

図1 正常気管支上皮と喘息患者末梢血単核球層の Co-cultureに対する抗原刺激の影響

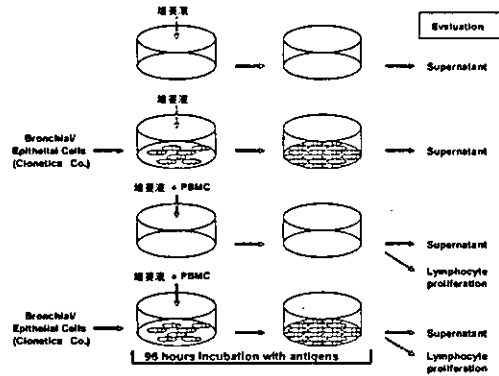


表1. 患者背景

	非難治群(ステップ1~2)	難治群(ステップ4)
症例数	22例	10例
男女比	10:12	5:5
現年齢	61.1±8.7才(44~72)	64.3±12.5才(41~82)
発症年齢別分類	全例成人発症型	全例成人発症型
発症年齢	47.7±11.3才(18~61)	48.1±9.3才(28~53)
罹病期間	14.4±9.1年(1~39)	25.2±10.0年(13~41)
BDP(内服+吸入)	313.6±94.1(200~400)μg/日	2007.7±773.3(1000~3400)μg/日
病型		
アトピー型	10例	1例
混合型	1例	2例
感染型	11例	7例

表2. 合併症

	非難治群	難治群
副鼻腔炎	5% (1/22例)	40% (4/10例)
AR	59% (13/22)	50% (5/10)
AD	5% (1/22)	0% (0/10)
AIA	23% (5/22)	50% (5/10)

重複あり

図2. 気道過敏性試験

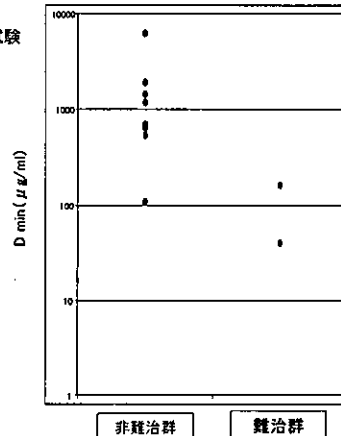


表3. IgE値

	非難治群	難治群
IgE RIST(μ/ml)	425.2±446.3(30~1852)	204.61±183.3(28~533)
CAP-RAST(≥score2)		
HD-mite	45% (9/20例)	60% (3/5例)
Candida	10% (2/20)	33.3% (1/3)
スギ花粉	52.8% (10/19)	50% (2/4)
ネコ	12.5% (2/16)	0% (0/2)

表4. 好酸球

	非難治群	難治群
末梢血好酸球出現率%	6.85±4.93% (2.1~24.1)	4.32±4.87% (0~12.3)
喀痰好酸球の有無		
+	78.6% (11/14例)	20% (1/5例)
-	21.4% (3/14)	80% (4/5)
喀痰好酸球出現率%	22.2±25.2% (0~66)	0.3±0.6% (0~1)

図3. 肺機能検査

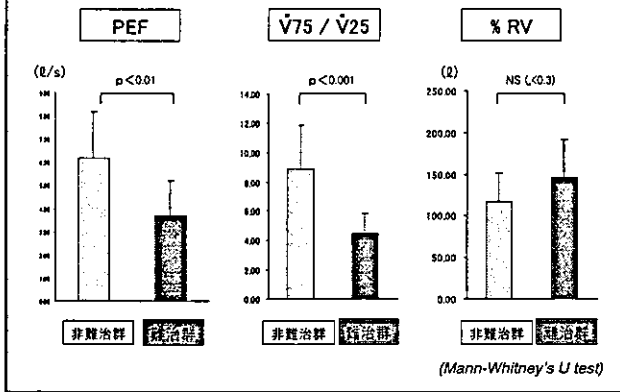


図4. 器質化指標

	非難治群	難治群
胸部HRCT		
壁肥厚あり	0% (0/3例)	100% (2/2例)
壁肥厚なし	100% (3/3)	0% (0/1)



表5. 症例一覧

氏名	性別	年齢	発症年齢	経過年数	病型	気管支炎		器質化指標				
						慢性	急性	胸壁肥厚	気管壁肥厚	肺動脈拡張	肺野陰影	気腫
T.C	M	49	20	19	慢性(内服)	●	●	×	×	×	×	×
B.C	F	68	42	27	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
K.M	M	79	44	23	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
U.Y	F	69	53	16	アレルギー	×	×	×	×	×	×	×
H.H	M	65	27	38	アレルギー	●	●	×	×	×	×	×
K.T	M	45	46	1	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
S.T	F	59	56	3	慢性(内服)	×	●	×	×	×	×	×
I.M	M	57	24	24	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
M.H	F	58	50	7	慢性(内服)	●	●	×	×	×	×	×
K.K	F	67	57	11	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
M.K	F	58	41	17	慢性(内服)	×	●	×	×	×	×	×
T.T	M	54	18	28	アレルギー	●	●	×	×	×	×	×
U.Y	M	59	25	14	アレルギー	●	●	×	×	×	×	×
Y.H	M	60	54	7	アレルギー	●	●	×	×	×	×	×
T.O	F	61	58	12	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
K.S	F	67	61	7	アレルギー	●	●	×	×	×	×	×
N.S	M	68	57	10	アレルギー	●	●	×	×	×	×	×
A.K	M	68	42	22	慢性	×	●	×	×	×	×	×
M.N	F	64	64	1	慢性(内服)	●	●	×	×	×	×	×
M.A	F	72	58	10	アレルギー	×	×	×	×	×	×	×
O.T	F	70	55	16	アレルギー	●	●	×	×	×	×	×
K.M	F	72	59	14	アレルギー	●	●	×	×	×	×	×
A.Y	M	48	20	20	慢性	×	×	×	×	×	×	×
O.T	F	60	49	21	慢性	×	×	×	×	×	×	×
K.M	F	64	28	26	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
P.Y	F	58	44	18	慢性(内服)	●	●	×	×	×	×	×
M.H	M	63	53	12	慢性(内服)	●	●	×	×	×	×	×
M.K	F	70	45	28	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
K.S	M	61	29	15	アレルギー	×	×	×	×	×	×	×
T.A	M	74	52	23	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
O.K	F	62	42	41	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×
K.K	M	75	49	26	慢性(内服)	×	×	×	×	×	×	×

図5. 気管支喘息患者の末梢血単核球からのリンパ球幼若化反応とIL-5産生能の検討

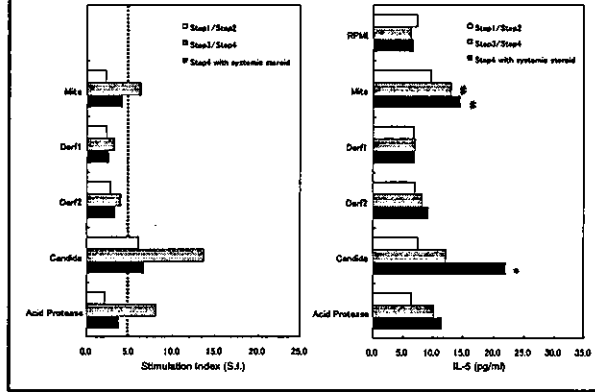


図6. 抗原刺激によるリンパ球の幼若化に対する培養気管支上皮細胞の影響

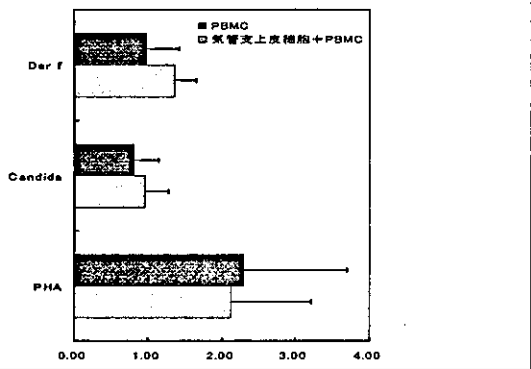


図7. 抗原刺激によるPBMCからのIL-5産生に対する培養気管支上皮細胞の影響

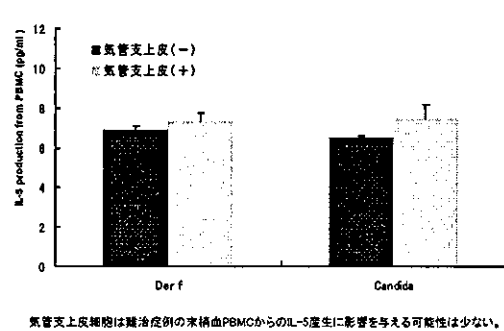


図8. 気管支上皮培養細胞と気管支喘息患者のPBMCの相互作用MMP-9濃度とActivityの検討

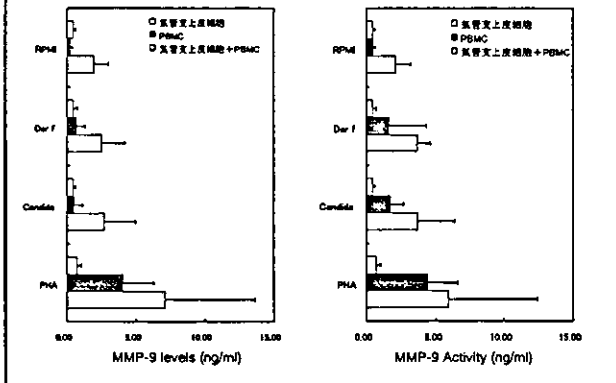


図9. 喀痰中ムチン量とcysLT量, 1秒量との関連

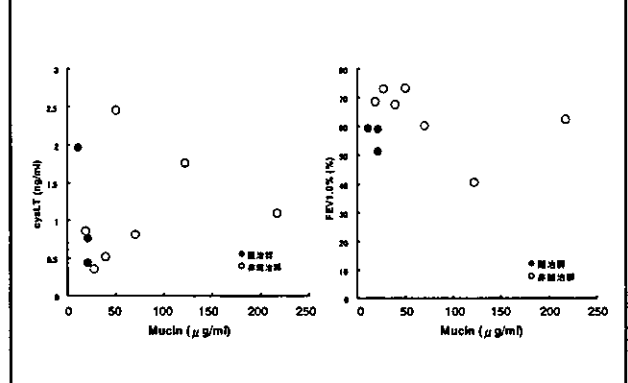


図10. 喀痰中ムチン量と症状, 治療薬との関連

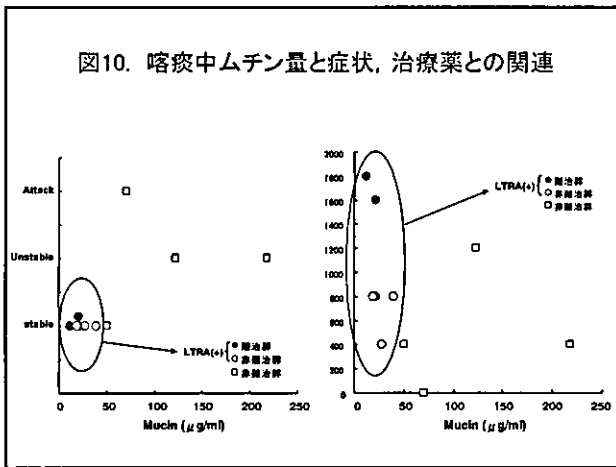


図11. ヒト培養好塩基球のアポトーシスに及ぼすデキサメサゾンの効果

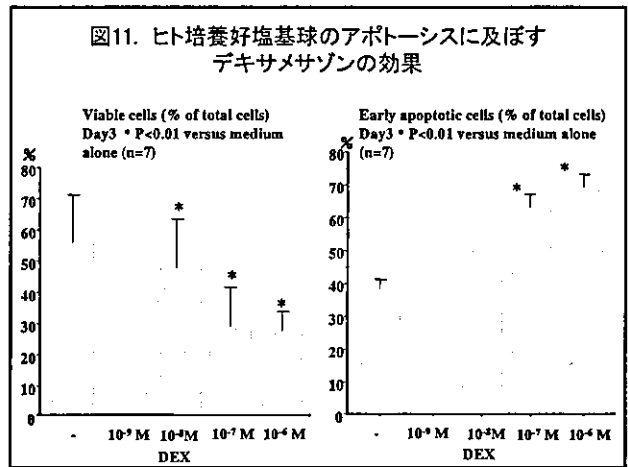


図12. ヒト培養好塩基球のアポトーシスに及ぼすIL-3とデキサメサゾンの相互作用

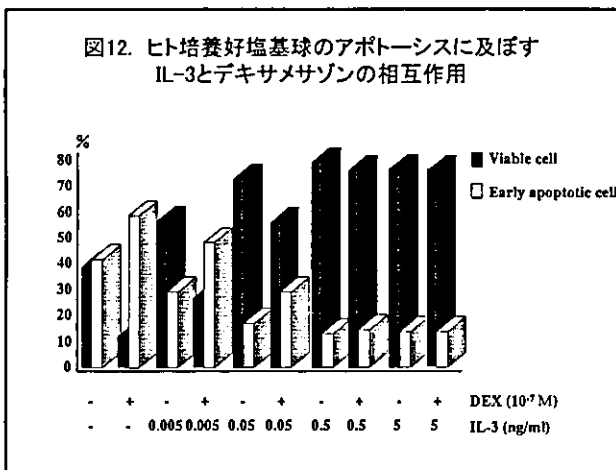


図13. ヒト培養好塩基球のアポトーシスに及ぼすプラニルカストの効果

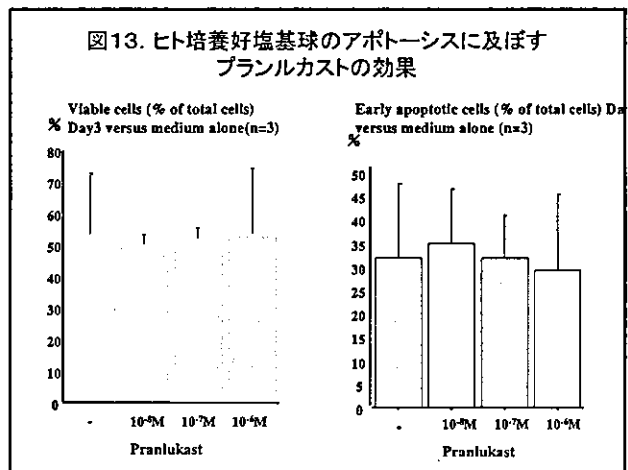


図14. ヒト培養好塩基球のアポトーシスに及ぼす  
テオフィリンの効果

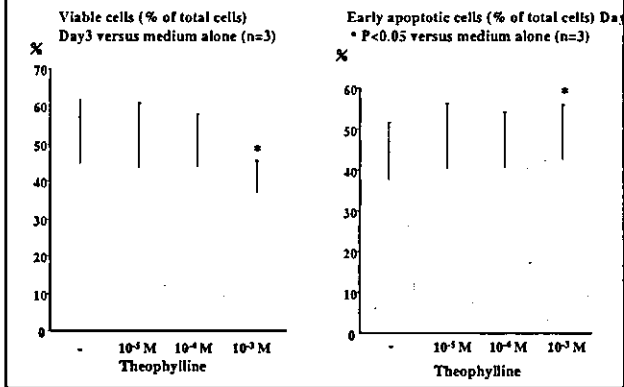
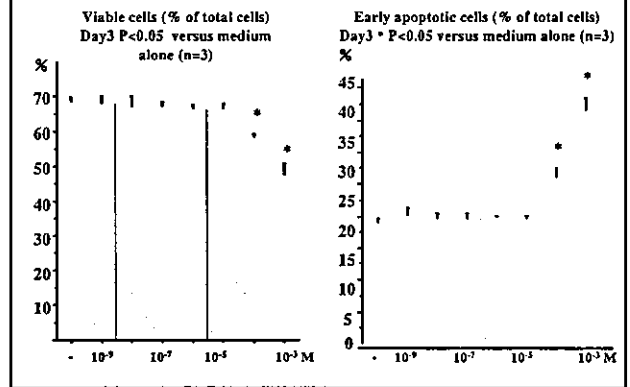


図15. ヒト培養好塩基球のアポトーシスに及ぼす  
サルブタモールの効果



厚生労働科学研究補助金（研究事業）  
分担研究報告書

気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と難治化の予防・治療法の開発に関する研究  
「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シン（TRX）の可能性についての検討」

分担研究者 相 沢 久 道 久留米大学医学部第一内科教授

研究協力者	星 野 友 昭	久留米大学医学部第一内科
	一 木 裕 子	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
	井 上 博 雅	九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設
	松 元 幸 一 郎	九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

研究要旨

難治性喘息に対する治療は、現在用いられている薬物を多剤併用し、その患者の最良の状態にし、かつ出来るだけ副作用を少なくするしか現在治療法がなく、難治性喘息に有効な薬剤の開発が望まれる。Thioredoxin (TRX)は酸化還元制御に携わるレドックス制御因子として働く。我々の研究で TRX の過剰発現がマウス間質性肺炎モデルで炎症細胞浸潤を抑制することから、TRX の喘息モデルに対する効果を検討した。Balb/c マウスでの卵白アルブミン (OVA) 感作モデルの気道炎症、気道過敏性を指標に、ヒトリコンビナント TRX を 1 群に投与しその効果を評価した。その結果、ヒトリコンビナント TRX 投与群では OVA 投与による気道過敏性亢進と、気道炎症を著明に抑制した。これは TRX が気道の過敏性と好酸球性炎症を酸化還元制御に作用し改善させるためと考えられ、TRX は新しい喘息治療薬となりうる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

難治性喘息は、「通常の治療では改善されず、ステロイド剤を用いなければ日常生活が出来ない重症、通年性の気管支喘息」と定義される。難治性喘息に対する治療は、現在用いられている薬物を多剤併用し、その患者の最良の状態にし、かつ出来るだけ副作用を少なくするしか現在治療法がなく、難治性喘息に有効な薬剤の開発が望まれる。我々は難治性喘息の新しい治療法を開発するために、従来の喘息治療薬と異なる薬剤の臨床応用を検討した。

生物において酸素は重要な役割を負うが化学的にはラジカルであり、生体内で還元されて最終的には化学的に安定な H<sub>2</sub>O に変化する。この過程でスーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、ヒドロキシラジカル(OH)、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)など様々な活性酸素種を生じる。これら活性酸素種は化学的に不安定で、その強力な酸化作用は近傍の脂質、タンパク質、核酸などの生体高分子物質に切断、重合、修飾などの傷害を与える。これらは結果として細胞の機能障害、異常増殖、細胞死を引き起こす。生体はこのような酸化ストレスに対して NADPH oxidases (NOXs), superoxide dismutase (SOD; O<sub>2</sub><sup>-</sup>の除去), catalase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の分解), glutathione (GSH), thioredoxin

(TRX)等の酸化還元サイクルを持つ。このようにして細胞内外の酸化還元のバランスを保っている。このような酸化、還元のバランス制御をレドックス(redox: reduction/oxidation)制御と呼ぶ。なかでも TRX はそれ自身が酸化還元サイクルを持つ。ヒト TRX は京都大学の淀井らによって成人T細胞白血病細胞株の培養上清中に存在する IL-2R $\alpha$ 鎖(Tac; CD25)の誘導物質、ATL derived factor(ADF)としてクローニングされた(2)。ヒト TRX は 104 個のアミノ酸からなる約 12kDa のユビキタスな蛋白である。その活性に必要な Cys-Gly-Pro-Cys というコンサーブされた配列を持つ。この配列中の 2 個のシステイン残基は種を超えて保存されている。このシステイン残基からのプロトン供与により標的蛋白のジスルフィド結合(S-S bond)を開裂される強い還元活性を持つ。TRX はそれ自身が酸化されることにより、ジスルフィド結合を持つ他のタンパク質を還元する。一方、還元反応後のジスルフィド結合を形成した酸化型 TRX はチオレドキシシン・リダクターゼ(thioredoxin reductase)により再還元されて還元型 TRX に戻る。これによって酸化されたチオレドキシシン・リダクターゼはそのプロトドナーである NADPH によって再還元される。これまでの我々の研究で TRX の過剰発現がマウス間質性肺炎モデルで炎症細胞浸潤を抑制することを明らかに

してきた。そこで、TRX が喘息にも有効か否かを検討するために OVA 感作マウスを用いて TRX の気道における作用をみた。

## B. 方法

感作用の卵白アルブミンは Ovalbumin (SIGMA 社製; 以下、OVA と略す) を必要量秤量した後、生理食塩水で希釈し、これをアルミニウムゲル: Al(OH)<sub>3</sub> (Alu-Gel-S suspension, research grade, sterile; SERVA 社製)を用いて、50 μg / ml となるように用時調製して使用した。誘発用の卵白アルブミンは、OVA を必要量秤量し、生理食塩水を用いて 5%溶液となるように調製して使用した。マウスへの麻酔は、塩酸ケタミンを使用した。気道過敏性測定用のアセチルコリンは ACETYLCHOLINE CHLORIDE (SIGMA 社製; 以下、Ach と略す) を用い、PBS で希釈し使用した。Human recombinant Thioredoxin, mutant human Thioredoxin (C32S/C35S)は中村らの方法 (Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):15143-8) で作成した。

Balb/c マウスでの卵白アルブミン (OVA) 感作モデルを用い 6 群に分けた (図 1)。群分けは、1) 無処置群(non-treat)、2) 感作群、3) 感作+ challenge 群、4) 感作+ challenge + TRX 投与群、5) 感作+ challenge + mutant TRX、6) 感作時に TRX 投与+感作+ challenge の 6 群に分けた。具体的には OVA 腹腔内投与し感作したのみで challenge は行わず気道過敏性の測定と BAL を行った群、次に感作し、OVA 吸入により airway challenge し同様に気道過敏性の測定と BAL を行った群、感作、challenge ともに行い、ヒトリコンビナント TRX (40 μg / head) もしくは 32S/35S mutant human TRX (40 μg / head) をそれぞれ腹腔内投与し、気道過敏性の測定と BAL を行った群、感作時にヒトリコンビナント TRX (40 μg / head) を投与、感作と challenge ともに行い、そして control 群とに分けた。

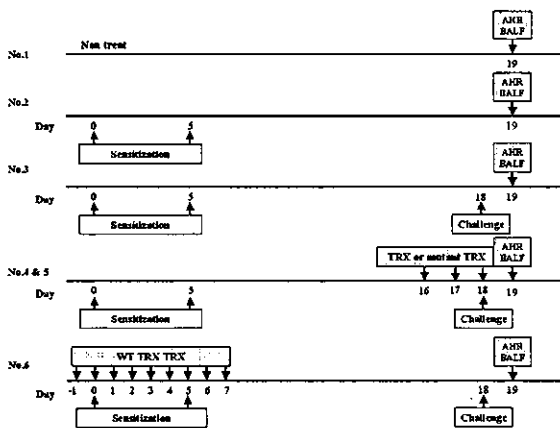


図 1 Balb/c マウスでの卵白アルブミン (OVA) 感作モデルを用いた 6 群

## 気道過敏性の測定

気道過敏性は、whole body plethysmography を用いた (Baxco 社製)覚醒・自発呼吸下のマウスで Penh を気道収縮の指標として測定した。最初に PBS を吸入させ Penh の base line の値を測定し、次いで Ach 0.75 mg/ml から順次高濃度のものを吸入させ Penh の変化を観察する。そして、Penh が base line の 2 倍になったところの Ach 濃度を EC<sub>2</sub>Penh と表現した。

## C. 結果

感作と challenge を行った群は control 群と比べ有意な過敏性の亢進と BAL 液中の総細胞数と好中球の増加を認めた (図 2)。

wild type human TRX 投与群ではその気道過敏性亢進と、BAL 液中の総細胞数と好酸球の増加はともに有意に改善していた (図 3)。

一方、mutant TRX 投与群では wild type TRX 投与群でみられたような、気道過敏性や気道炎症の改善はみられなかった (図 4)。

病理学的にも感作、誘発群で認められた好酸球の浸潤は、wild type human TRX 投与群では改善し、mutant TRX 投与群では control 群と比較しても変化がなかった (図 5)。

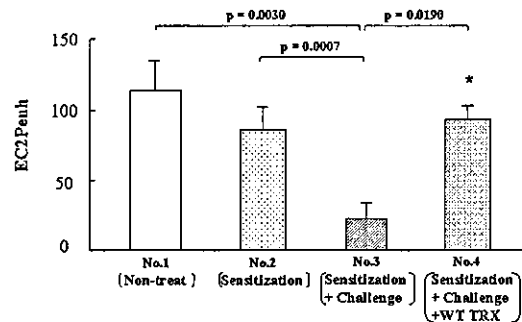


図 2. WT TRX は気道過敏性を抑制する

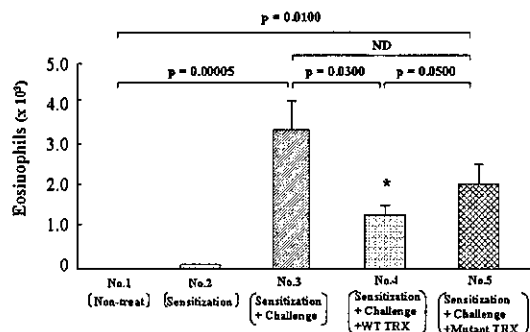


図3. WT TRXは好酸球を抑制する

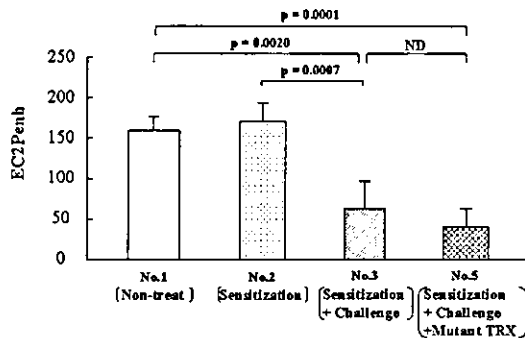


図4. Mutant TRXは気道過敏性を抑制しない

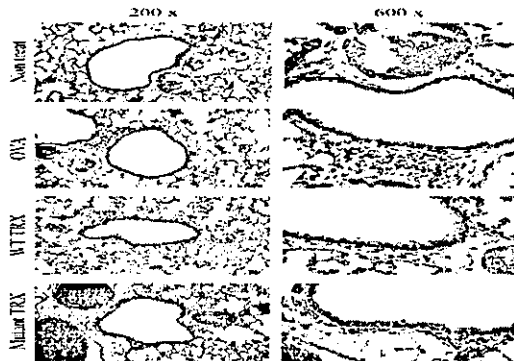


図5. 好酸球の浸潤は、wild type human TRX 投与群では改善し、mutant TRX 投与群では control 群と比較しても変化がなかった。(HE染色)

#### D. 考察

今回の検討では、参加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有意にかつ著明に抑制した。これまで、気道炎症や気道過敏性の亢進に気道への酸化ストレスが関与することは、実験的に示され、あるいは臨床的にも推定されてきた。しかしながら、SODをはじめとして、これまでin vitroの実験系において気道炎症や気道過敏性を有意に抑制する薬物はなかった。今回のTRXがマウス喘息モデルにおいて、アレルゲンによる気道反応を抑制したのは、その生体における持続的な作用によるものと考えられる。

TRXのこの作用は、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するものであり、新しい喘息治療薬となりうるものと考えられる。

#### E. 結論

TRXは酸化還元制御に作用し、アレルゲンにより引き起こされる気道の過敏性と好酸球性炎症を、改善させることが示された。これはTRXの喘息治療薬となりうる可能性を示している。

#### F. 業績

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Fumimori 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. 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<sup>2+</sup> Refilling of Sarcoplasmic Reticulum in Guinea Pig. *Pulm Pharmacol Ther* 15: 112-120., 2002.

21. 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.



厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 永井 博式（岐阜薬科大学 薬理学教室 教授）

**研究要旨** 本研究では、マウス気道過敏性モデルを用いて、抗原曝露により生ずる気道過敏性発症に関与する責任遺伝子の同定を目的とし、網羅的遺伝子解析を行った。また、気道リモデリング形成における好酸球ならびにIL-5の意義を各種遺伝子改変マウスならびに中和抗体を用いて検討した。すなわち、能動的に感作したマウスに抗原を2回吸入させ、その4および24時間後に気管・気管支および肺実質を採取し、得られたcDNAをサンプルとした。これまでの検討より、本モデルにおける気道過敏性は、ステロイド処置により抑制され、また、抗IL-5中和抗体あるいはIL-5の全身的過剰発現では影響を受けないことを見出している。そこで、本研究ではこれらの処置を組み合わせ、生理食塩水吸入群に比し抗原曝露群において2倍以上発現が変動（亢進あるいは低下）し、かつ、抗IL-5抗体処置およびIL-5 transgenic (IL-5Tg) マウスにおいて2倍以上の変動が認められない遺伝子を、抗原曝露早期の4時間後および後期の24時間後で探索した。気道リモデリングモデルでは、能動的に感作したマウスに抗原を3週間連日吸入曝露し、気道内好酸球増多・TGF- $\beta$ 1産生・気道上皮における杯細胞の過増生・肺組織中ヒドロキシプロリン含量の定量・基底膜下の線維化について、IL-5受容体 $\alpha$ 鎖欠損マウス、IL-5 Tgマウスならびに抗IL-5抗体を用いて検討した。その結果、網羅的遺伝子解析においては、上述の条件を満たす遺伝子として、抗原曝露4時間後では発現増強遺伝子が2遺伝子、24時間後では発現低下遺伝子が5遺伝子検索された。今後、各個体レベルでの発現を再評価し、表現系との関連性について検討する必要があると思われる。また、気道リモデリングモデルを用いた検討では、抗原長期曝露によって観察される気道内好酸球増多、肺組織中ヒドロキシプロリン量の増加、気管支肺胞洗浄液(BALF)中TGF- $\beta$ 1量の増加、基底膜下の線維化は、いずれもIL-5受容体 $\alpha$ 鎖欠損マウスならびに抗IL-5中和抗体投与マウスではほとんど観察されず、IL-5 Tgマウスでは増悪が観察された。そこで、気道および肺組織の免疫染色を行ったところ、TGF- $\beta$ 1産生細胞は主として好酸球ならびに筋線維芽細胞であることが明らかとなった。今後、TGF- $\beta$ 1の役割を検討する必要があると思われる。

研究協力者

稲垣直樹（岐阜薬科大学薬理学教室・助教授）  
田中宏幸（岐阜薬科大学薬理学教室・助手）

A. 研究目的

気管支喘息は、呼気性呼吸困難、気道内好酸球を中心とする気道炎症ならびに気道反応性亢進、すなわち気道過敏性を特徴とする慢性閉塞性呼吸器疾患である。特に、気道過敏性の程度と重症度とは相関することが報告されていることから、

気道過敏性発症に関与する機能分子を同定することは、新規治療ターゲットの探索はもとより喘息の治療法においても重要である。昨年度、教室ではマウス抗原反復曝露により生ずる気道過敏性モデルを用いて、まず、抗原曝露により変動し、かつ、ステロイドによりその変動が抑制されている遺伝子を網羅的に解析した。その結果、抗原曝露4時間後ならびに24時間後において、それぞれ646ならびに661遺伝子が同定された。これまでに、本モデルにおける気道過敏性は、ステロ

イド処置により抑制され、また、抗 IL-5 中和抗体あるいは IL-5 の全身的過剰発現では影響を受けないことを見出している。そこで、本年度はこれら変動遺伝子の絞り込みを目的として、生理食塩水吸入群に比し抗原曝露群において2倍以上発現が変動(亢進あるいは低下)し、かつ、抗 IL-5 抗体処置および IL-5 transgenic (IL-5Tg) マウスにおいて2倍以上の変動が認められない遺伝子を、抗原曝露早期の4時間後および後期の24時間後で探索した。

また、近年、気管支喘息の難治化・重症化に気道リモデリングの関与が推察されている。すなわち、遷延化する気道炎症の結果、気道の組織学的再構築 (Airway Remodeling) が生じ、結果として気道内腔が狭小化し、気道抵抗が増大しているものと思われる。近年の様々な検討、特に組織学的・病理学的検討により、気管支喘息における気道リモデリングには、1) 気道上皮細胞のリモデリング (杯細胞の増生・肥厚)、2) 上皮下の線維化 (網状層および基底膜下の肥厚)、および3) 気道平滑筋の増生・肥厚などの変化が、主として報告されてきた。しかし、それぞれの器質的変化が症状とどの程度関連しているのか、あるいはどのような細胞や機能分子がそれぞれの変化に関与しているのかについては不明である。そこで教室では、遺伝的背景が明確で、かつ、種々の実験材料ならびに遺伝子改変動物も豊富なマウスを用いて抗原反復曝露による気道リモデリングモデルを作成し、その形成に関与する細胞および機能分子を検索するとともに、症状、特に気道過敏性との関連性について検討を行ってきた。その結果、本モデルにおける気道リモデリングは Th2 依存性であり、特に気道内好酸球数と基底膜下の線維化に有意な相関が観察されている。そこで、本研究では、IL-5 受容体 $\alpha$ 鎖欠損マウス、IL-5 Tg マウスならびに抗 IL-5 抗体を用いて、好酸球増多と気道リモデリング、特に基底膜下の線維化形成との関連性について検討した。

## B. 方法

### 1) マウス気道過敏性モデル

実験は、当教室のマウス気道過敏性モデルのプロトコールに従って行った。すなわち、雄性 BALB/c マウスを、抗原として卵白アルブミンおよび水酸化アルミニウムゲルを用いて2回免疫し、その後、抗原を2回反復吸入し反応を惹起した。最終抗原曝露4時間および24時間後に、ア

セチルコリンによる気道収縮反応を測定し、その直後に気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。遠心後、BAL 液中の炎症性細胞数は Diff-Quik 染色液により染色後、各分画ごとにカウントした。また、血清中の免疫グロブリン量は ELISA により定量した。一方、上述の時間に気管・気管支および肺実質を含むサンプルを採取し、DNA マイクロアレイにより、抗原曝露による変動遺伝子ならびに IL-5Tg マウスおよび抗 IL-5 抗体投与による変動遺伝子群を解析した。なお、抗 IL-5 抗体は、抗原曝露期間中10日間連日腹腔内投与した。

### 2) マウス気道リモデリングモデル

実験は、当教室のマウス気道リモデリングモデルのプロトコールに従って行った。すなわち、雌性 BALB/c マウスを、抗原として卵白アルブミンおよび水酸化アルミニウムゲルを用いて2回免疫し、その後、抗原を3週間連日曝露し反応を惹起した。また、本反応における IL-5 ならびに好酸球の意義を検討する目的で、IL-5 受容体 $\alpha$ 鎖欠損マウスならびに IL-5 Tg マウスを用いて、それぞれ野生型マウスの表現系と比較検討した。また、抗 IL-5 抗体を用いて、後天的な中和による影響を併せて検討した。なお、抗 IL-5 抗体は、抗原曝露期間中3週間連日腹腔内投与した。

## C. 結果

### 1) マウス気道過敏性モデル

最終抗原曝露4時間後では、アセチルコリンに対する気道反応性亢進、すなわち気道過敏性が認められたが、BALF 中の炎症性細胞数の増加は顕著ではなかった。一方、24時間後では、気道内好酸球増多ならびに気道過敏性が観察された。これに対し、ステロイドは、24時間後の気道内好酸球増多を抑制するとともに、いずれの場合においても気道過敏性を有意に抑制した。一方、IL-5 Tg マウスでは、気道内好酸球増多の有意な亢進が観察されたが、気道過敏性のさらなる亢進は観察されなかった。また、抗 IL-5 抗体は好酸球増多をほぼ完全に抑制したが、気道過敏性には影響を及ぼさなかった。そこで、昨年度検索した遺伝子群から、より気道過敏性に特異性の高い遺伝子群を検索することを目的とし、IL-5 Tg や抗 IL-5 抗体により変動しない遺伝子を抽出した。その結果、抗原曝露4時間後では発現増強遺伝子として2遺伝子、24時間後では発現低下遺伝子として5遺伝子検索された。

### 2) マウス気道リモデリングモデル

本モデルでは、抗原反復曝露によりアセチルコリンに対する気道過敏性、気道内好酸球増多、BAL液中 TGF- $\beta$ 1 量の増加、肺組織中ヒドロキシプロリン量の増加ならびに基底膜下の線維化が観察される。これに対し、IL-5 受容体 $\alpha$ 鎖欠損マウスでは、いずれも有意な低下が観察された。一方、IL-5 Tg マウスでは気道過敏性を除き、いずれのパラメーターも有意な亢進が観察された。さらに、抗 IL-5 抗体を抗原曝露期間中に投与することにより、気道過敏性を除き、いずれのパラメーターも有意な抑制が観察された。そこで、線維化反応に重要な因子である TGF- $\beta$ 1 の産生細胞を免疫染色により同定したところ、抗原曝露初期では好酸球が、曝露期間後期では $\alpha$ -smooth muscle actin 陽性の筋線維芽細胞がそれぞれ主たる産生細胞であることが明らかとなった。

#### D. 考察

本研究では、昨年度の成績を踏まえ、気道過敏性発症に関与する遺伝子をさらに検索する目的で、IL-5 Tg マウスならびに抗 IL-5 抗体を用いて、遺伝子群の絞り込みを行った。その結果、発現変動遺伝子として7つの遺伝子が確認された。今後、各個体レベルでの発現を再評価し、表現系との関連性を検討する必要があると思われる。

一方、気道リモデリング、特に基底膜下の線維化形成における好酸球の意義を遺伝子改変マウスならびに中和抗体を用いて検討した結果、好酸球は TGF- $\beta$ 1 産生を介しアレルギー反応による線維化に重要な役割を有することが明らかとなった。TGF- $\beta$ 1 は、これまでにも種々の臓器における線維化に重要なサイトカインであることが知られているが、一方で抗炎症作用が知られている。従って、今後、TGF- $\beta$ 1 の中和による影響を検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

昨年度に引き続き、マウス喘息モデルを用いた気道過敏性発症に関与する遺伝子群をスクリーニングした結果、気道過敏性に特異的な遺伝子として、抗原曝露4時間後ならびに24時間後において、計7つの遺伝子が同定された。また、マウス気道リモデリングモデルを用いた検討から、アレルギー反応によって生ずる基底膜下の線維化には好酸球が重要な役割を有することが明らかとなった。

F. 健康危惧情報  
特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

- 1) 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.
- 2) 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.

##### 2. 学会発表

- 1) 田中宏幸、永井博式：気道リモデリング治療の分子標的。第54回日本アレルギー学会総会シンポジウム10（2004年11月、横浜）
- 2) 稲垣直樹、田中宏幸、永井博式：モルモットおよびマウスを用いた気道過敏性の評価。第54回日本アレルギー学会総会 イブニングシンポジウム12（2004年11月、横浜）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

## 気道炎症遷延化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

国立病院機構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。治療に抵抗する慢性炎症において最も主要なエフェクター細胞は好酸球であるが、本研究ではその新しい機能を解明し、新規治療薬開発のための基礎的知見を確立することをめざした。まず、好酸球の炎症組織への集積機構に関しては、昨年度までに明らかにした好酸球のヒスタミン受容体の機能についてさらに詳細に解明した。好酸球は4種のヒスタミン受容体のうちH2とH4受容体を高発現するが、両者は拮抗する作用を持ち、H2阻害下において好酸球はH4受容体を介する活性酸素産生が誘導されるとともに、ヒスタミンによる遊走活性も著明に増強されることを観察した。次に、好酸球の新たなエフェクター機能として、好酸球がダニ抗原に直接反応して、IL-9を産生することを明らかにした。IL-9はTh2サイトカインの一種で気道過敏性、粘液過分泌など重症喘息の病態に深く関与することが知られているが、好酸球がアレルゲンを直接認識することにより、このTh2免疫反応を増強する作用を持つのである。本研究で明らかにされたヒスタミンH4受容体、IL-9は今後の重症喘息の新しい治療ターゲットとしてきわめて重要であると考えられる。

### 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ある。その結果もたらされる組織破壊と修復機構の破綻によって非可逆的变化である気道リモデリングなどが生じ、治療抵抗性となると考えられる。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ヒスタミン受容体の機能を昨年度に引き続いてさらに詳細に明らかにするとともに、好酸球がアレルゲンに直接反応しサイトカインを産生することも見いだして、今後の治療ターゲット設定の基礎づくりを行った。

### 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。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。活性酸素産生はチトクローム還元法によって定量した。ケモタキシスはChemotaxicel™を用いて検討した。

好酸球をlipopolysaccharideおよびHouse dust mite抽出物(HDM)により刺激して、16-40時間後RNAを抽出、前述の定量的PCR法によって、12種類のサイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, TGF-β)発現を測定した。IL-9タンパク量は特異的ELISA法により定量した。一部の実験ではHDMをProtease阻害薬で処理したのちに好酸球と反応させてIL-9発現を定量した。

### C. 研究結果

好酸球のヒスタミン受容体発現を定量したところ、H2とH4の発現が高いことが明らかとなった(図1)。ヒスタミン受容体はG蛋白共役受容体ファミリーに属するが、H2はG $\alpha$ 、H4はG $i$ と共役する。一般的にこれらは互いに拮抗する作用を持つことが知られているので、好酸球においてH2とH4作用の相互関係を解析した。

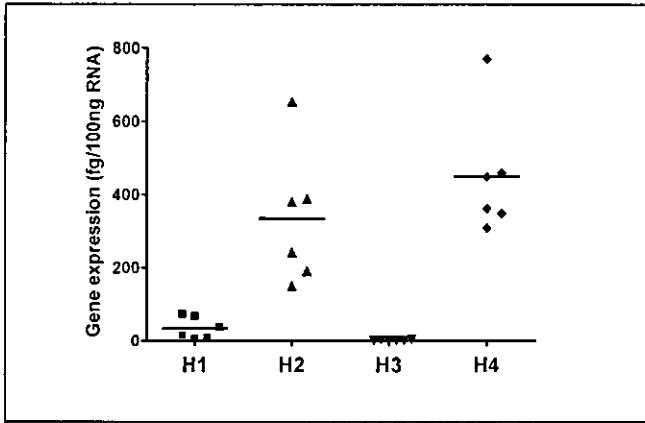


図1 好酸球によるヒスタミン受容体発現

まず、活性酸素産生能について検討したところ、ヒスタミン単独では好酸球の活性酸素産生を誘導しなかったが、H2阻害薬であるFamotidineで好酸球を前処理したところ、有意な活性酸素産生が誘導された(図2)。

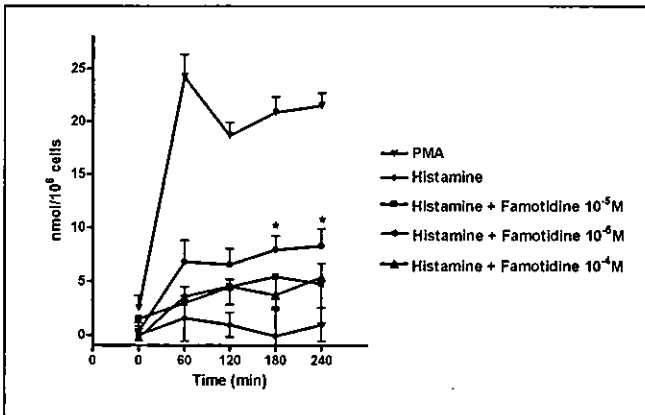


図2 H2阻害下のヒスタミンによる好酸球活性酸素産生

またこの反応はH4受容体阻害薬であるThioperamideによって抑制された(図3)。

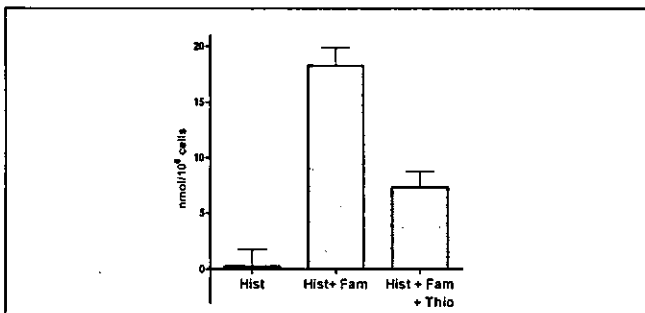


図3 H2阻害下のヒスタミン誘導活性酸素産生はH4阻害で抑制

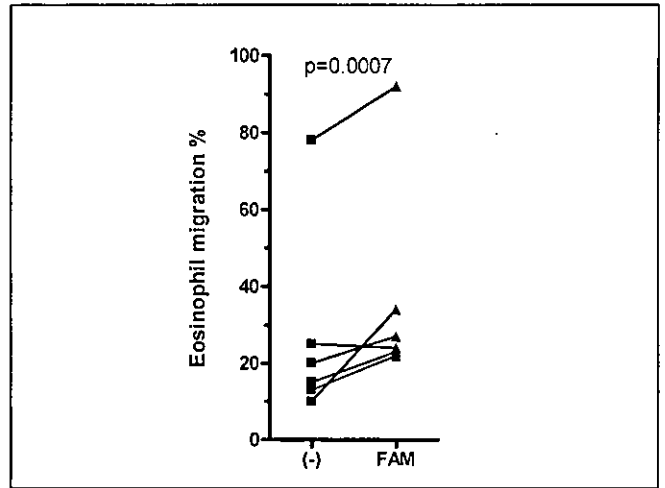


図4 ヒスタミンによる遊走はFamotidine存在下で増強される

さらにFamotidineによるH2阻害はヒスタミンによる好酸球遊走も増強した(図4)。以上より、H2とH4は拮抗的に作用し、H2阻害がH4による好酸球のエフェクター機能を増強する可能性が考えられた。

次に、好酸球が抗原に直接反応して、サイトカイン産生を行うことができるか検討した。抗原刺激としては、細菌由来のLipopolysaccharide(LPS)とアレルギーであるHouse dust mite抽出物(HDM)を用いた。12種のサイトカイン発現をスクリーニングしたところ、16時間刺激では著しく発現が増強されるサイトカインはなかったが、40時間刺激でIL-9遺伝子発現の著しい増強が認められた(図5)。

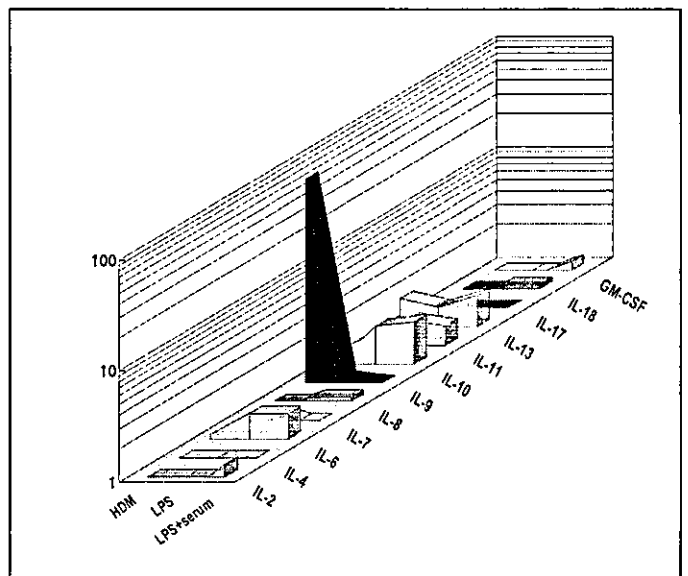


図4 抗原刺激による好酸球のサイトカイン遺伝子発現

この IL-9 産生は蛋白についても ELISA 法により測定して確認した。

そこで好酸球による抗原刺激 IL-9 産生メカニズムを明らかにするため、IgE の関与と Protease-activated receptor (PAR) の関与を検討した。まず、HDM による好酸球からの IL-9 発現は好酸球ドナーの HDM に対する IgE 抗体の有無には無関係であった。次に、HDM は蛋白分解酵素でもあるため、Protease 阻害薬で HDM を処理した後の反応を調べたところ、cysteine protease 阻害薬では変化がみられなかったが、serine protease 阻害薬である AEBSF 処理により IL-9 発現が完全に抑制された (図 5)。Serine protease は PAR2 のリガンドであり、好酸球は PAR2 を介して HDM と反応する可能性が考えられた。

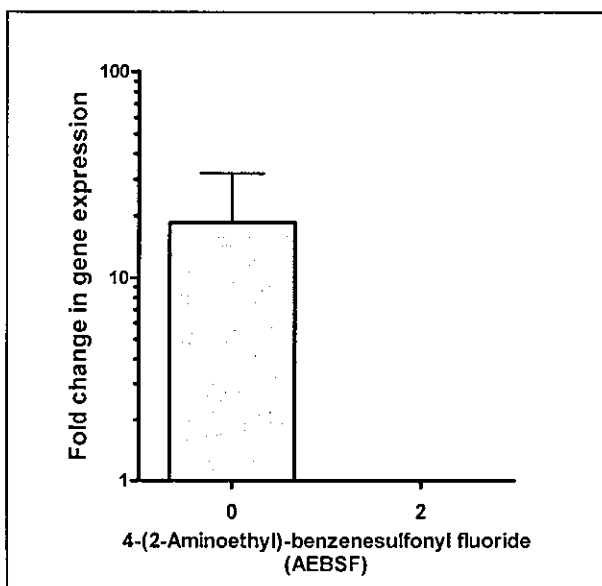


図 5 Serine protease 阻害による HDM 誘導 IL-9 産生の抑制

#### D. 考察

本年度の研究においては、第一に好酸球に発現するヒスタミン受容体 H4 と H2 の拮抗的關係を明らかにした。ヒスタミンによる好酸球のエフェクター機能誘導は H4 受容体を介することが確認されたが、H2 を介する刺激がこれを調節している可能性がある。一方、我々はケモカインの CCL16 (MEC) が H4 受容体に結合して好酸球の遊走を引き起こすこと、さらに CCL16 が血清中に多量に存在して、骨髄からの好酸球動員に関与している可能性についても別

に報告している<sup>1)</sup>。現在、アレルギー疾患に用いられる抗ヒスタミン薬は H1 拮抗薬のみであるが、今後、H4 特異的阻害薬が開発されるならば、好酸球炎症抑制の有効な治療薬となる可能性が期待できる。

次に、多くの喘息患者が感作される HDM アレルゲンに対して好酸球が直接反応して多量の IL-9 を産生することも明らかにした。この反応は PAR2 を介するものである可能性が示されたが、PAR2 は酵素リガンドに対しての好酸球上の主要な受容体であり、PAR2 リガンドの serine protease は HDM に多量に含まれることがよく知られている。これまでは好酸球は抗原と直接反応するのではなく、抗原刺激時に活性化されたリンパ球や肥満細胞からのサイトカインによって機能を発現する終末エフェクター細胞とされていたが、今回の知見は好酸球が第一線の細胞として抗原を認識して、局所においては免疫反応のコンダクターとしての機能も有することが想定された。この機構に対する有効な介入方法の開発も新しい治療薬の発見につながるものと考えられる。

#### E. 結論

難治性喘息の特徴である好酸球性炎症の成立機序を明らかにする過程で、H4 受容体を介する好酸球の新たな機能と好酸球が直接ダニ抗原と反応して IL-9 を産生することを見いだした

本研究で明らかとなった分子群はいずれも難治性喘息の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) 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.
- 2) 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
- 3) 藤澤隆夫: 好酸球研究の最前線. 医学のあゆみ 208(8), 697-701, 2004

- 4) 藤澤隆夫：好酸球の細胞生物学、その他の炎症細胞の細胞生物学 p104-115, 総合アレルギー学 福田健 編、南山堂、東京、2004
- 5) 藤澤隆夫：吸入ステロイドは喘息を治癒させるか？ 日本小児アレルギー学会誌 18:131-136, 2004
- 6) 藤澤隆夫：ゲノム情報とアレルギーの病態解析. 日本小児アレルギー学会誌 18:145-150, 2004
- 7) 増田佐和子、藤澤隆夫：スギ花粉飛散が気管支喘息の呼吸抵抗、気道過敏性を与える影響. アレルギー科 17:36-42, 2004
- 8) 井口光正、藤澤隆夫、熱田純、神谷齊：小児慢性喘息が成人期にキャリアオーバーした患者の臨床経過. アレルギーの臨床 24:320-323, 2004
- 9) 藤澤隆夫：好酸球学の最近のトピックス アレルギーの臨床 24(10):760-765, 2004
- 10) 藤澤隆夫：アレルギー性炎症における好酸球の役割-善玉説と悪玉説の検証 感染・炎症・免疫 34:182-191, 2004
- 11) 藤澤隆夫、中山隆志、平井浩一、義江修：好酸球のヒスタミン受容体-ヒスタミンの新しい役割について アレルギー科 18(4):337-346, 2004
- 本アレルギー学会春期臨床大会. 前橋市 2004年5月12-14日 アレルギー-53:214, 2004.
- 4) 加藤佳子、勝又元、西森久史、熱田純、井口光正、藤澤隆夫. LTD4による好酸球からのTGF- $\beta$ 産生について. 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会. 前橋市 2004年5月12-14日 アレルギー-53:298, 2004.
- 5) 加藤佳子、藤澤隆夫. イブニングシンポジウム「好酸球は悪玉か？善玉か？」 免疫調節細胞としての好酸球. 第54回日本アレルギー学会総会. 横浜市 2004年11月4-6日 アレルギー-53:849, 2004

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 (国立病院機構三重病院臨床研究部)

2. 学会発表

- 1) Y. Kato, T. Fujisawa, H. Kamiya, O. Yoshie. Autocrine Activation of Eosinophil Transmigration With Cyteinyl Leukotrienes 60<sup>th</sup> Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2004. 3. 21 San Francisco, USA J Allergy Clin Immunol 113:s166, 2004
- 2) 藤澤隆夫 「イブニングシンポジウム 小児気管支喘息の特徴とその治療・管理」 新しい治療の試み. 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会. 前橋市 2004年5月12-14日 アレルギー-53:253, 2004.
- 3) 藤澤隆夫 「シンポジウム 好酸球、肥満細胞の Cross talk とアレルギー発症」 好酸球性炎症におよぼす肥満細胞の役割. 第16回日

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 (国立病院機構福岡病院 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。本研究では下気道にあたる気管支の平滑筋を肥厚させる要因として平滑筋細胞の遊走を考え、気道に存在する多様な因子に対する平滑筋細胞の遊走作用を解析することにより、気道リモデリングにおける平滑筋肥厚への新たな治療標的の同定を試みている。本年度は気管支平滑筋細胞自身により産生・放出される気管支平滑筋細胞遊走因子の同定を行い、これがフィブロネクチンであることを確認した。さらに分担研究者は、気管支平滑筋細胞より産生・放出されるプロテアーゼとしてMMP-2が含まれることを明らかにした。以上の結果より、喘息患者の気管支において、気管支平滑筋細胞がフィブロネクチンと共にMMP-2等のプロテアーゼを産生・放出することにより、平滑筋から結合組織へと遊走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大学院生)  
岡元 孝二 (同上 教授)

A. 研究目的

気管支喘息患者の気道粘膜に生じる組織の構造変化である「気道のリモデリング」は、組織が傷害から修復へ向かう過程での1つの病態である。気道の修復やリモデリングに伴い、平滑筋細胞を含む気道の構成細胞は活性化され傷害部位に遊走し、増殖しながら細胞外マトリックス、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平滑筋から結合組織への遊走に起因し、さらにその遊走因子が平滑筋細胞自身により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、気管支におけるリモデリングを想定して気管支平滑筋細胞の遊走解析を続けている。研究の結果、一昨年度、気管支平滑筋細胞が気管支平滑筋細胞自身に対する遊走因子を産生・放出すること、ラミニン、フィブロネクチン及びI型コラーゲンが気管支平滑筋細胞遊走因子として作用することを示した。更に昨年度は、気管支平滑筋細胞自身が少なくとも120、58及び54kDaの分子量を持つ3種類のゼラチナーゼを産生・放出することを確認した。そこで本年度では、気管支平滑筋細胞

が産生・放出する気管支平滑筋細胞遊走因子及びプロテアーゼの同定を試みた。

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(クロネティクス社より購入)である。遊走実験の標的細胞には、サブコンフルエントにまで培養したこの気管支平滑筋細胞を0.025%トリプシン/0.01%EDTAで回収し、細胞濃度を $1 \times 10^6$  cells/mlに調節したものを使用した。細胞培養上清には、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%CO<sub>2</sub>条件下でインキュベート後採取した培養液を使用した。

気管支平滑筋細胞培養上清に含まれるプロテアーゼ及び細胞外マトリックスを同定する為、各種MMP抗体及び細胞外マトリックス抗体を用いて気管支平滑筋細胞培養上清のウエスタンブロッティングを行った。

更にウエスタンブロッティングにて気管支平滑筋細胞培養上清に含まれることが確認された細胞外マトリックスが気管支平滑筋細胞遊走因子として作用しているか否か、細胞外マトリックス抗体を用いた気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性測定により検討した。遊走活性測定



は48穴ボイデンチャンパーを用いて行った。チャンパーの下室に遊走活性を測定する気管支平滑筋細胞培養上清、上室には標的細胞である気管支平滑筋細胞の浮遊液を入れ、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で6時間インキュベートした。チャンパー下室に添加した上清には、予め細胞外マトリックスのポリクローナル抗体を添加し、1時間37°Cにてインキュベートしたものを使用した。このインキュベートが終了した後、遊走膜の下室側に遊走した細胞のみを Diff-Quik で染色した。この染色細胞を倍率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。そして気管支平滑筋細胞培養上清に細胞外マトリックス抗体を添加することにより、本上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走が抑制されるか否かを検討した。

### C. 結果

各々の抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果より、気管支平滑筋細胞培養上清にはフィブロネクチン及びMMP-2が存在していることが示された (Fig.1)。更に抗フィブロネクチン抗体を用いた遊走実験より、気管支平滑筋細胞は気管支平滑筋細胞自身より産生・放出されたフィブロネクチンに対して遊走することが *in vitro* にて確認された (Fig.2)。

### 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, Airway Remodeling, 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。病態形成に平滑筋細胞の遊走及び増殖が関与することは、気管支喘息以外の疾患においても報告がなされている。アテローム性動脈硬化症はその一例で、その初期病変である内膜肥厚の主因が血管中膜平滑筋細胞の遊走及び増殖であるとする Ross の傷害反応仮説は現在広く受け入れられている (Ross R, N. Engl. J. Med., 340, 115-126, 1999)。動脈は内膜、中膜及び外膜の三層で構成されており、平滑筋細胞は通常はその中膜のみに存在しているが、動脈硬化巣では内膜にも認められる。血管平滑筋細胞と気管支平滑筋細胞との差異は細胞近傍の細胞外マトリックス量であると考えられる。血管中膜には平滑筋細胞のみならずエラスチンも豊富に存在する。一方、気管支平滑筋には血管中膜程細胞外マトリックスが存在しておらず、平滑筋細胞同士が強固に結合していることが予想される。しかしながら細胞間結合が強固で

ある上皮細胞も創傷治癒過程にて遊走することが報告されていることより、気管支平滑筋細胞も *in vivo* にて遊走する可能性があると考えた。

本年度の研究により気管支平滑筋細胞培養上清にフィブロネクチンが含まれ、これが気管支平滑筋細胞に対する遊走因子として作用することが明らかになった。気管支平滑筋細胞培養上清にはMMP-2も含まれていることから、*in vivo* においても気管支平滑筋細胞がフィブロネクチン及びMMP-2を産生・放出して平滑筋から結合組織へと遊走する可能性が示唆された。この平滑筋から結合組織への平滑筋細胞の遊走は、気道リモデリングにおける平滑筋の肥厚に寄与しているかもしれない。

### E. 結論

気管支平滑筋細胞培養上清にはMMP-2及びフィブロネクチンが含まれる。本上清中のフィブロネクチンは気管支平滑筋細胞に対する遊走因子として作用することから、*in vivo* において気管支平滑筋細胞はフィブロネクチン及びMMP-2を産生・放出し平滑筋から結合組織へと遊走する可能性が示された。

### F. 研究発表

1. 論文発表      なし
2. 学会発表
  - 1) The chemotactic migration of airway smooth muscle cells toward the extracellular matrix components and its role in airway remodeling  
American Thoracic Society 100th International Conference  
2004年5月
  - 2) 気管支喘息の気道リモデリングにおける気管支平滑筋細胞のオートクライン機序による遊走とフィブロネクチン及びMMP-2の関与  
第25回日本炎症・再生医学会  
2004年7月
  - 3) Involvement of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell migration induced airway remodeling  
第77回日本生化学会大会  
2004年10月

### 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

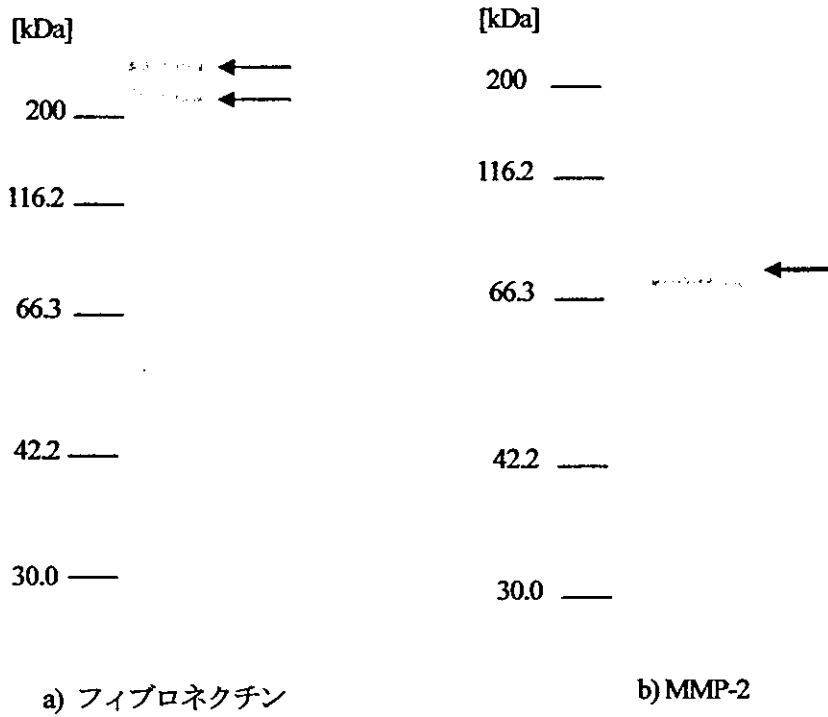


Fig.1 抗フィブロネクチン抗体及び抗MMP-2抗体を用いた  
気管支平滑筋細胞培養上清のウエスタンブロッティング

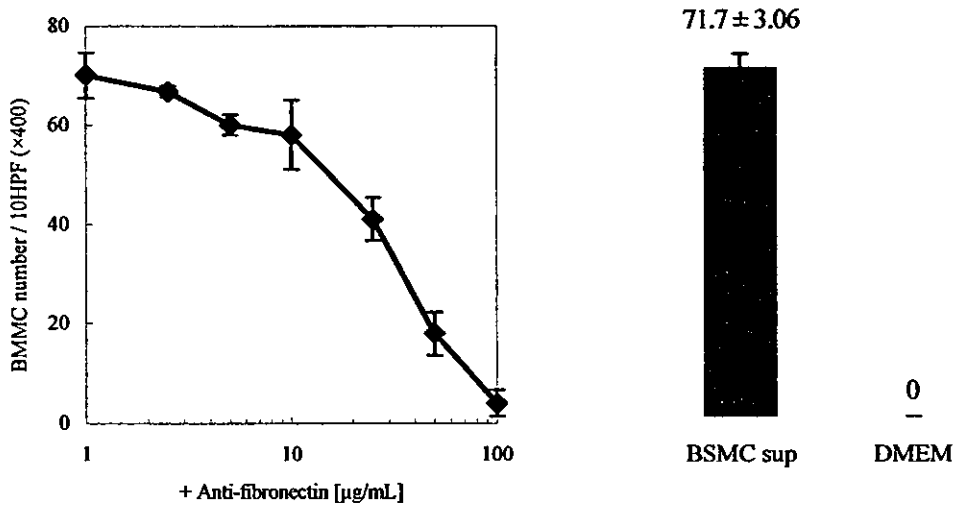


Fig.2 抗フィブロネクチン抗体を添加した気管支平滑筋細胞培養上清に対する  
気管支平滑筋細胞の遊走

## 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

分担研究者 柳原行義

所属機関 国立病院機構相模原病院臨床研究センター遺伝子診断・治療研究室長

研究要旨：本研究では、喘息の増悪因子であるウイルス感染について、気道平滑筋細胞におけるTLRファミリーの発現とその機能を中心に検討した。気道平滑筋細胞（TLR3<sup>+</sup>7<sup>-</sup>8<sup>-</sup>）をdsRNAで刺激すると、HR、CysLTRおよびMRサブタイプのうち、M2Rの発現低下とM3Rの発現増強が誘導されたが、いずれの調節作用もクロロキンの前処置によって解除された。また、発現増強されたM3Rが機能的であることについては、AChによる細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルのさらなる増強作用から確認できた。さらに、各種阻害剤を用いた結果から、M3Rの発現増強にはp38 MAPKやPI3Kが関与していると考えられた。一方、TLR3の発現はdsRNAのみならず、IFN-αやIFN-γによっても増強されたが、両IFNsにはM3Rの発現増強作用は認められなかった。しかし、IFN-αやIFN-γを前処置した細胞ではdsRNAによるM3Rの発現増強はさらに強く誘導されたが、dsRNA依存性PKRの活性化はIFN-αを前処置した場合にのみ認められた。以上の結果から、ウイルス由来のdsRNAはM2Rの発現低下とM3Rの発現増強を誘導することによって気道反応性の亢進に関与していると考えられた。

### A. 研究目的

気管支喘息の重要な病態の一つとして、メディエーターなどの非特異的刺激に対する気道反応性の亢進があげられる。また、喘息の増悪因子としてはウイルス感染が関与している。本研究では、気道平滑筋細胞を用いて病原微生物の構成成分をパターン認識するToll様受容体（TLR）ファミリーの発現を解析すると共に、TLRリガンドによるヒスタミン受容体（HR）、システニルロイコトリエン受容体（CysLTR）およびムスカリン受容体（MR）の各サブタイプの発現調節作用についても検討した。

### B. 方法

TLR、HR、CysLTRおよびMRのmRNA発現はRT-PCRやreal-time PCR、これらのタンパク発現はFACSやWestern blot、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度はFluoroskan、サイトカインはELISAでそれぞれ測定した。また、PKRの活性化はin vitro kinase assayで測定した。

### C. 結果

気道平滑筋細胞にはウイルス由来のdsRNAを認識するTLR3は発現されていたが、ssRNAを認識するTLR7と8は検出されなかった。また、HR、CysLTRおよびMRのサブタイプに関しては、H3Rを除いて、すべてのサブタイプが発現されていた。気道平滑筋細胞のTLR3をdsRNAで刺激すると、M2Rの発現低下とM3Rの発現増強が誘導されたが、いずれの調節作用もクロロキンの前処置によって解除された。また、dsRNAで刺激した細胞では無刺激細胞に比べてAChによる細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルの上昇はさらに増強された。この増強作用がM3Rに特異的であることについては、M3Rアンタゴニスト（4-DAMP）を用いた結果から確認できた。また、dsRNAによるM3Rの発現増強はdexamethasoneのみならず、p38 MAPK阻害剤（SB203580）やPI3K阻害剤（LY294002）によっても抑制された。しかし、MEK阻害剤（PD98059）には抑制作用は認められなかった。一方、TLR3の発現もdsRNAの刺激によって

増強され、またIFN- $\gamma$ はIFN- $\alpha$ に比べて顕著な増強作用を示した。しかし、dsRNA刺激した細胞の上清中にはIFN- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ のいずれも検出されなかった。IFN- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ の単独刺激ではM3Rの発現は増強されなかったが、IFN- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ を前処置した細胞では無処置細胞に比べてdsRNAによるTLR3とM3Rの発現増強はさらに強く誘導された。しかし、dsRNA依存性PKRの活性化はIFN- $\alpha$ を前処置した細胞においてのみ検出された。

#### D. 考察

気道平滑筋細胞に発現されているTLR3をリガンドのdsRNAで刺激すると、HR、CysLTRおよびMRサブタイプのうち、M2Rの発現低下とM3Rの発現増強が誘導された。このようなdsRNAによるM2RとM3Rの発現調節にエンドソームの酸性化が関与していることは、クロロキンをを用いた結果から明らかである。また、発現増強されたM3Rの機能や特異性に関しては、AChによる細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルのさらなる増加やM3Rアンタゴニストによる抑制作用などからも確認できた。さらに、各種阻害剤を用いた結果から、dsRNAによるM3Rの発現増強にはp38 MAPKやPI3Kの活性化が関与していると考えられた。

一方、dsRNA刺激した細胞ではM3Rに加えて、TLR3の発現も増強され、またIFN- $\gamma$ はIFN- $\alpha$ に比べてTLR3の発現を著しく増強した。しかし、dsRNAはIFN- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ のいずれの産生も誘導しないので、dsRNAによるTLR3の発現増強にはIFN- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ のオートクリン産生は関与していない。また、IFN- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ を前処置した細胞をdsRNAで刺激すると、TLR3とM3Rの発現はさらに増強されたが、dsRNA依存性PKRの活性化はIFN- $\alpha$ を前処置した場合においてのみ認められた。IFN- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ はM3Rの発現を増強しないので、dsRNAによるM3Rの発現増強にはPKRは関与していないと推察される。したがって、ウイルス感染によるI/II型IFNのバラクリン産生は気道平滑筋細胞におけるTLR3の発現を増強することによってdsRNAによるM3Rのさらなる発現増強に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

気道平滑筋細胞にはウイルス由来のdsRNAを認識するTLR3が発現されていた。また、dsRNAの刺激によってM2Rの発現低下とM3Rの発現増強が誘導されたので、このような様式でウイルス感染は気道反応性の亢進に関与していると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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- $\gamma$  in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J. Invest. Dermatol.* 122, 20-28, 2004.
- 2) 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.
- 3) 柳原行義: IgE産生の調節機構. *分子呼吸器病* 8, 177-184, 2004.
- 4) 柳原行義: IgE産生の分子調節機構. *日本内科学雑誌* 93, 2649-2655, 2004.
- 5) 梶原景一、森嶋大貴、柳原行義: B<sub>L</sub>Y<sub>S</sub>と免疫グロブリンのクラススイッチ. *臨床免疫* 41, 643-648, 2004.
- 6) 柳原行義: IgE産生とアレルギー性炎症. *喘息* 17, 2-6, 2004.
- 7) 梶原景一、柳原行義: IgE産生のメカニズム. *喘息* 17, 21-25, 2004.
- 8) 柳原行義: IgE抗体産生の調節. *総合アレルギー学* pp.81-87, 2004.
- 9) 梶原景一、羅 智靖、柳原行義: 可溶性Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ と抗IgE抗体のIgE産生抑制機序. *臨床免疫* 41, 219-222, 2004.
- 10) 柳原行義: アレルギーと感染—hygiene hypothesisを含めて. *小児アレルギー学会誌* 18, 14-18, 2004.