

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790093

研究課題名(和文)OX40リガンドを分子標的にした難治性喘息治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new refractory asthma treatments of targeting OX40 ligand.

研究代表者

大友 隆之(OHTOMO, TAKAYUKI)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90463108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：喘息難治化のメカニズムの1つに、T細胞レベルでのステロイド抵抗性がある。T細胞活性化にはT細胞受容体(TCR)を介する抗原特異的シグナルと共刺激分子を介する抗原非特異的シグナルが必要であるが、TCRシグナルのみの活性化と比較して、TCRシグナルと共刺激シグナル両方を活性化するとステロイド抵抗性が高くなることが知られている。本研究では、共役分子の1つであるOX40リガンドとステロイド抵抗性の関係を調査した。OX40リガンド欠損マウスではステロイド薬の効果が高く、低濃度のステロイド薬で喘息反応が抑制された。したがって、OX40リガンドは難治性喘息治療薬開発の新たな分子標的となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Steroid-resistant T cell is thought to be one of the causes to refractory asthma. It is necessary for two receptors signaling in order to activate T cells. One is antigen-specific signal through the T cell receptor (TCR), and the other is antigen non-specific signal through the co-stimulatory molecules. It is known that the steroid resistance of T cell more increases when stimulated both TCR signal and co-stimulatory signals compared to only TCR signal. OX40 ligand is one of the co-stimulatory molecules. In this study, we investigated steroids-sensitivity of T cell under the condition of OX40 ligand deficient. It was observed that asthmatic reaction (eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness) of OX40 deficient mice was reduced by low-concentrated steroids, but that of wild type mice was not. Thus, it is thought that OX40 ligand could be a new molecule target of development of refractory asthma drug.

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

喘息治療ガイドラインの普及と薬物療法の進歩により、軽度～中軽度の喘息症例に対して吸入ステロイド薬が十分にコントロール可能となってきた。しかしながら、重症・難治性喘息症例においては高容量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、高口イコトリエン薬、長時間作用型 刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない現状がある。このことから重症・難治性喘息症例に早急な対策を講じる必要があるが、その多くはステロイド抵抗性であるため、現行の薬物治療では十分な効果が期待できない。喘息重症・難治化のメカニズムの1つに、*in vivo*のT細胞レベルでステロイド抵抗性が明らかになっている。T細胞活性化にはT細胞受容体(TCR)を介する抗原特異的なシグナルと共刺激分子を介する抗原非特異的なシグナル(共刺激シグナル)が必要であるが、申請者らの*in vitro*の実験から、TCRシグナルのみの活性化と比較して、TCRシグナルと共刺激シグナル両方を活性化するとステロイドに対する抵抗性が高くなるという結果が得られている。そのため、共刺激シグナルの遮断はT細胞のステロイド抵抗性を改善し、重症・難治性喘息に効果を示すことが期待される。CD80やCD86は抗原提示細胞上に発現する共刺激分子で、T細胞上に発現しているCD28に結合してT細胞増殖やサイトカイン産生を増強する。CTLA4(CD152)はCD28に競合してCD80/CD86に結合するため、CD28を介した共刺激シグナルを阻害してT細胞の活性化を抑制する。CTLA4とイムノグロブリン(Ig)Gの融合タンパク質であるCTLA4-Igは、リウマチ治療薬として世界50カ国以上で販売されて効果を挙げている(商品名:オレンシア®、一般名:アバタセプト)。現在、申請者らは難治性喘息治療薬(T細胞ステロイド抵抗性改善薬)としてのCTLA4-Igにの可能性について検討中である。

一方、OX40リガンド(OX40L)は抗原提示細胞上に発現している共役分子の1つで、T細胞上に発現しているOX40と結合して共刺激シグナルの活性化、活性化T細胞の生存や増殖を増強することが知られている。OX40Lトランスジェニックマウスでは、CD4陽性記憶T細胞数が増加し、その機能も著しく亢進することが分かっている。そこで本研究では、OX40/OX40Lを介した共刺激シグナルがT細胞のステロイド抵抗性に与える影響を検証する目的で、OX40L欠損マウスで喘息モデルを作製して検討する。このことにより、難治性喘息治療薬開発に向けて、分子標的としてのOX40ならびにOX40Lの有用性を評価する。

2. 研究の目的

「OX40/OX40Lを介した共刺激シグナルがT細胞のステロイド抵抗性に与える影響」を明らかにする目的で、以下の5項目を証明する。

(1)～(3)では個体のステロイド抵抗性を、(4)と(5)ではT細胞のステロイド抵抗性を評価する。

(1)OX40L欠損マウスは、低容量ステロイドで気道過敏性亢進が抑制される。

気管支喘息モデルでは、抗原刺激により気道過敏性が亢進する。OX40L欠損がステロイド感受性を増加(ステロイド抵抗性を改善)させて気道過敏性の亢進を抑制すること証明する。

(2)OX40L欠損マウスは、低容量のステロイドで好酸球浸潤が抑制される。

気管支喘息では、抗原刺激により炎症部位で好酸球浸潤が観察される。OX40L欠損がステロイド感受性を増加(ステロイド抵抗性を改善)させて気管支肺胞内への好酸球浸潤を抑制すること証明する。

(3)OX40L欠損マウスは、低容量のステロイドでT細胞浸潤が抑制される。

気管支喘息では、炎症部位への好酸球浸潤に先んじてT細胞浸潤が観察される。OX40L欠損がステロイド感受性を増加(ステロイド抵抗性を改善)させて気管支肺胞内へのT細胞浸潤を抑制すること証明する。

(4)OX40L/OX40シグナルの欠如は、低容量ステロイドでT細胞増殖が抑制される。

抗原存在下、抗原提示細胞とT細胞を共培養するとT細胞が増殖する。OX40L/OX40共刺激シグナルの欠如がステロイド感受性を増加(ステロイド抵抗性を改善)させてT細胞増殖を抑制することを証明する。

(5)OX40L/OX40シグナルの欠如は、低容量ステロイドで炎症性サイトカイン産生が抑制される。

抗原存在下、抗原提示細胞とT細胞を共培養するとT細胞が炎症性サイトカインを産生する。OX40L/OX40共刺激シグナルの欠如がステロイド感受性を増加(ステロイド抵抗性を改善)させてT細胞による炎症性サイトカインの産生を抑制することを証明する。

3. 研究の方法

研究目的(1)～(3)のマウス個体のステロイド抵抗性に関しては、非アトピー型喘息モデルであるT細胞移入喘息モデルを作製して、

気管支喘息の徴候（気道過敏性の亢進、好酸球浸潤、T細胞浸潤）を測定することにより評価する。（4）と（5）のT細胞のステロイド抵抗性に関しては、抗原存在下でT細胞クローンと抗原提示細胞を共培養して、T細胞の増殖やT細胞のサイトカイン産生などを測定することにより評価する。いずれにおいても、ステロイド抵抗性に関連する周辺データを収集し、仮説の更なる裏付けに供する。

4. 研究成果

（1）OX40L 欠損マウスは、低容量ステロイドで気道過敏性亢進が抑制される。

T細胞移入喘息モデルを用いて、OX40L 欠損が気道過敏性亢進に及ぼす影響を評価した。測定はBUXCO社の全身プレチスモグラフィを使用して行い、気道収縮の程度は enhanced pause: P_{enh} を用いて評価した。気道過敏性は、塩化メサコリン吸入に対する P_{enh} を測定し、容量反応曲線を作成して評価した。その結果、デキサメタゾン未処置群では、OX40L 欠損マウスは野生型と同等の気道過敏性を示した。一方、高容量（3 mg/kg）および低容量（1 mg/kg）のデキサメタゾン処置群では、OX40L 欠損マウスの気道過敏性の亢進が有意に低下した（図1）。

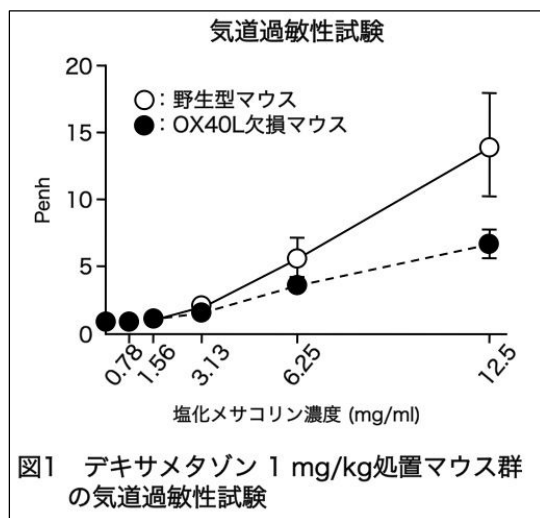


図1 デキサメタゾン 1 mg/kg処置マウス群の気道過敏性試験

このことから、OX40L 欠損はステロイドの感受性を高め、気道過敏性亢進の抑制することが明らかになった。

（2）OX40L 欠損マウスは、低容量のステロイドで好酸球浸潤が抑制される。

T細胞移入喘息モデルを用いて、OX40L 欠損が気管支肺胞における好酸球浸潤に及ぼす影響を評価した。抗原吸入 48 時間後の T細胞移入喘息モデルマウスから気管支肺胞洗浄液を採取し、好酸球数を計測した。その結果、デキサメタゾン未処置群では、OX40L 欠

損マウスは野生型と同等の好酸球浸潤が認められた。一方、高容量（3 mg/kg）および低容量（1 mg/kg）のデキサメタゾン処置群では、OX40L 欠損マウスの好酸球浸潤が有意に低下した（図2）。

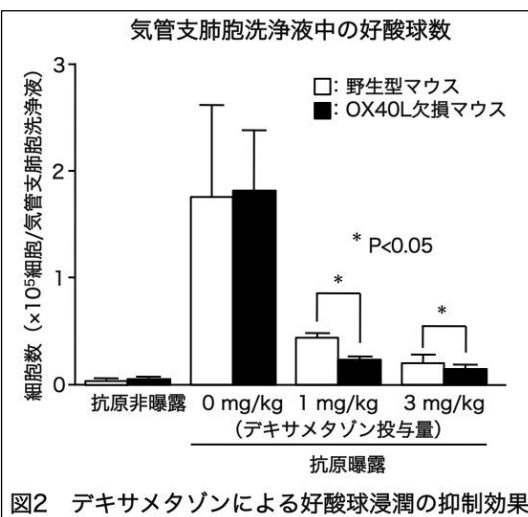


図2 デキサメタゾンによる好酸球浸潤の抑制効果

このことから、OX40L 欠損はステロイドの感受性を高め、気管支肺胞への好酸球浸潤を抑制することが明らかになった。

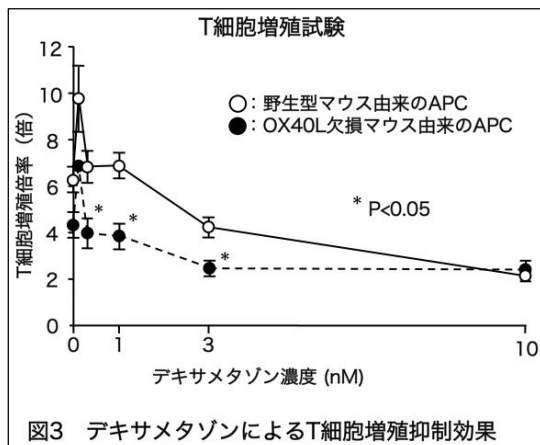
（3）OX40L 欠損マウスは、低容量のステロイドでT細胞浸潤が抑制される。

T細胞移入喘息モデルを用いて、OX40L 欠損が気管支肺胞におけるT細胞浸潤に及ぼす影響を評価した。抗原吸入 48 時間後の T細胞移入喘息モデルマウスから気管支肺胞洗浄液を採取し、T細胞数を計測した。その結果、デキサメタゾン未処置群では、OX40L 欠損マウスのT細胞浸潤が認められた。一方、高容量（3 mg/kg）および低容量（1 mg/kg）のデキサメタゾン処置群では、OX40L 欠損マウスのT細胞浸潤が有意に低下した。このことから、OX40L 欠損はステロイドの感受性を高め、気管支肺胞へのT細胞浸潤を抑制することが明らかになった。

（4）OX40L/OX40 シグナルの欠如は、低容量ステロイドでT細胞増殖が抑制される。

OX40L 欠損マウスおよび野生型マウスの脾臓から抗原提示細胞（Antigen presenting cell; APC）を調整し、抗原存在下でT細胞クローンと共培養した。細胞増殖は、³Hチミジン取り込み法を用いて評価した。その結果、デキサメタゾン未添加群では、OX40L 欠損マウス由来のAPCとの共培養は野生型マウス由来のAPCとの共培養と同等のT細胞増殖作用が認められた。一方、培地にデキサメタゾンを添加すると、デキサメタゾン 0.1 nM

～3 nM 群において、OX40L 欠損マウス由来の APC との共培養で T 細胞の増殖率が有意に低下していた。しかし、10 nM 群では両群間に有意な差は認められなかった (図 3)。



これら結果から、OX40L/OX40 共刺激シグナルの欠如はステロイドの感受性を高め、低容量のステロイドでも T 細胞の増殖を抑制することが明らかになった。

(5) OX40L/OX40 シグナルの欠如は、低容量ステロイドで炎症性サイトカイン産生が抑制される。

OX40L 欠損マウスおよび野生型マウスの脾臓から APC を調整し、抗原存在下で T 細胞クローンと共培養した。一定時間培養後の培地に含まれるサイトカインを ELISA 法によって測定した。その結果、0.1 nM～3 nM のデキサメタゾン添加では、OX40L 欠損マウス由来の APC と共培養した培地中のインターロイキン-4、インターロイキン-5 およびインターロイキン-13 濃度が有意に低下していた。これらの結果から、OX40L/OX40 共刺激シグナルの欠如はステロイドの感受性を高め、低容量ステロイドでも T 細胞の炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかになった。

以上 (1)～(5) の結果から、OX40L/OX40 共刺激シグナルの欠如は、T 細胞のステロイドの感受性を高めることで、T 細胞の増殖や炎症部位への浸潤、炎症性サイトカインの産生が抑制された。このことが、*in vivo* での気道過敏性の亢進や好酸球浸潤を抑制したと考えられる。今後、OX40 および OX40L をターゲットにした新たな難治性喘息治療薬の開発が期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

神山智、大友暁美、大友隆之、山口美也子、飯島葉、森晶夫、非アトピー型喘息のマウス

モデル作成と解析、第 44 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会、2013 年 7 月 5 日～6 日、相模原市

Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Itoh, J., Saito, N., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., Kaminuma, O. Adoptive transfer of Th clones confer late-phase asthmatic response in mice, European Academy of Allergy and Clinical Immunology-World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大友 隆之 (OHTOMO, TAKAYUKI)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90463108