

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860823

研究課題名(和文) 抗原特異的遅発型喘息反応の生物学的、薬理的検討

研究課題名(英文) Biological and pharmacological investigation on antigen-specific late asthmatic response

研究代表者

関谷 潔史 (Sekiya, Kiyoshi)

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)・その他部局等・研究員

研究者番号：90385774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞依存性の気流閉塞モデルを作成した。まず、D011.10 transgenicマウスからOVA(卵白アルブミン)特異的T細胞クローンを樹立し、無処置Balb/cマウスに移入、翌日OVAを経気道的にチャレンジした後、経時的に気道抵抗(RL)、呼吸パターン(Penh)を測定した。in vitroで、T細胞培養上清の平滑筋収縮活性検出システムを立ち上げた。in vitroおよびin vivoでロイコトリエン阻害剤を使用して、T細胞依存性の遅発型喘息反応におけるロイコトリエンの関与を解析した。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze T cell dependent airflow limitation, T cell clone transfer asthma model was established. Collagen gels embedded with primary cultured murine bronchial smooth muscle cells were established to detect contractile activity in vitro. Culture supernatant of the T cell clone that conferred late asthmatic response could induce gel contraction. The response was not inhibited by montelukast. However, montelukast inhibited late asthmatic response in vivo. T cell dependent airflow limitation seems to be induced through multiple pathways involved multiple mediators.

研究分野：呼吸器内科学、アレルギー学

キーワード：アレルギー T細胞 気管支喘息 気流閉塞 平滑筋 遅発型反応

## 1. 研究開始当初の背景

重症喘息の大部分は非アトピー型喘息であることが明らかになっている(米国 SARP 研究、欧州 ENFUMOSA 研究、厚生労働科学研究重症喘息班)。アトピー型喘息では、いわゆる Th2 型免疫応答を司る T 細胞が、慢性炎症の引き金を担っていると考えられているが、非アトピー型喘息においても、CD4<sup>+</sup> T 細胞の活性化が認められるなど、外来抗原の関与を窺わせるエビデンスが数多く報告されている。そこで、われわれは、末梢血中 T 細胞の IL-5 産生を指標とすることにより、アトピー型喘息、非アトピー型喘息の両病型において、T 細胞応答抗原を同定した。次いで、インフォームドコンセントの得られた症例を対象に、吸入負荷試験を実施し、非アトピー型喘息においても、T 細胞応答抗原の吸入に引き続いて、遅発型喘息反応(気流閉塞)が生じることを突き止めた。そこで、IgE 抗体が認められない非アトピー型喘息において認められた気流閉塞のメカニズムを分子レベルで解明することを目指す。

## 2. 研究の目的

T 細胞が気流閉塞のエフェクター細胞であるとの学説は、現在の学会の通説とは異なるため、免疫学的レベルで証明する必要がある。われわれは、無処置マウスに T 細胞クローンを受身移入し、抗原チャレンジすることで、抗原をアジュバントとともに感作し、チャレンジする通常の喘息モデルと同等の気道炎症、気道過敏性が得られるとの知見を報告している(Kaminuma O. et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:448, 1997)。さらに、本モデルの解析を継続して、T 細胞移入モデルにおいて、気流閉塞が起きることを見出した(Ohtomo, T., et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):2-6, 2009)。本モデルは、IgE 抗体をはじめとする液性免疫の関与を無視で

きる、非アトピー型喘息研究に最適のモデルと考えられる。そこで、ロイコトリエン等既知のメディエータ阻害剤の効果を *in vivo* で確認することを考えた。さらに、気管支平滑筋収縮活性を *in vitro* でアッセイできる実験系を樹立し、気流閉塞を惹起できる T 細胞クローンの培養上清の解析を行うことで、最終的に、収縮物質の精製、同定をめざしたい。

## 3. 研究の方法

### 1) T 細胞クローンの樹立、喘息モデル

I-A<sup>d</sup> 拘束性の Ovalbumin (OVA) 特異的 T 細胞レセプターを有する transgenic mouse である DO11.10 より、spleen cell を採取し、抗原として OVA を加え、IL-2 存在下で培養して、T 細胞ラインを得る。さらに、X 線照射 spleen cell を抗原提示細胞として限界希釈法を行って、T 細胞クローンを得る。

### 2) T 細胞移入喘息モデル(基本的な方法は Kaminuma O., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:448, 1997 に詳述)

気流閉塞は、Buxco 社無拘束測定装置(Penh)に加えて、麻酔下に、レスピレータ接続し、呼吸抵抗測定装置(R<sub>L</sub>)を用いて、経時的に測定する(Ohtomo, T., et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):2-6, 2009 に詳述)。R<sub>L</sub> はダイレクトに気流閉塞を示す指標として有用で、一方、Penh は呼吸パターンとしてのインダイレクトな指標であるが、長時間フォローできる点でともに有用である。

治療薬として、抗ロイコトリエン剤をはじめとするメディエータ拮抗薬を投与し、効果を *in vivo* で解析する(Nakata, A., et al. *Int. Immunol.* 13:329, 2001 に準じる)。投与時期は、抗原チャレンジ前後に、効果を見極めながら 1 日 1 回、計 2、3 回投与する。

### 3) 培養平滑筋細胞アッセイ (in vitro)

3-4 週齢の Balb/c マウスより気管支を採取し、37℃、3 時間半コラゲナーゼ(1 mg/ml)処理を行う。処理後、気管支を軽く洗い、培地(DMEM/F-12, 10% FBS)に懸濁して 24 ウェルプレートに分注することにより、マウス気管支平滑筋細胞の初代培養を行う。4 日後に継代し、さらにその 3 日後に、24 ウェルプレートにマウス気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンを作成する。コラーゲンは Cellmatrix type1-A (新田ゼラチン)を用い、コラーゲンゲル 1 ウェルあたり  $3 \times 10^5$  cells のマウス気管支平滑筋細胞を封入する。培地交換は毎日行い、測定 2 日前より FBS を加えない培地を用いる。培養 6 日後にコラーゲンゲル収縮アッセイを行う。OVA 特異的マウス T 細胞クローンを固相化抗 CD3 抗体で刺激し、24 時間後に上清を回収、透析し、収縮アッセイのサンプルとする。サンプルをコラーゲンゲルに作用させ、15、30、60、90 分後にデジタルカメラでコラーゲンゲルの収縮を撮影、画像解析ソフトウェア ImageJ (NIH) を用いてコラーゲンゲルの表面積を測定し、収縮率を求める (ヒト培養細胞を用いたゲルの作成とアッセイは、Kitamura, N., et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 146 (Suppl 1):36, 2008 に詳述)

### 4. 研究成果

平滑筋収縮活性を測定する方法として、市販されているヒト由来平滑筋細胞をコラーゲンゲルに包埋し、24 ウェルプレート上で培養する方法が報告されている。しかしマウスの気管支平滑筋細胞 Mouse Bronchial Smooth Muscle Cell (mBSMC)の利用は報告がない上、マウス気管支平滑筋は一般に流通していない。マウスの喘息モデルおよびマウス由来の平滑筋収縮因子を評価する上で、mBSMC

を用いた平滑筋収縮活性評価は不可欠である。

そこで、培養マウス気管支平滑筋細胞を用いた収縮アッセイ系の樹立を試みた (図 1)。3 週齢マウスの肺、気管支、気道を無菌的に摘出した。シャーレにとり、RPMI 培地上で気管支と気道以外をきれいに除いた。ハンクス緩衝液 1 ml にコラゲナーゼ Type Ⅰ を終濃度 1 mg/ml で添加し、気管支組織を入れて 37℃、3.5 時間浸透しながら酵素反応処理した。5%FBS 添加ハンクス緩衝液を 1 ml 加えて反応停止し、遠心して酵素切断された気管支組織の沈殿を回収した。10%FBS 添加 DMEM/F-12 培地で組織をよく懸濁し、24 ウェル組織培養プレート上で、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下で初代培養を行った。培養細胞は 4~5 日後に培養ディッシュへ継代培養した。平滑筋マーカー抗カルデスモン抗体を用いた免疫組織染色によって、平滑筋細胞が増殖していることを確認し、気管支平滑筋細胞として実験に用いた。コンフルエントに増殖した細胞からマウス気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲル(mBSMC ゲル)を作製し、収縮実験に用いた。

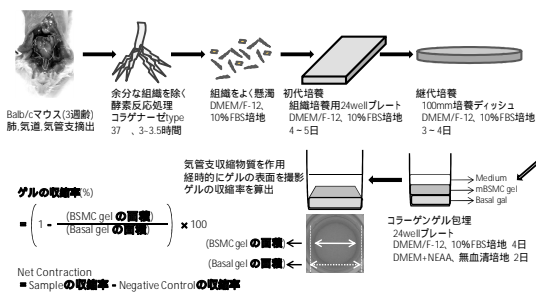


図 1 マウス由来気管支平滑筋細胞の初代培養と平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルの収縮アッセイ

作製した mBSMC ゲルは平滑筋収縮物質への反応性を評価する必要がある。気道過敏性試験において代表的に用いられるメサコリン、気管支喘息のケミカルメディエ

ーターであるロイコトリエンを用いて評価した。ロイコトリエン D<sub>4</sub>(LTD<sub>4</sub>, 10 μM) およびメサコリン(100 μM)を作用させて 15, 30, 60, 90, 120 分間隔でゲルの撮影を行い、画像解析ソフトを用いて BSMC 包埋ゲルと底面のゲルの面積比からゲル収縮率を求めた。ロイコトリエンおよびメサコリンは mBSMC ゲルを有意に収縮させた(図 2)。ロイコトリエンは 60 分でゲル収縮率は最大(26%)に達し、最初の 15 分で最大ゲル収縮率の 80% (21%)収縮させた。メサコリンは 60 分で最大ゲル収縮率 (5.9%)に達し、最初の 15 分で最大ゲル収縮率の 77% (4.6%)収縮させた。

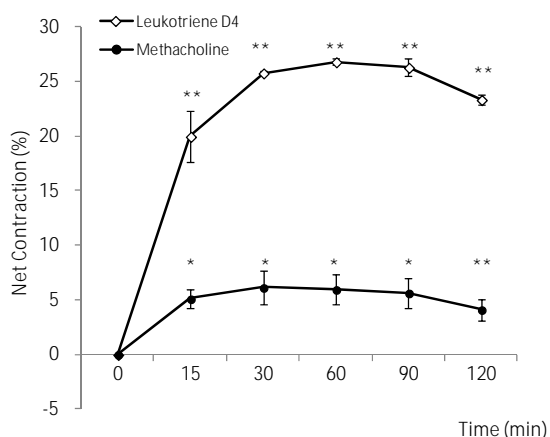


図 2 ロイコトリエンおよびメサコリンを用いた mBSMC 包埋コラーゲンゲルの収縮アッセイ

(LTD<sub>4</sub>:n=3, Methacholine:n=4) 収縮物質無添加のゲルと比較 p<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*)

次にアンタゴニストによる収縮抑制試験を行った。LTD<sub>4</sub> (10 μM) にモンテルカスト(10, 30 μM)、メサコリン(100 μM)にアトロピン(300 μM, 1 mM)を作用させた。アンタゴニストを添加して 30 分後、ウェルを Krebs 緩衝液で洗浄して収縮物質を作用させた。モンテルカストは容量依存的かつ有意に LTD<sub>4</sub> の収縮活性を阻害し、アトロピ

ンは容量依存的かつ有意にメサコリンの収縮活性を阻害した(図 3)。

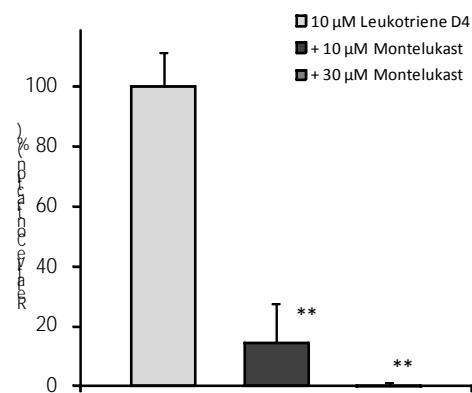
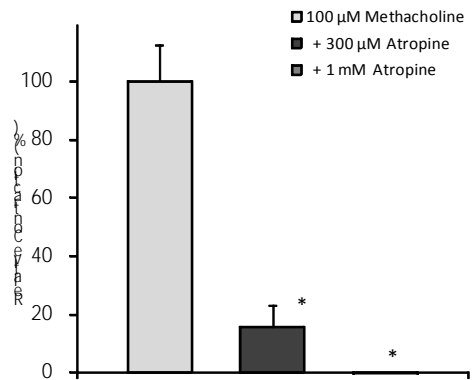


図 3 アンタゴニストによる平滑筋収縮抑制

(LTD<sub>4</sub>:n=3, Methacholine:n=3) アンタゴニスト無添加のゲルと比較 p<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*)

mBSMC ゲルは平滑筋収縮物質により収縮し、アンタゴニストの作用により収縮反応が抑制されたことから、平滑筋の生理学的機能を備えていると言える。以上の結果から、マウス気管支の初代培養から得られた気管支平滑筋細胞を培養して作出された、mBSMC ゲルを用いたアッセイ系は、平滑筋収縮因子の活性測定と評価に用いることができると見られる。

そこで、培養マウス気管支平滑筋細胞ゲルを用いた T 細胞クローン由来気管支収縮活性の評価を行った。LAR を惹起する T 細胞クローン T6-2 を抗 CD3 抗体、CD3

抗体および抗 CD28 抗体で刺激し、無血清培地で 48 時間培養して得た培養上清を MWCO7,000 のメンブレンで透析した。培養上清を mBSMC ゲルに作用させ、15、30、60、90、120 分間隔でゲルを撮影して収縮活性を測定した。

CD3 刺激で活性化した T 細胞クローンの培養上清では、30 分以降で平滑筋収縮が有意に上昇した。抗 CD3 抗体、及び抗 CD3/CD28 抗体で刺激した T6-2 の培養上清を mBSMC に作用させたところ、ゲルは時間依存的に収縮率が増加した(図 4)。無刺激の培養上清の収縮量は、Krebs 緩衝液の収縮率と有意な差はなかった。ロイコトリエンおよびメサコリンの作用による収縮活性が、15 分で最大ゲル収縮率の 80% 収縮するのに対し、T 細胞クローン培養上清の 15 分での収縮活性はゲル最大収縮率の 15% だった。以上の結果から、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。また、即時的に収縮反応を惹起するケミカルメディエーターとは異なり、T 細胞クローン培養上清において時間依存的に収縮率が増大したことから、T 細胞依存的な喘息反応はロイコトリエン受容体やアセチルコリン受容体を介した機序とは異なるものと考えられる。

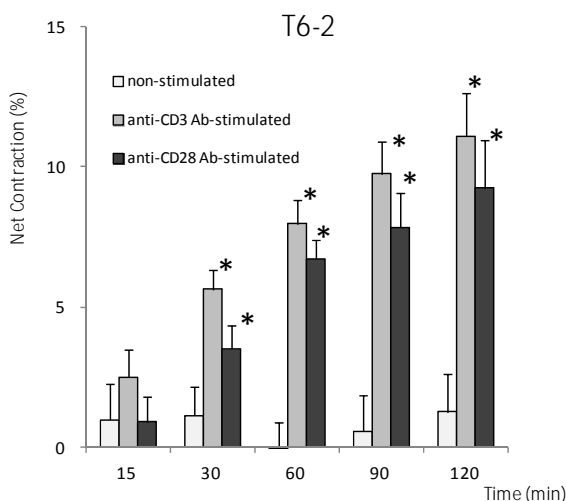


図 4 T 細胞クローン培養上清を用いた mBSMC 包埋コラーゲンゲルの収縮アッセイ (T6-2:n=6)、無刺激の培養上清と比較  $p < 0.05$  (\*)

この収縮活性がモンテルカストで阻害されるか否かを解析したところ、モンテルカスト 3  $\mu\text{M}$  前培養によって、LTD4 1  $\mu\text{M}$  の収縮はほぼ完全に抑制された一方で、T6-2 培養上清による収縮は、抑制されなかった(図 5)。

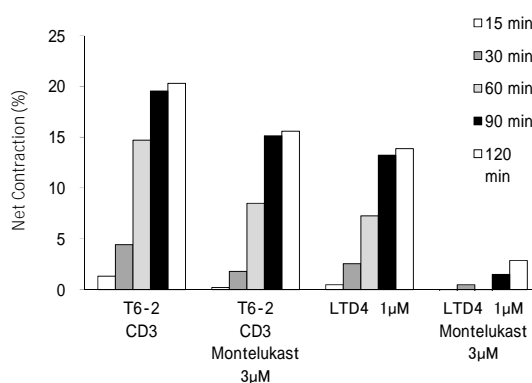


図 5 モンテルカスト前培養による平滑筋収縮に対する効果

最後に、モンテルカストの効果を *in vivo* で検証した。D011.10 transgenic mouse から OVA 特異的 Th クローンを樹立し、無処置の Balb/c マウスに移入した。Th クローン移入の 24 hr 後に OVA を経鼻的にチャレンジし、40 hr 後まで Penh 値を測定した。さらに、麻酔下にレスピレータを装着、拘束下にダイレクトに気道抵抗値を計測した。この場合も、約 6 時間後から気道抵抗値 ( $R_L$ ) の上昇を認めた。この T 細胞依存性、IgE 非依存性の気流閉塞に対して、ロイコトリエン阻害剤を投与した場合、Penh の抑制がみられた(結果略)。

これらの *in vitro*、*in vivo* の結果を総合して考察すると、ロイコトリエン阻害剤はダイレクト、インダイレクトに喘息反応

を調節している可能性が示唆される。

#### 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 18 件)

1. Sekiya, K., et al. 2013. Age-specific background of inpatients with severe asthma exacerbation. *Allergology International*. 62:331-25.
2. Takahashi, K., ..., Sekiya, K., et al. 2015. Oral Mite Anaphylaxis Caused by Mite-Contaminated Okonomiyaki Pancake-Mix in Japan: 8 Case Reports and a Review of 28 Reported Cases. *Allergology International*. 63: 51-56
3. Minami, T., ..., Sekiya, K., ..., Mori, A., et al. 2015. IgE Abs to Der p 1 and Der p 2 as diagnostic markers of house dust mite allergy as defined by a bronchoprovocation test. *Allergology International*. 64: 90-95

他、省略

[学会発表](計 54 件)

1. 関谷 潔史、...、森 晶夫、... : 成人喘息大発作症例における臨床背景の変化(年齢階級別の比較) 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、2013.4.19-21(東京)
2. Sekiya, K.、.....、Mori, A.、 et al. : Age-specific background in inpatients with severe asthma exacerbation、The 23th Congress of Interasthma Japan/North Asia、2013.6.28-29(東京)
3. 関谷 潔史、...、森 晶夫、... : 若年成人喘息におけるペット飼育が肺機能

に与える影響、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013.11.28-30(東京)

4. Sekiya, K.、Taniguchi, M.、Watai, K.、Saito, N.、Mitsui, C.、Hayashi, H.、Itoh, J.、Oshikata, C.、Tsurikisawa N.、Fukutomi, Y.、Tsuburai, T.、Mori, A.、 and Akiyama, K. : The Border line Fractional Exhaled Nitric Oxide in Patients With Prolonged / Chronic Cough、The 24th Congress of Interasthma Japan/North Asia、2014.7.18(名古屋)
- 他、省略

[図書](計 0 件)

[その他]  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

関谷 潔史(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)

研究者番号 : 90385774

##### (2)研究分担者

##### (3) 研究協力者

森 晶夫(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)

研究者番号 : 80251247

神山 智(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)

研究者番号 : 20626783