

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011-2012
 課題番号：23790897
 研究課題名（和文）気管支喘息における新規myeloid系細胞の役割の解明
 研究課題名（英文）The role of new myeloid subsets in asthma
 研究代表者
 岩田 有史（IWATA ARIFUMI）
 千葉大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：90436353

研究成果の概要（和文）：

気管支喘息において気道炎症によって誘導された単球由来樹状細胞(iDC)が如何なる働きをするのかは不明であった。本研究者は 1) Th2 細胞依存的炎症によって誘導される iDC が M2 マクロファージのマーカである arginase1 等を強く発現すること、2) その発現は内在性 STAT6 に依存することを示し、iDC は炎症環境によって性質が制御されていることを明らかにした。さらに Th2 細胞依存的炎症によって誘導された iDC は気道炎症とは独立して気道過敏性の誘導に重要な働きをすることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Dendritic cells (DCs) play critical roles in determining the fate of CD4+ T cells. While previous studies have shown that CD11c+ DCs play an indispensable role in the induction of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity (AHR) in murine asthma models, the precise roles of monocyte-derived inflammatory DCs (iDCs) in the asthmatic responses remain largely unknown. We show here that Th2 cell-mediated inflammation in murine asthma models instructs iDCs to express a part of alternatively-activated macrophage markers arginase 1 by a mechanism depending on the intrinsic expression of STAT6. Moreover, we show that iDCs under a Th2 environment play a critical role in the induction of AHR independently of allergic airway inflammation. Our results thus indicate the importance of iDCs in the induction of AHR as downstream effector cells in Th2 cell-mediated asthmatic responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー性気道炎症、樹状細胞、アルギナーゼ、気道過敏性

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は可逆的気道収縮と気道過敏性の亢進を特徴とする疾患であり、その発症にはIL-4、IL-5、IL-13を産生するT細胞(Th2細胞)が中心的な役割を果たしている。近年の研究によりTh2細胞依存的なアレルギー性気道炎症の誘導に樹状細胞が重要であることが報告されているが、炎症によって誘導される単球由来樹状細胞の気管支喘息における働きは不明である。

2. 研究の目的

気管支喘息モデルにおける単球由来樹状細胞の性質と役割を解析する。

3. 研究の方法

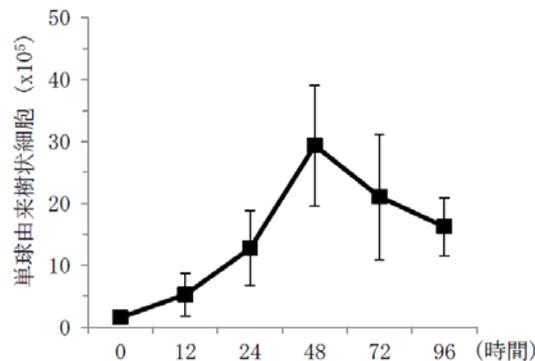
- (1) 卵白アルブミン(OVA)の腹腔内感作、もしくはOVA特異的TCRを発現するOT-IIマウス由来CD4陽性T細胞を*in vitro*で分化誘導し細胞移入することによって感作したのち、OVAを吸入投与し気道炎症を誘発した。
- (2) 単球由来樹状細胞を単離し、遺伝子発現、たんぱく質発現を解析した。
- (3) 気道炎症、気道過敏性の亢進における単球由来樹状細胞の働きを解析した。

4. 研究成果

(1) 単球由来樹状細胞は気道炎症により48時間をピークに強く誘導される

アレルギー性炎症における単球由来樹状細胞誘導の経時的変化を解析するために、Balb/cマウスをOVAと水酸化アルミニウムで2回腹腔内感作し、その後OVAを1回吸入投与し、肺内への単球由来樹状細胞の誘導を解析した。単球由来樹状細胞(CD11b⁺CD11c⁺MHC classII^{high}細胞)はOVA吸入48時間後をピークに増加し、その後減少した。(図1)

図1：単球由来樹状細胞の肺内経時的推移

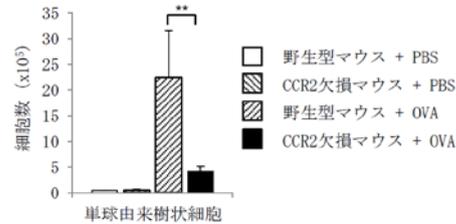


(2) 単球由来樹状細胞はCCR2依存的に誘導される

気管支喘息における単球由来樹状細胞の誘導へのCCR2の関与を検討した。OVA特異的

TCRを発現するOT-IIマウス由来T細胞をTh2細胞へ分化誘導し、野生型もしくはCCR2欠損マウスに移入し、その後OVAを吸入投与し気道炎症を誘導した。CCR2欠損マウスでは気道炎症による単球由来樹状細胞の誘導は著明に低下した(図2)。

図2：単球由来樹状細胞はCCR2依存的に誘導される

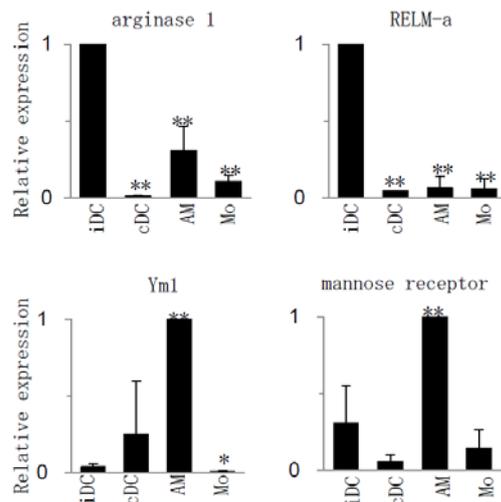


(3) 単球由来樹状細胞はalternatively activated macrophageの特徴の一部を呈する

アレルギー性気道炎症によって誘導される単球由来樹状細胞の働きを解析するため、(2)と同様の方法でOVA特異的Th2細胞によるアレルギー性気道炎症を誘導し、単球由来樹状細胞、古典的樹状細胞、肺胞マクロファージ、単球を単離し、遺伝子発現を解析した。

単球由来樹状細胞ではarginase 1、RELM-α等のalternatively activated macrophageのマーカーが高く発現していたが、別のマーカーであるYm1やmannose receptorの発現は低かった(図3)。

図3：単球由来樹状細胞の遺伝子発現 (iDC:単球由来樹状細胞、cDC:古典的樹状細胞、AM:肺胞マクロファージ、Mo:単球)

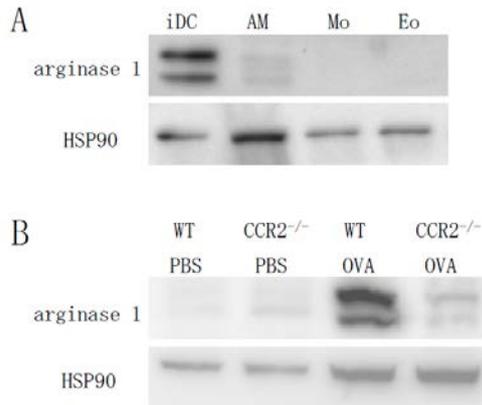


(4) 単球由来樹状細胞はarginase 1の主要産生細胞である

arginase 1は気管支喘息において気道過敏性の誘導に重要であることが報告されてい

るため、その蛋白発現をWB法で解析した。単球由来樹状細胞では肺胞マクロファージ等の他の myeloid 系細胞に比してきわめて高い arginase 1 の発現が見られた(図 4A)。さらに単球由来樹状細胞を欠損する CCR2 欠損マウスのアレルギー性気道炎症時の肺内 arginase1 が低下することから(図 4B)、単球由来樹状細胞は arginase1 の主要な産生細胞であると考えられた。

図 4 : 単球由来樹状細胞は arginase 1 の主要産生細胞である

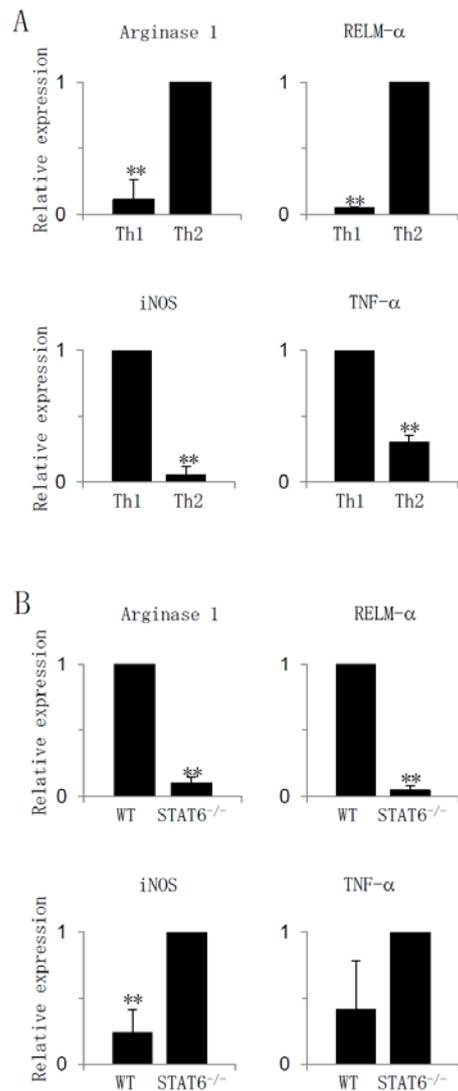


(5) 単球由来樹状細胞は炎症によって性質が変化する

単球由来樹状細胞の誘導機構を明らかにするため、OVA 特異的 Th1 細胞を野生型マウスへ移入後、OVA を吸入投与し、Th1 細胞性気道炎症を誘発した。肺組織から単球由来樹状細胞を単離し遺伝子発現を解析した。arginase 1、RELM- α は Th2 細胞性気道炎症で選択的に誘導され、一方、Th1 細胞性気道炎症では、感染における病原体駆除のエフェクター細胞として重要な Tip-DC (TNF-iNOS producing DC)のマーカーである、TNF- α 、iNOS が誘導された(図 5A)。

単球由来樹状細胞は Th2 細胞性炎症依存的に誘導されたため、次に単球由来樹状細胞における内在性 STAT6 の働きを解析した。野生型マウスに放射線照射後、野生型由来の骨髄細胞と STAT6 欠損マウス由来の骨髄細胞を混合し移入することで混合性骨髄キメラマウスを作製した。このマウスに Th2 細胞性気道炎症を誘導し単球由来樹状細胞を単離した。単離の際に野生型マウス由来の単球樹状細胞と STAT6 欠損マウス由来単球樹状細胞を分けることにより、同一環境下で誘導された単球由来樹状細胞における内在性 STAT6 の役割を解析した。その結果 arginase 1、RELM- α は STAT6 依存的に誘導されることが明らかとなった(図 5B)。これらのことより単球由来樹状細胞は炎症環境によって性質が制御されることが明らかとなった。

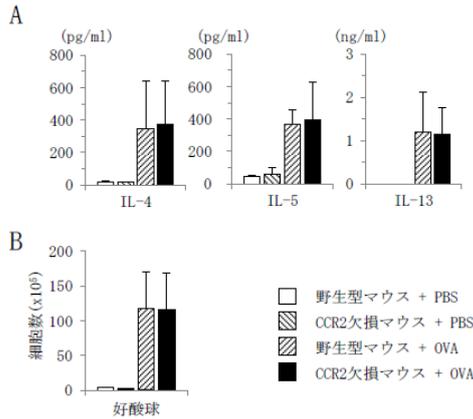
図 5 : 単球由来樹状細胞の性質は炎症によって制御される



(6) 単球由来樹状細胞は気道過敏性を誘導する

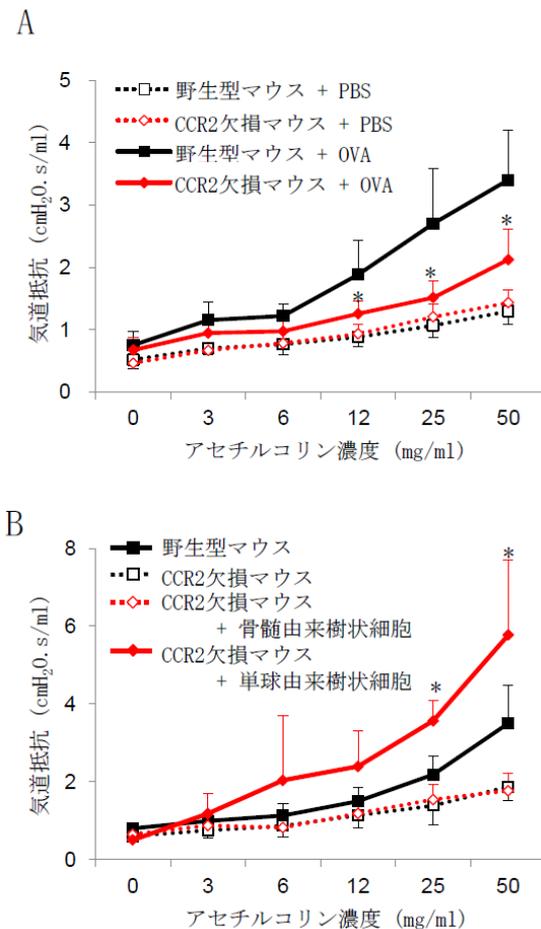
単球由来樹状細胞の働きを明らかにするため、野生型マウスと単球由来樹状細胞を欠損する CCR2 欠損マウスに OVA 特異的 Th2 細胞を移入し、その後 OVA を吸入投与してアレルギー性気道炎症を誘導し、喘息の表現型を解析した。いずれのマウスにおいても肺胞洗浄液内 Th2 サイトカインの濃度(図 6A)、好酸球性炎症(図 6B)に差は認められないため、すでに感作が成立した条件では単球由来樹状細胞は炎症の成立には必須でないことが明らかとなった。

図6：CCR2欠損マウスの気道炎症の解析



しかし OVA 特異的 Th2 細胞を移入した CCR2 欠損マウスでは野生型に比して気道過敏性が有意に低下した(図 7A)。この CCR2 欠損マウスの気道過敏性低下は野生型マウス由来単球樹状細胞の移入により、キャンセルされることから(図 7B)、単球由来樹状細胞は炎症の誘導とは異なる機序で気道過敏性を誘導するエフェクター細胞として働くことが明らかとなった。

図7：単球由来樹状細胞は気道過敏性を誘導する



結語

単球由来樹状細胞はアレルギー性気道炎症によって CCR2 依存的に誘導される arginase 1 の主要産生細胞であること、気管支喘息の主症状である気道抵抗の上昇を引き起こす原因細胞であることを明らかとした。一方 Th1 細胞性炎症によって細菌感染のエフェクター細胞である Tip-DC 様樹状細胞が誘導されることより、単球由来樹状細胞は樹状細胞としての機能とは別に、炎症環境によって教育されるエフェクター細胞として機能することが明らかとなった。これらの結果より、単球由来樹状細胞は喘息の治療標的となりうることが示唆された。

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)

① Kobayashi Y, Iwata A, Suzuki K, Suto A, Kawashima S, Saito Y, Owada T, Kobayashi M, Watanabe N, Nakajima H. B and T lymphocyte attenuator inhibits LPS-induced endotoxic shock by suppressing Toll-like receptor 4 signaling in innate immune cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Mar 26;110(13):5121-6. (査読有)

② Iwata A, Ikeda K, Hirose K, Takatori H, Takahashi K, Sanayama Y, Tanaka S, Suto A, Nakajima H. Pre-dinner administration increases the efficacy of proton pump inhibitors on refractory GERD symptoms in connective tissue disease patients. Mod Rheumatol. 2013 Mar;23(2):357-64. (査読有)

③ Kawashima S, Hirose K, Iwata A, Takahashi K, Ohkubo A, Tamachi T, Ikeda K, Kagami S, Nakajima H. β -glucan curdolan induces IL-10-producing CD4⁺ T cells and inhibits allergic airway inflammation. J Immunol. 2012 Dec 15;189(12):5713-21. (査読有)

④ Takahashi K, Hirose K, Kawashima S, Niwa Y, Wakashin H, Iwata A, Tokoyoda K, Renauld JC, Iwamoto I, Nakayama T, Nakajima H. IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2011 Nov;128(5):1067-76.e1-6 (査読有)

⑤ Iida K, Suzuki K, Yokota M, Nakagomi

D, Wakashin H, Iwata A, Kawashima H, Takatori H, Nakajima H. STAT4 is required for IFN- β -induced MCP-1 mRNA expression in murine mast cells.

Int Arch Allergy Immunol. 2011;155 Suppl 1:71-6. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

①川島沙紀、廣瀬晃一、岩田有史、高橋健太郎、加々美新一郎、中島裕史 curdlan は IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞を誘導し、アレルギー性気道炎症を抑制する第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 大阪 2012 年11月29 日

②Takahashi K, Kawashima S, Niwa Y, Iwata A, Kobayashi Y, Kagami S, Suto A, Hirose K, Watanabe N, Nakayama T, Nakajima H. IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. The American Association of Immunologists, Boston, USA 2012 年5月6日

③横田雅也、鈴木浩太郎、中込大樹、岩田有史、常世田好司、中山俊憲、上坂等、中島裕史 (2011) 多発性筋炎マウスモデルにおける肥満細胞の役割の解析 第40回日本免疫学会総会・学術集会 千葉 2011 年11月28 日

④高橋健太郎、廣瀬晃一、川島沙紀、丹羽祐輔、若新英史、岩田有史、小林芳久、常世田孝司、中山俊憲、谷口正実、秋山一男、中島裕史 (2011) IL-22 は気道上皮細胞による IL-25 産生を抑制し、アレルギー性気道炎症を制御する 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2011 年11月21 日

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/kenkyugyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 有史 (IWATA ARIFUMI)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90436353

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし