

抗原誘発性Th1・Th2サイトカイン産生に対する性ホルモンの影響の性差

今村 幸恵, 久保田智子, 高梨加奈子, 森 聡恵, 吉田 良太, 和田 佳奈,
奥山 香織*, 高柳 元明, 大野 勲

The effect of sex hormone on antigen-induced Th1/Th2 cytokine production

Yukie IMAMURA, Tomoko KUBOTA, Kanako TAKANASHI, Satoe MORI, Ryota YOHSHIDA, Kana WADA,
Kaori OKUYAMA, Motoaki TAKAYANAGI, and Isao OHNO

(Received November 21, 2006)

The incidence, severity and prognosis of asthma can be affected by a number of factors, including the patient's age and sex. Clinical observations and epidemiologic studies indicate that the prevalence and severity of asthma is higher among boys than girls, but that the ratio inverts after puberty. The reversal of the male/female prevalence of asthma at puberty strongly suggests a role of sex hormones. However, the mechanisms underlying the gender differences in the prevalence of asthma are not clear. Recently, we suggested that the sex differences were due to those in not only sex hormones but also lymphocyte functions based on findings in a murine model of allergic asthma. Therefore, we investigated the effect of sex hormones on antigen-induced cytokine production by lymphocytes to further investigate these gender differences. Splenocytes from ovalbumin (OVA)-sensitized female mice produced more IL-5, Th2 cytokine, than those from OVA-sensitized male mice, upon simulation with OVA. Progesterone decreased the production of IFN- γ , Th1 cytokine, by splenocytes from both sensitized male and female mice. 17 β -estradiol had no effect on Th1 and Th2 cytokine production by splenocytes from both mice. However, 5 α -dihydrotestosterone decreased the production of Th2 cytokines by splenocytes from sensitized female mice but not these from male mice. Our findings suggest that lymphocytes from males and females have different sensitivities to sex hormones in antigen-induced cytokine production.

Key words — asthma, gender difference, sex hormone, lymphocyte, Th2 cytokine

緒 言

気管支喘息は、気道の慢性炎症性疾患である。気道炎症は急性の気管支収縮、気道壁の腫脹、慢性的な粘液栓形成、気道壁のリモデリングからなる4つ形態の気流制限を引き起こす。気道炎症には、気道粘膜および気道内腔において活性化した好酸球、マスト細胞、マクロファージおよびTリンパ球の増加が関与する。また、炎症の悪化による気道過敏性の亢進を伴う¹⁾。ヘルパーT細胞に

は、1型(Th1)と2型(Th2)がある。Th1リンパ球は、主にインターロイキン(IL)-2とインターフェロン(IFN)- γ を分泌し、他のT細胞やマクロファージの活性化と補充の働きをする。Th2リンパ球は、Bリンパ球による抗体産生や好酸球の増殖・分化を促進するサイトカインであるIL-4, IL-5, IL-10, IL-13を分泌する^{2,3)}。アレルギー性炎症は、Th1とTh2のバランスが崩れ、Th2が優位になることにより引き起こされると考えられている⁴⁾。

疫学的には, 気管支喘息の症状は男性では幼年期に始まり, 思春期に消失する傾向があるのに対し, 女性では思春期以降の発症が多い. 重症度の目安となる入院率でも0歳から10歳で男性は女性の約2倍であるが, 10代では徐々に女性の率が高くなり, 20歳以上では女性が男性の約3倍となる. 喘息女性の3分の1が月経前で喘息症状の悪化を示す. 妊娠中には喘息症状が悪化する傾向にあるが, 妊娠後期では改善するという報告がある⁵⁾. 更年期になると喘息既往者では喘息症状が悪化し, 健常者でも喘息が発症するという報告もある⁵⁾. Estrogen 補充療法では喘息の発症リスクを増大させる⁵⁾. このようなことから, 喘息における罹患率や重症度の性差の原因のひとつとして性ホルモンの影響が示唆されている. しかし, その詳細なメカニズムは不明である.

性ホルモン受容体は様々な細胞に広く発現しており, Tリンパ球を含めた炎症細胞でも存在が認められる. Th細胞には androgen 受容体と estrogen 受容体, progesterone 受容体が存在することが確認されている^{3,6,7)}. また, アレルギー性結膜炎患者の粘膜で estrogen 受容体と progesterone 受容体の過剰発現が見られ⁵⁾, アレルギー性疾患と性ホルモン受容体の関連も示唆されている. 性ホルモンによる Th1/Th2 反応の調節として, 抗原特異的あるいは非特異的に刺激されたマウス脾臓由来 T 細胞からの Th2 サイトカイン産生を 5α -dihydrotestosterone (DHT) は抑制し⁸⁾, 17β -estradiol (E2)⁹⁾ や progesterone¹⁰⁾ は促進することが報告されている. 喘息モデルマウスでは, 抗原吸入後, 雄に比べ雌で気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好酸球数の著しい増加が見られるが¹¹⁾, 去勢した雄マウス¹²⁾ や progesterone を投与された雄マウス¹³⁾ では BALF 中の IL-5 や好酸球数の増加, 気道過敏性の亢進が認められた. このように, 性ホルモンがサイトカイン発現や, アレルギー性気道炎症に影響を与えることが示されている. 一方で, リンパ球の機能そのものに性差があり, 非特異的的刺激によるサイトカイン発現でみると, 女性では男性に比べ Th2 反応が Th1 反応より優位であることが報告されている²⁾.

以上のことから, 喘息における性差は, 抗原特

異的な Th1, Th2 サイトカイン産生に対する性ホルモンの影響が雄リンパ球と雌リンパ球との間で異なることによると考えた. そこで我々はこの仮説を検証するために雌雄の感作マウスの脾細胞を種々の濃度の性ホルモンの存在下で特異抗原によって刺激し, Th1 および Th2 サイトカイン産生を比較した.

実験材料および方法

1. 使用動物

6~8週齢の C57BL/6 系雄性および雌性マウス (日本クレア, 大阪, 日本) を使用した. 動物は実験に使用するまで明暗サイクル12時間 (明期 7:00~19:00, 暗期 19:00~7:00) 室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の一定環境下で1週間以上飼育した. なお, 動物には滅菌済みのマウス用固形飼料および滅菌済みの水道水を自由に摂取させた. 実験は東北薬科大学動物実験指針に従って行った.

2. 抗原感作

実験は, Kumagai ら¹⁴⁾ の報告に従って行った. 抗原として, 卵白アルブミン (OVA) (Grade V, Sigma, St. Louis, MO, USA) を用い, OVA/Alum (OVA $16 \mu\text{g/ml}$, $\text{Al}(\text{OH})_3$ 8 mg/ml in saline) (和光純薬, 大阪, 日本) $500 \mu\text{L}$ の腹腔内投与にて感作した. 投与は5日間隔で2回行った (Fig. 1A).

3. 脾臓細胞の培養

2回目の OVA/Alum 投与12日後, マウスを脱血死させ脾臓を採取し, 脾臓細胞を Wise ら¹⁵⁾ の方法によって分離および培養した. 洗浄した脾臓細胞を RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) [非働化した10% fetal bovine serum (ICN, Costa Mesa, CA, USA), $55 \mu\text{M}$ 2-mercaptoethanol (和光), 50 U/ml penicillin G (明治製薬, 東京, 日本), $50 \mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate (明治製薬) および 2 mM L-glutamine (和光) を含む] を用いて 5×10^6 cells/ml に懸濁した. これに OVA ($200 \mu\text{g/ml}$) を添加し, 96 well プレートに 1×10^6 cells/well になるように蒔き, $5\% \text{ CO}_2$ 存在下 37°C で培養した. 性ホルモンの添加と培養上清の採取

は以下の方法で行った (Fig. 1B).

- ① 17β -estradiol (E2) (10^{-9} M) (Sigma) を OVA 添加1時間前あるいは OVA と同時に添加し, 72 時間後に培養上清を採取した.
- ② E2 ($10^{-11} \sim 10^{-7}$ M), progesterone ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ M) (Sigma) あるいは 5α -dihydrotestosterone (DHT) ($10^{-11} \sim 10^{-8}$ M) (和光純薬) を OVA と同時に添加し, 72 時間後に培養上清を採取した.

なお, 性ホルモン非添加群には ethanol (最終濃度 0.05 %) を添加した. 採取した培養上清は, サイトカイン測定まで -80°C で保存した.

4. サイトカインの測定

培養上清中の IL-4, IL-5, IL-13 および IFN- γ は, それぞれ ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて付属プロトコールに従い測定した. なお, それぞれの測定範囲は, IL-4 が $2 \sim 500$ pg/ml,

IL-5 が $7 \sim 1000$ pg/ml, IL-13 が $1.5 \sim 1000$ pg/ml, IFN- γ が $2 \sim 1000$ pg/ml である.

5. 統計処理

棄却検定はスミルノフの棄却検定を用いた. データは mean \pm SD で表した. Mann-Whitney の U 検定で統計処理し, $P < 0.05$ を有意差ありとした. 多群間の比較は一元配置分散分析法の Dunnett 法により統計処理し, $P < 0.05$ を有意差ありとした.

結 果

1. サイトカイン産生における性差

脾細胞上清中の IL-5 量は, 雌の方が雄に比較して高値を示した. IL-4, IL-13 および IFN- γ 量に雌雄差はなかった. また, IFN- γ /IL-4 においても雌雄差はなかった (Table 1). 雌脾細胞培養上清中の IL-4 および IFN- γ 量を E2 添加, 非添加で比較

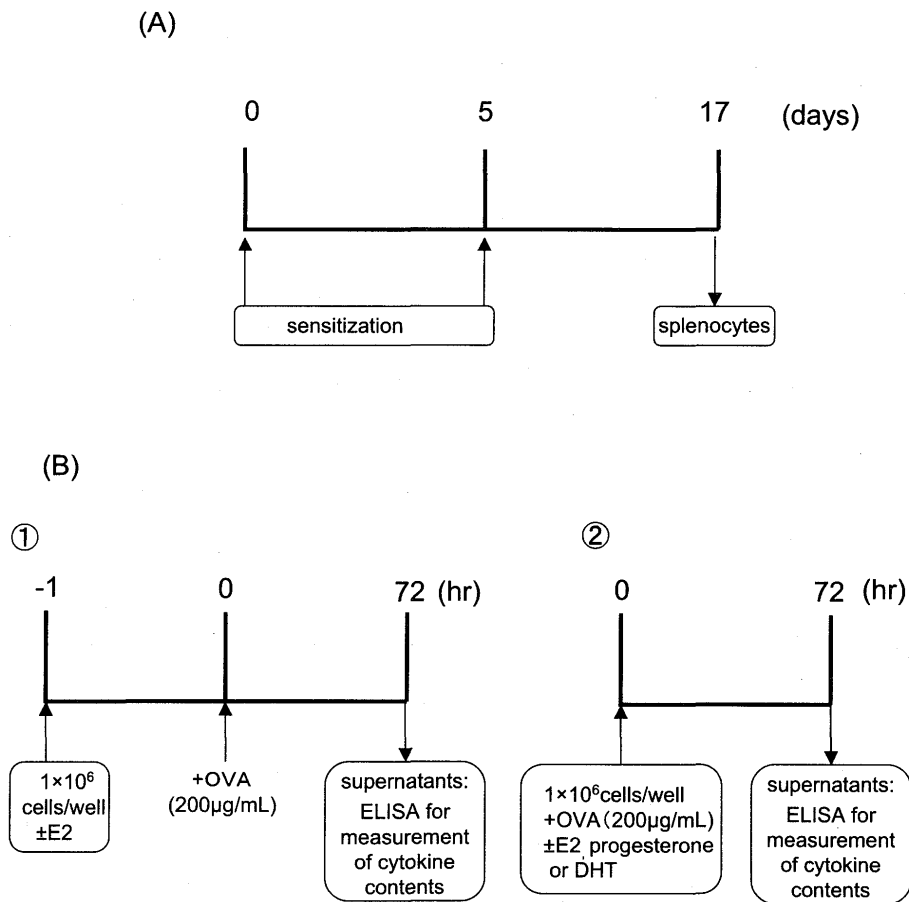


Fig. 1 Diagrammatic representation of the protocols for sensitization (A), and culture of splenocytes (B).

したところ, OVA 添加1時間前, あるいはOVAと同時に添加しても非添加群と有意な差は見られなかった (Table 2).

2. サイトカイン産生に対するE2の影響

IL-4ではE2添加による有意な変化は雌雄共どの濃度でも見られなかった (Fig. 2a). IL-5では 10^{-7} MのE2添加で非添加群と比べて雌で有意に低下した (Fig. 2b). IL-13では 10^{-9} MのE2添加で非添加群と比べて雄で有意に低下した (Fig. 2c). IFN- γ では 10^{-8} MのE2添加で非添加群と比べて雄で有意に増加した (Fig. 2d). IFN- γ /IL-4では, 10^{-11} , 10^{-10} MのE2添加により非添加群と比べて雄で有意に低下した (Fig. 5a).

3. サイトカイン産生に対するprogesteroneの影響

脾細胞培養72時間後の上清中のサイトカイン量は, IL-4では 10^{-6} Mのprogesterone添加で非添加群と比べて雄で有意に増加した (Fig. 3a). IL-5では 10^{-9} Mのprogesterone添加で非添加群と比べて雄で有意に増加し, 雌で有意に低下した (Fig. 3b). IL-13では 10^{-9} Mのprogesterone添加で非添加群と比べて雄で有意に増加した. また, 10^{-6} Mの

progesterone添加で非添加群と比べて雌で有意に低下した (Fig. 3c). IFN- γ では 10^{-9} ~ 10^{-6} Mのprogesterone添加で非添加群と比べて雄で有意に低下した. また, 10^{-6} Mのprogesterone添加で非添加群と比べて雌で有意に低下した (Fig. 3d). IFN- γ /IL-4では 10^{-7} , 10^{-6} Mのprogesterone添加で非添加群と比べて雌雄共に有意に低下した (Fig. 5b).

4. サイトカイン産生に対するDHTの影響

脾細胞培養72時間後の上清中のサイトカイン量は, IL-4では 10^{-9} , 10^{-8} MのDHT添加で非添加群に比べて雌で有意に低下した (Fig. 4a). IL-5では 10^{-8} MのDHT添加で非添加群に比べて雌で有意に低下した (Fig. 4b). IL-13では 10^{-9} MのDHT添加で非添加群に比べて雄で有意に低下した. また, 10^{-10} ~ 10^{-8} MのDHT添加で非添加群に比べて雌で有意に低下した (Fig. 4c). IFN- γ では 10^{-11} MのDHT添加で非添加群に比べて雌で有意に増加した (Fig. 4d). IFN- γ /IL-4ではDHT添加による有意な変化は雌雄共にどの濃度でも見られなかった (Fig. 5c).

Table 1. Concentrations of Th1 and Th2 cytokines production by splenocytes without sex hormones.

	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IFN- γ /IL-4
male	19.0 \pm 10.9	538.9 \pm 389.4	2896.9 \pm 2184.2	2571.0 \pm 2495.4	136.0 \pm 130.1
female	22.8 \pm 15.3	922.6 \pm 568.6*	4218.3 \pm 2725.7	1410.9 \pm 1129.3	93.3 \pm 105.5

*p < 0.05 compared with male

mean \pm SD (n=16-19)

Table 2. The effect of E2 pre-treatment on cytokine production.

E2 (M)	IL-4 (pg/mL)		IFN- γ (pg/mL)	
	-1 #	0 ##	-1 #	0 ##
0	21.3 \pm 10.2	24.1 \pm 21.1	713.4 \pm 303.2	591.3 \pm 463.8
10^{-9}	18.0 \pm 3.0	28.9 \pm 23.0	1044.0 \pm 325.5	880.2 \pm 419.5

Addition of E2 1hr before the start of OVA stimulation.

Addition of E2 at the same time as the start of OVA stimulation.

mean \pm SD (n=3-4)

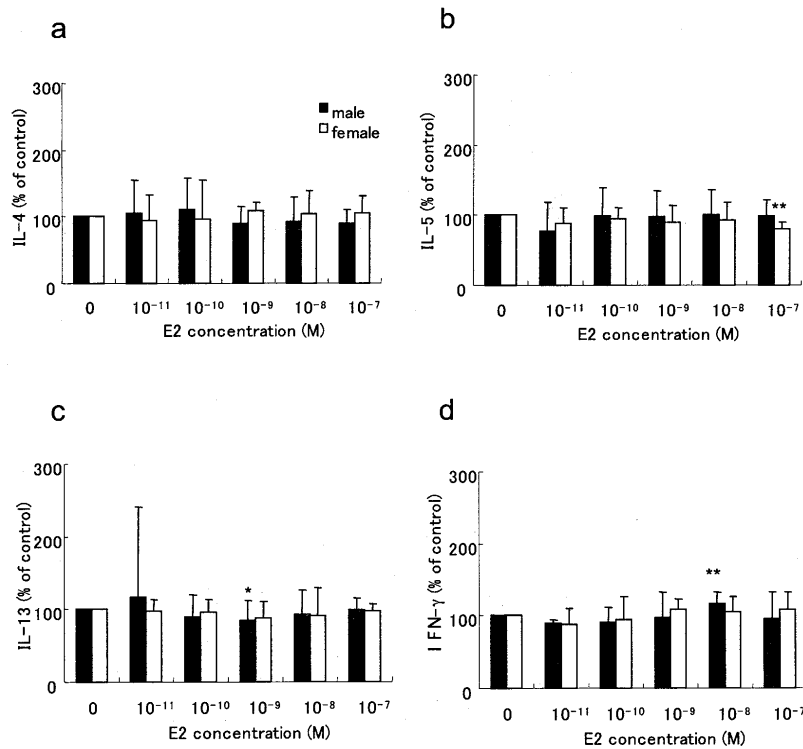


Fig. 2 The effect of E2 on cytokine production by splenocytes. Splenocytes from male (closed columns) and female (opened columns) mice were incubated in the presence of E2 ($10^{-11} \sim 10^{-7}$ M) and OVA ($200 \mu\text{g/ml}$). The levels of IL-4(a), IL-5(b), IL-13(c) and IFN- γ (d) in the culture medium were measured and expressed as percentage of the levels in the absence of E2. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the control.

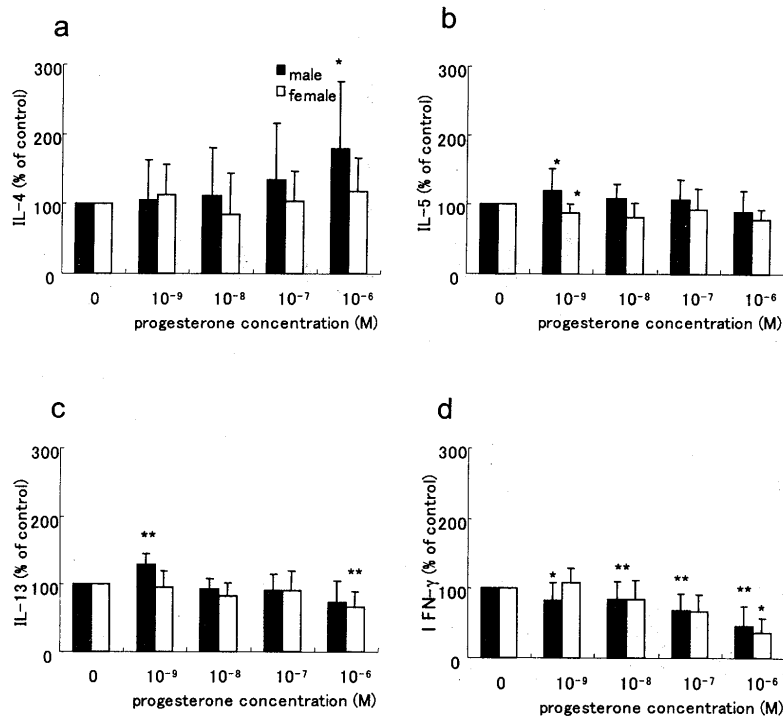


Fig. 3 The effect of progesterone on cytokine production by splenocytes. Splenocytes from male (closed columns) and female (opened columns) mice were incubated in the presence of progesterone ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ M) and OVA ($200 \mu\text{g/ml}$). The levels of IL-4(a), IL-5(b), IL-13(c) and IFN- γ (d) in the culture medium were measured and expressed as percentage of the levels in the absence of progesterone. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the control.

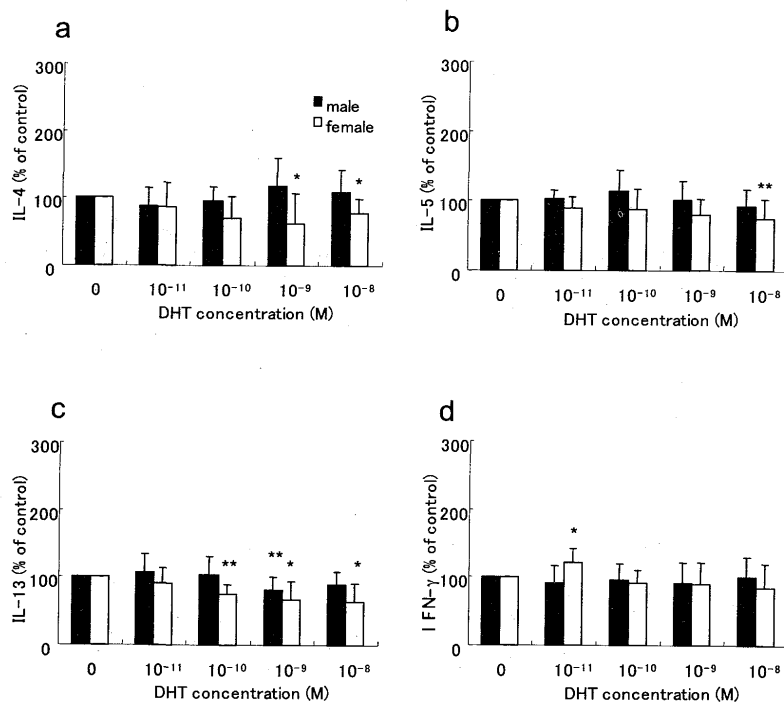


Fig. 4 The effect of DHT on cytokine production by splenocytes. Splenocytes from male (closed columns) and female (opened columns) mice were incubated in the presence of DHT ($10^{-11} \sim 10^{-8}$ M) and OVA ($200 \mu\text{g/ml}$). The levels of IL-4 (a), IL-5 (b), IL-13 (c) and IFN- γ (d) in the culture medium were measured and expressed as percentage of the levels in the absence of DHT. *p < 0.05 and **p < 0.01 compared with the control.

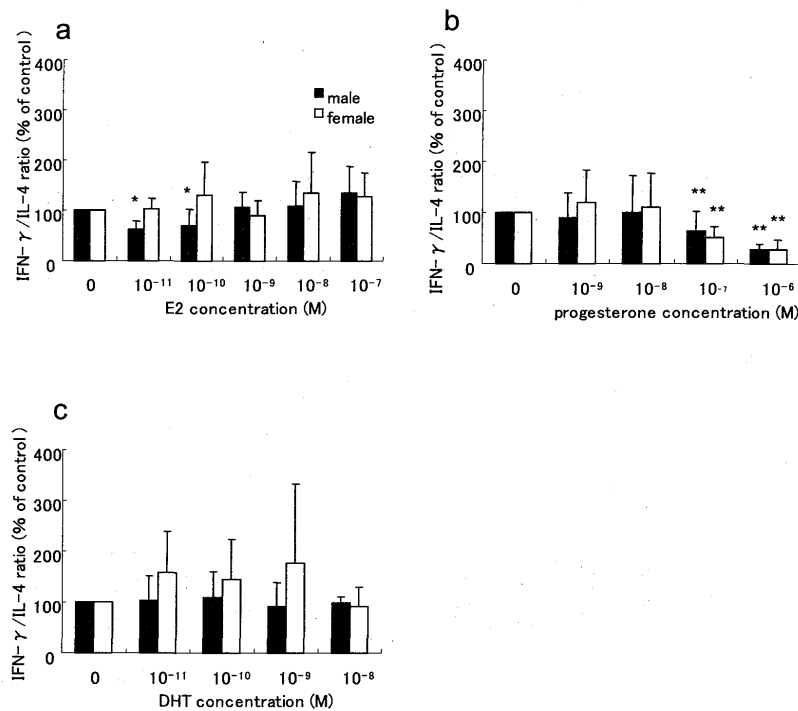


Fig. 4 The effect of sex hormones on IFN- γ /IL-4 ratio. IFN- γ and IL-4 produced by splenocytes from male (closed columns) and female (opened columns) mice were measured as described in Materials and Methods. The ratio of IFN- γ to IL-4 in the presence of sex hormones was expressed as percentage of that in the absence of the hormones. *p < 0.05 and **p < 0.01 compared with the control.

考 察

気管支喘息患者には、罹患率と重症度に性差がある⁵⁾。また、喘息モデルマウスでも、雄に比べて雌でより高い気道炎症が観察されている¹²⁾。Progesterone投与した雄喘息モデルマウスや去勢した喘息モデルマウスでは、Th2サイトカインの増加を伴った気道炎症の悪化が報告されている^{8,13)}。一方、リンパ球の機能にも性差があり、女性では男性に比べTh1/Th2が優位であることが報告されている²⁾。このように喘息における気道炎症の性差は性ホルモンの環境とリンパ球の違いから考えられる。我々は以前に、感作マウスの脾細胞を正常マウスに移入し、抗原吸入による炎症を比較し報告した¹⁶⁾。感作した雄または雌の脾細胞を移入したナイーブ雌マウスに抗原を吸入したところ、雌の脾細胞を移入した雌マウスでより強い炎症を示した。これは、炎症の性差の原因がリンパ球の違いであることを示唆する。しかし感作した雄または雌の脾細胞を移入したナイーブ雄マウスで同様に比較したところ、同程度の炎症を示したことから、炎症の原因はリンパ球のみでは説明できない。レシピエントマウスの性つまり性ホルモン環境により、リンパ球機能における性差が見られたり、見られなかったりするわけである。このことから、アレルギー性気道炎症において性ホルモンの環境とリンパ球の違いの両方が重要であることが示唆される。そこで我々は、性ホルモンのリンパ球に対する作用、ここでは抗原特異的サイトカイン産生、に対する影響を雄および雌のリンパ球で比較した。

雌マウス脾細胞にE2をOVAと同時に投与あるいは前投与し、IFN- γ およびIL-4産生を比較したところ、有意な差は見られなかった。そこで、データには示していないがE2の分解性を考慮し、E2をOVAと同時に、さらに24、48時間後に追加投与し、計3回添加し、OVAと同時に添加の群と比較したところ、サイトカイン産生に有意な差が見られなかった。よって、性ホルモンの添加方法によるサイトカイン産生の差はないと判断したため、以後の実験では、性ホルモンはOVAと同時

添加とした。

E2は、高濃度ではTh1反応を促進し、低濃度ではTh2反応を促進するという報告があるが¹⁷⁾、今回我々の実験では高濃度、低濃度いずれにおいてもE2の影響は雌雄共に確認できなかった。Progesteroneは抗CD3抗体と抗CD28抗体で刺激したマウスの脾臓T細胞においてTh1分化を抑制し、Th2分化を促進するという報告がある¹¹⁾。我々の実験でも同様に、progesteroneは雄リンパ球に対し生体内濃度 (10^{-8} M) より高い濃度である 10^{-6} M添加によりIL-4が増加し、 $10^{-9} \sim 10^{-6}$ M添加により濃度依存的にIFN- γ が低下した。一方、雌リンパ球に対しては 10^{-6} M添加によりIFN- γ が低下した。また、 10^{-7} 、 10^{-6} M添加により雌雄共にIFN- γ /IL-4が低下した。このことより、progesterone添加により雌雄いずれにおいても、Th1反応を抑制し、Th2反応を促進することが示唆された。DHTはCD3抗体で刺激したマウス脾臓T細胞におけるIL-4、IL-5、IFN- γ 産生を低下するという報告がある⁹⁾。我々の実験では、 10^{-8} MのDHT添加により雌でIL-4、IL-5、IL-13が低下した。DHT添加による雄でのサイトカイン産生の変化は見られなかった。Fig. 2c, Fig. 2dではそれぞれE2の 10^{-9} 、 10^{-8} Mの一濃度のみの変化、またFig. 3b, Fig. 3cではprogesterone低用量 10^{-9} 、Fig. 4dではDHT低用量 10^{-11} 、Fig. 5aではE2低用量 10^{-11} と 10^{-12} のみでの変化であった。用量依存性が認められないあるいは低用量においてのみ認められるような結果が得られた理由として、調整された脾臓細胞の質的heterogeneityが考えられる。すなわち調整された脾臓細胞は、T細胞以外の免疫細胞、例えばB細胞やNK細胞を含み、サイトカイン産生において促進的にまた抑制的に作用する細胞も含まれる。そして個体毎にその比率は当然異なることになる。また、そのheterogeneityにより、サイトカイン産生促進細胞とサイトカイン産生抑制細胞が同時にホルモンにより刺激され、促進と抑制のバランスが産生に適した濃度によりのみサイトカインが検出できた可能性も否定できない。

ProgesteroneとDHTのサイトカイン産生への影響が雌と雄のリンパ球で異なる原因は、今回の実

験からは不明である。Th細胞にはアンドロゲン受容体とエストロゲン受容体, プロゲステロン受容体が存在することが確認されているが^{3,7,8)}, リンパ球での性ホルモン受容体発現の性差に関する研究は行われていない。しかし, ヒト末梢血リンパ球に様々な濃度の性ホルモンを添加しても男女のリンパ球によるサイトカイン産生に変化は見られなかったという報告もある²⁾。また, Th1, Th2サイトカイン産生に関わる転写因子として nuclear factor kappa B, T-bet, GATA-3があるが^{10,17,18)}, これらの発現に性差があるか否かは検討されていない。一方, E2によりGATA-3の発現が増加したという報告もある¹⁰⁾。サイトカイン産生に対するホルモンの影響に性差が現れたのは, リンパ球機能における性ホルモン受容体と転写因子の発現に性差が存在するからかもしれない。

我々の実験結果から, 喘息マウスでの気道炎症の性差が性ホルモンの環境とリンパ球の違いによることが考えられる。また, DHT添加によりTh2サイトカインが低下したことから, ヒトの喘息治療に男性ホルモンが利用可能であることが示唆される。

REFERENCES

- 1) NHLBI/WHO Workshop report. Global strategy for Asthma Management and prevention. 02-3659 (2002)
- 2) Giron-Gonzalez J. A., Moral F. J., Elvira J., Garcia-Gil D., Guerrero F., Gavilan I., Escobar L., *Eur. J. Endocrinol.*, **143**, 31-36 (2000)
- 3) Liva S. M., Voskuhl R. R., *J. Immunol.*, **167**, 2060-2067 (2001)
- 4) Hoglund C. O., Axen J., Kemi C., Jernelov S., Grunewald J., Muller-Suur C., Smith Y., Gronneberg R., Eklund A., Stierna P., Lekander M., *Clin. Exp. Allergy*, **36**, 982-992 (2006)
- 5) Balzano G., Fuschillo S., Melillo G., Bonini S., *Allergy*, **56**, 13-20 (2001)
- 6) Yellayi S., Zakroczymski M. A., Selvaraj V., Valli V. E., Ghanta V., Helferich W. G., Cooke P. S., *J. Endocrinol.*, **176**, 267-274 (2003)
- 7) Chiu L., Nishimura M., Ishii Y., Nieda M., Takedani Y., Shibata Y., Tadokoro K., Juji T., *Am. J. Immunol.*, **35**, 6, 552-557 (1996)
- 8) Araneo B. A., Dowell T., Diegel M., Daynes R. A., *Blood*, **78**, 3, 688-699 (1991)
- 9) Lambert K. C., Curran E. M., Judy B. M., Milligan G. N., Lubahn D. B., Estes D. M., *J. Immunol.*, **175**, 5716-5723 (2005)
- 10) Miyaura H., Iwata M., *J. Immunol.*, **168**, 1087-1094 (2002)
- 11) Melgert B. N., Postma D. S., Kuipers I., Geerlings M., Luinge M. A., van der State B. W., Kerstjens H. A., Timens W., Hylkema M. N., *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 1496-1503 (2005)
- 12) Hayashi T., Adachi Y., Hasegawa K., Morimoto M., *Scand. J. Immunol.*, **57**, 562-567 (2003)
- 13) Hellings P. W., Vandekerckhove P., Claeys R., Billen J., Kasran A., Ceuppens J. L., *Clin. Exp. Allergy*, **33**, 1457-1463 (2003)
- 14) Kumagai K., Ohno I., Okada S., Ohkawara Y., Suzuki K., Shinya T., Nagase H., Iwata K., Shirato K., *J. Immunol.*, **162**, 4212-4219 (1999)
- 15) Wise J. T., Baginski T. J., Mobley J.L., *J. Immunol.*, **162**, 5592-5600 (1999)
- 16) Komatsu S., Saito A., Hotta N., Yamanouchi M., Ohwada K., Okuyama K., Takayanagi M., Ohno I., *J. Tohoku Pharm. Univ.*, **52**, 111-124 (2005)
- 17) Maret A., Coudert J. D., Garidou L., Foucras G., Gourdy P., Krust A., Dupont S., Chambon P., Druet P., Bayard F. C., Guery J., *Eur. J. Immunol.*, **33**, 512-521 (2003)
- 18) Palanki M. S., *Curr. Med. Chem.*, **9**, 219-227 (2002)
- 19) Buono C., Binder C. J., Stavrakis G., Witztum J. L., Glimcher L. H., Lichtman L. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1596-1601 (2005)