

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	マスタ`チアキ 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關与する 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

【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關与している可能性が示唆されている。実際に、女性の喘息患者の 80% においてエストラジオール、プロゲステロン、コルチゾールのうちいずれか 1 つ以上の濃度が健康な女性に比べて高いことや、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) 型免疫応答が關与しており、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や、樹状細胞数の増加と抗原量に相関関係があることも分かっている。

喘息モデルマウスを用いた研究でも、喘息患者と同様に、卵巣摘出マウスで炎症が悪化するなど喘息病態への性ホルモンの影響が報告されている。さらに、樹状細胞を消失させると炎症が減弱することから、樹状細胞が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ている。しかし、Th2 型免疫応答の性差への樹状細胞の關与については、ヒトにおいてもマウスにおいても不明である。

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、主要な樹状細胞サブセッ

トである CD11b^{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 と 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 吸入後の気道反応性および気管支肺泡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性の性差を調べるために、肺樹状細胞上の CCR7 発現を解析した。加えて、OVA 抗原取り込み性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の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 細胞分化誘導性の性差を評価するために、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⁺ 樹状細胞を作製し、OVA または IL-33 存在下における CD86 発現および MHC II 発現への 17β-エストラジオールの影響を解析した。最後に、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⁺ 樹状細胞と CD4⁺ T 細胞を共培養し、CD4⁺ T 細胞上の ST2 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・考察】

喘息モデルマウスにおける OVA 吸入後の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はオスよりもメスで有意に増加した。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。

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 時間後における樹状細胞数はオスよりもメスで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⁺ 樹状細胞では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。これらの結果から、OVA 吸入後早期の肺内樹状細胞数がオスよりもメスで増加することと、樹状細胞の肺から気管支リンパ節への移動能がオスよりもメスで優れていることが、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。

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、CD11b^{hi} 樹状細胞ではオスとメスの間に差が認められなかった。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。これらの結果から、CD103⁺ 樹状細胞が 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。

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⁺ 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⁺ 樹状細胞と比較して有意に亢進し、IL-33 の添加でさらに亢進した。しかし、OVA 非存在下の IL-33 のみの添加では 17 β -エストラジオールによる影響が認められなかった。これらの結果より、17 β -エストラジオールが、抗原の存在下において Th2 細胞分化誘導関連分子の発現を亢進する一方で、IL-33/ST2 系の活性に対する影響は限定的である可能性が示唆された。

17 β -エストラジオールを添加して作製した CD103⁺ 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、抗 CD86 抗体の添加によりその差が消失した。さらに、17 β -エストラジオール添加群と無添加群両方において、抗 CD86 抗体の添加による Th2 細胞分化および活性化能の抑制が認められた。これらの結果から、17 β -エストラジオールによる CD86 発現亢進が CD103⁺ 樹状細胞による Th2 細胞分化および活性化の亢進に関与する可能性が示唆された。

【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、メスの気管支リンパ節 CD103⁺ 樹状細胞の数および抗原取り込み能、Th2 細胞分化誘導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 CD103⁺ 樹状細胞の Th2 細胞分化誘導能の亢進には 17 β -エストラジオールが CD86 発現を介して関与することを証明した。

【参考文献】 主論文（原著論文）

Chiaki Masuda, Tomomitsu Miyasaka, Kaori Kawakami, Jin-ichi Inokuchi, Tasuku Kawano, Kaori Dobashi-Okuyama, Tomoko Takahashi, Motoaki Takayanagi, Isao Ohno.

Sex-based differences in CD103⁺ dendritic cells promote female-predominant Th2 cytokine production during allergic asthma
Clinical and Experimental Allergy, In Press.