

200400705A

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 晶夫

平成17(2005)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. 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 _____ 15

高橋 清

3. 難治性喘息治療薬としてのレドックス蛋白チオレドキシ

(TRX) の可能性についての検討 _____ 23

相沢久道

4. マウス気道過敏性発症に関与する責任遺伝子の同定に関する研究

マウス気道リモデリング形成における好酸球およびIL-5の役割 _____ 27

永井博式

5. 気道炎症遷延化に果たす好酸球の役割に関する研究 _____ 30

藤澤隆夫

6. 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 _____ 34

庄司俊輔

7. 気道平滑筋細胞におけるメディエーター

受容体の発現調節に関する研究 _____ 37

柳原行義

8. 難治化に関連する遺伝因子の解析 _____ 40

大田 健

9. 気管支喘息症の重症度に関連する

好酸球関連蛋白の機能とその遺伝子多型 _____ 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

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長

分担研究者

高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター院長）

相沢久道（久留米大学医学部第一内科教授）

藤澤隆夫（独）国立病院機構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（独）国立病院機構福岡病院副院長）

柳原行義（独）国立病院機構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（国立病院機構相模原病院臨床研究センター長）

藤澤知恵（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

金廣有彦（岡山大学医学部第2内科助手）

谷本 安（岡山大学医学部第2内科助手）

平野 淳（国立病院機構南岡山医療センター第1内科医師）

一木裕子（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）

田中宏幸（岐阜薬科大学薬理学教室助手）

中山隆志（近畿大学医学部細菌学）

岡元孝二（九州工業大学大学院生命体工学研究科教授）

森嶋大貫（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

稲葉奈緒美（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

中島幹夫（帝京大学医学部内科助手）

中野純一（帝京大学医学部内科講師）

中村裕之（高知大学医学部環境医学科教授）

橋本知実（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

宗田 良（国立病院機構南岡山医療センター副院長）

岡田千春（国立病院機構南岡山医療センター第1内科医長）

木村五郎（国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科医長）

星野友昭（久留米大学医学部第一内科）

木下 隆（久留米大学医学部第一内科）

稲垣直樹（岐阜薬科大学薬理学教室助教授）

義江 修（近畿大学医学部細菌学）

西原麻千子（九州工業大学大学院生命体工学研究）

梶原景一（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

大路バク（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

長瀬洋之（帝京大学医学部内科助手）

足立哲也（帝京大学医学部内科講師）

山下直美（帝京大学医学部内科助教授）

東川史子（広島大学公衆衛生学講座助手）

研究要旨

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、遺伝子多型の諸要因が解析された結果、1) ダニアレルゲン中の“T細胞アレルゲン”とIgE結合主要アレルゲンとは異なる可能性があること、2) 遅発型喘息反応は即時型喘息反応とは独立した、細胞性免疫に依存したアレルギー反応と考えられ、“T細胞アレルゲン”診断テストは、アトピー型・非アトピー型両病型共通の、正しい喘息起因抗原診断法として有用であること、3) 臨床的・炎症・器質化の各指標から、重症難治性喘息の亜分類が可能であること、4) ステロイドによる好塩基球アポトーシスがサイトカインにより制御されること、5) thioredoxin は酸化還元制御に作用し、喘息治療薬として有望であること、6) CCL16 がヒスタミン受容体 H4 のリガンドであること、7) H2 と H4 は拮抗して好酸球機能を制御すること、8) House dust mite 中のプロテアーゼは、好酸球 IL-9 産生を誘導すること、9) 気管支平滑筋細胞はフィブロネクチン及び MMP-2 を産生し、遊走すること、10) ウイルス由来の dsRNA は、気管支平滑筋細胞の Toll-like receptor (TLR)3 を介して、メサコリン受容体 M3R 発現を増強すること、11) 好酸球と独立して気道過敏性自身に関連する遺伝子として、7 個の遺伝子を見いだしたこと、12) IL-18、TGF- β 1 プロモーター領域の多型が、喘息の寛解、重症化に関連する可能性があること、13) IL-4 受容体遺伝子多型は花粉症とアトピー性皮膚炎に関連するが、喘息に関連しないこと、が明らかになった。

A. 研究目的

近年の薬物療法の進歩にも拘わらず、なお全体的ステロイド薬の継続を余儀なくされる難治性喘息患者群は、成人喘息診療に残された難問である。小児喘息における難治群は、授業欠席、社会生活不適応、心身両面の成長障害など多彩な問題を抱えている。喘息難治化の機序解明と、有効な治療・予防法の開発は、喘息診療分野の最大の課題といえる。平成12～14年度の厚生科学研究「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。メカニズム研究の面からは、高用量ステロイド投与下でも持続する炎症反応を確認し、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を難治化関連要因として指摘してきた。さらに、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。臨床面では、難治性喘息の大部分が非アトピー型であるとの調査結果を踏まえて、IgE非依存性の”T細胞アレルギー”に関する診断法、評価法の確立をめざす。難治化要因の解明は、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）らはインフォームドコンセントの得られた成人喘息症例を対象とし、末梢血単核球を種々のアレルギーと培養し、サイトカイン産生、細胞増殖反応を測定した。また、IgE抗体、IgG抗体の測定、白血球分画を用いたヒスタミン遊離反応の測定を行うと共に、抗原吸入負荷試験を実施した。ダニ粗抗原をQ-sepharose イオン交換クロマトグラフィーにて、低塩濃度から高塩濃度へNo. 1-6に分画した。

2) 高橋（南岡山医療センター）らは、重症10例と軽・中等症22例につき、臨床指標、炎症指標（IgE、好酸球）、器質化指標（呼吸機能、可逆性試験、HRCT）を

検討した。難治症例のリンパ球活性化マーカー、サイトカイン産生能、気管支上皮細胞とリンパ球の相互反応性、LT拮抗薬の効果を検討した。喀痰中ムチン量を測定した。末梢血幹細胞から得た好塩基球のアポトーシス誘導につきFlow cytometryで解析した。

3) 相沢（久留米大学）らは、Balb/cマウスを卵白アルブミン（OVA）感作し、ヒトリコンピナントthioredoxin (TRX) (40 μg / head)、32S/35S mutant human TRX (40 μg / head)を腹腔内投与し、whole body plethysmographyによる気道過敏性の測定とBALF中の細胞分画を解析した。

4) 永井（岐阜薬大）らは、喘息モデルにおける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をDNAマイクロアレイにより解析した。IL-5トランスジェニックマウスおよび抗IL-5抗体を用いて、最終抗原曝露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、その後気管支肺泡洗浄（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、抗原曝露ならびにIL-5の過剰産生あるいは中和による変動遺伝子を解析した。IL-5受容体α鎖欠損マウス、IL-5トランスジェニックマウス、抗IL-5中和抗体を用いて気道過敏性、気道炎症、リモデリングを比較検討した。

5) 藤澤（三重病院）らは、H4受容体を介した好酸球機能解析を目的に、H4トランスフェクタントを用いて、H4リガンドをスクリーニングした。H2シグナルとH4シグナルの相互作用につき、H2阻害下のヒスタミンによる遊走および活性酸素産生を検討した。また、House dust mite (HDM)抽出物、細菌由来のlipopolysaccharide (LPS)と好酸球を培養し、発現するサイトカイン遺伝子をリアルタイムPCRにて定量した。

6) 庄司（福岡病院）らは、ヒト気管支平滑筋細胞の遊走実験システムを確立し、気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる遊走活性、プロテアーゼ及び細胞外マトリックスの同定を行った。抗フィブロネクチン抗体を用いて気管支平滑筋細胞培養上清に対する平滑筋細胞の遊走抑制を試みた。

7) 柳原（相模原病院）らは、ヒスタミン受容体（HR）、システイン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RT-PCRやreal-time 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Ca²⁺の濃度をFluorocanで、転写因子の細胞内局在変化を共焦点レーザー顕微鏡で、それぞれ解析した。サイトカインはELISAで測定した。

8) 大田（帝京大学内科）らは、小児喘息持ち越し成人

喘息、成人発症喘息、小児喘息寛解、難治性喘息の4群および健康人より血漿を採取、単核球分画よりDNAを採取しすると共に総IgE、臨床経過を解析した。気道リモデリングに関連するTGF- β 1および気道炎症に関連するIL-18のプロモーター領域のSNPsを日立のMassARRAY法で解析した。

9) 烏帽子田(広島大学)らは、東京都品川区五反田地区および京都市の住民を対象に分子疫学を実施した。アトピー性皮膚炎とスギ花粉症の分子疫学として75人の子供とその両親を対象とし、IL4RAのexon 3と9およびプロモーター領域をシーケンシングし、疾患座位と遺伝子座位の連鎖を検討した。次に気管支喘息とスギ花粉症の分子疫学として、247人の患者と、その対照250人に対し、IL4RA遺伝子座位について、相関解析およびハプロタイプ相関解析を実施した。

C. 結果およびD. 考察

1) アトピー型喘息症例では、末梢血リンパ球のダニ粗抗原に応答するIL-5産生が亢進していた。IgE抗体と結合するmajor allergenであるDer f 1, Der f 2は、広い濃度で有意のIL-5産生を誘導しなかった。イオン交換分画の抗原特異的T細胞増殖誘導活性はNo. 1~6に広く分布した。Major allergen活性(Der f 1, Der f 2)はNo. 1~3の分画に存在するが、IL-5産生誘導能は主としてNo. 5に存在した。皮内反応では、ダニ粗抗原は即時型皮膚反応(ISR)と遅発型皮膚反応(LSR)の両者を惹起したが、Der f 1, Der f 2はISRをダニ粗抗原と同レベルに誘導するも、LSRを誘導しなかった。また、非アトピー型喘息でダニ粗抗原に対して末梢血リンパ球のIL-5産生が誘導される症例群を見いだした。このIL-5産生群では、ダニアレルゲンの吸入負荷に反応して、即時型反応を欠く遅発型喘息反応が誘導された。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。IgE抗体産生誘導活性とIL-5産生誘導活性とは、ダニ粗抗原中の異なる分子により担われる可能性が示唆される。

2) Burning typeが示唆される難治性喘息では、Candida抗原に対するIL-5、IL-13産生が亢進しており抗原による病態形成が示唆されたが、亢進を示さないBurn out typeを規定するには、臨床指標と細胞機能の更なる検討が必要である。喀痰中ムチン量は重症度より治療や症状に影響された。好塩基球のアポトーシスはDexが誘導しIL-3存在下で抑制された。好塩基球が気道局所でIL-3により活性化されると、ステロイド薬の抗炎症作用が減弱する可能性がある。

3) 酸化還元反応を制御するTRXは、アレルゲン曝露による気道炎症、気道過敏性の亢進を著明に抑制した。

TRXは、ステロイドとは異なる機序で気道の炎症と過敏性を抑制し、新規喘息治療薬となりうるものと考えられる。

4) 抗原曝露による気道過敏性に関連し、かつステロイドで変動する遺伝子は約600個あったが、IL-5トランスジェニックマウスおよびIL-5中和抗体のサンプルから、好酸球と独立して気道過敏性自身に関連する遺伝子として、抗原曝露4時間後で発現上昇する2個と24時間後で発現低下する5個の遺伝子に絞ることができた。

喘息重症化に関連する気道リモデリングのモデルでは、IL-5ならびに好酸球は基底膜下の線維形成に重要であった。TGF- β 1産生細胞は炎症初期では好酸球、後期では筋線維芽細胞であった。

5) CCL16がH4受容体リガンドであることを証明した。生理作用を知る目的にCCL16をマウスに静注し、末梢血好酸球の著しい増加と骨髄中好酸球の減少を認めた。CCL16はH4受容体を介し骨髄からの好酸球動員作用を有する。好酸球のH2阻害薬処理によりヒスタミンの活性酸素産生、遊走の増強を認めた。H2とH4が拮抗して好酸球機能を制御する可能性が考えられる。HDMは、好酸球IL-9産生を強力に誘導した。セリンプロテアーゼ阻害剤処理で完全に抑制され、HDMが好酸球上のProtease-activated receptor (PAR)2を介して、IL-9産生を誘導するものと考えられた。

6) 気管支平滑筋細胞培養上清にフィブロネクチンが存在し、平滑筋細胞を遊走させる。抗フィブロネクチン抗体は遊走を抑制した。ウェスタンブロットティング、zymographyによって、上清のプロテアーゼ活性をMMP-2が担うことを明らかにした。気管支平滑筋細胞はフィブロネクチン及びMMP-2を産生し、組織中を遊走するメカニズムが示唆された。

7) 気管支平滑筋細胞はTLR3を発現し、dsRNAに反応して、M3R、TLR3発現が増強された。M3Rの発現増強にはp38 MAPKとNF- κ Bが関与していた。IFN- γ 前処置細胞をdsRNAで刺激すると、TLR3とM3Rの発現はさらに増強されるがIFN- γ はM3Rの発現を増強しないことから、ウイルス感染によるIFN- γ のパラクリン産生は気道平滑筋細胞におけるTLR3発現の増強を介してM3Rのさらなる発現増強に関与していると考えられた。

8) IL-18プロモーターの多型頻度は、日本人では欧米人に比較して低かったが、喘息群では健康人に比し有意に変異の頻度が高かった。アウトグロウ群でも同じ多型頻度が高く、寛解後のIgE高値持続との関連が示唆された。難治性喘息も、多型頻度が高かった。IgE値は他の喘息群より低い値を示した。TGF- β 1C-509TのSNPsではアトピー型喘息患者で、健康人や小児喘息アウトグロウ群に比し、有意にTアレルの頻度が高く、喘息寛

解の予測因子と考えられる。難治性喘息では、T アリルの頻度は低く、他に気道リモデリングおよび炎症に関連する因子について解析が必要と考えられた。

9) アトピー性皮膚炎とスギ花粉症の分子疫学ではプロモーター領域の変異によって生じる IL4 可溶性蛋白の活性の低下が、アレルギー重症化をもたらすことが推測された。気管支喘息とスギ花粉症の分子疫学ではプロモーター領域のいかなる領域においても、有意な相関は認められなかった。喘息では、重症化の病態としての IL4RA の役割は認めがたい。

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、遺伝子多型の諸要因が解析された結果、1) ダニアレルゲン中の“T 細胞アレルゲン”と IgE 結合主要アレルゲンとは異なる可能性があること、2) 遅発型喘息反応は即時型喘息反応とは独立した、細胞性免疫に依存したアレルギー反応と考えられ、“T 細胞アレルゲン”診断テストは、アトピー型・非アトピー型両病型共通の、正しい喘息起因抗原診断法として有用であること、3) 臨床的・炎症・器質化の各指標から、重症難治性喘息の亜分類が可能であること、4) ステロイドによる好塩基球アポトーシスがサイトカインにより制御されること、5) TRX は酸化還元制御に作用し、喘息治療薬として有望であること、6) CCL16 が H4 受容体リガンドであること、7) H2 と H4 が拮抗して好酸球機能を制御すること、8) HDM 中のプロテアーゼは、好酸球 IL-9 産生を誘導すること、9) 気管支平滑筋細胞はフィブロネクチン及び MMP-2 を産生し、遊走すること、10) ウイルス由来の dsRNA は、気管支平滑筋細胞の TLR3 を介して、M3R 発現を増強すること、11) 好酸球と独立して気道過敏性自身に関連する遺伝子として、7 個の遺伝子を見いだしたこと、12) IL-18、TGF- β 1 プロモーター領域の多型が、喘息の寛解、重症化に関連する可能性があること、13) IL-4 受容体遺伝子多型は花粉症とアトピー性皮膚炎に関連するが、喘息に関連しないこと、が明らかになった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文のみ)

1. Kaminuma, O., Mori, A., Kitamura, N., Hashimoto, T., Kitamura, F., Setoguchi, K., Shoda, H., Yajima, N., Inokuma, S., and Miyatake, S. 2004. Role of GATA-3 in IL-5 gene transcription by CD4⁺ T cells of asthmatic

patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)

2. Hashimoto, T., Kawaguchi, H., Maeda, Y., Taniguchi, M., Akiyama, K., and Mori, A. 2004. IL-17 production by peripheral blood T cells of asthma patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
3. Tsuda, M., Matsumoto, K., Inoue, H., Matsumura, M., Nakano, T., Mori, A., Azuma, M., and Nakanishi, Y. Expression of B7-H1 and B7-DC on airway epithelium is enhanced by double-stranded RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press)
4. 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.* 134:7-11.
5. Mitomi, H., Matsumoto, Y., Mori, A., Arai, N., Ishii, K., Tanabe, S., Kobayashi, K., Sada, M., Mieno, H. 2004. Multifocal granular cell tumors of the gastrointestinal tract: Immunohistochemical findings compared with those of solitary tumors. *Pathol. Int.* 54:47-51
6. Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Tsuda M, Ikegami T, Kibe A, Yoshiura Y, Komori M, Hamasaki N, Aizawa H and Nakanishi Y. Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 134: 295-302, 2004.
7. Matsumoto K, Inoue H, Nakano T, Tsuda M, Yoshiura Y, Fukuyama S, Tsushima F, Hoshino T, Aizawa H, Akiba H, Pardoll D, Hara N, Yagita H, Azuma M and Nakanishi Y. B7-DC Regulates Asthmatic Response by an IFN-gamma-Dependent Mechanism. *J Immunol* 172: 2530-2541, 2004.
8. Kitasato Y, Hoshino T, Okamoto M, Kato S, Koda Y, Nagata N, Kinoshita M, Koga H, Yoon D, Asao H, Ohmoto H, Koga T, Rikimaru T and Aizawa H. Enhanced Expression of IL-18 and its Receptor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31: 619-625, 2004.
9. Furnimori T, Honda S, Migita K, Hamada M, Yoshimuta T, Honda J, Fukuda T, Suzuki R, Gotoh M, Eguchi K and Aizawa H. Erythromycin suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in rheumatoid synovial cells. *J*

- Rheumatol 31: 436-441, 2004.
10. Sugihara E, Hirota N, Niizeki T, Tanaka R, Nagafuchi M, Koyanagi T, Ono N, Rikimaru T and Aizawa H. Usefulness of bronchial lavage for the diagnosis of pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) infection. *J Infect Chemother* 9: 328-332, 2003.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Kirii 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* 121: 502-509, 2003.
 16. 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, 2003.
 17. 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.
 18. Kaji 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.
 19. 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, 2003.
 20. 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, 2003.
 21. 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* 52: 67-72, 2003.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Yoshida M, Aizawa H, Inoue H, Matsumoto K, Koto H, Komori M, Fukuyama S, Okamoto M and Hara N. Effect of suplatast tosilate on airway hyperresponsiveness and inflammation in asthma patients. *J Asthma* 39: 545-552, 2002.
 25. Yoshida M, Aizawa H, Inoue H, Koto H, Nakano H, Komori M, Fukuyama S and Hara N. Ozone Exposure may Enhance Airway Smooth Muscle Contraction by Increasing Ca(2+) Refilling of Sarcoplasmic Reticulum in Guinea Pig. *Pulm*

- Pharmacol Ther 15: 112-120., 2002.
26. Rikimaru T, Kondo M, Kajimura K, Hashimoto K, Oyamada K, Miyazaki S, Sagawa K, Aizawa H and Oizumi K. Efficacy of common antiseptics against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 763-770, 2002.
 27. Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, Delespesse G, Nagai H. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; 31: 62-68.
 28. Nagao K, Akabane H, Masuda T, Komai M, Tanaka H, Nagai H. Effect of MX-68 on airway inflammation and hyperresponsiveness in mice and guinea-pigs. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004; 56: 187-196.
 29. Nakayama T, Kato Y, Hieshima K, Nagakubo D, Kunori Y, Fujisawa T, et al. Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16 attracts eosinophils by interacting with histamine H4 receptor. *J Immunol* 2004; 173:2078-83.
 30. 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.
 31. Kajiwara K, Shinazawa M, Morishima H, Yanagihara Y.: Differential effect of IL-4 and IL-13 on the expression of recombination-activating genes in mature B cells from human peripheral blood. *Cell. Immunol.* 227, 121-128, 2004.
 32. 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.
 33. Inhibition of airway remodeling, cell infiltration, and airway hyperresponsiveness. *Allergy Clin Immunol Int* (in press)
 34. Ohta K, Fukuchi Y, Grouse L, Mizutani R, Rabe KF, Rennard SI, Zhong NS. A prospective clinical study of theophylline safety in 3,810 elderly with asthma or COPD. *Respiratory Medicine* 2004 Oct;98(10):1016-24.
 35. Ikura M, Ebisawa M, Yamaguchi, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Transendothelial Migration of Human Basophil. *J Immunol.* 2004 Oct 15;173(8):5189-95.
 36. Adachi T, Cui C-H, Kanda A, Kayaba H, Ohta K, Chihara J.
 37. Activation of epidermal growth factor receptor via CCR3 in bronchial epithelial cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 2004 Jul 23;320(2):292-6
 38. Nakamura H, Higashikawa F, Miyagawa K, Nobukuni Y, Endo T, Imai T, Ozasa K, Motohashi Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Hatta K, Ogino K, Eboshida A. Association of single nucleotide polymorphisms in the eosinophil peroxidase gene with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 ;135 (1):40-3
 39. Nakamura H, Matsuzaki I, Sasahara S, Hatta K, Endo T, Imai T, Ozasa K, Motohashi Y, Ogino K, Eboshida A. Higher sense of coherence as a psychological factor responsible for elevated natural killer cell activity in patients with cedar pollinosis. *J Phys Fit Nutr Immunol* 2004, 14 (1) :25-32
2. 学会発表
省略 (分担研究報告書を参照)
- H. 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

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（独立行政法人国立病院機構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（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センター長 橋本知実（同センター流動研究員）
藤澤知恵（同センターリサーチレジデント）

研究要旨

過去 2 年のわれわれの調査においても、難治性喘息症例では高用量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 β 刺激薬等他種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない現状が確認された。喘息の起因抗原を分子レベルで明らかにすることは、難治性喘息の病因、病態、機序解明に貢献するのみならず、吸入ステロイド療法に限界のある難治性喘息では特に抗原特異的治療法の可能性を拓くものと期待される。われわれは、これまでにアトピー型・非アトピー型喘息はともに T 細胞レベルの IL-5 過剰産生を基盤とする好酸球性炎症疾患であるとのコンセプトを提唱し、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する。ダニアレルゲンはアトピー型喘息における IgE 抗体結合抗原であると同時に、IL-5 誘導抗原である。IgE 抗体結合活性を担う group I, group II アレルゲンは、強い即時型反応を惹起するものの、遅発型反応は弱く、しかも主たる IL-5 誘導抗原でないことを見出した。Crude なダニアレルゲンをイオン交換クロマトグラフィー分画し、主たる IL-5 誘導抗原は、group I, group II アレルゲンと異なる分画に存在することを明らかにした。現在のアレルゲン特異的減感作療法の主流である IgE 結合アレルゲンに加えて、IL-5 誘導抗原である「T 細胞アレルゲン」を用いることで、減感作療法の有効性を格段に向上できる可能性がある。

A. 研究目的

我々が実施した過去 2 年間の調査から、難治性喘息は非アトピー型が大部分を占め、高用量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 β 刺激薬等他種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない現状が明らかである。非アトピー型喘息の気道組織中 CD4 陽性 T 細胞の活性化など、外来性抗原に対する免疫応答異常を窺わせる知見が報告され、抗原特異的治療介入に希望がもたれるものの、未だ起因抗原診断法が確立されていない。アトピー型喘息では、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。昨年までの研究から得られた知見により、ダニアレルゲンの非アトピー型 (IgE 非依存

性) 喘息反応への関与が明らかになっているので、アトピー型・非アトピー型喘息を対象に、精製ダニアレルゲンおよびイオン交換クロマトグラフィー分画を用いて、T 細胞サイトカイン特に IL-5 の産生誘導と気道収縮反応につき解析した。

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 刺激薬、テオフィリン剤、インターール、抗コリン剤、ベクロメサゾン吸入は、12 時間以上、抗ヒスタミン剤、ステロイド剤は 24 時間以上中止した。アトピー型は、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。

アレルギー

粗抗原として用いたダニ、スギ、イヌ、ネコ、カンジダ、アルテルナリア、アスペルギルスなど各種アレルギー診断用エキスの原末は鳥居薬品より供与された。精製ダニアレルギー Der f 1、Der f 2 はアサヒビール薬品(株)より、精製カンジダアレルギー Secretory aspartic protease 2 (SAP2)、Superoxide dismutase (SOD)、cyclophilin、enolase、mannan A は宝酒造(株)より購入した。Stock solution として、Hank's buffered saline solution (HBSS) に 2 mg/ml の濃度で溶解し、使用時まで -20°C にて凍結保存した。

イオン交換カラム

ダニ粗抗原を 10 mg/ml の濃度で PBS に溶解し、Q-sepharose beads column (Pharmacia) に吸着、flow through 分画を得た後、wash し、50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、300 mM の塩濃度にて溶出した。それぞれの分画を 1 mg/ml の蛋白濃度まで濃縮し、透析後、培養に用いた。各分画中の Der f 1、Der f 2 濃度は、それぞれマウス抗 Der f 1、Der f 2 モノクローナル抗体を capture antibody とし、biotin 化ウサギ抗 Der f 1、Der f 2 ポリクローナル抗体を detecting antibody とする特異的 ELISA 法により測定した。

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、 2×10^6 /ml の濃度にて、AIM-V 培地に懸濁した。20 nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と 1 μ M の ionomycin (IOM) で 24 時間刺激した後、上清をハーベストした。Crude アレルギーとしてダニアレルギー、*Candida albicans* 抗原などによる T 細胞からのサイトカイン産生を調べるため *Dermatophagoides farinae* extract、*Candida albicans* extract、その他のアレルギー粗抗原エキス (鳥居薬品) の最終濃度 0.1、1、10 μ g/ml を加えて 6 日間培養し、上清をハーベストした。精製アレルギー、ダニアレルギー分画に対する反応も同様に、精製 (またはリコンビナント) Der f 1、Der f 2、あるいは *Candida albicans* 由来酸性プロテアーゼ (SAP2) 等の最終濃度 0.1、1、10 μ g/ml を加えて 6 日間培養し、上清をハーベストした。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- γ 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 ^3H -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。

(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、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、疫学研究に関する倫理指針 (平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成 15 年厚生労働省告示第 255 号) を遵守する。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期する。

C. 結果

アトピー型喘息症例はほとんどがダニアレルギーに感作され、抗ダニ IgE 抗体を有する。精製アレルギー Der f 1、Der f 2 は、患者血清中の IgE との結合を指標とした場合、多数の症例で高度の結合を示すとの意味で major allergen として確立された分子である。そこで、Der f 1、Der f 2 が T 細胞の IL-5 産生を誘導するか否かを検討した。粗製ダニアレルギー (mite extract)、リコンビナントアレルギー (rDer f 1、rDer f 2) をダニ感受性喘息患者の PBMC と培養し、上清の IL-5 産生量を比較した。至適抗原濃度が各アレルギー毎に異なる可能性が考えられるため、各々、0.1、1、10 μ g/ml と広い濃度で実験を行った。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応答する IL-5 産生が健常者に比べて亢進しており、特にダニアレルギーに応答した IL-5 産生が高値である (Mori A. et al. *Int. Immunol.* 7:449, 1995 および Fig. 1a)。しかしながら、Der f 1、Der f 2 とともに、0.1~10 μ g/ml のいずれの濃度においても IL-5 産生誘導は検出されなかった。患者 T 細胞の増殖反応は、明らかに認められることから (Fig. 1b)、刺激が無効であったとは考え難い。IgE 抗体と反応するアレルギーとは別に、T 細胞の IL-5 産生を誘導するアレルギー分子が存在する可能性が強く示唆される。

アトピー型喘息患者の血清中には Der f 1、Der f 2 に対する IgE 抗体が存在するため、皮内反応においては、高率に即時型皮膚反応を認めた (Table I)。しかしながら、遅発型皮膚反応を認めた症例は、ダニ粗抗原に比して、きわめて少数であった。即時型アレルギー反応は、IgE 結合活性を有するアレルギーにより、IgE 抗体-IgE 受容体を介して惹起されるが、遅

発型アレルギー反応は、IgE 依存性の即時型反応に引き続き自動的に惹起されるものでなく、細胞性免疫を動員する「T 細胞アレルギー」によって、T 細胞からの IL-5 を含むサイトカイン産生が誘導される結果生じることが示唆される。

次に、ダニ粗抗原をカラム分画することによって、「T 細胞アレルギー」活性を分析した。通常のゲル濾過法では、アグリゲーションのために T 細胞刺激活性を分画することが不可能であったため、まずイオン交換クロマトグラフィーを試みた。ダニ粗抗原を Q-Sepharose に吸着後、50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM の塩濃度で溶出した (Fig. 2a)。これらの分画 Fraction (Fr.) 1 から Fr. 6 に含まれる主要アレルギー Der f 1、Der f 2 量を各々特異的 ELISA にて測定した (Fig. 2b)。Der f 1 は、Fr. 2 と 3 に、Der f 2 は、Fr. 1 と 2 に、その大部分が存在する。Fr. 4、5、6 には、IgE 結合アレルギー、いわゆる主要アレルギーは、きわめて少量しか含まれていない。これらのアレルギー分画を加えて、喘息患者 PBMC を培養し、³H-Thymidine 取り込みを測定することによって T 細胞増殖刺激活性を評価した (Fig. 3a)。T 細胞増殖誘導は Fr. 1 から Fr. 6 のいずれの分画においても、大差なく認められた。これらのアレルギー分画のいずれに、T 細胞 IL-5 産生を誘導し、好酸球性炎症を惹起せしめる活性が存在するかが、重要な課題である。6つの分画を最終濃度 0.1 µg/ml にてアレルギー患者 PBMC と培養し、上清中に産生される IL-5 を測定した (Fig. 3b)。すべての分画において IL-5 産生が誘導され、ダニアレルギーには複数の「T 細胞アレルギー」が存在する可能性が示唆される。主要アレルギーの Der f 1、Der f 2 を含まない Fr. 5 が、顕著な IL-5 産生を誘導したとの結果は、IgE 結合における主要アレルギーと異なる分子が、「T 細胞アレルギー」であるとの考え方を支持する。

D. 考察

非アトピー型喘息の原因抗原を同定することは、喘息病態の解明にかかわる大課題である。われわれは、非アトピー型喘息症例の PBMC を種々のアレルギーと培養スクリーニングすることで、*Candida albicans* 粗抗原、および精製抗原 SAP2 に反応して IL-5 産生が誘導される患者群を見出した。IL-5 産生が誘導される症例では、IAR を欠く LAR (isolated LAR) が観察される。皮内に抗原が投与された場合にも、即時型反応を欠く遅発型反応が惹起される。IgE 抗体が関与しないことは、IAR の欠如により、さらに、negative RAST、negative HRT (histamine releasing test) により確認されている。これらの結果により、「T 細胞

アレルギー」が、IgE 抗体依存性の即時型アレルギー反応なしに、遅発型アレルギー反応を引き起こすことが明らかになった。

ダニアレルギーは我が国で最も高率にアレルギー疾患に関連するアレルギーであるが、従来は、IgE 抗体と結合し、IAR を惹起する major allergen、Der f 1、Der f 2 が重要視されてきた。喘息の本態が慢性炎症にあることを考慮すると、真の喘息起因抗原は IgE 結合抗原以外に存在する可能性が十分に考えられる。本研究では、まず Der f 1、Der f 2 は IL-5 産生誘導抗原でないこと、遅発型反応と関連しないことを明らかにした (Fig. 1 および Table I)。さらに、ダニ粗抗原を生化学的に分画することによって、Der f 1、Der f 2 以外に主要な T 細胞アレルギーが存在することを証明した (Fig. 2 および 3)。これらの結果は、非アトピー型、アトピー型両病型の喘息の病態・機序を一元的に解明し、新たな抗原特異的治療ターゲットを探索する上で重要な知見である。

現在までの国内外の研究成果から、気管支喘息の好酸球性炎症には T 細胞と T 細胞により産生されるサイトカインが重要であることが確立されている。殊に、活性化 T 細胞により産生される IL-5 は、好酸球に選択的に作用して、好酸球系前駆細胞の分化・成熟を促進すると同時に、成熟好酸球の生存延長・機能増強作用を有し、モデル動物のレベルにおいても、IL-5 ノックアウトマウスでは好酸球増多が起きないことや、抗 IL-5 中和抗体の投与によって、実験喘息モデルの好酸球浸潤・気道過敏性亢進が抑制されることから、好酸球性炎症に必須の因子であることが示されている。さらに、IL-5 を気道粘膜に transgenic に発現させたマウスでは、リンパ球、好酸球浸潤を伴う気道炎症が生じ、ほぼ臨床的に喘息で認められる病理像が観察され、気道過敏性も誘導される。ヒトを対象にした研究からも、気管支粘膜生検、気管支肺胞洗浄の所見から、1) 気管支喘息患者の気道炎症局所には、活性化 CD4⁺ T 細胞 (ヘルパー T 細胞) の浸潤が顕著にみられ、2) 喘息の重症度・気道過敏性の程度と活性化 T 細胞数との間に相関が認められ、3) 粘膜に浸潤する好酸球数と T 細胞数とが相関し、さらに 4) 喘息患者では末梢血中にも、活性化 T 細胞数が増加していることなどから、気管支喘息の好酸球性炎症はヘルパー T 細胞により産生される IL-5 が重要であることが示されている。好酸球に対して増殖促進、活性化作用を有するサイトカインは、IL-5 の他に、GM-CSF、IL-3 等が存在するが、喘息患者に抗原吸入負荷をおこなった後、BALF 中に含まれる好酸球活性化サイトカインは、主として IL-5 であることが知られている。また、BALF 中の IL-5 濃度と好酸球数、活性化 T 細胞数と

の間に相関がみられる。ステロイド治療は、BALF中に回収される IL-4、IL-5 mRNA 陽性細胞数を減少させる一方、IFN- γ mRNA 陽性細胞数を増加させる。さらに、IL-4、IL-5、GM-CSF mRNA 陽性細胞数と、気道狭窄・気道過敏性の程度との間に相関が認められる。アトピー型喘息においては、ダニアレルギー反応性 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。

IgE 抗体の存在には関係なく、IL-5 を産生する Th 細胞があれば、好酸球性炎症がおきるという仮説を検証するために、われわれは、既に Th 細胞受身移入マウスを用いて、気道の好酸球性炎症、気道過敏性がもたらされるか否かを検討している。従来の実験喘息モデルは、マウスを抗原で感作した後、抗原を吸入負荷するもので、IgE、IgG、IgA 抗体をはじめとする液性免疫と感作 T 細胞（細胞性免疫）の関与を分けて解析することが不可能であった。あらかじめ、Balb/c マウスを卵白アルブミン（OVA）にて感作し、所属リンパ節から、OVA 特異的 T 細胞クローンを樹立した。抗原刺激によって IL-5 を産生する Th クローンを無処置マウスに移入し、その後抗原を吸入させると、著明な気道好酸球性炎症が惹起された。気道粘膜への好酸球浸潤、気道上皮の破壊、杯細胞化生等の喘息患者の病理所見に準じた所見が観察されたが、IL-5 産生能の低いクローンを移入しても炎症所見はみられなかった。抗原負荷によってアセチルコリン（ACh）に対する気道反応性が約 10 倍亢進していた（気道過敏性）。本モデルによって、液性免疫の関与なしに、Th 細胞の活性化によって気道の好酸球性炎症が誘導されることが示された。この報告以前は、T 細胞や IL-5 は好酸球性炎症を発症するための必要条件として認識されていた。すなわち、抗原特異的な T 細胞が存在するだけでは不十分であり、むしろ、IgE 抗体を介したメカニズムによりマスト細胞が活性化され、即時相が生じ、そこで産生されるサイトカイン、ケモカイン、ケミカルメディエータが、後につづく遅発相における主たる effector 細胞である T 細胞、好酸球を局所に集積するのに重要であると捉えられてきたが、本知見は、IL-5 産生性の T 細胞の存在が、好酸球性炎症の成立の十分条件であることを明確に示している。

Kay らは、ネコアレルギーの喘息患者を対象に、Feld 1 の部分ペプチド 3 個からなる混合物 FC1P の効果を解析中に、このペプチドの皮内注射に反応して、DRB13 を有する患者では、IAR を欠く LAR が出現することを見出した。ペプチドは IgE とは反応しないことから、この場合も抗原提示細胞と T 細胞との interaction によって LAR が誘導されたと考えられ

る。皮内投与されたペプチドが、いかにして気道反応を引き起こしうるのであるのか、dendritic cell の関与があるのか、果たして本当に T 細胞の活性化が生じているのかなど、基本的な問題が解決される必要があるが、極めて興味深い現象といえよう。

In vitro IL-5 産生と遅発型アレルギー反応を結びつける機序は重要課題である。今後、メディエータ、炎症細胞を明らかにする必要がある。この関係では、抗 IL-5 抗体臨床試験において、末梢血中、喀痰中の好酸球数を減少させたにもかかわらず、喘息症状、抗原吸入誘発後の LAR、気道過敏性は変わらなかったとの結果が報告され、喘息病態における好酸球の関与に否定的な仮説が提唱されるきっかけとなった。しかしながら、抗 IL-5 抗体投与に際して気管支粘膜生検を実施したグループの学会発表によると、好酸球数は、血中、喀痰中、BALF 中では概ね 90% 低下していたが、気管支粘膜内では半減にとどまっていた。この知見は、抗 IL-5 中和抗体の効果が、喘息病態には最も重要と考えられる気道組織内に対しては、十分には及んでいないことを示唆する。生物学的に、不完全な中和実験から結論を導き出すことは不適切である。IL-5 の作用点には、増殖因子として骨髄での好酸球造血を促進する一方で、粘膜組織内において T 細胞から産生され、粘膜内の好酸球を活性化する、少なくとも 2 通りが想定される。後者のきわめて至近距離で発揮される作用が、分子量 20 万の巨大分子の全身投与によってブロックされるのかは疑問である。喘息患者の気道粘膜には IL-5 産生 T 細胞の存在が確認されている。T 細胞アレルギーにตอบสนองしたこれらの粘膜内 T 細胞の IL-5 産生が喘息発症に重要か否かは、低分子量のアンタゴニストの出現を待つ必要がある。

E. 結論

喘息を Th2 病とする仮説が提唱されているが、液性免疫の IgE 産生を誘導するいわゆるアレルギーと細胞性免疫の T 細胞 IL-5 産生を誘導する“T 細胞アレルギー”とが異なる分子である可能性が考えられる。喘息の本態が細胞性免疫に担われる慢性炎症にあることから、“T 細胞アレルギー”の同定は正しい標的に対する減感作療法の開発に不可欠の診断ステップである。IL-5 産生テストは、アトピー型・非アトピー型両病型共通の、喘息起因抗原診断法として有用と考えられる。遅発型喘息反応は、即時型喘息反応とは独立した、細胞性免疫に依存したアレルギー反応と考えられる。従来、IgE 抗体により認識されるアレルギーに注目が集められていたが、慢性炎症疾患の治療には、T 細胞によりメディエートされる遅い反応系を制御する必要があり、“T 細胞アレルギー”をターゲットと

することで現行の減感作療法は格段に地位を向上することが期待される (Fig. 4)。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaminuma, O., Mori, A., Kitamura, N., Hashimoto, T., Kitamura, F., Setoguchi, K., Shoda, H., Yajima, N., Inokuma, S., and Miyatake, S. 2004. Role of GATA-3 in IL-5 gene transcription by CD4⁺ T cells of asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 2) Hashimoto, T., Kawaguchi, H., Maeda, Y., Taniguchi, M., Akiyama, K., and Mori, A. 2004. IL-17 production by peripheral blood T cells of asthma patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 3) Tsuda, M., Matsumoto, K., Inoue, H., Matsumura, M., Nakano, T., Mori, A., Azuma, M., and Nakanishi, Y. Expression of B7-H1 and B7-DC on airway epithelium is enhanced by double-stranded RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press)
- 4) 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.* 134:7-11.
- 5) Mitomi, H., Matsumoto, Y., Mori, A., Arai, N., Ishii, K., Tanabe, S., Kobayashi, K., Sada, M., Mieno, H. 2004. Multifocal granular cell

tumors of the gastrointestinal tract: Immunohistochemical findings compared with those of solitary tumors. *Pathol. Int.* 54:47-51

2. 学会発表

- 1) Mori, A., Hashimoto, T., and Akiyama, K. 2004. Costimulatory signal confers steroid resistance on human helper T cells. 2004 American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual Meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:S48 (San Francisco) 2004/3/19-23
- 2) Mori, A., Hashimoto, T., and Akiyama, K. 2004. T cell IL-5 production to *Candida albicans* secretory aspartic proteinase 2 is related to IgE-independent late asthmatic response. 25th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (Bornholm) 2004/8/24-30

H. 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

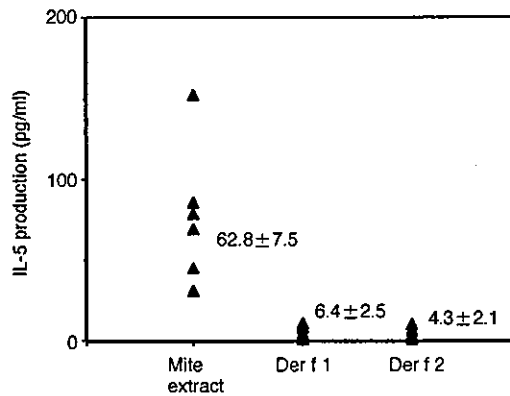
Table I. Immediate and late skin responses upon challenge with mite allergens

	ISR ^a		LSR ^b	
	+	-	+	-
Mite extract	98	2	40	60
Der f 1	82	18	1	99
Der f 2	72	28	1	99

^aAtopic asthma patients (n=100) were challenged with intradermal injection of crude mite extract, rDer f 1, and rDer f 2. Positive ISR was defined by >9 mm wheal response.

^bPositive LSR was defined by >10 mm erythema response.

Fig. 1 a



b

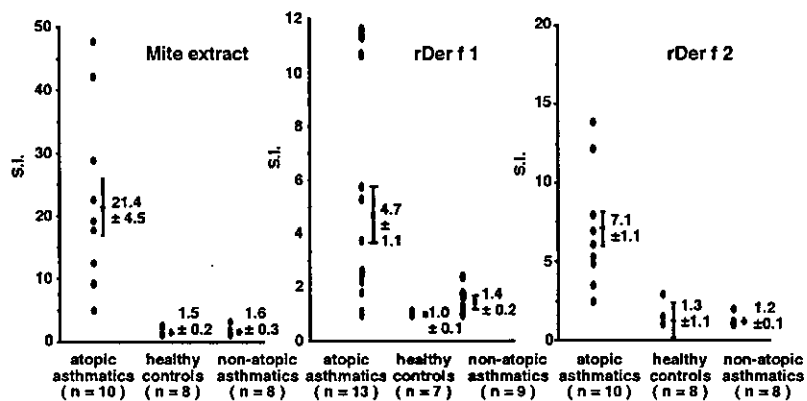
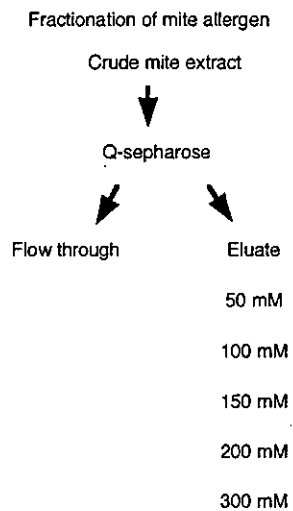


Fig. 2

a



b

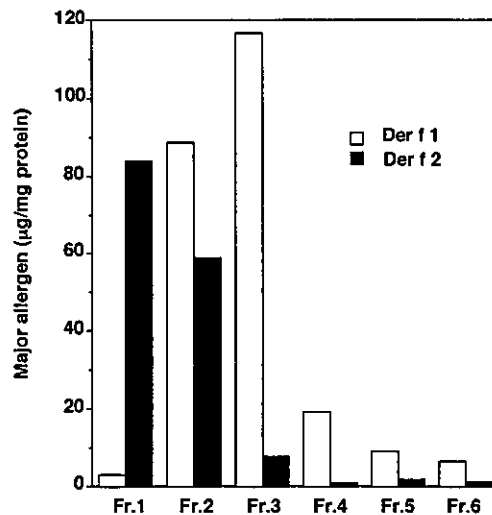
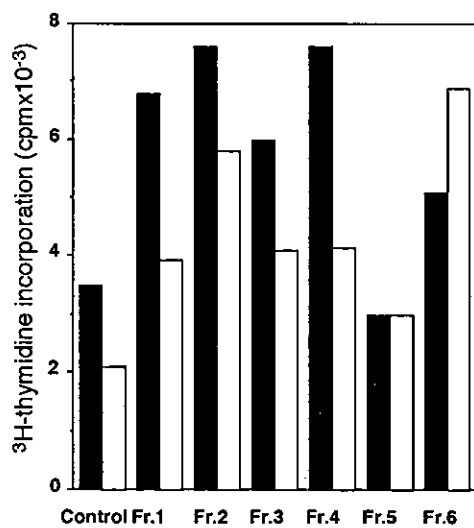


Fig. 3

a



b

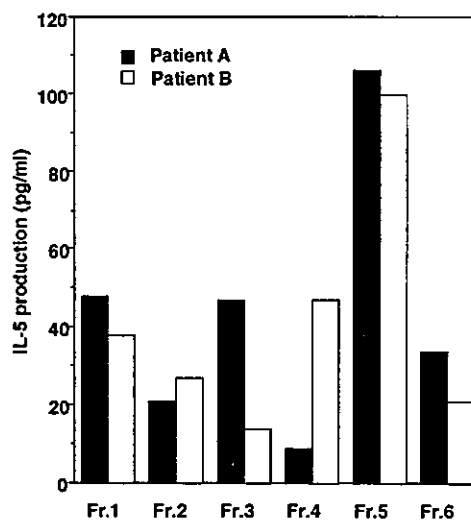
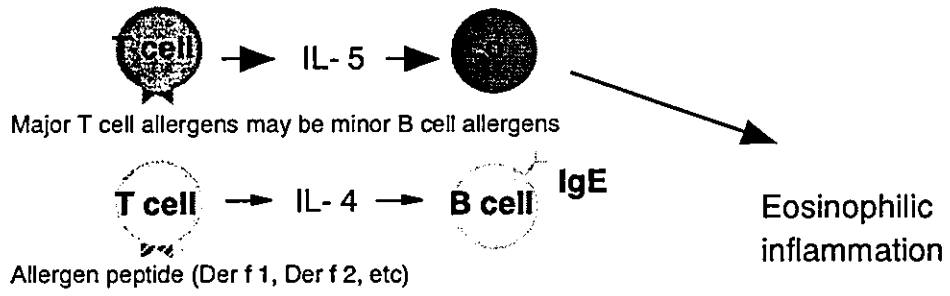
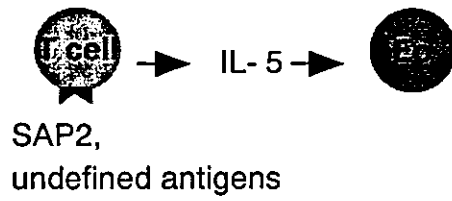


Fig. 4

Atopic asthma



Nonatopic asthma



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（独）国立病院機構南岡山医療センター 院長

研究要旨

難治性喘息の病態に即した治療方針を確立する為に、臨床指標（臨床的・炎症性・器質化の各指標）ならびに炎症細胞（リンパ球と好塩基球）機能の基礎的検討をした。臨床的各指標の検討からは、炎症優位型と器質化優位型の亜分類が可能で、難治性喘息は後者が多かったが前者の特徴を合わせ持つ症例があった。炎症細胞反応の検討では、難治性喘息ではCandida 抗原刺激でリンパ球の活性化が遷延する場合があります、この反応が気道上皮細胞からの MMP-9 産生を増強させ気道の器質化（気道壁の肥厚等）を促進する可能性が示唆された。また好塩基球のアポトーシス（AP）が DEX で誘導され、IL-3 の共存下では減弱することが判明した。以上、難治化の機序と効果の裏付け・今後の治療方針への示唆が得られた。

研究協力者

宗田 良（国立病院機構南岡山医療センター副院長） 金廣有彦（岡山大学医学部第2内科助手）
岡田千春（国立病院機構南岡山医療センター第1内科医長） 谷本 安（岡山大学医学部第2内科助手）
木村五郎（国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科医長）
平野 淳（国立病院機構南岡山医療センター第1内科医師）

A. 研究目的

重症難治性喘息の病因・病態は多様であり、画一的な治療では対応が困難な場合が多い。従って、まずそれらの基本的病態を整理し、その特徴に基づいた治療法を確立する必要がある。そこで今年度は、重症難治性喘息の臨床的な各種指標を用いて、治療に抵抗する強い炎症病態を有する炎症優位群（Burning type）と、過去の不十分な対応によるリモデリング優位な群（Burn out type）の特徴を検証した。また慢性化・難治化病態がいかなる免疫アレルギー学的背景に基づいているかを解明する観点から、IgE 依存性あるいは非依存性のアレルギー性炎症病態の検討として、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した。さらに好塩基球が IgE 依存性のみならず喘息の遅発型気道反応にも関与する重要な炎症細胞であることから、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して喘息の慢性化・難治化病態を解明する観点で、昨年度はステロイド薬（Dexamethasone; DEX）が濃度依存性にヒト好塩基球の AP を誘導し、ヒト好塩基球の分化増殖因子・活性化因子である IL-3 が AP を強力に抑制することを明らかにした。今年度は IL-3 存在下での DEX の AP 誘導効果並びに各種喘息治療薬の AP 誘導効果を検討し、難治性喘息の治療と重症化の予防対策に供したい。

B. 研究方法

(1) 臨床的検討：臨床病型の検討は、難治性喘息（JGL98 で規定された step4 の最重症型）10 例と対照の非難治群として軽・中等症喘息（step 1-2）22 例を対象に、臨床指標（発症年齢・病型・ステロイド薬の使用状況等の患者背景、合併症、気道過敏性）、炎症指標（IgE 等のアレルギー感受性指標、好酸球・リンパ球等の炎症細胞反応）並びに器質化を示唆する指標（呼吸機能、気道可逆性試験、HRCT 所見、喫煙状況等）について群間並びに症例毎で比較検討した。

(2) リンパ球機能の検討：難治症例においてリンパ球活性化を Flow cytometry を使用して解析し、単核球層からのサイトカイン産生パターンを ELISA 法で測定して検討した。気道炎症の重要細胞である気管支上皮細胞とリンパ球との相互反応を解析するために正常気管支細胞と喘息患者の末梢血単核球層を抗原刺激下で Co-culture し、同様にリンパ球の活性化、サイトカインの産生、MMP-9 の産生を検討した（図 1）。さらに喀痰中のムチン量の測定を行い薬剤および難治化との関連を解析した。さらに、難治化に対する治療法を探索する目的で、リンパ球の反応系における抗ロイコトリエン薬（LTRA）の効果を検討した。

(3) 好塩基球の検討：前年と同様に、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 (Basophil Isolation Kit, Miltenyi Biotec)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 DEX、その他の喘息治療薬(ロイコトリエン拮抗薬、テオフィリン、 β_2 刺激薬)の存在下で 72 時間培養し、観察されるアポトーシス (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) 臨床的検討：

臨床指標のうち、患者背景(表 1)は難治群、非難治の軽中等症群共に性別、現年齢、発症年齢型(全例成人発症型)に差はみられなかったが、罹病期間は難治群が長期にわたっていた。アトピー型は非難治群が 10/22 例に比して難治群は 1/10 例と非アトピー型喘息が多かった。合併症は難治例では副鼻腔炎や AIA が高率であった(表 2)。気道過敏性は、症例数が少なく有位検定は出来なかったが、難治群で亢進する症例が多かった(図 2)。

炎症指標では、難治例で IgE 系の反応が残存する症例もあったが、喀痰中好酸球の関与は軽微であった(表 3, 4)。

器質化指標では、難治群が PEF と $\dot{V}_{75}/\dot{V}_{50}$ は共に低値であったが、%RV は高い傾向であったが有意差は無かった(図 3)。HRCT により気道壁の肥厚を計測したところ、難治群が肥厚した症例が多く、次年度には症例を増やして検討したい(図 4)。喫煙については、両群間に差はなかった。

各症例毎に以上の三指標を検討したところ、表 5 の如く炎症指標が強くみられる症例や器質化指標が強い症例、両者を合わせ持つ症例があったが、難治群は器質化指標がより顕著な傾向を示した。

(2) リンパ球機能の検討：

難治性喘息の症例数を増やして検討したリンパ球の幼若化反応と IL-5 の産生能は、難治群において特に Candida 抗原によるリンパ球の活性化および IL-5 の産生亢進が認められ、昨年度までの結果を裏付けるものであった(図 5)。正常気管支上皮培養細胞と喘息患者 PBMC との相互作用の検討では、ダニ抗原と Candida 抗原刺激によるリンパ球の活性化(図 6)、IL-5(図 7)、IL-13 の産生には明らかな変化は認められなかった。しかし、リモデリングに関係していると考えられている MMP-9 の産生に関して検討してみると、気道上皮細胞単独では明らかな産生増加は認められないが、喘息患者の末梢血単核球層との Co-culture では有意に

産生増加(図 8)が認められた。MMP-9 に関してはタンパク量だけでなく活性も測定したが、やはり気道上皮細胞と喘息患者末梢血単核球層との Co-culture によって有意に増加した。この実験系の MMP-9 の産生細胞は気道上皮細胞であり末梢血単核球層から何らかのシグナルをうけ産生増強に転じた可能性が示唆される結果であった。

喀痰中ムチン量の検討では、難治群より step3 ~4 の中等症の患者の方が高値であった(図 9)。しかし、図 10 に示すように全身性ステロイド薬あるいは LTRA 使用患者ではムチン量が低値であることから、難治群において喀痰中ムチン量が低値を示したのは治療の影響と考えられた。

ダニ抗原、Candida 抗原に対するリンパ球の反応性に対する抗ロイコトリエン薬 Montelukast の抑制効果の検討では、リンパ球活性化には明らかな抑制効果は認められなかった。

(3) 好塩基球の検討：

培養好塩基球は DEX (10^{-6} – 10^{-8} M) で濃度依存性にアポトーシス (AP) が誘導された(図 11)。次に DEX (10^{-7} M) の AP 誘導効果を IL-3 の共存下で検討したところ、IL-3 (0.005–5ng/ml) は濃度依存性に DEX の AP 誘導効果を抑制した。特に、高濃度の IL-3 (0.5–5ng/ml) の共存下では DEX の AP 誘導効果はほぼ完全に抑制された(図 12)。

一方、ステロイド薬以外の喘息治療薬の AP 誘導効果を検討したところ、ロイコトリエン拮抗薬 pranlukast (10^{-6} – 10^{-8} M) (図 13) や theophylline (10^{-4} – 10^{-5} M) (図 14)、 β_2 刺激薬 salbutamol (10^{-5} – 10^{-9} M) (図 15) は好塩基球の AP を誘導しなかった。なお、高濃度の theophylline (10^{-3} M) 並びに salbutamol (10^{-3} – 10^{-4} M) は AP を軽度ながら誘導した。

D. 考察

重症難治性喘息の病態、重症化要因は多様であるが、何らかの原因で炎症がコントロール出来ない状態や、器質化病変が固定し薬剤に反応し難くなりステロイド薬が継続・増量される場合がある。かかる要因を難治と非難治喘息群間及び個々の症例毎に比較したところ、難治群では特定の合併症、気道過敏性亢進状態、非アトピー型反応、弱い炎症細胞の関与、末梢気道にまで及ぶ閉塞性換気機能の障害、気道壁の肥厚等が浮かび上がってきた。また各指標を症例毎に検討すると、非難治症例が炎症指標を多く残しているのに反し、難治症例は器質化の指標を示す症例が多かったが、ステロイド薬の全身投与にもかかわらず炎症指標を認める症例があった。かかる予備的な検討の結果、臨床・炎症・器質化の各指標を評価して炎症優位型

(Burning type)と器質化優位型(Burn out type)に亜分類し臨床応用できれば、喘息の病態にそってより個別性のある治療法や予防法を確立することが可能となる。

その観点から、難治病態を解明し炎症指標の基礎的検証をする目的で、気管支上皮細胞と喘息患者末梢血単核球層との相互作用を検討したところ、気管支上皮細胞単独では抗原刺激によって MMP-9 の産生が増加することはなく、リンパ球を中心とした喘息患者の末梢血単核球層との相互作用によって有意に MMP-9 の産生が増強することがわかった。この結果は、気道上皮細胞が気道における MMP-9 の産生細胞の一つであり、さらに喘息患者の単核球からだされるシグナルによってその MMP-9 の産生増強が出現している可能性を示唆する。今回の対象は難治性喘息の症例数が少なく有意差は認められなかったが、難治群の方が軽症中等症例より MMP-9 の産生増強が顕著であった。この結果は、難治性喘息症例の方が気道壁の肥厚が顕著であるとの今回の臨床的所見を説明できる興味ある所見であり、重要と考えられる。

喀痰のムチン量の解析では、喀痰中ムチン量は呼吸機能、重症度と直接関係するものではないことが判明した。しかし、喘息病状の安定期と非安定期、発作時の比較では明らかに病状の不安定期や発作時に喀痰中ムチン量が増加しており、病状とよく相関することが示唆された。また、喀痰中ムチン量に影響を及ぼすものとしてステロイド薬、抗ロイコトリエン薬などの治療が大きな要因であることも判明した。このことは、ステロイド、抗ロイコトリエン薬などにより充分気道の炎症をコントロールすれば気道分泌を抑えることが可能であり、喀痰による気道閉塞を緩和できることを裏付ける結果であろう。

ヒト末梢血幹細胞培養好塩基球を用いてアポトーシス(AP)に及ぼすステロイド薬やその他の喘息治療薬の効果を検討した。その結果、グルココルチコイドである DEX は濃度依存性に AP を強力に誘導するものの、高濃度の IL-3 (0.5-5ng/ml) 存在下ではその効果が抑制されることが判明した。このことは、好塩基球が気道局所で IL-3 などのサイトカインによって活性化されると、ステロイド薬の抗炎症作用が減弱する可能性を示唆するものである。かかるメカニズムを明らかにすることは、喘息の慢性化・難治化病態の解明とその克服に有用と考えられる。今後 IL-3 やグルココルチコイドによる好塩基球の遺伝子発現並びに AP やメディエーター遊離をはじめとした機能に関する蛋白発現制御について解析する予定である。一方、ロイコトリエン拮抗薬 pranlukast、theophylline、 β_2

刺激薬 salbutamol の AP 誘導効果についても検討したが、高濃度の theophylline、salbutamol でのみ AP を軽度誘導した。

E. 結論

臨床的各指標の検討から、炎症優位型と器質化優位型の亜分類が可能であった。その分類を適用すると、難治性喘息は後者が多かったが前者の特徴を合わせ持つ症例があり、治療方針を示唆する結果が得られた。

リンパ球の検討では、難治性喘息においては抗原刺激特に Candida 抗原刺激においてリンパ球の活性化が遷延しているものがあり、さらにこの反応が気道上皮細胞からの MMP-9 産生を増強させ気道のリモデリングの促進により気道壁の肥厚をきたし病状の難治化をもたらす可能性が示唆された。

好塩基球の検討からは、Dexamethasone がヒト好塩基球のアポトーシスを誘導し、その効果はアポトーシス抑制効果を有する IL-3 の共存下では減弱することが判明し、治療方針と効果の裏付けが得られた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高橋 清: 若年者の喘息死 —5-34 歳の喘息死数は吸入ステロイド薬の販売量に逆相関する—*International Review of Asthma* 5; 44-48, 2003.
- 2) 高橋 清: 真菌と難治性喘息. *アレルギー科* 17; 171-181, 2004.
- 3) 高橋 清, 河田典子: 増悪因子の回避, 除去. *総合アレルギー学* 264-268, 福田 健編, 南山堂, 東京, 2004.
- 4) 高橋 清, 宗田 良, 多田敦彦他: 気管支喘息と COPD の治療に関する中国・四国地方における実態調査. *呼吸* 23; 498-508, 2004.
- 5) 高橋 清, 庄司俊輔, 堀内 正, 山下直美他: 服薬コンプライアンスの向上の方策とその効果に関する検討. 公害健康被害補償予防協会委託業務成人気管支ぜん息の状況に応じた自己管理手法に関する研究報告書 2003 年度(第 6 期初年度)大田 健研究班 5-23, 2004.
- 6) 宗田 良, 高橋 清: 発症後の早期治療 —成人気管支喘息の早期治療—. *アレルギー・免疫* 11; 1338-1342, 2004.
- 7) 平野 淳, 高橋 清: One Airway, One Disease —アレルギー性鼻炎と喘息— 上下気道のリンク

—NSAIDs 不耐症—. Progress in Medicine 24;
3205-3209, 2004.

2. 学会発表

- 1) 高橋 清: 年代別喘息治療の現況と問題点—高齢者—. The 14th Congress of Interasma Japan/
North Asia(第14回国際喘息学会日本北アジア部
会), 2004. 7, 横浜
- 2) 須崎規之, 谷本 安, 高橋 清, 他: ヒト好塩基球に
おける CysLT1 受容体の発現と機能に関する検討.
第16回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2004. 5,
前橋
- 3) 岡田千春, 木村五郎, 高橋 清他: 慢性, 難治性喘
息の臨床的特徴と対応 —気道炎症からみた特徴
と対策—. 第16回日本アレルギー学会春季臨床大
会, 2004. 5, 前橋
- 4) 岡田千春, 平野 淳, 高橋 清他: 成人気管支喘息
の難治化におけるリンパ球および樹状細胞の関与.
第54回日本アレルギー学会総会, 2004. 11, 横浜
- 5) 高橋 清: 重症度を規定する因子 —社会的要
因を含む 1. 成人. 第24回六甲カンファレンス,
2004. 7・8, 京都
- 6) 岡田千春, 平野 淳, 高橋 清, 森 晶夫他: 成
人氣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, 2003. 10, 岐阜
- 7) 須崎規之, 谷本 安, 高橋 清他: 好塩基球におけ
る喘息治療薬のアポトーシス誘導効果に関する検
討. 第53回日本アレルギー学会総会, 2003. 10,
岐阜

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