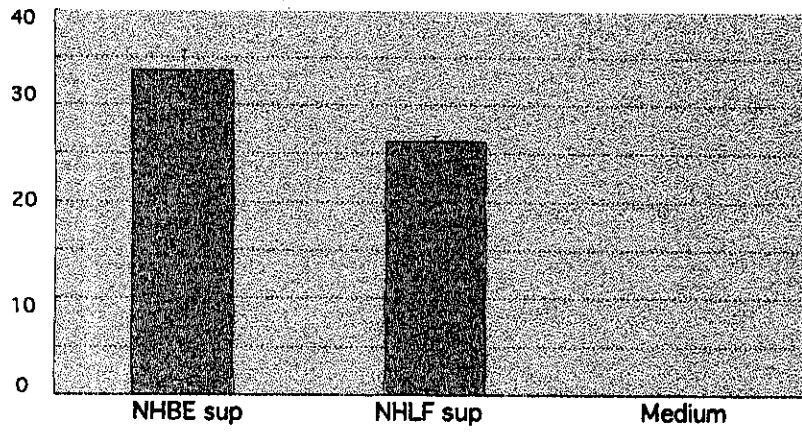
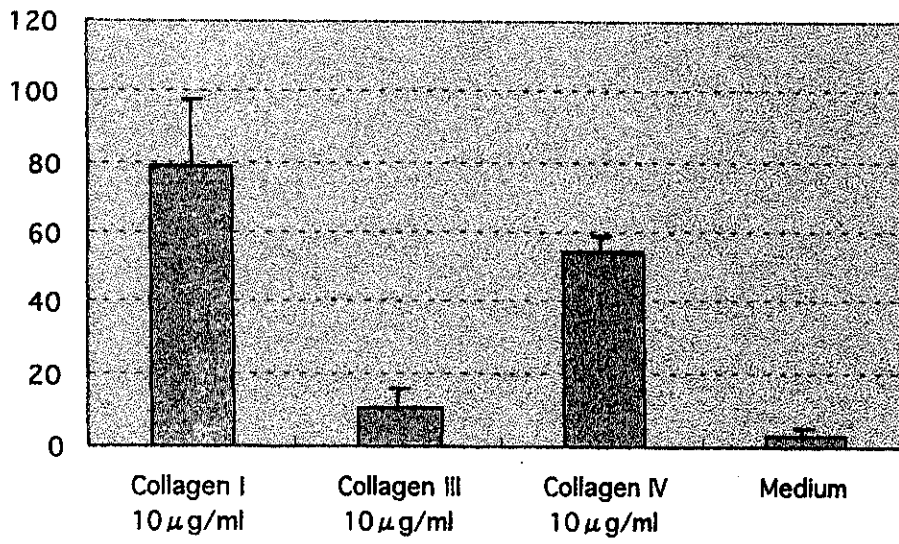


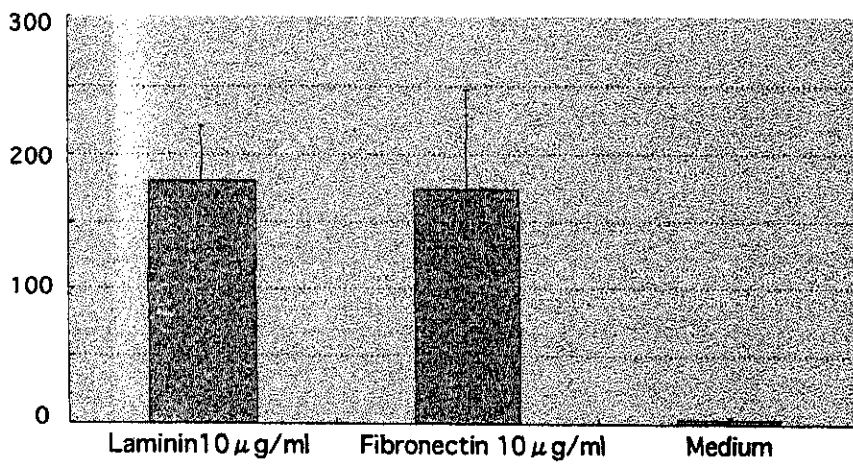
☒ 1



☒ 2



☒ 3



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

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基礎免疫研究部長

研究要旨：アトピー喘息と非アトピー喘息の間には好酸球性炎症、気道上皮杯細胞化生および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の獲得に関わるエフェクター分子を同定する目的で、正常者、アトピー喘息患者および非アトピー喘息患者由来の血液サンプルを用いて多角的な解析を行った。両喘息にはIL-13の過剰産生が共通に関与していることについては、昨年度報告した。今年度は、まずIL-13遺伝子のプロモーター領域における-1112C/T多型と両喘息との関連について検討した。その結果、両喘息では正常コントロールに比べてTアリル頻度が高いこと、およびTアリル型ではCアリル型に比べて抗CD3抗体と抗CD28抗体刺激によるIL-13産生が高値を示すことが明らかとなった。次に、IL-13の気道平滑筋細胞に対する作用について検討した所、IL-13刺激によってエオタキシンやTGF- β の産生が促進されると共に、LTR1の発現も増強されることが判明した。以上の結果から、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わる重要なエフェクター分子の一つであると考えられた。

A. 研究目的

気管支喘息にはアトピー型と非アトピー型の異なった2種類の病型があるが、好酸球性炎症、気道上皮杯細胞化生および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エフェクター分子の一つとして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。昨年度は、アトピー喘息と非アトピー喘息に共通なエフェクター分子としてIL-13が関与していることを報告した。今年度は、IL-13産生の調節に関わるプロモーター領域の多型解析を行うと共に、IL-13の気道平滑筋細胞に対する作用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から末梢血単核細胞(PBMC)を得た。抗CD3抗体と抗CD28抗体を用いてPBMCを刺激した後、培養上清中のIL-4とIL-13を特異的ELISAで測定した。germline C ϵ とmature C ϵ 転写物の生体内発現については、新鮮な無刺激PBMCからRNAを抽出した後、RT-PCR法により解析した。IL-13遺伝子プロモーター領域の-1112C/T多型については、PBMCからDNAを抽出した後、PCR-RFLP法により解析した。一方、気道平滑筋細胞におけるIL-4R α 、 γ c、IL-13R α 1、IL-13R α 2、LTR1およびLTR2の各mRNAの発現はRT-PCR法により、またこれらのタンパク発現はFACSにより、それぞれ解析した。また、気道平滑筋細胞由来のエオタキシンとTGF- β は特異的ELISAで測定した。

C. 結果

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。アトピー喘息患者の新鮮なPBMCではgermline Cεとmature Cεの両転写物の生体内発現が認められるが、非アトピー喘息患者ではgermline Cε転写物のみが検出されるので、両喘息に共通なIL-13の過剰産生は生体内でも反映されていることは明らかである。一方、気道平滑筋細胞はタイプIIのIL-4Rとデコイ受容体のIL-13Rα2を発現しており、IL-4結合細胞は約11%、IL-13結合細胞は約26%であった。また、IL-13は、IL-4と同様、増殖因子非依存的にエオタキシンやTGF-βの産生のみならず、LTR1の発現を増強した。IL-13Rα2発現細胞は約2%であるので、このデコイ受容体の発現を増強するサイトカインについては、現在検討中である。

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、血液サンプルを用いて多角的な検討を行った。その結果、両喘息ではIL-13遺伝子のプロモーター領域における-1112多型のTアリル頻度が高いこと、Tアリル型のIL-13産生能はCアリル型のそれに比べて高値を示すことおよびIL-13依存性のgermline Cε転写物の生体内発現が認められることなどが明らかとなった。

一方、気道平滑筋細胞をIL-13で刺激すると、エオタキシンやTGF-βの産生が促進され、またLTR1の発現も増強された。同様な結果はIL-13で刺激した単球やマクロファージを用いて示されている。IL-13と喘息との関係については、IL-13は喘息患者のBALF中で増加している、IL-13は気道のリモデリングを促進する、IL-13はβ2刺激薬による気道平滑筋細胞のcAMP上昇を抑制する、抗IL-13中和抗体は気道過敏性を抑制する、など多くの報告がある。

以上の結果から、IL-13は喘息の病態形成に密接に関与している可能性が強く示唆された。

E. 結論

IL-13はアトピー型と非アトピー型の喘息に共通なエフェクター分子の一つであると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koshio T, Kajiwara K, Ikizawa K, Nakagami K, Yanagihara Y : Blocking the CD154-CD40 interaction with anti-CD154 antibody differentially regulates interleukin-4 synthesis in T cells and IgE production in B cells. *Allergol. Int.* 50: 35-41, 2001.
- 2) Ikizawa K, Kajiwara K, Izuhara K, Yanagihara Y : PKCδ and ζ mediate IL-4/IL-13-induced germline ε transcription in human B cells: a putative regulation via PU.1 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 34-41, 2001.
- 3) Kajiwara K, Ra C, Yanagihara Y : Recombinant soluble form of the high-affinity IgE receptor α subunit and anti-IgE antibody inhibit IgE synthesis by IgE-expressing B cells through distinct pathways. *Allergol. Int.* in press.
- 4) 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.
- 5) 柳原行義 : サイトカイン阻害薬. *アレルギーナビゲーター* pp.166-167, 2001.
- 6) 柳原行義 : IgE. *アトピー疾患用語ハンドブック* p.184, 2001.
- 7) 柳原行義 : アトピー性皮膚炎患者の成熟B細胞におけるRAG発現. *臨床免疫* 36: 541-546, 2001.
- 8) 柳原行義 : IgE免疫応答を標的としたアレルギー性疾患制御の方策. *アレルギー・免疫* 8: 762-767, 2001.
- 9) 柳原行義 : IgE産生機構に関する最近の話題. *アレルギー科* 12: 92-99, 2001.
- 10) 柳原行義 : IgE産生誘導とその制御. *Progress in Mdicine* 20: 2598-2607, 2001.
- 11) 柳原行義 : IgE抗体研究の進展. *新世紀のアレルギー* 8: 7-9, 2001.
- 12) 前田尚子、柳原行義 : T細胞. *治療学* 35: 487-490, 2001.

- 13) 前田尚子、柳原行義：炎症性サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13). 日本臨床 59: 1894-1899, 2001.
- 14) 柳原行義、羅 智靖：可溶性FcεRIαによるIgE産生抑制 別冊・医学のあゆみーアレルギーの分子医学的究 pp. 71-75, 2002.
- 15) 柳原行義：アトピー体質と遺伝 アレルギー・免疫 9: 74-80, 2002.
- 16) 柳原行義：IgE・IgE抗体とその産生制御. 臨床アレルギー学 印刷中

2. 学会発表

- 1) Ikizawa K, Izuhara K, Yanagihara Y. PKCδ and ζ mediate STAT6-independent signaling of IL-4/IL-13 in human B cells. 11th International Congress of Immunology, 2001.
- 2) 柳原行義. 抗アレルギー剤の基礎と分類. 第10回小児臨床薬理・アレルギー免疫研究会, 2001.
- 3) 生澤公一、梶原景一、出原賢治、柳原行義. IL-4/IL-13によるgermline Cε transcriptの発現誘導におけるPKCδおよびζの役割. 第31回日本免疫学会, 2001.
- 4) 梶原景一、生澤公一、出原賢治、柳原行義. 成熟B細胞におけるIL-4応答性細胞とIL-13応答性細胞の機能解析. 第31回日本免疫学会総会学術集会, 2001.
- 5) 前田尚子、梶原景一、品澤美樹、秋山一男、柳原行義. HaCaT 細胞におけるTARC産生に対するTh1, Th2サイトカインの影響. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
- 6) 生澤公一、梶原景一、品澤美樹、柳原行義、出原賢治. IL-4/IL-13によるgermline Cε mRNAとCD23b mRNAの発現誘導におけるPKC依存性の差異. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
- 7) 梶原景一、生澤公一、品澤美樹、柳原行義、出原賢治. IL-4反応性B細胞とIL-13反応性B細胞における機能発現の比較検討. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
- 8) 柳原行義、梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、生澤公一、前田尚子、釣木澤尚美、森晶夫、谷口正実、秋山一男. B細胞にCD40リガンド (CD40L)の発現が認められた高IgE血症の1例. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.

- 9) 品澤美樹、梶原景一、生澤公一、秋山一男、柳原行義、海老澤元宏、高橋一夫. Activation-induced cytidine deaminase (AID) 遺伝子の多型解析. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
- 10) 森嶋大貴、梶原景一、森晶夫、釣木澤尚美、谷口正実、長谷川真紀、秋山一男、柳原行義. 気管支喘息患者におけるIL-13産生とIL-13プロモーター領域遺伝子多型. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
- 11) 柳原行義. IgE産生とアレルギー性炎症におけるサイトカインの役割. 第20回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2002.
- 12) 柳原行義. IgE制御の基礎と臨床. 第14回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002.

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)

厚生科学研究補助金（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」

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）

「小児気管支喘息の病態・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）研究報告書

研究要旨

小児期に発症した喘息が難治化する要因を明らかにするため、国立病院・療養所に反復入院と長期入院した症例から検討した。病歴や検査などの臨床背景のみならず、薬物療法、環境改善や鍛錬療法などの日常生活指導を含めた情報を合わせて検討すべきである。

分担研究者：

赤坂 徹（国立療養所盛岡病院 臨床研究部長）

藤澤隆夫（国立療養所三重病院 アレルギー科医長）

研究協力者：

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（同小児科）、和田博泰（同副院長）

深澤洋（同内科医長）

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）

反復群は 26 名、長期入院の 24 名と反復・長期入院の 3 名を合わせて長期群として 27 名であり、未記入の 2 名を除いて検討した。調査時年齢はそれぞれ 7.2 ± 3.8 歳、 12.4 ± 2.7 歳 ($p < 0.001$)、発作増悪時年齢は 4.6 ± 3.1 歳、 8.3 ± 3.7 歳 ($p < 0.001$) で、学童が多い長期群に有意に高かった (表 1)。

A. 研究目的

小児気管支喘息の治療・管理ガイドラインが利用されているにもかかわらず、治療が困難な症例が存在している。難治性喘息の定義を「通常の治療薬で有効性を認めない治療困難な喘息」とし、小児期において入院回数の多い症例にどのような要因が加わって難治化するかを、国立医療機関を対象として調査し、対応策を検討する。

表 1 対象症例

	例数	調査時年齢(歳)	入院時年齢(歳)
反復入院	26	7.2 ± 3.8 歳	4.6 ± 3.1 歳
反復・長期入院	27	12.4 ± 2.7 歳	8.3 ± 3.7 歳
有意差(反復:長期)		$P < 0.001$	$P < 0.001$
未記入	2		
計	55		

家族歴、既往歴、合併症の頻度には差は無かった (表 2)。

B. 研究方法

国立病院・国立療養所の小児科を対象として、治療が困難な気管支喘息（難治性喘息）に関する調査用紙を配布し、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を分けて検討する。

（倫理面への配慮）

担当医が病歴から転記したもので、I. D. は匿名とし、協力できない場合にも不利益がないことを確認しており、倫理面での問題はなかった。

表 2 家族歴、既往歴、合併症

陽性 頻度	家族歴 (BA:喘息、AR:アレルギー性鼻炎、AD:アトピー性皮膚炎、U:蕁麻疹)					アレルギー疾患	
	BA	AR	AD	U	他	既往歴	合併症
反復群	14 53.8 %	12 46.2 %	8 30.8 %	2 7.7 %	1 3.8 %	8 30.8 %	10 38.5 %
長期群	20 74.1 %	15 55.6 %	10 37.0 %	6 22.2 %	3 11.1 %	5 18.5 %	16 59.3 %
有意差	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

C. 研究結果

国立病院は 20/63 施設、国立療養所は 27/67 施設から計 55 名 (男 34、女 21) が回収された (回収率 31.7%、40.3%)。

難治化要因は反復群で 88.5%、長期群で 70.4%に認められ、差はなかった (表 3)。喘息発作に関連して、反復ないし長期入院、大発作の反復、抗原の大量暴露には差がなかった。感染などの合併は反復群に多かった ($p < 0.05$)。

表 3 難治化要因と関連した喘息発作

陽性頻度 (%)	難治化要因	喘息発作反復ないし長期入院	喘息発作大発作を反復	喘息発作抗原の大量暴露	喘息発作その他
反復群	23 (88.5)	13 (50.0)	12 (46.2)	7 (26.9)	12 (46.2)
長期群	19 (70.4)	17 (63.0)	13 (48.1)	5 (18.5)	0
有意差	NS	NS	NS	NS	$P < 0.05$

治療薬の投与量の不足、選択の過誤、治療法の過誤など、喘息児のやる気などには差がなかった (表 4)。

表 4 難治化要因としての治療薬と喘息児

陽性頻度	治療薬投与量の不足	治療薬選択の過誤	治療薬治療法の過誤	治療薬その他	喘息児やる気がない	喘息児その他
反復群	7 (26.9%)	6 (23.1%)	2 (7.7%)	2 (7.7%)	5 (19.2%)	1 (3.8%)
長期群	4 (14.8%)	4 (14.8%)	3 (11.1%)	3 (11.1%)	7 (25.9%)	4 (14.8%)
有意差	NS	NS	NS	NS	NS	NS

保護者に関して、無理解、世話をしないなどについては差はなかった (表 5)。心理的要因について、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 ($P < 0.05$)。

表 5 難治化要因としての保護者、心理社会的要因

陽性頻度	保護者無理解	保護者世話をしない	保護者その他	心理社会的要因心理的要因	心理社会的要因家族関係	心理社会的要因他の人間関係	心理社会的要因その他
反復群	6 (23.1)	4 (15.4)	7 (26.9)	5 (19.2)	6 (23.1)	2 (7.7)	1 (3.8)
長期群	6 (22.2)	8 (29.6)	4 (14.8)	13 (48.1)	14 (51.9)	6 (22.2)	4 (14.8)
有意差	NS	NS	NS	$P < 0.05$	$P < 0.05$	NS	NS

重症の頻度は、初診時に長期群に多く、増悪時には差がなかった (表 6)。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 ($p < 0.1$)。

表 6 初診時と増悪時における重症の頻度と血清 IgE 値

	初診時重症の頻度 (%)	初診時血清 IgE (IU/ml)	増悪時重症の頻度 (%)	増悪時血清 IgE (IU/ml)
反復群	3 (11.5)	233.6 ±233.4	10 (38.5)	610.7 ±729.9
長期群	14 (51.9)	1917.8 ±2909.7	5 (18.5)	1317.9 ±1492.5
有意差	$P < 0.005$	$P < 0.05$	NS	$P < 0.1$

治療内容として、増悪時にベクロメタゾン、フルチカゾンを導入していたが、環境改善や鍛錬療法の併用には施設間で差が認められた。

D. 考察

小児期に発症した気管支喘息の難治化の病態・機序を解明するために、現在の治療レベルを評価する必要がある。国立の医療機関における反復入院および長期入院の症例をレトロスペクティブに検討した。薬物療法と非薬物療法の組み合わせによって、より有効で予防・治療法を開発するために、次のような計画を提案したい。

1. 小児期の難治性気管支喘息に関する疫学調査

①ケース・コントロール・スタディ

難治化の要因を更に詳細に検討するためには、平成13年度の調査に協力いただいた施設に依頼して、難治症例と同性で年齢幅を1年以内とした対照症例2例以上を選び、臨床背景と薬物療法とその効果を比較するケース・コントロール・スタディを実施したい。これらの結果をもとに難治度を数値化して、同一症例の軽快や増悪、地域間の比較を試みる。

②プロスペクティブ・スタディ

新患の喘息児と保護者から了解が得られた症例を対象として、対症療法を主とした伝統的な治療計画と、発症早期から環境改善や吸入ステロイドによる早期介入による治療計画から選択させ、プロスペクティブ・スタディとして数年間追跡調査して、改善・悪化要因を明らかにする。

2. 小児期の難治性気管支喘息の病態に関する関連研究

①気管支喘息の軽快や増悪に関連したサイトカインを測定し、難治度を判定する。

②気管支喘息の発症早期の治療内容による予後の変化を評価して、早期介入を検討する。

E. 結論

小児期に発症した喘息が難治化する要因を、反復入院と長期入院の症例から検討した。病歴や検査などの臨床背景のみならず、薬物療法、環境改善や鍛錬療法などの日常生活指導を含めた情報を合わせて検討すべきである。

F. 健康危険情報

健康状態に悪影響を及ぼす危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 赤坂徹：A.修飾因子としての心理的背景、心理的修飾因子としての疾患 11. アレルギー疾患をもつ子ども、小児アレルギー疾患、最新の診療、岩田力編著、中外医学社、東京、172-188,2001

2) 赤坂徹：難治性アレルギー疾患の心の問題、心の問題への小児科医の対応、ケーススタディからのアプローチ、小児科 42:1584-1588,2001

2. 学会発表

学会の発表はなかった。

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願及び登録の予定はない。

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

分担研究者 藤澤隆夫

国立療養所三重病院アレルギー科医長

研究要旨

難治化した気管支喘息の病理組織学的特徴は気道粘膜への著しい好酸球浸潤であり、好酸球浸潤の制御は難治性喘息の治療に直結する。好酸球の浸潤機構とその制御法を解明するために、昨年度の研究において培養気道上皮とコラーゲンマトリックスを組み合わせた新しい三次元好酸球トランスマイグレーションモデルを確立した。本年度はこれを用いて好酸球のトランスマイグレーションにおいて気道上皮が産生する細胞外基質蛋白のうち IV 型コラーゲンが重要であることを明らかにした。とくに IV 型コラーゲンの好酸球遊走増強作用については新知見である。本モデルを用いることにより、好酸球浸潤に関わる細胞間相互作用の多面的な解析が可能となったが、難治性喘息の病態解明、治療法の開発にきわめて有用であると考えられる。

A. 研究目的

難治化した気管支喘息の病理組織学的特徴は気道粘膜への著しい好酸球浸潤であり、好酸球浸潤の制御は難治性喘息の治療に直結する。好酸球の浸潤機構とその制御法を解明するためには、細胞間相互作用を解析し得る *in vitro* の浸潤モデルが必要とされるが、これまでに用いられた実験モデルでは解析可能な因子に限られるとともに細胞間または分子間相互作用の解析も不十分であった。昨年度、我々は細胞外基質蛋白、気道上皮細胞、好酸球を組み合わせた新しい実験モデルを確立して、好酸球浸潤に関わる多様な因子の相互作用を解析することを可能にした。昨年は気道上皮細胞が産生するケモカインの動態を明らかにしたが、本年度は細胞外基質蛋白の役割を解析することを試みた。

B. 研究方法

ラット尻尾から抽出した I 型コラーゲン溶液をゲル化し、Polystyrene 製の Culture Insert である Netwell (Pore size: 74 μ m) 内にゲル層 (0.5mm) を形成させた。その上にヒト気道上皮細胞 BEAS-2B を confluent まで培養した後、好酸球浸潤がゲル層側から上皮層側に起こるようにするため、Netwell に培養液を満たして栓をして上下反転、リングキャップをつけて、ゲル層と上皮細胞を境界とする上室 (ゲル側) および下室 (上皮側) を形成した。その後、上室にサイトカイン (TNF, IL-4) を加えて、細胞を 48 時間刺激、上室に分離好酸球

を添加して、90 分後に下室に遊走した好酸球数を算定した。コラーゲンゲルと上皮細胞の免疫組織学検討を行った。さらに、IV 型コラーゲンが CCR3 リガンドによる好酸球遊走に及ぼす影響について、transwell を用いた通常の chemotaxis assay によって検討した。

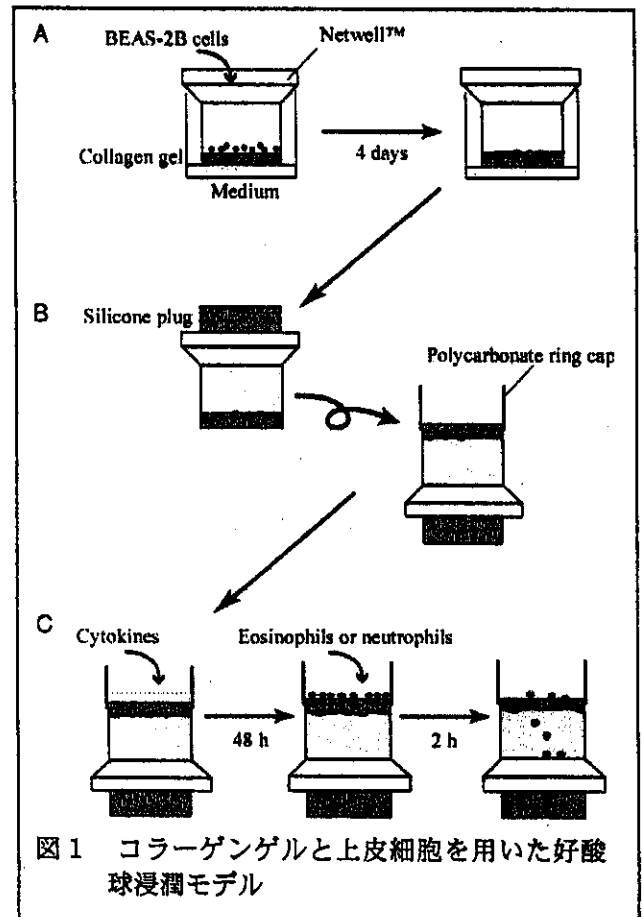
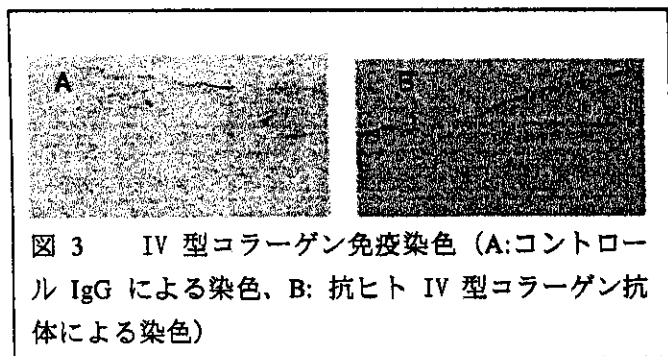
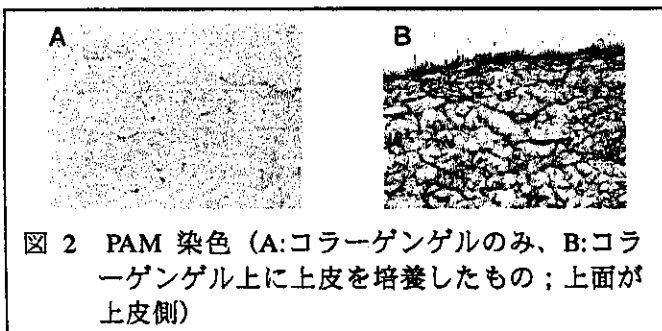


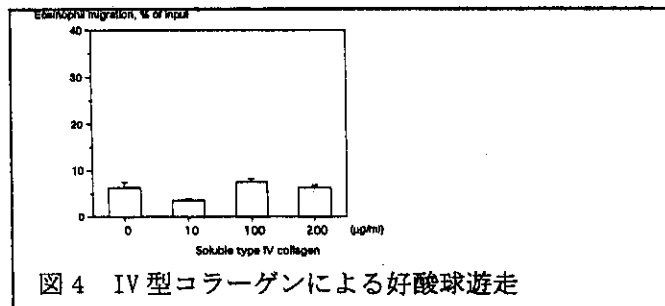
図1 コラーゲンゲルと上皮細胞を用いた好酸球浸潤モデル

C. 研究結果

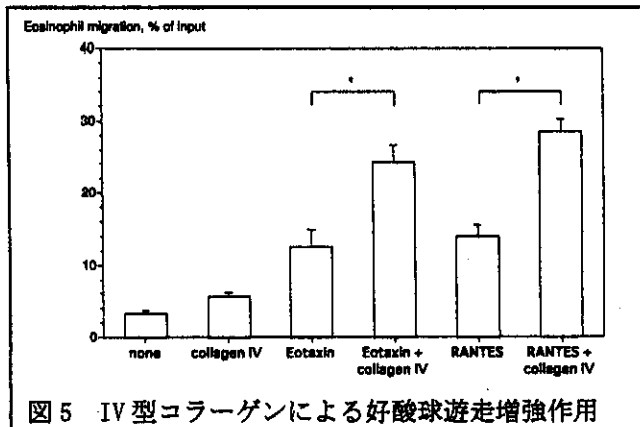
上皮細胞の培養後、PAM 法にてコラーゲンゲルを染色したところ、コラーゲンゲル単独ではわずかな染色が認められたのみであったのに対して、上皮を培養したコラーゲンゲルは PAM 教養性となった (図 2)。この染色は細網繊維など糖蛋白を含む細胞外基質物質を検出することから、上皮細胞が何らかの細胞外基質蛋白を産生していることが示唆された。さらに IV 型コラーゲンの免疫染色を行ったところ、上皮下に強い染色が認められ (図 3)、上皮細胞が産生する蛋白のひとつに IV 型コラーゲンを産生していることを免疫染色により観察した。



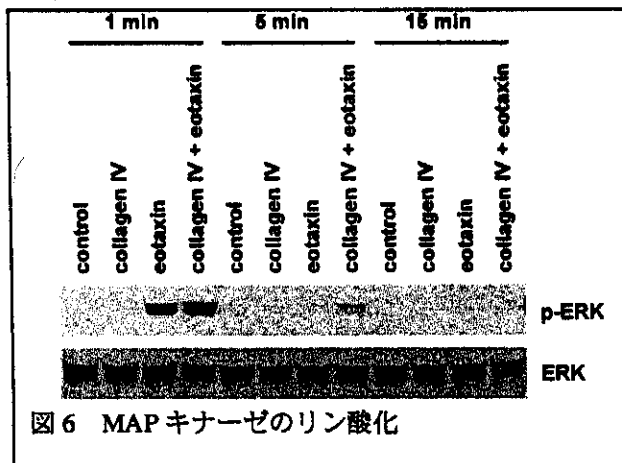
上皮細胞が新たに IV 型コラーゲンを産生することを確認したので、IV 型コラーゲンが実際に好酸球遊走に関わるかどうかを明らかにするために chemotaxis assay を行った。IV 型コラーゲン自体は好酸球遊走活性をもたなかった (図 4)



しかし、eotaxin ならびに RANTES による好酸球遊走を著しく増強することを観察した (図 5)。



チェッカーボードアッセイにより、この作用はケモタキシスではなく、ケモカインエシスによることを確認した。さらに、メカニズムを明らかにするために、Western blot 法により、MAP キナーゼの ERK1/2 の活性化を評価したところ、IV 型コラーゲンはそれ自体では ERK1/2 のリン酸化を誘導しないが、eotaxin によるリン酸化は著しく増強した (図 6)。



D. 考察

本研究では、気道組織を構築する細胞外基質、気道上皮細胞を模するものとして、コラーゲンゲル、気道上皮細胞株を組み合わせる三次元培養系を確立、これに炎症性サイトカインと好酸球を加えることにより、気道炎症における好酸球のトランスマイグレーションモデルを作成した。昨年の研究においてはシステムの確立ならびにこの実験系で気道上皮が必須の役割を果たすことを明らかにしたが、今年度は気道上皮が産生する細胞外基

質蛋白とくに IV 型コラーゲンが CCR3 リガンドによる好酸球遊走を著しく増強することを明らかにした。これまで IV 型コラーゲンが気道炎症に関わるとの報告はないが、新生児呼吸窮迫症候群の患者で、後に Bronchopulmonary dysplasia を発症する者はそうでない者に比べて BAL 液中の IV 型コラーゲン濃度が有意に高値で、さらに IV 型コラーゲン濃度は BAL 液の好中球数に相関するとの報告がある。(Ohki, Y, et al, *Elevated type IV collagen in bronchoalveolar lavage fluid from infants with bronchopulmonary dysplasia* Biol Neonate, 2001, 79(1) p. 34-8) これは IV 型コラーゲンが炎症細胞浸潤に関わることを示しており、本研究の結果を支持するものとして興味深い。さらに、気管支喘息ではマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が増加することも知られており、MMP がコラーゲンを分解し、可溶性コラーゲンが組織中に増加、好酸球浸潤を増強する可能性も考えられる。

E. 結論

好酸球性気道炎症の新しい実験モデルを用いることによって、気道上皮から産生される IV 型コラーゲンが著しい好酸球遊走増強作用を有することを明らかにした。IV 型コラーゲンと炎症細胞浸潤の関係については気管支喘息においてははまだ知られていないが、今後この機構をさらに解明することにより、難治性喘息の新たな治療法の開発が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文

1. Terada A, Fujisawa T, Togashi K, Miyazaki T, Katsumata H, Atsuta J, et al. Exhaled Nitric Oxide Decreases during Exercise-induced Bronchoconstriction in Children with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(10):1879-1884.2.
2. 藤澤隆夫：抗アレルギー薬の作用域 2 好酸球. *治療学* 35(5):481-85, 2001
3. 加藤佳子, 藤澤隆夫：気道上皮細胞三次元培養システム-培養した細胞. *細胞工学* 20(4):569-571, 2001
4. 加藤佳子, 藤澤隆夫：Rnase-richな好酸球からのRNA抽出-超音波破碎装置の利用-. *細胞工学* 20(5):752-753, 2001

2. 学会発表

1. Takao Fujisawa, Yoshiko Kao, Akihiko Trada, Jun Atuta, Hajime Kaumata, Kosei Iguchi, Hitoshi Kamiya, A new model of eosinophil transmigration through collagen gel and airway epithelial cells. 57th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (New Orleans, USA) (2001.3.16-21)
2. Hajime Katsumata, Takao Fujisawa, Akihiko Terada, Kosei Iguchi, Hitoshi Kamiya. Hypoalbuminemia in severe atopic dermatitis: Possible involvement of aldosterone and vasopressin. 57th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. New Orleans, USA.
3. A Terada, T Fujisawa, J Atsuta, K Iguchi, H Kamiya, and H Togai. Exhaled Nitric Oxide Decreases During Exercise-Induced Bronchoconstriction in Children With Asthma. 57th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. New Orleans, USA. 2001.3.16-21
4. 藤澤隆夫, 加藤佳子, 勝又元, 井口光正, 義江修：三次元培養気道上皮細胞を用いた新しい transmigration システム. 第 13 回日本アレルギー学会春期臨床大会 (2001.5.10-12, 横浜)
5. 藤澤隆夫, 加藤佳子, 勝又元, 井口光正, 義江修：血漿 Th2 特異ケモカイン (TARC, MDC) の臨床的意義. 第 13 回日本アレルギー学会春期臨床大会 (2001.5.10-12, 横浜)
6. 藤澤隆夫：サイトカイン・ケモカイン 第 38 回日本小児アレルギー学会シンポジウム「アレルギー研究の最前線」司会、発表 (2001.10.7, 小倉)
7. 藤澤隆夫, 加藤佳子, 勝又元, 井口光正, 大島信治, 森田寛：ロイコトリエン D4 による好酸球脱顆粒. 第 51 回日本アレルギー学会総会 (2001.10.29-31, 福岡)
8. 岡田千春, 藤澤隆夫, 坂口基, 松本寛, 木村五郎, 谷本安, 義江修, 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 MDC, TARC の関連の検討. 第 51 回日本アレルギー学会総会 (2001.10.29-31, 福岡)
9. 藤澤隆夫：好酸球制御. 気道アレルギーとその制御. 第 5 回小児気道アレルギー研究会 (2001.11.11, 福岡)

研究協力者

義江 修 (近畿大学細菌学)
加藤佳子 (国立療養所三重病院)

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—

分担研究者：大田 健 (帝京大学医学部内科教授)

研究の要旨

トロンボキサン合成酵素に関連し遺伝子マーカーをもちいた検討では、喘息患者で正常と比較して特異な遺伝子多型の頻度が有意に高いのに対し、小児喘息寛解例では正常人と同等の頻度であった。寛解を予測する因子となりえる可能性が考えられた。FcεR1遺伝子については、有意差は得られなかったが同様の傾向を示した。ムスカリンのM2受容体について1050番目に点変異を検出したが、各群で出現頻度に差異は認めなかった。他に気道リモデリングに関与するTGF-βの-509番目の変異およびエオタキシンに多型について、喘息(難治性喘息と小児喘息寛解例を含む)と健康人との差異について検討を進めている。

研究協力者：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)、上原誓志夫 (東京大学保健管理センター助教授)、石井 彰 (東京大学医学部付属病院呼吸器内科助手)、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)

A 目的

喘息の難治化の予知に有益となる喘息治療の新たなターゲットを見出すことを目的に遺伝子多型を検討した。アレルギー反応の面ではFcεR1遺伝子の多型、気道炎症の側面ではトロンボキサン合成酵素遺伝子の多型、ケモカイン受容体として好酸球のCCR3およびTh2細胞のCCR4各遺伝子の多型、アレルギー性炎症で重要なサイトカインであるエオタキシンのプロモーター領域の多型および気道のリモデリングに関与するTGF-β1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の多型を検討することとした。

B 方法

1. 成人喘息症例、2. 成人の小児喘息寛解症例 3. 小児喘息症例 4. 成人難治性喘息症例 5. 健康人を対象に検討した。同時に各群の患者について発作歴を聴取し、背景として、総IgE、IgE RAST (吸入系：ハウスダスト、ダニ、スギ、ブタクサ、ネコ毛)、好酸球数を検討

した。患者の構成を表1に示す。ムスカリンのM2、ヒスタミンのH1遺伝子についてはダイレクトシーケンス法で解析した。PCR-SSCP法でFcεR1鎖のエキソン1-7の遺伝子多型を解析した。トロンボキサンA2合成酵素(TXAS)の多型性については、TXAS遺伝子の存在する遺伝子の近傍に存在するD7S684遺伝子をマーカーにした遺伝子解析を行った。

C 結果 および考察

トロンボキサンA2合成酵素(TXAS)の多型性については、D7S684遺伝子をマーカーにした遺伝子解析を行い、CA repeatsの異なった6種類のホモ多型(CA18, 19, 22, 23, 24, 25)を認め、非寛解例ではCA24ホモ多型が多く寛解例では少なかった($p < 0.05$) (表2)。FcεR1遺伝子は237の野生型はG1であるがG2に変異しているタイプが存在し、その多型の頻度が喘息症例では高く、寛解例では正常人と同等である傾向を示した(表3)。気道過敏性のネガティブフィードバックに関与しているM2受容体については1050番目に塩基がAからGに置換されているSNIPが同定できたが、喘息と健康人では頻度に差異を認めなかった(表4)。M3については変異を認めなかった。TGF-β1は-509番目に点変異を認めた。喘息群と健康人で変異の頻度に差異はなかったが、変異群でTGF-β1の産生が有意に亢進している所見を認めた。このことから特に難治性喘息でTGF-β1の変異が関連している可能性を考え現在検討を進めている。現在までのところ寛解を規定するマーカーとしてトロンボキサンA2合成酵素の変異とFcεR1遺伝子の変異が有望でありさらに検討を進めている。小児

喘息症例については、表5に示すように追跡調査をしており、40例中21例が3年の経過を経て寛解していることが同定できた。これらの症例についても上記の遺伝子変異について検討を進めている。

表3

Fccε1β鎖の多型の頻度

	codon 237 type				(多型組成)
	total	01u (wild homo)	01u/01y (hetero)	01y (mut homo)	
アレルギー性喘息					
Non-outgrow	35	22	12	1	(37.1%)
outgrow	38	27	9	2	(28.0%)
control	82	60	22	1	(28.0%)

M5
P<0.05

表1 対象患者のプロファイル

対象	喘息発病時期	
	小児期	成人期
健康人 (n=117)	なし	なし
Outgrow (n=64)	あり	なし
Non-outgrow (n=55)	あり	あり
成人発症喘息(n=54)	なし	あり
遺伝性喘息(n=6)		

表4

M2	
outgrow	16% (58症例中9例変異)
Non-outgrow	12% (25症例中3例変異)
健康群	14% (70症例中10例変異)
M3	
outgrow	- (47症例中変異なし)
Non-outgrow	- (18症例中変異なし)
健康群	- (31症例中変異なし)

表2

D7S648 CA24 Allele 出現頻度

	CA24 (+)	CA24 (-)	
健康人(n=282)	29 (10.3%)	253 (89.7%)	P=0.00026
Outgrow (n=118)	15 (12.7%)	103 (87.3%)	
Non-outgrow (n=102)	19 (18.6%)	83 (81.4%)	P=0.032
成人発症(n=238)	53 (22.3+%)	185 (77.7+%)	

表5

小児喘息症例

平成10年に国立東埼玉病院（杉本日出雄小児科医長）受診小児喘息患者 45例より採血した。

平成13年に再度経過を確認
40例中 21例が寛解した(2年以上発作なし)。

E.業績

1. Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q. Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon R1): role in asthma. *FASEB J* 2001; 15:940-9.
2. Hasegawa S, Tashiro N, Matsubara T, Furukawa S, Ra C. A comparison of Fc epsilon R1-mediated RANTES release from human platelets between allergic patients and healthy individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125:42-7.
3. Hira K, Misuishi K, Kawamoto K, Suto H, Nakao A, Ra C, et al. Establishment and characterization of a murine mast cell line derived from NC/Nga mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125:67-70.
4. Iida M, Matsumoto K, Tomita H, Nakajima T, Akasawa A, Ohtani NY, et al. Selective down-regulation of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon R1) alpha-chain messenger RNA among transcriptome in cord blood-derived versus adult peripheral blood-derived cultured human mast cells. *Blood* 2001; 97:1016-22.
5. Iwasaki T, Tanaka A, Itakura A, Yamashita N, Ohta K, Matsuda H, et al. Atopic NC/Nga mice as a model for allergic asthma: severe allergic responses by single intranasal challenge with protein antigen. *J Vet Med Sci* 2001; 63:413-9.
6. Kanamaru Y, Nakao A, Mamura M, Suzuki Y, Shirato I, Okumura K, et al. Blockade of TGF-beta signaling in T cells prevents the development of experimental glomerulonephritis. *J Immunol* 2001; 166:2818-23.
7. Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 15:15.
8. Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, et al. Variations in the human CC chemokine eotaxin gene. *Genes Immun* 2001; 2:461-3.
9. Nagase H, Kubo K, Izumi S, Ohta K, Kobayashi N, Yamaguchi M, et al. Chemokine receptor expression profile of eosinophils at inflamed tissue sites: Decreased CCR3 and increased CXCR4 expression by lung eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:563-9.
10. Nishiyama C, Hasegawa M, Nishiyama M, Takahashi K, Yokota T, Okumura K, et al. Cloning of full-length genomic DNA encoding human Fc epsilon R1 alpha-chain and its transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:1056-64.
11. Ohta K, Yamashita N, Tajima M, Miyasaka T, Kawashima R, Nakano J, et al. In vivo effects of apoptosis in asthma examined by a murine model. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124:259-61.
12. Ohta K. Symposium on molecular pathogenesis of respiratory diseases and its clinical implication. 2. Obstructive lung disease. *Intern Med* 2001; 40:162-4.
13. Takahashi K, Nishiyama C, Okumura K, Ra C, Ohtake Y, Yokota T. Molecular cloning of rat USF2 cDNA and characterization of splicing variants. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65:58-62.
14. Takahashi K, Nishiyama C, Nishiyama M, Okumura K, Ra C, Ohtake Y, et al. A complex composed of USF1 and USF2 activates the human Fc epsilon R1 alpha chain expression via a CAGCTG element in the first intron. *Eur J Immunol* 2001; 31:590-9.
15. Tsuge T, Shimokawa T, Horikoshi S, Tomino Y, Ra C. Polymorphism in promoter region of Fc alpha receptor gene in patients with IgA nephropathy. *Hum Genet* 2001; 108:128-33.
16. Yamaguchi M, Hirai K, Komiya A, Miyamasu M, Furumoto Y, Teshima R, et al. Regulation of mouse mast cell surface Fc epsilon R1 expression by dexamethasone. *Int Immunol* 2001; 13:843-51.
17. Yamashita N, Sekine K, Miyasaka T, Kawashima R, Nakajima Y, Nakano J, et al. Platelet-derived growth factor is involved in the augmentation of airway responsiveness through remodeling of airways in diesel exhaust particulate-treated mice. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:135-42.