

## アレルギー性気道炎症の性差の加齢変化 — サイトカイン産生とプロゲステロンの影響に関する検討 —

斎藤 彩, 栗山 愛, 和田 佳奈, 奥山 香織, 大河原雄一,  
高柳 元明, 大野 勲\*

### The influence of age on the sex-related difference in allergic airway inflammation: the effect of progesterone on cytokine production by lymphocytes

Aya SAITO, Ai KURIYAMA, Kana WADA, Kaori OKUYAMA, Yuichiro OHKAWARA,  
Motoaki TAKAYANAGI, and Isao OHNO\*

(Received November 20, 2008)

The incidence, severity and prognosis of asthma can be affected by a number of factors, including the patient's age and sex. Clinical observations and epidemiologic studies indicate that the severity of asthma is higher among boys than girls, but that the ratio inverts after puberty. Thereafter, in the elderly, the sex difference disappears. However, the mechanisms underlying the age-related sex differences in the severity of asthma are not clear. Therefore, to clarify the mechanisms we compared using a murine model of asthma allergen-induced airway inflammation and the effect of progesterone on antigen-induced cytokine production by lymphocytes between the different age and sex. In 6 weeks old C57BL/6 mice, the airway inflammation in female mice sensitized with OVA followed by OVA inhalation was more severe than that in male mice, whereas the sex difference in the airway inflammation was not observed in 16 weeks old mice. In not only 6 but also 16 weeks old mice, bronchial lymph nodes (BLN) cells from OVA-sensitized female mice produced more Th2 cytokine, than those from age-matched male mice, upon stimulation with OVA. Progesterone did not significantly affect the sex difference in Th2 cytokine production by BLN cells in either 6 or 16 weeks old mice. Our findings suggest that the age-related sex differences in allergic airway inflammation are not due to simply the differences in lymphocytes function and sensitivities to progesterone.

**Key words** — asthma; airway inflammation; sex difference; age difference; Th2 cytokine; progesterone

## 緒 言

気管支喘息は気道の慢性炎症と種々の程度の気道狭窄と気道過敏性の亢進, そして, 臨床的には繰り返し起こる咳, 喘鳴, 呼吸困難で特徴づけられる. 気道炎症には好酸球, T細胞, マスト細胞等の炎症細胞, 気道上皮細胞, 線維芽細胞をはじめとする気道構築細胞, および種々の液性因子が関与する. 持続する気道炎症は気道障害とそれに引き続く気道構造の変化 (リモデリング) を惹起し, 非可逆性の気流制限をもたらし, 気道過敏性を亢進させる. 気道炎症の成立には, 気道に浸潤してきた炎症細胞と気道構築細胞が分泌する種々の炎症性メディエーターおよびサイトカインの相互作用が関与している. サイトカインを産生するヘルパー T細胞には1型 (Th1) と2型 (Th2) がある. Th1はinterleukin (IL)-2,  $\gamma$ -interferon

(IFN- $\gamma$ )等を産生し, これらのTh1サイトカインは細胞性免疫応答に関与する. Th2はIL-4, IL-5, IL-13等を産生し, 体液性免疫応答に関与する.<sup>1)</sup> 喘息の気道炎症はTh1/Th2反応のバランスがTh2反応へシフトすることにより発症する<sup>2)</sup>と考えられている. 実際, 喘息患者の末梢血中のTh2数は健常者と比較して増加し, IFN- $\gamma$ /IL-4産生比は低下する.<sup>3)</sup> 吸入された抗原は抗原提示細胞で処理されT細胞がそれを認識して活性化され, ナイーブヘルパーT細胞 (Th0)はTh2へ分化し, Th2優位な状態となる. Th2が産生するサイトカインのうち, IL-5は好酸球の骨髄での分化・増殖, 活性化, 気道局所への遊走, 生存延長に深く関与し, IL-4, 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.<sup>1)</sup>

喘息は環境因子と個体因子が絡み合って病態を形成する. 環境因子には大気汚染, 喫煙等があり,

個体因子としては性差がある。<sup>1)</sup>疫学的にみると、2～17歳では喘息患者の入院率は女性より男性の方が高いが、18～54歳では入院率が男性より女性で約3倍も高くなり、思春期以降に入れ替わっている。<sup>4)</sup>さらに、更年期(50歳前後)の女性では、喘息の重症化や発症率が増加する傾向にある。<sup>5)</sup>喘息モデル動物でも、喘息症状に対する加齢の影響が報告されている。雌性の喘息モデルマウスでは、若齢(6週齢)に比べ加齢(6ヶ月齢)で気道炎症に悪化がみられ、また、脾細胞からのIL-5およびIFN- $\gamma$ 産生量においても若齢に比べ加齢で増加した。<sup>6)</sup>一方、雄性の喘息モデルラットを用いた研究では、若齢(8週齢)に比べ加齢(3ヶ月齢)でIFN- $\gamma$ が増加し、気道炎症は著しく低い<sup>7)</sup>という報告がある。しかし、喘息における重症度の性差が加齢によって変化する詳細なメカニズムは不明である。

喘息の重症度に関わるものとして女性ホルモンが考えられている。女性ホルモンのプロゲステロンとエストラジオールはTh0からTh2系統への分化を増進させ、<sup>8)</sup>IL-4、IL-5の抗原特異的な産生を高めるなどTh2反応を優位にする機能を持ち、気道炎症の悪化に寄与している。<sup>9,10)</sup>喘息モデルマウスにおいても気道炎症の性差に性ホルモンの影響が報告されている。プロゲステロンを投与された雄性マウスの気道への好酸球の浸潤やTh2サイトカインの増加、気道過敏性の亢進が認められた<sup>11)</sup>という報告がある。

一方、リンパ球の機能そのものに性差があることが報告されている。ヒトでは、非特異的的刺激による末梢血リンパ球からのサイトカイン産生でみると男性に比べ女性でIFN- $\gamma$ /IL-4産生比が低い<sup>12)</sup>ということが報告されている。喘息モデルマウスでは、抗原刺激による脾細胞からのIL-5産生が雄性に比べ雌性で高かった<sup>13)</sup>ということも報告されている。

以上のことから、気道炎症の性差が加齢によって変化するのには、プロゲステロンによるTh2サイトカイン産生への影響が加齢により変化するためであり、そして、リンパ球によるTh2サイトカイン産生の性差が加齢によって変化するためであるという仮説を立てた。

この仮説を検証するために、喘息モデルマウスを用いて、加齢による気道炎症の変化を観察し、週齢ごとにプロゲステロン存在下および非存在下

での抗原刺激による気管支リンパ節細胞からのサイトカイン産生量を、雌雄間および週齢間で比較した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 使用動物

動物は6および16週齢のC57BL/6系の雄性および雌性マウス(日本クレア, 東京, 日本)を使用した。マウスは実験に使用するため(明期7:00～19:00, 暗期19:00～7:00), 室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の一定環境下1週間以上飼育した。なお、マウスには滅菌済みのマウス用固形飼料(CE-2, 日本クレア)および滅菌済みの水道水を自由に摂取させた。実験は東北薬科大学動物実験指針に従って行った。

### 2. 抗原感作と抗原吸入

実験はOkuyama<sup>13)</sup>らの報告に従って行った。6および16週齢のマウスに抗原として卵白アルブミン(OVA)(GradeV, SIGMA, St.Louis, MO, USA)を用い、OVA/Alum(OVA $16 \mu\text{g/mL}$ , Al(OH) $_3$  8 mg/mL in saline)(和光純薬, 大阪, 日本)を $500 \mu\text{L}$ 腹腔内投与により感作した。投与は5日間隔で2回行った。2回目のOVA/Alum投与から12日後、マウスにプラスチックボックス内でOVA(5 mg/mL)を1時間吸入させ、4時間後さらに1時間の吸入を行った。OVAの噴霧は、Bennet nebulizer(Sunrise Medical HHG, INC., Somerset, PA, USA)を用い、流速10 L/minで行った。抗原吸入1日後、気管支リンパ節(BLN)を採取した。吸入5日後、diethyl ether(和光純薬)麻酔下で、眼窩よりキャピラリーで採血し、脱血後、マウスの胸部を開き、気管にカニユーレを挿入、固定後気管および肺を一塊にして摘出した。カニユーレよりphosphate-buffered saline(PBS)(NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na $_2$ HPO $_4$ ·12H $_2$ O 8.1 mM, KH $_2$ PO $_4$  1.47 mM, pH 7.4)(和光純薬)0.25 mLを注入し2回洗浄した。回収した気管支肺胞洗浄液(BALF)は200  $\mu\text{g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ で3分間遠心後、細胞残渣は1% fetal bovine serum(FBS)(ICN, Biomedicals, Icn., Aurora, OH, USA)/PBS 0.2 mLで懸濁した。このうち0.04 mLを0.1% trypan blue(和光純薬)0.04 mLに添加し、総白血球数を算定した。残りの0.16 mLは、300 rpm, 3分間サイトスピン(Thermo Shandon, Runcorn, UK)にかけて、乾燥後Diff-Quik染色液

(国際試薬, 神戸, 日本) で染色し, 細胞分画を算定した (倍率 1000 倍で総細胞数 200 個以上観察) (Fig. 1). なお, この喘息モデルマウスは, 有意な抗原誘発性気道炎症および気道過敏性亢進を引き起こすことを報告している.<sup>13,14)</sup>

### 3. 気管支リンパ節細胞の調整と培養

採取した BLN は 1% CollagenaseD (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) により処理し, BLN 細胞を得た. 洗浄した BLN 細胞を RPMI-1640 [非働化した 10% FBS, 2 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> (和光純薬), 55 μM 2-mercaptoethanol (和光純薬), 2 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin-G (明治製菓, 東京, 日本), 50 μg/mL streptomycin sulphate (明治製菓) 含] 培地を用いて  $5 \times 10^6$  cells/mL に懸濁した. これに OVA (200 μg/mL) を添加し, 96 well プレートに  $1 \times 10^6$  cells/well になるように蒔き, 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した. Progesterone ( $10^{-10} \sim 10^{-6}$  M) (SIGMA) は OVA と同時に添加した. なお, progesterone 非添加群には ethanol (最終濃度 0.05%) を添加した. 培養 72 時間後, 培養上清を採取し, サイトカイン測定まで -80°C で保存した (Fig. 1).

### 4. サイトカインの測定

培養上清中の IL-4, IL-5 および IFN- $\gamma$  はそれぞれ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて, 付属のプロトコールに従って測定した. なお, それぞれの測定範囲は IL-4 が 2 ~ 500 pg/mL, IL-5 が 7 ~ 1000 pg/mL, IFN- $\gamma$  が 2 ~ 600 pg/mL である.

### 5. 統計処理

棄却検定には Smirnov の棄却検定を用いた. データは mean  $\pm$  S.D. で表した. 各週齢間および雄雌間の比較には Mann-Witney の U 検定を行い解析した. 各週齢ごとの progesterone 添加濃度間の比較には Tukey の一因子反復測定分散分析・多重比較検定を行った. 解析には PRISM4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) および Stat Mate III (ATMS, 東京, 日本) を使用した. なお,  $P < 0.05$  を有意差ありとした.

## 実験結果

### 1. 抗原誘発性気道炎症反応の性差と加齢変化

抗原吸入後 5 日目の BALF 中炎症細胞を各週齢ごとに雌雄間で比較すると, 6 週齢では (Fig. 2A)

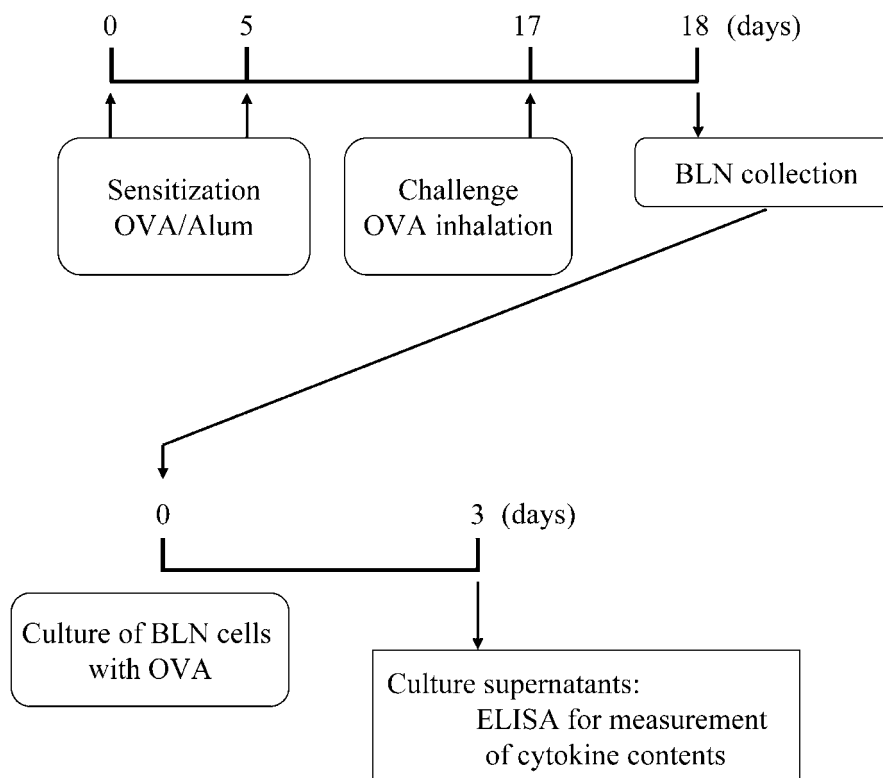


Fig. 1. Diagrammatic representation of the protocols for sensitization and culture of BLN cells

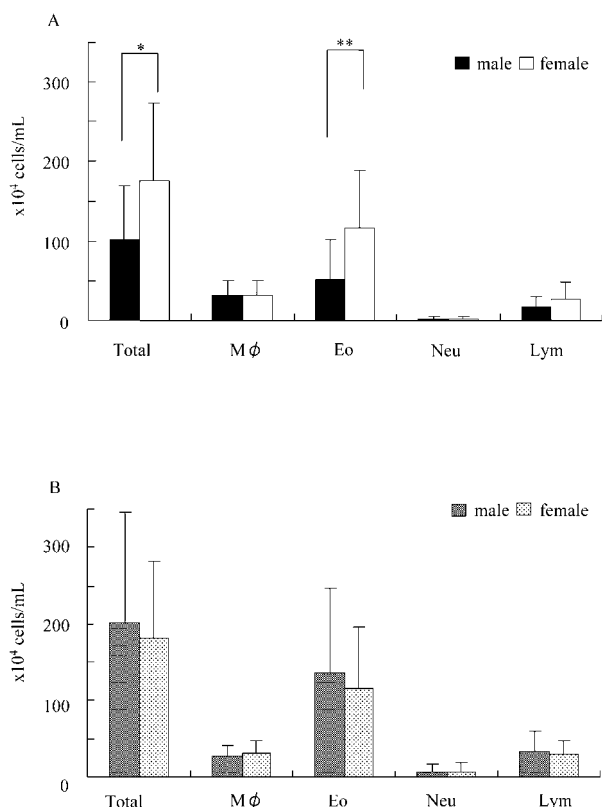


Fig. 2. Sex differences in the numbers of cells in BALF from age-matched male and female mice after OVA inhalation. Male and female mice were sensitized at 6 (A) and 16 (B) weeks old, and BALF were obtained 5 days after the OVA inhalation as described in Materials and Methods. The numbers of total cells (Total), macrophages (M $\phi$ ), eosinophils (Eo), neutrophils (Neu) and lymphocytes (Lym) in BALF from male and female mice were counted. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=16~26). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

総細胞および好酸球が雄性マウスに比べ雌性マウスで有意に高かった。(総細胞：雄性： $100.8 \pm 69.1 \times 10^4/\text{mL}$  vs 雌性： $175.8 \pm 98.4 \times 10^4/\text{mL}$ ,  $P < 0.05$ , 好酸球：雄性： $51.2 \pm 49.5 \times 10^4/\text{mL}$  vs 雌性： $115.3 \pm 73.2 \times 10^4/\text{mL}$ ,  $P < 0.01$ ). 16週齢では (Fig. 2B) すべての炎症細胞で有意な差はみられなかった。

雌雄ごとに週齢間で比較すると, 雄性マウスでは (Fig. 3A) 総細胞, 好酸球, 好中球およびリンパ球が6週齢に比べ16週齢で有意に高かった (総細胞：6週齢： $100.8 \pm 69.1 \times 10^4/\text{mL}$  vs 16週齢： $202.0 \pm 143.8 \times 10^4/\text{mL}$ ,  $P < 0.05$ , 好酸球：6週齢： $51.2 \pm 49.5 \times 10^4/\text{mL}$  vs 16週齢： $136.9 \pm 109.5 \times 10^4/\text{mL}$ ,  $P < 0.05$ , 好中球：6週齢： $1.8 \pm 2.8 \times 10^4/\text{mL}$  vs 16週齢： $6.5 \pm 9.0 \times 10^4/\text{mL}$ ,  $P < 0.05$ , リンパ球：6週齢： $16.7 \pm$

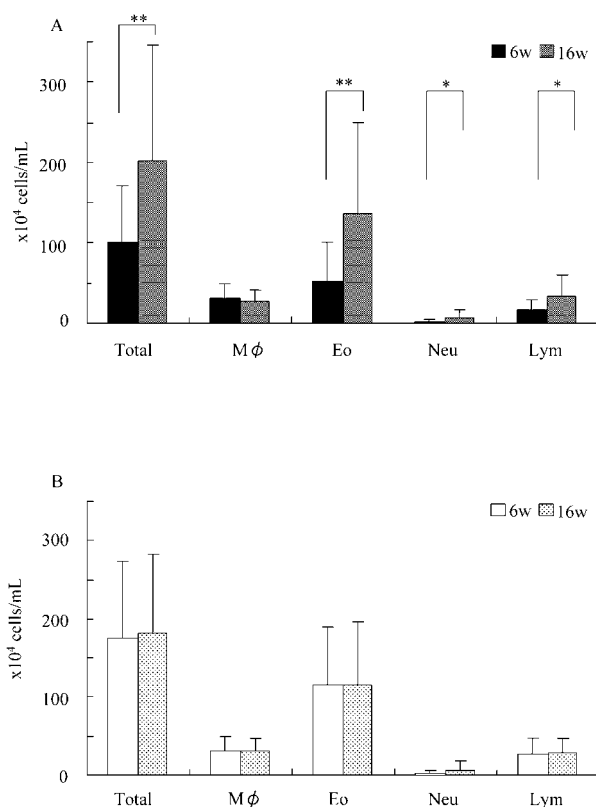


Fig. 3. Age differences in the numbers of cells in BALF from sex-matched 6 weeks old and 16 weeks old mice after OVA inhalation. BALF were obtained as in Fig.2. The numbers of total cells (Total), macrophages (M $\phi$ ), eosinophils (Eo), neutrophils (Neu) and lymphocytes (Lym) cells in BALF from male (A) and female (B) mice were counted. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=16~26). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

$12.9 \times 10^4/\text{mL}$  vs 16週齢： $32.3 \pm 27.4 \times 10^4/\text{mL}$ ,  $P < 0.05$ ). 雌性マウスでは (Fig. 3B) すべての炎症細胞で有意な差はみられなかった。

## 2. BLN細胞によるサイトカイン産生量の性差と加齢変化

プロゲステロン非添加時のサイトカイン量を6週齢において雌雄間で比較すると, IL-5が雄性マウスに比べ雌性マウスで有意に高かった (IL-5：雄性： $1908.6 \pm 946.3 \text{ pg/mL}$  vs 雌性： $3610 \pm 1774.6 \text{ pg/mL}$ ,  $P < 0.05$ ). IL-4, IFN- $\gamma$ およびIFN- $\gamma$ /IL-4に有意な差はみられなかった. プロゲステロン添加, 非添加間でのサイトカイン量を比較すると, 6週齢雄性マウスではIFN- $\gamma$ およびIFN- $\gamma$ /IL-4が非添加時に比べ $10^{-6}$  M添加時で有意に低かった (IFN- $\gamma$ ：非添加： $2027.1 \pm 1276.5 \text{ pg/mL}$  vs  $10^{-6}$

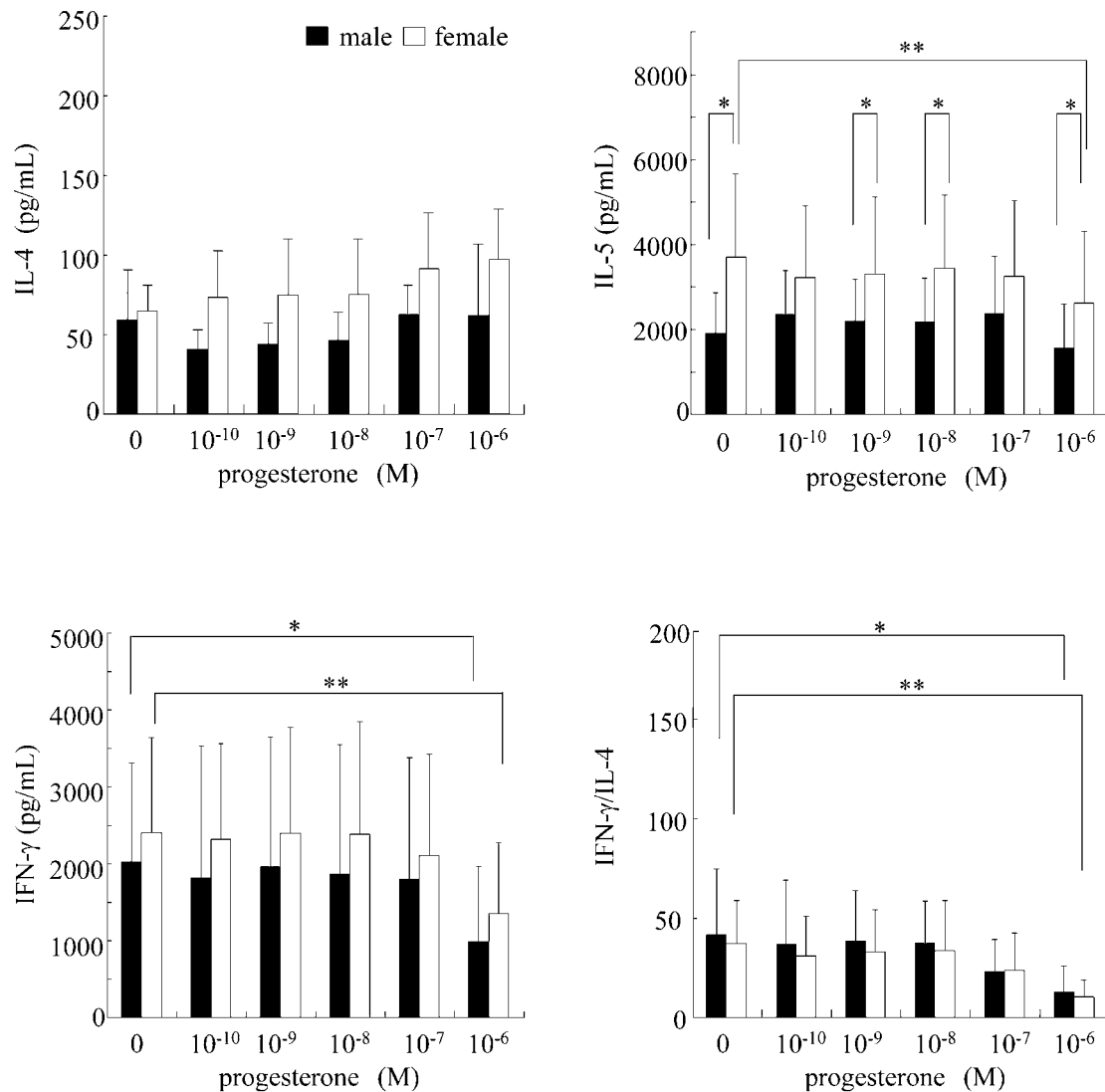


Fig. 4. Sex differences in cytokine production by BLN cells. BLN cells from 6 weeks old male and female mice were incubated with OVA (200  $\mu$ g/mL) in the presence ( $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  M) or absence of progesterone. The levels of IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-4 in the culture medium were measured as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=7~11). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

M :  $982.2 \pm 874.6$  pg/mL,  $P < 0.05$ , IFN- $\gamma$ /IL-4 : 非添加 :  $41.2 \pm 33.2$  vs  $10^{-6}$  M :  $12.3 \pm 13.4$ ,  $P < 0.05$  . 6 週齢雌性マウスでは IL-5, IFN- $\gamma$  および IFN- $\gamma$ /IL-4 が非添加時に比べ  $10^{-6}$  M 添加時で有意に低かった (IL-5 : 非添加 :  $3610 \pm 1774.6$  pg/mL vs  $10^{-6}$  M :  $2644.5 \pm 1440.1$  pg/mL,  $P < 0.01$ , IFN- $\gamma$  : 非添加 :  $2391.7 \pm 1239.6$  pg/mL vs  $10^{-6}$  M :  $1350.3 \pm 916.4$  pg/mL,  $P < 0.01$ , IFN- $\gamma$ /IL-4 : 非添加 :  $37.7 \pm 21.2$  vs  $10^{-6}$  M :  $10.6 \pm 8.0$ ,  $P < 0.01$ ) . プロゲステロン添加時のサイトカイン量を 6 週齢において雌雄間で比較すると, プロゲステロン  $10^{-6}$  M 添加時に IL-5 が雄性マウスに比べ雌性マウスで有意に高かった (IL-5 :  $10^{-6}$  M :

雄性 :  $1548 \pm 1053.9$  pg/mL vs 雌性 :  $2644.5 \pm 1440.1$  pg/mL,  $P < 0.05$ ) (Fig. 4).

サイトカイン量を 16 週齢において雌雄間で比較すると, プロゲステロン非添加時では, IL-4 および IL-5 が雄性マウスに比べ雌性マウスで有意に高かった (IL-4 : 雄性 :  $28.8 \pm 13.5$  pg/mL vs 雌性 :  $70.3 \pm 27.2$  pg/mL,  $P < 0.01$ , IL-5 : 雄性 :  $2658 \pm 1788.2$  pg/mL vs 雌性 :  $5830 \pm 1368.2$  pg/mL,  $P < 0.05$ ) . IFN- $\gamma$  および IFN- $\gamma$ /IL-4 に有意な差はみられなかった. プロゲステロン添加, 非添加間のサイトカイン量を比較すると, 16 週齢雄性マウスでは IL-4 において非添加時に比べ  $10^{-6}$  M 添加時で有意に高く (IL-4 : 非添加 :  $28.8 \pm 13.5$  pg/mL vs



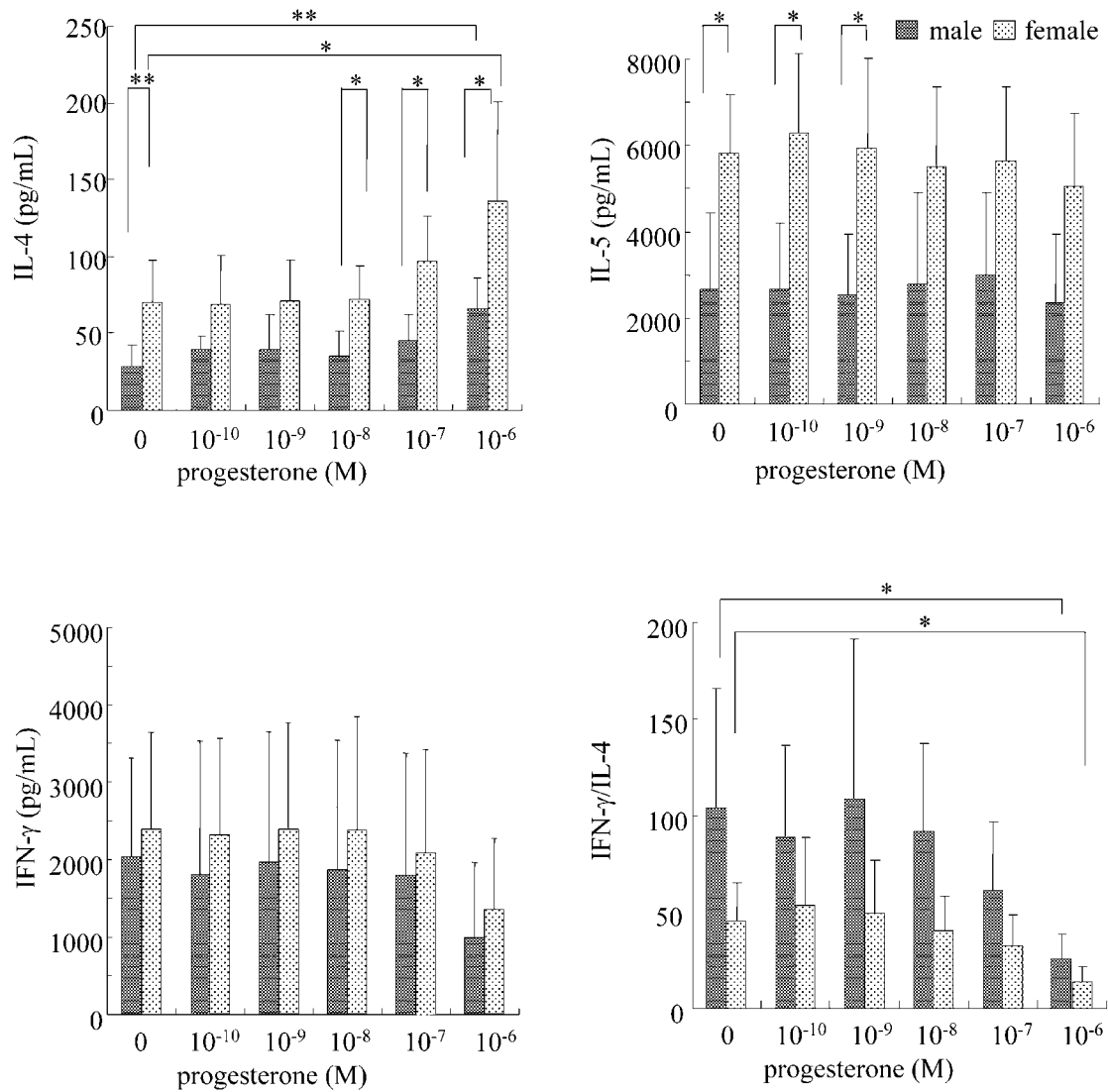


Fig. 5. Sex differences in cytokine production by BLN cells. BLN cells from 16 weeks old male and female mice were incubated with OVA ( $200 \mu\text{g/mL}$ ) in the presence ( $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  M) or absence of progesterone. The levels of IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-4 in the culture medium were measured as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=5). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

$10^{-6}$  M:  $66.5 \pm 19.3$  pg/mL,  $P < 0.01$ ), IFN- $\gamma$ /IL-4 では非添加時に比べ  $10^{-6}$  M 添加時で有意に低かった (IFN- $\gamma$ /IL-4 : 非添加:  $104.2 \pm 62.1$  vs  $10^{-6}$  M:  $25.5 \pm 13.0$ ,  $P < 0.05$ ). 16 週齢雌性マウスでは IL-4 において非添加時に比べ  $10^{-6}$  M 添加時で有意に高く (IL-4 : 非添加:  $70.3 \pm 27.2$  pg/mL vs  $10^{-6}$  M:  $136.4 \pm 64.0$  pg/mL,  $P < 0.05$ ), IFN- $\gamma$ /IL-4 では非添加時に比べ  $10^{-6}$  M 添加時で有意に低かった (IFN- $\gamma$ /IL-4 : 非添加:  $45.3 \pm 19.8$  vs  $10^{-6}$  M:  $14.3 \pm 6.9$ ,  $P < 0.05$ ). プロゲステロン添加時のサイトカイン量を 16 週齢において雌雄間で比較すると,  $10^{-6}$  M 添加時に IL-4 が雄性マウスに比べ雌性マウスで有意に高かった (IL-4 :  $10^{-6}$  M : 雄

性:  $66.5 \pm 19.3$  pg/mL vs 雌性:  $136.4 \pm 64.0$  pg/mL,  $P < 0.05$ ) (Fig. 5).

サイトカイン量を雄性マウスにおいて週齢間で比較すると, プロゲステロン非添加時では有意な差はみられなかった. プロゲステロン添加, 非添加間のサイトカイン量を比較すると, 前述の通り, IL-4 において 16 週齢雄性マウスでは非添加時に比べ  $10^{-6}$  M 添加時で有意に高くなったが,  $10^{-6}$  M 添加時において週齢間で比較すると, 非添加時と同様に有意な差はみられなかった. IFN- $\gamma$  において 6 週齢雄性マウスでは非添加時に比べ  $10^{-6}$  M 添加時で有意に低くなったが,  $10^{-6}$  M 添加時において週齢間で比較すると, 非添加時と同様に有意な差は

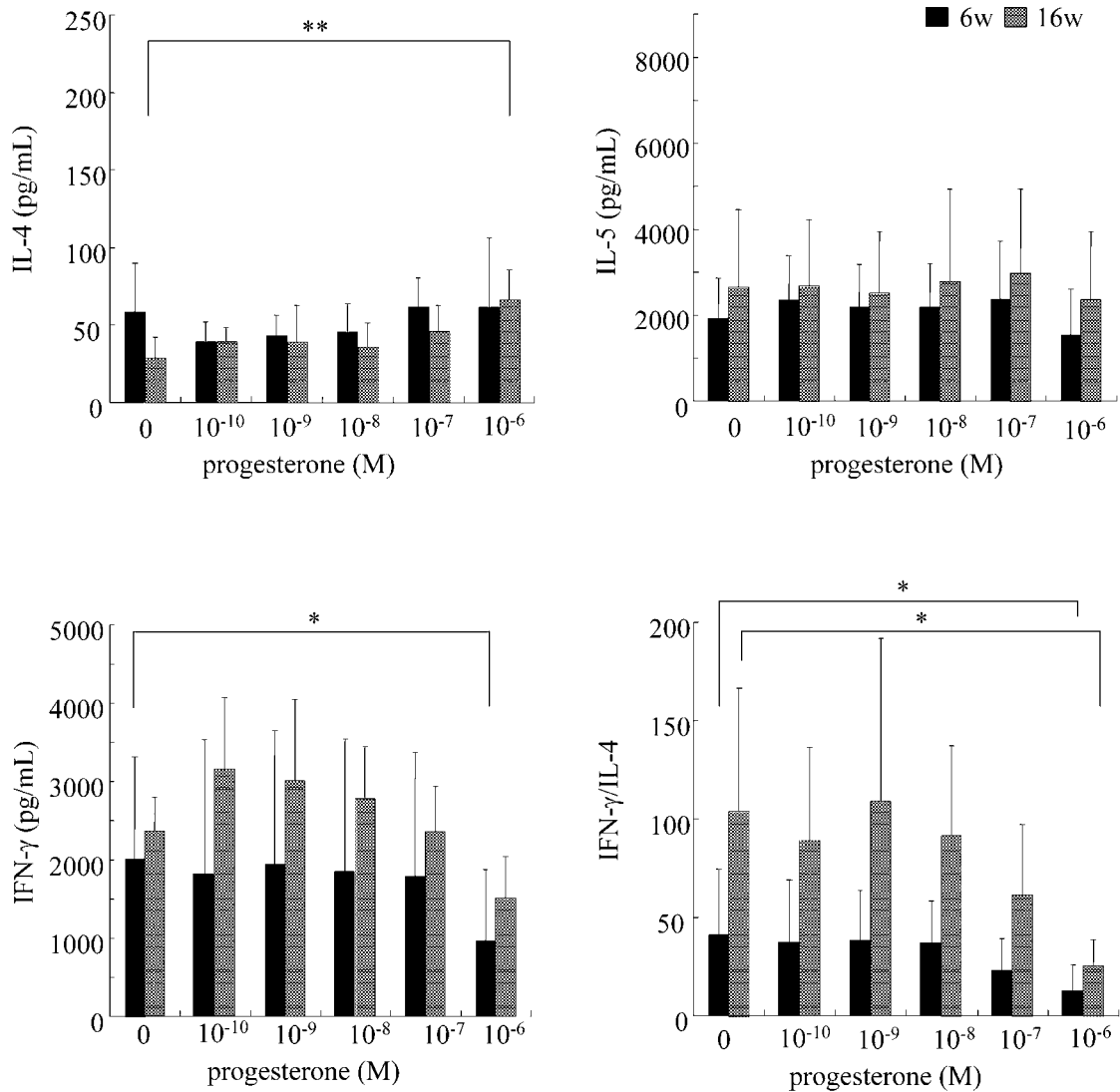


Fig. 6. Age differences in cytokine production by BLN cells. BLN cells from 6 and 16 weeks old male mice were incubated with OVA (200  $\mu$ g/mL) in the presence ( $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  M) or absence of progesterone. The levels of IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-4 in the culture medium were measured as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=5~7). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

みられなかった。IFN- $\gamma$ /IL-4において6および16週齢雄性マウスでは非添加時に比べ10<sup>-6</sup> M添加時で有意に低くなったが、10<sup>-6</sup> M添加時において週齢間で比較すると、非添加時と同様に有意な差はみられなかった (Fig. 6)。同様に雌性マウスにおいて週齢間で比較すると、プロゲステロン非添加時ではIL-5が6週齢に比べ16週齢で有意に高く (IL-5: 非添加: 6週齢: 3610  $\pm$  1774.6 pg/mL vs 16週齢: 5830  $\pm$  1368.2,  $P$  < 0.05), IL-4, IFN- $\gamma$  および IFN- $\gamma$ /IL-4は有意な差はみられなかった。プロゲステロン添加, 非添加間のサイトカイン量を比較すると, 前述の通り, IL-4において16週齢雌性マウスでは非添加時に比べ10<sup>-6</sup> M添加時で有

意に高くなったが, 10<sup>-6</sup> M添加時において週齢間で比較すると, 非添加時と同様に有意な差はみられなかった。IL-5において6週齢雌性マウスでは非添加時に比べ10<sup>-6</sup> M添加時で有意に低くなったが, 10<sup>-6</sup> M添加時において週齢間で比較すると, 非添加時と同様に6週齢に比べ16週齢で有意に高かった (10<sup>-6</sup> M: 6週齢: 2644.5  $\pm$  1440.1 pg/mL vs 16週齢: 5056  $\pm$  1699.0 pg/mL,  $P$  < 0.05)。IFN- $\gamma$ において6週齢雌性マウスでは非添加時に比べ10<sup>-6</sup> M添加時で有意に低くなったが, 10<sup>-6</sup> M添加時において週齢間で比較すると, 非添加時と同様に有意な差はみられなかった。IFN- $\gamma$ /IL-4において6および16週齢雌性マウスでは非添加時に比

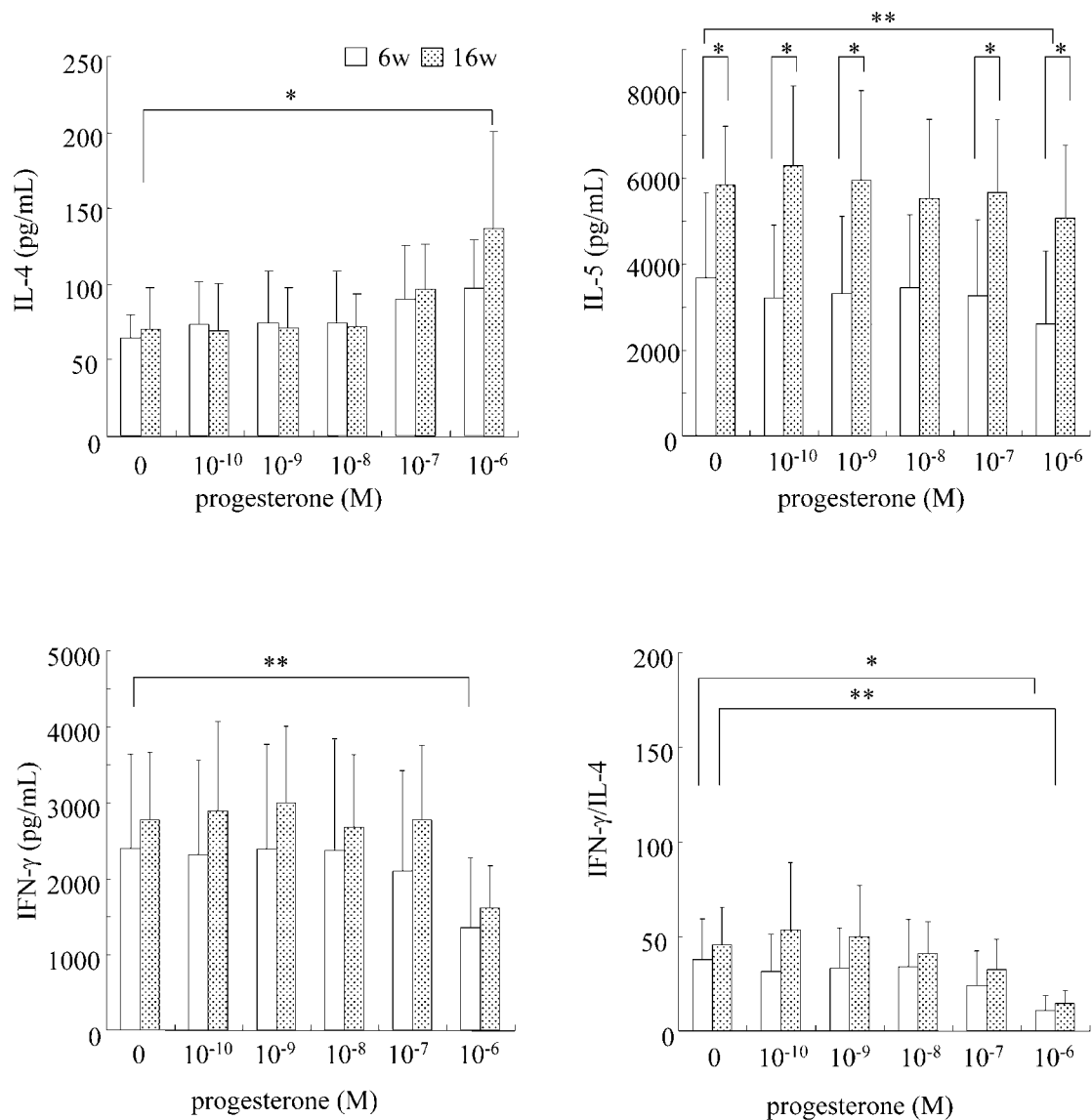


Fig. 7. Age differences in cytokine production by BLN cells. BLN cells from 6 and 16 weeks old female mice were incubated with OVA (200  $\mu$ g/mL) in the presence ( $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  M) or absence of progesterone. The levels of IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-4 in the culture medium were measured as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=5~11). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

べ  $10^{-6}$  M 添加時で有意に低くなったが、 $10^{-6}$  M 添加時において週間間で比較すると、非添加時と同様に有意な差はみられなかった (Fig. 7).

## 考 察

今回、我々は、喘息患者の重症度における性差が加齢により変化するメカニズムについて検討した。喘息患者の重症度を入院率でみた場合、2~17歳では女性より男性の方が高いが、18~54歳では男性より女性で約3倍高くなる。<sup>4)</sup> また、50歳代から60歳代でこのような性差が消失する<sup>15)</sup>

ことが知られている。このような喘息患者の重症度における性差の加齢変化の原因は不明であるが、性差と加齢による病態の変化のそれぞれについては、いくつかの報告がある。まず性差の原因の一つとしてリンパ球による Th2 サイトカイン産生能における性差が知られている。ヒトでの非特異的的刺激による末梢血リンパ球からのサイトカイン産生でみると、男性に比べ女性で IFN- $\gamma$ /IL-4 が低い。<sup>12)</sup> つまり Th2 優位の発現になっていること、また、喘息モデルマウスにおいて抗原特異的に刺激された脾細胞からの IL-5 産生が雄性に比べ雌性で高い<sup>13)</sup> ということが報告されている。さらにリンパ球か



らのサイトカイン産生に対して、性ホルモンが促進的あるいは抑制的に作用することも示されている。4～6週齢雄性マウスの非特異的刺激Tリンパ球に女性ホルモンであるプロゲステロンを添加すると、IL-4産生は促進され、IFN- $\gamma$ 産生は抑制されていた。<sup>8)</sup> 一方、20～39週齢マウスの非特異的刺激Tリンパ球に男性ホルモンであるジヒドロテストステロンを添加すると、IL-4およびIFN- $\gamma$ 産生は抑制された。<sup>16)</sup> しかし、性ホルモンの影響が男性（雄性）と女性（雌性）のリンパ球の間で異なるかは検討されていない。また、このようなリンパ球機能が加齢とともに変化するということが報告されている。男性では若齢（30歳前後）より老齢（80歳前後）においてIL-4産生は高くなり、IFN- $\gamma$ 産生は変化せず、女性ではIL-4およびIFN- $\gamma$ 産生は変化しない<sup>17)</sup> ことが示されている。喘息モデル動物でも、加齢の影響が報告されている。雄性の喘息モデルラットを用いた研究では、若齢（8週齢）に比べ加齢（3ヶ月齢）で、BALF中のIFN- $\gamma$ が増加し、気道炎症は著しく軽減した<sup>7)</sup> という報告がある。一方、雌性の喘息モデルマウスを用いた研究では、若齢（6週齢）に比べ加齢（6ヶ月齢）で脾細胞からのIL-5およびIFN- $\gamma$ 産生量が増加し、気道炎症に悪化がみられた。<sup>6)</sup> しかし、気道炎症における性差の加齢変化のメカニズムを明らかにするためには、今回我々が実施したように、リンパ球のサイトカイン産生能および性ホルモンの影響さらにこれらの加齢による変化を同時に同じモデルで検討することが必要である。プロゲステロンは抗原特異的に刺激されたマウス脾細胞からのTh2サイトカイン産生を促進する<sup>18)</sup> こと、プロゲステロンを投与された雄性喘息モデルマウスでは気道の好酸球の増加、気道過敏性の亢進が認められる<sup>11)</sup> ことなどにより、性ホルモンのうちプロゲステロンを用いて実験を行った。

6週齢と16週齢の気道炎症を雌雄間で比較すると、6週齢では雌性で有意に高く、16週齢では有意な差はみられなかった。雌雄ごとの加齢変化を比較すると、雌性では有意な差はみられなかったが、雄性では16週齢で有意に増悪しており、このことが16週齢での性差消失の背景となっていると考えられる。この加齢による気道炎症の性差の変化は、人での喘息重症度の性差の加齢変化を再現していると考えられる。この機序を明らかにするため、リンパ球のサイトカイン産生能および性ホ

ルモンの影響を検討した。雄性マウスで加齢に伴う気道炎症が増加した原因として、加齢に伴うTh2サイトカイン産生量の増加あるいはTh2優位のサイトカイン産生があると予想したが、IL-4、IL-5産生量およびIFN- $\gamma$ /IL-4に6週齢と16週齢の間に有意な差はみられなかった。16週齢雄性の気道炎症の増加にサイトカイン以外の関与している因子として、Th2抑制細胞である制御性T細胞（Treg）の低下やケモカインの増加が考えられる。一方、雌性では加齢に伴う気道炎症に変化はみられなかったことから、Th2サイトカイン産生量およびIFN- $\gamma$ /IL-4に有意な変化はみられないことが予想されたが、週齢間で比較すると、16週齢でIL-5が有意に増加していた。気道炎症に対するIL-5の影響が16週齢マウスでは少ないことが可能性として考えられる。今回、6週齢でみられた気道炎症の性差が16週齢で消失していたが、これまで我々は、30週齢で気道炎症が雄性よりも雌性において有意に高く、性差が再び出現することを確認している。従って、ヒトにおいても加齢による変化を検討する際には、若齢と高齢の他に中年における変化にも注目する必要があると考えられる。次に、気道炎症の週齢ごとの性差の結果から、6週齢の雌性で有意に高かったIL-5の性差が16週齢では消失するのではないかと考えた。しかし、16週齢でも雌性優位のIL-5の性差は存続し、さらにIL-4も雌性で有意に高かった。このことから、加齢による気道炎症の性差の変化は、Th2サイトカイン産生の性差だけで説明できるものではないと思われる。

今回用いた喘息モデルマウスの血中プロゲステロン濃度をenzyme-immunoassayで測定したところ、その濃度は $4.2 \times 10^{-9} \sim 7.3 \times 10^{-9}$  Mであり、雌雄間および週齢間に有意差はみられなかった。今回の検討で添加した $10^{-9} \sim 10^{-8}$  Mはマウスの血中濃度に一致する。プロゲステロン添加、非添加間のサイトカイン量を比較すると、非添加に比べ $10^{-6}$  Mで有意な差がみられるものもあったが、プロゲステロン添加による性差および加齢変化への影響はみられなかった。マウスの生体内でのプロゲステロン量を考慮しても、性差および加齢変化への影響はみられなかった。従って、サイトカイン産生の性差の加齢変化にプロゲステロンは関与していないと考えられる。また、ヒトの末梢血リンパ球からのサイトカイン産生量はプロゲステ

ロンの添加による変化はみられなかった<sup>12)</sup> という報告もある。

以上のことから, 喘息気道炎症の性差における加齢変化には, サイトカインの変動のみではなく, ケモカインや, Th2 免疫応答を抑制する細胞である Treg などが関与している可能性が考えられる。今後は, 喘息病態でみられる性差や加齢変化の解析には, サイトカイン以外の気道炎症に関与する他の因子についても検討することが必要だと思われる。

## REFERENCES

- 1) 喘息予防・管理ガイドライン 2006 ; 日本アレルギー学会監修
- 2) Larche M., Robinson D. S., Kay AB., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111**, 450-463 (2003).
- 3) Shirai T., Inui N., Suda T., Chida K., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **118**, 622-626 (2006).
- 4) Schatz M., Clark S., Camargo C. A. Jr., *Chest*, **129**, 50-55 (2006).
- 5) Bonner J. R., *Clin. Chest Med.*, **5**, 557-565 (1983).
- 6) Busse P. J., Zhang T. F., Srivastava K., Schofield B., Li X. M., *Clin. Exp. Allergy*, **37**, 1392-1403 (2007).
- 7) Yagi T., Sato A., Hayakawa H., Ide K., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, 38-47 (1997).
- 8) Miyaura H., Iwata M., *J. Immunol.*, **168**, 1087-1094 (2002).
- 9) Piccinni M. P., Giudizi M. G., Biagiotti R., Beloni L., Giannarini L., Sampognaro S., Parronchi P., Manetti R., Annunziato F., Livi C., Romagnani S., Maggi E., *J. Immunol.*, **155**, 128-133 (1995).
- 10) Lambert K. C., Curran E. M., Judy B. M., Milligan G. N., Lubahn D. B., Estes D. M., *J. Immunol.*, **175**, 5716-5723 (2005).
- 11) Hellings P. W., Vandekerckhove P., Claeys R., Billen J., Kasran A., Ceuppens J. L., *Clin. Exp. Allergy*, **33**, 1457-1463 (2003).
- 12) Giron-Gonzalez J. A., Moral F. J., Elvira J., Garcia-Gil D., Guerrero F., Gavilan I., Escobar L., *Eur. J. Endocrinol.*, **143**, 31-36 (2000).
- 13) Okuyama K., Wada K., Chihara J., Takayanagi M., Ohno I., *Clin. Exp. Allergy*, **38**, 1212-1219 (2008).
- 14) Kumagai K., Ohno I., Okada S., Ohkawara Y., Suzuki K., Shinya T., Nagase H., Iwata K., Shirato K., *J. Immunol.*, **162**, 4212-4219 (1999).
- 15) Zannolli R., Morgese G., *Med. Hypotheses*, **48**, 27-32 (1997).
- 16) Araneo B. A., Dowell T., Diegel M., Daynes R. A., *Blood*, **78**, 688-699 (1991).
- 17) Pietschmann P., Gollob E., Brosch S., Hahn P., Kudlacek S., Willheim M., Woloszczuk W., Peterlik M., Tragl K. H., *Exp. Gerontol.*, **38**, 1119-1127 (2003).
- 18) Imamura Y., Kubota T., Takanashi K., Mori S., Yoshida R., Wada K., Okuyama K., Takayanagi M., Ohno I., *J. Tohoku Pharmaceutical Univ.*, **53**, 77-84 (2006).