

## 気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究

所 属 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部  
研究者 松本健治

研究要旨 気道上皮細胞を用いた網羅的な遺伝子の発現解析系を確立し、炎症病態が惹起する組織の繊維化の機序に関する検討を行った。また気管支喘息患者の非発作時の末梢気道閉塞を検討し、小児においてもリモデリングの様な拘束性傷害が存在することを明らかとした。

### 分担研究者

- (1) 理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター アレルギー遺伝子研究ユニット 斎藤博久
- (2) 日研化学株式会社医薬研究所 山名研司郎
- (3) 第一サントリー生物医学研究所 福田好晃

### A. 研究目的

近年、罹患率が増加している気管支喘息の病態の根本はアレルギー性炎症反応と呼ばれており、遷延化したアレルギー性炎症反応は組織の非可逆的な変化（リモデリング）を惹起する。リモデリングには気道粘液腺の過形成や気道上皮基底膜の肥厚、気道平滑筋細胞の過形成や肥大、気道粘膜下組織の繊維化などの多くの要素が含まれるが厳密な定義はない。重症化した気管支喘息の長期的な予後や生命予後に最も相関するのは気道のリモデリングであると考えられているが、現在までにリモデリングの臨床的な判定方法は気道の生検という非常に侵襲的な検査以外にない。一方、慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者数も年々増加傾向にあり、2000年現在で推計22万人、疫学的には潜在患者も含めて530万人といわれている。その発症には喫煙や公害、感染、遺伝など様々な因子が関与することが報告されているが、その発症機序や病態には不明な点が多く残されている。COPDの病理学的な特徴は、気管支喘息のリモデリングと同じく、高度の慢性炎症像と非可逆性の肺組織の繊維化などである。アレルギー性炎症反応の形成には好酸球やマスト細胞、好塩基球の活性化が、リモデリングやCOPDの病態には気道上皮細胞や繊維芽細胞、気道平滑筋細胞の活性化が重要な役割を演じていると考えられている。本研究では網羅的な遺伝子の発現解析に基づきこれらの細胞の活性化や機能に特異的で他の細胞群に発現していない分子群やシグナル伝達経路などを検索して、一分子ごとの検証ではなく、組織全体、細胞全体のシステムとして理解した上で、その分子群を制御することによって他の細胞に影響を与えることなく（安全な）これらの細胞の生存や機能を制御するようなアレルギー疾患の治療法を開発することを最終目標とする。さらに本研究では、患者からの生検組織や実験モデル動物からの組織などの網羅的な遺伝子発現解

析を通じて、リモデリングやCOPDの重症度を臨床的に判定する分子マーカーの検索を行い、それらを元にした新しい臨床評価方法の開発を行うことも目標とする。

初年度である本年度の研究目的は1. 気管支喘息およびCOPDの*in vitro model*を用いての病態関連遺伝子の探索、2. 臨床的な気管支喘息のリモデリングのマーカーの検索（主任担当）、3. マスト細胞特異的リモデリング関連分子の探索（理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター担当）、4. マウス好中急性炎症モデルの確立とその遺伝子発現の網羅的な解析（日研化学株式会社医薬研究所担当）および5. 好酸球性浸潤モデルの確立とマウス好酸球単離法の確立（第一サントリー生物医学研究所担当）である。

### B. 研究方法

1. 気道上皮細胞株 BEAS-2B を TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  もしくは IL-4 で刺激し、6時間培養後の遺伝子発現を網羅的に解析した。また、この系に Dexamethasone を添加して影響を解析した。
2. 小児気管支喘息患者の非発作時の末梢気道閉塞に関与する因子について呼吸機能検査を行い、治療歴や経過との関係について検討を行った。
3. 培養マスト細胞を IgE で感作後抗 IgE 抗体で刺激し、遺伝子発現を網羅的に解析した。また、この系に Dexamethasone を添加して影響を解析した。またこうして見いだされた分子の機能について *in vitro* および気管支喘息患者肺生検組織を用いて行った。
4. 6週令の雌 BALB/c マウスに LPS 吸入慢性好中球性炎症モデルを作成、マウス肺における網羅的な遺伝子の発現量解析を行った。
5. BALB/C マウス（雌性、8-10週齢）をブタクサ花粉抽出液で感作後、同抗原の腹腔内投与を行い、マウス好酸球浸潤を誘導する系を確立した。こうして誘導された細胞分画に含まれる好酸球を抗 Thy1.2 抗体と抗 B220 抗体を用いた MACS の *negative selection* と抗 CCR3 抗体を用いた FACS sorting により純化を試みた。

### C. 研究結果

1. IL-4、IFN- $\gamma$  いずれの刺激においても異なった種類の好中球遊走性の Chemokine が誘導され、

IFN 刺激では Th1 細胞遊走性の Chemokine の産生が強く認められた。IFN- $\gamma$  刺激時の Chemokine の産生は Dexamethasone では部分的な抑制しか認められなかった。また IL-4 刺激でより強い Metalloproteinase (MMP) 9 や MMP14 の産生が認められ、Dexamethasone はこれらの MMP の誘導を部分的に抑制した。

2. 大発作回数と末梢気道閉塞を反映する %V25 (努力肺活量の 25% 点での流速) は全体では有意な相関を認めなかった。しかし、大発作回数が 10 回以上であるのに %V25 が 90% を越える群 (H 群 6 名) と大発作回数に伴い %V25 が 70% を下回る群 (L 群 14 名) が認められた。H 群と L 群では年齢、性別、最終発作からの日数、吸入ステロイドや抗ロイコトリエン剤の使用の有無、家庭内喫煙の有無や Peek Flow には差は認められなかったが、L 群は H 群に比して %FVC が有意に小さく、一秒率 (%FEV1.0) や最大中間呼吸速度 (MMF) も有意に低値であった。

3. LPS 慢性暴露モデルの肺から RNA を抽出後、遺伝子の発現量を GeneChip を用いて定量し、疾患モデル動物の肺において変動のあった遺伝子を抽出した。Sham 群と比較解析した結果、LPS 慢性暴露により 2 倍以上誘導を受けた遺伝子として 214 genes (270 probe sets) が抽出された。誘導を受けた遺伝子の中にはヒト COPD の患者の肺組織もしくは BALF 中で誘導を受けていることが報告されているケモカイン、プロテアーゼだけでなく、CD 分子、補体、レクチン関連、immunoglobulin 関連、cytoskeleton 関連、転写・複製関連、免疫関連、トランスポーター関連、接着関連及び代謝酵素関連の遺伝子など多彩な遺伝子が存在していることが明らかとなった。

4. ブタクサ花粉抽出液で感作後、同抗原の腹腔内投与を行い、マウス好酸球浸潤の系が確立した。また抗 Thy1.2 および B220 抗体を用いた MACS ビーズ法と CCR3 抗体を用いた FACS sorting により、99% 以上の純度の好酸球が得られ、マウス好酸球の単離法が確立した。

(倫理面への配慮)

1. 臍帯血由来造血幹細胞と成人末梢血由来造血幹細胞の採取、および気管支生検に関しては「臨床試験に関する倫理指針 (平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)」に従い、各医療機関の倫理委員会の許可を得たのち、ボランティア及び患者から文書によるインフォームドコンセントを取得して行われた。倫理的な問題はなかった。

2. 次年度以降も同様に「臨床試験に関する倫理指針 (平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)」を遵守する。

#### D. 考察

1. 気道上皮細胞は Th1 型の炎症反応 (たとえば COPD や Sarcoidosis) と Th2 型の炎症反応 (気管支喘息) で異なった Chemokine や MMP を産生して病態に関与し、ステロイドはこれらの一部を抑制して薬効を発揮する可能性が示唆された。

2. 発作の反復に伴い拘束性の傷害に至る患者群

が小児においても存在する可能性が明らかとなった。また、非発作時の気管支喘息患者の %V25 (努力肺活量の 25% 点での流速) はリモデリングの臨床的なマーカーとして有用である可能性が示唆され、今後の更なる検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

気道上皮細胞株や培養マスト細胞を用いた網羅的な遺伝子発現解析の系や in vitro での好中球性炎症モデル、好酸球浸潤モデルなどを確立した。網羅的な遺伝子発現解析は細胞の活性化や機能に特異的で他の細胞群に発現していない分子群やシグナル伝達経路などを検索して、一分子ごとの検証ではなく、組織全体、細胞全体のシステムとして理解する上で重要な手法となることが強く示唆された。今年度のこれらの成果は当初予定していた本研究の達成目標を満たしており、次年度以降の更なる成果が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yoshikawa M, Nakajima T, Matsumoto K, Okada N, Tsukidate T, Iida M, Otori N, Haruna S, Moriyama H, Imai T, Saito H: TNF-alpha and IL-4 regulate expression of fractalkine (CX3CL1) as a membrane-anchored proadhesive protein and soluble chemotactic peptide on human fibroblasts. *FEBS Lett* 2004;561:105-110.

2. Ogawa K, Itoh M, Miyagawa M, Nagasu T, Sugita Y, Katsunuma T, Akasawa A, Matsumoto K, Tsujimoto G, Saito H, Hashida R: Expression of a human SOCS protein, HSOC1-1, in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;134 Suppl 1:2-6.

3. Nakajima T, Iikura M, Okayama Y, Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H: Identification of granulocyte subtype-selective receptors and ion channels by using a high-density oligonucleotide probe array. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:528-535.

4. Matsumoto K, Terakawa M, Miura K, Fukuda S, Nakajima T, Saito H: Extremely rapid and intense induction of apoptosis in human eosinophils by anti-CD30 antibody treatment in vitro. *J Immunol* 2004;172:2186-2193.

5. Kato A, Ogasawara T, Homma T, Batchelor J, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K: CpG oligodeoxynucleotides directly induce CXCR3 chemokines in human B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1139-1147.

6. Kato A, Ogasawara T, Homma T, Saito H, Matsumoto K: Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN-beta signaling pathway in human monocytes. *J Immunol* 2004;172:6185-6194.

7. Homma T, Kato A, Hashimoto N, Batchelor J, Yoshikawa M, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K: Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression

in respiratory epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2004;31:463-469.

8. Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito H, Okayama Y: FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. J Allergy Clin Immunol 2005;115:272-279.

## 2.学会発表

第108回日本小児科学会学術集会(2005 東京)  
「気管支喘息児の非発作時の末梢気道閉塞に関与する因子についての検討」発表予定  
第17回日本アレルギー学会春期臨床大会(2005 岡山)「炎症によって気道上皮細胞に誘導される Chemokine や Metalloproteinase の網羅的な解析」発表予定

American Academy Of Allergy, Asthma And Immunology (AAAAI) 61st Annual Meeting (San Antonio, Texas, March 18-March 22, 2005)にて  
「Induction of mucin gene expression in human airway epithelial cells by FcεRI-mediated-amphiregulin production from human mast cells」発表

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし