

B. 研究方法

気道上皮細胞におけるサイトカイン、ケモカイン、接着分子の発現につき検討ならびに報告を行ってきたが、これらの機序を分子生物学的視点から追求することは、喘息病態を理解する上で重要と考えられる。今回我々は転写メカニズムの解明されていないサイトカイン/ケモカインに焦点を置き、その promoter 領域の確定、転写活性、およびそれを調節する転写因子につき詳細を検討した。ウイルス感染実験モデルとして dsRNA を用い気道上皮刺激を行い Real Time - PCR 法を用いて MIP- α , RANTES, IP-10, MCP-1, SR-PSOX, IL-1R antagonist などの炎症関連もしくは生体防御因子の発現を検討し、さらに細胞内情報伝達機序につき siRNA を用い検討を加える。

さらに IL-17F は気道炎症との関連で注目されているが、アレルギー性炎症病態形成への関与についての詳細は不明な点が多い。我々は、気管支喘息における IL-17F の役割をマウス実験モデルならびに気管支喘息患者について病理学的検討を加えた。

C. 研究結果

今回我々は in vitro 実験系において基礎的検討を行いウイルス感染に対する考察を加えた。気道上皮細胞を用いた実験系において dsRNA 刺激より種々のサイトカイン、ケモカインの産生が確認された。この結果は、ウイルス感染による喘息増悪機序の一部を説明し得るものと考えられる。感冒罹患により好酸球炎症の増悪ならびに好中球炎症が誘導され気道におけるアレルギー性炎症の増悪へと結びつくことが想定された。この結果より、喘息増悪因子としてのウイルス感染は極めて重要と考えられた。今後はこれらの研究を進展させ基礎的検討のみならず臨床的検討も行いその実態を明らかとし喘息増悪に対する関与へのさらなる検討を加えることが重要と考えられる。また喘息増悪の過程において好中球の関与は重要と考えられた。好中球炎症のみならず好酸球炎症に深く関わりとされる IL-17F に関し、その遺伝子多型と臨床像とが関連しその重要性が示唆された。

感染は喘息のみならず全ての疾患においてその病態を修飾し大きな影響を及ぼすことが考えられる。ゆえに気管支喘息に対するウイルス感染の影響を検討することは極めて重要であり今後も詳細な検討が必要と考えられる。

D. 考察

気道上皮細胞は dsRNA 刺激により IL-6, IL-8, RANTES, MIP- α , IP-10, MCP-1, SR-PSOX, IL-1R antagonist などの炎症関連もしくは生体防御因子の発現の増強がみられた。RANTES の promoter 領域を用いた発現実験において NF- κ B, IRF の関与が確認された。さらに TLR-3 は気道上皮細胞においてはその細胞表面に発現しているものは僅かで細胞内に多く存在し細胞内情報伝達において重要な働きを行っていることが確認された。各々の因子発現に対する TLR-3 との関係につき検討を加えたところ、細胞内情報伝達に NF- κ B, IRF の関与が確認されたがその関与の度合いは因子により様々であった。

IL-17F は dsRNA 刺激により気道上皮細胞より発現が確認された。マウス喘息モデルならびに気管支喘息患者気道上皮に IL-17F の発現が確認された。

E. 結論

今回我々は in vitro 実験系において基礎的検討を行いウイルス感染に対する考察を加えた。気道上皮細胞を用いた実験系において dsRNA 刺激より種々のサイトカイン、ケモカインの産生が確認された。この結果は、ウイルス感染による喘息増悪機序の一部を説明し得るものと考えられる。感冒罹患により好酸球炎症の増悪ならびに好中球炎症が誘導され気道におけるアレルギー性炎症の増悪へと結びつくことが想定された。この結果より、喘息増悪因子としてのウイルス感染は極めて重要と考えられた。今後はこれらの研究を進展させ基礎的検討のみならず臨床的検討も行いその実態を明らかとし喘息増悪に対する関与へのさらなる検討を加えることが重要と考えられる。また喘息増悪の過程において好中球の関与は重要と考えられた。好中球炎症のみならず好酸球炎症に深く関わりとされる IL-17F に関し、その遺伝子多型と臨床像とが関連しその重要性が示唆された。

感染は喘息のみならず全ての疾患においてその病態を修飾し大きな影響を及ぼすことが考えられる。ゆえに気管支喘息に対するウイルス感染の影響を検討することは極めて重要であり今後も詳細な検討が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsukura S., Kokubu F., Noda H., Tokunaga H., Adachi M.; Expression of IL-6, IL-8 and regulated on activation, normal

- Tcell, expressed and secreted (RANTES) on human bronchial epithelial cells, NCH-H292, induced by Influenza virus A.
J Allergy Clin Immunol 98;1080-1087 1996
- 2) Matsukura S., Kokubu F., Noda H., Watanabe H., Fukuchi K., Gomi K., Adachi M.; Expression of ICAM-1 on human bronchial epithelial cells after Influenza virus infection.
Allergology Int 45;97-103 1996
 - 3) Adachi M., Matsukura S., Tokunaga H., Kokubu F.; Expression of cytokines on human bronchial epithelial cells induced by Influenza virus A.
Int Arch Allergy Immunol 113;307-311 1997
 - 4) Kokubu F., Matsukura S., Kuga H., Kawaguchi M., Tomita T., Noda H., Tokunaga H., Imai T., Adachi M. Cytokine production by bronchial epithelial cells after influenza virus A infection
The Proceedings of the 5th West Pacific Allergy Symposium pp227-236 1997
 - 5) Matsukura S., Kokubu F., Adachi M. et al; Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after Influenza virus A infection.
Am J Respir Cell Mol Biol 18;602-609 1998
 - 6) 川口未央 國分二三男 足立満 他; IL-17 による培養気道上皮細胞の ICAM-1 の発現に対する影響 アレルギー48;1184-1187 1999
 - 7) Kawaguchi M., Kokubu F., Adachi M. et al; Influenza Virus A stimulates expression of eotaxin by bronchial epithelial cells.
Int Arch Allergy Immunol 122;44-49 2000
 - 8) Kawaguchi M, Kokubu F, Matsukura SHuang SK, Adachi M.
Influenza virus A stimulates expression of eotaxin by nasalepithelial cells.
Clin Exp Allergy.;31(6):873-80 2001
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 1、特許取得
特になし
 - 2、実用新案登録
特になし

自然免疫による病原体の認識機構とアレルギー疾患の発症に関する研究

分担研究者

河野 陽一

千葉大学大学院医学研究院小児病態学教授

研究要旨

- 1) RSV 細気管支炎患者は健康人と比べ、CD14C(-550)T 多型において、有意に CC の割合 (CC vs CT+TT, $p=0.020$) および C アリルの割合 ($p=0.036$) が高かった。CD14C(-159) 多型とは有意な関係はなかった。RSV 細気管支炎後の反復性喘鳴の有無と CD14C(-159)T および CD14C(-550)T 多型間に有意な関係はなかった。以上から、CD14C(-550) 遺伝子多型は RSV 細気管支炎発症の遺伝因子の一つであることが示唆された。
- 2) $\gamma\delta$ T細胞のリガンドである isopentenyl pyrophosphate (IPP) 刺激による末梢血 $\gamma\delta$ T細胞からの *in vitro* での IFN- γ 産生は、RSV 存在下で抑制された。この抑制は抗 IL-10 抗体の添加および IL-12 の添加により解除された。以上から、RSV による自然免疫系の $\gamma\delta$ T細胞機能の抑制機序のひとつが IL-10 産生によることが示唆された。

研究協力者

下条直樹 (千葉大学大学院医学研究院小児病態学講師)
菱木はるか (千葉大学大学院医学研究院小児病態学)
星岡 明 (千葉県こども病院アレルギー科主任医長)
青柳正彦 (国立療養所下志津病院アレルギー科医長)
山口賢一 (千葉市立海浜病院)

井上祐三朗 (千葉大学大学院医学研究院小児病態学)
石和田稔彦 (千葉大学医学部附属病院助手)
山出晶子 (千葉県こども病院アレルギー科)
沼田朋子 (千葉市立青葉病院小児科)
本多昭仁 (旭中央病院小児科)

A. 研究目的

自然免疫における細菌やウイルスの成分の認識には Toll-like Receptor (以下TLR)、CD14等が関わっており、一般にTh1型の免疫反応を誘導する。したがって、TLR、CD14の発現低下や機能不全は、Th1反応の誘導不全をきたし、感染症に引き続くアレルギーの発症に関与すると考えられる。respiratory syncytial virus (RSV) 細気管支炎への罹患は小児気管支喘息の発症寄与因子として知られているが、自然免疫における RSV の認識にも TLR4、CD14 が関与していることが最近明らかとなった。本研究では TLR4、CD14 の発現・機能に關係する遺伝子多型と RSV 細気管支炎後の反復性喘鳴の關係を検討する。前年度までの研究から、日本人には TLR4 遺伝子多型 Asp259Gly、Thr359Ile がなく、CD14 遺伝子多型 C(-159)T は RSV 細気管支炎の発症およびその後の反復性喘鳴・喘息発症とは關係しないことが明らかとなった。しかしながら、*in vitro* において可溶

性 CD14 (sCD14) の RSV に対する自然免疫応答への影響が見られた。そこで、本年度の研究では sCD14 血中濃度に関与するという報告のある他の CD14 遺伝子多型についてさらに検討した。

また、過去の我々の研究では RSV 細気管支炎時の $\gamma\delta$ T細胞からの IFN- γ の産生低下と細気管支炎後の反復性喘鳴が關係していたが、IFN- γ 産生抑制の機序は明らかではなかった。そこで今年度の研究では、RSV による $\gamma\delta$ T細胞からの IFN- γ 産生抑制機序を *in vitro* の系で解析した。

B. 方法

- 1) 2001-2004年に RSV 細気管支炎の診断で千葉大学小児科および協力病院に入院した2歳未満の小児で、かつインフォームドコンセントが得られた34名 (男子18名、女子16名) において、CD14C(-159)T および CD14C(-550)T 遺伝子多型解析および細気管支炎後の反復性喘鳴の有

無、喘息家族歴、兄弟数、集団生活の有無、等についてアンケート調査を行った。出生時体重が2500g以下、NICU入院の既往、およびRSV細気管支炎罹患以前の反復性喘鳴を認めた患者は対象外とした。多型解析の対照としては健康成人80名のDNAを用いた。

2) γ δ T細胞のリガンドである isopentenyl pyrophosphate (IPP) 刺激による *in vitro*でのIFN- γ 産生系にRSVを共存させた場合のIFN- γ 産生の抑制能、およびその抑制に対する抗サイトカイン抗体添加の効果等を検討した。

C. 研究結果

1) RSV 細気管支炎患者は健康人と比べ、CD14C(-550)T多型において、有意にCCの割合(CC vs CT+TT, $p=0.020$) およびCアレルの割合($p=0.036$)が高かった(表1、2)。CD14C(-159)多型とは有意な関係はなかった。RSV 細気管支炎後の反復性喘鳴の有無とCD14C(-159)TおよびCD14C(-550)T多型の間には有意な関係はなかった(表3)。

2) IPP刺激による末梢血 γ δ T細胞からのIFN- γ 産生は、RSV存在下で抑制された(図1)。この抑制は抗IL-10抗体の添加により解除されたことから、RSVによる抑制はIL-10を介することが示唆された(図2)。また、RSVによるIPP刺激末梢血 γ δ T細胞からのIFN- γ 産生の抑制は、IL-12の添加により解除された(図3)。

D. 考察

1) 本年度に新たに解析を行ったCD14C(-550)T多型はRSV細気管支炎後の反復性喘鳴とは関連がなかったが、細気管支炎の発症とは統計学的な関連が見られた。CD14C(-550)T多型は健康人においてもCアレル優位であるため、TアレルがRSV細気管支炎発症に対して予防的な遺伝素因である可能性がある。

CD14C(-550)T多型とsCD14量の関係については、海外からの成人における報告しかない。これらによると、Cアレルのほうが高いsCD14血中濃度と関係があるとさ

れている。しかし、sCD14は小児期において年齢によって増加していくため、成人におけるCD14遺伝子多型とsCD14量の関係が小児には当てはまらない可能性がある。したがって今後、乳幼児を対象としたCD14遺伝子多型とsCD14量の関係については検討する必要がある。

2) IPP刺激による末梢血 γ δ T細胞からのIFN- γ 産生はIL-12により促進され、IL-10により抑制されると考えられる。RSVはIL-10産生を誘導してIL-12産生を抑制することが示唆される。この機序により、RSVは γ δ T細胞からのIFN- γ 産生を抑制し、細気管支炎の発症、また細気管支炎後の反復性喘鳴に関与する可能性がある。

E. 結論

1) CD14C(-550) 遺伝子多型はRSV 細気管支炎発症の遺伝因子の一つであることが示唆された。

2) RSV による自然免疫系の γ δ T細胞機能の抑制機序のひとつがIL-10産生によることが示唆された。

以上からRSV感染では抗原提示細胞からのサイトカイン産生能の個体差が、 γ δ T細胞の機能、さらに α β T細胞の機能を決定し、細気管支炎発症の有無および反復性喘鳴に関連する可能性が示唆された(図4)

表1

CD14 C(-550)T多型とRSV細気管支炎の関係

	CC	CT+TT
健康人	40	40
RSV細気管支炎	25	9

} $p=0.020$
Odds ratio
2.78

表2

CD14 C(-550)T多型とRSV細気管支炎の関係

	C allele (frequency)	T allele (frequency)
健康人	113 (0.71)	47 (0.29)
RSV細気管支炎	57 (0.84)	11 (0.16)

p=0.036
Odds ratio 2.16

図2 IPP 刺激 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- γ 産生に対するRSVの抑制：抗IL-10抗体による解除

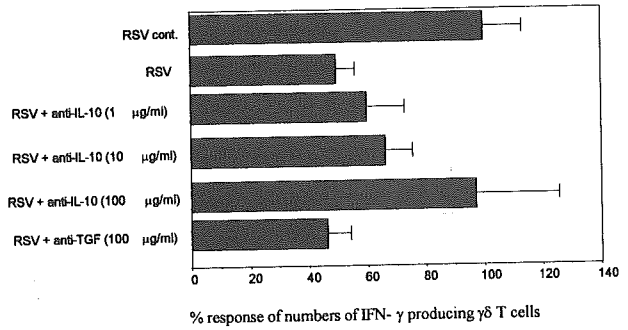


表3

CD14 C(-550)T多型とRSV細気管支炎後喘鳴の関係

	CC	CT	TT
RS細気管支炎後 喘鳴あり	10	2	1
RS細気管支炎後 喘鳴なし	14	4	1

† : p>0.05 (χ²検定)

図3 IPP 刺激 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- γ 産生に対するRSVの抑制：IL-12による解除

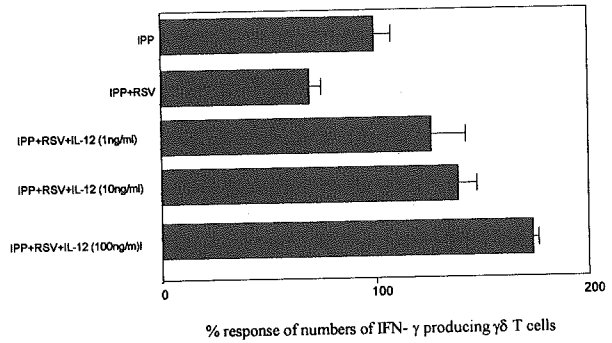


図1 IPP 刺激 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- γ 産生に対するRSVの抑制効果

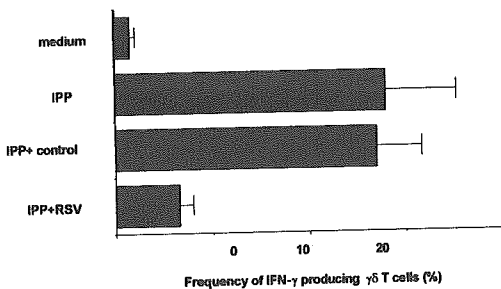
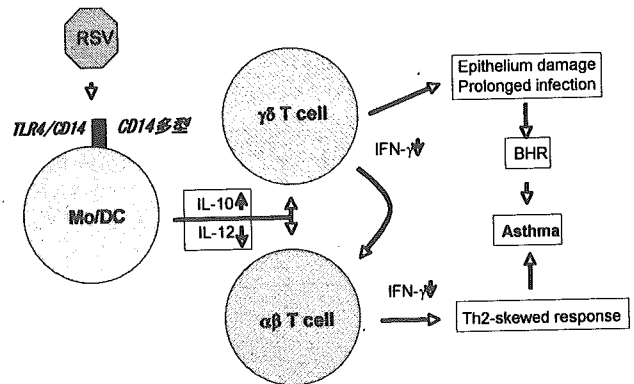


図4 RSV感染によるサイトカイン産生パターンと喘息発症



アレルギー疾患にかかわる胎内/胎外因子の同定に関する研究
アレルギー疾患の発症に関する疫学的検討

分担研究者氏名 小田嶋 博 (国立病院機構福岡病院 統括診療部長)

小児のアレルギー疾患は近年増加の傾向にあり、我々の西日本の調査では喘息についてみると10年間に1.4倍、20年間に約2倍に増加している。これらの急速に増加する疾患について、その発症を特に胎内因子と胎外因子について検討することは、その治療、管理の上からも極めて重要である。我々は過去2年間の検討で病院を受診した児について0歳、1歳、2歳について、アレルギー疾患の発症に関与する因子について検討して来た。その結果、妊娠中のアレルギー症状や感染との関連、また出生後の感染との関連が認められることを報告した。

また、過去の3年間にわたり、福岡市内の3地区6小学校の疫学調査を行い、呼吸器症状のみとめられる児においては肺機能と血液学的調査を実施。その値について分析してきた。また、呼気中のNOについても測定可能な症例では検討し、今年度は、この3年間の症例についてまとめて検討した。その結果、喘息群は寛解群に比べ、末梢気道の閉塞が強いこと、また血清IgE値が寛解群に比べて明らかに高値であることが確認された。呼気中のNOは関連がみられなかった。また近年、one-way one-diseaseが提唱されているが、鼻炎症状をみとめたものでは特に低学年においては喘息が寛解し難いことがわかった。

研究協力者

野間 剛	北里大学小児科講師
森川 みき	JR山台病院小児科医長
川野 豊	横浜赤十字病院小児科部長
渡辺 美砂	東邦大学医学部小児科
佐伯 敏秋	北里大学小児科
岡田 賢司	国立病院機構福岡病院小児科
本村知華子	国立病院機構福岡病院小児科
手塚純一郎	国立病院機構福岡病院小児科

九州地区、関東地区、東北地区の各地域において疫学調査にない正確な病歴が得られる可能性を考え、病院受診者に共通の問診表を用い、アレルギー疾患の発症要因を検討した。今年度は生後1年目と生後2年目の患者に関してその保護者を中心に胎内、胎外因子の関与について調査を行った。昨年度までの検討に加え受動喫煙の影響についても検討した。

また、福岡市内の3地区6小学校において疫学調査を2003、2004、2005年度の3年度にわたって実施して、その小学校でのデータを分析してアレルギー疾患の発症に関する胎外因子について検討した。対象は、ATS-DLD問診票で呼吸器症状ありと診断された625名で、喘息350名および喘息寛解275名。両群の差異について検討した。Flow Volume曲線、血液IgE値、高感度CRPを求め、また可能な者については呼気中のNOの値を測定した。これらの値について比較検討した。

A. 研究目的

近年、小児のアレルギー疾患は急速に増加を続けている。我々の西日本での調査では喘息は20年間で2倍に増加していた。喘息以外のアレルギー疾患もその多くが増加を続けている。このような急激な増加は胎内、胎外の因子が複雑に絡み合って発症すると考えられる。すでにわれわれは、誕生月によりアレルギー疾患の発症が異なることを報告した。その原因としては生後の感染の罹患また妊娠中の母親の状態が関連していると推定された。また、昨年度は生後1歳の児を中心に検討したが、これらの因子についてさらに詳しく検討し発症への関与を明らかにしていくことを目的とする。

B. 研究方法

C. 研究結果

今回の検討となった小児科外来を受診している患者での有症率は1歳、2歳それぞれ、喘息4.6%、13%、アレルギー性鼻炎3.2%、6.5%、アトピー性皮膚炎11.8%、22.5%、食物アレルギー3.8%、13%であった。1歳児に比べ、アレルギー疾患無しが81%から63%と減少していた。この年齢層はアレルギー疾患の発症が多いことまた、医師を

受診するものの増加することが推定され重要な時期と考えられた。

出生時の体重に関しては1歳時点ではアレルギーあり 3039±457 g、アレルギーなし 2962±427 g と有意な差がみられたが2歳の児ではアレルギーあり 3060±362 g に対してアレルギーなしは 3008±440 g とアレルギーのあるものは高い傾向にあったが有意ではなかった。しかし、1歳児にみられた在胎週数との関連は明らかでなかった。

家族歴のある者ではないものに比べ、アレルギー疾患の発症が1歳2歳ともに多かったが、家族歴のある者での発症率は1歳では31.6%であるが2歳では75.3%とその傾向が明らかになった。

家族歴でのアレルギー疾患患者の数、および母親のアレルギー症状の数は児の有症率に関連し、この関係には1歳、2歳で差がみられなかった。

栄養法との関連に関しては、1歳では母乳のほうが人工乳よりもアレルギー有症率が高い疾患はアトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、食物アレルギーであり、母乳のほうが有症率の低いものは喘息であった。この内、統計学的に有意差があったのは喘息のみであった。2歳でもこの関係は変わらないが、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーにおいて母乳と人工乳の間に統計学的に有意差が認められた。この間、の1年間で、アレルギー性鼻炎以外の疾患では明らかに母乳群では有症率が増加していた。喘息でも有症率が増加しているが、やはり母乳群の方が有症率が少なかった。

保育園の影響は1歳では明らかでなく2歳では通園の者に喘息が多くなった。有毛ペット保有群では、1歳児におけるADの発症率が有意に高かった。また、2歳における気管支喘息の発症率が高かった。

問診票より、家族の喫煙についての項目を詳細に検討し、アレルギー疾患の発症について受動喫煙の影響を検討した結果では家族の喫煙群と非喫煙群でのアトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎の発症の比較では、アトピー性皮膚炎とアレルギー性鼻炎の発症には差がなかった。家族の喫煙を「妊娠中から」と「生後から」で区別して比較すると、「生後から」の喫煙群が非喫煙群に比べ児の気管支喘息の発症が多い傾向にあった。今回の検討では、母親自身の喫煙が、その他の家族の喫煙に比べ「生後から」の時期に多かった事が、その背景にあった。アレルギー疾患の発症要因としての喫煙の影響は、母親から暴露される時期によって異なる

可能性が考えられた。

小学校の喘息群と喘息寛解群の差についての検討では、肺機能に関しては、%FVC、%PEFは全ての学年で有意差がなかった。%FEV_{1.0}は2年生で、%MMF、%V₅₀については、2年生と4年生で、%V₂₅については、2、4、5年生で有意差をみとめた。また、log(IgE)については、4年生以外で有意差をみとめ、小学生ではアレルギーの関与の強いことがみとめられた。

しかし、同時に測定した呼気中のNOの値は寛解とは関係がなかった。高感度CRPは明らかな関連が見出せなかった。

またアレルギー性鼻炎の合併については、小学校の1、2年生ではアレルギー性鼻炎のみとめられるもので明らかに寛解が少なかった。小学校3年生以上ではこの関与はみとめられなかった。

D. 考察

小児アレルギー疾患の発症は低年齢化しているが、1～3歳はアレルギー疾患発症の時期として重要である。病院受診者の検討として、今回は1、2歳の患者で検討したが、上記のように胎外因子は1歳では明らかでないものが2歳では関連をもってくる。また逆に胎内因子は2歳では1歳よりも影響が減ってくる可能性が認められた。また、疾患によって影響が異なることが推定された。今後、さらに経過を追って観察する必要がある。昨年までの検討に加えて、今回は受動喫煙との関連を検討したが、母親の喫煙は影響がありさらに、時期が問題であることが分かった。喫煙は環境改善の中でも容易にできそうでできないもので、更に日本での若年女性の喫煙の現状からさらに説得力のあるデータの蓄積が必要と考えられる。

また、小児においてはアレルギー疾患の寛解がみとめられることから、寛解因子、増悪因子が胎外因子として重要である。そこで小学生の調査において、過去2年間の症状の有無により、現症と寛解を分け、両者の差異を検討した。この間の過去3年間分のデータについて分析したが、小学生ではやはりアレルギーの関与が大きいところから、これは予後についても大きな因子であった。また、近年提唱されている one-way one-disease の考えから鼻炎症状の有無と喘息症状の関係をみたが、低学年では明らかに鼻炎がみられた方が予後が悪

いことがわかった。

しかし、今回の検討から呼気中のNOに関しては、両群間で有意な差は検出されなかった。呼気中のNOは喘息の有無とは関連があることが、すでに報告されているが、予後とは関連がなかった。

E.まとめ

胎内因子は1歳では明らかでも2歳では関連が減少し、胎外因子は1歳では明らかではないものが2歳では関連がみとめられてくる。また母親の喫煙対策が必要である。

学童期では予後は血清IgE値と関連が強い。また、末梢気道の状態が予後と関連すると推定された。低学年ではアレルギー性鼻炎合併は予後の悪化因子と考えられた。

また、呼気中のNOの値は寛解の有無とは関連がみられなかった。

F.研究発表

論文発表

1. Odajima H and Nishio K : Clinical reality of asthma death and near-fatal cases, in a department of pediatrics of a Japanese chest hospital. *Allergology International* 54 (1) : 7-15. 2005.
2. 小田嶋 博 : 気管支喘息の診断と疫学—諸外国との比較—. *カレントセラピー* 23 (4) : 8-13. 2005.
3. 小田嶋 博 : アレルギー疾患の疫学. *Pharma Medica* 23 (4) : 13-17. 2005.
4. 小田嶋 博 : 小児気管支喘息の最近の疫学と増加要因. *小児科* 46 (2) : 541-550. 2005.
5. 井手康二、小田嶋 博 : 喘息危険因子としての喫煙EBM. *アレルギーの臨床* 25 (5) : 18-23. 2005.
6. 西尾 健、小田嶋 博 : 小児呼気中NO濃度測定. *アレルギーの臨床* 25 (6) : 69-73. 2005.
7. Kawano Y, Morikawa M, Watanabe M, Ohshiba A, Noma T and Odajima H : Fetal growth promotion in allergic children. *Ped. Allergy & Immunology* 16 : 354-356. 2005.
8. Kawano Y, Morikawa M, Watanabe M, Ohshiba A, Noma T and Odajima H : A study of the factors responsible for the development of allergic diseases in early life. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 23 : 1-6.

2005.

9. 小田嶋 博 : 喫煙の気管支喘息への影響. *日本小児アレルギー学会誌* 19 (3) : 237-246. 2005.

10. 小田嶋 博 : 小児気管支喘息の発症パターンと原因・危険因子の多様性. *喘息* 18 (4) : 15-20. 2005.

11. 小田嶋 博、藤野時彦、岡 尚記、濱崎雄平、市丸智浩、水元裕二、松本重孝、是松聖悟、大庭健一、熊本俊則、野原 薫 : 小児気管支喘息患者と保護者の Quality of Life の検討—九州・沖縄地区、多施設検討報告—. *アレルギー* 54 (11) : 1260-1271. 2005.

学会発表

1. 小田嶋 博 : 小児喘息の成人への移行—QOLを考えた—. 第5回千葉喘息フォーラム. 平成17年2月10日. 千葉.
2. 小田嶋 博、本村知華子、手塚純一郎、井手康二、西間三馨 : 小児気管支喘息におけるゴキブリ抗原に関する検討. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会. 平成17年6月2-4日. 岡山.
3. 小田嶋 博 : 気管支喘息の経過に対する妊娠ならびに出産の影響. 第18回小児気管支喘息治療管理研究会. 平成17年6月11日. 東京.
4. Nogami H., Kamikawaji N., Odajima H., Shimoda T., Shoji S. and Nishima S. : The predicting factors of airway hyperresponsiveness in the patients suffering from chronic cough. *ATS 2005 San Diego International Conference*.
5. 小田嶋 博 : 小児喘息における早期介入. *イブニングシンポジウム* 10. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成17年10月20-22日. 岩手.
6. 渡邊美砂、佐伯敏亮、川野 豊、森川みき、大柴晃洋、野間 剛、小田嶋 博 : 小児アレルギー疾患発症の予知に関する検討 (第7報) : 1歳児と2歳児の比較. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成17年10月20-22日. 岩手.
7. 本村知華子、久保田典里子、森安善生、ケイジ・スピヤント、手塚純一郎、渡辺恭子、岡田賢司、小田嶋 博、西間三馨、山田篤伸 : 気管支喘息幼児の喘息重症度と肺機能・アレルギー性鼻炎との関連. 第42回日本小児アレルギー学会. 平成17年11月19-20日. 福井.

平成17年度 厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
免疫アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究

研究課題名 “アレルギー気道炎症・リモデリング形成に
果たす胎内胎外因子の役割”

分担研究者 徳山研一 群馬大学医学部小児科助教授

小児喘息は成人喘息と異なり寛解例が多い。その原因として、アレルギー性炎症による気道リモデリングの進展とその修復機転が小児と成人では異なる可能性がある。しかしながら、気道リモデリングの年齢による差異をヒトで検討するのは現時点では難点が多い。そこでマウス、特に幼若マウスの抗原反復曝露モデルを確立し、このモデルにおけるリモデリングの経時的変化を成熟マウスの病態と比較検討した。即ち、新生仔（日齢3）および成熟（8週齢）BALB/Cマウスに、10 μ gの卵白アルブミン（ovalbumin; OA）を週1回ごと計3回腹腔内投与して感作した。次いで2.5% OA溶液を1週間に3回の頻度で吸入チャレンジした。チャレンジ開始後1、2、4、8週後の時点で、気道過敏性を測定し、気管支肺胞洗浄液（BALF）を採取後、採血したのち気道組織を摘出した。一昨年度はこのうち気道過敏性の経時的変化の特徴を報告し、昨年度はBALF中の好酸球数の経時的変化、気道組織における炎症細胞浸潤の程度、粘液分泌細胞増加の程度について検討した。今年度は幼若および成熟マウスの気道炎症の経時的変化に果たすサイトカインの役割を検討する目的で、BALF中の各種サイトカインを測定した。即ち、BALF中の、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、TNF- α 、IFN- γ をBio-Plexサイトカインアッセイキットを用いて測定した。その結果、以下の結果を得た。

1. 成熟マウスではTh2サイトカインであるIL-4のみ1,2週で有意に高値を示した。4,8週ではIL-4は有意の増加は認められなくなった。
2. 幼若マウスでも成熟マウスと同様にIL-4は1,2週で有意に高値を示し、4,8週では有意の増加は認められなくなった。一方、成熟マウスと異なり、幼若マウスでは1,2週において、Th1サイトカインであるIL-2も有意に増加した。

今回我々は、幼若マウスの慢性のアレルギー性気道炎症モデルを樹立することが出来た。昨年までの検討結果では、幼若マウスでは成熟マウスに比べて気道炎症、気道過敏性亢進ともに早期に収束することが明らかになった。その機序は不明であるが、気道局所のサイトカイン産生の違いが異なる炎症の進展様式をもたらしている可能性が示唆された。

大木康史
群馬大学医学部
周産母子センター講師

黛 博雄
群馬県立小児医療センター
新生児科医長

A. 研究目的

成人喘息の気道ではアレルギー性の慢性気道炎症所見に加え、気道構造の再構築（リモデリング）が認められることが明らかとなった。

このため、成人喘息は不可逆的な変化をともなう慢性的な気道の炎症性疾患と認識されるに至った。

一方、小児喘息では成人喘息と比べ、疫学的に寛解例が多い。このことは、アレルギー性炎症による気道リモデリングの進展とその修復機転が小児と成人では異なる可能性を示唆している。

我々は昨年までの検討で幼若マウスの慢性のアレルギー性気道炎症モデルを樹立することが出来た。その結果、幼若マウスでは成熟マウスに比べて気道炎症、気道過敏性亢進ともに早期に収束することが明らかになった。その機序は不明であるが、アレルギー性炎症の結果産生される気道局所のサイトカインが異なる炎症の進展様式をもたらしている可能性がある。

そこで今年度我々は、上記の仮説を検討する目的で、新生仔マウスおよび成熟マウス気管支肺胞洗浄液（BALF）中の各種サイトカインの測定を行い、異なる気道炎症、気道過敏性亢進の進展様式の違いの理由を明らかにしたいと考えた。

B. 研究方法

1. プロトコール

新生仔（日齢 3）および成熟（8 週齢）BALB/C マウスに、 $10\mu\text{g}$ の卵白アルブミン（ovalbumin; OA）を週 1 回ごと計 3 回腹腔内投与して感作した。次いで 2.5% OA 溶液を 1 週間に 3 回の頻度で吸入チャレンジした。チャレンジ開始後 1、2、4、8 週後の時点で、気道過敏性を測定後、気管支肺胞洗浄液（BALF）を採取し、更に気道組織を摘出した。一昨年度はこのうち気道過敏性の経時的変化の特徴を報告した。また昨年度は BALF 中の好酸球数の経時的変化、気道組織における炎症細胞浸潤の程度、粘液分泌細胞増加の程度について検討した。今年度は BALF 中の各種サイトカイン量を定量した。

2. BALF の採取

気道過敏性の測定後、動物をペントバルビタールにて麻酔し、採血した。次いで、気管内に 24 ゲージのカニューレを挿入し、phosphate buffered saline (PBS) を注入し、BALF を回収した。PBS の注入量は、チャレンジ開始後 1、2 週後の幼若マウスでは 0.3ml、4、8 週後の幼若マウスでは 0.4ml であった。成熟マウスはいずれのチャレンジ後も 0.4ml 採取した。BALF は 800rpm で 5 分間遠沈して上清をサイトカインの測定に供した。沈殿物は 0.3 ml の RPMI-1640 メディウムに再浮遊させ、好酸球数の算定に用いた。

3. サイトカインの測定

BALF 中の、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、TNF- α 、IFN- γ を Bio-Plex サイトカインアッセイキットを用いて測定した。

C. 研究結果

1. 成熟マウスではTh 2サイトカインであるIL-4のみ1,2週で有意に高値を示した。4,8週ではIL-4は有意の増加は認められなくなった。

2. 幼若マウスでも成熟マウスと同様にIL-4は1,2週で有意に高値を示し、4,8週では有意の増加は認められなくなった。一方、成熟マウスと異なり、幼若マウスでは1,2週において、Th 1サイトカインであるIL-2も有意に増加した。

D. 考察と結論

我々は、幼若マウスの慢性のアレルギー性気道炎症モデルを樹立することが出来た。

一昨年は気道過敏性の変化に焦点を当て検討した。その結果、幼若マウスでは成熟マウスに比べて気道過敏性は成熟動物に比べ、早期に収束した。

昨年度はBALF中好酸球数、炎症細胞浸潤、粘液分泌細胞過形成について経時的変動を観察した。その結果、これらの病態も気道過敏性同様、幼若マウスでは成熟マウスに比べて早期に収束した。このことはアレルギー性気道炎症の進展は、個体の成熟段階によって異なる可能性を示唆しており、小児喘息では寛解例が多いことを考える際に、興味ある現象と思われた。今回我々は、幼若マウスで成熟マウスに比べて気道炎症、気道過敏性亢進ともに早期に収束する理由を明らかにする目的で気道局所のサイトカイン産生を測定した。その結果、Th 2サイトカインであるIL-4の時間的変化は幼若マウスと成熟マウスで差を認めなかったが、Th 1サイトカインであるIL-2は幼若マウスでのみ有意に高値であった。このことは炎症の進展に伴い産生されるサイトカインの量あるいは質が生体の成熟段階によっ

て異なること、その結果気道炎症の進展が異なってくる可能性を示唆しており興味深い。今後アレルギー性炎症におけるサイトカイン、特に炎症を収束に向かわせる方向に働くサイトカインや増悪させる方向に働くサイトカインが同定されれば、喘息の予後を変えうる治療薬の開発に結びつく可能性があり、興味深い。

E. 研究発表

1. 論文発表

Koyama H, Tokuyama K, Nishimura H, Mizuno T, Mayuzumi H, Ohki Y, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. The effect of disodium cromoglycate on airway mucus secretion during antigen-induced late asthmatic response in a murine model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005 138:189-196

Ohki Y, Tokuyama K, Mayuzumi H, Sato A, Koyama H, Takizawa T, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. Characteristic features of allergic airway inflammation in a murine model of infantile asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005 138:51-58

Mochizuki H, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A. Bronchial sensitivity and bronchial reactivity in children with cough variant asthma. *Chest* 2005 128:2427-2434

徳山研一：プロカテロールドライシロップ. 呼吸 24(8):687-693, 2005.

徳山研一：小児の発熱. 健康通信(発行:上毛新聞社出版局)第4号30-31, 2005.

徳山研一、海老沢元宏、David B Allen：小児喘息の吸入ステロイド療法における安全性。International review of asthma 7(1):8-28, 2005.

徳山研一：“ニューロペプチド研究会”のあゆみ。アレルギーと神経ペプチド 1:45-48, 2005.

徳山研一：β 2 刺激薬の抗炎症効果。アレルギー・免疫 12(3):24-31, 2005.

森川昭廣、滝沢琢己、徳山研一：気管支喘息におけるプロピオン酸ベクロメサゾン (HFA-134a-BDP：キュバール TM) の使用経験。VII. 今後の展開～小児領域を中心に～。アレルギー・免疫 12(3):114-119, 2005.

鈴木雅登、徳山研一：小児における咳嗽と喘息。呼吸と循環 53(6):589-594, 2005.

鈴木雅登、徳山研一：小児気道感染とアレルギー。Pharma Medica 23(4):23-28, 2005.

河野美幸、徳山研一：受動喫煙と小児喘息。アレルギーの臨床 25(5):361-365, 2005.

水野隆久、徳山研一：ウイルス感染と喘息。ALLERGIA TRENDS 7(2):10-13, 2005.

水野隆久、徳山研一：乳児期の喘鳴およびウイルス感染関連喘息。小児科診療 68(8):74-80, 2005.

水野隆久、徳山研一：知っておきたい診療上の留意点 なぜそうするのか、なぜそうしてはいけないの

か」II. 検査 10. アレルギー 2) 血液検査。小児科 46(5):761-764, 2005.

徳山研一：β 2 刺激薬の抗炎症効果。アレルギー・免疫 12(3):24-31, 2005.

2. 学会発表

- 1) 徳山研一：小児気管支喘息の予防と治療－ガイドラインの考え方を中心に－、第 17 回東日本外来小児科学研究会特別講演、2005.10.30、高崎市
- 2) 徳山研一：小児喘息の Early intervention、第 108 回日本小児科学会学術集会ランチョン・セミナー、2005.4.23、東京
- 3) 徳山研一：小児気管支喘息に対する治療的早期介入の考え方、第 2 回堺小児アレルギー研究会特別講演、2005.10.22、大阪府堺市
- 4) 徳山研一：β 2 刺激薬の多彩な薬理作用と喘息治療における可能性、第 13 回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会会長講演、2005.2.20、高崎市
- 5) 徳山研一：H 1 受容体拮抗薬、第 14 回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会シンポジウム 2：抗アレルギー薬の新たな展開 2005.12.11 (岐阜)
- 6) 徳山研一：日本における乳幼児喘息治療、第 42 回日本小児アレルギー学会シンポジウム 2：乳幼児喘息治療の最前線、2005.11.19 (福井)

- 7) 徳山研一：小児喘息の長期寛解因子－早期治療介入の是非－、第 55 回日本アレルギー学会総会 イブニングシンポジウム 8：小児及び成人気管支喘息の長期寛解因子、2005.10.21(盛岡)

- 8) 徳山研一：Early intervention：小児領域、第 17 回日本アレルギー学会春季臨床集会 イブニングシンポジウム 01:気管支喘息における early intervention の評価、2005.6.2 (岡山)

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）
免疫アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究

ヒト気道上皮細胞における RSV 感染による遺伝子発現解析
-Th1 および Th2 サイトカイン存在下における検討-

分担研究者 吉原 重美 獨協医科大学小児科・助教授

研究要旨 気道感染ウイルスのひとつである RSV 感染は、細気管支炎の発症、罹患後の反復性喘鳴さらに小児気管支喘息の発症や増悪因子として重要視されている。近年、その病態には、RSV に対する免疫応答の個体差が関与している可能性が考えられている。今回、宿主（個体）側の Th1・Th2 バランスと、RSV 感染との相互関連を明らかにする目的で、Th1 または Th2 サイトカインを添加し培養したヒト気道上皮細胞において、RSV 感染が誘導する遺伝子発現を Gene Chip(Affymetrix)を用いて網羅的に解析し比較検討した。その結果、RSV 感染および IL-4 前処置+RSV 感染のクラスターリングによる遺伝子発現パターンは類似しており、IFN- γ 前処置+RSV 感染による遺伝子発現パターンとは相違していた。さらに、IFN- γ 前処置+RSV 感染と比較して、RSV 感染や IL-4 前処置+RSV 感染で特に強く発現を示した 658 の遺伝子の中には、RANTES, CCL20(LARC), CXCR4, ICAM-1, VEGF, MMP-1, MMP-10, IL-1 β などが含まれていた。以上の成績から、宿主側の十分な IFN- γ の存在は、RSV 感染による気道炎症に及ぼす種々の遺伝子発現を抑制している可能性が示唆された。したがって、宿主側の Th1・Th2 バランスが、RSV 気道感染による気道炎症の病態に大きく関与していることが考えられた。

研究協力者:

山田裕美 獨協医科大学小児科・助手
松本健治 国立成育医療センター研究所
アレルギー研究室室長
齋藤博久 国立成育医療センター研究所
免疫アレルギー研究部部长
堤 裕幸 札幌医科大学小児科・教授
七種美和子 横浜市衛生研究所

A. 研究目的

気道ウイルス感染が喘息発症の病態に影響を与えることは、特にライノウイルスや RS ウイルス感染で知られている。疫学的研究から、乳幼児期に細気管支炎に罹患した児は、肺機能の低下や呼吸抵抗の増大、気道過敏性の増悪が認められることや、喘鳴が遷延し喘息に移行する報告がある。近年、胎内または生後早期の初期免疫応答が、その後の適応免疫応答に重要な影響を与えることから、

宿主側素因が、気道ウイルス感染による気道アレルギー疾患発症に関連するとした報告が散見される。今回、宿主（個体）側の Th1・Th2 バランスと、RSV 感染との相互関連を明らかにする目的で、Th1 または Th2 サイトカインを感染前に添加し培養したヒト気道上皮細胞において、RSV 感染が誘導する遺伝子発現を Gene Chip(Affymetrix)を用いて網羅的に解析し比較検討した。

・B. 研究方法

A549 細胞(ヒトII型肺胞上皮細胞)に Th1 サイトカイン(IFN- γ)および Th2 サイトカイン(IL-4)を添加し、2日間培養の後に HEp-2 細胞で増殖させた RSV(long 株)を1時間感染させ、洗浄後培養した。対照として 1%FCS を用いた。96hr 後に感染細胞を回収し、total RNA を抽出、Oligonucleotide Probe Array System (Affymetrix Gene Chip)を用いて遺伝子発現量を定量的に検討し、得られたデータを clustering 解

析した。

C. 研究結果

1)シグナル値100を超えた検出可能な13,560の遺伝子のうち、対照と比較して強く(2倍以上)発現した遺伝子数は、RSV感染;1542、IFN- γ 前処置+RSV感染;390、IL-4前処置+RSV感染;1285だった(Fig.)。2)RSV感染およびIL-4前処置+RSV感染のクラスタリングによる遺伝子発現パターンは類似しており、IFN- γ 前処置+RSV感染による遺伝子発現パターンとは相違していた。3)IFN- γ 前処置+RSV感染と比較して、RSV感染およびIL-4前処置+RSV感染で特に強く発現(2倍以上)を示した658の遺伝子の中には、RANTES, CCL20(LARC), CXCR4, ICAM-1, VEGF, MMP-1, MMP-10, IL-1 β などが含まれていた(Table)。

D. 考察

従来より、下気道ウイルス感染は、気道上皮傷害や気道炎症、気道過敏性亢進を誘導することが認識されている。しかし、下気道ウイルス感染の罹患により、全例が気管支喘息を発症するわけではないことは明らかである。今回の我々の検討では、ヒト気道上皮細胞におけるRSV感染による遺伝子発現は、感染前のTh1あるいはTh2サイトカインの存在下で差異を認め、特にIFN- γ 前処置+RSV感染では、気道炎症に関連する遺伝子の抑制が認められた。このことは、宿主側にIFN- γ の存在が不十分な条件(生後早期の感染、アトピー素因の存在、アレルゲン感作がすでに成立している個体など)がある場合、RSV感染による気道炎症が遷延し気管支喘息への進展につながる可能性を示唆していると考えられた。

今後は、この結果がRSV感染に特異的かどうか、また、IL-4添加濃度やIL-13添加などでの再検討が必要であると考えている。

E. 結論

宿主側のTh1・Th2バランスが、RSV気道感染

による気道炎症の病態に関与していることが示唆された。

F. 発表

1. 論文発表

- ・Yoshihara S, Morimoto H, Yamada Y, Abe T, Arisaka O: Endogenous cannabinoid receptor agonists inhibit neurogenic inflammations in guinea-pig airway. *Int Arch Allergy Immunol*, 138, 80-87, 2005.
- ・吉原 重美、山田裕美、有阪 治: RSウイルスによる喘鳴と乳児喘息。カレントセラピー、23、363-368、2005.
- ・吉原重美、山田裕美、阿部利夫、有阪 治: 小児気管支喘息の早期診断。小児科臨床、58、1987-1991、2005
- ・山田裕美、吉原重美、有阪 治: 気道ウイルス感染と喘息発症。Allergy from the nose to lung. 13: 12-16, 2005.
- ・山田裕美、吉原重美: 乳幼児の気管支喘息における気道炎症-痰中Creola Bodyからのアプローチ-。アレルギーの臨床 25:17-21, 2005.
- ・山田裕美、吉原重美、有阪 治: 小児アレルギー疾患のABC-乳児喘鳴性疾患と乳児喘息-。小児科診療 68:1469-1474, 2005.
- ・山田裕美、吉原重美、有阪 治: シンポジウム・乳児喘息の病態-痰からのアプローチを中心に-。第21回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会講演集、45-47、2005.

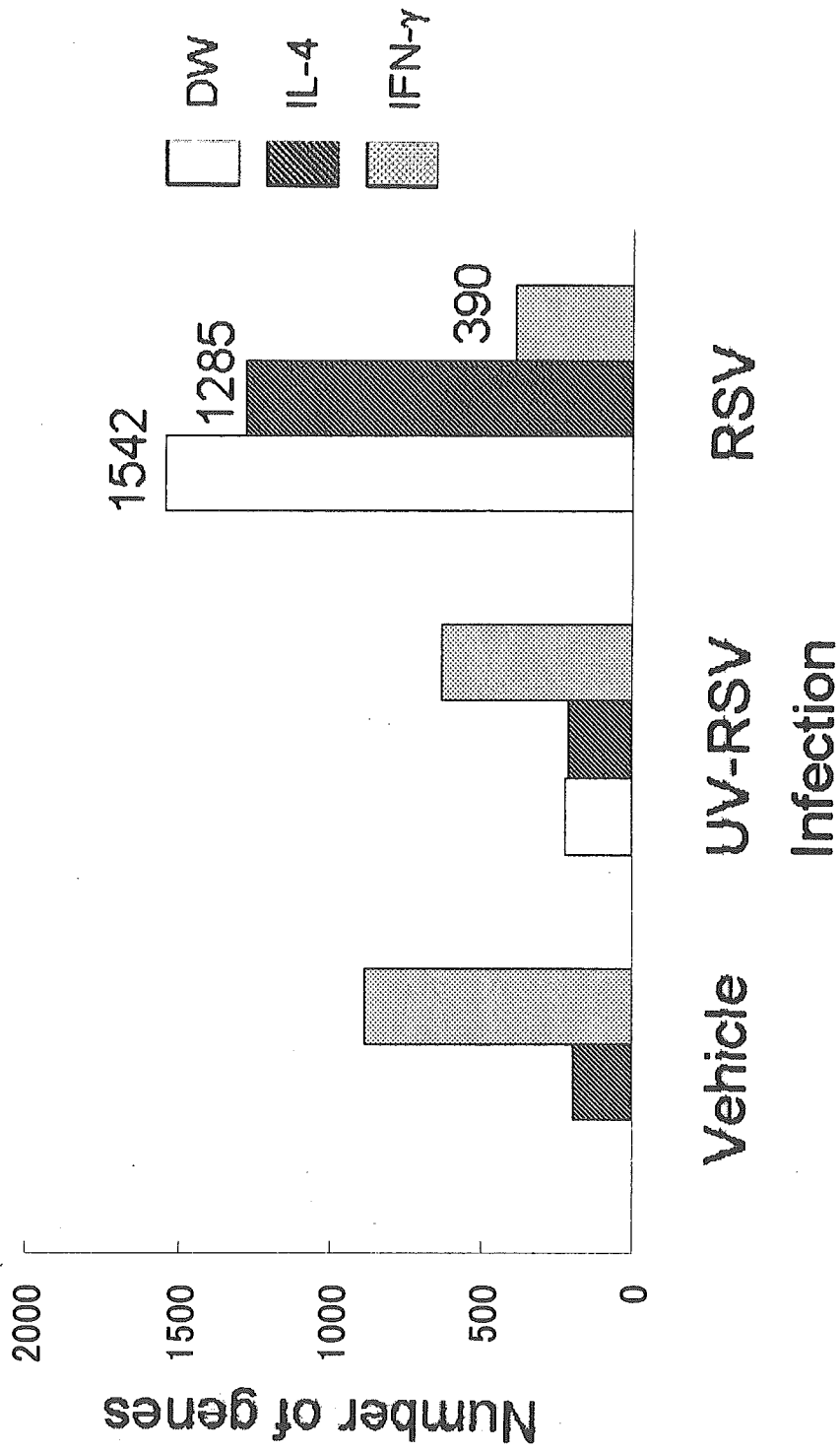


Figure Upregulated# expression genes with RSV-infection after stimulated by cytokines

Table

Common name	Expression ratio*	
	RSV	IL-4+RSV
CCL5(RANTES)	6.3	3.0
CCL20(LARC)	30.9	9.1
CXCR4	38.2	53.4
ICAM-1	4.6	5.0
VEGF	7.8	7.5
MMP-1	85.4	40.7
MMP-10	24.5	13.6
MUC3B	6.9	4.7
IL1- β	2.5	2.5

* the expression ratio compared to IFN- γ +RSV exposed cells

平成17年度 厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
免疫アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究
研究課題名：正常ヒト肺線維芽細胞における Eotaxin 発現に対する
デキサメサゾンの影響とその分子メカニズムの検討

分担研究者 荒川浩一 群馬大学大学院小児生体防御学講師

研究要旨：感染やアレルギー曝露による気管支喘息の急性増悪時には、ステロイドの投与が行われる。その作用は、多岐にわたるが、気道上皮に対し Eotaxin 産生を低下させ、好酸球性炎症を抑制する可能性が示唆されている。しかしながら、線維芽細胞に対する効果は不明である。昨年までに、正常ヒト肺線維芽細胞 (NHLF) における IL-4 依存性の Eotaxin 産生に対するステロイドの影響を検討し、NHLF において、DEX は、IL-4 刺激による Eotaxin 蛋白質および mRNA 産生を添加後 24 時間では抑制したが、48 時間、72 時間後では反対に増強することを報告した。本年は、Th2 サイトカインである IL-13 が同様の効果を示すか、さらに 48 時間以降のエオタキシン増強効果に IL-4 受容体 α 鎖の発現が関与しているかを検討した。その結果、IL-13 も Eotaxin 産生の亢進があり、DEX が 48 時間以降の増強を示した。DEX は、IL-4 受容体 α 鎖の発現は亢進しなかった。また、この反応に NF- κ B が関与するかを検討するために、NF- κ B の阻害薬を用いて検討したが、NF- κ B を介さないことが分かった。DEX は線維芽細胞の Eotaxin 産生に対して 2 相性の反応を呈し、その分子機序として、新規に生成される何らかの蛋白質の関与が推定された。

研究協力者

鈴木僚子 群馬大学小児生体防御学

存在する線維芽細胞に対する効果は不明である。

A. 研究目的

気管支喘息における気道炎症においては、好酸球が重要な役割を果たしており、IL-5 や Eotaxin などのサイトカインがメディエーターとして介在している。肺線維芽細胞は Eotaxin を産生する細胞のひとつであり、また、末梢気道では、上皮下に好酸球の集積が強いことが知られている。

また、気管支喘息の増悪時の治療にステロイドの全身投与がしばしば用いられている。ステロイドは上皮細胞において Eotaxin の産生を低下させるといわれているが、上皮下に

IL-4 は、IL-4 受容体複合体に結合し、JAK, STAT 系を介して Eotaxin の転写を起こす。JAK 1, 3 がリン酸化し、この JAK により、STAT 6 (signal transducers and activators of transcription) がリン酸化を受け、二量体を形成し、核内に情報を伝達する。STAT6 は、STAT6 binding site に結合して、Eotaxin の転写が始まる。

正常ヒト肺線維芽細胞において、IL-4 依存性の Eotaxin 産生がみられるかどうか、また、Eotaxin 産生に対するステロイドの効果について検討する。

B. 研究方法

正常ヒト肺線維芽細胞(normal human lung fibroblast;NHLF)を培養し、IL-4(10ng/mL)、あるいは IL-13(10ng/mL)で刺激し、同時に 10^{-4} ~ 10^{-8} M のデキサメサゾン (DEX)、ハイドロコチゾンあるいはプレドニソロンを添加したあとに、エオタキシン蛋白質、mRNA、を測定し、プロモーターアッセイを行った。エオタキシン蛋白質の定量は、IL-4、DEX の添加後 24, 48, 72 時間後の培養上清中のエオタキシン蛋白質を ELISA 法にて測定した。エオタキシン mRNA の測定は、IL-4、DEX の添加後 12, 24, 48, 72 時間後に Isogen にて total RNA を抽出し、Reverse Transcriptase で mRNA から cDNA を作成し、エオタキシンおよび β アクチン、IL-4 受容体 α 鎖の転写量を Real-Time PCR 法で測定した。

IL-4、DEX の添加した後、蛋白合成を阻害する Cycloheximide (CHX) (100 nM)、NF- κ B の阻害薬を添加し、72 時間後にエオタキシン mRNA を抽出し測定した。

IL-4 と DEX の添加により発現する新規蛋白質を同定するために、バイオプレックスを用いて 17 種類のサイトカイン・ケモカインを網羅的に検討した。

C. 研究結果

エオタキシン蛋白質は、IL-4 の刺激により発現が増強した。しかし、IL-4 と同時に DEX を添加すると、エオタキシン蛋白質は、24 時間後では抑制されたが、48 時間後、72 時間後ではさらに増強していた。

エオタキシン mRNA は、IL-4 の刺激により発現が増強した。DEX を添加すると、24 時間後までは抑制されたが、48 時間以降は増強していた。また、この DEX の濃度を 10^{-5} ~ 10^{-8} M

と変えて添加した実験では、IL-4、DEX 添加 72 時間後において、DEX 10^{-6} M でエオタキシン mRNA は最も強く発現していた。

IL-13 に関しても、IL-4 と同様にエオタキシンの産生を増強し、DEX の添加により、さらにエオタキシン発現を増強した。

48 時間以後のエオタキシン mRNA、蛋白質の発現の増強の機序を解明するために、以下の実験を行った。IL-4 や DEX の添加により、細胞の増殖があるかどうか調べるため、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞数を測定したところ、細胞数に変化はなく、DEX は細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

IL-4、DEX の添加した後、蛋白合成を阻害する Cycloheximide (CHX) (100 nM) を添加し、72 時間後にエオタキシン mRNA を抽出し測定した。その結果、IL-4 と DEX を添加により発現が増強したエオタキシン mRNA は、CHX の添加によりほぼ完全に抑制された。これにより、新規蛋白質の合成を介する可能性が示唆された。

IL-4 と DEX の添加により発現する新規蛋白質を同定するために、バイオプレックスを用いて 17 種類のサイトカイン・ケモカインを網羅的に検討した。その結果、IL-4 が IL-4 単独に比して DEX 添加により上昇していることが分かった。一方、IL-4 受容体 α 鎖の発現増強はみられなかった。また、NF- κ B の阻害薬を用いた検討より、この経路を介さない可能性が示唆された。

D. 考察

正常ヒト肺線維芽細胞において、IL-4 依存性のエオタキシン産生がみられ、その産生に対し、ステロイドは、24 時間以内の早期ではエオタキシンの mRNA や蛋白質の発現は抑制

された。一方、48時間後以降では、逆に増強していた。この機序に関して、新規に生成される IL-4 を含めた蛋白質により、エオタキシンの産生が増加することが推定された。

24時間以降も IL-4 とステロイドをインキュベーションすると、エオタキシンの産生が、反対に亢進することが示された。これは、24時間以降も転写ならびに蛋白質への翻訳も増強していた。この現象の機序を解明するために、いくつかの実験を行った。

次に、我々は24時間以降のエオタキシン亢進に、新規に産生された蛋白質を介しているかを検討するために、蛋白合成抑制薬であるシクロヘキサミドを用いて実験を行った。その結果、シクロヘキサミド添加により、デキサメタゾンによる IL-4 のエオタキシン mRNA の産生亢進を完全に抑制された。このことより、新規に産生された蛋白質を介して増強効果が起こることを示している。この蛋白質の同定を行うために、培養上清中のサイトカインを網羅的に検討してみた。

Th1 や Th2 サイトカインに加えて、炎症性サイトカインやケモカインなど 17 種類を同時に測定できるキットを用いて検討を加えた。その結果、デキサメタゾンを加えた系において、IL-4 が有意に亢進していることが示された。IL-4 は、先に添加をしているが、IL-4 単独の系以上の上昇を示していた。すなわち、ステロイドは IL-4 の autocrine な増強効果を示す可能性を示唆している。IL-4 の mRNA 発現に対する効果のさらなる検討が必要と思われる。

Yamamoto らは、気道上皮において IL-4 によるエオタキシン 3 の産生に対して、インターフェロンの 48 時間の前処置により、増強効果を示すことを報告している。その機序と

して、IL-4 受容体 α 鎖の発現増強を介していることを示している。我々も、IL-4 受容体 α 鎖の発現増強を介しているかを検討したが、ステロイドの添加では、有意な増強作用を認めなかった。今後、デキサメタゾンの前処置における影響を検討する必要があると思われる。

さらに、新規に産生された蛋白質による効果が NF- κ B を介しているかを検討するために、NF- κ B の阻害薬を前処置して検討した。その結果、NF- κ B の阻害効果は認められなかった。この結果は、新規産生蛋白質の役割において NF- κ B が関与していないことを示している。今後、代表的な細胞内信号系である MAPK 系に関しても検討していく必要がある。

E. 結論

Th2 バランス (IL-4 刺激下) においては、肺線維芽細胞からも気道上皮と同様に Eotaxin を産生し、喘息の気道炎症に関与する可能性が示唆された。デキサメタゾンは 2 面性の効果を示し、気道炎症に対する短期抑制効果は確認されたが、中止後にリバウンドが生じる可能性が示唆された。

F. 研究発表

学会発表

- 1) 鈴木僚子、荒川浩一他：鈴木僚子、荒川浩一他：正常ヒト肺線維芽細胞における Eotaxin 発現に対するデキサメタゾンの影響とその分子メカニズムの検討、第 17 回日本アレルギー学会 2005. 5 (岡山)
- 2) 鈴木僚子、荒川浩一他：正常ヒト肺線維芽細胞における Eotaxin 発現に対するデキサメタゾンの影響とその分子メカニズムの検討、第 42 回日本小児アレルギー学会 2005. 11 (福