

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

**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14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15年（2003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. 重症喘息の気道炎症及び気道リモデリングの成因の解析 福田 健	9-11
3. CpGモチーフによるTh2反応の制御 田村 弦	12-15
4. Churg-Strauss syndrome (CSS)の発症機序に関する研究 秋山一男	16-17
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	18-103

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感染症・呼吸器内科講師）

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） 瀬戸洋平（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学）
前沢裕子（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学） 池田啓（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）
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）
本多京子（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） 森晶夫（国立相模原病院臨床研究センター室長）
富田君子（国立相模原病院臨床研究センター） 東愛（国立相模原病院臨床研究センター）
橋本直方（国立相模原病院臨床研究センター） 森田園子（国立相模原病院臨床研究センター）
大友守（国立相模原病院臨床研究センター） 前田裕二（国立相模原病院臨床研究センター）
佐野公仁夫（東北大学医学研究科内科病態学感染症部門助手）
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）

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、Tyk2 キナーゼは IL-12 シグナルの構成因子として Th2 細胞活性化とアレルギー性気道炎症を抑制し、一方で、IL-13 シグナルの構成因子として杯細胞分化及びムチン産生を増強することを明らかにした。さらに IgE 依存性肥満細胞活性化は PG 産生を介して気道へ CD4 陽性 T 細胞を動員し、Th2 細胞依存性好酸球浸潤を増強すること、及び IL-25 産生を介してアレルギー性気道炎症を増強し、重症化に関与することが明らかにされた。2) アレルギー性気道炎症の新規免疫療法として、CpGDNA-アレルギー結合体は気道炎症に対する抑制効果が著しく増強し、有望な抗原特異的な抗アレルギー-DNA ワクチン療法であることが示唆された。3) ステロイド抵抗性の分子機構について、GR α の減少と Bcl2 発現がステロイド抵抗性に関与することが明らかにされた。4) 気道リモデリングの発症機序について、上皮下線維増生に TGF- β シグナルの活性化が関与すること、Smad7 分子はそれに拮抗的に作用し喘息における気道リモデリングを抑制する方向に働くことが示唆された。したがって、TGF- β シグナル伝達分子はリモデリング治療薬開発の1つのターゲットになる。5) 重症喘息である Churg-Strauss syndrome (CSS)の早期診断には、好酸球と T 細胞の CD69 発現が指標にな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及び気道リモデリングの発症維持・重症化に関与する分子群をターゲットとする新しい治療薬開発の可能性が示唆される。

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、重症喘息の病因・病態の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制御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. Tyk2 キナーゼによるアレルギー性気道炎症の制御機構 (岩本)

IL-12 と IL-13 シグナルに関与する Jak キナーゼである Tyk2 の Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症への関与について、Tyk2 欠損マウスを用いて解析した。その結果、Tyk2 欠損マウスの喘息モデルでは、抗原吸入による気道での Th2 サイトカイン産生が増強し、さらに気道への好酸球及び CD4 陽性 T 細胞浸潤が増強した。すなわち Tyk2 は、Th2 細胞依存性のアレルギー性気道炎症に対して抑制性に機能している。そして、この気道好酸球浸潤の増強効果は、Tyk2 欠損 CD4 陽性 T 細胞を SCID マウスに移入しても再現できることより、CD4 陽性 T 細胞における Tyk2 の発現が気道好酸球浸潤の抑制に重要であることが明らかとなった。一方、興味深いことに Tyk2 欠損マウスでは、抗原吸入後の IL-13 産生が増強しているにもかかわらず、杯細胞分化およびムチン遺伝子 Muc5AC の発現が減弱していた。これらの結果は、Tyk2 は IL-12 シグナルの構成因子としてアレルギー性炎症における Th2 細胞活性化を抑制し、一方で、IL-13 シグナルの構成因子として杯細胞分化及びムチン産生に関与していることを示している。

2. 肥満細胞によるアレルギー性気道炎症の重症化の分子機構 (岩本、福田)

アレルギー性気道炎症の重症化における IgE 依存性肥満細胞活性化の役割を明らかにするため、IgE トランスジェニック (TNP-IgE) マウスに抗原を単回投与し、気道炎症と気道過敏性を解析した。次に肥満細胞が Th2 サイトカイン産生を誘導する新規サイトカイン IL-25 を産生するか否か、及びその産生機構を解析した。さらに肥満細胞から産生される PGD2 が気道炎症に影響を与えるか否か、及びその機序を解析した。

TNP-IgE マウスに抗原である TNP-BSA を単回経鼻投与すると 48 時間後をピークとする気道 CD4 陽性 T 細胞浸潤を認めた。しかし好酸球浸潤は認められなかった。さらに抗原特異

的 Th2 細胞を TNP-IgE マウスに移入しておくと、抗原吸入により気道好酸球浸潤が惹起され、それは TNP-BSA 投与により著明に増強された。これらの結果は、IgE 依存性肥満細胞活性化は、気道への CD4 陽性 T 細胞浸潤を惹起し、それ自体では気道好酸球浸潤を惹起しないが、間接的に Th2 細胞依存性好酸球浸潤を増強することを示している。さらに IgE 刺激により肥満細胞が IL-25 を産生することが明らかとなった。IL-25 は非 T 細胞から IL-4, IL-5 産生を惹起することから、肥満細胞が IL-25 産生を介しアレルギー性気道炎症を増強することが示唆される。

次に抗原 (OVA) 感作マウスに PGD2 を吸入させ、24 時間後に低用量 OVA を吸入させると、至適用量 OVA 吸入と同程度の Th2 型気道炎症が誘導された。しかし PGD2 単独吸入では気道炎症の増強は認めず、また PGD2 は OVA 刺激 T 細胞による IL-4, IL-5 産生にも影響を及ぼさなかった。PGD2 吸入後に低用量 OVA を吸入したマウスでは、気道上皮において著明な Th2 細胞特異的遊走ケモカインである MDC 発現がみられたことから、PGD2 は気道上皮からの MDC 遊離を惹起し Th2 型気道炎症を増強すると考えられる。

2) CpGDNA-アレルギー結合体によるアレルギー性気道炎症の制御法の開発 (田村)

細菌やウイルスの遺伝子に特有の塩基配列である CpG モチーフを含む DNA (CpGDNA) は、マクロファージ、樹状細胞、NK 細胞、B 細胞を活性化させ、IL-12、IFN- γ 、TNF- α などを産生し、強い Th1 型炎症反応を惹起する。そこで、アレルギー性気道炎症に対する CpGDNA によるワクチン療法の可能性を検討した。

マウスを抗原 (OVA) で感作後、OVA、CpGDNA、もしくは 2 つを同時に気道内に前投与し、6 日後に OVA を気道内暴露した。コントロールとして PBS を前投与した。CpG や OVA のみを前投与した群では好酸球性気道炎症に影響はみられなかったが、OVA と CpG を同時に前投与した群では気道の好酸球浸潤が有意に抑制された。OVA と CpG を含まないコントロール DNA を同時に前投与した群では影響がみられなかった。したがって、抗原と CpG を含む DNA を同時に投与した場合にのみ、引き続き抗原チャレンジによる好酸球性気道炎症の抑制を認めた。次に CpG による好酸球性気道炎症の抑制には抗原との同時投与が重要

であり、抗原特異的な抑制が考えられたため、CpG と OVA を化学的に結合させ、その効果を検討した。CpG 10 μ g と OVA の同時投与群では好酸球性気道炎症が抑制されたが、CpG 0.1 μ g と OVA の同時投与では抑制されなかった。しかし、その抑制しない量の CpG 0.1 μ g と OVA を結合体で投与すると好酸球性気道炎症が抑制された。CpG を含まないコントロール DNA と OVA の結合体は抑制しなかった。そして、この CpG-OVA 結合体投与の抑制効果は少なくとも 8 週間持続した。したがって、CpG-OVA 結合体は同時投与に比べ、100 倍少ない CpG 量で好酸球性気道炎症を抑制することが示され、その有用性が期待される。

3) ステロイド抵抗性 T 細胞活性化の分子機構の解明 (中島)

重症喘息におけるステロイド抵抗性 T 細胞活性化の機序を明らかにするため、1) ステロイド受容体 β 鎖 (GR β) のステロイド誘導アポトーシスに対する阻害効果、2) ステロイド誘導アポトーシス抵抗性に関与する抗アポトーシス分子を同定した。ヒト GR にはスプライシングにより GR α と GR β の 2 つのアイソフォームが存在するが、それらを T 細胞に発現させステロイド誘導アポトーシスを検討した。その結果、GR α の発現は用量依存性にステロイド誘導アポトーシスを惹起したが、GR β の発現はアポトーシスを惹起せず、また GR α によるアポトーシスに対して阻害効果を発揮しなかった。したがって、GR α の量的、質的差異がステロイド抵抗性に関与している可能性があり、スプライシング機構を解析中である。

次にステロイド誘導アポトーシスに抵抗性である肥満細胞の cDNA ライブラリーを T 細胞に遺伝子発現させ、抗アポトーシス分子を同定を試みた。その結果、ステロイド誘導アポトーシス抵抗性の複数のクローンから Bcl2 が単離された。したがって、Bcl2 がステロイド抵抗性に関与していると考えられ、気道における Bcl2 不活化が重症喘息の治療に有用である可能性がある。

4) 気道リモデリングの発症機序の解明 (福田)

気道リモデリングの発症機序の解明は、不可逆性気道閉塞及び喘息重症化の予防に極めて重要である。

TGF- β は線維化に関与する主要なサイトカインであり、最近 TGF- β シグナルはリン酸化

Smad2 などの正の伝達分子と Smad7 の負の伝達分子によって巧妙に調節されていることが明らかにされた。そこで、喘息の上皮下線維増生におけるこれら TGF- β の正と負の伝達分子の役割を検討した。軽症～重症喘息患者 40 名、正常者 6 名から生検にて採取した気管支粘膜組織におけるリン酸化 Smad2、Smad7 の発現を免疫染色法にて評価し、その強さと上皮下線維増生層の厚さの関連を調べた。その結果、気道上皮細胞におけるリン酸化 Smad2 の発現は正常人に比し喘息患者の方が有意に強かった。喘息群ではリン酸化 Smad2 は重症例ほど強く発現し上皮下線維増生層の厚さとの間に有意な正の相関が認められた。反対に Smad7 は軽症例ほど発現しておりその発現の強度は上皮下線維増生層の厚さと負の相関を示した。これらのことから、上皮下線維増生には TGF- β シグナルの活性化が関与すること、Smad7 分子はそれに対して拮抗的に作用し喘息における気道リモデリングを抑制する方向に働くことが示唆された。

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

CSS は重症喘息と末梢血好酸球増多を呈する全身性壊死性血管炎である。本研究は、CSS の病態と早期診断及び治療法を明らかにするため、発症前の検査成績が得られた CSS における末梢血好酸球数と気道過敏性について retrospective に解析し、さらに喘息経過中の末梢血好酸球 (CD9+)、T 細胞 (CD4+、CD8+) の活性化マーカー (CD69 と CD25) の発現について解析した。

その結果、CSS 発症前の喘息重症度は Step4 が 14 名/15 名 (93.3%) と重症が多く、初診時の末梢血好酸球数が一般喘息と比較して有意に高値であった。さらに一般喘息では喘息重症度に比例して気道過敏性 (AchPC20) は亢進していたが、CSS 発症前の気道過敏性は一般喘息の Step3、Step4 と比較して軽度であった。症状安定期の喘息では重症度にかかわらず末梢血好酸球数は差を認めないが、CD69+CD9+ および CD69+CD4+、CD69+CD8+ の発現は重症度に比例して高かった。CSS 発症時には末梢血好酸球数および CD69+CD9+ の著明増加、さらに CD69+CD4+、CD69+CD8+ の増加を認めた。このことから CSS ではすでに CD4 および CD8 T 細胞が活性化されており、その結果好酸球増多と活性化好酸球数の増加をきたした

と考えられた。以上から、一般喘息では重症度に比例して気道過敏性の亢進を認めるが、CSS の喘息の重症度は末梢血好酸球増多が示すように好酸球性炎症を主体とした過敏性で、喘息が血管炎の一症状である可能性を示唆すると考えられた（血管炎喘息）。また血管炎発症前から CD69+CD9+の経過を追跡できた 3 症例については好酸球増多を来す前から CD69+CD9+が増加しており CSS 発症とともに著明に増加した。したがって、CD69 抗原の発現はより鋭敏なマーカーであると考えられた。

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、個人情報保護の保護、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

本年度の研究により、重症喘息の病因・病態の解明、治療法の開発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、Tyk2 キナーゼは IL-12 シグナルの構成因子としてアレルギー性炎症における Th2 細胞活性化を抑制し、一方で、IL-13 シグナルの構成因子として杯細胞分化及びムチン産生を増強することが明らかにされた。さらに IgE 依存性肥満細胞活性化は PG 産生を介して気道へ CD4 陽性 T 細胞を動員し、それにより Th2 細胞依存性好酸球浸潤を増強すること、及び IL-25 産生を介してアレルギー性気道炎症を増強し、重症化に関与することが明らかにされた。

2) アレルギー性気道炎症の新規免疫療法として、CpGDNA-アレルギー結合体は有望な抗原特異的な抗アレルギー-DNA ワクチン療法であることが示唆された。すなわち、CpGDNA を抗原と直接結合するという新しい方法により、抑制効果が著しく増強し、CpGDNA の投与量を 1/100 に減量できることを発見した。

3) ステロイド抵抗性の分子機構について、GR α の減少と Bcl2 発現がステロイド抵抗性に関与することが明らかにされ、気道における Bcl2 不活化が重症喘息の治療に有用である可能性がある。

4) 気道リモデリングの発症機序について、上皮下線維増生に TGF- β シグナルの活性化が関与すること、Smad7 分子はそれに拮抗的に作用し喘息における気道リモデリングを抑制する方向に働くことが示唆された。したがって、TGF- β シグナル伝達分子はリモデリング治療薬開発の 1 つのターゲットになる。

5) 重症喘息である CSS の早期診断には、好酸球と T 細胞の CD69 発現が指標にな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及び気道リモデリングの発症維持・重症化に関与する分子群をターゲットとする新しい治療薬開発の可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Seto Y, Nakajima H, Suto A, Shimoda K, Saito Y, Nakayama K, Iwamoto I. Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice. *J. Immunol.* 2003; 170: 1077-1083.
2. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc ϵ RI-mediated activation. *Blood* 2003; in press.
3. Suzuki K, Nakajima H, Kagami S, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Hiwasa T, Takeda K, Saito Y, Akira S, Iwamoto I. Proteolytic processing of Stat6 signaling in mast cells as a negative regulatory mechanism. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 27-38.
4. Suto A, Nakajima H, Ikeda K, Kubo S, Nakayama T, Taniguchi M, Saito Y, Iwamoto I. CD4+ CD25+ T cell development is regulated by at least two distinct mechanisms. *Blood* 2002; 99: 555-560.
5. Suto A, Nakajima H, Hirose K, Suzuki K, Kagami S, Seto Y, Hoshimoto A, Saito Y, Foster DC, Iwamoto I. Interleukin-21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germline C ϵ transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood* 2002; 100: 4565-4573.
6. Honda K, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D₂ augments low-dose antigen-induced Th2 type airway inflammation in mice. *Dokkyo J Med Sci.*

2003; in press.

7. Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF- β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110:249-254.
8. Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Fukuda T. Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110:873-878.
9. 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 Med.* 2002; 166:409-416.
10. Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Tamura G. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J Immunol.* 2002; 169:787-94.
11. 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.* 2001; 167: 66-74.
12. Tsurikisawa N, Taniguchi M, Suzuki S, Akiyama K. Effects of a nitro compound patch on neuropathy in Churg-Strauss syndrome. *Allergy.* 2003; in press.
13. Kawagishi Y, Mita H, Taniguchi M, Maruyama M, Oosaki M, Higashi N, Kashii T, Kobayashi M, Akiyama K. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:936-942.
14. Higashi N, Taniguchi M, Mita H, Osame M, Akiyama K. A comparative study of eicosanoid concentration in sputum and urine in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1484-1490.

2. 学会発表

1. 前沢裕子、熊野浩太郎、中島裕史、久保秀一、鳥山一、岩本逸夫. 抗原誘発気道炎症細胞浸潤におけるマスト細胞の役割. 第 15 回ア

レルギー好酸球研究会.

2. 岩本逸夫. 喘息の病因解明に対する分子生物学的アプローチ. 第 52 回日本アレルギー学会総会.
3. 池田啓、鈴木浩太郎、中島裕史、岩本逸夫、齋藤康. Stat6 による肥満細胞 TNF- α 産生の抑制. 第 52 回日本アレルギー学会総会.
4. 瀬戸洋平、中島裕史、須藤明、岩本逸夫、齋藤康、下田和哉、中山敬一. 抗原誘発気道アレルギー性炎症における Tyk2 の役割. 第 52 回アレルギー学会総会.
5. 高取宏昌、広瀬晃一、中島裕史、加々美新一郎、須藤明、鈴木浩太郎、岩本逸夫、齋藤康. Th2 細胞分化における Stat5a の役割. 第 52 回日本アレルギー学会総会.
6. 須藤明、中島裕史、広瀬晃一、鈴木浩太郎、岩本逸夫、齋藤康. IL-21 は germline C ϵ transcription を抑制することにより IgE 産生を抑制する. 第 32 回日本免疫学会総会.
7. 鈴木浩太郎、中島裕史、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 32 回日本免疫学会総会.
8. Honda K, Arima M, Cheng G, Eda F, Hirata H, Fukushima F, Fukuda T. The role of prostaglandin D₂ in the pathogenesis of asthma. *American Thoracic Society 2002 International Conference, Atlanta, May, 2002.*
9. Sgara H, Nakao A, Okada T, Chibana N, Ota M, Ra C, Fukuda T. Expression of Smad7 in the airway of asthmatics correlates with disease severity and airway wall thickness. *American Thoracic Society 2002 International Conference, Atlanta, May, 2002.*
10. 田村弦. シンポジウム「アレルギー学会関連学会トピックス」アレルギーのための DNA ワクチン. 第 52 回日本アレルギー学会総会.
11. 田村弦. CpG モチーフによる Th2 反応の抑制. 第 30 回箱根呼吸討論会.
12. 釣木澤尚実、齊藤博士、富田君子、東 愛、橋本直方、水城まさみ、大友 守、森 晶夫、前田裕二、谷口正実、秋山一男. Churg-Strauss syndrome(CSS)の病態：血管炎発症前の気道過敏性と活性化好酸球のマーカーCD69 の検討. 第 52 回日本アレルギー学会総会、横浜 2002.11.30.

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、鈴木浩太郎、須藤明、広瀬晃一、瀬戸洋平、前沢裕子、池田啓
(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構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) IL-12 及び IL-13 シグナルに關与する Tyk2 キナーゼによるアレルギー性気道炎症の制御機構、2) 肥満細胞によるアレルギー性気道炎症の増強作用の分子機構、及び3) 肥満細胞の新規サイトカイン IL-25 産生機構を明らかにした。まず Tyk2 キナーゼの Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症における役割を Tyk2 欠損マウスの喘息モデルを作成し解析した。その結果、Tyk2 欠損マウスでは、抗原吸入による気道での Th2 サイトカイン産生が増強し、さらに気道への好酸球及び CD4 陽性 T 細胞浸潤が増強した。すなわち Tyk2 は、Th2 細胞依存性アレルギー性気道炎症に対して抑制性に機能している。一方、興味深いことに Tyk2 欠損マウスでは、抗原吸入後の IL-13 産生が増強しているにもかかわらず、杯細胞分化およびムチン遺伝子 Muc5AC の発現が減弱していた。これらの結果は、Tyk2 は IL-12 シグナルの構成因子としてアレルギー性気道炎症における Th2 細胞活性化を抑制し、一方で、IL-13 シグナルの構成因子として杯細胞分化及びムチン産生に關与していることを示唆している。次に IgE 依存性肥満細胞活性化のアレルギー性気道炎症の発症維持における役割を IgE トランスジェニックマウス (TNP-IgE マウス) を用い解析した。TNP-IgE マウスに抗原である TNP-BSA を単回経鼻投与すると 48 時間後をピークとする気道 CD4 陽性 T 細胞浸潤が認められた。しかし好酸球浸潤は認められず、気道過敏性も亢進しなかった。この際抗原特異的 Th2 細胞を TNP-IgE マウスに移入しておく、抗原吸入により気道好酸球浸潤が惹起され、それは TNP-BSA 投与により著明に増強された。これらの結果は、IgE 依存性肥満細胞活性化は、気道への CD4 陽性 T 細胞浸潤を惹起し、それ自体では気道好酸球浸潤を誘導しないが、Th2 細胞の気道局所への動員作用を介して間接的に Th2 細胞依存性好酸球浸潤を増強することを示唆している。さらに肥満細胞の新規サイトカイン IL-25 産生機構を骨髄由来培養肥満細胞 (BMFC) を IgE 受容体を介して抗原刺激し解析した。BMFC を IgE 抗体で感作し抗原刺激すると、1 時間後をピークとする IL-25 産生が認められ、この IL-25 産生はカルシニューリン依存性であった。したがって、IL-25 は非 T 細胞から IL-4, IL-5 産生を惹起することから、肥満細胞が IL-25 産生を介しアレルギー性気道炎症を増強することが示唆される。

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により惹起され、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構及びその制御機構の分子レベルでの解明が必須である。さらに肥満細胞もアレルギー性気道炎症の惹起に重要な役割を果たしていると考えられているがその詳細は不明である。この目的のため、1) IL-12 及び IL-13 シグナルに關与する Tyk2 キナー

ゼによるアレルギー性気道炎症の制御機構、2) 肥満細胞によるアレルギー性気道炎症の増強作用の分子機構、及び3) 肥満細胞が新規サイトカイン IL-25 を産生するか否か、及びその産生機構を明らかにした。

B. 方法

1) Tyk2 キナーゼの Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症における役割：

Tyk2 欠損マウス (または正常マウス) を抗原感作後、抗原吸入により喘息モデルを作成した。それらマウスのアレルギー性気道炎症、粘液産生、気道過敏性、サイトカイン産生を

比較した。さらに Tyk2 欠損 CD4 陽性 T 細胞を SCID マウスに移入し喘息モデルを作成し、アレルギー性気道炎症を解析した。

2) 肥満細胞によるアレルギー性気道炎症の増強作用の分子機構の解析:

アレルギー性気道炎症の発症維持における IgE 依存性肥満細胞活性化の役割を明らかにするため、IgE トランスジェニックマウス (TNP-IgE マウス) に抗原を単回経鼻投与し、気道炎症と気道過敏性を解析した。

3) 肥満細胞の新規サイトカイン IL-25 産生機構の解析:

肥満細胞が非 T 細胞の IL-4, IL-5 産生を誘導する新規サイトカイン IL-25 を産生するか否か、及びその産生機構を骨髓由来培養肥満細胞 (BMMC) を IgE 受容体を介して抗原刺激し解析した。

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規定に従い遂行した。

C. 結果及び考察

1) IL-12 と IL-13 シグナルの下流に位置する Jak キナーゼである Tyk2 のアレルギー性気道炎症への関与について、Tyk2 欠損マウスを用いて解析した。その結果、Tyk2 欠損マウスでは、抗原吸入による気道での Th2 サイトカイン産生が増強し、さらに気道への好酸球及び CD4 陽性 T 細胞浸潤が増強した。すなわち Tyk2 は、Th2 細胞依存性アレルギー性気道炎症に対して抑制性に機能している。そして、この気道好酸球浸潤の増強効果は、Tyk2 欠損 CD4 陽性 T 細胞を SCID マウスに移入しても再現できることより、CD4 陽性 T 細胞における Tyk2 の発現が気道好酸球浸潤の抑制に重要であることが明らかとなった。一方、興味深いことに Tyk2 欠損マウスでは、抗原吸入後の IL-13 産生が増強しているにもかかわらず、杯細胞分化およびムチン遺伝子 Muc5AC の発現が減弱していた。これらの結果は、Tyk2 は IL-12 シグナルの構成因子としてアレルギー性炎症における Th2 細胞活性化を抑制し、一方で、IL-13 シグナルの構成因子として杯細胞分化及びムチン産生に関与していることを示唆している。

2) TNP-IgE マウスに多価抗原である TNP-BSA を単回経鼻投与すると 48 時間後をピークとする気道リンパ球浸潤が認めら、その大

部分は CD4 陽性 T 細胞であった。しかし好酸球浸潤は、ほとんど認められず、気道過敏性も亢進しなかった。また気道局所での有意なサイトカイン産生も認められなかった。この CD4 陽性 T 細胞浸潤は COX 阻害薬で抑制されることから PG 産生を介して惹起されることが示唆される。さらに抗原特異的 Th2 細胞を TNP-IgE マウスに移入しておく、抗原吸入により気道好酸球浸潤が惹起され、それは TNP-BSA 投与により著明に増強された。これらの結果は、IgE 依存性肥満細胞活性化は、気道への CD4 陽性 T 細胞浸潤を惹起し、それ自体では気道好酸球浸潤を誘導しないが、Th2 細胞の気道局所への動員作用を介して間接的に Th2 細胞依存性好酸球浸潤を増強することを示唆している。

3) IgE 刺激により肥満細胞が IL-25 を産生することが明らかとなった。すなわち、BMMC を IgE 抗体で感作し抗原刺激すると、1 時間後をピークとする IL-25 産生が認められた。その産生量は Th2 細胞のそれと同等であった。さらにこの IL-25 産生はカルシニューリン依存性であった。したがって、IL-25 は非 T 細胞から IL-4, IL-5 産生を惹起することから、肥満細胞が IL-25 産生を介しアレルギー性気道炎症を増強することが示唆される。

D. 結論

本研究により、Tyk2 キナーゼは Th2 細胞活性化とアレルギー性気道炎症を抑制し、一方で、杯細胞分化及びムチン産生を増強することが明らかにされた。さらに肥満細胞は PG 産生を介して気道へ CD4 陽性 T 細胞を動員し、IL-25 産生を介してアレルギー性気道炎症を増強することにより、重症化に関与することが明らかにされた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Seto Y, Nakajima H, Suto A, Shimoda K, Saito Y, Nakayama K, Iwamoto I. Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice. *J. Immunol.* 2003; 170: 1077-1083.
2. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I. Mast cells

produce interleukin-25 upon FcεRI-mediated activation. *Blood* 2003; in press.

3. Suzuki K, Nakajima H, Kagami S, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Hiwasa T, Takeda K, Saito Y, Akira S, Iwamoto I. Proteolytic processing of Stat6 signaling in mast cells as a negative regulatory mechanism. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 27-38.

4. Suto A, Nakajima H, Ikeda K, Kubo S, Nakayama T, Taniguchi M, Saito Y, Iwamoto I. CD4+ CD25+ T cell development is regulated by at least two distinct mechanisms. *Blood* 2002; 99: 555-560.

5. Suto A, Nakajima H, Hirose K, Suzuki K, Kagami S, Seto Y, Hoshimoto A, Saito Y, Foster DC, Iwamoto I. Interleukin-21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germline Cε transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood* 2002; 100: 4565-4573.

2. 学会発表

1. 前沢裕子、熊野浩太郎、中島裕史、久保秀一、鳥山一、岩本逸夫。抗原誘発気道炎症細胞浸潤におけるマスト細胞の役割。第15回アレルギー好酸球研究会。

2. 岩本逸夫。喘息の病因解明に対する分子生物学的アプローチ。第52回アレルギー学会総会。

3. 池田啓、鈴木浩太郎、中島裕史、岩本逸夫、齋藤康。Stat6による肥満細胞TNF-α産生の抑制。第52回アレルギー学会総会。

4. 瀬戸洋平、中島裕史、須藤明、岩本逸夫、齋藤康、下田和哉、中山敬一。抗原誘発気道アレルギー性炎症におけるTyk2の役割。第52回アレルギー学会総会。

5. 高取宏昌、広瀬晃一、中島裕史、加々美新一郎、須藤明、鈴木浩太郎、岩本逸夫、齋藤康。Th2細胞分化におけるStat5aの役割。第52回アレルギー学会総会。

6. 須藤明、中島裕史、広瀬晃一、鈴木浩太郎、岩本逸夫、齋藤康。IL-21はgermline Cε transcriptionを抑制することによりIgE産生を抑制する。第32回日本免疫学会総会。

7. 鈴木浩太郎、中島裕史、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32回日本免疫学会総会。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

重症喘息の気道炎症及び気道リモデリングの成因の解析

分担研究者 福田 健 (獨協医科大学 呼吸器・アレルギー内科)

研究要旨

微量抗原吸入による Th2 型気道炎症の誘導・維持、および、慢性 Th2 型気道炎症の結果生じる気道リモデリングは喘息重症化要因の1つと考えられる。本研究は、これらの機序解明を目的として、PGD₂ 前処置が感作マウスの低用量抗原吸入惹起気道反応に与える影響、および、TGF- β シグナルの細胞内伝達分子、リン酸化 Smad2、Smad7 の喘息患者気道粘膜における発現強度と上皮線維増生層の厚さの関係を検討した。

それ自体では Th2 型気道炎症を惹起しない低用量 卵白アルブミン (OVA) の吸入負荷 2 4 時間前に PGD₂ を吸入させておくと、至適用量 OVA 吸入時と同程度の Th2 型気道炎症が誘導された。その機序として、PGD₂ 単独吸入では炎症細胞数増加がなかったこと、PGD₂ は OVA 刺激マウス T 細胞の IL-4、IL-5 産生に有意な影響を与えなかったこと、PGD₂ 吸入後低用量 OVA 負荷マウスでは気道上皮において MDC 発現がみられたことから、上皮から遊離された MDC の作用で Th2 細胞が動員され、その結果、Th2 型気道炎症が顕性になったと考えられた。

気管支粘膜におけるリン酸化 Smad2 の発現は正常人に比し喘息患者の方が有意に強く、その発現度合いと上皮線維増生層の厚さとの間には有意な正相関が認められた。逆に Smad7 は軽症例ほど発現しておりその発現強度は上皮線維増生層の厚さと負の相関を示した。これらのことから、上皮線維増生には TGF- β シグナルの活性化が関与すること、Smad7 分子はそれに対して拮抗的に作用し気道リモデリング抑制方向に働くことが示唆された。

以上の結果より、PGD₂ と Smad2、Smad7 は喘息治療薬開発の1つのターゲットになると考えられる。

A. 研究目的

本研究は、1) 喘息を重症化させる要因の1つと考えられる、微量抗原の吸入でアレルギー性炎症が起こるメカニズム、2) 不可逆性気道閉塞の原因となる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た。プロスタグランジン D₂ (PGD₂) は肥満細胞由来の化学伝達物質で、これまでは、喘息発作時における気道攣縮、粘膜浮腫において重要な役割を演じると考えられてきた。しかし、最近、PGD₂ 受容体ノックアウトマウスを用いて作製した喘息モデルでは、抗原を吸入さ

せても好酸球、リンパ球浸潤が殆ど起こらないことが報告され、PGD₂ の Th2 型気道炎症での役割が注目され始めている。私共は、PGD₂ は微量抗原吸入による不顕性のアレルギー性気道炎症を顕性化させるのではないかと考えた。一方、気道リモデリングの1つである上皮線維増生に関与するサイトカイン、TGF- β のシグナル伝達はリン酸化 Smad2 などの正の伝達分子と Smad7 の負の伝達分子によって巧妙に調節されていることが最近明らかになってきた。そこで私共は、個々の喘息患者の上皮線維増生の程度は、この正

と負の伝達分子の発現の強さによって決定される可能性があると考えた。

B. 研究方法

1) PGD₂ による前処置が感作マウスの低用量抗原吸入チャレンジに対する気道反応に与える影響の検討：卵白アルブミン (OVA) で感作した BALB/c マウスに、PGD₂ (10⁻³ M) ないし生食水を吸入させ、その 24 時間後に、それ自体では明らかな Th2 型気道反応を惹起しない低用量 OVA (0.1%) の吸入負荷を行った。その後起こる気道炎症の強さを気管支肺胞洗滌 (BAL) 液中の炎症細胞数、IL-2、IL-4、IL-5、IFN- γ 濃度で評価し、至適用量 OVA (1%) 負荷を行ったマウスの気道炎症の強さと比較した。また、PGD₂ のヒト気道上皮細胞に対する作用、OVA 刺激マウス T 細胞の IL-4、IL-5 産生に対する作用を試験管内で検討した。

2) 喘息患者気道粘膜におけるリン酸化 Smad2、Smad7 の発現強度と上皮下線維増生層の厚さの関係の検討：軽症～重症喘息患者 40 名、正常者 6 名から生検にて採取した気管支粘膜組織における Smad2 のリン酸化状態、Smad7 の発現を免疫染色法にて評価し、その強さと上皮下線維増生層の厚さの関係を調べた。さらに、ヒト気道上皮細胞 (BEAS2B) の TGF- β 刺激転写反応において Smad7 が果たす役割についても検討した。細胞および T 細胞に対する PGD₂ の直接作用を試験管内で検討した。

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、個人情報の保護、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。

C. 研究結果

1) それ自体では明らかな Th2 型気道炎症を惹起しない低用量 OVA の吸入負荷 24 時間前に PGD₂ を吸入させると、BAL 中炎症細胞数、IL-5 サイトカイン濃度は至適用量 OVA 吸入時のそれと同程度の Th2 型気道炎症が誘導された。PGD₂ 単独吸入マウスでは炎症細胞数の増加は認められなかった。OVA 刺激マウス T 細胞による IL-4、IL-5 産生は PGD₂ による有意な影響を受けなかった。PGD₂ を吸入した後に低用量の OVA を吸入したマウスでは気道上皮において Th2 細胞特異的遊走ケモカイン、MDC の著明な発現が認められた。抗 MDC 抗体による前処置によって PGD₂ の Th2 型気道炎症促進作用は失われた。

2) 気道上皮細胞におけるリン酸化 Smad2 の発現は正常人に比し喘息患者の方が有意に強かった。喘息群ではリン酸化 Smad2 は重症例ほど強く発現し上皮下線維増生層の厚さとの間に有意な正相関が認められた。反対に Smad7 は軽症例ほど発現しておりその発現の強度は上皮下線維増生層の厚さと負の相関を示した。また、BEAS2B 細胞においてアンチセンス・オリゴニュークレオチドを用いて Smad7 発現を欠損させると、TGF- β 刺激転写反応は促進され、逆にアデノウィルスベクターを用いて Smad7 cDNA を移入し Smad7 を過剰発現させると TGF- β 刺激転写反応は著しく抑制された。

D. 考察

PGD₂ の前吸入により、本来不顕性である低用量 OVA 吸入による Th2 型気道炎症が、至適用量 OVA 吸入時と同程度の Th2

型気道炎症になった。その機序として、PGD₂ が好酸球、リンパ球遊走因子である可能性、T 細胞の Th2 型サイトカイン産生が高められた可能性が考えられたが、PGD₂ 単独吸入では炎症細胞数増加がなく、OVA 刺激マウス T 細胞の IL-4、IL-5 産生も PGD₂ によって有意な影響を受けなかったことから、これらの可能性は否定的された。PGD₂ 吸入後低用量 OVA 負荷マウスでは、気道上皮において著明な MDC 発現がみられたことから、上皮から遊離された MDC の作用で Th2 細胞が動員され、その結果、Th2 型気道炎症が顕性になったと考えられた。

また、喘息患者の気管支粘膜生検組織におけるリン酸化 Smad2、Smad7 発現の解析からは、上皮下線維増生には TGF-β シグナルの活性化、特に Smad2 のリン酸化が関与すること、Smad7 分子はそれに対して拮抗的に作用し喘息における気道リモデリングを抑制する方向に働くことが示唆された。

E. 結論

PGD₂ は、気道上皮による MDC 産生を介して Th2 細胞を気道粘膜に動員し、その Th2 細胞が産生、遊離する IL-4 や IL-5 などのサイトカインの作用によって好酸球、リンパ球浸潤を特徴とする Th2 型気道炎症が増強されるので、抗 PGD₂ 薬は喘息慢性化の抑制において有用である可能性がある。また、気道リモデリングの1つである上皮下線維増生の程度は TGF-β シグナル伝達因子の発現強度によって調節されている可能性があるため、リモデリング治療薬開発の1つのターゲットになる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda K, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Arima M, Eukuda T. Prostaglandin D₂ augments low-dose antigen-induced Th2 type airway inflammation in mice. Dokkyo J Med Sci. 2003; in press.
2. Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Eukuda T, Nakao A. Activation of TGF-β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2002; 110:249-254.
3. Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Eukuda T. Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in patients with asthma. J Allergy Clin Immunol. 2002; 110:873-878.
4. 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 Med. 2002; 166:409-416.

2. 学会発表

1. Honda K, Arima M, Cheng G, Eda F, Hirata H, Fukushima F, Eukuda T. The role of prostaglandin D₂ in the pathogenesis of asthma. American Thoracic Society 2002 International Conference, Atlanta, May, 2002.
2. Sgara H, Nakao A, Okada T, Chibana N, Ota M, Ra C, Eukuda T. Expression of Smad7 in the airway of asthmatics correlates with disease severity and airway wall thickness. American Thoracic Society 2002 International Conference, Atlanta, May, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

CpGモチーフによるTh2反応の制御に関する研究

分担研究者 田村 弦 東北大学医学部附属病院感染症・呼吸器内科講師

研究要旨 CpGモチーフは細菌やウイルスの遺伝子に特有のオリゴ DNA であり、強力に免疫系を刺激し Th1 誘導能を持つことが報告されており、様々な疾患への応用が期待されている。我々はマウスの気管支喘息モデルに CpGDNA を投与しアレルギー性炎症に対する効果を検討した。CpGDNA は強力な免疫応答を誘導する結果、有害作用をしめすことより、投与方法の効率化を図り工夫を試みた。その結果、CpGDNA を抗原と直接結合するという新しい方法を導入することによって、その効果が著しく増強することを発見した。今回の研究により、CpG-アレルギー結合体は将来有望な抗アレルギーDNA ワクチン療法となる可能性が示唆された。

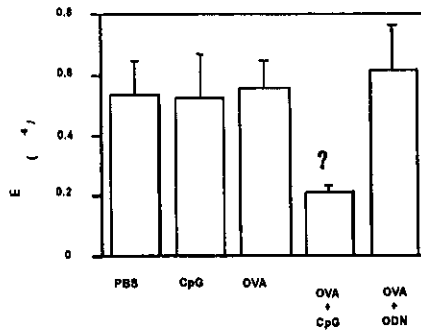
A. 研究目的

CpGモチーフは細菌やウイルスの遺伝子に特有のオリゴ DNA であり、特定の 6 塩基で構成されるパルンドローム構造 (5'- purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3') を有する。哺乳類の免疫システムはこの CpGモチーフを認識することで細菌が生体に進入してきた危険信号と捉え、感染に対する防衛機構を活性化させると考えられている。CpGモチーフを含む DNA (CpGDNA) は B 細胞を増殖・活性化させ、IL-6 や抗体産生を誘導し、NK 細胞の IFN- γ 産生とキラー活性を増強させる。また、マクロファージや樹状細胞を活性化させ、IL-12 や TNF- α を産生し、Th1 細胞を分化誘導することが報告されている。一方、CpGDNA は大量投与により有害な炎症反応を惹起し、致命的なトキシックショックを起こすこと、気道内や関節腔内に投与すると肺炎や関節炎を引き起こすことより、CpGDNA は細菌やウイルスの構成要素のなかで LPS と同様に有害な炎症を引き起こす主要なコンポーネントでもある。そこで、マウスの気管支喘息モデルに CpGDNA を投与し、アレルギー性炎症に対する CpGDNA によるワクチン療法の可能性を研究した。

B. 研究方法と結果

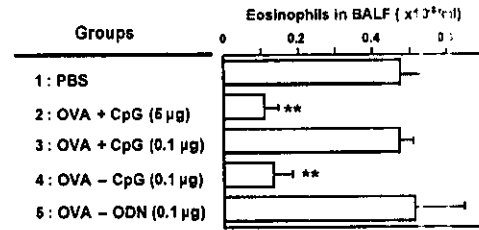
1. CpG と抗原の気道内前投与による好酸球性炎症の抑制

OVA で感作したマウスに OVA、DNA、もしくは 2 つ同時に 2 日連続で気道内前投与し、6 日後に OVA チャレンジした。前投与される OVA はブースト効果がみられない量の抗原を使用した。下図に示すように、コントロール群である PBS の前投与と比較し、CpG や OVA のみを前投与した群では好酸球性炎症に影響はみられなかった。しかし、その影響のみられない量の OVA と CpG を同時に前投与した群では好酸球数が有意に抑制された。また、OVA と CpG を同時に前投与した群では総白血球数も有意な抑制が認められたが、好中球数やリンパ球数、単核球 (マクロファージと単球) 数においては差が認められなかった。したがって、抗原と CpG を含む DNA を同時に投与した場合にのみ、引き続き抗原チャレンジによる好酸球性気道炎症の抑制を認めた。



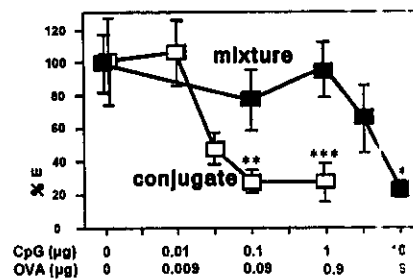
2. CpG-OVA 結合体による好酸球性炎症の抑制

CpG による好酸球性炎症抑制は抗原との同時投与が重要であり、抗原特異的な抑制が考えられたため、CpG と OVA を化学的に結合させ、実験を行った。右上の図に示すようにコントロール群と比べ、前の結果と同様に CpG 5 μ g と OVA の同時投与群では好酸球性炎症が抑制されたが、CpG 0.1 μ g と OVA の同時投与では抑制されなかった。しかし、その抑制しない量の CpG 0.1 μ g と OVA を結合体の形で投与すると好酸球性炎症が抑制された。CpG を含まないコントロールの DNA と OVA の結合体は抑制しなかった。尚、好中球数、リンパ球数、単核球数においては差が認められなかった。したがって、CpG と抗原を結合させると、同時投与に比べ 50 倍少ない量の CpG で好酸球性炎症を抑制することが示された。この CpG-OVA 結合体投与の抑制は少なくとも 8 週間持続することを確認した。



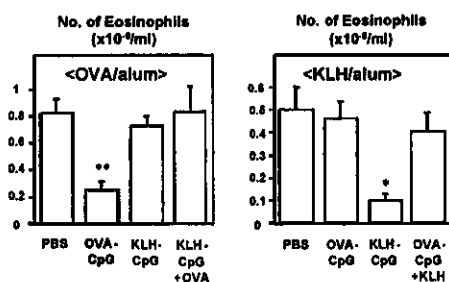
3. CpG と OVA の同時投与と結合体投与の効力比較

CpG と OVA の同時投与と CpG-OVA 結合体投与の抑制効果を比較するため、下図に示すように抑制効果用量依存性に検討した。結合体と同時投与の実験は別々に行われたため、各々の PBS 前投与群を 100% として結果を表示した。CpG-OVA の前投与では、CpG が 0.03 μ g で抑制する傾向を示し、0.1 μ g で有意に抑制した。しかし、それに相当する CpG と OVA の同時投与では、抑制を示さず CpG 10 μ g で抑制した。以上の結果より、CpG-OVA 結合体は同時投与に比べ、100 倍少ない CpG 量で好酸球性炎症を抑制することが示された。



尚、0.1 μ g の CpG-OVA 結合体の前投与により好酸球性炎症の抑制が認められることより、以下の実験は全てこの量で行われた。

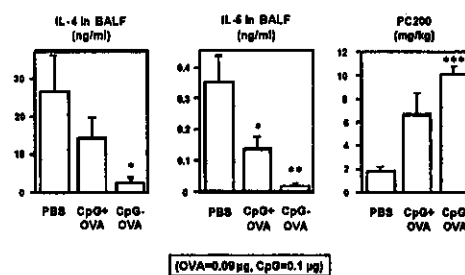
4. CpG 抗原結合体による抗原特異的な抑制
 CpG 抗原結合体による抗原特異性を調べるために OVA と同様の重量比で別の抗原である KLH と CpG を結合させて実験を行った。下図に示すように、OVA で感作し、OVA チャレンジしたマウスでは CpG-OVA の前投与で好酸球数が抑制されたが、別の抗原である CpG-KLH の前投与では抑制されなかった。さらに、CpG-KLH に OVA を同時に前投与しても抑制されなかった。逆に KLH で感作し、KLH チャレンジしたマウスでは CpG-OVA の前投与では抑制されず、CpG-KLH の前投与で好酸球数が抑制された。以上より、CpG 抗原結合体による好酸球性炎症の抑制効果は抗原特異的であることが確認された。また、別の抗原との結合体と抗原を同時に投与しても抑制は認められないことより、CpG と抗原を結合体とすることにより非特異的に CpG の効果が増強するのではないことが明らかとなった。



5. BALF 中 Th2 サイトカインの抑制と気道過敏性の改善

OVA で感作したマウスに PBS、CpG (0.1 μg) と OVA の同時、もしくは結合体を投与した後、OVA チャレンジし 24 時間後に BALF 中のサイトカインを測定した。下図に示すように、CpG-OVA 前投与群はコントロールと比較し IL-4 と IL-5 を有意に抑制した。また、

好酸球性炎症を抑制できない量の CpG と OVA の同時投与は BALF 中 Th2 サイトカインを軽度抑制する傾向があった。さらに、マウスの気道抵抗を測定し、メサコリンに対する気道反応性への影響を検討した。CpG-OVA 前投与は PC200 を有意に改善させた。また、CpG と OVA の同時投与は気道反応性の亢進を改善させる傾向にはあったが有意ではなかった。



(倫理面への配慮)

いずれの実験も全て「東北大学における動物実験に関する指針」に基づいて、実施された。

D. 考察

マウスを用いた研究により、CD4 陽性ヘルパー T 細胞には産生するサイトカインのパターンによりいくつかのサブタイプが存在することが知られている。代表的なものは Th1 細胞と Th2 細胞があり、これらは前駆細胞となるナイーブ T 細胞から樹状細胞により抗原提示され、分化誘導される。Th1 細胞は IFN-γ を産生し、細胞性免疫に関与し、細菌やウイルスの感染防御に重要な役割を果たす。一方、Th2 細胞は IL-4、IL-5、および IL-13 を産生し、抗体産生等の液性免疫に関与し、寄生虫の感染防御に重要であると考えられている。アレルギー性炎症は正常な免疫反応と本質的に何ら変わりはなく、アレルゲンに反応する Th2

細胞の過剰な、あるいは不適当な反応が原因と理解されている。Th1 細胞と Th2 細胞は抑制する関係にあり、互いに調節しあいながら生態防御システムを形成していることが知られている。そして、両者のバランスの破綻と Th2 細胞優位の状態がアレルギー性炎症の基本的骨格と考えられる。したがって、アレルギーに反応する Th2 細胞のみを抑制する免疫療法がアレルギー疾患に対する理想的な治療となる。

近年、CpGDNA は強力に免疫系を刺激し Th1 誘導能を持つことが報告されており、様々な疾患への応用が期待されている。我々はマウスの気管支喘息モデルに CpGDNA を投与しアレルギー性炎症に対する効果を検討した。CpGDNA は強力な免疫応答を誘導する結果、有害作用をしめすことより、投与方法の効率化を図り工夫を試みた。そして、CpGDNA を抗原と直接結合するという新しい方法を導入することによって、その効果が著しく増強することを発見した。今後は、その背景となる機序を今後さらに研究することが必要である。

E. 結論

CpG-アレルギー結合体は将来有望な抗アレルギー-DNA ワクチン療法とな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

1) Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Tamura G. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by

elaborating IL-12. J Immunol. 2002; 169:787-94.
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. 2001; 167: 66-74.

2. 学会発表

1) 第52回日本アレルギー学会総会・シンポジウム「アレルギー学会関連学会トピックス」演題「アレルギーのための DNA ワクチン」

2) 第30回箱根呼吸討論会。

講演「CpGモチーフによる Th2 反応の抑制」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

なし。

2) 実用新案登録

なし。

3) その他

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長）

研究協力者：釣木澤尚実、斉藤博士、冨田君子、東 愛、橋本直方、森田園子、谷口正実、

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 は喘息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 は重症喘息が多いといわれているが、喘息の臨床像については不明な点が多い。今回、我々は血管炎発症前の検査成績が得られた CSS について末梢血好酸球数と気道過敏性について解析し、CSS と一般の重症喘息における喘息の臨床像に差違があるのかどうかについて検討した。また前年度の本研究では活性化好酸球のマーカーである CD69+CD9+陽性細胞数が重症喘息および CSS 発症時に著明に増加することを報告し、今回、血管炎発症前から CD69+CD9+、CD69+CD4+の経過を追跡し得た3症例についても解析した。結果、CSS は喘息初診時から重症であり、末梢血好酸球数は一般喘息と比較してより高値であるが一般の重症喘息では重症度に応じて気道過敏性は亢進するのに対し CSS のアセチルコリン気道過敏性はむしろ軽度であった。また CSS 発症前から CD69+CD9+の経過を追跡できた症例はいずれも血管炎発症前から CD69+CD9+が一般喘息と比較して高値であり、CD69+CD9+陽性細胞数は全身性の血管炎発症前の出現直前から好酸球増多に先行し、CSS 発症時に著明に増加した。以上のことから CSS の喘息は気管支攣縮よりも好酸球性炎症をより強く反映している可能性が考えられた。また CSS 発症前、発症時の経過の指標には好酸球の活性化マーカーである CD69+CD9+が有用であることが示唆された。今回の結果から、一般の重症喘息と CSS を発症しうる喘息は異なり将来、CSS を発症しうる喘息症例を予測できる可能性があると考えられる。

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。しかし、血管炎発症前の病態については不明な点が多い。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。かつては喘息治療の LT 拮抗薬と CSS 発症についての報告が散見されたが、数々の case report より LT 拮抗薬が直接 CSS 発症の trigger になっているのではなく LT 拮抗薬が効果的である重症喘息が経口ステロイドを減量、中止することで潜在化していた CSS の血管炎症状、好酸球増多が出現すると考えられている。最近の疫学研究では LT 拮抗薬を使用している喘息患者における CSS 発症の頻度と LT 拮抗薬を使用していない喘息患者における CSS の発症頻度はほぼ同数であるとの見解が出され、CSS 発症との直接の因果関係は否定されつつある。CSS は重症喘息に発症するといわれているがどのような重症喘息なのかについてはまだ知られていない。今回、我々は血管炎発症前の検査成績が得られた CSS について末梢血好酸球数と気道過敏性について解析し、CSS と一般の重症喘息における喘息の臨床像に差違があるのかどうかについて検討した。また活性化好酸球や T 細胞 (CD4+, CD8+) の指標として CD69 抗原や CD25 抗原の発現が報告されており、前年度の本研究で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

(CD69+CD9+) が認められることを明らかにし、かつ CSS 発症時には末梢血の CD69+CD9+陽性細胞数、CD69+CD4+陽性細胞数が著増することを明らかにした。今回、血管炎発症前から CD69+CD9+、CD69+CD4+の経過を追跡し得た3症例についても解析した。

B. 研究方法

1. 気道過敏性測定。

アセチルコリン気道過敏性測定を標準法を用いて行った。Ach 156 μ g/ml から 20000 μ g/ml まで 2 倍希釈系列を作成しスパイログラムを用いて FEV1 を測定し、負荷前の FEV1 の 80%以下に低下するアセチルコリンの濃度を AchPC₂₀ (μ g/ml) として計算した。

2. 末梢血好酸球およびリンパ球の解析。

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、単核球を 20 μ g/10⁶ 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℃で 5 分間 430 g 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。以

下、好酸球および T 細胞の活性化マーカーとして CD69 抗原の発現をそれぞれ CD9+CD69+, CD4+CD69+, CD8+CD69+ とし FITC, PE 標識で FACS 解析した。

喘息の重症度分類はガイドライン (JGL'98) に準拠し、吸入ステロイド使用量を BDP 換算で Step 1 (BDP < 200 μ g), Step 2 (BDP \geq 200 μ g), Step 3 (BDP \geq 400 μ g), Step 4 (BDP \geq 800 μ 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 群に分類した。

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、個人情報の保護、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。

C. 研究結果

1. 喘息臨床像および気道過敏性。CSS 発症前の喘息重症度は 93% が Step 4 の重症喘息であった。また一般喘息では重症度に比例して AchPC₂₀ は低下したが、発症前 CSS は AchPC₂₀ が高値でありアセチルコリン気道過敏性は軽度であった。

2. 一般喘息では重症度にかかわらず、初診時の末梢血好酸球数には有意差を認めないが、CSS 発症前の喘息初診時の末梢血好酸球数は 18.8% と喘息群の 7.7% と比較して有意に高値であった。CD9+CD69+陽性細胞数は喘息重症度に応じて増加し CSS 発症時には著明に増加した。

3. さらに CD69+CD9+, CD69+CD4+ の経過を CSS 発症前から追跡し得た 3 症例では初診時から喘息が重症であり、末梢血好酸球数、CD69+CD9+, CD69+CD4+ が一般の重症喘息と比較して高値であり CSS 発症時にはさらに増加した。

D. 考察

CSS の血管炎発症前の喘息期の状態については重症喘息が圧倒的に多い。しかしながら一般の重症喘息では重症度に応じて気道過敏性は亢進するのに対し CSS のアセチルコリン気道過敏性はむしろ軽度であった。また喘息初診時の末梢血好酸球数は一般喘息と比較してより高値であり喘息期から強い好酸球性炎症の存在を伺わせた。このことから CSS の喘息は CSS と独立して存在するのではなく、むしろ血管炎の一症状である可能性も考えられた。前年度の本研究でも明らかとなったことであるが、末梢血の好酸球性炎症のマーカーと

しては好酸球数よりも CD69+CD9+陽性細胞数がより有用であり、喘息重症度に応じて増加し、CSS 発症時には著明に増加した。今回、喘息初診時から CSS 発症時まで CD69+CD9+の経過を追跡できた症例はまだ 3 例と少ないが、いずれも血管炎発症前から CD69+CD9+が一般喘息と比較して高値であり、全身性の血管炎症状の出現直前から好酸球増多に先行し CSS 発症時に著明に増加したことを考えると CSS 発症に際しては好酸球数よりも鋭敏なマーカーであると考えられる。以上の結果から今後、重症喘息の中で CSS を発症しうる喘息症例を予測できる可能性があると考えられる。

E. 結論

CSS は重症喘息が多いが、喘息初診時より末梢血好酸球数が多く、アセチルコリン気道過敏性は一般の重症喘息と比較して軽度であり喘息が血管炎の一症状であると考えられる。また、CSS 発症前、発症時の経過の指標には好酸球の活性化マーカーである CD69+CD9+が有用であることが示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsurikisawa N, Taniguchi M, Suzuki S, Akiyama K. Effects of a nitro compound patch on neuropathy in Churg-Strauss syndrome. *Allergy*. 2003. in press.

2. Kawagishi Y, Mita H, Taniguchi M, Maruyama M, Oosaki M, Higashi N, Kashii T, Kobayashi M, Akiyama K. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:936-942.

3. Higashi N, Taniguchi M, Mita H, Osame M, Akiyama K. A comparative study of eicosanoid concentration in sputum and urine in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1484-1490.

2. 学会発表

1. 鈴木尚実、齊藤博士、富田君子、東 愛、橋本直方、水城まさみ、大友 守、森 晶夫、前田裕二、谷口正実、秋山一男. Churg-Strauss syndrome (CSS) の病態：血管炎発症前の気道過敏性と活性化好酸球のマーカー-CD69 の検討. 第 52 回日本アレルギー学会総会、横浜 2002. 11. 30.

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. Seto Y, Nakajima H, Suto A, Shimoda K, Saito Y, Nakayama K, Iwamoto I. Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice. *J. Immunol.* 2003; 170: 1077-1083.
2. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I. Mast cells produce interleukin-25 upon FcεRI-mediated activation. *Blood* 2003; in press.
3. Suzuki K, Nakajima H, Kagami S, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Hiwasa T, Takeda K, Saito Y, Akira S, Iwamoto I. Proteolytic processing of Stat6 signaling in mast cells as a negative regulatory mechanism. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 27-38.
4. Suto A, Nakajima H, Ikeda K, Kubo S, Nakayama T, Taniguchi M, Saito Y, Iwamoto I. CD4⁺ CD25⁺ T cell development is regulated by at least two distinct mechanisms. *Blood* 2002; 99: 555-560.
5. Suto A, Nakajima H, Hirose K, Suzuki K, Kagami S, Seto Y, Hoshimoto A, Saito Y, Foster DC, Iwamoto I. Interleukin-21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germline Cε transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood* 2002; 100: 4565-4573.
6. Honda K, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D2 augments low-dose antigen-induced Th2 type airway inflammation in mice. *Dokkyo J Med Sci.* 2003; in press.
7. Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF-β/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110:249-254.
8. Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Fukuda T. Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110:873-878.
9. 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 Med.* 2002; 166:409-416.
10. Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Tamura G. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J Immunol.* 2002; 169:787-94.
11. 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.* 2001; 167: 66-74.
12. Tsurikisawa N, Taniguchi M, Suzuki S, Akiyama K. Effects of a nitro compound patch on neuropathy in Churg-Strauss syndrome. *Allergy.* 2003; in press.
13. Kawagishi Y, Mita H, Taniguchi M, Maruyama M, Oosaki M, Higashi N, Kashii T, Kobayashi M, Akiyama K. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:936-942.
14. Higashi N, Taniguchi M, Mita H, Osame M, Akiyama K. A comparative study of eicosanoid concentration in sputum and urine in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1484-1490.