

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）要旨

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

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。近年、気管支喘息に罹患する患者数は微増となっているものの、入院患者数は減少が続いている。その反面、死亡者数は横這いとなっている。これらの原因のひとつに、難治性の喘息が挙げられる。難治性喘息は、治療抵抗性であり、悪化しやすいとされ、入退院を繰り返すケースが散見される。そのなかで好酸球好中球混合喘息は、難治性喘息のひとつとされている。これまでの当研究室では、免疫寛容誘導期における精神的ストレスによって好酸球と好中球の気管支浸潤を示すマウスモデルを報告している。そのため、このマウスモデルを使用して難治性喘息である好酸球好中球混合喘息のメカニズムを解明し、治療の一助となるよう検討した。

実験には BALB/c 雌 7 週齢マウスを使用した。寛容誘導期（卵白アルブミン; Ovalbumin (OVA) 単独吸入）、感作期（OVA+水酸化アルミニウムアジュバント混合物腹腔内投与）、気道炎症誘導期（OVA 吸入）の 3 相を経て喘息モデルを構成した。ストレス負荷は 1 日 6 時間の拘束ストレスを寛容誘導期に 6 日間連続で負荷した。これらの条件より 4 群を作製し実験を行った（喘息群、ストレス群、免疫寛容群、ストレス/免疫寛容群）。喘息気道応答は、気道過敏性、気道粘液産生、気管支肺泡洗浄液（Broncho alveolar lavage fluid (BALF)）中炎症性細胞（総細胞、好酸球、好中球、リンパ球）の算定、血清中 OVA 特異的

IgE の定量より評価した。また、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13)、Th17 サイトカイン (IL-17) は ELISA を用いて測定し、T 細胞の分画 (制御性 T 細胞 (Treg)、Th2 細胞、Th17 細胞) はフローサイトメトリーを用いて解析した。

はじめに、抗原暴露 5 日後の BALF に存在する炎症性細胞について算定した。好酸球数は、喘息群と比較して免疫寛容群において減少し、免疫寛容群と比較してストレス/免疫寛容群では有意に上昇していた。そして好中球数は、驚くべきことにストレス/免疫寛容群でのみ上昇していた。このことにより免疫寛容誘導期における精神的ストレスの負荷は、免疫寛容の成立を阻止して、好酸球・好中球炎症を惹起することを確認した。

次に、マウスモデルにおける抗原暴露 3 日後の気管支リンパ節 (Bronchial lymph node: BLN) に存在する Treg 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞の割合についてフローサイトメトリーを用いて検討した。Treg 細胞は、喘息群と比較して免疫寛容群で有意に上昇するが、免疫寛容群と比較してストレス/免疫寛容群でその増加が消失した。また、Th2 細胞は、喘息群と比較して免疫寛容群では減少するが、免疫寛容群と比較してストレス/免疫寛容群で再び増加した。さらに、Th17 細胞について免疫寛容群と比較してストレス/免疫寛容群で有意に上昇した。このことより精神的ストレスの負荷は、Treg 細胞への分化を抑制し、Th2 細胞と Th17 細胞への分化が亢進することが明らかになった。このように、免疫寛容誘導期における精神的ストレスが、好酸球好中球混合喘息を呈する原因のひとつに上記 T 細胞サブセットの特徴的な発達の関与が示唆された。

ここまでの結果をもとに、炎症性細胞への IL-17A の関与を確認するために Wild Type (WT) マウスと IL-17AKO マウスを用いて好酸球と好中球の変化を抗原暴露後 5 日目の BALF で確認した。その結果、WT マウスと比較して IL-

17AKO マウスにおいて、好中球の気道浸潤は低下していたが、好酸球は変化がなかった。このように、IL-17A をノックアウトしただけでは、好中球炎症のみが消失し、好酸球炎症が残存してしまった。このことより、精神的ストレスが好酸球好中球炎症を引き起こす原因が、IL-17A の作用すなわち Th17 細胞が分化誘導し活性化することよりも上流にあると考えた。そこで、抗原感作前の免疫寛容誘導期における精神的ストレスがどのように T 細胞サブセットの特徴的な発達を引き起こすか検討するために、精神的ストレス負荷直後の BLN を採取し、その遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、精神的ストレスは、Treg 細胞の分化に関与する *Icos* 遺伝子発現の減少、Th17 細胞の転写因子である *Roryt* 遺伝子発現上昇を惹き起していることが明らかになった。これら遺伝子発現の再現性を確認するために、定量 PCR を実施するとマイクロアレイと同様の結果を得ることが出来た。

この免疫寛容誘導期の精神的ストレス負荷による、*Roryt* 発現の上昇が認められたことから、炎症誘導性サイトカインと呼ばれる IL-1 β に着目した。IL-1 β は、転写因子 *Roryt* の発現に関与し、Th17 分化誘導に大きく関わることが知られている。そこで、免疫寛容誘導期における精神的ストレスが肺における IL-1 β 産生を亢進させるのかについて検討した。その結果、免疫寛容誘導期における精神的ストレス負荷は IL-1 β を増加させることが明らかになった。このことより、寛容誘導期の精神的ストレス負荷は IL-1 β 産生を起点とした免疫応答を惹起し、好酸球・好中球気道炎症症を惹き起こす可能性が考えられた。そのため、この精神的ストレスによって増加した IL-1 β の作用を拮抗させるために、IL-1 受容体拮抗薬 (IL-1RA) を用いて、好酸球と好中球の気道浸潤における変化を確認した。IL-1RA はストレス負荷 60 分前にマウス投与し、その効果を検証した。その結果、IL-1RA の投与は、精神的ストレスによる気道への好酸球浸

潤も好中球浸潤も有意に抑制した。さらに、IL-1RA 投与は、T 細胞サブセットに対するストレス負荷の影響も抑制し、寛容誘導群と同じような T 細胞サブセットを形成させることが明らかになった。

以上のことから、好酸球・好中球気道炎症の発現には、免疫寛容誘導期における精神的ストレスが関与していることが判明した。その発症メカニズムとして、精神的ストレスによる①IL-1 β の放出を起点とした、Th17 の分化誘導と免疫応答の活性化、②Treg の分化抑制による免疫寛容の破綻が明らかになった。これらのことから、IL-1 β を無効化することで、難治性喘息である好酸球・好中球気道炎症の改善に繋がられる可能性がある。しかしながら、人体において IL-1 β を無効化する術として日本未発売であるアナキンラや高額であるカナキムマブが挙げられるが、臨床的に使用することは難しい。そこで、IL-17A の効果を直接抑制する抗ヒト IL-17A モノクローナル抗体であるセクキヌマブやイクセキズマブ、抗ヒト IL-17 受容体 A モノクローナル抗体であるブロダルマブなどの薬剤がある。これらの薬剤は、乾癬や強直性脊椎炎の自己免疫性疾患に対する適応しか取得していないが、十分に有効性を得られる可能性があると考ええる。今後、今回の研究が難治性喘息の治療の一助になり、人体に応用できると考えられる。

<参考文献>主論文 (原著論文)

Shinsuke Sato, Tasuku Kawano, Erina Ike, Kento Takahashi, Jyunji Sakurai, Tomomitsu Miyasaka, Yasuo Miyauchi, Fumiaki Ishizawa, Motoaki Takayanagi, Tomoko Takahashi. IL-1 β derived Th17 immune responses are a critical factor for neutrophilic-eosinophilic airway inflammation on psychological stress-induced immune tolerance breakdown in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. Decision Accept