

20030657

厚生労働科学研究研究費補助金

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機序の解明と  
予防・治療法の開発に関する研究 (H15-免疫-007)

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 晶夫

平成 16 (2004) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

気管支喘息の難治化機序の解明と予防・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機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究	7
森 晶夫	
2. 気道平滑筋細胞におけるメディエーター受容体の 発現調節作用に関する研究	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. 気道炎症蔓延化と気道リモデリングに果たす 好酸球の役割に関する研究	20
藤澤隆夫	
5. 難治性喘息のリモデリング機序 細胞要因と治療に関する研究	24
庄司俊輔	
6. 重症アレルギー疾患の難治化機序に基づく 治療法の確立に関する研究	27
高橋 清	
7. 難治性喘息の治療のターゲットとしての増殖因子の検討	36
大田 健	
8. マウス気道過敏性発症に関する責任遺伝子の同定 に関する研究	39
永井博弐	
9. 喘息・アレルギーの発症と重症化に関わる遺伝子 に関する研究	43
烏帽子田 彰	

## 気管支喘息の難治化機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究

主任研究者 森 晶夫

国立相模原病院臨床研究センター部長

### 分担研究者

高橋 清 (国立療養所南岡山病院院長)

相沢久道 (久留米大学医学部第一内科教授)

藤澤隆夫 (国立療養所三重病院臨床研究部長)

永井博弐 (岐阜薬科大学学長)

庄司俊輔 (国立療養所南福岡病院副院長)

柳原行義 (国立相模原病院臨床研究センター部長)

大田 健 (帝京大学医学部内科教授)

烏帽子田彰 (広島大学公衆衛生学講座教授)

### 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)

谷口正実 (国立相模原病院臨床研究センター室長)

藤澤知恵 (国立相模原病院臨床研究センター)

谷本 安 (岡山大学第2内科講師)

金廣有彦 (岡山大学第2内科)

平野 淳 (国立療養所南岡山病院アレルギー科)

岡元孝二 (九州工業大学大学院生命体工学研究科教授)

木下祐一 (久留米大学医学部第一内科)

梶原景一 (国立相模原病院臨床研究センター)

中野純一 (帝京大学医学部内科講師)

田中宏幸 (岐阜薬科大学薬理学教室助手)

三田晴久 (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)

宗田 良 (国立療養所南岡山病院副院長)

岡田千春 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医長)

木村二郎 (国立療養所南岡山病院アレルギー科医師)

西原麻千子 (九州工業大学大学院生命体工学研究科)

古賀文晴 (久留米大学医学部第一内科講師)

山本ひとみ (国立相模原病院臨床研究センター)

山下直美 (帝京大学医学部内科助教授)

稲垣直樹 (岐阜薬科大学薬理学教室助教授)

中村裕之 (高知大学医学部環境医学科教授)

### 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、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、リモデリングの諸要因が解析された結果、1) IL-5 産生テストは、「T 細胞アレルギー」同定法として有用であること、また、遅発型喘息反応は、即時型とは独立した、細胞性免疫に依存したアレルギー反応と考えられること、2) 重症化要因は、症例毎に多様であるが、その相違点に基づき Burning type と Burn out type に大別できれば、より具体的な治療法・予防法が可能となること、3) 喘息のコントロール不良は気道リモデリングを促進し、喘息の難治化の原因になること、4) 組織破壊に伴って遊離する細胞外基質蛋白が好酸球浸潤を増強し、増悪に関与すること、また、即時型反応のメディエータであるヒスタミンが好酸球浸潤を制御すること、5) 気道リモデリングに関与する好酸球由来の TGF- $\beta$  が、ロイコトリエンの制御を受けること、6) IL-4、IL-13 は CysLT1 と M3R の発現を増強することにより、またウイルス由来の dsRNA は M3R の発現を増強することにより気道反応性の亢進に関与すること、7) 気管支平滑筋細胞はプロテアーゼ産生・放出を行い、細胞外器質を消化するが、細胞外器質の断片は平滑筋細胞の遊走を促進すること、8) 気道過敏性関連遺伝子には、気道炎症に依存する遺伝子群と、比較的依存しない遺伝子群が含まれること、9) IGF-I が、気道リモデリング、炎症に重要な因子であること、10) CCR2、CCR3 の遺伝子多型は、花粉症の合併によって喘息の発症を促す、あるいは重症化を引き起こす可能性があること、が明らかになった。

### A. 研究目的

慢性喘息の本態が好酸球性炎症にあることが解明され、吸入ステロイドを主とする抗炎症療法が普及した結果、比較的軽症な症例に対しては十分な予後・QOLの向上がもたらされたが、中等症ないし重症の症例群に対する治療効果は十分な水準に達していない。なかでも、経口ステロイド薬を常時使用する必要のある重症者（いわゆる難治性喘息患者）は、喘息死の予備群とも位置づけられ、

喘息分野に残された最大の課題である。必ずしも近年の治療成績向上の恩恵には浴していないこと、頻回の救急受診・長期入院・社会不適應を理由とする医療・厚生費に占める比重の高いことが指摘されている。難治性気管支喘息患者について、その病態・発症機序を解明し、その治療法・予防法を確立することができれば、年間6,000-7,000人といわれる喘息死を未然に防止するのみならず、難治性喘息のために家庭や社会から隔絶されている患者、

患者家族のQOLの改善はもとより増大しつつある医療費の削減にもつながることが期待される。平成12~14年度に実施した厚生科学研究「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)では、厚生省免疫異常ネットワーク研究協力施設の参加も得て、難治性喘息の今日的診断基準を確立し、現在の我が国における実態、病態、治療内容を把握した。難治性喘息の少なくとも3分の1以上が喘息発症1~2年以内にステロイド依存に陥っていることから、発症時から通常の喘息とは異なっていることが明らかになった。高用量のステロイド使用にもかかわらず、高度の炎症反応が持続しているとの知見は、ステロイドに良好に反応する通常の喘息との本質的差異を示唆する。好酸球過剰活性化、気道リモデリング、T細胞を中心とした細胞性免疫の異常が難治化関連要因として見いだされてきたので、炎症細胞(T細胞、好酸球、気道上皮細胞)における、サイトカイン受容体、シグナル伝達分子、サイトカイン遺伝子転写機構などの異常を分子的に詳細に解析するとともに、*in vitro*の実験と平行する形でマウス喘息モデルを用いて検証し、*in vivo*でのステロイド低応答性、気道過敏性、リモデリングに関与する責任分子の特定をめざす。難治化の分子生物学的要因の解明は、予防、治療への突破口と期待される。また、難治化関連遺伝子多型を見出し、診断法として確立し、早期発見、予防への応用をめざす。

## B. 方法

- 1) 森(主任研究者)らは難治性喘息に多い非アトピー型喘息の起因アレルゲンを同定し、抗原特異的治療法を開拓する目的に、T細胞サイトカイン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、特にIL-5およびIL-13産生と喘息反応との関連につき解析した。また、難治性喘息症例の特徴であるステロイド抵抗性のT細胞機序につき、PI-3 kinaseとAktの阻害薬、FK-506を用いて免疫薬理学的研究を行った。
- 2) 柳原(国立相模原病院)らは、ヒスタミン受容体(HR)、システニルロイコトリエン受容体(CysLTR)およびムスカリン受容体(MR)の各サブタイプとToll様受容体(TLR)ファミリーの遺伝子発現をPCR法で、タンパク発現をFACS、Western blotで、これらの受容体シグナルによる細胞内Ca<sup>2+</sup>の濃度をFluorocanで解析した。また、polyI:Cの刺激によって発現誘導される遺伝子群について、GeneChipを用いて網羅的に解析した。
- 3) 相沢(久留米大学)らは、132例の気管支喘息症例につき、最近提唱されたATSの重症喘息診断基準を用いてレトロスペクティブに、病歴、環境因子、合併症、スパイロメトリー、末梢血所見、IgE値の点から調査した。

また、発作受診した症例の末梢血中MMP-2、MMP-9、TIMP-1を測定した。

- 4) 藤澤(国療三重病院)らは、ラミニン、コラーゲンなどの細胞外基質蛋白ならびにヒスタミンが、エオタキシンによる好酸球遊走に与える影響を検討した。細胞外基質蛋白の実験系では各種接着分子に対する抗体を、ヒスタミンの系では各種ヒスタミン受容体アゴニスト・アンタゴニストを用いた。ヒスタミン受容体の発現をリアルタイムPCR法にて定量した。好酸球由来の線維化促進サイトカイン産生機構に関わる因子を明らかにするため、ロイコトリエンおよびIL-5、GM-CSF存在下でのTGF- $\beta$ 、IL-11、IL-17の遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて定量した。
- 5) 庄司(国療南福岡病院)らは、ヒト正常気管支平滑筋細胞の遊走実験系を確立し、ラミニン、フィブロネクチンおよび平滑筋細胞自身の培養上清中に存在する遊走活性につき解析した。また、細胞培養上清あるいは遊走実験後のチャンバー下室サンプルを濃縮した後、産生されるプロテアーゼをゼラチンゼイモグラフィにより測定した。
- 6) 高橋(国療南岡山病院)らは、JGL'98基準の難治性喘息23例を臨床指標の面から、治療抵抗性の強い炎症病態を有する難治群(Burning type)と、過去の不十分な対応によるリモデリングの結果、呼吸機能と薬剤反応性が低下した難治群(Burn out type)の2群に分類し、リンパ球の活性化、サイトカイン産生をFlow cytometryとELISA法により解析した。気道上皮細胞とリンパ球、好酸球、樹状細胞(DC)との相互作用につき難治例のPBMCと気道上皮培養細胞を用いて解析した。また、末梢血幹細胞をIL-3存在下で培養し、negative selectionにより得た高純度好塩基球をDexamethasoneやIL-3存在下で培養し、アポトーシスをFlow cytometryで解析した。
- 7) 大田(帝京大学内科)らは、重要な難治化要因とされるリモデリングに関わる増殖因子(PDGF、TGF- $\beta$ 、IGF-I)の役割を明らかにするため、マウス喘息モデルでIGF-1、IGF-BP3産生について、遺伝子発現をリアルタイムPCR法で、蛋白発現を免疫染色で検討した。喘息患者の気道局所でのIGF-1の発現を免疫組織染色で検討した。
- 8) 永井(岐阜薬大)らは、サイトカイン遺伝子ノックアウトマウスまたは中和抗体を用いた喘息モデルを解析した。最終抗原暴露4、24時間後に、アセチルコリン(Ach)による気道収縮反応を測定し、その後気管支肺胞洗浄(BAL)を実施、BAL液中の炎症性細胞数、分画をカウントした。気管・気管支および肺実質を含むサンプルを採取し、DNAマイクロアレイにより、抗原曝露による変動遺伝子ならびにステロイド投与による変動遺

伝子群を解析した。

9) 烏帽子田 (広島大学) らは、品川区五反田、牧丘地区において、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症のうちのいずれかの疾患を有する罹患同胞対 52 対を対象として、分子疫学を実施した。候補感受性遺伝子は、染色体 3p21.3 に位置し、相互が近接する CCR ケモカインである CCR1、CCR2、CCR3、CCR5、CCXCR1 とした。

#### C. 結果およびD. 考察

1) アトピー型喘息では、ダニアレルゲンに反応した IL-5、IL-13 産生が高値であるが、IgE 抗体が検出できない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 IL-5 産生が誘導される症例群を見いだした。実際に、これらの抗原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惹起された。RAST、ヒスタミン遊離、皮内反応が陰性であることから、IgE 抗体の関与は否定された。IL-5 産生がみられず、IL-13 産生のみ誘導される症例群では、喘息反応は観察されなかった。難治性喘息の症例登録調査より、大部分が非アトピー型に分類されることが明らかになったが、T 細胞 IL-5 産生を指標として、非 IgE 依存性喘息反応の原因抗原を *in vitro* で診断しうることを明らかにした。

重症喘息では、高用量吸入ステロイド+経口ステロイドの投与にも拘わらず、末梢血 Th 細胞 IL-5 産生が亢進していた。Th 細胞各応答の dexamethasone に対する感受性は、増殖反応において最も低かったが、CD28 シグナルによってステロイド抵抗性が誘導され、その過程では Th 細胞により産生される IL-2 が重要であることが明らかになっている。この観点からは、免疫抑制剤 FK-506 は IL-2 産生の抑制を通じて、ステロイド抵抗性を改善することが明らかになった。また、PI-3 kinase 阻害剤によって、ステロイド抵抗性の誘導が抑制されるが、CD28 シグナルによるアポトーシス阻害効果に関連する Akt の阻害剤は作用しなかった。Th 細胞における PI-3 kinase 制御を含むシグナル伝達が、ステロイド反応性改善のターゲットであることが示唆される。

2) 培養気道平滑筋細胞は、タイプ II IL-4R、TLR3、H1R、H2R、H4R、CysLT1、CysLT2、M1R-M5R を発現していた。CysLT1 と M3R の発現は IL-4、IL-13 によって増強され、M3R の発現は polyI:C の刺激によっても増強された。LTD4、Ach による細胞内  $Ca^{2+}$  レベルの上昇は、IL-4、IL-13、poly I:C により増強されたが、ヒスタミンによる細胞内  $Ca^{2+}$  レベルの上昇には影響なかった。発現増強された CysLT1 と M3R の機能は、各々の特異的アンタゴニストによって抑制された。

PolyI:C 刺激によって、約 650 種類の遺伝子が誘導され、特に MAP キナーゼ系、NF- $\kappa$ B 系、STAT 系の遺伝子群が強く誘導されていた。

3) ATS の重症喘息診断基準に合致する症例は 15 例 (11.4%) であった。難治群では非難治群に比し、成人発症、ペット飼育、慢性副鼻腔炎/鼻茸の合併、アスピリン喘息の合併が有意に多く、スパイロメトリーでは、FEV1/FVC、 $\beta_2$  刺激薬に対する反応が有意に低かった。常に気道狭窄が持続し、気管支拡張剤で改善しないことが窺われ、気道リモデリングの存在が示唆される。末梢血中 MMP-9 値は、喘息発作時に有意に増加し、緩解時に正常化することが明らかになり、リモデリング進行の要因と考えられた。

4) ラミニン、IV 型コラーゲン、ファイブロネクチン、フィブリノーゲンは単独では好酸球遊走活性を有さないが、エオタキシンによる遊走を著しく増強した。それぞれ抗  $\alpha$ M、 $\alpha$ L、 $\alpha$ 4 インテグリン抗体で抑制された。ヒスタミンは H4 受容体を介して、好酸球遊走を誘導し、エオタキシンと相加作用を示した。IL-5、GM-CSF は H4 受容体発現、ヒスタミンによる遊走を増強した。また、LTD4 は好酸球の TGF- $\beta$  発現を誘導したが、IL-5・GM-CSF の存在下でさらに増強された。ステロイドでは抑制されず、CysLT1 拮抗薬でのみ抑制された。

5) 気管支平滑筋細胞培養上清中に産生されるプロテアーゼ活性は時間依存的に増加し、特に 120、58 及び 54kDa の 3 種類のゼラチナーゼの活性増加を認めた。一方、細胞外基質、細胞培養上清により遊走する気管支平滑筋細胞はプロテアーゼ活性の増加を示さず、遊走活性との相関は見られなかった。気道平滑筋細胞はプロテアーゼを産生し、細胞外基質を切断すること、自ら細胞外基質を産生することで、平滑筋の肥厚に関与する可能性が考えられる。

6) 難治症例の臨床的特徴は、成人発症の非アトピー型喘息で、長い罹病期間とアスピリン喘息等の合併症を有し、不十分な日常管理が問題であった。難治症例の一部で Candida 抗原に対する IL-5、IL-13 の産生が亢進しており、末梢血中 TARC 高値、Candida 抗原に対する PBMC からの TARC 産生亢進を示す Burning type が存在した。DC depletion により抗原に対するリンパ球の活性化、PBMC からのサイトカイン産生、TARC 産生は著明に減少し、DC が TARC の産生細胞である可能性が示唆された。末梢血中好塩基球のアポトーシスは、DEX で濃度依存性 ( $10^{-6}$ ~ $10^{-9}$  M) に誘導され、逆に高濃度の IL-3 (0.5~5 ng/ml) で抑制された。

7) マウス喘息モデルで、IGF-I mRNA 発現は特異抗原依存性に増強した。IGF-I 作用の制御に関連する IGF-IBP3 の発現も増強した。免疫組織染色では、IGF-I

は気道上皮細胞およびマクロファージにより産生されていた。喘息死症例の病理組織で、気道上皮細胞および浸潤細胞に IGF-I 蛋白発現を認めた。また、血清中の IGF-I レベルもコントロールと比較して喘息患者で高い傾向を認めた。

8) 抗原曝露 4 時間後、ACh に対する気道過敏性は認められたが、BALF 中の炎症性細胞の増加は顕著でなかった。24 時間後、気道好酸球増多、気道過敏性認めた。

ステロイドは、気道過敏性を有意に抑制した。ジーンチップ解析では、4 時間後の時点で、生理食塩水吸入群に比し OA 吸入群において 2 倍以上変動し、かつステロイドにより 2 倍以上変動した遺伝子数は 646 であった。

また、24 時間後では、661 遺伝子が同定された。4 時間後では、気道炎症に比較的依存しない遺伝子群が、24 時間後では気道炎症に依存する遺伝子群が含まれるものと推測される。

9) CCR2 の Val64Ile、Asn260Asn (T860C)、CCR3 の Tyr17Tyr (T51C) の 3 つの多型は、連鎖不均衡にあった。喘息単独、花粉症単独および喘息+花粉症の間での Zir score を調べたところ、喘息単独に対して喘息+花粉症においてこれらの多型における Zir score が高いことが示されたが、花粉症単独に際しても、喘息との合併ほど高い値ではないものの、比較的高い値を呈した。

#### 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、リモデリングの諸要因が解析された結果、1) IL-5 産生テストは、「T 細胞アレルゲン」同定法として有用であること、また、遅発型喘息反応は、即時型とは独立した、細胞性免疫に依存したアレルギー反応と考えられること、難治性喘息の特徴である T 細胞レベルのステロイド抵抗性はシグナル伝達制御により解除できること、2) 重症化要因は、症例毎に多様であるが、その相違点に基づき Burning type と Burn out type に大別できれば、より具体的な治療法・予防法が可能となること、3) 喘息のコントロール不良は気道リモデリングを促進し、喘息の難治化の原因になること、4) 組織破壊に伴って遊離する細胞外基質蛋白が好酸球浸潤を増強し、増悪に関与すること、また、即時型反応のメディエータであるヒスタミンが好酸球浸潤を制御すること、5) 気道リモデリングに関与する好酸球由来の TGF- $\beta$  が、ロイコトリエンの制御を受けること、6) IL-4、IL-13 は CysLT1 と M3R の発現を増強することにより、またウイルス由来の dsRNA は M3R の発現を増強することにより気道反応性の亢進に関与すること、7) 気管支平滑筋細胞はプロテアーゼ産生・放出を行い、細胞外器質を消化するが、細胞外器質の断片は平滑筋細胞の遊走を促進すること、8) 気道過敏性関連遺伝子には、気道炎

症に依存する遺伝子群と、比較的依存しない遺伝子群が含まれること、9) IGF-I が、気道リモデリング、炎症に重要な因子であること、10) CCR2、CCR3 の遺伝子多型は、花粉症の合併によって喘息の発症を促す、あるいは重症化を引き起こす可能性があること、が明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hashimoto, T., Kawaguchi, H., Maeda, Y., Taniguchi, M., Akiyama, K., and Mori, A. 2003. Correlation of allergen-induced IL-5 and IL-13 production by peripheral blood T cells of asthma patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* In press
2. Ogawa, K., Kaminuma, O., Kikkawa, H., Akiyama, K., and Mori, A. 2003. Interaction with monocytes enhances IL-5 gene transcription in peripheral T cells of asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131:20-25.
3. Mitomi, H., Nakamura, T., Ihara, A., Otani, Y., Sada, M., Igarashi, M., Akino, F., Ichinose, M., Ojima, T., Mori, A., and Okayasu, I. 2003. Frequent Ki-ras mutations and transforming growth factor- $\alpha$  expression in adenocarcinomas of the small intestine-report of 7 cases. *Digest. Dis. Sciences* 48:203-209.
4. Mitomi, H., Sada, M., Kobayashi, K., Igarashi, M., Mori, A., Kanazawa, H., Nishiyama, Y., Ihara, A., and Otani, Y. 2003. Different apoptotic activity and p21WAF1/CIP1, but not p27Kip1, expression in serrated adenomas as compared with traditional adenomas and hyperplastic polyps of the colorectum. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129:449-455.
5. Fujii M, Tanimoto Y, Takata M, Takao K, Hamada N, Suwaki T, Kawata N, Takahashi K, Harada M, Tanimoto M. Association of IgG Fc receptor II with tyrosine kinases in the human basophilic leukemia cell line KU812F. *Allergology International* 2003, 52: 149-154.
6. Aizawa H, Yoshida M, Inoue H and Hara N. Traditional oriental herbal medicine, Bakumondo-to, suppresses vagal neuro-effector transmission in guinea pig trachea. *J Asthma* 2003;40: 497-503.
7. Hoshino T, Nakamura H, Okamoto M, Kato S, Araya S, Nomiyama K, Oizumi K, Young HA, Aizawa H and Yodoi J. Redox-Active Protein

- Thioredoxin Prevents Proinflammatory Cytokine- or Bleomycin-Induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168: 1075-1083.
8. Ichiki M, Gohara R, Fujiki R, Hoashi S, Rikimaru T and Aizawa H. Phase I and pharmacokinetic study of carboplatin and paclitaxel with a biweekly schedule in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;52: 67-72.
  9. Ichiki M, Rikimaru T, Gohara R, Koga T, Kawayama T, Matunami M, Oshita Y, Kamimura T and Aizawa H. Phase II Study of Irinotecan and Ifosfamide in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology* 2003;64: 306-311.
  10. Ichiki M, Gohara R, Rikimaru T, Kitajima T, Fujiki R, Shimada A and Aizawa H. Combination Chemotherapy with Irinotecan and Ifosfamide as Second-Line Treatment of Refractory or Sensitive Relapsed Small Cell Lung Cancer: A Phase II Study. *Chemotherapy* 2003;49: 200-205.
  11. Kawamoto N, Yamada A, Ohkouchi S, Maeda T, Tanaka S, Hashimoto T, Saijo Y, Saijo S, Nukiwa T, Shichijo S, Aizawa H and Itoh K. IgG reactive to CTL-directed epitopes of self-antigens is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigens* 2003;61: 352-361.
  12. Kaji M, Watanabe A and Aizawa H. Differences in clinical features between influenza A H1N1, A H3N2, and B in adult patients. *Respirology* 2003;8: 231-233.
  13. Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Kiri Y, Nishiwaki E, Maeda Y, Takeda J, Okamoto M, Kato S, Imaizumi T, Aizawa H and Yoshino K. Exacerbated and Prolonged Allergic and Non-Allergic Inflammatory Cutaneous Reaction in Mice with Targeted Interleukin-18 Expression in the Skin. *J Invest Dermatol* 2003;121: 502-509.
  14. Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Nakamura M, Maeda Y, Nishiwaki E, Zenmyo M, Hiraoka K, Aizawa H and K. Y. Bone malformations in interleukin-18 transgenic mice. *J Bone Miner Res* 2003;18: 975-983.
  15. Kawayama T, Fujiki R, Honda J, Rikimaru T and Aizawa H. High Concentration of (1→3)-beta-D-Glucan in BAL Fluid in Patients With Acute Eosinophilic Pneumonia. *Chest* 2003;123: 1302-1307.
  16. Oshita Y, Koga T, Kamimura T, Matsuo K, Rikimaru T and Aizawa H. Increased circulating 92 kDa matrix metalloproteinase (MMP-9) activity in exacerbations of asthma. *Thorax* 2003;58: 757-760.
  17. Mine T, Gohara R, Hida N, Imai N, Azuma K, Rikimaru T, Katagiri K, Nishikori M, Sukehiro A, Nakagawa M, Yamada A, Aizawa H, Shirouzu K, Itoh K and Yamana H. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. *Cancer Sci* 2003;94: 548-556.
  18. 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* 2003;167: 50-56.
  19. Yanagihara Y: Regulatory mechanisms of human IgE synthesis. *Allergol. Int.* 2003;52,1-12.
  20. Yamamoto, H., Yanagihara Y: Genetic variants of chemical mediator receptors in relation to asthma. *Int. Rev. Asthma* 2003;5:60-66.
  21. Fujii-Maeda, S., Kajiwarra, K., Ikizawa, K., Shinazawa, M., Yu, B., Koga, T., Furue, M., Yanagihara Y: Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/ macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon- $\gamma$  in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J. Invest. Dermatol.*, 122, 20-28, 2004.
  22. Yamamoto N, Takeshita K, Shichijo M, Kokubo T, Sato M, Nakashima K, Ishimori M, Nagai H, Li Ying-Fu, Yura T, Bacon KB. The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;306: 1174-1181.
  23. Yasunaga S, Yuyama N, Arima T, Tanaka H, Toda S, Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Nagai H, Izuhara K. The negative-

- feedback regulation of the IL-13 signal by the IL-13 receptor alpha2 chain in bronchial epithelial cells. *Cytokine* 2003;24: 293-303.
24. Yamada H, Takahashi Y, Ishizaki M, Musoh K, Ohashi T, Tanaka H, Inagaki N, Nagai H. Effects of RS-601, a novel leukotriene D4 / thromboxane A2 dual receptor antagonist, on asthmatic responses in guinea pigs. *Pharmacology* 2003;69: 51-58.
25. Kabashima K, Murata T, Tanaka H, Matsuoka T, Sakata D, Yoshida N, Katagiri K, Kinashi T, Tanaka T, Miyasaka M, Nagai H, Ushikubi F, Narumiya S. Thromboxane A2 modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. *Nature Immunol.* 2003;4: 694-701.
26. Masuda T, Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Nagai H. Mast cells play a partial role in allergen-induced subepithelial fibrosis in a murine model of allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2003;33: 705-713.
27. Nagao K, Tanaka H, Komai M, Masuda T, Narumiya S, Nagai H. Role of prostaglandin I2 in airway remodeling induced by repeated allergen challenge in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003;29: 314-320.
28. Nakamura N, Ochi T, Sawada M, Tanaka H, Inagaki N, Saiki I, Nagai H. Role of T cells in IgE-dependent triphasic cutaneous reaction caused by dinitrofluorobenzene in the mouse ear: Participation of CD8<sup>+</sup> T cells. *Allergol. Int.* 2003;52: 31-36.
29. Inagaki N, Igeta K, Shiraishi N, Kim JF, Nagao M, Nakamura N, Nagai H. Evaluation and characterization of mouse scratching behavior by a new apparatus, *MicroAct*. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2003;16: 165-175.
30. Komai M, Tanaka H, Masuda T, Nagao K, Ishizaki M, Sawada M, Nagai H. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Br. J. Pharmacol.* 2003;38: 912-920.
31. Miyagawa N, Honma T, Kagechika H, Shudo K, Nagai H. Effect of synthetic retinoid, TAC-101, on experimental autoimmune disease. *Pharmacology* 2003;67: 21-31.
32. Sasahara S, Matsuzaki I, Nakamura H, Ozasa K, Endo T, Imai T, Honda Y, Hatta K, Ide T, Motohashi Y, Eboshida A. Environmental factors and lifestyles as risk factors for Japanese cedar pollinosis in recent urban areas. *Arch Complex Environ Studies* 2003 in press
33. Kihara M, Ono-Kihara M, Feldman MD, Ichikawa S, Hashimoto S, Eboshida A, Yamamoto T, Kamakura M. HIV/AIDS surveillance in Japan, 1984-2000. *J Acquir Immune Defic Synd*, 2003; Suppl 1:S55-62
34. Ohta K, Yamashita N, Arai H, Tashimo H, Kuramochi M, Ohbayashi O, Ishida H, Kawashima R, Nakano J, Ishii A, Hirai K, Horiuchi T, Miyamoto T. Inhibition of airway remodeling, cell infiltration, and airway hyperresponsiveness. *Allergy Clin Immunol Int* 2003 in press
35. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, and Hirai K. Expression and function of toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol.* 2003;171(8):3977-82.
36. 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. Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene. *Immunogenetics* 2003;54:742-745.
37. Komiya, A., Hirai, K., Ikura, 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. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130:40-50.
- 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機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究

主任研究者 森 晶夫 (国立相模原病院臨床研究センター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長) 三田晴久 (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) 谷口正実 (国立相模原病院臨床研究センター室長)  
大友 守 (国立相模原病院臨床研究センター室長)  
藤澤知恵 (国立相模原病院臨床研究センターリサーチレジデント)

### 研究要旨

難治性喘息の大多数は成人発症型であり、非アトピー型喘息であることが明らかになった。ステロイドを中心とする抗炎症療法の効果に限界のある難治性喘息においては、特に抗原特異的治療法の導入が期待される。アトピー型喘息の起因抗原は、皮膚反応や RAST などにより IgE 抗体を指標としてスクリーニングし、吸入負荷試験において即時型喘息反応を確認することで診断している。原因アレルゲンが診断された場合には、減感作療法を実施することによって、一定の臨床効果が得られているが、IgE 抗体を欠く非アトピー型喘息に対しては現在まで起因抗原診断法が確立されていない。われわれがこれまでに提唱したアトピー型・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に基づき、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が診断可能となることを指摘した。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。一方、IL-13 はアレルギー性炎症の重要なサイトカインとして注目を集めているが、IL-13 産生誘導抗原は遅発型喘息反応を惹起しなかった。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、抗原特異的治療による非アトピー型喘息の解決へ向けて大きな意義を有する。

### A. 研究目的

過去3年間の難治性喘息症例調査の結果、難治性喘息の大部分は成人発症の非アトピー型喘息が占め、高用量の吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β2刺激薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていないことが明らかになった。軽症喘息の多くはアトピー型で、原因アレルゲンの診断が比較的容易であり、減感作療法を実施できるが、非アトピー型喘息においては IgE 抗体を指標とできないため、起因抗原診断法は確立されていない。非アトピー型喘息病態の解明と抗原特異的治療介入をめざして、T 細胞サイトカイン特に IL-5 と IL-13 産生と気道収縮反応との関連につき解析した。

### B. 方法

#### 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。抗 *Candida albicans* acid protease (CAAP) IgE 抗体は RAST 法にて、IgG 抗体はダイナボッド社製キットにて測定した。

#### 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、 $2 \times 10^6$ /ml の濃度にて、AIM-V 培地に懸濁した。Positive control として 20 nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と 1 μM の ionomycin (IOM) で 24 時間刺激した。抗原特異的応答を調べる目的には、*Dermatophagoides farinae* extract、*Candida albicans* extract (鳥居薬

品)、精製 *Candida albican* 抗原およびその他のアレルギーエキスの最終濃度 0.1、1、10  $\mu\text{g/ml}$  を加えて 6 日間培養した。サイトカイン産生の評価には、上清中の IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  をそれぞれ特異的サンドイッチ ELISA 法にて測定した。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、16 時間  $^3\text{H}$ -Thymidine パルスにて測定した。IgE 抗体を介する反応を否定する目的に、白血球分画を分離して、抗原と 5~30 分間インキュベートし、ヒスタミン遊離反応を測定した。

#### ステロイド抵抗性解析

当病院受診中の喘息症例で、インフォームドコンセントの得られた症例より採血し、末梢血単核球を得た。Negative selection 法により CD4 細胞を enrich した。アトピー型喘息症例の末梢血単核球よりダニアレルゲン Der f 2 特異的ヘルパー-T (Th) 細胞クローンを樹立した。種々の活性化刺激にตอบสนองしたサイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。培養中に各濃度の dexamethasone を加え、用量反応曲線より  $\text{IC}_{50}$  値を求めた。T 細胞受容体を介した活性化シグナルに加えて、CD28 を介した costimulatory signal を与え、サイトカイン産生、増殖反応につき、ステロイド感受性を解析した。培養中に PI-3 kinase、Akt 阻害薬、免疫抑制剤 FK-506 を加えて、ステロイド感受性に及ぼす作用を解析した。

#### (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し、当施設の倫理委員会の承認を得た。

#### C. 結果

アトピー型喘息では、末梢血リンパ球の抗原非特異的活性化刺激にตอบสนองする IL-5 産生が健常者に比べて亢進しており、特にダニアレルゲンにตอบสนองした IL-5 産生が高値である (Mori A. et al. *Int. Immunol.* 7:449, 1995)。今年度は、IgE 産生のみならず気道上皮、平滑筋、粘液細胞にも作用し喘息病態への関与が強く示唆されている IL-13 産生についても解析した。アトピー型喘息では、IL-5、IL-13 の産生量には有意の相関を認めた (図 1)。好酸球活性化プロセスを担う IL-5 と、気道過敏性や好酸球以外の喘息病態にも強く関与する IL-13 とが、共通の制御を受けている可能性が示唆された。

難治性喘息の大部分を非アトピー型喘息が占めることが、前年度までの調査で明らかになっていた。非アトピー型喘息においても、アトピー型喘息と同様に、末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞の抗原非特異的活性化刺激にตอบสนองする IL-5 産生が健常者に比べて高値である (Mori A. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100:S56, 1997)。そこで、IL-5、IL-13 産生を指標として、非アトピー型喘息の起因抗原 (T 細胞アレルギー) を突き止めることができないか試みた。種々のアレルギーエキス、精製抗原を用いて、非アトピー型喘息症例の末梢血単核球を刺激し、サイトカイン産生の有無を検討したところ、ダニ、カンジダアレルギーに反応して、IL-5 産生が誘導される症例群を認めた。粗製カンジダ抗原に反応する大部分の症例は、*Candida albicans* acid protease (CAAP) に対して IL-5 産生がみられた。IL-5 産生のみられるすべての症例で IL-13 産生が誘導された。一方、IL-13 産生が誘導されるが、IL-5 産生が誘導されない症例群も認めた。IL-5 産生誘導群では、CAAP の吸入負荷にตอบสนองして、即時型反応を欠く遅発型喘息反応が観察された (図 2) が、IL-13 のみ産生する群では、喘息反応は観察されなかった。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。IgG 抗体は検出されなかった。

重症喘息においては、高用量吸入ステロイド+経口ステロイドの投与にも拘わらず、末梢血 Th 細胞 IL-5 産生が亢進していた。Th 細胞各応答の dexamethasone に対する感受性は、増殖反応において最も低かったが、CD28 シグナルによってステロイド抵抗性が誘導され、その過程では Th 細胞により産生される IL-2 が重要であることが明らかになっている。免疫抑制剤 FK-506 または PI3 kinase 阻害剤によって、このステロイド抵抗性の誘導がキャンセルされるが、CD28 シグナルによるアポトーシス阻害に関連する Akt 阻害剤によっては影響を受けなかった (図 3)。

#### D. 考察

喘息には IgE 抗体を特徴とするアトピー型と IgE 抗体の認められない非アトピー型の 2 型が存在する。いずれのタイプも同様の臨床症状、検査所見を呈することから、IgE 抗体とは異なる喘息共通の病態が存在するとの仮説が提唱されてきた。現在までの国内外の研究結果から、気管支喘息の好酸球性炎症には T 細胞と Th 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<sup>+</sup> 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きた。

しかしながら、抗 IL-5 中和抗体が実験喘息ではきわめて喘息予防効果が高いのに、ヒトの臨床試験で有効性が確認されなかったことから、ヒトの喘息は、IL-13 やその他の因子の関与が大きいとの考え方が強調されている。IL-13 は、IL-4 と受容体を共有し、IgE 抗体産生促進、線維芽細胞増殖、平滑筋細胞増殖、粘液産生細胞増殖など、多くの喘息病態に関連する。今回、アトピー型の症例においては、アレルゲンに応答した IL-5 と IL-13 の産生量に密接な関連が存在することが明らかになった。サイトカインタンパク合成の上流に位置し、IL-5 と IL-13 産生を協調して制御するメカニズムの存在がうかがわれ、興味深い。

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、IL-5 産生誘導抗原は、*in vitro* で T 細胞を活性化するのみならず、*in vivo* で遅発型アレルギー反応を惹起することが明らかになった。IL-5 非産生、IL-13 産生症例群では遅発型反応がみられないことから、IL-13 産生は喘息反応と直接の関連はないことが示唆される。今後、抗真菌療法などの trial などにより、これらの症例における、*Candida*

抗原反応性 IL-5 産生の意義を一層解明する必要がある。「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 (図 4)。

ステロイド抵抗性は T 細胞レベルの誘導現象であることを明らかにしてきたが、CD28 シグナルに関連して重要と考えられている PI-3 kinase、Akt の役割につき解析した。PI-3 kinase 阻害により、CD28 依存性のステロイド抵抗性は消失したが、もう一つのシグナル伝達分子 Akt の阻害によっては、変化が見られなかった。この知見は、Th 細胞の PI-3 kinase 活性の制御が、ステロイド反応性改善のターゲットであることを示唆するものである。また、FK-506 は、ステロイド抵抗性改善効果を期待しうる。

## E. 結論

「T 細胞アレルゲン」は、即時型喘息反応とは独立した、遅発型喘息反応を惹起する。細胞性免疫に依存したアレルギー反応制御が喘息の非アトピー機序の解決に向けて重要と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hashimoto, T., Kawaguchi, H., Maeda, Y., Taniguchi, M., Akiyama, K., and Mori, A. 2004. Correlation of allergen-induced IL-5 and IL-13 production by peripheral blood T cells of asthma patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 2) Mitomi, H., Matsumoto, Y., Mori, A., Arai, N., Ishii, K., Tanabe, S., Kobayashi, K., Sada, M., and Mieno, H. 2004. Multifocal granular cell tumors of the gastrointestinal tract: Immunohistochemical findings compared with those of solitary tumors. *Pathol. Int.* 54:47-51.
- 3) Ogawa, K., Kaminuma, O., Kikkawa, H., Akiyama, K., and Mori, A. 2003. Interaction with monocytes enhances IL-5 gene transcription in peripheral T cells of asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131:20-25.
- 4) Mitomi, H., Nakamura, T., Ihara, A., Otani, Y., Sada, M., Igarashi, M., Akino, F., Ichinose, M., Ojima, T., Mori, A., and Okayasu, I. 2003. Frequent Ki-ras mutations and transforming growth factor- $\alpha$  expression in adenocarcinomas of the small intestine-report of 7 cases. *Digest. Dis. Sciences* 48:203-209.

5) Mitomi, H., Sada, M., Kobayashi, K., Igarashi, M., Mori, A., Kanazawa, H., Nishiyama, Y., Ihara, A., and Otani, Y. 2003. Different apoptotic activity and p21WAF1/CIP1, but not p27Kip1, expression in serrated adenomas as compared with traditional adenomas and hyperplastic polyps of the colorectum. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129:449-455.

2. 学会発表

1) Mori, A., Hashimoto, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Hasegawa, M., Mita, H., and Akiyama, K. 2003. T cell IL-5 production to *Candida albicans* secretory aspartic protease 2 is related to non-IgE-mediated late-phase bronchial response. World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI. *J. Allergy Clin. Immunol.*

109:S38-39 (Vancouver) 2003/9/7-12

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



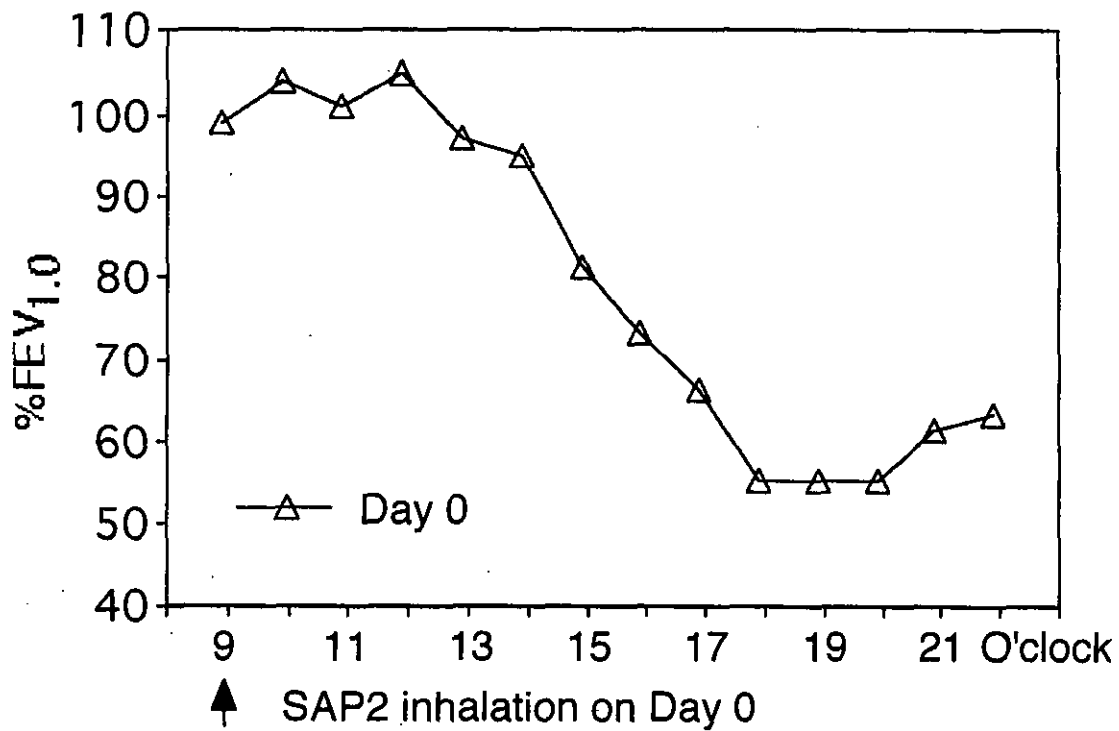


図2. CAAPに対するIL-5産生症例における吸入負荷試験

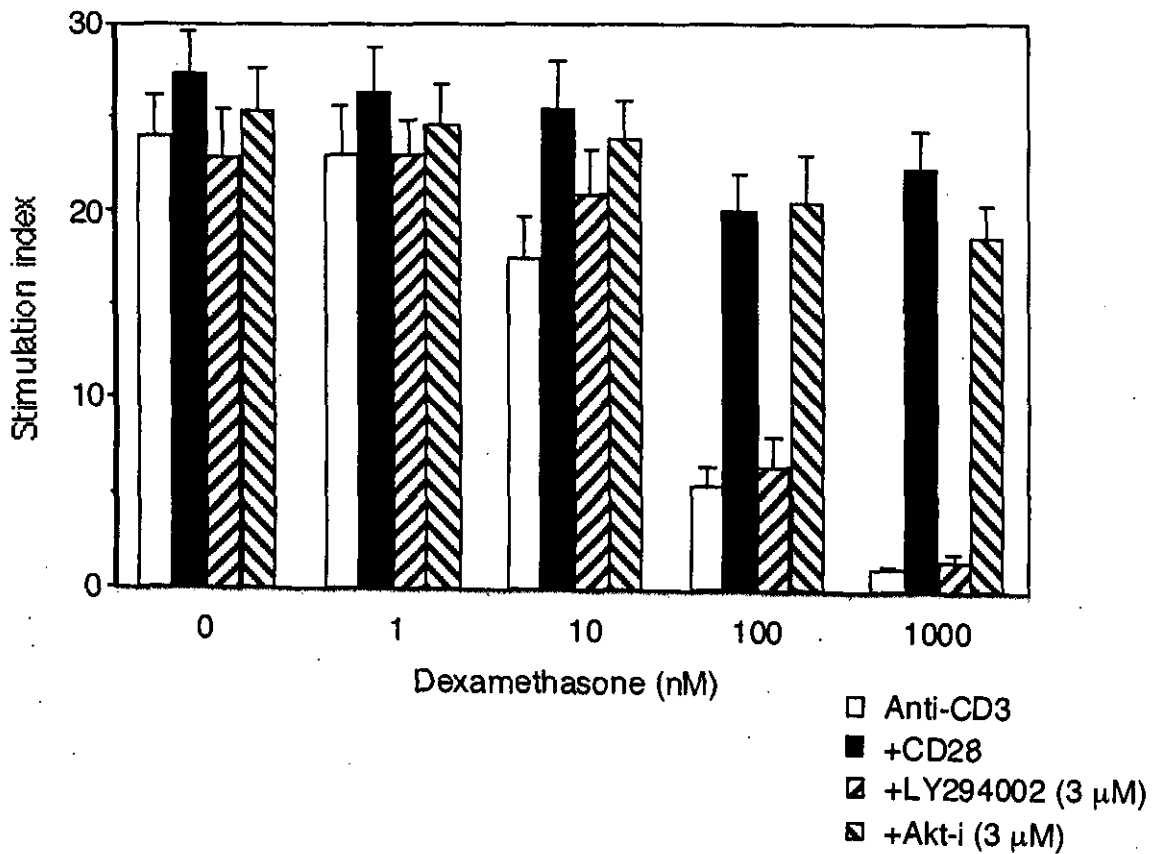


図3. CD28シグナルによるステロイド抵抗性誘導に対するPI-3 kinase阻害剤とAkt阻害剤の効果

# アレルギーの診断法

臨床面

研究面

現在

IgE抗体（液性免疫）を指標

皮膚テスト、  
RAST



吸入チャレンジ



即時型反応  
（遅発型反応）



原因抗原の診断

Western, ELISA

Immunochemistry

将来

細胞性免疫を指標

IL-5産生  
テスト



吸入チャレンジ



遅発型反応



原因抗原の診断

細胞反応  
生体反応

Immunobiology



正しい抗原に対する減感作療法

図4. T細胞依存性アレルギー反応の診断と治療への応用

# 気道平滑筋細胞におけるメディエーター受容体の発現調節作用に関する研究

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：気管支喘息の重要な病態の一つである気道反応性の亢進にサイトカインやウイルス感染によるメディエーター受容体の発現調節が関与しているか否かについて、気道平滑筋細胞を用いて検討した。その結果、HR、CysLTR および MR の各サブタイプのうち、CysLT1R と M3R の発現は IL-4/IL-13 の刺激によって増強されたが、IFN- $\gamma$  の刺激では増強されなかった。また、M3R の発現は dsRNA アナログの poly I : C の刺激によっても増強されたが、ssRNA アナログの poly C には増強作用は認められなかった。さらに、poly I : C による M3R の発現増強は TLR3 依存的であった。発現増強された CysLT1R や M3R の機能に関しては、LTD<sub>4</sub> や Ach による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度のさらなる上昇作用から確認できた。また、特異性に関しては、LT1R アンタゴニストや M3R アンタゴニストによる抑制作用などからも確認できた。以上の結果から、Th2 サイトカインの IL-4/IL-13 は CysLT1R と M3R の発現を増強することにより、またウイルス由来の dsRNA は M3R の発現を増強することにより気道反応性の亢進に関与していると考えられた。IL-4/IL-13 と poly I : C の刺激に共通な M3R の発現増強メカニズムについては、誘導遺伝子の発現解析も含めて現在検討中である。

## A. 研究目的

気管支喘息の病態の一つとして、メディエーターなどの種々の非特異的刺激に対する気道反応性の亢進があげられる。また、ウイルス感染も喘息の増悪因子として関与している。本研究では、気道平滑筋細胞におけるヒスタミン受容体 (HR)、システイニルロイコトリエン受容体 (CysLTR) およびムスカリン受容体 (MR) の発現に対して、Th1 サイトカインの IFN- $\gamma$  や Th2 サイトカインの IL-4/IL-13 が調節的に作用するか否かについて検討した。さらに、ウイルス感染との関係を調べるために、Toll 様受容体 (TLR) ファミリーの発現を解析すると共に、ウイルス由来 dsRNA のアナログである poly I : C を用いて HR、CysLTR および MR の発現に対する調節作用についても併せて検討した。

## B. 方法

気道平滑筋細胞における HR、CysLTR および MR の各サブタイプと TLR ファミリーの各メ

ンバーの mRNA 発現は RT-PCR や real-time PCR により、これらのタンパク発現は FACS や Western blot により、また細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は Fluoroskan によりそれぞれ解析した。尚、細胞は EGF 非存在下で IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-13 あるいは poly I : C で刺激した。また、poly I : C の刺激によって発現誘導される遺伝子群については、GeneChip を用いて網羅的に解析した。

## C. 結果

気道平滑筋細胞には H1R、H2R、H4R、CysLT1R、CysLT2R および M1R~M5R が発現されていた。これらのサブタイプのうち、CysLT1R と M3R の発現は IL-4 や IL-13 の刺激によって増強されたが、IFN- $\gamma$  の刺激では増強されなかった。また、気道平滑筋細胞には poly I : C を認識する TLR3 に加えて、TLR1、4、5、6、9 も発現されていた。TLR3 依存的に発現調節されるメディエーター受容体については、M3R の発現が poly I : C の刺激によって増強された。



IL-4/IL-13で刺激した細胞では無刺激の細胞に比べて、LTD4やAchによる細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルの増加はさらに上昇した。同様に、poly I:C刺激した細胞ではAchによる細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルの増加はさらに上昇した。しかし、いずれの刺激細胞においてもヒスタミンによる細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルの増加には影響が認められなかった。また、発現増強されたCysLT1RやM3Rが機能的であることについては、CysLT1RアンタゴニストやM3Rアンタゴニストによって特異的に抑制されることから確認できた。

一方、ssRNAアナログのpoly Cは、poly I:Cとは異なり、M3Rのみならず、他のメディエーター受容体サブタイプの発現にも影響を与えなかった。また、poly I:C刺激した細胞では約650種類の遺伝子が誘導され、特にMAPキナーゼ、NF-κBおよびSTATファミリーの遺伝子群が強く誘導された。

#### D. 考察

本研究では、気道平滑筋細胞におけるメディエーター受容体サブタイプとTLRファミリーの発現を解析すると共に、IFN-γ、IL-4、IL-13およびpoly I:Cの刺激によるメディエーター受容体サブタイプの発現調節作用についても検討した。気道平滑筋細胞にはH1R、H2R、H4R、CysLT1R、CysLT2RおよびM1R~M5Rのみならず、TLR1、3、4、5、6、9も発現されていた。また、メディエーター受容体サブタイプのうち、CysLT1RとM3Rの発現はIL-4/IL-13の刺激によって増強されたが、IFN-γの刺激では増強されなかった。また、M3Rの発現はTLR3を活性化するpoly I:Cの刺激によっても増強されることが明らかとなった。

発現増強されたCysLT1RやM3Rの機能や特異性に関しては、LTD4やAchによる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度のさらなる上昇のみならず、LT1RアンタゴニストやM3Rアンタゴニストなどを用いた結果などからも確認できた。したがって、IL-4/IL-13受容体やTLR3の活性化を介して発現増強される特定のメディエーター受容体は気道反応性の亢進に重要な役割を果たしていると考えられる。

IL-4/IL-13とpoly I:Cの刺激に共通なM3Rの

発現増強メカニズムについては、M3R遺伝子の発現調節に関わるシグナル伝達経路や分子を同定する必要がある。この点については、poly I:Cの刺激によって約650種類の遺伝子が誘導されること、また特にMAPキナーゼ、NF-κBおよびSTATファミリーの遺伝子群が強く誘導されることが明らかとなった。poly I:CやIL-4/IL-13の刺激によって共通に誘導される遺伝子産物とM3Rの発現増強との関係については、現在検討中である。

#### E. 結論

Th2サイトカインのIL-4/IL-13はCysLT1RとM3Rの発現を増強することにより、またウイルス由来のdsRNAはM3Rの発現を増強することにより気道反応性の亢進に関与していると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yanagihara, Y.: Regulatory mechanisms of human IgE synthesis. *Allergol. Int.*, 52, 1-12, 2003.
- 2) Yamamoto, H., Yanagihara, Y.: Genetic variants of chemical mediator receptors in relation to asthma. *Int. Rev. Asthma.*, 5, 60-66, 2003.
- 3) Fujii-Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Shinazawa, M., Yu, B., Koga, T., Furue, M., Yanagihara, Y.: Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-γ in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J. Invest. Dermatol.*, 122, 20-28, 2004.
- 4) 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*, 39, 623-628, 2003.
- 5) 柳原行義: IgE産生の分子機構. *アレルギー・リウマチ・膠原病*, 19, 109-116, 2003.
- 6) 山本ひとみ、柳原行義: 喘息とリンパ球. *THE LUNG perspectives*, 11, 460-463, 2003.
- 7) 柳原行義: IgE産生とアレルギー性炎症. *喘息*, 17, 2-6, 2004.

- 8) 梶原景一、柳原行義: IgE産生のメカニズム. 喘息, 17, 21-25, 2004.
- 9) 柳原行義: IgE抗体産生の調節. 総合アレルギー学 印刷中
- 10) 柳原行義: アレルギーと感染—hygiene hypothesisを含めて. 小児アレルギー学会誌 印刷中
- 11) 梶原景一、羅 智靖、柳原行義: 可溶性FcεRIαと抗IgE抗体のIgE産生抑制機序. 臨床免疫 印刷中
- 12) 梶原景一、森嶋大貴、柳原行義: BLYSと免疫グロブリンのクラススイッチ. 臨床免疫 印刷中
- 13) 柳原行義: IgE産生の調節機構. 分子呼吸器病 印刷中

## 2. 学会発表

- 1) 柳原行義. アレルギーと感染—hygiene hypothesisを含めて—. 第40回日本小児アレルギー学会, 2003.
- 2) 柳原行義. 新規TNFスーパーファミリー分子によるIgE産生の誘導機序 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
- 3) 山本ひとみ、梶原景一、品澤美樹、柳原行義. IL-4/IL-13による気道平滑筋細胞muscarinic M3Rの発現増強作用 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
- 4) 山本ひとみ、梶原景一、品澤美樹、柳原行義. 気道平滑筋細胞における各種メディエーター受容体の発現に対するpoly I : Cの作用. 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
- 5) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、生澤公一、谷口正美、秋山一男、柳原行義. B lymphocyte stimulator (BLyS)とIgEクラススイッチ (1) 樹状細胞におけるBLyS発現とその機能解析 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
- 6) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、生澤公一、柳原行義. B lymphocyte stimulator (BLyS)とIgEクラススイッチ (2) 可溶性BLySを用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
- 7) 森嶋大貴、梶原景一、品澤美樹、山本ひとみ、釣木澤尚美、谷口正美、秋山一男、

柳原行義. CpG ODNによるIgE産生の調節作用 (1) 末梢血単核細胞を用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.

- 8) 品澤美樹、梶原景一、森嶋大貴、山本ひとみ、柳原行義. CpG ODNによるIgE産生の調節作用(2) B細胞を用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
- 9) 山本ひとみ、梶原景一、柳原行義. 気道平滑筋細胞における各種メディエーターレセプターの発現に対するIL-4/IL-13 と poly I : Cの影響 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003.
- 10) 梶原景一、山本ひとみ、生澤公一、柳原行義. 新規TNF様リガンドであるBLySとAPRILによるIgEクラススイッチの誘導 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003.

## 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、森嶋大貴 (国立相模原病院臨床研究センター)

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 相 沢 久 道 久留米大学医学部第一内科教授

研究協力者	古 賀 丈 晴	久留米大学医学部第一内科講師
	大 下 祐 一	久留米大学医学部第一内科
	上 村 知 子	久留米大学医学部第一内科
	井 上 博 雅	九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設
	松 元 幸 一 郎	九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

研究要旨

難治性喘息の発症機序を解明する目的で、(1)難治性喘息の頻度とその背景因子の調査、(2)難治性の危険因子の一つである気道リモデリングの機序を健とするため、リモデリングのトリIGGERとなる MMP-9 の産生を気管支喘息患者で検討した。その結果、(1)難治性喘息患者は 15 例 (11.4%) であった。難治性喘息では非難治性喘息に比し、成人発症、ペット飼育、慢性副鼻腔炎/鼻茸の合併、アスピリン喘息の合併が有意に多かった。また、スパイロメトリーでは、FEV1/FVC が有意に低く、 $\beta 2$  刺激薬に対する反応も有意に悪かった。(2) MMP-9 は喘息発作時に有意に増加し、発作が緩解するとコントロールのレベルまで戻ることがわかった。これらの成績より、難治性喘息患者の臨床的な危険因子が明らかになった。また、難治性喘息患者では気道狭窄が持続するにもかかわらず気管支拡張薬に対する可逆性が低下しており、気道のリモデリングが存在することが考えられた。さらに、MMP-9 の成績より、気道リモデリングは喘息発作のたびに進行していく可能性が考えられ、日常の喘息コントロール不良がさらに難治化を進行させる要因になることが示唆された。

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。我々は難治性喘息の発症機序を解明するために、

(1)その危険因子を明らかにする目的で、難治性喘息患者の臨床像での特徴を当科受診中の難治性喘息患者・非難治性喘息患者で調査した。

(2)さらに、難治化の危険因子の一つと考えられる気道リモデリングの関与を検討するために、気道リモデリングのトリIGGERとされている MMP-9 を喘息患者の末梢血を用いて経時的に検討した。

B. 方法

(1)対象は久留米大学第一内科通院中の132例の気管支喘息患者で、レトロスペクティブに診療録より調査した。調査項目は、病歴として現在の治療、家族歴、発症年齢、増悪回数・程度、入院歴、致死的発作の有無など、環境因子として喫煙、粉塵曝露、ペット飼育など、他疾患の合併の有無としてアトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎/鼻茸、湿疹、蕁麻疹、アスピリン過敏性などである。さらに、スパイロメトリー、末梢血所見、IgEを調査した。

(2)喘息発作で受診した患者の末梢血を採取し、

MMP-2、MMP-9、TIMP-1を測定した。これらの患者を経過観察し、完全に発作が緩解した時点で再度末梢血中のMMP-2、MMP-9、TIMP-1を測定した。

C. 結果

(1)ATSの診断基準に合致する難治性喘息患者は15例 (11.4%) であった。これらの患者の、病歴、環境因子、合併症、スパイロメトリー、末梢血所見、IgEを調査したところ、難治性喘息では非難治性喘息に比し、成人発症が多く、ペット飼育、慢性副鼻腔炎/鼻茸の合併、アスピリン喘息の合併が有意に多かった。また、スパイロメトリーでは、FEV1/FVCが有意に低く、 $\beta 2$ 刺激薬に対する反応も有意に低かった。

Pulmonary function tests

	non-RA	RA	p
%FEV1(%)	81.0±22.3	72.8±26.6	0.42
%FEV1(post)(%)	89.1±21.1	79.9±26.9	0.32
FEV1/FVC(%)	88.1±13.7	87.7±13.8	0.013
FEV1/FVC(post)(%)	89.1±21.1	79.9±26.9	0.012
ΔFEV1(ml)	221±171	145±106	0.085
ΔFEV1/ΔIIFEV1(%)	12.2±10.5	11.4±10.1	0.81

表 1. 難治性喘息(RA)と非難治性喘息(non-RA)での肺機能の比較. 難治性喘息では気管支拡張薬吸入前後のFEV1/FVCとも有意に低く, 気管支拡張薬による改善も悪い傾向にあった.

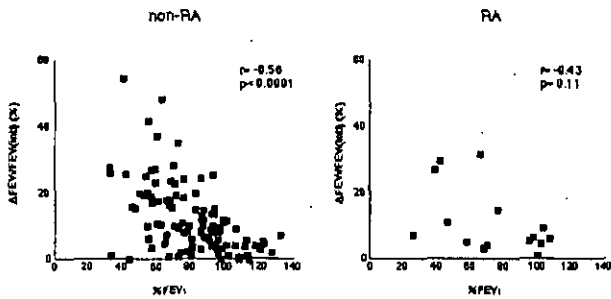


図 1. 非難治性喘息では, %FEV1が小さいほど気管支拡張薬による改善率も大きくなるが (図左), 難治性喘息ではこの相関が無く, 気道狭窄があっても改善率が悪い (図右).

(2)末梢血中の MMP-2, MMP-9, TIMP-1 の検討では, 喘息発作時に MMP-9 が有意に増加することが分かった. この MMP-9 は発作が緩解するとコントロールのレベルまで戻った.

Serum MMPs and TIMP-1 concentrations

	Exacerbation (n=21)	Stable (n=21)	p-value*
MMP-2 (ng/ml)	998.9 (42.7)	1041.1	0.3585
MMP-9 (ng/ml)	202.9 (22.0)	(42.7)	0.0003
TIMP-1	285.0 (16.7)	107.7 (9.9)	0.0969
(ng/ml)		321.7 (15.2)	

Data are presented as mean (SE).  
MMP = matrix metalloproteinase; TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinase.  
Mann-Whitney U non-parametric test.

表 2. 気管支喘息発作時には MMP-1 が有意に高い.

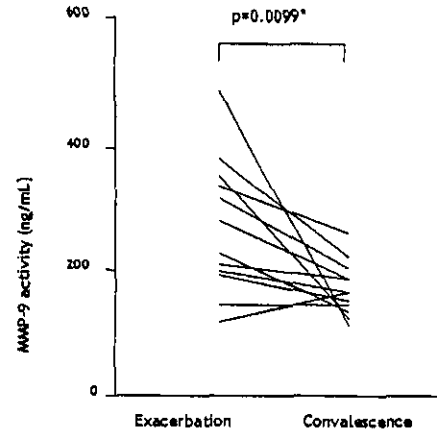


図 2. 喘息発作が緩解すると MMP-9 濃度は低下する.

#### D. 考察

今回の検討においては, 難治性喘息患者では成人発症, ペット飼育, 慢性副鼻腔炎/鼻茸の合併, アスピリン喘息の合併が有意に多いことが特徴としてあげられると考えられた.

また, 肺機能上の特徴としては気管支拡張剤の前後ともFEV1/FVCが有意に低いことから, 恒に気道狭窄が持続しており, それにもかかわらず気管支拡張剤により十分には改善しないことがわかった.

これらの成績は, 難治性喘息の特徴の1つとして気道のリモデリングの存在を強く示唆するものと考えられた. そこで, リモデリングに関与する MMP-2, MMP-9, TIMP-1の動態を検討したところ, MMP-9は喘息発作時に有意に増加することが分かった. したがって, 喘息発作時はMMP-9が増加しリモデリングが進行する可能性が考えられた. したがって, 日常の喘息のコントロール不良はさらに難治化を進める可能性が考えられた.

#### E. 結論

喘息のコントロール不良は気道リモデリングを促進し, 喘息の難治化の原因になると考えられた.

#### F. 業績

1. Aizawa H, Yoshida M, Inoue H and Hara N. Traditional oriental herbal medicine, Bakumondo-to, suppresses vagal neuro-effector transmission in guinea pig trachea. *J Asthma* 40: 497-503, 2003.
2. Hoshino T, Nakamura H, Okamoto M, Kato S, Araya S, Nomiyama K, Oizumi K, Young HA, Aizawa H and Yodoi J. Redox-Active Protein Thioredoxin Prevents Proinflammatory Cytokine- or Bleomycin-Induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1075-1083, 2003.
3. Ichiki M, Gohara R, Fujiki R, Hoashi S.