

200/0794

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 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 晶夫

平成 14 (2002) 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	5
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	8
高橋 清	
3. 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	14
相沢久道	
4. 成人難治性喘息の病態・機序、細胞要因	17
庄司俊輔	
5. 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	20
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	23
赤坂 徹	
7. 好酸球性炎症成立機序の解明に関する研究 :気道上皮から産生される細胞外基質蛋白の役割	26
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—	29
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先端技術開発研究部長)

分担研究者

高橋 清 (国立療養所南岡山病院長) 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 (久留米大学医学部第一内科教授)
柳原行義 (国立相模原病院臨床研究センター部長) 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) 前田裕二 (国立相模原病院臨床研究センター室長)
鈴木直仁 (同愛記念病院アレルギー呼吸器科) 佐野靖之 (同愛記念病院アレルギー呼吸器科部長)
美濃口健治 (昭和大学第一内科講師) 足立 満 (昭和大学第一内科教授)
相良博典 (獨協医科大学呼吸器アレルギー内科講師) 福田 健 (獨協医科大学呼吸器アレルギー内科教授)
岡田千春 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医長) 木村五郎 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医師)
坂口 基 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医師) 宗田 良 (国立療養所南岡山病院副院長)
河田典子 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医師) 金廣有彦 (岡山大学第2内科助手)
谷本 安 (岡山大学第2内科助手) 高田昇平 (国立療養所福岡東病院)
松本幸一郎 (九州大学医学研究院胸部疾患研究施設) 古藤 洋 (九州大学医学研究院胸部疾患研究施設)
井上博雅 (九州大学医学研究院胸部疾患研究施設) 福山 聡 (九州大学医学研究院胸部疾患研究施設)
木部敦子 (九州大学医学研究院胸部疾患研究施設) 池上智美 (九州大学医学研究院胸部疾患研究施設)
古賀丈晴 (久留米大学第一内科) 大下祐一 (久留米大学第一内科)
上村知子 (久留米大学第一内科) 増田 敬 (国立療養所盛岡病院アレルギー科医長)
一戸奈穂子 (国立療養所盛岡病院小児科) 和田博泰 (国立療養所盛岡病院副院長)
深澤洋 (国立療養所盛岡病院内科医長) 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) 梶原景一 (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) 釣木澤尚美 (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) 義江 修 (近畿大学細菌学教室)
加藤佳子 (国立療養所三重病院) 森田 寛 (お茶の水女子大学保健センター教授)
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) 太田康男 (東京大学医学部付属病院感染内科助手)
羅 智靖 (日本大学医学部教授) 石井 彰 (東京大学医学部付属病院呼吸器内科助手)
山下直美 (帝京大学医学部内科助教授) 山本寿子 (帝京大学医学部内科研究生)
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)
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)にはIL-2のautocrineな作用が関与すること(森)、2) アトピー型、非アトピー型両病型の喘息で重症症例で産生亢進の認められたIL-13に関して、IL-13プロモーター遺伝子多型が産生量に相関すること(柳原)、3) 免疫抑制サイトカインIL-10産生T細胞が重症喘息で減少していること(相沢)、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(高橋)、5) 創傷治癒過程で賛成されるIII型、IV型コラーゲンのパターンによって気管支平滑筋細胞の遊走が異なること、6) 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た好酸球浸潤モデルを用いたシステムで、IV型コラーゲンがERK1/2依存性に好酸球遊走を

増強すること、7) 難治性の対極に位置する寛解にトロンボキサン合成酵素遺伝子近傍のサテライトマーカ-の遺伝子多型が関与すること、が明らかになった。また、8) 小児喘息の難治化要因として反復入院、長期入院につき検討したところ、臨床背景に加え、薬物療法、環境改善、鍛錬療法などの複数の情報を勘案し、同一施設で対照症例を選択するケースコントロールスタディー、プロスペクティブスタディーを実施する必要性が明らかになった。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

吸入ステロイドを第一選択とする抗炎症療法の普及により、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、未だ十分な水準に達していない。特に、経口ステロイド薬を常用する必要が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、喘息分野に残された最大の課題である。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) 炎症に引き続く組織学的・機能的改変（リモデリング）があり、その結果として臨床的なステロイド低応答性もたらされるものと考えられる。1年目の研究成果として、a) の観点からは、T・B細胞の細胞性免疫異常機転に関する研究を森、柳原が行い、IL-5、IL-13産生異常機転の存在が指摘されたので、本年度はさらにその分子的基盤につき解析した。また、相沢らは近年注目されているIL-10産生細胞の重症喘息における動態について解析した。高橋らは、起因抗原と免疫応答の解析から、ダニおよびカンジダアレルギーの関与を明らかにしたが、本年度はケモカイン産生の観点から解析を進めた。藤沢らは、effector phaseに当たる好酸球過剰活性化機構の解析を分担し、昨年度三次元培養気道上皮を用いたモデルシステムを新たに構築したので、*in vivo*のオリエンテーションを再現したシステムでの好酸球動態につき解析を進めた。b) の見地から、庄司らは気道リモデリングにおけるcollagenサブタイプの役割の差異を見いだしたが、本年度は気管支平滑筋細胞を対象を拡張解析した。これらの病理学的、生物学的な異常に関係する遺伝因子について、大田らは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、症例数を増やして解析している。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、藤沢らは、昨年度の今日的定義、要因に関する研究を進展させ、頻回、長期入院喘息児に関する調査を行って我が国の小児喘息難治化要因を解析した。

B. 方法

研究班員の関連施設を対象に昨年度施行した難治性喘

息の定義、基準に関する調査をもとに、日本アレルギー学会内科系専門医（374名中回答150名）に難治性喘息の基準と病態の概念についてアンケート調査を行った。喘息治療管理ガイドラインのステップ4の治療を行いかつ経口prednisolone（PSL）換算10mg以上/日を必要とするものを難治性喘息と考えるものが62.2%であった。より緩やかな基準としてPSL換算5mg/日以上を難治とすることには賛否半々であった。この結果をもとに班員関連施設において難治性喘息症例を抽出するパイロットスタディーを施行した。難治例には男女差なく、非アトピー型、低血清total IgE値、40才をピークとする成人発症型、アスピリン喘息の合併が特徴的で、約80%の症例は週に数回以上喘息症状があり管理が不十分な状況であった。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PSL換算10mg/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え、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、costimulatoryシグナルによるT細胞のステロイド感受性調節機構を解析した。また、重症喘息の割合が多い非アトピー型喘息の起因抗原を同定をめぐり、IL-5産生を指標とする遅発型喘息反応誘導抗原診断法を確立した。

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 α 鎖（sIL-4R α ）、T細胞のIL-4、IL-13産生能および特にIL-13遺伝子プロモーター領域の-1112C/T多型について引き続き解析した。

3) 藤沢（国療三重病院）らは、好酸球性炎症成立機序の解明を目的として、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、上皮細胞が新たにIV型コラーゲン

を産生することを免疫染色により確認したので、IV型コラーゲンと好酸球遊走の関係を明らかにするため chemotaxis assay を行った。

4) 庄司(国療南福岡病院)らは、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改変をきたす機構について、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いことを明らかにしたが、さらに近年気道リモデリングの中心的細胞として注目されているヒト気管支平滑筋細胞につき遊走システムを用いて解析した。

5) 高橋(国療南岡山病院)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、ケモカインを測定した。

6) 相沢(久留米大学)らは、代表的抗炎症性サイトカインであるIL-10産生細胞の動態をcytokine flow cytometryを用いて解析し、軽症、重症喘息群で比較した。

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FcεRI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(国療盛岡病院)らは、小児気管支喘息の難治化の病態・要因を解明を目的として、国立医療機関を対象に、最近3年間に3回以上反復入院した反復群、1年以上の長期入院した長期群につきいかなる要因が加わって難治化するかを解析した。

(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) 重症喘息においては、高用量吸入ステロイド+経口ステロイドの投与にも拘わらず、末梢血Th細胞IL-5産生が亢進していた。Th細胞各応答のdexamethasoneに対する感受性は、増殖反応において最も低かったが、

さらに、同一症例の経時的解析により、コントロール不良期における低下を認めた。CD28シグナルによるステロイド抵抗性の誘導を昨年報告したが、サイトカイン産生においては遺伝子発現のレベルで抵抗性が誘導されていた。また、増殖応答におけるステロイド抵抗性は、Th細胞により産生されるIL-2およびTh細胞のPI3 kinase活性に依存することが明らかになった。シグナル伝達経路の解明によって、難治性喘息においてステロイド感受性を回復しうる可能性がある。成人難治性喘息で認められるT細胞レベルのステロイド感受性低下(抵抗性)には、costimulatory signalが関与し、その制御は治療ターゲットとして有望である。

2) 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患者>正常者≧非アトピー喘息患者の順であるが、IL-13産生能はアトピー喘息患者≧非アトピー喘息患者>正常者の順であった。また、IL-13遺伝子-1112C/T多型のTアリル頻度は両喘息患者では正常者に比べて約2倍高く、またTアリルをもつ患者の刺激PBMCからのIL-13産生はC/Cホモ接合体をもつ患者に比べて有意に高値を示した。

3) 気道上皮から産生されるIV型コラーゲン自体は好酸球遊走活性をもたなかったが、MAPキナーゼ、ERK1/2の活性化依存的にeotaxinならびにRANTESによる好酸球遊走を著しく増強した。

4) ヒト気管支平滑筋細胞は、気道上皮細胞と肺線維芽細胞それぞれの培養上清に対して有意な遊走活性を示した。I型とIV型コラーゲン、フィブロネクチン及びラミニニンに対しては有意に遊走したが、III型コラーゲンに対しては遊走しなかった。

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、難治性喘息で一層の亢進を認めた。抗原刺激された単核球上清中のTARC及びMDC濃度は、軽症例で高値を示し重症例とくに難治性症例では低値であった。

6) 難治性喘息患者では高用量吸入ステロイドの使用にもかかわらず、気道炎症は抑制されておらず、気道過敏性はさらに亢進していた。難治性喘息患者の末梢血におけるIL-10産生メモリー型CD4リンパ球は無刺激および刺激後の何れにおいても減少していたが、IL-4産生CD4リンパ球やIFN-γ産生CD4リンパ球には難治性喘息患者と軽症患者の間に差はみられなかった。

7) トロンボキサンA2合成酵素(TXAS)近傍のD7S684遺伝子マーカー6種類のホモ多型(CA18, 19, 22, 23, 24, 25)につき、非寛解例ではCA24ホモ多型が多く寛解例では少なかった($p<0.05$)。FcεRI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。TGF-β1遺伝子の509番目に点変異を認め、喘息群と健常人でその頻度に差はないが、変異群

ではTGF- β 1の産生が有意に亢進していた。

8) 家族歴、既往歴、合併症の頻度には反復群と長期群で差は無かった。難治化要因は反復群で88.5%、長期群で70.4%に認められ、差は無かった。喘息発作、治療薬、喘息児、保護者に差は無かったが、心理的ストレスの頻度はそれぞれ19.2%、48.1%、家族関係の問題は23.1%、51.9%であり、長期群に有意に多かった($P < 0.05$)。重症の頻度は、初診時に長期群に多く、増悪時には差が無かった。血清総IgE値は初診時に長期群に高く($P < 0.05$)、増悪時には長期群に高い傾向が見られた($p < 0.1$)。

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) 気管支平滑筋細胞が気道粘膜内で結合織に向かって遊走し、気道の閉塞やリモデリングに関与すること、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、TXAS、Fc ϵ RI、TGF- β 1など少なくとも複数の遺伝子多型が関与すること、6) IL-10産生の低下が難治性喘息の要因となりうること、7) MMPsによる可溶性コラーゲンの遊離が好酸球をはじめとする炎症細胞浸潤を増強する可能性があること、が指摘された。また、8) 小児喘息の難治化要因が確認された。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が深められ、臨床アレルギー学的、免疫学的、細胞生物学的、遺伝学的異常機構が解明されつつある。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)
鈴木直仁 (同愛記念病院アレルギー呼吸器科) 佐野靖之 (同愛記念病院アレルギー呼吸器科部長)
美濃口健治 (昭和大学第一内科講師) 足立満 (昭和大学第一内科教授)
相良博典 (獨協医科大学呼吸器アレルギー内科講師)
福田健 (獨協医科大学呼吸器アレルギー内科教授)

研究要旨

難治性喘息における T 細胞レベルのステロイド感受性低下は、炎症反応の持続、遷延化の要因として重要である。CD28 分子を介する costimulatory signal (signal 2) は、サイトカイン産生、増殖反応を増強するのみならず、ステロイド感受性の低下をもたらすと知見は、ステロイド感受性の低い症例において、ステロイド投与に拘わらず *in vivo* で T 細胞活性化が持続するメカニズムとして有力である。その分子細胞機序につき解析したところ、signal 2 自体ではなく、signal 2 の結果産生される IL-2 によってもたらされる IL-2 受容体活性化シグナル (signal 3) が、細胞レベルでのステロイド抵抗性誘導に関わっていることが明らかになった。また、PI3 kinase 活性阻害によって、ステロイド感受性が回復することは、重症喘息の新たな治療ターゲットとして重要な知見である。

A. 研究目的

喘息病態の重症・難治化には複数の因子が関与するものと想定されるが、臨床的にはステロイド効果不全としてとらえられる。比較的大量のステロイド投与にもかかわらず、気管支粘膜の好酸球性炎症を制御しきれない基盤として、これまでの研究から T 細胞機能、殊に IL-5 産生に関する異常を明らかにしてきた。前年度の研究では、難治症例の T 細胞は、*in vivo* においてはステロイド感受性が低下しているが、*in vitro* ではステロイド感受性に差を認めなかった。Costimulatory signal が T 細胞レベルでのステロイド感受性低下を誘導することを明らかにしたので、その分子細胞機序につき解析した。

B. 方法

当病院受診中の喘息症例で、インフォームドコンセントの得られた症例より採血し、末梢血単核球を得た。Negative selection 法により CD4 細胞を enrich した。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 特異的ヘルパー T (Th) 細胞クローンを樹立した。種々の活性化刺激に应答したサイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。培養中に各濃度の

dexamethasone を加え、用量反応曲線より IC₅₀ 値を求めた。T 細胞受容体を介した活性化シグナルに加えて、CD2、LFA1、CD28 等を介した costimulatory signal を与え、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

重症喘息においては、高用量吸入ステロイド+経口ステロイドの投与にも拘わらず、末梢血 Th 細胞 IL-5 産生が亢進していた。Th 細胞各応答の dexamethasone に対する感受性は、増殖反応において最も低かったが、さらに、同一症例の経時的解析により、コントロール不良期における低下を認めた (図 1)。CD28 シグナルによるステロイド抵抗性の誘導を昨年報告したが、サイトカイン産生においては遺伝子発現のレベルで抵抗性が誘導されていた。また、抗 IL-2 中和抗体の存在下においては、増殖反応自体は約 2 割程度の抑制が認められるにすぎないが、CD28 シグナルによる

ステロイド抵抗性の誘導がみられなくなることから、増殖応答におけるステロイド抵抗性は、Th細胞により産生される IL-2 が重要であることが明らかになった。さらに、PI3 kinase 阻害剤によって、ステロイド抵抗性の誘導が抑制されることから、CD28 シグナルによるステロイド抵抗性の誘導がTh細胞の PI3 kinase 活性に依存することが明らかになった。

D. 考察

T細胞のステロイド感受性は、活性化シグナルによって規定される。IL-5 高産生持続群でみられる T細胞レベルのステロイド感受性の低下には、costimulatory signal によるステロイド抵抗性誘導メカニズムが関与する可能性が考えられる。すなわち、難治性喘息における T細胞のステロイド感受性低下は、intrinsic なものでなく、活性化シグナル依存性に誘導される可能性が考えられる(図2)。CD28 の ligand である CD80、CD86 発現レベルを検討することが重要である。また、詳細なシグナル伝達経路の解明によって、難治性喘息においてステロイド感受性を回復しうる可能性がある。

E. 結論

成人難治性喘息で認められる T細胞レベルのステロイド感受性低下(抵抗性)には、costimulatory signal が関与し、その制御は治療ターゲットとして有望である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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⁺ T cells and bronchial hyperresponsiveness. *Int. Immunol.* 13:329-339.
- 2) Mori, A., Okudaira, H., Kobayashi, N., and Akiyama, K. 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.* 124:172-175.
- 3) 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.* 124:287-289.
- 4) Mori, A., Ikeda, Y., Taniguchi, M., Aoyama, C., Maeda, Y., Hasegawa, M., and Akiyama, K. 2001.

IL-5 production by peripheral blood Th cells of adult asthma patients in response to *Candida albicans* allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125 (suppl 1):48-50.

- 5) Kaminuma, O., Fujimura, H., Fushimi, K., Nakata, A., Kikkawa, H., Akiyama, K., and Mori, A. 2001. Humoral immunity is dispensable for the local recruitment of antigen-specific Th2 cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125 (suppl 1):17-18.
- 6) Kaminuma, O., Fujimura, H., Fushimi, K., Nakata, A., Sakai, A., Chishima, S., Ogawa, K., Kikuchi, M., Kikkawa, H., Akiyama, K., and Mori, A. 2001. Dynamics of antigen-specific helper T cells at the initiation of airway eosinophilic inflammation. *Eur. J. Immunol.* 31:2669-2679, 2001.
- 7) Ogawa, K., Kaminuma, O., Kikkawa, H., Nakata, A., Asahina, M., Egan, R. W., Akiyama, K., and Mori, A. 2002. Transient contribution of mast cells to pulmonary eosinophilia but not to hyperresponsiveness. *Clin. Exp. Allergy* 32:140-148, 2002.
- 8) Kaminuma, O., Eily, C., Tanaka, Y., Mori, A., Liu, Y.-C., Altman, A., and Miyatake, S. 2002. Vav-induced activation of the human IFN- γ gene promoter is mediated by upregulation of AP-1 activity. *FEBS Letters* in press

2. 学会発表

- 1) Mori, A., Ikeda, Y., Taniguchi, M., Hasegawa, M., Maeda, Y., Mita, H., and Akiyama, K. 2002. T cell IL-5 production in vitro in response to *Candida albicans* acid protease is associated with isolated late asthmatic response upon inhalation challenge in a group of nonatopic asthmatics. 2002 American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual Meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109:S38-39 (New York) 2001/3/1-6

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

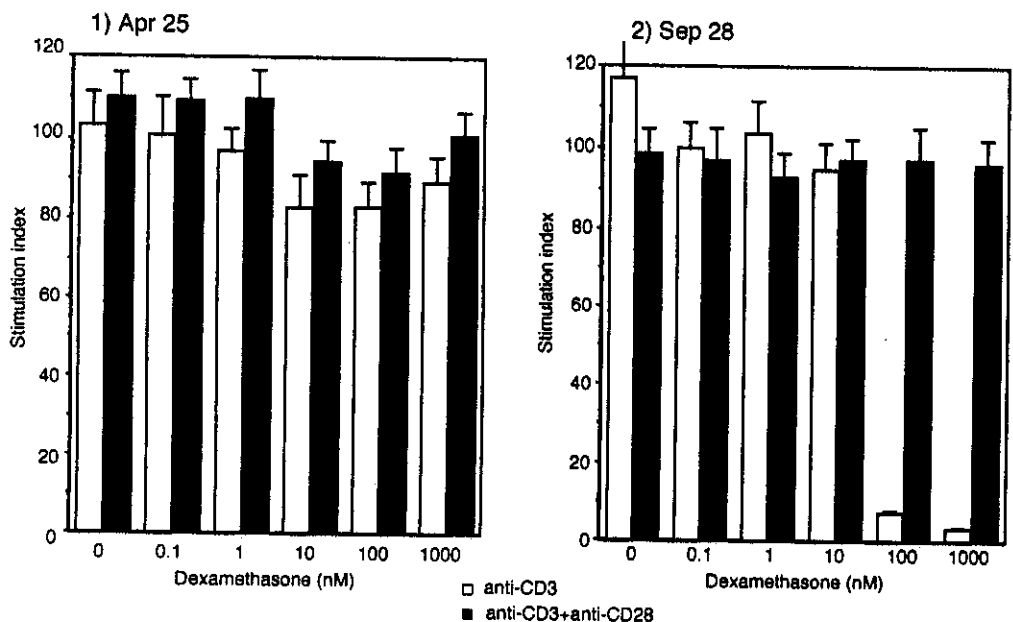


図1、末梢血T細胞のステロイド感受性変化
 末梢血CD4 T細胞を分離、固相化抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激した。各濃度のDexamethasoneを加え72時間培養した。3H-Thymidine uptakeにより増殖反応を測定した。中等症喘息患者の増悪(1)に際して、ステロイド薬の全身投与が開始されたが、治療に対する反応性は乏しかった。症状の改善した時期に再び解析したが、ステロイド感受性の復帰が認められた。

Microenvironment

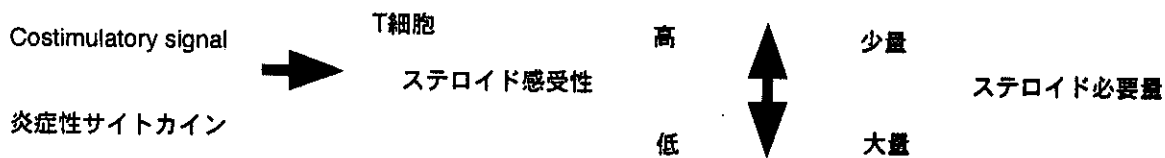


図2、T細胞microenvironmentによるステロイド感受性の調節

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

今年度は、臨床と基礎の 2 研究を行った。臨床的研究として、難治性喘息の基準に関する喘息専門医の意識調査と、病態解明のための難治例の検討を行った。その結果、経口ステロイド薬(PSL 換算) ≥ 10 mg/日で規定(2000 年版 JGL)する意見が多数を占めた。病態的特徴としては、成人発症型・非アトピー型でアスピリン喘息を合併する 50~60 才台が多く、ステロイド薬でも気道炎症の制御が困難な群と、リモデリングでステロイドに反応しにくくなっている群に大別されることが判明した。

基礎的検討として、難治性喘息の病態機序解明のため、重症喘息症例においてアイソトープを使用せず FACSCalibur にて細胞分裂の S 期の細胞を解析し、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、難治性喘息においても、抗原刺激によるリンパ球の活性化が認められ、しかも重症症例においてリンパ球の活性化が亢進している傾向があった。Th2 リンパ球の特異的ケモカインである TARC 濃度の検討では、難治性と TARC には関連がなかった。

A. 研究目的

成人喘息は、近年の喘息治療ガイドラインの普及にも関わらず、今なお高用量経口ステロイド薬を必要とする難治性喘息が存在する。そこで今年度は、その実態と病態の解明に資する研究対象症例を規定するために、我が国の喘息専門医の意識調査を行い難治性喘息の基準案やグループ化の試案作りを検討した。

次に、臨床的に難治性喘息と考えられる症例の多くは、原因抗原の明白でない非アトピー型喘息が占める。その病態・機序の解明の目的で、昨年度の当研究では特異的 IgE 抗体の認められない非アトピー型喘息においても、アトピー型喘息と同じように気道における Th2 タイプのサイトカイン産生が亢進していること、また抗原刺激によるリンパ球の活性化が認められることを報告した。今年度は難治性喘息患者におけるリンパ球の活性化の有無と、これらのリンパ球系の活性化がどのようなメカニズムで起こるかを検討する目的で、Th2 リンパ球に対する特異的ケモカインである thymus- and activation-regulated chemokine (TARC) を検討した。

B. 研究方法

I. 難治性喘息の基準に関する検討

1. アンケート調査の対象症例と内容

成人喘息の専門医として、アレルギー学会の内科系専門医 377 名を対象に選んだ。難治性喘息と診断する根拠として、①経口/吸入ステロイド薬の常用量で規定するか、②病態や病像の特徴について、③難治性喘息の自験例数と適正な比率について、などをアンケート調査した。その有効回答は 150 名であった。

2. 難治症例の解析

国立療養所南岡山病院(n=19)と国立相模原病院(n=17)の、主治医が難治性喘息と判明した 36 症例(平均 59 才)について、経口ステロイド薬常用量別(≥ 10 mg/日 23 例, ≥ 5 mg/日 11 例, < 5 mg/日 2 例)に、その病態と喘息の管理状態を解析した。

II リンパ球に関する検討

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、同意が得られた成人喘息患者 22 例(重症難治性喘息患者 7 例を含む)を対象とした。コントロールとして、年齢をマッチ

させた健常者6例を選んだ。

2.細胞培養およびリンパ球活性化指標のアッセイ

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。この PBMC を RPMI1640 で 1×10^6 /ml に調整し *Candida albicans* と、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、7日間 37°C 、5% 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。

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

3.単核細胞上清中の TARC 測定

同様に PBMC を 1×10^6 /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°C 、5% 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、TARC 濃度を ELISA キット (R&D Co.) で測定した。

C.研究結果

I.難治性喘息の基準に関する検討

1.アンケート調査

アレルギー学会内科系専門医(n=150)は、54.3%が経口ステロイド薬常用量、37.7%が吸入ステロイド薬、8.0%が経口+吸入ステロイド薬で難治性喘息を規定すると回答した。

その過半数を占めた経口ステロイド薬の常用量で規定する内容に関しては、Figure1.の如く、「反対」の 17.1%に比して「賛成」が 58.6%と圧倒的に高い比率を示した。さらに経口ステロイド薬の用量については、PSL 換算 $\geq 10 \text{ mg}/\text{日}$ が 62.2%と高率であったが、 $\geq 5 \text{ mg}/\text{日}$ は反対意見の方が勝っていた。

経口 PSL5 mg=BDP600 μg の換算化ですべてのステロイド薬を吸入ステロイド薬に換算する提案に対しては、賛否ほぼ同数であった。

ステロイド薬の常用期間は、63.5%が 1 年以上を適当とした。また、ステップ 4 に相当するステロイド薬以外の喘息治療薬を併用すべきとするものが 55.8%を占めた。

次に難治性喘息の特徴的な病像については、85.1%が非難治性との間に病態の違いがあるとし、その相違する理由としては Figure2.の如き意見に集約された。特に、治療法が不適切であったために難治性となったことが強調された(73.9%)。

各専門医が適正と考えている難治性喘息の比率は、全喘息の 5%程度が最も多かった。

2.難治性症例の解析

発症年齢は成人発症型が 94.5%(n=34)と大半を占めた。病型は 70%(n=23)が感染型で、アトピー型は 1 例のみであった。血清総 IgE 値は 63%(n=22)が 100IU/ml未満であったが、1000 IU/ml以上が 2 例あった。

アスピリン喘息の合併は 33.3%(n=12)であり、不明を除くと 46.2%を占め、全喘息の 10~15%に比して明らかに高率であった。

難治性喘息の長期管理については、Figure3.の如く、 $\geq 10 \text{ mg}/\text{日}$ 群では 66%が毎日有症状であり、年間を通して全く症状がない例は認められなかった。

II.難治性喘息のリンパ球機能に関する検討

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 Figure4.に示す。重症難治性喘息患者群でも、*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亢進していた。今回の検討症例では重症群、中等症群において軽症群に比較してリンパ球の活性化が亢進していた。

抗原刺激に対する単核球層からの TARC 産生の検討では、Del f 抗原、*Candida* 抗原刺激ともに TARC 濃度の上昇を認めた (Figure 5.)。しかし、TARC 濃度はアトピー型喘息症例において高値をとり、非ア

トピー型喘息では低値であり、重症度別の検討では、重症の症例ほど低値を示した。従って、今回検討した Th2 特異的ケモカインである TARC は、気管支喘息の難治化のメカニズムには関与していないと考えられた。

D. 考察

我が国の成人喘息専門医の大半は、「喘息予防管理ガイドライン'98」の長期管理ステップ 4 の治療に加えて「経口ステロイド薬(PSL 換算) ≥ 10 mg/日以上を 1 年以上の常用している症例」を難治性喘息の基準として受け入れていることが判明した。かかる結果は、1998 年版のガイドラインがよく周知されていることを示すものと考えられた。今回提案した「経口 PSL(5 mg)を BDP(600 μ g)にすべて換算して規定する方法」は、現在広く普及しつつある吸入ステロイド薬の影響を加味した新分類でなければ病態に則していないのではという問いかけであったが、未だ議論が熟していないための結果であった。今後の重要な課題としたい。また、米国胸部疾患学会の Refractory asthma の基準(2000 年)は、我が国のそれよりかなり緩く、ステップ 4 の大半が含まれるものと考えられる。臨床的検討には参考にすべき基準である。

難治性喘息病態(病像)の主因は、吸入ステロイド薬等の抗炎症薬による初期治療の失敗、例えば late intervention, β -刺激薬に依存、容易な経口ステロイド薬や除放射性ステロイド薬(筋注)の使用など、並びに教育不足から、気道炎症(発作)の管理が不十分でリモデリングをもたらした結果であろうとの意見が多くを占めた。

また、難治例は 50~60 才代に多く、90%以上が成人発症型で、感染型かつ血清 IgE 低値などの特徴に加えて、アスピリン喘息の合併が特に高率であった。すなわち非難治群との最大の相違は、①持続する強い気道アレルギー性炎症の制御が不十分であることと、②リモデリング等によるステロイド薬への反応性の低下、③合併症等が考えられる。そのため、難治例の日常管理は大変困難であり、今回検討した 2 専門施設ですら症状の十分な管理ができておらず、

今後画期的な治療の開発が待たれる。

昨年度のリンパ球機能に関する研究から、IgE 抗体の関与が乏しい非アトピー型の症例においても、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された。今年度の研究では、さらに重症難治群においてもリンパ球の活性化が起こっており、軽症に比し重症、中等症においてリンパ球の活性化が顕著である可能性が示唆された。しかし、このメカニズムを解明する目的で検討した Th2 リンパ球に特異的なケモカインである TARC 濃度は、抗原刺激された単核球層上清で上昇していたが、重症になるほど低値をとる傾向があり重症難治化には関与しないと考えられた。

E. 結論

難治性喘息は、経口ステロイド薬の常用量で規定する我が国の喘息予防管理ガイドラインの指針が喘息専門医のコンセンサスとなっているが、今後吸入ステロイド薬の評価も検討されなければならない。

難治例は、病態としては成人発症型、非アトピー型で、アスピリン喘息を合併する 50~60 才代が多かった。その基盤には、抗原に対するリンパ球の活性化が重要な役割を果たし気道のアレルギー性炎症がステロイド薬ですら制御困難な群と、リモデリング等でステロイド薬の反応が低下している群が存在していることが窺われた。今後その観点からの解析が必要であろう。

F. 研究発表

学会発表

高橋清, 岡田千春, 森晶夫, 秋山一男; 難治性喘息の病態と治療をめぐって 難治性喘息の定義と臨床像. 第 51 回日本アレルギー学会総会シンポジウム, 2001 年, 福岡

岡田千春, 藤澤隆夫, 坂口基, 松本寛, 木村五郎, 谷本安, 吉江修, 吉永泰彦, 宗田良, 高橋清; 抗原刺激によるリンパ球の活性化と macrophage-derived chemokine (MDC) と thymus-and activation-regulated chemokine (TARC) の関連の検討. 第 51 回日本アレルギー学会総会, 2001 年, 福岡

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)

坂口 基 (国立療養所南岡山病院アレルギー科)

宗田 良 (国立療養所南岡山病院アレルギー科)

河田典子 (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)

藤澤隆夫 (国立療養所三重病院アレルギー科)

Figure1.

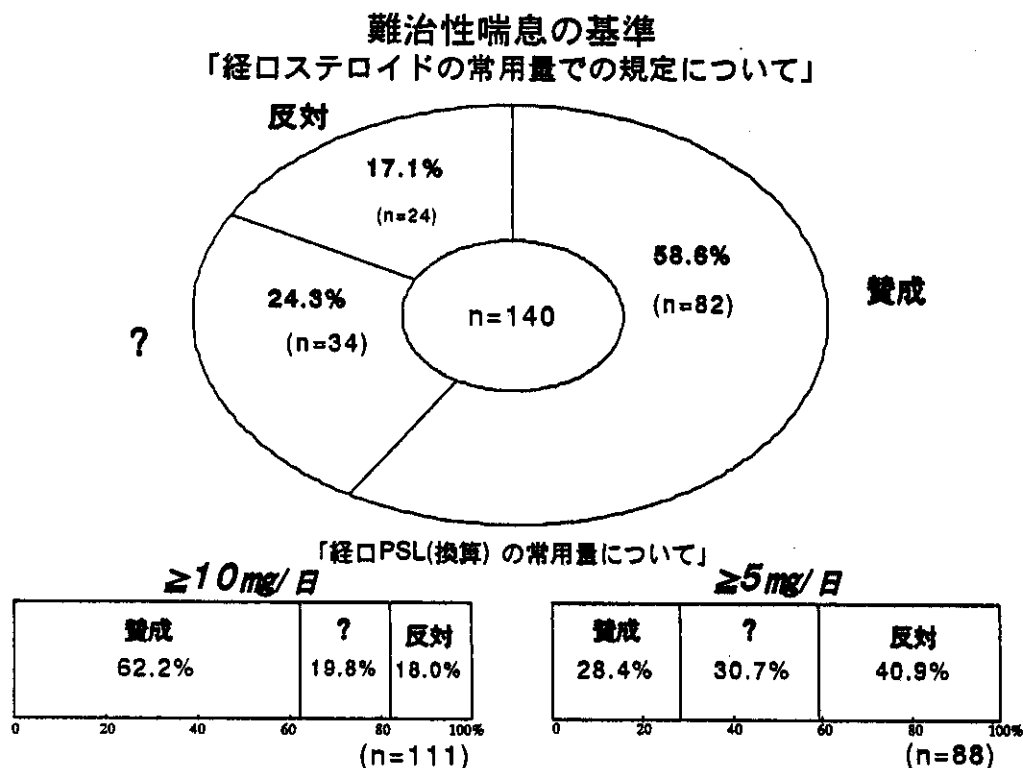


Figure2.

難治性喘息は非難治性と比べて基礎病態に違いがあるか？

“はい”

- ステロイド薬で管理し難い“持続する強い炎症”がある
- ステロイド薬等への反応性が低下している
- リモデリングがある
- 合併症 (COPD, Sinusitis 等の気道感染)が関与する

“いいえ”

- 慢性炎症が共通した病態で、その強度が違うだけ
 - ・ 病因(アレルゲン等)からの回避が可能か不可能
 - ・ 治療が適正か不適當
- 気道過敏性、リモデリングが進展し易いかどうかの違い
“現時点では、区別する根拠が不明確”

Figure3.

喘息(発作)の長期管理

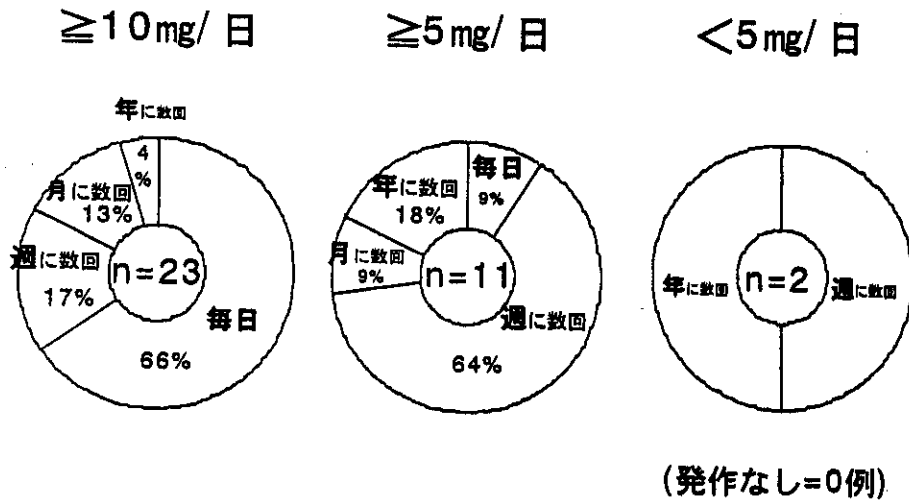


Figure4.

気管支喘息患者におけるリンパ球活性化

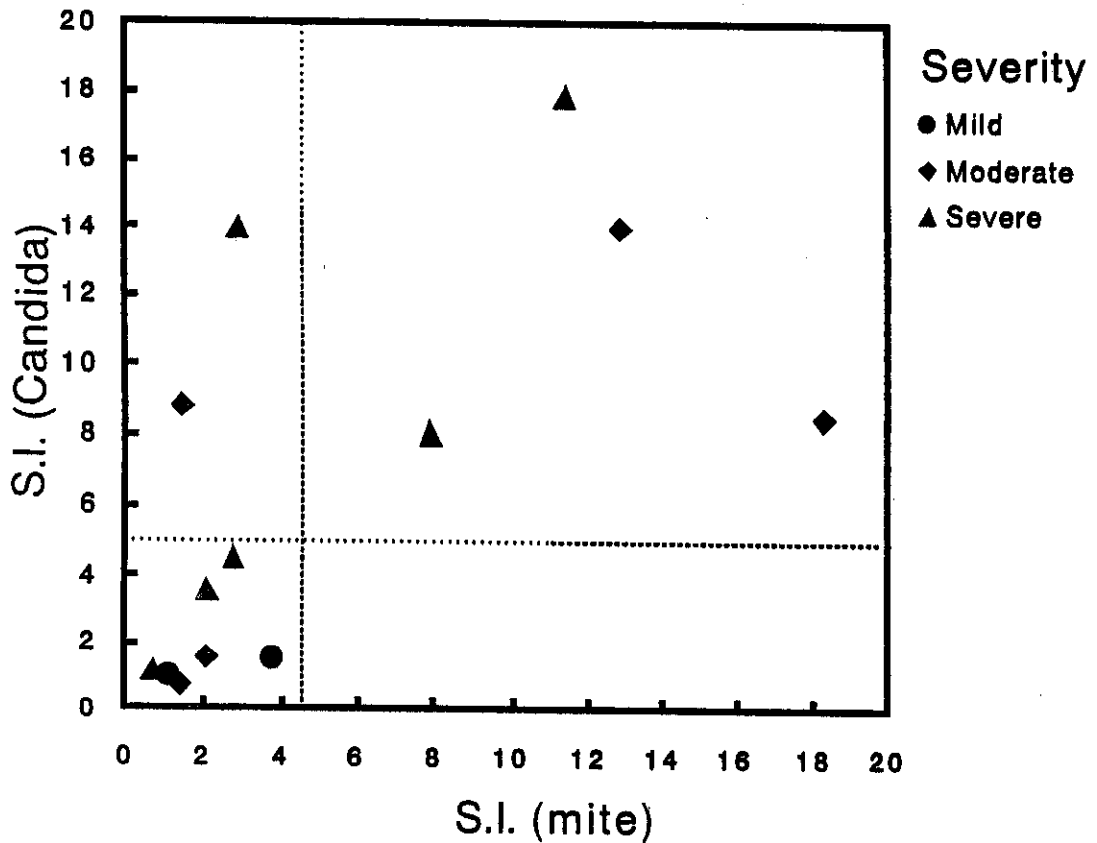
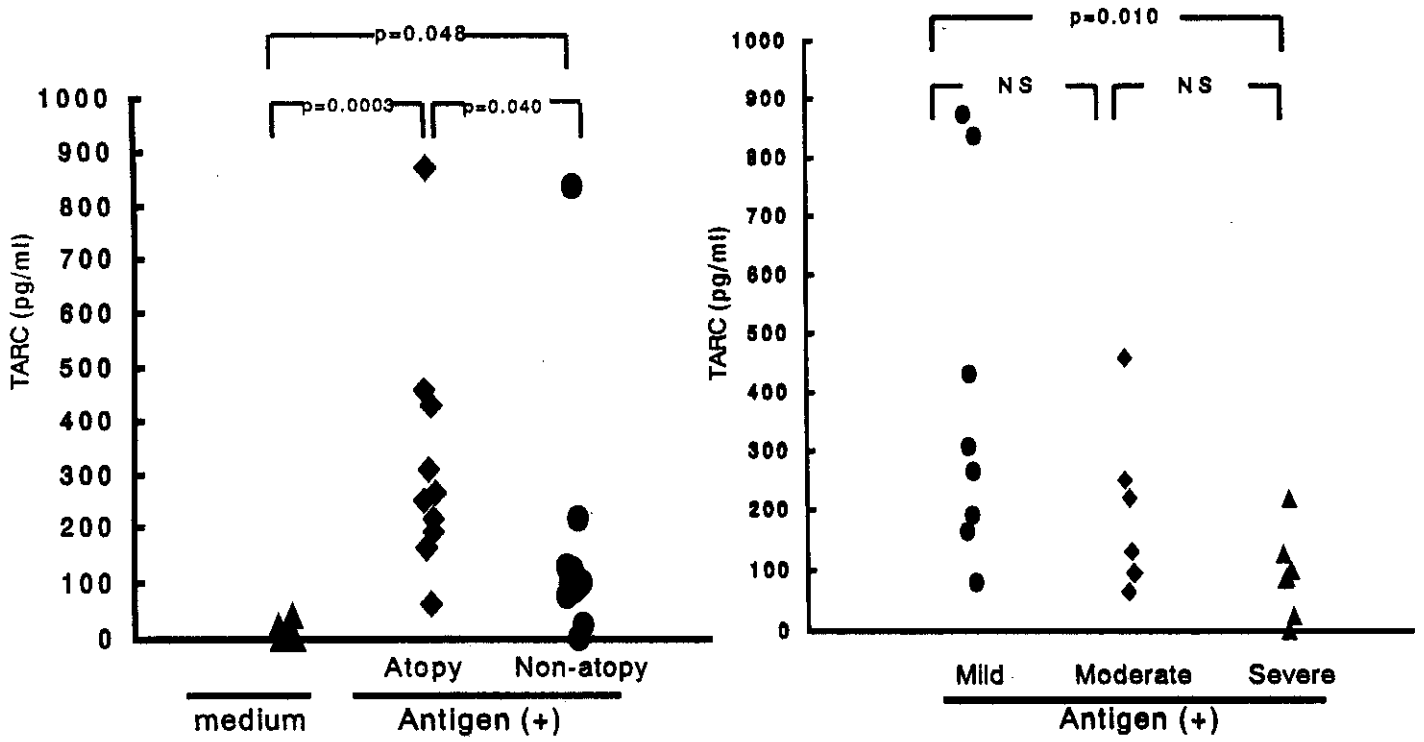


Figure5.

Mite抗原刺激によるPBMC上清中のTARC濃度



研究要旨

難治性喘息を引き起こす要因のうち、「気管支喘息難治化における Interleukin-10 の関与」について検討した。IL-10はT細胞を含む様々な細胞で産生され、主に免疫機能を調節しているサイトカインである。アトピー性喘息はアレルギー性気道炎症によって起こると考えられるので、喘息患者の末梢血でのCD4+ T細胞からのIL-10産生と喘息の重症度との相関を調べた。対象患者をその症状と肺機能により軽症・中等症・重症に分け、末梢血単球を抗CD3,抗CD28抗体存在下と非存在下に培養し、抗CD4,抗CD45RO,抗CD54抗体により染色し、フローサイトメトリーにて細胞内IL-10を測定した。IL-10産生CD4+細胞はほとんどCD45RO+CD54+細胞、すなわち活性化されたメモリー細胞に限られていた。重症群は高用量の吸入ステロイド投与にも関わらず、持続する喀痰中好酸球増多、気道過敏性の亢進を示した。IL-10産生細胞は、軽症及び中等症では健常者と差がなかった。しかしながら、重症群では軽症群に比しIL-10産生細胞は有意に少なかった。IL-4とIFN- γ については差がなかった。これらの結果より、T細胞からのIL-10の産生の減少が難治性喘息の発症に関与していると考えられた。

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。アトピー性喘息は吸入抗原に対するアレルギー性炎症が基本病態であり、難治性喘息はこの炎症反応が強く起こっていると考えられる。気道炎症の経過においては種々の抗炎症性制御機構が機能しており、病態の難治化にはそれら制御機構の破綻が関与している可能性がある。IL-10は代表的な抗炎症性サイトカインであり、IL-10産生CD4リンパ球はアレルゲン吸入によって末梢血から気道へ動員・集積され、産生されたIL-10は喘息の気道炎症を抑制する役割をしている可能性があると考えられる。そこで、我々は喘息の重症化・難治化におけるIL-10の関与を、末梢血リンパ球レベルで検討した。

B. 方法

対象は九州大学附属病院呼吸器科外来通院中の非喫煙アトピー性喘息患者で、測定前の少なくとも1ヶ月間は病状不変であることとした。受診時、呼気中一酸化窒素濃度、スパイロメトリー、気道過敏性測定(アストグラフ法・PD35Grs)、誘発喀痰中好酸球(%)の測定を行い、末梢血を採取し、好酸球比率、cytokine flow cytometryの測定を行った。その結

果を、対象患者をGINAのガイドラインに準じ、軽症・中等症・重症の3群に分けて比較検討した(軽症間欠型と持続型は1群とした)。ただし、治療内容は重症度の判定指標としては考慮していない。

C. 結果

重症喘息患者群においてはBDP相当量で1200 μ g/day以上の高用量吸入しており(図1)、ステロイドの使用にもかかわらず症状あるいは肺機能のコントロール不良であり、ATS workshopの提唱する難治性喘息に対応していた。

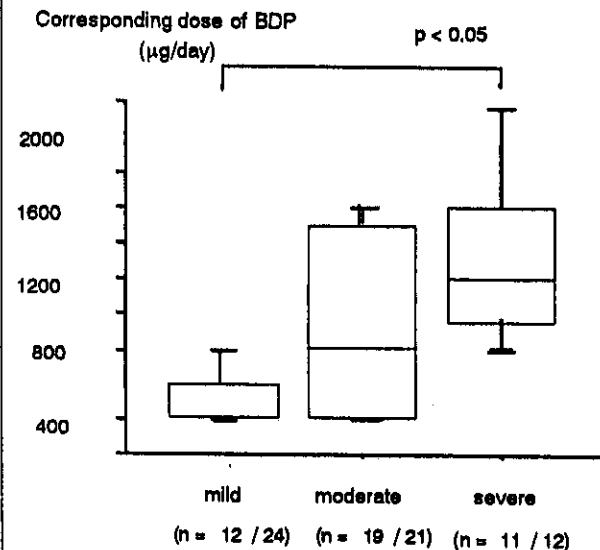


図1. 重症度別による吸入ステロイドの使用量。

難治性喘息患者では高用量吸入ステロイドの使用にもかかわらず、呼気中NOや喀痰中好酸球で示される気道炎症は抑制されておらず、気道過敏性はさらに亢進していた(図2)。

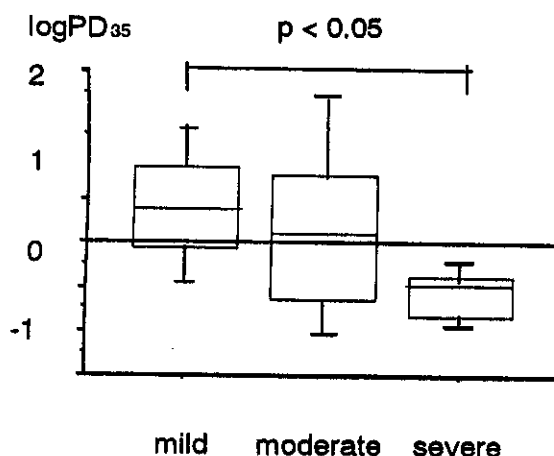


図2. 重症度別にみた気道過敏性。

難治性喘息患者の末梢血におけるIL-10産生メモリー型CD4リンパ球は無刺激(図3)および刺激後(図4)の何れにおいても減少していた。一方、IL-4産生CD4リンパ球やIFN- γ 産生CD4リンパ球には難治性喘息患者と軽症患者の間に差はみられなかった。

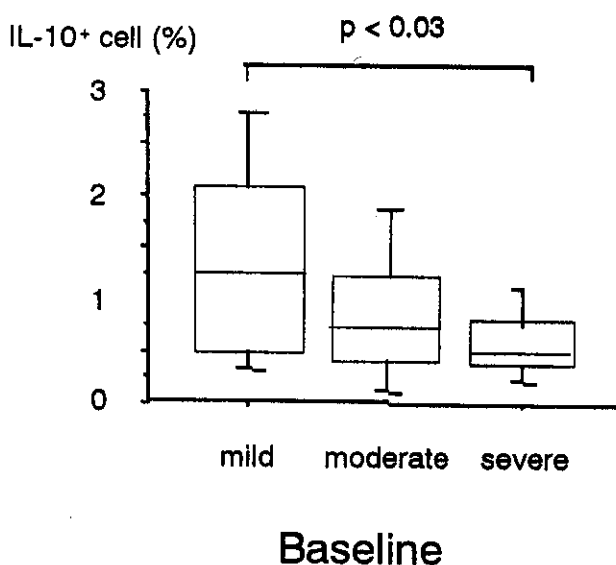
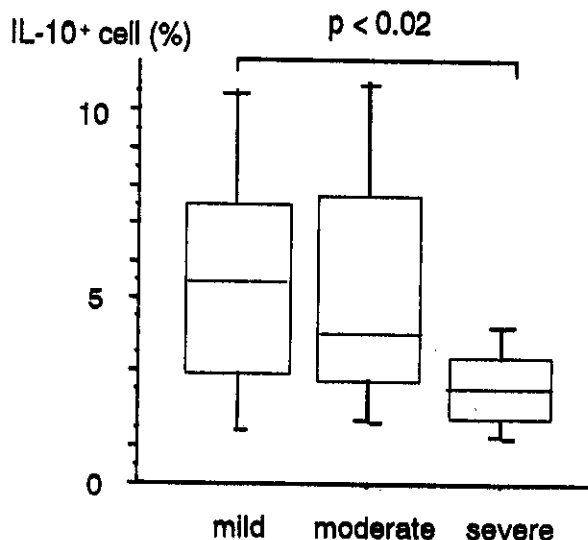


図3. 重症度別にみた末梢血のIL-10産生細胞数(baseline)。



Stimulated with α CD3 / α CD28

図4. 重症度別にみた末梢血のIL-10産生細胞数(α CD3と α CD28で非特異的に刺激後)。

D. 考察

今回の検討においては、難治性喘息患者では高用量吸入ステロイドの使用にもかかわらず、気道炎症は抑制されておらず、気道過敏性はさらに亢進していた。また、難治性喘息患者の末梢血におけるIL-10産生メモリー型CD4リンパ球は無刺激および刺激後の何れにおいても減少していた。CD4リンパ球におけるIL-10産生能の減弱は喘息の病態難治化の内因性規定因子の一つとなっているであろうか? リンパ球におけるサイトカイン産生は一般にcorticosteroidによって抑制を受けるが、今回の検討でも難治性喘息患者では高用量ステロイドが使用されている。したがって、今回の検討で得られたCD4リンパ球におけるIL-10産生の低下は単にステロイドの用量効果を反映しているに過ぎない可能性もある。そこで、IL-10以外のサイトカインの産生能について比較検討したが、CD4リンパ球からのIL-10・IL-4・IFN- γ の産生に対するデキサメサソンの抑制効果には難治性喘息患者と軽症患者の間に差はみられなかった。このように、ステロイドとは無関係に難治性喘息患者のCD4リンパ球においてはIL-10産生能の選択的減弱がみられ、これが病態難治化の内因性規定因子の一つとなっている可能性があると考えられた。

E. 結論

IL-10産生の低下が難治性喘息の原因の一つになっている可能性が考えられた。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。

F. 論文発表

1. 田尾義昭, 二宮 清, 宮崎正之, 相沢久道. 当院におけるMycobacterium kansasii症例の臨床的検討. 結核 2002;77:23-27.
2. Aizawa H, Takata S, Shigyo M, Matsumoto K, Inoue H, Hara N. N-omega-nitro-L-arginine methyl ester increases airway responsiveness to serotonin but not to acetylcholine in cats in vivo. Respiration 2001;68:286-91.
3. 相沢久道. 第2章. 喘息の病態. 気道過敏性. 泉孝英, 編. 新しい診断と治療のABC 2. 大阪. 最新医学社, 2001; 71-77.
4. 相沢久道. ピークフロー. 飛田渉, 永井厚志, 大田健, 編. 機能検査からみた呼吸器診断. 東京. メジカルレビュー社, 2001; 141-147.
5. 相沢久道. トロンボキサン阻害薬. 森田 寛, 永倉俊和, 宮地良樹, 岡本美孝, 編. 東京. メディカルレビュー社, 2001; 162-163.
6. Takahashi N, Iwanaga T, Aizawa H, et al. Acute interstitial pneumonia induced by ONO-1078 (pranlukast), a leukotriene receptor antagonist. Intern Med. 2001;40:791-4.
7. 中野寛行, 相沢久道, 井上博雅, et al. Pulmonary capillary hemangiomatosisによる肺高血圧症の1例. 日呼吸会誌 2001;39:471-475.
8. 相沢久道. 慢性閉塞性肺疾患(COPD)の治療—ステロイド薬の位置づけ—. 呼吸と循環 2001;49:1101-1106.
9. 相沢久道. 気管支喘息. EBMに基づく臨床データブック. 臨床医 2001;27:975-982.
10. 相沢久道. COPD患者の在宅酸素療法. 日医雑誌 2001;126.
11. 相沢久道. 気道反応性亢進(気道過敏性). MEDICAL PRACTICES 2001;18:779-781.

G. 知的財産権の出願・特許状況

- | | |
|-----------|----|
| 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

- 高田昇平 (国立療養所福岡東病院)
松元幸一郎 (九州大学呼吸器科)
古藤 洋 (九州大学呼吸器科)
井上博雅 (九州大学呼吸器科)
福山 聡 (九州大学呼吸器科)
木部敦子 (九州大学呼吸器科)
池上智美 (九州大学呼吸器科)
古賀丈晴 (久留米大学第一内科)
大下祐一 (久留米大学第一内科)
上村知子 (久留米大学第一内科)

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
研究協力者 沼尾利郎・福田 健 獨協医科大学アレルギー・呼吸器科

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。今年度の研究においては、気管支喘息における気管支平滑筋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。その結果、気道上皮細胞および線維芽細胞から気管支平滑筋細胞に対する遊走因子が産生されること、気管支平滑筋細胞がコラーゲンのタイプ別にはI型とIV型コラーゲン、細胞外基質因子ではフィブロネクチンとラミニンに対して遊走することが確認された。これは気道の修復やリモデリングの過程において、気管支平滑筋の遊走が重要な役割を演じる可能性を示唆しているものと考えられる。

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、線維芽細胞、血管内皮細胞及び気道平滑筋細胞などがすべて関与するものと考えられる。最近の報告では、気管支平滑筋細胞が結合織ないに遊走して気道粘膜修復に関わる可能性が指摘されており、今年度の研究ではこれを培養細胞を用いた遊走実験で検討した。

B. 研究方法

気道平滑筋細胞には、ヒト由来の気管支平滑筋細胞（Cryo BSMC：三光純薬）

を用いた。実験としては、（1）培養気道上皮細胞の上清と、培養線維芽細胞に対する気管支平滑筋細胞の遊走、（2）タイプ別コラーゲン（I、III、IV）に対する気管支平滑筋細胞に対する遊走、（3）細胞外基質(ECM)因子のうちのフィブロネクチンとラミニンに対する気管支平滑筋の遊走を検討した。

C. 研究結果

- （1）ヒト気管支平滑筋細胞は、気道上皮細胞と肺線維芽細胞それぞれの培養上清に対して有意な遊走活性を示した（図1）。
- （2）ヒト気管支平滑筋細胞は、I型とIV型コラーゲンに対しては有意に

遊走したが、Ⅲ型コラーゲンに対しては遊走しなかった(図2)。

- (3) ヒト気管支平滑筋細胞はフィブロネクチン及びラミニンに対して有意に遊走した(図3)。

D. 考察

前年度までの研究において、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そ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。

今年度の研究では、気管支喘息における気道閉塞の最重要因子であると同時に、気道リモデリングにおいても、細胞の肥大と増殖により、重要な役割を演じている気管支平滑筋細胞に焦点を当てた。最近、この気管支平滑筋が、結合織内に遊走し、線維芽細胞が活性型として変化したとされるアクチンフィラメントを多く含む筋線維芽細胞に、細胞のフェノタイプが変化する可能性が報告されている。今回、培養気管支平滑筋細胞が、気道粘

膜内の構成細胞や、それらの産生物質あるいは、気道リモデリングに関わるとされる種々の物質により遊走する可能性が示されたことは、今後のこの分野での研究の発展に寄与するものと期待している。

E. 結論

気管支平滑筋の肥大増殖は、気管支喘息での気道閉塞の主因となり、また、気道リモデリングを招来して、疾患の重症化に関わるとされる、気管支平滑筋細胞が、気道上皮細胞および線維芽細胞由来の産生物質、Ⅰ型やⅣ型コラーゲン、さらにラミニン、フィブロネクチンなどのECM因子に遊走することが示された。これは気管支平滑筋細胞が肥大増殖するのみならず、気道粘膜内で結合織に向かって遊走し、気道の閉塞やリモデリングに重要な関与をしていることを示唆する。

F. 研究発表

- (1) 庄司俊輔：気道のリモデリングとサイトカイン
臨床免疫 35：695-70, 2001.
- (2) 庄司俊輔：気管支喘息における気道リモデリング
日本医事新報 4042：33-36, 2001.
- (3) 庄司俊輔：気道リモデリングと気道上皮細胞、線維芽細胞
喘息 15：17-22, 2002.