

## 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 6月21日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2011

課題番号：22790773

研究課題名(和文) 遅発性喘息反応を惹起する T細胞の特性解析

研究課題名(英文) Characterization of murine T cells that confer late asthmatic response

研究代表者

安部 暁美 ( ABE AKEMI )

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 ・ 研究員

研究者番号：20570667

研究成果の概要 (和文): 抗 CD3 抗体及び抗 CD3/CD28 抗体で刺激したマウス T細胞クローンの培養上清を気管支平滑筋細胞包埋コラーゲングルに作用させたところ、マウスに移入・抗原チャレンジの施行により遅発型喘息反応を惹起する T細胞クローンの培養上清を作用させた場合にのみゲルの収縮が見られた。T細胞は活性化により、気管支平滑筋細胞を収縮させる物質を産出し、遅発型喘息反応の発症において大きな役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文): Culture supernatants of anti-CD3 antibody- or anti-CD3/CD28 antibodies-activated but not resting murine Th clones that conferred a late asthmatic response, induced the contraction of human bronchial smooth muscle cell-containing collagen gels. These results indicate that activated Th cells produce a contractile activity for bronchial smooth muscle *in vitro* and have an important role to confer a late asthmatic response.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：気管支平滑筋細胞・遅発型喘息反応・閉塞性肺疾患・T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー型喘息においては、抗原吸入により 2 種類の喘息反応、即時型喘息反応 (IAR) と遅発型喘息反応 (LAR) が引き起こされることが知られている。IAR は抗原吸入数分後に引き起こされ、抗原特異的 IgE のクロスリンクによるマスト細胞の脱粒化が引き金となることが明らかになっている。LAR は抗原吸入数時間後に起こり、IgE やロイコトリエンの関与も指摘されているが、詳細なメカニズ

ムについてはまだ明らかになっていない。

重症喘息の多くを占める非アトピー型喘息では抗原特異的 IgE が存在しないため、LAR の発症は T細胞の活性化によるものとも考えられている。喘息患者から採取した末梢血 T細胞の抗原特異的増殖反応は、LAR の程度と相関があること、また T細胞エクトペプチドの移入により、IgE やマスト細胞、浸潤炎症細胞の存在なしに LAR が惹起されることが明らかになっている。LAR の症状の 1 つで

ある気道閉塞は主に気管支平滑筋細胞の収縮によるものと考えられているが、T細胞が気管支平滑筋細胞の収縮を引き起こすことができるかどうかについては明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

我々の研究室ではこれまでに、卵白アルブミン(OVA)特異的ヘルパーT細胞クローンを樹立し、T細胞クローン移入マウス喘息モデルを構築することで、喘息におけるT細胞の役割について研究してきた。移入したT細胞クローンをOVAチャレンジにより活性化することで、肺組織において種々のサイトカインが産生され、続いて好酸球を含む炎症細胞の浸潤が起こり、気道閉塞や気道過敏性の亢進も惹起されることを報告している。T細胞クローン移入マウス喘息モデルの利点として、惹起される喘息反応は全てT細胞クローンの活性化を起点とするものであり、液性免疫の影響を排除できる点が挙げられる。これまでに当研究室で樹立した20種のT細胞クローンには、マウスに移入しOVAチャレンジすることによりLARを惹起させるもの、気道過敏性を亢進させるものがある。これらのT細胞クローンの特性を明らかにすることは、T細胞の活性化を起点とした喘息症状の発症メカニズムの理解につながる。

そこで本研究では、LARを惹起するT細胞クローン(T6-2、T6-7)と、LARを惹起しないT細胞クローン(T6-10)を用いて、LARの発症メカニズムの解明と新規治療ターゲットの同定を目指し、DNAマイクロアレイにより活性化T細胞クローンの遺伝子発現解析、活性化T細胞クローン培養上清のサイトカイン測定、さらに、活性化T細胞クローン培養上清中に気管支平滑筋細胞収縮因子があるかどうか、気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルを用いて収縮アッセイを行った。

## 3. 研究の方法

T細胞クローン(T6-2、T6-7、T6-10)を抗CD3抗体、抗CD3/CD28抗体で刺激し、刺激開始6時間後に総RNAを抽出し、DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。

刺激開始24時間後に培養上清を採取しKrebs bufferに透析した。サンドイッチELISA法により透析済サンプルのサイトカイン濃度(IL-4、IL-5、IL-13、IFN- )の測定を行った。また、透析済サンプルを用いて気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲル収縮アッセイを行った。メーカーより購入したヒト気管支平滑筋細胞をコンフルエントまで培養し、24穴プレートに気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルを作成した。透析済サンプル(刺激なし、抗CD3抗体刺激、抗CD3/CD28抗体刺激)をゲルに作用させ、経時的にゲルの

撮影を行い、画像解析ソフトを用いてゲルの上底面と下底面の面積を求めた。ゲルの下底面の面積を100%とし、そこから上底面の面積(下底面の面積に対する割合)を差し引いて、ゲルの収縮率を算出した。透析済サンプルを作用させた際のゲル収縮率から、Krebs bufferのみを作用させた際のゲル収縮率を差し引いた値を実収縮率とし、T細胞クローン培養上清のゲル収縮活性を評価した。

## 4. 研究成果

抗CD3抗体、及び抗CD3/CD28抗体で刺激したT細胞クローン(T6-2、T6-7、T6-10)の遺伝子発現解析を行ったところ、発現に変動が見られる遺伝子が多く、LARの発症に直接関与すると考えられる遺伝子候補を決定するには至らなかった。

抗CD3抗体、及び抗CD3/CD28抗体で刺激したT6-2、T6-7の培養上清を気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルに作用させたところ、ゲルの実収縮率は時間依存的に増加した(図1)。

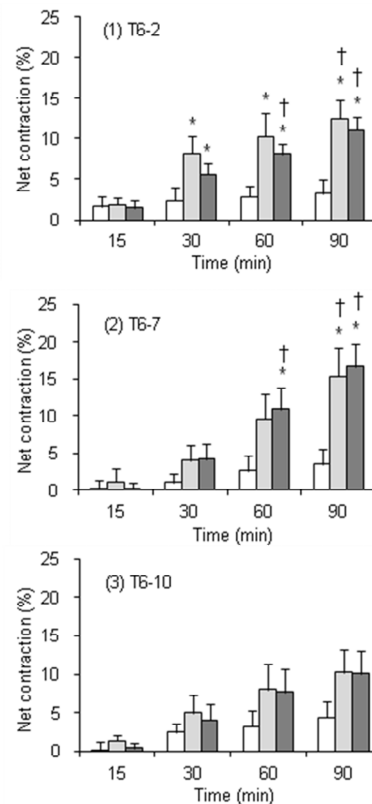


図1 気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルの収縮活性 (1)T6-2 (2)T6-7 (3)T6-10  
白: 刺激なし、薄灰: 抗CD3抗体刺激、濃灰: 抗CD3/CD28抗体刺激  
\*p<0.05 測定開始15分後の実収縮率と比較  
†p<0.05 同測定時間の刺激なしサンプルの実収縮率と比較

刺激なしの T6-2、T6-7 の培養上清を用いた場合には、ゲルは収縮しなかった。抗 CD3/CD28 抗体で刺激した T6-2、T6-7 の培養上清を作用させた場合には測定開始 60 分後に、抗 CD3 抗体で刺激した T6-2、T6-7 の培養上清を作用させた場合には測定開始 90 分後に、ゲルの実収縮率は刺激なしの実収縮率より高くなった。一方で T6-10 の培養上清を作用させた場合には、抗 CD3 抗体、及び抗 CD3/CD28 抗体で刺激したサンプルにおいてもゲルは収縮しなかった。以上の結果から、抗 CD3 抗体、及び抗 CD3/CD28 抗体で刺激した T6-2、T6-7 の培養上清は、気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルを収縮させたことから、T 細胞は他の炎症細胞の介在なしに、気管支平滑筋細胞を収縮させる能力を持つことが明らかになった。T6-2、T6-7 は、マウスに移入し OVA をチャレンジすることにより LAR を惹起させることが出来る T 細胞クローンである。一方で T6-10 は LAR を惹起しない T 細胞クローンであるため、T 細胞クローンの気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲル収縮活性は、LAR の惹起と関連があることも明らかになった。

抗 CD3 抗体、及び抗 CD3/CD28 抗体で刺激した T6-2、T6-7、T6-10 のサイトカイン産生を調べるため、サンドイッチ ELISA 法を用いて IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  の濃度を測定した(表 1)。

表 1 T 細胞クローンのサイトカイン産生

	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
<b>T6-2</b>				
N	<16	<31	<50	807
3	<16	<31	>2,500	>2,500
3/28	<16	<31	>2,500	>2,500
<b>T6-7</b>				
N	<16	<31	<39	550
3	<16	<31	<39	>2,500
3/28	<16	<31	<39	>2,500
<b>T6-10</b>				
N	29	109	95	<31
3	>1,000	>2,000	>2,500	<31
3/28	>1,000	>2,000	>2,500	<31

N: 刺激なし、3: 抗 CD3 抗体刺激、3/28: 抗 CD3/CD28 抗体刺激

抗 CD3 抗体、及び抗 CD3/CD28 抗体で刺激した場合、T6-2、T6-7 の培養上清では Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生が見られた。一方で T6-10 では、刺激下においては Th2 型サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 の産生が見られた。LAR を惹起する T 細胞クロー

ンである T6-2、T6-7 は Th1 型サイトカインを産生する T 細胞であることがわかったが、Th1 型サイトカインを産生する T 細胞クローン全てが LAR を惹起させることが出来るわけではない。本研究には用いなかったが、T5-3 という T 細胞クローンは Th1 型のサイトカイン産生パターンを示すが LAR を惹起させることは出来ない。そのため、LAR を惹起させることの出来る T 細胞クローンのフェノタイプはサイトカイン産生パターン以外のものにあると考えられる。

本研究により、T 細胞は活性化により気管支平滑筋細胞を収縮させる物質を産出し、LAR の発症に対して大きな役割を担い得ることを明らかにした。刺激時間によるゲル収縮活性の変化を測定し、さらに培養上清に含まれる物質を二次元電気泳動や質量分析などで解析することにより、気管支平滑筋細胞収縮活性をもつ物質の同定ができるものと考えられる。この T 細胞由来の気管支平滑筋細胞収縮物質の同定は、重症喘息の新規治療ターゲットの候補として期待されるものと考えられる。

## 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 2 件)

Abe A, Koyama S, Ohtomo T, Kitamura N, Kaminuma O, Mori A.

Murine T cell-derived contractile activity for bronchial smooth muscle cells.

Int Arch Allergy Immunol 査読有  
156(suppl 1), 7-10, 2012.

DOI: 10.1159/000337743

Abe A, Ohtomo T, Koyama S, Kitamura N, Kaminuma O, Mori A.

Comparative analysis of steroid sensitivity of Th cells in vitro and in vivo.

Int Arch Allergy Immunol 査読有  
155(suppl 1), 110-116, 2011.

DOI: 10.1159/000327494

### [学会発表](計 7 件)

Mori A, Abe A, Koyama S, Kitamura N, Yamaguchi M, Mitsui C, Oshikata C, Tanimoto H, Fukutomi Y, Sekiya K, Taniguchi M, Maeda Y, Ohtomo M, Hasegawa M, Akiyama K, Ohtomo T, Kaminuma O.

T cell clone transfer model for steroid resistant asthma.

European Respiratory Society Amsterdam 2011, 2011.9.25 (Amsterdam, the Netherlands)

安部 暁美、神山 智、大友 隆之、北村 紀子、神沼 修、森 晶夫

ヒト気管支平滑筋細胞ゲルを用いた気管支収縮因子の探索

アレルギー・好酸球研究会 2011

2011年6月18日 大手町サンケイプラザ (東京)

Mori A, Abe A, Koyama S, Kitamura N, Yamaguchi M, Tanimoto H, Sekiya K, Oshikata C, Mitsui C, Taniguchi M, Ohtomo M, Maeda Y, Hasegawa M, Akiyama K, Ohtomo T, Kaminuma O.

Comparative analysis of steroid sensitivity of Th cells in vitro and in vivo.

2011 European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2011.6.14 (Istanbul, Turkey)

Mori A, Kitamura N, Abe A, Ohtomo T, Kaminuma O.

Role of T cells in late phase asthmatic response.

The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology, 2010.11.7 (Singapore)

安部 暁美、大友 隆之、神山 智、北村 紀子、神沼 修、森 晶夫

T細胞クローン移入喘息モデルによるステロイド感受性解析

アレルギー・好酸球研究会 2010

2010年6月19日 大手町サンケイプラザ (東京)

Mori A, Kitamura N, Ohtomo T, Abe A, Kaminuma O.

T cell dependent bronchoconstriction in vivo and in vitro.

29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2010.6.8 (London, UK)

Mori A, Kitamura N, Ohtomo T, Abe A, Kaminuma O.

Analysis of T cell-dependent bronchoconstriction using human cultured bronchial smooth muscle cells.

28th Symposium of the Collegium International Allergologicum, 2010.4.25 (Ischia, Italy)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安部 暁美 (ABE AKEMI)

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・研究員

研究者番号：20570667