

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
（分担）研究報告書

重症喘息を対象としたCTLA4-Ig (Abatacept、オレンシア®) の適応拡大
をめざした医師主導治験および非臨床研究

研究分担者 神沼 修(東京都医学総合研究所主任研究員)

研究協力者

佐伯真弓(同研究所研究員)

西村友枝(同研究所研究員)

北村紀子(同研究所研究員)

廣井隆親(同研究所副参事研究員)

研究要旨

T 細胞レベルのステロイド抵抗性が難治性喘息の特徴であり、そのメカニズム解明が重要であるが、それが可能なモデル実験系はない。本年度は、ステロイド抵抗性獲得に関わる要因を解明するため、明確に分化した Th1, Th2, Th9 および Th17 細胞を用いて *in vitro* におけるステロイド抵抗性の比較を行うと共に、それぞれのサブセットに依存した実験喘息モデルを確立し、ステロイド抵抗性に関する検討を行った。D011.10/RAG2^{-/-}マウスより卵白アルブミン (OVA) 特異的 Th1, Th2, Th9, Th17 細胞を樹立した。それらのサイトカイン産生パターンを確認した後、*in vitro* のステロイド感受性を解析した結果、Th1 および Th17 は、Th2 および Th9 に比しステロイド感受性が低いことが明らかとなった。サイトカイン産生および炎症細胞浸潤のプロファイルが異なるにも関わらず、樹立したいずれの Th サブセットを移入したマウスにおいても、抗原チャレンジによって気道過敏性の亢進がみられたことから、T 細胞依存性の気道過敏性亢進発症に対し、ある種の炎症細胞が単独で機能している可能性は低いことが示唆された。各 Th 細胞移入マウスにおける炎症細胞浸潤および気道過敏性亢進に対する、ステロイドの作用検討を開始した。

T 細胞の反応性に対するステロイド感受性は、少なくとも *in vitro* では各サブセット間で異なることが明らかになった。またその結果が気道過敏性亢進に反映される可能性は高く、今後さらに解析を進めると共に、それらに対する CTLA4-Ig の効果を検討する計画である。

A. 研究目的

T 細胞レベルのステロイド抵抗性が難治性喘息の特徴であることが明らかになっている。ステロイド抵抗性のメカニズム解明は、難治性喘息の治療介入に向けた突破口として重要課題である。転写因子、細胞レベルの知見は比較的豊富であるが、個体レベルでステロイド抵抗性喘息の解析が可能なモデルの報告は未だ世界的にもみられない。そこで、*in vitro*、*in vivo* の両レベルでステロイド感受性・抵抗性を詳細に解析すると同時に、治療介入に向けた評価系として活用することをめざして、ステロイド抵抗性喘息モデルの樹立と解析を試みた。前年度、クローン化 T 細胞移入によるステロイド抵抗性マウス実験喘息モデルを確立し、CTLA4-Ig の効果を *in vivo* で解析することに成功した。本年度は、ステロイド抵抗性獲得に関わる要因を解明するため、明確に分化した Th1, Th2, Th9 および Th17 細胞を用い、*in vitro* におけるステロイド抵抗性の比較を行うと共に、それぞれのサブセットに依存した実験喘息モデルを確立し、ステロイド抵抗性に関する検討を行うこととした。

B. 研究方法

1) 既報に従い (Kaminuma O. et al. Clin Exp Allergy 42:315, 2012)、D011.10/RAG2^{-/-}マウスの末梢リンパ節よりリンパ球を回収、*in vitro* で抗原刺激を行った。その際、各 Th サブセットの分化に必要なサイトカインおよび抗サイトカイン抗体を添加することにより、OVA 特異的 Th1, Th2, Th9, Th17 細胞を樹立した。各 Th サブセットの分化状況は、*in vitro* において PMA + Ionomycin で再刺激し、産生されるサイトカインパターンを、細胞内染色および ELISA 法で解析することにより確認した。*In vitro* のステロイド感受性は、各 Th 細胞を抗原提示細胞、OVA、デキサメサゾン (DEX) とともに 96 well culture plate にて培養し、72 時間後に Non-radioactive cell proliferation assay kit を用いて細胞増殖反応を計測することにより評価した。各サブセットに依存した実験喘息モデルを製作するため、 2×10^7 個の各 Th 細胞を無処置 Balb/c マウスに尾静脈より注入し、翌日 OVA を経気道的にチャレンジした。72 時間後、Flexivent にてメサコリン気道反応性を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。

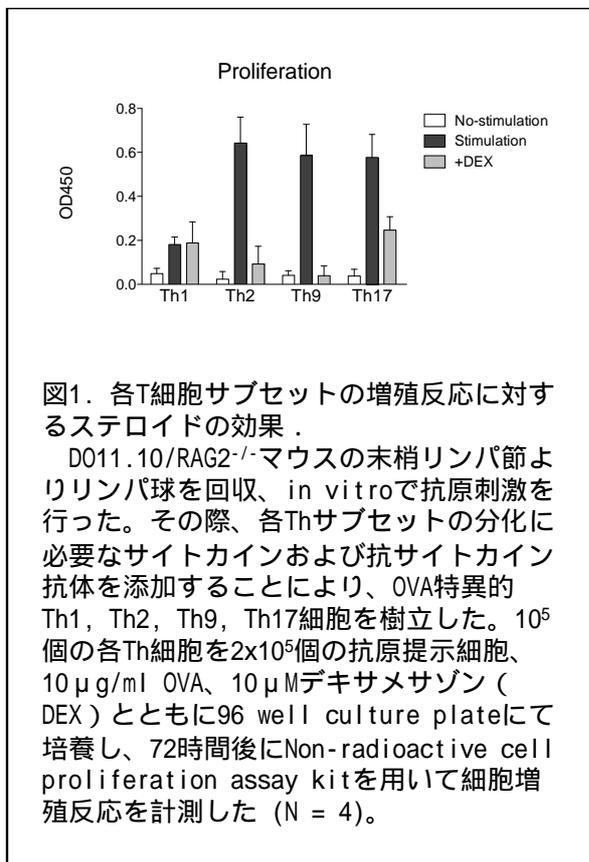


図1. 各T細胞サブセットの増殖反応に対するステロイドの効果。

D011.10/RAG2^{-/-}マウスの末梢リンパ節よりリンパ球を回収、in vitroで抗原刺激を行った。その際、各Thサブセットの分化に必要なサイトカインおよび抗サイトカイン抗体を添加することにより、OVA特異的Th1, Th2, Th9, Th17細胞を樹立した。10⁵個の各Th細胞を2x10⁶個の抗原提示細胞、10 μg/ml OVA、10 μMデキサメサゾン (DEX) とともに96 well culture plateにて培養し、72時間後にNon-radioactive cell proliferation assay kitを用いて細胞増殖反応を計測した (N = 4)。

(倫理面への配慮)

実験は、動物実験に関する倫理規定を遵守して行い、統計学的優位性を議論しうるできるだけ少ない動物数を実験に供した。

C. 研究結果およびD. 考察

1) サイトカイン産生パターンを検討した結果、各サブセットに明確に分化した抗原特異的T細胞が得られることが確認できた。それらを用いて *in vitro* のステロイド感受性を解析した結果、Th2およびTh9細胞はDEXにより細胞増殖反応が強く抑制されたのに対し、Th17細胞に対するDEXの抑制作用は比較的弱かった。またTh1細胞は、他のサブセットに比べて弱い増殖反応を示したが、それはDEXの添加により抑制されないことが明らかとなった。

2) 樹立したいずれのThサブセットを移入したマウスにおいても、抗原チャレンジによって気道過敏性の亢進がみられたが、その誘導能はTh1およびTh2細胞に比べ、Th9およびTh17細胞で強い傾向がみられた。またTh2細胞移入マウスでは強い気道内好酸球浸潤が認められたのに対し、Th1およびTh17細胞では好中球の浸潤が優位であり、Th9細胞移入マウスでは好酸球および好中球両者の浸潤が認められた。またリンパ球の浸潤も、Th1, Th2およびTh9細胞で誘導されたが、Th17細胞移入マウスでは殆どその浸潤はみられなかった。このことから、T細胞

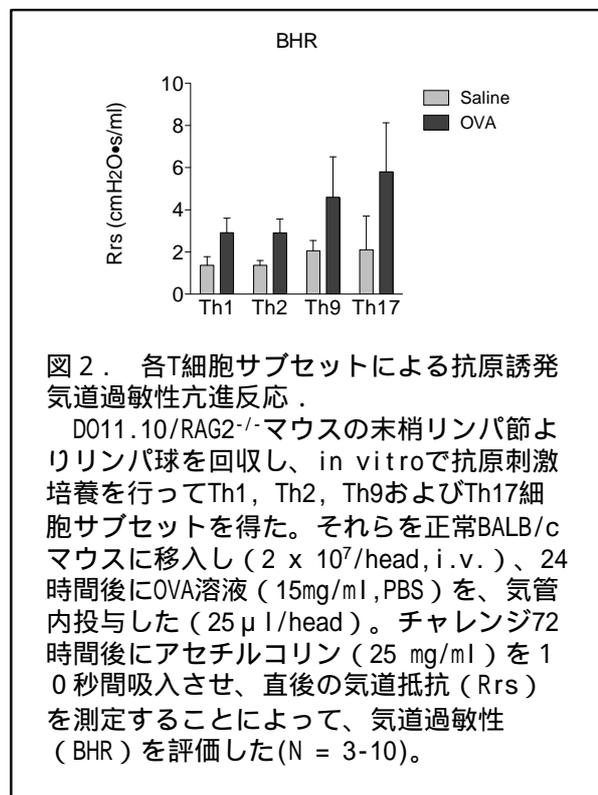


図2. 各T細胞サブセットによる抗原誘発気道過敏性亢進反応。

D011.10/RAG2^{-/-}マウスの末梢リンパ節よりリンパ球を回収し、in vitroで抗原刺激培養を行ってTh1, Th2, Th9およびTh17細胞サブセットを得た。それらを正常BALB/cマウスに移入し (2 x 10⁷/head, i.v.), 24時間後にOVA溶液 (15mg/ml, PBS) を、気管内投与した (25 μl/head)。チャレンジ72時間後にアセチルコリン (25 mg/ml) を10秒間吸入させ、直後の気道抵抗 (Rrs) を測定することによって、気道過敏性 (BHR) を評価した (N = 3-10)。

移入マウスにおける気道過敏性亢進の発症に対し、好酸球または好中球が単独で機能している可能性は低いことが示唆された。各Th細胞移入マウスにおける炎症細胞浸潤および気道過敏性亢進に対する、ステロイドの作用検討を開始した。

以上の結果から、T細胞の反応性に対するステロイド感受性は、各サブセット間で異なることが明らかになった。

E. 結論

T細胞サブセット間の比較により、T細胞レベルのステロイド抵抗性および、個体レベルでのステロイド抵抗性喘息、感受性喘息モデルのメカニズムが解明され、CTLA4-Igの評価が可能になる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nishimura T, Saeki M, Ohtsu H, Mori A, Kaminuma O, Hiroi T. Role of Histamine and Histamine Receptors in T cell function. *Allergol Int*, in press.
- Nishimura T, Saeki M, Kaminuma O, Takaiwa F, Hiroi T. Transgenic plants for allergen-specific immunotherapy. *World J Immunol*, 4:141-148, 2014.
- Mori D, Watanabe N, Kaminuma O, Murata T, Hiroi T, Ozaki H, Hori M. IL-17A induced hypo-contraction of intestinal smooth muscle via induction of iNOS in muscularis macrophages. *J Pharmacol Sci*, 125:394-405, 2014.

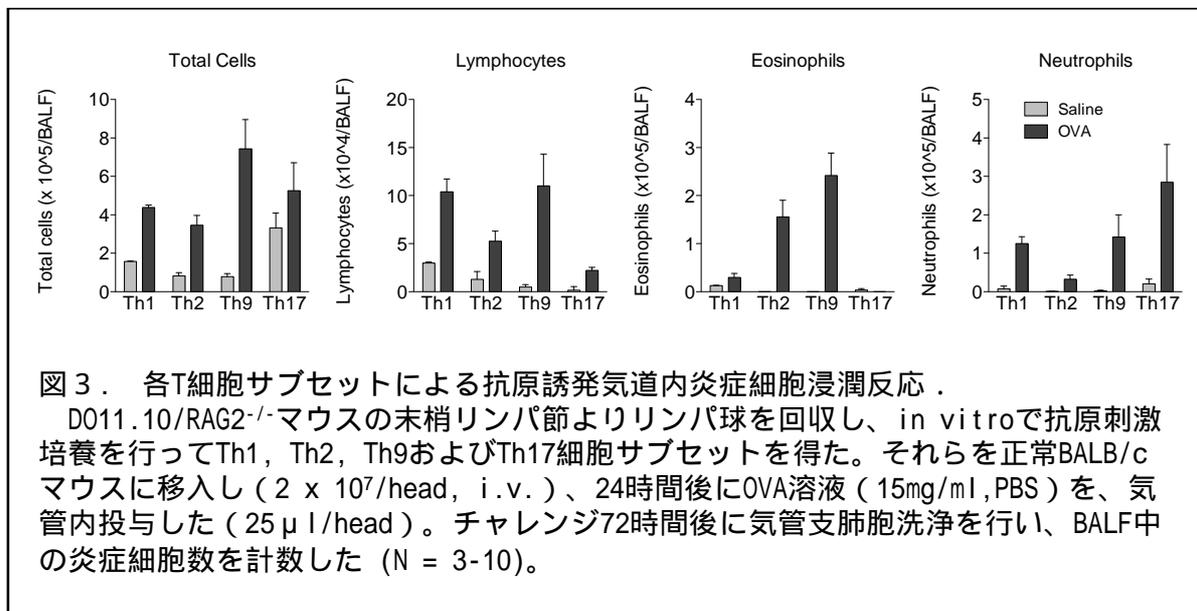


図3. 各T細胞サブセットによる抗原誘発気道内炎症細胞浸潤反応。

DO11.10/RAG2^{-/-}マウスの末梢リンパ節よりリンパ球を回収し、*in vitro*で抗原刺激培養を行ってTh1, Th2, Th9およびTh17細胞サブセットを得た。それらを正常BALB/cマウスに移入し(2 x 10⁷/head, *i.v.*)、24時間後にOVA溶液(15mg/ml, PBS)を、気管内投与した(25 μl/head)。チャレンジ72時間後に気管支肺胞洗浄を行い、BALF中の炎症細胞数を計数した(N = 3-10)。

4. Saeki M, Nishimura T, Mori A, Kaminuma O, Hiroi T. Antigen-induced mixed and separated inflammation in murine upper and lower airway s. *Allergol Int*, 63:S59-61, 2014.
5. Nishimura T, Saeki M, Motoi Y, Kitamura N, Mori A, Kaminuma O, Hiroi T. Selective suppression of Th2 cell-mediated lung eosinophilic inflammation by anti-major facilitator super family domain containing 10 monoclonal antibody. *Allergol Int*, 63:S29-35, 2014.
6. Shibahara K, Nakajima-Adachi H, Kaminuma O, Hiroi T, Mori A, Hachimura S. Food allergen-induced IgE response mouse model created by injection of *in vitro* differentiated Th2 cell culture and oral antigen intake. *Biosci Microb Food Health*, 31:41-46, 2014.
7. 神沼 修, 渡邊 伸昌, 後藤 穰, 中谷 明弘, 廣井 隆親. 特集 スギ・ヒノキ花粉症 X. スギ花粉症免疫療法の治療効果に連動したバイオマーカー. *アレルギー・免疫*. 21: 94-101, 2014.

2. 学会発表

1. 神沼 修. 免疫療法の治療効果を予見するバイオマーカーセット. 第88回日本薬理学会年会(名古屋)、ワークショップ6“疾患バイオマーカー研究の新展開”、2015.3.20.
2. Mori A, Kouyama S, Yamaguchi M, Iijima Y, Ohtomo A, Ohtomo T, Itoh J, Hayashi H, Watara i K, Mitsui C, Oshikata C, Fukutomi Y, Sekiya K, Tsuburai T, Maeda Y, Ohtomo M, Taniguchi M, Akiyama K, Kaminuma O. Development and treatment of steroid resistant asthma model by a doptive transfer of murine helper t cell clones. WAO International Scientific Conference 2014 (Rio de Janeiro, Brazil), 2014.12.6-9.
3. Kaminuma O, Kitamura N, Hiroi T. Diversity of nuclear factor of activated T cells in vertebrate organisms. 第87回日本生化学会大会(京都)、2014.10.17.
4. 西村 友枝, 佐伯 真弓, 北村 紀子, 大津 浩, 森 晶夫, 神沼 修, 廣井 隆親. マウスアレルギー性鼻炎モデルにおけるヒスタミンの関与. *アレルギー*

1. 好酸球研究会2014(東京)、2014.10.4.
5. 佐伯 真弓, 西村 友枝, 渡邊 伸昌, 森 晶夫, 神沼 修, 廣井 隆親. Th9細胞による気道過敏性亢進における好酸球の役割. *アレルギー・好酸球研究会2014(東京)*、2014.10.4.
6. 森 晶夫, 神山 智, 大友 暁美, 大友 隆之, 山口 美也子, 飯島 葉, 渡井 健太郎, 福原 正憲, 林 浩昭, 南 崇史, 三井 千尋, 伊藤 潤, 押方 智也子, 谷本 英則, 福富 友馬, 関谷 潔史, 粒来 崇博, 大友 守, 前田 裕二, 谷口 正実, 長谷川 真紀, 秋山 一男, 神沼 修. サイトカインからみた喘息の重症化要因. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会(京都)、シンポジウム2“喘息の重症難治化要因”、2014.5.9.
7. 西村 友枝, 佐伯 真弓, 森 晶夫, 後藤 穰, 大久保 公裕, 神沼 修, 廣井 隆親. マウスにおける抗原誘発鼻粘膜過敏性亢進反応に対する抗アレルギー薬の作用. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会(京都)、2014.5.9.
8. Kaminuma O, Kitamura N, Mori A, Hiroi T. S elective down-regulation of IL-2-mediated cytokine expression in human T cells by protein phosphatase 1 inhibitors. *EXPERIMENTAL BIOLOGY 2014 (San Diego)*, 2014.4.30.
9. 平出 恵利華, 足立 はるよ, 北村 紀子, 上 滝 隆太郎, 武山 純, 佐伯 真弓, 西村 友枝, 神沼 修, 廣井 隆親, 八村敏志. TCRトランスジェニックマウスを用いた食物アレルギーモデルにおけるTh2型皮膚炎の解析. 日本農芸化学会2014年度大会(東京)、2014.3.27-30.
10. Mori A, Kouyama S, Yamaguchi M, Iijima Y, Itoh J, Hayashi H, 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, Kaminuma O. Establishment and treatment of a steroid resistant asthma model by adoptive transfer of helper T cell clones. 2014 American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Annual meeting (San Diego), 2014.3.2.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし