

こされる気道過敏性や杯細胞化生を抑制することは出来ず、気道過敏性や杯細胞化生は気道の好酸球性炎症によってのみ起こるものではないことを示している。気道炎症の存在の有無にかかわらず、気道過敏性の亢進や杯細胞化生を引き起こす要因の一つとしてIL-13が考えられる。難治性喘息患者では、十分なステロイド療法を行って気道炎症所見が改善しても、なお気道過敏性の亢進や気道の過分泌が残存し難治化の要因となっている症例も数多く存在する。このような症例ではIL-13雅関与している可能性も考えられる。今後、臨床例でのIL-13の検討を考えている。

E. 結論

IL-13はマウスにおいて気道炎症治療によっても改善しない気道過敏性や気道過分泌の原因となっており、ヒトにおいてもこれらの作用を通じて難治性喘息の原因の一つになっている可能性が考えられた。

F. 論文発表

原著

1. Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, Machida K, Matsumoto K, Koto H, Ikegami T, Aizawa H, Hara N. Differential Regulation by Glucocorticoid of Interleukin-13-induced Eosinophilia, Hyperresponsive-ness, and Goblet Cell Hyperplasia in Mouse Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 50-56, 2003.
2. Yoshida M, Aizawa H, Inoue H, Koto H, Nakano H, Komori M, Fukuyama S, 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., 2002.
3. 田尾義昭, 宮崎正之, 二宮 清, 相沢久道. 当院におけるMycobacterium kansasii症例の臨床的検討. *結核* 77: 23-27, 2002.
4. 古森雅志, 井上博雅, 松元幸一郎, 福山 聡, 濱田直樹, 古藤 洋, 町田健太郎, 高田昇平, 相沢久道, 原信之. 肺Langerhans' cell histiocytosis 5 症例の検討. *日本呼吸器学会雑誌* 40: 545-549, 2002.
5. 加地正英, 渡邊 文, 久能治子, 飯島浩之, 相沢久道, 佐藤能啓. 脳血管障害患者の退院阻害因子. *臨床と研究* 79: 103-108, 2002.
6. Rikimaru T, Kondo M, Kajimura K, Hashimoto K, Oyamada K, Miyazaki S, Sagawa K, Aizawa H, Oizumi K. Efficacy of common antiseptics against

multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 763-770, 2002.

7. Hamada M, Honda J, Yoshimuta T, Fumimori T, Okamoto M, Aizawa H. Fosfomycin inhibits neutrophil function via a protein kinase C-dependent signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2: 511-518, 2002.
8. 加地正英, 渡邊 文, 相沢久道. 高齢神経疾患患者へのインフルエンザワクチン接種. *感染症学雑誌* 76: 263-268, 2002.
9. 一木昌郎, 力丸 徹, 合原ルミ, 大下祐一, 上村知子, 帆足茂久, 古賀丈晴, 相沢久道. 切除不能非小細胞肺癌に対するPaclitaxelとCarboplatinによるBiweekly併用化学療法の第 相試験. *癌と化学療法* 29: 1389-1394, 2002.
10. Yoshida M, Aizawa H, Inoue H, Matsumoto K, Koto H, Komori M, Fukuyama S, Okamoto M, Hara N. Effect of suplatast tosilate on airway hyperresponsiveness and inflammation in asthma patients. *J Asthma* 39: 545-552, 2002.

G. 知的財産権の出願・特許状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究協力者

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

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

分担研究者 藤澤隆夫

国立療養所三重病院臨床研究部長

研究要旨

難治化した気管支喘息の病理組織学的特徴は気道粘膜への著しい好酸球浸潤であり、好酸球浸潤の制御は難治性喘息の治療に直結する。我々はこれまでの研究で好酸球浸潤に関わる多様な因子の相互作用を解析し、気道上皮細胞が産生するケモカインおよび細胞外基質蛋白が果たす役割を明らかにしてきた。本年度は肥満細胞から多量に遊離されるヒスタミンの好酸球機能への作用を検討した。その結果、ヒスタミンは好酸球の遊走を誘導し、エオタキシンによる遊走に対しても相加的に増強することをみいだした。さらに、この遊走活性はヒスタミン H4 受容体を介するものであること、好酸球に発現する主なヒスタミン受容体は H4 であることも明らかにした。これまで即時型反応のメディエーターと考えられていたヒスタミンが、好酸球遊走を介して慢性炎症形成にも関わることが示唆された。H4 受容体阻害が難治喘息の新しい治療として有効である可能性も考えられる。

A. 研究目的

難治化した気管支喘息の病理組織学的特徴は気道粘膜への著しい好酸球浸潤であり、好酸球浸潤の制御は難治性喘息の治療に直結する。好酸球の浸潤機構とその制御法を解明するためには、我々は初年度と第2年度の研究で細胞外基質蛋白、気道上皮細胞、好酸球を組み合わせた新しい実験モデルを確立して、気道上皮細胞が産生するケモカインおよび細胞外基質蛋白が好酸球浸潤に果たす役割を明らかにしてきた。本年度の研究では細胞間の相互作用をさらに解明する目的で、即時型反応において肥満細胞から多量に放出されるヒスタミンの好酸球に対する直接作用について検討した。

B. 研究方法

好酸球は末梢血から CD16 negative selection 法により分離した。ケモタキシスは Chemotaxigel™ を用いて検討した。各種濃度のヒスタミンまたは各種ヒスタミン受容体アゴニストを下室に添加、上室には好酸球を添加した。一部の実験では遊走実験の前に好酸球をヒスタミン受容体アンタゴニストと 30 分間反応させた。90 分後、下室に遊走した好酸球数を測定した。

好酸球上のヒスタミン受容体発現は ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いた定量的 PCR 法によって解析した。さらに、L 細胞に H4 受容体遺伝子導入を行って、H4 受容体を発現させ、ヒスタミン H4 受容体に夜機

能も同様に検討した。

C. 研究結果

ヒスタミンは濃度依存性に好酸球の遊走を誘発した (図 1A)。また、ヒスタミンを上室、下室、または上室と下室両方にそれぞれ添加して、遊走反応を検討すると、遊走は下室にヒスタミンを添加した時のみに認められ、ヒスタミンの遊走活性は Chemotaxis であると考えられた (図 1B)。

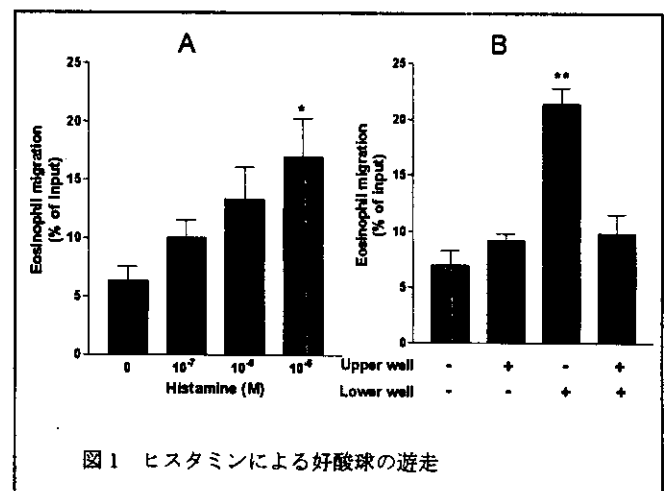


図1 ヒスタミンによる好酸球の遊走

好酸球に対する中心的なケモカインであるエオタキシンとの相互作用を検討すると、ヒスタミンの遊走活性はエオタキシンよりもやや少なかったが、両者は相加的に作用した (図 2)。

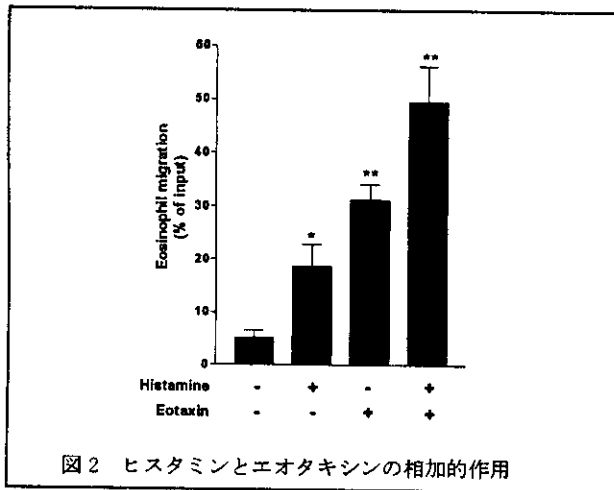


図2 ヒスタミンとエオタキシンの相加的作用

次に、各種ヒスタミン受容体アゴニストの効果を検討したところ、H1 アゴニスト 2-pyridylethylamine と H2 アゴニスト dimaprit は作用を持たなかったが、H3/H4 アゴニスト R- α -methylhistamine、H4 アゴニスト Clozapine は有意な遊走活性を示した(図3)。

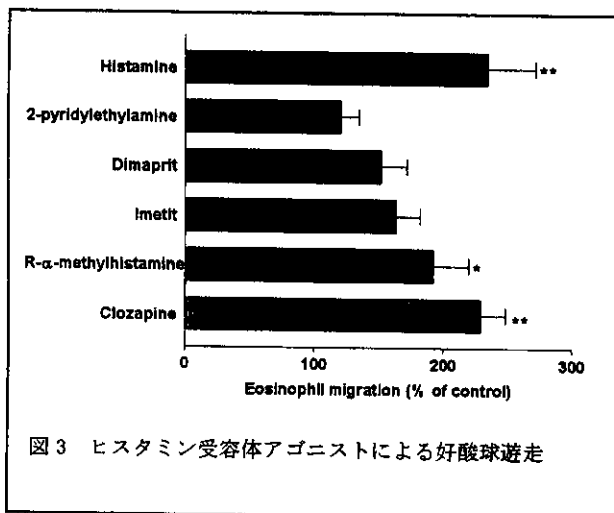


図3 ヒスタミン受容体アゴニストによる好酸球遊走

ヒスタミン誘発の好酸球遊走に対する受容体アンタゴニストの作用では、H1 アンタゴニスト pyrilamine と H2 アンタゴニスト cimetidine が抑制効果を持たないのに対して、H3/H4 アンタゴニストである thioperamide には有意な抑制作用が認められた(図4)。

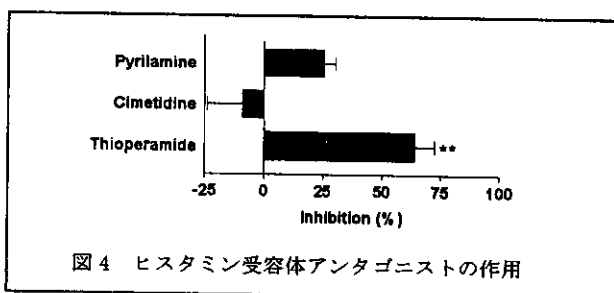


図4 ヒスタミン受容体アンタゴニストの作用

さらに、ヒスタミンによる好酸球遊走は百日咳毒素による前処理によって抑制されることも観察した。ここまでの検討で、ヒスタミンは好酸球の H3 または H4 受容体を介して遊走活性を持つ可能性が考えられたので、4 種のヒスタミン受容体の遺伝子発現を定量的 PCR により検討したところ、好酸球は H4 受容体を豊富に発現する一方、H3 受容体の発現はわずかであることが明らかになった(図5)。

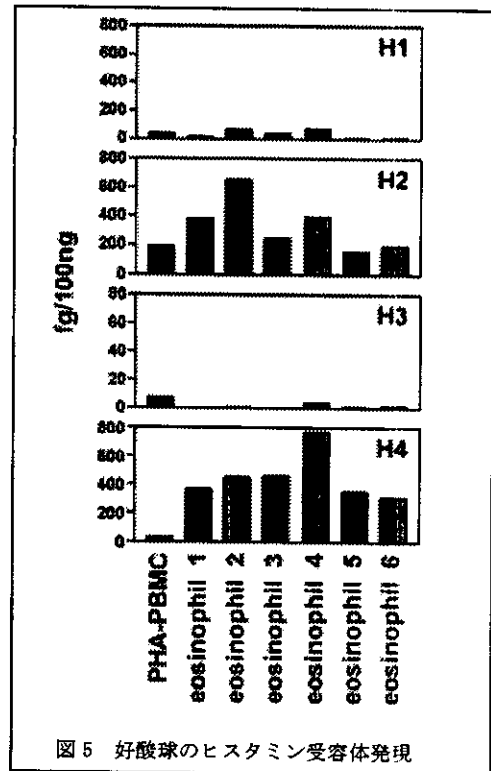


図5 好酸球のヒスタミン受容体発現

以上より、ヒスタミンは H4 受容体を介して、好酸球の遊走を起こすと結論した。さらに、H4 受容体の発現調節について検討したところ、好酸球の分化増殖に作用する IL-5 と GM-CSF が H4 受容体発現を増強することも観察した(図6)。

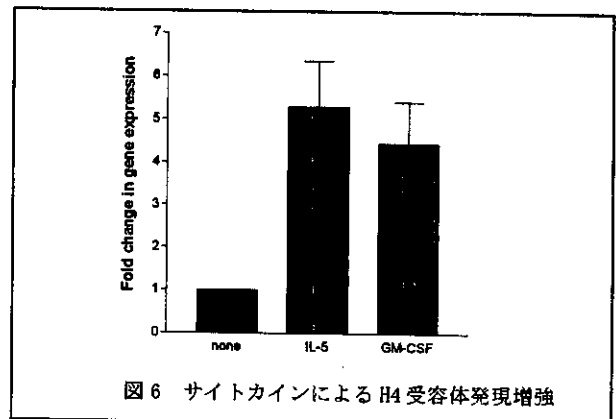


図6 サイトカインによる H4 受容体発現増強

さらに、L細胞にH4受容体を発現させると、ヒスタミンによる遊走を誘発できることも確認した(図7)。

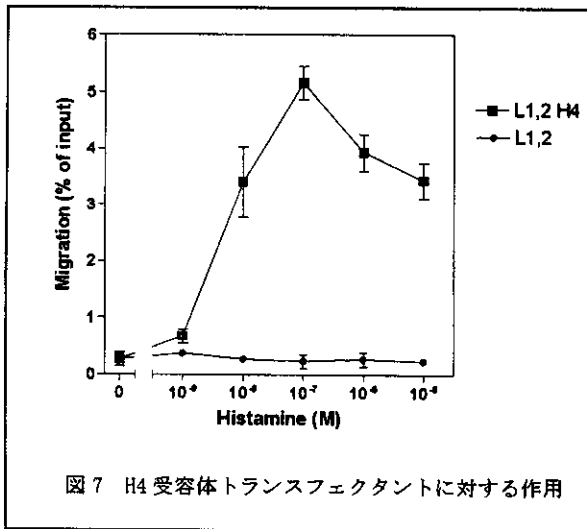


図7 H4受容体トランスフェクタントに対する作用

D. 考察

アレルギー反応では、肥満細胞の活性化に引き続いて、好酸球の浸潤が起こり、慢性炎症が形成される。肥満細胞からのメディエーターのうち、TNF, IL-5などのサイトカインやプロスタグランジンD2, ロイコトリエンなどの脂質メディエーターが好酸球の浸潤や活性化に関わることが明らかになっているが、主要なメディエーターのひとつであるヒスタミンが好酸球に対してどのような作用を持つかはこれまで不明であった。本研究ではヒスタミンが好酸球の遊走を直接引き起こすことをはじめで証明して、ヒスタミンが即時型反応のみならず、好酸球性炎症成立にも関与している可能性を明らかにした。

ヒスタミンはIgEを介する刺激により肥満細胞や好塩基球より多量に放出され、気道平滑筋の収縮、気道分泌亢進などを引き起こす即時型反応のメディエーターとして古くより知られている。その他にも多彩な生理活性を持ち、胃消化器系機能の制御、循環器系の制御、神経伝達物質として睡眠覚醒、食欲などの中枢神経系の制御などにも関与する。最近では、造血やTh1/Th2バランス制御など免疫系にも作用を持つことが明らかにされている。ヒスタミン受容体にはH1, H2, H3, H4の4種が同定されているが、H1は主に気道平滑筋などに発現してアレルギーの即時型反応に、H2は胃粘膜などに発現して消化管

機能の調節に、H3は神経系に発現して中枢神経系の機能調節に関与するとされている。免疫系ではTh1細胞にH1受容体が、Th2細胞にH2受容体が発現し、その機能調節に関わるとされる。また、最近クローニングされたH4受容体はH3受容体と構造的相同性をもつが、その発現は主に免疫細胞であり、とくに好酸球に強く発現していることが報告されている。しかし、H4受容体の機能については不明な点が多かった。

本研究ではヒスタミンによる好酸球遊走はアゴニスト及びアンタゴニストを用いた実験によって、H4受容体を介していることを示した。H4特異的なアンタゴニストは存在しないため、H3受容体を介する可能性も否定できなかったが、定量的PCRによる発現定量で、H4受容体がH3受容体より圧倒的に多く発現していること、H4受容体トランスフェクタントでもヒスタミンによる遊走が誘発されることから、遊走活性はH4受容体を介すると結論付けた。さらに興味深いことに、好酸球の分化増殖・活性化を起こすIL-5とGM-CSFがH4受容体発現を著しく増強することも観察し、アレルギー炎症の成立過程でヒスタミンを軸とした炎症増強経路が存在することも示唆された。

E. 結論

ヒスタミンはH4受容体を介して、好酸球遊走を引き起こす。今後H4受容体の機能がさらに解明され、H4特異的な阻害剤が開発されるならば、難治性喘息に対する新しい治療薬として有用である可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文

- 1) Fujisawa, T., Y. Kato, A. Terada, K. Iguchi, and H. Kamiya. 2002. Synergistic effect of theophylline and procaterol on interleukin-5-induced degranulation from human eosinophils. *J Asthma* 39:21-7.
- 2) Kato, Y., T. Fujisawa, M. Shibano, T. Saito, W. Gatto, H. Kamiya, K. Hirai, M. Sumida, and O. Yoshie. 2002. Airway epithelial cells promote transmigration of eosinophils in a new three-dimensional chemotaxis model. *Clin. Exp. Allergy* 32:889-897.

- 3) Fujisawa, T., R. Fujisawa, Y. Kato, T. Nakayama, A. Morita, H. Katsumata, H. Nishimori, K. Iguchi, H. Kamiya, P. W. Gray, D. Chantry, R. Suzuki, and O. Yoshie. 2002. 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.* 110:139-46.
- 4) Ohshima, N., H. Nagase, T. Koshino, M. Miyamasu, M. Yamaguchi, K. Hirai, K. Yamamoto, T. Fujisawa, N. Nakagawa, K. Kishikawa, and Y. Morita. 2002. A functional study on CysLT(1) receptors in human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 129(1):67-752.
- 5) 藤澤隆夫: サイトカイン・ケモカイン. 日本小児アレルギー学会誌 16:71-76, 2002
- 6) 藤澤隆夫: 気管支喘息治療のEBM- Controller DSCG. 小児科診療 65(8):1267-1274, 2002
- 7) 藤澤隆夫: 好酸球とロイコトリエン. 呼吸 21(7): s112-119, 2002
- 8) 藤澤隆夫: わかりやすい親への説明マニュアル アトピー性皮膚炎. 小児科診療 65(11), 2002

研究協力者

義江 修 (近畿大学細菌学)

中山隆志 (近畿大学細菌学)

加藤佳子 (リサーチレジデント)

2. 学会発表

- 1) Takao Fujisawa, Yoshiko Kato, Hisashi Nishimori, Hajime Katsumata, Jun Atsuta, Kosei Iguchi, Hitoshi Kamiya, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie. Histamine induces eosinophil chemotaxis, possibly through H4 receptor 58th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (Denver, USA) (2003.3.7-12)
- 2) Yoshiko Kato, Takao Fujisawa, Hisashi Nishimori, Hajime Katsumata, Jun Atsuta, Kosei Iguchi, Hitoshi Kamiya, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie. Roles of Extracellular Matrix Proteins in Eosinophil Chemotaxis (Denver, USA) (2003.3.7-12)
- 3) 藤澤隆夫. 「シンポジウム アレルギー炎症における好酸球の意義とその対応」好酸球と気道上皮細胞. 第14回日本アレルギー学会春期臨床大会. 千葉市. 2002.3.21

厚生科学研究費補助金（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・治療法開発に関する研究
分担研究報告書

成人難治性喘息の病態・機序、細胞要因

分担研究者 庄司 俊輔（国立療養所南福岡病院副院長）

研究協力者 西原 麻千子（九州工業大学大学院生命体工学研究科大学院生）
岡元 孝二（同上 教授）

研究要旨

気道患者の気道粘膜において組織の構造変化である「気道のリモデリング」は組織が傷害から修復へ向かう過程での1つの病態であり、組織を構成する上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、気道平滑筋細胞など全て関与するものと考えられる。本年度の研究ではこのうち気道平滑筋細胞に注目し、*in vitro*での細胞遊走実験によって気道リモデリング生成機序に関する基礎的検討を行った。その結果、平滑筋細胞がフィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンに対して遊走するがIII型コラーゲンには遊走しないことを報告した。またこの気道平滑筋細胞が気道上皮細胞、肺線維芽細胞、血管内皮細胞及び気道平滑筋細胞自身の培養上清に対する遊走活性を持つことを報告した。さらに血管内皮細胞及び気道平滑筋細胞自身の培養上清に含まれる気道平滑筋細胞遊走因子はフィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンであることが示唆された。今回の研究により、気道平滑筋細胞が気道リモデリングの生成に重要な役割を持つことが示唆された。

A. 研究目的

気道平滑筋細胞の肥厚は気管支喘息の病理組織学的特長であり、気道リモデリングの1形態として知られている。この気道平滑筋の肥厚は平滑筋細胞の肥大・増殖によって起こるとされ、遊走との関与は注目されていなかった。しかしながら近年平滑筋細胞の遊走を伴う増殖過程が提唱されたことにより、気道平滑筋の肥厚に平滑筋細胞の遊走が関与する可能性が示された。

平滑筋細胞を含め気道構成細胞である気道上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などは全てが活性化され傷害部位に遊走し、増殖しつつも細胞外基質因子（ECM）、サイトカイン等の遊走因子を産生して気道の修復やリモデリングに関与すると考えられる。そこで本研究では培養したヒト気管支平滑筋細胞を用いて、気道リモデリングへの気道平滑筋細胞遊走の関与を解明することを目的とした。

B. 研究方法

本実験に使用した細胞は正常ヒト気管支平滑筋細胞及び肺微小血管内皮細胞である。これらの正常ヒト細胞は全て米国クロティクス社（輸入元：三光純薬）より購入した。細胞培養上清は前述した2種類の正常ヒト細胞を培養ディッシュにコンフルエ

ントまで培養した後、ディッシュ中の培養液を無血清のものに置換して、37°C、5%CO₂条件下で一定時間培養することにより採取した。また遊走実験の標的細胞には、正常ヒト平滑筋細胞をサブコンフルエントに培養した後トリプシン処理により回収したものを使用した。なお標的細胞に対し細胞外基質因子による前処理が必要となる場合は、トリプシン処理により回収した後の細胞に細胞外基質因子を10 µg/mlとなるように添加して37°C、5%CO₂条件下で1時間プレインキュベートした。

遊走活性物質には細胞外基質因子及び各種細胞の培養上清を使用した。細胞外基質因子は米国シグマ社より購入したラミニン、フィブロネクチン、I、III及びIV型コラーゲンを10 µg/mlに溶解して使用した。遊走活性の測定には48穴ボイデンチャンバーを使用した。チャンバー下室に遊走活性物質を添加し、上室に1×10⁶cells/mlに調整した標的細胞の浮遊液を添加した。上室と下室との間は孔径8 µmの遊走膜によって隔てられている。このチャンバーを37°C、5%CO₂条件下で6時間インキュベートし、遊走膜の下室側に遊走した細胞のみをディフクイックで染色した。染色された細胞を倍率400倍に設定した光学顕微鏡で10視野測定し、その合計数を遊走活性と規定した。

C. 研究結果

1) 気道平滑筋細胞は血管内皮細胞及び気管支平滑筋細胞自身の培養上清に対して遊走した。これらの細胞培養上清の遊走活性は濃度依存性かつ細胞培養時間依存的に上昇することが確認された。(Fig1, 2.)

2) 気道平滑筋細胞に対する遊走活性をもつフィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンで前処理した気道平滑筋細胞を用いて気道平滑筋細胞及び肺微小血管平滑筋細胞培養上清に対する遊走を検討したところ、フィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンによる前処理は2種類の細胞上清に対する細胞遊走を抑制した。一方IV型コラーゲンによる前処理は細胞遊走を抑制しなかった。(Fig3)

D. 考察

近年平滑筋細胞の遊走を伴う増殖過程についての仮説が示された (Stewart AG, Airway Remodeling, 2001)。この仮説では、平滑筋細胞は結合織内へと遊走して筋線維芽細胞へと脱分化し、脱分化した筋線維芽細胞が更に遊走し線維芽細胞へと脱分化する。そしてこの線維芽細胞が増殖し筋線維芽細胞へと分化した後、この筋線維芽細胞が平滑筋細胞へと分化して遊走し平滑筋へと戻るとされている。

今回気道平滑筋細胞が気道の構成細胞である血管内皮細胞及び気道平滑筋細胞自身の産生物質により遊走する可能性が示された。これは上述した平滑筋細胞の遊走を伴う増殖過程において、これらの構成細胞の産生物質中に含まれる遊走因子により細胞遊走が始まり、その結果気道リモデリングで見られるような気道平滑筋細胞の肥厚が引き起こされていく可能性を示している。

今回我々は気道平滑筋細胞の遊走が確認された気道構成細胞の培養上清より血管内皮細胞及び気道平滑筋細胞自身の培養上清を取り上げ、培養上清中の平滑筋細胞遊走因子の検討を行った。気管支喘息の気道リモデリングにおいては血管新生が特徴的に見られることはよく知られているが、その血管内皮細胞が気道平滑筋に対する遊走因子を放出するかどうかはこれまで検討がなされていなかった。また気道平滑筋細胞についても気道平滑筋に対する遊走因子を出す、つまり自己分泌機構で遊走を活性化するのか明らかになっていない。我々はこれら2種類の気道構成細胞が産生している平滑筋細胞遊走因子として細胞外基質因子であるラミニン、フ

イブロネクチン、I型及びIV型コラーゲンが含まれているのではないかと考えた。これらの細胞外基質因子は気道粘膜における気道上皮下の基底膜及び結合織の主要構成物質であり、平滑筋細胞の遊走が既に確認されているためである。これらの細胞培養上清中にラミニン、フィブロネクチン、I型及びIV型コラーゲンが含まれ、かつこれらの細胞外基質因子に対する気道平滑筋細胞の遊走がレセプターを介した細胞内情報伝達により行われると仮定すると、遊走実験で用いる平滑筋細胞をこれらの細胞外基質因子で予め前処理してレセプターを飽和した状態にすれば、細胞培養上清に対する遊走は抑制されることが考えられる。この考えに基づき気道平滑筋細胞及び肺微小血管平滑筋細胞培養上清中の遊走因子にこれらの細胞外基質因子が含まれている可能性について検討したところ、ラミニン、フィブロネクチン、I型コラーゲンによる前処理が未処理時に比べて2種類の細胞上清に対する細胞遊走を抑制した。以上の結果より、血管内皮細胞及び気道平滑筋細胞自身の培養上清に含まれる気道平滑筋細胞遊走因子はフィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンであることが示唆された。

E. 結論

気道平滑筋細胞が気道上皮細胞、肺線維芽細胞、血管内皮細胞及び気道平滑筋細胞自身の培養上清に対する遊走活性を持つことを報告した。さらに血管内皮細胞及び気道平滑筋細胞自身の培養上清に含まれる気道平滑筋細胞遊走因子はフィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンであることが示唆された。

F. 研究発表

学会発表

気管支喘息での気道リモデリングにおける気管支平滑筋細胞の遊走

第52回日本アレルギー学会総会 (2002,11,28)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

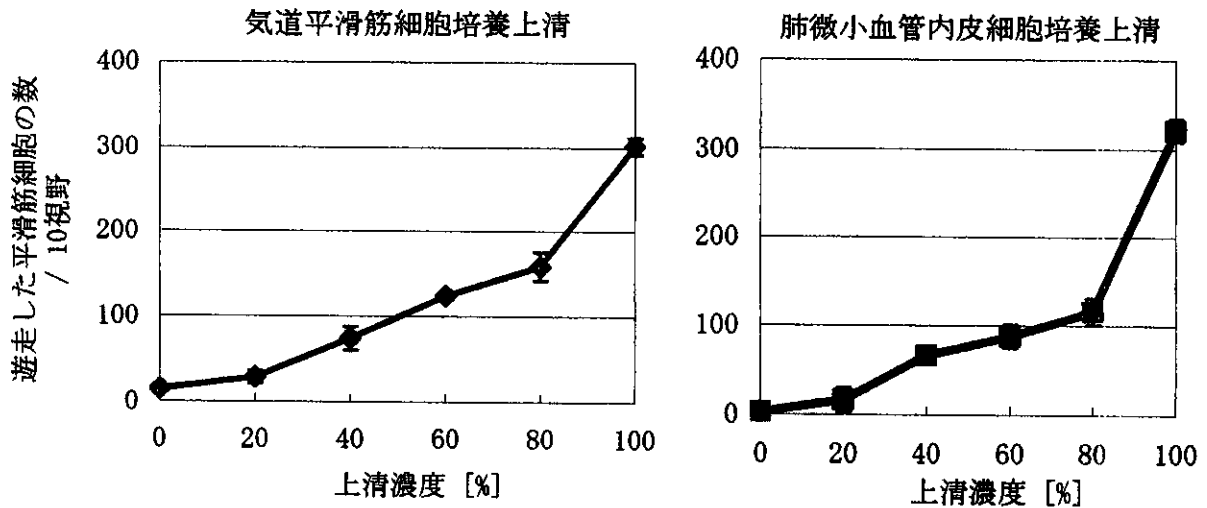


Fig1. 気道平滑筋細胞及び肺微小血管内皮細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走

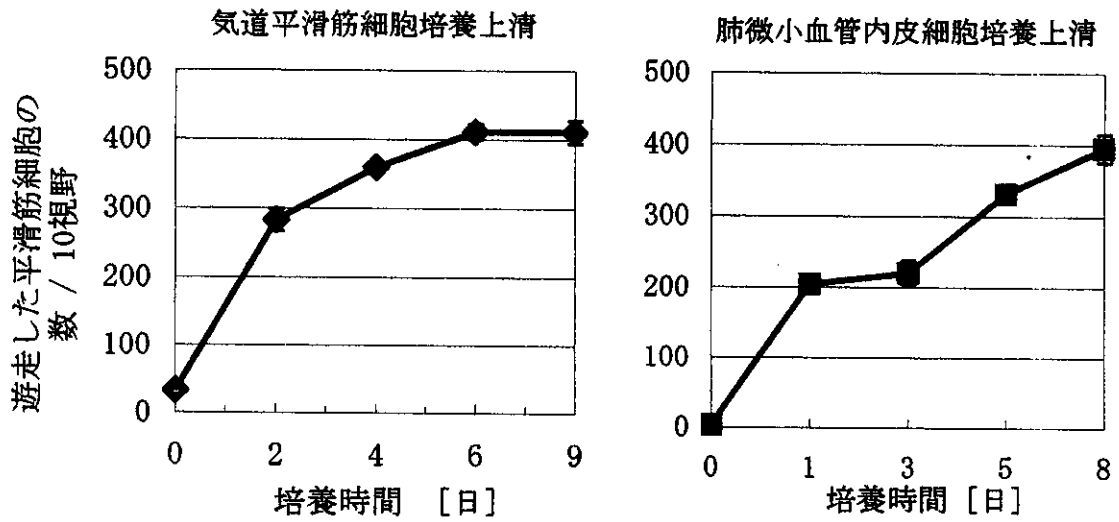


Fig2. 気道平滑筋細胞に対する気道平滑筋及び肺微小血管内皮細胞培養上清の経時的な遊走活性変化

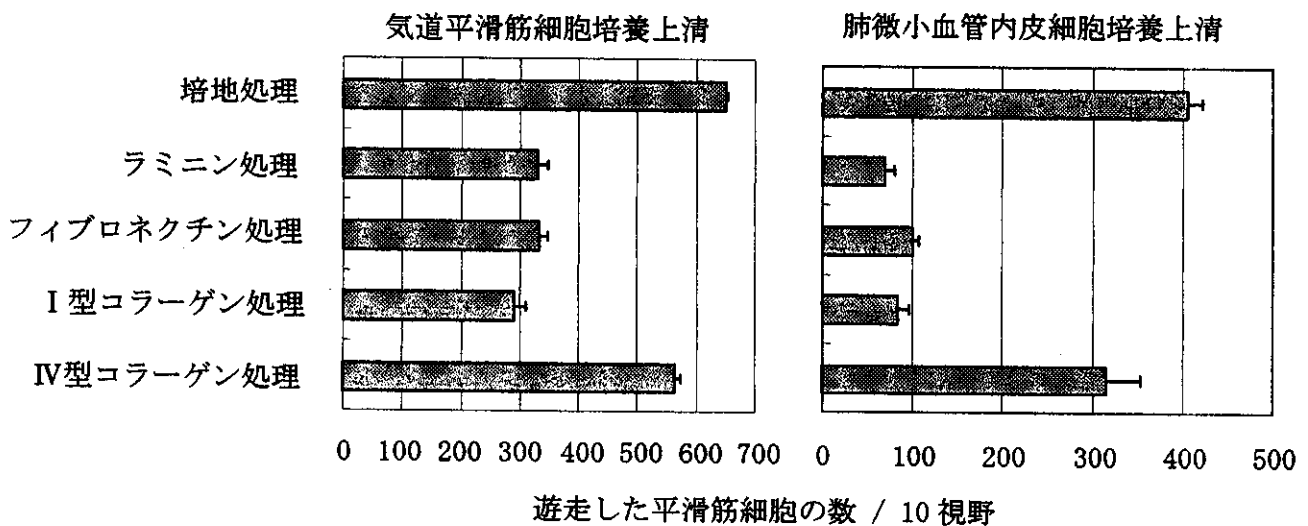


Fig3. 細胞外気質因子で前処理した気道平滑筋細胞に対する細胞培養上清の遊走活性

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）
分担研究報告書

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

分担研究者 高橋 清 国立療養所南岡山病院長

研究要旨

今年度は、難治性喘息のリンパ球の研究と粘膜免疫において重要な役割を有する $\gamma\delta$ T細胞の役割を喘息モデルマウスを用いた基礎的研究を行った。喘息患者の mite や *Candida albicans* の粗抗原と Acid protease に対するリンパ球幼若化反応並びに IL-5 産生は、軽・中等症よりも重症例で低下していたが、*Candida* による IL-5 産生能は難治群では著増し IL-10 は逆に低値であった。なお TARC 濃度も含め難治群の抗原に対するリンパ球反応性は不一致で、今度は難治病態別並びに個々の症例での検討が必要と考えられる。また、喀痰中の MMP-9 は重症例で高値を、その阻害酵素の TIMP-1 濃度は低値を示し、難治化との関連が示唆された。 $\gamma\delta$ T細胞は、innate immune system においては $\alpha\beta$ T細胞、B細胞非依存性機序により抗原曝露後の気道過敏性を抑制し、adaptive immune response においては $\alpha\beta$ T細胞と協調して抑制することが判明した。

研究協力者

宗田 良（国立療養所南岡山病院アレルギー科）
岡田千春（国立療養所南岡山病院アレルギー科）
木村五郎（国立療養所南岡山病院アレルギー科）
河田典子（国立療養所南岡山病院アレルギー科）

坂口 基（国立療養所南岡山病院アレルギー科）
金廣有彦（岡山大学医学部第2内科）
谷本 安（岡山大学医学部第2内科）

A. 研究目的

気管支喘息の治療法は進歩してきたが、依然副腎皮質ホルモンの全身投与が必要な難治性喘息患者の存在と、それに対する治療法は改善されていない。これは、難治化に至るメカニズムが十分に解明されていないためであり、治療法確立のためには解明の努力が必要とされる。

臨床的に難治性喘息と考えられる症例の多くは、原因抗原の明白でない非アトピー型喘息が占める。そこで、1, 2 年度の当研究で特異的 IgE 抗体の認められない非アトピー型喘息においても、アトピー型喘息と同じように気道における Th2 タイプのサイトカイン産生が亢進していること、また抗原刺激によるリンパ球の活性化が認められることを報告した。最終年度の今回は、難治性喘息患者における病態をリンパ球系の活性化、サイトカイン産生パターン、ケモカインの変動を解析するとともに、気道のリモデリングに関与する Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 及び Tissue inhibitors of MMP-1 (TIMP-1) を喀痰中で検討した。

一方、気管支喘息の病態において $\alpha\beta$ T細胞および好酸球が中心的な役割を果たしていると考えられているが、 $\gamma\delta$ T細胞は、個体発生上 $\alpha\beta$ T細胞よ

り早期に出現し、肺、腸管など外界との接触の多い上皮内に多数存在するため、粘膜免疫において重要な役割を果たしている可能性が報告されている。この $\gamma\delta$ T細胞がいかに気管支喘息の発症及び重症・難治化の機序に関与しているかは全く明らかにされていない。

そこでまず、 $\gamma\delta$ T細胞が気道過敏性及び炎症細胞浸潤をどのように制御しているかを明らかにする目的で、TCR- $\gamma\delta$ ⁺マウス、TCR- $\alpha\beta$ ⁺マウス及び TCR- δ , TCR- β に対するモノクローナル抗体を使用し $\gamma\delta$ T細胞の気管支喘息における役割を検討した。

B. 研究方法

1. 難治性喘息のリンパ球機能と気道リモデリングに関する検討

(1) 対象症例

国立療養所南岡山病院アレルギー科通院中の成人喘息症例 24 例(副腎皮質ホルモン 5mg/日以上)の全身投与を受けている難治性喘息患者 13 例、ガイドライン Step3/4 の中等症・重症患者 6 例、Step1/2 の軽症患者 5 例)を対象とした。

(2) 細胞培養およびリンパ球活性化指標のアッセイ

対象者よりヘパリン加末梢血 20ml を採取し、比

重遠心法にて末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cells :PBMC) を分離採取した。この PBMC を RPMI1640 で 1×10^6 /ml に調整し *Candida albicans* と、Del f 抗原を最終濃度で $20 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、7 日間 37°C 、5% CO_2 の環境で培養した。その後、DNA Cycle TEST™ PLUS DNA Reagen Kit (Becton Dickinson)を用いて培養細胞の細胞周期 S 期の割合を FACSCalibur にて解析した。その値を元に、リンパ球の活性化の指標として以下に示すように Stimulation Index (S.I.)を算出した。

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

S-phase cells(%) in control sample

(3)PBMC 上清中の IL-5, IL-10, thymus- and activation-regulated chemokine (TARC)測定

同様に PBMC を抗原添加で 7 日間 37°C 、5% CO_2 の環境で培養した。この培養上清を採取し、IL-5, IL-10, TARC 濃度を ELISA キット (R&D Co.) で測定した。

(4)喀痰中 MMP-9 及び TIMP-1 濃度アッセイ

5%食塩水による誘発法を用いて喀痰を採取した。喀痰は等量の生食と混和後超遠心にて上清を採取ストックした。この上清中の MMP-9 と TIMP-1 濃度を MMP-9 総量, active MMP-9, TIMP-1 ELISA キットにて測定した。

2.マウス $\gamma\delta\text{T}$ 細胞の役割に関する検討

TCR- $\gamma\delta^+$ マウス及び TCR- $\alpha\beta^+$ マウスを卵白アルブミン(OVA)で 2 回腹腔内感作後 OVA を 3 日間連続吸入曝露し、曝露 48 時間後にメサコリン (Methacholine; MCh)吸入に対する lung resistance (RL)及び dynamic compliance (Cdyn)を検討した。

(倫理面への配慮)

この研究に関して、国立療養所南岡山病院倫理委員会での承認を受け、対象患者からはインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1.難治性気管支喘息患者末梢血リンパ球の活性化とサイトカイン産生の検討:

気管支喘息患者末梢血の mite, *Candida albicans* の各種抗原に対するリンパ球の活性化の解析結果を Figure1 に示す。吸入ステロイドをプロピオン酸ベクロメサゾン (BDP) 換算で $400 \mu\text{g/日}$ まで使用する軽症の Step1/2 群より、 $400 \sim 1600 \mu\text{g/日}$ を使用する中等症、重症の Step3/4 群の方が S.I.で高値を示した。しかし、副腎皮質ホルモンの全身投与を必要とする難治群では、逆に Step3/4 群より低下していた。しかし、これら素抗原での反応は、抗原特異的

なものではなく酵素反応を表しているのではないかと批判がある。従って今回は mite 抽出精製抗原である Derf1, Derf2 と *Candida albicans* の抽出抗原である Acid-protease に対する反応も同時に解析した。結果は、S.I.の値は相対的に低下するものの素抗原と同様の反応を示し、これらのリンパ球の活性化は抗原特異的の反応を表していると考えられた。

この系での PBMC 培養上清中の IL-5 の濃度はリンパ球の活性化と必ずしも平行しなかった (Figure2)。Step1/2 群と Step3/4 群の間ではリンパ球の活性化と同様の傾向を示したが、難治群では逆に Step3/4 群より高値をとることが示された。特にこの傾向は *Candida* 抗原に対する IL-5 産生において顕著であった。また、同じ条件下での IL-10 濃度は難治群においては著明に低く (Figure3)、同じ細胞集団でもサイトカインの間で産生パターンに違いがあることが推測された。

さらに同じ環境下での PBMC 培養上清中の Th2 細胞特異的ケモカインである TARC 濃度は、mite 抗原では Step1/2 の軽症群で高く、*Candida* 抗原では Step3/4 の中等症、重症群で高い傾向を示した (Figure4)。しかし、難治群では両抗原に対する TARC 濃度の上昇は低く、難治群における TARC の関与の低さを示唆するものであった。ただし、同じ難治症例における血清中の TARC 濃度は高く (Data not shown)、PBMC の培養実験での産生パターンとの乖離が認められた。

一方、気道リモデリングの関与を検討するために喀痰中 MMP-9 濃度を Figure5 に示す。軽症間欠型の Step1 では低値であるが、Step2~4 の中等症・重症型では上昇傾向を示すが統計上有意差は認めなかった。また MMP-9 の阻害酵素である TIMP-1 濃度は重症例になるほど低値を示す傾向があり (Figure6)、相対的には重症例ほど MMP-9 の活性が高い可能性が示唆された。

OVA で感作・曝露した wild type マウスでは気管支喘息患者と同様に有意な気道過敏性の亢進、気道局所における好酸球及びリンパ球の浸潤、さらに BALF 中 IL-4, IL-5 などの Th2-type サイトカイン及び血清中 OVA 特異的 IgE 抗体の産生亢進、また気道上皮の goblet cells の増加を認めた。これに対し、適応免疫応答 (Adaptive immune response) である TCR- $\alpha\beta^+$ マウスは予想どおり気道過敏性は有意に低値でしかも気道局所への炎症細胞浸潤も認められなかったが、TCR- $\gamma\delta^+$ マウスの気道過敏性は感作・曝露および曝露のみの両群において有意に亢進し、さらにストレインの異なる BALB/c マウスに対

する anti-TCR- δ モノクローナル抗体投与においても同様の結果が得られた (Figure7)。しかしこの TCR- $\gamma\delta$ ⁺マウスの BALF 中好酸球数は、感作・曝露群において曝露のみの群より有意に増加しているものの、wild type である C57BL/6 と比較して有意に低値であり、また TCR- $\gamma\delta$ ⁺マウスの IL-4, IL-5 産生は感作・曝露群において曝露のみの群より増加していたが、C57BL/6 マウスとの間には有意な差は認められなかった。一方自然免疫応答 (Innate immune response) である曝露のみの群では TCR- $\gamma\delta$ ⁺マウス及び C57BL/6 マウス共に BALF 中好酸球数の増加、IL-4, IL-5 レベル及び血清中 OVA 特異的 IgE レベルの亢進は認められなかった。さらに TCR- $\alpha\beta$ ⁺マウスを anti-TCR- δ モノクローナル抗体で処理すると、曝露のみの群においても好酸球と無関係に気道過敏性の有意な亢進が認められた (Figure8)。

D. 考察

13 年度の結果では、重症難治群でも抗原特異的なリンパ球の活性化、IL-5 などの Th2 サイトカインの産生亢進が認められる症例があることが示されたが、そのリンパ球の活性化、IL-5 産生、TARC 濃度の亢進パターンは必ずしも一致しない。この矛盾は、mite・Candida などの抗原に対するリンパ球の反応性が異なるのか、あるいは非アトピー型喘息に関与する可能性が示唆されている IL-5 産生 CD8⁺T 細胞の関与があるのかもしれない。これは、重症難治群での PBMC 上清中の Th2 細胞特異的ケモカインである TARC 濃度が低値であることから推測される。また、重症難治化に大きな影響を与えると思えるリモデリングについては、喀痰中 MMP-9 濃度、TIMP-1 濃度より重症例においてこれらの酵素の関与が推測されるものである。

一方、気管支喘息において airway function を制御している機序は複雑で、未だ完全には解明されておらず、その解析が難治性喘息の予防・治療に有用であることは論を待たない。その目的で今回 TCR- $\gamma\delta$ ⁺マウスや anti-TCR- δ モノクローナル抗体を用いて、気道過敏性への $\gamma\delta$ TCR 細胞の役割を検討したところ、 $\gamma\delta$ T 細胞は innate immune system においては $\alpha\beta$ T 細胞及び B 細胞非依存性機序により抗原曝露後の気道過敏性を、一方 adaptive immune response においては $\alpha\beta$ T 細胞と協調して気道過敏性を down-regulate している可能性が考えられた。

E. 結論

難治性喘息のリンパ球の活性化や IL-5 産生能は

一定のパターンを示さず、難治病態・症例ごとに mite, Candida などの抗体への反応性が異なることや、TARC 濃度が低値であることから CD8⁺T 細胞の関与する可能性、並びに気道リモデリングに関する酵素との関連を、難治病態・症例別に詳細に検討することが今後の課題であろう。また、粘膜免疫の観点から注目されつつある $\gamma\delta$ TCR 細胞が気道過敏性を制御することから、難治病態と $\gamma\delta$ TCR 細胞細胞の機能低下が示唆され、今後の大きな検討課題と考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 足立 満, 高橋 清, 玉置 淳, 江頭洋祐. 難治性喘息と漢方. 漢方医学 26: 252-262, 2002
- 2) Kanehiro A, Lahn M, Makela MJ, Dakhama A, Joetham A, Rha YH, Born W, and Gelfand EW: Requirement for the p75 TNF- α receptor (TNFR2) in the regulation of airway hyperresponsiveness by $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol.* 169:4190-4197. 2002.
- 3) Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Joetham A, Schwarze J, Kohler G, O'Brien R, Gelfand EW, and Born W. Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nature Med* 5:1150-6. 1999.

2. 学会発表

- 1) 高橋 清. 気管支拡張剤の使い方. 第 14 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002
- 2) 岡田千春, 谷本 安, 金廣有彦, 高橋 清. 難治化の要因とその対策 -成人-. 第 14 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002
- 3) 高橋 清, 岡田千春, 木村五郎, 谷本 安, 岡野光博. 上気道と下気道の関連性 One airway, one disease -疫学-. 第 14 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002
- 4) 平野 淳, 岡田千春, 高橋 清. Pirfenidone のマウス喘息モデルにおける気道過敏性及び気道炎症に対する抑制効果の検討. 第 14 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002
- 5) 高橋 清. 真菌抗原と難治性喘息. 第 52 回日本アレルギー学会総会, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Figure 1 リンパ球の活性化

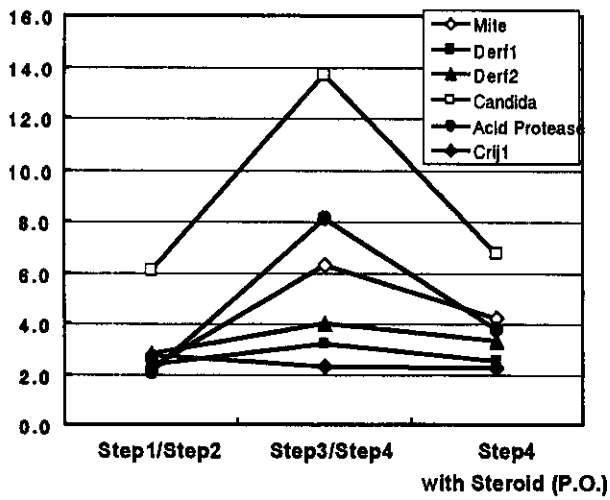


Figure 2 IL-5産生

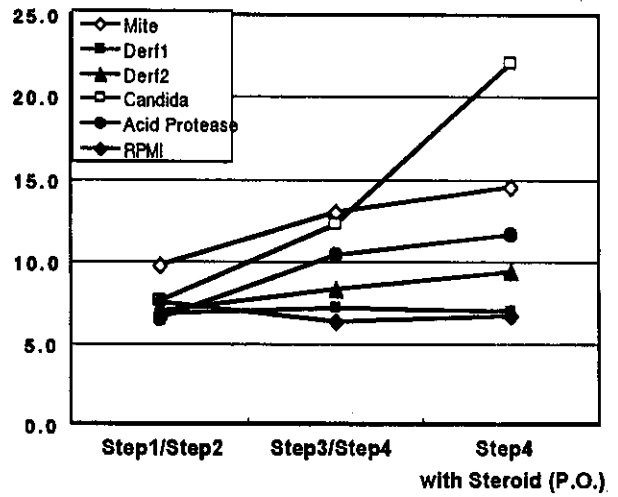


Figure 3 IL-10産生

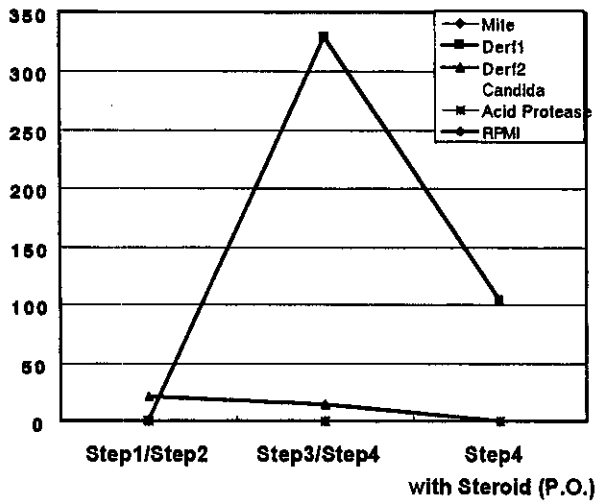


Figure 4 TARC濃度

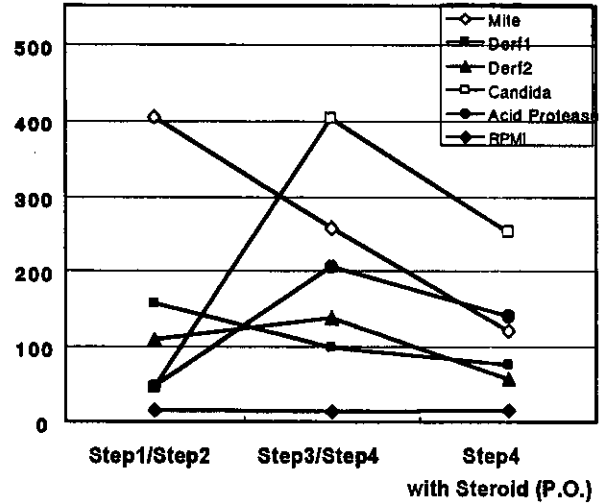


Figure 5 喀痰中MMP9濃度

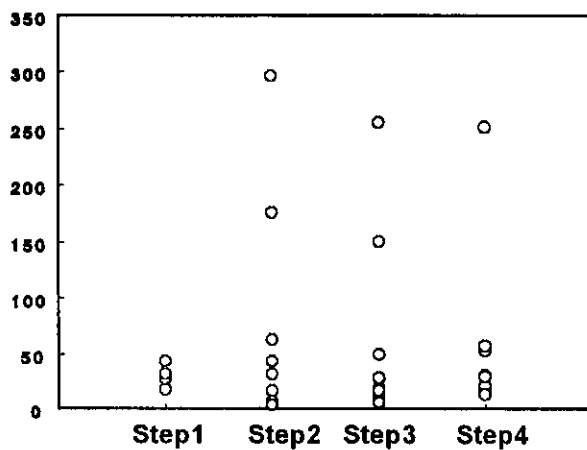


Figure 6 喀痰中TIMP-1濃度

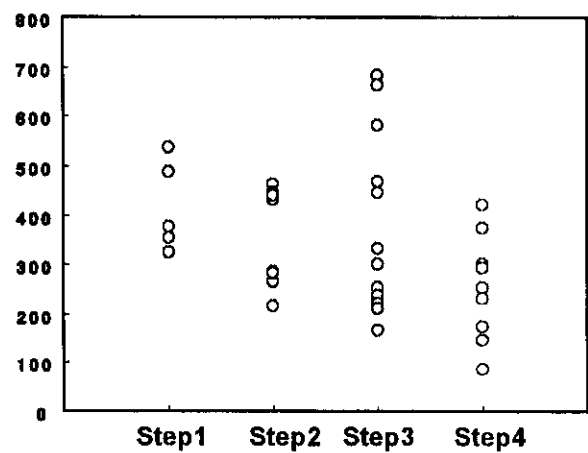
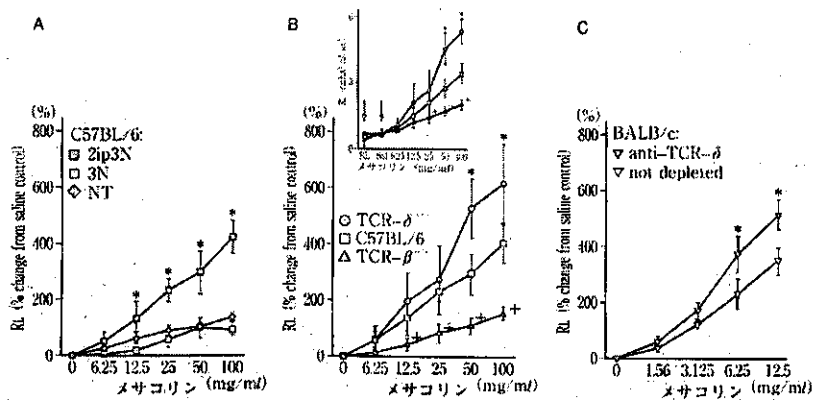


Figure.7

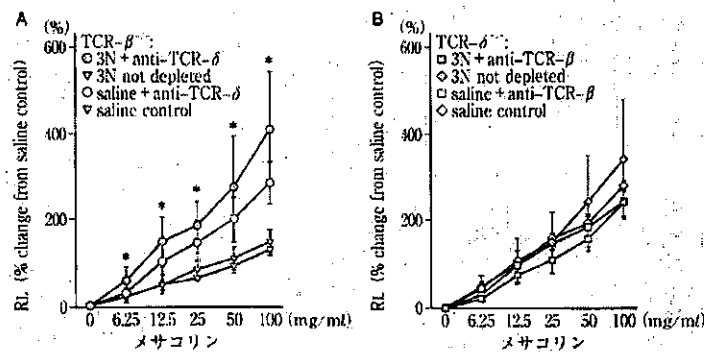
蛋白アルブミン (OVA) で感作, 暴露した TCR- α $\beta^{-/-}$ および TCR- γ $\delta^{-/-}$ マウス (C57BL/6 マウス由来) の気道過敏性の解析



- A: C57BL/6 マウス OVA 感作・暴露群 (2ip3N), OVA 暴露群 (3N), 無処置群 (NT) のメサコリン吸入に対する気道過敏性 (RL)
- B: C57BL/6, TCR- α $\beta^{-/-}$ および TCR- γ $\delta^{-/-}$ マウス OVA 感作・暴露群 (2ip3N) のメサコリン吸入に対する気道過敏性 (RL)
- C: BALB/c マウス OVA 感作・暴露群 (2ip3N) の抗 TCR- δ モノクローナル抗体投与群 (anti-TCR- δ), 非投与群 (not depleted) におけるメサコリン吸入に対する気道過敏性 (RL)

Figure.8

TCR- α $\beta^{-/-}$ および TCR- γ $\delta^{-/-}$ マウスに対する抗 TCR モノクローナル抗体投与群のメサコリン吸入に対する気道過敏性 (RL) の解析



- A: 卵白アルブミン (OVA) で暴露のみ施行した群 (3N) の TCR- α $\beta^{-/-}$ マウスに対する抗 TCR- δ モノクローナル抗体投与群 (3N+anti-TCR- δ), 非投与群 (3N not depleted) および生理食塩液で暴露のみ施行した群の TCR- α $\beta^{-/-}$ マウスに対する抗 TCR- δ モノクローナル抗体投与群 (saline+anti-TCR- δ), 非投与群 (saline control).
- B: 卵白アルブミン (OVA) で暴露のみ施行した群 (3N) の TCR- γ $\delta^{-/-}$ マウスに対する抗 TCR- β モノクローナル抗体投与群 (3N+anti-TCR- β), 非投与群 (3N not depleted) および生理食塩液で暴露のみ施行した群の TCR- γ $\delta^{-/-}$ マウスに対する抗 TCR- β モノクローナル抗体投与群 (saline+anti-TCR- β), 非投与群 (saline control).

小児気管支喘息の病態・機序と難治化の予防・治療法の開発に関する研究

分担研究者 赤坂 徹 (国立療養所八戸病院 院長)

分担研究者 藤澤隆夫 (国立療養所三重病院 臨床研究部長)

研究要旨

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、国立病院・療養所7施設から58名(男36、女22)を入院反復群と、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。重症例は初診時で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。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

国立病院・国立療養所の小児科を対象として、治療が困難な気管支喘息(難治性喘息)に関する調査用紙を配布し、最近3年間に3回以上反復入院した反復群、1年以上の長期入院した長期群に分けて検討する。

〔倫理面への配慮〕

調査の目的に賛同した医師が、自分の施設での実態を記載したもので、喘息児の個人情報とは完全無記名で記載された。

C. 研究結果

国立病院(国病と略)は21/63施設、国立療養所(国療と略)は28/67施設から回収され、回収率はそれぞれ41.8%、33.3%であった。小児喘息を診療していない9施設(国病4、国療5)、難治性喘息症例がない23施設(国病13、国療10)を除く7施設(国病4、国療13)から58名(国病17、国療41)が登録された。男女はそれぞれ36名、22名であった。

予後が未記入であった2名を除いて、反復群の26名と、長期入院の27名と反復・長期入院の3名を合わせた長期群30名を比較した。発症年齢はそれぞれ 2.0 ± 1.3 歳、 3.1 ± 2.2 歳($p < 0.05$)、発作増悪時の年齢は 4.7 ± 3.1 歳、 7.6 ± 3.7 歳($p < 0.01$)、調査時年齢は 7.4 ± 3.8 歳、 12.5 ± 2.7 歳($p < 0.001$)であり、年齢はいずれも長期群が有意に高かった。

アレルギー疾患の家族歴、既往歴、合併症の頻度には有意差はなかった。難治化要因は反復群で95.8%、長期群で100%に認められ差はなかった。喘息発作では反復ないし長期入院はそれぞれ63.6%、65.4%、大発作を反復するものが54.5%、48.1%、抗原への大量曝露が29.2%、20.0%で有意差はなかったが、感染症により悪化するものが45.8%、0%で反復群に多かった($p < 0.005$)。治療薬に関することでは、投与量不足がそれぞれ26.9%、17.9%、選択の過誤が23.1%、14.8%、治療法の過誤(例えば吸入法が未熟)が8.3%、11.1%で有意差はなかった。喘息児については、やる気がないが19.2%、32.1%であり、保護者の無理解は23.1%、21.4%、世話をしないが15.4%、32.1%であり、いずれも有意差がなかった。心理社会的要因では、心理的ストレスが25.0%、50.0%($p < 0.1$)、家族関係では28.0%、59.3%($p < 0.025$)で長期群に多かった。他の人間関係では9.1%、26.9%で有意差はなかった。重症の頻度は初診時にはそれぞれ15.4%、46.7%で長期群に多く($p < 0.025$)、増悪時には38.4%、13.3%と逆転して長期群に少なかった($p < 0.05$)。血清総IgE値は初診時にはそれぞれ 258.3 ± 268.4 、 1895.6 ± 2679.4 IU/ml ($p < 0.025$)、増悪時には 601.0 ± 749.3 、 1452.6 ± 1436.0 IU/ml ($p < 0.05$)でいずれも長期群に高かった。治療内容として、増悪時にベクロメタゾン、フルチカゾンを導入していたが、環境改善や鍛錬療法の併用には施設間で差が見られなかった。

D. 考察

松井は日本アレルギー学会小児科専門医を対象とした調査から、難治性喘息を「最近1年間でステロイドを使用せざるを得なかった月において、経口でプレドニゾン換算量で1日5mg、あるいは隔日で10mg以上、ベクロメタゾンは400 μ g以上、静注

では発作の度毎に必要な」と定義した。本研究における国立医療機関の小児科を対象とした調査では難治性喘息が少なかった。そこで、喘息発作のために入院を反復したり、長期入院が必要だった症例を集めて検討した。治療内容を検討した結果からも、難治性喘息とするより、その予備群と考えられる。喘息治療・管理ガイドラインの普及により、吸入ステロイド薬や抗ロイコトリエン薬が長期管理薬として使用されている現在、厳密な定義での難治性喘息は少なくなった。この状況では反復・長期入院群の検討が難治化を予防するために重要になると考えられる。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 赤坂徹、小田嶋博：気管支喘息（小児）、西間三馨 監修、心身症診断・治療ガイドライン2002、協和企画、東京都、2002、pp. 184 - 197
- 2) 赤坂徹、近藤直実：小児気管支喘息の心理療法、QOL、小児気管支喘息治療・管理ガイドライン2002、古庄巻史、西間三馨 監修、協和企画、東京都、2002、pp. 108 - 118
- 3) 白崎和也、赤坂徹：気管支喘息児のライフイベントと施設入院療法について、小児科臨床 55:1003 - 1009, 2002

2. 学会発表

- 1) 赤坂徹：会長講演「小児心身症としてのアレルギー疾患」、第39回日本小児アレルギー学会、平成14年11月1日（盛岡市）
- 2) 赤坂徹、松井猛彦、西間三馨、鳥居新平、三河春樹：小児喘息の実態から見た喘息死対策、ポスターワークショップ8 喘息死—実態とその対応—、第14回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成14年3月23日（千葉市）

〔研究協力者〕

- 増田 敬(元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(国立療養所青森病院アレルギー科医長)
白崎和也(国立療養所秋田病院小児科医長)
杉本日出雄(国立療養所東埼玉病院小児科医長)
関根邦夫(国立療養所下志津病院小児科医長)

気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と難治化の予防・治療法の開発に関する研究

—喘息に関連する遺伝子多型の解析—

分担研究者：大田 健（帝京大学医学部内科教授）

気管支喘息の難治化に係わる遺伝子多型を解析する目的で気道過敏性に関係するムスカリン受容体、アレルギー炎症に関連するFcε受容体、ケモカイン受容体の遺伝子多型およびトロンボキサンの変換酵素の遺伝子マーカーを検討した。その中で産生増加の機能と結びついている、TARCの遺伝子多型の頻度が、有意差はないものの難治性喘息で高い傾向を示した。さらに血清レベルを検討すると、難治性喘息でエオタキシンおよびTARCの産生量が有意に増加しており、さらに検討をすすめるターゲットであることが示された。

研究協力者：森田 寛（お茶の水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（日本大学医学部先進医学総合センター教授）、太田康男（東京大学医学部附属病院感染内科助手）、山下直美（帝京大学医学部内科助教授）、

上原誉志夫（東京大学保健管理センター助教授）、石井 彰（東京大学医学部附属病院中央検査部講師）、

土屋尚之（東京大学医学部大学院医学系研究科人類遺伝学助教授）、越野 健（東京大学保健センター助手）、山本寿子（帝京大学医学部内科研究生）、中島幹夫（帝京大学医学部内科助手）

A. 目的

気管支喘息の難治化および寛解を規定する遺伝子多型を解析し、根本的治療につながる標的とその制御法を確立することを最終的な目標とした。アレルギー反

応の面ではFcεRI遺伝子の多型、気道炎症の側面ではトロンボキサン合成酵素遺伝子の多型、ケモカイン受容体として好酸球のCCR3およびTh2細胞のCCR4各遺伝子の多型、アレルギー性炎症で重要なサイトカインであるエオタキシンおよびTARCの産生、気道過敏性の面からムスカリン受容体の多型を検討することとした。

B. 方法

1. 成人喘息症例 103例、2. 成人の小児喘息寛解症例 77例 3. 成人難治性喘息症例 50例 4. 健常人 96例を対象にEDTA採血し、単核球分画よりDNAを採取した。同時に各群の患者について発作歴を聴取した。背景として、総IgE、IgE RAST（吸入系：ハウスダスト、ダニ、ブタクサ、ネコ毛、ゴキブリ）、好酸球数を検討した。ムスカリンのM2、M3の多型をダイレクトシーケンス法 polymerase chain reation (PCR)-restriction fragment length polymorphism(PFLP)法で解析した。また、PCR-SSCP法でFcεRI鎖のエクソン1-7の遺伝子多型を解析した。トロンボ

キサソA2合成酵素 (TXAS) の多型性については、TXAS遺伝子の存在する遺伝子の近傍に存在するD7S684遺伝子をマーカーにした遺伝子解析を行なった。

血清中Eotaxin、TARC濃度の測定は既報の如くELISAにより行った。

Eotaxin遺伝子プロモーター領域のSNP (-384 A>G)、TARC遺伝子プロモーター領域のSNP (-431 C>T) については、既報の如く各々、*TthHB8I*、*SalI*を制限酵素として、RELP法で行った。

C. 結果 およびD. 考察

M2受容体については1050番目に塩基がAからGに置換されているSNPが同定できた。各群での頻度に差異はなかった(図1)。女性において喘息継続例で変異の頻度が少なく、マーカーと成り得る可能性が考えられさらに検索を進めている。

FcεRI遺伝子は237の野生型はGluであるがGlyに変異しているタイプが存在するが、難治性喘息で特にアレル頻度の差異は認めなかった。

トロンボキサソA2合成酵素 (TXAS) の多型性については、D7S684遺伝子をマーカーにした遺伝子解析を行い、CA repeatsの異なった6種類のホモ多型(CA18, 19, 22, 23, 24, 25)を認め、非寛解例ではCA24ホモ多型が多く、寛解例では少なく、マーカーとして使用できることが示唆された。

血漿Eotaxin、TARC濃度は(a)outgrow群と健常人群、小児発症・成人継続群間で血漿Eotaxin、TARC濃度に有意な差はなかった。(b)成人難治性喘息群は、健常人、成人発症・成人継続群に比べ、有意に高い血漿Eotaxin、TARC濃度を示した(図2)。

(c)健常人atopy群、non-atopy群とも血漿Eotaxin濃度とTARC濃度の間に相関を認

めたが、Eotaxin濃度、TARC濃度とIgE値、好酸球数の間には相関はなかった。

(d)成人発症・成人継続群では血漿Eotaxinと好酸球数、IgE値の間に逆相関が認められた。一方、小児発症・成人継続群では、これらの相関を認めなかった。また、outgrow群ではこれらの間の逆相関に加え、TARC濃度と好酸球数も有意に相関していた。一方、TARC SNPのアレル頻度はIgE値、好酸球数と有意に関連しなかったが、TTのホモタイプ、CTのヘテロタイプはCCのホモタイプに比べ血漿TARC濃度が有意に高かった(CC; 60 ± 6.7 、CT; 90 ± 7.9 、TT; 84 ± 10.3 pg/ml、CC vs CT; $p < 0.01$ 、CC vs TT; $p = 0.02$)。SNPと機能が結びついていることがわかった。TARCのSNPとエオタキシンのSNPを組み合わせると難治性喘息でアレル頻度が高い傾向を示した(図3)。

E. 結論

ステロイド依存性の難治性喘息の難治化要因を明かにする目的でSNPの検討を行った。TARCのSNPについてエオタキシンのSNPと組み合わせると難治性喘息で高い傾向を示した。表現型として、血漿レベルを検討したところ、難治性喘息で高い傾向を示し、今後さらに検討を続けるターゲットとして有望であることが考えられた。

Miyamasu, M., T. Sekiya, et al. (2001). "Variations in the human CC chemokine eotaxin gene." *Genes Immun* 2(8): 461-3.

Nishiyama, C., M. Hasegawa, et al. (2002). "Regulation of human Fc epsilon RI alpha-chain gene expression by multiple

transcription factors." J Immunol 168(9): 4546-52.

Sekiya, T., M. Miyamasu, et al. (2000). "Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation- regulated chemokine by human bronchial epithelial cells." J Immunol 165(4): 2205-13.

Sekiya, T., Y. Tsunemi, et al. (2003). "Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene." Immunogenetics 54(10): 742-5.

Shimokawa, T. and C. Ra (2003). "C/EBPalpha and Ets Protein Family Members Regulate the Human Myeloid IgA Fc Receptor (FcalphaR, CD89) Promoter." J Immunol 170(5): 2564-72.

Yamaguchi, M., K. Hirai, et al. (2001). "Regulation of mouse mast cell surface Fc epsilon R1 expression by dexamethasone." Int Immunol 13(7): 843-51.

Yamamoto, T., N. Yamashita, et al. (2002). "Mutation screening of the muscarinic m2 and m3 receptor genes in asthmatics, outgrow subjects, and normal controls." Ann Genet 45(3): 109-13.

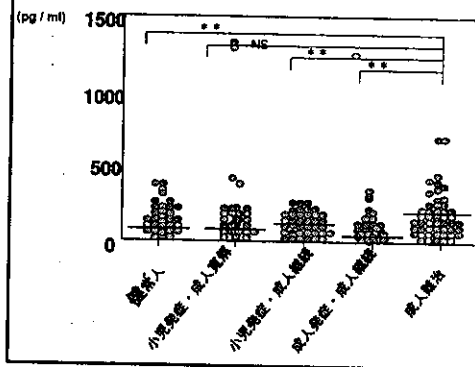
Yamashita, N., K. Sekine, et al. (2001). "Platelet-derived growth factor is involved in the augmentation of airway responsiveness through remodeling of airways in diesel exhaust particulate-treated

mice." J Allergy Clin Immunol 107(1): 135-42.

図1 M2のSNPの頻度

	(wild homo)	(hetero)	(mut homo)
健康人(n=119)	102(85.7%)	16 (13.4%)	1(0.8%)
Outgrow(n=65)	56 (86.2%)	9 (13.8%)	0(0%)
喘息(n=101)	90(89.1%)	11 (10.9%)	0(0%)
喘息難治(n=50)	42(84.0%)	7 (14.0%)	1(2.0%)

図2 血漿中 TARC



TRAC SNP (T positive)

Eotaxin-384 (-)	G (+)	G
難治性喘息(n=29) 14 (48.3%)	15 (51.7%)	
非難治性喘息 (n=66) (57.6%)	28 (42.4%)	38

X²検定 p=0.068