

学 位 論 文 題 名

Studies on pathogenic and regulatory mechanisms of
immune-related diseases

(免疫関連疾患の発症および制御機構の解明に関する研究)

学位論文内容の要旨

Background and Objectives Bronchial asthma, typically recognized as helper T (Th) 2 cell-mediated airway inflammation, is pathogenically characterized by airway hyperresponsiveness (AHR), eosinophilic airway inflammation, mucus hyperproduction in airway epithelium, and elevated serum levels of IgE. Numerous chemicals and medicines against immunological cells have been researched and developed for clinical use in asthma. However, patients suffering from asthma occasionally develop severe neutrophilia in the lung and show steroid resistance, which then results in “severe asthma”. It has been reported that neutrophil infiltration in the lung was not observed in Th2 cell-associated airway inflammation models. Thus, the precise mechanisms of severe asthma are less understood compared with those of Th2 cell-mediated airway inflammation. Previously, Th1- and Th2-mediated airway inflammation models were established by the adoptive cell transfer of ovalbumin (OVA)-specific Th1 or Th2 cells followed by OVA inhalation. In contrast to Th2 cells, Th1 cells induce strong AHR concomitantly with neutrophilia in the lung but without mucus hypersecretion. Therefore, the Th1 cell-mediated airway inflammation model appeared to be suitable for characterizing the pathology of severe asthma, since little has been done to elucidate how Th1 cells induce elevation of AHR.

Tachykinins such as substance P (SP) and neurokinin A (NKA) are located in the excitatory non-adrenergic and non-cholinergic (NANC) nerves of the mammalian respiratory tract. Excitation of these nerves results in the release of tachykinins, which may be involved in the pathogenesis of airway allergy in humans. Because those factors are produced in the airway tissues during inflammatory responses, tachykinin receptor antagonists might become good targets for developing therapeutic drugs for the treatment of allergic inflammation. However, the precise role of NKA/neurokinin-2 receptor (NK2R) signaling has not yet been elucidated, though SP signaling through tachykinin neurokinin-1 receptor was demonstrated to be crucial for the induction of neutrophilia in the lung and AHR elevation. Generally, SP secreted by neurons in response to local tissue damage, is capable of inducing and augmenting many inflammatory responses. Recent papers indicated that SP regulated function of various leukocytes. On the other hand, NKA has known to control various vital responses such as airway contraction, vasodilatation, and vascular permeability in human. However the function of NKA on involvement in immune system has less defined than that of SP.

In the present work, we established a novel AHR induction model by intranasal (i.n.) administration of IFN- γ and investigated the critical role of IFN- γ and NKA in Th1 cell-mediated airway inflammation model. Furthermore, we confirmed the effect of NKA/NK2R signaling on immune system.

Methods In order to elucidate the role of IFN- γ , we examined pathogenesis of the Th1 cell-dependent

airway inflammation after treatment with neutralizing mAb against IFN- γ . To determine the precise role of IFN- γ in the elevation of AHR, we directly administered i.n. IFN- γ to wild-type BALB/c mice consecutive 3 days. At 24 h after the IFN- γ administration, pulmonary function was evaluated. To confirm the direct effects of IFN- γ on the airway component cells such as airway smooth muscle cells (ASMCs), we prepared mouse ASMCs from airway tracheal and examined their mRNA levels with IFN- γ stimulations. To investigate whether NK2R-mediated signaling cascade was involved in the subsequent airway responsiveness in vitro and in vivo, we monitored calcium influx (Ca^{2+})_i in ASMCs after the β -methacholine chloride (Mch) stimulation with or without NK2R antagonist and evaluated whether NK2R antagonist inhibited AHR elevation induced by i.n. IFN- γ administration. Next, CD11c-DTR Tg mice were i.n. injected with diphtheria toxin (DT), and then IFN- γ was further injected into the mice to elucidate whether CD11c⁺ cells were related with the elevation of NKA level. To address the effect of neuropeptide signaling on dendritic cell (DC)-mediated immune responses, we further investigated expression levels of NKA and NK2R of GM-CSF-induced bone marrow-derived DCs (BMDCs) in Type-1 immune condition and expression level of cytokines in NKA-stimulated DCs. In order to evaluate NK2R-mediated NKA stimulation on DC functions, we transduced NK2R gene into DCs by retrovirus infection system and evaluated surface MHC class II expression level after NKA stimulation. Then, we co-cultured OT-2 CD4⁺ T cells with Mock- or NK2R-transduced DCs in the presence of OT-2 peptides. To confirm the effect of NKA-NK2R signaling on antigen-specific T cell responses, we cultured spleen cells obtained from OT-2 or OT-1 mice in the presence of NK2R antagonist. Finally, we administrated i.n. NK2R antagonist in Th1 cell-mediated asthma model for evaluating whether inhibition of NK2R signaling reduced IFN- γ -dependent AHR elevation.

Results We found here that Th1 cell-induced AHR elevation was mimicked by i.n. administration of IFN- γ . IFN- γ directly induced NK2R expression and NKA production in the lung. Then, the IFN- γ -induced elevation of AHR was significantly inhibited by specific antagonist of NK2R in our model. We confirmed that one of neurokinin producing cells was CD11c⁺ cells in lung and IFN- γ stimulated BMDC produced NKA. NKA-NK2R signaling cascade activates DC-mediated immune responses in vitro. Finally, we demonstrated that AHR was significantly inhibited by specific antagonist of NK2R in the Th1 cell-mediated airway inflammation model.

Discussion In the present study, we clearly demonstrated that NKA, one of neuropeptides which were generally located in the sensory nerves of mammalian respiratory tract and produced after excitation of the nerves as well as SP, would be involved in the elevation of AHR induced by severe asthma. It might be possible to consider that severe symptoms of patients suffering from severe asthma are due to excess activation of antigen-specific Th1 immunity and subsequent IFN- γ -mediated augmentation of NKA/NK2R signaling, which causes the increase of Ca^{2+} -dependent contraction of airway tracheal smooth muscle cells. Thus, our established IFN- γ -induced airway inflammation model will become a useful tool to elucidate the pathogenesis of severe asthma and to develop therapeutic drugs for IFN- γ -induced inflammatory diseases via NKA/NK2R signaling.

Conclusion Previous reports demonstrated that IFN- γ secreted by Th1 cells was the critical mediator for the induction of AHR, however, the precise mechanism of AHR induction by IFN- γ remained unclear. In the present study, we first established IFN- γ -mediated AHR elevation model, which was induced only i.n. administration of IFN- γ . Then, we found that IFN- γ activated NKA/NK2R signaling cascade, which was important for IFN- γ -induced AHR elevation. Furthermore, we demonstrated that NK2R-dependent neuropeptide signaling enhanced DC function and subsequent T-cell immune responses. Our present findings suggested that NK2R-mediated neuro-immuno cross-talk would be a promising target for developing novel drugs in Th1 cell-mediated chronic inflammation, including severe asthma.

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	瀬 谷 司
副 査	准教授	濱 田 淳 一
副 査	教 授	西 村 孝 司
副 査	教 授	清 野 研一郎

学位論文題名

Studies on pathogenic and regulatory mechanisms of immune-related diseases

(免疫関連疾患の発症および制御機構の解明に関する研究)

好中球浸潤性難治性喘息は、一般的な喘息の治療法であるステロイド投与に対して抵抗性を示すことから、臨床的に大きな問題となっている。本研究は、好中球浸潤性難治性喘息の動物モデルとして過去に報告がなされていた Th1 免疫依存的気道炎症モデルにおける病態制御機構の一端を解明したものである。

申請者は、IFN- γ 中和抗体を用いた検討から、Th1 細胞依存的気道炎症モデルにおける気道過敏性亢進には細胞浸潤や炎症ではなく IFN- γ の直接的な働きが重要であることを見出した。さらに IFN- γ を鼻腔内投与することにより、細胞浸潤などをほとんど引き起こすことなく、気道過敏性亢進を引き起こすモデルを作出した。また、IFN- γ 投与によって、肺胞洗浄液中の NKA の産生や、肺組織における NK2R の発現上昇が引き起こされることを証明し、IFN- γ による気道過敏性亢進に NKA/NK2R シグナルが関与している可能性を示唆した。さらに培養気道平滑筋細胞を IFN- γ で刺激することにより NK2R の発現上昇が引き起こされることを明らかとした。また NK2R selective antagonist によって、培養平滑筋細胞の methacholine による Ca^{2+} influx や IFN- γ による気道過敏性亢進が抑制されることから、NKA/NK2R シグナルが Th1 免疫依存的気道炎症モデルにおける気道過敏性亢進に関与することを証明した。

また、CD11c-DTRTg マウスを用いた検討と、BMDC を用いた系から、樹状細胞が IFN- γ 投与における NKA 産生細胞の一つであることを見出した。さらに、BMDC が NK2R を発現し、その発現が IFN- γ や LPS の刺激によって増加すること、BMDC に NK2R からの刺激が入ることによって type I interferon や IL-12 の mRNA 量、MHC classII の発現が上昇することを明らかとした。さらに、NKA/NK2R シグナルによって Th1 免疫の活性化が引き起こされることを証明した。最後に、NK2R からのシグナルの阻害は Th1 免疫依存的気道炎症モデルにおける気道過敏性亢進を有意に抑制することから、このモデルにおける気道過敏性亢進に NKA/NK2R シグナルを紹介

た制御機構が存在することを明らかとした。

審査会において副査である浜田淳一准教授より、今回のモデルにおける好中球浸潤のメカニズムについての質問を受け、IFN- γ や Th1 免疫と関連して産生される好中球ケモカインについて述べた。また、NK2R と Th2 型喘息との関与についての質問に対して、NK2R antagonist を用いた Th2 細胞依存的喘息モデルの治療に関する報告について述べた。さら、NK2R 阻害の標的細胞についての質問を受け、QOL や炎症増悪の観点を踏まえた意見を述べた。

次に副査である清野研一郎教授から免疫染色と PCR の結果の矛盾点についての質問を受け、PCR のサイクル数について説明した。さらに、Th1 免疫が関与する喘息の割合や、喘息の重症例と Th1 免疫との関与についての質問を受け、臨床の報告や動物モデルを用いた最近の知見を説明し、推察を述べた。また、Th1 依存的気道炎症モデルと IgE などとの関連について質問を受け、本モデルにおいて IgE の産生が認められないことから、IgE は関与しない可能性が高い旨を説明した。

次に主査である瀬谷司教授より、本研究で作出した気道炎症モデルの新規性についての質問を受け、最近の報告を述べるとともに、本モデルの新規性や、制御機構解明に関する新規性について述べた。NK2R からのシグナルが Th1 細胞の活性化にどのように関わるかについて質問を受け、NK2R 下流のシグナル機構と、それらのシグナルから引き起こされる Th1 細胞活性化機序についての知見を述べた。また、NK2R の発現上昇と気道過敏性の関与について質問を受け、NK2R と気道収縮との関与についての知見について述べた。さらに、気道過敏性における NK2R からのシグナルの依存性について質問を受け、NK2R antagonist 投与の系の結果を踏まえ NK2R 以外のシグナルが関与する可能性を述べた。

最後に、副査の西村孝司教授より、strain difference についての質問を受け、C57BL/6 マウスでは Th1 や IFN- γ による気道過敏性が引き起こされない旨について説明した。また、医薬品開発への展望について質問を受け、IFN- γ 鼻腔内投与の系や平滑筋の Ca^{2+} influx の系を用いたスクリーニング系の可能性について述べた。最後に、治療の標的として受容体カリガンドのどちらを標的にするのかについてと、神経系の受容体などを標的とした際の危険性についての質問に対して、受容体の発現の限局性から得られる受容体阻害の安全性についての知見をのべ、副作用の報告などから投与に注意が必要である旨を述べた。

この論文は、好中球浸潤性難治性喘息の制御機構の解明や新しい治療ターゲットの発見につながる新たな動物モデルの作出と、本モデルを使用した実験により神経ペプチドシグナルが免疫系の活性化に関与することを明らかにしており、今後はこの基礎研究をさらに発展させることにより、創薬ターゲットの探索や臨床的な応用が期待されるものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を取得するのに十分な資格を有するものと判定した。