

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

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(H12-免疫-005)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 晶夫

平成15(2003)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	6
森 晶夫	
2. 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	14
柳原行義	
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	17
相沢久道	
4. 好酸球性炎症成立機序の解明に関する研究 :ヒスタミンによる好酸球遊走とその機序について	20
藤澤隆夫	
5. 成人難治性喘息の病態・機序、細胞要因	24
庄司俊輔	
6. 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	27
高橋 清	
7. 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	32
赤坂 徹	
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—	34
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院長) 赤坂 徹 (国立療養所八戸病院院長)
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臨床研究部長)
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)
宗田 良 (国立療養所南岡山病院副院長) 谷本 安 (岡山大学第2内科助手)
岡田千春 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医長) 金廣有彦 (岡山大学第2内科助手)
木村五郎 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医師) 坂口 基 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医師)
増田 敬 (国立療養所盛岡病院アレルギー科医長) 和田博泰 (国立療養所盛岡病院副院長)
黒沼忠由樹 (国立療養所若木病院小児科医長) 白崎和也 (国立療養所秋田病院小児科医長)
西原麻千子 (九州工業大学大学院生命体工学研究科) 岡元孝二 (九州工業大学大学院生命体工学研究科)
井上博雅 (九州大学医学研究院胸部疾患研究施設講師) 木部敦子 (九州大学医学研究院胸部疾患研究施設)
古賀丈晴 (久留米大学医学部第一内科講師) 木下祐一 (久留米大学医学部第一内科)
山本ひとみ (国立相模原病院臨床研究センター) 梶原景一 (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) 三田晴久 (国立相模原病院臨床研究センター)
平島光臣 (香川医科大学免疫病理学教授) 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)
羅 智靖 (日本大学医学部教授) 太田康男 (東京大学医学部付属病院感染内科助手)
山下直美 (帝京大学医学部内科助教授) 石井 彰 (東京大学医学部付属病院呼吸器内科助手)
上原蒼志夫 (東京大学保健管理センター助教授) 越野 健 (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)
山本寿子 (帝京大学医学部内科研究生) 中島幹夫 (帝京大学医学部内科助手)

研究要旨

難治性喘息に関与する抗原、免疫応答、好酸球浸潤、リモデリング、合併症、遺伝子多型の諸要因を解析した結果、1) T細胞レベルのステロイド感受性低下(抵抗性)にはcostimulatory signal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) IL-13気管内投与喘息モデルの気道過敏性、粘液産生反応はステロイド抵抗性であること(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、およびIL-5産生試験が起因抗原診断法となりうること(森、高橋)、5) $\gamma\delta$ T細胞の機能低下が気道炎症やAHRを悪化させること(高橋)、6) 好酸球がH4受容体を発現し、ヒスタミンがH4受容体を介してGi依存性に好酸球の遊走を引き起こすこと(藤澤)、7) 新生血管内皮細胞により気管支平滑筋細胞遊走因子が産生されること(庄司)、8) 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(大田)、9) 成人難治性喘息ではエオタキシンおよびTARCの血漿中濃度が有意に高く、気道炎症の状態を反映していること(大田)、が明らかになった。加えて、10) 反復入院、長期入院につき検討し、小児喘息の難治化要因が確認された。難治性喘息には複数の要因が関与することが本研究班のこれまでの成果からも明らかにな

っているが、さらに、免疫応答、炎症、組織の改築をターゲットとすることで、難治化予防策につながる多くのシードが得られた。

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、未だ満足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がもたらされるものと考えられる。1、2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、IL-13遺伝子多型と重症喘息との関連が指摘されたので、本年度はこれらの免疫応答のターゲットとなる抗原の診断法を検討した。また、気道におけるIL-13の生理作用につき解析した。相沢らはIL-13の気道炎症、過敏性における*in vivo*の役割について解析した。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ゲンの関与を明らかにし、難治性喘息がリンパ球活性化のレベルで2型に分けられることを見出したので、本年度はアポトーシス関連分子と難治化につき解析した。藤沢らは、*in vivo*のオリエンテーションを再現した好酸球動態解析システムを確立し、重症喘息のホールマークである好酸球浸潤機構を新たな観点から解析した。b) の観点からは、庄司らは気道リモデリングに関与する線維芽細胞、平滑筋細胞に対するcollagenサブタイプの役割の差異を見いだしたが、さらに血管新生、内皮細胞につき解析した。大田らは、約10種の喘息候補遺伝子について寛解との関連を明らかにしたので、さらに過敏性、難治化につき解析した。赤坂、藤沢らは、小児喘息における難治性を規定する要因を解明するため、頻回、長期、反復入院児に関する調査を行った。

B. 方法

1、2年目に行った調査の結果、経口ステロイド薬の常用量で難治性を規定する考え方が国内の専門医に概ね支持されていたので、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）らは今日の難治性喘息臨床像を把握する目的で、研究班員の施設を中心に症例調査を実施した。また、2) 気道炎症に必須のサイトカインIL-5の産生を指標とする遅発型喘息反応誘導抗原診断法を樹立し、Tリンパ球機能異常と喘息の関連につき解析した。
- 3) 柳原（国立相模原病院）らは、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IL-13遺伝子プロモーター領域の-1112C/T多型が、難治化に関連する因子であることを明らかにしたので、特にIL-13の気管支平滑筋に対する作用を解析した。加えて、T細胞のgalectin-9産生を解析した。
- 4) 相沢（久留米大学）らは、リコンビナントIL-13をマウスに気管内投与し、気道過敏性、炎症細胞浸潤、病理組織を解析した。また、難治化の観点から、デキサメサゾンの抑制効果につき検討した。
- 5) 藤沢（国療三重病院）らは、好酸球組織浸潤を*in vivo*を反映した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、古典的メディエータのヒスタミンの好酸球活性化における役割を解析した。
- 6) 庄司（国療南福岡病院）らは、組織リモデリングの課程で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、さらに肺血管内皮細胞、平滑筋細胞の培養上清中に存在する気管支平滑筋細胞遊走活性につき解析した。
- 7) 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。
- 8) 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FceRI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。
- 9) 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) 難治性喘息の症例調査から、発症から難治化にいたる期間が 1~2 年以内と短期間のグループと 10 年以上の長期間のグループとの 2 群に大別されることが明らかになった。長期間持続した炎症の結果としてのリモデリングによる難治化以外に、そもそも発症した時点で異なる要因が存在する可能性がある。
- 2) また、難治性喘息の大部分は非アトピー型に分類されることがわかったが、T 細胞 IL-5 産生を指標にすることで、非 IgE 依存性喘息反応の原因抗原が *in vitro* で診断しうることを明らかにした。非アトピー型喘息症例においても、アトピー型喘息と同様に、末梢血 CD4⁺ T 細胞の IL-5 産生が健常者に比べて高値であった。アトピー型喘息では、ダニアレルゲンに反応して IL-5 産生がみられるが、非アトピー型喘息症例においても、ダニ、カンジダアレルゲンに反応して、末梢血リンパ球の IL-5 産生がみられる症例が存在した。これらの症例では、アレルゲンの吸入負荷に反応して、即時型反応を欠く遅発型喘息反応が観察された。IgE 抗体の関与は、RAST、ヒスタミン遊離反応、皮内反応が陰性であることから、否定された。
- 3) 気道平滑筋細胞を IL-13 で刺激すると、IL-4 刺激と同様、LT1R 発現が増強され、LTD4 による細胞内 Ca²⁺ の上昇が促進された。また、喘息の病型を問わず、galectin-9 mRNA 発現が健常者に比べて強く誘導され、galectin-9 が喘息の病態形成に関与していると考えられた。
- 4) IL-13 を単独でマウス気道に投与すると、用量依存性に気道過敏性を亢進させ、気道上皮の杯細胞化生、気道の好酸球の増多、エオタキシンの増加、MUC5AC の過剰発現を引き起こした。デキサメサゾンエオタキシンの発現と好酸球増加を完全に抑制したが、気道過敏性と MUC5AC の過剰発現には影響しなかった。TNF- α の同時投与は IL-13 による気道への好酸球浸潤を著明に増強したが、気道過敏性へは影響を与えなかった。
- 5) 好酸球が H4 受容体を発現すること、ヒスタミンが H4 受容体を介して Gi 依存性に好酸球の遊走を引き起

こすことを明らかにした。マスト細胞を中心とする即時型アレルギー反応系と好酸球とのクロストークを示唆する。

- 6) 血管新生はリモデリングでの重要な所見であるが、血管内皮細胞が気管支平滑筋に対する遊走因子を放出することが明らかになった。気管支平滑筋細胞が、傷害あるいは炎症により活性化された血管内皮細胞により、また、自分自身からの遊走因子によって、結合織中に遊走(移動)する可能性を示唆しており、炎症や気道リモデリングにおける平滑筋細胞の役割や細胞間相互作用に新たな視点を付与するものと考えられる。
- 7) 難治性喘息でも抗原刺激に対してリンパ球の活性化を認める症例もあるが、全体としては非難治例に比較して活性化が低かった。難治性喘息は 2 群に大別されたと考えられた。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。 $\gamma\delta$ T 細胞の多い mice 喘息モデルでは AHR、好酸球数、IL-5、IL-10 は有意に低下し、anti-TCR- δ の投与で AHR が有意に上昇した。
- 8) 成人難治性喘息ではエオタキシンおよび TARC の血漿中濃度が他の群と比較して有意に高く気道炎症の状態を反映していると考えられた。SNIP の頻度には各群で差異がなかった。Fc ϵ RI 鎖遺伝子、トロンボキサン合成酵素の遺伝子多型については、非寛解例で正常と比較して特異な多型が存在するのに対し、寛解例では正常と同等の多型を示す傾向を認めた。寛解を予測する因子となりうる可能性が考えられた。
- 9) 小児期に発症した喘息が難治化する要因を解明するため、入院反復群と、長期入院群に分けて検討した。2 群間ではアレルギー疾患の家族歴、既往歴、合併症、喘息発作の原因、治療薬の使用状況、喘息児のやる気と家族の理解には差はなかった。重症例は初診時に長期群に多かったが、その後は反復群に多くなった。反復群は年少児に多かったが、発症年齢と増悪年齢が低く、感染症が悪化要因とされた。長期群は学童期に多く、心理的ストレスや家族関係に問題が多く、血清 IgE 値が高かった。小児期に発症した喘息の難治化には、年少児で感染症により悪化するものと、年長児で心因が関与するものがあり、それぞれの対応策が必要となる。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。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、増悪時には長期群に高い傾向が見られた。

E. 結論

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) アトピー型喘息、非アトピー型喘息の両病型が、外因性抗原に対する免疫異常を基盤とすること、T 細胞レベルの免疫応答異常と気流制限とのリンクが示された。また、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) IL-13 はステロイド抵抗性の難治化要因である可能性があること、4) マスト細胞由来の即時型メディエータのヒスタミンと好酸球性遅発型反応との関連があること、5) 新生血管内皮細胞により気管支平滑筋細胞遊走因子が産生されること、6) 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、7) $\gamma\delta$ T 細胞の低下が気道炎症や AHR を悪化させること、8) 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、が示された。加えて、9) 小児喘息の難治化要因が確認された。難治性喘息には複数の要因が関与することが本研究班のこれまでの成果からも明らかになっているが、さらに、免疫応答、炎症、組織の改築をターゲットとすることで、難治化予防策につながる多くのシードが得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Kaminuma, O., Elly, C., Tanaka, Y., Mori, A., Liu, Y.-C., Altman, A., and Miyatake, S. 2002. Vav-induced activation of the human IFN-g gene promoter is mediated by upregulation of AP-1 activity. *FEBS Letters* 214:153-158.
3. Kaminuma, O. and Mori, A. 2002. Potential initiation of eosinophilic skin inflammation by antigen-specific T helper type 2 cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128 (suppl 1):21-23.
4. Ogawa, K., Kaminuma, O., Okudaira, H., Kikkawa, H., Ikezawa, K., Sakurai, N., and Mori, A. 2002. Transcriptional regulation of the IL-5 gene in peripheral T cells of asthmatic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 130:475-483.
5. Ogawa, K., Kaminuma, O., Kikkawa, H., Sakurai, N., Akiyama, K., and Mori, A. 2002. Interaction with monocytes enhances IL-5 gene transcription in human peripheral T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* in press
6. Mitomi, H., Nakamura, T., Ihara, A., Otani, Y., Sada, M., Igarashi, M., Akino, F., Ichinoe, M., Ojima, T., Mori, A., and Okayasu, I. 2003. Frequent Ki-ras mutations and transforming growth factor- α expression in adenocarcinomas of the small intestine-report of 7 cases. *Digest. Dis. Sciences* in press
7. Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, Machida K, Matsumoto K, Koto H, Ikegami T, Aizawa H and Hara N. Differential Regulation by Glucocorticoid of Interleukin-13-induced Eosinophilia, Hyperresponsiveness, and Goblet Cell Hyperplasia in Mouse Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 50-56, 2003.
8. Yoshida M, Aizawa H, Inoue H, Koto H, Nakano H, Komori M, Fukuyama S and Hara N. Ozone Exposure may Enhance Airway Smooth Muscle Contraction by Increasing Ca(2+) Refilling of Sarcoplasmic Reticulum in Guinea Pig. *Pulm Pharmacol Ther* 15: 112-120., 2002a.
9. Rikimaru T, Kondo M, Kajimura K, Hashimoto K, Oyamada K, Miyazaki S, Sagawa K, Aizawa H and Oizumi K. Efficacy of common antiseptics against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 763-770, 2002.
10. Hamada M, Honda J, Yoshimuta T, Fumimori T, Okamoto M and Aizawa H. Fosfomycin inhibits neutrophil function via a protein kinase C-dependent signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2: 511-518, 2002.
11. Yoshida M, Aizawa H, Inoue H, Matsumoto K, Koto H, Komori M, Fukuyama S, Okamoto M and Hara N. Effect of supalast tosilate on airway hyperresponsiveness and inflammation in asthma patients. *J Asthma* 39: 545-552, 2002b.
12. Yokoyama T, Sakamoto T, Fumimori T, Ide S, Hirohashi N, Kaku N and Aizawa H. Successful bystander cardiopulmonary resuscitation by chest compression without ventilation; a case of the patient with traumatic asphyxia. *日本救急医学会雑誌* 13: 397-400, 2002a.
13. Yokoyama T, Sakamoto T, Shida N, Shimada T, Kaku N, Aizawa H and Oizumi K. Bacteremic and leukopenic pneumococcal pneumonia: successful treatment with antibiotics, pulse steroid, and continuous hemodiafiltration. *J Infect Chemother* 8: 247-251, 2002b.
14. Kawayama T, Fujiki R, Morimatsu Y, Rikimaru T and Aizawa H. Fatal idiopathic acute eosinophilic pneumonia with acute lung injury. *Respirology* 7: 373 -375, 2002.
15. Yu B, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Maeda S, Yanagihara Y, Furue M: Differential regulation of thymus- and activation-

regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in human keratinocyte and fibroblast. *J. Dermatol. Sci.* 30: 29-36, 2002.

16. Basaki Y, Ikizawa K, Kajiwara K, Yanagihara Y: CD40-mediated tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 signaling upregulates IL-4-induced germline C ϵ transcription in a human B cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 199-204, 2002.
17. 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.* 51: 175-184, 2002.
18. Yanagihara Y: Regulatory mechanisms of human IgE synthesis. *Allergol. Int.* in press.
19. Yanagihara Y: Regulation of IgE synthesis. *Int. Proc.* in press.
20. Kato Y, Fujisawa T, Shibano M, Saito T, Gatto W, Kamiya H, et al. Airway epithelial cells promote transmigration of eosinophils in a new three-dimensional chemotaxis model. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:889-97.
21. Fujisawa T, Fujisawa R, Kato Y, Nakayama T, Morita A, Katsumata H, et al. Presence of high contents of thymus and activation-regulated chemokine in platelets and elevated plasma levels of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:139-46.
22. Fujisawa T, Kato Y, Terada A, Iguchi K, Kamiya H. Synergistic effect of theophylline and procaterol on interleukin-5-induced degranulation from human eosinophils. *J Asthma* 2002; 39:21-7.
23. Sekiya, T., Tsunemi, Y., Miyamasu, M., Ohta, K., Morita, A., Saeki, H., Matsushima, K., Yoshie, O., Tsuchiya, N., Yamaguchi, M., Yamamoto, K., Tamaki, K., and Hirai, K. (2003) Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene. *Immunogenetics* 54, 742-745.
24. Komiyama, A., Hirai, K., Iikura, M., Nagase, H., Yamada, H., Miyamasu, M., Ohta, K., Morita, Y., Ra, C., Yamamoto, K., and Yamaguchi, M. "Induction of Basophil Desensitization in Physiological Medium: Enhancement after IgE-Dependent Upregulation of Surface IgE Binding on Basophils." (2003) *Int Arch Allergy Immunol* 130, 40-50.
25. Yamashita, N., Tashimo, H., Ishida, H., Kaneko, F., Nakano, J., Kato, H., Hirai, K., Horiuchi, T., and Ohta, K. (2002) "Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)." *Cell Immunol* 219, 92-97.
26. Yamamoto, T., Yamashita, N., Kuwabara, M., Nakano, J., Sugimoto, H., Akiyama, K., Hirai, K., Ishii, A., Uehara, Y.,

and Ohta, K. "Mutation screening of the muscarinic m2 and m3 receptor genes in asthmatics, outgrow subjects, and normal controls." "Mutation screening of the muscarinic m2 and m3 receptor genes in asthmatics, outgrow subjects, and normal controls." (2002) *Ann Genet* 45, 109-113.

27. Nagase, H., Kudo, K., Izumi, S., Ohta, K., Kobayashi, N., Yamaguchi, M., Matsushima, K., Morita, Y., Yamamoto, K., and Hirai, K. (2001) Chemokine receptor expression profile of eosinophils at inflamed tissue sites: Decreased CCR3 and increased CXCR4 expression by lung eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 108, 563-569.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得（日本国特許申請中）

気管支喘息の原因抗原の同定方法、発明者：森 晶夫、秋山一男、竹迫一任、加藤郁之進

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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)
三田晴久 (国立相模原病院臨床研究センター室長)

研究要旨

難治性喘息の大多数は非アトピー型喘息である。アトピー型喘息の起因抗原は IgE 抗体を指標として診断するが、非アトピー型喘息に関しては現在まで起因抗原診断法が存在しない。われわれは、これまでにアトピー型・非アトピー型喘息はともに T 細胞レベルの IL-5 過剰産生を基盤とする好酸球性炎症疾患であるとのコンセプトを発表しているが、今回、抗原特異的なサイトカイン産生を指標とすることで、非アトピー型喘息の起因抗原診断法の可能性を開拓した。非アトピー型喘息症例における IL-5 産生誘導抗原は、吸入誘発試験で即時型喘息反応を惹起せず、遅発型喘息反応を惹起した。IL-5 誘導抗原が遅発型アレルギー反応の責任抗原であるとの知見は、起因抗原決定、抗原特異的治療による非アトピー型喘息の解決に向けた第一歩として評価できる。

A. 研究目的

当研究班が実施した難治性喘息の病態に関する調査では、7割以上の症例が非アトピー型に分類された。難治化機序を解明するためには、非アトピー型喘息の発症メカニズムを明らかにする必要がある。そのためにはまず、原因となるアレルゲンを解明することが必要であるが、IgE 抗体を介する皮膚反応、RAST などの検査法で診断するアトピー型喘息の場合とは異なり、まったく手が出せないというのが現状である。われわれは、これまでにアトピー型・非アトピー型喘息はともに T 細胞レベルの IL-5 過剰産生を基盤とする好酸球性炎症疾患であるとのコンセプトを発表している。そこで、T 細胞反応性を指標として非アトピー型喘息の起因抗原を診断できないか検討した。

B. 方法

B-1、対象症例、臨床検査

国立相模原病院アレルギー科外来に通院中の成人喘息症例より、インフォームドコンセントを得たうえで対象とした。アセチルコリン、ヒスタミンに対する気道過敏性の測定、および抗原吸入負荷試験は、日本アレルギー学会の標準法によって行った。β刺激剤、テオフィリン剤、インターール、抗コリン剤、ベクロメサゾン吸入は、12時間以上、抗ヒスタミン剤ステロイド剤は24時間以上中止した。アトピー型は、当院にて通常施行している吸入アレルゲン20種を含む皮膚テストにおいて、一つ以上の陽性を示すものと定義し

た。非アトピー型は皮膚テスト陰性のものとした。

B-2、細胞培養およびアッセイ

ヘパリン採血の後、Ficoll-paque 比重遠心法にて末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を得、 2×10^6 /ml の濃度にて、AIM-V 培地に懸濁した 20 nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と 1 μM の ionomycin (IOM) で 24 時間刺激した後、上清中の IL-2、IL-4、IL-5、IFN-γ を特異的 ELISA 法にて測定した。ダニアレルゲン、*Candida albican* 抗原による T 細胞からのサイトカイン産生を調べるため *Dermatophagoides farinae* extract、*Candida albicans* extract (鳥居薬品)、および精製 *Candida albican* 抗原の最終濃度 0.1、1、10 μg/ml を加えて 6 日間培養し、上清中の IL-5 を同様に ELISA で調べた。リンパ球の増殖反応は 10^5 個の細胞を刺激後 6 日間培養した後、 ^3H -Thymidine パルスにて測定した。

(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

3-1、*Candida albicans* 粗抗原に対する IL-5 産生および増殖反応

Candida albicans 粗抗原に対する免疫応答の指標

として、*Candida albicans* 粗抗原、Mannan A および Acid protease に対する特異的 IgE、IgG 抗体、加えて、末梢血単核球の増殖応答、IL-5 産生につき検討した。まず、*Candida albicans* 粗抗原に対する皮内テストの陽性群と陰性群の比較において解析した (Figure 1, 2)。Table 1 に結果をまとめた。*Candida albicans* に対する RAST 陽性者は、皮内テスト陽性群で 30.5% (11/25)、陰性群で 8% (2/23) であった。*Candida albicans* 粗抗原、Mannan A および Acid protease に対する特異的 IgE 抗体は、両群ともほとんど検出限界以下であった。陽性群では *Candida albicans* 粗抗原と Mannan A に対する特異的 IgG が、陰性群に比べて有意に高値であった。それ以外の臨床プロフィールである血清総 IgE 値、一秒率 (FEV₁₀)、末梢血中好酸球数、Histamine PC₂₀ には両群間に特に差を認めなかった。また、カンジダ粗抗原に対する増殖反応、IL-5 産生に関しても、統計学的に有意な差を認めなかった。つまり、皮内反応の陽性・陰性に関わらず、*Candida* 粗抗原に反応して IL-5 産生の誘導が起きる症例が存在することが判った。*Candida* 粗抗原に対する特異的 IgE 抗体を有する群と有さない群の間で比較しても、特に有意な差は認められなかった。以上より、IgE 抗体の有無には関わらず、*Candida* 抗原に反応して IL-5 を産生する症例群が存在することが確かめられた。

次に、*Candida* 粗抗原に対する IL-5 産生が 20 pg/ml 以上の高産生群と 20 pg/ml 未満の低産生群に分けて、臨床プロフィールを解析した (Table 2)。*Candida* 粗抗原に対する RAST 陽性率は両群とも約 20%、*Candida* 粗抗原に対する皮内反応陽性率はともに約 50% であった。血清総 IgE 値および *Candida* 粗抗原と Mannan A、Acid protease の各抗原に対する特異的 IgE と IgG 値には、両群間に差は認められなかった。この知見は、*Candida* 抗原に反応して IL-5 を産生する症例が、特に皮内反応や IgE 抗体が陽性である症例というわけではないことを示す。また、一秒率、気道過敏性、末梢血中の好酸球数といった臨床データ上にも、IL-5 産生群と非産生群の間に、特に差は認めなかった。

3-2、*Candida* 精製抗原に対する IL-5 産生および増殖反応 (Figure 3, 4)

Candida 粗抗原に対する IL-5 産生の高い症例群について、*Candida* 精製抗原の Acid protease と Mannan A に対する増殖反応、IL-5 産生を解析した。*Candida* 粗抗原に対する S.I. は平均で 15.2、Acid protease は 3.1 を示したが、Mannan A の S.I. は 0.6 と、有意な増殖反応は認めなかった。IL-5 産生誘導

についても、*Candida* 粗抗原では平均 36 pg/ml、Acid protease で 11 pg/ml、Mannan A ではほとんど IL-5 産生が認められず、IgE、IgG 反応抗原である Mannan A は、IL-5 産生誘導に関与しないことが判った。

3-3、誘発喘息反応におけるダニ、真菌アレルゲンの関連の解析

非アトピー型喘息の症例のうち *Candida* 抗原、ダニ抗原に反応した IL-5 産生量の高い症例群における、IL-5 産生の意義を明らかにする目的で、抗原吸入負荷試験を行った。結果を Table 3 に示す。いずれの症例においても IgE 抗体が存在しないことが、即時型喘息反応の欠如により確認される。IL-5 産生の高い症例では、遅発型喘息反応が認められた。IgE 抗体の関与がないことは、さらに、negative RAST、negative HRT (histamine releasing test) により確認された。本知見によって、IL-5 産生誘導抗原が T 細胞アレルゲンとして、IgE 抗体非依存性に喘息反応を惹起することが明らかである。

D. 考察

現在までの国内外の研究成果から、気管支喘息の好酸球性炎症には T 細胞と T 細胞により産生されるサイトカインが重要であることが確立されている。殊に、活性化 T 細胞により産生される IL-5 は、好酸球に選択的に作用して、好酸球系前駆細胞の分化・成熟を促進すると同時に、成熟好酸球の生存延長・機能増強作用を有し、モデル動物のレベルにおいても、IL-5 ノックアウトマウスでは好酸球増多が起きないことや、抗 IL-5 中和抗体の投与によって、実験喘息モデルの好酸球浸潤・気道過敏性亢進が抑制されることから、好酸球性炎症に必須の因子であることが示されている。ヒトを対象にした研究からも、気管支粘膜生検、気管支肺胞洗浄の所見から、1) 気管支喘息患者の気道炎症局所には、活性化 CD4⁺ T 細胞 (ヘルパー T 細胞) の浸潤が顕著にみられ、2) 喘息の重症度・気道過敏性の程度と活性化 T 細胞数との間に相関が認められ、3) 粘膜に浸潤する好酸球数と T 細胞数とが相関し、さらに 4) 喘息患者では末梢血中にも、活性化 T 細胞数が増加していることなどから、気管支喘息の好酸球性炎症はヘルパー T 細胞により産生される IL-5 が重要であることが示されている。

アトピー型喘息においては、ダニアレルゲン反応性 T 細胞が、好酸球活性化因子 IL-5 を過剰産生することによって、気道粘膜において好酸球性炎症が惹起されるものと推測される。非アトピー型喘息においては、抗原非特異的活性化刺激 (PMA+ionomycin) により IL-5 産生が顕著に誘導されるが、好酸球性炎症の成

立機序を考える上で、いかなる抗原に反応して IL-5 産生がおこなわれるかが興味深い。成人発症型喘息では IgE 抗体を認めない非アトピー型が多く、IgE 抗体を有するアトピー型がほとんどを占める小児発症型とは、発病の背景が異なり、より環境因子の影響が大きいとされる。

今回、Candida 抗原に反応して IL-5 産生が誘導される症例群が存在することが明らかになった。IgE 抗体の有無や、臨床パラメータでは、区別されなかった。IL-5 誘導症例では抗原吸入チャレンジにより遅発型喘息反応が例外なく観察されることから、IL-5 産生と喘息反応の関連が明らかになった。抗真菌療法の trial などにより、これらの症例における、Candida 抗原反応性 IL-5 産生の意義を一層説明する必要がある。「T 細胞アレルゲン」というコンセプトを導入し、喘息の原因抗原を T 細胞レベルで同定することは、非アトピー型喘息の診断に貢献するのみならず、病態の解明、治療法の確立を大いに促進するものと考えられる。

E. 結論

非アトピー型喘息においても、T 細胞をターゲットすることで、起因抗原を診断し、抗原を回避することや、抗原特異的な治療法を行うことによって、アトピー型と同様な効果が得られると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Kaminuma, O., Elly, 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* 214:153-158.
- 3) Kaminuma, O. and Mori, A. 2002. Potential initiation of eosinophilic skin inflammation by antigen-specific T helper type 2 cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128

(suppl 1):21-23.

- 4) Ogawa, K., Kaminuma, O., Okudaira, H., Kikkawa, H., Ikezawa, K., Sakurai, N., and Mori, A. 2002. Transcriptional regulation of the IL-5 gene in peripheral T cells of asthmatic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 130:475-483.
- 5) Ogawa, K., Kaminuma, O., Kikkawa, H., Sakurai, N., Akiyama, K., and Mori, A. 2002. Interaction with monocytes enhances IL-5 gene transcription in human peripheral T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* in press
- 6) Mitomi, H., Nakamura, T., Ihara, A., Otani, Y., Sada, M., Igarashi, M., Akino, F., Ichinoe, M., Ojima, T., Mori, A., and Okayasu, I. 2003. Frequent Ki-ras mutations and transforming growth factor- α expression in adenocarcinomas of the small intestine-report of 7 cases. *Digest. Dis. Sciences* in press

2. 学会発表

- 1) Mori, A., Ikeda, Y., Murakami, E., Mita, H., Hashimoto, N., Tsurikizawa, N., Taniguchi, M., Maeda, Y., Hasegawa, M., and Akiyama, K. 2002. 4th Asian Pacific Association of Pediatrics Allergy, Respiriology, and Immunology. Luncheon Seminar 2. Helper T cells in inflammation, late asthmatic response, and BHR. Tokyo, Japan. 2002/9/21-23

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得（日本国特許申請中）
気管支喘息の原因抗原の同定方法、発明者：森 晶夫、秋山一男、竹迫一任、加藤郁之進
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1. 即時型皮膚反応陽性・陰性群の臨床的免疫学比較

	<i>Candida albicans</i> Skin test	
	- 群	++ / + 群
n	37	43
Age	49.2±2.5	42.7±2.9
M/F	17/20	17/26
Atopic/Nonatopic	21/16	25/18
<i>Candida</i> RAST +/-	2/23 (nd = 12)	11/25 (nd = 7)
<i>Candida</i> Skin test +/-	37/0	43/0
total IgE (IU/ml)	487.1±34.6	486.4±37.7
anti- <i>Candida</i> IgE (IU/ml)	0.1±0.8	0.1±1.0
anti- <i>Candida</i> IgG (U/ml)	7.0±3.6	* 21.1±4.6
anti-Mannan A IgE (U/ml)	0.1±0.5	0.1±0.6
anti-Mannan A IgG (U/ml)	38.0±7.6	* 172.1±16.0
FEV _{1.0} (%)	70.4±1.6	74.7±1.3
Eosinophil (/μl)	542.6±16.4	526.7±19.9
Ach PC ₂₀ (μg/ml)	3638.5±63.1	5910.6±93.9
His PC ₂₀ (μg/ml)	932.0±27.4	1622.7±53.5
IL-5 production (<i>Candida</i> , pg/ml)	22.0±8.2	94.2±30.2
IL-5 production (P+I, pg/ml)	11.4±6.2	13.2±5.9
³ H-TdR uptake (S.I.)	10.2±3.2	12.1±2.7

* P < 0.0001

Table 2. *Candida* 抗原に対するIL-5高産生・低産生群の比較

	IL-5 production (pg/ml)	
	<20	≥20
n	53	31
Age	45.8±2.9	44.8±2.5
M/F	23/30	14/17
Atopic/Nonatopic	31/22	17/14
<i>Candida</i> RAST + / -	8/30 (nd = 15)	5/17 (nd = 9)
<i>Candida</i> Skin test + / -	23/25 (±, nd = 5)	16/11 (±, nd = 4)
total IgE (IU/ml)	470.4±37.9	407.9±26.7
anti- <i>Candida</i> IgE (IU/ml)	0.1±1.0	0.1±0.6
anti- <i>Candida</i> IgG (U/ml)	13.1±4.4	14.7±4.8
anti-Mannan A IgE (U/ml)	0.1±1.6	0.03±0.4
anti-Mannan A IgG (U/ml)	93.8±15.5	128.4±17.4
FEV _{1.0} (%)	70.3±1.7	74.9±1.0
Eosinophil (/μl)	508.2±18.5	528.2±14.4
Ach PC ₂₀ (μg/ml)	5906.6±87.7	4463.5±89.8
His PC ₂₀ (μg/ml)	1191.2±45.5	919.4±30.2
IL-5 production (<i>Candida</i> , pg/ml)	3.4±2.3	148.6±26.1
IL-5 production (P + I, pg/ml)	7.2±5.8	14.9±5.9
³ H-TdR uptake (S.I.)	9.5±2.6	13.5±3.2

Table 3. 抗原特異的IL-5産生と吸入誘発喘息反応の関連

Case	Antigen	IL-5 production	Bronchial responses ^a	
		(pg/ml)	IAR	LAR
1	Candida	239.3	<5	20.0
2	Candida	286.6	<5	19.5 (attack)
	Acid protease	152.4	<5	51.3 (attack)
	Mite	<20	<5	<5
3	Candida	591.0	<5	13.0
	Mite	271.0	<5	20.2
4	Candida	211.4	<5	9.1
	Acid protease	<20	<5	<5
5	Candida	79.6	<5	19.1
	Mite	191.9	<5	20.0
6	Candida	55.6	<5	15.8
	Mite	12.5	<5	<5

^a%reduction from the baseline value

Figure 1. 即時型皮膚反応陽性・陰性群のCandida粗抗原に対する増殖反応

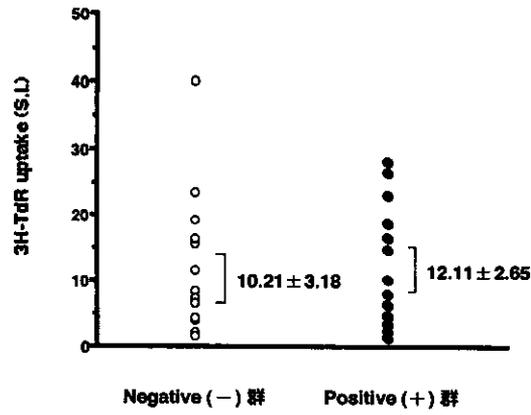


Figure 2. 即時型皮膚反応陽性・陰性群のCandida粗抗原に対するIL-5産生

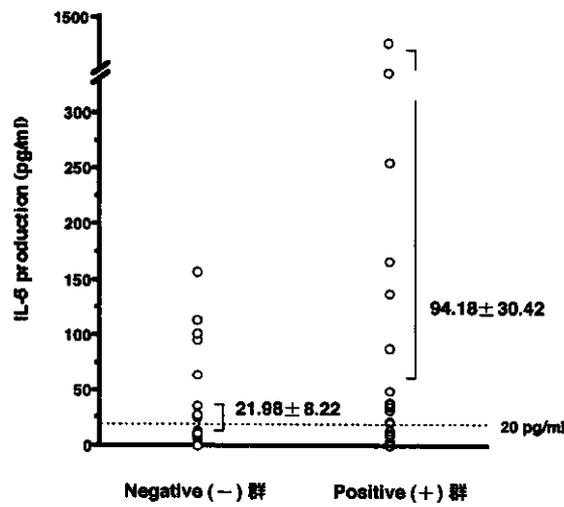


Figure 3. Candida粗抗原および精製抗原 Acid protease, Mannan Aによる増殖誘導

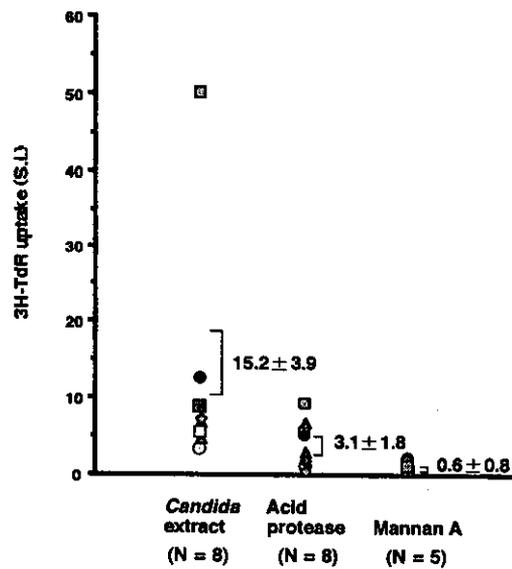
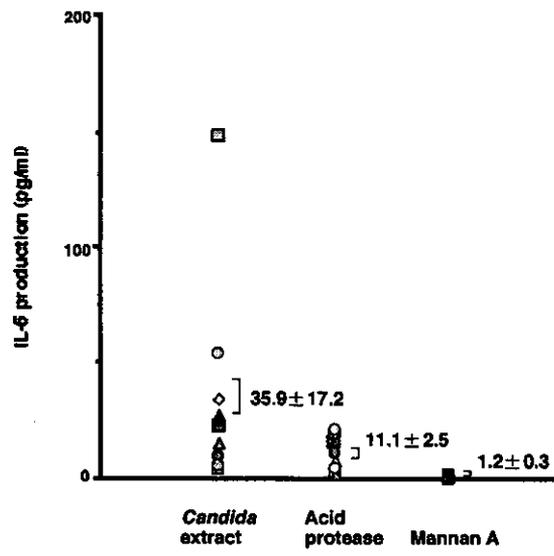


Figure 4. *Candida* 粗抗原および精製抗原
Acid protease, Mannan AによるIL-5産生誘導



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、気道過敏性など共通の臨床所見が認められ、このような喘息形質を媒介する機能分子として、これまでにIL-13が関与していることを明らかにした。昨年度は、IL-13遺伝子のプロモーター領域の多型解析ならびに気道平滑筋細胞におけるIL-13Rの発現について報告したが、今年度はIL-13の気道平滑筋細胞におけるcysteinyl LTRやH1Rの発現に対する作用について検討を行った。その結果、IL-13で刺激した細胞では、LT1Rのみ発現が誘導されること、無刺激の細胞に比べてLTD₄による細胞内Ca²⁺の上昇が増強されること、さらにこの増強作用はLT1R阻害剤とLT1/2R阻害剤によってほぼ完全に抑制されたことから、この抑制がLT1R特異的であることが明らかとなった。次に、両喘息における好酸球遊走因子galectin-9の関与の有無について検討するため、PBMCをPMAとionomycinで刺激したところ、galectin-9 mRNA発現は、喘息の病型を問わず、患者では健常者に比べて強く誘導された。以上の結果から、IL-13は気道平滑筋細胞におけるLT1Rの発現増強を介して気道過敏性の亢進に関与し、またgalectin-9は両喘息に共通な好酸球浸潤に関与していると考えられた。

A. 研究目的

アトピー型と非アトピー型の気管支喘息には共通の臨床所見が認められ、このような喘息形質を媒介する機能分子としてはIL-5が知られている。さらに、IL-13も関与していることを明らかにし、昨年度はそのプロモーター領域の多型解析ならびに気道平滑筋細胞におけるIL-13Rの発現について報告した。今年度は、IL-13の気道平滑筋細胞におけるcysteinyl LTRやH1Rの発現に対する作用について検討を行った。また最近、既知のサイトカイン/ケモカインとは全く異なった構造と生物学的作用を示す好酸球遊走因子galectin-9のモルモット喘息モデルへの関与が示されているので、galectin-9の関与の有無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) 気道平滑筋細胞をIL-13やIL-4で刺激した後、LT1R、LT2RおよびH1RのmRNA発現をRT-PCRやreal-time PCRにより、これらのタンパク発現をFACSにより、また細胞内Ca²⁺濃度をFluoroskanによりそれぞれ解析した。また、健常者、アトピー型喘息患者および非アトピー型喘息患者から末梢血単核細胞(PBMC)を分離し、PMAとionomycinで刺激した後、galectin-9 mRNA発現をreal-time PCRにより解析した。

C. 結果

気道平滑筋細胞をIL-13で刺激すると、IL-4刺激と同様、LT1R mRNAとタンパク発現は増強されたが、LT2RとH1Rの発現には変化が認められなかった。また、IL-13やIL-4で刺激した細胞では、無刺激の細胞に比べて、LTD₄に

よる細胞内Ca²⁺の上昇はさらに増強された。この増強作用は、LT1R阻害剤MK-571とLT1/2R阻害剤Bay-u9773によって同程度に抑制されたことから、この抑制はLT1Rに特異的であることは明らかである。IL-13やIL-4によるLT1Rの発現増強に接着分子の発現調節が関与しているか否かについて検討したが、CD11aやCD54などの発現には影響が認められなかった。一方、PBMCをPMAとionomycinで刺激したところ、galectin-9 mRNA発現は、喘息の病型を問わず、患者では健常者に比べて強く誘導された。したがって、galectin-9も喘息の病態形成に関与していると考えられた。

D. 考察

本研究では、アトピー型と非アトピー型喘息に共通な免疫学的パラメーターであるIL-13の気道平滑筋細胞に対する作用について検討を行った。その結果、IL-13で刺激した細胞ではLT1Rの発現が増強された。また、無刺激の細胞に比べてLTD₄による細胞内Ca²⁺の上昇が増強されること、またこの増強作用はLT1R阻害剤とLT1/2R阻害剤によってほぼ完全に抑制されることから、この抑制がLT1R特異的であることが明らかとなった。IL-13が喘息患者のBALF中で増加しており、気道のリモデリング促進に関与すること、さらにその中和抗体が気道過敏性を抑制することなど、種々の知見から考えても、IL-13がLT1Rを介し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。

さらに、両喘息における好酸球遊走因子galectin-9の関与の有無についても検討した。PBMCをPMAとionomycinで刺激したところ、galectin-9 mRNAの発現は、喘息の病型を問わず、患者では健常者に比べて強く誘導された。したがって、galectin-9も両喘息の病態形成に関与していることが示された。galectin-9は主として活性化T細胞から産生・遊離されるガレクチンファミリーのメンバーであるので、サイトカイン/ケモカインとは異なった様式で好酸球に対し遊走活性を発揮すると考えられる。また、動物実験ではgalectin-9は好酸球に対して遊走以外のいくつかの生物学的作用をもっており、例えばO₂⁻産生の誘導作用や生存延長作用などが知られている。これらの臨床的意義については

今後さらなる詳細な解析が必要である。

E. 結論

IL-13は気道平滑筋細胞におけるLT1Rの発現増強を介して気道過敏性の亢進に関与している可能性が示唆された。また、galectin-9はアトピー型と非アトピー型の喘息に共通な好酸球浸潤に関与していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yu B, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Maeda S, Yanagihara Y, Furue M : Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in human keratinocyte and fibroblast. *J. Dermatol. Sci.* 30: 29-36, 2002.
- 2) Basaki Y, Ikizawa K, Kajiwara K, Yanagihara Y : CD40-mediated tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 signaling upregulates IL-4-induced germline C ϵ transcription in a human B cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 199-204, 2002.
- 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.* 51: 175-184, 2002.
- 4) Yanagihara Y : Regulatory mechanisms of human IgE synthesis. *Allergol. Int.* in press.
- 5) Yanagihara Y : Regulation of IgE synthesis. *Int. Proc.* in press.
- 6) 柳原行義、羅 智靖 : 可溶性Fc ϵ RI α によるIgE産生抑制. 別冊・医学のあゆみ—アレルギーの分子医学的研究 pp. 71-75, 2002.
- 7) 柳原行義 : アトピー体質と遺伝. *アレルギー・免疫* 9: 74-80, 2002.
- 8) 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. *耳鼻免疫アレルギー* 20: 29-36, 2002.
- 9) 山本ひとみ、品澤美樹、梶原景一、柳原行義 : アトピー遺伝子の同定とその機能解析. *アレルギー・免疫* 9: 1174-1180, 2002.
- 10) 梶原景一、山本ひとみ、柳原行義 : 成熟B細胞

胞におけるIL-4応答性細胞とIL-13応答性細胞. アレルギー科 14: 120-126, 2002.

- 11) 梶原景一、品澤美樹、山本ひとみ、柳原行義: AIDの遺伝子多型とその機能. アレルギー科 14: 403-407, 2002.
- 12) 柳原行義: IgE・IgE抗体とその産生制御. アレルギー病学 pp38-44, 2002.
- 13) 柳原行義: IgE産生の分子調節機構. アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療 印刷中
- 14) 柳原行義: IgE抗体産生の調節. 総合アレルギー学 印刷中
- 15) 柳原行義: CD40に依存しない免疫グロブリンクラススイッチ. 臨床免疫 印刷中

2. 学会発表

- 1) Yanagihara Y. Regulation of human IgE synthesis. The 5th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, 2002.
- 2) Yanagihara Y. Signal transduction mechanisms of IL-4 and IL-13. The 12th Congress of Interasma Japan/North Asia, 2002.
- 3) Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Morishima, H., Shinazawa, M., Yamamoto, H., Furue, M., Yanagihara, Y. Reciprocal regulation of TRAC and MDC production by IL-4 or IL-13 and IFN- γ in a human keratinocyte cell line. The 9th Meeting of the Trans-Pacific Allergy and Immunology, 2002.
- 4) 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.
- 5) 柳原行義. IgE産生の誘導とその制御機構. 第5回免疫薬理研究会, 2002.
- 6) 前田尚子、梶原景一、生澤公一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、秋山一男、柳原行義、于彬、古江増隆. ケラチノサイト株 HaCaT細胞からのTARC/MDC産生に対するIFN- γ とIL-4/IL-13の作用. 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 7) 山本ひとみ、梶原景一、森嶋大貴、品澤美樹、前田尚子、三田晴久、秋山一男、柳原行義. IL-4/IL-13による気道平滑筋細胞 cysteinyl LT1Rの発現増強作用 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 8) 田端祐一、楠幸博、栃丸博幸、渡辺徹、崎山幸雄、柳原行義. 肝機能障害を伴った好酸

球増多症の1例 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.

- 9) 山田一恵、宇理須厚雄、河村牧子、各務美智子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、柳原行義、鳥居新平. 鶏卵アレルギーの寛解とPepsin処理Ovomucoidによる末梢血単核球のTh1・Th2サイトカイン産生能の関係 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 10) 品澤美樹、梶原景一、生澤公一、森嶋大貴、前田尚子、山本ひとみ、秋山一男、柳原行義. IL-4応答性成熟B細胞に発現されるRAGの機能解析 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 11) 生澤公一、梶原景一、出原賢治、柳原行義. IL-4/IL-13によるgermline C ϵ transcriptの発現誘導におけるPU.1の関与 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 12) 梶原景一、生澤公一、柳原行義. 抗CD40抗体によるgermline C ϵ transcriptの発現増強におけるTRAF3の関与 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 13) Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Furue, M., Yanagihara, Y. Reciprocal regulation of TRAC/MDC production by IL-4/IL-13 and IFN- γ in a human keratinocyte cell line 第32回日本免疫学会総会・学術集会, 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

山本ひとみ、梶原景一、三田晴久、森嶋大貴、品澤美樹、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）、河野茂勝（京都薬科大学薬理学）、平島光臣（香川医科大学免疫病理学）

研究要旨

難治性喘息を引き起こす要因のうち、「Interleukin-13 の関与」について検討した。IL-13は、本研究班の成績でも難治性喘息患者の気道において高発現を認め、またマウスのモデルでは気管内投与により好酸球浸潤、気道過敏性、粘液過分泌といった喘息に重要な病態を惹起することが知られている。しかしながら、IL-13により惹起されるこれらの病態に対するステロイドの影響は不明な点が多い。ステロイドに対する低反応性は喘息難治化の大きな要因であることより（森）、IL-13により誘導される気管支喘息の病態におけるステロイドの役割を検討した。IL-13の気管内投与は単独で用量依存性に気道炎症・気道過敏性を誘導し、TNF- α を同時投与すると気道炎症には相乗効果を認めたが、気道過敏性には影響しなかった。デキサメサゾン投与は、IL-13による気道炎症をほぼ完全に抑制したが、気道過敏性、MUC5ACの発現、杯細胞化生には影響しなかった。気道過敏性亢進は好酸球の活性化、脱顆粒とは関連を認めなかった。また、デキサメサゾンはIL-13で誘導される好酸球性炎症を抑制したが、杯細胞化生や気道過敏性亢進を抑制し得なかった。以上より、IL-13による気道過敏性亢進は、好酸球性炎症とは直接の因果関係がなく、IL-13に誘導される気道過敏性や杯細胞化生のようなステロイド抵抗性因子の制御は、喘息の新しい治療目標となり得ると考えられた。

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。難治化の共通した原因としては、ステロイドに対する抵抗性があげられる。すなわち、高用量のステロイドを用いても気道炎症の改善が十分でない、気道過敏性が低下しない、気道狭窄が完全には改善しないなどの症例では難治化が進行すると考えられる。IL-13は気管支喘息患者の気道での発現が亢進しており、好酸球浸潤、気道過敏性亢進、粘液分泌増加などの作用を有するサイトカインであり、気管支喘息の病態生理異常に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、我々は IL-13によって引き起こされるマウス喘息モデルを用いてステロイドの効果を検討し、気管支喘息難治化の機序を明らかにしようとした。

B. 方法

6週令のA/Jマウスに50 μ lのリコンビナント IL-13あるいはビークルを1,3,5日に気管内投与した。デキサメサゾン0.5mg/kgを最初のIL-13（またはビークル）投与24時間後より4日間投与した。IL-13と

TNF- α の相互作用を調べるために、それ自体では気道過敏性を起こさない用量の TNF- α をIL-13と同時投与しその効果を検討した。気道過敏性、気管支肺胞洗浄(BAL)、組織学的検査、肺組織からの RNA 定量を最終のIL-13投与より24時間後の6日目に行った。

方法は、マウスを麻酔後(ケタミン+ペントバルビタール ip)、気管切開後カニューラを留置し、筋弛緩薬を投与した。人工呼吸器でマウスを換気し、経時的に気道内圧をモニターした(一回換気量0.3mL、呼吸数120回/分)。超音波ネブライザーを用いてアセチルコリンを吸入(120呼吸数)させ、濃度を0.6から20mg/mLまで倍々に漸増した。気道過敏性は、気道内圧を基礎値の2倍まで上昇させるアセチルコリン濃度(PC200-ACh)として表現した。気管支肺胞洗浄(BAL; Bronchoalveolar lavage)は両肺に気管カニューラから25cmH₂Oの静水圧で生理食塩水を注入後3度洗浄し、回収した肺胞洗浄液の総細胞数を算定するとともに、サイトスピンの標本を作成し、簡易ライトギムザ染色を行い、細胞成分を分類した。組織学的評価は25cmH₂Oの静水圧下に10%ホルマリン溶液で肺を固定しパラフィン切片を作成した後ムチンを同定するため、PAS/alcian blue染色を施行した。

MUC5AC mRNA発現の検討については、総 RNA はグアニチニウムチオシアネートフェノールクロロ

ホルム法を用いて肺組織から分離した。RT-PCR法を1.0 μ gの総RNAを用いて行った。オリゴ(dT)プライマーを逆転写反応に用い、cDNAをそれぞれ特異的なプライマーを使ってPCRにより増幅した。オリゴヌクレオチドプライマーは以下のものを用いた。

MUC5AC

51-CAGCCGAGAGGAGGGTTTGATCT-31

51-AGTCTCTCTCCGCTCCTCTCAAT-31

β -actin

51-TCCTGTGGCATCCATGAAACT-31

51-GAAGCACTTGCGGTGCACGAT-31

C. 結果

IL-13単独では用量依存性に気道過敏性を亢進させ、気道上皮の杯細胞化生、気道の好酸球の増多、エオタキシンの増加、MUC5ACの過剰発現を引き起こした。TNF- α を同時投与すると気道炎症には相乗効果を認めたが(図1)、気道過敏性には影響しなかった(図2)。デキサメサゾンはエオタキシンの発現と好酸球増加を完全に抑制したが(図3)、気道過敏性とMUC5ACの過剰発現には影響しなかった(図4)。

図1.IL-13 と TNF- α の気管内投与による肺胞洗浄液中の好酸球数

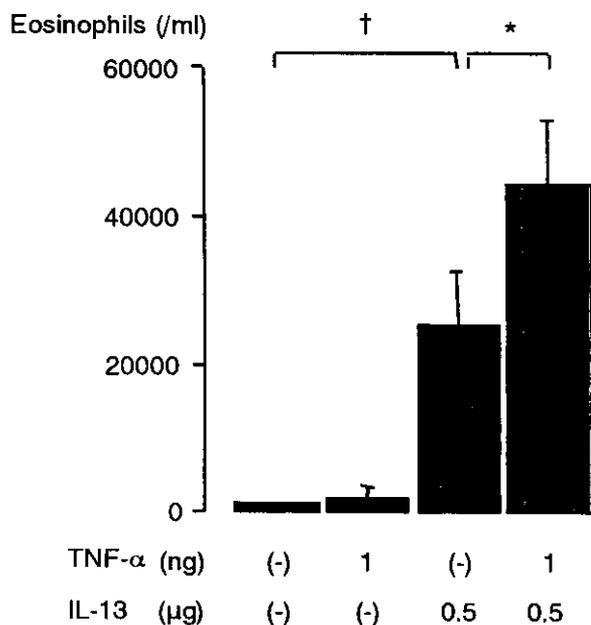


図2.IL-13 気管内投与後の気道過敏性に及ぼすTNF- α の影響

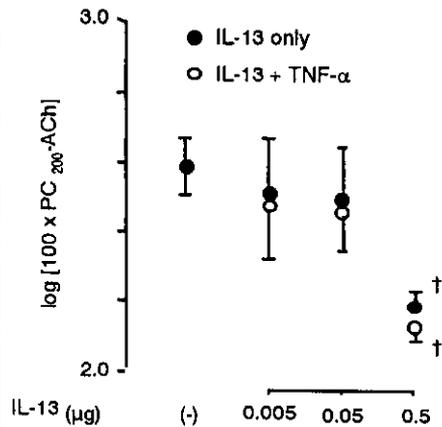


図3.IL-13 気管内投与後のBAL中好酸球数に及ぼすデキサメサゾンの効果

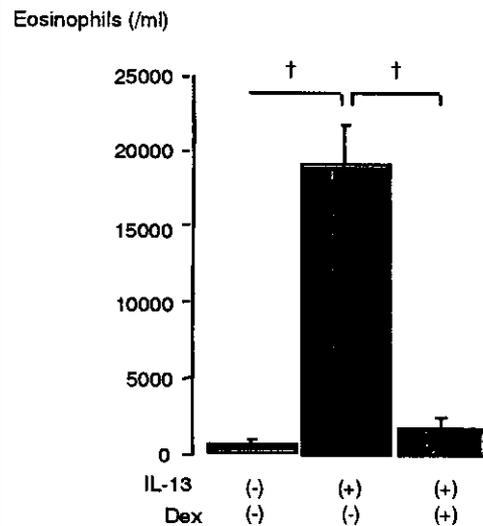
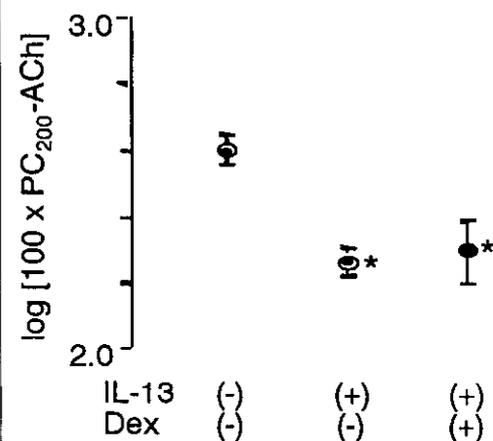


図4.IL-13気管内投与後の気道過敏性に及ぼすデキサメサゾンの効果



D. 考察

以上の成績は、ステロイドは IL-13により引き起