BL/6 マウスを用いた喘息モデルマウスで観察された喘息病態の性差に関与する T 細胞を明らかにする目的で、CD4 または CD8 欠損 (KO) マウスを用いて喘息病態の性差を検討した。CD4KO マウスでは、気

道腔内への炎症性細胞の浸潤はほとんど認められず、アレルギー性炎症は減弱し、病態の性差は認められなかった。一方、CD8KO マウスでは C57BL/6 マウスと比較して、アレルギー性炎症が増悪する傾向を認め、喘息病態の性差は消失していた。CD8<sup>+</sup>T 細胞のフェノタイプの性差における検討では、CD4<sup>+</sup>T 細胞からの IL-4 産生に対する抑制能、気道炎症に対する抑制能において性差が認められ、いずれも、雌マウスの気管支リンパ節より採取された CD8<sup>+</sup>T 細胞よりも雄マウスより採取された CD8<sup>+</sup>T 細胞において亢進していた。さらに、雄マウスの気管支リンパ節では雌マウスよりも CD8<sup>+</sup>T 細胞の Tc1 型免疫応答性 (IFN- $\gamma$  産生、T-bet 発現) が亢進しており、CD8<sup>+</sup>T 細胞の Tc1/Tc2 分化偏向段階における雌雄差が喘息病態の性差を形成する 1 つの要因である可能性が示唆された。

(3) OVA 吸入後の肺における白血球の集積を経時的に観察した。雌マウスでは OVA 吸入後よりわずかに増加し、16~20 時間をピークとして増加が認められ、24 時間後には減少する傾向が明らかとなった。一方、雄マウスでは雌マウスと同様に 20 時間後に肺内白血球数の増加が認められるものの 16 時間後では、OVA 吸入直後と同程度の白血球数の集積しか認められなかった。本研究の目的である肺内樹状細胞 (CD11c<sup>high</sup>MHC-II<sup>high</sup>SSC<sup>low</sup> 細胞) も肺内白血球と同様の経時的変化を認めた。樹状細胞をさらに CD11b 陽性細胞と CD103 陽性細胞に分けて解析したところ、CD103 陽性樹状細胞は OVA 吸入後にわずかな細胞数の増加が認められ、雄よりも雌において肺内の樹状細胞数は増加していた。一方 CD11b 陽性樹状細胞は、雌マウスにおいて、OVA 吸入後に増加が認められたものの、雄マウスでは OVA 吸入直後と同程度の細胞数であった。これらの結果から、雌マウスにおける樹状細胞数の増加は喘息免疫応答の亢進に関与している可能性が示唆された。

(4) 肺における活性化樹状細胞数の性差を比較検討した実験では、CD11b<sup>+</sup>樹状細胞と CD103<sup>+</sup>樹状細胞ともに CD86 を発現した樹状細胞数が雄マウスと比較して雌マウスにおいて有意に増加していた。

(5) 樹状細胞の誘導に関与する可能性があるケモカイン発現量の性差を解析したところ、OVA 吸入後の雌マウスの肺において CCL19、CCL20 の発現が増加していた。樹状細胞の機能的変化に関与する可能性があるサイトカイン産生量の性差を解析したところ、TSLP 産生量には性差が認められなかった一方で、IL-1 $\beta$ 、GM-CSF の mRNA 発現量は雌マウスにおいて有意に増加していた。これらのサイトカインならびにケモカインの発現量の性差は、雌マウスの肺における活性化樹状細胞数の増加という事実を支持す

る結果であった。さらに、肺における CCL17 の発現量も雌マウスにおいて増加しており、樹状細胞の機能的性差の存在が示唆された。

(6) OT-I マウスの脾臓より採取した CD8<sup>+</sup>T 細胞と、喘息モデルマウスの気管支リンパ節より採取した樹状細胞を共培養した実験では、雄マウスより採取した樹状細胞は、CD8<sup>+</sup>T 細胞の IFN- $\gamma$  産生 T 細胞への分化を促進した。

(7) 雄マウスと雌のマウスの骨髓細胞より、GM-CSF を用いて骨髓由来樹状細胞を作成し、OVA 抗原とともに培養した後に上清中の TARC 産生量を比較したところ、性差は認められなかった。この実験結果は、さらに詳細な検討の追加を要するところであるが、性と関連した環境因子の存在が樹状細胞の機能的性差の原因となっている可能性、などを示唆する結果であると考えており、さらに解析を加える必要があるものと考えられた。

## 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 1 件)

Okuyama K, Dobashi K, Miyasaka T, Yamazaki N, Kikuchi T, Sora I, Takayanagi M, Kita H, Ohno I. The involvement of glucocorticoids in psychological stress-induced exacerbations of experimental allergic asthma, *Int Arch Allergy Immunol*, 2014; 163(4): 297-306. doi: 10.1159/000360577. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

MIYASAKA Tomomitsu et al. Possible roles for CD8<sup>+</sup> T cells in female-dominant IL-4 production in allergic asthma, 第 43 回日本免疫学会総会, 2014 年 12 月 10 日~12 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/byotai/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮坂 智充 (MIYASAKA, TOMOMITSU)  
東北薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：50709912

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：