

- 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* 52: 67-72, 2003a.
4. 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* 64: 306-311, 2003b.
5. 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* 49: 200-205, 2003c.
6. 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* 61: 352-361, 2003.
7. Kajl M, Watanabe A and Aizawa H. Differences in clinical features between influenza A H1N1, A H3N2, and B in adult patients. *Respirology* 8: 231-233, 2003.
8. Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Kirii Y, Nishiwaki E, Maeda Y, Takeda J, Okamoto M, Kato S, Imazumi 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* 121: 502-509, 2003a.
9. 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* 18: 975-983, 2003b.
10. 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.
11. Kawayama T, Fujiki R, Honda J, Rikimaru T and Aizawa H. High Concentration of (1 \rightarrow 3)-beta-D-Glucan in BAL Fluid in Patients With Acute Eosinophilic Pneumonia. *Chest* 123: 1302-1307, 2003.
12. 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* 58: 757-760, 2003.
13. Mine T, Gouhara 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* 94: 548-556, 2003.
14. Kawayama T, Fujiki R, Rikimaru T and Aizawa H. Chronic eosinophilic pneumonia associated with Schizophyllum commune. *Respirology* 8: 529-531, 2003.
15. Harada M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Kumemura H, Fujimatsu Y, Hanada S, Koga H, Harada R, Tanaka K, Okamura T, Kumashiro R, Aizawa H and Sata M. Unusual hyperbilirubinemia associated with bacterial pneumonia and acute myeloid leukemia. *Hepato Res* 26: 114-118, 2003.
16. 北里裕彦, 池堂ゆかり, 山田一彦, 溝口祐輔, 星野友昭 and 相沢久道. 塩酸テモカプリル (エースコール) による薬剤誘起性間質性肺炎の1例. 日本呼吸器学会雑誌 41: 660-665, 2003.
17. 藤木 玲, 白石 香, 野田和人, 大下祐一, 深堀茂樹, 城島浩人, 田中 健, 力丸 徹 and 相沢久道. 粟粒結核に起因した血球貪食症候群の1例. 結核 78: 443-448, 2003.
18. 嶋田亜希子, 大下祐一, 木下 隆, 力丸 徹 and 相沢久道. 原発性上咽頭結核の1例. 結核 78: 751-755, 2003.
19. 森松嘉孝, 田中勝一郎, 田口和仁, 戸田玲子, 緒方健二, 本田和, 丸岡浩誌 and 相沢久道. MPO-ANCA 陽性結節性多発動脈炎患者に発症した仁動脈瘤破裂による出血性ショックの一例. 日本サルコイドーシス学会誌 23: 99-103, 2003.
20. 森松嘉孝, 石川律子, 横須賀公章, 石竹達也, 加納龍彦 and 相沢久道. 高濃度トリクロロエチレン曝露に伴った急性肺損傷の1例. 呼吸と循環 51: 1167-1170, 2003.
21. 森松嘉孝, 木下正治, 古賀丈晴 and 相沢久道. 気管支喘息が顕在化しなかったアレルギー性肉芽腫性血管炎の1例. 日本呼吸器学会雑誌 41: 655-659, 2003.
22. 森松嘉孝, 渡邊 尚 and 相沢久道. 急速に進行し、白血球減少を来した COP/BOOP の症例. 呼吸 22: 714-719, 2003.
23. 森松嘉孝, 秋吉裕也 and 相沢久道. 壊死性筋膜炎に対する左下肢截肢術により急性期をのりきった敗血症型 *Vibrio vulnificus* 感染の1例. 感染症学会誌 77: 174-177, 2003.

気道炎症遷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

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

重症喘息では、正常な炎症終息機構の逸脱により、気道炎症が遷延化した状態が生じている。その結果もたらされた修復機構の破綻が非可逆的変化である気道リモデリングである。この病態における主要なエフェクター細胞は好酸球であるが、その機能についてはまだ解明されるべき点が多い。本研究では、好酸球性炎症遷延化の機構として、炎症による組織障害で遊離する可溶型の細胞外基質蛋白がケモカインによる好酸球遊走を増強することを明らかにするとともに、関与する接着分子についても解析した。さらに、昨年の研究でヒスタミンが H4 受容体を介して好酸球遊走を起こすことを報告したが、本年度は好酸球のヒスタミン受容体の発現動態を検討し、IL-5, GM-CSF が H4 受容体を選択的に発現誘導することを明らかにした。次に、リモデリングの病態として、好酸球がロイコトリエンの刺激によって、線維化サイトカインのひとつである TGF- β を産生すること、さらにこの産生が IL-5 などの好酸球活性化サイトカインによって著しく増強されることを明らかにした。以上、好酸球が気道炎症の遷延化、気道リモデリングに関与する機構の一端を解明した。今後の新しい治療ターゲット選定に有用な情報になると考えられた。

A. 研究目的

重症喘息では、正常な炎症終息機構の逸脱により、気道炎症が遷延化した状態が生じている。その結果もたらされた修復機構の破綻が非可逆的変化である気道リモデリングである。そのなかでの主要なエフェクター細胞は好酸球であるが、詳細な機能についてはまだ解明されるべき点が多い。好酸球は気道上皮に対する強力な障害活性のみならず、その強力なサイトカイン産生によりその他の炎症細胞や気道の構築細胞の機能に影響を及ぼす可能性をもつ。本研究では炎症遷延化とリモデリングに果たす好酸球の役割を解明し、その正常化を導く治療法の開発をめざすが、本年度は好酸球性炎症遷延化の機構として、炎症による組織障害過程で遊離する可溶型の細胞外基質蛋白が好酸球遊走に及ぼす影響について、及び好酸球の遊走に関わるヒスタミン受容体の動態について検討した。また、好酸球のリモデリング病態への役割解明を目的として、好酸球由来線維化サイトカインである TGF- β 産生機構についても検討した。

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 ChemotaxiceTM を

用いて検討した。各種濃度の細胞外基質蛋白 (collagen I, collagen IV, laminin-1, laminin-10, fibronectin, fibrinogen) 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各種接着分子に対する抗体 (CD29, 49d, 49f, 47, 18, 11a, 11b) または isotype-matched control IgG と 30 分間反応させ、90 分後に下室へ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。H1, H2, H3, H4 受容体のプライマーは Applied Biosystems 社の Primer Express ソフトウェアを用いて設計した。

好酸球の TGF- β 遺伝子発現は細胞を LTD4 または IL-5, GM-CSF で刺激後、定量的 PCR 法によって測定した。

C. 研究結果

collagen IV, laminin-1, laminin-10, fibronectin, fibrinogen は eotaxin による好酸球の遊走を有意に増強した (図 1)。collagen I は作用を持たなかった。これらの蛋白は単独では好酸球

遊走を誘導せず、Eotaxinを介するシグナルを増強する(ERKリン酸化を確認)ものと考えられた。

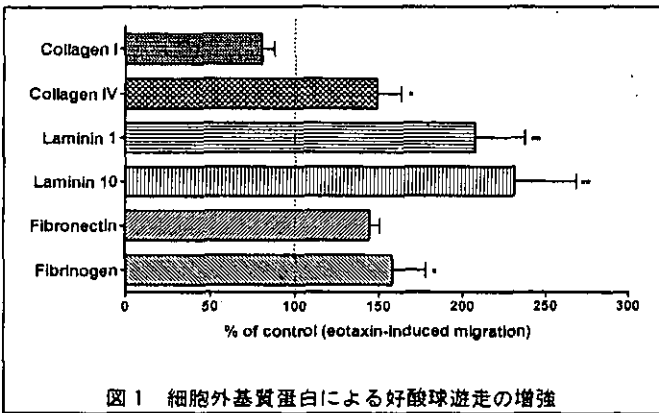


図1 細胞外基質蛋白による好酸球遊走の増強

この中でもっとも強い活性を持つ laminin について以後の検討を進めたが、遊走増強効果は eotaxin を介するものだけでなく、PAF、C5a による遊走も同様に増強することを観察した。

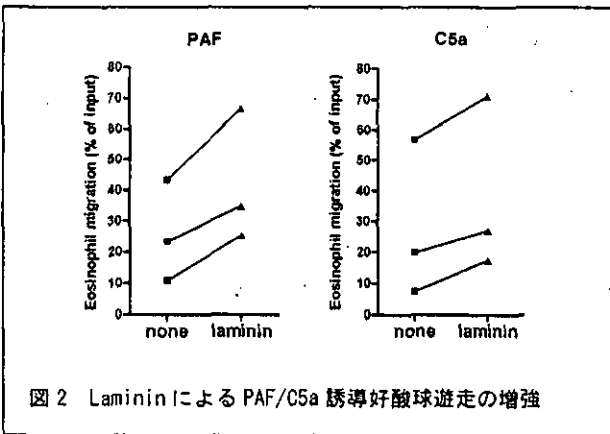


図2 LamininによるPAF/C5a誘導好酸球遊走の増強

次に、これらの作用がどの接着分子を介するかについても検討を加えた(図3A、3B)。

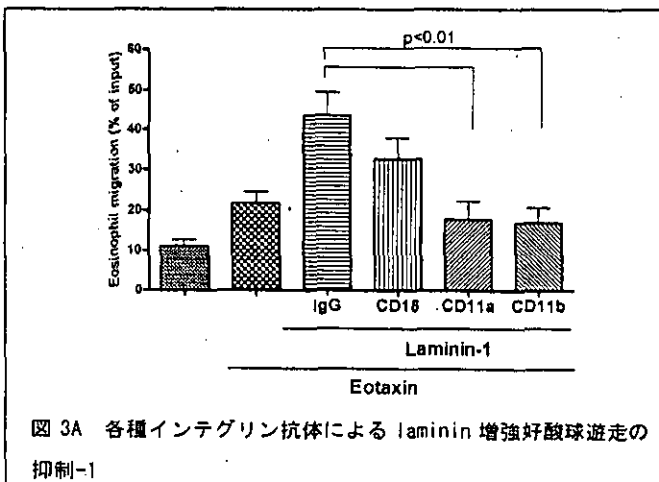


図3A 各種インテグリン抗体による laminin 増強好酸球遊走の抑制-1

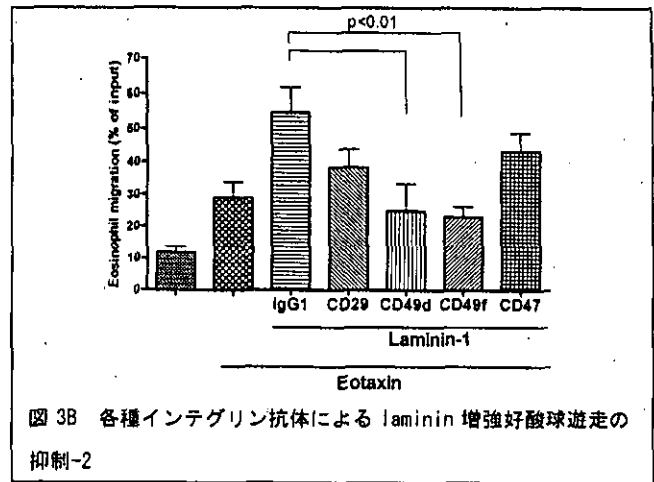


図3B 各種インテグリン抗体による laminin 増強好酸球遊走の抑制-2

その結果、lamininによる遊走増強効果は $\alpha 1$, αM , $\alpha 6$, $\alpha 4$ に対する抗体で抑制されることが観察され、lamininは多種のインテグリンを介して好酸球遊走に関与することが示唆された。

次に、好酸球のヒスタミン受容体発現動態について検討した。昨年度の研究で、ヒスタミンが H4 受容体を介して、好酸球を遊走させることを明らかにしたが、今回は IL-5, GM-CSF などの好酸球活性化サイトカインがヒスタミン受容体発現に及ぼす影響をみた。IL-5, GM-CSF はいずれも H4 発現を著しく増強するが、H1, H2, H3 発現にはまったく作用を持たないことが明らかとなった(図4A)。

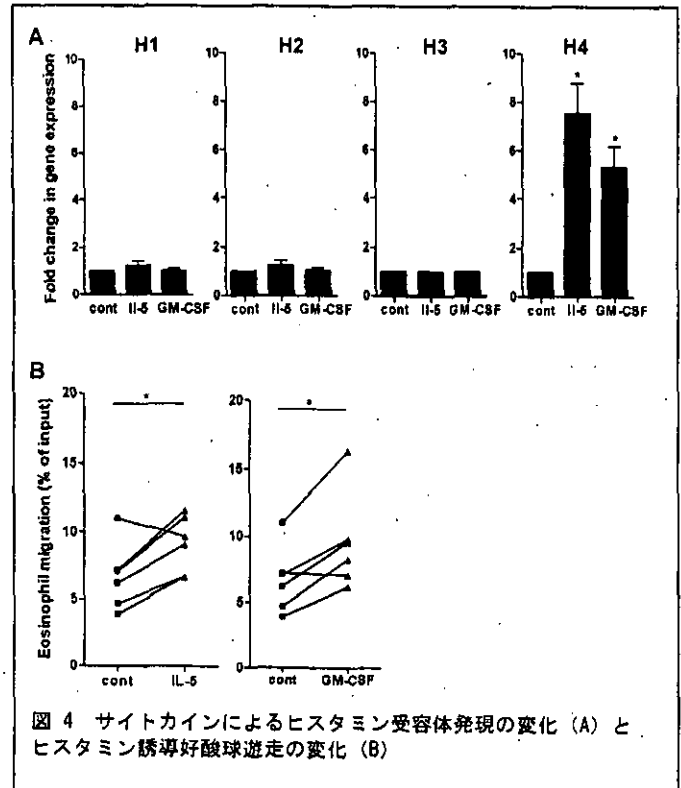


図4 サイトカインによるヒスタミン受容体発現の変化(A)とヒスタミン誘導好酸球遊走の変化(B)

さらに IL-5 または GM-CSF 前処置により、実際にヒスタミン誘導の好酸球遊走が増強することも確認した (図 4B)。

最後に、好酸球からの TGF- β 産生機構について検討した。好酸球を LTD4、IL-5、GM-CSF またはそれらのコンビネーションにて刺激すると、いずれも TGF- β mRNA 発現が誘導された。とくに LTD4+IL-5、LTD4+GM-CSF の組み合わせで相乗的に遺伝子発現が増強されることが明らかとなり、好酸球活性化サイトカインとロイコトリエンの共存がリモデリング促進に関わる可能性が示唆された (図 5)。

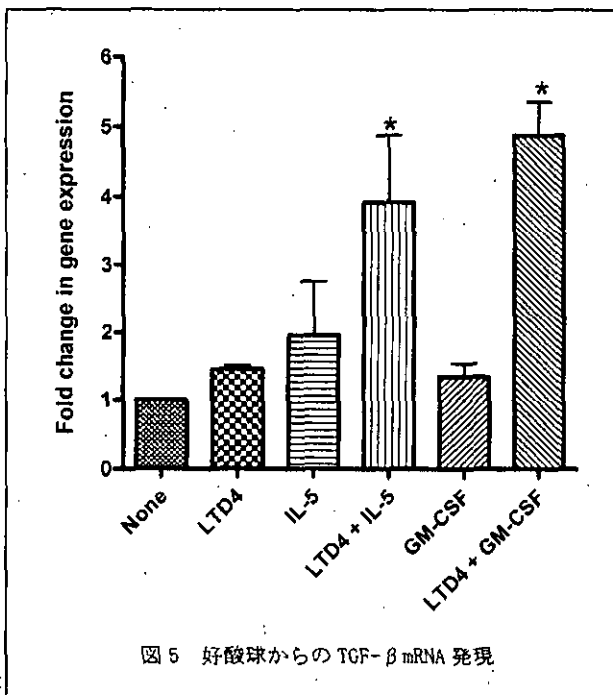


図 5 好酸球からの TGF- β mRNA 発現

また、LTD4 による TGF- β 発現は CysLT1 受容体拮抗薬 Montelukast により抑制されたが、Dexamethasone は効果をもたないことも観察した。これはリモデリングにはステロイド不応の局面が存在することを示すものと考えられた。

D. 考察

本年度の研究においては、第一にラミニンをはじめとする細胞外基質蛋白が、エオタキシン、PAF または C5a による好酸球遊走を著しく増強することを明らかにした。難治性気管支喘息患者の肺組織では、浸潤した炎症細胞からのメディエーターにより組織破壊が起こっているが、マトリックスメタプロ

テアーゼ (MMP) などの蛋白分解酵素がこの組織障害に強く関与することが報告されている。MMP は細胞外基質蛋白を分解して、リモデリングの形成に関わるとともに、炎症細胞の浸潤の誘導も促すとされている。MMP による細胞浸潤促進のメカニズムはこれまで知られていなかったが、今回のデータはプロテアーゼで分解を受け可溶化した細胞外基質蛋白が好酸球の遊走を増強し、炎症のさらなる増悪を誘導している可能性を示したといえる。喘息の動物モデルではプロテアーゼの阻害により、好酸球性炎症が抑制され、気道過敏性も改善すると報告されており、今回のデータと合わせると、細胞外基質蛋白の分解・遊離抑制=プロテアーゼ阻害が新しい治療戦略のひとつになり得ると考えられた。

次に、IL-5、GM-CSF がヒスタミンによる好酸球遊走を増強し、ヒスタミン受容体のうち H4 を選択的に発現誘導することを明らかにした。昨年度の研究でヒスタミンが H4 受容体を介して好酸球遊走をおこし好酸球性炎症成立に関わることを示したが、今回のデータは IL-5、GM-CSF 産生が亢進する難治性喘息患者では H4 を介した好酸球浸潤がさらに強く誘導されることを示唆する。H4 受容体の機能にはまだ不明な点が多いが、これをターゲットとする治療が炎症の抑制に有効である可能性がある。

最後に、LTD4 が TGF- β 発現を誘導すること、IL-5、GM-CSF がこれを相乗的に増強することを初めて明らかにした。好酸球由来の TGF- β が気道リモデリングに関与することは報告されているが、ロイコトリエンがこの過程に深く関わっていることを示すと考えられる。ロイコトリエン受容体拮抗薬の臨床的有用性はすでに認められているところであるが、今後は単なる症状抑制のみならず、リモデリング予防をも目的とした、より効果的な投与方法も検討されるべきであると考えた。

E. 結論

難治性喘息の特徴である好酸球性炎症の成立機構について、可溶型の細胞外基質蛋白と H4 受容体の関与を明らかにした。さらに、好酸球の TGF- β 産生の動態についても検討し、ロイコトリエンの関わりを明らかにした。本研究で明らかとなった難治化

に関わる分子群はいずれも新たな治療ターゲットになり得るものであり、今後さらに解析を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文

- (1) Yoshimura-Uchiyama C, Yamaguchi M, Nagase H, Fujisawa T, Ra C, Matsushima K, et al. Comparative effects of basophil-directed growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302:201-6.
- (2) 藤澤隆夫: アレルギー疾患における好酸球と気道上皮細胞のインターアクション. *アレルギー科* 15(3):245-250, 2003
- (3) 藤澤隆夫: アレルギー疾患の免疫学: 好酸球の役割. *小児内科* 35(4):556-560, 2003
- (4) 藤澤隆夫: 気管支喘息における好酸球の役割: 好酸球悪玉説. *喘息* 16(4):21-26, 2003
- (5) 藤澤隆夫: 気道炎症マーカーの選び方と解釈. *小児科外来診療のコツと落とし穴* 1) 小児喘息診療 p24-25, 柳沢正義, 森川明廣 編, 中山書店, 東京, 2003
- (6) 藤澤隆夫: 抗アレルギー薬療法における薬剤選択について—症例による検討. *小児科外来診療のコツと落とし穴* 1) 小児喘息診療 p126-127, 柳沢正義, 森川明廣 編, 中山書店, 東京, 2003
- (7) 藤澤隆夫: アレルギー疾患増加の原因: Th1・Th2細胞とサイトカイン. *小児科診療* 66(8):1327-1331, 2003
- (8) 藤澤隆夫: 薬剤による気道リモデリングのアーリーインターベンション: 新たな治療法の展望. *アレルギーの臨床* 308(9):789-793, 2003
- (9) 藤澤隆夫: 喘息にかかわる炎症性細胞の特徴と役割 p 25-41, 図説 *小児喘息の特徴-病態と薬物療法を中心に* 西間三馨, 森川昭廣 編, メディカルレビュー社, 東京, 2003
- (10) 藤澤隆夫: 診断: 随伴症 p83-92, *小児のアレルギー性鼻炎* 西間三馨, 森川昭廣 編, 現代医療社, 東京, 2003
- (11) 藤澤隆夫: 科学的根拠に基づくアレルギー治療. *日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌* 2(1), 1-4, 2004
- (12) 藤澤隆夫: 好酸球研究の最前線. *医学のあゆみ* 208(8), 697-701, 2004

2. 学会発表

- (1) Takao Fujisawa, Yoshiko Kato, Hitoshi Kamiya, Osamu Yoshie. Autocrine activation of eosinophil transmigration by cyteinyl leukotrienes. 60th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (San Francisco, USA) (2004. 3. 18-24) *J Allergy Clin Immunol* 113:s166, 2004
- (2) 藤澤隆夫. 「シンポジウム 喘息における吸入ステロイドとの併用療法」LT受容体拮抗薬の併用療法. 第53回日本アレルギー学会総会, 岐阜市. 2003. 10. 23-25 *アレルギー* 52: 782, 2003

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 (国立療養所三重病院臨床研究部)

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・治療法開発に関する研究
分担研究総合研究報告書
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

分担研究者 庄司 俊輔（国立療養所南福岡病院副院長）

研究要旨

気道平滑筋の肥厚は難治性喘息におけるリモデリングの病理組織学的特長であり、その制御はリモデリングの治療に繋がる。本研究では気道平滑筋肥厚の要因として平滑筋細胞の遊走を考え、気管支平滑筋細胞を用いて気道に存在する多様な因子による作用を解析することで新たな治療標的を同定することを目的とした。本年度は気管支平滑筋細胞自身によりオートクラインに産生・放出されるプロテアーゼの検討を行い、120、58 及び 54kDa の少なくとも 3 種のゼラチナーゼを確認した。また細胞外基質及び気管支平滑筋細胞培養上清へと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認められなかった。以上の結果より、気管支平滑筋細胞は細胞外基質因子の産生と共にプロテアーゼ産生による細胞外基質の分解により平滑筋の肥厚に関与する可能性が示唆された。

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）
岡元 孝二（同上 教授）

A. 研究目的

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ひとつの病態である。気道の修復やリモデリングにおいては平滑筋細胞を含む気道の構成細胞が活性化され傷害部位に遊走し、増殖しながら細胞外基質因子、サイトカイン、プロテアーゼ等を産生していると考えられる。本研究では気道リモデリングの病理組織学的特長である平滑筋の肥厚が平滑筋細胞の遊走到に起因し、さらにその遊走因子が平滑筋細胞自身によりオートクラインに産生されている可能性を考えて気道リモデリングへの平滑筋細胞の遊走を検討してきた。現在下気道のリモデリングが喘息重篤の原因になることが報告されている為、遊走実験には下気道におけるリモデリングを想定して気管支平滑筋細胞を使用した。その結果本研究では前年度、気管支平滑筋細胞が産生・放出した細胞外基質因子が気管支平滑筋細胞自身をオートクラインに遊走させる因子として作用する可能性を示した。しかし気管支平滑筋細胞が結合織内へと遊走する為には、結合織を構成する細胞外基質因子を分解して自らの遊走経路を作らねばならない。そこで本年度は気管支平滑筋細胞自身より産生・放出されるプロテアーゼの解析を行った。

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細胞（米国クロネティクス社より購入）である。遊走実験ではこの細胞をサブコンフルエントにまで培養した後、トリプシン処理により回収して使用した。細胞培養上清はこの気管支平滑筋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、ディッシュ中の培地を無血清培地に置換し、37°C、5%CO₂ 条件下で一定時間培養したものを採取した。

気管支平滑筋細胞培養上清中にプロテアーゼが含まれているか否かを検討する為、細胞培養上清を濃縮した後にゼラチンザイモグラフィを行った。この時、アクリルアミドゲル濃度は 7.5% に設定した。

次いで気管支平滑筋細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清及び細胞外基質因子の遊走活性を 48 穴ボイデンチャンバーにより測定した。チャンバーの下室に遊走活性を測定する細胞外基質因子或いは気管支平滑筋細胞培養上清、上室に 1×10⁶ cells/ml に調整した気管支平滑筋細胞の浮遊液を入れ、37°C、5%CO₂ 条件下で 6 時間（遊走時のプロテアーゼ活性変化を測定する際は経時的に）インキュベートした。細胞外基質因子はラミニン及びフィブロネクチンの 2 種類を使用した。インキュベート終了後、遊走膜の下室側に遊走し

た細胞のみを Diff-Quick 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した。遊走実験後のチャンバー下室のサンプルは濃縮した後、7.5%アクリルアミドゲルを用いてゼラチンザイモグラフィを行った。

C. 結果

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上清を採取するまでの細胞培養時間依存的な増加を示した。この時、120, 58 及び 54kDa 少なくとも 3 種類のゼラチナーゼについて活性増加が認められた (Fig.1)。一方、細胞外基質因子及び細胞培養上清へと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 (Fig.2 及び 3)。

D. 考察

近年、気道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 AD, 2001)。この仮説は気道平滑筋細胞の遊走が平滑筋の肥厚に関与する可能性を示している。また現在、下気道のリモデリングが喘息重篤化の原因となることが報告されている。昨年の研究では気管支平滑筋細胞を用い、平滑筋細胞が平滑筋細胞培養上清へと遊走することを示した。この結果を基に、今年度の研究においては平滑筋細胞が結合織内へと遊走する為には細胞外基質因子と共にプロテアーゼをオートクラインに産生・放出との仮説を立てた。そして遊走実験後の細胞培養上清や細胞外基質因子を採取し、遊走実験前に比べプロテアーゼ活性に変化が見られるかどうかをゼラチンザイモグラフィにより検討を行った。

ゼラチンザイモグラフィの結果、気管支平滑筋細胞は遊走時に有意なプロテアーゼ活性の増加を示さなかった。細胞培養上清中に産生されるプロテアーゼ活性は経時的に増加していたことから、本実験系における気管支平滑筋細胞はプロテアーゼ産生・放出を行なうものと遊走するものとの二種類に分かれている可能性がある。今後はプロテアーゼ阻害剤を用いたザイモグラフィにおけるプロテアーゼ活性の阻害やプロテアーゼ抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、気管支平滑筋細胞培養上清中のプロテアーゼを同定することを予定している。

E. 結論

気管支平滑筋細胞培養上清中に産生されるゼラ

チナーゼ活性は細胞培養時間依存的に増加するが、気管支平滑筋細胞より遊走時に産生・放出されるプロテアーゼ活性の増加は遊走活性と相関しなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 気管支喘息の気道リモデリングにおける細胞外マトリックス及び気道平滑筋細胞の意義
北九州医工学術者会誌 p39~42 (2003,6)

2. 学会発表

1) Involvement of extracellular matrix components in chemotactic response of airway smooth muscle cells associated with airway wall remodeling
The 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (2003,6,6)

2) 気管支喘息の気道リモデリングにおける細胞外マトリックス及び気道平滑筋細胞の意義
第 27 回 北九州医工学術者会議
(2003,6,27)

3) Effect of extracellular matrix components on the migration of airway smooth muscle cells in asthma
第 76 回 日本生化学会大会
(2003,10,18)

4) 気管支喘息での気道リモデリングにおける細胞外基質因子の気管支平滑筋細胞遊走作用
第 53 回 日本アレルギー学会総会
(2003,10,24)

5) 気管支喘息での気道リモデリングにおけるオートクライン機序による気道平滑筋細胞遊走の意義
第 7 回 アレルギー・気道上皮細胞研究会
(2003,12,6)

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

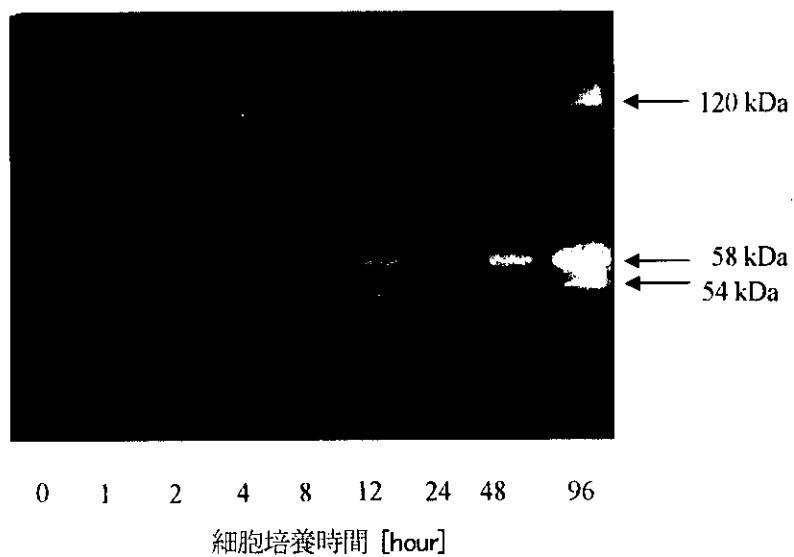


Fig.1 気管支平滑筋細胞培養上清に存在するプロテアーゼ

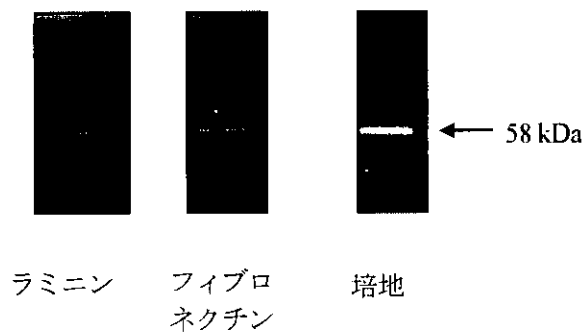


Fig.2 ラミニン及びフィブロネクチンへ遊走する気管支平滑筋細胞より放出されるプロテアーゼ

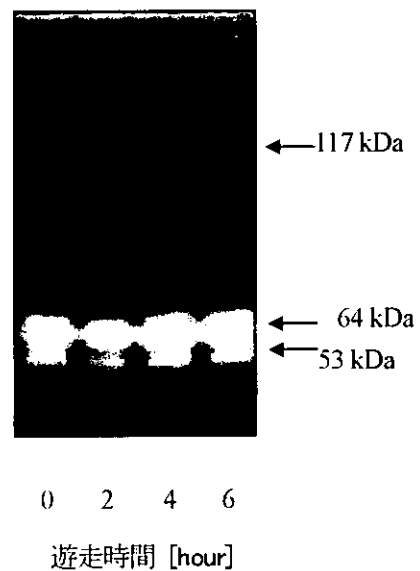


Fig.3 気管支平滑筋細胞の遊走に伴う平滑筋細胞培養上清中のプロテアーゼ変化

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

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

分担研究者 高橋 清 国立療養所南岡山病院長

研究要旨

難治性喘息の機序を解明し、それに基づいて重症喘息に適合した治療法を行うことを目的とし、臨床と基礎の両面から検討した。まず臨床的検討では、難治性喘息は成人発症型、非アトピー型が圧倒的多数を占め、アスピリン喘息や上気道疾患の合併が高率であった。また病期期間は10年以上で、全例日常発作管理が不十分(有症状)であった。次に基礎的検討では、ステロイド非投与で中等・重症例のリンパ球機能はPBMCのS.I.が高値であったが、難治例の一部にCandida抗原に対するIL-5、IL-13、並びに樹状細胞由来と考えられるTARK産生が亢進し、TH2系が活性化されBurning typeを示唆する症例の有無が明らかになった。またIgE依存性の反応並びに遅発型喘息反応を介して難治化に関与する好塩基球は、Dexamethasoneでアポトーシスが誘導され、IL-3で抑制されることが判明し、治療へのヒントが得られた。

以上、難治性喘息には気道炎症が制御できていないBurning typeと、長期にわたる不十分な治療で肺が器質化して治療に不応性となったBurn out type等があることから、今後臨床像と基礎的解析により両群を分類し、それに合わせた治療法を確立したい。

研究協力者

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）
平野 淳（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

喘息が難治化し、ステロイド薬に依存する病態と過程は様々である。従って難治性喘息の治療や喘息の重症化を予防するために個々の症例の特性に合致した治療法と対策をとることが求められる。その目的でまずかかる臨床上的特徴を整理し、治療に抵抗する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で呼吸機能と薬剤反応性が低下した難治群(Burn out type)の2群に分類することを試みる。

その裏付けとして、まず難治病態の中心を担うリンパ球機能と気管支上皮細胞の特有な抗原反応性の制御と相互反応性を検討する。

次いでIgE依存性アレルギー性炎症や遅発型喘息反応局所に好酸球とともに好塩基球が増加しており、気管支喘息の慢性化・難治化病態に

関与していることが示唆されていることから、難治化予防の治療戦略を立てる上でIgEの標的細胞としてのマスト細胞や好塩基球におけるアポトーシス(AP)の制御機構を明らかにすることは、有用と考えられる。そこで、ヒト末梢血幹細胞培養好塩基球を用いて、好塩基球のAPに及ぼすサイトカインやステロイド薬の効果を検討する。

B.研究方法

(1)臨床的検討：JGL'98に示されている“重症喘息のなかで、喘息症状を最小限にするためにBDPの大量吸入(800~1600 μ g/日)と経口ステロイド薬(PSL1日10mg以上)を長期(1年以上)にわたり維持量として使用することが必要な”難治性喘息23例を対象に、今年度は表1.に示す各指標の内の臨床的指標について解析した。

(2) リンパ球機能の検討：前記 2 型の難治群間におけるリンパ球の活性化、サイトカイン産生パターンの解析を Flow cytometry と ELISA 法を用いて行った。さらに気道炎症において重要な役割を担う細胞である気管支上皮細胞とリンパ球、好酸球、樹状細胞 (DC) との相互反応を難治症例の PBMC と気管支上皮培養細胞を用いて解析した。

(3) 悪性リンパ腫や肺癌の治療において末梢血幹細胞移植の目的で採取された幹細胞を豊富に含む末梢血単核球の一部を IL-3 (5ng/ml) の存在下で 3 週間培養し、immunomagnetic beads を用いた negative selection により高純度 (95% 以上) の好塩基球を得た (Clin Exp Allergy 2003; 33: 1561)。この培養好塩基球をさらに IL-3 や Dexamethasone (DEX) の存在下で培養し、観察される AP を Annexin V と PI による二重染色の後 Flow cytometry で解析した。

C. 研究結果

(1) 難治性喘息症例の臨床指標の検討では、患者背景は男 13 例、女 8 例で、現年令は中央値 59 才 (23~75 才) であり、その発症年令は小児発症型喘息が 2 例のみで他の 21 例は成人発症型 (平均 38 才) であった。病悩期間は 6/9 例が 10 年から 20 年未満で 30 年以上が 2/9 例であった。また半数以上は喫煙歴がなかった。病型は 1 例を除いて全例が混合・感染型を合わせた非アトピー型であり、血清 IgE 値も低かった (表 2)。合併症には、アスピリン喘息が一般喘息に比べて非常に多く、その他上気道疾患も高頻度にみられた (表 3)。かかる難治症例の臨床症状は、経口ステロイド薬を含む高用量の抗喘息薬の使用にも係わらず、66% の患者が何らかの症状を毎日自覚し、年間を通して無症状の症例はなかった (図 1)。

(2) リンパ球の活性化の検討では、ステロイドの全身投与のない中等症・重症例において活性化の指標 (Stimulation Index : S.I.) が高値を示した (図 2a)。しかし、逆にステロイドの全身投

与のある難治症例の一部に Candida 抗原に対する IL-5 (図 2b)、IL-13 (図 2d) の産生が増加しており Th2 サイトカインの産生亢進がステロイドの投与によっても抑制されてないことが示唆された。また Th2 ケモカインである TARC の PBMC からの産生の検討では、ダニ抗原に対しては軽症例で高値を示すが、カンジダ抗原では中等症・重症で高値を示すなど抗原による差が認められた (図 2c)。また、末梢血中の TARC 濃度の測定では、難治群でも高値を示すなど、Burning type を示唆する結果が示された。

Monoclonal Antibody を用いた DC depletion により各種抗原に対するリンパ球の活性化は、減少傾向を示した (図 3)。同様に、DC depletion により抗原による PBMC からの IL-5 の産生は減少傾向を示した (図 4)。しかし、PBMC からの TALC 産生は著明に減少し、TALC の産生細胞が DC である可能性が示唆された (図 5)。

図 6 に示すように抗原刺激によるリンパ球の活性化、および IL-5、IL-13、TARC 濃度の関連の検討では、PBMC からの TARC 産生と血清中の TARC 濃度、PBMC からの IL-13 の産生は正の相関を認めた。また、オープンサークルで示した症例は、どの指標も低値を示し Burn out type と考えられた。また、今年度の検討では気管支上皮培養細胞の難治症例における関与は不明であった。

(3) 好塩基球を DEX あるいは IL-3 の存在下、非存在下に 7 日間培養した。DEX や IL-3 の非存在下では、培養 3 日後 (72 時間後) には早期 AP 細胞 (Annexin V 陽性・PI 陰性細胞 ; 図 7) の比率が明らかに増加し、以後経時的に増加した。DEX ($10^{-7}M$) の存在下では培養 3 日後には早期 AP 細胞が著明に増加しており (図 9)、AP の評価は 3 日間培養後の早期 AP 細胞比率で行った。DEX (10^{-6} - $10^{-9}M$) は濃度依存性に AP を誘導した。一方、AP は IL-3 (5pg/ml-5ng/ml) により濃度依存性に抑制された (図 10)。

D. 考察

難治性喘息の特徴は、成人発症型の中高齢者に多く、病期は長期に及ぶが、難治化するまでの期間は様々である。さらにアスピリン喘息や上気道疾患の合併が喘息を慢性化、重症化させて難治性喘息へと進展させる一要因になるものと考えられる。

その他の難治化要因として、アレルゲン等の増悪因子が排除し難い、あるいは治療コンプライアンスが悪いために、経口ステロイド薬でも気道炎症が制御困難な程に強く持続的な場合(Burning type)がある。また現在は気道炎症が終息しつつあるものの、治療が不適切な状態が長期間繰り返された結果気管支壁の肥厚、肺弾性の低下等の器質性肺障害が残存し治療不応性となる場合(Burn out type)がある。それ以外にも、社会的要因や心理的要因によって難治化する場合がある。特にその治療と難治化防止のために病態の相違点を解明する必要があるのは前二者の type であろう。

その観点で難治症例の PBMC を用いたリンパ球機能等を解析した結果、臨床所見より導き出される Burning type と Burn out type に合致する症例の存在する可能性が示された。特に Burning type を示唆する症例では、Candida 抗原に対する IL-5, IL-13 産生が亢進しており、また DC からの Th2 ケモカインである TARC の産生亢進もあり、抗原による病態へ特異的影響が推定される結果であった。

以上、次年度以降は気道炎症を表すアレルゲンに対する IgE 系、好酸球、リンパ球のサイトカイン産生能、さらには好中球や樹状細胞機能等の炎症指標、並びに気道可逆性や喫煙等による気腫性変化を呼吸機能や画像で評価して器質化指標を検討する予定である。

さらに治療法確立の根拠として、末梢血幹細胞を培養して得た大量かつ高純度の好塩基球を用いて AP に及ぼす IL-3 やステロイド薬の効果を検討した。その結果、IL-3 は好塩基球の遊走やケミカルメディエーター遊離を増強するだけでなく、

好塩基球の AP も抑制し、生存延長を強力に誘導することが明らかとなった。このことは、好塩基球が IL-3 などのサイトカインによって活性化され、遅発型喘息反応局所で生存延長し、アレルギー性炎症の遷延化・慢性化に関与している可能性を示唆するものである。一方、グルココルチコイドである DEX は濃度依存性に AP を誘導することが判明し、かかる AP 誘導効果は、気管支喘息におけるステロイド薬の抗炎症作用の機序の一つと考えられた。次年度は IL-3 存在下での DEX の AP 誘導効果、各種喘息治療薬の AP 誘導効果について検討する予定である。

E. 結論

難治性喘息の臨床的指標、リンパ球の活性化やサイトカイン産生の解析から、亜分類の可能性が示唆された。また好塩基球の AP が DEX で誘導され IL-3 で抑制されることが判明し、治療へのヒントが得られた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takao K, Tanimoto Y, Fujii M, Hamada N, Yoshida I, Ikeda K, Imajo K, Takahashi K, Harada M, Tanimoto M. *In vitro* expansion of human basophils by interleukin-3 from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells. *Clin Exp Allergy* 33: 1561-7, 2003.

2) 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. *Allergol Int* 52: 149-54, 2003.

2.学会発表

1)Takahashi K, et al.: Characteristic features of steroid-dependent Intractable asthma in Japan. World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI, (Vancouver), 2003.

2)Kimura G, et al.: The role of T-cell activation and cytokine in severe bronchial asthma. World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI, (Vancouver), 2003.

3)岡田千春他：成人気管支喘息の難治病態におけるリンパ球の活性化とサイトカインの検討 第53回日本アレルギー学会総会 (岐阜), 2003.

4)Suzaki N, Tanimoto Y, Sakugawa M, Hamada N, Takao K, Kanehiro A, Ikeda K, Kataoka M, Tanimoto M, Imajo K, Takahashi K. Effect of anti-asthma drugs on human basophil apoptosis. WAO Congress-XVIII ICACI (Vancouver), 2003.

5)Sakugawa M, Tanimoto Y, Suzaki N, Inoue Y, Ikeda K, Imajo K, Nakajima T, Saito H, Tanimoto M. Human basophils can release interleukin-18 upon FcεRI cross-linking. WAO Congress-XVIII ICACI (Vancouver), 2003.

6)須崎規之, 谷本 安, 佐久川 亮, 高尾和志, 金廣有彦, 池田和真, 片岡幹男, 今城健二, 高橋 清, 谷本光音：ヒト末梢血幹細胞培養好塩基球のアポトーシスに関する検討. 第100回日本内科学会講演会 (福岡), 2003.

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

表 1. 難治性喘息分類の各指標

臨床指標		
(1) 年齢、発症年齢	(4) PSL+BDP量	(7) 合併症(COPD、副鼻腔炎 etc.)
(2) 病歴期間	(5) 病型	(8) 気道過敏性試験
(3) ステロイド依存度と/との期間	(6) IgE・R1ST, RAST	

炎症指標	特異化指標
(1) Allergenの反応 ① 皮内反応 ② IgE・R1ST, RAST ③ リンパ球反応性	(1) 呼吸機能 ① PEFと低値安定 ② RV, 拡張率
(2) (±)好酸球反応 末梢血、喀痰、ECP	(2) 気道可塑性
(3) リンパ球反応 ① Blastogenesis ② Cytokine(IL-5, IL-3 etc.) ③ ILP-3産生能(上皮細胞間遊走)	(3) 画像 ① 胸部Xp ② CT ③ 副鼻腔Xp
(4) 他の炎症細胞反応 ① 好中球とLT-6 ₄ , IL-8 ② 樹状細胞	(4) 喫煙歴 禁煙と受容

表 2. 病型

病型			
アトピー型	混合型	感染型	
n=23例	1例	7例	13例

血清総IgE値			
<100 μ g/ml	100-300	300-1000	>1000
12例	3例	6例	1例

表 3. アスピリン喘息の合併

n=23例	あり	なし	不明
	7例	8例	8例

その他の合併症

アレルギー性鼻炎 5例、副鼻腔炎 5例
肺気腫 2例、慢性気管支炎・拡張症 0例
アトピー性皮膚炎 1例

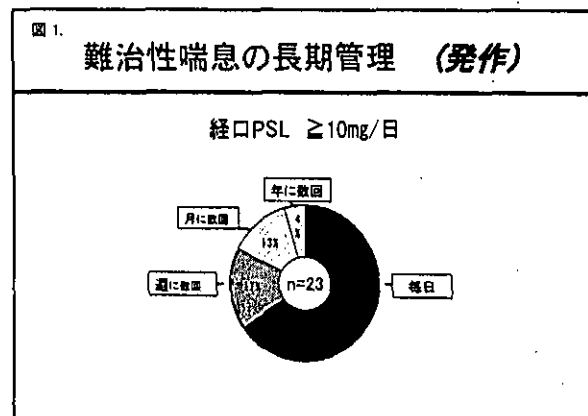


図2 抗原刺激によるリンパ球の活性化およびIL-5, IL-13, TARC levelの検討

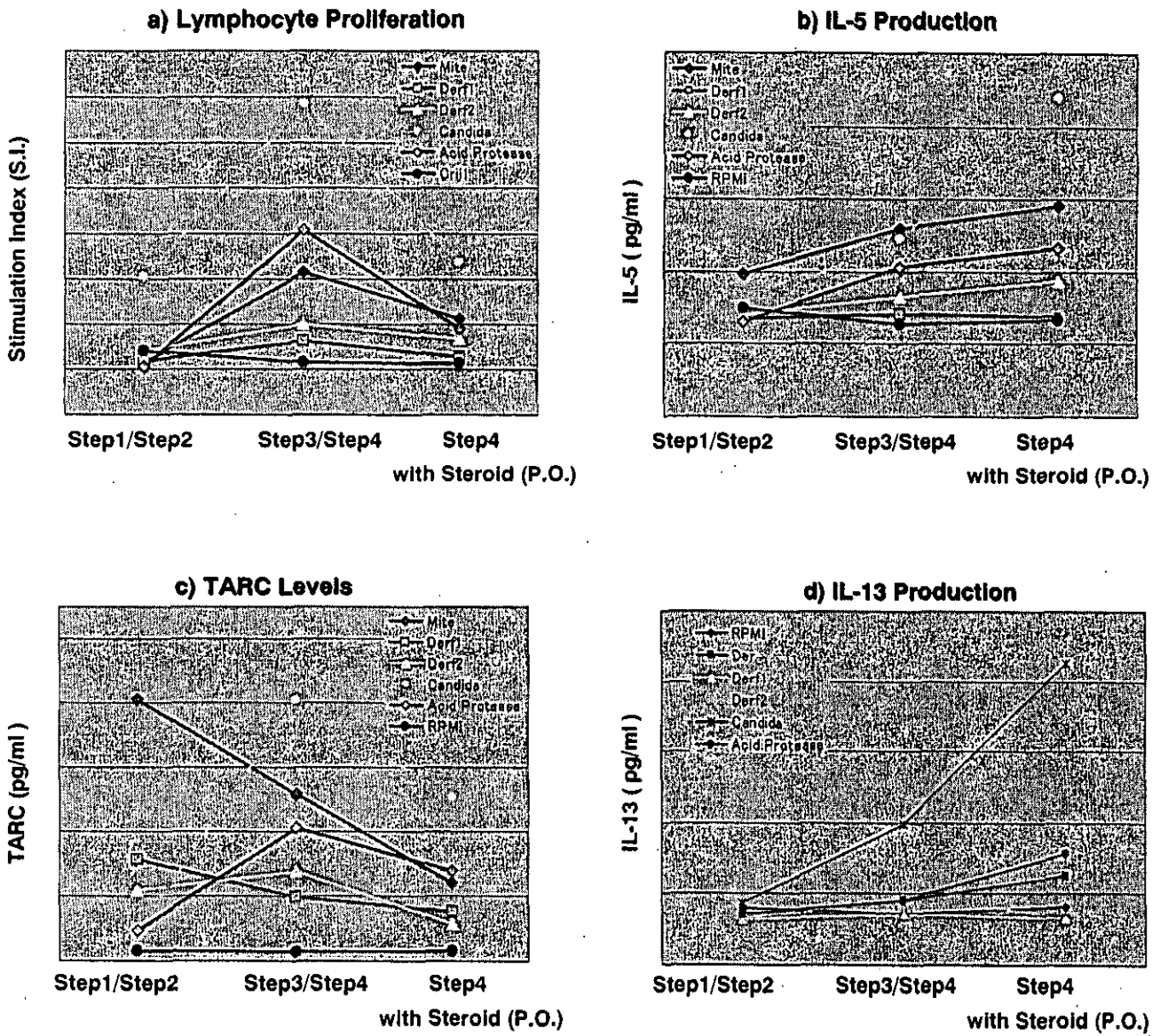


図3 抗原刺激によるリンパ球の活性化に対するDendritic cells depletionの影響

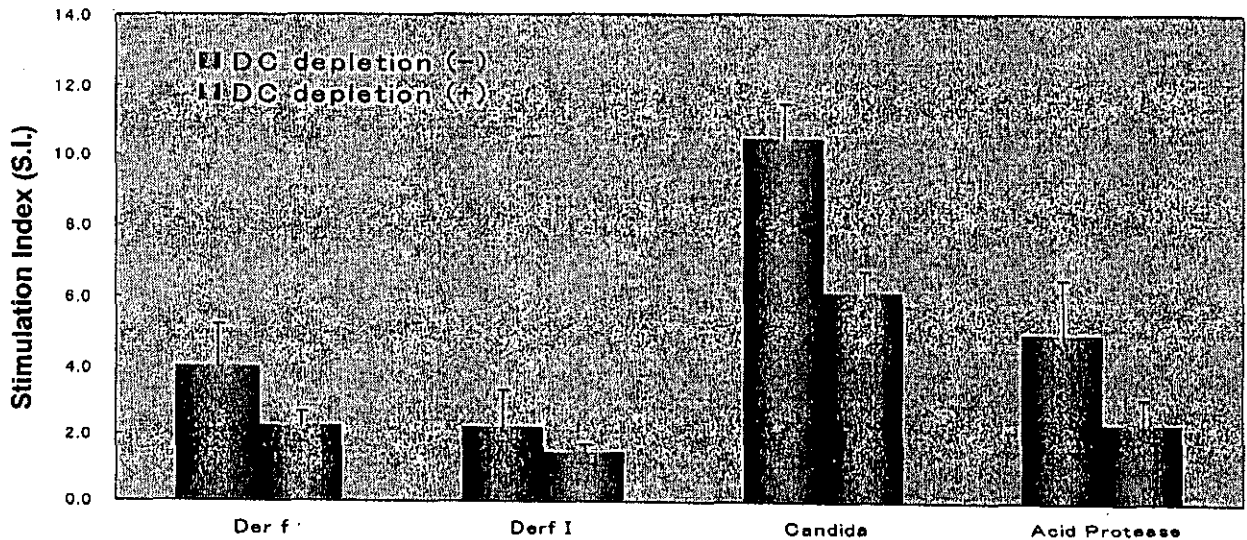


図4 抗原刺激によるPBMCからのIL-5産生に対するDendritic cells depletionの影響

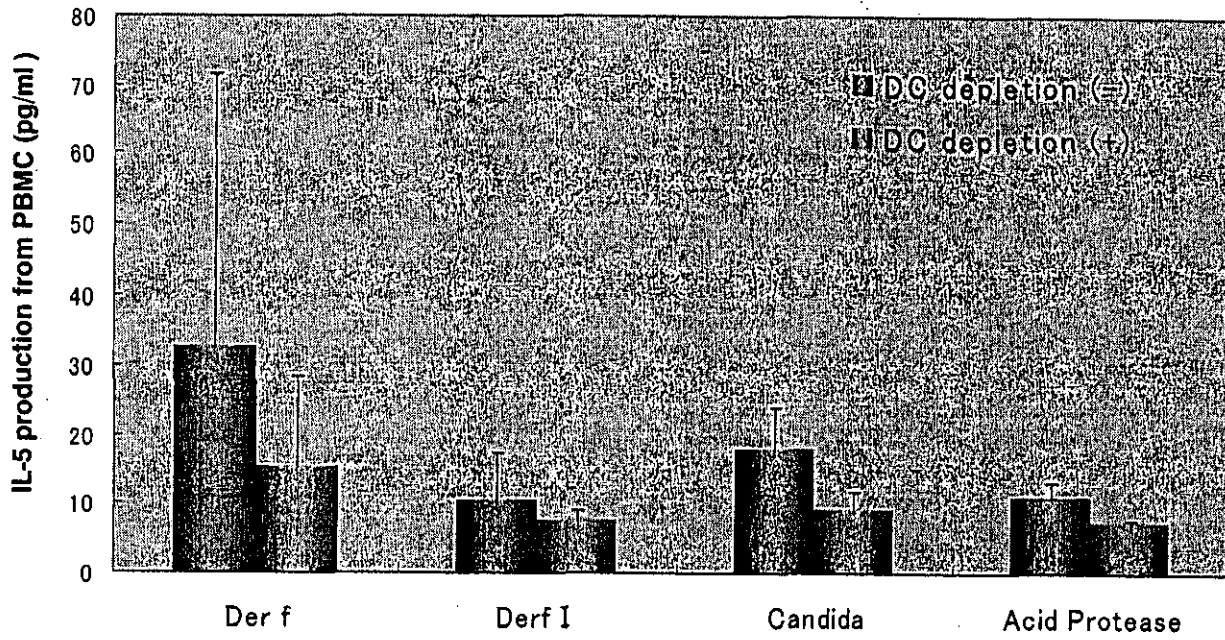


図5 抗原刺激によるPBMCからのTARC産生に対するDendritic cells depletionの影響

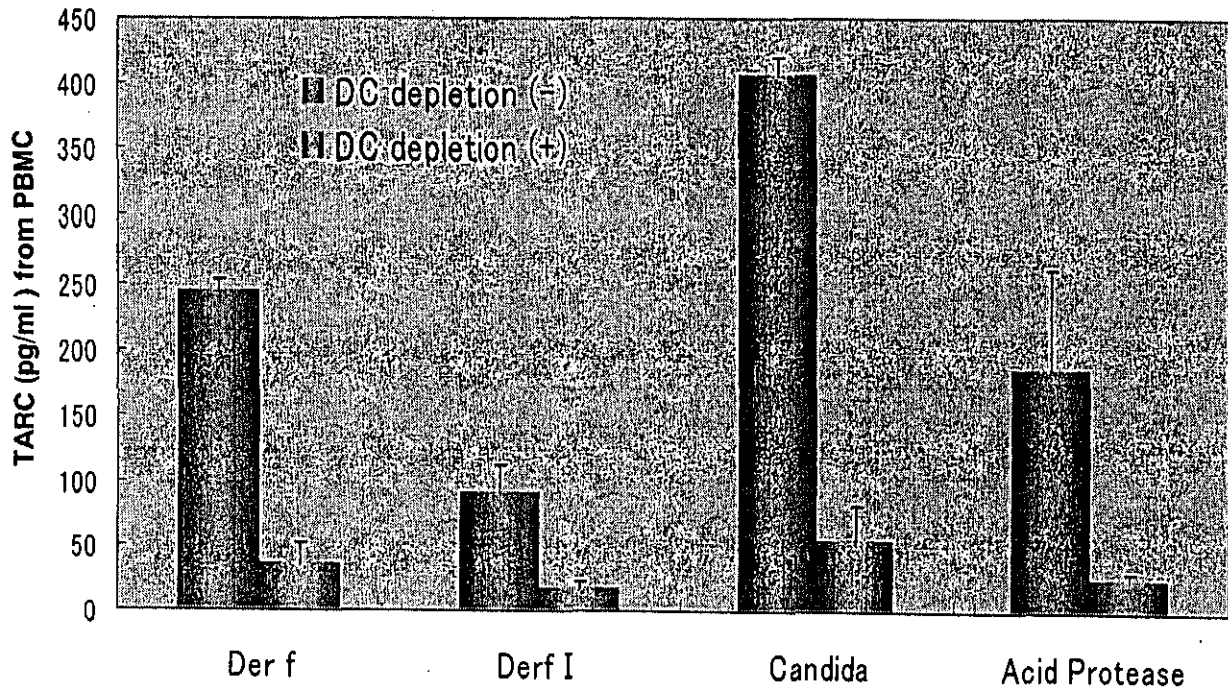
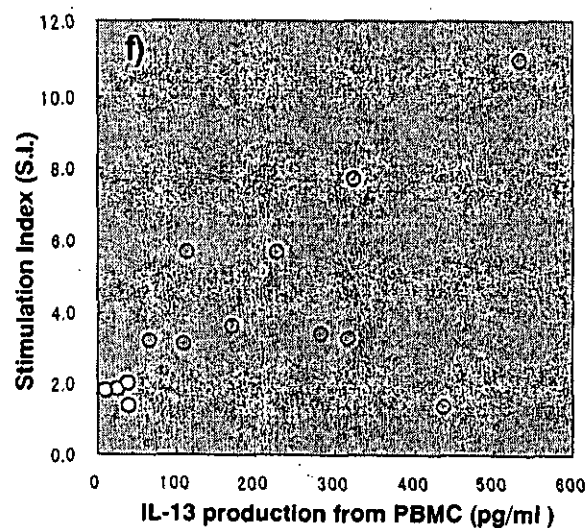
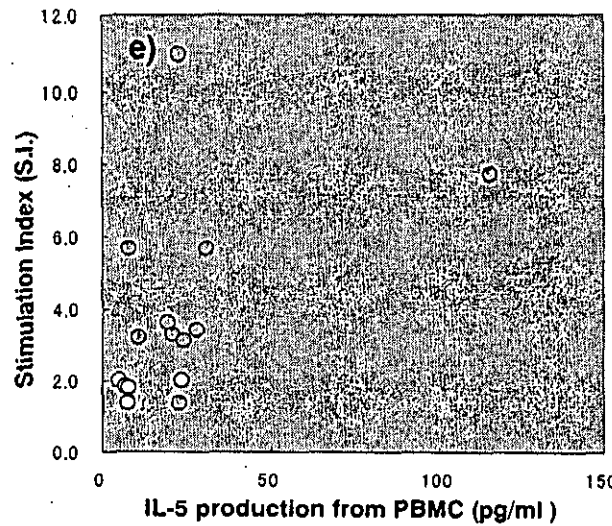
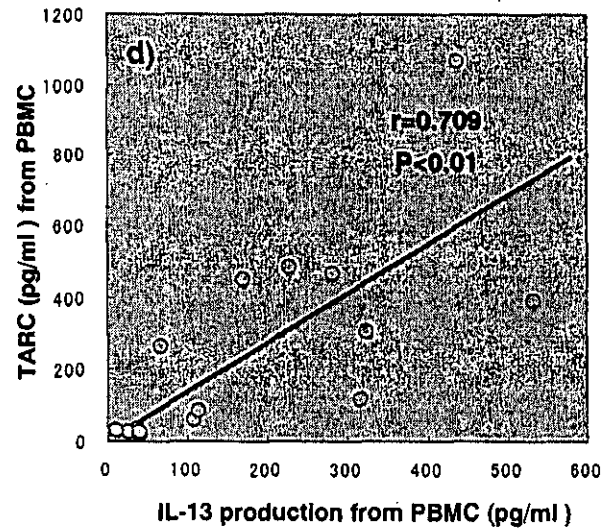
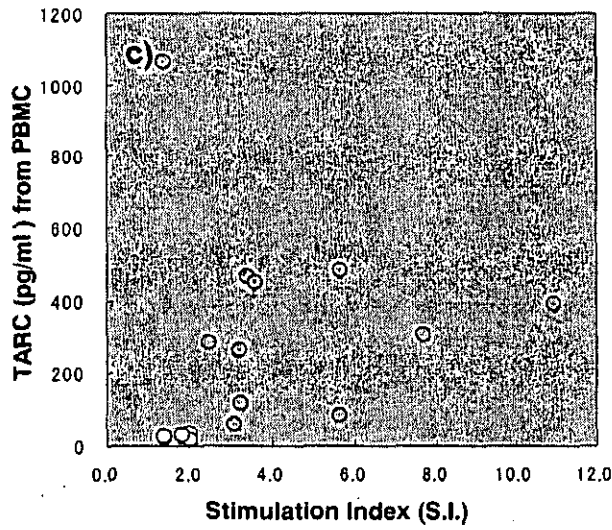
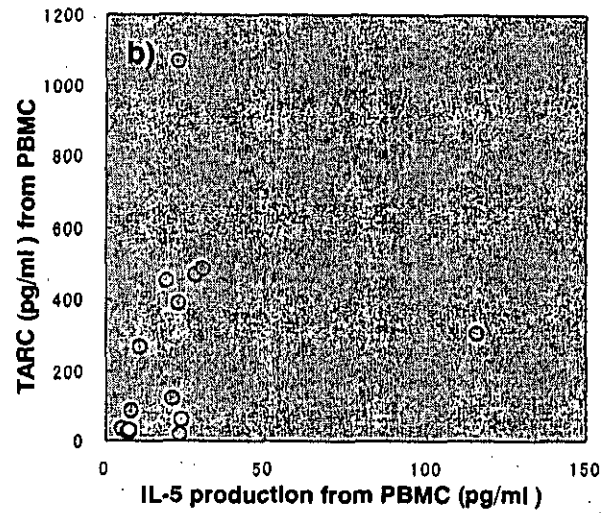
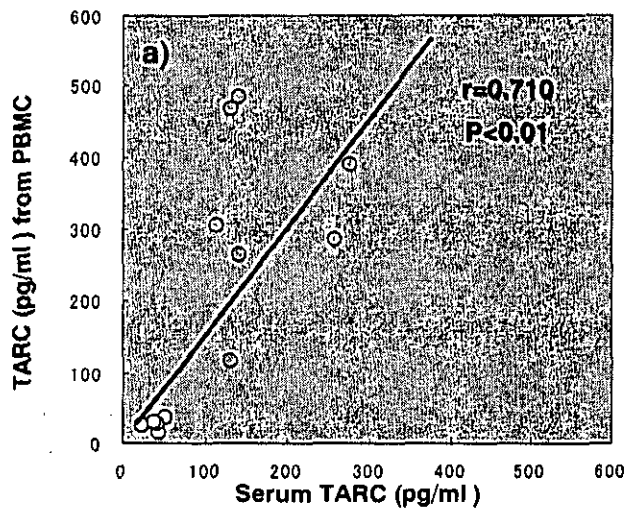
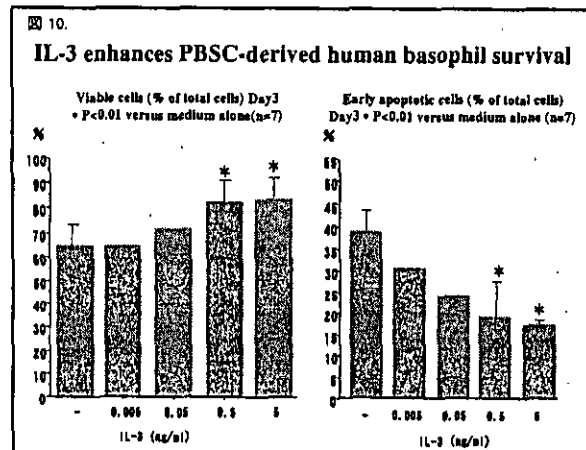
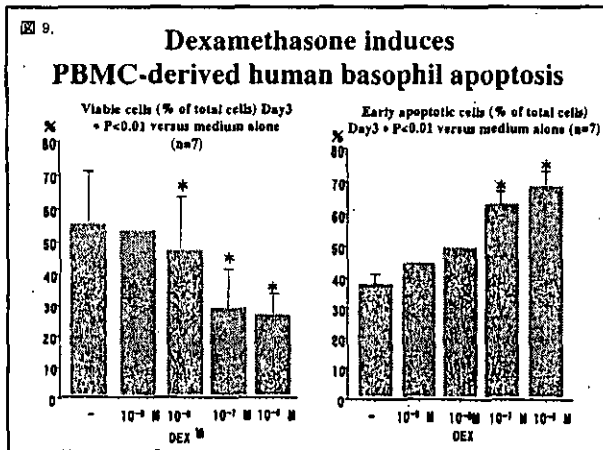
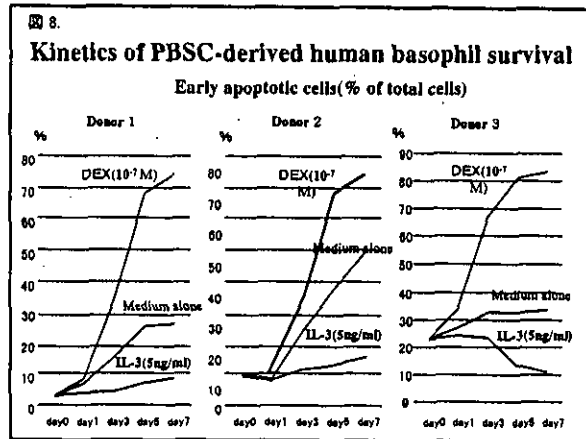
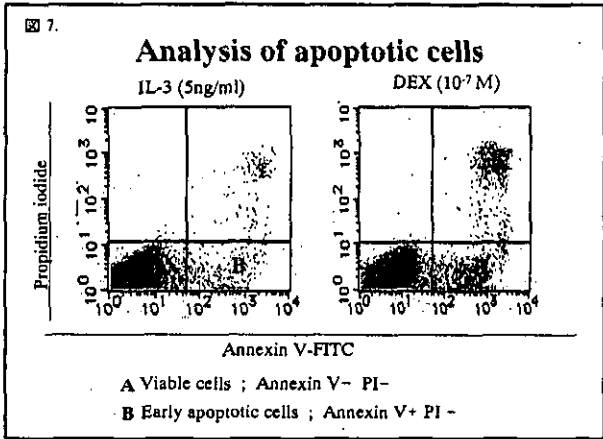


図6 抗原刺激によるリンパ球の活性化およびIL-5, IL-13, TARC levelの関係





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

分担研究者：大田 健（帝京大学医学部内科教授）

喘息治療は飛躍的な進歩を遂げているが、ステロイド依存性の難治性喘息は今だ一定の割合で存在する。そのひとつの因子として、気道リモデリングの関与が考えられる。我々は、マウスの喘息モデルで、中和抗体を用いることにより、増殖因子であるTGF- β およびIGF-Iがリモデリングに関与していることを明らかにしていた。今回、マウスのモデルでのこれら因子の肺局所での局在およびヒトでの検討を行った。ヒトの血漿レベルが健常人に比較して喘息患者で増加を認めた。IGF-Iの血漿レベルは癌の予測因子として有用性が報告されており、今後症例数を重ねるとともに、患者背景についても詳細な検討を加えていく予定である。

研究協力者：山下直美（帝京大学医学部内科助教授）、中野純一（帝京大学医学部内科講師）、足立哲也（帝京大学医学部内科講師）、長瀬洋之（帝京大学医学部助手）

A. 目的

吸入ステロイド薬の普及により喘息治療は格段の進歩を遂げたが、現在でも経口ステロイドを必要とする重症喘息、喘息死が問題になっている。気道リモデリングは難治化因子として重要であり、ステロイド薬でも完全が望みにくい因子である。我々は、マウス喘息モデルで増殖因子(PDGF, TGF- β , IGF-I)の中和抗体を投与することにより気道リモデリングを抑制できることを明らかにした。本研究では、まず喘息モデルでの増殖因子産生

を明らかにした上で難治性喘息患者および喘息死患者の血清中および気道局所で

のこれら増殖因子の発現分布を明らかにし、治療のターゲットとしてアプローチを見出すことを目的とした。

B. 方法

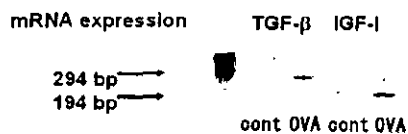
1) A/JマウスをOA+ アラム免疫後、OA吸入を行う。一部のマウスではOA吸入と並行して、各増殖因子の中和抗体を投与した。マウス喘息モデルで増殖因子のうちIGF-1、IGF-BP3の産生についてmRNAの発現をreal-timePCRで蛋白を免疫染色で発現検討した。

2) 喘息患者について、気道局所でのIGF-1の発現を免疫組織染色で検討した。血漿IGF-I値はELISA法を用いて測定した。

C. 結果

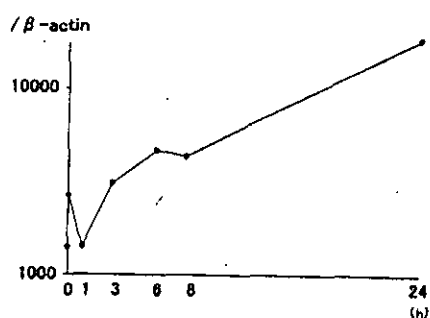
マウス喘息モデルで、OA吸入群ではIGF-IおよびTGF- β のmRNAの発現が特異抗原で刺激すると肺で増強した(図1)。

図1 mRNAの発現



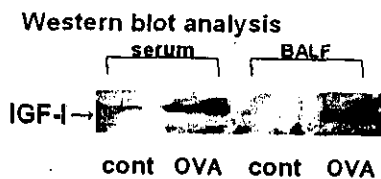
時間経過を検討するとOA吸入後1時間目より増加し始め24時間まで上昇し続けた(図2)。

図2 real-time PCRでの検討



蛋白レベルをウエスタンブロットおよびOA吸入群で検出できることを明らかにした(図3)。

図3 IGF-I蛋白の発現



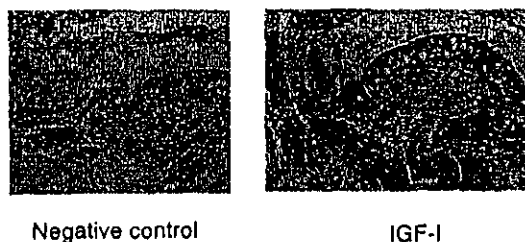
免疫組織染色で検討すると、IGF-Iは気道上皮細胞およびマクロファージより産生されていた(図4)。

図4 IGF-I免疫染色



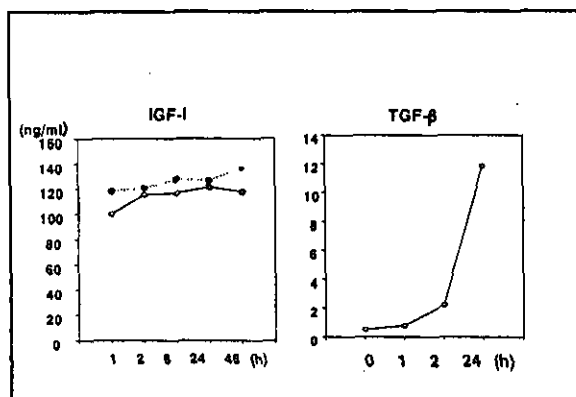
次にヒトの喘息での発現を検討した。喘息死した患者の病理組織切片および、肺病変以外で死亡した患者について検討した。喘息死患者で、IGF-Iに蛋白発現を気道上皮細胞および浸潤細胞に認めた(図5)。

図5 IGF-I免疫組織染色



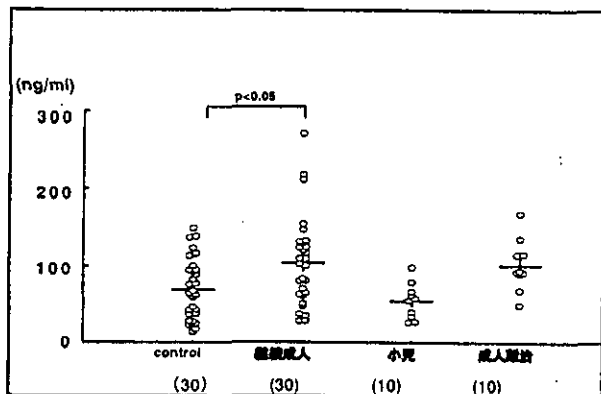
次に増殖因子の血漿レベルを検討した。TGFβについてはすでに報告しているように-509C/GSNPと血漿レベルで相関を認めた。しかし、日本人で検討を進めると、図4に示すように採血後の時間経過で血漿レベルの大幅な変化を示した。このことから、採血後の時間を指定できない、多施設で検討を行うのは難しい状況であった。同様にIGF-Iについても採血後の時間経過を検討した(図6)。

図6 血漿レベルの時間経過



IGF-Iのレベルは24時間の経過でほぼ一定で変動を認めないことが明らかになった。そこで、今回の多施設での検体について検討した。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。一方、難治性喘息患者でも高い傾向を示した(図7)。

図7 IGF-I血漿レベル



D. 考察

マウスの喘息モデルで気道リモデリングに関与していることが示されたIGF-Iの血漿レベルがヒトの喘息患者でも高まっていることが示唆された。今後症例を増やし検討を進める予定である。一方IGF-Iの血漿レベルは乳癌や膵臓癌などの癌のマーカーとして有用なことも報告されており、今後潜在的な癌の関与についても考慮してデータ解析を行う必要が考えられる。

D. 業績

1. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 2003; 171:3977-82.

2. Komiya A, Nagase H, Yamada H, Sekiya T, Yamaguchi M, Sano Y, et al. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol* 2003; 225:91-100.
3. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Kaneko F, Nakano J, Kato H, et al. Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Cell Immunol* 2002; 219:92-7.