

● 平成15年度

喫煙曝露の喘息病態への影響の検討

**B. 方法** C57bl6マウスおよびBalb/cマウスを6群に分けて検討した。1) 無処置, 2) 喫煙曝露のみ、卵白アルブミン (OVA)+alumで免疫後、3) 無処置, 4) 喫煙曝露, 5) OVA吸入, 6) OVA吸入+喫煙曝露。曝露期間は以下の2群に分けた。実験 ①: OVA+alum免疫後、OVA吸入と同時に2週間喫煙曝露, 実験 ②: OVA+alum免疫開始時から計7週間曝露。最終曝露24時間後、気道過敏性を測定し、血清、肺胞洗浄液、病理組織を採取した。

喫煙曝露はマウス用隔離型全身曝露装置 (M・I・P・S社製)、煙草はhi-liteを使用し、週に6日間・1日1回の条件で曝露した。曝露量は、尿中コチニンを測定し、ヒトの喫煙での最高レベル15,000 (ng/ml)相当になるように設定した。

気道過敏性の測定ではAChを低濃度より3分間ずつ順次吸入させ、body plethysmograph内、覚醒下でenhanced pause (Penh)を測定し、吸入前値 (100%Penh)に対する%値を%Penhとして評価した。

**C. 結果**

最初にIgE産生に及ぼす影響を検討した。総IgE及びOVA特異的IgEは、OVA単独吸入群と比較して、煙草曝露とOVA吸入を併用しても抗体価に差異は認めなかった。次にBALF細胞について検討した。短期間の喫煙曝露では総細胞数の有意な減少を示した (図1)。この減少は好酸球数の減少によるものであった。気道過敏性も同様に有意に抑制された (図1)。

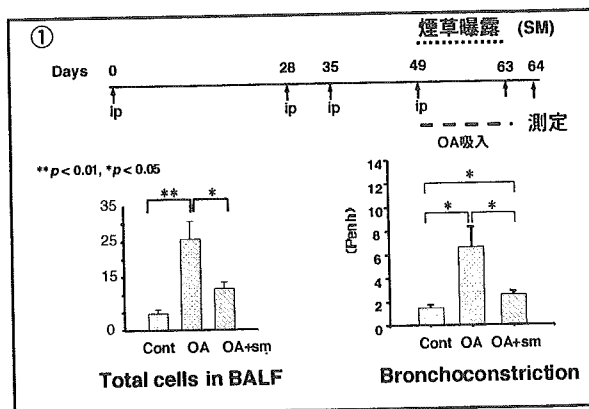


図1: 喫煙短期曝露の影響 (n=5)

一方、7週間曝露ではBALFの総細胞数はOVA単独群とOVA+喫煙曝露群の間で差異がなかった。喫煙単独群ではコントロールと比較して有意な細胞数の増加があり、特にマクロファージと好中球の増加が認められた。気道過敏性は、OVA単独曝露群と喫煙曝露併用群の間に有意差を認めなかった。

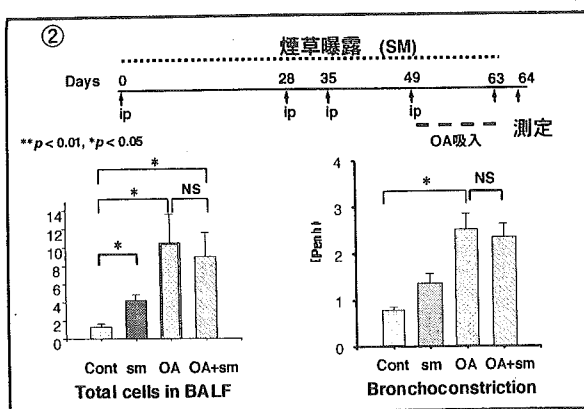


図2: 喫煙長期曝露の影響 (n=5)

さらにmRNAの発現について検討すると好中球の活性化および浸潤に関連するTNF- $\alpha$ およびMIP-2の有意な上昇が喫煙曝露群で認められた(図3)。

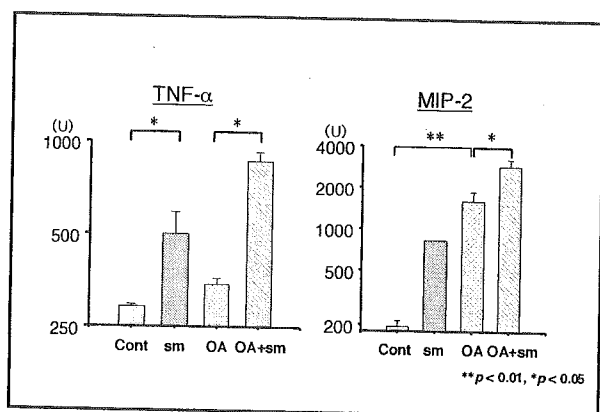


図3: サイトカインmRNA発現 (n=3)

#### D. 考察

喘息の発症に関与する因子として遺伝、アレルゲンなどが重要であるが、胎外因子として環境因子も大きく関わっている。喫煙が喘息へあたえる影響として、直接気道収縮を引き起こす刺激として作用するのみならず、気道炎症を惹起し、喘息状態の悪化因子として作用するとの報告も既に存在する。本実験では短期間の曝露では炎症抑制傾向があった。この原因はさらに検討の必要があるが、喫煙曝露では一般的にTh1タイプのサイトカインが誘導されることが知られており、短期の曝露ではTh1サイトカインが誘導されることにより、アレルギー炎症により惹起される気道過敏性が低下したことが想定された。長期曝露では、TNF- $\alpha$ およびMIP-2など、好中球遊走および活性化に関連するサイトカインやケモカインの上

昇を認め、これらが、気道炎症悪化に関与していることが示唆された。

我々は既にディーゼル排気微粒子(DEP)の単独投与が気道過敏性を惹起することを報告した。喫煙曝露は単独では気道過敏性を惹起しなかった。今回は示さないが、長期の喫煙単独曝露は肺の気腫化を促進したが、この時点でも気道過敏性は変化しなかった。本結果は喫煙が直接的には気道過敏性を惹起しないことを示したものだが、喘息患者に喫煙を許可するという形に解釈されるものではなく、一律に扱われている非特異的な刺激物質の気道への作用機序が異なることを示唆する所見である。

#### E. 結論

長期喫煙曝露は気道炎症の悪化に働いたが、気道過敏性を悪化させる直接作用は認めなかった。

● 平成16年度

菌体成分による気道上皮細胞活性化・細胞死の網羅的検討 (*in vitro*)

**B. 方法** 気道上皮細胞株BEAS-2B, および文書にて同意を得た肺癌手術検体の健康部由来のヒト初代培養気道上皮細胞をTLR2 (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>), TLR3 (poly I:C), TLR4 (LPS), TLR5 (Flagellin), TLR7/8 (R-848), TLR9 (CpGDNA)リガンドで72時間刺激後、培養上清中のIL-8, IP-10をELISAにて定量した。また、細胞生存をannexin-V, propidium iodideによる二重染色後、FACSを用いて解析した。TUNELアッセイでも細胞死を検討した。

**C, D. 結果および考察** まず、いかなるTLRリガンドが気道上皮細胞を活性化するかを明らかにする目的でケモカイン産生を指標として網羅的に検討した。図4に示すように、BEAS-2Bにおいて、TLR3リガンドであるpoly I:Cのみが有意なIP-10産生を誘導し、IL-8産生を有意に増強した。また、同様の結果がヒト初代培養気道上皮細胞でも得られた。TLR3リガンドが気道上皮細胞を活性化することは知られていたが、種々のTLRリガンドの中でも、気道上皮細胞はTLR3リガンド特異的に活性化されることが明らかとなった。

喘息気道の重要な病理学的所見は、気道上皮細胞の損傷、剥離であり、気道上皮細胞死が病態形成に関与すると想定されている。ウイルス感染気道上皮細胞がアポトーシスに陥ることは報告されてきたが、いかなるウイルス成分が責任分子であるかは明らかではなかった。そこで、TLRリガンドの気道上皮細胞生存に及ぼす影響を網羅的に解析した。図5に示すように、ケモカイン産生パターンと同様に、TLR3リガンドのみが有意に生存細胞

を減少させ、アポトーシス、ネクローシス細胞を増加させた。また、細胞死誘導をTunelアッセイを用いて検討したが、同様にpoly I:Cが気道上皮細胞死を誘導することが確認された。BEAS-2Bを用いた実験結果をヒト初代培養気道上皮細胞でも検討したが、BEAS-2B同様にpoly I:Cのみが細胞生存を短縮し、アポトーシス細胞を増加させた。

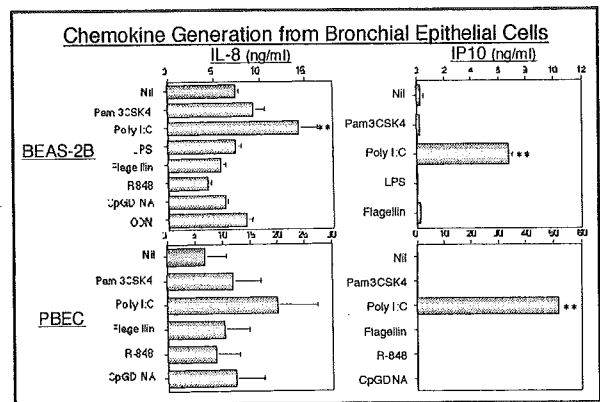


図4: TLRリガンドによる気道上皮細胞からのケモカイン産生

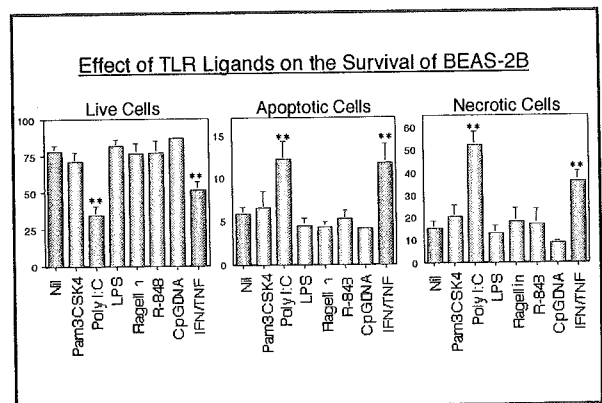


図5: TLRリガンドの気道上皮細胞生存に及ぼす影響

次にpoly I:Cによる気道上皮細胞死がTLR3を介していることを抗TLR3モノクローナル抗体を用いて確認した。図6に示すように、抗TLR3抗体は無刺激での気

道上皮細胞生存には影響を与えなかったが、poly I:C刺激下では有意に生存減少を回復させ、気道上皮細胞死におけるTLR3の関与が示された。

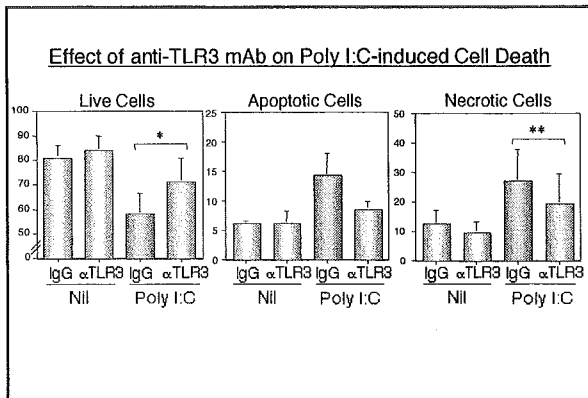


図6 Poly I:Cによる気道上皮細胞死に及ぼす抗TLR3抗体の影響

poly I:Cはウイルス増殖過程で生成される二重鎖RNAのアナログである。種々のウイルスが、気道上皮細胞活性化、細胞死を惹起することが知られてきたが、以上の結果よりウイルス成分の中でも二重鎖RNAが重要な役割を果たしていることが示唆された。またその受容体であるTLR3の関与も抗TLR3抗体を用いた検討で示された。さらには、気道上皮細胞がTLR3リガンドに特異的に反応することから、気道上皮細胞はウイルス特異的に活性化される可能性も示唆された。

正常状態では、ウイルス感染気道上皮細胞はケモカインを産生して生体防御に必要な炎症細胞を集積させると共に、自らの細胞死によりさらなるウイルスの増殖、伝播を防いでいる可能性がある。一方で惹起される炎症や、気道上皮細胞死がアレルギー性炎症存在下ではその増悪につながる可能性が示唆された。

## E. 結論

気道上皮細胞活性化、細胞死誘導に関与する菌体成分としてTLR3リガンドであるウイルスdsRNAが同定された。TLR3の阻害は感染時に惹起される過剰な炎症や気道上皮細胞死によるアレルギー性気道炎症増悪の抑制につながる可能性があり、新たな治療標的候補たりうる可能性がある。しかしながら、潜在的にはウイルスに対する生体防御を弱める可能性もあり、有効な抗ウイルス薬の開発も重要と考えられる。TLR3は樹状細胞、肥満細胞等での発現も報告されている。平成17年度は本件等に基づき、動物モデルを用いて、TLR3リガンドが惹起する炎症病態の総合的な検討を行い、ウイルス感染によるアレルギー性炎症増悪機構をさらに明らかにすることを試みた。

●平成17年度

ウイルス二重鎖RNAが既存の  
アレルギー性炎症に及ぼす影響の検討  
(*in vivo*)

**B. 方法** 5週齢のA/Jマウスを用い、OVA腹腔感作、点鼻チャレンジによる喘息モデルの作成後、poly I:Cを3日間点鼻投与し、気道過敏性測定、気管支肺胞洗浄、病理学的検討、アポトーシス解析を行った。全例に、OVA腹腔内投与による感作をまず行い、その後の点鼻は4群に分けて検討した。1) PBS点鼻のみのコントロール群、2) PBS点鼻の後にpoly I:C点鼻を行ったウイルス感染単独モデル群、3) OVA点鼻チャレンジを行った喘息モデル群、4) OVA点鼻チャレンジ後に引き続きpoly I:C点鼻を行った喘息+ウイルス感染モデル群とした(図7)。

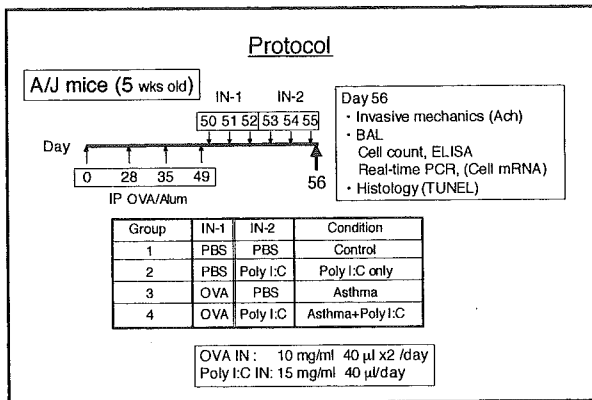


図7: 実験プロトコル

**C, D. 結果および考察** 気管支肺胞洗浄液 (BALF)の細胞成分は、OVAチャレンジ (喘息モデル群)で好酸球、リンパ球数が増加していたが、poly I:Cを引き続き点鼻すると (喘息+ウイルス感染群)、好酸球、リンパ球、マクロファージが有意に増加し (図8)、気道周囲の炎症細胞浸潤が増強し、アポトーシス細胞も増加した

(図9)。気道過敏性も有意に亢進した (図10)。

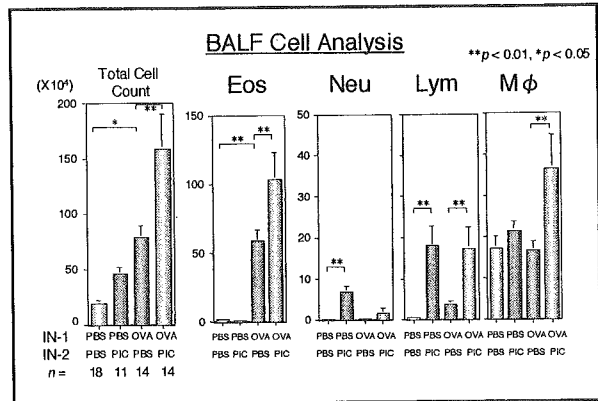


図8: BALF細胞分画

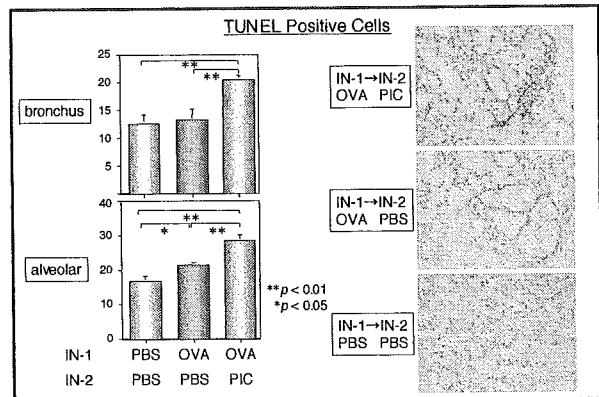


図9: アポトーシス細胞解析

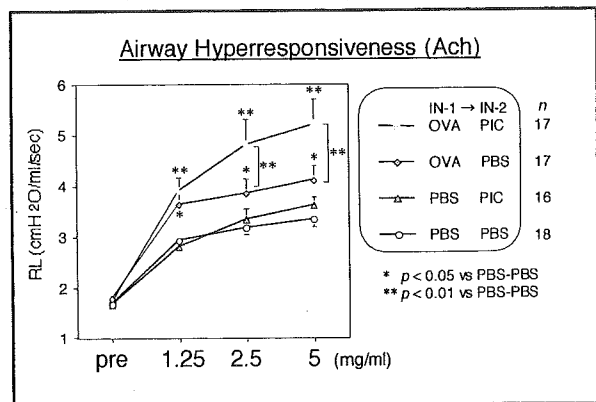


図10: Achに対する気道過敏性

また、好酸球、リンパ球等の細胞集積が増強したメカニズムを明らかにする目的で、BALF上清中のケモカイン濃度を測定した。好酸球指向性のeotaxinやTh2リンパ球指向性のTARC濃度はOVA点鼻の喘息モデル群で上昇していたが、poly I:C追加点鼻でのさらなる上昇は認められなかった。一方、好酸球、活性化リンパ球指向性のRANTES濃度はpoly I:C追加投与でOVA単独群に比して、有意な産生増強を認めた(図11)。

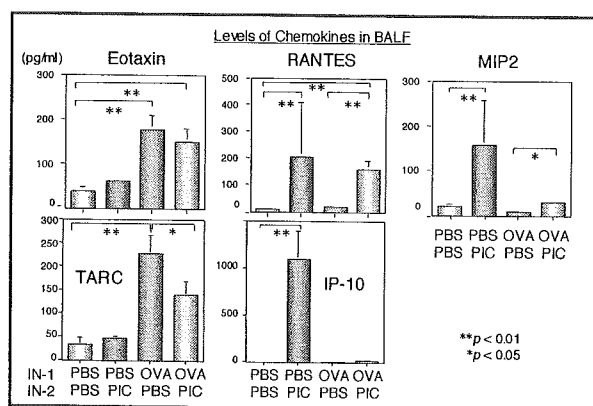


図 1 1 : BALF中ケモカイン濃度

また、局所のサイトカイン環境がTh1/Th2のいずれであるかを検討するために、BALF細胞のIFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNAを測定したが、OVA単独投与の喘息モデル群に比して、poly I:C追加投与群ではIFN- $\gamma$ 、IL-4双方のmRNAが増加していた(図12)。

以上のことから、TLR3リガンドであるdsRNAは、好酸球、リンパ球などの炎症細胞集積増強、RANTES等のケモカイン産生増強、肺構築細胞のアポトーシス誘導、IL-4、IFN- $\gamma$ 産生細胞の集積を惹起することで喘息モデルマウスの気道炎症を増悪させ、機能的に気道過敏性を亢進させることが示された。

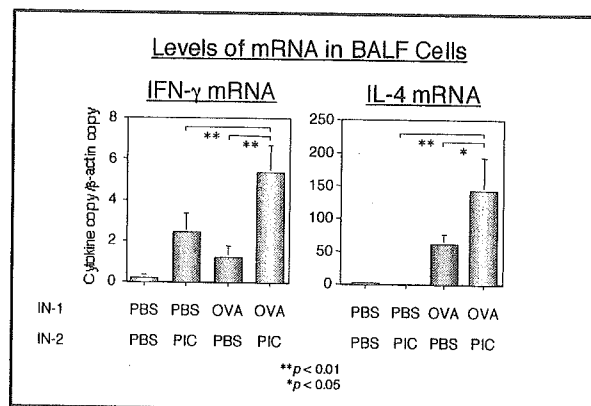


図 1 2 : BALF細胞mRNAの検討

**E. 結論** ウイルス成分のひとつであるdsRNAのみによっても、既存のアレルギー性炎症は増悪し、気道過敏性は亢進した。既存の喘息増悪に参与する胎外因子として、ウイルスdsRNAが関与することが強く示唆された。dsRNA/TLR3経路の阻害はウイルス感染による気管支喘息増悪の治療標的候補たりうる可能性も想定された。

## F. 業績

### 1. 論文発表

1. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Kaneko F, Nakano J, Kato H, Hirai K, Horiuchi T, Ohta K. Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of GM-CSF. *Cell Immunol* 2002;219:92-7.
2. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 2003;171(8):3977-82.
3. Komiya A, Nagase H, Yamada H, Sekiya T, Yamaguchi M, Sano Y, et al. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol* 2003;225:91-100.
4. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Arai H, Nagase H, Adachi T, Ohta K. Role of insulin-like growth factor-I in allergen-induced airway inflammation and remodeling. *Cell Immunol* 2005;235:85-91.
5. Suzukawa M, Hirai K, Iikura M, Nagase H, Komiya A, Yoshimura-Uchiyama C, Yamada H, Ra C, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. IgE- and FcepsilonRI-mediated migration of human basophils. *Int Immunol* 2005;17:1249-55.
6. Meng J, Thongngarm T, Nakajima M, Yamashita N, Ohta K, Bates CA, Grunwald GK, Rosenwasser LJ. Association of transforming growth factor-beta1 single nucleotide polymorphism C-509T with allergy and immunological activities. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:151-60.
7. Nakano J, Yano T, Yamamura K, Yoshihara H, Ohbayashi O, Yamashita N, Ohta K. Aminophylline suppress the release of chemical mediators in treatment of acute asthma. *Respir Med* 2006;100:542-50.
8. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Tamauchi H, Terashima M, Yoshiwara I, Habu S, Ohta K. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 Feb 17; [Epub ahead of print]
9. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Comparison of Expression and Function of Toll-like Receptors in Eosinophils and Neutrophils. *Allergy Clin Immunol Int* 2006 (in press)
10. 長瀬洋之, 平井浩一, 大田健: 好酸球と Toll-like receptors. *Asthma frontier* 3:20-28, 2004. 医薬ジャーナル社.
11. 長瀬洋之, 大田健: 喘息と Toll-like receptor. *Annual Review 呼吸器* 2005、中外医学社、東京、73-78、2005.
12. 長瀬洋之、大田 健: 自然免疫とアレルギー・気管支喘息 呼吸と循環 53(4):377-83, 2005.
13. 長瀬洋之: 喘息とウイルス感染 *Annual Review 呼吸器* 2006、中外医学社、東京、66-71、2006.

## 2. 学会発表

1. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K: Cytokine-Mediated Regulation of Toll-like Receptor Expression in Eosinophils. American Academy of Allergy Asthma & Immunology (AAAAI) 60<sup>th</sup> Annual Meeting, Mar, San Francisco, USA, 2004.
2. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K Comparison of Expression and Function of Toll-like Receptors in Eosinophils and Neutrophils. Collegium Internationale Allergologicum 25<sup>th</sup> Symposium, Aug. 28, Bornholm, Denmark, 2004.
3. Nagase H, Hirai K, Adachi T, Nakano J, Yamamoto K, Yamashita N, Ohta K: Effect of Toll-like receptor ligands on survival of human bronchial epithelial cells. 62<sup>nd</sup> AAAAI Annual Meeting, San Antonio, USA, March, 2005.
4. Nagase H, Yamashita N, Adachi T, Nakano J, Ohta K: Toll-like Receptor 3 (TLR3) Ligand Exacerbates Pre-existing Allergic Airway Inflammation in Murine Asthma Model 63<sup>rd</sup> AAAAI, Miami, USA, March, 2006.
5. 長瀬洋之、平井浩一、山下直美、足立哲也、中野純一、山本一彦、大田健: Toll-like受容体刺激による気道上皮細胞からのケモカイン産生とサイトカインによる制御. 第54回日本アレルギー学会総会 11/4, 横浜, 2004.
6. 長瀬洋之、平井浩一、大田健: シンポジウム10: アレルギー治療の分子標的薬 2. 細胞表面の受容体を標的とする治療戦略. 第54回日本アレルギー学会総会 11/6, 横浜, 2004.
7. 長瀬洋之、平井浩一、大田健: シンポジウム3 アレルギー疾患の新治療戦略 2. 細胞表面の受容体を標的とする治療戦略 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会 盛岡 2005年10月
8. 長瀬洋之、山下直美、足立哲也、中野純一、大田健: TLR3 リガンド poly I:C がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響 第55回日本アレルギー学会総会 盛岡 2005年10月



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

気管支喘息の胎外因子としてのウイルス感染、胎内因子としての遺伝子多型

分担研究者 足立満 昭和大学第一内科教授

**研究要旨：**ウイルス感染は気管支喘息の発症、増悪因子として重要であることが認識されている。気管支喘息の基本病態は慢性の気道炎症細胞浸潤と気道上皮の傷害に伴う気道過敏性の亢進である。この病態は、好酸球やリンパ球などの炎症細胞が気道へ浸潤することにより形成される。ウイルスによる上気道感染時の気管支喘息増悪は臨床上周知の事実である。アレルギー性気道炎症がウイルス感染によりどのように変化修飾を受けるのか、すなわちウイルス感染時にいかなる因子の関与により好酸球やリンパ球などの炎症細胞は活性化され気道炎症増悪が誘導されるのかなどについての詳細は不明な点が少なくない。このような背景より環境要因の中でも感染は極めて重要と考えられるため、我々は感染因子としてのウイルスにつき基礎的検討を行い気管支喘息悪化要因としての感染に対する検討を加えた。すなわちウイルス感染による喘息増悪の機序を解明する目的で気道上皮に着目し研究を実施した。気道内腔表面に存在する気道上皮は外界とのバリアー機能やその線毛運動などによる異物排除機能が研究の対象とされてきたが、近年気道上皮細胞へ種々の刺激を加えることによりサイトカイン、ケモカインなどの生理活性物質の産生放出や ICAM-1 などの接着分子の発現が観察されている。これらの結果は気道上皮細胞が気道炎症形成にあたり積極的に何らかの役割を演じていることを想定させる。我々は *in vitro* における気道上皮細胞培養系を確立し、これに対しインフルエンザウイルス感染やウイルス感染モデルである dsRNA 刺激を行い新たな生理活性物質の産生などにつき検討を加えた。気道上皮刺激後に Real Time - PCR 法を用いて MIP-1 $\alpha$ , RANTES, IP-10, MCP-1, SR-PSOX, IL-1R antagonist などの炎症関連因子や生体防御因子の発現を検討した。さらに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/調節機序を分子生物学的観点から追求することは、その病態の理解や治療への発展に不可欠であると考えられる。よって感染時に重要と考えられるサイトカイン/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検討を加えた。

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 *in vitro*, *in vivo* においてウイルス感染との関連について検討するとともに、インフォームドコンセントが得られた気管支喘息患者について IL-17F 遺伝子解析を行い臨床的関連につき検討を加えた。

以上の結果より 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える。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。感染は喘息のみならず全ての気道疾患においてその病態を修飾し大きな影響を及ぼす。しかしながら現時点では一部のウイルスを除いてはその感染に対する根治療法はない。このような観点からも、ウイルス感染の影響を検討することは極めて重要である。予防、治療法を考える上でもその実態を明らかとすべく今後も研究を進展させ基礎的検討のみならず臨床的検討においてもさらなる詳細の解明が必要と考えられる。

研究分担者

國分二三男 昭和大学第一内科(助教授)  
松倉聡 昭和大学第一内科  
川口未央 昭和大学第一内科

A. 研究目的

ウイルス感染は気管支喘息増悪リスクとしての環境要因の中でも最も重要な因子の一つと考えられる。よってその詳細について検討することは極めて重要と考えられる。*in vitro* 気道上皮細胞

培養系における検討は、近年注目されつつある分野であり現在までに気道上皮はIL-6,8,GM-CSF,RANTESなどの生理活性物質を産生し気道炎症特にアレルギー性炎症の形成に関与することが明らかとなっている。今回我々はin vitro 気道上皮細胞培養系を用い転写メカニズムの解明されていないサイトカイン/ケモカインの動態につき検討を加えた。

また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については不明な点が多い。我々は、気管支喘息におけるIL-17Fの役割をin vitro, in vivo で検討するとともに、インフォームドコンセントが得られた気管支喘息患者についてIL-17F遺伝子解析を行った。

## B. 研究方法

平成15年度

好酸球、Th2リンパ球に特異性が高いケモカインとしてEotaxinが注目されており、上皮細胞からのEotaxinの発現を、インフルエンザウイルスを含めた様々な状況下で検討した。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/調節につき様々な角度から検討/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、また、将来の治療の進歩に不可欠であると考えられる。今回特に、まだ転写メカニズムの解明されていないEotaxin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。さらに気道上皮細胞の炎症形成への関与のさらなる詳細を検討するため接着分子であるICAM-1発現機構の解析を核内蛋白質との関連で検討した。

平成16年度

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/調節につき様々な角度から検討/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、また将来の治療の進歩に不可欠であると考えられる。今回特に、まだ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RealTime-PCR法を用いてMIP-1 $\alpha$ , 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た。

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in vitro, in vivo で検討するとともに、インフォームドコンセントが得られた気管支喘息患者についてIL-17F遺伝子解析を行い臨床的関連につき検討を加えた。

平成17年度

我々はウイルス感染実験モデルとしてdsRNAを刺激物質として用いた実験を行った。気道上皮細胞はdsRNA刺激により、時間経過とともにIL-6,IL-8,RANTESなどを測定した。IL-8,RANTESのmessageについてはRT-PCR法を用いて検討した。RANTESのpromoter領域を用いた発現実験においてNF- $\kappa$ b, IRFの関与が確認された。さらにTLR-3との関係につき検討を加え細胞内情報伝達にどのような因子が関与しているかにつきsiRNAを使用し検討を加えた。また気管支喘息におけるIL-17Fの関与について検討を加えた。

## C. 研究結果

平成15年度

気道上皮細胞はEotaxinを発現し、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ によりその発現は増強された。さらに、インフルエンザウイルス感染により著明なEotaxinが誘導された。気道上皮におけるIL-8, RANTESの発現は、ステロイド(dexamethasone)にて抑制を受け、その臨床治療上の重要性が、in vitroの上皮細胞を焦点においた検討からも確認された。

平成16年度

気道上皮細胞はdsRNA刺激により、時間経過とともにIL-6,IL-8,RANTESを測定した。上清中のサイトカインについての検討ではIL-8,RANTES濃度はdsRNA刺激後24,48時間と増加が見られ有意(P<0.05)にその産生増加が認められた。Real Time - PCR法を用いてMIP-1 $\alpha$ , 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- $\kappa$ 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

において重要な働きを行っていることが確認された。

気管支喘息患者についての IL-17F 遺伝子解析結果において exon3 に SNPS が確認された。野生型 IL-17F を有する気管支喘息患者においては呼吸機能 FEV1.0 の有意な低下が観察された。リコンビナント野生型 IL-17F と変異型 IL-17F を用いた in vitro 実験においても野生型 IL-17F においてのみに IL-8, GRO  $\alpha$  の産生が見られた。

平成 17 年度

気道上皮細胞は dsRNA 刺激により、時間経過とともに IL-6, IL-8, RANTES を測定した。上清中のサイトカインについての検討では IL-8, RANTES 濃度は dsRNA 刺激後 24, 48, 時間と増加が見られ有意 ( $P < 0.05$ ) にその産生増加が認められた。IL-8, RANTES の message については RT-PCR 法を用いて検討した結果 mRNA レベルでの発現が確認された。RANTES の promoter 領域を用いた発現実験において NF- $\kappa$ B, IRF の関与が確認された。さらに現在 TLR-3 との関係につき検討を加え細胞内情報伝達に NF- $\kappa$ B, IRF の関与が確認された。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。

#### D. 考察

気道上皮細胞を用いた実験系において dsRNA 刺激より MIP-1  $\alpha$ , 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。すなわち感冒罹患により生体内でサイトカイン、ケモカインの産生増加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る。従来気道感染の重要性が指摘されている。特に成人喘息における増悪因子として、上気道ウイルス感染は特に重要と思われる。ウイルス感染により喘息がどのような機序により増悪するのか、すなわち喘息気道粘膜への好酸球やリンパ球等の炎症細胞浸潤はもつとも重要な病態であるが、この細胞浸潤/細胞の活性化がどのように引き起こされるのは不明である。また、ウイルス感染に限らず、喘息の基本病態は慢性の気道炎症細胞浸潤と気道上皮の傷害に伴う気道過敏性の亢進であるが、この病態を理解する上で、炎症細胞が気道へ浸潤する過程を解明することは非常に重要と考えられる。さらに

TLR3 による細胞内情報伝達に NF- $\kappa$ B と IRF が関与していることが推定されこれらを調節抑制することにより気道炎症制御への可能性が示唆された。IL-17F は IL-17 と同じ第 6 染色体 (6p21) に存在し、その距離はわずか 50kbp である。IL-17 ファミリーの中では最も高い 50% の類似性を示す。産生細胞は活性化 CD4<sup>+</sup>T 細胞 (Th0, 1, 2)、好塩基球、肥満細胞である。IL-17F mRNA は IL-17 mRNA と異なり、肺や肝臓を中心に広範囲の組織で発現している。これらのことから IL-17F は多機能を有して、多くの生体反応に関与していることが示唆される。機能として、気道上皮細胞から IL-6, IL-8, ICAM-1、内皮細胞から IL-6, IL-8, TGF $\beta$ , MCP-1、線維芽細胞から IL-8, G-CSF を誘導する。IL-17FR は同定されていないがシグナル伝達経路として MAPK (ERK1/2) を介する。抗原チャレンジ後の気管支喘息患者の BAL 中の細胞に IL-17F mRNA が発現することからアレルギー性気道炎症との関連が示唆されている。ヒト IL-17F 遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み、経気道的にマウスに投与すると気道への著明な好中球浸潤が認められる。これらの知見より IL-17F は気道炎症性疾患に関与する注目べきサイトカインの一つである。今回の検討で、野生型 IL-17F を有する気管支喘息患者においては呼吸機能 FEV1.0 の有意な低下が観察された。リコンビナント野生型 IL-17F と変異型 IL-17F を用いた in vitro 実験においても野生型 IL-17F においてのみに IL-8, GRO  $\alpha$  の産生が見られた。この結果は、野生型 IL-17F の臨床像への関連を裏付けるものであると考えられた。さらに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 の発現が確認されるとともに IL-17F は dsRNA 刺激により気道上皮細胞より発現が観察された。この結果より IL-17F は喘息病態へ関与しウイルス感染時に重要な役割を演じる可能性を示唆するものと考えられる。

#### E. 結論

ウイルス感染は喘息の増悪因子として重要であるが、その詳細な機序を解明すべく我々は in vitro 実験系を組み立てた。すなわちウイルス感染時の標的細胞である気道上皮細胞を培養しこれに対し各種サイトカイン刺激、ウイルス感染実験を行った。インフルエンザウイルス感染においてはアレルギー性炎症を形成する過程で重要と考えられるケモカインである RANTES, Eotaxin の産生を確認し、さらにその産生量の差異はそれぞれのケモカインのプロモーター領域の構造の違いによる

ことを明らかにした。またウイルス感染実験に用いたインフルエンザウイルス、ライノウイルス、RSウイルスなど気道感染ウイルスは大部分RNAウイルスであり、RNAウイルスは細胞内での複製過程において dsRNA を形成することが判明している。よってウイルス感染のより普遍的なモデルとして dsRNA 刺激を用いた実験を行った。その結果、dsRNA 刺激においてもウイルス感染と同様に RANTES, Eotaxin などのケモカインは産生されたが、ウイルス感染実験と同様にそれぞれの産生量には大きな違いがみられた。我々はこれらの実験の過程において気道上皮細胞に TLR3 が発現することを確認し、dsRNA による刺激がその受容体である TLR3 を介して行われることを推定した。さらに本実験の中で TLR3 による細胞内情報伝達に NF- $\kappa$ B と IRF が関与していることが推定された。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るとされる 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。しかしながら現時点では一部のウイルスを除いてはその感染に対する根治療法はない。このような観点より、気管支喘息病態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その予防、治療法を考える上で詳細な解明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 T cell, 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 Pasific 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
- 9) Kawaguchi M, Kokubu F, Kuga H, Matsukura S, Hoshino H, Ieki K, Adachi M, Huang SK. Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. *J Allergy Clin Immunol* 108:804-809 2003
- 10) Matsukura S., Kokubu F., Adachi M., Schleimer R.P. et al Differential regulation of eotaxin expression by IFN-g in airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 111;1337-1344 2003
- 11) Kawaguchi M, Kokubu F, Matsukura SHuang SK, Adachi M Induction of CXC Chemokines, GRO-a expression and ENA-78 by ML-1 (IL-17F) involves activation of Raf-1 MAPK ERK1/2 pathway. *J Pharm Exp Ther* 307:1213-1220 2003
- 12) Matsukura S., Kokubu F., Kurokawa M., Kawaguchi M., Ieki K., Odaka M., Suzuki S., Watanabe S., Adachi M. et al; Molecular mechanisms of repression of eotaxin expression with fluticasone propionate in airway epithelial cells.

- Int Arch Allergy Immunol 134;12-20 2004
- 13) Ieki K., Matsukura S., Kokubu F., Kurokawa M., Kawaguchi M., Odaka M., Suzuki S., Watanabe S., Adachi M. et al;  
Double-stranded RNA activates RANTES gene transcription through co-operation of NF-kB and interferon regulatory factors in human airway epithelial cells  
Clin Exp Allergy 34;745-752 2004
- 14) Kawaguchi M., Kokubu F., Matsukura S., Ieki K., Odaka M., Suzuki S., Watanabe S., Huang SK, Adachi M;  
Induction of GM-CSF by a new cytokine ML-1(IL-17F), via Raf-1 MEK ERK pathway. J Allergy Clin Immunol 114;444-450 2004
- 15) Kawaguchi M., Adachi M., Oda N., Kokubu F., SHuang SK; IL-17F cytokine family  
J Allergy Clin Immunol 114; 1265-73 2004
- 16) Watanabe S., Kokubu F., Matsukura S., Suzuki S., Kawaguchi M., Odaka M., Kurokawa M., Adachi M.; Prevention of asthma exacerbation with vaccination against influenza in winter season  
Allergy Int 54;305-309 2005
- 17) Kawaguchi M., Kokubu F., Matsukura S., Suzuki S., Huang SK, Adachi M et al ;  
Interleukin-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity  
J Allergy Clin Immunol (in press) 2006

ンポジウム) アレルギー 2005 54:920

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

学会発表

2) 研究成果

- 1) 國分二三男 松倉聡 足立満: ケモカインネットワークとウイルス感染(シンポジウム) アレルギー 2002 51:182
- 2) 松倉聡 國分二三男 足立満 他: ウイルス感染とケモカイン innate immunity との接点(シンポジウム) アレルギー 2002 51:828
- 3) 松倉聡 國分二三男 足立満 他: ケモカイン産生統御 発現調節 (シンポジウム) アレルギー 2002 51:821
- 4) 松倉聡 國分二三男 足立満 他: ウイルス感染と innate immunity(シンポジウム) アレルギー 2003 52:778
- 5) 鈴木慎太郎 國分二三男 松倉聡 川口未央 足立満 他: ウイルス感染と気管支喘息(シンポジウム) アレルギー 2005 54:973
- 6) 川口未央 國分二三男 鈴木慎太郎 松倉聡 足立満 他: IL-17F と気道上皮細胞(シ

## 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

Respiratory syncytial virus F タンパクは TLR4 および CD14 を介して認識され、Th1 型の免疫反応が誘導される。したがって TLR4、CD14 の発現および機能の低下は RSV 感染時の Th1 反応の誘導不全をきたし、RSV 細気管支炎の発症および細気管支炎後の反復性喘鳴および喘息発症に関与する可能性がある。

そこで本研究では、以下の研究を行った。

1) TLR4、CD14の発現・機能に関係する遺伝子多型とRSV細気管支炎および細気管支炎後の反復性喘鳴の関係を検討した。RSV細気管支炎患者および健康成人114名全てにおいて、TLR4の機能に関連する遺伝子多型として海外で報告されているAsp259Gly, Thr359Ileは認めなかった。CD14遺伝子多型については、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の割合およびCアリの割合が高かった。しかしながら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。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。一方、RSV細気管支炎後の反復性喘鳴がある群は、アンケート施行時における兄弟数が有意に多く、またアンケート施行時に集団保育がされている傾向があった。

2) CD14 遺伝子多型によって影響される可溶性 CD14 (sCD14) が RSV に対する自然免疫応答に与える影響を調べた。単球系培養細胞 THP-1 を RSV で刺激する実験では、LPS 刺激と同様に sCD14 は濃度依存的に RSV 刺激による IL-12p40 の産生を増強させることが明らかとなった。以上から、sCD14 値を決定している遺伝子因子および環境因子が細気管支炎後の喘鳴・喘息の発症に重要と考えられる

3)  $\gamma$   $\delta$  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- $\gamma$  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。

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、 $\gamma$   $\delta$  T細胞の機能、さらに $\alpha$   $\beta$  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ある。

### 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)

井上祐三朗 (千葉大学大学院医学研究院小児病態学)

菱木はるか (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)

星岡 明 (千葉県こども病院アレルギー科主任医長)

山出晶子 (千葉県こども病院アレルギー科)

青柳正彦 (国立療養所下志津病院アレルギー科医長)

沼田朋子 (千葉市立青葉病院小児科)

山口賢一 (千葉市立海浜病院)

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。

そこで本研究では初めに、TLR4, CD14の発現・機能に係る遺伝子多型とRSV細気管支炎および細気管支炎後の反復性喘鳴の関係を検討した。解析対象とした遺伝子多型としては、海外で報告されている機能的変化を伴うTLR4遺伝子多型Asp259Gly, Thr359Ile, CD14遺伝子の5'上流に位置し可溶性CD14 (sCD14) 量に関与するといわれているCD14遺伝子多型C(-159)TおよびC(-550)Tとした。次に、RSVに対する自然免疫応答に対するsCD14の影響を確認するためにin vitroの実験系で解析した。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- $\gamma$ の産生低下と細気管支炎後の反復性喘鳴が関係していたが、IFN- $\gamma$ 産生抑制の機序は明らかではなかった。そこでRSVによる $\gamma$   $\delta$  T細胞からのIFN- $\gamma$ 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、TLR4Asp259GlyおよびThr359Ile, CD14C(-159)TおよびCD14C(-550)Tの遺伝子多型解析を行った。そして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) RSV刺激によるin vitroでの単球系培養細胞株THP-1からのサイトカイン産生に対するsCD14添加の効果を検討した。

3)  $\gamma$   $\delta$  T細胞のリガンドである isopentenyl pyrophosphate (IPP) 刺激によるin vitroでのIFN- $\gamma$ 産生系にRSVを共存させた場合のIFN- $\gamma$ 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を検討した。

## C. 研究結果

1) RSV細気管支炎患者および健康成人114名全てにおいて、現在までにTLR4の機能に関連する遺伝子多型として海外で報告されているAsp259Gly, Thr359Ileは認めなかった (表1)。CD14遺伝子多型については、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2, 3)。しかしながら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多型の間に有意な関係はなかった (表4)。一方、RSV細気管支炎後の反復性喘鳴がある群は、アンケート施行時における兄弟数が有意に多かった ( $P=0.018$ )。 (図1) また、RSV細気管支炎後の反復性喘鳴がある群は、アンケート施行時に集団保育がされている傾向があった ( $P=0.09$ ) (表5)。

2) RSV刺激により単球細胞株THP-1は各種のサイトカインを産生する。そこで、IL-12p40を指標として、培養液中に異なる濃度のsCD14を加えてRSV刺激によるTHP-1細胞の反応性を検討した。その結果、LPS刺激と同様に (図2) sCD14は濃度依存的にRSV刺激によるTHP-1からのサイトカイン産生を増強させることが明らかとなった (図3)。

3) IPP刺激による末梢血 $\gamma$   $\delta$  T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生は、RSV存在下で抑制された (図4)。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5)。また、RSVによるIPP刺激末梢血 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生の抑制は、IL-12の添加により解除された(図6)。

#### D. 考察

1) これまで欧米においてはTLR4を介した認識の個体差についてTLR4の遺伝子多型の関与が報告されてきたが、我が国においてはTLR4の遺伝子多型は存在しないことから、TLR4を介した認識の個体差にはCD14の遺伝子多型が関与する可能性があると考えられる。我々の解析では、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が、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。また今回の研究から、RSV細気管支炎後の反復性喘鳴には、個体の素因以上に兄弟数や保育の有無などの感染への曝露の機会の多さが関連していると考えられた。少なくともRSV細気管支炎後の反復性喘鳴と遺伝子多型の関連の評価にはこのようなconfounding factorを考慮する必要があると考えられる。Zdolsekらのデータでは、アトピーと非アトピーでのsCD14値は学童期以降は有意な差をもってアトピー群で低いが乳児期には差異がない。この結果は、乳幼児期のsCD14量に関してCD14遺伝子多型などの遺伝因子以外に環境因子の影響が大きいと考えられる。そこで今後は、sCD14量の規定に関与する可能性のある環境因子として環境中

のエンドトキシン量などの測定も必要と考えられる。

2) sCD14を培養系に加えるとRSV刺激による単球細胞株からのサイトカイン産生がsCD14の濃度依存的に増加したことから、少なくともCD14がRSVの認識に関与することが確かめられた。Sofermanらは、RSV細気管支炎罹患時のsCD14値の多寡がその後の反復性喘鳴の有無と関連することを報告しており、CD14分子がRSVに対する自然免疫応答に関与している可能性は高い。Guerraらは、臍帯血中sCD14が低値の群では生後1年以内の反復性喘鳴のリスクが高いことを示している。したがって、機能に関連したTLR4遺伝子多型が存在しないと考えられる日本人においてはRSVによる細気管支炎の重症化・その後の反復性喘鳴にCD14の関与はより大きな可能性がある。CD14多型は血清sCD14値の多寡に関与しているとの報告は多く、sCD14値がRSV細気管支炎後の反復性喘鳴・喘息と関連するならば、CD14遺伝子多型との関連も予想される。

3) IPP刺激による末梢血 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- $\gamma$ 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 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- $\gamma$ 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) sCD14はRSVへの個体の免疫応答を規定していることから、sCD14値を決定している遺伝子因子および環境因子が細気管支炎後の喘鳴・喘息の発症に重要と考えられる

3) 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。

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、 $\gamma\delta$ T細胞の機能、さらに $\alpha\beta$ 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7)

## F. 健康危険情報

本研究は国民の生命、健康に重大な危険影響を及ぼすことはない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

下条直樹, 井上祐三朗, 富板美奈子, 藤井克則, 菱木はるか, 石和田稔彦, 青柳正彦, 西牟田敏之, 河野陽一: 小児気管支喘息の発症・増悪に及ぼす感染症(ウイルスを含む)の役割 基礎と臨床 Innate immunityと気管支喘息. 日本小児アレルギー学会誌: 2004;18:19-24

下条直樹: 気道感染と喘息発症 自然免疫の役割. アレルギーの臨床: 2005;25:33-37

### 2. 学会発表

Yuzaburo Inoue, Naoki Shimojo, Akiko Yamaide, Shuichi Suzuki, Tomoko Matsuura, Minako Tomiita, Akira Hoshioka, Yoichi Kohno: The single nucleotide polymorphisms of CD14/TLR4 and subsequent development of recurrent wheezing after respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis in Japanese children. World Allergy Congress (Munich 6/26-7/1/05)

Yuzaburo Inoue, Naoki Shimojo, Eduardo Campos, Akiko Yamaide, Shuichi Suzuki, Takayasu Arima, Tomoko Matsuura, Minako Tomiita, Masahiko Aoyagi, Akira Hoshioka, Yoichi Kohno: Single nucleotide polymorphisms of CD14 are associated with the development of respiratory syncytial virus

(RSV)-induced bronchiolitis in Japanese children. 第55回日本アレルギー学会総会(10/20-22/2005 盛岡)

井上祐三朗, 下条直樹, 富板美奈子, 河野陽一: RSVへの自然免疫応答に対する可溶性CD14の影響について. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(6/2-4/2005 岡山)

河野陽一: ウィルス感染と気管支喘息発症との関わり. 第19回東北小児喘息アレルギー研究会(6/12/2004 仙台)

井上祐三朗, 下条直樹, 山出晶子, 鈴木修一, 沼田朋子, 富板美奈子, 青柳正彦, 星岡明, 河野陽一: RSV細気管支炎患者におけるTLR4およびCD14の遺伝子多型解析. 第54回日本アレルギー学会総会(11/4-6/2004 横浜)

## 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. 実用新案特許 なし
3. その他 なし

表1

TLR4多型の解析結果

TLR4多型	LPSに対する 反応性	多型の有無	
		国外	日本人
299	低下	あり	なし
399	低下	あり	なし

表4

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 (χ<sup>2</sup>乗検定)

表2

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5

細気管支炎後喘鳴と集団保育の関係

	喘鳴あり	喘鳴なし
保育あり	5	3
保育なし	5	15

§ : p=0.091 (Fisher直接法)

表3

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1

細気管支炎後喘鳴と兄弟数の関係

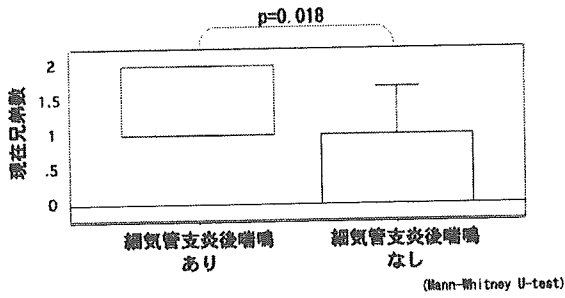


図4

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

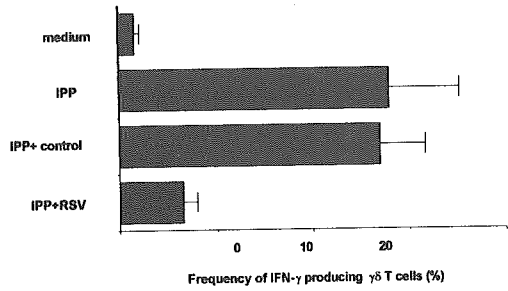


図2

LPS刺激での単球からのIL-12産生に対するsCD14の効果

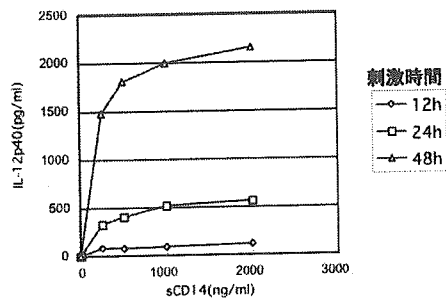


図5

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

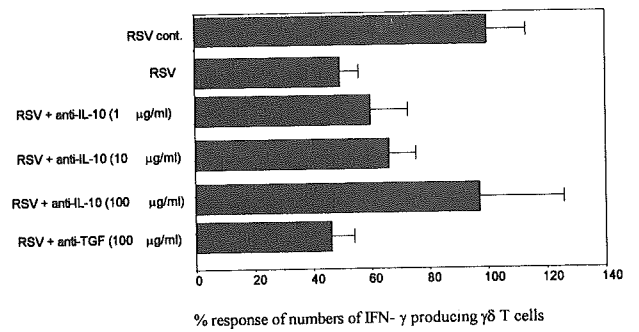


図3

RSV刺激での単球からのIL-12産生に対するsCD14の効果

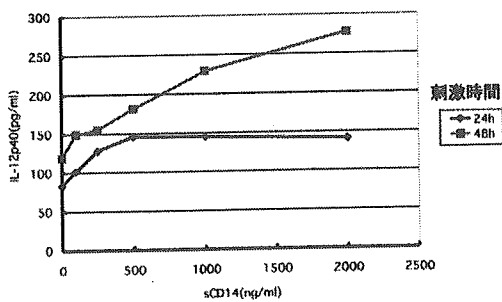


図6

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

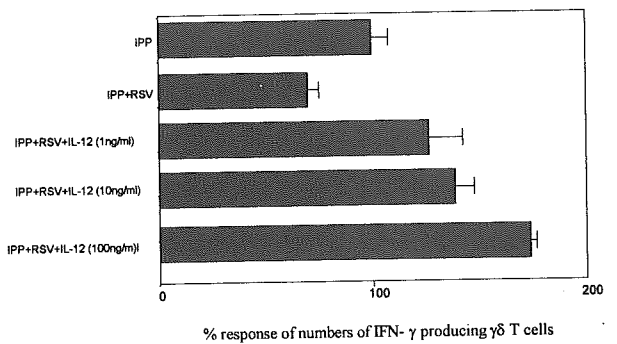


図7

RSV感染によるサイトカイン産生パターンと喘息発症

