

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	マスタ 千愛 増田 千愛（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第7号
学位授与の日付	平成30年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
学位論文題名	喘息における Th2 型免疫応答の性差に関与する樹状細胞機能の解析
論文審査委員	主査 教授 井ノ口 仁一
	副査 教授 丹野 孝一
	副査 教授 高橋 知子

喘息における Th2 型免疫応答の性差に関する 樹状細胞機能の解析

東北医科薬科大学大学院薬学研究科薬学専攻博士課程

病態生理学教室

増田千愛

目次

I. 要旨	5
II. 研究背景	9
III. 研究目的	13
IV. 研究方法	14
V. 研究結果	23
VI. 考察	32
VII. 結論	37
VIII. 謝辞	38
IX. 参考文献	39
X. Figure/Table	49

略語表

BALF	bronchoalveolar lavage fluid
BDCA	blood dendritic cell antigen
BLN	bronchial lymph node
BM	bone marrow
CCL	chemokine (c-c motif) ligand
CCR	chemokine (c-c motif) receptor
CD	cluster of differentiation
CFSE	5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
E2	17 β -estradiol
Fc ϵ RI α	Fc epsilon receptor 1 alpha
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HDM	house dust mite
ICOSL	inducible costimulatory ligand
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
ILC	innate lymphoid cell
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
OVA	ovalbumin

RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SSC	side scatter
TCR	T cell receptor
Th	helper T cell
Treg	regulatory T cell
TSLP	thymic stromal lymphopoietin

I 要旨

【背景・目的】

アレルギー性気管支喘息は、変動性をもった喘鳴や呼吸困難、繰り返し起こる咳を臨床症状とする疾患である。小児喘息の有病率や重症度は女児に比べて男児で高いが、思春期を過ぎた成人喘息では逆転して女性の方が高くなることから、年齢に関連した性ホルモンの変化が性差に関与している可能性が示唆されている。実際に、女性ホルモンであるエストロゲン補充療法や妊娠、生理周期の変化で喘息症状が悪化しやすいとの報告もある。免疫学的には、喘息患者における気道炎症の亢進には特に 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) 型免疫応答が関与しており、末梢血の Th2 サイトカイン産生 T 細胞は、男性患者よりも女性患者において増加する。Th2 細胞の誘導には、抗原提示細胞である樹状細胞が重要な役割を担っており、抗原吸入後の喘息患者の気道では、吸入前に比べて樹状細胞の集積が顕著であることが明らかとなっている。しかし、Th2 型免疫応答の性差に対する樹状細胞の役割については不明である。

そこで本研究では、成人喘息女性で亢進する Th2 型免疫応答に対する樹状細胞の役割に着目し、喘息モデルマウスを用いて、肺における主要な樹状細胞サブセットである cluster of differentiation (CD) 11b^{high(hi)} 樹状細胞と CD103⁺ 樹状細胞の性依存的役割および樹状細胞機能に対する性ホルモンの影響について解析を行った。

【方法】

喘息モデルマウスは、6~8 週齢のオスおよびメスの C57BL/6 マウスを用い、0 および 5 日目に卵白アルブミン (OVA) と水酸化アルミニウムの混合液を腹

腔内投与した後、26 日目に OVA を吸入させて作製した。

はじめに、OVA 吸入後のメサコリンに対する気道反応性および気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞を測定し、オスとメスにおける気道炎症の差を評価した。次に、OVA 吸入前および吸入後 1～3 日以内のオスとメスの肺および気管支リンパ節を採取し、樹状細胞数の経時的変化を CD11b^{hi} 樹状細胞と CD103⁺ 樹状細胞に分けて解析した。

肺 CD11b^{hi} 樹状細胞および CD103⁺ 樹状細胞の気管支リンパ節への移動能に関する性差を調べるために、肺樹状細胞上の CCR (chemokine (c-c motif) receptor) 7 発現を解析した。加えて、OVA 抗原取り込み能の性差を調べるために、蛍光標識 OVA を気管内に投与した後に気管支リンパ節樹状細胞の両サブセットにおける蛍光強度を測定した。続いて、Th2 細胞分化誘導能の性差を調べるために、気管支リンパ節細胞から分離した CD11b^{hi} 樹状細胞または CD103⁺ 樹状細胞と OVA ペプチド特異的 T 細胞受容体を発現する CD4⁺ T 細胞を共培養し、培養上清中の Th2 サイトカイン産生量の測定および CD4⁺ T 細胞の分化増殖割合の解析を行った。さらに、気管支リンパ節樹状細胞の両サブセットにおける Th2 細胞分化誘導関連分子の発現をオスとメスで比較した。

In vitro 実験においては、骨髓細胞から CD103⁺ 骨髓由来樹状細胞を作製し、OVA または IL-33 存在下における CD86 および major histocompatibility complex (MHC) II 発現への 17β-エストラジオールの影響を解析した。さらに、Th2 細胞分化および活性化能に対する CD86 発現を介した 17β-エストラジオールの影響を評価するために、17β-エストラジオール存在下で作製した CD103⁺ 骨髓由来樹状細胞と CD4⁺ T 細胞を共培養して、CD4⁺ T 細胞上の IL-33 受容体発現および培養上清中の Th2 サイトカイン産生量を測定した。

【結果】

喘息モデルマウスにおける OVA 吸入後のメサコリンに対する気道反応性はオスよりもメスで亢進しており、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数においてもオスよりもメスで有意に増加した。

オスおよびメスの肺における総樹状細胞数および CD11b^{hi} 樹状細胞数は、吸入前と比較して OVA 吸入後 16～20 時間にかけて増加し、16 時間後においてはオスよりもメスでその数が有意に増加していた。一方、CD103⁺ 樹状細胞数は OVA 吸入後の数の変化が認められなかった。肺 CCR7⁺ 樹状細胞の割合は CD103⁺ 樹状細胞のオスよりもメスで増加していたが、CD11b^{hi} 樹状細胞においてはそのような性差は認められなかった。さらに CCR7⁺ 樹状細胞数の比較では、いずれの樹状細胞サブセットにおいてもオスよりもメスでの増加が認められた。

気管支リンパ節における樹状細胞に着目すると、オスおよびメスの CD11b^{hi} 樹状細胞数および CD103⁺ 樹状細胞数は、吸入前と比較して吸入後 20～24 時間にかけて増加し、20 時間後においてはそれらの数がオスよりもメスで有意に増加していた。さらに、CD103⁺ 樹状細胞の OVA 抗原取り込み能および CD86 発現、MHC II 発現は、オスよりもメスで亢進していた。一方で、CD11b^{hi} 樹状細胞ではオスとメスの間に差は認められなかった。CD103⁺ 樹状細胞の Th2 細胞分化誘導能はオスとメスともに CD11b^{hi} 樹状細胞よりも亢進しており、さらに、メスの CD103⁺ 樹状細胞はオスの CD103⁺ 樹状細胞に比べて高い分化誘導能をもつことが明らかになった。

In vitro 実験では、OVA 存在下において、17 β -エストラジオールを添加して作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞上の CD86 発現および MHC II 発現は、17 β -エストラジオール無添加で作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞と比較して有意

に亢進していた。さらに、17 β -エストラジオールを添加して作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞による Th2 細胞分化および活性化能は、無添加群と比較して有意に亢進したが、その差は抗 CD86 抗体によって完全に消失し、17 β -エストラジオール添加群と無添加群ともに抗 CD86 抗体による Th2 細胞分化抑制が認められた。

【結論】

本研究結果から、喘息モデルのメスマウスの肺および気管支リンパ節における CD11b^{hi} 樹状細胞数および CD103⁺ 樹状細胞の数がオスよりも亢進していること、ならびにメスの CD103⁺ 樹状細胞の Th2 細胞分化誘導能および抗原取り込み能がオスよりも亢進していることが明らかとなった。さらに Th2 細胞分化誘導能の亢進には、CD86 発現を介して 17 β -エストラジオールが関与することを証明した。

II 研究背景

アレルギー性気管支喘息は、変動性をもった喘鳴や呼吸困難、繰り返し起こる咳を臨床症状とする疾患である。成人喘息患者を対象とした疫学調査で、総患者数は 88 万 8 千人と報告されており、そのうち約 70%は抗原特異的 Immunoglobulin (Ig) E が存在するアトピー型、約 30%は抗原が必ずしも明らかでない非アトピー型とされている。この疾患を生理学的にみると、可逆性の気道狭窄や気道過敏性の亢進が特徴的で、持続する気道炎症は気道閉塞とそれに続く気道リモデリングを惹起し、非可逆的な気流制限をもたらす。¹⁾ 組織学的には、好酸球やT細胞、肥満細胞などの炎症性細胞の浸潤と、気道上皮の剥離を伴う気道の炎症が特徴的である。このような特徴的所見は、浸潤した炎症性細胞と気道組織の構成細胞が分泌する様々な炎症性メディエーターおよびサイトカインの相互作用で生じる。¹⁾ 喘息における免疫応答は、特に 2 型ヘルパーT細胞 (Th2) 型免疫応答が優位になることでアレルギー性炎症を引き起こされるが、Th1 および Th17 細胞、制御性T細胞 (Treg)、2 型自然リンパ球 (ILC2) なども複雑に関与し合って形成されている。¹⁾ 気道から取り込まれた抗原は、抗原提示細胞により処理され、その一部が細胞表面に提示されると、ナイーブ T 細胞がそれを認識して活性化し、Th2 細胞へと分化して、Th2 型サイトカインを産生する。Th2 型サイトカインのうち Interleukin (IL) -5 は、好酸球の骨髄での分化および増殖、循環血中での特異的な活性化、気道局所への遊走、延命に深く関与する。IL-4 および IL-13 は、B 細胞に作用して IgE 抗体産生を促し、好酸球の選択的浸潤に関与する。¹⁾

生物学的な性は、細胞や分子、免疫学的な違いで定義づけられており、医学の分野においても疾患の重症度や治療反応性に関わる重要な調節因子として認

識されている。^{2) 3)} さらに、性は、気管支喘息における有病率や重要度、治療効果、副作用とも深く関与しており⁴⁾、救急外来受診後の喘息再発率が男性患者よりも女性患者で高いことや⁵⁾、全身的な炎症状態における気道過敏性の亢進に性が関与していることが報告されている。⁶⁾ 加えて、小児喘息の有病率や重症度は女児よりも男児で高いが、成人喘息では反対に男性よりも女性で高いことから、年齢に関連した性ホルモンの変化が性差に関与する可能性も報告されている。^{7) 8) 9)} 実際に、女性の喘息患者の 80%において女性ホルモンであるエストラジオールまたはプロゲステロン、副腎皮質ホルモンであるコルチゾールのうちいずれか 1 つ以上の濃度が非喘息女性に比べて高いこと¹⁰⁾ や、エストロゲン薬を単独使用した閉経後の女性は、ホルモン療法を行っていない閉経後の女性と比較して新たに喘息と診断される割合が高いこと^{11) 12)}、妊娠や生理周期の変化で喘息症状が悪化しやすいことが報告されている。¹³⁾ 臨床症例における免疫学的検討では、喘息患者の末梢血リンパ球を刺激すると IL-13 を産生する T 細胞が男性患者よりも女性患者で増加していることから¹⁴⁾、女性患者で亢進する Th2 型免疫応答が、女性患者で重症化する喘息病態の形成に重要である可能性が示唆されている。¹⁵⁾

喘息マウスモデルにおいても、喘息病態への性の影響が確認されている。OVA 誘導性喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液 (BALF) における CD4⁺ T 細胞数や好酸球数の増加、脾臓および気管支リンパ節 (BLN) における Th2 サイトカイン産生量の増加は、オスマウスよりもメスマウスで顕著に認められる。^{16) 17)} ¹⁸⁾ さらに、卵巣摘出またはエストラジオール拮抗薬処理したマウスでは OVA 吸入後に肺へ浸潤する好酸球数が減少し、卵巣摘出したメスマウスへエストラジオールを追加投与することにより BALF 中好酸球数が再び増加する。^{16) 19)}

樹状細胞は、最も卓越した抗原提示細胞である。アレルギー性気管支喘息の

重症化に重要な役割を担い、抗原存在下でナイーブ T 細胞を Th1 や Th2、Th17 細胞に分化させることができる。²⁰⁾ 抗原吸入 4～5 時間以内の喘息患者では、血中を循環している骨髄性樹状細胞が気道壁に移動し^{21) 22)}、抗原に対する免疫応答が起こりやすい状態がつくられる。ヒトの骨髄性樹状細胞は、細胞表面分子である BDCA1 (CD1c) または BDCA3 (CD141) 陽性のサブセットが知られており、Th2 型免疫応答が亢進している喘息患者の気道上皮では、Th2 型免疫応答が緩徐な喘息患者や健常人と比較して、BDCA1⁺ 骨髄性樹状細胞の集積が亢進している。²³⁾ アトピー性皮膚炎患者の成熟 BDCA1⁺ 骨髄性樹状細胞は、健常人のそれと比較して、IFN- γ 産生が少なく IL-4 を多く産生する Th 細胞を誘導する。²⁴⁾ さらに、アレルギー性鼻炎患者では、局所的な抗原曝露によって鼻粘膜および皮膚での骨髄性樹状細胞数および形質細胞様樹状細胞数が増加している。²⁵⁾ 一方で、喀痰中の骨髄性樹状細胞の BDCA3 発現は抗原曝露で増加し、BDCA3⁺ 骨髄性樹状細胞数の増加とハウスダスト抗原量は相関を示すことが報告されている²⁶⁾ ことから、BDCA1⁺ 骨髄性樹状細胞および BDCA3⁺ 骨髄性樹状細胞の両サブセットが喘息免疫応答に関与している可能性が示唆される。しかし、樹状細胞サブセットの男女差については未だ解明されておらず、Th2 型免疫応答の男女差へどのように関与しているのか不明である。

マウスを用いた最近の研究では、ヒト BDCA1⁺ 骨髄性樹状細胞および BDCA3⁺ 骨髄性樹状細胞のマウスホモログである CD11b⁺ CD103⁻ (CD11b⁺) 樹状細胞および CD11b⁻ CD103⁺ (CD103⁺) 樹状細胞が、抗原曝露後初期の Th2 反応に重要な役割を担う可能性が示唆されている。^{27) 28) 29)} 喘息モデルマウスにおいて樹状細胞を消失させることにより、リンパ節での Th2 サイトカイン産生および気道腔への好酸球浸潤は減少する。³⁰⁾ さらに、CD11b⁺ 樹状細胞または CD103⁺ 樹状細胞を選択的に消失させると、いずれの場合も喘息免疫応答が

有意に減弱する^{31) 32)}ことから、CD11b⁺ 樹状細胞および CD103⁺ 樹状細胞の両樹状細胞サブセットが、抗原吸入時の免疫応答の誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

本研究では、成人喘息女性で亢進する Th2 型免疫応答に対する樹状細胞の役割を明らかにすることを目的として、喘息モデルマウスを用いて、肺における主要な樹状細胞サブセットである CD11b^{hi} 樹状細胞と CD103⁺ 樹状細胞の数や機能における性依存性の解析と、樹状細胞機能に対する性ホルモンの影響を評価した。

Ⅲ 研究目的

本研究では、成人喘息女性で亢進する Th2 型免疫応答に対する樹状細胞の役割に着目し、喘息モデルマウスを用いて、肺における主要な樹状細胞サブセットである CD11b^{hi} 樹状細胞と CD103⁺ 樹状細胞の役割および樹状細胞機能に対する性ホルモンの影響について解析するため、[1]～[7]の点における性差を明らかにし、[8]および[9]では女性ホルモンの一つである 17β-エストラジオールによる樹状細胞の機能変化について明らかにする。

[1] OVA 吸入後の気道炎症

[2] 肺および気管支リンパ節における CD11b^{hi} 樹状細胞数と CD103⁺ 樹状細胞数の OVA 吸入後の経時的な変化

[3] 樹状細胞の遊走や分化、活性化に関与するケモカインおよびサイトカインの肺内発現量

[4] CD11b^{hi} 樹状細胞および CD103⁺ 樹状細胞の肺から気管支リンパ節への移動能

[5] CD11b^{hi} 樹状細胞および CD103⁺ 樹状細胞の OVA 抗原取り込み能

[6] CD11b^{hi} 樹状細胞および CD103⁺ 樹状細胞の Th2 細胞分化誘導能

[7] CD11b^{hi} 樹状細胞および CD103⁺ 樹状細胞における Th2 型免疫反応誘導に関与する分子発現

[8] Th2 型免疫反応誘導に関与する分子発現への影響

[9] Th2 細胞分化誘導能および活性化能への影響

IV 研究方法

1. マウス

オスおよびメスの C57BL/6 wild type (WT) マウスは CLEA Japan (Osaka, Japan) から、OT- I トランスジェニック (Tg) マウスおよび OT- II Tg マウスは Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) からそれぞれ購入した。すべてのマウスは東北医科薬科大学動物実験施設内の SPF (Specific pathogen free) 環境下で飼育し、実験は東北医科薬科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。実験期間中は、実験動物の苦痛の低減に充分配慮した。

2. 抗原感作と曝露

6～8 週齢の WT マウスを用いて、0 と 5 日目に 8 μ g の卵白アルブミン (OVA) と 4 mg の水酸化アルミニウム (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) の混合液 500 μ L を腹腔内投与して感作し、26 日目に 0.5% OVA を 1 時間ずつ 4 時間間隔で 2 回吸入曝露した。^{18) 33)}

3. 肺内白血球の採取

OVA 感作した WT マウスにおける OVA 吸入前と吸入後の各タイミングの肺内白血球は、これまでに報告されている方法で採取した。³⁴⁾ まず、心尖部より冷たい生食 5 mL を注入して肺内血液を還流し、全肺を摘出しホモジネートした。肺組織は、10% fetal calf serum (FCS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、100 U/mL ペニシリン G、100 μ g/mL ストレプトマイシン、10 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、20 U/mL コラゲナーゼ D、1 μ g/mL DNase I を含む RPMI 1640 (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) に懸濁して 37°C で 1 時間

培養した。続いて、40 μm のセルストレーナー (BD Falcon, Bedford, MA, USA) に通し、40% (v/v) パーコール(Pharmacia, Uppsala, Sweden) 4 mL に再懸濁して 80% (v/v) パーコール 4mL に乗せ、600 \times g 20 分 15 $^{\circ}$ C で比重遠心した。中間層の細胞を回収し、スライドガラスに乗せ、固定ならびに Diff-Quick (Sysmex Corp. Kobe, Japan) 染色してから顕微鏡でカウントした。肺内白血球分画は、細胞 200 個以上をカウントして出た割合を総白血球数に掛けて算出した。

4. 気管支肺胞洗浄液の採取

気管支肺胞洗浄液 (BALF) は、これまでに報告されている方法で採取した。¹⁸⁾ まず、OVA 吸入 3 日後または 5 日後のマウスの気管に挿入したカニューレを通して 0.5 mL の PBS を注入し、BALF を回収して、450 \times g 10 分 4 $^{\circ}$ C で遠心した。上清はサイトカイン測定のために -80 $^{\circ}$ C で保存した。沈殿した細胞のうち 1×10^5 個の細胞を Diff-Quick 染色した後、200 個以上を顕微鏡でカウントして白血球分画を算出した。BALF 中のエフェクター Th2 細胞数は、BD Aria II フローサイトメトリー (BD Biosciences, San Jose, CA) で解析した。

5. 樹状細胞の採取

OVA 感作した WT マウスの肺と気管支リンパ節 (BLN) は、OVA 吸入 16 時間または 20 時間後に採取した。肺内白血球と BLN 細胞の採取はこれまでに報告されている方法を用いた。¹⁷⁾ 各樹状細胞サブセットの細胞数は、カウントした肺内白血球数と BLN 細胞数および BD Aria II フローサイトメトリーで解析した総細胞中の樹状細胞割合で算出した。別の実験では、autoMACS Separator (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) と抗マウス panDC

MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて CD11c⁺ 細胞を濃縮し、BD Aria II フローサイトメトリーで SSC^{low} CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b^{hi} CD103⁻ 樹状細胞および SSC^{low} CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b⁻ CD103⁺ 樹状細胞をソーティングした。肺内樹状細胞の抗原取り込み能を解析する実験では、OVA 感作した WT マウスに、Alexa Fluor647 で蛍光標識した OVA (100 µg; Thermo Fisher Scientific) および LPS (0.1 µg; Sigma-Aldrich)、または非蛍光標識のエンドトキシンフリー OVA (Hyglos GmbH, Bernried am Starnberger See, Germany) および LPS を 50 µL の生食とともに気管内投与し、20 時間後の BLN を採取した。

6. 肺と気管支リンパ節ホモジネートの調整

RT-PCR 測定のため、OVA 感作した WT マウスの OVA 吸入前および吸入後 3、16、20 時間の肺および BLN を採取し、1% 2-メルカプトエタノールを含む Buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA, USA) 中でホモジナイズした。

サイトカイン測定のため、OVA 吸入 1 日後の肺を採取して、1% プロテアーゼインヒビター (Sigma-Aldrich) を含む 0.1% Triton-X PBS 中でホモジナイズし、15,000×g 15 分 4°C で遠心後の上清を -80°C で保存した。

7. 樹状細胞と T 細胞の共培養

CD4⁺ または CD8⁺ 細胞は、OT-II または OT-I のオスおよびメスマウスの脾細胞をそれぞれ採取し、抗マウス CD4 または CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を反応させた後、antoMACS Separator を用いて分離した。さらに、CD3⁺ CD4⁺ CD11c⁻ 細胞または CD3⁺ CD8⁺ CD11c⁻ 細胞を、BD Aria II フローサイトメトリーを用いて分離し、それぞれ CD4⁺ T 細胞または CD8⁺ T 細胞として実験に用いた。CD4⁺ T 細胞または CD8⁺ T 細胞の純度は、ソーティング後の細

胞に対して 99%以上であった。

これまでに CD4⁺ T 細胞からの Th2 サイトカイン産生量はオスとメスで異なるという報告があることから³⁵⁾、樹状細胞の機能における性差を解析する実験において、T 細胞の性の影響を最小限にするために、オスとメスの T 細胞を 1 : 1 の割合で混合して共培養実験に用いた。樹状細胞と CD4⁺ T 細胞または樹状細胞と CD8⁺ T 細胞を 1 : 3 の割合で混ぜ、OVA₃₂₃₋₃₃₉ または OVA₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドをそれぞれ添加し、10% FCS、100 U/mL ペニシリン G、100 µg/mL ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンおよび 50 µM 2-メルカプトエタノールを含んだ RPMI1640 で培養した。その後、1 µg/mL の抗 CD3ε 抗体 (Clone 145-2C11; BioLegend, San Diego, CA, USA) および 5 µg/mL の抗 CD28 抗体 (Clone 37.51; BioLegend) でコートしたマイクロウェルに移して培養した。別の実験では、CD4⁺ T 細胞を 1 µM 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE ; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) と 10 分間反応させてから、CD103⁺ 樹状細胞と 2 日または 4 日間共培養した。

8. CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞の作製

CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞は、これまでに報告されている方法を用いて作製した。³⁶⁾ まず、0 日目にオスの WT マウスから骨髄細胞を採取し、10% FCS、100 U/mL ペニシリン G、100 µg/mL ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンおよび 50 µM 2-メルカプトエタノールを含みフェノールレッドなしの RPMI1640 10mL に懸濁し、 1.5×10^6 個/mL に調整した。次に、3 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF ; Wako pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) および 200 ng/mL murine FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L ; PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) を

添加して、vehicle、17 β -estradiol (E2 ; 1 \times 10⁻⁷M ; Sigma-Aldrich) または E2 + ICI182,780 (1 \times 10⁻⁷M ; Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) 存在下で培養した。ICI182,780 はエストロゲン受容体アンタゴニストである。9 日目に非接着細胞を回収し、0 日目と同じように GM-CSF および Flt3L を含む完全培地 10 mL に 3 \times 10⁶ 個/mL になるように懸濁し、vehicle、E2 または E2 + ICI182,780 存在下で培養した。15 日目に非接着細胞を回収し、CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞として実験に使用した。CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞は、vehicle、E2、E2 + ICI182,780 存在下で、OVA またはマウスリコンビナント IL-33 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を添加し 24 時間培養した。別の実験では、CD86/CD28 の共刺激分子をブロックするために、0.25 μ L/mL の抗 B7-2/CD86 抗体 (R&D Systems, Inc.) またはそのアイソタイプ抗体を添加して培養した。

9. ELISA 法

IL-4、IL-5、IL-13、IL-17A、IL-33 および IFN- γ 量は、ELISA kits (eBioscience, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。IL-4、IL-5、IL-13 および IL-17A の検出限界は 4 pg/mL、IL-33 は 25 pg/mL、IFN- γ は 15 pg/mL である。一方、CCL20 量は ELISA kits (R&D System, Inc.) を用いて測定した。検出限界は 0.30 pg/mL である。さらに、肺ホモジネートにおいては、detergent-compatible protein assay kit (Bio-Red Laboratory, Hercules, CA, USA) を用いてタンパク量を測定し、サイトカインおよびケモカイン量の値を除いて濃度を算出した。

10. フローサイトメトリー解析

肺内白血球または BLN 細胞を、1% FCS および 0.1% アジ化ナトリウムを含む PBS に懸濁し、 1×10^6 個/100 μ L に調整した。そして、抗 Fc γ R II/III mAb (Clone93 ; BioLegend) を加えて 15 分間反応させた。樹状細胞サブセットまたはマクロファージをゲートするために、FITC 標識した抗 I-A/I-E 抗体 (Clone M5/114.15.2 ; BioLegend)、PE 標識した抗 CD11c 抗体 (Clone N418 ; BioLegend)、PerCP 標識した抗 CD11b 抗体 (Clone M1/70 ; BioLegend) および PE/Cy7 標識した抗 CD103 抗体 (Clone 2E7 ; BioLegend) で染色した。樹状細胞上の表面分子発現を評価する実験では、APC 標識した抗 CD40 抗体 (Clone 3/23 ; BioLegend)、抗 CD80 抗体 (Clone 16-10A1 ; BioLegend)、抗 CD86 抗体 (Clone GL-1 ; BioLegend) または Alexa Fluor 700 標識した抗 CCR7 抗体 (Clone 4B12 ; eBioscience, San Diego, CA, USA) を用いた。樹状細胞上の IL-33 受容体発現を調べる実験では、FITC 標識した抗 ST2 抗体 (Clone DJ8 ; MD Biosciences, Oakdale, MN, USA)、PE 標識した抗 CD11c 抗体、PerCP 標識した抗 CD11b 抗体、PE/Cy7 標識した抗 CD103 抗体および APC/Cy7 標識した抗 I-A/I-E 抗体 (Clone M5/114.15.2 ; BioLegend) で細胞を染色した。*In vitro* 実験における CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞上の CD86 および MHC II 発現を評価する実験では、FITC 標識した抗 I-A/I-E 抗体および APC 標識した抗 CD86 抗体で細胞を染色した。さらに、共培養実験に用いる CD4⁺ T 細胞を単離するために、OT-II Tg マウスの脾細胞を FITC 標識した抗 CD4 抗体 (Clone GK1.5 ; BioLegend)、PE 標識した抗 CD11c 抗体および PerCP 標識した抗 CD3 ϵ 抗体 (Clone 145-2C11 ; BioLegend) で染色した。CFSE を用いた CD4⁺ T 細胞の分化増殖実験では、OT-II Tg マウスの脾細胞を PE 標識した抗 CD11c 抗体、APC/Cy7 標識した抗 CD4 抗体 (Clone GK1.5 ; BioLegend) および PerCP 標

識した抗 CD3 ϵ 抗体または APC 標識した抗 CD3 ϵ 抗体 (Clone 145-2C11 ; BioLegend) で染色した。加えて、共培養実験に用いる CD8⁺ T 細胞を単離するために、OT- I Tg マウスの脾細胞を FITC 標識した抗 CD8 α 抗体 (Clone 53-6.7 ; BioLegend)、PE 標識した抗 CD11c 抗体および PerCP 標識した抗 CD3 ϵ 抗体で染色した。CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞と共培養した BLN CD4⁺ T 細胞上の IL-33 受容体発現を評価する実験では、FITC 標識した抗 ST2 抗体および APC 標識した抗 CD3 ϵ 抗体で細胞を染色した。BALF 中のエフェクター Th2 細胞を評価する実験では、FITC 標識した抗 CD3 ϵ 抗体 (Clone 145-2C11 ; BioLegend) または APC/Cy7 標識した抗 CD3 ϵ 抗体 (Clone 17A2 ; BioLegend)、PE 標識した抗 CD44 抗体 (Clone IM7 ; BioLegend)、PerCP 標識した抗 CD62L 抗体 (Clone MEL-14 ; BioLegend)、APC 標識した抗 ST2 抗体 (Clone DIH9 ; BioLegend) および Alexa Fluor 700 標識した抗 CD4 抗体 (Clone RM4-5 ; BD Bioscience) を用いて細胞を染色した。陽性細胞集団および平均蛍光強度 (MFI) は、各抗体のアイソタイプ抗体および FMO (fluorescence minus one) コントロールを用いて定義した。死細胞は、LIVE/DEAD fixable blue dead cell attain kit (Thermo Fisher Scientific) で染色し、解析から除いた。これらのデータは Diva (BD Biosciences) および FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) ソフトウェアを用いて解析した。

11. リアルタイム RT-PCR 測定

樹状細胞、肺ホモジネートおよび BLN ホモジネートの RNA 抽出は、ReliaPrep RNA cell miniprep system (Promega Corporation, WI, USA) または RNeasy micro kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いて行った。逆転写は、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa Bio Inc., Otsu,

Japan) を用いて行った。リアルタイム RT-PCR 測定は、遺伝子特異的なプライマー、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) および StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用いた。使用した各遺伝子のプライマー配列を Table 1 に示す。各遺伝子発現量は、スタンダードによる検量線を用いて、ハウスキーピング遺伝子である HPRT で除して算出した。

12. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法による測定は、これまでに報告されている方法を用いた。³⁷⁾ 調整した肺ホモジネートのサンプルは、アガロースゲルで電気泳動し、PVDF メンブレンに転写した。検出には抗 alpha Tubulin 抗体 (abcam, Cambridge, UK) および抗 IL-33 抗体 (MBL CO., LTD, Nagoya, Japan) を 1 次抗体として用いた。さらに、2 次抗体として抗ウサギ IgG HRP 抗体および抗マウス IgG HRP 抗体 (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を使用した。基質として、Amersham™ ELC™ Prim Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を使用し、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) で撮影した。

13. 共焦点顕微鏡解析

蛍光標識なしの OVA で感作したオスとメスの WT マウスに、Alexa Fluor 647 で蛍光標識した OVA を気管内投与し、20 時間後の BLN を採取した。BLN 細胞は、CellMask green plasma membrane stain (Thermo Fisher Scientific) および SYTO82 orange fluorescent nucleic acid stain (Thermo Fisher Scientific) で染色した。その後、10% FCS、0.1% アジ化ナトリウム、10mM HEPES を含む Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) で 1×10^5 個/200 μ L に

なるように懸濁し、35 mm glass bottom dishes (Matsunami Glass Ind., Ltd, Osaka, Japan) に撒いた。観察は、油浸対物レンズ (60×UPLSAPO, numerical aperture 1.35) および Fluoview FV1000 confocal laser scanning microscopy (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて行い、FV1000 software version 4.2 (Olympus) で解析した。

14. 気道反応性の測定

気道反応性はこれまでに報告されている方法で測定した。^{38) 39)} Buxco whole plethysmography (Buxco Electronics, Sharon, CT, USA) を用いてベースラインを引き、吸入した生食または 0~20 mg/mL メサコリン (Sigma-Aldrich) に対する反応を各濃度 3 分間ずつ測定した。

15. 統計学的解析

統計解析は、GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。2 群間の有意差検定は両側検定で対応のない 2 群間の検定 (Student's t-test) を用いた。3 群間以上の有意差検定は ANOVA with a post hoc 検定 (Turkey' multiple comparison test) を用いた。P 値は 0.05 未満を有意差ありと判定した。

V 研究結果

1. 抗原吸入後の気道炎症はメスマウスで亢進する

気道過敏性の亢進は、喘息病態において最も深刻な症状のひとつである。そこでまず私は、OVA 誘導性喘息モデルマウスにおける気道反応性の性差を確認した。OVA 吸入群では、抗原吸入 1 日後のオスとメスともにメサコリン濃度依存的な気道反応性の亢進が観察されたが、対照群である生理食塩水吸入群では亢進が認められなかった。さらに、OVA 吸入群のメスの気道反応性はオスに比べて有意に亢進していた (Fig. 1A)。それから、OVA 吸入 3 日後の BALF 中の IL-4、IL-5 および IL-13 産生量は、オスに比べてメスで有意に高く (Fig. 1B)、OVA 吸入 5 日後の BALF 中の好酸球数 (Fig. 1C) およびエフェクター Th2 細胞数 (Fig. 1D) は、オスよりもメスで有意に増加していた。これらの結果より、OVA 吸入後の気道炎症は、オスに比べてメスで有意に亢進することが確認された。

次に私は、OVA 吸入後 24 時間以内の肺における炎症細胞数をオスとメスで比較した。Fig. 2A に示すように、オスおよびメスの肺内白血球数は OVA 吸入より 16~20 時間後に増加し、16 時間後のメスの肺内白血球数はオスに比べて有意に増加した。白血球の分画ごとに細胞数の性差を解析すると、単核球数は OVA 吸入 16 時間後のオスよりもメスで有意に増加していたが、好酸球数、好中球数およびリンパ球数には性差が認められなかった (Fig. 2B)。喘息モデルマウスにおける OVA 吸入後の肺重量には性差が認められないこと (Fig. 2C) から、肺内白血球数および肺内単核球数の性差が炎症の程度における性差を反映している可能性が示唆された。

2. 肺の樹状細胞数はメスマウスで増加する

Fig. 3A に示すように、単核球分画に含まれる総樹状細胞 ($CD11c^{hi} MHC II^{hi}$ 樹状細胞) を主要なサブセットである $CD11b^{hi}$ 樹状細胞 ($CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b^{hi}$ 樹状細胞) と $CD103^{+}$ 樹状細胞 ($CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b^{-} CD103^{+}$ 樹状細胞) に分けて、OVA 吸入後の肺におけるそれぞれの樹状細胞数の経時的変化を観察した。OVA 吸入前と比較して、オスの総樹状細胞数は吸入 20~24 時間後にかけて、メスでは 16~20 時間後にかけてそれぞれ増加した。さらに OVA 吸入 16 時間後の総樹状細胞数は、オスよりもメスで有意に増加した (Fig. 3C)。 $CD11b^{hi}$ 樹状細胞数は、総樹状細胞数と同様に、オスでは OVA 吸入 20~24 時間後、メスでは OVA 吸入 16~20 時間後に増加が認められ、OVA 吸入 16 時間後の細胞数はオスよりもメスで有意に増加した (Fig. 3B、3C)。対照的に、 $CD103^{+}$ 樹状細胞数は OVA 吸入 16 時間後の肺においてオスよりメスで有意に増加していたものの、OVA 吸入前と比較して 24 時間以内の細胞数の増加が認められなかった (Fig. 3B・C)。同じく単核球分画に含まれるマクロファージ ($CD11c^{hi} MHC II^{low} SSC^{hi} cell$) においても、OVA 吸入による細胞数の増加や性差は認められなかった (Fig. 3D)。これらの結果から、肺内単核球数の増加と一致して、OVA 吸入後早期の肺内樹状細胞数がオスマウスよりもメスマウスで増加することが、抗原吸入後の炎症の性差に関与する可能性が示唆された。

3. 樹状細胞の遊走、分化、活性化に関与する液性因子はメスマウスで増加する

OVA 吸入後の肺内樹状細胞の動態の性差を明らかにするために、未熟な樹状細胞や樹状細胞の前駆細胞、単球の遊走に関与するケモカイン mRNA 発現をオスとメスの間で比較した。Fig. 4A に示すように、OVA 吸入 3 時間後および 16

時間後の CCL20 発現はオスよりもメスで有意に亢進していたが、CCL2、CCL7、CCL19 および CCL21 発現には性差が認められなかった。さらに、成熟樹状細胞への分化や活性化に関与する Flt3L および IL-33 の mRNA 発現は、OVA 吸入 3 時間後および 16 時間後のオスの肺に比べてメスの肺で有意に亢進していたが、GM-CSF、M-CSF、TSLP 発現に性差は認められなかった (Fig. 4B)。一方、IL-25 mRNA はオスとメスのいずれの肺においても検出されなかった (データなし)。加えて、CCL20 と IL-33 の肺内タンパク量は mRNA 発現と同様に、オスよりメスで有意に増加していた (Fig. 4C)。さらに、IL-33 の前駆体でありアレルギー性炎症に関与する Pro IL-33 の肺におけるタンパク量も、オスに比べてメスで有意に増加していた (Fig. 4D)。

4. 肺から気管支リンパ節への移動能はメスの樹状細胞で亢進する

肺で抗原を取り込んだ樹状細胞は、T 細胞への抗原提示を行うために気管支リンパ節 (BLN) へ遊走する。そこで、樹状細胞の BLN への移動に関与するケモカイン受容体の CCR7 発現およびそのリガンドであるケモカインの CCL19、CCL21 発現の性差を確認した。Fig. 5A に示すように、肺の CD11b^{hi} 樹状細胞における CCR7 発現細胞の割合は、OVA 吸入前後での変化および性差が認められなかったが、CD103⁺ 樹状細胞では、吸入によって CCR7 を発現する樹状細胞の割合が増加し、その割合はオスに比べメスで有意に高かった。肺における CCR7⁺ 樹状細胞数を比較すると、オスとメスの CD11b^{hi} 樹状細胞および CD103⁺ 樹状細胞のいずれにおいても、OVA 吸入前に比べ吸入後において CCR7⁺ 樹状細胞数の増加が認められ、さらに OVA 吸入 16 時間後におけるそれらの数はオスよりもメスで有意に増加した (Fig. 5B)。一方、CCL19 および

CCL21 の mRNA 発現をオスとメスの BLN 組織で測定したところ、OVA 吸入前と比較して OVA 吸入 16 時間後または 20 時間後における発現亢進が認められたものの、いずれの時間においても性差は認められなかった (Fig. 5C)。これらの結果より、CD11b^{hi} 樹状細胞と CD103⁺ 樹状細胞の両サブセットにおいて、オスよりもメスで BLN への移動能が優れている可能性が示唆された。

5. 遊走性 CD103⁺ 樹状細胞の抗原取り込み能はメスで亢進する

BLN には、常在性 (CD11c^{hi} MHC II^{dim}) 樹状細胞と遊走性 (CD11c^{hi} MHC II^{hi}) 樹状細胞が存在する。まず、肺で OVA を取り込んだ樹状細胞が BLN へ移動してきたことを確認するため、蛍光標識した OVA を気管内投与し、投与から 20 時間後の BLN 樹状細胞における OVA の蛍光強度を解析した。Fig. 6A に示すように、常在性樹状細胞の OVA 取り込みは限定的で、遊走性樹状細胞が多くの OVA を取り込んでいることが明らかになった。いずれの樹状細胞もオスとメス間で OVA の取り込みに有意な差は認められなかったが、メスの遊走性樹状細胞はオスのそれよりも多くの OVA を取り込んでいる傾向にあった。さらに、樹状細胞の細胞膜と核を染色して共焦点顕微鏡で観察すると、気管内投与した蛍光標識 OVA が細胞内に取り込まれていることが視覚的にも確認された (Fig. 6B)。次に、BLN 樹状細胞における常在性樹状細胞と遊走性樹状細胞の割合を比較すると、オスマウスの BLN 樹状細胞のうち $81.3 \pm 2.8\%$ が、メスマウスの BLN 樹状細胞のうち $79.2 \pm 5.6\%$ がそれぞれ遊走性樹状細胞であり、BLN における常在性樹状細胞と遊走性樹状細胞の割合に性差は認められなかった (Fig. 6C)。遊走性樹状細胞を CD11b^{hi} 樹状細胞と CD103⁺ 樹状細胞のサブセットに分けて解析すると、メスの CD103⁺ 樹状細胞における OVA 蛍光強度はオスより

も高いが、CD11b^{hi} 樹状細胞ではそのような性差が認められなかった (Fig. 6D)。これらの結果より、BLN における遊走性樹状細胞が T 細胞への抗原提示に関与しており、特に、遊走性 CD103⁺ 樹状細胞における抗原取り込み能がオスよりもメスで亢進している可能性が明らかとなった。

6. 気管支リンパ節の遊走性樹状細胞数はメスマウスで増加する

次に私は、BLN における遊走性樹状細胞数を解析した。Fig. 7A に示すように、OVA 吸入後の遊走性樹状細胞の総数およびその樹状細胞サブセットである CD11b^{hi} 樹状細胞数、CD103⁺ 樹状細胞数は、オスとメスともに OVA 吸入 20～24 時間後に増加し、その後 72 時間にかけて減少した。さらに OVA 吸入 16 時間後または 20 時間後の細胞数はオスよりもメスで有意に増加していた (Fig. 7B、7C)。

7. CD103⁺ 樹状細胞の Th2 細胞分化誘導能はメスマウスで亢進する

BLN 遊走性樹状細胞の Th2 細胞分化誘導能における性差を調べるために、BLN より CD11b^{hi} 樹状細胞と CD103 樹状細胞を分離し、OT-II Tg マウスまたは OT-I Tg マウスの脾臓より OVA ペプチド特異的 TCR を発現する T 細胞 (CD3⁺ CD4⁺ CD11c⁻ 細胞または CD3⁺ CD8⁺ CD11c⁻ 細胞) をそれぞれ分離した。分離したオスとメスの樹状細胞は、形態学的な違いが認められなかった (Fig. 8A)。次に、分離した樹状細胞および T 細胞に OVA ペプチドを添加して、共培養実験を行った。培養開始から 6 日後の培養上清中の IL-4、IL-5、IL-13 は、オスとメスともに CD11b^{hi} 樹状細胞と CD4⁺ T 細胞との共培養よりも CD103⁺ 樹状細胞

細胞と CD4⁺ T 細胞との共培養において高く産生されており、メス CD103⁺ 樹状細胞との共培養における産生量はオス CD103⁺ 樹状細胞とのそれに比べて有意に高かった (Fig. 8B)。一方、CD11b^{hi} 樹状細胞との共培養では培養上清中の Th2 サイトカイン産生量の性差が認められなかった (Fig. 8B)。CD4⁺ T 細胞から産生される IFN- γ 産生量は、Th2 サイトカイン産生量よりも 10~100 倍多かったが、CD11b^{hi} 樹状細胞と CD103⁺ 樹状細胞のどちらの樹状細胞と共培養した場合でも培養上清中の IFN- γ 量に性差は認められなかった (Fig. 8B)。さらに、CD4⁺ T 細胞から産生される IL-17A 産生量は他のサイトカインに比べて 40~4000 倍少なく、その産生量には CD11b^{hi} 樹状細胞と CD103⁺ 樹状細胞どちらの樹状細胞と共培養した場合でも性差が認められなかった (Fig. 8B)。加えて、Fig. 8C に示すように、メスの CD103⁺ 樹状細胞はオスのそれと比べて CD8⁺ T 細胞から IL-5 を多く産生させたが、CD11b^{hi} 樹状細胞ではそのような性差は認められなかった (Fig. 8C)。一方、両サブセットとも CD8⁺ T 細胞による IFN- γ 産生量に対して樹状細胞の性による違いは認められなかった (Fig. 8C)。最後に、CD103⁺ 樹状細胞の CD4⁺ T 細胞分化増殖能の性差を明らかにするため、CFSE ラベルした CD4⁺ T 細胞を用いて解析したところ、メス CD103⁺ 樹状細胞と共培養した CD4⁺ T 細胞の分化増殖は、培養開始 2 日後と 4 日後のいずれにおいても、オス CD103⁺ 樹状細胞と共培養したそれらと比較して有意に亢進していた (Fig. 8D、8E)。これらの結果から、CD11b^{hi} 樹状細胞と比べて CD103⁺ 樹状細胞に強い Th2 細胞分化誘導能があり、メスにおけるその亢進は Th2 型免疫応答の性差に主要な役割をもつ可能性が示唆された。

8. CD103⁺ 樹状細胞における Th2 細胞分化誘導に関与する分子発現はメスマウスで亢進する

メスの CD103⁺ 樹状細胞がオスの CD103⁺ 樹状細胞よりも Th2 細胞分化を促進している可能性をさらに裏付けるため、Th2 細胞分化誘導への関与が報告されている分子発現の性差を BLN 樹状細胞サブセットごとに評価した。メス CD103⁺ 樹状細胞における CD86 および MHC II 発現はオスに比べて有意に亢進していたが、CD40、CD80、FcεRIα、OX40L、Jagged2、ICOSL および TSLPR 発現に性差は認められなかった。一方、CD11b^{hi} 樹状細胞においては、いずれの分子発現にも性差が認められなかった (Fig. 9A、9B および 9C)。さらに、IL-33 受容体発現は、メス CD11b^{hi} 樹状細胞に比べてメス CD103⁺ 樹状細胞で有意に高く、オスではサブセット間の差が認められなかった (Fig. 9D)。これらの結果より、メスの CD103⁺ 樹状細胞はオスの CD103⁺ 樹状細胞よりも Th2 細胞分化誘導能が亢進しており、メスマウスにおける CD103⁺ 樹状細胞は CD11b^{hi} 樹状細胞よりも IL-33 による活性化を受けやすい可能性が示唆された。

9. 17β-エストラジオールは CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞の CD86 および MHC II 発現を亢進させる

女性ホルモンは樹状細胞の Th2 型免疫反応を促進させる可能性が報告されている。^{40) 41)} CD103⁺ 樹状細胞における Th2 細胞分化誘導関連分子発現への性ホルモンの影響を調べるために、女性ホルモンであるエストロゲンの中で最も活性が高い 17β-エストラジオール (E2) を用いて検討を行った。骨髄細胞より作製した樹状細胞は CD11b を発現せず CD103 を発現していた (Fig. 10A)。E2 を添加して作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞では、E2 無添加で作製した

CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞と比較して、OVA 存在下における CD86 および MHC II 発現が亢進し、OVA + IL-33 存在下でさらにそれらの発現が亢進した (Fig. 10B)。E2 によるそれらの分子発現の亢進は、エストロゲン受容体アンタゴニストの前添加で消失した (Fig. 10B)。一方、E2 無添加で作製し、15 日目にのみ E2 を添加した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞では、OVA 存在下においても CD86 および MHC II 発現の亢進が認められなかった (Fig. 10C)。興味深いことに、IL-33 単独存在下では、E2 による CD86 および MHC II 発現亢進が認められなかった (Fig. 10B)。これらの結果から、E2 は抗原存在下において Th2 細胞分化を誘導する分子発現を亢進し、E2 を CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞の活性化段階ではなく分化段階から作用させることが重要である可能性が示唆された。

10. 17β-エストラジオールは CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞の Th2 細胞分化誘導および活性化能を亢進する

次に、E2 添加で作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞による Th2 細胞分化誘導および活性化能を確認するため、CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞と BLN CD4⁺ T 細胞との共培養実験を行い、CD4⁺ T 細胞上 IL-33 受容体発現および培養上清中 Th2 サイトカイン産生量をもって評価した。E2 添加で作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞は、E2 無添加群と比較して、OVA 存在下における CD4⁺ T 細胞上の IL-33 受容体発現が亢進した。その発現亢進は、エストロゲン受容体アンタゴニストの前添加で消失した (Fig. 11A)。さらに、E2 添加で作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞との共培養上清中では、E2 無添加群と比較して、Th2 サイトカイン産生量が増加した (Fig. 11B)。これらの結果から、E2 が CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞による Th2 細胞への分化および活性化を促進させている可能性が示

唆された。

11. 17 β -エストラジオールによる樹状細胞の CD86 発現亢進が Th2 細胞分化誘導および活性化を促進する

さらに私は、E2 によって亢進する CD103⁺ 樹状細胞の Th2 細胞分化誘導および活性化能における CD86 分子の影響を解析した。E2 添加で作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞と CD4⁺ T 細胞との共培養では、E2 無添加で作製した CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞との共培養と比較して、CD4⁺ T 細胞からの Th2 サイトカイン産生量が多かった。E2 添加群と無添加群ともに抗 CD86 抗体により Th2 サイトカイン産生が抑制され、抗 CD86 抗体の存在下では E2 により認められた Th2 サイトカイン産生の増加は完全に消失した (Fig. 11C)。これらの結果から、E2 が CD103⁺ 骨髄由来樹状細胞上の CD86 発現亢進を介して Th2 細胞への分化および活性化を促進させる可能性が示唆された。

VI 考察

本研究は、喘息モデルにおける Th2 型免疫応答亢進の性差に対して、BLN CD103⁺ 樹状細胞の数および機能的な性差が重要な役割を担う可能性を示唆した最初の報告である。これまで私たちは、OVA 刺激された BLN 細胞から産生される IL-5 および IL-13 はオスマウスに比べてメスマウスで多い一方で、抗 CD3/CD28 抗体により刺激された BLN 細胞から産生されるそれらには性差が認められないことを報告している。³⁵⁾ これらの結果は、喘息における Th2 サイトカイン産生量の性差に抗原提示細胞が関与する可能性を示唆している。BLN 樹状細胞に関して、Nembrini らは、OVA 誘導性喘息モデルマウスにおいて、 1.2×10^5 個の樹状細胞が OVA 吸入 24 時間後のリンパ節で観察され、そのうち 1.5×10^4 個が FITC 標識 OVA を取り込んでいる遊走性樹状細胞であったと報告している。⁴²⁾ さらに彼らは、リンパ節の遊走性樹状細胞数は OVA 吸入 24 時間後をピークに増加し、48 時間後にはピーク時の半分まで減少することを示した。⁴²⁾ 加えて、Plantinga らは、ハウスダストマイト (HDM) 誘導性喘息モデルマウスにおいて、HDM 曝露 3 日後の BLN 樹状細胞のうち 60%が遊走性 (CD11c^{hi} MHC II^{hi}) 樹状細胞、40%が常在性 (CD11c^{hi} MHC II^{dim}) 樹状細胞であることを報告している⁴³⁾。しかしながら、いずれの報告においてもマウスの性による違いには言及されていない。本研究では、OVA 吸入 20~24 時間後をピークに BLN 遊走性樹状細胞数が増加し、48~72 時間後にはピーク時の半分以下まで減少したが (Fig. 7B)、OVA 吸入 20 時間後の BLN における遊走性樹状細胞割合には性差が認められなかった (Fig. 6B)。樹状細胞数の性差に関する Melgert らの報告によると、喘息のメスマウスにおける T 細胞分化は、CD11c^{hi} MHC II^{hi} 細胞として定義された多くの炎症性骨髓性樹状細胞が肺からリンパ節

へ移動することによって誘導される。⁴⁴⁾ 本研究結果もこれと一致して、CD11c^{hi} MHC II^{hi} と定義した樹状細胞数が肺および BLN において、オスよりもメスで増加した (Fig. 3C、7C)。

抗原への反応で活性化した気道上皮由来の CCL2 や CCL20 などのケモカインは、単球や樹状細胞前駆細胞を肺へ誘引する役割をもつ。⁴⁵⁾ 肺の TSLP、IL-25 および IL-33 は、主に気道上皮細胞から産生され⁴⁶⁾、ナイーブ T 細胞から Th2 細胞への分化誘導に関与する B7-1、B7-2 および OX40L を発現させる。^{47) -50)} 樹状細胞の分化に関して、肺 CD11b⁺ 樹状細胞は、M-CSF および GM-CSF サイトカイン量に依存するが、Flt3 と Flt3L の相互作用を必要としない。一方で、CD103⁺ 樹状細胞は Flt3 シグナルの段階的な作用に依存して分化する。²⁷⁾ しかし、Plantinga らは、Flt3L^{-/-} マウスが CD11b⁺ および CD103⁺ 樹状細胞を消失しており、HDM 曝露後の喘息マウスと比較して、BALF 中の好酸球、好中球、リンパ球浸潤が有意に減少することを報告している。⁴³⁾ 本研究では、肺組織中の Flt3L および IL-33 発現はオスよりもメスで亢進していたが、TSLP 発現レベルに性差が認められず (Fig. 4B)、IL-25 は検出されなかった (data not shown)。これらの結果より、喘息の肺において性に関連した Th2 志向型の樹状細胞数の増加または機能の亢進は、肺内樹状細胞の近傍に IL-33 または Flt3L を分泌する細胞を必要とする可能性が示唆された。

樹状細胞上に発現する CCR7 は、肺からリンパ節への移動に必須なケモカイン受容体である⁵¹⁾。CCR7 発現には樹状細胞の発生過程が影響しており、肺において Flt3L 非依存的に単球から分化する Ly-6C^{hi} CD11b⁺ 樹状細胞や CD14^{hi} CD11b⁺ 樹状細胞は *Ccr7* 発現レベルが低い。²⁷⁾ 一方で、肺 CD103⁺ 樹状細胞は *Ccr7* 発現レベルが高く、リンパ節への移動能は CD11b⁺ 樹状細胞よりも CD103⁺ 樹状細胞で高いことが報告されている。²⁸⁾ さらに、Besnard らにより、

肺樹状細胞上の CCR7 発現および樹状細胞活性化は IL-33 により誘導されることが報告された。⁵²⁾ 近年の Chen らの報告でも、肺において、IL-33 の受容体である ST2 を発現した細胞数が IL-33 の経気道曝露により増加することが分かっている。⁵³⁾ 本研究において、メス CD103⁺ 樹状細胞での IL-33 受容体の発現亢進は、メスの肺組織中の IL-33 発現の亢進を伴っていた (Fig. 4B、4C、4D、9D)。さらに、肺における CCR7⁺ CD103⁺ 樹状細胞数および割合の増加もメスマウスで観察された (Fig. 5A、5B)。これらの結果から、メスの肺における IL-33 産生亢進は、CD103⁺ 樹状細胞の活性化および CCR7 発現の亢進を誘導し、BLN における CD103⁺ 樹状細胞数の性差を導く可能性が示唆された (Fig. 7B、7C)。

CD11b^{hi} 樹状細胞および CD103⁺ 樹状細胞は、肺および縦隔リンパ節における主要な樹状細胞サブセットである。Nakano らは、抗原存在下における CD103⁺ 樹状細胞は Th2 反応を担う一方で、CD11b^{hi} 樹状細胞は Th1 反応を担うこと²⁸⁾ を報告している。Zhou らの報告では対照的に、CD11b⁺ 樹状細胞は Th2 反応を担う。³²⁾ さらに、BLN の CD103⁺ 樹状細胞は、CD11b^{hi} 樹状細胞とは対照的に、CD8⁺ T 細胞へ吸入抗原の交差提示を行う。⁵⁴⁾ ⁵⁵⁾ 本研究においても、CD103⁺ 樹状細胞の交差提示活性に従い、Th2 サイトカインは CD4⁺ T 細胞からだけでなく (Fig. 8B) CD8⁺ T 細胞からも産生され (Fig. 8C)、メス CD103⁺ 樹状細胞における Th2 細胞分化誘導能の亢進が確認された。一方、CD11b^{hi} 樹状細胞の Th2 細胞分化誘導能に性差は認められなかった (Fig. 8B) が、肺および BLN 樹状細胞の絶対数に性差があること (Fig. 3C、7C) から、CD11b^{hi} 樹状細胞により分化した Th2 細胞数は結果的にオスよりもメスで増加する可能性が示唆された。

Th2 細胞分化誘導能の亢進においては、樹状細胞上の CD40、CD80、CD86、CD252 (OX40L) 発現が Th1、Th2、Th17 細胞への分化や活性化に必要であ

り⁵⁶⁾、OX40L、Jagged2、ICOSL、TSLPR や FcεRI の発現が樹状細胞による Th2 細胞分化誘導の亢進に関与する。^{57) 58) 59)} 本研究では、CD103⁺ 樹状細胞上の CD40、CD80、OX40L、Jagged2、ICOSL、TSLPR、FcεRI の mRNA およびタンパク発現に性差は認められなかったが (Fig. 9B、9C)、CD86 発現がオスよりもメスで亢進しており、Th2 細胞の分化誘導を亢進させている可能性が示唆された (Fig. 9A、11A、11B)。

エストロゲンは、その受容体との相互作用により免疫反応を亢進させる。⁴⁰⁾ ⁶⁰⁾ Yang らの報告では、マウスの脾臓の CD11c⁺ 樹状細胞において、E2 が T 細胞分化に関与する共刺激分子や MHC II を正に制御する可能性が明らかになった。⁴¹⁾ 本研究では、E2 添加して作製した CD103⁺ 樹状細胞上の CD86 および MHC II 発現が OVA 存在下で亢進し、OVA + IL-33 存在下でさらに亢進した (Fig. 10B)。これは Rank らの報告と一致する。⁶¹⁾ さらに、CD103⁺ 樹状細胞の作製開始から終わりまで E2 を添加し続けることが、抗原曝露時のメス CD103⁺ 樹状細胞を活性化および成熟化させ、メスにおいて Th2 細胞分化誘導が亢進する要因であると考えられた (Fig. 10B、10C)。さらに、E2 は OVA 存在下で樹状細胞上の CD86 および MHC II 発現を増加させたが、IL-33 単独存在下ではそのような影響が認められなかった (Fig. 10B)。このことから、IL-33-ST2 系を介した CD103⁺ 樹状細胞活性化への E2 の関与は限定的である可能性が示唆された。この点に関しては、細胞内シグナル伝達促進の機序に関するさらなる研究が必要である。

本研究では、性に関連した喘息フェノタイプにおいて重要な役割を担う樹状細胞の病態生理学的な特徴が明らかとなった。近年、CD103⁺ 樹状細胞は、アジュバントのない無害な抗原に対しては Treg を誘導し、吸入抗原に対し免疫寛容的な役割をもつことが報告されている。^{62) 63)} 喘息に対する CD103⁺ 樹状細胞の

役割を完全に理解するためには、さらなる研究が必要である。さらに、マウス CD103⁺ 樹状細胞のヒトホモログである BDCA3⁺ 樹状細胞が喘息女性患者で亢進する Th2 サイトカイン産生に重要な役割をもつのかは依然解明されていない。これまでのマウスを用いた研究結果だけではヒトへの応用という点で限界があることから、臨床的な研究を行うことが必須である。それらは、女性の喘息患者に対するより効果的な治療への応用や喘息症状の増悪予防に貢献できるものと考えている。

VII 結論

本研究は、喘息モデルのメスマウスにおける CD103⁺ 樹状細胞が、メスで亢進する Th2 型免疫応答に重要な役割を担う可能性を示唆した最初の報告である。本研究結果から、メスの BLN CD103⁺ 樹状細胞の数および Th2 細胞分化誘導能、抗原取り込み能がオスよりも亢進していることが明らかとなり、さらに Th2 細胞分化誘導能の亢進には E2 が CD86 発現を介して関与することを証明した。本研究により、喘息における性に関連した免疫メカニズムを理解するための基盤情報を得ることができた。

VIII 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤な御指導とご鞭撻を賜りました東北医科薬科大学薬学部病態生理学教室 高橋知子教授ならびに同大学医学部医学教育推進センター 大野勲教授に心より感謝申し上げます。また、研究に必要な知識・技術から研究に対する姿勢まで幅広く御指導頂きました土橋（奥山）香織先生ならびに宮坂智充先生に心より感謝いたします。東北医科薬科大学薬学部病態解析学教室 大河原雄一教授、同大学薬学部病態生理学教室 河野資先生をはじめ病態生理学教室の皆さまから多くのご協力を頂きましたことに感謝いたします。OT-I および OT-II Tg マウスを御供与頂いた井ノ口仁一教授に心より感謝申し上げます。

これまでに多くの方々のお力添えを賜り、ここに本研究の完成を迎えることができました。今後もより一層研究に努め、患者さんの治療の助けとなるような研究者兼医療人になります。

IX 参考文献

- 1) 喘息予防・管理ガイドライン 2015: 一般社団法人日本アレルギー学会
喘息ガイドライン専門部会監修
- 2) Legato MJ, Johnson PA, Manson JE. Consideration of Sex Differences in Medicine to Improve Health Care and Patient Outcomes. *JAMA* 2016;**316**:1865-6.
- 3) Clayton JA, Tannenbaum C. Reporting Sex, Gender, or Both in Clinical Research? *JAMA* 2016;**316**:1863-4.
- 4) Choi IS. Gender-specific asthma treatment. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011;**3**:74-80.
- 5) Rowe BH, Villa-Roel C, Majumdar SR, Abu-Laban RB, Aaron SD, Stiell IG, Johnson J, Senthilselvan A. Rates and correlates of relapse following ED discharge for acute asthma: a Canadian 20-site prospective cohort study. *Chest* 2015;**147**:140-9.
- 6) Kony S, Zureik M, Driss F, Neukirch C, Leynaert B, Neukirch F. Association of bronchial hyperresponsiveness and lung function with C-reactive protein (CRP): a population based study. *Thorax* 2004;**59**:892-6.
- 7) Akinbami LJ, Moorman JE, Bailey C, Zahran HS, King M, Johnson CA, Liu X. Trends in asthma prevalence, health care use, and mortality in the United States, 2001-2010. *NCHS Data Brief* 2012;**94**:1-8.
- 8) Siroux V, Curt F, Oryszczyn MP, Maccario J, Kauffmann F. Role of

- gender and hormone-related events on IgE, atopy, and eosinophils in the Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**:491-8.
- 9) Almqvist C, Worm M, Leynaert B; working group of GA2LEN WP 2.5 Gender. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review. *Allergy* 2008;**63**:47-57.
 - 10) Balzano.G., Fuscjhilllo.S., Melillo.G.Bonini.S. Asthma and sex hormones. *Allergy* 2001;**56**, 13-20.
 - 11) Romieu I, Fabre A, Fournier A, Kauffmann F, Varraso R, Mesrine S, Leynaert B, Clavel-Chapelon F. Postmenopausal hormone therapy and asthma onset in the E3N cohort. *Thorax* 2010;**65**:292-7.
 - 12) Troisi RJ, Speizer FE, Willett WC, Trichopoulos D, Rosner B. Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma. A prospective cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;**152**:1183-8.
 - 13) Baldacara RP, Silva I. Association between asthma and female sex hormones. *Sao Paulo Med J.* 2017;**135** (1): 4-14
 - 14) Loza MJ, Foster S, Bleecker ER, Peters SP, Penn RB. Asthma and gender impact accumulation of T cell subtypes. *Respir Res* 2010;**11**:103.
 - 15) Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, Wardlaw AJ, Green RH. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**178**:218-24.

- 16) Okuyama K, Wada K, Chihara J, Takayanagi M, Ohno I. Sex-related splenocyte function in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;**38**:1212-9.
- 17) Wada K, Okuyama K, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. Gender differences in transcriptional regulation of IL-5 expression by bronchial lymph node cells in a mouse model of asthma. *Respirology* 2010;**15**:629-35.
- 18) Ito C, Okuyama-Dobashi K, Miyasaka T, Masuda C, Sato M, Kawano T, Ohkawara Y, Kikuchi T, Takayanagi M, Ohno I. CD8+ T Cells Mediate Female-Dominant IL-4 Production and Airway Inflammation in Allergic Asthma. *PLoS One* 2015;**10**:e0140808.
- 19) Riffo-Vasquez Y, Ligeiro de Oliveira AP, Page CP, Spina D, Tavares-de-Lima W. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy* 2007;**37**:459-70.
- 20) Gaurav R, Agrawal DK. Clinical view on the importance of dendritic cells in asthma. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;**9**:899-919.
- 21) Upham JW, Denburg JA, O'Byrne PM. Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 2002;**32**:818-23.
- 22) Jahnsen FL, Moloney ED, Hogan T, Upham JW, Burke CM, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax* 2001;**56**:823-6.
- 23) Greer AM, Matthay MA, Kukreja J, Bhakta NR, Nguyen CP, Wolters

- PJ, Woodruff PG, Fahy JV, Shin JS. Accumulation of BDCA1⁺ dendritic cells in interstitial fibrotic lung diseases and Th2-high asthma. *PLoS One* 2014;**9**:e99084.
- 24) Lebre MC, van Capel TM, Bos JD, Knol EF, Kapsenberg ML, de Jong EC. Aberrant function of peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:969-76.
- 25) Pilette C, Jacobson MR, Ratajczak C, Detry B, Banfield G, VanSnick J, Durham SR, Nouri-Aria KT. Aberrant dendritic cell function conditions Th2-cell polarization in allergic rhinitis. *Allergy* 2013;**68**:312-21.
- 26) Dua B, Tang W, Watson R, Gauvreau G, O'Byrne PM. Myeloid dendritic cells type 2 after allergen inhalation in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 2014;**44**:921-9.
- 27) Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 2012;**12**:101-13.
- 28) Nakano H, Burgents JE, Nakano K, Whitehead GS, Cheong C, Bortner CD, Cook DN. Migratory properties of pulmonary dendritic cells are determined by their developmental lineage. *Mucosal Immunol* 2013;**6**:678-91.
- 29) Chang CC, Wright A, Punnonen J. Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *J Immunol* 2000;**165**:3584-91.

- 30) Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, Kool M, Muskens F, Lambrecht BN. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 2010;**207**:2097-111.
- 31) Nakano H, Free ME, Whitehead GS, Maruoka S, Wilson RH, Nakano K, Cook DN. Pulmonary CD103(+) dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens. *Mucosal Immunol* 2012;**5**:53-65.
- 32) Zhou Q, Ho AW, Schlitzer A, Tang Y, Wong KH, Wong FH, Chua YL, Angeli V, Mortellaro A, Ginhoux F, Kemeny DM. GM-CSF-licensed CD11b⁺ lung dendritic cells orchestrate Th2 immunity to *Blomia tropicalis*. *J Immunol* 2014;**193**:496-509.
- 33) Nagafuku M, Okuyama K, Onimaru Y, Suzuki A, Odagiri Y, Yamashita T, Iwasaki K, Fujiwara M, Takayanagi M, Ohno I, Inokuchi J. CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:E336-42.
- 34) Kawakami K, Kohno S, Morikawa N, Kadota J, Saito A, Hara K. Activation of macrophages and expansion of specific T lymphocytes in the lungs of mice intratracheally inoculated with *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol* 1994;**96**:230-7.
- 35) Okuyama K, Suenaga M, Furuki S, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. Contribution of CD4⁺ T cells and dendritic cells to female-dominant antigen-induced T helper type 2 cytokine production by bronchial lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;**161 Suppl 2**:58-65.

- 36) Mayer CT, Ghorbani P, Nandan A, Dudek M, Arnold-Schrauf C, Hesse C, Berod L, Stüve P, Puttur F, Merad M, Sparwasser T. Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103⁺ dendritic cells from mouse bone marrow. *Blood* 2014;**124**:3081-91.
- 37) Hayashi D, Kawakami K, Ito K, Ishii K, Tanno H, Imai Y, Kanno E, Maruyama R, Shimokawa H, Tachi M. Low-energy extracorporeal shock wave therapy enhances skin wound healing in diabetic mice: a critical role of endothelial nitric oxide synthase. *Wound Repair Regen.* 2012; 20(6):887-95
- 38) Miyasaka T, Okuyama-Dobashi K, Masuda C, Iwami S, Sato M, Mizoguchi H, Kawano T, Ohkawara Y, Sakurada S, Takayanagi M, Ohno I. The involvement of central nervous system histamine receptors in psychological stress-induced exacerbation of allergic airway inflammation in mice. *Allergol Int* 2016;**65**:S38-44.
- 39) Okuyama K, Dobashi K, Miyasaka T, Yamazaki N, Kikuchi T, Sora I, Takayanagi M, Kita H, Ohno I. The involvement of glucocorticoids in psychological stress-induced exacerbations of experimental allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;**163**: 297-306.
- 40) Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Matsushita S. 17 Beta-estradiol (E2) plus tumor necrosis factor-alpha induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses. *Hum Immunol* 2008;**69**:149-57.
- 41) Yang L, Hu Y, Hou Y. Effects of 17beta-estradiol on the maturation,

- nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Mol Immunol* 2006;**43**:357-66.
- 42) Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, Kurrer M, Kopf M, Marsland BJ. Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax* 2011;**66**: 755-63
- 43) Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswynghe M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, Vanhoutte L, Neyt K, Killeen N, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 2013;**38**:322-35.
- 44) Melgert BN, Oriss TB, Qi Z, Dixon-McCarthy B, Geerlings M, Hylkema MN, Ray A. Macrophages: regulators of sex differences in asthma? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;**42**:595-603.
- 45) Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012;**18**:673-83.
- 46) Lambrecht BN, Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**134**:499-507
- 47) Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FX, Yao Z, Cao W, Liu YJ. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005;**202**:1213-23.

- 48) Su Z, Lin J, Lu F, Zhang X, Zhang L, Gandhi NB, de Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Potential autocrine regulation of interleukin-33/ST2 signaling of dendritic cells in allergic inflammation. *Mucosal Immunol* 2013;**6**:921-30.
- 49) Chu DK, Llop-Guevara A, Walker TD, Flader K, Goncharova S, Boudreau JE, Moore CL, Seunghyun In T, Waserman S, Coyle AJ, Kolbeck R, Humbles AA, Jordana M. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**:187-200.
- 50) Hongjia L, Caiqing Z, Degan L, Fen L, Chao W, Jinxiang W, Liang D. IL-25 promotes Th2 immunity responses in airway inflammation of asthmatic mice via activation of dendritic cells. *Inflammation* 2014;**37**:1070-7.
- 51) Forster R, Davalos-Missslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:362-71
- 52) Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol* 2011;**41**:1675-86.
- 53) Chen CC, Kobayashi T, Iijima K, Hsu FC, Kita H. IL-33 dysregulates regulatory T cells and impairs established immunologic tolerance in the lungs. *J Allergy Clin Immunol* 2017; pii: S0091-6749(17)30228-2.
- 54) Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. Differential antigen processing by

- dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007;**315**:107-11.
- 55) del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Förster R. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 2007;**178**:6861-6.
- 56) Walsh KP, Mills KH. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol* 2013;**34**:521-30.
- 57) Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 2004;**117**:515-26.
- 58) Shen C, Hupin C, Froidure A, Detry B, Pilette C. Impaired ICOSL in human myeloid dendritic cells promotes Th2 responses in patients with allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy* 2014;**44**:831-41.
- 59) Froidure A, Shen C, Pilette C. Dendritic cells revisited in human allergic rhinitis and asthma. *Allergy* 2016;**71**:137-48.
- 60) Keselman A, Heller N. Estrogen Signaling Modulates Allergic Inflammation and Contributes to Sex Differences in Asthma. *Front Immunol* 2015;**6**:568.
- 61) Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**123**:1047-54.
- 62) Semmrich M, Plantinga M, Svensson-Frej M, Uronen-Hansson H, Gustafsson T, Mowat AM, Yrlid U, Lambrecht BN, Agace WW. Directed antigen targeting in vivo identifies a role for CD103+

dendritic cells in both tolerogenic and immunogenic T-cell responses.

Mucosal Immunol 2012;**5**:150-60.

- 63) Khare A, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Fei M, Ray P, Ray A. Inhaled antigen upregulates retinaldehyde dehydrogenase in lung CD103+ but not plasmacytoid dendritic cells to induce Foxp3 de novo in CD4+ T cells and promote airway tolerance. *J Immunol* 2013;**191**:25-9.

X Figure/Table

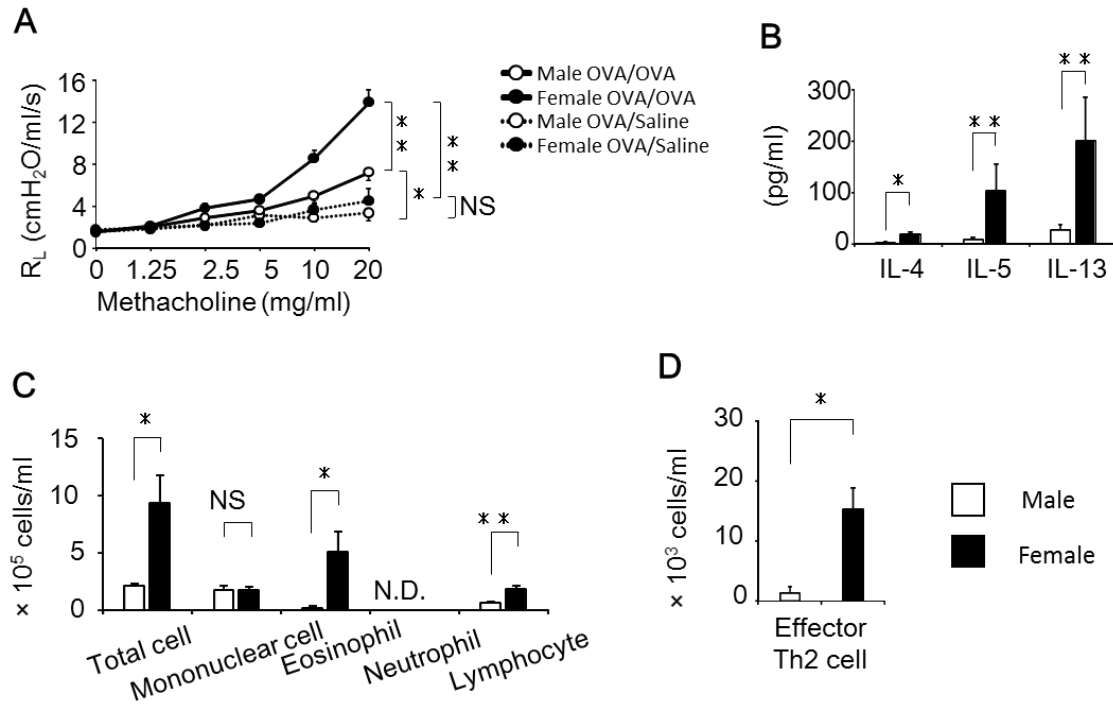


Figure 1. Sex-based differences in airway inflammation.

(A) Airway responsiveness in male and female sensitized mice were measured one day after OVA (OVA/OVA) or saline (OVA/Saline) challenge using whole body plethysmography. (B) IL-4, IL-5, and IL-13 levels in the BAL fluids 3 days post OVA challenge were measured by ELISA. (C) The amount of cells in each leukocyte fraction, and (D) the number of effector Th2 cells in the BAL fluids 5 days post OVA challenge was measured. Data are shown as the mean \pm SEM based on at least two independent experiments ($n = 7-13$). Open bar and circles, male mice; closed bar and circles, female mice. *, $p < 0.05$ compared to male mice; **, $p < 0.01$ compared to male mice; NS, not significant.

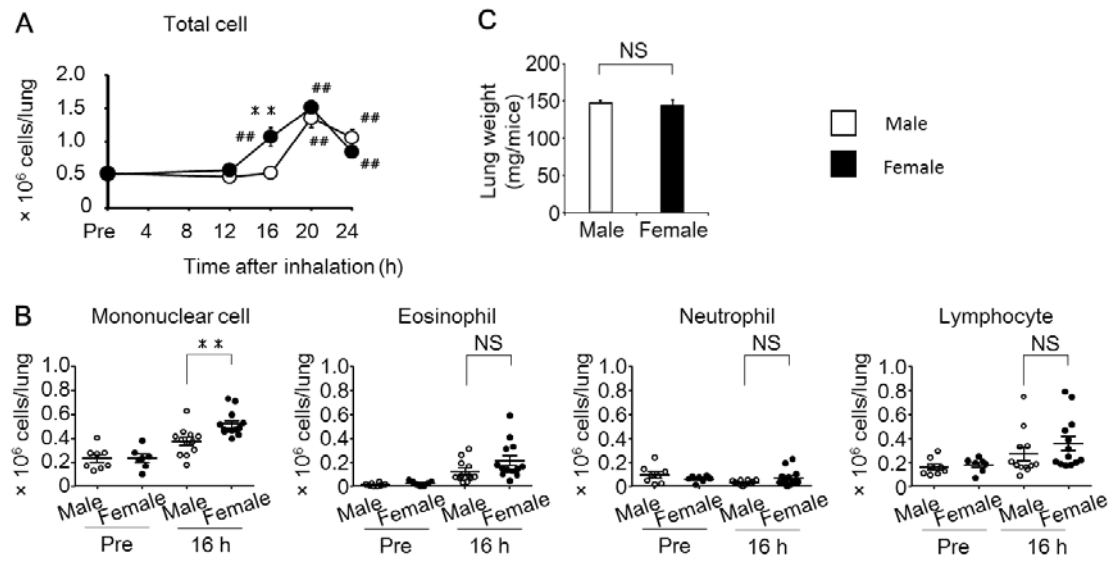


Figure 2. Sex-based differences in inflammatory cell infiltration in the lung. (A) The number of white blood cells in the mice lungs were counted before (Pre) and 12, 16, 20, and 24 h after (Post) ovalbumin (OVA) challenge. (B) The lung white blood cells pre and 16 h post OVA challenge were stained with Diff-Quick, and then observed using a microscope. The number of leukocyte fractions was estimated by multiplying the total leukocyte number by the proportion of each fraction. (C) Lungs weights of mice were measured one day after OVA challenge. Data are shown as the mean \pm SEM based on at least two independent experiments ($n = 7-13$). Open bar and circles, male mice; closed bar and circles, female mice. *, $p < 0.05$ compared to male mice; **, $p < 0.01$ compared to male mice; ##, $p < 0.01$ compared to the level before OVA inhalation; NS, not significant.

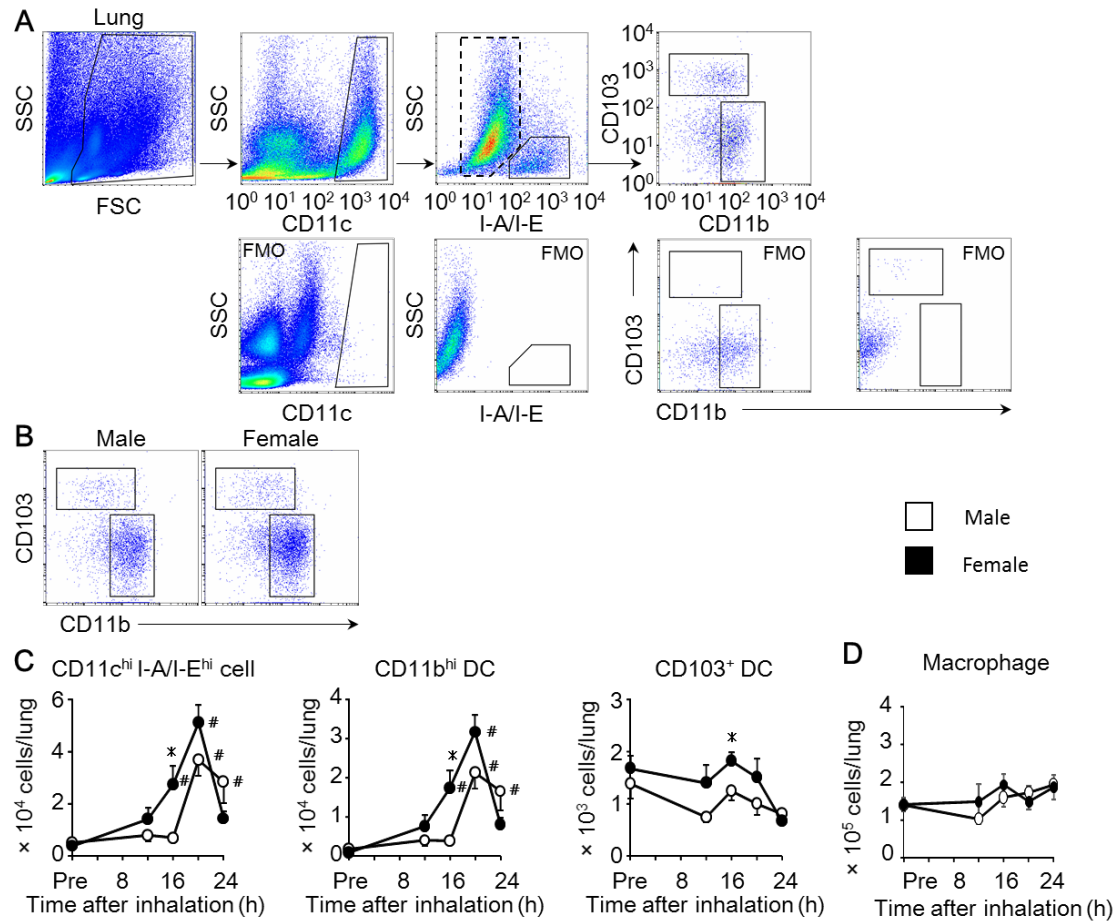


Figure 3. Sex-based differences in the number of dendritic cells in the lung. (A) Flow cytometric gating for SSC^{low} CD11c^{hi} I-A/I-E^{hi} dendritic cells (DCs) and SSC^{hi} CD11c^{hi} I-A/I-E^{low} cells (macrophages) from the mouse lungs. Positive populations are defined based on fluorescence minus one (FMO) controls. (B) Representative profile of the expression of CD11b and CD103 on DCs in the lung of male and female mice 16 h after OVA challenge. (C) Number of total DCs, CD11b^{hi} DCs, and CD103⁺ DCs in the lung were counted pre and 12, 16, 20 and 24 h post OVA challenge. (D) Number of macrophages in the lung were counted pre and 12, 16, 20 and 24 h post OVA challenge. Data are shown as the mean \pm SEM based on at least three independent experiments (n = 8–12). Open circle, male mice; closed circle, female mice. *, p < 0.05 compared to male mice; #, p < 0.05 compared to the level before OVA inhalation.

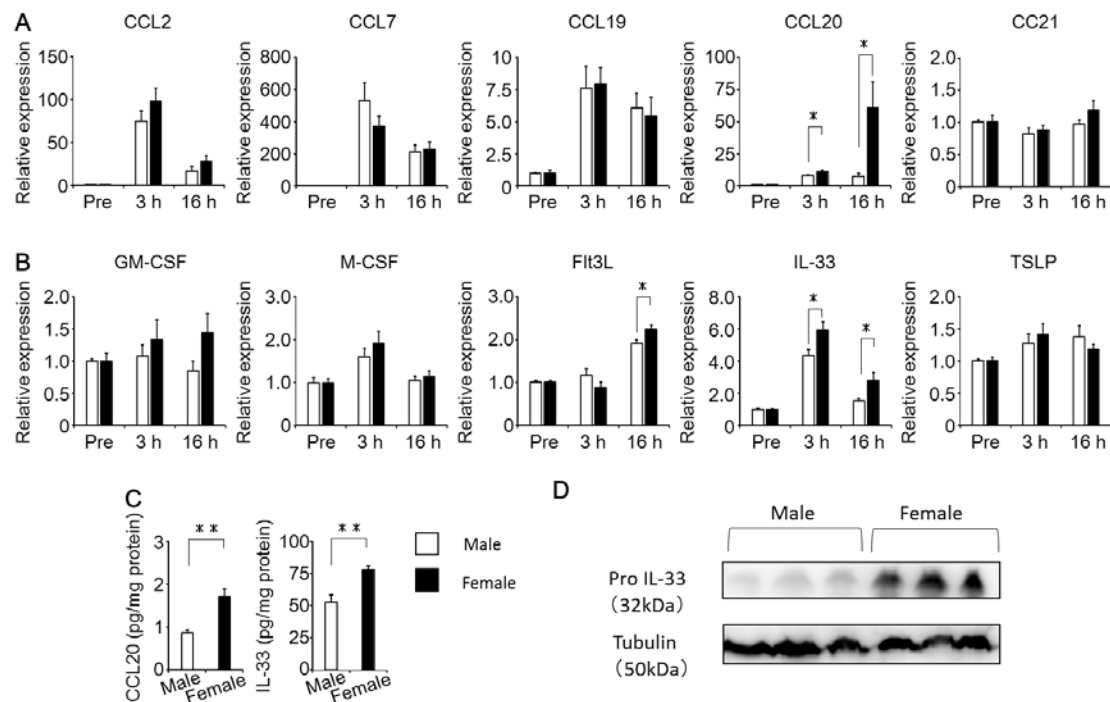


Figure 4. Sex-based differences in cytokine and chemokine expression in the lung. The mouse lungs were excised pre, and 3 and 16 h post OVA challenge. (A) Chemokine mRNA expression and (B) cytokine mRNA expression in the lungs were determined by real-time RT-PCR. (C) CCL20 and IL-33 protein levels in the lung 16 h post OVA challenge were measured by ELISA. (D) Pro IL-33 and Tubulin protein levels in the lung 16 h post OVA challenge were measured by Western blot. Data are shown as the mean \pm SEM based on two to three independent experiments ($n = 6-14$). Open bar, male mice; closed bar, female mice. *, $p < 0.05$ compared to male mice; **, $p < 0.01$ compared to male mice.

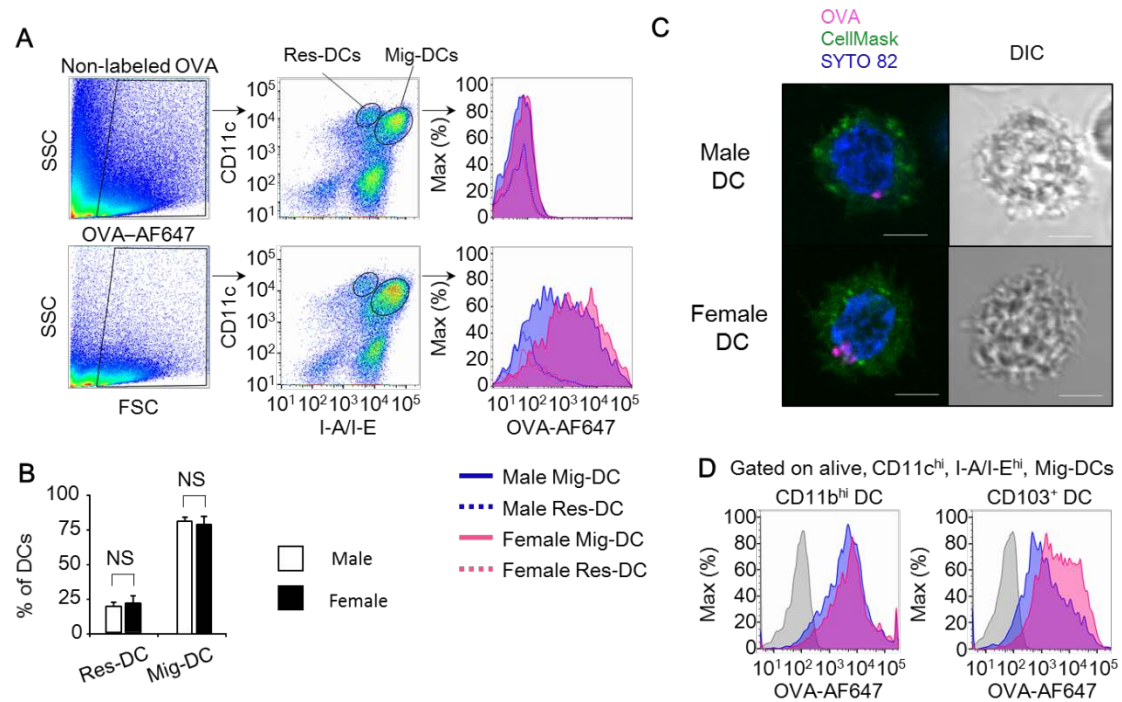


Figure 6. Sex-based differences in Th2 priming ability of DCs in the BLN. Male and female mice were sensitized by intraperitoneal injections with non-labeled OVA and then intratracheally administered with Alexa Fluor 647-conjugated OVA. DCs were prepared from the BLN of male and female mice. (A) Sex-based differences in OVA uptake by CD11c^{hi} I-A/I-E^{dim} BLN-resident DCs and CD11c^{hi} I-A/I-E^{hi} migratory DCs (from the lung to the BLN). Solid blue line, migratory DCs from male mice; solid red line, migratory DCs from female mice; dotted blue line, resident DCs from male mice; dotted red line, resident DCs from female mice. (B) The percentages of resident DCs and migratory DCs in BLN DCs of male and female mice. (C) Cells were stained with CellMask plasma membrane stain and SYTO 82 fluorescent nucleic acid stain. Cells were analyzed using a confocal laser scanning microscope. Scale bar = 5 μ m. DIC, differential interference contrast. (D) Sex-based differences in OVA uptake by CD11b^{hi} and CD103⁺ DCs in the BLN. Representative results of three independent experiments are shown. Gray line, DCs that took up non-conjugated OVA; blue line, migratory DCs of each subset from male mice; red line, migratory DCs of each subset from female mice. Open bar, male mice; closed bar, female mice. Data are shown as the mean \pm SEM based on four to six mice. Experiments were repeated twice with similar results. *, $p < 0.05$; NS, not significant.

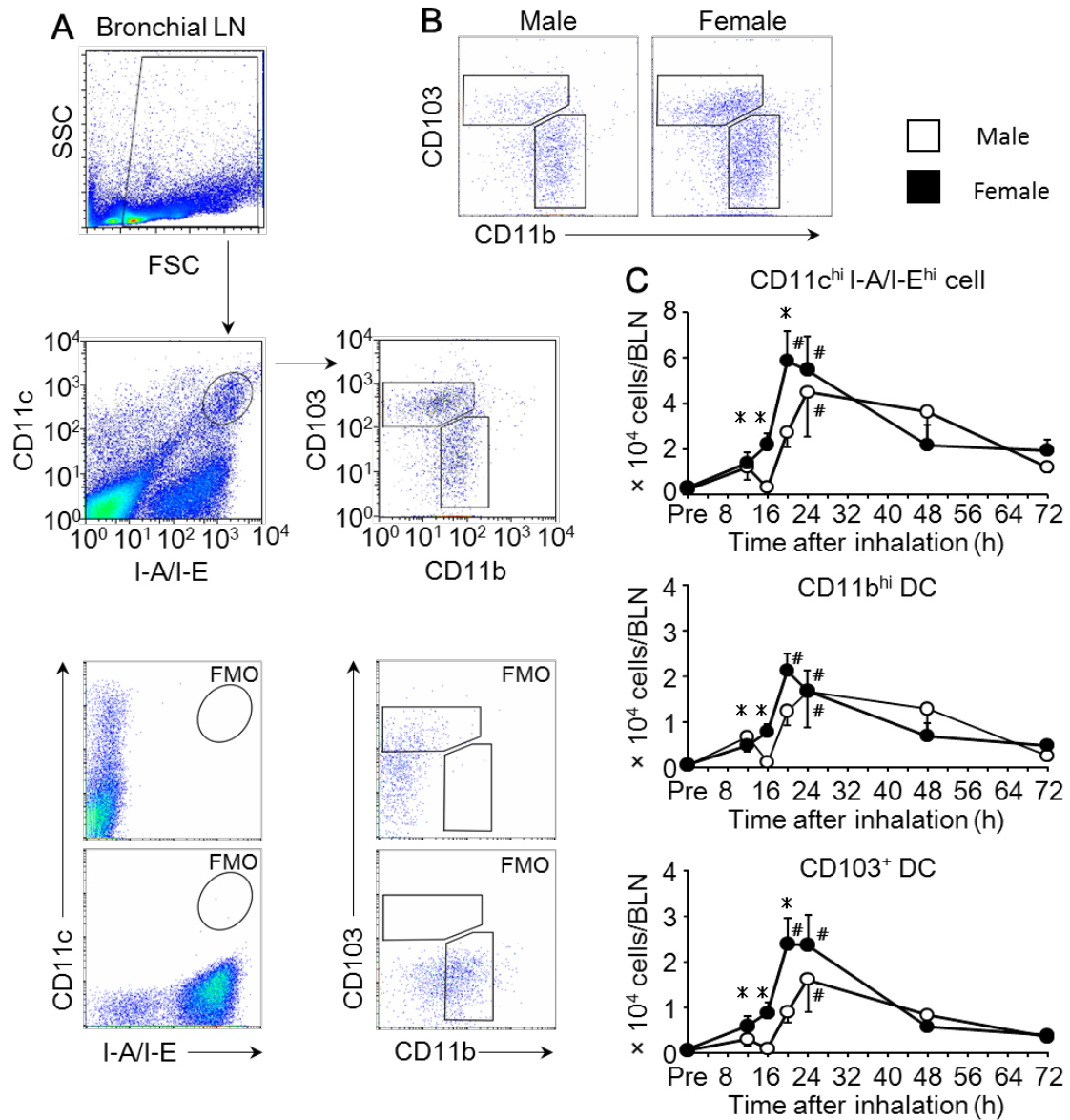


Figure 7. Sex-based differences in the number of DCs in the bronchial lymph node. (A) Flow cytometric gating for SSC^{low} CD11c^{hi} I-A/I-E^{hi} DCs from bronchial lymph nodes (BLNs) of mice. Positive populations are defined based on FMO controls. (B) Representative profile of the expression of CD11b and CD103 on DCs in the BLN of male and female mice 20 h after OVA challenge. (C) Numbers of total DCs, CD11b^{hi} DCs, and CD103⁺ DCs in the BLN were counted pre and 12, 16, 20, 24, 48, and 72 h post OVA challenge. Data are shown as the mean \pm SEM based on two to three independent experiments (n = 8–9). Open circle, male mice; closed circle, female mice. *, p < 0.05 compared to male mice; **, p < 0.01 compared to male mice; #, p < 0.05 compared to the level before OVA inhalation.

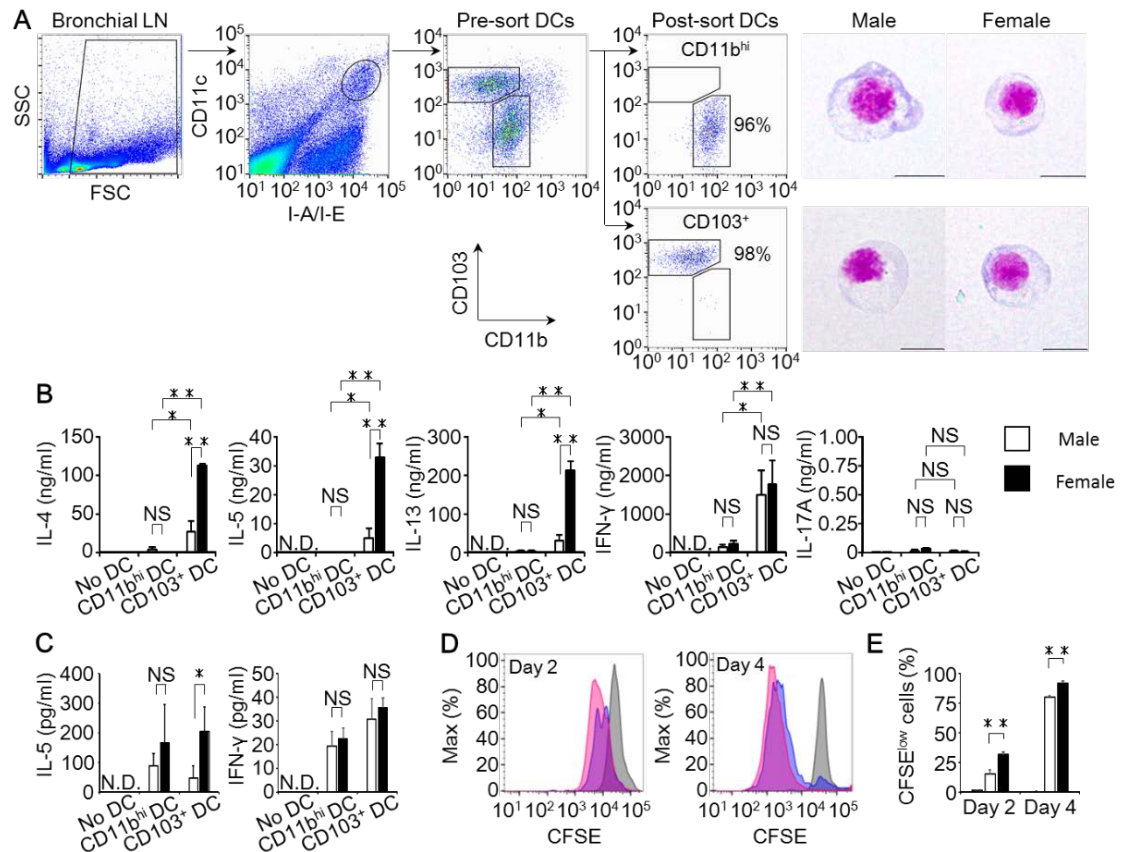


Figure 8. Sex-based differences in T cell differentiation promoted by BLN DCs. (A) Purity of sorted BLN CD11b^{hi} DCs and CD103⁺ DCs. Representative images of each population are shown. Scale bar = 10 μm. (B) Cytokine levels in cultures of CD4⁺ T cells from the spleen of OT-II transgenic (Tg) mice with CD11b^{hi} DCs or CD103⁺ DCs from the BLN of male or female mice. (C) Cytokine production in CD8⁺ T cells from OT-I transgenic (Tg) mice cultured with each DC subset from the BLN of male or female mice. Cytokine levels in the culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (D, E) 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) labeled-CD4⁺ T cells were cultured with CD103⁺ DCs from male or female mice. (D) The dilution of the CFSE signal on day 2 or 4 post-culture was assayed by flow cytometry. Representative results of two independent experiments are shown. Gray line, CFSE-labeled CD4⁺ T cells cultured without DCs; blue line, CD4⁺ T cells cultured with CD103⁺ DCs from male mice; red line, CD4⁺ T cells cultured with CD103⁺ DCs from female mice. (E) Percentage of CFSE^{low} cells in CD4⁺ T cells cultured with CD103⁺ DCs from the BLN of male and female mice after 2 or 4 days of culture. Gray bar, CFSE-labeled CD4⁺ T cells cultured without DCs; open bar, CFSE-labeled CD4⁺ T cells cultured with CD103⁺ DCs from male mice; closed bar, CFSE-labeled CD4⁺ T cells cultured with CD103⁺ DCs from female mice. Data are shown as the mean ± SD based on triplicate cultures. Experiments were repeated twice with similar results. *, p < 0.05; **, p < 0.01; NS, not significant; N.D., not detected

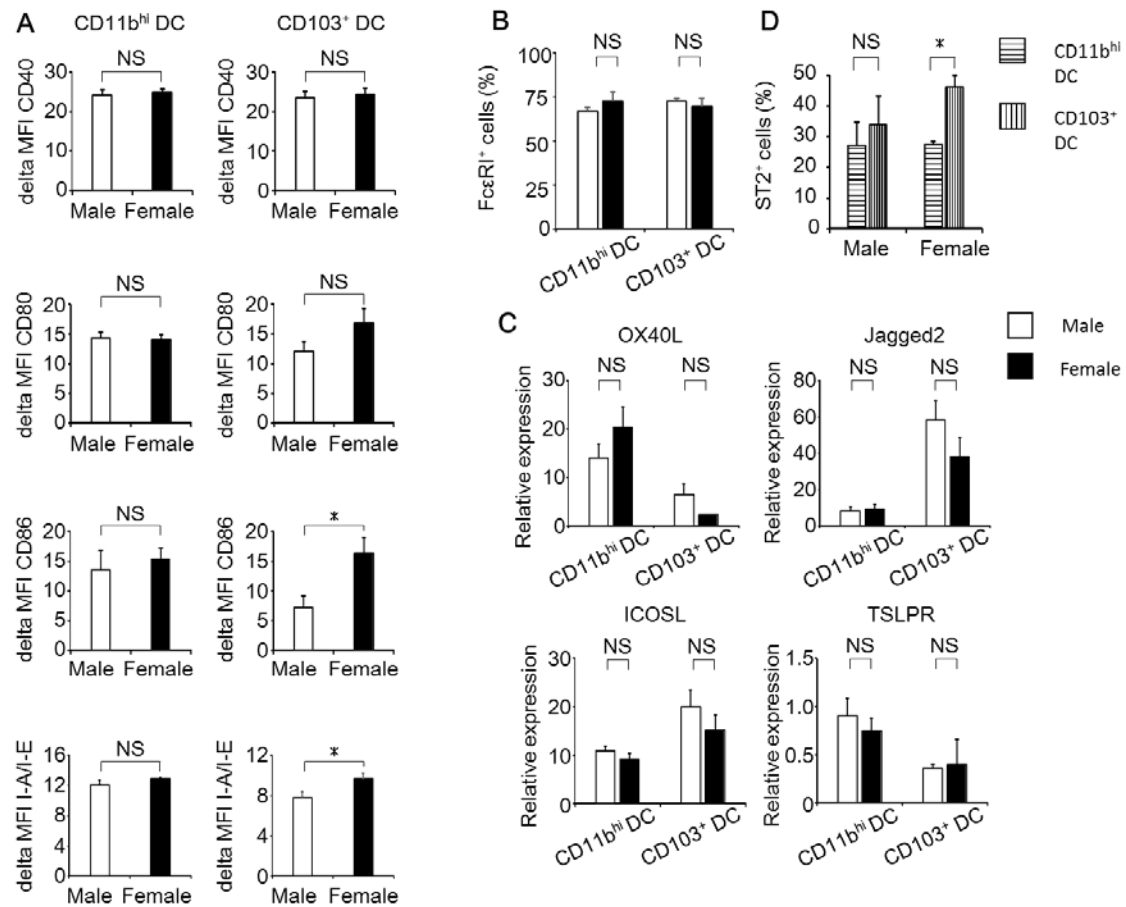


Figure 9. Sex-based differences in mRNA expression in BLN DCs. BLN DCs were isolated from mice 20 h after OVA challenge. (A) Sex-based differences in mean fluorescent intensity of CD40, CD80, CD86, and I-A/I-E on migratory CD11b^{hi} DCs and CD103⁺ DCs in the BLN. (B) Differences in FcεRI expression on migratory BLN CD11b^{hi} DCs and CD103⁺ DCs from male and female mice. (C) Expression levels of OX40L, Jagged2, ICOSL, and TSLPR mRNA in DCs were determined by real-time RT-PCR. (D) Differences in ST2 expression on migratory BLN CD11b^{hi} DCs and CD103⁺ DCs from male and female mice. Horizontal line bars, CD11b^{hi} DCs; vertical line bars, CD103⁺ DCs.

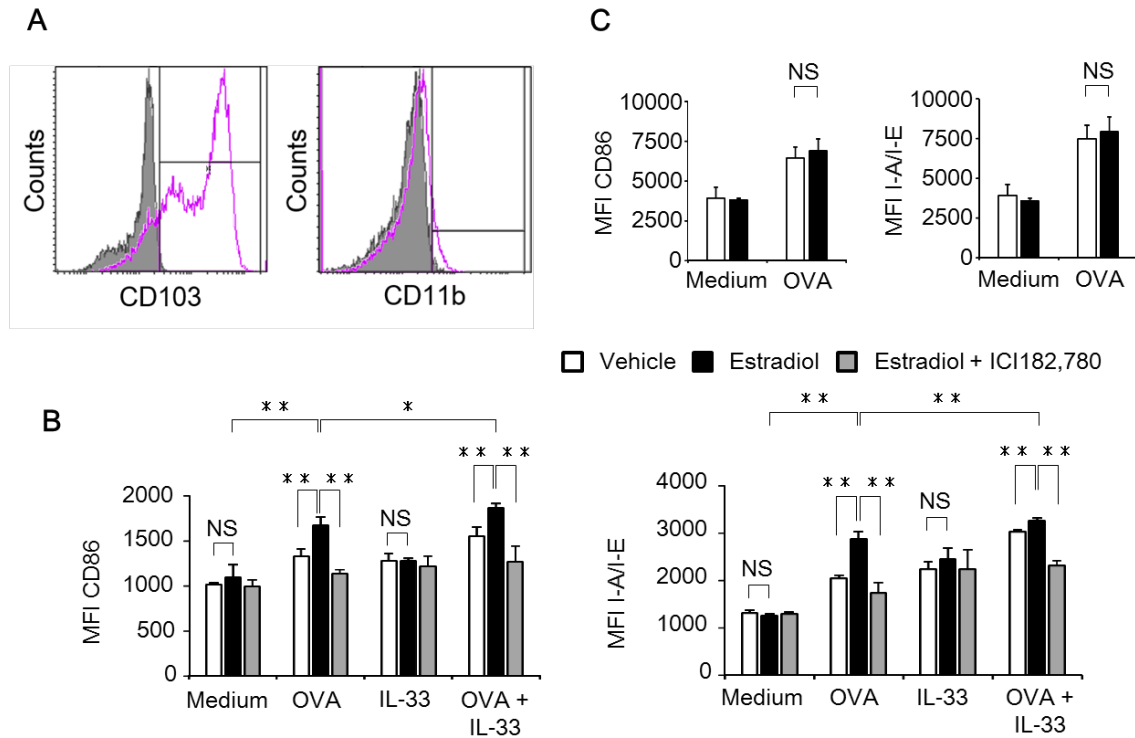


Figure 10. 17 β -estradiol enhances the expression of CD86 and I-A/I-E on bone CD103⁺ marrow-derived DCs. (A) CD103⁺ bone marrow (BM)-DCs were generated from BM cells of male mice in the presence of 17 β -estradiol, 17 β -estradiol plus ICI182,780, or vehicle. (B) Each set of CD103⁺ BM-DCs was cultured in the presence of OVA, IL-33, or OVA plus IL-33 for 24 h. CD86 and I-A/I-E expression levels on CD103⁺ BM-DCs were assayed by flow cytometry. (C) CD103⁺ BM-DCs were induced from the BM cells in the absence of 17 β -estradiol. CD103⁺ BM-DCs were cultured in the presence of 17 β -estradiol (closed bar) or vehicle (open bar) with OVA for 24 h. CD86 and I-A/I-E expression levels on CD103⁺ BM-DCs were assayed by flow cytometry. Data are shown as the mean \pm SD based on triplicate cultures. Experiments were repeated twice with similar results. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; NS, not significant.

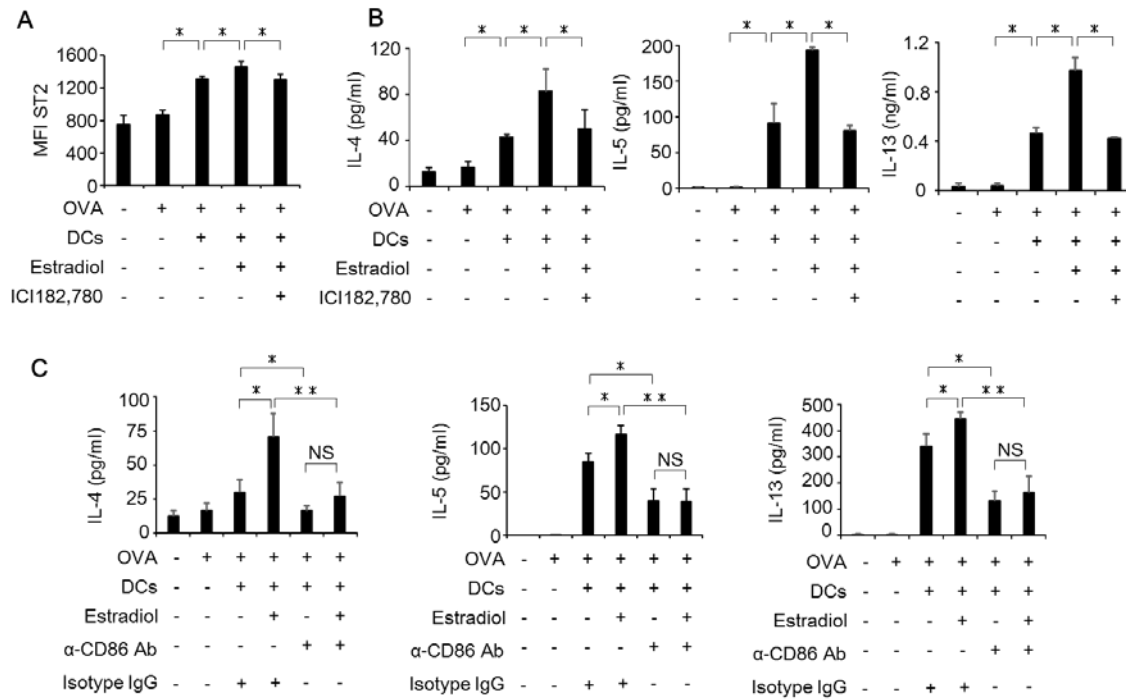


Figure 11. 17 β -estradiol enhances Th2 cell priming by bone marrow-derived CD103⁺ DCs. (A) BLN CD4⁺ T cells were cultured with 17 β -estradiol-primed, 17 β -estradiol plus ICI182,780-primed, or vehicle-primed CD103⁺ BM-DCs in the presence or absence of OVA. ST2 expression on CD4⁺ T cell from BLNs was determined by flow cytometry. (B) BLN CD4⁺ T cells were cultured with 17 β -estradiol-primed or vehicle-primed CD103⁺ BM-DCs in the presence or absence of OVA and (C) recombinant anti-mouse CD86 antibody. IL-5 levels in the culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data are shown as the mean \pm SD based on triplicate cultures. Experiments were repeated twice with similar results. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; NS, not significant.

Table 1. Primer sequences for real-time RT-PCR

Gene (Gene products)	Primer sequences
<i>Ccl2</i> (MCP-1)	forward: 5'- TTTCCACAACCACCTCAAGCAC -3' reverse: 5'- TAAGGCATCACAGTCCGAGTCA -3'
<i>Ccl7</i> (MCP-3)	forward: 5'- TGTGCCTGCTGCTCATAGCC -3' reverse: 5'- CCCAGGGACACCGACTACTG -3'
<i>Ccl19</i> (MIP-3B)	forward: 5'- CCTGGGAACATCGTGAAAGCCT -3' reverse: 5'- GGTGCTGTTGCCTTTGTTCTTGG -3'
<i>Ccl20</i> (MIP-3A)	forward: 5'- GAACTGGGTGAAAAGGGCTGTGA -3' reverse: 5'- CATTTCCCTCCTTGGGCTGTGTCC -3'
<i>Ccl21</i> (SLC)	forward: 5'- GCTCTGGTCTCATCCTCAACTCAA -3' reverse: 5'- AGTCCTGTCCCCCTCCATCAC -3'
<i>Csf1</i> (M-CSF)	forward: 5'- ACATTGGATTCTTCTGTGGGGCGA -3' reverse: 5'- AGGAGAGGGTAGTGGTGGATGTT -3'
<i>Csf2</i> (GM-CSF)	forward: 5'- CAAAGAAGCCCTGAACCTCCTGG -3' reverse: 5'- ATTGCCCCGTAGACCCTGCTC -3'
<i>Flt3l</i> (Flt3L)	forward: 5'- TGGATAGAGCAACTGAAGACTGTGG -3' reverse: 5'- ATTCTGGTAGGGGCTGGAAGGTA -3'
<i>Il33</i> (IL-33)	forward: 5'- TAACACAGTCTCCTGCCTCCCT -3' reverse: 5'- TGGTCTTTTCCAGAGTCGTCAACA -3'
<i>Tslp</i> (TSLP)	forward: 5'- CCCTTCACTCCCCGACAAAACA -3' reverse: 5'- CCGTCATTTCTCTCAGTTTCAGGG -3'
<i>Tnfsf4</i> (OX40L)	forward: 5'- GGACCCTCCAATCCAAAGACTCA -3' reverse: 5'- ATCGCACTTGATGACAACCGAAT -3'
<i>Jag2</i> (Jagged2)	forward: 5'- GTCGTCATTCCTTTTCAGTTTCGC -3' reverse: 5'- TCATCTGGAGTGGTGTCAATTGTCC -3'
<i>Icosl</i> (ICOSL)	forward: 5'- CTTGGTCTGTTCTTGCTGCTGTTG-3' reverse: 5'- AGTTGAAATGGCGTCTGTGGG -3'
<i>Cr1f2</i> (TSLPR)	forward: 5'- GTGACGCTGCTCTGGACACC -3' reverse: 5'- AGCCCGCCCACTGTCAAGTC-3'
<i>Hprt</i> (HPRT)	forward: 5'- TTGGGCTTACCTCACTGCTTTCC -3' reverse: 5'- ATCATCGCTAATCACGACGCTGG -3'
HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.	