

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591112

研究課題名(和文) Thバランスの制御による難治性喘息に対する新規治療法の探索

研究課題名(英文) Altering the Th1/Th2/Th17 balance as a therapeutic option for refractory asthma

研究代表者

森島 祐子 (Morishima, Yuko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10375511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Th2に偏位したGATA-3-tg喘息マウスにおいては、ステロイド反応性好酸球性気道炎症が誘導され、Th17に偏位したROR γ t-tg喘息マウスにおいては、ステロイド抵抗性好中球性気道炎症が誘導された。ROR γ t-tg喘息マウスでは、IL-17A発現亢進とともに、IL-6やCXCケモカインの発現が亢進しており、抗IL-17抗体、CXCケモカイン拮抗薬、抗IL-6受容体抗体を投与すると好中球性気道炎症および気道過敏性が抑制された。以上より、Th17優位な状況下では、IL-17とともに、IL-6やCXCケモカインがステロイド抵抗性好中球性気道炎症の病態成立機序に強く関与することが推察された。

研究成果の概要(英文)：GATA-3-overexpressing mice exhibited steroid-sensitive eosinophilic inflammation under Th2-biased conditions and ROR γ t-overexpressing mice developed steroid-insensitive neutrophilic inflammation under Th17-biased conditions. The levels of KC, MIP-2, IL-6 and other neutrophil chemotaxis-related mediators were significantly elevated in OVA-exposed ROR γ t-overexpressing mice, compared with wild-type mice. Interestingly, airway hyperresponsiveness accompanied by neutrophilic airway inflammation in ROR γ t-overexpressing mice was effectively suppressed by anti-IL-17 antibody, CXCR2 antagonist or anti-IL-6 receptor antibody administration. In conclusion, our results suggest that the expression levels of GATA-3 and ROR γ t may be important for determining the phenotype of asthmatic airway inflammation. Furthermore, blockade of the Th17 signaling pathway may be a treatment option for steroid-insensitive asthma.

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：難治性喘息 ステロイド抵抗性 好中球 Th2細胞 Th17細胞 GATA-3 ROR γ t IL-6

1. 研究開始当初の背景

喘息の主な病態は慢性気道炎症であり、その成立には好酸球のほか、IL-4、IL-5、IL-13といった Th2 サイトカインが重要な役割を担っている。しかしその一方で、難治性喘息患者では、しばしば気道内において好酸球のみならず好中球の浸潤を認め、また喘息患者に対して抗 Th2 サイトカイン抗体や IFN γ を投与した臨床試験では期待された効果は得られていない。つまり、喘息の病態は多様であり、Th1/Th2 バランスに基づいた概念だけでは説明できない病態が存在する可能性がある。

2. 研究の目的

Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞は共通の前駆細胞 (Th0 細胞) より分化するが、それぞれの分化誘導には転写因子 T-bet、GATA-3、retinoic acid-related orphan receptor- γ (ROR γ t)、Foxp3 が中心的役割を果たしている。難治性喘息患者では、喀痰中の IL-17 濃度が増加し、喘息の重症度と IL-17 レベルが相関すると報告されていることから、IL-17、Th17 細胞あるいは Th17 細胞特異的転写因子 ROR γ t が難治性喘息にみられる好中球優位のステロイド抵抗性気道炎症に関与している可能性を考え、検討を行った。

3. 研究の方法

GATA-3、ROR γ t を過剰発現する遺伝子改変マウス (それぞれ GATA-3-tg マウス、ROR γ t-tg マウス) を作成し、Th2 優位あるいは Th17 優位な状況下での抗原特異的気道炎症の病態成立機序について比較検討した。

さらに、最近の研究で、IL-6 は Th17 の分化誘導のみならず、その下流のシグナル伝達においても重要な役割を担っていることが明らかにされたことから、ROR γ t-tg マウスに IL-6、IL-17A、CXCR2 に対する中和抗体や拮抗薬を投与することで、Th17 優位な状況下での抗原特異的気道炎症を抑制できるかについても検討した。

具体的には、C57BL/6 系の GATA-3-tg マウス、ROR γ t-tg マウス、対照群として同系の野生型 (WT) マウスを使用し、各系統マウスにおいて下記の検討を行った。

- (1) 肺における転写因子 T-bet、GATA-3、ROR γ t、Foxp3 の発現
- (2) 抗原特異的気道炎症の誘導、評価
- (3) OVA 感作・曝露による OVA 特異的 IgE および Th2 / Th17 サイトカインの産生
- (4) OVA 感作・曝露による CXC ケモカイン、IL-6 の産生
- (5) 抗原特異的気道炎症に対するステロイドの反応性

- (6) 抗原特異的気道炎症に対する抗 IL-6 受容体抗体、抗 IL-17A 抗体、CXCR2 拮抗薬の効果

4. 研究成果

- (1) 肺における転写因子 T-bet、GATA-3、ROR γ t、Foxp3 の発現

OVA 感作/曝露前の肺内リンパ球においては、WT マウスと比較し、GATA-3-tg マウスでは GATA-3 mRNA が 379 倍、ROR γ t-tg マウスでは ROR γ t mRNA が 1557 倍のレベルで高発現していることを確認した。T-bet mRNA、Foxp3 mRNA の発現については、各群で変化はみられなかった。

- (2) 抗原特異的気道炎症の誘導、評価

OVA 感作/曝露後の肺組織では、いずれの系統マウスにおいても気管支血管周囲に炎症細胞浸潤像を認めた。WT/OVA 群と GATA-3-tg/OVA 群では BALF 中の好酸球増多を認め、その程度は GATA-3-tg/OVA 群で顕著であった。一方、ROR γ t-tg/OVA 群では、好中球数の増多を顕著に認めた (図 1)。

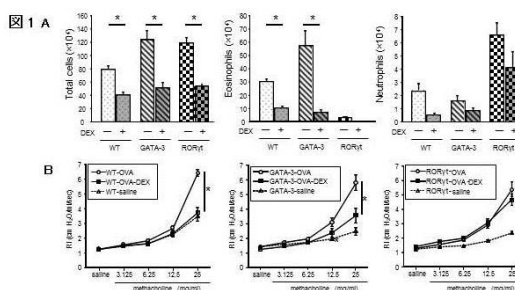


図1 野生型マウス (WT)、GATA-3過剰発現マウス (GATA-3)、ROR γ t過剰発現マウス (ROR γ t) について、卵白アルブミン (OVA) による感作・曝露後に気管支肺洗浄液 (BALF) 中の細胞成分 (A)、メタコリン吸入後の気道抵抗 (RAW) を解析した。GATA-3では好酸球性気道炎症と気道過敏性亢進がみられたが、ステロイド (DEX) によって抑制された。ROR γ tでは好中球性気道炎症と気道過敏性亢進がみられ、ステロイド (DEX) 感号で抑制されなかった。*p<0.05

- (3) OVA 感作/曝露による OVA 特異的 IgE および Th2 / Th17 サイトカインの産生

OVA 曝露後の血清 OVA 特異的 IgE 値は GATA-3-tg/OVA 群において他の OVA 群と比較し、有意な上昇を認めた。また OVA 感作/曝露の有無を問わず、GATA-3-tg 群では肺内 IL-4 産生 T 細胞の割合が増加し、ROR γ t-tg 群では肺内 IL-17A 産生 T 細胞の割合が増加していた。このことから、それぞれのマウスが Th2 あるいは Th17 に偏向した環境下にあることを確認した。

- (4) OVA 感作/曝露による CXC ケモカイン、IL-6 の産生

ROR γ t-tg/OVA 群では、好中球数増多と同様に肺組織中の CXCL1 と CXCL2、IL-6 のレベルが GATA-3-tg/OVA 群と比較し有意な上昇を認めた。

(5) 抗原特異的気道炎症に対するステロイドの反応性

DEX の投与により、WT/OVA 群や GATA-3-tg/OVA 群における BALF 中の好酸球数は著明に抑制されたが、ROR γ t-tg/OVA 群における BALF 中の好中球数は抑制されなかった。OVA 感作/曝露により、いずれの系統マウスにおいても生食投与群と比較して気道過敏性の亢進を認めた。DEX の投与により、WT/OVA 群や GATA-3-tg/OVA 群では気道過敏性が抑制されたが、ROR γ t-tg/OVA 群では抑制されなかった。

(6) 抗原特異的気道炎症に対する抗 IL-6 受容体抗体、抗 IL-17A 抗体、CXCR2 拮抗薬の効果

DEX 投与にて抑制されなかった ROR γ t-tg/OVA 群における BALF 中の好中球数と気道過敏性が、抗 IL-6 受容体抗体、抗 IL-17A 抗体、CXCR2 拮抗薬投与により抑制された(図2)。

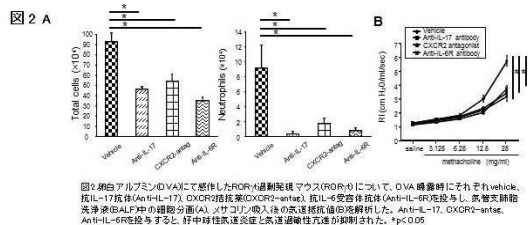


図2 卵白アルブミン(OVA)にて感作したROR γ t過剰発現マウス(ROR γ t)において、OVA曝露時にそれぞれ、vehicle、抗IL-17抗体(Anti-IL-17)、CXCR2拮抗薬(CXCR2-antag)、抗IL-6受容体抗体(Anti-IL-6R)投与し、気管支肺動脈液(BALF)中の細胞数(A)と、メタホルミン吸入後の気道過敏性を測定した。Anti-IL-17、CXCR2-antag、Anti-IL-6R投与すると、好中球性気道炎症と気道過敏性亢進が抑制された。*p<0.05

以上をまとめると、GATA-3 過剰発現マウスでは Th2 優位な環境下においてステロイド感受性好酸球性気道炎症が、ROR γ t 過剰発現マウスでは Th17 優位な環境下においてステロイド抵抗性好中球性気道炎症が誘導された。このことより、Th2 細胞特異的転写因子である GATA-3 と、Th17 細胞特異的転写因子である ROR γ t の発現バランスが、アレルギー性気道炎症のフェノタイプを規定する因子として重要であることが示唆された。

さらに、ROR γ t-tg 喘息モデルマウスでは、IL-17A 発現亢進とともに、IL-6 や CXC ケモカインの発現が亢進しており、Th17 優位な状況下では、IL-17 とともに、IL-6 や CXC ケモカインがステロイド抵抗性好中球性気道炎症の病態成立機序に強く関与することが推察された。IL-6、IL-17A、CXCR2 に対する中和抗体や拮抗薬を投与すると、ステロイド抵抗性好中球性気道炎症が有意に抑制されたことから、Th17 細胞の分化増殖やシ

グナル伝達において重要な役割を担っているメディエーターをブロックすることで、難治性喘息をコントロールできる可能性が推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

阿野哲士、森島祐子、檜澤伸之：T細胞特異的転写因子の発現バランスがアレルギー性気道炎症のフェノタイプを規定する。医学のあゆみ 248: 286 -287 (2014) 査読無

Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Yoh K, Yageta Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Takahashi S, Hizawa N: Transcription factors GATA-3 and ROR γ t are important for determining the phenotype of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. J Immunol 190: 1056-1065 (2013) 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1202386
Morishima Y, Ano S, Ishii Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Hizawa N: Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. Clin Dev Immunol 2013: 609395 (2013) 査読有 doi: 10.1155/2013/609395.

森島祐子、檜澤伸之：気道炎症と好中球。Respiratory Trends 2:12-15 (2012) 査読無

〔学会発表〕(計6件)

森島祐子、阿野哲士、石井幸雄、大塚茂男、松山政史、中澤健介、川口未央、坂本透、檜澤伸之：アレルギー性気道炎症のフェノタイプを規定する際の転写因子 GATA-3 と ROR γ t の重要性。第23回国際喘息学会日本・北アジア部会、2013年6月28日、都市センターホテル、東京
Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Kaneko Y, Fujita J, Ohtsuka S, Matsuyama M, Nakazawa K, Ohta K, Matsuno Y, Kawaguchi M, Sakamoto T, Hizawa N: Anti-IL-6 receptor antibody attenuates neutrophilic airway inflammation in ROR γ t-overexpressing mice. 2013 International Conference of American Thoracic Society, 2013年5月21日、Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA
阿野哲士、森島祐子、石井幸雄、大塚茂男、松山政史、中澤健介、川口未央、坂本透、檜澤伸之：OVA誘導性好中球性気道炎症に対する抗IL-6受容体抗体の抑

制効果に関する検討 .第 53 回日本呼吸器学会総会、2013 年 4 月 20 日、東京国際フォーラム、東京

阿野哲士、森島祐子、石井幸雄、大塚茂男、松山政史、中澤健介、松野洋輔、川口未央、坂本 透、檜澤伸之：OVA 誘導性好中球性気道炎症に対する抗 IL-6 受容体抗体の有効性 .第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012 年 11 月 29 日、大阪国際会議場、大阪

Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Yamadori T, Masuko H, Kaneko Y, Fujita J, Ohtsuka S, Matsuyama M, Nozato K, Kawaguchi M, Sakamoto T, Hizawa N: Th2/Th17 milieu determines the phenotype of airway inflammation in mice. 2012 International Conference of American Thoracic Society, 2012年5月20日, Moscone Center, San Francisco, USA

阿野哲士、森島祐子、石井幸雄、大塚茂男、松山政史、川口未央、坂本 透、檜澤伸之：アレルギー性気道炎症の多様性における転写因子 ROR γ t および GATA-3 の役割 . 第 52 回日本呼吸器学会総会、2012 年 4 月 20 日、神戸コンベンションセンター、神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森島 祐子 (MORISHIMA, Yuko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10375511