

20010799

厚生科学研究費補助金

**感覚器障害及び
免疫・アレルギー等研究事業**

**重症喘息の決定因子の同定と
それに基づく新規治療法の開発**

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩本 逸夫

(千葉大学大学院医学研究院)

平成14年（2002年）3月

目 次

I. 総括研究報告	
重症喘息の決定因子の同定とそれに基づく新規治療法の開発 岩本逸夫	1-5
II. 分担研究報告	
1. アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明 岩本逸夫	6-8
2. IL-9によるアレルギー性気道炎症の制御機構及び気道リモデリング の発症機序に関する研究 福田 健	9-11
3. 慢性的に気流閉塞を有する患者の可逆性に関する研究 田村 弦	12-14
4. Churg-Strauss syndrome (CSS)の発症機序に関する研究 秋山一男	15-17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
IV. 研究成果の刊行物・別冊	19-120

重症喘息の決定因子の同定とそれに基づく新規治療法の開発

主任研究者 岩本逸夫（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学助教授）

分担研究者

福田 健（獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科教授）
秋山一男（国立相模原病院臨床研究センター部長）
田村 弦（東北大学医学部附属病院循環器内科講師）

研究協力者

中島裕史（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学助手）
須藤明（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学） 鈴木浩太郎（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学）
加々美新一郎（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学）
広瀬晃一（ヒューマンサイエンス振興財団リサーチ・レジデント）
石井芳樹（獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科助教授）
相良博典（獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科講師） 成剛（獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科）
釣木澤尚実（国立相模原病院臨床研究センター） 谷口正実（国立相模原病院臨床研究センター室長）
斎藤博士（国立相模原病院臨床研究センター室長） 東 憲孝（国立相模原病院臨床研究センター）
佐野公仁夫（東北大学医学部附属病院循環器内科助手） 城田英和（東北大学大学院医学研究科）
大河原雄一（東北大学医学部附属病院感染症・呼吸器内科助手）
岩崎 正（東北大学医学部附属病院感染症・呼吸器内科医員）

研究要旨

本研究班は、重症喘息の病因・病態の解明と新規治療法の開発を目的とし、本年度は以下の重要な研究成果を得た。1) アレルギー性気道炎症の制御機構について、CD25 陽性制御性 T 細胞が Th2 細胞を誘導し、アレルギー性気道炎症を増強する方向に制御することを始めて明らかにした。IL-9 は気道上皮細胞の MDC 産生を介して Th2 細胞の気道粘膜への集積を惹起し、アレルギー性気道炎症を誘導することが示された。さらに Stat5a が Th2 細胞の分化誘導に重要であることを明らかにし、アレルギー性気道炎症の惹起に関与していることを示した。さらに Stat6 特異的プロテアーゼによる Stat6 シグナルの負の調節機構が存在することを明らかにした。2) 気道リモデリングの発症機序について、LTD4 が TGF- β と協調的に作用し気道平滑筋増殖及び肺線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックス産生を増強し関与することが明らかにされた。そして CysLT1 受容体拮抗薬が、気道リモデリングの治療に有用である可能性が示唆された。病態評価法について、HRCT 画像の新しい解析方法の開発により、HRCT による気道系全体の病態評価が初めて可能となった。また慢性閉塞性肺疾患を疑う患者においても、可逆性の評価には短期大量のステロイド療法を試みる価値が十分に存在することが示唆された。3) 重症喘息である Churg-Strauss syndrome (CSS) は、好酸球及び T 細胞の CD69 発現が病態に関与していることが示唆され、CSS 治療経過の指標に有用と考えられた。これらの成果から、重症喘息の気道炎症に関与するサイトカイン及び転写因子レベルの制御による新しい治療薬開発の可能性が示唆された。

A. 研究目的

気管支喘息の病態であるアレルギー性気道炎症は、Th2 細胞の選択的活性化、Th2 細胞と好酸球を主体とする炎症細胞浸潤、気道過敏性、粘液細胞の増加により特徴づけられる。さらに持続性気道炎症による気道構成細胞の活性化とその結果生じる気道リモデリングが重症化を促す。したがっ

て、重症喘息の病態解明と新規治療法の開発には、

1) アレルギー性気道炎症の成立機序及びその制御機構の解明が必須であるとともに、2) 気道リモデリングの発症機序の解明と病態評価法の開発が必要となる。さらに、3) 重症喘息の T 細胞、好酸球の異常活性化とステロイド抵抗性機序の解明が重要である。本研究班は、これら研究テーマ

を明らかにし、その成果に基づく重症喘息の新治療法を開発することを目的とする。

B. 方法及び C. 結果

1) アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明

1. CD25 陽性制御性 T 細胞によるアレルギー性気道炎症の制御機構 (岩本)

CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞は、CD25 陰性 CD4 陽性 T 細胞の増殖を抑制する制御性 T 細胞として最近発見された。しかし、Th2 細胞分化やアレルギー性炎症における CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞の役割は不明であった。

そこで我々は CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞がアレルギー性気道炎症の制御に関与しているか否かを検討した。

T 細胞レセプタートランスジェニックマウス (DO10 マウス) の脾細胞から CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞を除去した群 (CD25T 細胞除去群) と除去しない群 (非除去群) を内因性の免疫応答を欠く Rag-2 欠損マウスに経静脈的に移入し、それらのマウスでアレルギー性気道炎症を比較した。その結果、抗原吸入による気道好酸球浸潤は、CD25T 細胞除去群で有意に低下した。逆に、抗原吸入による好中球及び T 細胞浸潤は CD25T 細胞除去群で有意に増加していた。さらに CD25T 細胞除去群で BALF 中の IL-4 と IL-5 産生が著明に低下し、一方 IFN- γ 産生は増加した。in vitro の Th1/Th2 細胞分化の検討では、DO10 マウス脾細胞から CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞を除去すると Th1 細胞が増加し、Th2 細胞は減少した。一方、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞除去群に純化した CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞を戻すと Th2 細胞が増加し、Th1 細胞は減少した。以上から、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞は、Th1 細胞/Th2 細胞バランスを Th2 側に誘導し、アレルギー性気道炎症を増強する方向に制御している。

2. IL-9 によるアレルギー性気道炎症の制御機構 (福田)

Th2 細胞を中心としたアレルギー性気道炎症の維持に関わる因子は未だ同定されていない。最近、喘息発症の候補遺伝子の 1 つに挙げられている IL-9 が、アレルギー性気道炎症の維持に果たす役割を検討した。喘息マウスに抗 IL-9 抗体を投与すると BAL 液中の好酸球数、リンパ球数が著明

に減少した。抗 IL-9 抗体投与により IL-2、IL12、IFN γ レベルは変化しなかったが、IL-4 と IL-5 レベルは有意に減少した。しかし、脾臓 T 細胞の IL-4、IL-5 産生は抗 IL-9 抗体による影響を受けなかった。BAL 液中の eotaxin、RANTES、MCP-1、MIP-1 α レベルも抗 IL-9 抗体投与の影響を受けなかった。免疫組織化学的検索において喘息マウスでは上皮細胞において MDC と TARC の発現が著明に認められたが、抗 IL-9 抗体投与により MDC の発現が消失した。以上から、IL-9 を介した気道上皮細胞の MDC 発現が Th2 細胞の気道粘膜への集積を惹起し、アレルギー性気道炎症の誘導、維持に関与している可能性が示された。

3. 転写因子 Stat5 の Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症における役割 (研究協力者 中島裕史)

我々は、好酸球の分化増殖に重要なサイトカインである IL-5 により活性化される Stat5a がアレルギー性炎症の惹起に必須であることを見いだした。すなわち、Stat5a 欠損マウスでは抗原誘発気道好酸球浸潤は著明に減少していた。さらに予期に反して、Stat5a 欠損マウスの T 細胞サイトカイン産生は IL-4、IL-5 が著明に低下し、IFN- γ は正常であった。興味深いことに Stat5a 欠損マウスでは抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体産生が低下しており、逆に IgG2a 抗体産生は増加していた。このことは Stat5a 欠損マウスでは Th2 細胞への分化が障害されていることを示唆する。次に、Stat5a 欠損マウスを DO10 マウスと交配して DO10+ Stat5a 欠損マウスを作製し、Stat5a 欠損マウスにおける Th 細胞分化を単細胞レベルで解析した。その結果、DO10+ Stat5a 欠損 T 細胞は、DO10+ T 細胞に比して Th2 細胞分化が障害され、逆に Th1 細胞分化は亢進していた。これは IL-12 の存在下 (Th1 条件)、IL-4 の存在下 (Th2 条件) に関わらず認められた。さらに、DO10+ Stat5a 欠損 T 細胞にレトロウイルスを用いて Stat5a を発現させると Th2 細胞の分化が DO10+ T 細胞レベルまで回復した。以上から、Stat5a が Th2 細胞の分化誘導に重要であることが明らかとなり、アレルギー性気道炎症の惹起に関与していることが示された。

4. Stat6 特異的プロテアーゼによる Stat6 シグナルの調節機構 (岩本)

IL-4/IL-13 による Stat6 活性化は、Th2 細胞分化に必須であり、アレルギー性炎症及び IgE 産生に

最も重要である。これまで Stat6 シグナルの制御機構は、サイトカインレセプター或いは Jak キナーゼレベルを抑制する SOCS 蛋白の誘導によることが知られている。

今回我々は、Stat6 シグナルを負に制御する Stat6 特異的プロテアーゼを新たに発見し、その機能的意義を明らかにした。まず我々は肥満細胞における IL-4 シグナルを解析し、肥満細胞には通常の細胞に発現していない 65kDa Stat6 が特異的に発現していること、及び 65kDa Stat6 は、DNA への結合配列を保持しているが、転写活性化部位を欠くことを明らかにした。次に 65kDa Stat6 の産生機構とその機能解析を行った。その結果、Stat6 特異的プロテアーゼ活性は核分画に局在し、野生型 Stat6 を 65kDa Stat6 に分解した。しかし Stat5 は分解しなかった。65kDa Stat6 は転写活性を欠き、逆に野生型 Stat6 の転写を抑制した。さらに Stat6 プロテアーゼ抵抗性変異 Stat6 を Stat6 欠損 BMDC に発現させると IL-4 による CD23 発現及び増殖抑制作用が増強された。したがって、Stat6 プロテアーゼは Stat6 シグナリングを負に制御する新たな調節機構であることが明らかにされた。

2) 気道リモデリングの発症機序の解明

1. 気道リモデリングにおける LTD4 の役割 (福田)

気道リモデリングは喘息を重症化させる要因であり、その発症機序の解明は重症喘息の予防、新規治療法の開発に極めて重要である。とくに気道炎症、平滑筋収縮の主要なメディエーターである LTD4 の気道平滑筋増殖及び肺線維芽細胞増殖・細胞外マトリックス産生に及ぼす効果とその作用メカニズムの解明は重要であり、検討した。その結果、LTD4 自体にはヒト気道平滑筋増殖作用は認めなかったが、TGFβによる増殖反応を増強した。この作用は CysLT1 受容体を介するものであった。しかし、matrix metalloproteinase 阻害薬で前処置してもこの増強は認められ、IGF の平滑筋増殖を LTD4 が増強するのとは異なっていた。TGFβによるヒト肺線維芽細胞の増殖反応及びコラーゲン・フィブロネクチン(FN)産生も LTD4 により増強された。また、LTD4 自体にも弱いコラーゲン・FN 産生誘導能を認めた。肺線維芽細胞の CysLT1 受容体発現は TGFβの共存下では増強し、これにより TGFβと LTD4 の混合刺激によるコラーゲ

ン・FN 産生が増強されると考えられた。以上から、LTD4 は、TGFβによる気道平滑筋増殖及び肺線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックス産生を増強させ、気道リモデリングを促進していることが明らかにされた。

2. 慢性的に気道閉塞を有する喘息患者の可逆性に関する新規評価法の開発 (田村)

近年、気管支喘息においても治療によって改善しない気流制限、すなわち気道壁リモデリングの存在が注目されている。これまで気道系の評価は肺機能検査のみで行われてきたが、最近では high resolution computed tomography (HRCT)による非侵襲的な画像評価も試みられている。しかしこれまでの報告では、ある特定の気道のみでの評価が行われており、肺機能検査結果と比較した報告もない。

そこで、喘息発作がなく、慢性的に気流制限を示す患者 (FEV1 の基礎値が予測値の 70%以下) を対象に短期大量のステロイド薬と気管支拡張薬の投与を行い、本治療に対する気道拡張反応を肺機能のみならず HRCT による画像診断で検討した。治療は、デキサメサゾン を 16mg/day で開始し、漸減し 11 日間で終了し、その後 BDP 1000µg/day を継続した。さらに徐放性テオフィリン薬を併用した。上記の 4 週間治療により、20 名中 11 名が FEV1 が予測値の 80%以上に改善した。HRCT 画像で得られた気道外径と気道壁面積の解析では、9 名で治療前後に有意な改善が認められ、11 名で認められなかった。両群間で比較すると、今回の治療による FEV1 の改善量は HRCT 非改善群よりも改善群で有意であったが、治療前の喀痰及び末梢血中の好酸球比率、血清 IgE 値、β₂ 刺激薬吸入に対する可逆性は両群間に有意差を認めなかった。さらに治療前後の気道外径と壁面積の回帰直線を定積分して得られた面積は FEV1 の改善量と有意な相関を示した。本研究から、HRCT 画像の新しい解析方法により、HRCT による気道系全体の病態評価がはじめて可能となった。

3) Churg-Strauss syndrome (CSS)の発症機序の解明 (秋山)

CSS は重症喘息に発症する末梢血好酸球増多を伴う全身性壊死性血管炎である。本研究は、CSS の病態と早期診断に有用なバイオマーカーを明らかにするため、軽症、中等症、重症喘息群、CSS 群における末梢血好酸球及び T 細胞の CD69 及び

CD25 抗原の発現について比較検討した。

その結果、CSS 群 (治療前) では他喘息群に比し末梢血好酸球数が有意に高値であった。対照の非アレルギー群の末梢血好酸球の CD69 抗原の発現陽性率は 3%以下であった。軽症、中等症喘息群及び重症 (吸入ステロイド群) の末梢血好酸球の CD69 抗原陽性率は 0-10%であるのに対し、重症 (経口併用群) では 5-20%と比較的高値あり、CSS 群では 10-30%とさらに高値であった。CD25 抗原の発現率については全群間で有意差を認めなかった。また T 細胞における検討では、喘息群においては軽症、中等症、重症群すべてにおいて CD8/CD69 > CD4/CD69 であるのに対し、CSS 群 (治療前) では CD4/CD69 > CD8/CD69 であった。CD4/CD25, CD8/CD25 については全群間で有意差を認めなかった。CSS 群はステロイド剤および免疫抑制剤などの治療により好酸球の CD69 抗原の発現率の低下及び T 細胞の CD4/CD69 抗原の発現率の低下により CD8/CD69 > CD4/CD69 へと変化した。以上から、重症喘息では好酸球の CD69 発現高値及び T 細胞の CD4/CD69 発現高値が CSS の病態、発症に関与している。

倫理面への配慮

本研究を遂行するにあたり、対象とする喘息患者から提供される検体の取得に際しては、担当医師から研究の方法、必要性、危険性及び有用性さらに拒否しても不利益にならないことを十分に説明した後、同意が得られた場合のみ行った。また実験動物を用いた研究は、動物愛護に配慮し、実験は実験動物委員会の規定に従い遂行した。

D. 考察及び E. 結論

本年度の研究において、重症喘息の病因・病態の解明に重要な多くの研究成果が得られた。

1) アレルギー性気道炎症の制御機構について、CD25 陽性制御性 T 細胞のアレルギー性炎症における制御的役割がはじめて明らかにされた。IL-9 は MDC 産生を介してアレルギー性気道炎症を誘導することが示された。さらに転写因子 Stat5 が Th2 細胞の分化活性化を制御していることが明らかにされた。さらに Stat6 特異的プロテアーゼによる Stat6 シグナルの負の調節機構の存在が明らかにされた。2) 気道リモデリングの発症機序について、LTD4 が気道平滑筋増殖及び肺線維芽細胞

の増殖、細胞外マトリックス産生を増強し関与することが明らかにされた。病態評価法について、HRCT 画像の新しい解析方法の開発により、HRCT による気道系全体の病態評価がはじめて可能となった。3) 重症喘息である CSS は、好酸球及び T 細胞の CD69 発現が病態に関与していることが明らかにされた。これらの成果から、重症喘息の気道炎症に関与するサイトカイン及び転写因子レベルの制御による新しい治療薬開発の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

喘息発作がなく、慢性的に気流制限を示す患者において、 β 2 刺激薬に対する可逆性よりも短期間に全身性にステロイド薬を投与した場合の可逆性が統計学的に有意に多いこと、また、ステロイド薬に対する可逆性が高い患者では、その後の日常生活の質が著明に改善することより、臨床的に COPD と診断できる患者でも、ステロイド薬の全身投与を含む治療を実施することの臨床的な意義が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kagami S, Nakajima H, Suto A, Hirose K, Suzuki K, Morita S, Kato I, Saito Y, Kitamura T, Iwamoto I. Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. *Blood* 97: 2358-2365, 2001.
2. Suto A, Nakajima H, Kagami S, Suzuki K, Saito Y, Iwamoto I. Role of CD4+ CD25+ regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 680-687, 2001.
3. Uchida Y, Kurasawa K, Nakajima H, Nakagawa N, Tanabe E, Sueishi M, Saito Y, Iwamoto I. Increase of dendritic cells type 2 (DC2) by altered response to interleukin-4 in atopic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 1005-1011, 2001.
4. Kasai M, Kurasawa K, Nakajima H, Iwamoto I. T cell vaccination eliminates antigen-specific T cells and prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the tissue. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125 (Suppl): 59-66, 2001.
5. Cheng G, Arima M, Honda K, Hirata H, Eda F, Yoshida N, Fukushima F, Ishii Y, Fukuda T. Anti-

interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. In Press.

6. Terui T, Sano K, Shirota H, Kunikata N, Ozawa M, Okada M, Honda M, Tamura G, Tagami H. TGF- β -producing CD4+ mediastinal lymph node cells obtained from mice tracheally tolerized to ovalbumin (OVA) suppress both Th1- and Th2-induced cutaneous inflammatory responses to OVA by different mechanisms. *J. Immunol.* 167: 3661-7, 2001.

7. Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Shirato K, Tamura G. Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged antigen by dendritic cells. *J. Immunol.* 167: 66-74, 2001.

8. Liu Y, Tamura G, Iijima H, Taniguchi H, Kikuchi T, Ohkawara Y, Shirato K. Effect of whole-body x-irradiation on antigen-induced airway response in sensitized guinea pigs. *Eur. Respir. J.* 17: 615-22, 2001.

9. Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, Haley KJ, Garcia-Zepeda EA, Yamaguchi K, Lilly CM. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281: L1288-302, 2001.

10. Mita H, Endoh S, Kudoh M, Kawagishi Y, Kobayashi M, Taniguchi M, Akiyama K. Possible involvement of mast-cell activation in aspirin provocation of aspirin-induced asthma. *Allergy* 56: 1061-7, 2001.

11. Mita H, Hasegawa M, Saito H, Akiyama K. Levels of cysteinyl leukotriene receptor mRNA in human peripheral leucocytes: significantly higher expression of cysteinyl leukotriene receptor 2 mRNA in eosinophils. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1714-23, 2001.

2. 学会発表

1. 中島裕史, 岩本逸夫. アレルギー疾患と T 細胞 1. アレルギー性炎症と T 細胞. 第 13 回日本アレルギー学会春季臨床大会. (アレルギー 50, 209, 2001)

2. 平栗雅樹, 紀太博仁, 中島裕史, 岩本逸夫, 齋藤康. IL-5 によるヒト好酸球 MAPK 活性化経路の解析. 第 14 回アレルギー好酸球研究会. (抄録集 p. 14, 2001)

3. 鈴木浩太郎, 中島裕史, 加々美新一郎, 須藤明, 池田啓, 岩本逸夫, 齋藤康. 肥満細胞特異的 65-kDa Stat6 の産生機構. 第 51 回アレルギー学会総会. (アレルギー 50, 1033, 2001)

4. 平栗雅樹, 高橋英則, 吉田象二, 岩本逸夫. 好酸球増多症患者由来の好酸球 MAP kinase 活性化の検討. 第 51 回アレルギー学会総会. (アレルギー 50, 951, 2001)

5. 須藤明, 中島裕史, 池田啓, 中山俊憲, 谷口克, 岩本逸夫, 齋藤康. CD4+CD25+T 細胞分化発達機構の解明. 第 31 回日本免疫学会総会. (学術集会記録 31, 244, 2001)

6. 鈴木浩太郎, 中島裕史, 加々美新一郎, 須藤明, 岩本逸夫, 齋藤康. 肥満細胞特異的な蛋白分解による Stat6 シグナルの負の制御機構. 第 31 回日本免疫学会総会. (学術集会記録 31, 33, 2001)

7. 成剛, 有馬雅史, 福田健. Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. アメリカ胸部疾患学会 2001. 平成 13 年 5 月 18 日.

石井芳樹, 福田健. 増殖因子を標的とした気管支喘息治療の理論と実際. 第 51 回日本アレルギー学会総会. (アレルギー 50, 878, 2001)

8. 田村弦. 気管支喘息における気道の炎症とリモテリング. 気道リモテリングの臨床的評価法. 第 28 回日本臨床免疫学会.

9. 田村弦. COPD の診断と治療におけるステロイド薬の役割. 第 8 回呼吸器学会東北地方会教育セミナー.

10. 田村弦. 慢性気道狭窄を示す患者におけるテキサメサゾン大量投与の意義について—CT と肺機能における評価—. 第 3 回喘息リモテリング研究会.

11. 釣木澤尚実, 齊藤博士, 橋本直方, 東 憲孝, 関根健太郎, 松崎 剛, 森 晶夫, 谷口正実, 前田裕二, 長谷川真紀, 秋山一男. 末梢血からみた Churg-Strauss syndrome (CSS) の病態: 活性化マーカー CD69 の免疫学的検討. 第 13 回日本アレルギー学会春季臨床大会. (アレルギー 50, 294, 2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明

分担研究者 岩本逸夫

千葉大学大学院医学研究院細胞治療学助教授

研究協力者 中島裕史、須藤明、鈴木浩太郎、加々美新一郎、広瀬晃一

(千葉大学大学院医学研究院細胞治療学、ヒューマンサイエンス振興財団)

研究要旨

重症喘息の病態解明と新規治療法の開発には、アレルギー性気道炎症の成立機序及びその制御機構の解明が必須である。この目的のため、1) CD25 陽性制御性 T 細胞によるアレルギー性気道炎症の制御機構、2) アレルギー性気道炎症における Stat5 の役割、及び3) Stat6 特異的プロテアーゼによる Stat6 シグナリングの調節機構を明らかにした。

まず CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞のアレルギー性気道炎症における役割をマウス喘息モデルと *in vitro* の Th1/Th2 細胞分化で検討した。抗原吸入による気道好酸球浸潤は、CD25T 細胞除去群移入マウスで低下し、逆に、好中球及び T 細胞浸潤は増加した。さらに CD25T 細胞除去群移入マウスで BALF 中の Th2 サイトカイン IL-4 と IL-5 産生が著明に低下し、一方 Th1 サイトカイン IFN- γ 産生は増加した。CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞を除去すると Th1 細胞が増加し、Th2 細胞は減少した。以上から、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞は、Th1 細胞/Th2 細胞バランスを Th2 側に誘導し、アレルギー性気道炎症を増強する方向に制御している。次に Stat5a 欠損マウスでは抗原誘発気道好酸球浸潤は著明に減少していた。さらに予期に反して、Stat5a 欠損 T 細胞は、Th2 細胞分化が障害され、逆に Th1 細胞分化は亢進していた。さらに、Stat5a 欠損 T 細胞にレトロウイルスを用いて Stat5a を発現させると Th2 細胞の分化が野生型 T 細胞レベルまで回復した。以上から、Stat5a が Th2 細胞の分化誘導に重要であることが明らかとなり、アレルギー性気道炎症の惹起に関与していることが示された。さらに IL-4 刺激により肥満細胞は、核内に存在する Stat6 プロテアーゼにより通常の細胞に発現していない 65kDa Stat6 を特異的に発現することを見出した。Stat6 プロテアーゼは核内で Stat6 を転写活性部位を欠く 65kDa Stat6 に分解し、65kDa Stat6 自身は DNA 結合部位を有しドミナントネガティブ体として作用する。したがって、Stat6 特異的プロテアーゼは Stat6 シグナルを負に制御する新たな調節機構であることが明らかにされた。

A. 研究目的

気管支喘息の病態であるアレルギー性気道炎症は、Th2 細胞の活性化を起点とし、Th2 細胞と好酸球を主体とする炎症細胞浸潤、気道過敏性、粘液細胞の増加により特徴づけられる。したがって、重症喘息の病態解明と新規治療法の開発には、アレルギー性気道炎症の成立機序及びその制御機構の解明が必須である。この目的のため、1) CD25 陽性制御性 T 細胞によるア

レルギー性気道炎症の制御機構、2) アレルギー性気道炎症における Stat5 の役割、及び3) Stat6 特異的プロテアーゼによる Stat6 シグナリングの調節機構を明らかにした。

B. 方法

1) CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞の Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症における役割：T 細胞レセプタートランスジェニックマウス (DO10

マウス) の脾細胞から CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞を除去した群 (CD25 除去群) と除去しない群 (非除去群) を内因性の免疫応答を欠く Rag-2 欠損マウスに経静脈的に移入し、それらのマウスでアレルギー性気道炎症を比較した。CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞が Th1/Th2 細胞の分化を制御しているか否かを明らかにするために、Th1/Th2 細胞分化に対する CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞除去効果を検討した。

2) 転写因子 Stat5 の Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症における役割: Stat5a 欠損マウスと Stat5b 欠損マウスを OVA にて腹腔内感作し、その 2 週後に OVA を吸入投与しアレルギー性気道炎症を惹起し、好酸球と T 細胞浸潤及び BALF 中の IL-5 産生を検討した。また抗原刺激による脾 T 細胞のサイトカイン産生と Th1/Th2 細胞分化も検討した。さらに Stat5a 欠損 T 細胞にレトロウイルスを用いて Stat5a を発現させ Th1/Th2 細胞分化に対する効果を検討した。

3) Stat6 特異的プロテアーゼによる 65kDa Stat6 の産生機構とその機能解析: 野生型 Stat6 或いは種々の変異 Stat6 をレトロウイルスを用いて Stat6 欠損 BMMC に発現させ以下の検討を行った。Stat6 特異的プロテアーゼは Stat6 欠損 BMMC 核分画を用いた。それらを用い、Stat6 切断部位の決定、Stat6 プロテアーゼ活性の細胞内局在、Stat5 プロテアーゼとの比較、65kDa Stat6 の機能解析、Stat6 プロテアーゼ抵抗性 Stat6 の機能解析を行った。

倫理面への配慮

実験動物を用いた研究は、動物愛護に配慮し、実験は実験動物委員会の承認を得た上で遂行した。

C. 研究結果及び D. 考察

1) 抗原吸入による気道好酸球浸潤は、CD25T 細胞除去群移入マウスで有意に低下した。逆に、抗原吸入による好中球及び T 細胞浸潤は CD25T 細胞除去群移入マウスで有意に増加していた。さらに CD25T 細胞除去群移入マウスで BALF 中の Th2 サイトカイン IL-4 と IL-5 産生が著明に低下し、一方 Th1 サイトカイン IFN- γ 産生は増加した。in vitro の Th1/Th2 細胞分化の検討では、DO10 マウス脾細胞から CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞を除去すると Th1 細胞が増加し、Th2 細胞は減少した。一方、CD25 陽性 CD4 陽性 T

細胞除去群に純化した CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞を戻すと Th2 細胞が増加し、Th1 細胞は減少した。以上から、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞は、Th1 細胞/Th2 細胞バランスを Th2 側に誘導し、アレルギー性気道炎症を増強する方向に制御している。

2) 転写因子 Stat5 の Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症における役割

我々は、好酸球の分化増殖に重要なサイトカインである IL-5 により活性化される Stat5a がアレルギー性炎症の惹起に必須であることを見いだした。すなわち、Stat5a 欠損マウスでは抗原誘発気道好酸球浸潤は著明に減少していた。さらに予期に反して、Stat5a 欠損マウスの T 細胞サイトカイン産生は IL-4、IL-5 が著明に低下し、IFN- γ は正常であった。興味深いことに Stat5a 欠損マウスでは抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体産生が低下しており、逆に IgG2a 抗体産生は増加していた。このことは Stat5a 欠損マウスでは Th2 細胞への分化が障害されていることを示唆する。次に、Stat5a 欠損マウスを DO10 マウスと交配して DO10+ Stat5a 欠損マウスを作製し、Stat5a 欠損マウスにおける Th 細胞分化を単細胞レベルで解析した。その結果、DO10+ Stat5a 欠損 T 細胞は、DO10+ T 細胞に比して Th2 細胞分化が障害され、逆に Th1 細胞分化は亢進していた。これは IL-12 の存在下 (Th1 条件)、IL-4 の存在下 (Th2 条件) に関わらず認められた。さらに、DO10+ Stat5a 欠損 T 細胞にレトロウイルスを用いて Stat5a を発現させると Th2 細胞の分化が DO10+ T 細胞レベルまで回復した。以上から、Stat5a が Th2 細胞の分化誘導に重要であることが明らかとなった。

3) IL-4 刺激により 肥満細胞は通常の細胞に発現していない 65kDa Stat6 を特異的に発現した。Stat6 プロテアーゼ活性は核分画に局在し、野生型 Stat6 を 65kDa Stat6 に分解した。しかし Stat5 は分解しなかった。65kDa Stat6 は転写活性を欠き、逆に野生型 Stat6 の転写を抑制した。さらに Stat6 プロテアーゼ抵抗性変異 Stat6 を Stat6 欠損 BMMC に発現させると IL-4 による CD23 発現及び増殖抑制作用が増強された。以上から、Stat6 プロテアーゼは核内で Stat6 を転写活性部位を欠く 65kDa Stat6 に分解し、65kDa Stat6 自身は DNA 結合部位を有しドミナントネガティブ体として作用する。したがって、Stat6 特異的

プロテアーゼは Stat6 シグナルを負に制御する新たな調節機構であることが明らかにされた。

E. 結論

本研究により、CD25 陽性制御性 T 細胞は、Th2 細胞を誘導し、アレルギー性気道炎症を増強する方向に制御することをはじめて明らかにした。さらに Stat5a が Th2 細胞の分化誘導に重要であることを明らかにし、アレルギー性気道炎症の惹起に関与していることを示した。最後に Stat6 特異的プロテアーゼによる Stat6 シグナルの負の調節機構が存在することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kagami S, Nakajima H, Suto A, Hirose K, Suzuki K, Morita S, Kato I, Saito Y, Kitamura T, Iwamoto I. Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. *Blood* 97: 2358-2365, 2001.
2. Suto A, Nakajima H, Kagami S, Suzuki K, Saito Y, Iwamoto I. Role of CD4+ CD25+ regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 680-687, 2001.
3. Uchida Y, Kurasawa K, Nakajima H, Nakagawa N, Tanabe E, Sueishi M, Saito Y, Iwamoto I. Increase of dendritic cells type 2 (DC2) by altered response to interleukin-4 in atopic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 1005-1011, 2001.
4. Kasai M, Kurasawa K, Nakajima H, Iwamoto I. T cell vaccination eliminates antigen-specific T cells and prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the tissue. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125 (Suppl): 59-66, 2001.

2. 学会発表

1. 中島裕史、岩本逸夫。アレルギー疾患と T 細胞 1. アレルギー性炎症と T 細胞。第 13 回日本アレルギー学会春季臨床大会。(アレルギー 50, 209, 2001)
2. 平栗雅樹、紀太博仁、中島裕史、岩本逸夫、齋藤康。IL-5 によるヒト好酸球 MAPK 活性化経路の解析。第 14 回アレルギー好酸球研究会。(抄

録集 p. 14, 2001)

3. 鈴木浩太郎、中島裕史、加々美新一郎、須藤明、池田啓、岩本逸夫、齋藤康。肥満細胞特異的 65-kDa Stat6 の産生機構。第 51 回アレルギー学会総会。(アレルギー 50, 1033, 2001)
4. 平栗雅樹、高橋英則、吉田象二、岩本逸夫。好酸球増多症患者由来の好酸球 MAP kinase 活性化の検討。第 51 回アレルギー学会総会。(アレルギー 50, 951, 2001)
5. 須藤明、中島裕史、池田啓、中山俊憲、谷口克、岩本逸夫、齋藤康。CD4+CD25+T 細胞分化発達機構の解明。第 31 回日本免疫学会総会。(学術集会記録 31, 244, 2001)
6. 鈴木浩太郎、中島裕史、加々美新一郎、須藤明、岩本逸夫、齋藤康。肥満細胞特異的な蛋白分解による Stat6 シグナルの負の制御機構。第 31 回日本免疫学会総会。(学術集会記録 31, 33, 2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

IL-9によるアレルギー性気道炎症の制御機構及び気道リモデリング の発症機序に関する研究

分担研究者 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

アレルギー性気道炎症の新しい制御機構及び気道リモデリングの発症機序を解明することを目的として、抗IL-9抗体投与がマウス喘息における気道炎症に及ぼす影響、及びシステインルイコトリエン(Cys-LTs)が気管支平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックス産生に及ぼす影響について検討した。

喘息マウスに抗IL-9抗体を投与するとBAL液中の好酸球数、リンパ球数が著明に減少した。抗IL-9抗体投与によりIL-2,IL-12,IFN- γ レベルは変化しなかったが、IL-4,IL-5とIL-13レベルは有意に減少した。しかし脾臓T細胞のIL-4,IL-5とIL-13産生は影響を受けなかった。BAL液中のeotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1 α レベルも影響を受けなかった。免疫組織化学的検索において喘息マウスでは気道上皮細胞においてMDCとTARCの発現が著明に認められたが、抗IL-9抗体投与によりMDCの発現が消失した。以上の結果より、IL-9を介した気道上皮細胞のMDCの発現がTh2細胞の気道粘膜への集積を惹起し、アレルギー性気道炎症の誘導、維持に関与している可能性が示された。

Cys-LTsはTGF- β と協調的に作用し平滑筋増殖や線維芽細胞からのファイブロネクチンおよびコラーゲンの産生を亢進させており、気道リモデリングの病態に重要な役割を演じていることが明らかとなった。ロイコトリエン受容体拮抗薬はこれを抑制し、気道リモデリングの治療に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

気管支喘息の病態に関与するTh2サイトカインとして最近IL-9が注目を集めている。IL-9遺伝子が気管支喘息の遺伝子座に一致することからIL-9が病因に関与している可能性が報告されている。最近肺特異的なIL-9トランジェニックマウスにおいて、好酸球とリンパ球浸潤を伴う気道炎症および気道抵抗の上昇が認められた。実際の喘息患者の気道における解析も行われ、IL-9産生T細胞の増加およびIL-9R陽性細胞の増加が示されている。そこで今回我々

はマウス喘息モデルを用いて抗IL-9抗体の投与で喘息性気道炎症を抑制しうるか検討した。

一方、気管支喘息においては、気管支平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックス(ECM)の沈着など気道リモデリングの形成が慢性化、難治化の原因となっている。特に平滑筋の増殖は気管支壁を構成する細胞のうち大きな部分を占めるものであり、気流閉塞や気道過敏性亢進に大きく関与している。ロイコトリエンD4(LTD4)などCysteinyl leukotrienes(Cys-LTs)は、強力な気管支平滑筋収縮作用や

気道分泌促進作用などを有し、気管支喘息の病態に中心的な役割を演じているが、気道リモデリングにおいても重要な因子であると考えられる。Cys-LTs の気道リモデリングの病態における役割を解明するため Cys-LTs の気管支平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックス産生に及ぼす作用について、特に他の細胞増殖因子との協調作用などを焦点に当て検討した。

B. 研究方法

1. 抗 IL-9 抗体投与がマウス喘息における気道炎症に及ぼす影響.

BALB/c マウスを卵白アルブミン (OA) で day0, 5 に腹腔内感作し、day17 にネプラーザーにて1日2回1%OAを1時間吸入させた。そのチャンレンジの前に抗 IL-9 抗体あるいはコントロール抗体を i.v. 投与した。最終吸入より24時間後に肺胞洗浄液中の細胞数、細胞分画およびサイトカインの産生、気道過敏性を評価した。また免疫染色法を用いてマウス気道上皮における MDC と TARC 蛋白の発現を検討した。

2. Cys-LTs が気管支平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックス産生に及ぼす影響.

ヒト気道平滑筋細胞およびヒト肺線維芽細胞を培養し、Cys-LTs および TGF- β で刺激し、それぞれ単独での作用と協同作用を検討した。ロイコトリエン受容体拮抗薬の効果も検討した。細胞増殖活性は BrdU を用いた DNA 合成能を測定した。細胞外マトリックス産生能は、培養上清のファイブロネクチンおよび I 型コラーゲンを測定した。Cys-LT1 受容体 mRNA の発現は RT-PCR で検討した。

C. 研究結果

1. 抗 IL-9 抗体投与がマウス喘息における気道炎症に及ぼす影響.

マウスの喘息モデルにおける気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球、リンパ球の増加は抗 IL-9 抗体投与することにより強く抑えられた。抗 IL-9 抗体投与群では気管支肺胞洗浄液中の IL-2, IL-12, IFN- γ レベルは変化しなかったが IL-4, IL-5 と IL-13 レベルは有意に減少した。eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1 α レベルも抗 IL-9 抗体投与の影響を受けなかった。一方マウス脾臓 T 細胞の IL-4, IL-5 と IL-13 産生は抗 IL-9 抗体による影響を受けなかった。喘息マウスでは気道上皮細胞において MDC と TARC 蛋白の発現が著明に認められたが、抗 IL-9 抗体投与により MDC 蛋白の発現が消失した。また気道過敏性の亢進も抑制された。

2. Cys-LTs が気管支平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックス産生に及ぼす影響.

LTD4 は、それ自体では平滑筋増殖作用を示さなかったが、TGF- β による増殖作用を増強させ、この協同作用は、LT 受容体拮抗薬である Planlukast および Zafirlukast によって抑制された。matrix metalloproteinase (MMP) 阻害薬では影響されず、IGF-1 と Cys-LTs にみられる MMP の産生を介したメカニズムとは異なるものと考えられた。Cys-LTs は、TGF- β による線維芽細胞の増殖には影響しなかったが、TGF- β と協調して線維芽細胞からのファイブロネクチンやコラーゲン産生を増強させた。この協同作用は、LT 受容体拮抗薬によって抑制された。TGF- β は、Cys-LT1 受容体の発現を増強させたことから、TGF- β と CysLTs の協同作用の一部は Cys-LT1 受容体の発現の増強を介している可能性が示唆された。

D. 考察

抗 IL-9 抗体前処置によって、抗原チャレンジ後の気道炎症と気道過敏性の誘導が有意に抑制された。IL-9 が喘息性気道炎症の発症と気道過敏性の亢進とに関与することが示唆された。今後 IL-9 は新たな喘息の治療のターゲットとして期待される。

Cys-LTs は単独では、気道リモデリングに関して著明な影響を及ぼさなかったが、TGF- β など細胞増殖因子と協調的に作用して平滑筋の増殖や線維芽細胞からの細胞外マトリックス産生に関与していた。この作用のメカニズムは明確ではないが、これまで増殖因子など受容体型チロシンキナーゼを介するシグナルと G 蛋白結合受容体を介するシグナルが協調的に作用することが知られており、今回の結果も同様なメカニズムが考えられた。動物喘息モデルにおいて LT 受容体拮抗薬が気道リモデリングを抑制することが示されているが、今回の結果から細胞レベルでの Cys-LTs のリモデリングにおける役割の一部が明らかとなったと考えられる。

E. 結論

IL-9 を介した気道上皮細胞の MDC 発現が Th2 細胞の気道粘膜への集積を惹起し、アレルギー性気道炎症の誘導、維持に関与している可能性が示された。

CysLTs は TGF- β と協調的に作用し平滑筋増殖や線維芽細胞からの ECM の産生を亢進させ気道リモデリングの病態に重要な役割を演じていることが明らかとなった。ロイコトリエン受容体拮抗薬が、気道リモデリングの治療に有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Cheng G, Arima M, Honda K, Hirata H, Ishii Y, Fukuda T: Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. Am. J. Respir. Crit. Med. 2002. in press.

2. 学会発表

成 剛、有馬 雅史、福田 健: Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. アメリカ胸部疾患学会 2001. 平成 13 年 5 月 18 日.

石井 芳樹、福田 健: 増殖因子を標的とした気管支喘息治療の理論と実際、第 51 回日本アレルギー学会総会。(アレルギー 50, 878, 2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

慢性的に気流閉塞を有する患者の可逆性に関する研究

分担研究者 田村 弦 東北大学医学部附属病院循環器内科講師

研究要旨 喘息発作がなく、慢性的に気流制限を示す20名の患者を対象に短期大量のステロイド薬と気管支拡張薬の投与を行い、本治療に対する気道拡張反応を肺機能のみならず high resolution computed tomography(HRCT)による画像診断で検討した。20名中3名で β_2 刺激薬吸入後にFEV₁が予測値の80%以上に改善したが、上記の治療により、新たに11名が80%以上に改善し、統計学的に有意な改善を示した。また、HRCTでも有意な改善が9名に認められた。以上のことより、慢性閉塞性肺疾患を疑う患者においても、短期大量のステロイド療法を試みる価値が十分に存在することが示唆された。

A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者における気流制限は完全に可逆的でないことが特徴であるが、近年、気管支喘息(BA)においても治療によって改善しない気流制限、すなわち気道壁リモデリングの存在が注目されている。したがって、慢性的に気流制限を示す患者の中にはCOPDのみならずBAが存在する可能性がある。これまで気道系の評価は肺機能検査のみで行われてきたが、最近ではhigh resolution computed tomography (HRCT)による非侵襲的な評価も試みられている。これまでの報告では、ある特定の気道のみでの評価が行われており、肺機能検査結果と比較した報告もない。そこで、喘息発作がなく、慢性的に気流制限を示す患者を対象に短期大量のステロイド薬と気管支拡張薬の投与を行い、本治療に対する気道拡張反応を肺機能のみならずHRCTによる画像診断で検討した。。

B. 研究方法

入院後、肺機能検査を行い、FEV₁の基礎値が予測値の70%以下の症例を対象とした。 β_2 刺激薬高用量吸入による可逆性と胸部HRCTを施

行後、デキサメサゾン(DEX)を16mg/dayで静脈内投与を開始した。同量を5日間継続した後、2日間ごとに半分量に漸減し、DEX投与は11日間で終了し、その後ベクロメサゾン(BDP)1000 μ g/dayを継続した。また、アミノフィリン投与量は血中濃度が10 μ g/ml前後になるように調整し、点滴終了後は等価の徐放性テオフィリン薬の内服とした。治療開始4週間後に再度肺機能検査と胸部HRCTを実施した。試験期間中の呼吸困難に対しては、 β_2 刺激薬の吸入頓用のみで対処した。なお、HRCTの解析は長径と短径の比率が1.3以内のほぼ正接に切断され、かつ外径が3.5mmから12.5mmの気管支のみを対象に行った。その結果、各被験者で25個から60個の気管支が選択され、その外径をX軸に、その気道壁面積をY軸に表示し、各被験者の治療前後各々における回帰直線を求め、解析を行った。

(倫理面への配慮)

いずれの対象患者も全て入院患者であり、十分な時間をかけて治療方法と内容について説明を行った。また、本治療の受諾の有無は自由意志で決定している。

C. 研究結果

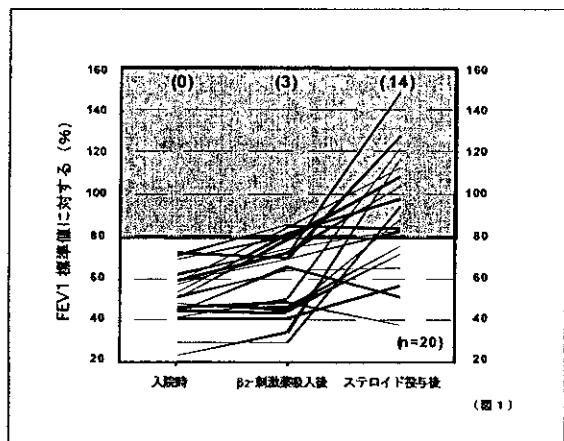
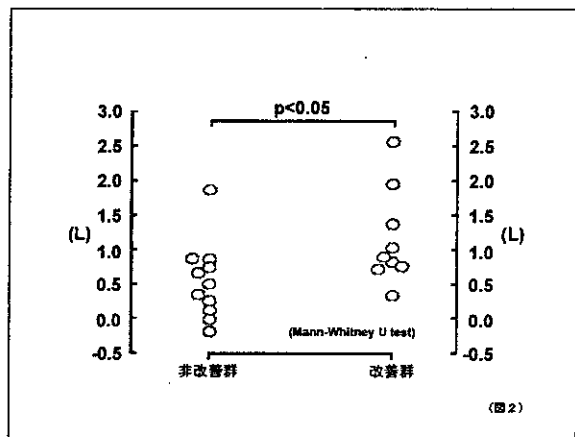
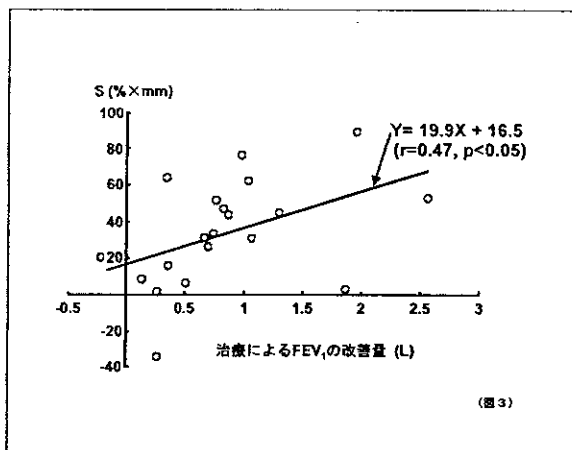


図1に示すように、20名中3名で β_2 刺激薬吸入後にFEV₁が予測値の80%以上に改善したが、上記の4週間治療により、さらに11名が80%以上に改善し、統計学的に有意な改善が示された。



また、HRCT解析で得られた各々の回帰直線を統計学的に解析したところ、9名で治療前後に有意な改善が認められ、11名で認められなかった。図2に示すように、両群間でFEV₁の改善量を比較すると、今回のステロイド治療によるHRCT上の改善群は非改善群よりもFEV₁の改善が有意 ($p < 0.05$) に多かったが、治療前の喀痰中の好酸球比率や末梢血中の好酸球比率、血清IgE値、 β_2 刺激薬吸入に対する可逆性など、いずれの指標においても両群間に有意差を認めなかった。



さらに、図3に示すように、治療前後の回帰直線を外径4~10mmの範囲で定積分して得られた面積(S)は今回のステロイド治療によるFEV₁の改善量と有意 ($p < 0.05$) な相関を示した。

D. 考察

HRCTを用いて、気道系を定量的に評価した報告はこれまで幾つかあるが、同一症例で前後比較を行った報告は1報だけである。その報告では、メサコリン吸入前と吸入後にHRCTを行い、その画像上で解剖学的にできるだけ同一と推測される部位を決定し、気道壁の変化を測定しているが、本研究の対象患者のように慢性的に気流制限を示す患者では、肺の過膨張が存在し、治療により気流制限が改善した場合には気道系の構造自体が大きく変化するため、同一の気道部位を画像上に求めることは困難である。また、HRCTの解析は一般的には気道の内径に基づいて行われているが、今回の対象患者では、内径は粘膜浮腫や粘液栓の影響を直接受けるため、治療による変化が大きい。そこで、本研究では、HRCT画像の新しい解析方法を導入したわけであるが、HRCT改善の客観的な指標がFEV₁の改善量と有意に相関したことより、HRCTでも気道系全体の評価が可能であることが示唆された。

今回のステロイド治療により、慢性的に気流閉塞を有する患者においても、著明に肺機能が改善し、健常者と同様な日常生活をおくれるようになった症例が存在した。また、この改善は治療前の喀痰中の好酸球比率や末梢血中の好酸球比率、血清 IgE 値、 β_2 刺激薬吸入に対する可逆性など、いずれの指標からも推測できなかった。さらに、今回の短期間のステロイド投与による副作用は全く認められなかったことより、本治療法は臨床的に COPD が強く疑われる症例に対して、一度は試みられるべき治療であると考えられる。

E. 結論

本研究により、臨床的には、COPD を疑う患者においても、短期大量のステロイド療法を試みる価値が十分に存在することが示唆された。

F. 健康危険情報

喘息発作がなく、慢性的に気流制限を示す患者において、 β_2 刺激薬に対する可逆性よりも短期間に全身性にステロイド薬を投与した場合の可逆性が統計学的に有意に多いこと、また、ステロイド薬に対する可逆性が高い患者では、その後の日常生活の質が著明に改善することより、臨床的に COPD と診断できる患者でも、ステロイド薬の全身投与を含む治療を実施することの臨床的な意義が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Terui T, Sano K, Shirota H, Kunikata N, Ozawa M, Okada M, Honda M, Tamura G, Tagami H. TGF- β -producing CD4+ mediastinal lymph node cells obtained from mice tracheally tolerized to ovalbumin

(OVA) suppress both Th1- and Th2-induced cutaneous inflammatory responses to OVA by different mechanisms. *J. Immunol.* 167: 3661-7, 2001.

2. Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Shirato K, Tamura G. Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged antigen by dendritic cells. *J. Immunol.* 167: 66-74, 2001.

3. Liu Y, Tamura G, Iijima H, Taniguchi H, Kikuchi T, Ohkawara Y, Shirato K. Effect of whole-body x-irradiation on antigen-induced airway response in sensitized guinea pigs. *Eur. Respir. J.* 17: 615-22, 2001.

4. Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, Haley KJ, Garcia-Zepeda EA, Yamaguchi K, Lilly CM. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281: L1288-302, 2001.

2. 学会発表

1. 第28回日本臨床免疫学会. ワークショップ「気管支喘息における気道の炎症とリモデリング」演題「気道リモデリングの臨床的評価法」
2. 第8回呼吸器学会東北地方会教育セミナー. 教育講演「COPDの診断と治療におけるステロイド薬の役割」
3. 第3回喘息リモデリング研究会. 「慢性気道狭窄を示す患者におけるデキサメサゾン大量投与の意義について—CTと肺機能における評価—」

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Churg-Strauss syndrome (CSS)の発症機序に関する研究

分担研究者 秋山一男 (国立相模原病院臨床研究センター部長)
研究協力者 釣木澤 尚実、谷口 正実、斉藤 博士、東 憲孝、東 愛、関根 健太郎、橋本 直方、大友 守、前田 裕二、森 晶夫 (国立相模原病院臨床研究センター)

研究要旨

CSS は重症気管支喘息が先行し、その経過中に発症する末梢血好酸球増多を伴う全身性壊死性血管炎である。一方、活性化好酸球や T 細胞の指標として CD69 抗原や CD25 抗原の発現が報告されている。しかし喘息患者の末梢血において CD69 抗原が発現するという報告はない。今回、我々は重症喘息患者の末梢血において好酸球表面に CD69 抗原の発現が認められることを明らかにした。さらに CSS は重症喘息患者に発症することが多いことから本研究では、軽症、中等症喘息群と重症喘息群、CSS 群に分類し末梢血好酸球および T 細胞表面の活性化マーカーである CD25 抗原および CD69 抗原の発現について比較検討を行った。重症喘息、特に経口ステロイド併用群では好酸球数は低値であるのに対し、その中で CD69 抗原の発現する好酸球数の比率が増加し、活性化好酸球数が増加する傾向が認められた。CSS 群 (治療前) では好酸球数の絶対的増加とともに CD69 抗原の発現する好酸球数も著明に増加した。また CSS 群 (治療前) では特に CD4/CD69 陽性細胞の T 細胞の増加が著明であり、 $CD4/CD69 > CD8/CD69$ であり治療とともに CD4/CD69 抗原の発現率の低下により $CD8/CD69 > CD4/CD69$ へと変化した。CSS 群においては高い好酸球活性化とともに CD4/CD69 陽性 T 細胞の活性化が考えられ、治療とともに変化 (減少) することから CSS の治療経過としてこれらのマーカーが有用であることが考えられた。また CSS の発症機序のひとつとして、重症喘息でかつ CD9/CD69 高値、CD4/CD69 高値の症例に対しては臨床経過を含めた経過観察が必要であると考えられた。

A. 研究目的

CSSは気管支喘息が先行し、その経過中に発症する末梢血好酸球増多を伴う全身性壊死性血管炎である。CSS発症前の喘息の重症度は重症喘息が多いといわれている。CSSの発症機序としては、喘息治療に対する経口ステロイドの減量、中止により潜在していた好酸球増多が表面化する、あるいは抗LT剤投与により喘息症状が緩和したことに伴う経口ステロイドの減量、中止による、などいくつかの知見が散見される。いずれにしても重症喘息患者の治療経過中に発症すると考えられている。

一方、活性化好酸球や T 細胞の指標として CD69 抗原や CD25 抗原の発現が報告されている。CD69 抗原は健常人の末梢血好酸球、T 細胞には発現していないが一部のアレルギー疾患では

局所に浸潤した好酸球や T 細胞表面に CD25 抗原よりも早期に発現するといわれている。CD25 抗原は恒常的に好酸球表面に発現しており、喘息発作などの好酸球活性化により発現量が増加することが知られているが、喘息患者の末梢血において CD69 抗原が発現するという報告はない。今回、我々は重症喘息患者の末梢血において好酸球表面に CD69 抗原の発現が認められることを明らかにした。さらに CSS は重症喘息患者に発症することが多いことから本研究では、軽症、中等症喘息群と重症喘息群、CSS 群に分類し末梢血好酸球および T 細胞表面の活性化マーカーである CD25 抗原および CD69 抗原の発現について比較検討を行い CSS の発症機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

末梢血採血により好酸球数およびリンパ球数を測定した。次に末梢血へパリン採血により、好酸球を分離せず全血から顆粒球、単核球に対して $20 \mu\text{g}/10^6$ 細胞に FITC ラベルした anti-human CD9 (BD PharMingen San Diego, CA, USA)、PE 標識の anti-human CD69 monoclonal antibody (mAb) (PharMingen) を室温で 30 分間反応させ、Lyse buffer で赤血球を溶解、除去した。検体を 4°C で 5 分間 430g で遠心し、洗浄し細胞を回収した後 flow cytometry (FACS)

Calibur (Nippon Becton Dickinson, Akasaka, Tokyo, Japan) で解析した (CD9/CD69)。以下、好酸球および T 細胞の活性化マーカーとして CD25 および CD69 抗原の発現をそれぞれ CD9/CD69, CD69/CD25, CD4/CD69, CD4/CD25, CD8/CD69, CD8/CD25 とし FITC, PE 標識で FACS 解析した。

喘息の重症度分類は気管支喘息治療管理ガイドラインに準拠し、吸入ステロイド使用量を BDP 換算で Step 1 ($\text{BDP} < 200 \mu\text{g}$), Step 2 ($\text{BDP} \geq 200 \mu\text{g}$), Step 3 ($\text{BDP} \geq 400 \mu\text{g}$), Step 4 ($\text{BDP} \geq 800 \mu\text{g}$) とし、Step 1, 2 を軽症群、Step 3 を中等症群、Step 4 は吸入ステロイド群 (重症・吸入群) と経口ステロイド併用群 (重症・経口併用群) の 2 群に分類し、これに CSS 群 (治療前)、CSS 群 (治療後) を加えて解析した。

C. 研究結果

喘息重症度別の末梢血好酸球数については有意差を認めなかったが CSS 群 (治療前) では有意に好酸球数が高値であった。非アレルギー群 (対照群) の末梢血好酸球に発現する CD9/CD69 抗原の発現陽性率は 3% 以下であった。軽症、中等症喘息群および重症・吸入群の末梢血好酸球の CD9/CD69 抗原陽性率は 0-10% であるのに対し、重症・経口併用群では 5-20% と比較的高値あり、CSS 群では 10-30% とさらに高値であった。CD9/CD25 抗原の発現率については軽症、中等症、重症喘息群、CSS 群において有意差を認めなかった。好酸球数と好酸球に発現する CD69 抗原の発現の相関を検討すると重症・吸入群では好酸球数の増加と比較し CD69 抗原の発現する好酸球数は低値であるのに対し、重症・経口併用

群では好酸球数は低値であるのに対し、その中で CD69 抗原の発現する好酸球数が増加している傾向が認められた。このことは重症喘息では全身ステロイドにより好酸球数は減少しているが、その中で好酸球の活性化は依然として残存していることが考えられる。CSS 群治療前では好酸球とともに CD69 抗原の発現も増加しており、ステロイド、免疫抑制剤などの治療により低下した。

また T 細胞における検討では、喘息群においては軽症、中等症、重症・吸入群、重症・経口併用群すべてにおいて $\text{CD8/CD69} > \text{CD4/CD69}$ であるのに対し、CSS 群 (治療前) では $\text{CD4/CD69} > \text{CD8/CD69}$ であった。特に CD4/CD69 陽性細胞の T 細胞の増加が著明であった。CD4/CD25, CD8/CD25 については軽症、中等症、重症喘息群、CSS 群において有意差を認めなかった。CSS 群はステロイド剤および免疫抑制剤などの治療により CD4/CD69 抗原の発現率の低下により $\text{CD8/CD69} > \text{CD4/CD69}$ へと変化した。

D. 考察

CSS の発症機序として ①喘息治療に対する経口ステロイドの減量・中止、②抗 LT 剤投与に伴う喘息症状の緩和による経口ステロイドの減量・中止、③喘息発症時にすでに CSS を発症している (喘息治療内容とは関係が否定されるもの)、などいくつかの知見が散見される。いずれにしても重症喘息患者の治療経過中に発症すると考えられる。本研究では、重症喘息患者では特に経過中に喘息症状が安定しており、好酸球数が増加していなくても活性化好酸球のマーカーである CD69 抗原の発現が高い症例は CSS 発症予備群である可能性があると考えて経過を追う必要があると考えられた。

吸入ステロイド薬治療量により分類した喘息重症度と末梢血好酸球数は統計学的有意差を認めなかったが、活性化好酸球のマーカーである CD69 抗原の発現は重症度に応じて増加した。特に重症・経口併用群ではステロイドの影響により末梢血好酸球数は低値であるのに対し CD69 抗原の発現率は高かった。CSS は重症喘息を背景に発症することが多く、重症喘息で特に

CD9/CD69高値の症例がCSS発症予備群の可能性があると考えられた。またCSS発症時にはT細胞レベルにおいてCD4/CD69の増加が認められ、ステロイド剤および免疫抑制剤などの治療により低下した。このことから活性化したCD4/CD69陽性のT細胞がTh2 サイトカイン産生を増加させ、その結果好酸球数の増加を来したと考えられる。我々は最近、重症喘息患者のCD9/CD69高値の患者からCSS を発症した症例を経験している。重症喘息でCD9/CD69高値、CD4/CD69高値症例はCSS発症の可能性があると考えて臨床経過を注意深く観察する必要がある。

E. 結論

好酸球およびT細胞の活性化マーカーであるCD69抗原の発現はCSSの病態、発症に関与している可能性が示唆された。またこれらのマーカーはCSS治療経過の指標になりうると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mita H, Endoh S, Kudoh M, Kawagishi Y, Kobayashi M, Taniguchi M, Akiyama K. Possible involvement of mast-cell activation in aspirin provocation of aspirin-induced asthma. *Allergy* 56: 1061-7, 2001.

2. Mita H, Hasegawa M, Saito H, Akiyama K. Levels of cysteinyl leukotriene receptor mRNA in human peripheral leucocytes: significantly higher expression of cysteinyl leukotriene receptor 2 mRNA in eosinophils. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1714-23, 2001.

2. 学会発表

釣木澤尚実、斉藤博士、橋本直方、東 憲孝、関根健太郎、松崎 剛、森 晶夫、谷口正実、前田裕二、長谷川真紀、秋山一男. 末梢血からみたChurg-Strauss syndrome(CSS)の病態：活性化マーカーCD69の免疫学的検討. 第13回日本アレルギー学会春季臨床大会 (アレルギー 50, 294, 2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Kagami S, Nakajima H, Suto A, Hirose K, Suzuki K, Morita S, Kato I, Saito Y, Kitamura T, Iwamoto I. Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. *Blood* 97: 2358-2365, 2001.
2. Suto A, Nakajima H, Kagami S, Suzuki K, Saito Y, Iwamoto I. Role of CD4+ CD25+ regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 680-687, 2001.
3. Uchida Y, Kurasawa K, Nakajima H, Nakagawa N, Tanabe E, Sueishi M, Saito Y, Iwamoto I. Increase of dendritic cells type 2 (DC2) by altered response to interleukin-4 in atopic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 1005-1011, 2001.
4. Kasai M, Kurasawa K, Nakajima H, Iwamoto I. T cell vaccination eliminates antigen-specific T cells and prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the tissue. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125 (Suppl): 59-66, 2001.
5. Cheng G, Arima M, Honda K, Hirata H, Eda F, Yoshida N, Fukushima F, Ishii Y, Eukuda T. Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. In Press.
6. Terui T, Sano K, Shirota H, Kunikata N, Ozawa M, Okada M, Honda M, Tamura G, Tagami H. TGF- β -producing CD4+ mediastinal lymph node cells obtained from mice tracheally tolerized to ovalbumin (OVA) suppress both Th1- and Th2-induced cutaneous inflammatory responses to OVA by different mechanisms. *J. Immunol.* 167: 3661-7, 2001.
7. Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Shirato K, Tamura G. Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged antigen by dendritic cells. *J. Immunol.* 167: 66-74, 2001.
8. Liu Y, Tamura G, Iijima H, Taniguchi H, Kikuchi T, Ohkawara Y, Shirato K. Effect of whole-body x-irradiation on antigen-induced airway response in sensitized guinea pigs. *Eur. Respir. J.* 17: 615-22, 2001.
9. Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, Haley KJ, Garcia-Zepeda EA, Yamaguchi K, Lilly CM. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281: L1288-302, 2001.
10. Mita H, Endoh S, Kudoh M, Kawagishi Y, Kobayashi M, Taniguchi M, Akiyama K. Possible involvement of mast-cell activation in aspirin provocation of aspirin-induced asthma. *Allergy* 56: 1061-7, 2001.
11. Mita H, Hasegawa M, Saito H, Akiyama K. Levels of cysteinyl leukotriene receptor mRNA in human peripheral leucocytes: significantly higher expression of cysteinyl leukotriene receptor 2 mRNA in eosinophils. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1714-23, 2001.