Year-in-Review

気管支喘息：病態

第25回日本アレルギー学会春季臨床集会

教育セミナー11

(平成25年5月12日)

東京大学医学部
アレルギーリウマチ内科
土肥　眞

気管支喘息:病態：近年の知見の進歩

- 疫学レベルでの知見: 肥満・喫煙・性差など
- 遺伝子レベルでの知見

  GWAS解析、ネットワーク解析、エピジェネティック制御（例：Th2サイトカイン発現）
- 分子レベルでの知見

  IL-13-periostin, IL-23-Th17 axis, IL-33/IL-25/TSLP/GM-CSF, ヒスタミンH1受容体、leukotrieneの網羅的解析
- 細胞レベルでの知見

  M1/2マクロファージ

  新しいhelper T 細胞の関与（Th9, TFHなど）

  Innate lymphoid cells（nuocyte, natural Th 細胞, ILC2）

  好塩基球、樹状細胞研究の進歩
- 体内時計
- その他

発表概要

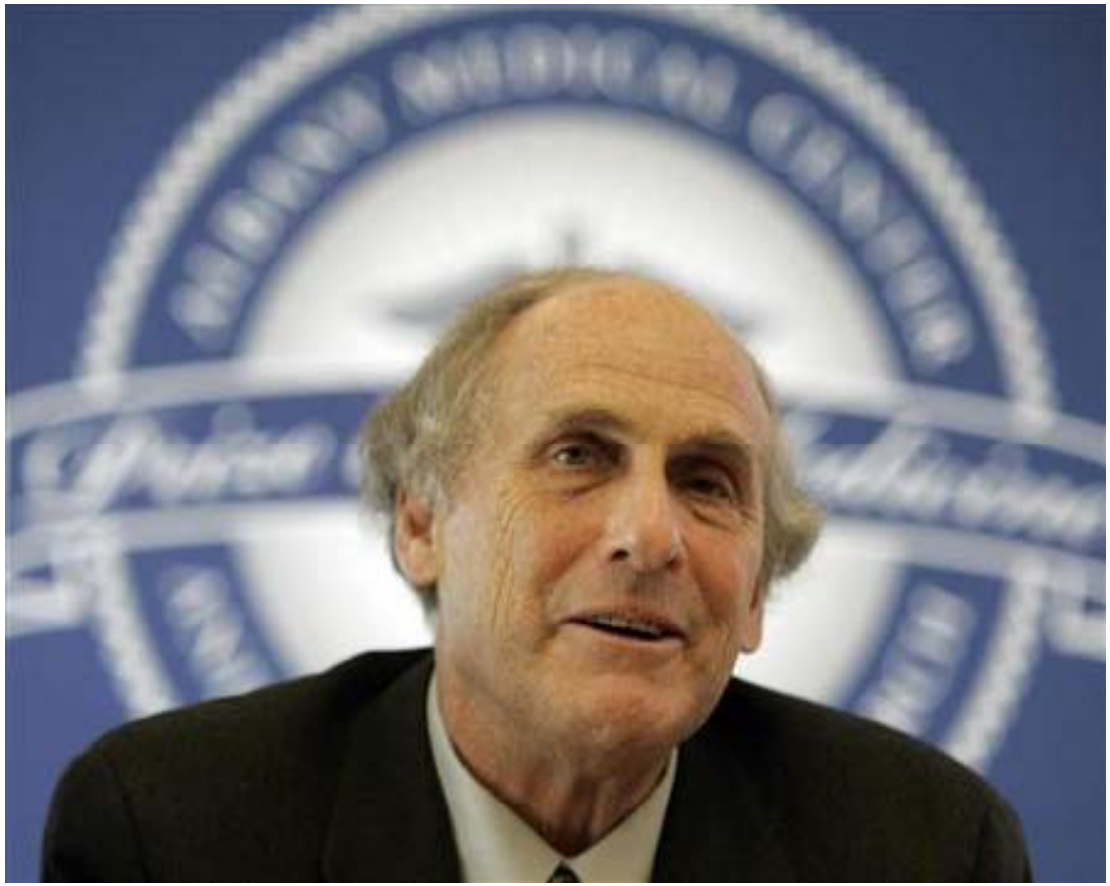
- 樹状細胞についての知見の進歩
- Innate type lymphoid cells (ILCs)について
- マクロファージの可能性

（病態への関与・治療の標的）

発表概要

- 樹状細胞についての知見の進歩
- Innate type lymphoid cells (ILCs)について
- マクロファージの可能性

（病態への関与・治療の標的）



Ralf M. Steinman (1943.1.14~2011.9.30)

Steinman RM and Cohn ZA.
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organ tissue of mice.
J Exp Med 137:1142-1162, 1973.

樹状細胞(dendritic cells: DC)とは

- 骨髄由来で、全身の組織に分布する細胞である
- 樹状突起(dendrite)を有する
- 最も強い抗原呈示能を持つ

  即ち、naive T cellに抗原を提示する
- 単一の細胞ではなく、起原や機能の異なるサブセットよりなる
- 自然免疫と獲得免疫との橋渡しをする

DCの機能、意義

- 抗原特異的免疫応答の開始と増幅（抗原提示）
- 免疫寛容の誘導
- $Th_1/Th_2/Th_{17}/T_{reg}$細胞の分化に関与
- それ自身がサイトカインを産生して免疫応答を修飾 (効果相/炎症相にも関与)

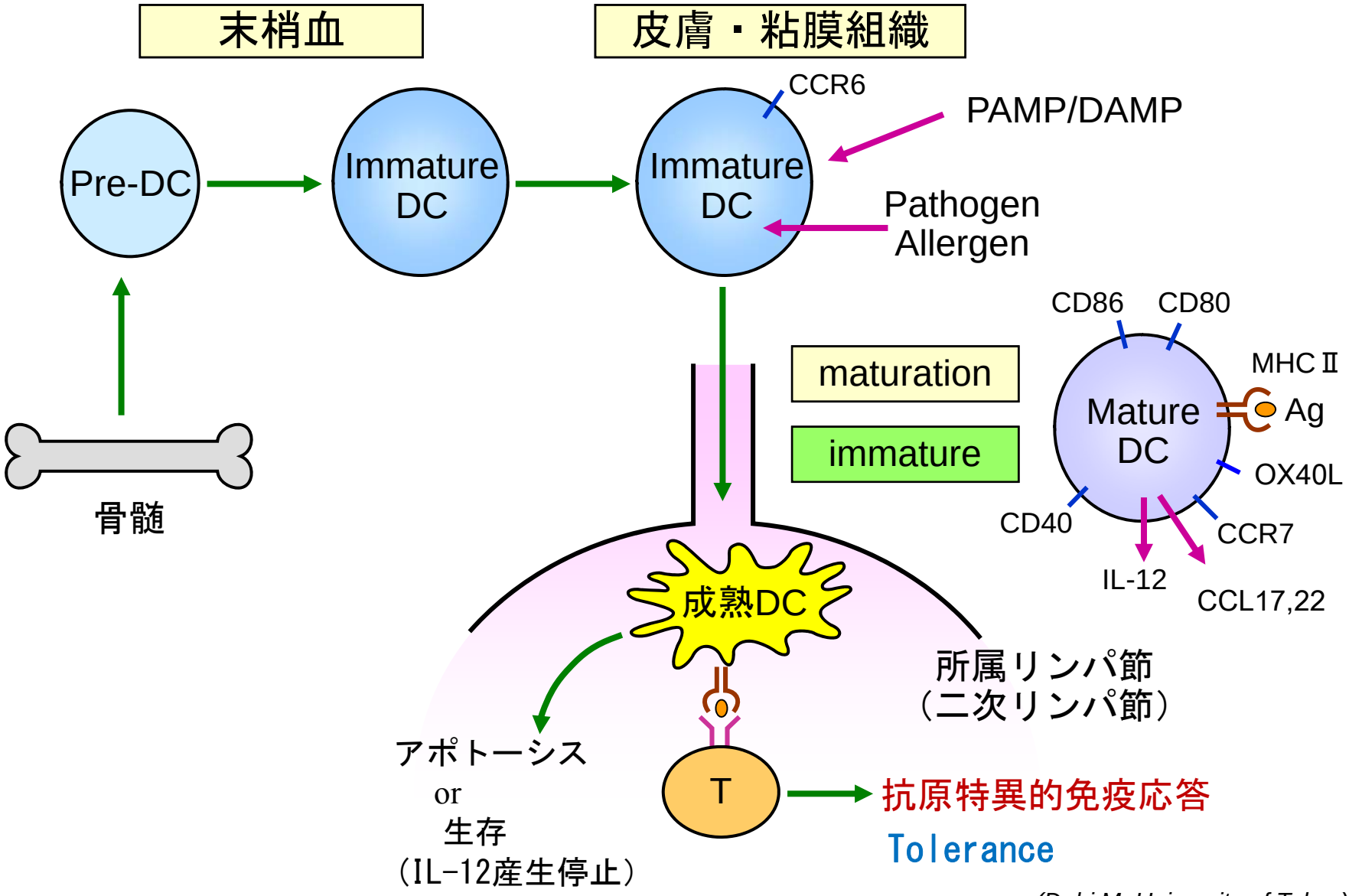
Conventional DC : cDC

- $CD11c^{high}$, $CD11b^{+ \text{ or } -}$
- サブセットによって、表面マーカーなどが微妙に異なる。
- 抗原を取り込み、maturationを起こしながら所属（二次）リンパ節へ遊走し、抗原を提示
- 末梢血単核球の0.5-1.0%

Plasmacytoid DCs (pDCs)

- $CD133^{low}$, $CD11c^{low/med}$, $B220^{+}$ (マウス)$BDAC2^{+}$(ヒト)
- Type I interferon（IFN-α/βなど）を産生
- Tolerance
- Anti-virus
- Anti-tumor
- Autoimmune
- 末梢血中単核球の0.5%以下

DCのライフサイクル(migratory DC)



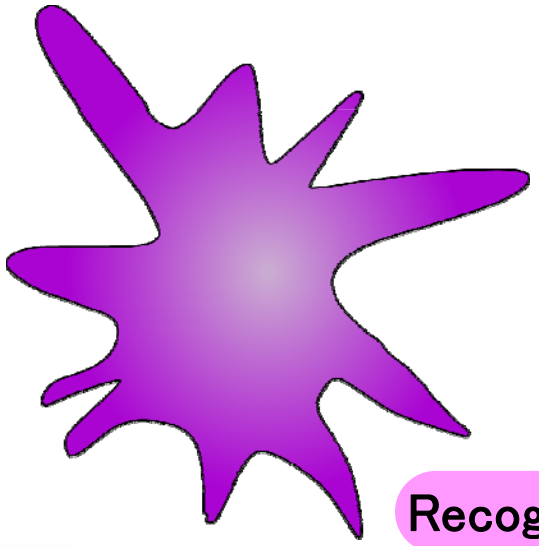
(Dohi M. University of Tokyo)

DC上の様々なレセプター

Recognition of microbial motifs

Toll like receptors 1-11

Intracellular receptors
NOD1/2
NALPs
TLR7, 9
PKB



Recognition of inflammation

Protease activated receptors

Complement receptors

Prostanoid receptors
DP1, EP4, IP

Neuropeptide receptors
NK1, CGRPR

Recognition of cell death/stress

Purinergic receptors
P2X, P2Y

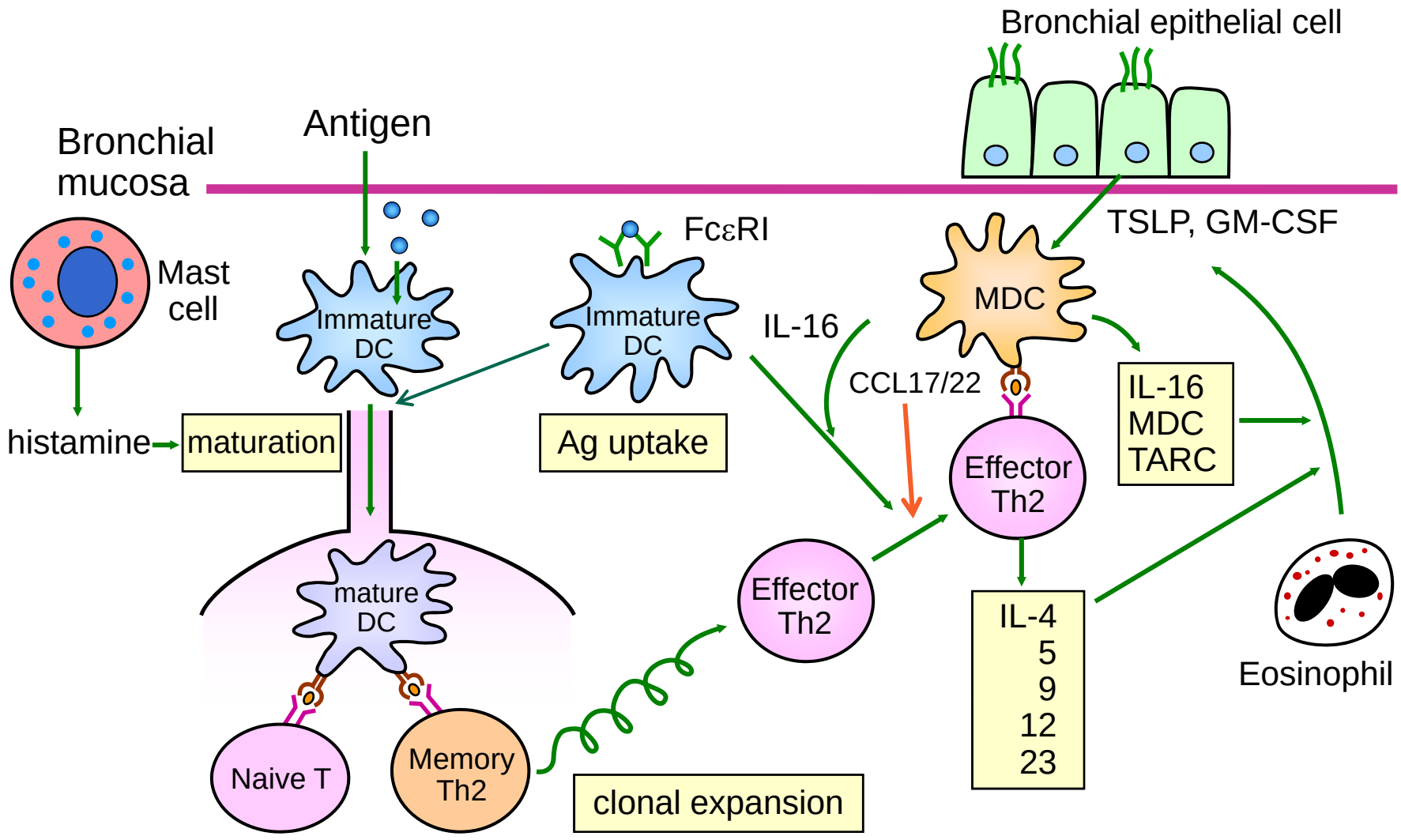
Receptors for death
NALP3
RAGE
heat shock proteins-R

Self/non-self discrimination

C-type lectin receptors
Dectin
macrophage mannose receptor
DEC205
BDCA-2

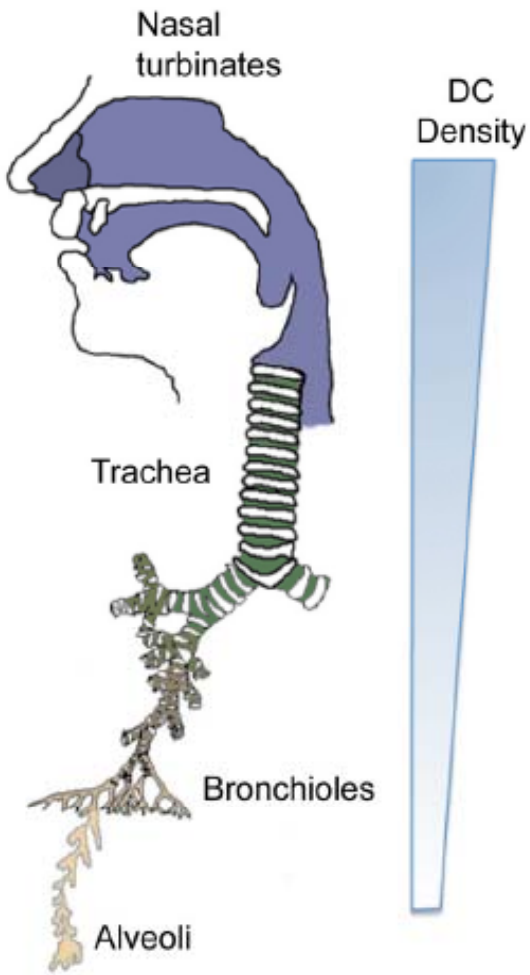
(Lambrecht: Curr Mol Med 8: 2008)

Role of DCs in the effector phase of allergic airway inflammation



(Dohi M. University of Tokyo)

Distribution of DCs in the respiratory tract



- 中枢気道では24～36時間で 85%近くが入れ代わるのに対して、肺末梢では半減期が 7～10日と長い（サブセットによる違いあり）
- 気道上皮内のDCはsemimature
  肺末梢のDCは基本的にimmature
- 通常はmaturationを抑制する機構がはたらく
  肺胞マクロファージ： IL-10, NO, PGD_2, PGI_2
  気道上皮細胞： NO, TGF-β
- 無害な抗原に対しては、anergy/tolerance を誘導して過剰な反応を抑制

(Condon, et al. JLB 90;883, 2010)

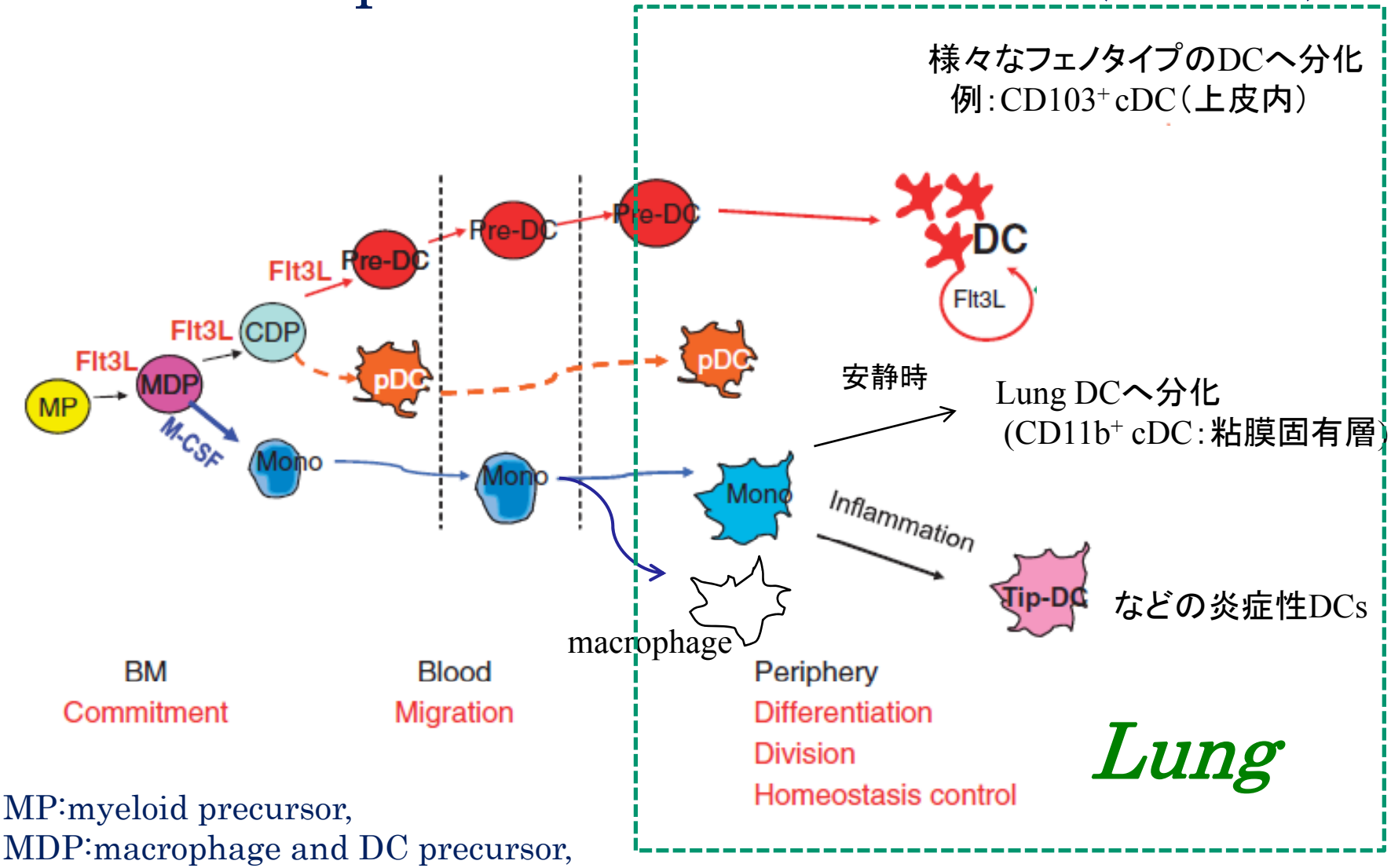
マウスと人のDCの種々のマーカー

TABLE 1. Cell Surface Markers, Activation Markers, and TLR Distribution for Mouse and Human Lung DC Subsets

DC subset	Surface markers	Activation markers	TLRs
Murine lung			
CD103^{+} DCs	CD11c^{+}, CD8α^{-}, CD11b$^{lo/-}$, CD103^{+}, MHC class II^{+}, Langerin^{+}	MHC class II, CD80, CD83, CD86, PDL1, PDL2, CD40	2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13
CD11b^{hi} DCs	CD11c^{+}, CD8α^{-}, CD11b^{hi}, CD103^{-}, MHC class II^{+}, Langerin^{-}	MHC class II, CD80, CD83, CD86, PDL1, PDL2, CD40	1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 13
pDCs	CD11c^{int}, CD11b$^{lo/-}$, B220^{+}, Ly6c^{+}, MHC class II$^{-/lo}$, SiglecH^{+}	MHC class II, CD80, CD86	7, 9, 12
Human DCs			
Myeloid DC in BALF, spleen, blood	CD11c^{+}, BDCA1^{+}, HLA-DR^{+}, BDCA3^{+}, BDCA4^{-}	HLA-DR, CD80, CD86	?
Myeloid DC in blood and interstitium	CD11c^{+}, BDCA3^{+}, HLA-DR^{+}, Clec9A (DNGR-1), Necl2^{+}, Langerin^{+}, CXCR1^{+}	HLA-DR, CD80, CD86	3
pDCs	CD11c^{dim}, BDCA2^{+}, BDCA4^{+} CD123^{+}, L-selectin^{+}, IL-3R^{+}, HLA-DR$^{-/lo}$	HLA-DR, CD80, CD86	7, 9

(Condon et al. J Leukoc Biol 90:883, 2011)

DC development and homeostasis(mouse)

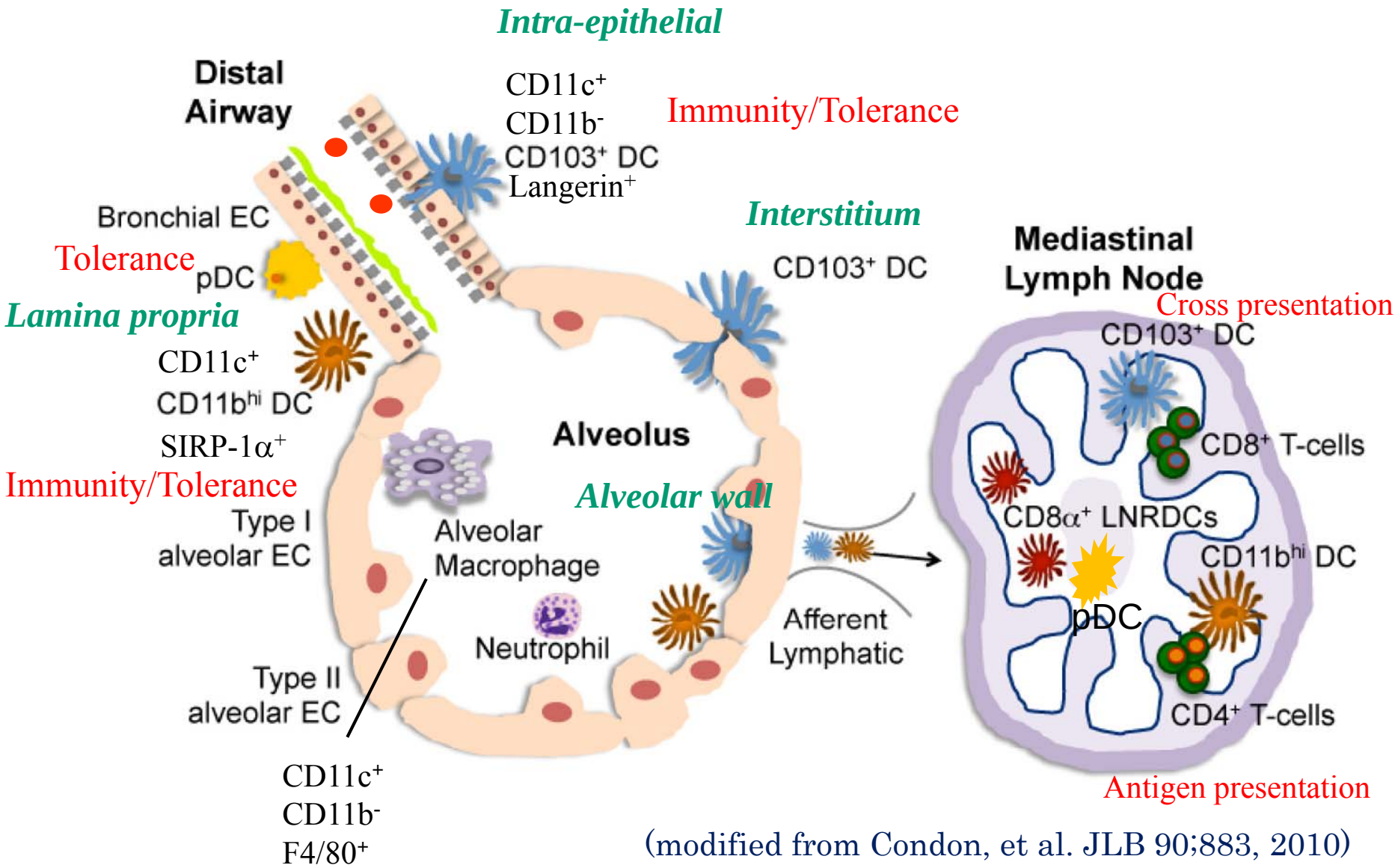


MP:myeloid precursor,
MDP:macrophage and DC precursor,
CDP:common DC precursor,

(Modified from Liu K. et al, EJI 40;2-85,2010)

DC subsets in the lung and MLN in steady state

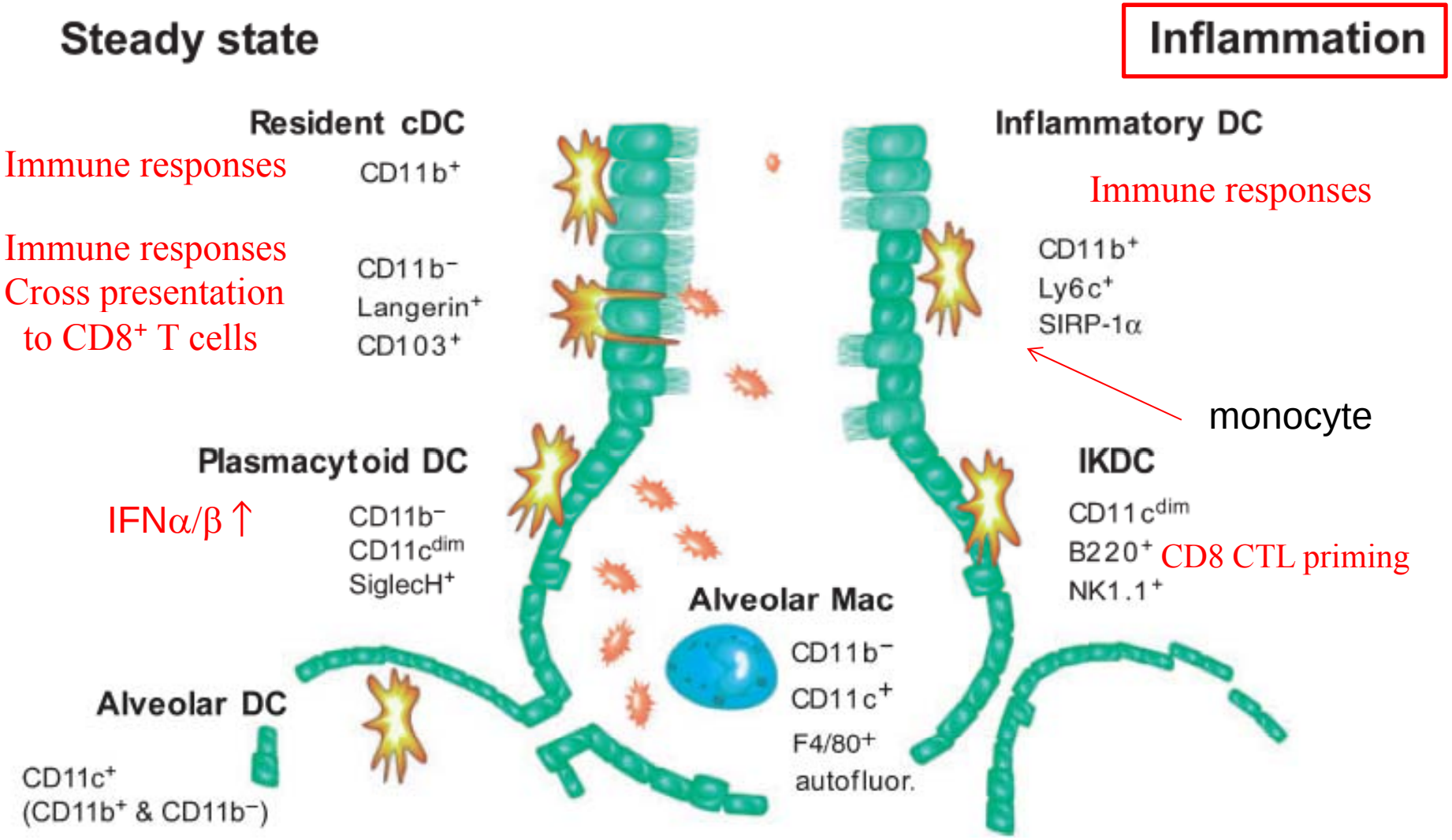
Resident DCs



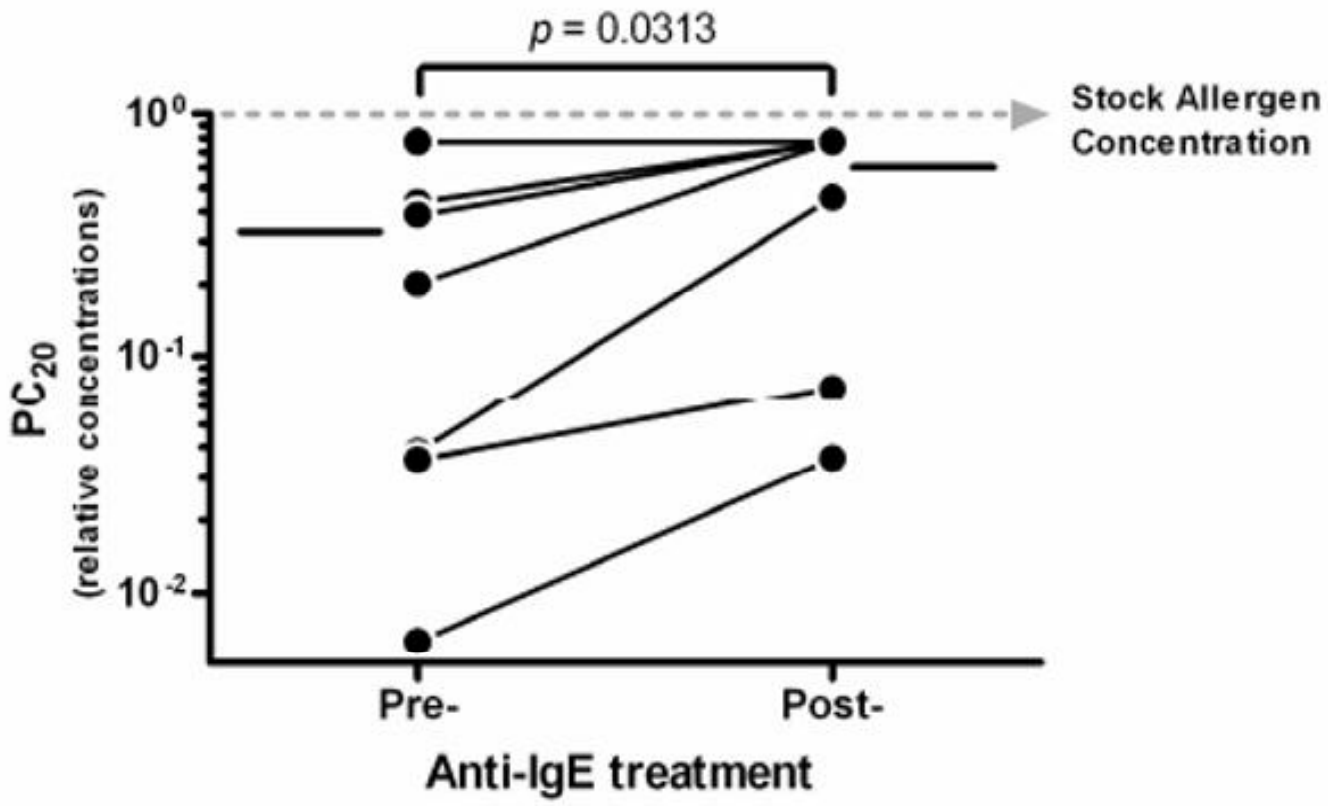
(modified from Condon, et al. JLB 90;883, 2010)

Lung DC subsets in the inflammation

(Modified from Plantinga et al. EJI 40;2085, 2010)

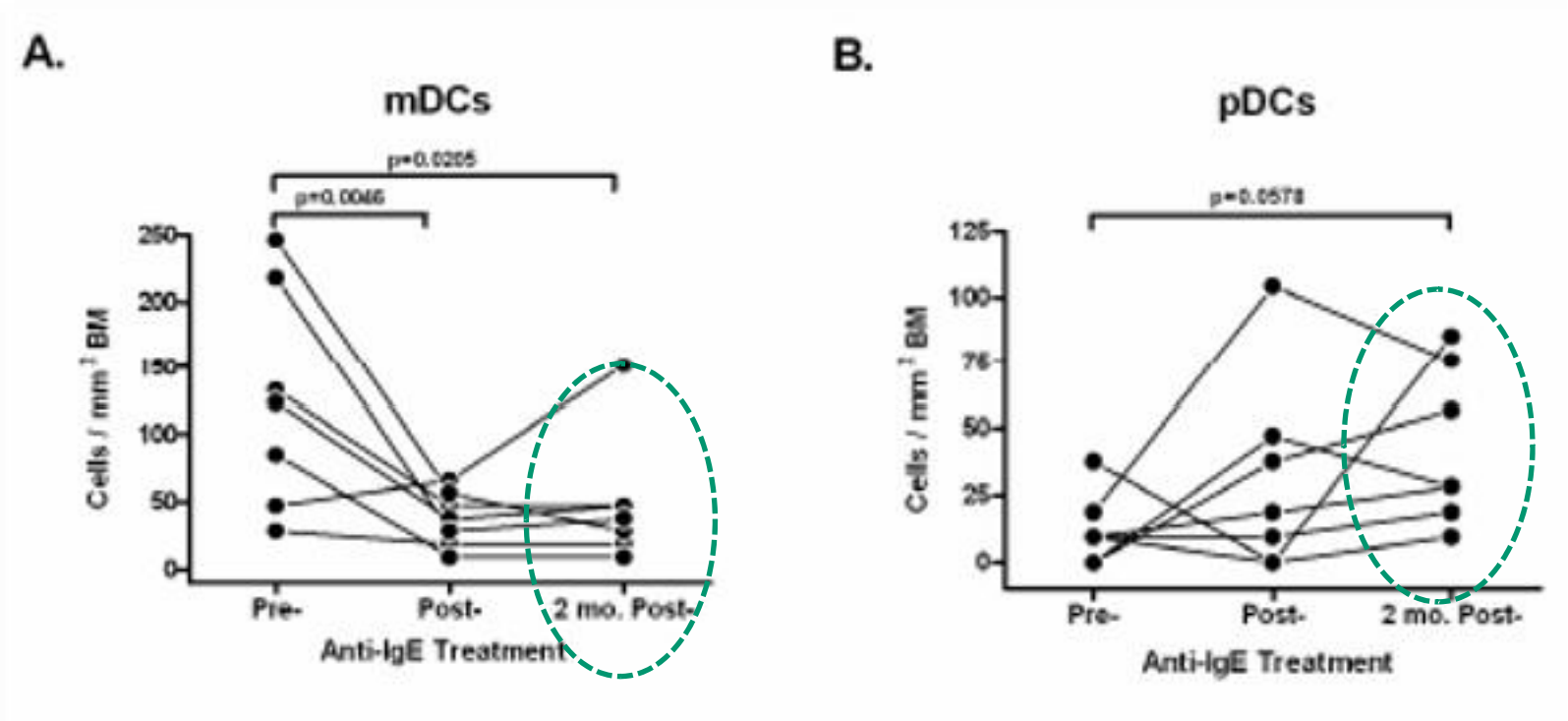


気管支喘息と DC (5)
omalizumabの効果:気道過敏性



(Chand HS, et al. JACI 125:1157,2010)

気管支喘息と DC (5)
omalizumabの効果：DCの数



（Chand HS, et al. JACI 125:1157,2010)

気道・肺組織のDCに関する疑問点

- 気道と肺実質とで質的にどのように異なるのか

  Flt3L-/-マウス:肺の実質ではcDC、pDC共に↓↓

  気道では減らない

- $CD11b^{+}$cDCと$CD11b^{-}CD103^{+}$cDCの由来はそれぞれ単一か？

  $CD103^{+}$cDCでも、monocyte由来の可能性がある

  （Jakubzick, JEM 205:2008)

- Precursorはどこで分化するのか（肺の前・中？）
- 半減期は？

  従来：肺末梢では7~10日

  最近の報告： $CD103^{+}$cDCで30日、$CD11b^{+}$cDCで15日

発表概要

◆ 樹状細胞についての知見の進歩

◆ Innate type lymphoid cells (ILCs)について

◆ マクロファージの可能性

（病態への関与・治療の標的）

アレルギー性炎症に関与するリンパ系細胞の多様性

- 獲得免疫に関与

  CD4陽性helper T cells

  CD8陽性helper T cells

  B cells

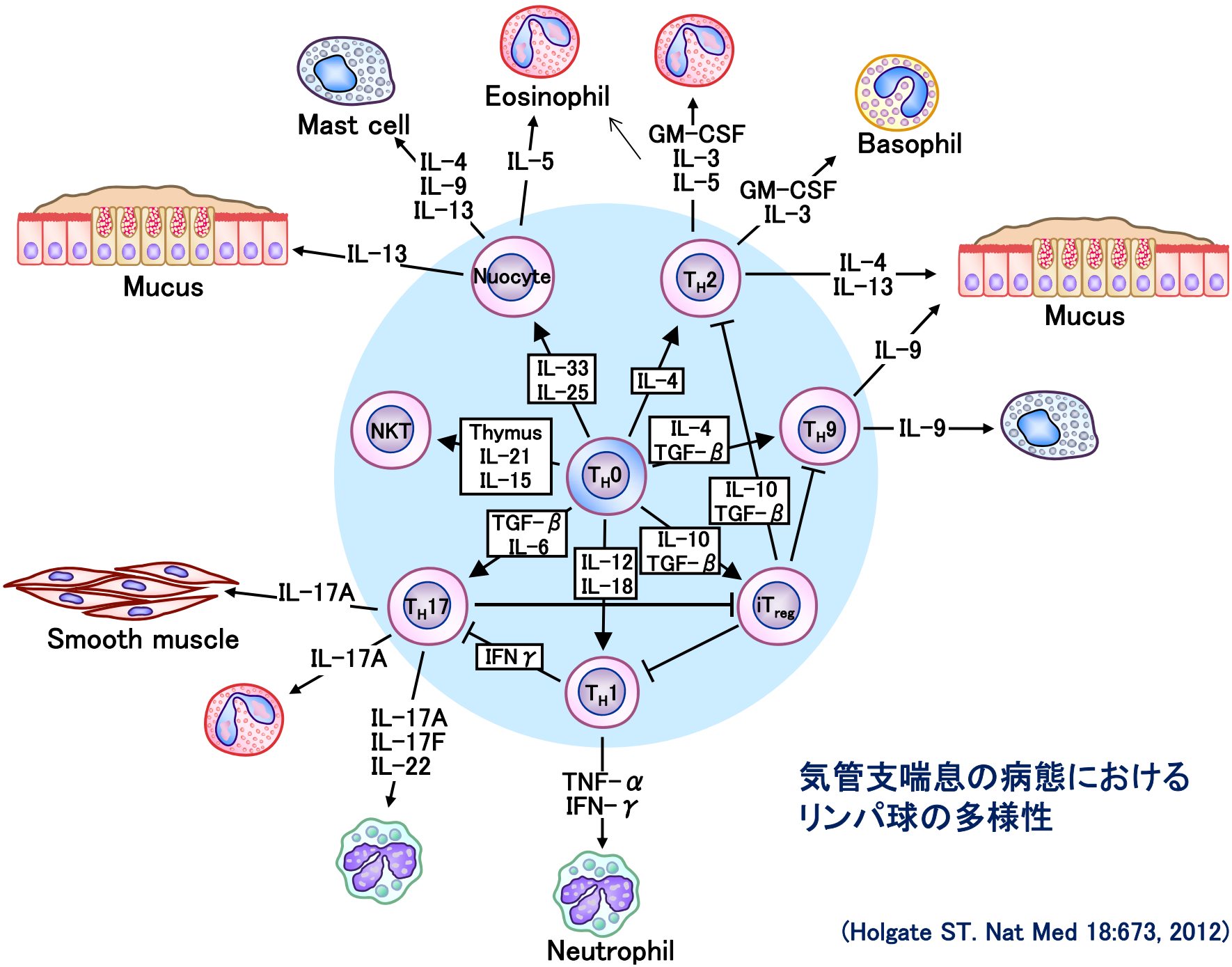
- 自然免疫に関与

  NK cells, NKT cells

  Innate lymphoid cells (ILCs)

獲得免疫に関与するヘルパーT細胞

- ◆ TCRを発現
- ◆ CD4を発現
- ◆ 病態を促進する方向に作用
  - Th1: IFNγ, IL-12を産生、細胞内細菌、ウイルス、自己免疫
  - Th2: IL-4,5,13を産生、アレルギー病態
  - Th17: IL-17Aを産生、自己免疫、細胞外細菌、真菌、アレルギー
  - Th9: IL-9を産生、寄生虫免疫、アレルギー
  - Tfh: CXCR5発現、2次リンパ節の濾胞胚中心、抗体先生
- ◆ 病態を制御する方向に作用
  - Treg：Thの作用を抑制・制御



気管支喘息の病態における
リンパ球の多様性

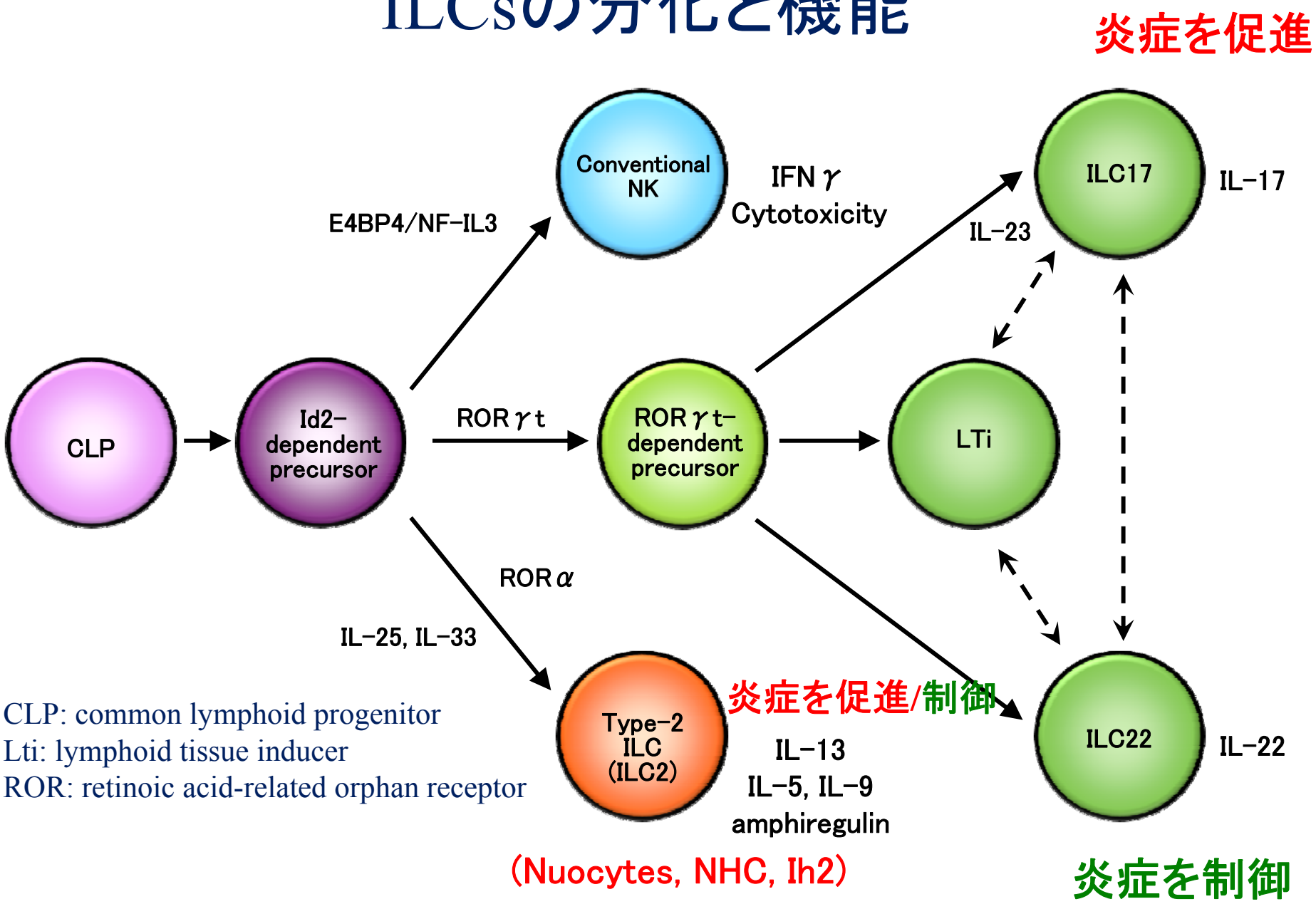
(Holgate ST. Nat Med 18:673, 2012)

自然免疫に関与するリンパ球様細胞
innate lymphoid cells : ILCs

- CD3/4/8をいずれも発現していない
- 種々のlineage markers (F4/80, CD11c, FcεRIα, Gr1, B220, TCRα/β鎖）が全て陰性
- IL-33受容体(ST2), IL-7受容体(CD127), IL-2Rα(CD25), c- kit受容体(CD117), Thy1 (CD90), ICOSを膜表面に発現
- 分化にはIL-2とIL-7の刺激が必要

ILCsとは、リンパ球以外のいずれの血球系統にも属さないが抗原受容体を発現していない、自然免疫系に属するリンパ球に類似した形態と機能を有する細胞群である

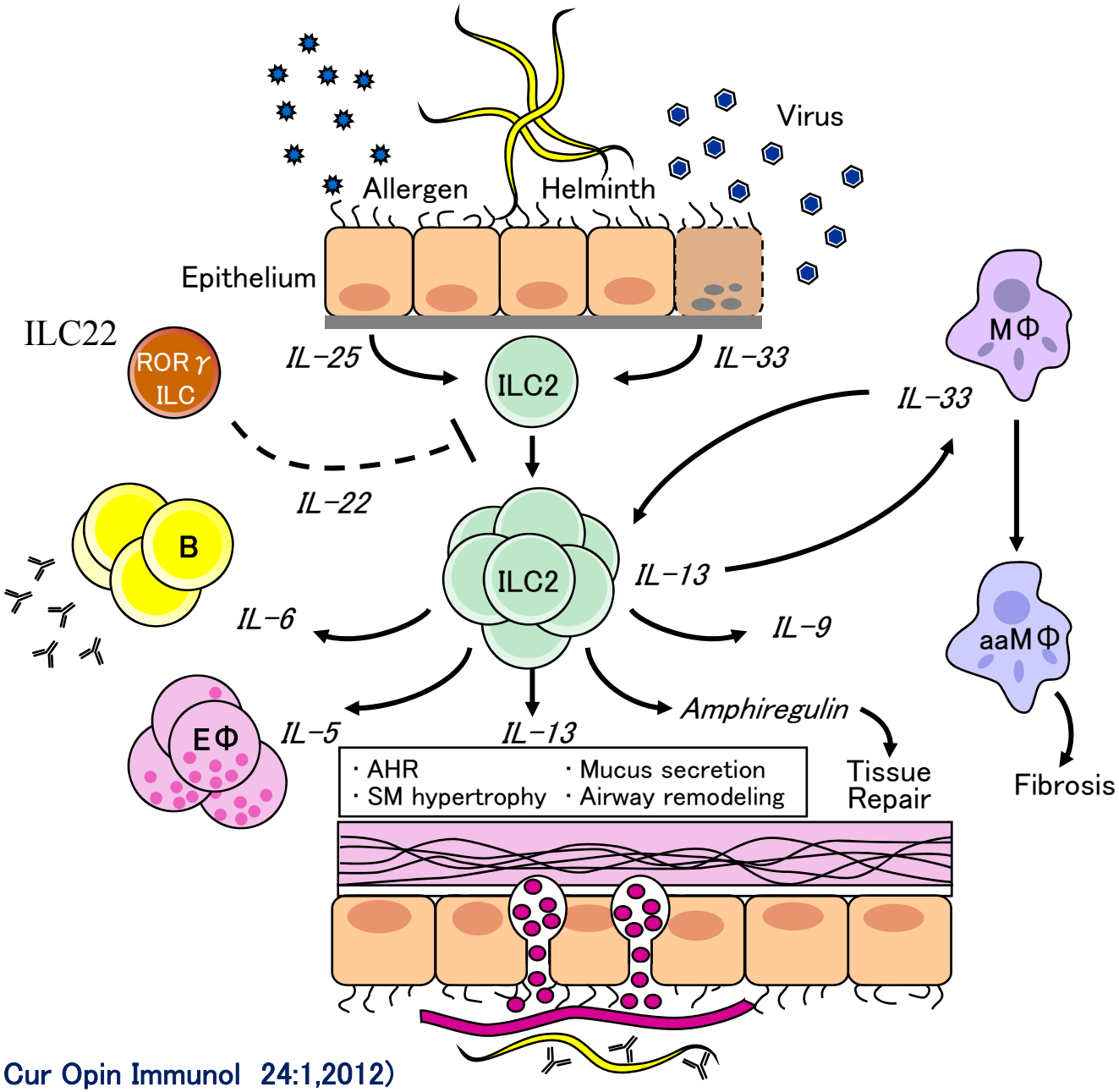
ILCsの分化と機能



CLP: common lymphoid progenitor
Lti: lymphoid tissue inducer
ROR: retinoic acid-related orphan receptor

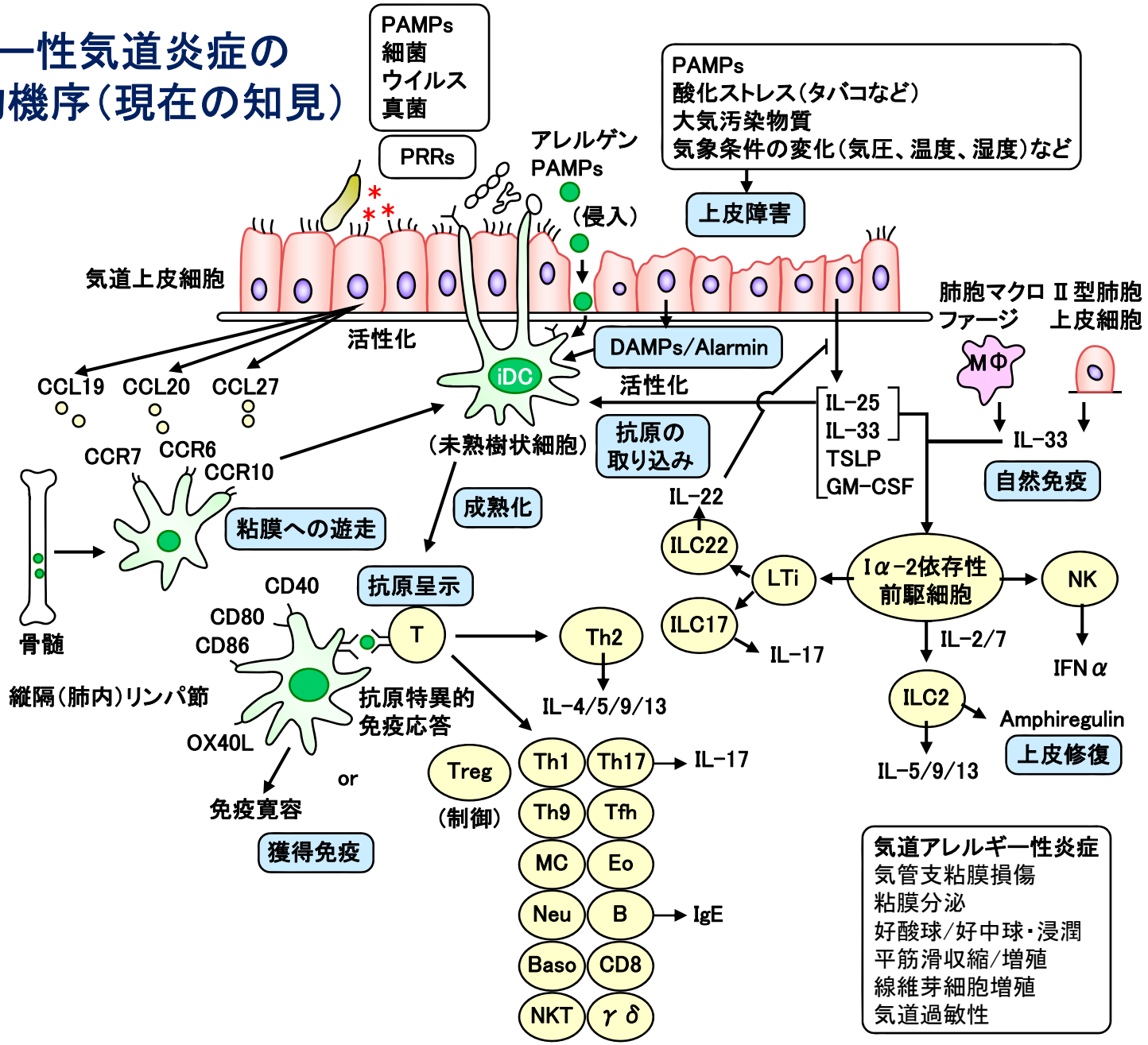
(Jennifer A, et al. Eur J Immunol 42:1368, 2012)

喘息の病態へのILCsの関与



(Scanlon S, et al. Cur Opin Immunol 24:1,2012)

アレルギー性気道炎症の免疫学的機序（現在の知見）



さまざまな免疫担当細胞・メディエーター

(土肥眞　2013)

発表概要

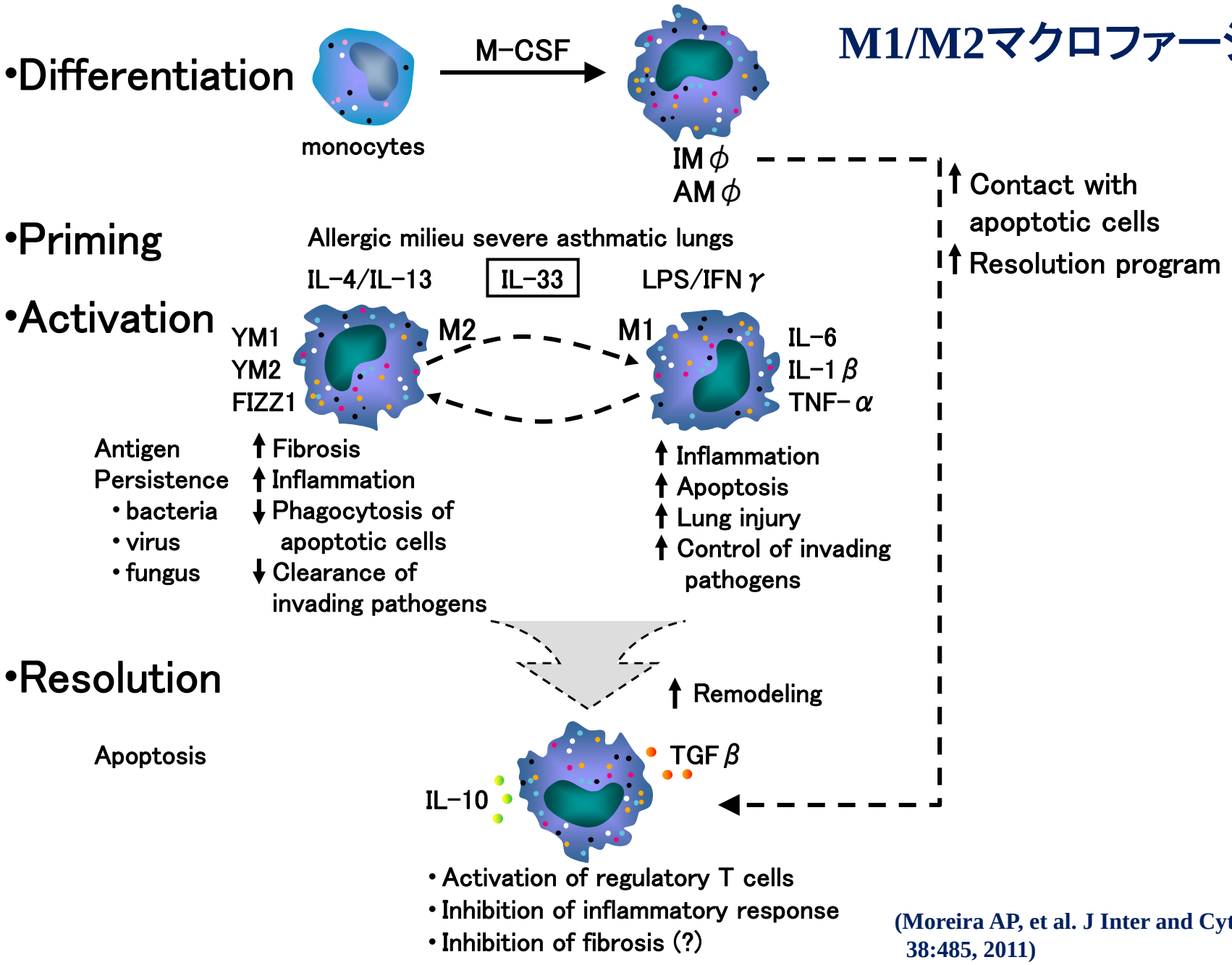
◆ 樹状細胞についての知見の進歩

◆ Innate type lymphoid cells (ILCs)について

◆ マクロファージの可能性

（病態への関与・治療の標的）

M1/M2マクロファージ



(Moreira AP, et al. J Inter and Cyto Res 38:485, 2011)

疑問

マクロファージの機能を制御することで

アレルギー性気道炎症を修飾できるか？

マウスアレルギー性気道炎症モデルにおける
アレンドロン酸の効果を検証

背景 1

近年、スタチンの免疫修飾作用について様々な報告がなされている

McKay A et al. : J Immunol 2004; 172: 2903-8.
Yeh Y et al.: J Biomed Sci 2004; 11: 599-606.
Kim D et al. : Eur J Pharmacol 2007; 557:76-86.
Imamura M et al.: Thorax 2009; 64:44-9.

スタチンは、メバロン酸/コレステロール合成阻害作用を有し、低分子量G蛋白の機能修飾などにより免疫修飾作用を発揮する

一方で、骨粗鬆症の治療薬である、窒素含有ビスフォスフォネート(N-BP)も、同じ代謝経路を阻害する

↓

N-BP も、免疫修飾作用を有する可能性があるのでは？

背景 2

- 一般的に、Bisphoshpnate(BP)は細胞膜の透過性に乏しく、破骨細胞をはじめとした食作用をもつ単球系細胞に選択的に取り込まれて効果を発揮する
- 他の食細胞系であるマクロファージにも効果を発揮する可能性がある。一例としてBPがマクロファージにアポトーシスを誘導するとの報告がある
- これまでBP製剤の骨以外への分布に関する報告は極めて少ないが、窒素含有BPの一つであるalendronateは、経口投与後72時間、気道に血清の4～20倍の濃度で留まるとの報告がある

(Hisaka A, et al. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 13:252, 1998)

仮説:

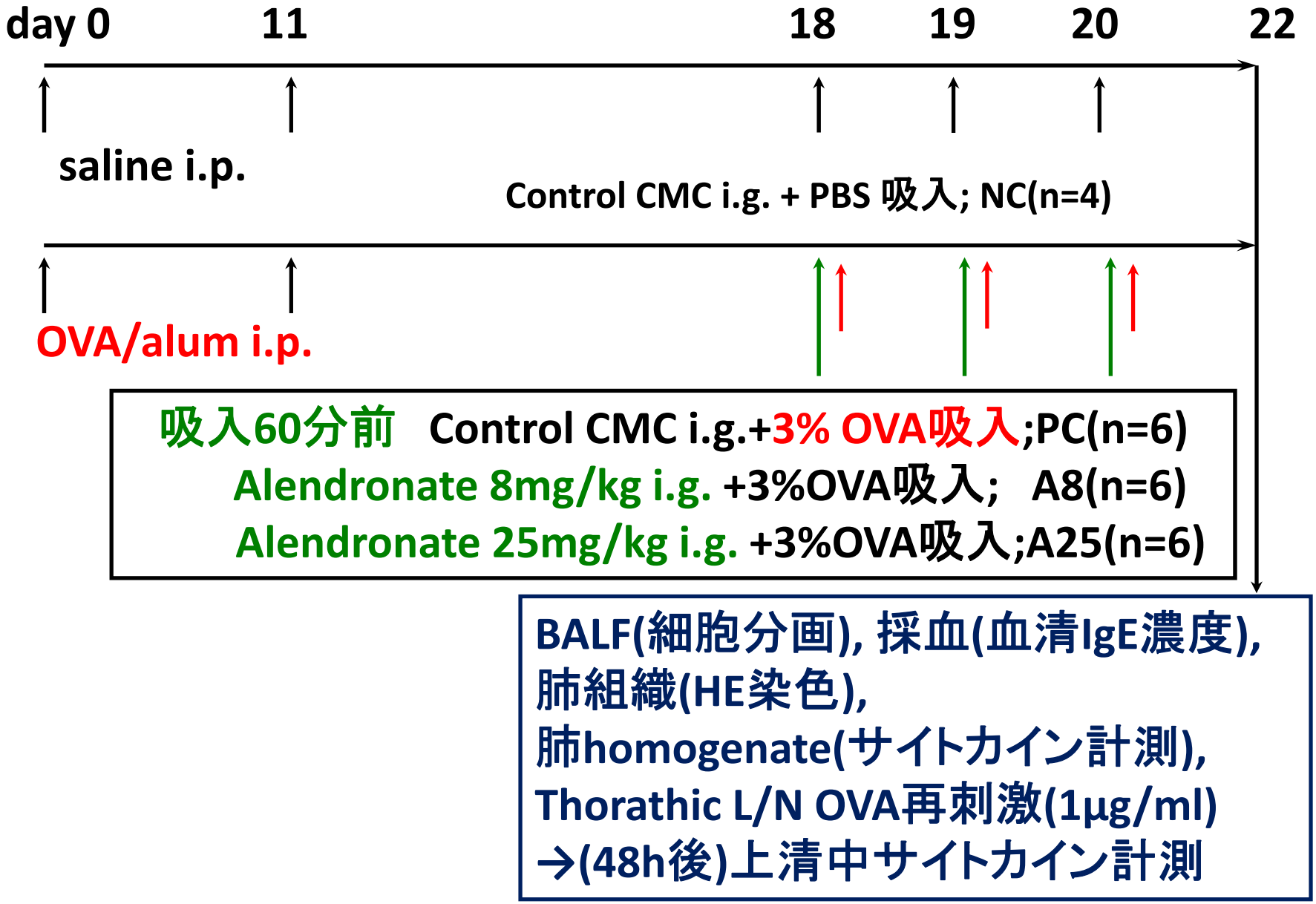
Alendronateは、気道・肺局所のマクロファージの機能に影響を与えることで、アレルギー性気道炎症を修飾する

仮説の検証:

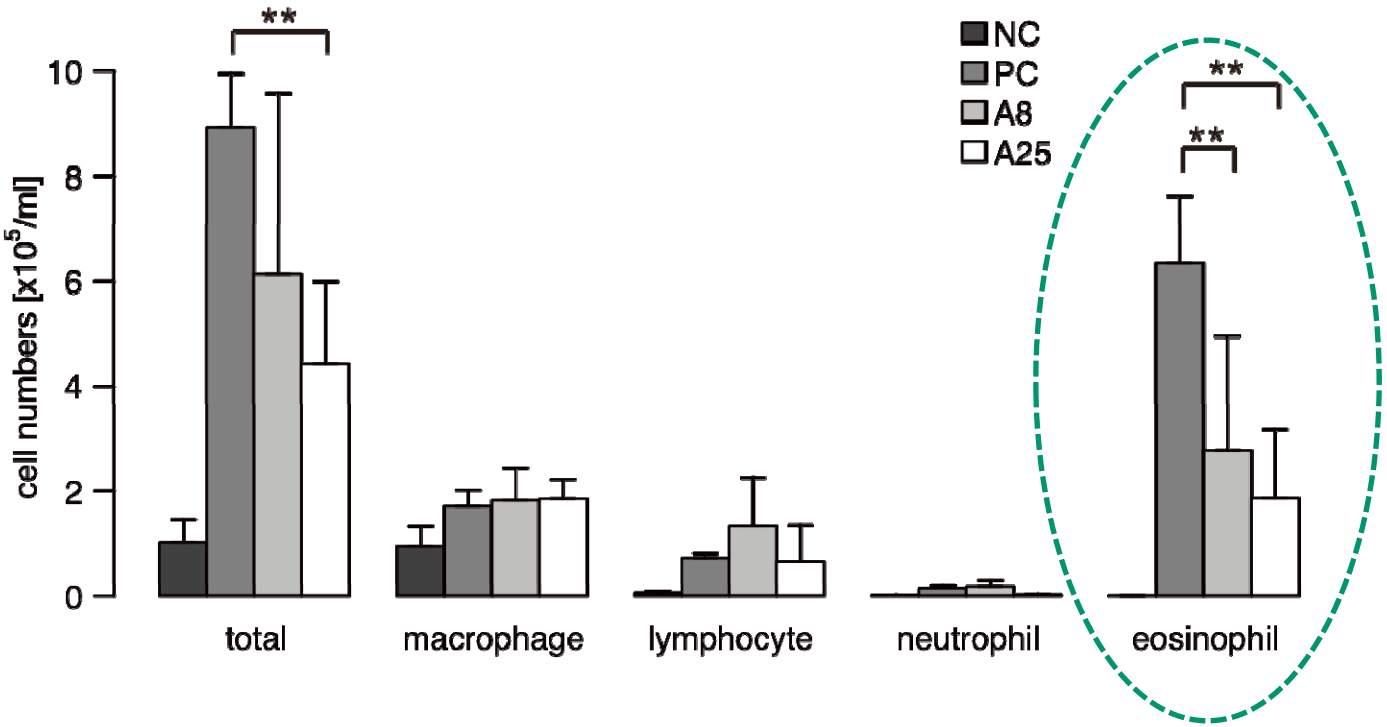
マウスアレルギー性気道炎症モデルを用い、alendronateの及ぼす効果を検証する

<方法>

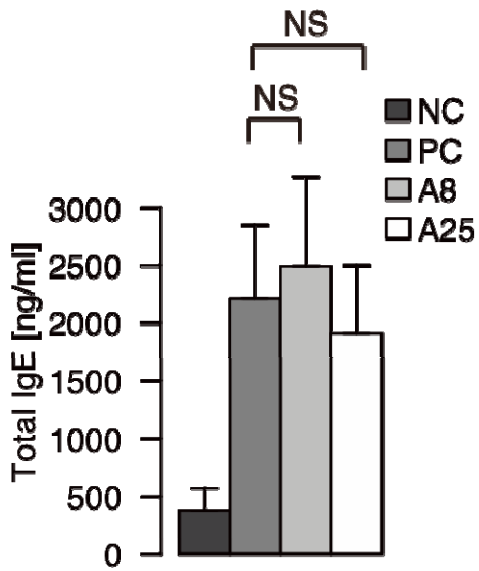
Balb/c, 雄, 7週令, 各群n=4~6



＜BALF中細胞分画＞



<血清総IgE値>

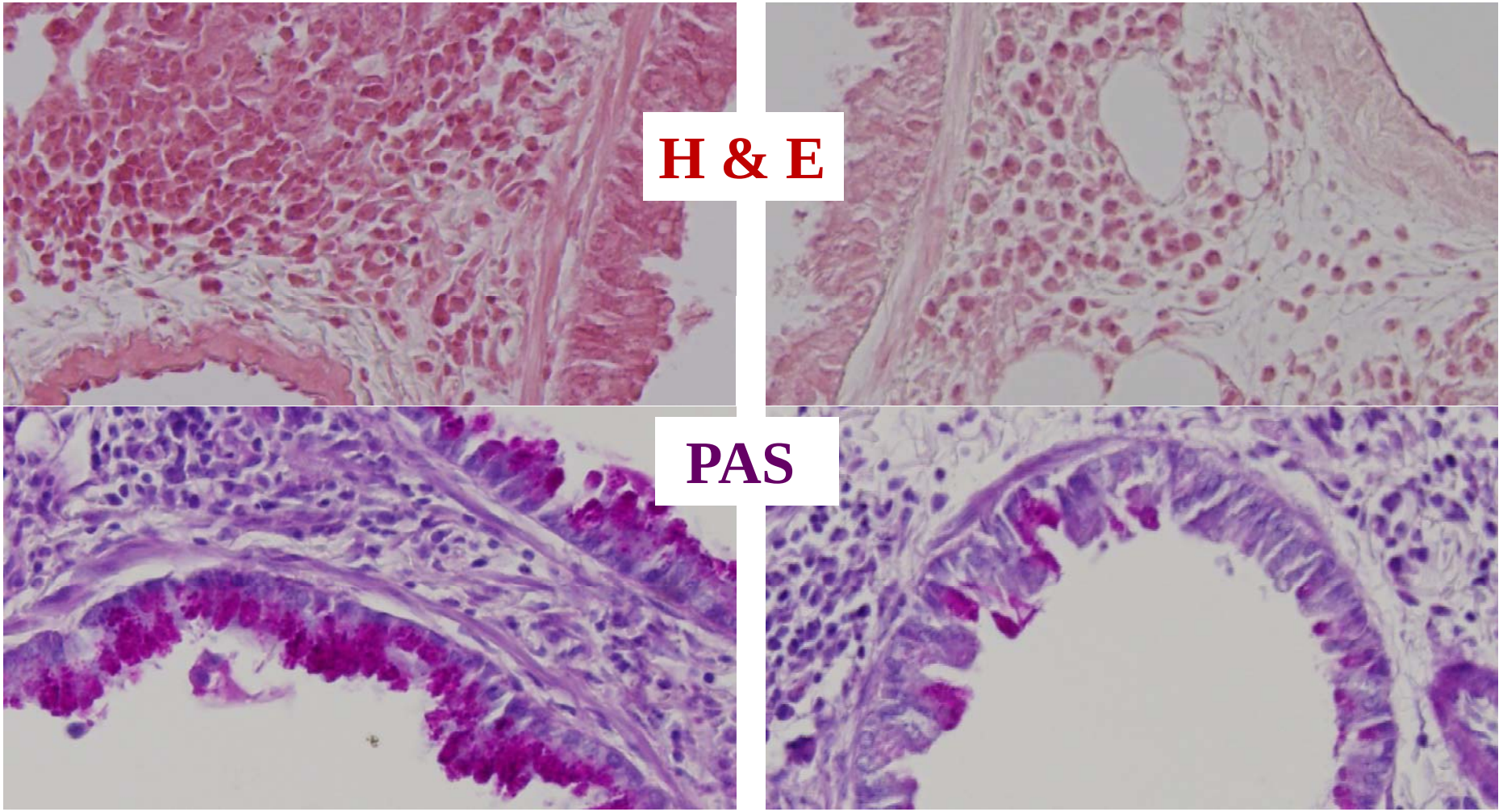


Alendronate投与は、

1. BALF中の好酸球数を抑制した。
2. OVA3日間吸入による、短期間で誘導される血清総IgE値に影響を及ぼさなかった。

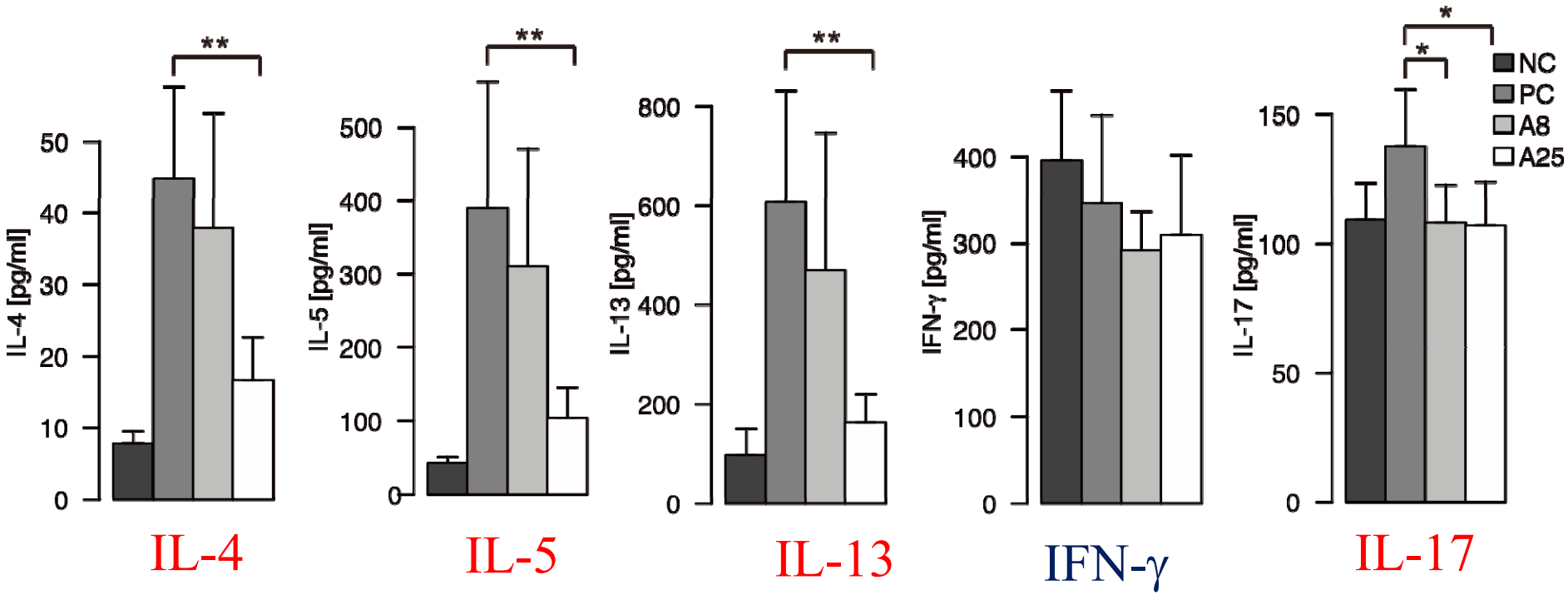
<肺組織>

PC　　Alendronate(A25)



100μm

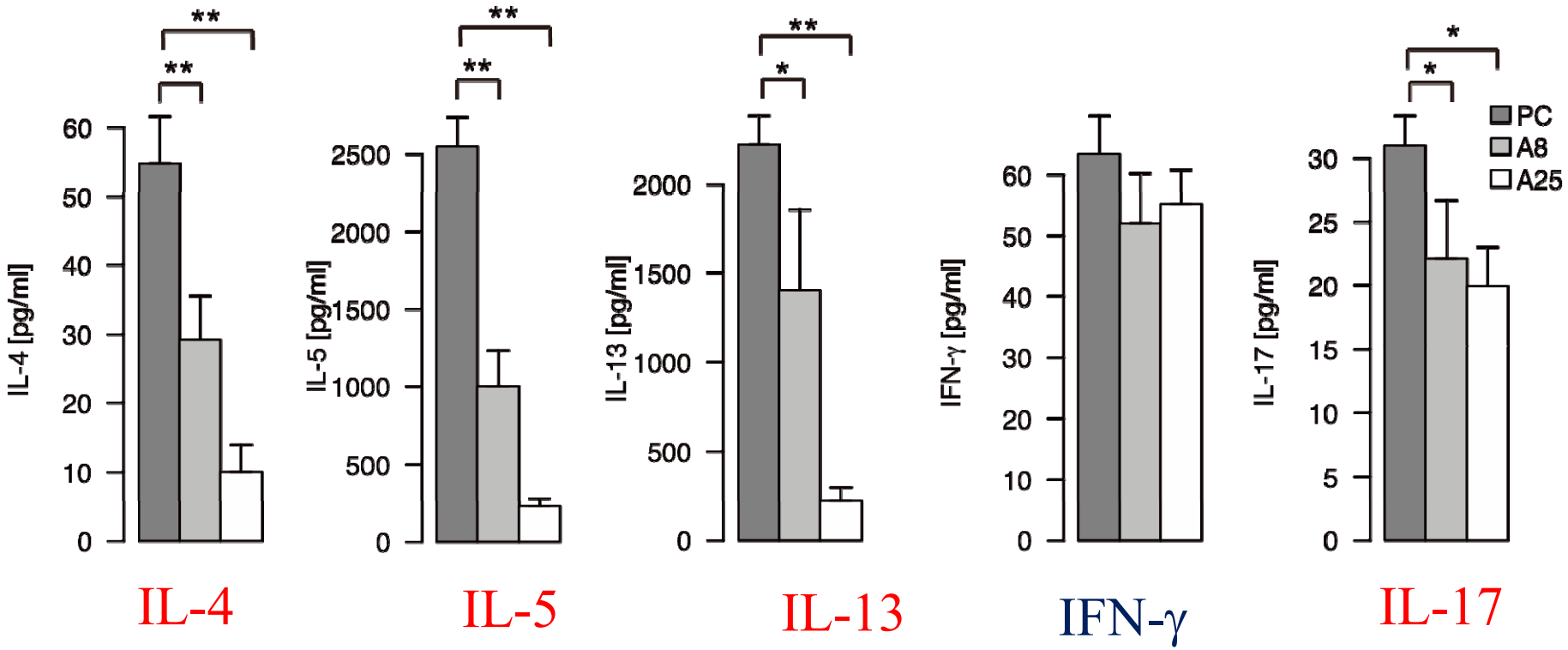
＜肺ホモジネート中サイトカイン濃度＞



Alendronate投与は、肺ホモジネート中の

1. Th2, Th17サイトカイン濃度を抑制した。
2. Th1サイトカイン濃度には、影響を及ぼさなかった。

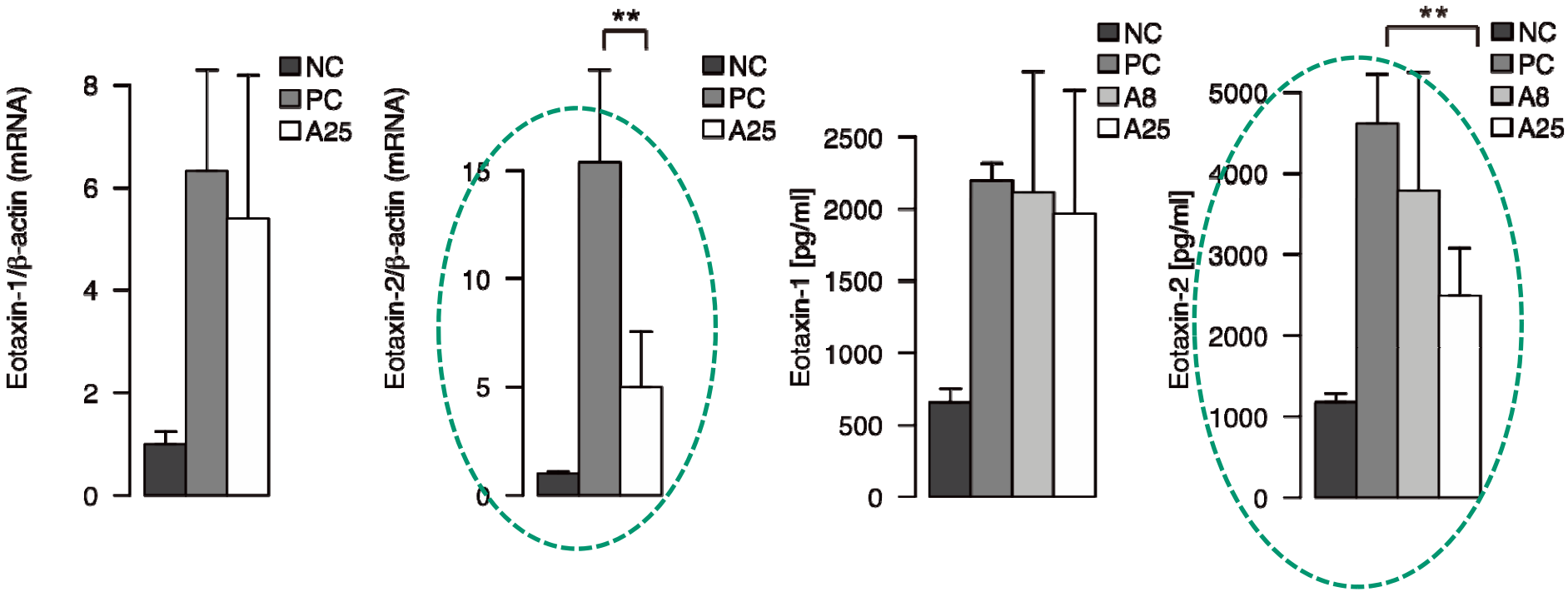
＜リンパ節OVA再刺激後上清中サイトカイン濃度＞



Alendronate投与は、リンパ節OVA再刺激後の

1. Th2, Th17サイトカイン産生を抑制した。
2. Th1サイトカイン濃度には、影響を及ぼさなかった。

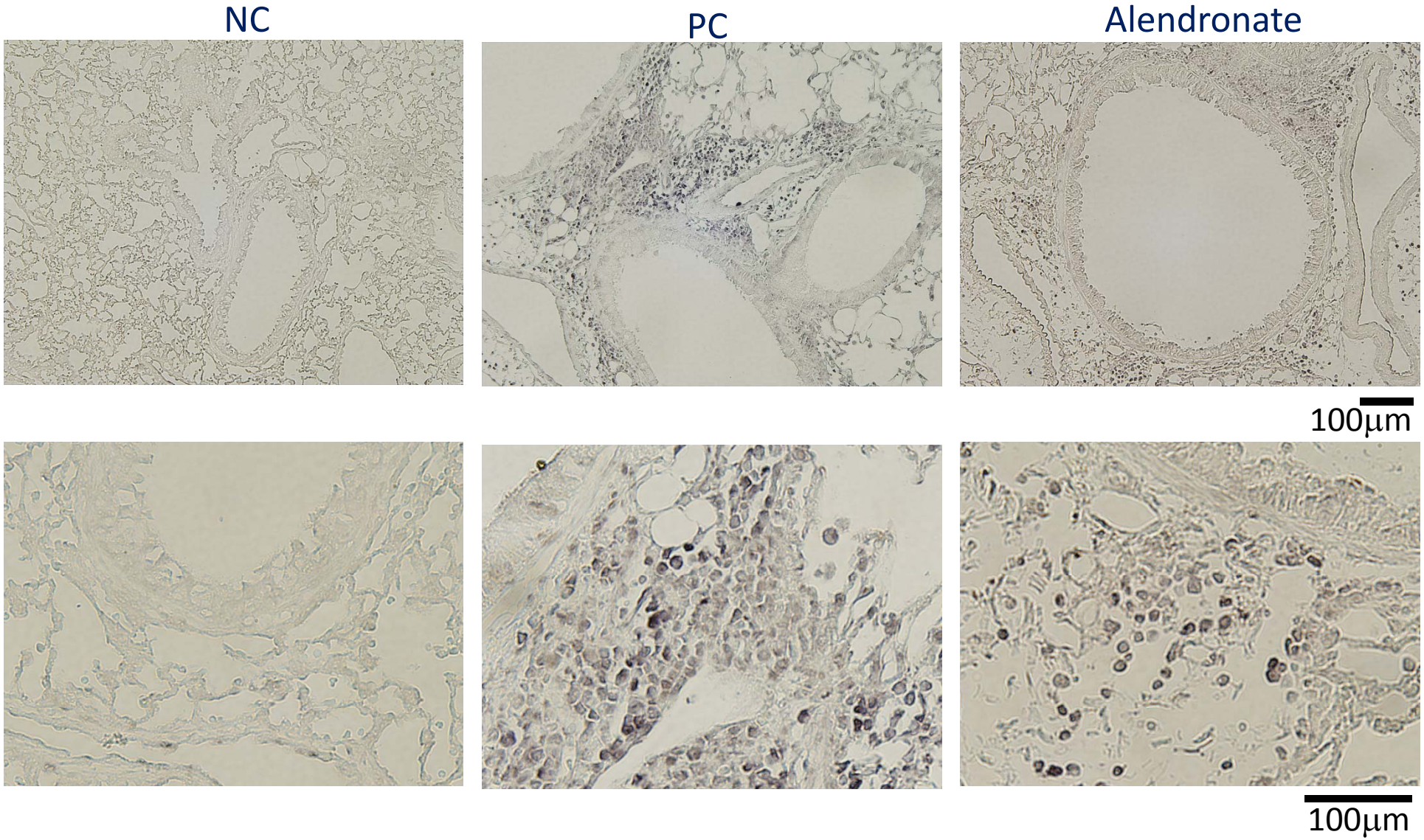
＜肺でのEotaxin-1/2 発現：qPCR, 蛋白濃度＞



Alendronate投与は、肺での

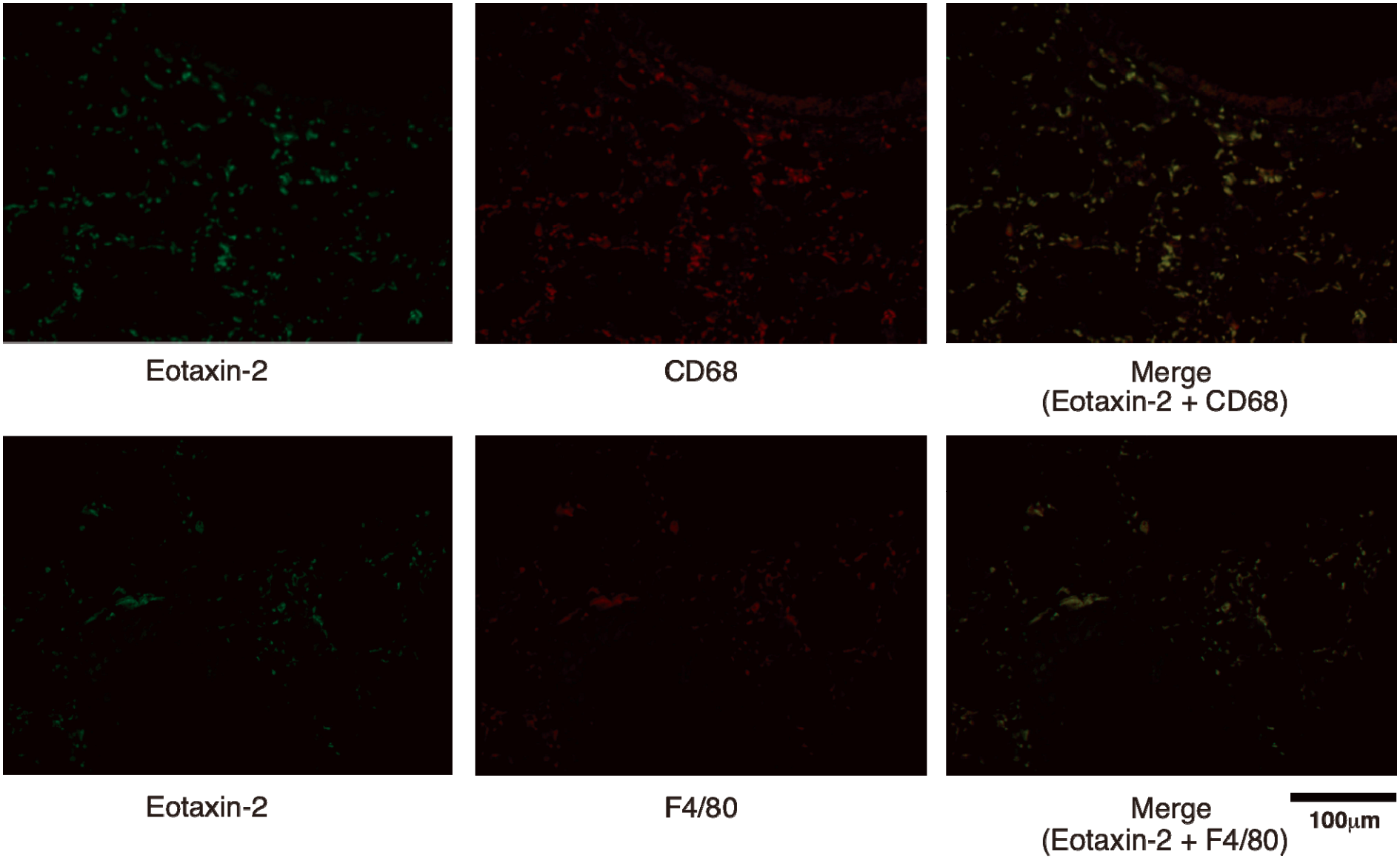
1. Eotaxin-2のmRNA及び蛋白量を抑制した。
2. Eotaxin-1のmRNA及び蛋白量には、影響を及ぼさなかった。

<免疫染色によるEotaxin-2産生細胞の同定>

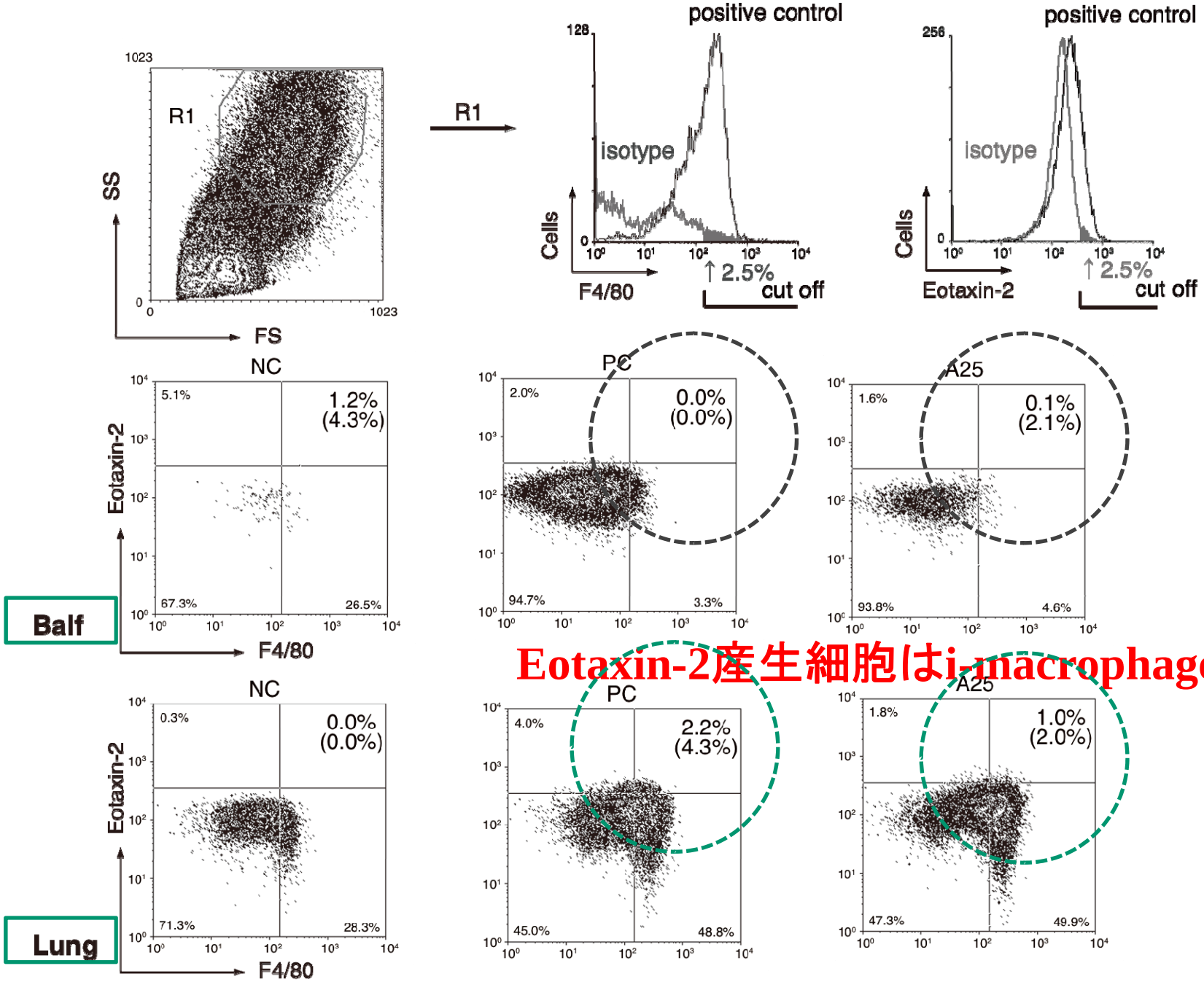


気道周囲・間質に浸潤した炎症細胞からのEotaxin-2産生が示唆された
(DAB-Ni染色。黒がEotaxin-2陽性細胞)

Eotaxin-2の主要な産生細胞は気道周囲・間質のマクロファージである
<免疫蛍光染色>

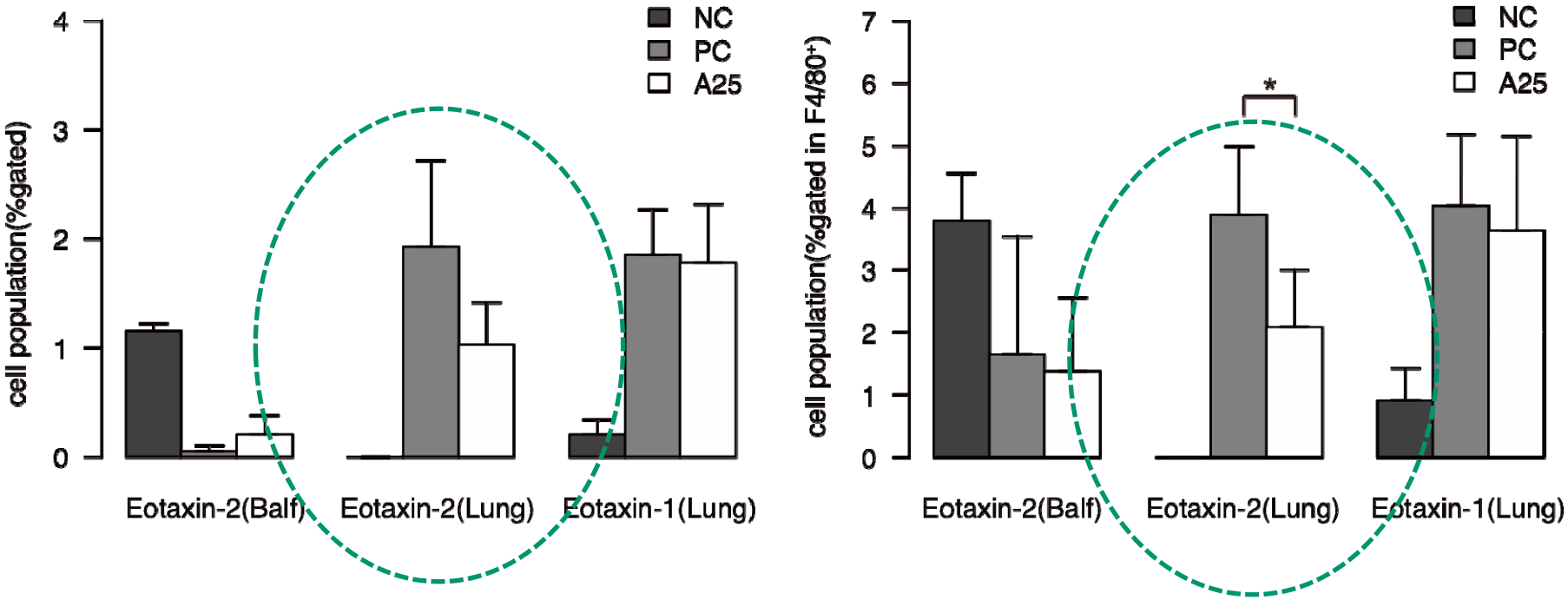


＜FCMでのEotaxin-2産生マクロファージの解析＞



Eotaxin-2産生細胞はi-macrophages?

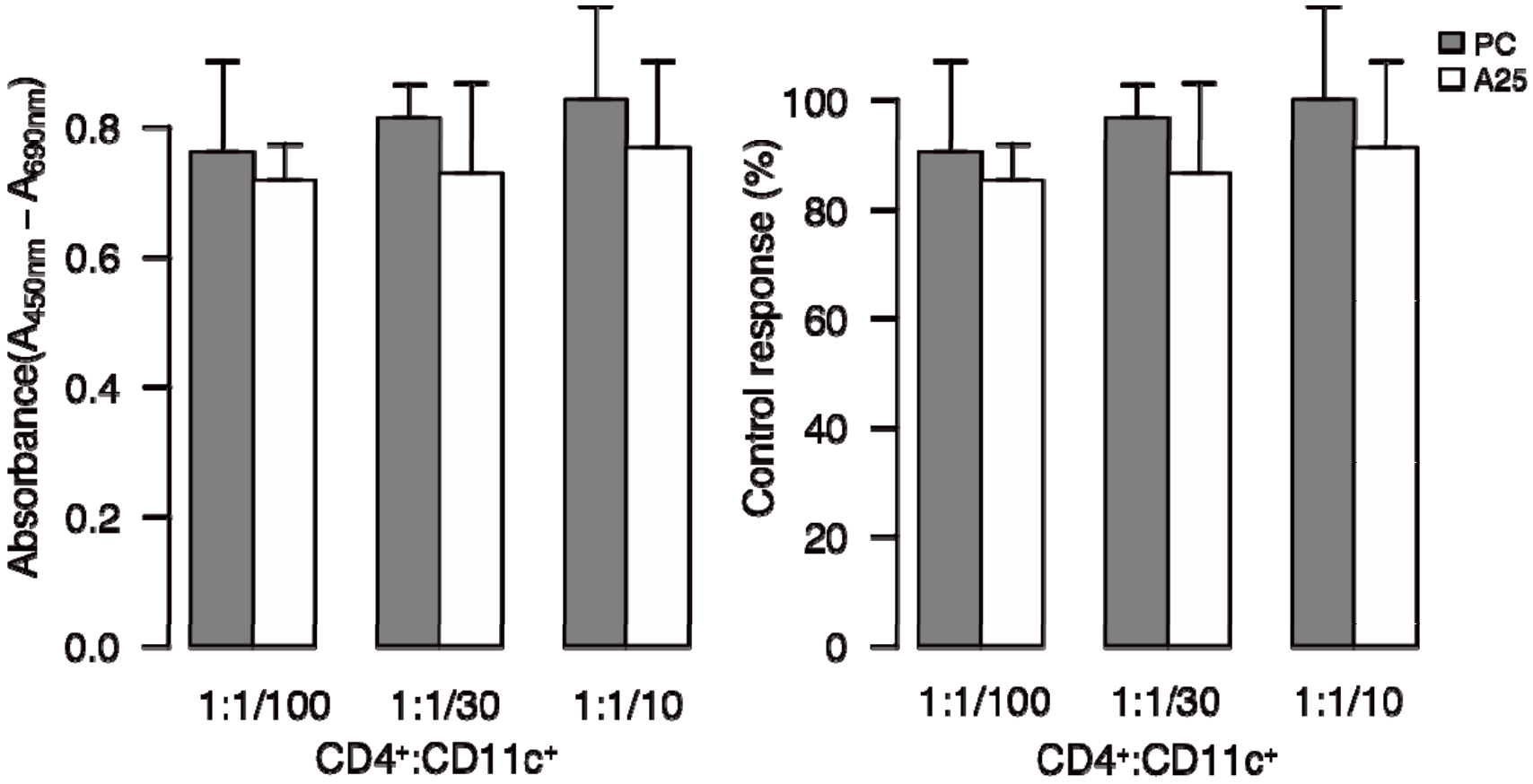
＜FCMでのEotaxin-1/2産生マクロファージの集計＞



Alendronate投与は、

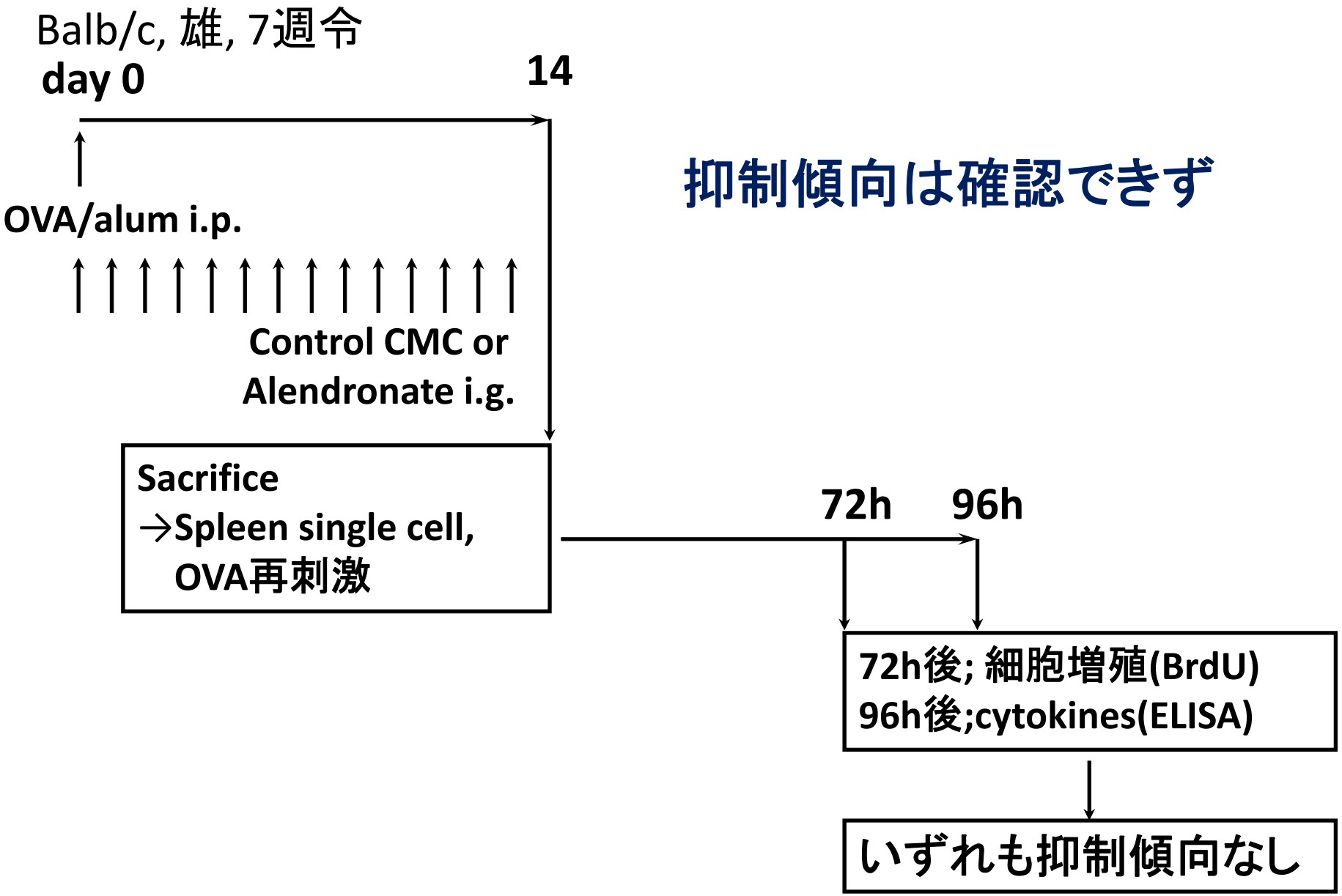
1. Eotaxin-2産生マクロファージの数を抑制した
2. 肺胞マクロファージ(BALF)よりも、肺組織内マクロファージにおけるEotasin-2産生を抑制した
3. Eotaxin-1産生マクロファージへの影響はみられなかった

<肺CD11c⁺細胞の抗原提示能>



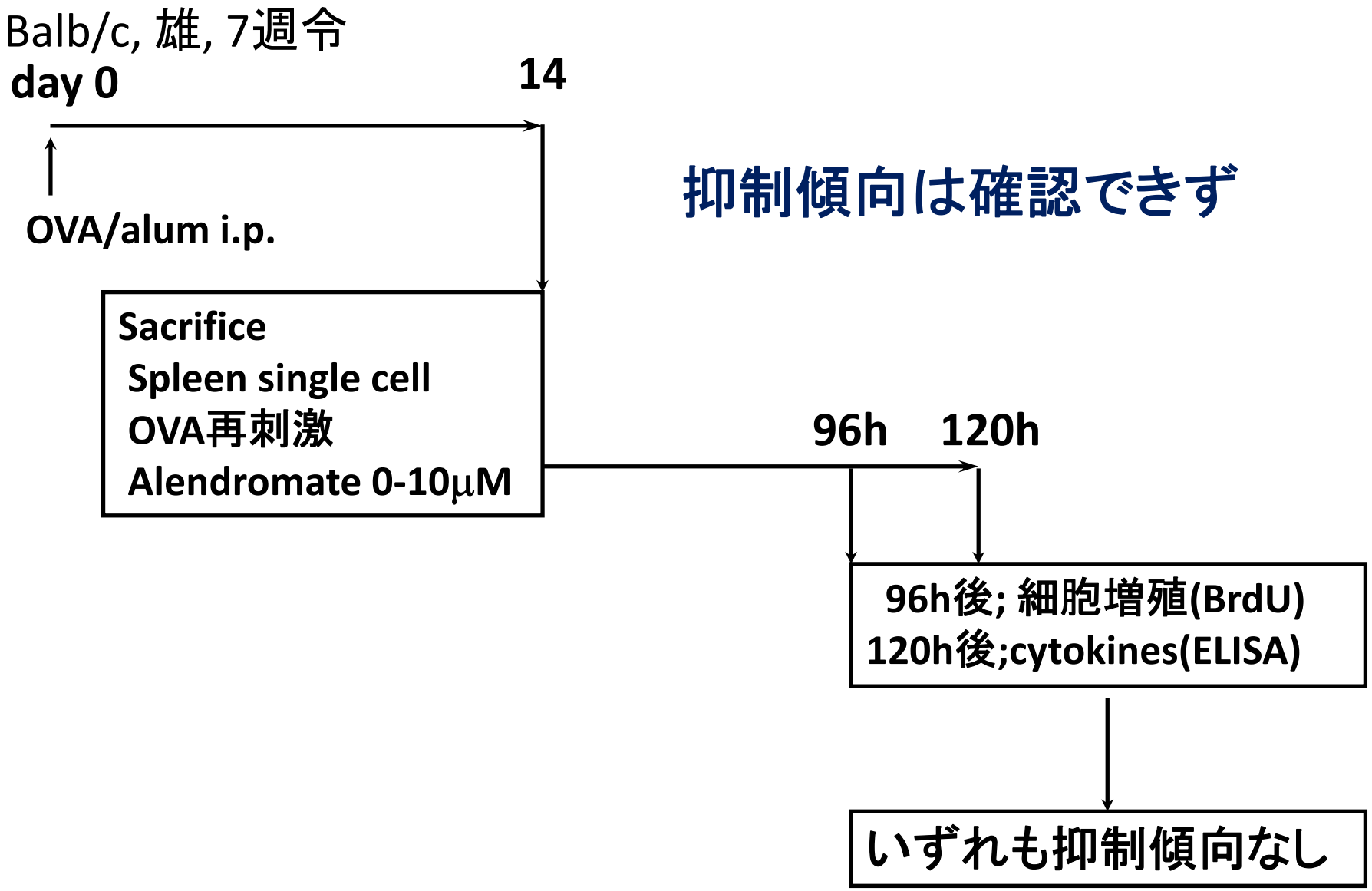
Alendronateは、肺CD11c⁺抗原提示細胞
(主として樹状細胞、一部マクロファージ)の
抗原提示能に有意な影響を与えなかった

<脾細胞を用いた、*ex vivo* でのアレンドロン酸の効果の検討>



抑制傾向は確認できず

<脾細胞を用いた、*in vitro* でのアレンドロン酸の効果の検討>



抑制傾向は確認できず

<結果のまとめ>

アレルギー性気道炎症モデルにおいて、Alendronateの投与により

1. 好酸球性気道炎症が抑制された

2. 肺や胸腔リンパ節でのTh2, Th17サイトカイン産生が抑制された

3. 肺でのEotaxin-2産生抑制が確認された（主要産生細胞はマクロファージ、特に間質マクロファージと考えられた）

4. 肺CD11c^{+}抗原提示細胞（主として樹状細胞）の、抗原提示能に有意な影響を与えなかった

5. Ex vivoおよび、In vitroの脾細胞を用いた系では、Alendronateの免疫修飾作用は確認されなかった

(Sasaki O, et al. J Immunology : under revision)

本検討の意義

- アレルギー性気道炎症に対する効果が人でも実証できれば、骨粗鬆症の予防・治療薬であるALNは高齢喘息に対して治療の効率化や医療経済上の節約効果をもたらすことが期待できる
- マクロファージとその機能を制御することが、アレルギー性気道炎症の治療標的の一つとなりうる可能性が示唆される

結語：病態研究の進歩

- 研究の進歩により、アレルギー性気道炎症に関与する新たな細胞とその意義が次々と明らかにされている
- このことは、アレルギー性気道炎症の病態の複雑さを示すと同時に、新たな視点から治療戦略を開発できる可能性を示している

ご清聴ありがとうございました