

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	サトウ シンスケ 佐藤 伸輔（宮城県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第 22 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 8 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	精神的ストレスによる免疫寛容の抑制が惹き起こす好酸球・好中球気道炎症に関する研究
論文審査委員	主査 教授 大河原 雄一
	副査 教授 丹野 孝一
	副査 教授 高橋 知子

精神的ストレスによる免疫寛容の抑制が惹き起こす
好酸球・好中球気道炎症に関する研究

東北医科薬科大学大学院 薬学研究科

病態生理学教室

佐藤 伸輔

目次

1. 略語集	1
2. 研究背景	3
3. 研究方法	6
4. 研究結果	11
5. 考察	15
6. 展望	20
7. 謝辞	22
8. 参考文献	23
9. Figure and Table	31

I. 略語集

BAL	Bronchoalveolar lavage
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
BLN	Bronchial lymph node
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Eo	Eosinophil granulocyte
FOXP3	Forkhead box P 3
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
Neu	Neutrophil granulocyte
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist
IL-17AKO	Interleukin-17A knock out
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Prostaglandin
QOL	Quality of life
RNA	Ribonucleic acid
Roryt	Retinoic acid-related orphan receptor gamma
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
Th	Helper T cell
Th2	Helper T 2 cell
Th17	Helper T 17 cell

Treg

Regulatory T cell

WT

Wild-type

II. 研究背景

気管支喘息は、気管支の慢性的な炎症により粘膜の肥厚、気道の狭窄、喘鳴や呼吸困難を引き起こす疾患である。2017年の全世界における喘息患者数は27,268万人（有病率3.57%）、死亡者数は49万人（死亡率0.006%）であった¹。気管支喘息は、アスピリン喘息や運動誘発性喘息などのさまざまなフェノタイプが存在し、臨床的、生理学的、および形態学的特徴により分類される²。しかし、フェノタイプ分類の指標のみでは、治療が著効しない症例が存在し、その病態形成の複雑さが問題となっている³。そのため、有効な治療を実施するには、フェノタイプの他にその背後にある分子病理学に従ったエンドタイプによる分類も考慮する必要がある³。このエンドタイプ分類とは、気道炎症の原因となるサイトカインなど、その免疫応答を反映する。フェノタイプからエンドタイプを推察することで、分子病理学的、免疫学的側面から有効な治療に繋がられる可能性がある⁴。特に、重篤な気管支喘息の症例においては、エンドタイプ分類を基に治療戦略を立案することが、効果的な治療の提供、さらに層別化医療の提供へ発展させることが期待できる⁵。このように、フェノタイプやエンドタイプを十分に理解し、治療方針を立てることは、気管支喘息患者のQuality of life (QOL) 上昇や適切な医療を実施する上で大変重要である。

気管支喘息の治療ガイドラインの制定により、喘息治療ステップが示されるようになり⁶、重症度を指標に治療方法について明確化されており、軽症例から使用する吸入ステロイド剤が治療のゴールドスタンダードになり、著効を示している。さらに近年、コントロール不良により著しくQOLを害していた好酸球性気管支炎症の重症例に対して、生物学的製剤が使用されるようになり、十分な治療効果を得ることが出来るようになってきた^{4,7,8}。現在使用されてい

る、気管支喘息に対する有効な生物学的製剤として、抗 IgE 抗体であるオマリズマブ⁹や抗 Interleukin-5 (IL-5) 受容体 α 抗体であるベンラリズマブ¹⁰、抗 IL-4 受容体 α 抗体であるデュピルマブ¹¹ などが挙げられる。このようなガイドライン制定、生物学的製剤の開発を背景として本邦において、入院患者数、死亡者数ともに減少傾向となっている⁶。しかしながら直近 10 年程度だけをみると喘息罹患者数は微増しており、さらに死亡者数は下げ止まりとなっている^{1,12}。この原因のひとつとして、現行の治療に対する難治性喘息の存在が挙げられる。難治性喘息のフェノタイプとしては、好酸球ばかりでなく好中球の気道浸潤を伴う症例が挙げられ⁶、重症化しやすいことが報告されている¹³。この好中球性喘息は、好中球単独の浸潤であることは少なく、好酸球好中球混合喘息となっている可能性が高い¹³。例えば、喀痰中の好中球の割合が 60%を超えるような好中球性フェノタイプの喘息患者の特徴は、成人男性、遅発性喘息、重篤な肺疾患の併発、高用量の吸入ステロイド剤の使用、経口ステロイドの使用、入院率の高さが挙げられる¹³。さらに好中球性喘息患者は、好酸球性喘息患者と比較し、気道炎症を抑えるために高用量のコルチコステロイド剤の投与を必要となり、ステロイド抵抗性の状態であることが多い¹³。また、上記の生物学的製剤は、その標的が好酸球炎症に関わる免疫応答であり、好中球性喘息に対する効果が期待できない。そのため現在、好中球浸潤による炎症を呈する重症喘息患者に対して、抗生物質であるマクロライド系薬剤を投与する治療法が実施されている^{14,15}が、効果は限定的でより優れた治療法の確立が必要である。以上のことから好酸球好中球混合喘息の発症機序を解明し、難治性喘息の病態の形成を抑制し、死亡者数の減少に繋げるようにすることが重要である。

以前、当研究室において、喘息マウスモデルを用いた実験で免疫寛容誘導期における精神的ストレス負荷が、好酸球と好中球の気道浸潤をおこすことを報

告している¹⁶。さらにそのマウスモデルでは、免疫寛容誘導期の精神的ストレス負荷が、免疫寛容の成立を抑制することを報告した^{17,18}。この免疫寛容の成立抑制は、制御性 T (Regulatory T: Treg) 細胞への分化が抑制されていることが明らかになった^{16,19,20}。Treg 細胞は、自己抗原に対する免疫学的無反応を維持し、また有害かつ過剰な免疫反応を抑制する作用をもち²¹、転写因子である *Foxp3* により細胞機能を発現している特徴を有する。このように、免疫寛容誘導期における精神的ストレスが免疫寛容の成立を阻止し、好中球炎症を引き起こす可能性を示唆した¹⁶。

免疫寛容誘導期における精神的ストレスの負荷を解消することは、好中球性の気管支喘息発現を抑制するために最重要と考えるが、今日のストレス社会ではすべてのストレスを解消させることは不可能である。しかしながら、免疫寛容誘導期における精神的ストレスによる影響を抑えることができれば、好酸球好中球混合型喘息の増悪を防ぐことができる可能性がある。したがって、本研究では、免疫寛容誘導期における精神的ストレスの影響について、サイトカインに焦点を当て、無害抗原曝露により確立される免疫寛容とその誘導期における精神的ストレスが、その後の喘息エンドタイプ・フェノタイプに及ぼす影響を調査することとした。さらに、免疫寛容誘導期における精神的ストレスによる好酸球、好中球の気道浸潤について解明を進めることで、その影響の抑制方法について、エンドタイプを考慮し精神的ストレス関連喘息による症状を軽減させる可能性について検討した。

III. 研究方法

1. マウス

特定病原体を含まない雌の BALB/c マウスは、日本クレア（東京、日本）で購入した。BALB/c バックグラウンドの Interleukin-17A knock out (IL-17KO) マウスは、東京理科大学・岩倉洋一郎博士より提供を受けた²²。マウスは、一定温度で 12 時間の明暗サイクルの下で飼育し、殺菌された食物と水は自由に摂取できる環境で飼育した。

本研究は、東北医科薬科大学の動物実験委員会により承認された（承認番号：16002-cn、および 17004-cn、A2040 および A2207）。さらに、すべての実験は、関連する機関のガイドラインに従って行い、実験動物の苦痛や疼痛の緩和に充分配慮した。

2. 免疫寛容の誘導、抗原感作、抗原暴露、ストレス負荷のプロトコル

7 週齢のマウスを使用し喘息モデルを作製した^{2,16,17,23} (Fig. 1A)。抗原として Ovalbumin (OVA) 及びアジュバントとして水酸化アルミニウム (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を 0 日目と 5 日目に 1 匹に対して 4mg を腹腔内に投与した。免疫寛容は、-6 日目と -3 日目に水酸化アルミニウムなしで OVA の吸入により誘導した²⁴。吸入方法は、ストレス曝露期間の最初の 30 分間、エアロゾル化した OVA (生理食塩水中 5 mg/mL) を OVA 曝露用のチャンバーにて曝露した (寛容マウス)。コントロールとして、生理食塩水のみをチャンバーにて曝露した (喘息マウス)。

精神的ストレスとして拘束ストレスを負荷した²⁵。拘束ストレスは、各マウスを複数の通気孔を開けた 50 mL のコニカルチューブを用いて行った¹⁶。拘束

により、マウスは仰臥位から腹臥位に回転することはできるが、頭を尻尾に向けたり、食べ物や水を消費したりすることは出来ないようにした。毎日 6 時間を 6 日間 (-7 日目～-2 日目) 連続して拘束ストレスを負荷した。ストレスを受けていないマウスも、ストレスを受けたマウスと同様の時間、食物と水を与えないようにした。免疫寛容誘導の有無と拘束ストレスの有無により喘息群、ストレス群、寛容群、寛容/ストレス群の 4 群を作成した。抗原暴露後、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage: BAL) を行った²。気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid: BALF) を採取し、炎症性細胞数と各種細胞を数えた。遠心分離後、酵素結合免疫吸着アッセイ (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) によるサイトカイン測定を行う前に、BALF の上清を-80°Cで保存した。

3. OVA 特異的 IgE および IgG₁ の測定

22 日目 (抗原暴露後 5 日目) に採取した血清中の OVA 特異的 IgE および IgG₁ の濃度は、ELISA を用いて測定した²。検出感度は、IgE で 1.9×10^{-2} EU/ml、IgG₁ で 1.9×10^{-2} EU/ml とした。

4. BALF 浸潤細胞の測定

BALB/c マウスを 4 群のグループに分け、17 日目の OVA 暴露から 5 日後 (22 日目) に、各群のマウスから BALF を採取した (Fig. 1A)。BAL は、0.25 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS) を気道より注入し回収する操作を 2 回実施することで行った。各マウスから約 0.4 mL の BALF を回収した。その BALF に存在する細胞数を測定し総細胞数を求めた。さらに、この BALF より塗抹標本を作製して好酸球数と好中球数を算定した。

5. フローサイトメトリー分析

気管支リンパ節 (Bronchial lymph node: BLN) は抗原暴露の3日目 (20日目) に採取した (Fig. 2A)。CD16/CD32 (FC gamma III/II receptor; BD Biosciences, Franklin Lanes, NJ) は、その後の抗体の非特異的結合を減少させるために使用した。LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して、死細胞を除外した。細胞は、抗 CD3 ϵ -PerCP-Cy5.5 (clone 145-2C11; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)、抗 CD4-AF700 (clone GK1.5; BD Biosciences)、または isotype control 抗体を用いて表面抗原について染色した。細胞内染色では、表面抗原染色の前に、細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml)、ionomycin (1000 ng/ml)、および monesin (2 μ M) で4時間刺激した。その後細胞の固定および透過処理の後、細胞を抗 FOXP3-PE-Cy7 (Clone. FJK-16s; Thermo Fisher Scientific)、抗 IL17A-APC-Cy7 (Clone. TC11-18H10. 1; Bio Legend, San Diego, CA)、抗 IL4-PE-CF594 (Clone. 11B11; Bio Legend)、抗 IFN- γ -APC (Clone. XMG1. 2; TONBO biosciences)、抗 IL-10-FITC (Clone. JES5-16E3; Bio Legend)、isotype control 抗体で染色を行った。Treg 細胞は CD3⁺CD4⁺FOXP3²⁶ 陽性、Th (Helper T) 2 細胞は CD3⁺CD4⁺IL-4²⁷ 陽性、Th17 細胞は、CD3⁺CD4⁺IL-17 陽性を指標に同定した²⁸。各細胞を FACS Aria II フローサイトメーター (BD Biosciences) で計数し、FACSDiva ソフトウェア (BD Biosciences) を使用して分析を行った。

6. Ribonucleic Acid (RNA) とマイクロアレイのハイブリダイゼーション

BLN は、寛容/ストレス群および寛容群にてストレス負荷直後 (-2日目) に採取した (Fig. 4A)。採取した BLN から RNA を抽出した。RNA は、RealiaPrepTM RNA Cell Miniprep System により抽出した。RNA の品質を評価は Agilent 2100

バイオアナライザーを使用し、RIN 値が 8 を超えるサンプルのみを使用した。その後、マイクロアレイハイブリダイゼーションは倉敷紡績株式会社に委託し実施した。

7. マイクロアレイによるデータ分析

マイクロアレイは、GeneChip Clariom S Array (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて実施した。得られたデータは、Microarray Analysis Suite ソフトウェア Transcriptome Viewer (KURABO Industries, Oosaka, Japan) のアルゴリズムを使用して遺伝子転写レベルを決定した。この Clariom S Array にてマウスの 22,100 を超える遺伝子を網羅的に解析した

8. RT-PCR による遺伝子変化の再現性

ストレス負荷直後 (-2 日目) に各群の BLN 組織より Rella PrepTM RNA Cell Miniprep System を使用し RNA を精製した。cDNA は、Prime ScriptTM RT 試薬キット (Perfect Real Time) (タカラバイオ, shiga, Japan) を使用し、製造元のプロトコルに従い合成した。PCR は、Power SYBR[®] Green Master Mix

(Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。Applied Biosystems Step OneTM Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、最適な PCR (95°C で 15 秒、60°C で 60 秒の 40 サイクル) を実施し、プレート読み取りにより増幅反応をリアルタイムでモニターした。融解曲線も取得した。得られたデータは、Applied Biosystems Step OneTM Real Time PCR System のアルゴリズムを用いて取得した。プライマーの情報を Table. 1 に示す。

9. 免疫寛容誘導期の精神的ストレスによる IL-1 β の量的変化

免疫寛容誘導期において、前述の通り精神的ストレスを与え、-2 日目において肺組織を摘出しホモジネートしたものを用いて、IL-1 β の量的変化を確認した。IL-1 β は Quantikine® ELISA Mouse IL-1 β /IL-1F2 Immunoassay (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて、付属のプロトコルに従い測定した。尚、IL-1 β の測定範囲は 0.46 ~ 4.8 pg/mL である。

10. 精神的ストレスに対する IL-1 受容体拮抗薬の効果

Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) (140 μ g/kg) (Biolegend) は、精神的ストレス負荷 60 分前に腹腔内に投与した (Fig. 6A)。喘息群、寛容群、寛容/ストレス群、寛容/ストレス/IL-1RA 群の 4 群に分けた。22 日目のマウスの BALF を採取し、炎症細胞数を算定した。また、フローサイトメトリーを用いて 20 日目の BLN を採取し、各細胞について確認した (Fig. 7A)。

11. 統計分析

データは、複数の独立した実験からの平均 \pm 標準偏差 (SD) として表した。2 群間の有意差は、ノンパラメトリックである Mann-Whitney U test により検定した。これらの分析は、Prism6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。p < 0.05 を統計的に有意差ありと判定した。

IV. 研究結果

1. 炎症性細胞の測定

これまで精神的ストレスによる免疫寛容の成立の阻止が、好酸球と好中球による混合型の炎症を引き起こすことをマウスモデルにおいて示してきた¹⁶。最初に、免疫寛容の有無とストレスの有無により喘息群、ストレス単独群、寛容群、寛容/ストレス群4群に分けた。抗原曝露から5日後にBALを実施し、気道へ浸潤した炎症細胞の総細胞数と好酸球数、好中球数を確認した。まず、総細胞数について、喘息群と比較して寛容群では有意に減少し、寛容群と比較して寛容/ストレス群では有意に増加した (Fig. 1B)。次に好酸球数について、喘息群と比較して、寛容群では有意に減少した。また、寛容群と比較して寛容/ストレス群では好酸球は有意に増加した (Fig. 1B)。さらに寛容群と比較して寛容/ストレス群では、好中球数が有意に増加した (Fig. 1B)。この結果は、免疫寛容誘導期の精神的ストレスが、好中球・好酸球炎症の引き金になることを示す。次に、4群のマウスにおける抗原曝露後のOVA特異的IgEおよびIgG₁合成に対する心理的ストレスの影響を評価した (Fig. 1C)。寛容群は、喘息群よりも血清中のOVA特異的IgEおよびIgG₁が有意に低かった。対照的に、IgEおよびIgG₁は、寛容群よりもストレス/寛容群において有意に高かった。ただし、喘息群とストレス群の間でIgEおよびIgG₁に有意差は認められなかった。

2. フローサイトメトリーを用いたBLN内の細胞の測定

次に、好中球・好酸球炎症を惹起した免疫応答について検討を行った。抗原吸入3日後(20日目)のBLNを採取し、そのリンパ節内の細胞について、フローサイトメトリーを用いてその性質を測定した。Treg細胞は、そのマスター転

写因子である *Foxp3* を有する $CD3^+CD4^+FOXP3^+$ 細胞を測定した。Treg ($CD3^+CD4^+FOXP3^+$) 細胞は、寛容群において有意に増加することが認められた。Gating strategy は、Fig. 2B に示す。次に Th2 細胞は、その細胞への分化を誘導するために必要な IL-4 を有する $CD3^+CD4^+IL-4^+$ 細胞を測定した²⁷。Th2 ($CD3^+CD4^+IL-4^+$) 細胞は、喘息群と比較して寛容群で有意に減少し、この減少は寛容/ストレス群で有意に抑制された。Th17 細胞は、その細胞より放出する IL-17 を有する細胞として $CD3^+CD4^+IL-17^+$ 細胞を測定した。Th17 ($CD3^+CD4^+IL-17^+$) 細胞は、寛容/ストレス群において有意に増加した (Fig. 2C)。各群における細胞分画の違いは、Fig. 1 にて認められた気道炎症フェノタイプと強く関連しており、Treg 細胞の上昇は免疫寛容を保持、Th2 細胞の上昇は好酸球性の炎症、Th17 細胞の上昇は好中球性の炎症の誘因に関わることを示している。

3. IL-17AKO マウスにおける好酸球と好中球の変化

IL-17 を産生することが出来ない IL-17AKO マウスにおいて、22 日目の BALF を採取し、炎症性物質である好酸球数と好中球を測定した。好中球数について Wild-type (WT) マウスと比較して IL-17AKO マウスでは減少していた。しかし、WT マウスと比較して IL-17AKO マウスでの好酸球数の減少を確認することは出来なかった (Fig. 3)。

4. マイクロアレイによる網羅的解析と q-PCR における量的変化

抗原暴露後の BLN 内の T 細胞サブセットの変化が確認できたので、この変化の起点を探索するために、ストレス負荷直後である -2 日目に着目し、免疫寛容誘導期における精神的ストレスの影響を網羅的に解析するために、マイクロア

レイを用いて遺伝子発現の変化を検討した。免疫寛容誘導期におけるストレス負荷の有無により、寛容群と寛容/ストレス群の2群に分け、BLNを採取しマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、ヒートマップを作成した (Fig. 4B)。その結果より、免疫寛容や好酸球性炎症、好中球性炎症に関与する遺伝子のうち特徴的な変化を示す遺伝子を抽出し、寛容群と比較してストレス/寛容群ではTreg細胞の分化に関与する *Icos* は低下した。さらに、Th17細胞の分化に関与する *Roryt* は上昇した (Fig. 4B)。網羅的解析であるマイクロアレイから得られた結果に基づき、再現性確認と発現量の定量を行うために、定量 RT-PCR を行った。*Icos* について寛容群と比較して寛容/ストレス群では、有意に減少した。同様に *Roryt* では、有意に増加した (Fig. 4C)。

5. 免疫寛容誘導期の精神的ストレスによる IL-1 β の量的変化

免疫寛容誘導期における精神的ストレスの影響が *Icos* や *Roryt* に大きく関与していることが判明したため、Treg細胞やTh17細胞への分化に関与し、精神的ストレスにより変化するとされている IL-1 β ²⁹ について、精神的ストレス負荷直後の肺における量的変化を ELISA にて確認した。IL-1 β は、寛容/ストレス群において有意に増加した (Fig. 5B)。

6. 精神的ストレスに対する IL-1RA の投与の効果

免疫寛容誘導期における精神的ストレスによる IL-1 β の放出が、免疫寛容の成立の阻止に繋がることから考えられるため、IL-1 β の作用を阻害するためにその IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1RA) を投与した。

まず IL-1RA 投与の効果を喘息徴候における炎症細胞の算定によりにおいて評価した。その結果、炎症性細胞の総細胞数は、寛容/ストレス群と比較して寛容

/ストレス/IL-1RA 群では有意に減少した (Fig. 6B)。さらに、好酸球数、好中球数の各々についても同様に、寛容/ストレス群と比較して寛容/ストレス/IL-1RA 群では、有意に減少した

次に IL-1RA 投与後の BLN 内の T 細胞サブセットの変化についてフローサイトメトリーを用いて確認した (Fig. 7A)。その結果、Th17 細胞と Th2 細胞について、寛容/ストレス群と比較して寛容/ストレス/IL-1RA 群では有意に減少した (Fig. 7B)。さらに Treg 細胞について、寛容/ストレス群と比較して寛容/ストレス/IL-1RA 群では、有意に増加した (Fig. 7B)。

V. 考察

本研究では、免疫寛容誘導期における精神的ストレスが免疫寛容の発現を抑制し、好酸球性の炎症を悪化させるだけでなく、好中球性の炎症を発現させていることが明らかになった。そして、この精神的ストレス負荷による一連の変化は、IL-1 β の作用により惹起されていることが明らかになった。

当研究室において、免疫寛容誘導期における精神的ストレスが免疫寛容の成立を阻止し、好酸球と好中球による浸潤を示す喘息を引き起こすことについてマウスモデルにおいて報告している¹⁶。喘息モデルマウスで認められる好酸球は、免疫寛容の誘導で抑制され、免疫寛容誘導期の精神的ストレスにより増加し、喘息症状を悪化させる。このことは、免疫寛容の発現により好酸球性の気道炎症が緩和し、その免疫寛容が免疫寛容誘導期の精神的ストレスにより減弱したためにおこると考える。免疫寛容は、Treg細胞が関与しており、過剰な炎症などを抑える機構である³⁰。そこで喘息モデルマウスにおいて、免疫寛容誘導期における精神的ストレスの有無を比較すると、寛容群と比較して寛容/ストレス群は有意に好酸球が上昇していることが確認できた。このことは、免疫寛容誘導期における精神的ストレス負荷が、免疫寛容の成立を阻止し、気道炎症を惹起することを示している。次に、同モデルを使用し、好中球炎症についても同様に比較すると、寛容/ストレス群では有意に好中球の発現が上昇していた。このように免疫寛容誘導期の精神的ストレスは、気道への好中球浸潤をもたらし、好中球性炎症を伴う喘息フェノタイプ³¹を発症させる可能性を示した。さらに驚くべきことに、免疫寛容誘導を行わないマウスに対する、精神的ストレス単独負荷は、喘息群と比較し好酸球数、好中球数ともに変化はなかった。このことから精神的ストレス単独の負荷は、喘息発症や症状の増悪を誘導しない

可能性が考えられる。また、精神的ストレス負荷は抗原やアレルゲンなどの外部刺激による免疫応答を伴う状況において、免疫修飾を行う作用を有することが示唆される。

前述の通り抗原暴露後 5 日目（22 日目）に、寛容/ストレス群において好酸球の増加、好中球の発現を惹起することが確認できた。そこで好酸球性の炎症を誘導する Th2 細胞免疫応答の亢進¹⁵と好中球性の炎症を誘導する Th17 免疫応答の活性化³²に対する可能性を考え解析を行った^{15,32}。抗原暴露後 3 日目（20 日目）の BLN を採取し免疫応答を検討した。BLN の Treg 細胞（Foxp3 陽性 T 細胞）、Th2 細胞（IL-4 陽性 T 細胞）、Th17 細胞（IL-17A 陽性 T 細胞）についてフローサイトメトリーを用いて同定し、各群における存在比率を確認した。その結果、寛容群は、免疫寛容が成立しているため、Treg 細胞が高値となり、Th2 細胞は低値となっている。このことにより好酸球性の炎症が抑制されていることが分かる（Fig. 2C）。次に、免疫寛容誘導期の精神的ストレスの負荷により免疫寛容の成立が阻止されていると考えられる寛容/ストレス群は、Treg 細胞の減少とともに Th2 細胞と Th17 細胞の両方を増加していることが確認できた。免疫寛容誘導期における精神的ストレスにより成立するはずであった免疫寛容を阻止することで好酸球性の炎症が悪化し、さらに好中球性の炎症が発現することで好酸球好中球混合喘息が発症するのではないかと考えられた。そこで、好中球性炎症を発現する IL-17A が欠損している状態にて、好酸球好中球混合喘息がどのようになるか IL-17AKO マウスを用いて検討を行った。その結果、好中球について WT マウスと比較して、IL-17KO マウスでは減少していた。IL-17AKO マウスでは、IL-17A が存在していないため、好中球の発現が減少しているが、好酸球では、WT マウスと IL-17AKO マウスの間で変化を確認することが出来なかった。これらのことより、好酸球浸潤に対して抑制的に作用する Treg

細胞の分化は、IL-17A が直接影響していないことが考えられた。したがって、精神的ストレスによる好中球好酸球浸潤を惹き起す免疫修飾は、IL-17A の作用よりもさらに上流の免疫学的変化が起因となる可能性を考えた。

好酸球好中球気道炎症における T 細胞サブセットの発達の起因を調査するために BLN での免疫反応について網羅的解析であるマイクロアレイを用いて、確認することとした³³。分析結果よりヒートマップを作成した (Fig. 4B)。その結果より好酸球性炎症、好中球性炎症、免疫寛容に関与し、さらに特徴的な変化を示す *Icos* と *Roryt* について抽出し、定量 RT-PCR を用いて再現性を確認した。まず精神的ストレスを与えたマウスにおいて Treg 細胞の分化に関与する^{34,35} *Icos* が大幅に減少することが確認することが出来た。本研究において *Icos* が減少することは、精神的ストレスにより Treg 細胞への分化が抑制され、免疫寛容の成立を阻止し、好酸球性の喘息の発現につながると考える。次に、*Roryt* の発現が有意に増加していることが確認できた。Th17 細胞の分化のメカニズムは、IL-6 がシグナル伝達および転写活性化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3: STAT3) に結合し、さらにこの因子が Th17 細胞のクロマチンに直接結合することで、*Roryt* を活性化させることである^{36,37}。本実験においても精神的ストレスにより免疫寛容の成立が阻止し、*Roryt* の発現が促進されたため、Th17 細胞の分化が促進され、好中球性の喘息の発現につながったと考える^{31,37}。つまり免疫寛容導入期における精神的ストレスにより *Icos* の発現減少、*Roryt* の発現増加となり、好酸球性および好中球性の喘息が発症する可能性が示唆される。

前述のことから、免疫寛容誘導期における精神的ストレスによる喘息症状の発症には、免疫寛容の成立の阻止による好酸球、好中球性炎症の発現が大きく関わっていることが判明した。Th17 細胞は、好中球の免疫応答に関与しており

強直性脊椎炎症や多発性硬化症などの自己免疫疾患にも関与している³⁸。そして naïve T 細胞が Th17 細胞に分化するためには、炎症誘発に関与する IL-1 β ³⁹などのサイトカインや *Ror γ t* などの転写因子を必要とする^{40,41}。CD4⁺T 細胞において IL-17A の産生は、IL-1 受容体によるシグナル伝達が必要である^{42,43}。さらに IL-1 は、脳内視床下部においてプロスタグランジン E₂ (Prostaglandin E₂: PGE₂) の合成を促進する作用がある⁴⁴。そして IL-1 β は、Naïve T 細胞から Th17 細胞に分化するためのサイトカインの放出に関与し、Naïve T 細胞から Treg 細胞への分化抑制にも関わっている⁴⁵。さらに OVA 投与とともに IL-1 β を吸入させることで Th2 細胞、Th17 細胞を増加させることができるとの報告がある^{46,47}。本研究において IL-1 β は、ストレス負荷時に増加することが確認出来た。このことから免疫寛容誘導期における精神的ストレスが、IL-1 β の放出に繋がっていることが示唆される。免疫寛容成立の阻止には IL-1 β が関与している可能性が高いと考え、免疫寛容誘導期における精神的ストレス負荷時の肺組織内の IL-1 β を測定した。その結果、肺組織内の IL-1 β 濃度が有意に増加することが明らかとなった。(Fig. 5B)。この結果より免疫寛容誘導期の精神的ストレス負荷による好酸球と好中球浸潤による気道炎症は、IL-1 β の作用を抑えることで消失できるのではないかと考えた。現在 IL-1 β によるリンパ球の活性化や炎症促進、PGE₂ 誘導などの作用が解明され、IL-1 β を阻害する薬の有効性が報告されるようになっている⁴⁸。IL-1 β の効果を抑制する方法として、IL-1 β 自体の無力化、IL-1 受容体遮断、IL-1 β 合成阻害、IL-1 受容体のシグナル伝達機構阻害の 4 機序が挙げられるとされている⁴⁹。そのなかでも IL-1 β 自体の無力化、IL-1 受容体遮断、IL-1 β 合成阻害においては既にヒトを対象とした研究が進んでいる⁴⁹。今回 IL-1 受容体を遮断する目的で、受容体阻害薬である IL-1RA を投与した。そして「IL-1RA 投与が、免疫寛容誘導期の精神的ストレスの影響を減弱し、好中球・好酸

球性気道炎症の発症を抑える」という仮説を証明するために IL-1RA 投与時の BALF 内の好酸球数、好中球数の変動について調査した。その結果、好酸球、好中球ともに、ストレス負荷で有意に上昇したが、IL-1RA 投与により有意に減少した (Fig. 6B)。このように IL-1RA 投与は、好酸球・好中球の浸潤を抑制することができた。すなわち IL-1RA の投与は、精神的ストレスによる免疫寛容の抑制作用を消失させることが示唆された。そのため、次に抗原暴露後の T 細胞サブセットに対する、IL-1RA 投与の影響をフローサイトメトリーにて検討した。免疫寛容誘導期のストレス負荷による Th17 細胞、Th2 細胞の増加は、IL-1RA 投与により、有意に減少した (Fig. 7B)。さらに、Treg 細胞は、IL-1RA 投与により有意に上昇し、寛容群と同等の割合まで回復した (Fig. 7B)。このことから、IL-1RA の投与は、ストレス負荷による影響を打ち消して、Th17 細胞と Th2 細胞分化の抑制と Treg 細胞分化の誘導をひき起こし、好中球および好酸球の浸潤による気道炎症を抑制することが明らかになった。すなわち、ストレス負荷による IL-1 β の作用を抑制することが、好酸球・好中球混合型喘息の症状の緩和や発症の防止に繋がる可能性が示唆された。

今回の研究において、免疫寛容誘導期における精神的ストレスにより免疫寛容の成立を阻止し、好酸球性炎症の増悪、好中球性炎症発現につながることを証明し、その原因は、IL-1 β の放出促進によるものであることを解明した。そのため今後、臨床的に IL-1 β の作用を抑制することが治療困難となっている好酸球好中球混合喘息患者の治療を可能とし、下げ止まりとなっている死亡率をさらに低下させることにつながると考える。

VI. 展望

本研究より、難治性喘息に分類される好酸球好中球混合喘息の発症には、IL-1 β が大きく関与していることが明らかになった。このマウスを対象とした研究結果より、今後、人間の治療に繋げる必要性がある。今回の研究において人間の難治性喘息の治療に IL-1 β を抑制することが、有効である可能性が高いことが示唆された。IL-1 β の作用を抑制するためには、IL-1 受容体阻害剤の一つであるアナキンラ⁵⁰ や抗 IL-1 β 抗体であるカナキヌマブの使用が有効であると考えられる。しかしながら、アナキンラは日本国内において未発売となっており、カナキヌマブは全身型若年性特発性関節炎などの適応で日本発売されているものの、高額な薬剤のため現実的に治療に使用することは難しいと考える。そのため、IL-1 β が Th17 細胞への分化亢進に関与していることから、直接 Th17 細胞の作用を抑制させることで前述の効果を低下させることが出来ると考えられる。現在日本において、抗ヒト IL-17A モノクローナル抗体製剤とヒト IL-17 受容体 A モノクローナル抗体が Th17 細胞の作用を低下することが出来る薬剤となっている。抗ヒト IL-17A モノクローナル抗体製剤は、IL-17A に対して結合することで IL-17 受容体への結合を阻止する薬剤である。ヒト IL-17 受容体 A モノクローナル抗体は、IL-17 受容体に直接結合し IL-17A が受容体に結合することを阻止する薬剤である。このことにより体内において IL-17A の活性を中和することが出来る薬剤である⁵¹。2022 年日本において、抗ヒト IL-17A モノクローナル抗体製剤はセクキヌマブ、イキセキズマブの 2 製剤、ヒト IL-17 受容体 A モノクローナル抗体はプロダルマブの 1 製剤が発売となっている⁵¹。2022 年時点において、これら 3 製剤は、乾癬や強直性脊椎炎などの自己免疫性疾患の適応は取得しているものの喘息に対する適応は取得されていない。しかしながら、IL-17A

の効果を中和できる薬剤であるため十分に効果を期待できる薬剤だと考えられる。

今回の研究より、好酸球好中球混合型喘息の治療に対する新たな視点を加えることができた。今後、ヒトへの応用へ向けて継続した研究が、難治性喘息の治療に対して多大な貢献をもたらすと考える。

VII. 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 高橋知子教授に心より感謝申し上げます。

本論文作成にあたり、ご構成とご助言を賜りました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、ならびに同大学薬学部 薬理学教室 丹野孝一教授に深く感謝申し上げます。

また、研究に必要な知識・技術から研究に対する姿勢まで公私共に、幅広く御指導頂きました東北医科薬科大学薬学部 病態生理学教室 河野資先生、同大学医学部 医学教育推進センター 宮坂智充先生、同大学薬学部 病態生理学教室 高橋健人先生に心より感謝申し上げます。

大学院進学にあたり多大なるご助言を賜りました東北医科薬科大学若林病院 石澤文章先生に心より感謝申し上げます。

大学院での生活を送りにあたり、精神的支援を賜りました家族や友人、東北医科薬科大学若林病院薬剤部の皆様に心より感謝を申し上げます。

これまでに私を支えてくださった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となる所存です。

VIII. 参考文献

1. Mattiuzzi, C., and Lippi, G. (2020). Worldwide asthma epidemiology: insights from the Global Health Data Exchange database. *Int Forum Allergy Rhinol* 10, 75-80. 10.1002/alr.22464.
2. Okuyama, K., Dobashi, K., Miyasaka, T., Yamazaki, N., Kikuchi, T., Sora, I., Takayanagi, M., Kita, H., and Ohno, I. (2014). The involvement of glucocorticoids in psychological stress-induced exacerbations of experimental allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 163, 297-306. 10.1159/000360577.
3. Wenzel, S.E. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 18, 716-725. 10.1038/nm.2678.
4. Fahy, J.V. (2015). Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol* 15, 57-65. 10.1038/nri3786.
5. Agache, I. (2019). Severe asthma phenotypes and endotypes. *Semin Immunol* 46, 101301. 10.1016/j.smim.2019.101301.
6. 一般社団法人日本アレルギー学会. (2021). 喘息予防・管理ガイドライン 2021.
7. Bel, E.H., Wenzel, S.E., Thompson, P.J., Prazma, C.M., Keene, O.N., Yancey, S.W., Ortega, H.G., and Pavord, I.D. (2014). Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 371, 1189-1197. 10.1056/NEJMoa1403291.
8. McGregor, M.C., Krings, J.G., Nair, P., and Castro, M. (2019). Role of Biologics in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 199, 433-445. 10.1164/rccm.201810-1944CI.

9. Pelaia, C., Calabrese, C., Terracciano, R., de Blasio, F., Vatrella, A., and Pelaia, G. (2018). Omalizumab, the first available antibody for biological treatment of severe asthma: more than a decade of real-life effectiveness. *Ther Adv Respir Dis* 12, 1753466618810192. 10.1177/1753466618810192.
10. Nair, P., Wenzel, S., Rabe, K.F., Bourdin, A., Lugogo, N.L., Kuna, P., Barker, P., Sproule, S., Ponnarambil, S., and Goldman, M. (2017). Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Benralizumab in Severe Asthma. *N Engl J Med* 376, 2448-2458. 10.1056/NEJMoal703501.
11. Castro, M., Corren, J., Pavord, I.D., Maspero, J., Wenzel, S., Rabe, K.F., Busse, W.W., Ford, L., Sher, L., FitzGerald, J.M., et al. (2018). Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med* 378, 2486-2496. 10.1056/NEJMoal804092.
12. Nakamura, Y., Tamaoki, J., Nagase, H., Yamaguchi, M., Horiguchi, T., Hozawa, S., Ichinose, M., Iwanaga, T., Kondo, R., Nagata, M., et al. (2020). Japanese guidelines for adult asthma 2020. *Allergol Int* 69, 519-548. 10.1016/j.alit.2020.08.001.
13. Crisford, H., Sapey, E., Rogers, G.B., Taylor, S., Nagakumar, P., Lokwani, R., and Simpson, J.L. (2021). Neutrophils in asthma: the good, the bad and the bacteria. *Thorax* 76, 835-844. 10.1136/thoraxjnl-2020-215986.
14. Gibson, P.G., Yang, I.A., Upham, J.W., Reynolds, P.N., Hodge, S., James, A.L., Jenkins, C., Peters, M.J., Marks, G.B., Baraket, M., et al. (2017). Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 390, 659-668. 10.1016/s0140-6736(17)31281-3.

15. Ray, A., and Kolls, J.K. (2017). Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. *Trends Immunol* 38, 942-954. 10.1016/j.it.2017.07.003.
16. Kawano, T., Ouchi, R., Ishigaki, T., Masuda, C., Miyasaka, T., Ohkawara, Y., Ohta, N., Takayanagi, M., Takahashi, T., and Ohno, I. (2018). Increased Susceptibility to Allergic Asthma with the Impairment of Respiratory Tolerance Caused by Psychological Stress. *Int Arch Allergy Immunol* 177, 1-15. 10.1159/000488289.
17. Kim, D.I., Song, M.K., and Lee, K. (2019). Comparison of asthma phenotypes in OVA-induced mice challenged via inhaled and intranasal routes. *BMC Pulm Med* 19, 241. 10.1186/s12890-019-1001-9.
18. Yonas, M.A., Lange, N.E., and Celedón, J.C. (2012). Psychosocial stress and asthma morbidity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 12, 202-210. 10.1097/ACI.0b013e32835090c9.
19. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 490-500. 10.1038/nri2785.
20. Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A.K., Akkoc, T., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2010). Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 40, 1232-1240. 10.1002/eji.200940045.
21. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787. 10.1016/j.cell.2008.05.009.
22. Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., and Iwakura, Y. (2002). Antigen-specific T cell

- sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375-387. 10.1016/s1074-7613(02)00391-6.
23. Ouchi, R., Kawano, T., Yoshida, H., Ishii, M., Miyasaka, T., Ohkawara, Y., Takayanagi, M., Takahashi, T., and Ohno, I. (2018). Maternal Separation as Early-Life Stress Causes Enhanced Allergic Airway Responses by Inhibiting Respiratory Tolerance in Mice. *Tohoku J Exp Med* 246, 155-165. 10.1620/tjem.246.155.
 24. Behrendt, A.K., and Hansen, G. (2010). CD27 costimulation is not critical for the development of asthma and respiratory tolerance in a murine model. *Immunol Lett* 133, 19-27. 10.1016/j.imlet.2010.06.004.
 25. Wang, J., Charboneau, R., Barke, R.A., Loh, H.H., and Roy, S. (2002). Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 169, 3630-3636. 10.4049/jimmunol.169.7.3630.
 26. Palomares, O., Rückert, B., Jartti, T., Küçüksezer, U.C., Puhakka, T., Gomez, E., Fahrner, H.B., Speiser, A., Jung, A., Kwok, W.W., et al. (2012). Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3+ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 129, 510-520. 520.e511-519. 10.1016/j.jaci.2011.09.031.
 27. Chen, L., Grabowski, K.A., Xin, J.P., Coleman, J., Huang, Z., Espiritu, B., Alkan, S., Xie, H.B., Zhu, Y., White, F.A., et al. (2004). IL-4 induces differentiation and expansion of Th2 cytokine-producing eosinophils. *J Immunol* 172, 2059-2066. 10.4049/jimmunol.172.4.2059.
 28. Hashimoto, M., and Mimori, T. (2012). [Role of Th17 cells and innate

- immunity for the induction of autoimmune arthritis]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 35, 463-469. 10.2177/jsci.35.463.
29. Shintani, F., Nakaki, T., Kanba, S., Sato, K., Yagi, G., Shiozawa, M., Aiso, S., Kato, R., and Asai, M. (1995). Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotrophic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. *J Neurosci* 15, 1961-1970. 10.1523/jneurosci.15-03-01961.1995.
 30. Saravia, J., Chapman, N.M., and Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol* 16, 634-643. 10.1038/s41423-019-0220-6.
 31. Wills-Karp, M. (2018). Neutrophil ghosts worsen asthma. *Sci Immunol* 3. 10.1126/sciimmunol.aau0112.
 32. Boonpiyathad, T., Sözener, Z.C., Satitsuksanoa, P., and Akdis, C.A. (2019). Immunologic mechanisms in asthma. *Semin Immunol* 46, 101333. 10.1016/j.smim.2019.101333.
 33. Izuhara, K., and Saito, H. (2006). Microarray-based identification of novel biomarkers in asthma. *Allergol Int* 55, 361-367. 10.2332/allergolint.55.361.
 34. Maazi, H., and Akbari, O. (2015). ICOS regulates ILC2s in asthma. In *Oncotarget*, pp. 24584-24585. 10.18632/oncotarget.5245.
 35. Li, D.Y., and Xiong, X.Z. (2020). ICOS(+) Tregs: A Functional Subset of Tregs in Immune Diseases. *Front Immunol* 11, 2104. 10.3389/fimmu.2020.02104.
 36. Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ mat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133. 10.1016/j.cell.2006.07.035.

37. Leija-Martínez, J.J., Huang, F., Del-Río-Navarro, B.E., Sánchez-Muñoz, F., Romero-Nava, R., Muñoz-Hernandez, O., Rodríguez-Cortés, O., and Hall-Mondragon, M.S. (2020). Decreased methylation profiles in the TNFA gene promoters in type 1 macrophages and in the IL17A and RORC gene promoters in Th17 lymphocytes have a causal association with non-atopic asthma caused by obesity: A hypothesis. *Med Hypotheses* 134, 109527. 10.1016/j.mehy.2019.109527.
38. Juszczak, M., and Głabiński, A. (2009). [Th17 cells in the pathogenesis of multiple sclerosis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 63, 492-501.
39. Yazdi, A.S., and Ghoreschi, K. (2016). The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol* 941, 21-29. 10.1007/978-94-024-0921-5_2.
40. Yasuda, K., Takeuchi, Y., and Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol* 41, 283-297. 10.1007/s00281-019-00733-8.
41. Minns, D., Smith, K.J., Alessandrini, V., Hardisty, G., Melrose, L., Jackson-Jones, L., MacDonald, A.S., Davidson, D.J., and Gwyer Findlay, E. (2021). The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation. *Nat Commun* 12, 1285. 10.1038/s41467-021-21533-5.
42. Reed, M., Morris, S.H., Owczarczyk, A.B., and Lukacs, N.W. (2015). Deficiency of autophagy protein Map1-LC3b mediates IL-17-dependent lung pathology during respiratory viral infection via ER stress-associated IL-1. *Mucosal Immunol* 8, 1118-1130. 10.1038/mi.2015.3.
43. Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2012). Pathogen-induced

- human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature* 484, 514-518. 10.1038/nature10957.
44. Takii, T., Akahoshi, T., Kato, K., Hayashi, H., Marunouchi, T., and Onozaki, K. (1992). Interleukin-1 up-regulates transcription of its own receptor in a human fibroblast cell line TIG-1: role of endogenous PGE2 and cAMP. *Eur J Immunol* 22, 1221-1227. 10.1002/eji.1830220517.
 45. Kimura, A., and Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40, 1830-1835. 10.1002/eji.201040391.
 46. Kobayashi, T., Iijima, K., Checkel, J.L., and Kita, H. (2013). IL-1 family cytokines drive Th2 and Th17 cells to innocuous airborne antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49, 989-998. 10.1165/rcmb.2012-0444OC.
 47. McKim, D.B., Weber, M.D., Niraula, A., Sawicki, C.M., Liu, X., Jarrett, B.L., Ramirez-Chan, K., Wang, Y., Roeth, R.M., Sucaldito, A.D., et al. (2018). Microglial recruitment of IL-1 β -producing monocytes to brain endothelium causes stress-induced anxiety. *Mol Psychiatry* 23, 1421-1431. 10.1038/mp.2017.64.
 48. Dinarello, C.A. (2011). A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* 41, 1203-1217. 10.1002/eji.201141550.
 49. Gabay, C., Lamacchia, C., and Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6, 232-241. 10.1038/nrrheum.2010.4.
 50. Vastert, S.J., Jamilloux, Y., Quartier, P., Ohlman, S., Osterling Koskinen, L., Kullenberg, T., Franck-Larsson, K., Fautrel, B., and de Benedetti, F. (2019). Anakinra in children and adults with Still's disease. *Rheumatology (Oxford)* 58,

vi9-vi22. 10.1093/rheumatology/kez350.

51. Bai, F., Li, G.G., Liu, Q., Niu, X., Li, R., and Ma, H. (2019). Short-Term Efficacy and Safety of IL-17, IL-12/23, and IL-23 Inhibitors Brodalumab, Secukinumab, Ixekizumab, Ustekinumab, Guselkumab, Tildrakizumab, and Risankizumab for the Treatment of Moderate to Severe Plaque Psoriasis: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Immunol Res* 2019, 2546161. 10.1155/2019/2546161.

IX. Figur and Table

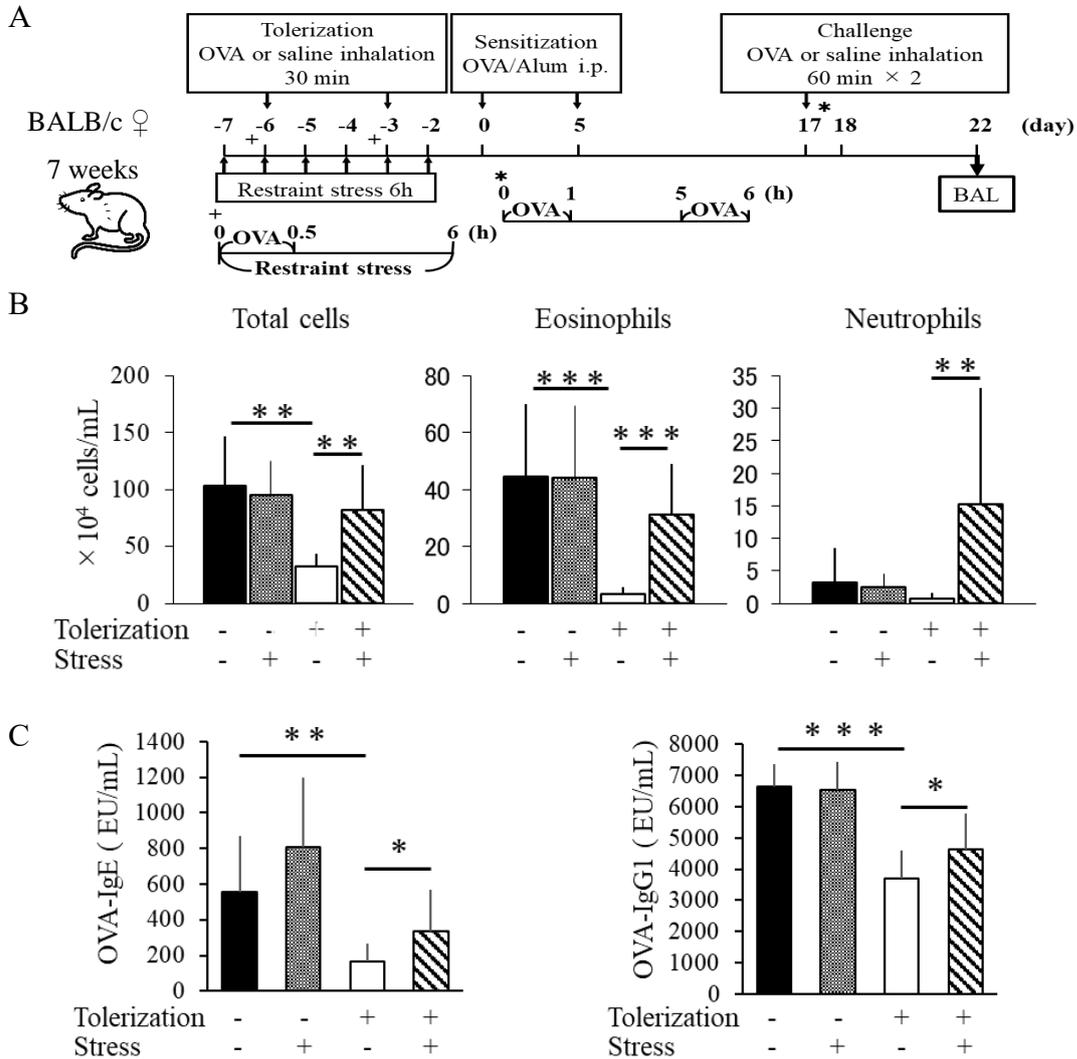


Fig. 1 Effects of immune tolerance and stress on allergic airway responses.

Schematic representation of the protocols used for tolerization, stress exposure, sensitization, and antigen challenge (A).

BALFs were obtained from mice of each group 5 days after the last OVA challenge (day 22). Total cells, eosinophils, neutrophils were counted (B).

5 days after the last OVA challenge (day 22), the effect of stress on OVA-specific IgE and IgG1 in sera obtained from each group of mice was measured (C).

Data are expressed as the mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

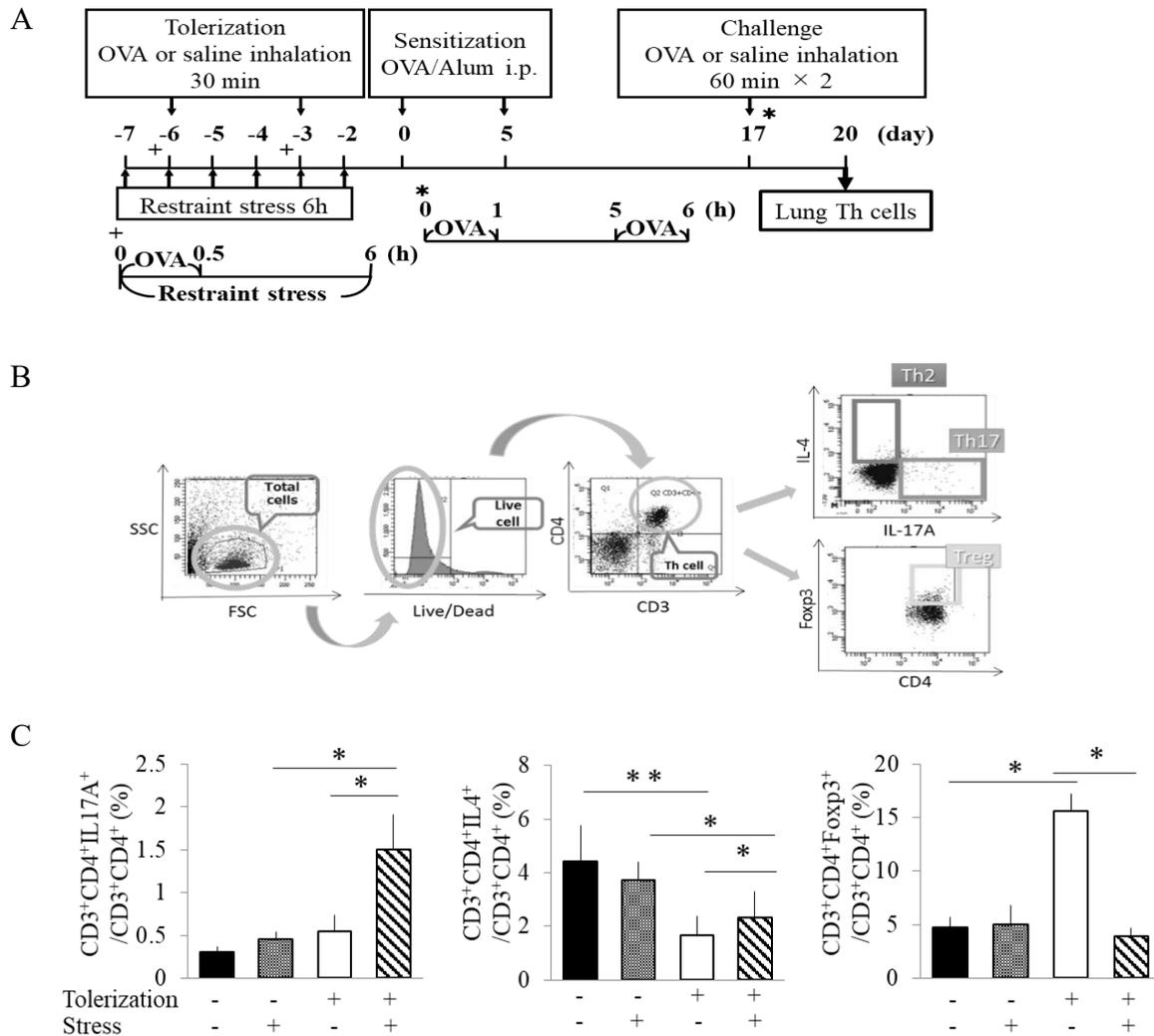


Fig. 2 Measurement of cytokines using flowcytometry in BLN of asthmatic mice.

Schematic representation of the protocols used for tolerization, stress exposure, sensitization, and antigen challenge (A).

The flow cytometric gating strategies used to evaluate cell subsets were shown (B). BLN was collected on the third day (Day 20) after antigen exposure to the OVA. The percentages of CD3⁺CD4⁺IL17A⁺ / CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁺IL4⁺ / CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ / CD3⁺CD4⁺ are displayed. The numbers and percentages of CD3⁺CD4⁺IL17A⁺ cells (C), and CD3⁺CD4⁺IL4⁺ cells (C), and CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ Cells (C) were determined. Data are expressed as mean ± SD. * p < 0.05, ** p < 0.01.

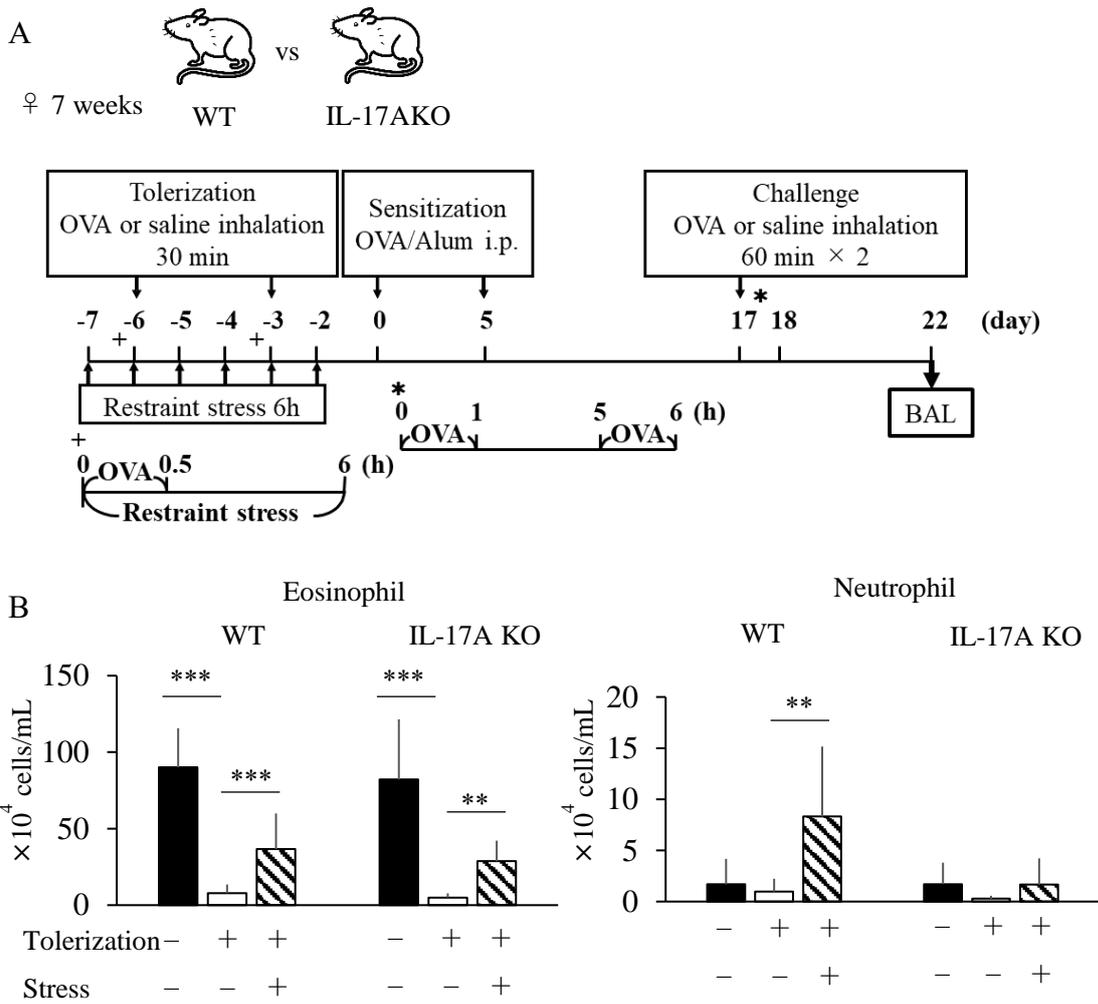


Fig. 3 Changes in eosinophils and neutrophils by IL-17AKO mice after antigen exposure.

Schematic representation of the protocols used for tolerization, stress exposure, sensitization, and antigen challenge (A).

Five days after antigen exposure (Day 22), BLN was collected and eosinophil and neutrophil counts were measured.

Data are expressed as the mean ± SD. **p < 0.01, and ***p < 0.001.

A

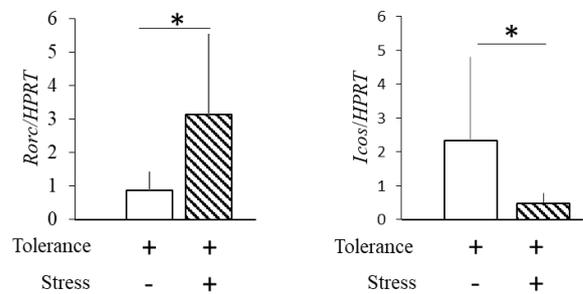
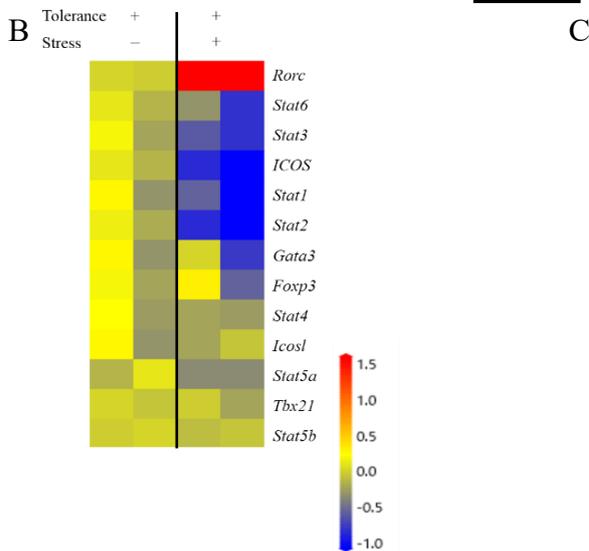
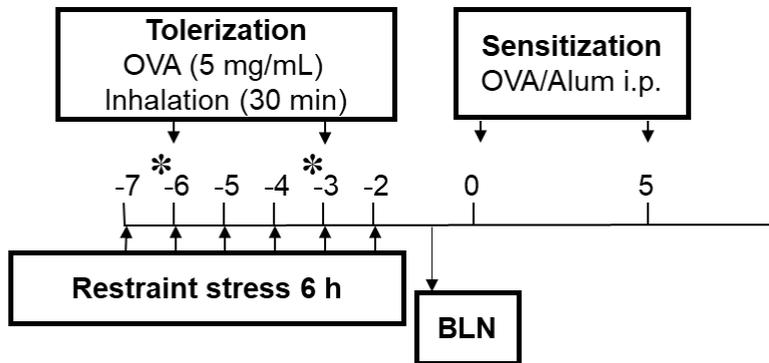
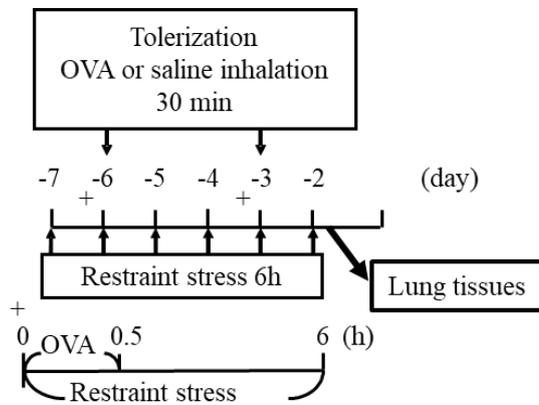


Fig. 4 Comprehensive analysis by microarray in BLN before antigen sensitization and distinctive cytokines in BLN prior to antigen sensitization.

Measurements Using Microarray and RT-PCR in the BLN of Asthmatic Mice Schematic of Protocols Used for Tolerization, Stress Exposure, Sensitization, and Antigen Challenge (A).

Heatmap depicting cytokines and chemokines in BLN before antigen sensitization (Day -2) (B). q-PCR was performed for reproducibility of ROR γ t (C) and ICOS (C), which were involved in eosinophilic inflammation, neutrophilic inflammation, and immune tolerance and showed characteristic changes from the results obtained by microarray. * $p < 0.05$.

A



B

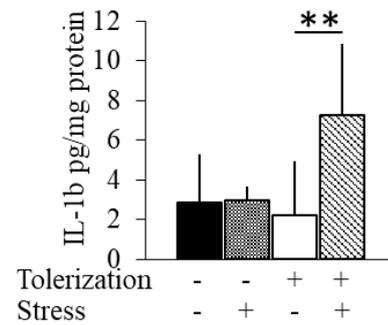


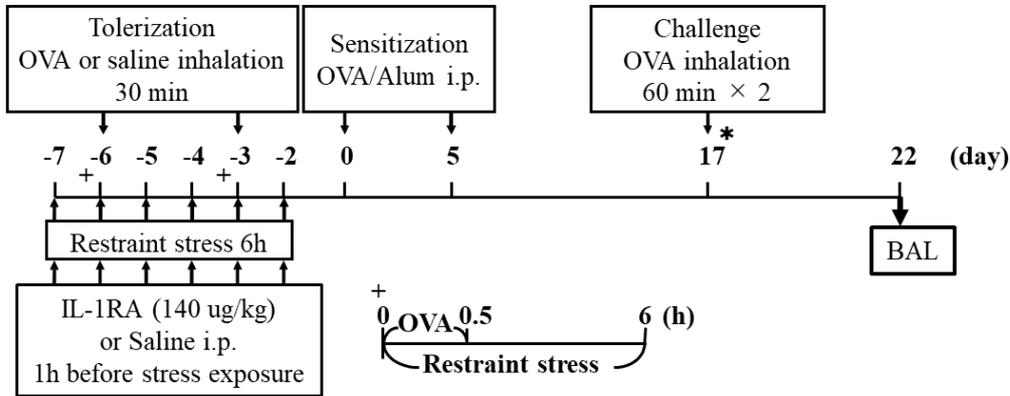
Fig. 5 Expression level of IL-1 β due to psychological stress before antigen sensitization.

Schematic representation of the protocols used for tolerization, stress exposure, sensitization, and antigen challenge (A).

After the sixth mental stress was applied, lung tissue was collected and IL-1 β present in the lung tissue was measured (B).

Data are expressed as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$

A



B

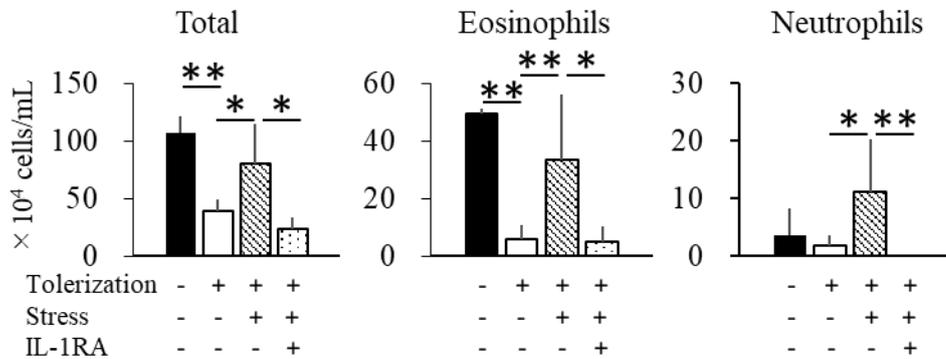
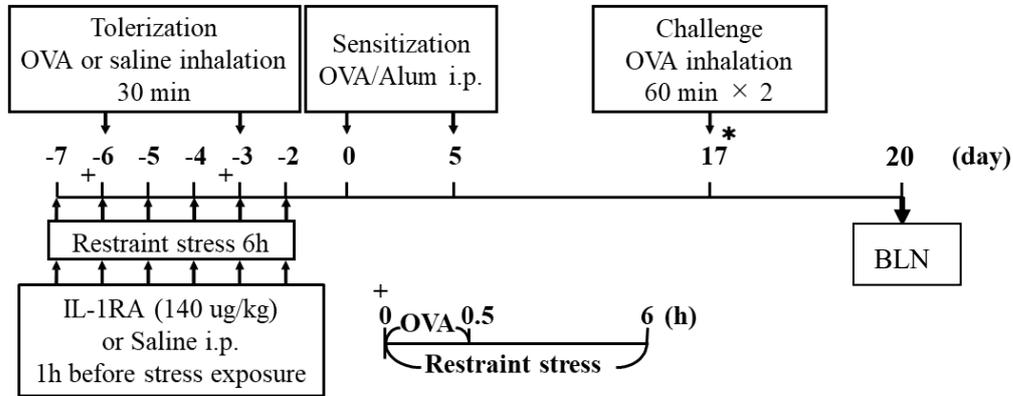


Fig. 6 Effect of IL-17RA on inflammatory cells during immune tolerance induction.

Schematic representation of the protocols used for tolerization, stress exposure, sensitization, and antigen challenge (A).

IL-1RA was administered immediately before daily psychological stress during the induction of immune tolerance. Each cell in each of the four groups of mice was counted. The respective cells were inflammatory total cells, eosinophils, and neutrophils (B). Data are expressed as the mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

A



B

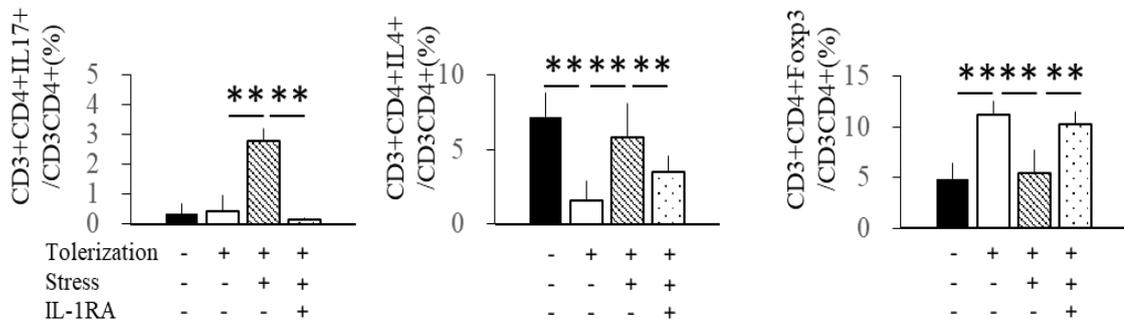


Fig. 7 Effect of IL-17RA on inflammatory cells during immune tolerance induction.

Schematic representation of the protocols used for tolerization, stress exposure, sensitization, and antigen challenge (A).

IL-1RA was administered just prior to routine psychological stress during induction of immune tolerance. The proportion of each cell was confirmed using flow cytometry for the four groups of mice. The respective cells are Th17 cells, Th2 cells and Treg cells (B).

Data are expressed as mean \pm SD. **p < 0.01.

Table. 1 Primer sequences for RT-PCR.

Gene	Primer sequences
<i>Roryt</i>	Forward: 5'-GAC CCA CAC CTC ACA AAT TGA-3'
	Reverse: 5'-AGT AGG CCA CAT TAC ACT GCT-3'
<i>Icos</i>	Forward: 5'- ATG AAG CCG TAC TTC TGC CG-3'
	Reverse: 5'-AGT AGG CCA CAT TAC ACT GCT-3'
<i>Hprt</i>	Forward: 5'-CTT CCT CCT CAG ACC GCT TT-3'
	Reverse: 5'-CAT CATC GCT AAT CAC GAC GC-3'