

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591120

研究課題名(和文)肥満による喘息悪化機序の解明—CD8陽性T細胞との関係

研究課題名(英文)The role of visceral adipose tissue CD8+ T cells in obese murine asthma model

研究代表者

大西 広志(OHNISHI, Hiroshi)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：90553876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は喘息悪化と関係し、脂肪炎症にはCD8陽性T細胞が関与していると報告されている。内臓脂肪中のCD8陽性T細胞が、喘息を惹起または増強するかをマウス喘息モデルで検討した。肥満マウスの喘息モデルでは、非肥満マウスと比べ喘息病態が増強していた。抗原感作肥満マウスの内臓脂肪単核球を、未感作または喘息を一旦発症した非肥満マウスの腹腔に受身移入し抗原曝露したが、喘息病態の惹起または増強は出来なかった。未感作肥満マウスの内臓脂肪CD8陽性T細胞を、非肥満マウスの腹腔に受身移入し喘息モデルを作成すると、喘息病態の発生が抑制された。内臓脂肪CD8陽性T細胞は、喘息にむしろ抑制的に作用する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Obesity is associated with poorer control of asthma. CD8+ T cells contribute to adipose tissue inflammation. Effector CD8+ T cells are associated with asthma pathogenesis. We investigated whether visceral adipose tissue CD8+ T cells can enhance asthma phenotype in murine asthma model. Obese murine asthma model showed enhanced asthma phenotype compared with non-obese asthma model. Antigen inhalational challenge after adoptive transfer of mononuclear cells from visceral adipose tissue of allergen-sensitized obese mice failed to develop or enhance asthma phenotype in non-sensitized or secondary allergen-challenged non-obese mice. Adoptive transfer of visceral adipose tissue CD8+ T cells from obese mice suppressed asthma phenotype in allergen-sensitized and -challenged non-obese mice. These data suggested that visceral adipose tissue CD8+ T cells from obese mice might suppress the development of asthma phenotype.

研究分野：医学、呼吸器内科学

キーワード：喘息 CD8陽性T細胞 肥満 好酸球性気道炎症 気道過敏性

1. 研究開始当初の背景

喘息の病態には、好酸球、CD4 陽性 Th2 細胞、肥満細胞などが中心的役割を担っているが、ステロイド治療により、好酸球や CD4 陽性 T 細胞は容易にアポトーシスに陥る。一方で、CD8 陽性 T 細胞や好中球は、ステロイド治療に抵抗性で、CD8 陽性 T 細胞炎症はステロイドによりむしろ増強する可能性を報告した()。脾臓やリンパ節由来の CD8 陽性 T 細胞を感作してエフェクターメモリ化して受身移入すると、アレルギー性気道炎症および気道過敏性亢進が増強することを、マウス喘息モデルで明らかにした()。IL-13 陽性ロイコトリエン B4 受容体陽性 CD8 陽性 T 細胞が、喘息患者の気道中に存在し、気流閉塞と関係していることを報告した()。この様に、喘息と CD8 陽性 T 細胞は密接に関係している。

一方で、肥満は喘息の発症を増加させ、喘息コントロールを悪化させることが、疫学調査より指摘されているが、その機序は不明である。肥満の脂肪組織には多数の CD8 陽性 T 細胞が浸潤しており、肥満の脂肪炎症には、CD8 陽性 T 細胞が必須であることが明らかにされた()。実際に、肥満マウスの内臓脂肪を酵素処理して、脂肪組織中のリンパ球を単離すると、肥満マウスでは内臓脂肪中の CD8 陽性 T 細胞数が増加していることを確認した。

2. 研究の目的

マウス喘息モデルを用いて、内臓脂肪組織の CD8 陽性 T 細胞が、アレルギー性気道炎症および気道過敏性亢進を惹起または増強し得るか否かを検討し、肥満の内臓脂肪中の CD8 陽性 T 細胞と喘息の病態の悪化との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(実験 1) 5-6 週齢メスの C57BL/6 マウスに、高脂肪食 (58%脂肪) または低脂肪食 (11%脂肪) を 12 週間与え、肥満マウスと非肥満マウスを作成した。卵白アルブミン (OVA) と Alum を Day0、Day14 に腹腔感作し、Day28 ~ 30 に 1%OVA をネブライザーで吸入曝露し喘息モデルを作成した。Day32 に全身麻酔下に気管内挿管を行い、メサコリン吸入に対する気道抵抗を測定 (BUXCO 社) した。安楽死の後、生理食塩水 1 ml にて気管支肺胞洗浄を行い、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の分画を測定した。

(実験 2) OVA で腹腔感作した肥満マウスから内臓脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理後に単核球を分離し、未感作非肥満マウスの腹腔内に受身移入して、OVA 吸入曝露し、気道炎症と気道過敏性を評価した。

(実験 3) 非肥満マウスに OVA を Day0、Day7 に腹腔感作し、0.2%OVA を吸入曝露して、軽度の好酸球性気道炎症を一旦惹起する。気道炎症の消退を待った後に、OVA で腹腔感作した肥満マウスの内臓脂肪の単核球を受身移

入して、1%OVA を吸入曝露して、気道炎症と気道過敏性を評価した。

(実験 4) 未感作の肥満マウスの内臓脂肪から CD8 陽性 T 細胞をネガティブセレクションにより精製し、未感作非肥満マウスの腹腔内に受身移入して、OVA の腹腔感作と吸入曝露を行い、喘息表現型を調べた。

4. 研究成果

まず、肥満マウスと非肥満マウスの喘息モデルを作成し、喘息の表現型を比較した(実験 1)。肥満マウスの喘息モデルでは、非肥満マウスの喘息モデルよりも、気管支肺胞洗浄液中に好中球、リンパ球、特に好酸球を中心とするアレルギー性気道炎症が増強しており(図 1)、メサコリン刺激に対する気道過敏性も亢進している(図 2)ことが確認された。

図1. 肥満マウスと非肥満マウスにおけるアレルギー性気道炎症

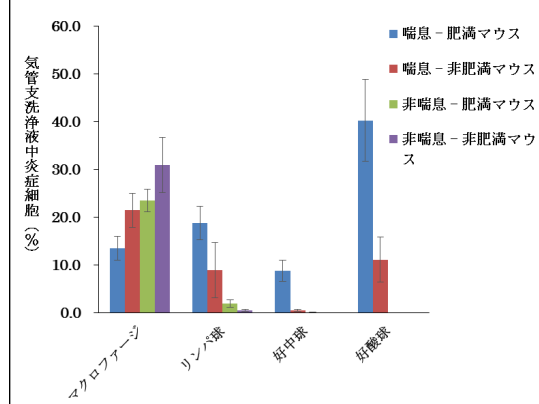
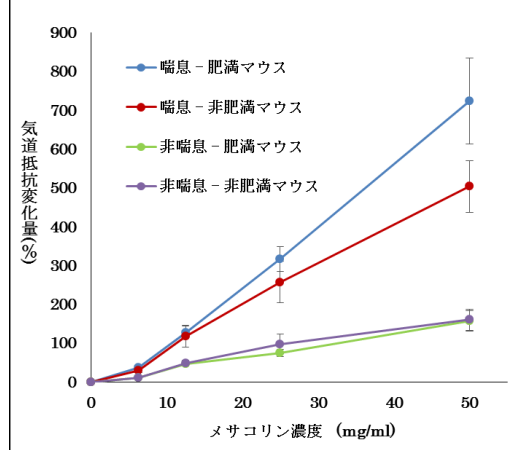
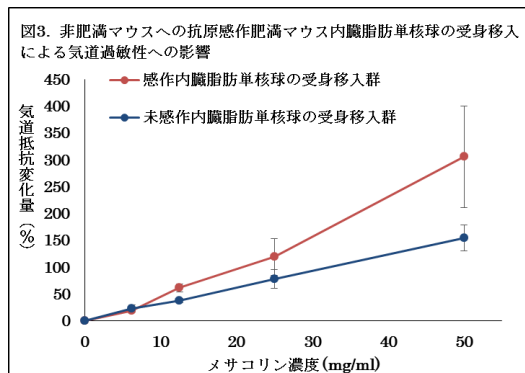


図2. 肥満マウスと非肥満マウスにおける気道過敏性

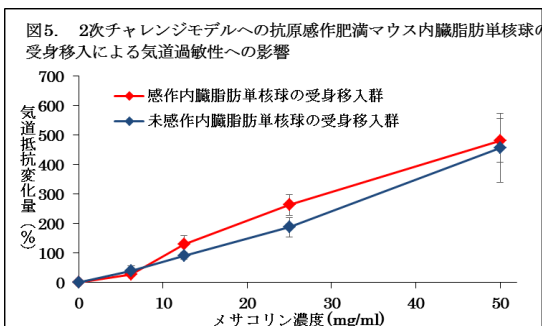
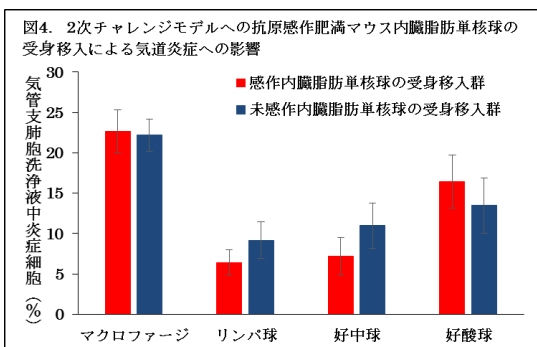


実験 1 の結果より、肥満マウスの内臓脂肪組織に含まれる単核球に、喘息を惹起する作用があると仮説を立てて、OVA で腹腔感作した肥満マウスから内臓脂肪を取り出し、内臓脂肪組織内の単核球を精製し、未感作の非肥満マウスの腹腔内に受け身移入して、OVA を吸入曝露させる受け身移入喘息モデルを作成して、喘息病態が惹起できるか否かを調べた(実験 2)。未感作の肥満マウスの内臓脂

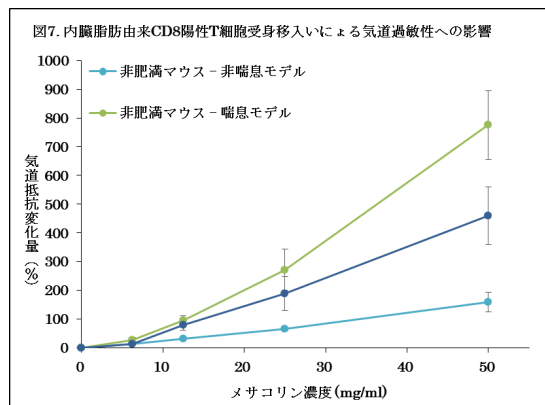
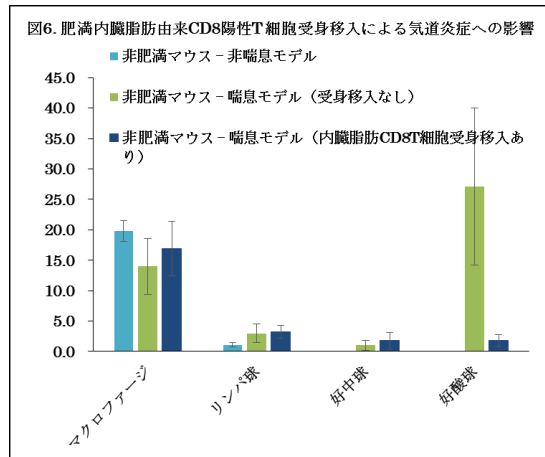
肪組織内の単核球を受身移入した場合に比較して、気道過敏性が亢進する傾向にはあった(図3)が、気管支肺胞洗浄液中にリンパ球や好酸球の増加は見られずアレルギー性気道炎症を惹起できなかった。



喘息表現型の発現には、抗原感作による記憶リンパ球の誘導(感作相)と抗原再暴露によるエフェクターリンパ球への分化による炎症反応の惹起(効果相)の両方が必須であるが、実験2では、感作相が不十分であった可能性があった。一旦好酸球性気道炎症を惹起したあと、気道炎症の消退を待ってから、再度エフェクター細胞を受身移入する2次チャレンジモデルを用いると反応の差を検出しやすいことを報告している()。そこで、2次チャレンジモデルを用いて、未感作非肥満マウスを一旦感作暴露したあとに、抗原腹腔感作した肥満マウスの内臓脂肪中の単核球を受身移入して表現型を確認した(実験3)。好酸球浸潤と気道過敏性亢進は惹起できたが、抗原感作した肥満マウスの内臓脂肪中の単核球を、非肥満マウスの腹腔に受身移入して喘息モデルを作成しても、更なる好酸球性気道炎症(図4)と気道過敏性亢進(図5)の増強は認めなかった。



次に、未感作肥満マウスの内臓脂肪由来のCD8陽性T細胞に、喘息を増強する作用があるかどうかを調べる目的で、未感作肥満マウスの内臓脂肪中のCD8陽性T細胞を精製して、非肥満マウスの腹腔に受身移入し喘息モデルを作成した。CD8陽性T細胞を受身移入すると、アレルギー性気道炎症(図6)や気道過敏性(図7)の発現が抑制された。



これまでに、マウスの喘息モデルでCD8陽性T細胞には喘息を惹起増強する作用があること、また、ヒトの喘息患者においてもCD8陽性T細胞が喘息病態に関与していることを示しており、当初の予測では、内臓脂肪のCD8陽性T細胞にも喘息を増強する作用があると仮説を立てて実験を行った。肥満マウスでは喘息の表現型の悪化が認められたが、肥満マウスの内臓脂肪から精製したCD8陽性T細胞には、喘息の増悪作用は認めず、むしろ喘息の病態の発生に対して抑制的に作用する可能性が示された。

<引用文献>

Ohnishi H, 他 6 名. Corticosteroids enhance CD8⁺ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and allergic inflammation by upregulating leukotriene B₄ receptor 1. *J Allergy Clin Immunol* 121: 864-71, 2008.

Ohnishi H, 他 2 名. The role of

leukotriene B₄ in allergic diseases. *Allergol Int* 57: 291-8, 2008.

Ohnishi H, 他 7 名. Mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent pathways are essential for CD8⁺ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 123:249-57, 2009.

Dakhama A, Collins ML, Ohnishi H, 他 6 名. IL-13-producing BLT1-positive CD8 cells are increased in asthma and are associated with airway obstruction. *Allergy*. 2013; 68: 666-73.

Nishimura S, 他 12 名. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Med* 15:914-20, 2009

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Chung EH, Jia Y, Ohnishi H, 他 6 名. Leukotriene B₄ receptor 1 (BLT1) is differentially expressed on peripheral blood T cells of steroid-sensitive and steroid-resistant asthmatics. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;112:211-216.e1. doi: 10.1016/j.anai.2013.12.006. 査読有

Nagasaki T, Matsumoto H, Kanemitsu Y, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwahara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, 他 14 名. Integrating longitudinal information on pulmonary function and inflammation using asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:1474-1477. e1-2. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1084. 査読有

Izuhara Y, Matsumoto H, Kanemitsu Y, Izuhara K, Tohda Y, Horiguchi T, Kita H, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, 他 16 名. GLCCI1 variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids. *Allergy*. 2014;69:668-673. doi: 10.1111/all.12400. 査読有

Ohnishi H, 他 4 名. Seasonal variation of serum KL-6 concentrations is greater in

patients with hypersensitivity pneumonitis. *BMC Pulm Med*. 2014;14:129. doi: 10.1186/1471-2466-14-129. 査読有

Sakai M, Kubota T, Ohnishi H, 他 1 名. A novel lung injury animal model using KL-6-measurable human MUC1-expressing mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 432:460-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.123. 査読有

Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwahara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, 他 17 名. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:305-312.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2013.04.050. 査読有

Dakhama A, Collins ML, Ohnishi H, 他 6 名. IL-13-producing BLT1-positive CD8 cells are increased in asthma and are associated with airway obstruction. *Allergy*. 2013; 68: 666-73. doi: 10.1111/all.12135. 査読有

Joetham A, Ohnishi H, 他 6 名. Loss of T regulatory cell suppression following signaling through glucocorticoid-induced tumor necrosis receptor (GITR) is dependent on c-Jun N-terminal kinase activation. *J Biol Chem*. 2012;287:17100-8. doi: 10.1074/jbc.M111.316943. 査読有

Joetham A, Okamoto M, Takeda K, Schedel M, Ohnishi H, 他 2 名. CD8 regulates T regulatory cell production of IL-6 and maintains their suppressive phenotype in allergic lung disease. *J Immunol*. 2011;186:113-20. doi: 10.4049/jimmunol.1001663. 査読有

Nakashima T, Yokoyama A, Ohnishi H, 他 5 名. Chronic hepatitis C virus infection is associated with more severe asthma. *Allergol Int*. 2011;60:299-304. doi: 10.2332/allergolint.10-0A-0240. 査読有

Shin YS, Takeda K, Ohnishi H, 他 9 名. Targeting CXCR3 reduces ligand-induced T-cell activation but not development of lung allergic responses. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;107:145-53. doi: 10.1016/j.anai.2011.04.013. 査読有

[学会発表](計3件)

Ohnishi H. Activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is essential for the development of CD8+T cell-mediated allergic airway inflammation. East asia allergy symposium, Seoul, Korea, 2012/5/25-26.

Ohnishi H. The role of leukotriene B4-dependent migration of T cells in allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 日韓中合同シンポジウム、グランドプリンスホテル高輪、東京 2011/11/10-12

Ohnishi H, et al. Synergistic effects of CD4+ and CD8+ T cells for the full development of allergen-induced airway hyperresponsiveness required leukotriene B4 receptor-1 expression. 2011 American Thoracic Society International Conference. Denver, CO, USA. 2011/5/13-18.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 広志 (OHNISHI, Hiroshi)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 90553876

(2) 研究協力者

小見山 周三 (KOMIYAMA, Shuzo)
高知大学・医学部・技術補佐員