

厚生科学研究研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と  
難治化の予防・治療法の開発に関する研究 (12130301)

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 晶夫

平成 13 (2001) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と 難治化の予防・治療法の開発に関する研究	1
森 晶夫	

### II. 分担研究報告書

1. 気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と 難治化の予防・治療法の開発に関する研究	4
森 晶夫	
2. 気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と 難治化の予防・治療法の開発に関する研究	7
高橋 清	
3. 成人難治性喘息の病態・機序、細胞要因	10
庄司俊輔	
4. 気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と 難治化の予防・治療法の開発に関する研究	13
相沢久道	
5. アトピー喘息と非アトピー喘息に共通した 免疫学的パラメーターの解析	16
柳原行義	
6. 小児気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と 難治化の予防・治療法の開発に関する研究	19
赤坂 徹	
7. 好酸球性炎症成立機序の解明に関する研究:三次元培養 気道上皮を用いた好酸球浸潤の新しい実験モデル作成	21
藤澤隆夫	
8. 気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と 難治化の予防・治療法の開発に関する研究—喘息に 関連する遺伝子多型の解析—	24
大田 健	

## 気管支喘息の難治化の病態機序の解明と難治化の予防・治療法開発に関する研究

主任研究者 森 晶夫 (国立相模原病院臨床研究センター室長)

### 分担研究者

高橋 清 (国立療養所南岡山病院院長) 赤坂 徹 (国立療養所盛岡病院臨床研究部長)  
庄司俊輔 (国立療養所南福岡病院副院長) 相沢久道 (国立療養所福岡東病院臨床研究部長)  
柳原行義 (国立相模原病院臨床研究センター室長) 藤澤隆夫 (国立療養所三重病院アレルギー科医長)  
大田 健 (帝京大学医学部内科教授)

### 研究協力者

秋山一男 (国立相模原病院臨床研究センター部長) 長谷川真紀 (国立相模原病院診療部長)  
谷口正実 (国立相模原病院臨床研究センター室長) 木村輝明 (昭和大学第一内科助手)  
岡田千春 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医長) 金廣有彦 (岡山大学第2内科助手)  
木村五郎 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医師) 谷本 安 (岡山大学第2内科助手)  
増田 敬 (国立療養所盛岡病院アレルギー科医長) 和田博泰 (国立療養所盛岡病院副院長)  
黒沼忠由樹 (国立療養所岩木病院小児科医長) 白崎和也 (国立療養所秋田病院小児科医長)  
福田 健 (獨協医科大学アレルギー呼吸器科教授) 沼尾利郎 (獨協医科大学アレルギー呼吸器科講師)  
梶原景一 (国立相模原病院臨床研究センター) 山本尚美 (国立相模原病院臨床研究センター)  
生澤公一 (国立相模原病院臨床研究センター) 森嶋大貴 (国立相模原病院臨床研究センター)  
品澤美樹 (国立相模原病院臨床研究センター) 前田尚子 (国立相模原病院臨床研究センター)  
森田 寛 (東京大学医学部付属病院呼吸器内科助教授)  
平井浩一 (東京大学医学部大学院医学系研究科生体防御機能学客員助教授)  
羅 智靖 (順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター助教授)  
太田康男 (東京大学医学部付属病院感染内科助手) 山下直美 (帝京大学医学部内科助教授)  
石井 彰 (東京大学医学部付属病院呼吸器内科助手) 上原誉志夫 (東京大学保健管理センター助教授)  
土屋尚之 (東京大学医学部大学院医学系研究科人類遺伝学助教授)  
越野 健 (東京大学医学部付属病院呼吸器内科助手) 山本寿子 (帝京大学医学部内科研究生)  
中島幹夫 (帝京大学医学部内科助手)

### 研究要旨

難治性喘息に関与する抗原、免疫応答、好酸球浸潤、リモデリング、合併症、遺伝子多型の諸要因を解析した結果、1) T細胞レベルのステロイド感受性低下(抵抗性)が関与すること、2) IL-13がアトピー型、非アトピー型両病型の喘息で重症化に関与していること、3) III型、IV型コラーゲンの産生パターンで創傷治癒過程が異なること、4) IgE抗体を介さないリンパ球の活性化が難治性喘息の原因となること、5) 難治性の対極に位置する寛解には、少なくとも複数の遺伝子多型が関与すること、6) 非アトピー性喘息患者では、客観的な気道狭窄の評価を行い、十分な治療を行うことが難治化の予防につながることを明らかにした。また、7) 上皮細胞の極性、好酸球浸潤の方向性を実際の気道組織に一致させて、喘息の気道炎症に類似した好酸球浸潤を実験室内で観察すること、8) 小児難治性喘息の調査に向けた土台が構築された。ステロイドの効果不全をきたす分子機構の解明は、難治性喘息のみならず他のステロイド抵抗性の難治性炎症疾患(リウマチ、SLE、自己免疫性血管炎等)の病態解明・治療法開発に道をひらくもので医学的意義が大きい。

#### A. 研究目的

気管支喘息の本態が好酸球性炎症にあることが近年解明され、吸入ステロイドを主とする抗炎症療法が普及した結果、軽症喘息症例に対しては比較的十分な予後、QOLの向上がもたらされた。一方、中等症ないし重症の喘息患者に対する治療効果は、未だ満足な水準に達していない。経口ステロイド薬を常時使用する必要のある難治性喘息患者は、喘息死の予備軍とも位置づ

けられ、喘息分野に残された最大の課題である。必ずしも近年の治療成績向上の恩恵には浴していないこと、頻回の救急受診・長期入院・社会不適応を理由とする医療・厚生費に占める比重の高いことが指摘されている。喘息難治化の病態・発症機序の解明、有効な治療法・予防法の開発は、気管支喘息診療に携わる医療関係者に渴望されている。喘息の重症・難治化プロセスには、1) 喘息自体の重症化、2) 合併症、増悪因子

の関与が指摘されている。1) の要因としては、a) より高度な炎症の持続、b) 炎症に引き続くかあるいは全く independent な組織学的・機能的変化があげられ、結果として臨床的なステロイド低応答性がもたらされるものと考えられる。a) の観点から、T・B細胞を中心とした細胞性免疫異常機転に関する研究を森、柳原らが、起因抗原と免疫応答の解析を高橋らが、その下流に位置する effector phase の好酸球過剰活性化の解明を藤沢らが分担する。b) では気道リモデリングの解析を庄司らが、呼吸生理学的解析を相沢らが分担する。2) における最大要因とされる肺気腫合併の病態を相沢らが解析した。加えてこれらの病理学的、生物学的な異常の背景にある遺伝因子の可能性について、大田らが難治化の対極に位置する寛解の遺伝要因との比較において解析する。小児喘息における難治性は成人喘息とは異なる見地から規定されるが、赤坂らは小児難治性喘息の今日的定義、その要因、病態を解析する。

## B. 方法

難治性喘息の概念は、治療法の進歩を加味して変遷するものと考えられるが、本研究班では、高用量吸入ステロイドに加え、年間を通じて prednisolone 換算 10 mg/day 以上の全身性ステロイド投与を必要とする症例を definitive な難治性喘息と捉えた。高用量吸入ステロイドに加えて全身性ステロイド（量は問わず）を常用する症例についてもより広範囲の難治群と考へ、重症・難治化の要因、機序の解析対象とした。

1) 森（主任研究者）らによる難治性喘息における T リンパ球機能異常の関与を明らかにする研究では、気道炎症に必須のサイトカイン IL-5 の産生亢進を明らかにし、さらに、クローンレベルで *in vitro* において T 細胞のステロイド抵抗性を解析しうるモデルシステムを構築した。

2) 柳原（国立相模原病院）らによるアトピー喘息と非アトピー喘息に共通な免疫学的パラメーターの同定に関する研究においては、IL-5 以外の Th2 サイトカイン関連因子として、血清中の可溶性 IL-4 受容体  $\alpha$  鎖 (sIL-4R $\alpha$ )、T 細胞の IL-4、IL-13 産生能および遺伝子多型について解析し、重症喘息群、軽症喘息群の間で比較した。

3) 藤沢（国立療養所三重病院）らによる好酸球性炎症成立機序の解明に関する研究においては、気管支喘息の重症度と概ね併行する好酸球の組織浸潤を *in vivo* に近い状態で再現しうる三次元培養気道上皮を用いたモデルシステムを構築し、高度な好酸球浸潤をきたす機構の解明を試みた。炎症細胞浸潤に重要と考えられるケモカインについても重症喘息群と軽症喘息群の間で比較した。

4) 庄司（国立療養所南福岡病院）らによる成人難治性喘息の病態・機序、細胞要因の研究においては、難

治性喘息の炎症反応が正常な組織修復に向かわず、非可逆的な組織学的変化をきたす機構について、気道上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞の遊走システムで解析した。

5) 高橋（国立療養所南岡山病院）らによる難治性喘息における IgE 非依存性リンパ球活性化機構の研究においては、末梢血単核球をダニ、カンジダ、アスペルギルス抗原と培養し、propidium iodide 取り込みにより FACSCalibur にて細胞周期を解析した。同時に、培養上清のサイトカインを測定した。

6) 相沢（国立療養所福岡東病院）らによる肺気腫合併喘息の研究においては、気道過敏性（アストグラフ法にて PD35-Grs を指標とした）、肺機能（肺気量分画、スパイログラム）、誘発喀痰、呼気中 NO を解析し、肺気腫のない喘息症例と肺気腫を合併した喘息症例での重症度（気道過敏性、肺機能）の比較を行った。また、喘息患者の呼吸生理学的研究では、アストグラフ法による気道過敏性測定時に Borg Scale による呼吸苦を記録し、気道収縮と自覚的呼吸苦の関連について検討した。気道収縮の進行に比例して呼吸苦を自覚する症例と、気道収縮の進行に関わらず呼吸苦の自覚が遅れる症例について、喘息の重症度、治療歴、重症発作の既往等につき比較した。気道過敏性の測定前後（気道収縮の程度の差）で聴診所見の差を検討した。

7) 大田（帝京大学内科）らによる気管支喘息の難治化・寛解に関係する遺伝子多型の研究においては、成人喘息症例、成人の小児喘息寛解症例、小児喘息症例、成人難治性喘息症例、健常人を対象に、単核球分画より DNA を採取し、アレルギー反応の面から Fc $\epsilon$ RI 遺伝子の多型、気道炎症の側面からトロンボキサン合成酵素遺伝子 (TXAS) の多型、ケモカイン受容体として CCR3 および CCR4 各遺伝子の多型、気道過敏性の面からムスカリンおよびヒスタミン受容体遺伝子の多型を検討した。

8) 赤坂（国立療養所盛岡病院）らによる小児気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と難治化の予防・治療法の開発に関する研究においては、日本小児アレルギー学会所属の専門医を対象に難治性喘息の定義と難治化の要因の調査を実施した。また、反復入院症例の臨床的解析を行った。

9) 難治性喘息の全国規模の患者疫学調査に向けて、本研究グループ内で難治性喘息の定義、診断基準案を検討した。

### （倫理面への配慮）

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査においては、インフォームドコンセントを徹底するとともに、ヘルシンキ宣言を遵守するものとした。各研究者の施設ごとに倫理委員会の承認を得ている。

### C. 結果およびD. 考察

- 1) 難治性喘息症例では、高用量吸入ステロイド+経口ステロイドの投与に拘わらず、末梢血 Th 細胞の IL-5 産生亢進を認めた。in vitro の dexamethasone 感受性には差がないことから、T 細胞に intrinsic な異常が存在するとは考えにくい。クローンレベルで、CD28 シグナルによりステロイド抵抗性が誘導されることから、costimulatory molecules によって臨床的なステロイド感受性が調節される可能性が示唆された。
- 2) 血清 sIL-4R $\alpha$  値、末梢血 T 細胞 IL-13 産生能はアトピー型、非アトピー型喘息に共通して健常者に比較して高値で、しかも重症例においてより高値を示した。IL-4 産生能はアトピー型喘息群においてのみ高値であった。IL-13 の 110Arg-Gln 多型において、Gln 型の頻度がアトピー喘息群と非アトピー喘息群で高く、重症喘息の頻度がより高かった。
- 3) コラーゲンゲル上に上皮細胞を培養し、基底膜から管腔方向への好酸球遊走を解析しうる三次元培養気道上皮システムを構築した。上皮細胞をサイトカイン (TNF、IL-4) で刺激するとさらに遊走が増強された。この遊走には上皮細胞から下室方向に産生遊離された Eotaxin、RANTES などのケモカイン (CCR3 リガンド) と上皮細胞が産生する IV 型コラーゲンが関与することが明らかになった。
- 4) 創傷治癒過程で組織中に産生されるコラーゲンのうち、IV 型コラーゲンに対しては気道上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の何れもが遊走活性を示すが、III 型コラーゲンに対しては全く遊走しなかった。I 型コラーゲンに対しては、気道上皮細胞と線維芽細胞は遊走したが、血管内皮細胞は遊走しなかった。気管支喘息患者および健常人 BAL 液には、これらの細胞に対する遊走活性は認められなかった。
- 5) 気管支喘息群では、健常群に比しダニ、カンジダに対するリンパ球の活性化亢進を認めた。ダニとカンジダに対するリンパ球活性化には正の相関が認められたが、ダニ、カンジダに対する IgE 抗体の存在とは相関はなかった。サイトカイン産生の検討では、ダニ刺激では IL-4、IL-5、INF- $\gamma$  の産生亢進を、カンジダ刺激では IL-5、INF- $\gamma$  の産生亢進を認めた。IgE 抗体を介さないダニや真菌類によるアレルギー炎症の経路があることを示唆するものと考えられる。
- 6) 肺気腫の合併により気道炎症の程度には変化はないが、より高度な気道狭窄、気道過敏性の亢進が認められ、気管支喘息の難治化に関与すると考えられた。喘息患者において、呼吸困難感と気道狭窄との間には相関はなく、個々の症例により呼吸困難の感受性が異なること、重症発作の既往のある症例では、呼吸困難の感受性が低いことがわかった。
- 7) Fc $\epsilon$ RI 遺伝子 Glu237Gly 多型の頻度が非寛解例で高く、寛解例では正常人と同等の頻度であった。TXAS 遺伝子近傍に位置する D7S684 マーカーの CA

repeats 多型のうち非寛解例では CA24 ホモ多型が多く、寛解例では少なかった。喘息の発症、寛解、継続にこれらの遺伝子多型が関与する可能性が示唆された。

- 8) 小児喘息における難治化には、大発作の反復、抗原への大量暴露、感染、気胸などの合併症、治療薬、やる気のなさ、無理解、学業不振、保護者、心理的ストレス、家族関係、学校での人間関係等の諸因子が、子供の年齢層に応じて関与するものと考えられた。我が国の小児喘息専門医は、テオフィリン、経口抗アレルギー薬、DSCG、吸入ステロイド薬を「通常の療法」と認識しており、これらで効果のみられない症例群が難治性と判定される傾向であった。

### E. 結論

難治性喘息は heterogenous な集団であり、多彩な要因の関与が窺われる。本研究班によって抗原レベル、免疫細胞レベル、好酸球レベル、リモデリング、合併症の諸要因が解析された結果、1) T 細胞レベルのステロイド感受性低下 (抵抗性) が関与すること、2) IL-13 がアトピー型、非アトピー型両病型の喘息で重症化に関与していること、3) III 型、IV 型コラーゲンの産生パターンで創傷治癒過程が異なること、4) IgE 抗体を介さないリンパ球の活性化が難治性喘息の原因となること、5) 難治性の対極に位置する寛解には、少なくとも複数の遺伝子多型が関与すること、6) 非アトピー性喘息患者では、客観的な気道狭窄の評価を行い、十分な治療を行うことが難治化の予防につながることを指摘された。また、7) 上皮細胞の極性、好酸球浸潤の方向性を実際の気道組織に一致させて、喘息の気道炎症に類似した好酸球浸潤を実験室内で観察すること、8) 小児難治性喘息の調査に向けた土台が構築された。難治性喘息に関与する複合的諸要因を網羅的に追究する本研究班において、我が国の現時点における難治性喘息の理解を確立し、臨床アレルギー学的、免疫学的、細胞生物学的、遺伝学的アプローチを行って、シグナル伝達分子、遺伝子転写機構などの生物学的異常機構を解明し、予防、治療への突破口を見出したい。ステロイドの効果不全をきたす分子機構の解明は、難治性喘息のみならず他のステロイド抵抗性の難治性炎症疾患 (リウマチ、SLE、自己免疫性血管炎等) の病態解明・治療法開発に道をひらくもので医学的意義が大きい。

## 気管支喘息の難治化の病態機序の解明と難治化の予防・治療法開発に関する研究

主任研究者 森 晶夫 国立相模原病院臨床研究センター先端技術開発研究部分子生物学研究室長

### 研究協力者

秋山一男 (国立相模原病院臨床研究センター部長) 長谷川真紀 (国立相模原病院診療部長)  
前田裕二 (国立相模原病院臨床研究センター室長) 谷口正実 (国立相模原病院臨床研究センター室長)  
木村輝明 (昭和大学第一内科助手)

### 研究要旨

難治性喘息は heterogenous な集団により構成される。IL-5 高産生持続群では、*in vivo* における T 細胞レベルのステロイド感受性の低下が認められる。*in vitro* の dexamethasone 感受性に差がみられないことから、既に報告されている c-fos の過剰発現といった T 細胞の intrinsic な機能異常は考えにくい。CD86 分子は気道好酸球浸潤、気道過敏性の誘導に関与することが実験的に証明されているが、costimulatory signal の多寡により臨床的なステロイド感受性の変化がもたらされる可能性が考えられる。

#### A. 研究目的

気管支粘膜の好酸球性炎症は、T 細胞依存性、IL-5 依存性であることが確立されている。この観点から、ステロイド抵抗性喘息における T 細胞の機能異常が次々と指摘されつつある。しかしながら、真に重症喘息と呼ぶべきステロイド依存性(難治性)喘息を対象とする分子・細胞生物学的研究は少ない。そこで、喘息重症度分類の最重症に位置づけられるステロイド依存性喘息を対象として、T 細胞機能、IL-5 産生に関する解析を行った。さらに、*in vivo* のステロイド感受性低下をもたらす細胞レベルの機構につき解析した。

#### B. 方法

国立相模原病院アレルギー科受診中の喘息症例のうち、年間を通じて prednisolone 換算 10 mg/day 以上の経口ステロイドを必要とする症例を難治性喘息群として、軽症喘息群と比較した。末梢血単核球を種々の刺激で活性化し、サイトカイン産生量、遺伝子発現量、細胞増殖反応につき測定した。培養中に各種濃度の dexamethasone を加え、用量反応曲線より、IC<sub>50</sub> 値を求めた。アトピー型喘息症例の末梢血単核球よりダニアレルゲン Der f 2 特異的 Th 細胞クローンを樹立し、T cell receptor complex を介した活性化シグナルに加えて、CD2、LFA1、CD28 等を介したシグナルを与え、各種のサイトカイン産生、増殖反応につき、ステロイド感受性を解析した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査においては、インフォームドコンセントを徹底

するとともに、ヘルシンキ宣言を遵守するものとし、施設の倫理委員会の承認を得た。

#### C. 結果

軽症喘息群では、治療前に末梢血 Th 細胞 IL-5 産生の亢進が認められ、吸入ステロイドの開始により速やかに低下を認めたが、難治性喘息群の半数において、高用量吸入ステロイド+経口ステロイドの投与に拘わらず、IL-5 産生高値であった(表 1)。*in vitro* の IC<sub>50</sub> 値で評価した末梢血単核球の dexamethasone 感受性には、難治群、軽症群、健常コントロールの 3 群間において差は認められなかった。ただし、サイトカイン産生と増殖を誘導する活性化シグナルの種類によって、dexamethasone に対する感受性は大きく異なっていた。アレルゲン特異的 Th クローンのサイトカイン産生、増殖反応は、CD28 シグナルにより増強されるのみならず、dexamethasone 感受性の低下(ステロイド抵抗性)がもたらされた(図 1)。IL-5 産生においては、遺伝子発現のレベルで抵抗性が獲得されていた。海外でレポートされている IL-2+IL-4、IL-13 のサイトカインによるステロイド抵抗性の誘導は再現性を認めなかった。

#### D. 考察

難治性喘息は heterogenous な集団により構成される。IL-5 高産生持続群では、*in vivo* における T 細胞レベルのステロイド感受性の低下が認められる。*in vitro* の dexamethasone 感受性に差がみられないことから、既に報告されている c-fos の過剰発現といった T 細胞の intrinsic な機能異常

は考えにくい。CD86 分子は気道好酸球浸潤、気道過敏性の誘導に関与することが実験的に証明されているが、costimulatory signal の多寡により臨床的なステロイド感受性の変化がもたらされる可能性が考えられる。

#### E. 結論

成人難治性喘息には、T 細胞レベルのステロイド感受性低下（抵抗性）が関与する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ogawa, K., Kaminuma, O., Kikkawa H., Akiyama, K., and Mori, A. 2000. IL-5 synthesis by T cells of allergic subjects is regulated at the transcriptional level. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122 (suppl 1):63-66.
- 2) Mori, A., Kaminuma, O., Ogawa, K., Nakata, A., Egan, R. W., Akiyama, K., and Okudaira, H. 2000. Control of interleukin-5 production by human helper T cells as a treatment for eosinophilic inflammation: comparison of in vitro and in vivo effects between selective and nonselective cytokine synthesis inhibitors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106:S58-64.
- 3) Mori, A., Kaminuma, O., Ogawa, K., Okudaira, H., and Akiyama, K. 2000. Transcriptional regulation of IL-5 gene by nontransformed human T cells through the proximal promoter element. *Internal Med.* 39:618-625.
- 4) Kaminuma, O., Fujimura, H., Fushimi, K., Ogawa, K., Nakata, A., Kikkawa, H., Okudaira, H., and Mori, A. 2001. Antigen-induced airway migration of T helper 2 clone. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 5) Mori, A., Akiyama, K., and Okudaira, H. 2001. Selective regulation of T cell IL-5 synthesis by OM-01, JTE-711, and P38 MAP kinase inhibitor: independent control of Th2 cytokines, IL-4 and IL-5. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 6) Kaminuma, O., Fujimura, H., Loh, D. Y., Saito, T., Marrack, P., Tanaka, Y., Altman, A., Akiyama, K., and Mori, A. 2001. Humoral immunity is dispensable for the local recruitment of antigen-specific Th2 cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 7) Mori, A. Ikeda, Y., Taniguchi, M., Tomita, S., Chujo, M., Nakagawa, Y., Murakami, E., Maeda, Y., Hasegawa, M., and Akiyama, K. 2001. *Candida albicans* allergen induces IL-5 production by Th cells of adult asthma patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 8) Nakata, A., Kaminuma, O., Ogawa, K., Fujisawa,

H., Fushimi, K., Kikkawa H., Naito, K., Ikezawa, K., Egan, R. W., and Mori, A. 2001. Correlation between eosinophilia induced by CD4<sup>+</sup> T cells and bronchial hyperresponsiveness. *Int. Immunol.* (in press)

9) Mori, A. 2000. Current understanding and problems of steroid-resistant asthma. *Allergology International* 49:225-230.

##### 2. 学会発表

- 1) Mori, A., Akiyama, K., and Okudaira, H. 2000. Selective regulation of T cell IL-5 synthesis by OM-01, JTE-711, and P38 MAP kinase inhibitor: Independent control of Th2 cytokines, IL-4 and IL-5. 22nd Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (Hakone) 2000/5/18-23
- 2) Kaminuma, O., Fujimura, H., Okudaira, H., and Mori, A. 2000. Dynamics of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the airway eosinophilic inflammation. 22nd Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (Hakone) 2000/5/18-23
- 3) Mori, A., Ohmura, T., Ikeda, Y., Nakagawa, Y., Chujo, M., Tomita, S., Yamamoto, N., Taniguchi, M., Maeda, Y., Hasegawa, M., and Akiyama, K. 2000. Analysis of human T cell IL-5 gene transcription induced by T cell receptor signal. 17th International Congress of Allergology and Clinical Immunology. ACI International Supplement No.2:168 (Sydney) 2000/10/15-20
- 4) Akiyama, K., Mori, A., Ikeda, Y., Saito, A., Yasueda, H., Yamamoto, N., Tomita, S., Taniguchi, M., Maeda, Y., and Hasegawa, M. 2000. *Candida albicans* can activate eosinophils via non-IgE mediated pathway – a possible cause of intrinsic asthma. 17th International Congress of Allergology and Clinical Immunology. ACI International Supplement No.2:108-109 (Sydney) 2000/10/15-20

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

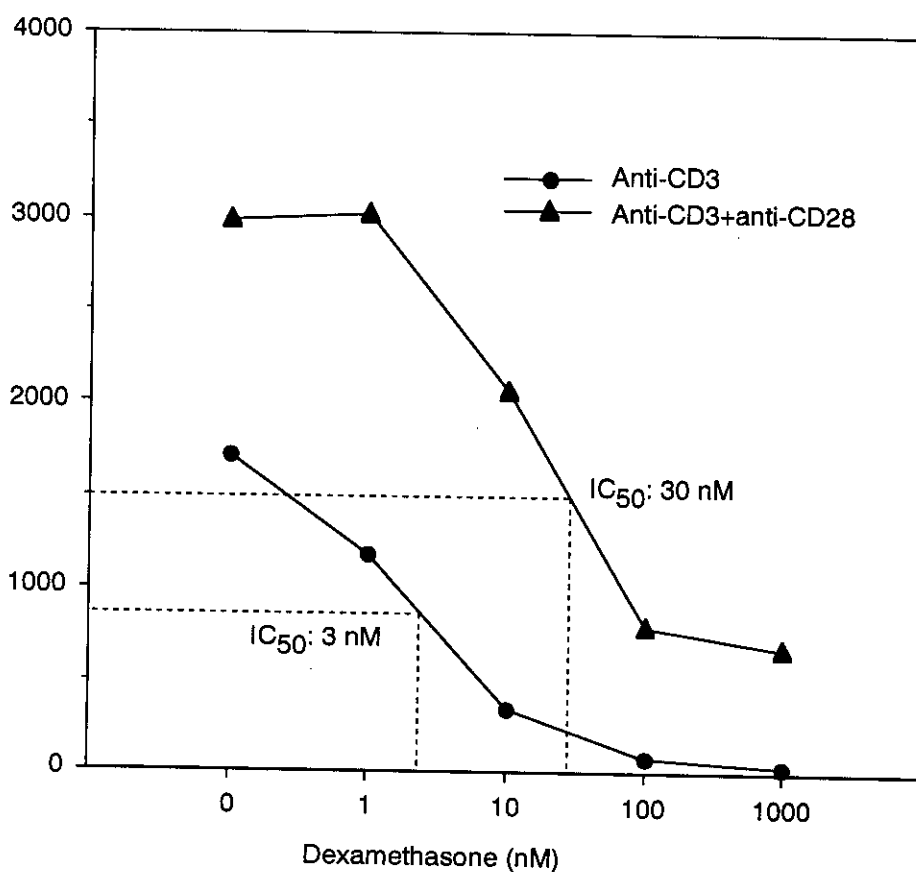
##### 3. その他

なし

表 1、ステロイド依存性喘息におけるT細胞IL-5産生高値持続

	Severe asthma	Symptomatic mild asthma	
		before BDI	after BDI
N	11	10	
Age	58.4±6.4 (38-74)	45.9±6.0 (21-72)	
M/F	6/5	6/4	
Atopic/Nonatopic	2/9	7/3	
FEV <sub>1.0</sub> %	52.7±8.4	74.7±4.4	84.7±4.4
Eosinophil (/ $\mu$ l)	189.7±39.4	548.0±162.3	492.7±135.7
Ach PC20 ( $\mu$ g/ml)	567±2644	9332±3205	
IL-5 production (P+l, pg/ml)	46.5±16.4	46.1±11.8	4.4±2.0
IL-2 production (P+l, pg/ml)	2029±489	4954±522	3132±824
IL-4 production (P+l, pg/ml)	196.9±41.9	403.8±117.7	227.4±53.4

図 1、CD28シグナルによるステロイド抵抗性の誘導





# 気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と難治化の予防・治療法の開発に関する研究

分担研究者 高橋 清

国立療養所南岡山病院院長

## 研究要旨

成人喘息は、IgE 抗体の関与が乏しく非アトピー型として分類される症例が多く難治化する傾向も強い。今回は、非アトピー型喘息の病態機序の解明のため、アイソトープを使用せず FACSCalibur にて細胞分裂の S 期の細胞を解析することにより、ダニ、Candida 抗原刺激によるリンパ球の活性化を評価した。その結果、アトピー型喘息と異なり特異的 IgE 抗体の認められない非アトピー型喘息においても、抗原刺激によるリンパ球の活性化が認められた。非アトピー型喘息患者では、IgE 抗体の関与よりもむしろ種々の抗原によるリンパ球の活性化が病態の主役となる可能性が証明された。

## A. 研究目的

成人喘息患者のかなりの部分が原因抗原の明白でない非アトピー型喘息に分類される。抗原特異的 IgE 抗体が認められないため、通常の検査では抗原を発見できないためである。しかし、難治性喘息と考えられる症例の多くは、この非アトピー型喘息に属する。このため、非アトピー型喘息における気道炎症の引き起こされるメカニズムを解明することが重要であると考えられる。我々は、非アトピー型喘息でも気道における Th2 タイプのサイトカイン産生が、アトピー型喘息と同じように亢進していることを報告してきている。それ故、非アトピー型喘息においても何らかの抗原によって、Th2 リンパ球の活性化が IgE 抗体の産生系に関わらないメカニズムで起こっている可能性がある。さらにこの Th2 リンパ球系の活性化が喘息の難治化をもたらしていることが推測される。今回は、この非アトピー型喘息における原因抗原の候補として、真菌抗原である *Candida albicans* と、アトピー型喘息において原因抗原として認められている *Dermatophagoides farinae* (Del f) を用いて、これらの抗原により喘息患者末梢血中のリンパ球の活性化が起こるかどうかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象症例

国立療養所南岡山病院アレルギー科通院中の成人喘息症例のうち、担当医師が研究の目的、必要性および有用性について説明をして、同意が得られたアトピー型喘息患者 15 例、非アトピー型患者 14 例を対象とした。コントロールとして、年齢をマッチさせた健康者 7 例を選んだ。対象者よりヘパリン加末梢血 20ml を採取し、Histopaque による比重遠心法にて末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cells :PBMC) 層を分離採取した。

### 2. 細胞培養およびリンパ球活性化指標のアッセイ

この PBMC を RPMI1640 で  $1 \times 10^6$ /ml に調整し *Candida albicans* と、Del f 抗原を最終濃度で  $20 \mu$ g/ml になるように添加し、7 日間  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養した。その後、DNA Cycle TEST™ PLUS DNA Reagen Kit (Becton Dickinson) を用いて培養細胞 DNA に Propidium iodide (PI) を取り込ませ、FACSCalibur にて PI の蛍光を測定し細胞周期 S 期の割合を Modfit software にて解析した。その値を元にしてリンパ球の活性化の指標として以下に示すように、抗原添加群と無添加群の S 期の細胞の比、Stimulation Index (S. I.) を算出した。

$$S. I. = \frac{S\text{-phase cell}(\%) \text{ in antigen-stimulated sample}}{S\text{-phase cells}(\%) \text{ in control sample}}$$

### 3. 単核細胞上清中のサイトカイン測定

同様に PBMC を  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整し *Candida albicans*, Del f 抗原を最終濃度で  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加し, 96 時間  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養した。この培養上清を採取し, INF- $\gamma$ , IL-5, IL-10 濃度を ELISA キット (Endogen) で測定した。

### C. 研究結果

気管支喘息患者と健常人における, *Candida albicans* および Del f 抗原によるリンパ球活性化の解析結果を Table 1 に示す。気管支喘息患者群では, 健常群に比し *Candida albicans* および Del f 抗原に対する S-phase のリンパ球と, S. I. を指標としたリンパ球の活性化反応が有意に亢進していた ( $p < 0.05$ )。また, Figure 1 に示すように, *Candida albicans* および Del f 抗原に対する S. I. を指標としたリンパ球の活性化の間には, 正の相関が認められた ( $r = 0.75$ ,  $p = 0.006$ )。このリンパ球の活性化は, その症例のダニあるいは *Candida* に対する IgE 抗体の存在とは明らかな相関は認められなかったことより, IgE 系とは異なったメカニズムで活性化が起こっている可能性が示唆された。また, アトピー型と非アトピー型との間には明らかな違いは認められなかった。

抗原刺激に対するリンパ球からのサイトカイン産生の検討では, Del f 抗原刺激では IL-5, INF- $\gamma$  の産生亢進を認め, *Candida* 抗原刺激でも IL-5, INF- $\gamma$  の産生亢進を認めた (Figure 2)。アトピー型と非アトピー型喘息のリンパ球からのサイトカイン産生の比較検討では, 非アトピー型喘息において *Candida* 抗原刺激による IL-10 の産生がアトピー型よりも低下の傾向を示し, これが慢性アレルギー性炎症の遷延をもたらす可能性が示唆された。

### D. 考察

今回の結果から, IgE 抗体の関与が乏しい症例においても, 抗原に対するリンパ球の活性化が起こっていることが示唆された。さらに, アトピー型, 非アトピー型に分けて検討しても, リンパ球の活性化

に差はなく, IgE 抗体を介さないアレルギー性炎症の経路が, 非アトピー型喘息の病態形成に関与している可能性を示すものと考えられた。しかし, Del f 抗原と *Candida* 抗原に対する反応性は, アトピー型と非アトピー型に分けて検討しても差がなく, また両抗原に対するリンパ球の反応性が相関することから, 原因となっている抗原が違うことだけがメカニズムの差ではなく, リンパ球の活性化をもたらす機序の中でまだ判明していない部分にアトピー型と非アトピー型を分ける要素があることを示唆する成績であった。

これに対して, 抗原刺激に対するリンパ球からのサイトカイン産生の検討では, 抗原によって産生されるサイトカインのパターンが異なり, 抗原に対するリンパ球の反応性の違いによって難治化がもたらされる可能性もあることが考えられた。

### E. 結論

非アトピー型喘息患者では, IgE 抗体の関与よりもむしろ種々の抗原によるリンパ球の活性化が, 病態の主役となる可能性が証明された。

### F. 研究発表

#### 学会発表

M. Horiba, C. Okada, R. Soda, K. Takahashi et al.: *Candida albicans* induced different cytokine production compared with dust mite in asthmatics. International Congress of Allergology and Clinical Immunology, 2000, Sidney Australia

#### 研究協力者

岡田千春 (国立療養所南岡山病院アレルギー科)

木村五郎 (国立療養所南岡山病院アレルギー科)

金廣有彦 (岡山大学医学部第2内科)

谷本 安 (岡山大学医学部第2内科)

Table 1. 喘息患者および健康人におけるリンパ球の活性化反応の解析

Antigen	S-phase (%)		Stimulation Index (S.I.)	
	Asthmatics	Healthy subjects	Asthmatics	Healthy subjects
Candida	5.47±4.25*	1.46±0.78	24.40±21.09*	5.10±2.41
Der f	5.33±3.62*	1.33±0.67	25.13±22.85*	4.79±2.43
Control	0.28±0.11	0.29±0.05		

\* statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared with healthy subjects (mean ± SD)

Figure 1. Del fに対するS.I.とCandidaに対するS.I.の相関

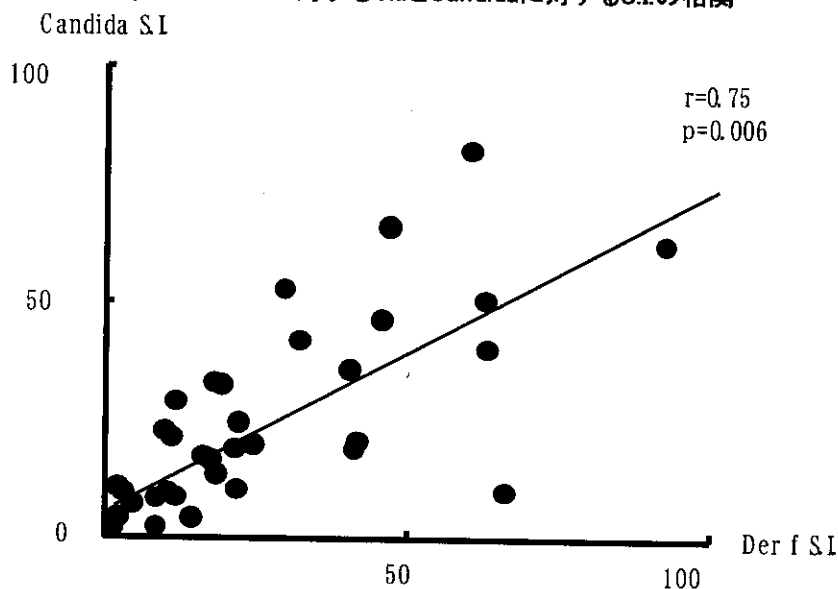
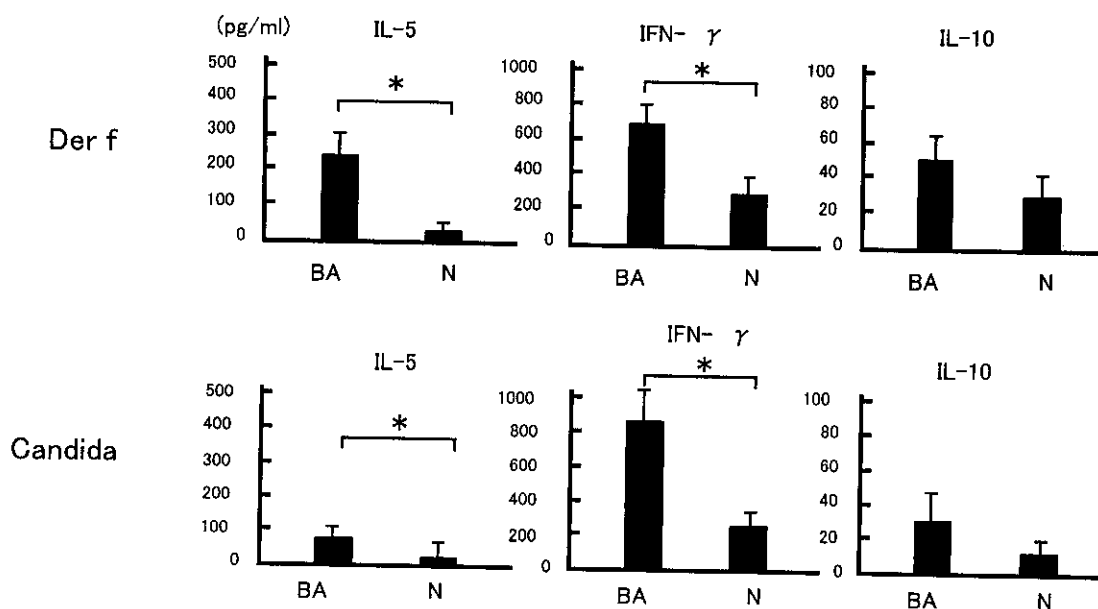


Figure 2. 喘息患者および健康人におけるDel fとCandida抗原によるサイトカイン産生の検討



## 成人難治性喘息の病態・機序、細胞要因

分担研究者 庄 司 俊 輔

国立療養所南福岡病院 副院長

### 研究要旨

近年、気管支喘息の難治化の要因として、気道上皮が修復する際に生じる組織の構造変化である「気道のリモデリング」が注目を浴びている。今回の研究においては、気管支喘息における線維芽細胞および気道上皮細胞の役割をインビトロの培養細胞を用いた細胞遊走実験にて検討した。特に主要な細胞外基質因子のひとつであるコラーゲンのタイプによる遊走活性の違いを検討し、これらの細胞がI型とIV型コラーゲンに対しては遊走するのに、III型コラーゲンには遊走しないことを見いだした。これは気道の修復やリモデリングの過程において結合織中のコラーゲンの型の違いの重要性を示唆していると考えられる。さらに、気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄(BAL)液を用いてこれらの細胞遊走に対する影響を検討中である。

### A. 研究目的

喘息患者の気道粘膜において組織の構造変化である「気道のリモデリング」は組織が傷害から修復へ向かう過程でのひとつの病態であり、組織を構成する上皮細胞、内皮細胞および血管内皮細胞などや好中球、リンパ球、好酸球などの炎症細胞がすべて活性化され、傷害組織に遊走し、増殖しながら、かつ自らも種々の遊走因子やサイトカインを産生・放出して気道の修復やリモデリングに関与するものと考えられる。今回の研究では、培養細胞を用いた *in vitro* での実験により、結合織における線維芽細胞と上皮組織における気道上皮細胞の遊走について検討した。

研究は主として次のように二つの別々の方向性を持った実験系にて行う。

- (1) コラーゲンをはじめとする細胞外基質蛋白に対する気道上皮細胞・線維

### 芽細胞の遊走

- (2) 気管支喘息患者の BAL 中に存在する各種細胞に対する遊走活性とその制御。

### B. 研究方法

細胞はすべて培養細胞を用い、当初は気道上皮細胞にはウシ肺より得られた正常初代気管支上皮細胞を、線維芽細胞にはヒト胎児肺より得られた二倍体線維芽細胞株である HFL-I 細胞を用いた。現在では気道上皮細胞および線維芽細胞ともに市販されているそれぞれのヒト正常組織由来の細胞を主として実験に用いている。

コラーゲンは、主として線維芽細胞より産生され基底膜の主要構成成分となるIV型コラーゲン、結合織中のコラーゲンの大半を占めるI型コラーゲン、および、気道リモデリ

ングの特徴ともいえる基底膜（下）肥厚の主成分であるⅢ型コラーゲンを培養液に溶解し、それぞれの有する細胞遊走活性を測定した。

気管支患者および健常者コントロールから気管支肺胞洗浄(BAL)液を採取し、活性物質を顕在化させるために BAL 液は 20 倍から 50 倍に濃縮したものをを用いた。BAL 液は主として安定している気管支喘息患者と、健常人（実際には肺癌患者切除肺の健常部）より採取し、その中に存在するそれぞれに対する遊走活性を測定した。

#### C. 研究結果

(1) 気道上皮細胞、線維芽細胞の双方とも、Ⅳ型コラーゲンおよびⅠ型コラーゲンに対して有意な遊走を行ったが、これに対して、Ⅲ型コラーゲンに対しては全く遊走しなかった。

(2) 気管支喘息患者気道より得られた BAL 液と健常人（肺癌患者切除肺の健常部）気道より得られた BAL 液の間には、BAL 液を濃縮しないで遊走活性を調べても気道上皮細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞に対する細胞遊走活性に関しての有意な差は認められなかった。現在 BAL 液の濃縮作業進行中である。

#### D. 考察

気管支喘息患者と健常者間で有意な細胞遊走活性が認められなかったことの原因として BAL 液の希釈に原因がある可能性がある。濃縮して高い濃度の蛋白を生成し、再度遊走実験を行う必要があると思われる。

Ⅳ型コラーゲンに対して気道上皮細胞、線維芽細胞が有意な遊走を示したことは、Ⅳ

型コラーゲンが正常な基底膜のそしてⅠ型コラーゲンが正常な結合組織の維持にそれぞれ重要であり、気道粘膜の修復に不可欠であることを示唆し、これに対し、Ⅲ型コラーゲンが各種細胞に対して全く遊走活性を示さなかったことは、気道リモデリングの際のⅢ型コラーゲンの大量沈着を来す病態においてはこれらの細胞遊走が妨げられ、ひいては気道粘膜の修復が阻害されることを示唆する。

#### E. 結論

(1) 結合織中に存在する主たる細胞外基質蛋白であるコラーゲンをを用いた細胞遊走実験において、気道粘膜由来の線維芽細胞および気道上皮細胞は、Ⅰ型コラーゲンとⅣ型コラーゲンに対しては遊走したが、Ⅲ型コラーゲンに対しては遊走しなかった（下図）。

(2) 寛解期にある気管支喘息患者より得られた気管支肺胞洗浄液は生理食塩水により希釈された採取状態の濃度では線維芽細胞および気道上皮細胞に対する細胞遊走活性を有しなかった。

#### F. 研究発表

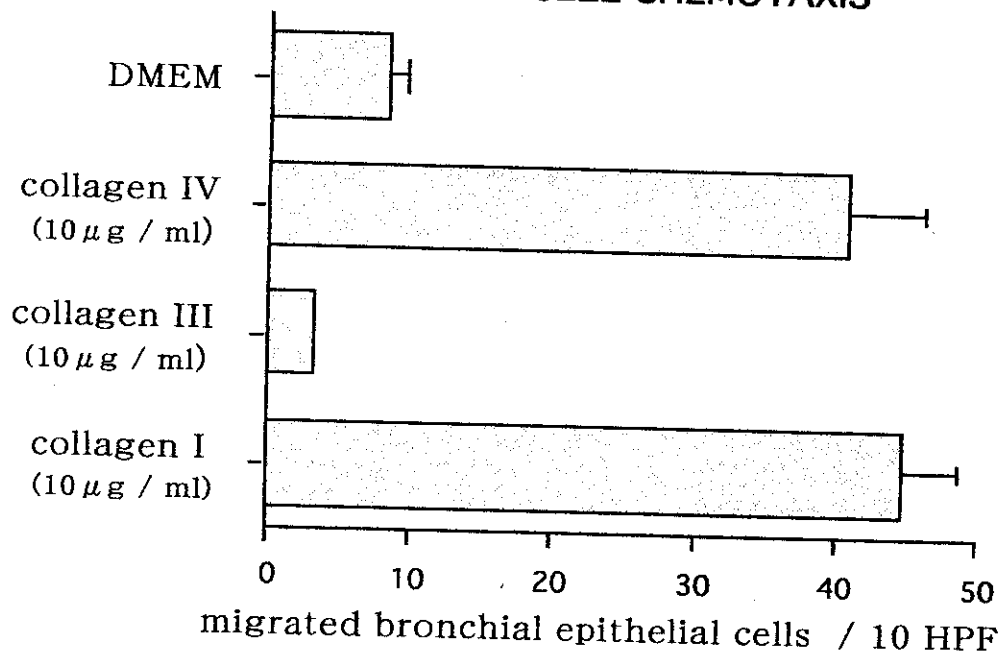
- 1) 庄司俊輔. アレルギーの基礎知識「気管支喘息と気道リモデリング」アレルギー科 9 (Suppl.1): 132-137, 2000.
- 2) 庄司俊輔. 気道リモデリング—肥満細胞、上皮細胞、線維芽細胞を中心に—. Pharma Medica 18 (Suppl.): 21-26, 2000.
- 3) 庄司俊輔. 喘息に関与する細胞の分子医学—気道上皮細胞の役割現代医療 33:

59-65, 2000.

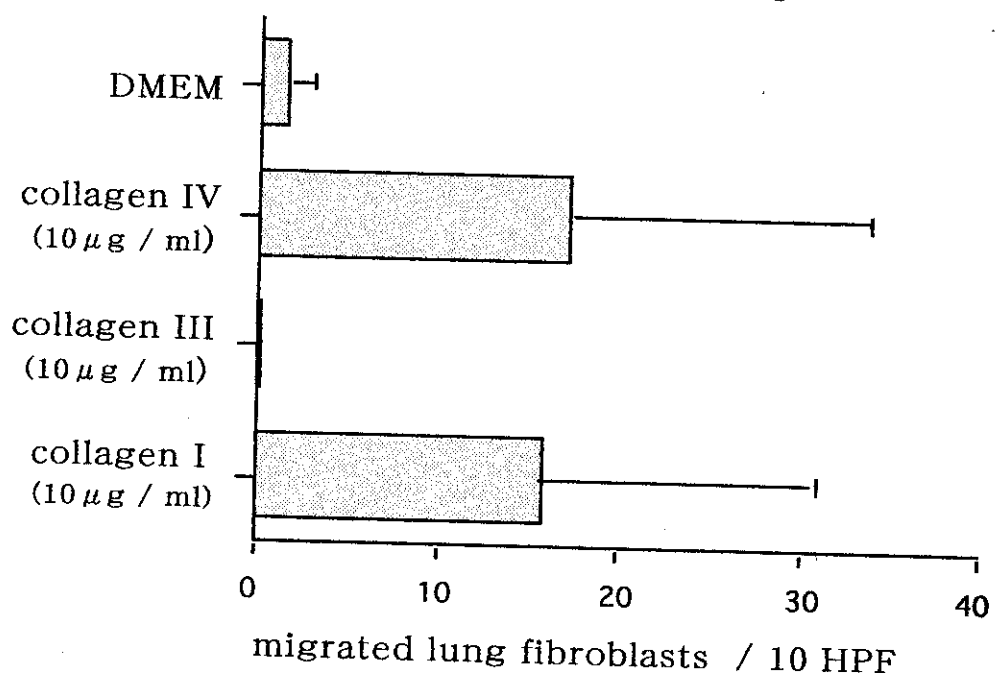
4) 庄司俊輔, 西間三馨. アレルゲンの回避.

内科 87: 473-476, 2000.

### BRONCHIAL EPITHELIAL CELL CHEMOTAXIS



### LUNG FIBROBLAST CHEMOTAXIS



# 気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と難治化の予防・治療法の開発に関する研究

分担研究者 相 沢 久 道 国立療養所福岡東病院 臨床研究部長

## 研究要旨

難治性喘息を引き起こす要因のうち、慢性閉塞性肺疾患の合併と不適切な喘息重症度評価について検討した。気管支喘息症例304例(男性:200, 女性:104, 年齢  $65.8 \pm 6.9$ 歳), および気管支喘息に肺気腫を合併した症例32例(男性:31, 女性:1, 年齢  $71.5 \pm 7.8$ 歳)を対象とした。その結果、肺気腫の合併により好酸球性の気道炎症は変化ない。しかしながら、肺気腫合併により気道狭窄の進行がみられるとともに、有意な気道過敏性の亢進がみられた。また、気管支喘息患者34名(男性22名、女性12名、平均年齢  $45.6 \pm 17.1$ 歳、平均%FVC  $90.8 \pm 12.8$ %, 平均%FEV1  $183.0 \pm 13.1$ %)を対象に検討した。その結果、聴診所見と気道狭窄との間には相関はみられない。呼吸困難感と気道狭窄との間には相関はみられず、個々の症例により呼吸困難の感受性は違うことが判った。さらに、過去に重症発作を起こした患者は、呼吸困難の感受性が低いことがわかった。

## A. 研究目的

難治性喘息は、「通常の治療では改善されず、ステロイド剤を用いなければ日常生活が出来ない重症、通年性の気管支喘息」と定義される。気管支喘息の難治化に関与する因子としては、様々なものが考えられる。例えば、気道のリモデリングの進行による可逆性要素の消失、慢性閉塞性肺疾患の合併、慢性心不全の合併などがあると、気管支喘息に対する治療を充分に行っても症状や肺機能の改善が乏しいことが予想される。また、患者の喘息重症度の評価が不適切であると、日常の治療が不十分となり、そのために難治化する可能性も考えられる。そこで、今回は難治性喘息を引き起こす要因の中で以上の4つの因子について、実際にこれらの因子によって喘息が難治化するか否かを明らかにしたい。すなわち、これらの因子が喘息の重症度や気道過敏性・肺機能などと相関するかを検討することとした。今年度はこれらのうち、慢性閉塞性肺疾患の合併により喘息患者の気道過敏性・肺機能はどうか、および気道収縮の程度と呼吸苦の自覚の間に乖離がある患者では重症度(気道過敏性・肺機能)はどうかの検討をした。

## B. 方法

### 1) 慢性閉塞性肺疾患の合併の影響

肺気腫のない喘息症例、肺気腫を合併した喘息症

例に分類し、肺気腫のない喘息症例と肺気腫を合併した喘息症例での重症度(気道過敏性・肺機能)の比較を行う。肺気腫の診断にはCTを用い、評価項目は肺機能(肺気量分画、スパイログラム)・誘発喀痰・呼気中NO・気道過敏性(アストグラフにてPD35-Grsを指標とした)である。

### 2) 重症度評価が適切かどうかの検討についての検討

アストグラフにて気道過敏性を測定しながらBorg Scaleを用いて呼吸苦の程度を記録する。気道収縮の進行に比例して呼吸苦を自覚する患者と、気道収縮が進行するにも関わらず呼吸苦の自覚が遅れる患者について、喘息の重症度、これまでの治療歴、重症発作の既往等について比較する。また、気道過敏性の測定前後(気道収縮の程度の差)で聴診所見の差を検討した。

## C. 結果

### 1) 慢性閉塞性肺疾患の合併の影響

気管支喘息症例304例(男性:200, 女性:104, 年齢  $65.8 \pm 6.9$ 歳), および気管支喘息に肺気腫を合併した症例32例(男性:31, 女性:1, 年齢  $71.5 \pm 7.8$ 歳)を対象とした。その結果、肺気腫の合併により気道炎症は変化ない(但し、好酸球性の炎症に限る)。しかしながら、肺気腫合併により気道狭窄の進行がみられるとともに、有意な気道過敏性の亢進がみられた(図1)。

## 2)重症度評価が適切かどうかの検討についての検討

気管支喘息患者34名（男性22名、女性12名、平均年齢45.6 ± 17.1歳、平均%FVC90.8 ± 12.8%，平均%FEV183.0 ± 13.1%）を対象に検討した。その結果、聴診所見と気道狭窄との間には相関はみられない。呼吸困難感と気道狭窄との間には相関はみられず、個々の症例により呼吸困難の感受性は違うことが判った。さらに、過去に重症発作を起こした患者は、呼吸困難の感受性が低いことがわかった（図2）。

## D. 考察

喘息患者が慢性閉塞性肺疾患の合併によって悪化することは当然予想されるが、これまではっきり示した報告はなかった。さらに、慢性閉塞性肺疾患と気管支喘息の合併症例がどの位あるかは不明である。今回の検討で、肺気腫の合併により明らかな気道狭窄の進行・気道過敏性の亢進がみられ、肺気腫の合併は気管支喘息の難治化に関与する因子であると考えられた。

呼吸困難の自覚が少ない患者において、重症発作の危険が高い可能性はこれまでも指摘されている。しかしながら、これらは、外的な抵抗を負荷したときの成績のみであり、自然の気道収縮時の検討はない。また、呼吸困難の自覚の少ない患者で、喘息自体が難治化しやすいかどうかは不明である。今回の検討より、喘息患者では呼吸困難と気道狭窄の程度は一致せず、特に重症発作の経験のある患者では感受性が低かった。また、聴診所見とも気道狭窄の程度は一致しなかった。したがって、患者の自覚症状や理学所見で気道狭窄の程度は判定できないことをよく知り、客観的な気道狭窄の評価を行い、十分な治療を行うことが難治化の予防につながると考えられた。

## E. 結論

このような検討により、喘息の難治化に関与する因子を一つ一つ明らかにすることにより、難治化の予防および治療の方法を開発できると考えられる。例えば、難治性喘息を診たときに、自覚症状が軽度であっても気道狭窄が高度であれば十分な治療を行うようにすることなどは今すぐにも出来る。さらに、将来慢性閉塞性肺疾患などの対しても有効な治療法を検討していき、積極的にそれらを応用することにより難治性喘息の治療が出来るようになると考えられる。

## F. 論文発表

1. Nakano H, Aizawa H, Matsumoto K, Fukuyama S, Inoue H, Hara N: Cyclooxygenase-2 participates in the late phase of airway hyperresponsiveness after ozone exposure in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 403: 267-75, 2000
2. Nogami H, Aizawa H, Matsumoto K, Nakano H, Koto H, Miyazaki H, Hirose T, Nishima S, Hara N: Neutrophil elastase inhibitor, ONO-5046 suppresses ozone-induced airway mucus hypersecretion in guinea pigs. *European Journal Pharmacology* 390: 197-202, 2000
3. Matsumoto K, Aizawa H, Inoue H, Koto H, Fukuyama S, Hara N: Effect of dimethylthiourea, a hydroxyl radical scavenger, on cigarette smoke-induced bronchospasm in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 403: 157-61, 2000
4. Inoue H, Aizawa H, Nakano H, Matsumoto K, Kuwano K, Nadel JA, Hara N: Nitric oxide synthase inhibitors attenuate ozone-induced airway inflammation in guinea pigs. possible role of interleukin-8. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161: 249-256, 2000
5. Yoshida M, Aizawa H, Takahashi N, Shigyo M, Hara N: Pituitary adenylate cyclase activating peptide mediates inhibitory nonadrenergic noncholinergic relaxation. *Eur J Pharmacol*. 395: 77-83, 2000
6. Takahashi H, Aizawa H, Fukuyama S, Inoue H, Nishima S, Hara N: Thapsigargin, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor, relaxes guinea pig tracheal smooth muscle by producing epithelium-dependent relaxing factors. *Eur J Pharmacol* 410: 61-68, 2000
7. Aizawa H, Iwanaga T, Inoue H, Takata S, Matsumoto K, Takahashi N, Yoshida M, Hara N: Once-daily theophylline reduces serum eosinophil cationic protein and eosinophil levels in induced sputum of asthmatics. *International Archives of Allergy and Immunology* 121:123-128, 2000
8. 柴田和美, 相沢久道, 井上博雅, 杉尾賢二, 原



信之: 横隔膜部分切除縫縮術後も長期間にわたり再発を繰り返した月経随伴性気胸の一例. 日本呼吸器学会雑誌 38: 278-282, 2000

9. 相沢久道: 炎症性マーカーとしてのCO. 分子呼吸器病学 4: 63-65, 2000

10. Aizawa H, Inoue H, Matsumoto K, Hara N: Histamine-induced increase in isometric tension of smooth muscle is mediated by local vagus nerve in human bronchus. *Respiration* 67: 652-656, 2000

11. Fukuyama S, Inoue H, Aizawa H, Oike M, Kitaura M, Yoshie O, Hara N: Effect of eotaxin and platelet-activating factor on airway inflammation and hyperresponsiveness in guinea pigs in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1844-1849, 2000

12. Komori M, Inoue H, Matsumoto K, Koto H, Fukuyama S, Aizawa H, Hara N: PAF mediates cigarette-smoke induced goblet cell metaplasia in guinea pig airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L436-41, 2001

13. 相沢久道: NOの気道への作用の多様性. 臨床免疫 35: 132-140, 2001

14. 相沢久道: COPDに対する急性増悪の薬物療法. 医学のあゆみ 196:681-686,2001

#### 研究協力者

高田昇平 (国立療養所福岡東病院)  
 執行睦実 (国立療養所福岡東病院)  
 中野寛行 (九州厚生年金病院)  
 古藤 洋 (九州大学呼吸器科)  
 木部敦子 (九州大学呼吸器科)  
 三嶋理晃 (京都大学呼吸器内科)  
 新実彰男 (京都大学呼吸器内科)

図1. 喘息単独群と肺気腫合併喘息群との気道過敏性の差. 肺気腫合併により有意な気道過敏性の亢進がみられた.

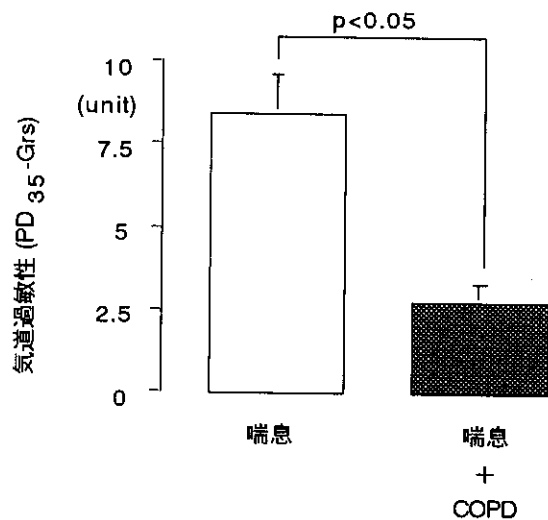
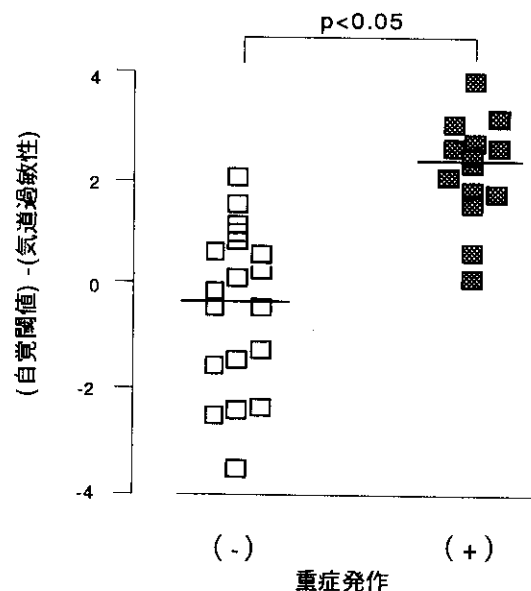


図2. 自覚症状の閾値と気道過敏性(PD<sub>35</sub>-Grs)の閾値の差. すなわち, 気道収縮が起こったときどの時点で初めて呼吸困難を感じているかを見たもの. 過去に重症発作を起こした患者は, 呼吸困難の感受性が低い.



## アトピー喘息と非アトピー喘息に共通した免疫学的パラメーターの解析

分担研究者 柳原行義

所属機関 国立相模原病院臨床研究センター室長

研究要旨：アトピー喘息と非アトピー喘息との間には、共通して好酸球性炎症や気道過敏性などの喘息形質が関与している。このような喘息形質の獲得に関わる免疫学的パラメーターを同定する目的で、血清、末梢血単核細胞(PBMC)および遺伝子の各レベルで多角的な解析を行った。その結果、血清レベルでは可溶性IL-4受容体 $\alpha$ 鎖 (soluble IL-4R $\alpha$ ; sIL-4R $\alpha$ ) 値の増加、PBMCレベルでは抗CD3抗体と抗CD28抗体の刺激によるIL-13産生の亢進、また遺伝子レベルではIL-4R $\alpha$  mRNAの発現増強のみならず、IL-13の110番目のグルタミン型の出現頻度が高いことなどが、アトピー喘息と非アトピー喘息に共通なパラメーターであった。また、いずれのパラメーターも重症患者では軽症患者に比べて高値を示した。これらのパラメーターのうち、IL-13は気道系にも作用するサイトカインであり、また気道系細胞はIL-4R $\alpha$ とIL-13R $\alpha$ 1を発現していた。実際、IL-13は、IL-4と同様、気道平滑筋細胞にeotaxinやTGF- $\beta$ の産生を誘導した。以上の結果から、T細胞由来のIL-13はアトピー喘息と非アトピー喘息に共通した病態形成に関与していると考えられた。

### A. 研究目的

気管支喘息にはIgE依存性のアトピー喘息とIgE非依存性の非アトピー喘息の2種類の病型があるが、いずれにおいても好酸球性炎症や気道過敏性などの喘息形質が共通に関与している。このような喘息形質を媒介する候補分子としては、T細胞由来のIL-5が知られているが、他の分子については不明な点が多い。今回、アトピー喘息と非アトピー喘息の病態形成に共通に関わる免疫学的パラメーターを同定するために、血液サンプルを用いてin vitroで多角的な解析を行った。また、気道平滑筋細胞を用いてエフェクター細胞側の要因についても併せて検討した。

### B. 方法

1) 被験者の採血に際しては、研究の目的、必要性および有用性のみならず、不利益や危険性の排除についても十分に説明した後、同意が得られた場合にのみ、採血と遺伝子解析を行った。尚、本研究は当院の倫理委員会からの承認

を得ている。

2) 正常者、アトピー喘息患者および非アトピー喘息患者の末梢血から血清と単核細胞を得た。免疫グロブリン、サイトカイン、ケモカインおよび可溶性サイトカイン受容体は特異的ELISAまたはRIAで測定した。末梢血単核細胞(PBMC)におけるサイトカイン受容体の発現はFACSにより、またサイトカイン、サイトカイン受容体およびC $\epsilon$ の各mRNAの発現はRT-PCRにより、それぞれ解析した。サイトカインやサイトカイン受容体の遺伝子多型については、特異プライマーで増幅したPCR産物をダイレクトシーケンスすることにより解析した。

### C. 結果

血清中の各種サイトカインと可溶性サイトカイン受容体の濃度を測定したところ、特に可溶性IL-4受容体 $\alpha$ 鎖 (soluble IL-4R $\alpha$ ; sIL-4R $\alpha$ ) がアトピー喘息と非アトピー喘息に共通して有意に高値を示した。また、両喘息患者の新鮮な無刺激PBMCでは生体内におけるIL-4R $\alpha$  mRNA

の発現亢進も認められた。このような作用はIL-4やIL-13で刺激した正常者PBMCを用いても得られたが、IL-2R $\gamma$ とIL-13R $\alpha$ 1の各mRNAの発現レベルには影響は認められなかった。しかし、新鮮なPBMC中のCD3、CD4、CD8、CD19各陽性細胞中のIL-4R $\alpha$ を発現している細胞数には、正常者、アトピー喘息患者および非アトピー喘息患者の3群間で有意差は認められなかった。抗CD3抗体と抗CD28抗体で刺激したPBMCからのIL-4産生能はアトピー喘息においてのみ有意に高値を示したが、IL-13産生能は、アトピー喘息と同様、非アトピー喘息においても有意に高値を示した。また、IL-13の110番目のアルギニン-グルタミン(Gln)多型に関しても、Gln型の頻度がアトピー喘息と非アトピー喘息で高かった。さらに、重症度との関連を調べてみると、血清中のsIL-4R $\alpha$ 値、PBMCからのIL-13産生能およびIL-13の110Gln型の頻度のいずれも軽症患者に比べて重症患者の方が高値を示した。

一方、IL-4R $\alpha$ とIL-13R $\alpha$ 1を発現している気道平滑筋細胞をIL-13で刺激すると、IL-4刺激と同様、TGF- $\beta$ のみならず、eotaxinも産生され、またeotaxinの産生量はTGF- $\beta$ のそれよりも約10倍高値を示した。

#### D. 考察

本研究では、アトピー喘息と非アトピー喘息に共通な免疫学的パラメーターを同定するために、多角的な解析を行った。その結果、両喘息では共通して血清中のsIL-4R $\alpha$ 値が高いこと、無刺激PBMCにおけるIL-4R $\alpha$  mRNAの発現レベルが高いこと、抗CD3抗体と抗CD28抗体で刺激したPBMCからのIL-13産生能が高いこと、およびIL-13の110Gln型の頻度が高いことなどが明らかとなった。興味あることに、いずれのパラメーターも軽症患者に比べて重症患者の方が高値を示した。しかし、sIL-4R $\alpha$ の遊離に関与するIL-4R $\alpha$ 発現細胞については、両喘息患者と正常者との間には量的な差は認められないので、この点についてはsIL-4R $\alpha$ のスプライシングの違いをさらに検討する必要がある。また、両喘息に共通しているIL-13産生能の亢進機序を明らかにするためには、IL-13遺伝子のプロモーター領域における多型も解析する必要がある。

る。これらについては、現在検討中である。

一方、IL-4やIL-13は気道系にも作用することが最近の研究で明らかにされ、例えばムチン遺伝子発現やコラーゲン産生などはIL-4R $\alpha$ の活性化シグナルを介して増強される。また、本研究の結果によれば、IL-13刺激した気道平滑筋細胞は、IL-4刺激の場合と同様、好酸球性炎症に関与するeotaxinのみならず、リモデリングに関与するTGF- $\beta$ をも産生することが明らかとなった。

以上の知見から、活性化T細胞から産生されるIL-13はアトピー喘息と非アトピー喘息に共通した病態形成に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

T細胞由来のIL-13はアトピー喘息と非アトピー喘息に共通した喘息形質の獲得に関与していると考えられた。

#### F. 論文発表

- 1) Ikizawa K, Yanagihara Y : Possible involvement of Shc in IL-4-induced germline  $\epsilon$  transcription in a human B cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 54-59, 2000.
- 2) Izuhara K, Yanagihara Y, Hamasaki N, Shirakawa, Hopkin JM : Atopy and the human IL-4 receptor  $\alpha$  chain. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: S65-71, 2000.
- 3) Yanagihara Y, Kajiwara K, Basaki Y, Ikizawa K, Mori M, Akiyama K, Kawamura N, Sakiyama Y : Induction of IgE synthesis by genetically modified CD8<sup>+</sup> T cells of a patient with adenosine deaminase deficiency. *Allergol. Int.* 49: 195-204, 2000.
- 4) Koshio T, Kajiwara K, Ikizawa K, Nakagami K, Yanagihara Y : Blocking the CD154-CD40 interaction with anti-CD154 antibody differentially regulates IL-4 synthesis in T cells and IgE production in B cells. *Allergol. Int.* in press.
- 5) 生澤公一、柳原行義 : Germline C $\epsilon$  transcript を発現させるシグナル *Annual Review 免疫* pp. 24-30, 2000.
- 6) 柳原行義、出原賢治 : アレルギー疾患と遺伝子多型 *医療* 54: 67-72, 2000.

- 7) 柳原行義、出原賢治：アトピー性疾患とIL-4レセプター $\alpha$ 鎖遺伝子多型 アレルギー・免疫 7: 800-805, 2000.
- 8) 生澤公一、柳原行義：IL-4レセプターシグナルの多様性 臨床免疫 33: 664-668, 2000.
- 9) 出原賢治、赤岩美奈、梅下律子、濱崎直孝、大島孝一、北市正則、富地信和、井上洋西、柳原行義：IL-13レセプターの肺組織における発現分布とIL-13のシグナル伝達についての解析 呼吸 19: S47-49, 2000.
- 10) 梶原景一、柳原行義：CD23 臨床免疫 35: 127-131, 2000.
- 11) 梶原景一、柳原行義：気管支喘息におけるTh2細胞と転写因子 臨床免疫 35: 127-131, 2001.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### 研究協力者

梶原景一、生澤公一、森嶋大貴、品澤美樹、前田尚子、森 晶夫、釣木澤尚美、谷口正実、長谷川真紀、秋山一男（国立相模原病院臨床研究センター）