

遅発型喘息反応のT細胞による新たな発症機構の解明

東京都医学総合研究所 ゲノム医科学研究分野
花粉症プロジェクト
神沼 修

1. はじめに 目的

気管支喘息において、アレルゲン吸入数時間後から発症する喘息発作(遅発型喘息反応 Late asthmatic response: LAR)は、遷延的に呼吸困難が持続し、既存の気管支収縮性メディエーター拮抗薬では部分的にしか抑制されないことから、LARの発症を制御することは喘息治療における重要な課題である。さらに、抗原特異的IgEが検出されず肥満細胞の関与が否定される非アトピー型喘息でも発症するなど、LARに対する未知の気管支収縮物質の関与が強く示唆される。一方T細胞はこれまで、気管支収縮性物質を放出するとは考えられていなかったが、申請者は最近、LARの発症にT細胞が直接関与する可能性を明らかにした。すなわち、感作マウスよりin vitroで刺激培養することによって得た抗原特異的T細胞クローンを、正常マウスに移入して抗原を経気道的にチャレンジした結果、Immediate asthmatic response (IAR)の発現は全く見られないにも関わらず、チャレンジ数～数十時間後をピークとするLARの発症が観察された[1]。さらに、気管支喘息患者末梢血T細胞をin vitroで抗原刺激して得た培養上清を、申請者らがこれまでに樹立したヒト気管支平滑筋を用いたコラーゲンゲル収縮アッセイ系 [2,3] に添加したところ、明らかな収縮活性を示した。そこで本研究では、この喘息患者T細胞由来の新規気管支収縮物質を同定し、LARの発症要因としてのT細胞およびT細胞由来気管支収縮物質の重要性を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

LARの発症要因となるT細胞由来の気管支平滑筋収縮物質を同定するため、非アトピー型喘息患者末梢血単核球を特異抗原によってin vitroで刺激培養して抗原特異的T細胞を得た。さらに限界希釈および刺激培養を繰り返してT細胞クローンを樹立した。種々のT細胞クローンをPMA+Ionomycinで刺激培養し、その培養上清サンプルを回収した。各サンプルを、ヒト気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルに添加して収縮作用を検討し、培養上清に収縮活性が認められたT細胞クローンを大量培養した後、刺激培養上清を回収した。透析および濃縮を行ったサンプルについて、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過を行い、活性画分を回収した。SDS-PAGEを行って銀染色し、活性画分に特異的に認められるバンドを切り出して質量分析を行い、気管支収縮候補物質を抽出した。

また申請者らはこれまでに、一部のクローン化したマウスT細胞を正常マウスに移入して抗原チャレンジすることにより、LARが誘発されることを明らかにしている [1]。そこで、各

T細胞クローン間の比較解析を行うために、マウス気管支平滑筋細胞を用いたコラーゲンゲル収縮法の樹立を試みた。

3. 結果 研究成果

活性画分に特異的に認められた5バンドを切り出して質量分析した結果、トータル43種類の蛋白質が同定できた。その中には、既知の平滑筋収縮物質は含まれておらず、T細胞が産生する新たな気管支収縮物質の存在が明らかとなった。

マウス気管支平滑筋を用いたコラーゲンゲル収縮アッセイ系が樹立できた。このアッセイ系では、メサコリンに比しLTD4によってより強い収縮が誘発された。またそれらの収縮反応は、各々アトロピンおよびモンテルカストの添加によって拮抗的に阻害された。

4. 考察 まとめ

同定された新規気管支収縮物質候補について、さらに中和抗体やリコンビナント分子などを用い、その生理活性を確認してゆく計画である。それによりT細胞由来の新規気管支収縮物質を確定した後、その検出法を速やかに樹立し、LAR発症患者のT細胞および気管支局所における産生・発現レベルについて検討してゆきたい。

また、今回樹立したマウス気管支平滑筋によるコラーゲン収縮アッセイ系を利用して、マウスT細胞クローンより産生される気管支収縮物質の探索も並行して実施し、ヒト由来の候補物質との比較解析を行う計画である。それにより、T細胞由来気管支収縮物質におけるLAR発症要因としての重要性を実証してゆきたい。

5. 発表論文、参考文献

発表論文

[1] Kouyama S, Otomo-Abe A, Kitamura N, Kaminuma O, Mori A. A contraction assay system using primary cultured mouse bronchial smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 161:S93-97, 2013.

参考文献

[1] Ohtomo T, Kaminuma O, Kitamura N, Kobayashi N, Mori A. Murine Th clones confer late asthmatic response upon antigen challenge. *Int Arch Allergy Immunol*, 149: S2-6, 2009.

[2] Kitamura N, Kaminuma O, Ohtomo T, Kiyokawa N, Mori A. Evaluation of cysteinyl leukotriene-induced contraction of human cultured bronchial smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 149: S83-86, 2009.

[3] Kitamura N, Kaminuma O, Mori A. A contraction assay system using established human bronchial smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 146: S36-39, 2008.