

アレルギー性気道炎症における  
アンドロゲンによる 2 型ヘルパー T 細胞  
抑制機構の解析

江島 亜希

# 目次

## 要旨

## 略称一覧

## 第1章 序論

- 1-1 免疫機能の性差
- 1-2 喘息と性ホルモン
- 1-3 喘息の機序
- 1-4 喘息における性ホルモンと免疫細胞の関係
- 1-5 喘息と DUSP2
- 1-6 本研究の目的と結果

## 第2章 材料と方法

- 2-1 マウス
- 2-2 細胞単離
- 2-3 抗体とフローサイトメトリー解析
- 2-4 Th2 細胞への分化
- 2-5 ダニ抗原による喘息誘導
- 2-6 ELISA
- 2-7 H&E 染色
- 2-8 気道過敏反応性の測定
- 2-9 Th2 細胞の移入
- 2-10 RNA-seq 解析
- 2-11 逆転写とリアルタイム PCR
- 2-12 レポーター解析
- 2-13 クロマチン免疫沈降
- 2-14 Th2 細胞へのレトロウイルス感染
- 2-15 統計処理

### 第3章 結果

- 3-1 雌マウスは雄マウスよりも気道炎症が悪化する
- 3-2 T細胞特異的 AR 欠損雄マウスで気道炎症が悪化する
- 3-3 T細胞特異的 ER 欠損マウスは気道炎症に影響を与えない
- 3-4 アンドロゲンは Th2 細胞のサイトカイン産生を抑制する
- 3-5 アンドロゲンは記憶 Th2 細胞の IL-5 産生を抑制する
- 3-6 AR 欠損 Th2 細胞の遺伝子発現プロファイル解析
- 3-7 アンドロゲンは Dusp2 遺伝子の 5'UTR 領域に結合し転写を上昇させる

### 第4章 考察

- 4-1 培養 Th2 細胞における IL-5 産生とウイルス感染の影響について
- 4-2 喘息研究における本研究の位置づけ
- 4-3 DUSP2 は Th2 細胞のみならず Th1、Th17 細胞の機能も抑制するのか
- 4-4 DUSP2 による 2 型サイトカイン産生の抑制機構

総括

引用文献

謝辞

## 要旨

成人における喘息患者数は男性よりも女性の方が多いが、その原因は未解明の点が多い。そこで、喘息の性差が生じる原因を明らかにするために、男女の身体的特徴をつかさどる性ホルモンと喘息における主要な免疫細胞である T 細胞に着目した。まず、野生型マウスにイエダニ抗原を用いて気道炎症を誘導して病状を解析したところ、雌は雄よりも気道炎症が悪化しやすいことが示された。次に、T 細胞特異的なアンドロゲン受容体 (AR) およびエストロゲン受容体 (ER) 欠損マウスを作製し、イエダニ抗原を用いて気道炎症を誘導した。T 細胞特異的 AR 欠損マウスは対照マウスよりも重度の気道炎症を発症したが、T 細胞特異的 ER $\alpha$ / $\beta$ ダブル欠損マウスは対照マウスと同程度の炎症を示した。対照マウスのナイーブ T 細胞を 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) に分化誘導させる際に、ジヒドロテストステロンで刺激すると Th2 細胞のサイトカイン産生が減少したが、T 細胞特異的 AR 欠損マウス由来の Th2 細胞では減少しなかった。また、卵白アルブミン (OVA) に反応する OT-II TCR トランスジェニック AR 欠損 Th2 細胞を野生型マウスへ移入すると、OVA 投与後に重度の気道炎症を誘発した。次に、アンドロゲンの気道炎症抑制機構を解明するために AR 欠損 Th2 細胞を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。AR 欠損 Th2 細胞は細胞周期と Th2 細胞分化に関連する遺伝子を高発現しており、p38 の負の調節因子である DUSP2 を低発現していた。さらに、クロマチン免疫沈降法により AR が *Dusp2* 遺伝子座の 5' 非翻訳領域の AR 結合配列に結合すること、レポーター解析から AR が *Dusp2* の転写を活性化することを明らかにした。最後に、レトロウイルスベクターを用いて Th2 細胞に DUSP2 を過剰発現させた結果、AR が IL-4 の発現を抑制することが示された。以上の結果から、アンドロゲンが T 細胞の AR を介して DUSP2 の発現を上昇させ、Th2 細胞のサイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。本研究結果は成人における喘息患者の性的偏りの一部を説明しており、新しい喘息治療薬の開発に発展することが期待される。

## 略称一覧

AR, androgen receptor  
ARE, androgen response element  
BALF, bronchoalveolar lavage fluid  
ChIP, chromatin immunoprecipitation  
DEG, differentially expressed gene  
DHT, dihydrotestosterone  
DMSO, dimethyl sulfoxide  
DUSP, dual-specificity phosphatase  
ER, estrogen receptor  
GR, glucocorticoid receptor  
HDM, house dust mite  
H&E, hematoxylin & eosin  
ILC2, type 2 innate lymphoid cell  
IL, interleukin  
OVA, ovalbumin  
Rag 2, recombination activating gene 2  
TCR, T cell receptor  
Tg, transgenic  
Th2, type 2 helper T  
UTR, untranslated region

# 第 1 章

## 序論

## 第1章 序論

### 1-1 免疫機能の性差

免疫機能には性差があり、女性の方が男性よりも高い免疫応答能力を示す。例えば、免疫細胞の一つである CD8 T細胞のエフェクター活性や IFN- $\gamma$ の産生能は男性よりも女性の方が高く、これは男性の方が大腸癌や肺癌の発症率と死亡率が高いことと一致する(1)。他にも、末梢血 B細胞からの IgG、IgM 抗体産生能は女性の方が高い。これは、ワクチンにおいて女性の抗体価の方が男性よりも高いことと一致する(2)。一方で、高い免疫応答を示す女性では、自己免疫疾患やアレルギー患者が男性よりも多い。実際に、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスは男性に対して女性は9倍、関節リウマチや多発性硬化症は4倍の頻度となる(3, 4)。全身性エリテマトーデスは妊娠可能年齢に好発し、妊娠中に病状が悪化しやすいことや、女性ホルモン補充治療により発病リスクが上昇することが報告されている。これらの知見から、男女の身体的特徴を規定する性(ステロイド)ホルモンが免疫細胞に作用することで、免疫機能や疾患の性差を引き起こす可能性が考えられる。しかし、免疫機能は様々な細胞が相互作用しているため、性ホルモンがどのように免疫機能に関与しているか不明な点が多い。

### 1-2 喘息と性ホルモン

性差がある免疫疾患の中でも、アレルギー疾患である喘息は特徴的な傾向を示す。喘息は小児期には女兒よりも男児に多いが、二次性徴期以降に女性患者の数が増加し逆転するため(5, 6)、性ホルモンの影響が大きい疾患であると推測されている(図1)。

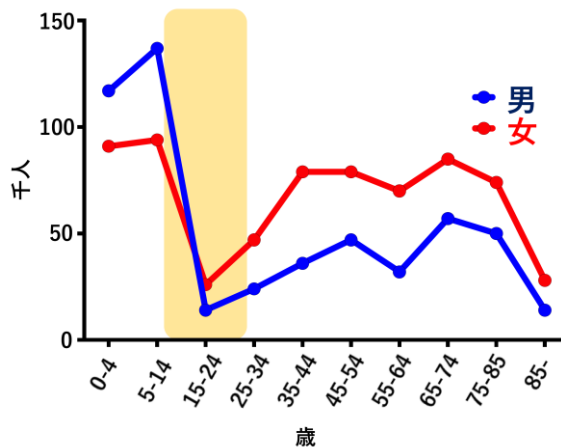


図1 2014年度厚生労働省による年齢別・性別の喘息患者調査

厚生労働省公式ホームページに掲載されている平成26年（2014）患者調査の概況の数字を引用した。

性ホルモンは、男性ホルモンであるアンドロゲンと女性ホルモンであるエストロゲン、プロゲステロンに分類される。アンドロゲンはアンドロステンジオン、テストステロン、ジヒドロテストステロンの総称であり、主に精巣と副腎から分泌される。一方、エストロゲンはエストロン、エストラジオール、エストリオールの総称で、主に卵巣と副腎から分泌される（図2）。

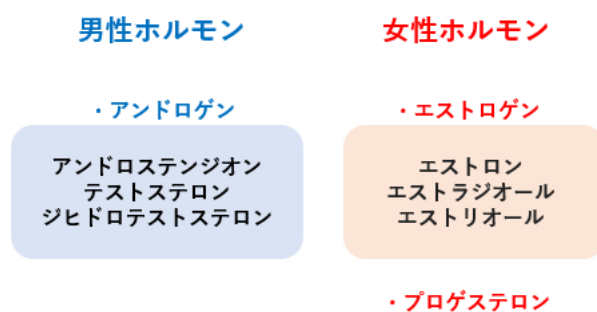
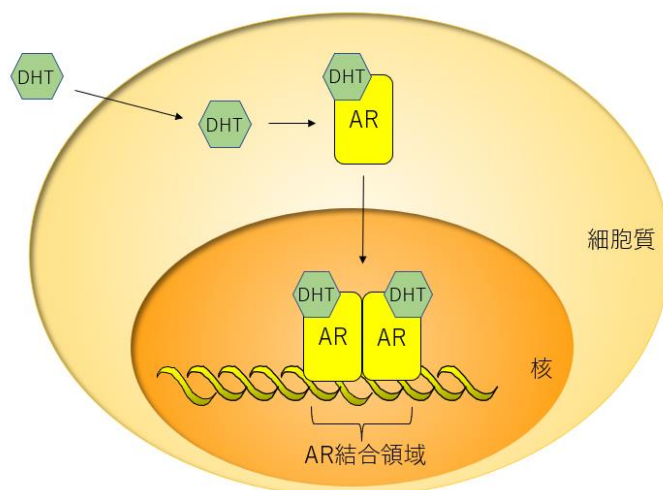


図2 男性ホルモンと女性ホルモンの分類

各器官から分泌された性ホルモンは細胞質内に存在するアンドロゲン受容体（androgen receptor, AR）もしくはエストロゲン受容体（estrogen receptor, ER） $\alpha$  および  $\beta$  と結合する。リガンドが結合した後、AR および ER は Hsp90 や Hsp70 などのシャペロンから分離しリン酸化される。次に AR および ER は二量体を形



成して核内に移行し、DNA 上の特異的なモチーフ配列と結合し、標的遺伝子の転写を調節する（**図 3**）(7)。AR および ER は CD4 T 細胞やマクロファージなどの免疫細胞で発現されており(8, 9)、免疫機能に様々な影響を及ぼす可能性が示唆されている。



**図 3** 核内転写因子である AR による遺伝子発現調節方法

### 1-3 喘息の機序

喘息は気道上皮から抗原が体内に侵入することで引き起こされる。ダニやカビのアレルゲンのプロテアーゼ活性は、気道上皮細胞間のバリアを破綻させ抗原の侵入を可能にするとともに、気道上皮細胞を傷害しその核内に恒常的に蓄積されている IL- (interleukin) 33 を放出させる。放出された IL-33 は 2 型自然リンパ球 (type 2 innate lymphoid cell, ILC2) や 2 型ヘルパー T (type 2 helper T, Th2) 細胞膜上に存在する IL-33 受容体と結合し、2 型サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 の産生を促進する。IL-4 は Th2 細胞の分化に重要な転写因子 GATA3 の発現を誘導し、Th2 細胞の分化をさらに促進する(10)。加えて、B 細胞は IL-4 の存在下で IgE 産生 B 細胞へ分化し、抗原に特異的な IgE 抗体を産生する。B 細胞から産生された IgE はマスト細胞及び好塩基球に発現する高親和性 IgE 受容体に結合する。抗原が再侵入し高親和性 IgE 受容体に結合すると、マスト細胞からヒスタミンやロイコトリエンなどの炎症メディエーターが放出され炎症を誘導する。IL-5 は好酸球の成熟や増殖、活性化を引き起こし、好酸球性の気道炎症を促進する(11, 12)。IL-13 は好酸球誘導性ケモカインの発現や粘液の産生を誘導し、好酸球性の気道炎症や気道の狭窄に関与する（**図 4**）(13-15)。

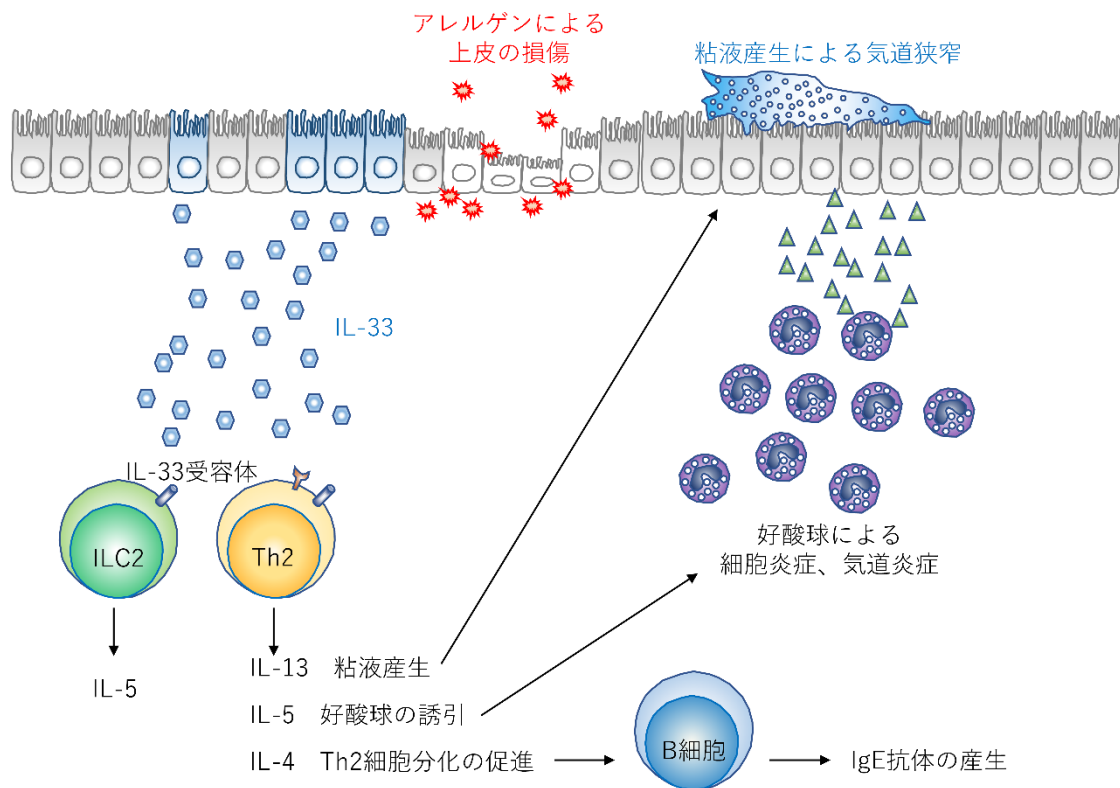


図4 喘息の発症メカニズム

#### 1-4 喘息における性ホルモンと免疫細胞の関係

先行研究では、マクロファージ特異的 AR 欠損マウスにアレルギー性気道炎症を引き起こすと M2 マクロファージの分化が抑制されること(16)、マクロファージ特異的 ER $\alpha$ 欠損マウスにおいて M2 マクロファージの分化が促進されることが報告されている(17)。また、AR 欠損マウスにイエダニ (house dust mite, HDM) 抗原により気道炎症を引き起こすと、ILC2 の数と Th17 細胞が増加し炎症が増悪する。さらに、制御性 T 細胞特異的 AR 欠損マウスにアルテルナリア抽出物により気道炎症を引き起こすと、炎症が悪化する(18)。このような知見から、アンドロゲンは気道炎症を抑制し、エストロゲンは気道炎症を増強すると推測されてきた。しかし、喘息の悪化には2型サイトカインが必須であるため、2型サイトカインを多量に産生する ILC2 や Th2 細胞の寄与が大きいことが予想される。従って、ILC2 や Th2 細胞においてもアンドロゲンの炎症抑制作用やエストロゲンの炎症亢進作用が存在するかを検証する必要がある。さらに、初回の抗原

暴露の後に Th2 細胞の一部は記憶 Th2 細胞に分化し、体内で長期にわたって維持される。記憶 Th2 細胞は、抗原の再暴露に際して迅速かつ強力に反応することで気道炎症が再燃し、病態の増悪と慢性化を引き起こす。同時に、気道が過敏になるため乾燥や温度変化などの小さな刺激でも気道の狭窄を引き起こされる(19)。このような喘息の発症から慢性化に至るまでの過程で、性ホルモンが Th2 細胞の分化や活性化ならびに記憶 Th2 細胞の維持や応答に関係するのことも詳細に解析する必要がある。

### 1-5 喘息と DUSP2

二重特異性ホスファターゼ (dual-specificity phosphatase, DUSP) ファミリーは ERK、p38 および JNK を脱リン酸化し、結果として免疫細胞における炎症性サイトカインの産生を抑制する (図 5)。DUSP ファミリーの一員である DUSP2 は胸腺、脾臓、リンパ節などの T 細胞が豊富な組織で発現しており、その発現レベルはナイーブ CD4 T 細胞の T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) 刺激後に上昇する(20)。一般的に糖質コルチコイドは免疫抑制剤として喘息の治療に使用されるが(21)、糖質コルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor, GR) は、ERK1/2 および AP-1 を脱リン酸化して不活性化する DUSP1 の発現を誘導する (22)。

DUSP1 は ERK、p38、JNK に、DUSP2 は ERK、JNK に作用することが報告されている。DUSP1 と DUSP2 間は 71% のアミノ酸が保存されているため、両者は類似した機能を持つ可能性が高い(23)。加えて、GR、AR、ER は構造が類似しており、その応答エレメントがいくつかの塩基を共有しているため、共通の標的遺伝子を制御することも多い(24, 25)。従って、糖質コルチコイド以外のステロイドホルモンも、DUSP2-ERK/p38/JNK 経路を介してサイトカインの発現を抑制する可能性がある。しかし、性ホルモンが DUSP2 を介して Th2 細胞のサイトカイン産生を抑制するかはまだ不明である。

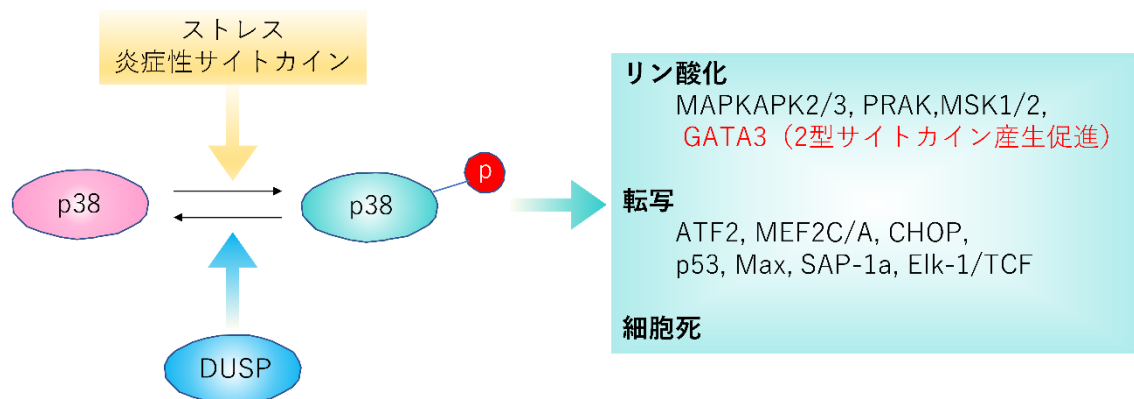


図5 p38 のリン酸化とその作用

### 1-6 本研究の目的と結果

免疫疾患には性差があり、特に喘息では男性よりも女性の方が罹患者数は多い。本研究では、喘息悪化に必須である2型サイトカインを多量に産生し、かつメモリー細胞としての機能があるT細胞に着目して実験を行い、喘息の性差の機序を解明することを目指した。最初に、T細胞特異的なARおよびER欠損マウスに気道炎症を引き起こし、症状の性差がエストロゲンではなくアンドロゲンに起因すると特定した。加えて、ARはアンドロゲン刺激を受けると、脱リン酸化因子である*Dusp2*遺伝子座の非翻訳領域に結合することで発現を上昇させ、IL-4の産生とTh2細胞の増殖を抑制することを見出した。以上の結果から、アンドロゲンはT細胞に存在するARを介して2型サイトカインの産生を抑制することで、喘息の悪化を防ぐことが示唆された。本研究結果は成人における喘息患者の性的偏りの一部を説明しており、新しい喘息治療薬の開発に発展することが期待される。

# 第 2 章

## 材料と方法

## 第2章 材料と方法

### 2-1 マウス

本実験で使用したマウスは遺伝的背景が C57BL/6 の 6~12 週齢のマウスである。CD4-Cre transgenic (Tg) (26)、AR<sup>flox/y</sup> (27)、ER $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> (28)、ER $\beta$ <sup>flox/flox</sup> (29)、OT-II TCR Tg (30)、recombination activating gene 2 (Rag2)<sup>-/-</sup>マウスを使用した。CD4-Cre Tg  $\times$  AR<sup>flox/y</sup> および CD4-Cre Tg  $\times$  ER $\alpha$ <sup>flox/flox</sup>  $\times$  ER $\beta$ <sup>flox/flox</sup> マウスを、それぞれ T 細胞特異的な AR および ER 欠損マウスとした。一方、AR<sup>flox/y</sup> および ER $\alpha$ <sup>flox/flox</sup>  $\times$  ER $\beta$ <sup>flox/flox</sup> マウスをコントロールとした。卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) タンパク質の 323~339 番目のアミノ酸配列 (ISQAVHAAHAEINEAGR) に対応する TCR を持つ OT-II TCR Tg マウスと VDJ 組換え酵素を欠損する Rag2<sup>-/-</sup>マウスを交配して、OVA 特異的 TCR のみを発現した T 細胞を持つマウスを作製した。これらのマウスは、京都大学の医生物学研究所 4 号館の動物実験施設で specific pathogen free 環境化で飼育した。なお、本研究は「京都大学動物実験に関する指針」に従って行った。

### 2-2 細胞単離

肺を小さな断片に切断して 1 mg/ml コラゲナーゼ D (Roche) および 100  $\mu$ g/ml DNase I (Worthington) で 37°C で 40 分間消化した。消化物を 40  $\mu$ m セルストレーナーでろ過し、1,200 rpm で 7 分間遠心分離した。細胞ペレットを 30% Percoll に懸濁し、620  $\times$  g で 20 分間遠心分離して上皮細胞を除去した。その後、赤血球を ACK バッファーで溶解した。リンパ節細胞は、顎下、腋窩、腕神経叢、鼠径部、腸間膜、骨盤のリンパ節から採取した。ナイーブ CD4 T 細胞は、MagniSort mouse CD4 ナイーブ T 細胞濃縮キット (Thermo Fisher Scientific) を使用して分離した。

### 2-3 抗体とフローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析は以下の蛍光色素またはビオチン結合抗体を使用した。TCR $\beta$  (H57-597)、CD4 (GK1.5)、FoxP3 (3G3)、Gr-1 (RB6-8C5)、CD11b (M1/70)、Siglec-F (E50-2440)、CD11c (N418)、Ki67 (SolA15)、IFN- $\gamma$  (XMG1.2)、IL-4 (11B11)、IL-13 (eBio13A)、IL-17A (TC11-18H10.1)、IL-5 (TRFK5)、IL-

10 (JES5-16E3)、CD45.1 (A20)、CD45.2 (104)、マウス IgG1κアイソタイプコントロール (MOPC-21)、ERK1/2 pT202/pY204 (20A)、および p38 MAPK pT180/pY182 (36/p38)。蛍光色素またはビオチン結合抗体は、Thermo Fisher Scientific、BD Biosciences、BioLegend、および Tonbo Biosciences から購入した。染色した細胞は、FACSVerse フローサイトメーター (BD Biosciences) で計測し、Flowjo ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。死細胞は、ヨウ化プロピジウム染色にてゲートをかけて解析から除外した。サイトカインの細胞内染色は、まず T 細胞を 50 ng/ml PMA および 2 μg/ml イオノマイシン、10 μg/ml brefeldin A の存在下で 4 時間刺激した。次に、細胞を表面抗原で染色し、IC fixation buffer (eBioscience) で固定後に氷冷メタノールで透過処理し、抗体で染色した。Ki67 の細胞内染色では、T 細胞を表面抗原で染色し、Foxp3 staining buffer set (eBioscience) で固定後に透過処理し、抗 Ki67 抗体で染色した。リン酸化 p38 および ERK1/2 の細胞内染色では、Foxp3 staining buffer set で細胞を固定し、氷冷メタノールで透過処理し抗体で染色した。

## 2-4 Th2 細胞への分化

単離したナイーブ CD4 T 細胞を、プレートに固相化した 10 μg/ml 抗 CD3 抗体 (145-2C11, Bio X Cell) と、8 μg/ml 可溶性抗 CD28 抗体 (37.51, Bio X Cell) で刺激・培養した。培地には 20 ng/ml ヒト IL-2 (BioLegend)、10 ng/ml マウス IL-4 (BioLegend)、5 ng/ml 抗 IFN-γ抗体を添加した。培地は、10%FBS、50 μM 2-メルカプトエタノール、10 mM HEPES (pH 7.4)、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地を用いた。培養の 4 日目の細胞に 10 nM のジヒドロテストステロン (5α-dihydrotestosterone, DHT) (Sigma) または DMSO (dimethyl sulfoxide) を添加し、さらに 48 時間刺激した。次に、細胞を brefeldin A の存在下で PMA およびイオノマイシンで 4 時間刺激後に固定して、サイトカインを抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

## 2-5 ダニ抗原による喘息誘導

マウスは、0 日目と 14 日目にイエダニ抽出物 (ITEA Inc.) と Imject Alum (Thermo Scientific) の混合物を腹腔内に投与して感作させた。21、22、23 日目に 10 μg イエダニ抗原を含む PBS 20 μl を鼻腔内に投与した。26 日目にマウスを解剖し、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) を 800 μl の PBS を用いて回

収した。喘息誘導方法は以下に示す（図6）。

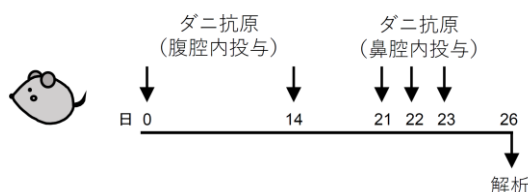


図6 ダニ抗原を用いた気道炎症モデルの実験プロトコル

0日目と14日目のマウスにイエダニ抗原を腹腔内注射し、21、22、23日目にイエダニ抗原を鼻腔内投与した。26日目にマウスを解析した。

## 2-6 ELISA

血清の抗体価や、BALFのサイトカイン濃度を mouse IgE uncoated ELISA kit (Invitrogen)、mouse IL-4 uncoated ELISA kit (Invitrogen)、mouse IL-5 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience)、Mouse IL-13 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) を用いて検出した。

## 2-7 Hematoxyrin & Eosin (H&E)染色

肺を50 mlのPBSで灌流した後、摘出した。組織を10%ホルマリンで3時間固定し、70%エタノールで保存しパラフィンに包埋した。その後、厚さ5 μmの切片をH&Eで染色した。画像はKEYENCE社Biozero BZ-8000顕微鏡で取得解析した。各群32~80の細気管支領域の画像を検査し、合計で6匹のマウスを調べた。炎症の組織学的重症度は、2人の独立した検査者によって判定した。細胞浸潤は0から3の点数で判定した。

## 2-8 気道過敏反応性の測定

マウスにペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) を腹腔内注射して麻酔し、気管切開により気管に18ゲージのスチール針でカニューレを挿入した。次に、マウスをflexiVent® (emka SCIREQ社、モントリオール、カナダ) に接続し、150回/分の頻度で1回換気量8 ml/kgで換気した。その後、ベースライン時およびAeroNeb® (Aerogen Inc.、アイルランド) による噴霧メタコリンの投与後、ス



ナップショット摂動を使用して気道抵抗を測定した。

## 2-9 Th2 細胞の移入

CD45.2 抗原陽性の CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup> または CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> OT-II Tg+ Rag2<sup>-/-</sup> および AR<sup>flox/y</sup> OT-II Tg+ Rag2<sup>-/-</sup> マウスからナイーブ CD4 T 細胞を単離し、Th2 分化条件で培養した。Th2 細胞培養開始日を 0 日として、6 日目に Th2 細胞 ( $3 \times 10^6$  細胞、CD45.2<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) を野生型マウス (CD45.1) に移入した。36、38、42、44 日目に宿主マウスの鼻腔内に OVA を投与した。34 日目または 47 日目にマウスを解剖・解析した。

## 2-10 RNA-seq 解析

CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup> 雄マウスのナイーブ CD4 T 細胞を Th2 条件で培養し、4 日目に DHT で刺激し 48 時間後 (培養開始から 6 日目) に解析した。Th2 細胞を Buffer LTR (Qiagen) で溶解し、RNA を RNeasy Micro Kit (QIAGEN) で精製した。二本鎖 cDNA を SMART-Seq HT キット (タカラ) を使用して合成し、シーケンスライブラリーを Nextera XT DNA ライブラリー調製キット (イルミナ) を使用して作製した。ライブラリーは、イルミナ HiSeq X Ten シーケンサー (イルミナ) で 150 bp ペアエンドリードにてシーケンスした。低品質のシーケンスを除外するために、生のシーケンスされた読み取りは Trimmomatic (バージョン 0.33) によってフィルタリングした (31)。フィルタリングされた配列は Hisat2 (バージョン 2.1.0) (32) を使用してマウスリファレンスゲノム (mm10) にアラインメントし、アラインメントされたリードは featureCount (バージョン 1.6.5) (33) を使用して定量化した。edgeR (バージョン 3.28.1) (34) を使用して、差次的に発現する遺伝子 (differentially expressed gene, DEG) を正規化および識別した。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 解析は、Shiny GO Web 分析ツール(35) を使用して実行した。本研究の次世代シーケンシングデータは、Gene Expression Omnibus にアクセッション番号 GSE200840 で寄託した。

## 2-11 逆転写とリアルタイム PCR

RNA は TRIzol (Invitrogen) にて抽出し、ReverTra Ace (TOYOBO) とランダムプライマーを用いて逆転写した。リアルタイム PCR は、QuantiTect SYBR Green

PCR Kit (Qiagen) と ROX reference dye (Invitrogen) にて増幅し、ABI 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて検出した。PCR は、95°C 15 秒を 1 回、続いて 95°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 45 回行った(36)。プライマー配列は下記の通りである。Dusp2, 5'-GAAGATAACCAGATGGTGGAGATAA-3' と 5'-CCCCACTATTCTTCACCGAGT-3'; Dusp1, 5'-GTGCCTGACAGTGCAGAATC-3' と 5'-CACTGCCCAGGTACAGGAAG-3'; Dusp10, 5'-GGGCTACGCTTATTGATGAAAC-3' と 5'-CCTGTCTGCTAAAGGAGATGGA-3'; Hprt, 5'-GTTGGATACAGGCAGACTTTGTTG-3' と 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3'。

## 2-12 レポーター解析

マウス *Dusp2* プロモーターと 5'非翻訳領域 (untranslated region, UTR) (852 bp) の両端に Kpn I と EcoR I の制限酵素サイトを付加した DNA を PCR によって増幅し、PCR 産物を Kpn I と EcoR I で処理した。同様に制限酵素処理した pGL4.10 [Luc2]ベクター (Promega) とライゲーションをし、マウス *Dusp2* プロモーターと 5'UTR を組み込んだ。マウス AR cDNA を PCR にて増幅し、PCR 産物と pcDNA3 ベクターを BamH I と Xho I で処理したあと、ライゲーションし、AR 発現ベクターを作成した。プライマー配列は下記の通りである。Dusp2 プロモーター, 5'-TCGGTACCTGGGAGAGCCCAGCATCGTCAA-3' と 5'-AGAAGCTTAAAGCCTCCTGCTTCCGGATGT-3'; AR cDNA, 5'-CAGGATCCAAGCTCAAGGATGG-3' と 5'-TAAGCTCGAGGTTTCCAAATCTTCA-3'。

Jurkat 細胞 ( $4 \times 10^5$  個) に、100 ng の pGL4.74 [hRluc/TK]コントロールプラスミド (Promega)、200 ng の AR/ pcDNA3 発現ベクター、および 200 ng の *Dusp2* プロモーター/pGL4.10 を ViaFect Transfection Reagent (Promega) を用いて一過性にトランスフェクトし、24 時間後にレポーターアッセイを行った。次に、細胞溶解物をデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) で溶解し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーター (ARVO X3; PerkinElmer) で測定した。

## 2-13 クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation, ChIP)

ナイーブ CD4 T 細胞 ( $5 \times 10^6$  個) を 10 nM DHT を含む RPMI 1640 培地で 2 日間培養した。細胞を回収し 1% ホルムアルデヒドを加えて、室温で 10 分間反応させ固定した。150  $\mu$ M グリシンを添加し、室温で 10 分反応させ固定を停止さ

せた。3,000 rpm で 4 分遠心し、上清を除いた後 FACS buffer (PBS, 0.2% bovine serum albumin, 0.05% NaN<sub>3</sub>) に懸濁した。3000 rpm で 4 分遠心し、上清を除いた後に、SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0], 1% SDS, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin) を加え、氷上で 10 分間静置し、密閉式超音波細胞破碎装置 (Bioruptor、ソニック・バイオ株式会社) を用いて超音波処理を行った (Power high、破碎 30 秒 + 1 分静置を 6 サイクル)。その後、15,000 rpm、8°C で 10 分間遠心し、上清を 200 µl 回収した。上清に ChIP dilution buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 167 mM NaCl, 1.1% Triton X-100, 0.11% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin) を 1,800 µl 追加し、そのうち 100 µl をインプットとした。上記の 1,800 µl の分画に 50% protein G Sepharose beads を加えローテーターにて 6 時間攪拌したのち、10 µg の抗 AR 抗体 (441、Santa Cruz Biotechnology) またはアイソタイプコントロール IgG1κ で免疫沈降した。精製した DNA をリアルタイム PCR によって増幅した。プライマー配列は下記の通りである。Dusp2 プロモーター-ChIP, 5'-TAAGCCCGGGCTCGA CGAAG-3' と 5'-AGCCTCCTGCTTCCGGATGT-3'。

## 2-14 Th2 細胞へのレトロウイルス感染

マウス Dusp2 cDNA の両端に BamH I と EcoR I を付加した DNA を PCR で増幅し、PCR 産物と MSCV MIGR1 レトロウイルスベクターを BamH I と EcoR I で制限酵素処理した後に、16°C で 2 時間ライゲーションすることでマウス Dusp2 cDNA をベクターに組み込んだ (37)。プライマー配列は下記の通りである。Dusp2 ウイルス, 5'-GCAGGATCCCAGGAGGCTTTGCGATGCC-3' と 5'-GTCTAGA ATTCGGCTGGGCTTTGCCTCA-3'。

ナイーブ CD4 T 細胞を Th2 分化条件で 4 日間培養した。MSCV-Dusp2 ベクターまたは空のベクターを、TransIT-X2 Dynamic Delivery System (Takara) により、PLAT-E パッケージングセル (東京大学北村俊夫博士より分与) にトランスフェクトした。トランスフェクションの 2 日後、上清を回収し、8000×g、16 時間 4°C で遠心分離した。ペレットを、10% FBS および 20 ng/ml ヒト IL-2 を含む 500 µl の RPMI 1640 培地に再懸濁した。Th2 培養の 4 日目に、CD4 T 細胞を 100 µg/ml レトロネクチン T100 (タカラ) の存在下で濃縮レトロウイルスに感染させた。48 時間後に培地を除去し、10% FBS および 20 ng/ml ヒト IL-2 を含む RPMI 1640 培地に交換した。感染から 3 日後、EGFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで解

析した。

## 2-15 統計処理

各実験は3回以上独立して実施した。すべてのデータは平均値±SEMで示し、2つのサンプル間の比較はt検定を用いた。統計分析は、GraphPad Prism ソフトウェア（GraphPad Software 社）を用いた。多群比較は分散分析を用いた。

## 第 3 章

### 結果

### 第3章 結果

#### 3-1 雌マウスは雄マウスよりも気道炎症が悪化する

まず、マウスにおいて喘息の性差を調べるために、イエダニ抗原を用いて気道炎症を誘導した。野生型の雌雄マウスに図6の方法で気道炎症を誘導した後にBALFを回収し、肺胞内に浸潤した細胞をフローサイトメトリーで解析した。細胞は図7に示す手順で分画した。

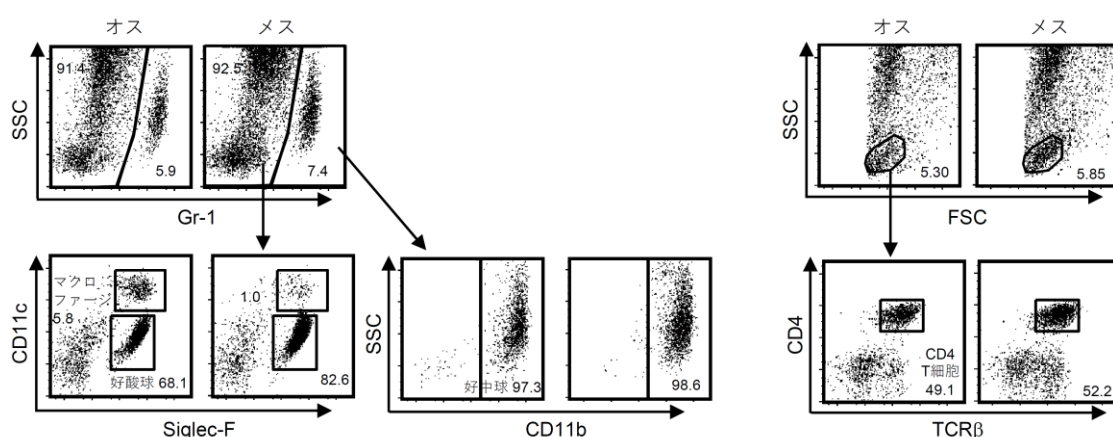


図7 BALFの細胞分画方法

野生型の雌雄マウスをイエダニ抗原にて気道炎症を誘導し、肺胞内に浸潤した好酸球 (Gr-1<sup>-</sup>CD11c<sup>int</sup>Siglec-F<sup>+</sup>)、マクロファージ (Gr-1<sup>-</sup>CD11c<sup>high</sup>Siglec-F<sup>+</sup>)、好中球 (Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>)、およびCD4 T細胞 (TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)を分画した。

肺炎症における雌雄マウスの細胞数を比較すると、BALFでは全細胞、好酸球、CD4 T細胞の数が雌で増加したが、マクロファージと好中球は有意な差がなかった(図8A)。次に、肺実質中に含まれるリンパ球を解析した結果、雌で全細胞およびCD4 T細胞が増加したが、制御性T細胞は変化なかった(図8B)。さらに、血清中のIgE濃度をELISAで測定したところ、雌マウスで血中IgE濃度が増加していた(図8C)。以上の結果より、肺胞中に浸潤した炎症性細胞の数や肺実質中のCD4 T細胞、及び血清中IgE濃度が雄よりも雌マウスで増加していたことから、雌は雄よりも気道炎症が悪化しやすいことが示された。

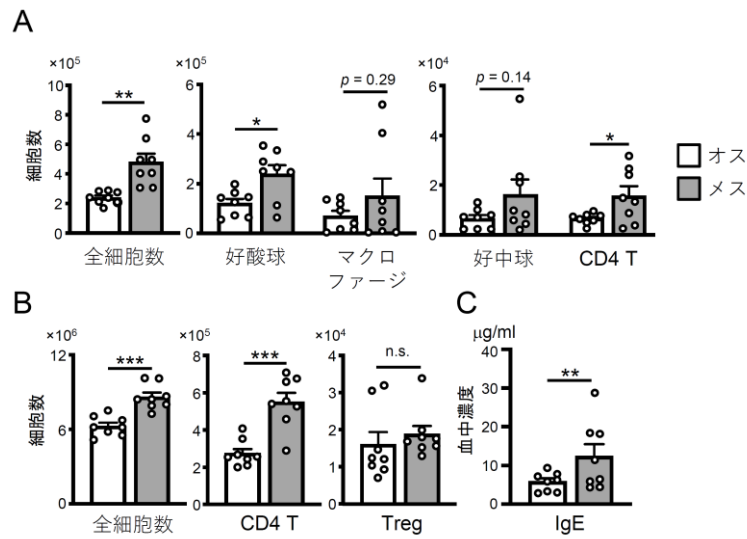
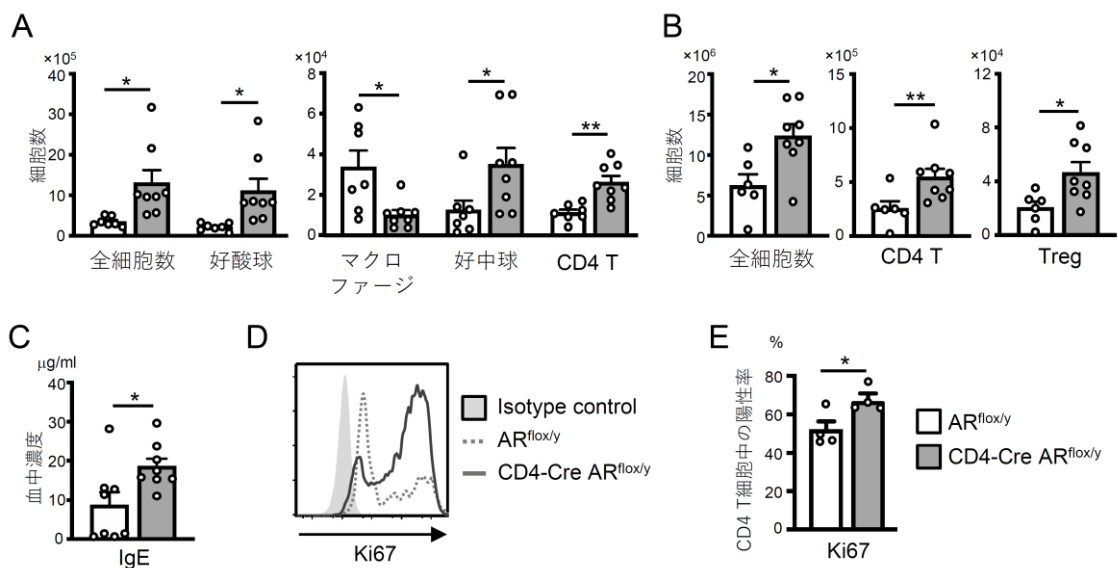


図8 気道炎症を誘導した雌雄マウスにおける病態解析

野生型の雌雄マウスにイエダニ抗原にて気道炎症を誘導した。(A) BALFにおける免疫細胞分画の細胞数 (n=8)。(B) 肺実質における免疫細胞分画の細胞数 (n=8)。(C) ELISAによって測定した血清 IgE 濃度 (n=8)。データは平均±SEMを示す。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、n.s. 有意差なし。

### 3-2 T細胞特異的 AR 欠損雄マウスで気道炎症が悪化する

次に、喘息における主要な免疫細胞である T 細胞に対するアンドロゲンの作用を調べるために、T細胞特異的 AR 欠損マウス(CD4-Cre AR<sup>fllox/y</sup>)を作製して気道炎症を解析した。図6の誘導系で T細胞特異的 AR 欠損雄マウスに気道炎症を誘導し、BALF と肺実質内の細胞をフローサイトメトリーにて解析した。加えて、血清中の IgE 濃度を ELISA にて測定した。AR 欠損マウスの BALF では全細胞、好酸球、好中球、CD4 T 細胞の数が増加したが、マクロファージは減少した(図9A)。また、AR 欠損マウスの肺実質では全細胞、CD4 T 細胞、制御性 T 細胞の数が増加した(図9B)。次に、血清中の IgE 濃度は AR 欠損マウスで増加していた(図9C)。さらに、肺実質の CD4 T 細胞において細胞増殖の指標である Ki67 の発現をフローサイトメトリーで解析したところ、AR 欠損マウスの CD4 T 細胞で陽性率が増加していたことから、AR 欠損マウスでは T 細胞の増殖が亢進していると考えられた(図9DE)。以上の結果から、アンドロゲンは T 細胞を介して気道炎症を抑制することが示された。

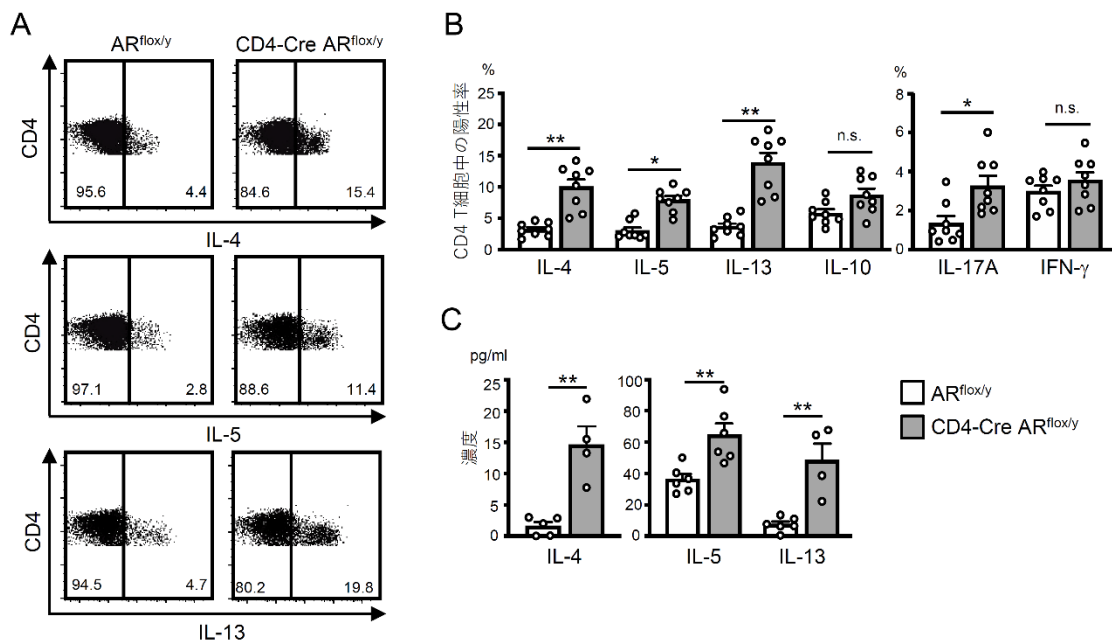


**図 9 T 細胞特異的 AR 欠損雄マウスにおいて気道炎症が増悪する**

CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup> 雄マウスにイエダニ抗原にて気道炎症を誘導した。(A) BALF における免疫細胞分画の細胞数 (n=7-8)。(B) 肺実質における免疫細胞分画の細胞数 (n=6-8)。(C) 血清 IgE 濃度 (n=8)。(D) 肺実質の CD4 T 細胞における Ki67 発現のフローサイトメトリー解析。(E) 肺実質の CD4 T 細胞における Ki67 細胞の陽性率 (n=4)。データは平均±SEM を示す。  
\* p < 0.05、\*\* p < 0.01。

次に、喘息を悪化させる 2 型サイトカインを産生する CD4 T 細胞を T 細胞特異的 AR 欠損雄マウスで調べた。フローサイトメトリーを用いて、肺実質内 CD4 T 細胞における IL-4、IL-5、IL-13 などの 2 型サイトカイン陽性細胞の割合を調べたところ、AR 欠損マウスにて増加していた (図 10A, B)。IL-17A 産生細胞も増加していたが、IL-10 や IFN- $\gamma$  産生細胞は変化しなかった (図 10B)。加えて、BALF に含まれる 2 型サイトカインの濃度を ELISA で測定すると、IL-4、IL-5、IL-13 の濃度は AR 欠損マウスで増加していた (図 10C)。従って、アンドロゲンは T 細胞を介して 2 型サイトカインの産生を抑制することが示された。





**図 10 T 細胞特異的 AR 欠損マウスで 2 型サイトカインの産生が上昇する**

CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup> 雄マウスにイェダニ抗原にて気道炎症を誘導した。(A) 肺実質における CD4 T 細胞のフローサイトメトリープロット。(B) 肺実質の CD4 T 細胞におけるサイトカイン産生細胞の頻度。これらの細胞は PMA とイオノマイシンで 4 時間刺激してサイトカイン産生を誘導した (n = 8)。(C) ELISA によって測定した BALF におけるサイトカイン濃度 (n = 4-6)。データは平均±SEM を示す。\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、n.s. 有意差なし。

次に、臨床的および組織学的な観点から気道炎症を解析した。臨床現場における喘息の診断指標である気道抵抗性を測定した。喘息は悪化すると気道が硬くなり、圧力を加えたときに押し返す力（気道抵抗）が発生する。京都大学医学研究科の佐藤晋博士に気道炎症を誘導したマウスで気道抵抗性を測定していただいたところ、T 細胞特異的 AR 欠損マウスで気道抵抗性が上昇した（**図 11A**）。次に、H&E 染色をおこない病理学的な解析を行った（**図 11B,C**）。T 細胞特異的 AR 欠損マウスでは細胞の浸潤を示す病理学的スコアが上昇した。以上の結果より、T 細胞特異的 AR 欠損マウスで気道炎症が増悪することが示された。

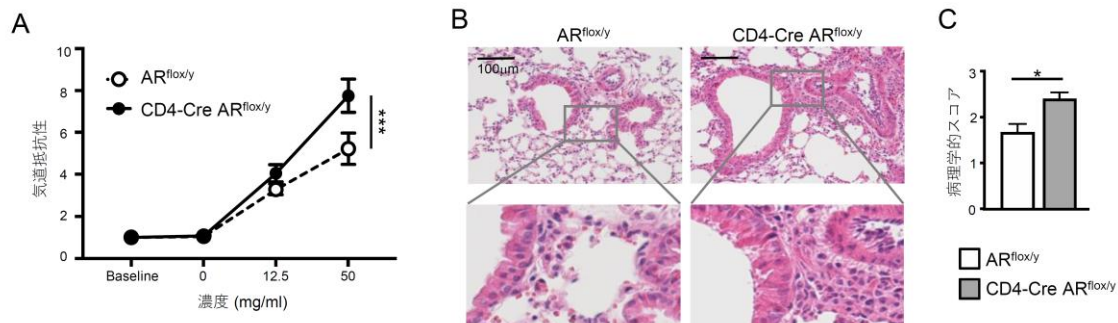
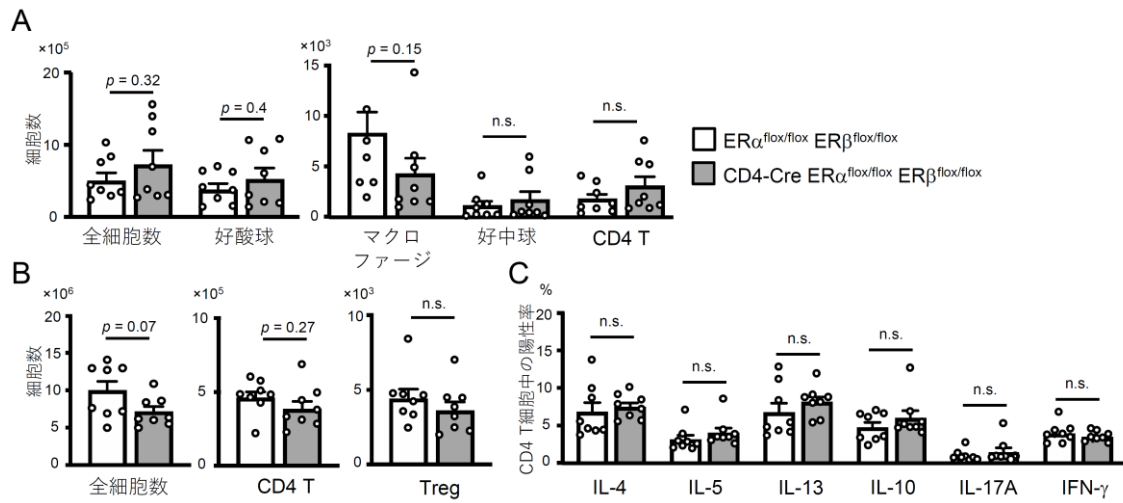


図 11 T 細胞特異的 AR 欠損マウスで気道抵抗性と細胞の浸潤が認められた

CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup> 雄マウスにイエダニ抗原にて気道炎症を誘導した。(A) 最後の HDM 投与から 72 時間後のメタコリン濃度の増加に応じた気道抵抗性 (n=7)。(B) 肺切片の H & E 染色像。200 倍の対物レンズで撮影した。スケールバーは 100 μm を示す。(C) 細気管支周囲の免疫細胞浸潤の病理学的スコア (n=6)。データは平均±SEM を示す。\* p < 0.05、\*\*\* p < 0.001。

### 3-3 T 細胞特異的 ER 欠損マウスは気道炎症に影響を与えない

アンドロゲンと同様に、女性ホルモンであるエストロゲンも喘息に影響を与える可能性がある。先行研究から、呼吸機能はエストロゲンレベルが最も高くなる月経周期の後期卵胞期に悪化することや (38)、エストロゲンを含む経口避妊薬の使用が喘息の症状を悪化させることが報告されている (38)。そこで、T 細胞特異的 ERα/β 欠損マウス (CD4-Cre ERα<sup>flox/flox</sup>ERβ<sup>flox/flox</sup>) を作製し、雌マウスに気道炎症を誘導し、BALF と肺実質の細胞をフローサイトメトリーにて解析した。BALF では全細胞、好酸球、マクロファージ、好中球、CD4 T 細胞の数に有意な差はなかった (図 12A)。肺実質内でも全細胞、CD4 T 細胞、制御性 T 細胞の数に有意な差はなかった (図 12B)。次に、サイトカインの産生をフローサイトメトリーにて解析した。肺実質内の CD4 T 細胞における IL-4、IL-5、IL-13 などの 2 型サイトカインや IL-17A、IL-10、IFN-γ の産生に有意な差はなかった (図 12C)。以上の結果より、T 細胞特異的 ERα/β 欠損マウスでは気道炎症の病状に大きな変化はないことが示された。したがって、以後の実験はアンドロゲンに着目して進めた。



**図 12 T 細胞特異的 ER 欠損マウスでは気道炎症もサイトカイン産生も変化しない**

CD4-Cre ER $\alpha^{flox/flox}$ ER $\beta^{flox/flox}$  および ER $\alpha^{flox/flox}$ ER $\beta^{flox/flox}$  雌マウスにイエダニ抗原にて気道炎症を誘導した。(A) BALF における各細胞分画の細胞数 (n = 6-8)。(B) 肺実質における細胞分画の細胞数 (n = 8)。(A) CD4 T 細胞におけるサイトカイン産生細胞の頻度。細胞は PMA とイオノマイシンで 4 時間刺激した (n = 8)。データは平均  $\pm$  SEM を示す。n.s. 有意差なし。

### 3-4 アンドロゲンは Th2 細胞のサイトカイン産生を抑制する

喘息の症状には 2 型サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 が大きく関与する。本研究の喘息モデルにおいて、T 細胞特異的 AR 欠損マウスにおいて肺の CD4 T 細胞が産生する 2 型サイトカインが増加したことから (図 10A,B)、アンドロゲンが Th2 細胞の分化および 2 型サイトカインの産生を抑制している可能性が考えられる。そこで、リンパ節から単離したナイーブ CD4 T 細胞を Th2 細胞分化条件下で培養し、4 日目にアンドロゲンである DHT を加え、48 時間後 (6 日目) にフローサイトメトリーで解析した (図 13A)。AR<sup>flx/y</sup> 由来のコントロール Th2 細胞を DHT で刺激すると IL-4 と IL13 の産生が減少したが、AR 欠損 Th2 細胞では DHT 刺激後も IL-4 と IL13 の産生細胞の割合は変化しなかった (図 13B,C)。以上の結果から、アンドロゲンは IL-4 と IL-13 の産生を抑制することが示された。

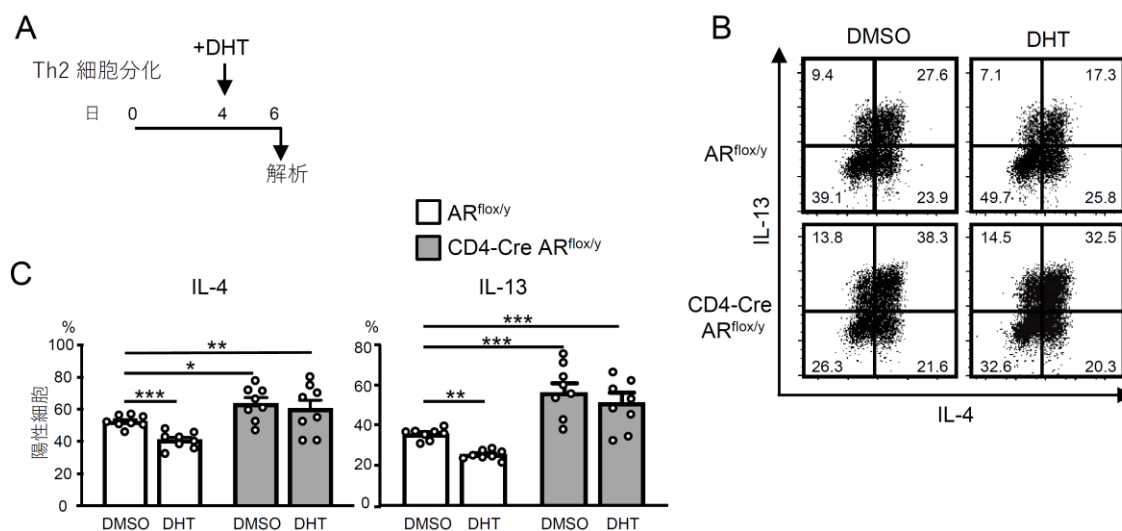


図 13 アンドロゲンは 2 型サイトカイン産生を抑制する

(A) Th2 細胞分化の実験手順。CD4-Cre AR<sup>flx/y</sup> および AR<sup>flx/y</sup> マウスのナイーブ CD4 T 細胞を Th2 細胞条件 (抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、IL-2、IL-4、および抗 IFN- $\gamma$  抗体を含む培養液) で培養した。4 日目に DHT または DMSO を添加し、6 日目に解析した。(B) IL-4 と IL-13 の細胞内染色のフローサイトメトリー。(C) IL-4 および IL-13 陽性細胞の割合 (n=8)。データは平均  $\pm$  SEM を示す。\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、n.s. 有意差なし。

次に、アンドロゲンが Th2 細胞への分化を抑制しているかを調べるために、Th2 細胞に必要な転写因子である GATA3 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。DHT 刺激による GATA3 陽性細胞の割合に変化はみられなかったが (図 14A)、DHT 刺激されたコントロール Th2 細胞 ( $AR^{flox/y}$ ) では GATA3 の発現量が減少する傾向が見られた (図 14B)。以上の結果から、アンドロゲンは Th2 細胞のサイトカイン産生を抑制するが、Th2 細胞の分化には大きな影響を与えないことが示唆された。

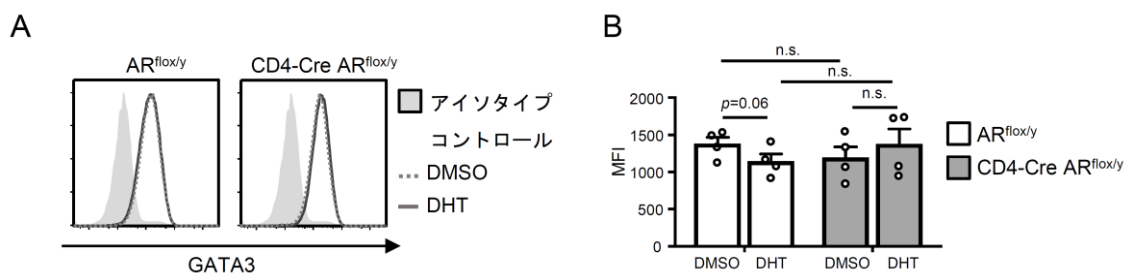


図 14 アンドロゲンは GATA3 の発現に大きな影響を与えない

(A) Th2 細胞における GATA3 発現のフローサイトメトリー。(B) Th2 細胞の GATA3 発現の平均蛍光強度 (MFI) ( $n=4$ )。データは平均 $\pm$ SEMを示す。n.s. 有意差なし。

### 3-5 アンドロゲンは記憶 Th2 細胞の IL-5 産生を抑制する

慢性のアレルギー疾患である喘息は、気道の炎症が繰り返されることで様々な刺激に敏感に反応し、発作的な気道の狭窄を引き起こす疾患である。特に慢性期では記憶 Th2 細胞が主要な働きをし、抗原の再刺激により炎症を悪化させる(39)。そこで、記憶 Th2 細胞の定着と維持にアンドロゲンが関与するか調べるために、活性化 Th2 細胞を養子移入して記憶 Th2 細胞として定着させた。T 細胞特異的 AR 欠損マウス (CD45.2) 由来のナイーブ CD4 T 細胞を Th2 細胞分化条件下で 6 日間培養し、野生型マウス (CD45.1) に移入した。培養開始より 34 日目に、移入した細胞 (CD45.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) の数をフローサイトメトリーにて解析した (図 15A)。脾臓と肺において AR 欠損 Th2 細胞の数はコントロール Th2 細胞に比べて差はなかった (図 15B)。また、肺実質における移入細胞のサイトカイン産生も差はなかった (図 15C)。従って、アンドロゲンは記憶 Th2 細胞の定着に影響しないと考えられた。

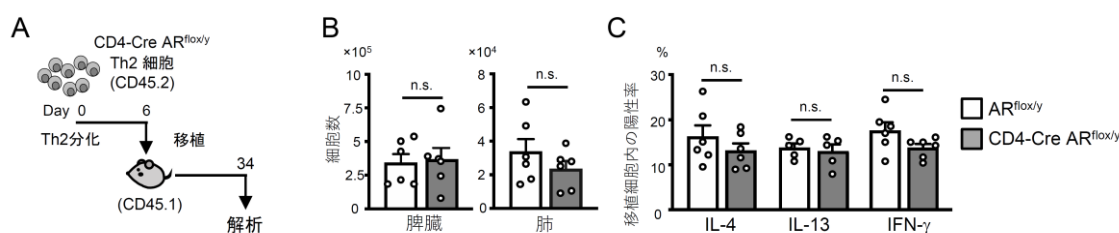


図 15 記憶 Th2 細胞の定着にアンドロゲンは関与しない

(A) Th2 細胞移入の実験手順。CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup> マウス (CD45.2) のナイーブ CD4 T 細胞を Th2 条件下で 6 日間培養し、野生型マウス (CD45.1) に静脈内投与し、34 日目に宿主マウスを解析した。(B) 34 日目における肺実質および脾臓に定着した移入 Th2 細胞 (CD45.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) の数 (n = 6)。(C) 34 日目における肺実質に定着した移入 Th2 細胞 (CD45.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) におけるサイトカイン産生細胞の頻度 (n = 5-6)。データは平均±SEMを示す。n.s. 有意差なし。

次に、アンドロゲンが記憶 Th2 細胞の活性化に影響を与えるか調べるために再刺激実験を行った。図 15A と同様の手順で、OVA 特異的な TCR を発現する CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> Rag2<sup>-/-</sup> OT-II Tg<sup>+</sup> マウス (CD45.2) のナイーブ CD4 T 細胞を Th2 細胞分化条件下で培養し、野生型マウス (CD45.1) に移入した。培養開始より 36、38、42、44 日目に OVA を投与して二次応答を惹起し、47 日目に免疫細胞数とサイトカイン産生をフローサイトメトリーで解析した (図 16A)。AR 欠損 Th2 細胞を移入したマウスの BALF 中の全細胞数と好酸球はコントロール Th2 細胞と比較して増加したが、マクロファージと好中球、CD4 T 細胞は変化しなかった (図 16B,C)。これは、OVA に反応した移入 Th2 細胞が宿主の好酸球の肺への浸潤を促し、炎症を亢進させていることが示唆される。肺実質の移入 Th2 細胞 (CD45.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) の数は AR 欠損 Th2 細胞で増加した (図 16D)。また、移入細胞における Ki67 陽性細胞の割合が AR 欠損記憶 Th2 細胞で増加したことから (図 16E)、細胞増殖が亢進したと考えられる。移入細胞におけるサイトカイン産生は IL-5 が増加していたが、IL-4、IL-13、IL-10 は変化しなかった (図 16F)。この結果は、移入 AR 欠損 Th2 細胞の IL-5 産生が増加し、好酸球を誘引したためと考えられる。加えて、BALF 中の 2 型サイトカイン濃度と血清中の IgE 濃度を ELISA で解析したが、変化はみられなかった (図 16G,H)。以上の結果から、気道炎症においてアンドロゲンは記憶 Th2 細胞の増殖と IL-5 産生を抑制することが示された。

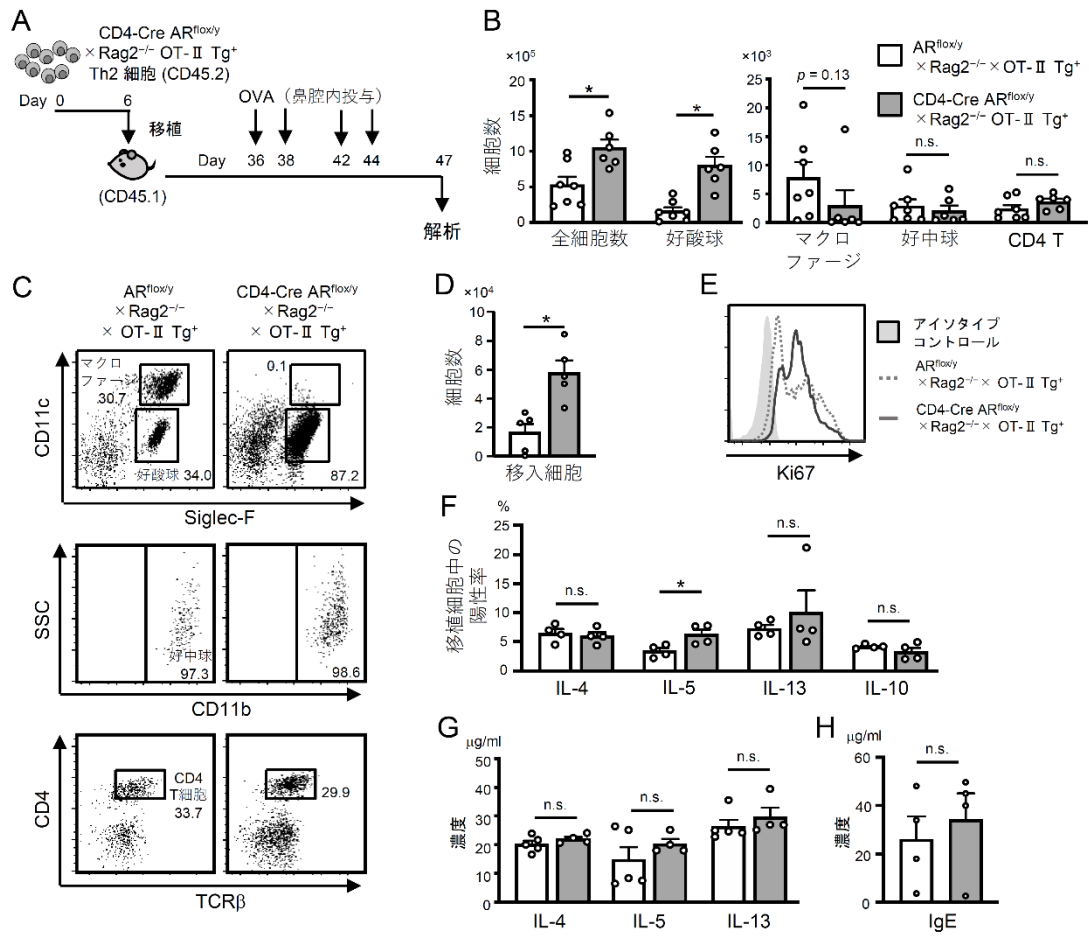


図 16 アンドロゲンは記憶 Th2 細胞の増殖と IL-5 産生を抑制する

(A) CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> OT-II Tg<sup>+</sup> Rag2<sup>-/-</sup> および AR<sup>flox/y</sup> OT-II Tg<sup>+</sup> Rag2<sup>-/-</sup> マウス (CD45.2) のナイーブ CD4 T 細胞を Th2 条件で 6 日間培養し、野生型マウス (CD45.1) に移入した。宿主マウスは 36、38、42、44 日目に OVA を投与し、47 日目に解析した。(B) BALF の細胞のフローサイトメトリー解析。(C) BALF の細胞分画の細胞数 (n = 6-7)。(D) 肺実質における移入 Th2 細胞 (CD45.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) の細胞数 (n = 5)。(E) 肺実質の移入 Th2 細胞における Ki67 発現のフローサイトメトリー解析。(F) PMA およびイオノマイシンで刺激した肺実質内の移入 Th2 細胞におけるサイトカイン産生細胞の頻度 (n=4)。(G) ELISA により測定された BALF のサイトカイン濃度 (n=4-5)。(H) マウスの血清 IgE 濃度 (n=4)。データは平均 ± SEM を示す。\* p < 0.05、n.s. 有意差なし。



### 3-6 AR 欠損 Th2 細胞の遺伝子発現プロファイル解析

アンドロゲンが Th2 細胞を介して喘息を抑制する分子機構を明らかにするために、Th2 細胞の RNA-seq 解析を行った。Th2 細胞を分化培養し、DHT を添加 48 時間後の細胞から RNA を回収した。コントロールと比べて AR 欠損 Th2 細胞で 651 遺伝子の発現が増加し、311 遺伝子が減少していた (図 17A)。変動した遺伝子がどのような経路に関連するものかを調べるために、KEGG 解析を行うと、AR 欠損細胞で細胞増殖経路や代謝経路に関係する遺伝子発現の変動が大きいことが明らかになった (図 17B)。

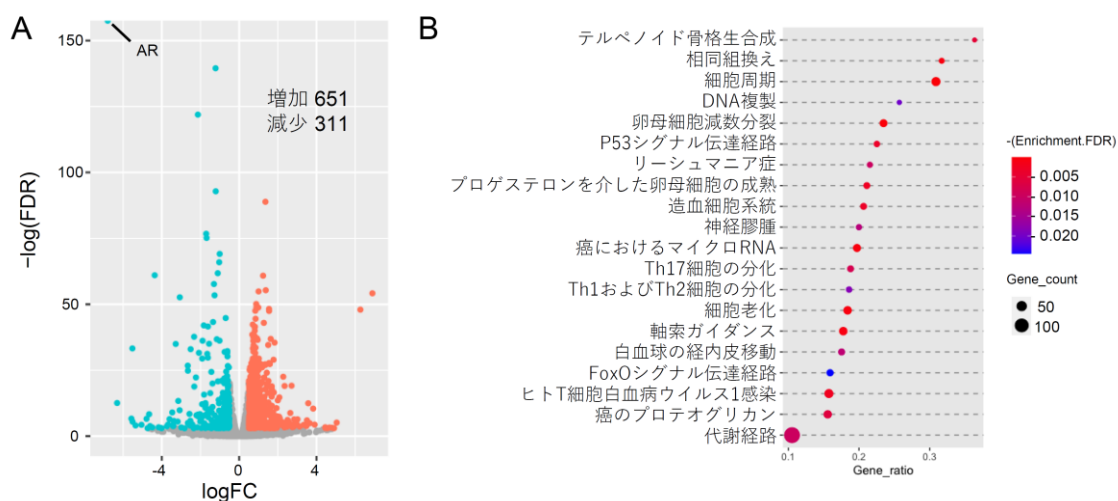


図 17 Th2 細胞の遺伝子変動と KEGG 解析

(A) CD4-Cre AR<sup>flx/y</sup> および AR<sup>flx/y</sup> マウスのナイーブ CD4 T 細胞を Th2 条件で 4 日間培養し、DHT で 48 時間刺激した際の遺伝子発現。プロットは AR<sup>flx/y</sup> Th2 細胞と比較した CD4-Cre AR<sup>flx/y</sup> Th2 細胞の増加 (赤) および減少 (青) を示している。(B) AR<sup>flx/y</sup> マウスと比較した CD4-Cre AR<sup>flx/y</sup> マウスからの Th2 細胞における DEG の KEGG 経路解析。

次に、図 17B の Th1、Th2、Th17 細胞分化に関与する遺伝子発現の増減をヒートマップで示した (図 18A)。Th2 細胞の主要転写因子である *GATA3* (10) や、記憶 Th2 細胞の生存に関与する *Rbpj* (40) が、AR 欠損細胞で増加していた (図 18A)。これらの結果は、転写段階では Th2 細胞への分化が AR 欠損 Th2 細胞で増強されることを示唆する。また、TCR シグナル伝達関連経路では、AR 欠損 Th2 細胞で *Mapk3* (ERK1/2) と *Mapk11* (p38) の発現が増加した (図 18A)。そこで、AR が ERK1/2 および p38 の活性化に影響を与えるか調べるために、AR 欠

損 Th2 細胞にて ERK1/2 と p38 のリン酸化をフローサイトメトリーで解析した。コントロール Th2 細胞と AR 欠損 Th2 細胞を DHT で刺激すると、リン酸化 ERK1/2 は変化がなかったが、リン酸化 p38 はわずかに上昇した (図 18B,C)。また、リン酸化 ERK1/2 はコントロールおよび AR 欠損の Th2 細胞の両方で DHT 刺激により蛍光強度が低下した。一方、リン酸化 p38 は AR 欠損 Th2 細胞を DHT で刺激をしても蛍光強度は変化しなかった。従って、DHT による ERK の脱リン酸化に AR は関与しないが、p38 の脱リン酸化は AR を介して行われることが示唆された。これらの結果は、AR シグナル伝達が *Dusp2* の発現を誘導し、p38 のリン酸化を抑制する可能性を示唆している。

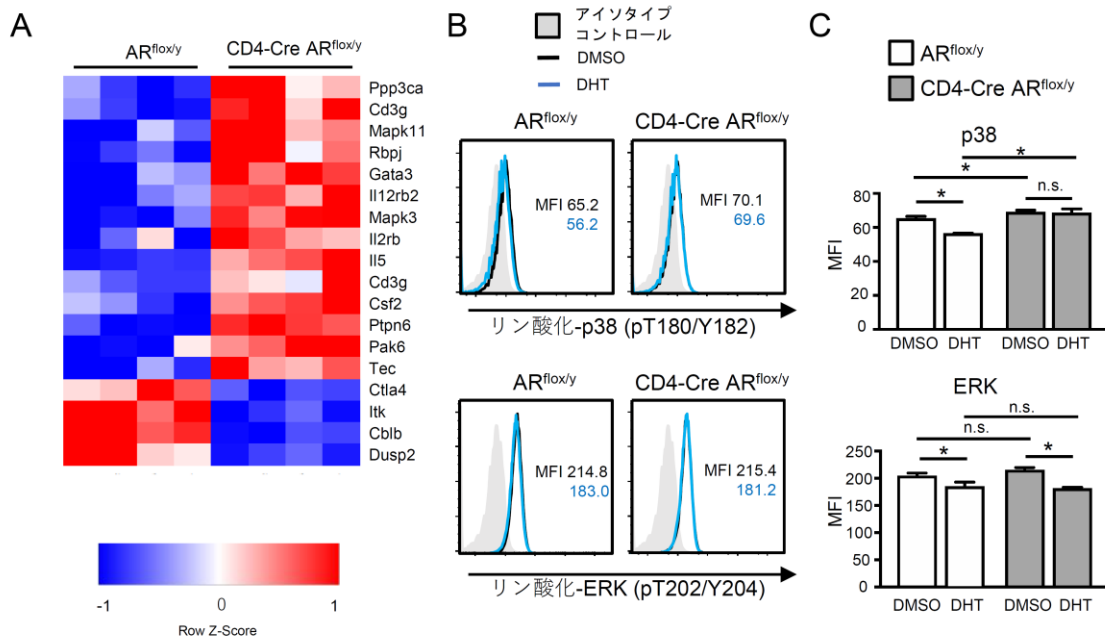


図 18 アンドロゲンは Th2 細胞関連遺伝子の発現を上昇させ、p38 のリン酸化を抑制する

(A) (図 17B) の Th1、Th2 細胞分化と Th17 細胞分化経路に関連する遺伝子のヒートマップ。(B) CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup>Th2 細胞におけるリン酸化 p38 および ERK のフローサイトメトリー解析。(C) リン酸化 p38 および ERK の平均蛍光強度。データは平均±SEM を示す。\* p<0.05、n.s. 有意差なし。

### 3-7 アンドロゲンは *Dusp2* 遺伝子の 5'UTR 領域に結合し転写を上昇させる

DUSP ファミリー遺伝子は MAPK の脱リン酸化因子であり、T 細胞にも発現していることが報告されている(41)。また、本研究での RNA-seq 解析において *Dusp2* 遺伝子の発現が AR 欠損 Th2 細胞で減少していたことから、アンドロゲンが DUSP2 を介して炎症抑制に寄与する可能性が示唆される。そこで、Th2 細胞を DHT で刺激した後の *Dusp2* の発現量を解析した。T 細胞では *Dusp2* のほかに *Dusp1* や *Dusp10* も発現しているため (20)、これらを同時に解析した。コントロール Th2 細胞において、DHT 刺激は *Dusp2* の発現を増加させたが、*Dusp10* や *Dusp1* の発現には影響しなかった (図 19A)。次に、野生型の雌雄マウスのナイーブ CD4 T 細胞における *Dusp2*、*Dusp10*、*Dusp1* の発現量を比較した。その結果、雌よりも雄のナイーブ T 細胞で *Dusp2* がより強く発現していた (図 19B)。したがって、アンドロゲンは AR を介して *Dusp2* 遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

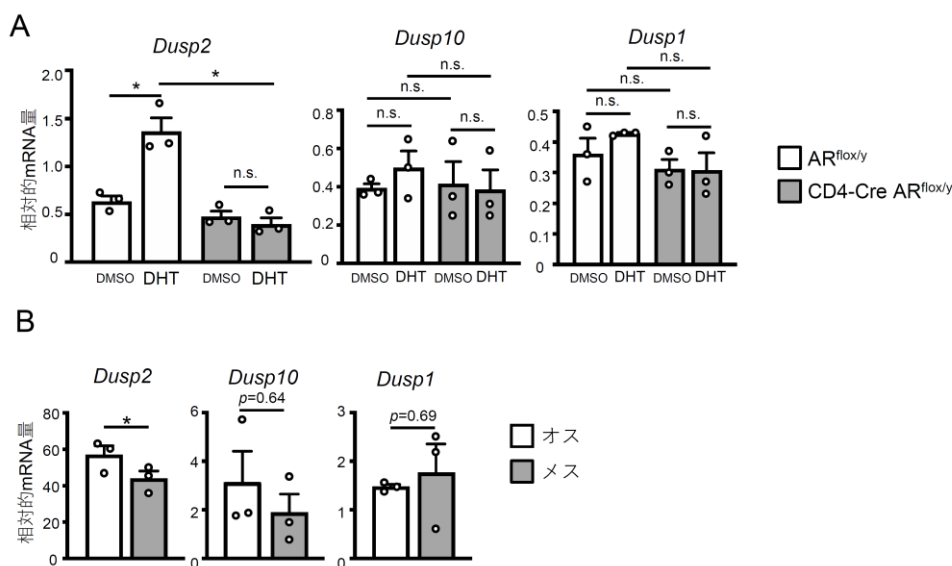


図 19 アンドロゲンは AR を介して *Dusp2* 遺伝子の発現を誘導する

(A) CD4-CreAR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup> マウスから単離した Th2 分化誘導させた細胞を、DHT または DMSO で刺激した後の *Dusp2*、*Dusp10*、*Dusp1* mRNA 量の解析 (n=3)。(B) 野生型の雄および雌マウスのナイーブ CD4 T 細胞における *Dusp2*、*Dusp10*、*Dusp1* mRNA 量の解析 (n=3)。データは平均±SEM を示す。\* p < 0.05、n.s. 有意差なし。

次に、転写因子である AR が *Dusp2* 遺伝子座に結合して *Dusp2* の転写増加に寄与するか調べるために、AR の結合配列 (androgen response element, ARE) が *Dusp2* 遺伝子座に存在するかを ECR Browser を用いて検索した。その結果、5'UTR の領域に ARE に近似した配列を発見した (図 20A)。次に、この領域に AR が結合するかを調べるために ChIP 解析を行った。DHT 刺激後のナイーブ T 細胞の可溶化クロマチンに抗 AR 抗体を添加して、AR が結合する DNA 領域を免疫沈降した。回収した DNA を図 20A の P1 と P2 で示したプライマーにて PCR 増幅した。その結果、コントロール細胞では増幅が観察されたが、AR 欠損 T 細胞ではアイソタイプ抗体を用いた抽出物に比べて、有意な増幅が見られなかった (図 20B)。従って、AR が P1 と P2 プライマーの間の DNA 領域に結合することが示された。

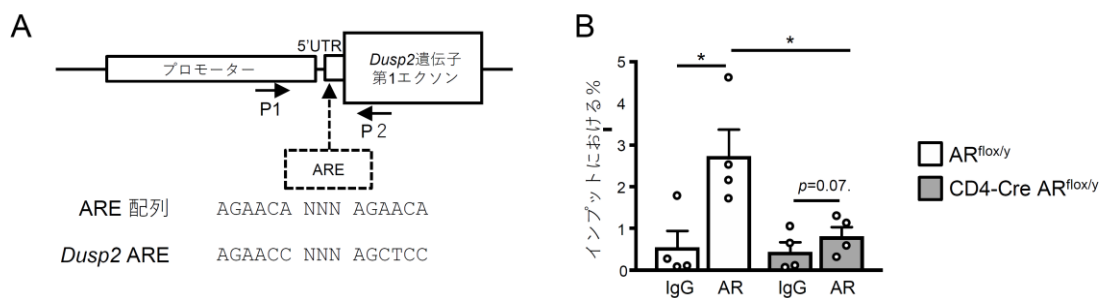


図 20 AR は *Dusp2* 遺伝子の 5'UTR 領域に結合する

(A) *Dusp2* 遺伝子座の概略図と ARE の配列。矢印は ChIP 解析で用いたプライマーを示す。(B) CD4-Cre AR<sup>flox/y</sup> および AR<sup>flox/y</sup> マウスからナイーブ CD4 T 細胞を DHT で刺激し、可溶化クロマチンに抗 AR 抗体を用いて免疫沈降した。精製された DNA を (A) に示す P1 および P2 プライマーを使用して増幅した (n = 4)。データは平均 ± SEM を示す。\* p < 0.05。

さらに、AR が ARE に結合して *Dusp2* 遺伝子の転写を誘導するかを調べるためにレポーター解析を行った。ARE と推定される配列に 2 カ所点変異を導入した *Dusp2* プロモーター/pGL4.10 ベクターを作製した (図 21A)。作製したベクターを pGL4.74 コントロールベクター、AR/pcDNA3 発現ベクターと共に Jurkat 細胞に一過性にトランスフェクトしてレポーターアッセイを行った。DHT 非刺激下では AR/ pcDNA3 発現ベクター依存的なルシフェラーゼ活性は誘導されなかったが、DHT 刺激下において野生型 *Dusp2* プロモーター/pGL4.10 ベクターを導

入すると、AR/ pcDNA3 発現ベクター依存的に活性が上昇した。しかし、変異 *Dusp2* プロモーター/pGL4.10 ベクターは DHT 刺激下においてもルシフェラーゼ活性に変化がなかった (図 21B)。また、野生型 *Dusp2* プロモーター/pGL4.10 ベクターでは AR/ pcDNA3 発現ベクターの濃度依存的にルシフェラーゼ活性が上昇したが、変異 *Dusp2* プロモーター/pGL4.10 ベクターでは変化しなかった (図 21C)。従って、AR は DHT 依存的に 5'UTR の ARE に結合し、*Dusp2* の転写を上昇させることが示唆された。

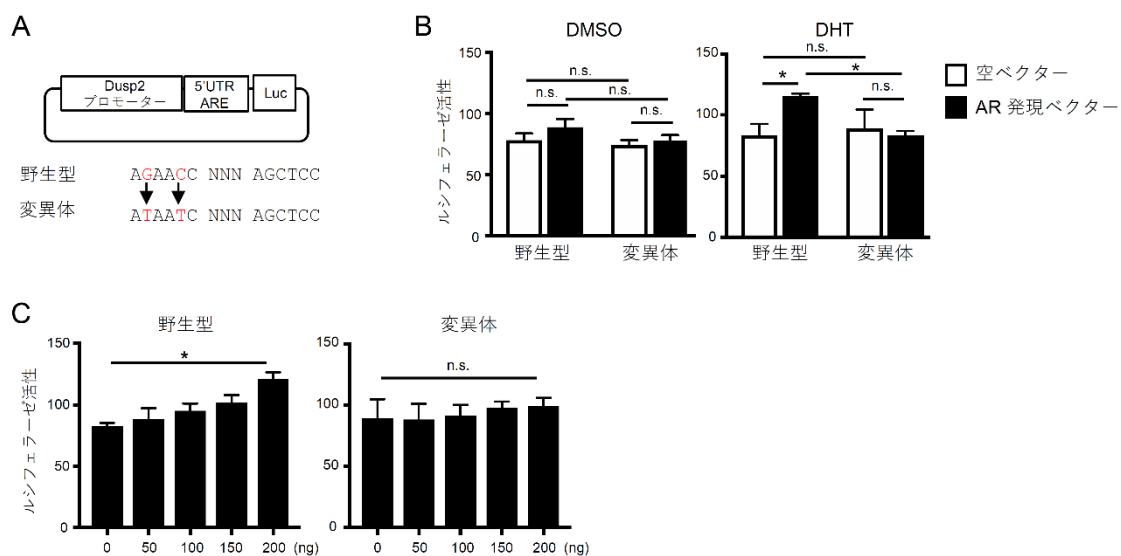


図 21 AR は *Dusp2* 遺伝子の 5'UTR 領域に結合し転写を誘導する

(A) *Dusp2* プロモーター/pGL4.10 ベクターの概略図。(B) Jurkat 細胞に野生型または、変異 *Dusp2* プロモーター/pGL4.10 ベクターを pGL4.74 コントロールベクター、AR/pcDNA3 発現ベクターと共に遺伝子導入した後、DHT または DMSO で刺激した。24 時間後に細胞溶解して、ルシフェラーゼの蛍光を測定した (n=5)。(C) 異なる量の AR/pcDNA3 発現ベクターを用いたレポーターアッセイを (B) と同じ手順で行った (n=5)。データは平均±SEM を示す。\* p<0.05。

最後に、DUSP2 が 2 型サイトカインの産生と Th2 細胞の活性化を抑制するかを調べるために、レトロウイルスを用いて Th2 細胞に DUSP2 を過剰発現させ、2 型サイトカインの産生と Ki67 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。DUSP2 を強制発現した細胞では、IL-4 陽性細胞の割合が減少したが、IL-13 陽性細胞は変化しなかった (図 22A)。また、細胞増殖の指標である Ki67 の陽性細胞の割合が低下した (図 22B,C)。以上の結果から、アンドロゲンが AR を介して DUSP2 の発現を上昇させ、2 型サイトカインの産生と細胞増殖を抑制することが示された。

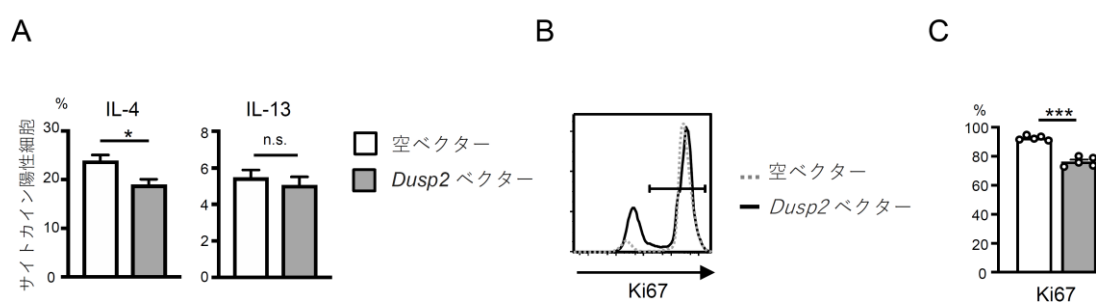


図 22 Th2 細胞に DUSP2 を過剰発現すると IL-4 産生と増殖が抑制される

(A) 分化誘導させて 3 日目の Th2 細胞に *Dusp2* レトロウイルスベクターまたは空レトロウイルスベクターを感染させた。7 日目に PMA とイオノマイシンで再刺激し、フローサイトメトリーで分析した。EGFP 陽性 Th2 細胞におけるサイトカイン産生細胞の頻度。(B) 7 日目のレトロウイルスベクター感染 Th2 細胞における Ki67 のフローサイトメトリー解析。(C) 7 日目のレトロウイルスベクター感染 Th2 細胞における Ki67 の発現頻度。データは平均±SEM を示す。\*  $p < 0.05$ 。

# 第 4 章

## 考察

## 第4章 考察

喘息の患者頻度には性差があり、性ホルモンであるアンドロゲンは喘息を抑制し (42)、エストロゲンは喘息を増強すると報告されてきたが (38)、その詳細な機構は未解明であった。本研究では、最初にダニ抗原を用いたアレルギー性喘息モデルにおいて、雌が雄よりも重度の炎症を発症することを確認した。次に、その原因の一端として T 細胞におけるアンドロゲンのシグナル伝達が重要であることを示した。さらに、アンドロゲンが喘息の慢性化に重要な記憶 Th2 細胞の増殖と IL-5 産生を抑制することを明らかにした。最後に、アンドロゲンが DUSP2 を誘導することで、p38 シグナルを抑制し Th2 細胞による 2 型サイトカイン産生を抑制することを示した。本章では、1) 培養 Th2 細胞における IL-5 産生とウイルス感染の影響について、2) 喘息研究における本研究の位置づけ、3) DUSP2 は Th2 細胞のみならず Th1、Th17 細胞も抑制するのか、4) DUSP2 による 2 型サイトカイン産生の抑制機構、の 4 点に焦点を絞り考察を加える。

### 4-1 培養 Th2 細胞における IL-5 産生とウイルス感染の影響について

本研究で行った記憶 Th2 細胞の解析で、アンドロゲンは記憶 Th2 細胞の IL-5 産生を抑制することが示された (図 16F)。記憶 Th2 細胞には CXCR3<sup>low</sup>CD62L<sup>low</sup> 分画が存在し、IL-5 を多量に産生することが報告されている (43)。従って、アンドロゲンが特異的に CXCR3<sup>low</sup>CD62L<sup>low</sup> の Th2 細胞に作用して IL-5 の産生を抑制する可能性があるため、この分画に焦点を当てたより詳細な解析が必要である。また、培養した Th2 細胞に DHT 刺激を加えると、IL-4、IL-13 産生が共に抑制された (図 13C)。しかし、この培養方法は IL-5 が産生されない系であるため、AR による IL-5 抑制機構を検証できていない。そのため、他の培養方法も検討する必要がある。加えて、Th2 細胞への DUSP2 過剰発現の実験では IL-4 産生のみが抑制され、IL-13 産生は変化しないという結果となった (図 22A)。過剰発現なしの Th2 細胞分化では IL-4 は 40~60%、IL-13 は 30~60%程度産生される (図 13C)。しかし、Dusp2 を過剰発現させることで、IL-4 は 20%、IL-13 は 5%に減少した (図 22A)。従って、過剰発現によるサイトカイン産生の低下が原因で、変化が見えなくなっている可能性も考えられる。それ故、生体内で過剰発現させ、喘息を誘導したときに 2 型サイトカイン産生が減少するか確認する必要がある。また、本研究で同定した ARE に変異を加えたマウスを作製し、気道炎



症を誘導して病状を解析することも必要である。

#### 4-2 喘息研究における本研究の位置づけ

先行研究では、去勢、全身性 AR 欠損マウス、またはマクロファージ特異的 AR 欠損マウスを用いて喘息モデルにおけるアンドロゲンの役割が報告されている。本研究は、T 細胞特異的 AR 欠損マウスを使用して、喘息モデルにおけるアンドロゲンの T 細胞に対する直接的な作用を実証した最初の研究である。加えて、エストロゲンではなくアンドロゲンが Th2 細胞のサイトカイン産生を抑制することを発見した。しかし、女性の喘息の有病率は思春期以降徐々に増加するため、エストロゲンも喘息の発症に何らかのプラスの影響を与える可能性が推察される。一般に、呼吸機能はエストロゲン濃度が最も高くなる月経周期の後期卵胞期に悪化する (38)。同様に、エストロゲンを含む経口避妊薬の使用は、喘息の症状を悪化させることが報告されている (38)。特に、ER $\beta$ は肺と卵巣で高度に発現しており、ER $\beta$ 欠損マウスは肺機能障害を示す (44)。従って、アンドロゲンとエストロゲンは喘息において異なる作用機序を持っている可能性があるため、ER を発現する気道上皮細胞など気道周辺の細胞の解析を行うことが必要である。

#### 4-3 DUSP2 は Th2 細胞のみならず Th1、Th17 細胞の機能も抑制するのか

先行研究では DUSP2 が STAT3 を脱リン酸化することで、Th17 細胞の分化を抑制することが報告されている(20)。本実験で T 細胞特異的 AR 欠損マウスに気道炎症を誘導すると IFN- $\gamma$ は変化しなかったが、IL-17A の産生が上昇していたことから、AR が喘息において Th17 細胞分化を抑制する可能性も考えられる。また、実際に本研究で行った RNA-seq の KEGG 解析において Th1 細胞や Th17 細胞の分化に関与する遺伝子群に変動が確認された。DUSP2 は T 細胞で高度に発現しており TCR 刺激後にその発現が高くなることから(20)、Th2 細胞以外への分化の影響についても十分に関与が考えられるため、より詳細な実験を行う必要がある。加えて、2 型サイトカインが優位な疾患においてのみ DUSP2 の抑制機構が認められるのか、それとも他の疾患でも DUSP2 による T 細胞の抑制がかかるのかを、Th1 や Th17 細胞でのアンドロゲン刺激や DUSP2 の過剰発現を、2 型サイトカイン以外が優位な疾患モデルなどの実験系にて検証する必要がある。

#### 4-4 DUSP2 による 2 型サイトカイン産生の抑制機構

GATA3 は Th2 細胞のマスター転写因子であり、2 型サイトカインの産生を促進する (10)。先行研究から、CD4 T 細胞が抗原刺激を受けた際に、GATA3 は p38 によってリン酸化され、インポーチン $\alpha$ によって細胞質から核に輸送されることが報告されており (45)、GATA3 の核輸送が p38 のセリン残基のリン酸化に依存すると考えられる。本実験で、アンドロゲンが p38 の脱リン酸化因子である DUSP2 の発現を上昇させることを見出した。この結果から、アンドロゲン-AR-DUSP2-p38-GATA3 という経路の存在が想定される。この機構が働いた場合、DUSP2 を過剰発現した際には GATA3 のリン酸化が低下するはずであるので、検証する必要がある。

また、実際に喘息の治療薬として使用される糖質コルチコイドは GR に結合後に核に移行し、炎症性遺伝子の発現を抑えることで喘息の症状を抑制するとともに(46, 47)、GR がインポーチン $\alpha$  に結合し GATA3 の核への移行を阻害することで病状悪化を防いでいる。さらに、GR は p38 を脱リン酸化する DUSP-1 の発現を増加させ (22)、p38 による GATA3 のリン酸化を抑制する。DUSP1 と DUSP2、GR と AR はそれぞれ類似した構造を持つため、AR-DUSP2 経路は GR-DUSP1 経路と同等の喘息抑制の効力を発揮している可能性もある。

#### 4-5 総括

本研究では、アンドロゲンが AR-DUSP2-p38 経路によって T 細胞の 2 型サイトカイン発現を抑制する機序を示した (図 23)。これは、アンドロゲンを使用した喘息治療薬の開発につながる可能性がある。実際、アンドロゲンの投与によりマウスの喘息症状が緩和するとの報告がある (48)。臨床試験では、アンドロゲンの一種であるデヒドロエピアンドロステロン 3 硫酸塩の投与により喘息の症状が緩和される。しかし、男性ホルモンであるアンドロゲンを女性に投与することの弊害や、アンドロゲンの長期投与の安全性は証明されていない (3)。本研究で明らかになった Th2 細胞における AR-DUSP2-p38 経路が将来的に喘息の新しい治療標的になる可能性がある。

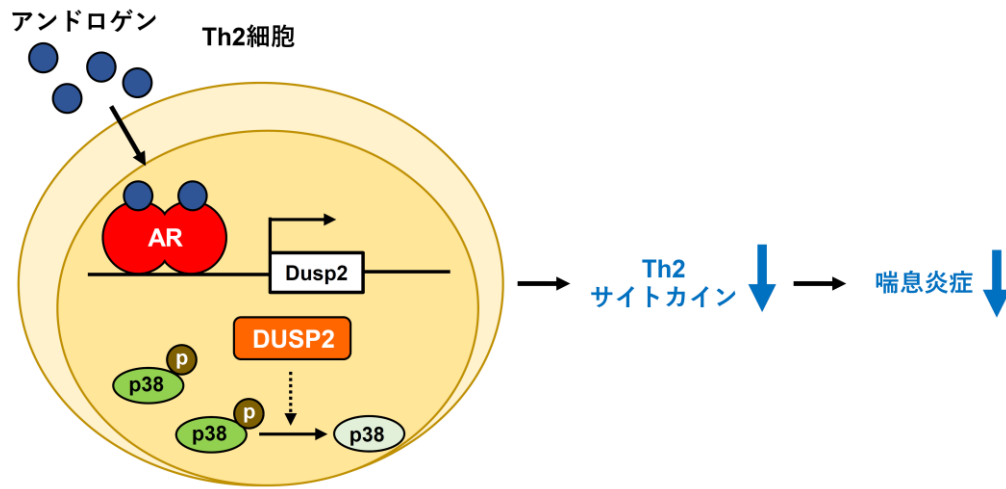


図 23 AR を介した喘息抑制メカニズムの模式図

## 引用文献

1. Yang, C., J. Jin, Y. Yang, H. Sun, L. Wu, M. Shen, X. Hong, W. Li, L. Lu, D. Cao, X. Wang, J. Sun, Y. Ye, B. Su, and L. Deng. 2022. Androgen receptor-mediated CD8(+) T cell stemness programs drive sex differences in antitumor immunity. *Immunity* 55: 1268-1283.e1269.
2. Sakiani, S., N. J. Olsen, and W. J. Kovacs. 2013. Gonadal steroids and humoral immunity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9: 56-62.
3. Wenzel, S. E., C. B. Robinson, J. M. Leonard, and R. A. Panettieri, Jr. 2010. Nebulized dehydroepiandrosterone-3-sulfate improves asthma control in the moderate-to-severe asthma results of a 6-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy Asthma Proc.* 31: 461-471.
4. Ngo, S. T., F. J. Steyn, and P. A. McCombe. 2014. Gender differences in autoimmune disease. *Front. Neuroendocrinol.* 35: 347-369.
5. Carey, M. A., J. W. Card, J. W. Voltz, S. J. Arbes, Jr., D. R. Germolec, K. S. Korach, and D. C. Zeldin. 2007. It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 18: 308-313.
6. Pennell, L. M., C. L. Galligan, and E. N. Fish. 2012. Sex affects immunity. *J. Autoimmun.* 38: J282-291.
7. Gottlieb, B., R. Lombroso, L. K. Beitel, and M. A. Trifiro. 2005. Molecular pathology of the androgen receptor in male (in)fertility. *Reproductive biomedicine online* 10: 42-48.
8. Liva, S. M., and R. R. Voskuhl. 2001. Testosterone acts directly on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to increase IL-10 production. *J. Immunol.* 167: 2060-2067.
9. Kovats, S. 2015. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* 294: 63-69.
10. Zheng, W., and R. A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89: 587-596.
11. Rosenberg, H. F., K. D. Dyer, and P. S. Foster. 2013. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 9-22.
12. Nussbaum, J. C., S. J. Van Dyken, J. von Moltke, L. E. Cheng, A. Mohapatra, A. B. Molofsky, E. E. Thornton, M. F. Krummel, A. Chawla, H. E. Liang, and R. M. Locksley. 2013. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 502: 245-248.

13. Aman, M. J., N. Tayebi, N. I. Obiri, R. K. Puri, W. S. Modi, and W. J. Leonard. 1996. cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor  $\alpha$  chain. *J. Biol. Chem.* 271: 29265-29270.
14. Pope, S. M., E. B. Brandt, A. Mishra, S. P. Hogan, N. Zimmermann, K. I. Matthaei, P. S. Foster, and M. E. Rothenberg. 2001. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 594-601.
15. Takayama, G., K. Arima, T. Kanaji, S. Toda, H. Tanaka, S. Shoji, A. N. McKenzie, H. Nagai, T. Hotokebuchi, and K. Izuhara. 2006. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 98-104.
16. Becerra-Díaz, M., A. B. Strickland, A. Keselman, and N. M. Heller. 2018. Androgen and androgen receptor as enhancers of M2 macrophage polarization in allergic lung inflammation. *J. Immunol.* 201: 2923-2933.
17. Keselman, A., X. Fang, P. B. White, and N. M. Heller. 2017. Estrogen signaling contributes to sex differences in macrophage polarization during asthma. *J. Immunol.* 199: 1573-1583.
18. Gandhi, V. D., J. Y. Cephus, A. E. Norlander, N. U. Chowdhury, J. Zhang, Z. J. Ceneviva, E. Tannous, V. V. Polosukhin, N. D. Putz, N. Wickersham, A. Singh, L. B. Ware, J. A. Bastarache, C. M. Shaver, H. W. Chu, R. S. Peebles, Jr., and D. C. Newcomb. 2022. Androgen receptor signaling promotes Treg suppressive function during allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 132: e153397.
19. Lommatzsch, M., and J. C. Virchow. 2014. Severe asthma: definition, diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 111: 847-855.
20. Lu, D., L. Liu, X. Ji, Y. Gao, X. Chen, Y. Liu, Y. Liu, X. Zhao, Y. Li, Y. Li, Y. Jin, Y. Zhang, M. A. McNutt, and Y. Yin. 2015. The phosphatase DUSP2 controls the activity of the transcription activator STAT3 and regulates Th17 differentiation. *Nat. Immunol.* 16: 1263-1273.
21. Nabe, T. 2020. Steroid-resistant asthma and neutrophils. *Biol. Pharm. Bull.* 43: 31-35.
22. Hirose, I., A. Kanda, K. Noda, and S. Ishida. 2019. Glucocorticoid receptor inhibits Müller glial galectin-1 expression via DUSP1-dependent and -independent deactivation of AP-1 signalling. *J. Cell. Mol. Med.* 23: 6785-6796.
23. Seternes, O. M., A. M. Kidger, and S. M. Keyse. 2019. Dual-specificity MAP kinase phosphatases in health and disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1866: 124-143.

24. Bolton, E. C., A. Y. So, C. Chaivorapol, C. M. Haqq, H. Li, and K. R. Yamamoto. 2007. Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes Dev.* 21: 2005-2017.
25. Cleutjens, C. B., K. Steketee, C. C. van Eekelen, J. A. van der Korput, A. O. Brinkmann, and J. Trapman. 1997. Both androgen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specific antigen expression, but differ in their growth-stimulating properties of LNCaP cells. *Endocrinology* 138: 5293-5300.
26. Lee, P. P., D. R. Fitzpatrick, C. Beard, H. K. Jessup, S. Lehar, K. W. Makar, M. Pérez-Melgosa, M. T. Sweetser, M. S. Schlissel, S. Nguyen, S. R. Cherry, J. H. Tsai, S. M. Tucker, W. M. Weaver, A. Kelso, R. Jaenisch, and C. B. Wilson. 2001. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15: 763-774.
27. Shiina, H., T. Matsumoto, T. Sato, K. Igarashi, J. Miyamoto, S. Takemasa, M. Sakari, I. Takada, T. Nakamura, D. Metzger, P. Chambon, J. Kanno, H. Yoshikawa, and S. Kato. 2006. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 224-229.
28. Dupont, S., A. Krust, A. Gansmuller, A. Dierich, P. Chambon, and M. Mark. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127: 4277-4291.
29. Antal, M. C., A. Krust, P. Chambon, and M. Mark. 2008. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ER  $\beta$ -null mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 2433-2438.
30. Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17-27.
31. Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
32. Kim, D., B. Langmead, and S. L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 12: 357-360.
33. Liao, Y., G. K. Smyth, and W. Shi. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30: 923-930.
34. Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139-140.
35. Ge, S. X., D. Jung, and R. Yao. 2020. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment

- tool for animals and plants. *Bioinformatics* 36: 2628-2629.
36. Tani-Ichi, S., K. Wagatsuma, T. Hara, G. Cui, S. Abe, H. Miyachi, S. Kitano, and K. Ikuta. 2020. Innate-like CD27<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup>  $\gamma\delta$  T Cells Require TCR Signaling for Homeostasis in Peripheral Lymphoid Organs. *J. Immunol.* 204: 2671-2684.
  37. Pear, W. S., J. P. Miller, L. Xu, J. C. Pui, B. Soffer, R. C. Quackenbush, A. M. Pendergast, R. Bronson, J. C. Aster, M. L. Scott, and D. Baltimore. 1998. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 92: 3780-3792.
  38. Keselman, A., and N. Heller. 2015. Estrogen signaling modulates allergic inflammation and contributes to sex differences in asthma. *Front. Immunol.* 6: 568.
  39. Yamamoto, T., Y. Endo, A. Onodera, K. Hirahara, H. K. Asou, T. Nakajima, T. Kanno, Y. Ouchi, S. Uematsu, H. Nishimasu, O. Nureki, D. J. Tumes, N. Shimojo, and T. Nakayama. 2018. DUSP10 constrains innate IL-33-mediated cytokine production in ST2(hi) memory-type pathogenic Th2 cells. *Nat. commun.* 9: 4231.
  40. Maekawa, Y., C. Ishifune, S. Tsukumo, K. Hozumi, H. Yagita, and K. Yasutomo. 2015. Notch controls the survival of memory CD4<sup>+</sup> T cells by regulating glucose uptake. *Nat. Med.* 21: 55-61.
  41. Lang, R., M. Hammer, and J. Mages. 2006. DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J. Immunol.* 177: 7497-7504.
  42. Laffont, S., E. Blanquart, M. Savignac, C. Cénac, G. Laverny, D. Metzger, J. P. Girard, G. T. Belz, L. Pelletier, C. Seillet, and J. C. Guéry. 2017. Androgen signaling negatively controls group 2 innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 214: 1581-1592.
  43. Endo, Y., C. Iwamura, M. Kuwahara, A. Suzuki, K. Sugaya, D. J. Tumes, K. Tokoyoda, H. Hosokawa, M. Yamashita, and T. Nakayama. 2011. Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3. *Immunity* 35: 733-745.
  44. Siegfried, J. M., P. A. Hershberger, and L. P. Stabile. 2009. Estrogen receptor signaling in lung cancer. *Semin. Oncol.* 36: 524-531.
  45. Maneechotesuwan, K., Y. Xin, K. Ito, E. Jazrawi, K. Y. Lee, O. S. Usmani, P. J. Barnes, and I. M. Adcock. 2007. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J. Immunol.* 178: 2491-2498.
  46. Barnes, P. J. 2006. How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture 2005. *Br. J. Pharmacol.* 148: 245-254.

47. Rhen, T., and J. A. Cidlowski. 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 353: 1711-1723.
48. Liou, C. J., and W. C. Huang. 2011. Dehydroepiandrosterone suppresses eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness via modulation of chemokines and Th2 cytokines in ovalbumin-sensitized mice. *J. Clin. Immunol.* 31: 656-665.



## 謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導いただきました医生物学研究所免疫制御分野の生田宏一教授と研究室の皆様、並びに組織恒常性システム分野の豊島文子教授に心より感謝申し上げます。また、CD4-Cre トランスジェニックマウスを分与いただいた Christopher B. Wilson 博士 (Bill and Melinda Gates Foundation)、AR-flox マウスを分与いただいた医療創生大学の加藤茂明博士、気道圧の測定実験を行っていただいた京都大学医学研究科の佐藤晋博士に重ねて感謝申し上げます。加えて、本論文をご精読頂き、貴重なご意見を頂戴しました野田岳志教授ならびに木村郁夫教授、高原和彦准教授に深謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

## 著者名

Ejima, A., Abe, S., Shimba, A., Sato, S., Uehata, T., Tani-ichi, S., Munakata, S., Cui, G., Takeuchi, O., Hirai, T., Kato, S., and Ikuta, K.

## 論文題目

Androgens alleviate allergic airway inflammation by suppressing cytokine production in Th2 cells

## 雑誌名

*The Journal of Immunology*, 2022, 209: 1083-1094.