

20030678

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

**重症喘息の決定因子の同定とそれに基づく
新規治療法の開発**

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩本逸夫

(千葉大学大学院医学研究院)

平成16年 (2004)年 3月

目 次

I 総括研究報告	
重症喘息の決定因子の同定とそれに基づく新規治療法の開発 岩本逸夫	1-5
II 分担研究報告	
1 アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明 岩本逸夫	6-8
2 慢性喘息における気道過敏性亢進機序および CD4+T 細胞および サブセットの MDC/TARC 産生能に関する研究 福田 健	9-11
3 CpG モチーフによる Th2 反応の制御に関する研究 田村 弦	12-14
4 アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明 秋山一男	15-17
III 研究成果の刊行に関する一覧表	18
IV 研究成果の刊行物・別冊	19-122

重症喘息の決定因子の同定とそれに基づく新規治療法の開発

主任研究者 岩本逸夫（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学 助教授）

分担研究者

福田 健（獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科教授）
秋山一男（国立相模原病院臨床研究センター長）
田村 弦（東北大学医学部附属病院感染症・呼吸器内科講師）

研究協力者

中島裕史（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学助手） 須藤明（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学）
鈴木浩太郎（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学） 広瀬晃一（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学）
前沢裕子（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学） 瀬戸洋平（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学）
他田啓（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学） 王地智宏（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学）
杉山公美弥（獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科） 成剛（獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科）
平田博国（獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科） 本多京子（獨協医科大学呼吸器 アレルギー内科）
釣木澤尚実（国立相模原病院臨床研究センター） 谷口正実（国立相模原病院臨床研究センター室長）
斎藤博士（国立相模原病院臨床研究センター室長） 粒来崇博（国立相模原病院臨床研究センター）
富田君子（国立相模原病院臨床研究センター） 西山晃好（国立相模原病院臨床研究センター）
豊田信明（国立相模原病院臨床研究センター） 森田園子（国立相模原病院臨床研究センター）
大友守（国立相模原病院臨床研究センター） 前田裕二（国立相模原病院臨床研究センター）
佐野公仁夫（東北大学医学研究科内科病態学感染症部門助教授）
大河原雄一（東北大学医学部附属病院感染症・呼吸器内科助手）

研究要旨

本研究班は、重症喘息の病因・病態の解明と新規治療法の開発を目的とし、本年度は以下の重要な研究成果を得た。1) アレルギー性気道炎症の制御機構について、T 細胞サイトカイン IL-21 は、IFN- γ 産生誘導を介し IgE 産生及びアレルギー性気道炎症を抑制的に制御していることを明らかにした。さらに肺特異的 IL-25 トランスジェニックマウスの解析により、新規の Th2 細胞サイトカイン IL-25 は、アレルギー性気道炎症を増強し、遷延化・重症化に関与することが示唆された。2) アレルギー性気道炎症の新規免疫療法として、CpG DNA-アレルゲン結合体結合体は樹状細胞の抗原取り込みを劇的に増加させ、成熟・活性化を誘導することにより、気道炎症を抗原特異的に強力に抑制することを明らかにした。3) 気道リモデリングによる気道過敏性の発症機序について、Th2 細胞の IL-5 か好酸球性炎症を介さず、直接気道平滑筋の反応性亢進を惹起する可能性が示唆された。4) 喘息患者の T 細胞活性化異常について、喘息患者の naive CD4+T 細胞は健常者に比し MDC と TARC を大量に産生し、Th2 型気道炎症の誘導、維持に関与している可能性が示唆された。5) 重症喘息である Churg-Strauss 症候群 (CSS) の早期診断と治療効果の判定には、活性化好酸球と活性化 CD4+T 細胞が指標になることが明らかにされた。これらの成果から、重症喘息の気道炎症及び気道リモデリングの発症維持・重症化に関与する分子群をターゲットとする新しい治療薬開発の可能性が示唆される。

A 研究目的

気管支喘息の病態であるアレルギー性気道炎症は、Th2 細胞の選択的活性化、Th2 細胞と好酸球を主体とする炎症細胞浸潤、気道過敏性、粘液細胞の増加により特徴づけられる。さらに持続性気道炎症による気道構成細胞の活性化とその結果生じる気道リモデリングが重症化を促す。したがっ

て、重症喘息の病因・病態の解明と新規治療法の開発には、1) アレルギー性気道炎症の成立機序及びその制御機構の解明が必須であるとともに、2) 気道リモデリングの発症機序の解明と制御法の開発が必要となる。さらに、3) 重症喘息の T 細胞、好酸球の異常活性化機序の解明とその制御法の開発が重要である。本研究班は、これら研究

テーマを明らかにし、その成果に基づく重症喘息の新治療法を開発することを目的とする。

B 方法及び C 結果

1) アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明

1 IL-21 によるアレルギー性気道炎症の制御機構 (岩本)

IL-21 は活性化 CD4 陽性 T 細胞から産生される新規サイトカインで、T 細胞増殖及び NK 細胞分化を誘導することが示されている。本研究では、IL-21 の B 細胞の免疫グロブリン産生に対する効果、ヘルパー T 細胞の分化制御に対する効果、さらにアレルギー性気道炎症制御における役割をマウス喘息モデルを用い検討した。さらに IL-21 の IgE 産生抑制の分子機構を解析した。感作マウスにリコンビナント IL-21 を投与すると、抗原特異的 IgE 産生が著明に抑制され、抗原吸入によるアレルギー性気道炎症も抑制された。しかし、IL-21 産生は Th1 細胞/Th2 細胞間で差はなく、また IL-21 は、Th1 細胞/Th2 細胞分化に影響を与えなかった。IL-21 は、LPS+IL-4 刺激による B 細胞からの IgE 産生を用量依存的に抑制し、その作用は、IL-21 に対して中和活性を有する soluble IL-21 receptor の投与により解除された。しかし IL-21 は他のクラスの免疫グロブリン産生には影響を与えなかった。そして IL-21 は、LPS+IL-4 刺激による B 細胞における germline C ϵ transcript 産生を抑制したか、IL-4 による Stat6 のリン酸化及び LPS による NF- κ B の活性化を抑制しなかった。さらに IL-21 による IgE 産生抑制は、抗 IFN- γ 抗体により部分的に阻害され、IFN- γ 産生誘導を介することが示唆された。以上より、IL-21 は IgE 産生及びアレルギー性気道炎症を抑制的に制御していることが明らかとなった。

2 新規サイトカイン IL-25 のアレルギー性気道炎症の遷延化・重症化における役割 (岩本)

IL-25 は新規の Th2 細胞性サイトカインで、非 T 細胞から IL-4, IL-5, IL-13 産生を惹起することから、アレルギー性炎症の増強及び遷延化に関与している可能性が推測されている。しかしながら、アレルギー性炎症における IL-25 の役割は依然不明である。そこで本研究では、肺特異的 IL-25 トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、アレルギー性気道炎症における IL-25 の役割を検討した。CC10 promoter の制御下に IL-25 を発現する

Tg マウスは 5 ラインが樹立された。肺特異的 IL-25 Tg マウスは、いずれにおいても肺特異的 IL-25 mRNA の発現が確認された。しかし、IL-25 発現のみではアレルギー性気道炎症は惹起されなかった。次に肺における IL-25 過剰発現の効果をマウス喘息モデルを用い検討した。肺特異的 IL-25 Tg マウスを感作、抗原吸入するとアレルギー性気道炎症及び気道の Th2 サイトカイン産生が増強された。これらの結果から、IL-25 は、アレルギー性気道炎症を増強し、遷延化・重症化に関与することが示唆される。

2) CpGDNA-アレルゲン結合体によるアレルギー性気道炎症の制御機構の解明 (田村)

昨年度の本研究で、CpGDNA を抗原と直接結合するという新しい方法を導入することによって、アレルギー性好酸球性気道炎症の抑制効果が著しく増強し、CpGDNA の投与量を 1/100 に減量できることを発見した。したがって、CpG-抗原結合体は将来有望な抗原特異的な抗アレルギー DNA ワクチン療法として、その有用性が期待される。

今年度の本研究では、CpG-抗原結合体によるアレルギー性気道炎症の制御機構を解明するために、CpG を介した樹状細胞による抗原取り込みを解析した。樹状細胞による CpG-抗原結合体の取り込みを観察するため、蛍光蛋白である R-PE を CpG と結合させ、樹状細胞に取り込まれた R-PE をフローサイトメトリーで解析した。R-PE のみ、R-PE と CpG を同時に、もしくは CpG-R-PE 結合体をマウス樹状細胞に加え、3 時間培養した。R-PE のみを加えた場合は R-PE 陽性の樹状細胞は数%であり、R-PE と CpG を同時に加えてもその割合は増加しなかった。しかし、R-PE と CpG を結合体にするると R-PE 陽性細胞が劇的に上昇し、88%となり、ほとんどの樹状細胞に R-PE が結合、もしくは取り込まれたと考えられた。

次に樹状細胞の CpG-抗原結合体取り込みによる成熟化・活性化について、その指標である CD40 と CD86 の発現を CpG と R-PE の同時投与と結合体投与を比較した。樹状細胞に CpG-R-PE 結合体を加え一晩培養した。R-PE のみを加えた場合は R-PE を取り込んだ樹状細胞の CD40 の発現が弱く、CpG を同時に加えると R-PE を取り込んだ樹状細胞の CD40 発現は高かった。CpG-R-PE 結合体を加えるとほとんどの樹状細胞が R-PE を取り込み、CD40 も CD86 の発現も増強しており、CpG-抗原結合体により抗原が効率よく樹状細胞に取り込まれると

同時に成熟 活性化されることか示された。

3) 気道リモテリングによる気道過敏性の発症機序の解明 (福田)

慢性喘息の気道過敏性亢進には持続的 Th2 型気道炎症と気道リモテリングが関与するが詳細は不明である。最近、IL-5 が気管支平滑筋のアセチルコリンに対する反応性を亢進することが報告された。本研究では、IL-5 が慢性喘息における気道反応性亢進に関与しているか否かをマウス慢性喘息モデルを用い検討した。

感作マウスに抗原吸入を 3 日間あけて 2 回行い急性モデルとした。また、連日 14 日間抗原吸入で気道リモテリングを誘発した後に再度抗原吸入を行ったものを慢性モデルとした。両モデル共に、最終抗原吸入曝露 24 時間前に抗 IL-5 抗体または抗 IL-5 受容体抗体を腹腔投与し、抗原吸入 24 時間後にアセチルコリンに対する気道反応性測定と気管支肺胞洗滌 (BAL) を行った。

抗 IL-5 抗体ないし抗 IL-5 受容体抗体を投与した急性喘息モデルでは、BAL 液中好酸球数はコントロール抗体投与群に比し有意に少なく、気道反応性亢進も有意に抑制されていた。一方、慢性モデルでは抗 IL-5 抗体投与は好酸球数増加を抑制したが、気道反応性亢進は抑制しなかった。しかし、抗 IL-5 受容体抗体投与により気道反応性亢進も有意に抑制された。今回の結果は、慢性喘息における気道過敏性亢進には IL-5 が好酸球を介せず直接関与する可能性を示唆する。

4) 喘息患者 CD4+T 細胞およびサブセットの MDC/TARC 産生能の解析 (福田)

昨年度までの本研究で、Th2 型気道炎症の誘導・維持機構については、IL-9 や PGD2 刺激で気道上皮細胞から産生される Th2 細胞特異的遊走ケモカインの MDC や TARC が関与する可能性を示してきた。今回は喘息患者の T 細胞はこれらケモカインを産生するか否か、どの T 細胞サブセットか産生するかを明らかにすることを目的とした。健康人、喘息患者末梢血 CD4+T 細胞は共に抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激により MDC、TARC を産生したか、産生量は圧倒的に喘息患者で大であった。これらケモカインを産生するサブセットは CD45RO+CD4+T 細胞 (memory/effector T 細胞) ではなく、CD45RA+CD4+T 細胞 (naive T 細胞) であった。さらに in vitro で分化させた Th2 細胞株は Th1 細胞株に比し有意に多い MDC と TARC を産生したか、

naive T 細胞ほととはなかった。本研究により、喘息患者 naive T 細胞は MDC と TARC を大量に産生し、Th2 型気道炎症の誘導、維持に寄与している可能性が示唆された。

5) Churg-Strauss syndrome (CSS) の早期診断法と治療法の開発 (秋山)

CSS は重症喘息と末梢血好酸球増多を呈する全身性壊死性血管炎で、一般喘息とは病態が異なり、11T 細胞及び好酸球活性化による好酸球性炎症を主体とした過敏性と考えられる。本研究は、CSS の病態と早期診断及び治療法を明らかにするため、血管炎発症前から臨床経過を追跡できた CSS (11 症例) について末梢血 T 細胞、好酸球の活性化マーカーを発症時、ステロイド減量後、再燃時に検討し、さらに CD25+CD4+T 細胞と CD25-CD4+T 細胞の IL-5 産生能の差異について検討した。

一般喘息では重症度により末梢血好酸球数には差を認めないが、CSS 発症時に著明に増加した。活性化好酸球 (CD69+CCR3+) は重症喘息の一部のみ検出され、CSS 発症時に著明に増加した。ステロイド減量後再燃時の CSS では末梢血好酸球数は治療後安定期と比較して有意差を認めないが、活性化好酸球 (%) は増加した。一般喘息全体では CD25+CD4+T 細胞数が高値であるか、CSS 発症時は低値であった。CD69+CD4+T 細胞数は喘息重症度に応じて増加し CSS 発症時に著増した。CSS 発症時には CD69+CD4+T 細胞数高値、CD25+CD4+T 細胞数低値であるのに対し、治療後安定期には CD69+CD4+T 細胞数低下、CD25+CD4+T 細胞数増加した。また再燃時には CD69+CD4+T 細胞数増加、CD25+CD4+T 細胞数低下した。IL-5 産生は CD25+CD4+T 細胞では一般喘息、CSS とともに産生し (76.9% vs 85.7%)、CD25-CD4+T 細胞では一般喘息での産生率が 23.1% であるのに対し、CSS では 85.7% が産生した。

今回の結果から CSS の発症、鎮静化、増悪のメカニズムに CD25+CD4+T 細胞が関与している可能性が示唆される。また CSS では一般喘息と比較して CD25-CD4+T 細胞の IL-5 産生能が亢進しており、CSS と一般喘息の病態が異なることを示唆している。以上から、活性化 T 細胞の解析により、CSS の発症予知、早期診断、治療効果の判定、治療薬減量の基準が確立できる可能性がある。

倫理面への配慮

本研究を遂行するにあたり、対象とする喘息患

者から提供される検体の取得に際しては、担当医師から研究の方法、必要性、危険性及び有用性、個人情報保護、さらに拒否しても不利益にならないことを十分に説明した後、同意が得られた場合のみ行った。また実験動物を用いた研究は、動物愛護に配慮し、実験は実験動物委員会の規定に従い遂行した。

D 考察及びE 結論

本年度の研究により、重症喘息の病因・病態の解明、治療法の開発に重要な多くの研究成果が得られた。1) アレルギー性気道炎症の制御機構について、T細胞サイトカイン IL-21 は、IFN- γ 産生誘導を介し IgE 産生及びアレルギー性気道炎症を抑制的に制御していることが明らかとなった。さらに肺特異的 IL-25 トランスジェニックマウスの解析により、新規の Th2 細胞サイトカイン IL-25 は、アレルギー性気道炎症を増強し、遷延化・重症化に関与することが示唆された。

2) CpG DNA-アレルギー結合体によるアレルギー性好酸球性気道炎症の制御機構を解析し、CpG DNA-抗原結合体が樹状細胞の抗原取り込みを劇的に増加させ、かつ成熟・活性化を誘導することを明らかにした。したがって、CpG DNA-抗原結合体は有望な抗原特異的な抗アレルギー DNA ワクチン療法である。

3) 気道リモデリングによる気道過敏性の発症機序について、Th2 細胞の IL-5 が好酸球性炎症を介さず、直接気道平滑筋の反応性亢進を惹起する可能性が示唆された。

4) 喘息患者の naive CD4+T 細胞は健常者に比し MDC と TARC を大量に産生し、Th2 型気道炎症の誘導・維持に関与している可能性が示唆された。

5) 重症喘息である CSS の早期診断と治療効果の判定には、活性化好酸球と活性化 CD4+T 細胞が指標になることが明らかにされた。さらに CD25-CD4+T 細胞の IL-5 産生能も有用である。

これらの成果から、重症喘息の気道炎症及び気道リモデリングの発症維持・重症化に関与する分子群をターゲットとする新しい治療薬開発の可能性が示唆される。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Suzuki K, Nakajima H, Ikeda K, Maezawa Y, Suto A, Takatori H, Saito Y, Iwamoto I IL-4-Stat6 signaling induces tristetraprolin expression and inhibits TNF- α production in mast cells J Exp Med 2003, 198 1717-1727

2 Suzuki K, Nakajima H, Ikeda K, Tamachi T, Hiwasa T, Saito Y, Iwamoto I Stat6-protease but not Stat5-protease is inhibited by an elastase inhibitor, ONO-5046 Biochem Biophys Res Commun 2003, 309 768-773

3 Seto Y, Nakajima H, Suto A, Shimoda K, Saito Y, Nakayama K, Iwamoto I Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice J Immunol 2003, 170 1077-1083

4 Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I Mast cells produce interleukin-25 upon Fc ϵ RI-mediated activation Blood 2003, 101 3594-3596

5 Maezawa Y, Nakajima H, Seto Y, Suto A, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Saito Y, Iwamoto I IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways Clin Exp Immunol 2004, 135 12-18

6 Mori Y, Hirose K, Suzuki K, Nakajima H, Seto Y, Ikeda K, Shimoda K, Nakayama K, Saito Y, Iwamoto I Tyk2 is essential for IFN- α -induced gene expression in mast cells Int Arch Allergy Immunol In Press

7 Honda K, Arima M, Cheng G, Takai S, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Hatano M, Tokuhisa T, Fukuda T Prostaglandin D2 reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine J Exp Med 2003, 198 533-43

8 Hirata H, Arima M, Cheng G, Honda K, Fukushima F, Yoshida N, Eda F, Ishii Y, Fukuda T Production of TARC and MDC by naive T cells in asthmatic patients J Clin Immunol 2003, 23 34-45

9 福田健 好酸球 小林節雄, 宮本昭正, 中島重徳 編, 第 22 回六甲カンファレンス, 喘息に関する細胞をめくって (最近の進歩), ライフサイエンス出版, pp 57-65, 2003

10 Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T,

Ohuchi K, Hattori T, Shirato K, Tamura G Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged Ag by dendritic cells J Immunol 2001, 167 66-74

11 Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Tamura G B cells capturing Ag conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12 J Immunol 2002, 169 787-94

12 Sano K, Shirota H, Terui T, Hattori T, Tamura G Oligodeoxynucleotides without CpG motifs work as adjuvant for the induction of Th2 differentiation in a sequence-independent manner J Immunol 2003, 170 2367-73

13 Tsurikisawa N, Taniguchi M, Saito H, Himeno H, Ishibashi A, Suzuki S, Akiyama K Treatment of Churg-Strauss syndrome with high-dose intravenous immunoglobulin Annals Allergy Asthma Immunol 2004, 92 80-87

14 鈴木澤尚実 秋山一男 Churg-Strauss 症候群と神経症状 (ニューロパチー) 呼吸 22(4) 349-356, 2003

2 学会発表

1 高取宏昌、中島裕史、鈴木浩太郎、齋藤康、岩本逸夫(2003) Stat6 非依存性 Th2 細胞分化における Stat5a の役割 第 33 回日本免疫学会総会 33 206

2 須藤 明、中島裕史、岩本逸夫、齋藤 康 (2003) IL-21 による IgE 産生抑制機構の解明 第 53 回日本アレルギー学会総会 アレルギー 52 925

3 鈴木浩太郎、中島裕史、岩本逸夫、齋藤 康 (2003) 蛋白分解による Stat シグナルの負の制御 第 53 回日本アレルギー学会総会 アレルギー 52 865

4 王地智宏、森由美子、廣瀬晃一、鈴木浩太郎、中島裕史、岩本逸夫、齋藤 康、下田和哉、中山敬一 (2003) 肥満細胞における IFN- α -Tyk2 シグナルの役割 第 53 回日本アレルギー学会総会 アレルギー 52 866

5 他田 啓、中島裕史、鈴木浩太郎、前沢裕子、岩本逸夫、齋藤 康 (2003) 肥満細胞からの IL-25 産生機構の解明 第 53 回日本アレルギー学会総会 アレルギー 52 865

6 Nakajima H, Ikeda K, Suzuki K, Suto A, Iwamoto I (2003) Mast cells produce Interleukin-25 upon IgE-mediated activation 90th AAI meeting

7 Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Suto A, Iwamoto I (2003) Characterization of mast cell-specific Stat6 protease 90th AAI meeting

8 Maezawa Y, Nakajima H, Saito Y, Iwamoto I (2003) IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways WAO 2003

9 Takatori H, Nakajima H, Hirose K, Kagami S, Saito Y, Iwamoto I (2003) Role of Stat5a in T helper 2 cell differentiation WAO 2003

10 Sugiyama K, Cheng G, Aoki Y, Fukuda T Anti-IL-5 receptor antibody, but not anti-IL-5 antibody, inhibits airway hyperresponsiveness in murine model of chronic asthma American Thoracic Society 2003 International Conference, Seattle, 2003

11 田村弦 シンポジウム「アレルギー疾患の免疫療法の展望」CpG ODN を用いたワクチン療法と展望 第 53 回日本アレルギー学会総会

12 鈴木澤尚実、齋藤博士、富田君子、東 愛、橋本直方、森田園子、大友 守、森 晶夫、前田裕二、谷口正実、秋山一男 Churg-Strauss 症候群(CSS)に対する γ グロブリン大量療法 (IVIG) — その有効性と限界に関する検討 アレルギー 52, 382, 2003

13 鈴木澤尚実、齋藤博士、富田君子、東 愛、粒来崇博、森田園子、谷口正実、森 晶夫、大友 守、前田裕二、秋山一男 Churg-Strauss syndrome(CSS) の病態 治療経過中における CD69+CD4+ および CD25+CD4+T 細胞の検討 アレルギー 52, 923, 2003

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明

分担研究者 岩本逸夫

千葉大学大学院医学研究院細胞治療学助教授

研究協力者 中島裕史、鈴木浩太郎、須藤明、広瀬晃一、前沢裕子、他田啓、王地智宏
(千葉大学大学院医学研究院細胞治療学)

研究要旨

重症喘息の病態解明と新規治療法の開発には、アレルギー性気道炎症の成立機構及びその制御機構の解明が必須である。この目的のため、1) 新規の T 細胞サイトカインである IL-21 による IgE 産生及びアレルギー性気道炎症の制御機構、及び 2) 新規 Th2 細胞サイトカイン IL-25 のアレルギー性気道炎症における制御的役割を明らかにした。

はじめに、IL-21 は抗原特異的 IgE 産生を著明に抑制し、抗原吸入によるアレルギー性気道炎症も抑制した。しかし、IL-21 は Th1 細胞/Th2 細胞分化に影響を与えなかった。IL-21 は、LPS+IL-4 刺激による B 細胞からの IgE 産生を用量依存的に抑制し、その作用は、IL-21 に対して中和活性を有する soluble IL-21 receptor の投与により解除された。しかし IL-21 は他のクラスの免疫グロブリン産生には影響を与えなかった。そして IL-21 は、LPS+IL-4 刺激による B 細胞における germline C ϵ transcript 産生を抑制したが、IL-4 による Stat6 のリン酸化及び LPS による NF- κ B の活性化を抑制しなかった。さらに IL-21 による IgE 産生抑制は、抗 IFN- γ 抗体により部分的に阻害され、IFN- γ 産生誘導を介することか示唆された。以上より、IL-21 は IgE 産生及びアレルギー性気道炎症を抑制的に制御していることか明らかとなった。

次に、IL-25 のアレルギー性気道炎症の増強作用について、肺特異的 IL-25 トランスジェニック (Tg) マウスを作製し検討した。CC10 promoter の制御下に IL-25 を発現する Tg マウスは 5 ラインが樹立された。肺特異的 IL-25 Tg マウスは、いずれにおいても肺特異的 IL-25 mRNA の発現が確認された。しかし、IL-25 発現のみではアレルギー性気道炎症は惹起されなかった。次に肺における IL-25 過剰発現の効果をマウス喘息モデルを用い検討した。肺特異的 IL-25 Tg マウスを感作、抗原吸入するとアレルギー性気道炎症及び気道の Th2 サイトカイン産生が増強された。これらの結果から、IL-25 は、アレルギー性気道炎症を増強し、遷延化 重症化に関与することが示唆される。

A 研究目的

気管支喘息の病態であるアレルギー性気道炎症は、Th2 細胞の選択的活性化により惹起され、Th2 細胞と好酸球を主体とする炎症細胞浸潤、気道過敏性、粘液細胞の増加により特徴づけられる。したがって、重症喘息の病態解明と新規治療法の開発には、アレルギー性気道炎症の成立機序及びその制御機構の分子レベルでの解明が必須である。この目的のため、1) 新規の T 細胞サイトカインである IL-21 による IgE 産生及びアレルギー性気道炎症の制御機構、及び 2) 新規サイトカイン IL-25 のアレルギー性気道炎症における制御的役割を明らかにした。

B 方法

1) IL-21 による IgE 産生及びアレルギー性気道炎症の制御機構の解析

IL-21 は活性化 CD4 陽性 T 細胞から産生される新規サイトカインである。本研究では、IL-21 の B 細胞の免疫グロブリン産生に対する効果、ヘルパー T 細胞の分化制御に対する効果、さらにアレルギー性気道炎症制御における役割をマウス喘息モデルを用い検討した。さらに IL-21 の IgE 産生抑制の分子機構を解析した。

2) 新規サイトカイン IL-25 のアレルギー性気道炎症の増強及び遷延化における役割の解析

IL-25 は近年新たに同定された Th2 細胞性サイトカインで、非 T 細胞から IL-4, IL-5, IL-13 産生を惹起することから、アレルギー性炎症の増強及び遷延化への関与が推測されている。本研究では、肺特異的 IL-25 トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、アレルギー性気道炎症における IL-25 の役割を検討した。すなわち、CC10 promoter の制御下に IL-25 を発現する Tg マウスを作製し、

IL-25 過剰発現の効果を抗原吸入による気道の炎症細胞浸潤、サイトカイン産生により検討した。

倫理面への配慮

実験動物を用いた研究は、動物愛護に配慮し、実験は実験動物委員会の規定に従い遂行した。

C 結果及びD 考察

1) 感作マウスにリコンビナント IL-21 を投与すると、抗原特異的 IgE 産生が著明に抑制され、抗原吸入によるアレルギー性気道炎症も抑制された。しかし、IL-21 産生は Th1 細胞/Th2 細胞間で差はなく、また IL-21 は、Th1 細胞/Th2 細胞分化に影響を与えなかった。IL-21 は、LPS+IL-4 刺激による脾臓 B 細胞からの IgE 産生を用量依存的に抑制し、その作用は、IL-21 に対して中和活性を有する soluble IL-21 receptor の投与により解除された。しかし IL-21 は他のクラスの免疫グロブリン産生には影響を与えなかった。そして IL-21 は、LPS+IL-4 刺激による脾臓 B 細胞における germline Cε transcript 産生を抑制したが、IL-4 による Stat6 のリン酸化及び LPS による NF-κB の活性化を抑制しなかった。さらに IL-21 による IgE 産生抑制は、抗 IFN-γ 抗体により部分的に阻害され、IFN-γ 産生誘導を介することが示唆された。

2) CC10 promoter の制御下に IL-25 を発現する Tg マウスは 5 ラインが樹立された。肺特異的 IL-25 Tg マウスは、いずれにおいても肺特異的 IL-25 mRNA の発現が確認された。しかし、IL-25 発現のみではアレルギー性気道炎症は惹起されなかった。次に肺における IL-25 過剰発現の効果をマウス喘息モデルを用い検討した。肺特異的 IL-25 Tg マウスを感作、抗原吸入するとアレルギー性気道炎症及び気道の Th2 サイトカイン産生が増強された。これらの結果から、IL-25 は、アレルギー性気道炎症を増強し、遷延化・重症化に関与することが示唆される。

E 結論

本研究により、T細胞サイトカイン IL-21 は、IFN-γ 産生誘導を介し IgE 産生及びアレルギー性気道炎症を抑制的に制御していることが明らかとなった。さらに肺特異的 IL-25 トランスジェニックマウスの解析により、新規の Th2 細胞サイトカイン IL-25 は、アレルギー性気道炎症を増強することが明らかにされた。これらの結果は、IL-21 或いは IL-25 の制御によるアレルギー性気道疾患治療の可能性を示唆する。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Suzuki K, Nakajima H, Ikeda K, Maezawa Y, Suto A, Takatori H, Saito Y, Iwamoto I IL-4-Stat6 signaling induces tristetraprolin expression and inhibits TNF-α production in mast cells J Exp Med 2003,198 1717-1727

2 Suzuki K, Nakajima H, Ikeda K, Tamachi T, Hiwasa T, Saito Y, Iwamoto I Stat6-protease but not Stat5-protease is inhibited by an elastase inhibitor, ONO-5046 Biochem Biophys Res Commun 2003,309 768-773

3 Seto Y, Nakajima H, Suto A, Shimoda K, Saito Y, Nakayama K, Iwamoto I Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice J Immunol 2003, 170 1077-1083

4 Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I Mast cells produce interleukin-25 upon FcεRI-mediated activation Blood 2003,101 3594-3596

5 Maezawa Y, Nakajima H, Seto Y, Suto A, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Saito Y, Iwamoto I IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways Clin Exp Immunol 2004,135 12-18

6 Mori Y, Hirose K, Suzuki K, Nakajima H, Seto Y, Ikeda K, Shimoda K, Nakayama K, Saito Y, Iwamoto I Tyk2 is essential for IFN-α-induced gene expression in mast cells Int Arch Allergy Immunol In Press

2 学会発表

1 高取宏昌、中島裕史、鈴木浩太郎、齋藤康、岩本逸夫(2003) Stat6 非依存性 Th2 細胞分化における Stat5a の役割 第 33 回日本免疫学会総会 33 206

2 須藤 明、中島裕史、岩本逸夫、齋藤 康 (2003) IL-21 による IgE 産生抑制機構の解明 第 53 回日本アレルギー学会総会 アレルギー 52 925

3 鈴木浩太郎、中島裕史、岩本逸夫、齋藤 康 (2003) 蛋白分解による Stat シグナルの負の制御 第 53 回日本アレルギー学会総会 アレルギー

52 865

4 王地智宏、森由美子、廣瀬晃一、鈴木浩太郎、中島裕史、岩本逸夫、齋藤 康、下田和哉、中山敬一 (2003) 肥満細胞における IFN- α -Tyk2 シグナルの役割 第 53 回日本アレルギー学会総会 アレルギー 52 866

5 池田 啓、中島裕史、鈴木浩太郎、前沢裕子、岩本逸夫、齋藤 康 (2003) 肥満細胞からの IL-25 産生機構の解明 第 53 回日本アレルギー学会総会 アレルギー 52 865

6 Nakajima H, Ikeda K, Suzuki K, Suto A, Iwamoto I (2003) Mast cells produce Interleukin-25 upon IgE-mediated activation 90th AAI meeting

7 Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Suto A, Iwamoto I (2003) Characterization of mast cell-specific Stat6 protease 90th AAI meeting

8 Maezawa Y, Nakajima H, Saito Y, Iwamoto I (2003) IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways WAO 2003

9 Takatori H, Nakajima H, Hirose K, Kagami S, Saito Y, Iwamoto I (2003) Role of Stat5a in T helper 2 cell differentiation WAO 2003

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

慢性喘息における気道過敏性亢進機序および CD4+T 細胞およびサブセットの MDC/TARC 産生能に関する研究

分担研究者 福田 健 (獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科教授)

研究要旨

ヒト気管支平滑筋を IL-5 に曝露するとアセチルコリンに対する反応性は好酸球とは無関係に亢進することが最近報告された。慢性喘息患者における気道過敏性亢進にこの機序が関与するかを調べることを、本研究第一の目的とし、急性および慢性喘息モデルに対する抗 IL-5 抗体および抗 IL-5 受容体抗体投与の影響に関する検討を行った。一方、リモデリング形成の基盤となる持続的 Th2 型気道炎症には Th2 細胞特異的遊走ケモカインの MDC や TARC が関与することが知られている。喘息患者の T リンパ球はこれらのケモカインの供給源となるのか、どのサブセットの T 細胞にその能力があるかを検討することを第二の目的とした。

抗 IL-5 抗体ないし抗 IL-5 受容体抗体を投与した急性喘息モデルでは、BAL 液中好酸球数と気道反応性亢進は有意に抑制された。慢性喘息モデルでは抗 IL-5 抗体投与は好酸球数増加を抑制したが、気道反応性亢進は抑制しなかった。しかし、抗 IL-5 受容体抗体投与では気道反応性亢進も有意に抑制された。

健常人、喘息患者 CD4+T 細胞共に抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激により MDC、TARC を産生したが産生量は圧倒的に喘息患者で大きかった。これらのケモカインを産生するサブセットは memory/effector T 細胞でなく naive T 細胞であった。以上の結果から、慢性喘息における気道過敏性亢進には IL-5 が好酸球を介せず直接関与する可能性を示唆された。また、naive T 細胞は memory/effector T 細胞の前駆細胞であるだけでなく MDC、TARC の重要な供給源となって、Th2 型気道炎症の誘導、維持に寄与している可能性が示唆された。

A 研究目的

重症持続型気管支喘息患者でしばしば認められる不可逆性の気道閉塞および著明な気道過敏性亢進の一因は気道リモデリングにあるとされているが、リモデリングによる気道過敏性亢進の機序、ならびにリモデリング形成の基盤となる持続的 Th2 型気道炎症の機序については不明な点が多い。前者については、気道壁肥厚が気道ダイナミクスに及ぼす影響で説明されてきているが、最近、ヒト気管支平滑筋には特異的に IL-5 受容体が発現しており、IL-5 との培養により平滑筋のアセチルコリンに対する反応性は好酸球とは無関係に亢進することか報告された。この所見は、慢性喘息患者における気道過敏性亢進には長期にわたる過剰な IL-5 への曝露が関与する可能性を示唆する。この可能性を検証することを、本研究の第一の目的とし、マウス慢性喘息モデルにおける気道反応性亢進か抗 IL-5 受容体抗体による前処置で抑制されるか否かを検討した。一方、後者の Th2 型気道炎症の誘導・維持機構については、これまで私共は、IL-9 や PGD2 刺激で気道上皮から産生される Th2 細胞特異的遊走ケモカインの MDC や TARC が関与する可能性を指摘してきた。今回は喘息患

者の T リンパ球はこれらのケモカインの供給源となりうるのか、とのサブセットの T 細胞にその能力があるかを検討することを第二の目的とした。

B 研究方法

1) 急性および慢性喘息モデルに対する抗 IL-5 抗体および抗 IL-5 受容体抗体投与の影響に関する検討 卵白アルブミン (OVA) に対する感作が成立したマウスに OVA 吸入曝露を 3 日間あけて 2 回行い急性モデルとした。また、連日 14 日間 OVA 吸入曝露で気道リモデリングを誘発し、1 週間後に再度抗原曝露を行ったものを慢性モデルとした。両モデル共に、最終抗原曝露 24 時間前に抗 IL-5 抗体または抗 IL-5 受容体抗体 5mg/kg を腹腔投与し抗原曝露 24 時間後にメサコリンに対する気道反応性測定と気管支肺胞洗滌 (BAL)、肺組織採取を行った。

2) 喘息患者および健常人 CD4+T 細胞およびそのサブセットの MDC および TARC 産生能に関する検討 健常人およびダニ抗原特異的 IgE 抗体陽性の軽症喘息患者より末梢血単核球を分離、さらに negative selection 法にて CD45RA+CD4+T 細胞 (naive T 細胞)、CD45RO+CD4+T 細胞

(memory/effector T 細胞)を分離した。また、得られた CD45RA+CD4+T 細胞を IL-4 と抗 IL-12 抗体存在下で培養することにより Th2 細胞株を、IL-12 と抗 IL-4 抗体存在下で培養することにより Th1 細胞株を得た。末梢血単核球はダニ抗原 (Dermatophagoides farinae, Df) で刺激し、その他の細胞は抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の共存下で 48 時間培養後、上清中の MDC、TARC、IL-4、IL-5、IFN- γ を ELISA 法で、また、MDC と TARC の mRNA 発現を RC-PCR 法にて測定した。

C 研究結果

1) 抗 IL-5 抗体ないし抗 IL-5 受容体抗体を投与した急性喘息モデルでは、BAL 液中好酸球数は、コントロール抗体投与群に比し有意に抑制され (好酸球数, 抗 IL-5 抗体 > 抗 IL-5 受容体抗体)、気道反応性亢進も BALF 中の好酸球に比例し有意に抑制されていた。一方、慢性モデルでは、抗 IL-5 抗体および抗 IL-5 受容体抗体の投与により BALF 中の好酸球数は同程度に抑制した。しかし、気道反応性亢進については、抗 IL-5 抗体群では抑制されなかったか、抗 IL-5 受容体抗体投与群では有意に抑制された。

2) 健常人、喘息患者 CD4+T 細胞共に抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体刺激のみならず、Df 特異的刺激による末梢血単核球からも MDC、TARC を産生したか産生量は圧倒的に喘息患者で大きであった。また、喘息患者 CD4+T 細胞からの MDC、TARC と IL-4、IL-5、IFN- γ 産生に正の相関は認められなかった。以上より、これらのケモカインを産生するサブセットは memory/effector T 細胞でなく naive T 細胞であった。Th2 細胞株は Th1 細胞株に比し有意に多い MDC、TARC を産生したが、naive T 細胞ほどではなかった。

D 考察

今回の研究結果は、気道リモデリングに伴う気道過敏性亢進には、気道および気管支平滑筋のダイナミクスの変化以外に、炎症性サイトカイン曝露による気管支平滑筋の薬理学的特性の変化も関与する可能性を示唆する。慢性喘息モデルにおける気道過敏性亢進は IL-5 抗体では抑制されず抗 IL-5 受容体抗体でのみ抑制された理由は不明であるか、一般にサイトカイン作用を阻害するにはサイトカイン自身に対する抗体より受容体に対する抗体の方が遙かに効力があることで説明されるかも知れない。また、Th2 型気道炎症の持続に

より平滑筋における IL-5 受容体発現が増加することを免疫組織化学法、in situ hybridization で試みたが、おそらく発現量が少なすぎて確認はできず、現在より鋭敏な方法による確認を急いでいるところである。

naive T 細胞による MDC、TARC 産生の意義であるが、最近、肺においては naive T 細胞はリンパ組織だけでなく末梢にも存在することが報告されている。気道粘膜における MDC、TARC の由来はマクロファーン、樹状細胞、気道上皮細胞と考えられてきたが、本研究の結果は naive T 細胞もその供給源の一つであることを示す。また、リンパ組織にある naive T 細胞の MDC、TARC 産生は memory Th2 細胞のリンパ組織への再移行を促す意味を持つ。

E 結論

今回の結果より、慢性喘息における気道過敏性亢進には IL-5 が好酸球を介せず気管支平滑筋に直接関与している可能性、naive T 細胞は memory/effector T 細胞の前駆細胞であるだけでなく MDC、TARC の重要な供給源となっており、Th2 型気道炎症の誘導、維持に寄与している可能性が示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Hirata H, Arima M, Cheng G, Honda K, Fukushima F, Yoshida N, Eda F, Ishii Y, Fukuda T Production of TARC and MDC by naive T cells in asthmatic patients J Clin Immunol 23 34-45, 2003

2 Honda K, Arima M, Cheng G, Takai S, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Hatano M, Tokuhisa T, Fukuda T Prostaglandin D2 reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine J Exp Med 198 533-43, 2003

3 福田健 好酸球 小林節雄, 宮本昭正, 中島重徳 編, 第 22 回六甲カンファレンス, 喘息に関する細胞をめくって (最近の進歩), ライフサイエンス出版, pp 57-65, 2003

2 学会発表

1 Sugiyama K, Cheng G, Aoki Y, Fukuda T
Anti-IL-5 receptor antibody, but not anti-IL-5
antibody, inhibits airway hyperresponsi-
veness in murine model of chronic asthma
American Thoracic Society 2003 International
Conference, Seattle, May 2003
the airway of asthmatics correlates with
disease severity and airway wall thickness
American Thoracic Society 2002 International
Conference, Atlanta, May 2002

H 知的財産権の出願・登録状況
なし

CpG モチーフによる Th2 反応の制御に関する研究

分担研究者 田村 弦 東北大学病院感染症・呼吸器内科講師

研究要旨

昨年の本研究において、Th1 誘導能を持つ CpGDNA を抗原と直接結合させる方法を導入することによって、アレルギー性炎症の抑制効果が著しく増強することを報告した。今年度は、この免疫活性の増強機序の解明を目的として、抗原提示細胞である樹状細胞に注目して研究を行った。その結果、CpGDNA 自体が先導的な役割を果たすことによって、結合体の樹状細胞への取り込みが増強されると同時に樹状細胞の活性化も増強することが示された。したがって、各種の抗原を CpG と直接結合させれば、抗原特異的なアレルギー疾患に対する有用な DNA ワクチン療法を開発できることが示された。

A 研究目的

CpG モチーフは細菌やウイルスの遺伝子に特有のオリゴ DNA であり、特定の 6 塩基で構成されるパリンδροーム構造 (5'- purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3') を有する。哺乳類の免疫システムはこの CpG モチーフを認識することで細菌が生体に進入してきた危険信号と捉え、感染に対する防衛機構を活性化させると考えられている。昨年度の研究において、この CpG モチーフが保有する Th1 への分化誘導作用を利用したアレルギー性炎症に対するワクチン療法を報告した。すなわち、感作マウスに CpGDNA を抗原と同時に気道内へ前投与すると、その後の抗原暴露による好酸球性炎症を有意に抑制すること、さらに CpGDNA を抗原と直接結合して気道内へ前投与すると、アレルギー性炎症抑制効果は約百倍増強することを報告した。したがって、CpGDNA と抗原を結合体として投与すれば、CpG モチーフによる有害な炎症反応を惹起せずに、アレルギー性炎症を抑制できることを報告し、CpGDNA と抗原の直接結合体は将来有望な抗アレルギー DNA ワクチン療法となる可能性を示唆した。今年度は、CpGDNA を抗原と直接結合することによるアレルギー性炎症抑制効果の増強機序を研究するため、我々は抗原提示細胞に着目して研究を実施した。

B 研究方法及び C 結果

1 CpG を介した樹状細胞による抗原取り込みの増強

樹状細胞による CpG-抗原結合体の取り込みを観察するため、蛍光蛋白である R-PE を CpG と結合させ、樹状細胞に取り込まれた R-PE をフローサイトメトリーで解析した。樹状細胞はマウスの脾細胞より精製した。R-PE のみ、R-PE と CpG を同

時に、もしくはその直接の結合体を樹状細胞に加え、3 時間培養した後、抗 CD11c 抗体で染色した細胞にゲートをかけ解析した。R-PE 陽性の樹状細胞、つまり R-PE を取り込んだ細胞をヒストグラムで表した。下図 A に示すように R-PE のみを加えた樹状細胞は R-PE 陽性細胞が数%であり、R-PE と CpG を同時に加えてもその割合はほとんど上昇しなかった。しかし、R-PE と CpG を結合体にするると R-PE 陽性細胞数が劇的に上昇し、88%となり、ほとんどの樹状細胞に R-PE が結合もしくは取り込まれたと考えられた。なお、下図 B に示すように、この取り込みの割合は、CpG-抗原結合体量を増やすことによって、ほぼ直線的に増加した。その結果、CpG-抗原結合体は CpG と抗原の同時投与に比べ、樹状細胞による R-PE の取り込みを約 100 倍増強することを確認した。

2 樹状細胞による CpG-抗原結合体取り込みと costimulatory molecule 発現

樹状細胞による CpG-抗原結合体取り込みと共に成熟化・活性化の指標である CD40 (右図 A) と CD86 (右図 B) の発現増強について、R-PE 単独、CpG と R-PE の同時投与、両者の結合体投与を比較した。マウス骨髄細胞を GM-CSF で培養し、未熟な樹状細胞を得た。R-PE のみ、もしくは CpG を同時に加え、樹状細胞を一晩培養すると、CpG を加えない場合の樹状細胞は CD 40 と CD86 の発現が弱い。CpG を同時に加えると樹状細胞の CD 40 と CD86 の発現は増強した。しかし、両方とも R-PE の取り込みはほぼ同じで、数%のレベルだった。一方、CpG-R-PE 結合体を加えて 1 晩培養した場合、ほとんどの樹状細胞が R-PE を取り込むと同時に CD40 と CD86 の発現を増強した。したがって、CpG-抗原結合体により抗原が効率よく樹状細胞に取り

込まれると同時に、樹状細胞自体も活性化されることが示された。

3 CpG-抗原結合体を取り込んだ樹状細胞における IL-12 の発現

CpG-抗原結合体を取り込んだ樹状細胞において、結合体が IL-12 を優先的に産生するか否かを検討した。骨髓由来の樹状細胞を CpG-R-PE を加え、6 時間培養し、フローサイトメトリーで IL-12 の発現を検討した。下図に示すように、R-PE のみと培養された樹状細胞は IL-12 を発現しておらず、R-PE と CpG を同時に加えた場合、約半数の樹状細胞に IL-12 の発現を認めたが、R-PE の取り込みはほとんど見られなかった。一方、CpG-R-PE 結合体を加えた場合は、ほとんどの樹状細胞が R-PE を取り込むと同時に IL-12 を発現していた。さらに、この IL-12 の発現は、フリーの anti-IL-12 抗体の存在下では消失することより、IL-12 の発現が確実に証明された。

(倫理面への配慮)

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

D 考察

マウスを用いた研究により、CD4 陽性ヘルパー T 細胞には産生するサイトカインのパターンによりいくつかのサブタイプが存在することが知られている。代表的なものは Th1 細胞と Th2 細胞であり、これらは前駆細胞となるナイーブ T 細胞から樹状細胞により抗原提示され、分化誘導される。Th1 細胞は IFN- γ を産生し、細胞性免疫に関与し、細菌やウイルスの感染防御に重要な役割を果たす。一方、Th2 細胞は IL-4、IL-5、および IL-13 を産生し、抗体産生等の液性免疫に関与し、寄生虫の感染防御に重要であると考えられている。アレルギー性炎症は正常な免疫反応と本質的に何ら変わりはなく、アレルギーに反応する Th2 細胞の過剰な、あるいは不適当な反応が原因と理解されている。Th1 細胞と Th2 細胞は抑制する関係にあり、互いに調節しあいなから生態防御システムを形成していることが知られている。そして、両者のバランスの破綻と Th2 細胞優位の状態がアレルギー性炎症の基本的骨格と考えられる。したがって、アレルギーに反応する Th2 細胞のみを抑制する免疫療法かアレルギー疾患に対する理想的な治療と

なる。

近年、CpGDNA は強力に免疫系を刺激し Th1 誘導能を持つことが報告されており、様々な疾患への応用が期待されている。我々はマウスの気管支喘息モデルに CpGDNA を投与しアレルギー性炎症に対する効果を検討した。CpGDNA は強力な免疫応答を誘導する結果、有害作用を示すことより、投与方法の効率化を図り工夫を試みた。そして、CpGDNA を抗原と直接結合するという新しい方法を導入することによって、その効果が著しく増強することを発見した。その背景には、結合体とすることによって CpGDNA の炎症誘導効果のこれまで全く知られていなかった作用が働き、樹状細胞とヘルパー T 細胞の細胞間相互反応レベルで強力に免疫応答を誘導できる機序が生まれることが判明した。CpG-アレルギー結合体を将来有望な抗アレルギー DNA ワクチン療法として位置付け、その応用を視野に入れた基礎研究を実施した。

E 結論

CpG をアレルギーと結合すると、CpG 自体が樹状細胞の取り込みや活性化の先導的な役割を果たす結果、CpG-アレルギー結合体は有用な抗アレルギー DNA ワクチン療法となる可能性が示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1 H Shirota, K Sano, N Hirasawa, T Terui, K Ohuchi, T Hattori, K Shirato, G Tamura Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged Ag by dendritic cells J Immunol 167 66-74, 2001

2 H Shirota, K Sano, N Hirasawa, T Terui, K Ohuchi, T Hattori, G Tamura B cells capturing Ag conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12 J Immunol 169 787-94, 2002

2 学会発表

1 第 53 回日本アレルギー学会総会シンポジウム「アレルギー疾患の免疫療法の展望」演題「CpG ODN を用いたワクチン療法と展望」

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

アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明

分担研究者 秋山一男（国立相模原病院臨床研究センター）

研究協力者 釣木澤尚実、斉藤博士、富田君子、粒来崇博、西山晃好、豊田信明、前田裕二、森田園子、大友 守、谷口正実（国立相模原病院臨床研究センター）

研究要旨

CSS は気管支喘息経過中に発症する末梢血好酸球増多を伴う全身性壊死性血管炎である。CSS は重症喘息が多いといわれている。CSS の特徴的病態である好酸球性炎症はステロイドや免疫抑制剤により鎮静化するが長期経過においての治療薬減量の基準は確立していない。またこれまでに活性化好酸球および T 細胞の指標として CD69 抗原や CD25 抗原の発現について、CSS では一般喘息と比較して CD69+CD9+（もしくは CD69+CCR3+）、CD4+CD69+T 細胞が増加したことを報告した。今回の研究では臨床経過を追跡できた CSS 症例について末梢血 T 細胞、好酸球の活性化マーカーをステロイド減量後、再燃時に検討した。結果、CSS 発症時には CD69+CD4+T 細胞数高値、CD25+CD4+T 細胞数低値であるが、治療後安定期には CD69+CD4+T 細胞数低下、CD25+CD4+T 細胞数が増加した。また再燃時には CD69+CD4+T 細胞数増加、CD25+CD4+T 細胞数低下した。CD25+CD4+T 細胞の増減は CD25-CD4+T 細胞の増減と相反することから CD25+CD4+T 細胞と CD25-CD4+T 細胞の差違について type 2 cytokine である IL-5 産生能について検討した。その結果、一般喘息では CD25+CD4+T 細胞が主な IL-5 産生源であり CD25-CD4+T 細胞からはわずかにしか産生されないか、CSS では CD25+CD4+ T 細胞と CD25-CD4+ T 細胞の両細胞から産生され、その産生量は CD25-CD4+T 細胞が多いことか明らかとなった。以上の結果から CSS では CD25+CD4+T 細胞が制御性 T 細胞の役割を担っており、その臨床経過において CD25+CD4+、CD69+CD4+T 細胞の経過を追跡することで CSS の免疫学的状態の詳細な把握が可能となり、ステロイド、免疫抑制剤の減量を試みるのがより安全にできると考えられる。

A 研究目的

CSS は重症の気管支喘息の経過中に発症する全身性壊死性血管炎である。多くは喘息またはアレルギー性鼻炎が先行し好酸球増多、続いて全身の血管炎症状が出現する。局所の病理所見では生検組織では壊死性血管炎の所見は得られにくいものの血管外好酸球およびリンパ球浸潤は高率に認められる。CSS の病態を形成している炎症細胞は好酸球およびリンパ球であるということには異論のないところである。一方、活性化好酸球や T 細胞の指標として CD69 抗原や CD25 抗原の発現が報告されている。これまでの知見では CD69 抗原の発現は健常人の末梢血好酸球、T 細胞には発現していないか一部のアレルギー疾患では局所に浸潤した好酸球や T 細胞表面に CD25 抗原よりも早期に発現すると考えられている。CD25 抗原は恒常的に好酸球表面に発現しており、喘息発作などの好酸球活性化により発現量が増加することが知られているか、喘息患者の末梢血において CD69 抗原が発現するという報告はこれまでになく、一昨年度の本研究では活性化好酸球 CD69+CD9+（もしくは CD69+CCR3+）は重症喘息で発現が高く、発症前よ

り経過を追跡できた CSS 症例ではその発現は CSS 発症前より重症喘息と同様に高く、発症時にさらに増加したこと、また T 細胞レベルにおいて CSS 発症時には CD4+CD69+T 細胞が増加し、ステロイド剤、免疫抑制剤などの治療により低下したことを報告した。CSS の特徴的病態である好酸球性炎症はステロイドや免疫抑制剤により鎮静化するが長期経過での治療薬減量の基準は確立していない。今回の本研究では、臨床経過を追跡できた CSS 症例について末梢血 T 細胞、好酸球の活性化マーカーをステロイド減量後、再燃時に検討した。また最近、アレルギー疾患、自己免疫疾患では制御性 T 細胞である CD25+CD4+ T 細胞が病態の抑制的調節を担っているといわれている。マウスの移入実験では CD25+CD4+T 細胞を移入することで自己免疫疾患の発症を抑制することが示されている。CSS の臨床経過においても安定期に CD25+CD4+T 細胞が増加し、再燃期に CD25+CD4+T 細胞が低下することから、CD25+CD4+T 細胞が制御性 T 細胞の作用を有することが示唆される。そこで CD25+CD4+T 細胞と CD25-CD4+T 細胞は相反することから、CD25+CD4+T 細胞と CD25-CD4+T 細胞の

差違について type 2 cytokine である IL-5 産生能について検討を加えた。

B 研究方法

(1) 対象

血管炎発症時から経過を追跡できた CSS11 症例を対象とし、喘息群は当院外来通院中の成人喘息患者 152 名を対象とした。また健常者 23 名を正常対象群とした。

(2) 喘息の重症度分類

喘息重症度分類は GINA ガイドラインを用い、吸入ステロイド使用量を BDP 換算で Step 1 (BDP < 200 μ g), Step 2 (BDP \geq 200 μ g), Step 3 (BDP \geq 400 μ g), Step 4 (BDP \geq 800 μ g) とし、Step 1, 2 を軽症群、Step 3 を中等症群、さらに Step 4 は吸入ステロイド群 (重症、吸入群) と経口ステロイド併用群 (重症、経口併用群) の 2 群に分類した。

(3) 末梢血好酸球およびリンパ球の解析

末梢血採血より好酸球数およびリンパ球数を測定した。次に末梢血へパリン採血より、好酸球を分離せず全血から顆粒球、単核球 20 μ g/10⁶ 細胞に FITC ラベルした anti-human CCR3 または CD9、PE 標識の anti-human CD69 monoclonal antibody (mAb) を室温で 30 分間反応させ、遠心、洗浄し細胞を回収した後 flow cytometry (FACS) で解析した。以下、末梢血好酸球、T 細胞の活性化を CD25 および CD69 抗原の発現頻度をそれぞれ CD69+CCR3+(CD69+CD9+)、CD25+CD4+、CD69+CD4+、CD25+CD8+、CD69+CD8+ とし FITC、PE 標識で FACS 解析し、一般喘息と CSS 発症時の比較、さらに CSS の臨床経過、すなわち CSS 発症時、ステロイド治療後安定期、ステロイド減量後血管炎症状再燃時と比較検討した。また CD4 T 細胞を FACS で分離し、P+I 刺激後の細胞内サイトカイン IL-5 産生について CD25+CD4+ と CD25-CD4+ T 細胞別に検討した。

C 研究結果

(1) 一般喘息では重症度に応じて末梢血好酸球数は差を認めないが、CSS 発症時に著明に増加した。CD69+CCR3+陽性細胞数は中等症以下の喘息では検出されず一部の重症喘息で検出が可能であり、CSS 発症時に著明に増加した。

(2) 一般喘息全体では control と比較して CD25+CD4+T 細胞数が高値であるか、CSS 発症時は低値であった。CD69+CD4+および CD25+CD8+T 細胞数は喘息重症度に応じて増加し CSS 発症時に著明

に増加した。CD69+CD8+T 細胞数は control および喘息群では差を認めないが CSS 発症時に増加した。

(3) 治療経過中の CSS ではステロイド減量後再燃時の末梢血好酸球数 (cells) は治療後安定期と比較して有意差を認めないが CD69+CCR3+ (%) は増加した (p<0.01)。

(4) CSS 発症時には CD69+CD4+T 細胞数高値、CD25+CD4+T 細胞数低値であるのに対し、治療後安定期には CD69+CD4+T 細胞数低下、CD25+CD4+T 細胞数増加した。また再燃時には CD69+CD4+T 細胞数増加、CD25+CD4+T 細胞数低下した。CD25+CD8+ および CD69+CD8+T 細胞数は治療経過中に有意な変動を認めなかった。

(5) IL-5 産生についての検討は CD25+CD4+ T 細胞では一般喘息、CSS とともに産生し (76.9% vs 85.7%, N.S)、CD25-CD4+ T 細胞では一般喘息での産生率が 23.1%であるのに対し、CSS では 85.7%が産生した (p<0.01)。

D 考察

制御性 T 細胞に関する研究はマウスの移入実験や遺伝性疾患である IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) から証明されており、自己免疫性疾患やアレルキー性疾患においてもその役割が解明されつつある。CSS についての報告はまた存在しないが、今回の結果から疾患の発症、鎮静化、増悪のメカニズムに制御性 T 細胞が重要な役割を担っていることは十分に想像されることである。しかし、CSS においては CD25-CD4+ T 細胞内のサイトカイン産生能は主に IL-5 であり、一般的に考えられている制御性 T 細胞が産生すると考えられている IL-10 は P+I 刺激後も産生を認めなかった。制御性 T 細胞に関する疾患は自己免疫性疾患や遺伝性疾患の報告が多く、CSS は好酸球性炎症を背景とする疾患のため制御性 T 細胞から IL-5 が産生されることも十分に考えられることである。また一般喘息と比較すると CSS は CD25-CD4+ T 細胞内のサイトカイン (IL-5) 産生能が異なっており、CSS では一般喘息では産生頻度の少ない CD25-CD4+ T 細胞から IL-5 が主に産生されることか明らかとなり、このことは CSS と喘息の病態の免疫学的機構が異なることを示唆している。以上のことから、活性化 T 細胞の解明が進むことにより、CSS の発症予知、早期診断、治療効果、治療薬減量の基準が確立できる可能性があると考えられる。

E 結論

CSS の病態は好酸球性炎症を主体としているがそれを制御しているのは活性化 T 細胞である。病状安定期 CSS では制御性 T 細胞である CD25+CD4+ T 細胞が増加している。CD25+CD4+、CD69+CD4+ T 細胞のバランスを追跡することで CSS の免疫学的病態の詳細な把握が可能となり、ステロイド、免疫抑制剤の減量を試みることでより安全にできると考えられる。さらに CSS の病因はいまだ不明であるが CD25-CD4+ T 細胞の免疫学的作用の解明が病因解明に寄与すると考えられる。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Tsurikisawa N, Taniguchi M, Saito H, Himeno H, Ishibashi A, Suzuki S, Akiyama K Treatment of Churg-Strauss syndrome with high-dose intravenous immunoglobulin *Annals Allergy Asthma Immunol* 92 80-87, 2004

2 鈴木尚実、秋山一男 Churg-Strauss 症候群と神経症状（ニューロパチー） *呼吸* 22(4) 349-356, 2003

2 学会発表

1 鈴木尚実、齊藤博士、富田君子、東 愛、橋本直方、森田園子、大友 守、森 晶夫、前田裕二、谷口正実、秋山一男 Churg-Strauss 症候群(CSS)に対するγグロブリン大量療法(IVIG)ーその有効性と限界に関する検討 *アレルギー*52,382, 2003

2 鈴木尚実、齊藤博士、富田君子、東 愛、粒来崇博、森田園子、谷口正実、森 晶夫、大友 守、前田裕二、秋山一男 Churg-Strauss syndrome(CSS)の病態 治療経過中におけるCD69+CD4+およびCD25+CD4 T細胞の検討 *アレルギー*52, 923, 2003

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

III 研究成果の刊行に関する一覧表

- 1 Suzuki K, Nakajima H, Ikeda K, Maezawa Y, Suto A, Takatori H, Saito Y, Iwamoto I IL-4-Stat6 signaling induces tristetraprolin expression and inhibits TNF- α production in mast cells J Exp Med 2003, 198 1717-1727
- 2 Suzuki K, Nakajima H, Ikeda K, Tamachi T, Hiwasa T, Saito Y, Iwamoto I Stat6-protease but not Stat5-protease is inhibited by an elastase inhibitor, ONO-5046 Biochem Biophys Res Commun 2003, 309 768-773
- 3 Seto Y, Nakajima H, Suto A, Shimoda K, Saito Y, Nakayama K, Iwamoto I Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice J Immunol 2003, 170 1077-1083
- 4 Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I Mast cells produce interleukin-25 upon Fc ϵ RI-mediated activation Blood 2003, 101 3594-3596
- 5 Maezawa Y, Nakajima H, Seto Y, Suto A, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Saito Y, Iwamoto I IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways Clin Exp Immunol 2004, 135 12-18
- 6 Mori Y, Hirose K, Suzuki K, Nakajima H, Seto Y, Ikeda K, Shimoda K, Nakayama K, Saito Y, Iwamoto I Tyk2 is essential for IFN- α -induced gene expression in mast cells Int Arch Allergy Immunol In Press
- 7 Honda K, Arima M, Cheng G, Taki S, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Hatano M, Tokuhisa T, Fukuda T Prostaglandin D2 reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine J Exp Med 2003, 198 533-43
- 8 Hirata H, Arima M, Cheng G, Honda K, Fukushima F, Yoshida N, Eda F, Ishii Y, Fukuda T Production of TARC and MDC by naive T cells in asthmatic patients J Clin Immunol 23 34-45, 2003
- 9 福田健 好酸球 小林節雄, 宮本昭正, 中島重徳 編, 第 22 回六甲カンファレンス, 喘息に関する細胞をめぐって (最近の進歩), ライフサイエンス出版, pp 57-65, 2003
- 10 Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Shirato K, Tamura G Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged Ag by dendritic cells J Immunol 167 66-74, 2001
- 11 Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Tamura G B cells capturing Ag conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12 J Immunol 169 787-94, 2002
- 12 Sano K, Shirota H, Terui T, Hattori T, Tamura G Oligodeoxynucleotides without CpG motifs work as adjuvant for the induction of Th2 differentiation in a sequence-independent manner J Immunol 2003, 170 2367-73
- 13 Tsurikisawa N, Taniguchi M, Saito H, Himeno H, Ishibashi A, Suzuki S, Akiyama K Treatment of Churg-Strauss syndrome with high-dose intravenous immunoglobulin Annals Allergy Asthma Immunol 2004, 92 80-87
- 14 釣木澤尚実 秋山一男 Churg-Strauss 症候群と神経症状 (ニューロパチー) 呼吸 22(4) 349-356, 2003