

200500754 A

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業

気管支喘息の難治化機序の解明と予防・治療法の開発

に関する研究 (H 1 5 - 免疫 - 0 0 7)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 晶夫

平成 18 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

気管支喘息の難治化機序の解明と 予防・治療法の開発に関する研究	1
森 晶夫	

II. 分担研究報告書

1. 気管支喘息の難治化機序の解明と 予防・治療法の開発に関する研究	10
森 晶夫	
2. 重症アレルギー疾患の難治化機序に基づく 治療法の確立に関する研究	18
高橋 清	
3. 難治性喘息治療薬としてのレドックス蛋白チオレドキシ (TRX) の可能性についての検討	23
相沢久道	
4. 気道リモデリング形成における TGF- β 1 の役割 ダニ抗原誘発喘息モデルにおける気道リモデリング形成の解析	27
永井博弐	
5. 気道炎症の難治化に果たす好酸球の役割に関する研究	31
藤澤隆夫	
6. 難治性喘息のリモデリング機序 細胞要因と治療に関する研究	36
庄司俊輔	
7. 気道平滑筋細胞における CD40 の機能解析に関する研究	39
柳原行義	
8. 難治化に関連する遺伝因子の解析	42
大田 健	
9. 気管支喘息症の重症度に関連する 好酸球関連蛋白の機能とその遺伝子多型	45
烏帽子田 彰	

厚生労働科学研究費（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
総括研究報告書

気管支喘息の難治化機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究

主任研究者 森 晶夫

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長

分担研究者

高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター院長） 庄司俊輔（独）国立病院機構福岡病院副院長）
相沢久道（久留米大学医学部第一内科教授） 柳原行義（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長）
藤澤隆夫（独）国立病院機構三重病院臨床研究部長） 大田 健（帝京大学医学部内科教授）
永井博弐（岐阜薬科大学学長） 烏帽子田彰（広島大学公衆衛生学講座教授）

研究協力者

秋山一男（国立病院機構相模原病院臨床研究センター長） 谷口正実（同センター喘息研究室長）
後藤牧子（同センターリサーチレジデント） 橋本知実（同センター流動研究員）
梶山雄一郎（同センター研究生） 宗田 良（国立病院機構南岡山医療センター副院長）
金廣有彦（岡山大学医学部第2内科講師） 岡田千春（国立病院機構南岡山医療センター第1診療部長）
谷本 安（岡山大学医学部第2内科講師）
木村五郎（国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科医長） 平野 淳（同左第一内科医師）
西原麻千子（九州工業大学大学院生命体工学研究科） 岡元孝二（九州工業大学大学院生命体工学研究科教授）
足立哲也（帝京大学医学部内科講師） 長瀬洋之（帝京大学医学部内科助手）
中村裕之（高知大学医学部医学科環境医学教授） 稲垣直樹（岐阜薬科大学薬理学教室教授）
田中宏幸（岐阜薬科大学薬理学教室講師） 星野友昭（久留米大学医学部第一内科講師）
川山智隆（久留米大学医学部第一内科講師） 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） 今岡治樹（久留米大学医学部第一内科）
加藤佳子（国立病院機構三重病院臨床研究部） 梶原景一（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）
森嶋大貫（国立病院機構相模原病院臨床研究センター） 大路バク（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）
稲葉奈緒美（国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

研究要旨

本研究班によって抗原レベル、免疫細胞レベル、好酸球レベル、リモデリング、遺伝子多型の諸要因が解析された結果、1) 免疫抑制剤 FK506 は T 細胞レベルのステロイド抵抗性を改善する治療薬の候補であるものの、重症喘息における IL-13 制御の重要性が指摘されている観点からは、気道組織における FK506 の作用についての詳細な解析が必要であること、2) IL-5 産生と IL-13 産生につき coordinate に制御するシグナル以外に、特異的に制御するシグナルを解明する必要があること、3) 臨床レベルでのステロイド抵抗性に CD86 発現の高止まりが関与する可能性があること、4) 炎症優位と器質化優位の難治性喘息の亜分類法が可能であること、5) 気管支平滑筋細胞は MMP-1、2、3 を産生、結合組織を分解し、自ら産生するフィブロネクチンの作用で遊走すること、6) 気管支平滑筋細胞上の CD40、OX40L は活性化 T 細胞との相互作用に重要で、M3R を介して気道過敏性に関与すること、7) 好酸球はグルココルチコイド拮抗物質 MIF の重要なソースであり、その産生はステロイドで抑制されないこと、8) TRX は気道過敏性、炎症細胞浸潤、粘液産生亢進、気道平滑筋肥厚を伴ったリモデリングを抑制するのみならず、出来上がったリモデリングをも改善し、治療薬として有望であること、9) TGF- β 1 は炎症反応の制御と繊維化増強の両面的作用を持ち、これを標的とした治療には限界があること、10) ダニ抗原の気管内反復投与によりアジュバントフリーのリモデリング解析モデルが確立できること、11) Eotaxin-2 C275T 多型および ICOS G-1413A 多型は、難治化に関わること、12) IL4RA の I50V 多型は気管支喘息の感受性遺伝子であることが確認されたが、難治化とは関連しないこと、が明らかになった。

A. 研究目的

近年の薬物療法の進歩にも拘わらず、なお全身のステロイド薬の継続を余儀なくされる難治性喘息患者群は、成人喘息診療に残された難問である。小児喘息における難治群は、授業欠席、社会生活不適応、心身両面の成長障害など多彩な問題を抱えている。喘息難治化の機序解明と、有効な治療・予防法の開発は、喘息診療分野の最大の課題といえる。平成12～14年度の厚生科学研究「気管支喘息の難治化の病態機序の解明と難治化の予防・治療法開発に関する研究」（主任研究者 森 晶夫）では、厚生省免疫異常ネットワーク研究協力施設の参加も得て、難治性喘息の今日的診断基準を確立し、現在の我が国における実態、病態、治療内容を把握した。難治性喘息の少なくとも3分の1以上が喘息発症1～2年以内にステロイド依存に陥っていることから、発症時から通常の喘息とは異なっていることが明らかになった。高用量のステロイド使用にもかかわらず、高度の炎症反応が持続しているとの知見は、ステロイドに良好に反応する通常の喘息との本質的差異を示唆する。メカニズム研究の面からは、高用量ステロイド投与下でも持続する炎症反応を確認し、好酸球過剰活性化、気道リモデリング、T細胞を中心とした細胞性免疫の異常を難治化関連要因として指摘してきた。さらに、炎症細胞（T細胞、好酸球、気道上皮細胞）における、サイトカイン受容体、シグナル伝達分子、サイトカイン遺伝子転写機構などの異常を分子的に詳細に解析するとともに、*in vitro*の実験と平行する形でマウス喘息モデルを用いて検証し、*in vivo*でのステロイド低応答性、気道過敏性、リモデリングに関与する責任分子の特定をめざす。臨床面では、難治性喘息の大部分が非アトピー型であるとの調査結果を踏まえて、IgE非依存性の”T細胞アレルギー”に関する診断法、評価法の確立をめざす。難治化要因の解明は、予防、治療への突破口と期待される。また、難治化関連遺伝子多型を見出し、診断法として確立し、早期発見、予防への応用をめざす。

B. 方法

1) 森（主任研究者）らは、末梢血CD4⁺細胞、Der f 2特異的ヘルパーT（Th）細胞クローンを用い、固相化抗CD3抗体、抗CD28抗体、rIL-2を活性化刺激とし、サイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。培養中に各濃度のdexamethasone、FK506、抗IL-2抗体を加え、dexamethasone、FK506については、用量反応曲線よりIC₅₀値を求めた。成人喘息患者を対象とし、同意が得られた後、気管支ファイバーにて気管支粘膜を2-3カ所採取した。採取した組織をホ

ルマリン固定、またはOTC compound包埋凍結保存した。ホルマリン固定標本は、パラフィン包埋薄切し、Hematoxylin-Eosin(HE)染色にて、光学顕微鏡下で観察した。凍結組織は抗CD80抗体、抗CD86抗体を用いて免疫組織染色し、一定面積における陽性細胞数を算定し、Step 1-2の吸入ステロイド治療群と無治療群、Step 4の3群間で比較した。

2) 高橋（南岡山医療センター）らは、ステップ1～2（軽症喘息）とステップ4（重症、難治性喘息）を対象に、臨床・炎症・器質化の各指標項目を比較し、重症度区分と病態分類の妥当性を検討した。ヒト末梢血幹細胞培養好塩基球のCysLT1受容体発現をRT-PCR法で、細胞内Ca濃度やアポトーシスをFlow cytometry法で解析し、LTD4による遊走反応を検討した。難治例のリンパ球活性化とサイトカインを測定し、気管支上皮細胞との相互反応と、これら反応系における抗LT薬の効果を検討した。

3) 庄司（福岡病院）らは、ヒト気管支平滑筋（ASM）細胞を用い、培養上清採取及び48穴ポイデンチャンパー遊走実験を行った。細胞を抗インテグリンβ1またはβ3抗体で前処理した。抗MMP抗体を用いて培養上清のウエスタンブロッティングを行った。

4) 柳原（相模原病院）らは、ASM細胞におけるCD40、OX40L、ICAM-1、LFA-3発現をFACSで、サイトカイン/ケモカイン産生をELISAで、HR、CysLTR、MRの各サブタイプのmRNA発現をRT-PCR、real-time PCRで、タンパク発現をFACS、Western blotで、細胞内Ca²⁺濃度をFluoroskanで測定した。末梢血好酸球、T細胞におけるCD40L発現をFACS解析し、³H-thymidineラベル活性化T細胞とASM細胞の細胞接着を解析した。

5) 藤澤（三重病院）らは、CD16 negative selection法により末梢血好酸球を分離し、固相化IgA、IgG、IL-5と反応させ、遊離されたMIF (migration inhibitory factor)をELISA法にて測定した。各種濃度のDexamethasoneを加えて、効果を検討した。末梢血好酸球、好中球、単核球分画を分離し、Cell lysateに含まれるMIF、PMA刺激で遊離されるMIFを測定した。PAR2アゴニストのTrypsinで好酸球を刺激し、リアルタイムPCRにてMIF遺伝子発現を定量した。

6) 相沢（久留米大学）らは、Balb/cマウスをOVA感作し、長期間抗原暴露による気道リモデリングモデルを樹立した。ヒトリコンビナントthioredoxin (TRX) (40 μg / head)、32S/35S mutant human TRX (40 μg / head)を腹腔内投与し、whole body plethysmographyによる気道過敏性の測定、BALF中の細胞分画、肺組織を解析した。

7) 永井（岐阜薬大）らは、気道リモデリング解析モ

デルで、抗原曝露 21 日間 (全期間)、前半 10 日間、後半 11 日間抗 TGF- β 1 抗体を腹腔内投与した。最終抗原曝露 24 時間後に気道過敏性を測定し、その後右肺は気管支肺胞洗浄 (BAL) を、左肺は組織学的検討を行った。ダニ抗原吸入感作モデルでは、吸入麻酔下に *Der f* 抽出物を複数回気管内投与して反応を惹起した。

8) 大田 (帝京大学内科) らは、重症度 (Step 1? 4) 別に、TGF- β 1 C-509T、IL-13 Arg110Gln、IL-18 C-113G、eotaxin-2 C275T、eotaxin-3 T2497G の 5 箇所の SNP につき、日立 Mass ARRAY 法で解析した。

9) 烏帽子田 (広島大学) らは、難治群として Step 4 を 8 例、非難治群として Step 1-2 を 16 例、対照として健常人 24 例リクルートし患者対照研究を実施した。IL4RA 遺伝子 Exon 3 (I50V)、Exon 9 (E375A)、プロモーター領域 (C-3223T、T-1914C、T-890C)、CXCR1 (A111G、R27C、R252E)、CCR1 (T947C、CCR2 (V64I、T860C)、CCR3 (T51C)、CCR5 (R223Q) をシーケンスした。

C. 結果および D. 考察

1) CD28 シグナルにより T 細胞レベルのステロイド抵抗性が誘導され、IL-2 中和抗体の存在により阻止された。Costimulatory signal によるステロイド抵抗性誘導は IL-2 依存性である。FK506 は、costimulatory signal 存在下でも非存在下と同様にサイトカイン産生、増殖を抑制した。Th クローンでは IL-2 受容体シグナル (IL-2、IL-15) 単独で、サイトカイン産生、細胞増殖が誘導され、ステロイドは IL-5、IL-13 産生をともに抑制した。が、FK506 は、IL-2 応答性の IL-13 産生を抑制しなかった。IL-5 と IL-13 はともに Th2 細胞から産生されるサイトカインとして coordinate な産生制御がされているが、IL-5 産生は IL-2 シグナル依存性である一方、IL-13 産生は IL-2 シグナル非依存性であり、2つの喘息関連サイトカイン間での産生制御メカニズムは異なっていることが明らかになった。CD86 陽性細胞数は、吸入ステロイド無治療群に比べ治療群でより少数であった。Step 4 では高い症例と低い症例とが混在していた。CD86 発現レベルでの heterogeneity が明らかになった。好酸球数との相関はみられなかった。

2) 軽症、重症、難治の 3 群間では、炎症指標の喀痰中好酸球に有意差はなかったが軽症群で高い傾向であった。PEF と気管支壁肥厚、%RV、血中コーチゾル値等器質化を示唆する指標は軽症より重症・難治群が有意に悪かった。症例毎の検討で、軽症群には炎症指標陽性例が、難治群には器質化指標が優位に多く、重症群は両指標が多かった。培養好塩基球は CysLT1 受容

体の m-RNA を発現していた。CysLTs 誘導性の細胞内 Ca 濃度上昇は、CysLT1 R 拮抗薬で抑制された。CysLTs は好塩基球のアポトーシスを軽度ながら抑制し、LTD4 (10^{-8} M) で最大となる遊走反応を誘導した。気管支上皮細胞と難治性喘息患者 PBMC とで産生される MMP-9 は、非難治群に較べて亢進していた。Mite や *Candida* 抗原によるリンパ球の活性化に対する抗 LT 薬の抑制効果はなかったが、MMP-9 産生に対して抗 LT 薬は抑制傾向を示した。

3) ASM 細胞培養上清に対する ASM 細胞の遊走は、抗 β 1 インテグリン抗体で前処理することにより抑制された。ASM 細胞培養上清中に、抗 MMP-1、2 及び 3 抗体と反応するバンドがウエスタンブロットティングで確認された。

4) 喘息患者の発作時の末梢血好酸球に CD40L 発現を認めた。健常者の好酸球、T 細胞は PMA/Iono 刺激により CD40L を発現した。T 細胞は OX40 も発現した。ASM 細胞は、ICAM-1、VCAM-1、LFA-3、CD40、OX40L を発現していた。活性化好酸球、T 細胞と ASM 細胞の細胞接着を確認した。T 細胞と ASM 細胞の接着は、LFA-1、CD2、OX40 抗体、可溶性 CD40、抗 CD40L 抗体によって抑制された。ASM 細胞では抗 CD40 抗体刺激により、IL-6、IL-8 産生、M3R mRNA 発現が誘導された。M3R 発現をタンパクレベルで確認した。抗 CD40 抗体刺激 ASM 細胞では ACh による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が増強した。抗 OX40L 抗体単独では M3R 発現は増強しないが、抗 CD40 抗体と抗 OX40L 抗体のコンビネーションでさらに増強した。ASM 細胞の CD40 発現は IFN- γ 、TNF- α により増強されたが、OX40L 発現は変化しなかった。

5) 固相化 sIgA、IgA、IgG は 4 時間培養で好酸球からの MIF 遊離を誘導し、IL-5 により増強された。IL-5 単独で MIF 遊離を誘導した。Dexamethasone は MIF 遊離を抑制しなかった。白血球各分画に含まれる MIF 量に差はなかったが、PMA 刺激による好酸球からの遊離は単核球に比べて有意に高かった。Trypsin は好酸球の MIF 遺伝子発現を増強した。グルココルチコイド拮抗物質 MIF と喘息難治化の関連が示唆される。

6) OVA チャレンジ Day 18 から Day 33 のリコンビナントヒト TRX 隔日投与 (40 μ g) は気道過敏性、炎症細胞浸潤、杯細胞化生、気道平滑筋の肥厚を伴った気道リモデリングを有意に抑制した。一旦リモデリングが生じた後の 7-9 回の OVA チャレンジ時 (day 32 から Day 45) に TRX を隔日投与 (40 μ g) した場合にも、これらの気道リモデリング指標は有意に抑制された。TRX は酸化還元制御を介して、リモデリング、難治化を予防、治療できることが明らかになった。

7) 抗 TGF- β 1 抗体を抗原曝露の 21 日間投与した場合

には、気道過敏性は変化せず、好酸球増多、杯細胞化生が用量依存的に増悪した。基底膜下の線維化は、用量依存的に抑制された。前半 10 日間の投与では、好酸球増多、杯細胞化生は増悪したが、気道過敏性、線維化は変化しなかった。後半 11 日間の投与では、好酸球増多、杯細胞化生に変化なく、線維化が用量依存的に抑制された。TGF- β 1 は炎症、リモデリングのフェーズにより、善悪両面的な作用を果たしていると推察される。ダニ抗原の気管内投与により、アジュバントフリー条件で、気道過敏性、Th2 サイトカイン産生、血清中抗原特異的 IgG1 産生、気道上皮の杯細胞化生、基底膜下線維化を伴うリモデリングモデルが樹立できた。フルチカゾンプロピオネートは、気道過敏性に対しては部分的な抑制に過ぎなかったが、他のパラメータを用量依存的に抑制した。

8) Step 3 (100 例) と Step 4 (72 例) の間で、eotaxin-2 C275T の SNP 頻度に有意な差を認めた (Step 3 vs Step 4, $p = 0.048$)。ICOS G-1413A の A アリル頻度は、小児喘息寛解群に比して難治性喘息群で有意に低かった ($p = 0.0054$)。eotaxin-2 C275T と ICOS G-1413A は、喘息の難治化関連遺伝子と考えられる。

9) 対照群に対する IL4RA I50V 頻度における Odds ratio (OR) (95 % 信頼区間) は、難治群 0.36 (0.14-0.96)、非難治群 0.27 (0.12-0.64) と統計学的に有意であったが、難治群と非難治群の間に差はなかった。-3223T の OR は、難治群 1.95 (0.20-19.2)、非難治群 1.64 (0.27-9.86) と、有意ではなかった。CCR family 遺伝子多型で喘息との関連が認められたのは、CCR3 T51C であり、非難治型の 51C 頻度が、対照群に比し有意な高値を示したが、難治群と非難治群の間には有意差はなかった。IL4RA I50V の多型ごとに総 IgE 値を比較すると、I/I、I/V、V/V の順に有意に低下した。C-3223T についても同様の結果であった。IL4RA I50V と C-3223T の遺伝子座位間の相互作用の結果、プロモーター領域の変異で生じる IL4 可溶性蛋白の低下が、IL4 受容体の機能亢進をもたらし、IgE 産生につながるとの機構が推測される。

E. 結論

本研究班によって抗原レベル、免疫細胞レベル、好酸球レベル、リモデリング、遺伝子多型の諸要因が解析された結果、1) 免疫抑制剤 FK506 は T 細胞レベルのステロイド抵抗性を改善する治療薬の候補であるものの、重症喘息における IL-13 制御の重要性が指摘されている観点からは、気道組織における FK506 の作用についての詳細な解析が必要であること、2) IL-5 産生と IL-13 産生につき coordinate に制御するシグナル以外に、特異的に制御するシグナルを解明する必

要があること、3) 臨床レベルでのステロイド抵抗性に CD86 発現の高止まりが関与する可能性があること、4) 炎症優位と器質化優位の難治性喘息の亜分類法が可能であること、5) 気管支平滑筋細胞は MMP-1、2、3 を産生、結合組織を分解し、自ら産生するフィブロネクチンの作用で遊走すること、6) 気管支平滑筋細胞上の CD40、OX40L は活性化 T 細胞との相互作用に重要で、M3R を介して気道過敏性に関与すること、7) 好酸球はグルココルチコイド拮抗物質 MIF の重要なソースであり、その産生はステロイドで抑制されないこと、8) TRX は気道過敏性、炎症細胞浸潤、粘液産生亢進、気道平滑筋肥厚を伴ったりリモデリングを抑制するのみならず、出来上がったリモデリングをも改善し、治療薬として有望であること、9) TGF- β 1 は炎症反応の制御と繊維化増強の両面的作用を持ち、これを標的とした治療には限界があること、10) ダニ抗原の気管内反復投与によりアジュバントフリーのリモデリング解析モデルが確立できること、11) Eotaxin-2 C275T 多型および ICOS G-1413A 多型は、難治化に関わること、12) IL4RA の I50V 多型は気管支喘息の感受性遺伝子であることが確認されたが、難治化とは関連しないこと、が明らかになった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaminuma, O., Mori, A., Kitamura, N., Hashimoto, T., Kitamura, F., Inokuma, S., and Miyatake, S. 2005. Role of GATA-3 in IL-5 gene transcription by CD4⁺ T cells of asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137:55-59.
- 2) Hashimoto, T., Akiyama, K., Kobayashi, N., and Mori, A. 2005. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137:51-54.
- 3) Tsuda, M., Matsumoto, K., Inoue, H., Matsumura, M., Nakano, T., Mori, A., Azuma, M., and Nakanishi, Y. 2005. Expression of B7-H1 and B7-DC on the airway epithelium is enhanced by double-stranded RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:263-270.
- 4) Kitamura, N., Kaminuma, O., Mori, A., Hashimoto, T., Kitamura, F., Miyagishi, M., Taira, K., and Miyatake, S. 2005.

- Correlation between mRNA expression of Th1/Th2 cytokines and their specific transcription factors in human helper T-cell clones. *Immunol. Cell Biol.* 83:536-541.
- 5) Mitomi, H., Mori, A., Arai, N., Kanazawa, H., Nishiyama, Y., Ihara, A., Otani, Y., Sada, M., Kobayashi, K., and Igarashi, M. 2005. Venous invasion and down-regulation of p21^{WAF1/CIP1} are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepato-Gastroenterology.* 52:1421-1426
 - 6) Mori, A., Ogawa, K., Kajiyama, Y., and Kaminuma, O. 2006. Th2 cell-mediated chemokine synthesis is involved in allergic airway inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* in press.
 - 7) Hashimoto, T., Kobayashi, N., and Mori, A. 2006. IL-12-induced IL-13 production by allergen-specific human helper T cell clones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* in press
 - 8) 高橋 清. 成人喘息発症の予知と重症化対策. *アレルギー* 34 : 1-5, 2005.
 - 9) 高橋 清. 重症度を規定する因子 社会的要因を含む—成人—. The 24th ROKKO CONFERENCE 喘息の重症度分類の再考—長期・短期・成人・小児における各臨床症状・治療—. 95-101, 2005.
 - 10) 木村五郎, 高橋 清. 成人気管支喘息—長期管理—. *アレルギーの臨床* 25 : 271-276, 2005.
 - 11) 高橋 清. 高齢者喘息の臨床的特徴とその対策—序—. *アレルギー・免疫* 12 : 603-605, 2005.
 - 12) Shigyo M, Inoue H, Honda Y, Takata S, Iwanaga T, Koto H, Takahashi N, Ichiki H, Aizawa H. Once-daily administration of fluticasone propionate does not worsen controlled airway hyperresponsiveness in patients with asthma. *Respiration.* 2005;72:480-5.
 - 13) Yokoyama T, Sato R, Rikimaru T, Hirai R, Aizawa H. Tuberculosis associated with gastrectomy. *J Infect Chemother.* 2004;10:299-302.
 - 14) Yokoyama T, Kinoshita T, Rikimaru T, Aizawa H. Helicobacter pylori infection rate in patients with nontuberculous mycobacteriosis who are on longterm combination chemotherapy of clarithromycin and rifampicin. *J Infect Chemother.* 2005;11:173-6.
 - 15) Ichiki H, Hoshino T, Kinoshita T, Imaoka H, Kato S, Inoue H, Nakamura H, Yodoi J, Young HA, Aizawa H. Thioredoxin suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:1141-8.
 - 16) Terasaki H, Fujimoto K, Muller NL, Sadohara J, Uchida M, Koga T, Aizawa H. Hayabuchi N. Pulmonary sarcoidosis: comparison of findings of inspiratory and expiratory high-resolution CT and pulmonary function tests between smokers and nonsmokers. *AJR Am J Roentgenol.* 2005;185:333-8.
 - 17) Koga T, Oshita Y, Kamimura T, Koga H, Aizawa H. Characterisation of patients with frequent exacerbation of asthma. *Respir Med.* 2005 Jul 2; [Epub ahead of print]
 - 18) Yokoyama T, Rikimaru T, Kinoshita T, Kamimura T, Oshita Y, Aizawa H. Clinical utility of lipoarabinomannan antibody in pleural fluid for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *J Infect Chemother.* 2005;11:81-3.
 - 19) Kaji M, Fukuda T, Tanaka M, Aizawa H. A side effect of neuraminidase inhibitor in a patient with liver cirrhosis. *J Infect Chemother.* 2005;11:41-3.
 - 20) Machida K, Inoue H, Matsumoto K, Tsuda M, Fukuyama S, Koto H, Aizawa H. Kureishi Y, Hara N, Nakanishi Y. Activation of PI3K-Akt pathway mediates antiapoptotic effects of beta-adrenergic agonist in airway eosinophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288:L860-7.
 - 21) Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, Tanaka H, Nagai H, Ichikawa A, Narumiya S. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature Immunol.* 2005; 6: 524-531.
 - 22) Fujisawa T. New positioning of eosinophils in asthma. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol* 2005; 25:1-7
 - 23) Kato Y, Fujisawa T, Nishimori H, Katsumata H, Atsuta J, Iguchi K, et al. Leukotriene D4 induces production of transforming growth factor- β 1 by eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137 Suppl 1:17-20

- 24) Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:505-9
- 25) 藤澤隆夫:抗ヒスタミン薬の多彩な薬理作用 アレルギー・免疫 12:257-263, 2005
- 26) 藤澤隆夫:好酸球と気道リモデリング カレントセラピー 23:88-89,2005
- 27) 藤澤隆夫:小児気管支喘息の発症・進展をどのように防ぐか?早期介入療法:吸入ステロイド 小児科臨床 58:2001-2008, 2005
- 28) 藤澤隆夫:小児気管支喘息長期管理薬の適応の多様性 喘息 18:38-42, 2005
- 29) 藤澤隆夫:小児における気管支喘息とアレルギー性鼻炎の関連 アレルギーの臨床 25:940-944, 2005
- 30) 藤澤隆夫:免疫調節細胞としての好酸球 アレルギー科 20:325-331, 2005
- 31) 藤澤隆夫, 長尾みづほ, 他:小児アトピー性皮膚炎の病勢評価マーカーとしての血清 TARC/CCL17 の臨床的有用性 日本小児アレルギー学会誌 19(5):744-757,2005
- 32) 藤澤隆夫:シスチニルロイコトリエンによる好酸球からの TGF- β 産生誘導炎症と免疫 14(1):25-30, 2006
- 33) 藤澤隆夫:アレルギー性鼻炎のプレーヤーたち 好酸球. 鼻アレルギーフロンティア 6(1):40-46, 2006
- 34) 藤澤隆夫:学童期・病態「喘息の病態と治療からみた世代的(年齢的)特徴 第25回六甲カンファレンス p32-36, 小林節雄, 宮本昭正, 中島重徳編 ライフサイエンス出版 2006
- 35) Tanaka G, Kanaji S, Hirano A, Arima K, Shinagawa A, Goda C, Yasunaga S, Ikizawa K, Yanagihara Y, Kubo M, Kuriyama-Fujii Y, Sugita Y, Inokuchi A, Izuhara K: Induction and activation of the aryl hydrocarbon receptor by IL-4 in B cells. *Int. Immunol.* 17: 797-805, 2005.
- 36) Yanagihara Y: Regulatory mechanisms of IgE synthesis by human B cells. *Clin. Exp. Allergy Rev.* in press.
- 37) 柳原行義: サイトカイン環境とIgE産生機構. アレルギー科 20, 273-280, 2005.
- 38) 柳原行義: IgE抗体とB細胞. 小児科診療 68, 1415-1420, 2005.
- 39) 梶原景一, 柳原行義: BlyS/APRILとIgE産生誘導. 臨床免疫 44, 1-7, 2005.
- 40) 梶原景一, 柳原行義: IgEへのクラススイッチとAPRIL/BlyS. 臨床免疫 44, 450-454, 2005.
- 41) 柳原行義: IgE産生の分子調節機構. アレルギー科 印刷中
- 42) 柳原行義: IgE産生の分子機構. アレルギー科 印刷中
- 43) Yamashita N, Tashimo H, Matsuo Y, Ishida H, Yoshiura K, Sato K, Yamashita N, Kakiuchi T, Ohta K. Role of CCL21 and in allergic inflammation in the OVA-specific murine asthmatic model. *J Allergy Clin Immunol* (in press).
- 44) 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* (in press).
- 45) Adachi T, Hanaka S, Yano T, Yamamura K, Yoshihara H, Nagase H, Chihara J, Ohta K. The role of platelet-derived growth factor receptor in eotaxin signaling of eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* (in press).
- 46) Meng J, Thongngarm T, Nakajima M, Yamashita N, Ohta K, Bates CA, Grunwald GK, Rosenwasser J. Association of transforming growth factor- β 1 single nucleotide polymorphism C-509T with allergy and immunological activities. *Int Arch Allergy Immunol* 138: 151-60, 2005.
- 47) 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* 235: 85-91, 2005.
- 48) Hattori K, Sasahara S, Nakamura H, Ozasa K, Endo T, Imai T, Ide T, Honda Y, Hatta K, Motohashi Y, Eboshida A, Matsuzaki I A study on the mechanisms of depressive tendency in patients with cedar pollinosis focusing on the sense of coherence (SOC) as a stress-coping skill. *J Phys Fit Nutr Immunol* 2004; 14(3): 188-194
- 49) Kaneko Y, Motohashi Y, Nakamura H, Endo T, Eboshida A Increasing prevalence of Japanese cedar pollinosis: a meta-regression analysis *Int Arch Allergy Immunol.* 2005; 136(4):365-371.

2. 学会発表

- 1) Mori, A., Hashimoto, T., and Akiyama, K. 2005. IL-5, an eosinophilic cytokine, production from a diagnostic viewpoint. The XIXth World Allergy Organization Congress (München) 2005/6/26-7/1
- 2) 森 晶夫, 前田裕二, 谷口正実, 大友 守, 長谷川眞紀, 秋山一男: 真菌アレルギーによる非IgE依存性遅発型喘息反応, 第17回日本アレルギー学会春期臨床大会シンポジウム3「真菌とアレルギー疾患」, Jpn. J. Allergol. 54:235, 2005.6.2 (岡山)
- 3) 森 晶夫, 梶山雄一郎, 前田裕二, 谷口正実, 三田晴久, 大友守, 長谷川眞紀, 秋山一男: アレルギー検査, 第55回日本アレルギー学会総会シンポジウム1「アレルギー性疾患の検査と治療; 評価と安全対策ガイド」, Jpn. J. Allergol. 54: 881, 2005.10.20 (盛岡)
- 4) 高橋 清. 花粉症と気管支喘息の関連 — “One airway, one disease” の観点から—. 第23回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(岡山), 2005.3
- 5) 高橋 清. 成人喘息発症の予知と難治化対策. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(岡山), 2005.6
- 6) 谷本 安, 高橋 清, 谷本光音他. アレルギーと炎症細胞 —好塩基球細胞とのクロストーク— —喘息難治化病態と好塩基性細胞—. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(岡山), 2005.6
- 7) 谷本 安, 金廣有彦, 高橋 清他. アレルギー疾患の発症と重症化を防ぐために—成人喘息発症と重症化を防ぐために—. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(岡山), 2005.6
- 8) 平野 淳, 木村五郎, 高橋 清他. 重症難治性喘息の検討—軽・中等症喘息との比較—. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(岡山), 2005.6
- 9) 岡田千春, 平野 淳, 高橋 清他. 成人気管支喘息患者における喀痰中ムチン量と各種パラメーターの関連. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(岡山), 2005.6.
- 10) 庄司俊輔. 気管支喘息の気道リモデリング形成機序: 気管支平滑筋細胞遊走に対するフィブロネクチン及びマトリックスメタロプロテアーゼの関与, 第37回日本結合組織学会 (2005年5月)
- 11) 庄司俊輔. 気管支喘息の気道リモデリングへの気道平滑筋細胞の関与: フィブロネクチン産生及び遊走による病態形成機構, 第55回日本アレルギー学会 (2005年10月)、気管支喘息の気道リモデリング形成機構:
- 12) 庄司俊輔. 気道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マトリックスメタロプロテアーゼの関与, 第9回アレルギー・気道上皮細胞研究会 (2005年12月)
- 13) 高橋 剛, 若原恵子, 那須礼史, 田中宏幸, 高野裕久, 奥村弘樹, 前島一仁, 稲垣直樹, 永井博式: ダニ抗原によるマウス気道リモデリングに及ぼすディーゼル排気粒子(DEP)の影響. 第14回 Airway Club in Sendai ポスターディスカッション14 (2005年9月, 仙台)
- 14) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式: 動物モデルによる気道リモデリングの解析. 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4 (2005年11月, 盛岡)
- 15) 高橋 剛, 若原恵子, 那須礼史, 田中宏幸, 高野裕久, 奥村弘樹, 前島一仁, 稲垣直樹, 永井博式: ダニ抗原によるマウス気道リモデリングに及ぼすディーゼル排気粒子(DEP)の影響. 第55回日本アレルギー学会総会 一般演題514 (2005年11月, 盛岡)
- 16) Y Noma, T Fujisawa, H Katsumata, M Nagao, J Atsuta, K Iguchi, H Kamiya. Changing outcome of childhood asthma with increased use of inhaled corticosteroids. 61st Annual meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. 2005年3月19日 San Antonio, Tx, USA. J Allergy Clin Immunol 115(2):s10, 2005
- 17) T Fujisawa, Y Kato, T Nakayama, K Hirai, O Yoshie. Dual expression of histamine receptors H2 and H4 regulate eosinophil chemotaxis and superoxide generation by histamine. 61st Annual meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. 2005年3月21日 San Antonio, Tx, USA. J Allergy Clin Immunol 115(2):s193, 2005
- 18) M Nagao, T Fujisawa, Y Kato, Y Noma, H Katsumata, H Nishimori, J Atsuta, K Iguchi, I Ogawauchi, H Tanaka, M Higashiura, H Kamiya. Clinical utility of serum TARC/CCL17 levels in children with atopic dermatitis. 61st Annual meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. 2005年3月22日 San Antonio, Tx, USA. J Allergy Clin Immunol 115(2):s272, 2005
- 19) Takao Fujisawa Symposium “New understanding of eosinophils in allergic inflammation” Clinical utility of eosinophil granular proteins for monitoring childhood asthma. Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology and Immunology. April 7-9, 2005, Seoul, Korea

- 20) Takao Fujisawa New positioning of eosinophils in asthma. International Symposium for Asthma of Inje University. 2005.5.12, Seoul, Korea
- 21) M. Nagao, R. Tokuda, Y. Noma, S. Nakayama, T. Fujisawa. Novel in vitro method for diagnosis of food allergy in children: utilization of CD203c expression in basophils. 2006 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, Miami Beach, USA, March 3-7, 2006
- 22) H. Katsumata, Y. Kato, T. Fujisawa. House dust mite extract induces interleukin-9 expression in human eosinophils. 2006 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, Miami Beach, USA, March 3-7, 2006
- 23) 藤澤隆夫 「シンポジウム アレルギー疾患の発症と重症化を防ぐために」 小児の喘息発症と重症化を防ぐために. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会. 岡山市 2005年6月2-4日 アレルギー54:250, 2005.
- 24) 藤澤隆夫 シンポジウム「アレルギー克服に向けての新たな治療薬開発の展望」 サイトカイン療法. 第13回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会 2005.2.19-20
- 25) 藤澤隆夫 ランチョンセミナー「小児気管支喘息治療の Essential Component」 第38回日本小児呼吸器疾患学会 2005.11.4
- 26) 藤澤隆夫 シンポジウム「トランスレーショナルリサーチに基づくアレルギー診療」抗アレルギー薬 第14回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会、2005.12.10
- 27) 藤澤隆夫 ランチョンセミナー「好酸球研究のアップデート」 第24回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2006.3.3
- 28) Yanagihara Y. Regulatory mechanisms of IgE synthesis by human B cells. AR FORUM2005, 2005.
- 29) 柳原行義. 感染とIgE産生. 第13回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会, 2005.
- 30) 梶原景一、森嶋大貴、大路バク、稲葉奈緒美、生澤公一、秋山一男、柳原行義. 気道平滑筋細胞におけるTLR3の機能解析. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2005.
- 31) 柳原行義. IgE産生の分子機構. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005.
- 32) 梶原景一、生澤公一、森嶋大貴、品澤美樹、大路バク、秋山一男、柳原行義. BlyS依存性のIgEクラススイッチにおけるKu70/80の関与. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005.
- 33) 森嶋大貴、梶原景一、稲葉奈緒美、大路バク、秋山一男、柳原行義. 気道平滑筋細胞におけるCD40の機能解析. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005.
- 34) 中村裕之、秋丸国広、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一朗、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰. 気管支喘息症の有症率と環境因子の関与についての地域間の相違. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成17年6月、岡山
- 35) 大矢幸弘、斎藤暁美、青田明子、小嶋なみ子、明石真幸、二村昌樹、秋山一男、高橋清、中川武正、西間三撃、小田嶋博、小林章雄、三宅吉博、烏帽子田彰、中村裕之、足立雄一、赤澤晃、全国全年齢階級喘息有症率調査(第1報) 全年齢用調査用紙の作成 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成17年6月、岡山
- 36) 斎藤暁美、青田明子、小嶋なみ子、明石真幸、二村昌樹、大矢幸弘、秋山一男、高橋清、中川武正、小林章雄、烏帽子田彰、中村裕之、小田嶋博、足立雄一、赤澤晃、全国全年齢階級喘息有症率調査(第2報) 電話・郵送調査方法の検討、 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成17年6月、岡山
- 37) 青田明子、斎藤暁美、小嶋なみ子、二村昌樹、明石真幸、大矢幸弘、秋山一男、高橋清、中川武正、小林章雄、烏帽子田彰、中村裕之、小田嶋博、足立雄一、赤澤晃、全国全年齢階級別気管支喘息有症率調査(第3報) 電話・郵送法による調査結果、 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成17年6月、岡山
- 38) 山本要、中村裕之、秋丸国広、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一朗、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰、スギ花粉症におけるNKT細胞の測定とその免疫学的意義についての考察、 第64回日本公衆衛生学会、平成17年8月、札幌
- 39) 中村裕之、秋丸国広、山崎千春、東川史子、信国好俊、宮川清、本橋豊、松崎一葉、笹原信一朗、荻野景規、遠藤朝彦、今井透、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰、スギ花粉症とCCR 遺伝子およびCCL 遺伝子の相関に関する患者対照研究、 日本人類遺伝学会第50回大会、平成17年9月、倉敷
- 40) 二村昌樹、小嶋なみ子、明石真幸、青田明子、斎藤暁美、大矢幸弘、秋山一男、高橋清、中川武正、小田嶋博、小林章雄、烏帽子田彰、中村裕之、

なし

立雄一、赤澤晃、ISAAC 調査票による東京都小中学生のアレルギー疾患有症率、第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 17 年 10 月、盛岡

- 41) 中村裕之、山本要、秋丸国広、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰、スギ花粉症と NKT 細胞の関連に関する患者対照研究、第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 17 年 10 月、盛岡
- 42) 秋丸国広、中村裕之、山崎千春、田中武司、東川史子、信国好俊、宮川清、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、遠藤朝彦、今井透、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰、スギ花粉症と Eotaxin ファミリー遺伝子の相関に関する患者対照研究、第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 17 年 10 月、盛岡
- 43) 中村裕之、秋丸国広、山崎千春、東川史子、信国好俊、宮川清、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、遠藤朝彦、今井透、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰、スギ花粉症における CCR 遺伝子および CCL 遺伝子とその遺伝子相互作用、第 5 回分子予防環境医学研究会、平成 17 年 11 月、東京
- 44) 中村裕之、山本要、秋丸国広、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰、予防医学的見地からスギ花粉症における NKT 細胞の減少を考える、第 3 回日本予防医学会、平成 17 年 12 月、宇部
- 45) 山崎千春、秋丸国広、中村裕之、東川史子、信国好俊、宮川清、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、遠藤朝彦、今井透、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰、スギ花粉症と Eotaxin family 遺伝子に関する症例対照研究、第 3 回日本予防医学会、平成 17 年 12 月、宇部
- 46) 中村裕之、秋丸国広、山崎千春、東川史子、信国好俊、宮川清、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、遠藤朝彦、今井透、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰、CCR および CCL 遺伝子を用いたスギ花粉症の遺伝子診断、第 76 回日本衛生学会総会、平成 18 年 3 月、宇部

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

気管支喘息の難治化機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究

主任研究者 森 晶夫（独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター先端技術開発研究部長）

研究協力者

秋山一男（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センター長） 谷口正実（同センター喘息研究室長）
後藤牧子（同センターリサーチレジデント） 橋本知実（同センター流動研究員）
梶山雄一郎（同センター研究生）

研究要旨

過去 2 年間のわれわれの調査研究の成果として、難治性喘息症例では高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない現状が確認された。重症喘息でのステロイド薬効果不全のメカニズムを解明し、ステロイド感受性、ステロイド薬本来の薬効を回復することは重症症例群に対する治療効果を格段に向上させるための鍵である。これまでに、難治性喘息症例においては *in vivo* の T 細胞レベルでステロイド抵抗性を確認している。今年度はその分子薬理機序の解明をめざして、CD28 シグナル、IL-13 産生に対する FK506 の作用を解析した。加えて、T 細胞に内在する異常よりむしろ周囲の微小環境側の要因が重要であることを明らかにしているため、CD28 の ligand である CD80、CD86 発現の検出を試みた。FK506 は、CD28 シグナルによりステロイド抵抗性が誘導された T 細胞クローンに対しても、CD28 シグナルを欠く条件と同等の用量反応曲線を示した。ただし、IL-2（あるいは IL-15）依存性の IL-13 産生を抑制せず、Th2 サイトカインごとに産生制御メカニズムが異なることが明らかになった。FK506 は国外で臨床試験が進行しているが、喘息病態における IL-13 の役割が重視されていることを考慮すると、その免疫学的効果の検証が必要である。免疫組織学的検索からは、重症喘息においては、costimulatory signal を生じる CD86 の発現が高止まりしていることが明らかになった。CD86 発現の制御はステロイド抵抗性克服に向けた標的と考えられる。

A. 研究目的

我々が実施した過去 2 年間の調査から、難治性喘息は非アトピー型が大部分を占め、高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない現状が明らかである。喘息病態の重症・難治化には複数の因子が関与するが、臨床的にはステロイド効果不全ととらえられる。比較的大量のステロイド投与にもかかわらず、気管支粘膜の好酸球性炎症を制御しきれない基盤として、これまでの研究から T 細胞機能、殊に IL-5 産生に関する異常を明らかにしてきた。前年度までの研究成果として、1) 難治症例の T 細胞は、*in vivo* においてはステロイド感受性が低下しているが、*in vitro* ではステ

ロイド感受性に差を認めないこと、2) Costimulatory signal が T 細胞レベルでのステロイド感受性低下を誘導することを明らかにしたので、今年度はさらにステロイド抵抗性の機序解明と制御法の開発を目指し、costimulatory signal に対する免疫抑制剤 FK506 の作用につき免疫薬理学的に解析した。また、costimulatory molecule である CD80、CD86 の気道組織中の発現につき解析した。ステロイド抵抗性の分子細胞機序解明は、重症喘息克服へ向けた重要なステップである。

B. 方法

対象症例、臨床検査

国立病院機構相模原病院アレルギー科外来に通院中の成人喘息症例より、インフォームドコンセン

トを得たうえで対象とした。アセチルコリン、ヒスタミンに対する気道過敏性の測定、および抗原吸入負荷試験は、日本アレルギー学会の標準法によって行った。 β 刺激剤、テオフィリン剤、インタール、抗コリン剤、ベクロメサゾン吸入は、12時間以上、抗ヒスタミン剤、ステロイド剤は24時間以上中止した。アトピー型は、吸入アレルゲン20種を含む皮膚テストにおいて、一つ以上の陽性を示すものと定義した。非アトピー型は皮膚テスト陰性のものとした。

細胞培養およびアッセイ

ヘパリン採血の後、Ficoll-paque 比重遠心法にて末梢血単核細胞(Peripheral blood mononuclear cells: PBMC)を得、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度にて、AIM-V培地に懸濁した。20 nMのPhorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)と $1 \mu\text{M}$ のionomycin (IOM)で24時間刺激した後、上清をハーベストした。Crudeアレルゲンとしてダニアレルゲン、*Candida albicans*抗原などによるT細胞からのサイトカイン産生を調べるため *Dermatophagoides farinae* extract、*Candida albicans* extract、その他のアレルゲン粗抗原エキス(鳥居薬品)の最終濃度0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて6日間培養し、上清をハーベストした。サイトカイン産生の評価には、上清中のIL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ をそれぞれ特異的サンドイッチELISA法にて測定した。リンパ球の増殖反応は 10^5 個の細胞を刺激後6日間培養した後、16時間 ^3H -Thymidineパルスにて測定した。実験によっては、negative selection法によりCD4細胞をenrichした。アトピー型喘息症例のPBMCをDer f 2と培養し、得られたリンパ芽球を限界希釈法によりクローニングし、ダニアレルゲンDer f 2特異的ヘルパーT(Th)細胞クローンを樹立した。さらに、autologousのPBMCを抗原提示細胞とし、抗原を加えて共培養することでsubcloning、増殖せしめ、種々の活性化刺激に応答したサイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。培養中に各濃度のdexamethasone、FK506を加え、用量反応曲線より IC_{50} 値を求めた。T細胞受容体を介した活性化シグナルに加えて、CD2、LFA1、CD28等を介したcostimulatory signalを与え、サイトカイン産生、増殖反応につき、ステロイド感受性を解析した。

成人喘息患者を対象とし、同意が得られた後、気管支ファイバーにて気管支粘膜を2-3カ所採取した。採取した組織をホルマリン固定、またはOCT compound包埋、凍結保存した。ホルマリン固定標本は、パラフィン包埋、薄切し、Hematoxylin-

Eosin(HE)染色にて、光学顕微鏡下で観察した。凍結組織は、抗CD80抗体、抗CD86抗体を用いて免疫組織染色し、一定面積における陽性細胞数を算定し、Step 1-2の吸入ステロイド治療群と無治療群、Step 4の3群間で比較した。

(倫理面への配慮)

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

C. 結果

アレルゲン特異的T細胞クローン、末梢血CD4細胞にCD3を介した活性化シグナルを与え、培養中にdexamethasoneを加えて感受性を解析した。CD28シグナルによりT細胞レベルのステロイド抵抗性が誘導され、IL-2中和抗体の存在により阻止された。Costimulatory signalによるステロイド抵抗性誘導はIL-2依存性と考えられる。FK506は、costimulatory signal存在下でも非存在下と同様にサイトカイン産生、増殖を抑制した(図1)。ThクローンではIL-2受容体シグナル(IL-2、IL-15)単独で、サイトカイン産生、細胞増殖が誘導され、dexamethasoneはIL-5、IL-13産生をともに抑制した。しかしながら、FK506は、IL-2応答性のIL-13産生を抑制しなかった。IL-2応答性のIL-5産生は抑制された。また、IL-5とIL-13はともにTh2細胞から産生されるサイトカインとしてcoordinateな産生制御がされているが、IL-5産生はIL-2シグナル依存性である一方、IL-13産生はIL-2シグナル非依存性であり、2つの喘息関連サイトカイン間での産生制御メカニズムは異なっていることが明らかになった(図3)。

次に、ステロイド抵抗性をT細胞に付与する微小環境側の因子として、気道粘膜局所におけるCD80、CD86発現を解析した。種々の重症度の喘息症例より気管支鏡検査時に粘膜生検組織を採取し、免疫組織染色法により、CD80、CD86陽性細胞を検出した。CD86陽性細胞数は、吸入ステロイド無治療群に比べ治療群でより少数であった(図4)。Step 4では高い症

例と低い症例とが混在していた。CD86 発現レベルでの heterogeneity が明らかになった。好酸球数との相関はみられなかった。CD80 の検出は低値であった。

D. 考察

吸入ステロイドによる抗炎症療法がガイドラインで推奨され普及したおかげで、比較的軽症例における治療効果、予後、QOLは大いに向上したが、重症例は、必ずしも近年の治療成績向上の恩恵には浴していないこと、頻回の救急受診・長期入院・社会不適応を理由とする医療・厚生費に占める比重の高いことが指摘されている。カナダ (1989 年) の医療経済統計によると、Very mild、Mild、Moderate、Severe、Very severe の 5 群で、患者数の分布は 40、30、20、8、2% となり、Severe+Very severe 群の 1 人あたり医療コストは残りの群の約 20 倍で、喘息全体の直接医療費の 4 割、間接コストの 6 割以上を占める。

難治性喘息の定義として、古くは「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できない重症、通年性の気管支喘息 (その診断には 1? 3 年の期間が必要である)」(光井ら、アレルギー 24:109, 1975) が知られている。我が国の喘息予防管理ガイドライン (2003 年版) では、「重症喘息のなかで喘息症状を最小限にするために吸入ステロイド薬の最大量の吸入と経口ステロイド薬 (プレドニソロン換算 1 日 10 mg 以上) を長期 (1 年以上) にわたり維持量として使用することが必要な症例」と規定されている。頻度に関して、国立病院機構南岡山医療センターの高橋らは全国約 1 万症例の調査から、経口ステロイド常用者は 17.4%、プレドニソロン換算 5 mg/day 以上は 11.1% と報告している。海外では 2001 年に ATS Workshop の提言が出されているが、高用量吸入ステロイド療法の普及を反映して、吸入ステロイドに対する反応性が乏しい症例群を包含するより広い概念となっている。難治性喘息とは単一の疾患でなく、複数の subgroup から構成されるものと想定されている。

喘息治療管理ガイドラインにおける重症度は、症状の程度、頻度、呼吸機能に基づいて Step1? 4 に分類されるが、吸入 (および経口) ステロイド薬の使用量と概ね平行する。より大量のステロイドが必要な症例がより重症と位置づけられている。Step4 でも特に経口ステロイド薬の常用を要する症例は「ステロイド依存性喘息」と呼ばれ、最重症群となる。

難治化機序の解明には、ステロイド依存性喘息でステロイド薬の効果が減弱するメカニズムの解明

が重要であるが、ステロイド依存性喘息を対象とした研究は少ないため、ステロイド抵抗性喘息を対象としたメカニズム研究で得られた知見が補完するという考え方もある。「ステロイド抵抗性喘息」とは、比較的高用量の全身性ステロイド薬を試験的に投与して、得られた臨床効果が低かった患者群として定義される。吸入 β_2 刺激薬による 1 秒量の改善が有意に (15%以上) 認められる症例すなわち気道可逆性を有する症例において、プレドニソロン 20-40 mg 同等量のステロイドを 10-14 日間投与し、前後で 1 秒量の改善が 15%未満の症例をステロイド抵抗性喘息、30%以上の改善を示す症例をステロイド感受性喘息と定義している。可逆的な気道閉塞を確認することで、肺気腫等を除外したうえで、実際にステロイド薬の効果が低いことを証明する、2 段階の条件を設定している。ステロイド抵抗性喘息とステロイド依存性喘息は必ずしも一致しない。実際に一流誌に掲載された論文のステロイド抵抗性喘息症例は、大部分軽症例であった。これまでに、個体レベルでのステロイド抵抗性が、T 細胞、末梢血単核球のレベルで反映されることが明らかになっている。ステロイド抵抗性喘息症例の T 細胞は、*in vivo* と *in vitro* の両方でステロイドに対して異常な反応性を有する。最近では分子レベルの研究から、ステロイド抵抗性喘息症例においては、Glucocorticoid (GC)-Glucocorticoid receptor (GR) の結合 affinity が数倍低下していること、GR- α の splice variant である GR- β 発現細胞が増加していること、Glucocorticoid responsive element (GRE) に結合する GC-GR 複合体の量が減少していること、AP-1 結合活性が dexamethasone により抑制されず、ステロイド感受性喘息に比較して 2 倍ほど高いこと、PMA により誘導される c-fos 発現が 4 倍高いことなどが報告されている。

すでに、われわれは、ステロイド依存性喘息症例の末梢血 T 細胞における IL-5 産生亢進、*in vivo* レベルのステロイド抵抗性、*in vitro* レベルのステロイド感受性、costimulatory signal によるステロイド抵抗性の誘導を報告してきた。これらの事実は、重症喘息症例のステロイド抵抗性は T 細胞に intrinsic な性質ではなく、T 細胞が存在する microenvironment の、サイトカイン (IL-2、IL-15 など) や、costimulatory signal (CD28-CD80、CD86 など) によりもたらされている可能性を示唆する (図 2)。実際に、肺組織の *ex vivo* の IL-5 産生には CD86 が必須であることが報告されている。しかしながら、喘息患者気道での CD80、CD86 発現を解析した仕事はまだみられない。そこで今年度、喘

息症例の気管支粘膜における CD80、CD86 発現が検出可能か否かをまず検討した。CD86 については、かなり良好な染色を得ることができた。発現細胞は主として樹状細胞、マクロファージと考えられる。吸入ステロイド治療前の軽症症例、吸入ステロイド使用症例、高用量の症例にわけて検討したところ (図 4)、吸入ステロイド投与で CD86 発現が低下することが明らかになった。Step 4 の症例数が少ないものの、ステロイド投与の後でも高止まりしている症例と、低値を示す症例の 2 グループを認めた。CD86 発現が持続しているケースでは、ステロイド抵抗性に T 細胞活性化シグナルが発生していることが示唆される。今後さらに症例数、重症例を増やして解析を深めることが必要である。

次に、ステロイド抵抗性の costimulatory signal を克服するための薬理的解析を行った。FK506 等の免疫抑制薬は臓器移植の分野では、ステロイド抵抗性の症例を治療する目的に使用されてきた。そこで、CD28 シグナルにより誘導されるステロイド抵抗性に対する薬理作用を解析した (図 1)。アレルギー特異的 T 細胞クローンの増殖反応は、CD3 を介する刺激単独であれば、Dex により完全に抑制されるが、CD28 抗体が加わるとほぼ 50% の反応が抑制されず、残存する。ところが、FK506 は CD28 の costimulatory signal の有無にかかわらず、増殖応答を用量依存的に抑制することが可能であった。この事実は、重症喘息での FK506 の応用を支持する。ただし、IL-2 依存性の IL-13 産生を、FK506 は抑制しない点に注意する必要がある (図 3)。

E. 結論

難治性喘息では、*in vivo* T 細胞レベルでステロイド抵抗性が確認されている。T 細胞に intrinsic な現象でなく、T 細胞をとりまく微小環境で誘導されるものと考えられる。殊に、CD28 を介する costimulatory signal がステロイド抵抗性の誘導を担っている。免疫抑制剤 FK506 は costimulatory signal の影響を受けないことから、T 細胞レベルのステロイド抵抗性を改善する治療薬の候補であるものの、重症喘息における IL-13 制御の重要性が指摘されている観点からは、気道組織における FK506 の作用についての詳細な解析が必要である。IL-5 産生と IL-13 産生を coordinate に制御するシグナル以外に、各々を特異的に制御するシグナルが存在する。臨床レベルでのステロイド抵抗性に CD86 発現の高止まりが関与する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaminuma, O., Mori, A., Kitamura, N., Hashimoto, T., Kitamura, F., Inokuma, S., and Miyatake, S. 2005. Role of GATA-3 in IL-5 gene transcription by CD4⁺ T cells of asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137:55-59.
- 2) Hashimoto, T., Akiyama, K., Kobayashi, N., and Mori, A. 2005. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137:51-54.
- 3) Tsuda, M., Matsumoto, K., Inoue, H., Matsumura, M., Nakano, T., Mori, A., Azuma, M., and Nakanishi, Y. 2005. Expression of B7-H1 and B7-DC on the airway epithelium is enhanced by double-stranded RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:263-270.
- 4) Kitamura, N., Kaminuma, O., Mori, A., Hashimoto, T., Kitamura, F., Miyagishi, M., Taira, K., and Miyatake, S. 2005. Correlation between mRNA expression of Th1/Th2 cytokines and their specific transcription factors in human helper T-cell clones. *Immunol. Cell Biol.* 83:536-541.
- 5) Mitomi, H., Mori, A., Arai, N., Kanazawa, H., Nishiyama, Y., Ihara, A., Otani, Y., Sada, M., Kobayashi, K., and Igarashi, M. 2005. Venous invasion and down-regulation of p21^{WAF1/CIP1} are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepato-Gastroenterology.* 52:1421-1426
- 6) Mori, A., Ogawa, K., Kajiyama, Y., and Kaminuma, O. 2006. Th2 cell-mediated chemokine synthesis is involved in allergic airway inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* In press.
- 7) Hashimoto, T., Kobayashi, N., and Mori, A. 2006. IL-2-induced IL-13 production by allergen-specific human helper T cell clones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* In press

2. 学会発表

- 1) Mori, A., Hashimoto, T., and Akiyama, K. 2005. IL-5, an eosinophilic cytokine, production

from a diagnostic viewpoint. The XIXth World Allergy Organization Congress (Munche)
2005/6/26-7/1

- 2) 森 晶夫、前田裕二、谷口正実、大友 守、長谷川眞紀、秋山一男：真菌アレルギーによる非IgE依存性遅発型喘息反応、第17回日本アレルギー学会春期臨床大会シンポジウム3「真菌とアレルギー疾患」、Jpn. J. Allergol. 54:235, 2005.6.2 (岡山)
- 3) 森 晶夫、梶山雄一郎、前田裕二、谷口正実、三田晴久、大友守、長谷川眞紀、秋山一男：アレルギー検査、第55回日本アレルギー学会総会シンポジウム1「アレルギー性疾患の検査と治療；評価と安全対策ガイド」、Jpn. J. Allergol. 54: 881, 2005.10.20 (盛岡)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

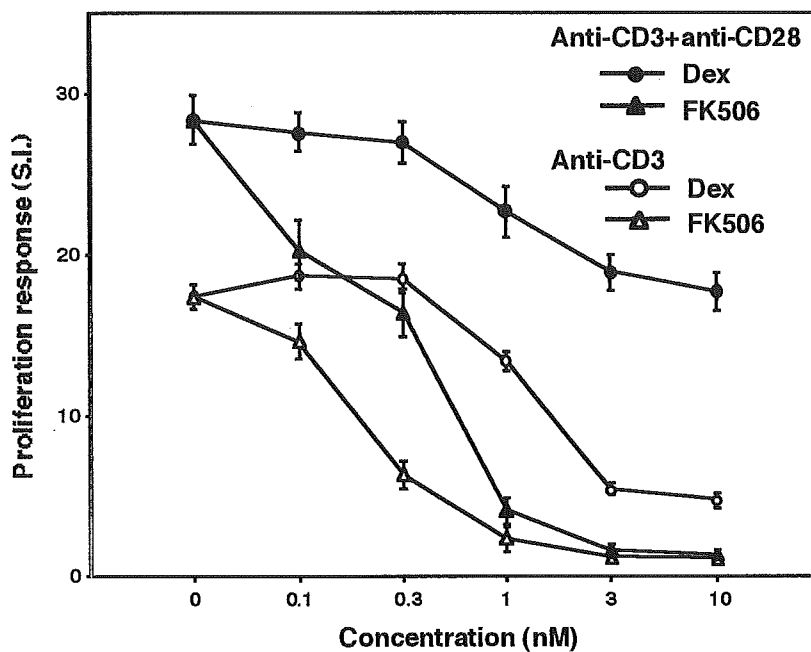


図 1. CD3 刺激と CD28 刺激による T 細胞増殖反応に対する dexamethasone、FK506 の作用

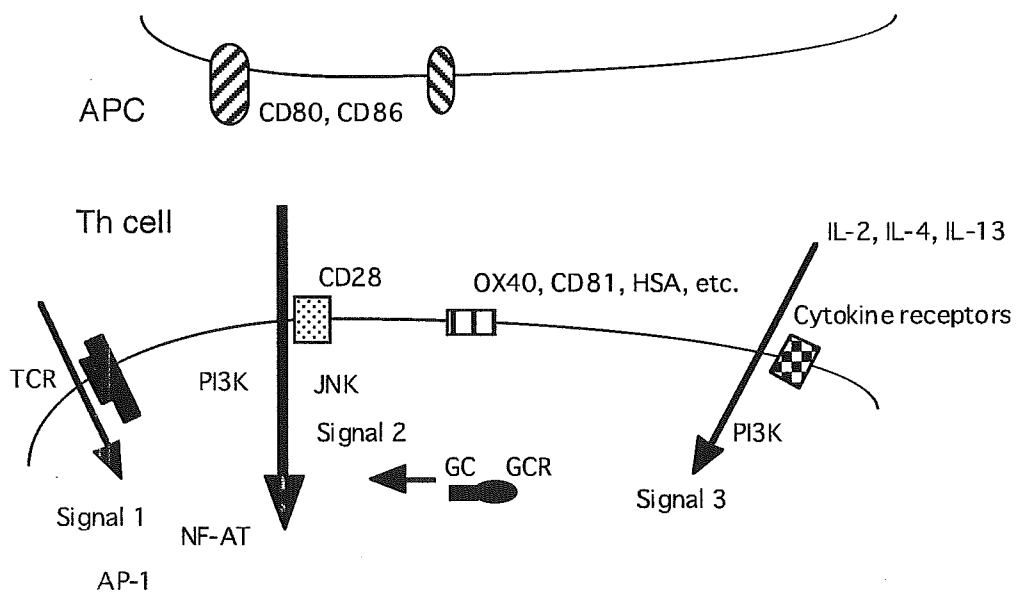


図 2. Costimulatory signal によるステロイド抵抗性の誘導にはサイトカイン受容体シグナル (Signal 3) が必須である

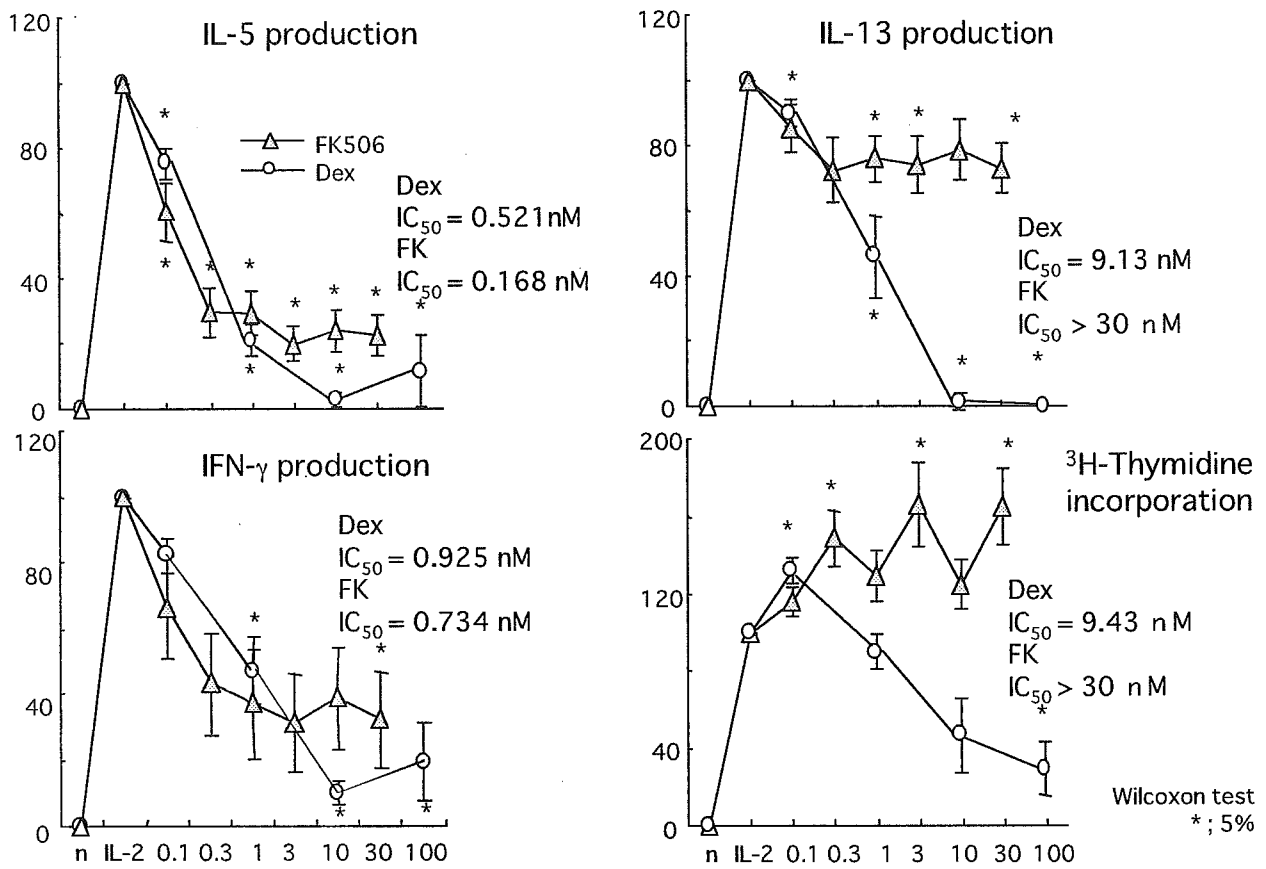
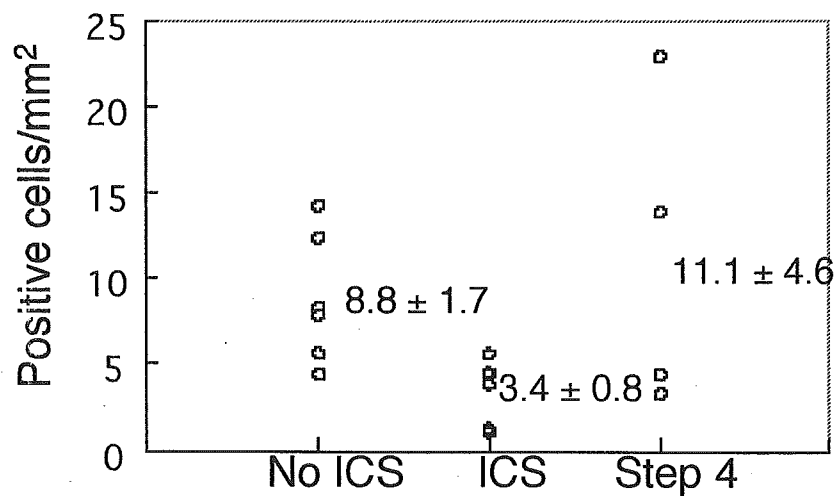


図 3 . サイトカイン産生、細胞増殖に対する Dex, FK506 の作用

1) CD86



2) CD80

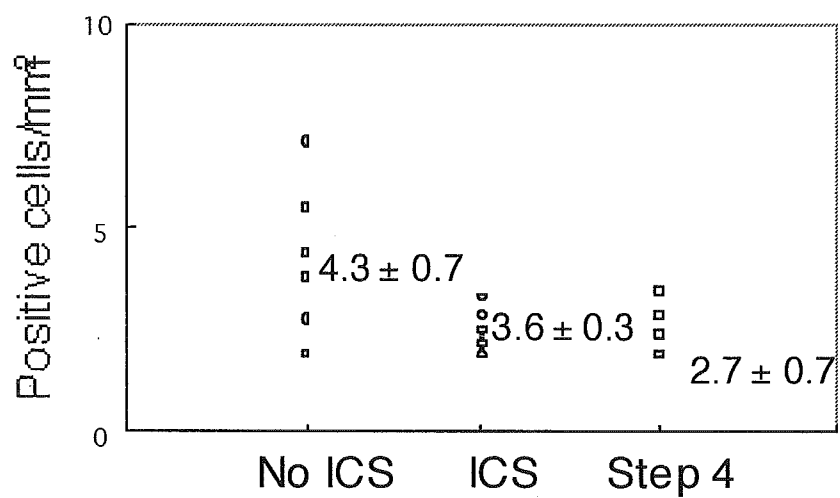


図 4 . 喘息症例気道粘膜における CD86、CD80 発現の比較

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）
分担研究報告書

重症アレルギー疾患の難治化機序に基づく治療法の確立に関する研究

分担研究者 高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター 院長

研究要旨

治療に直結する重症度分類基準と病態別分類法を、臨床・炎症・器質化の各指標で検討した。また難治化に係わるリンパ球と好塩基球の特性、並びにそれを防ぐ治療法に関して検討した。その結果、(1)器質化を示唆する指標は重症・難治群が、末梢気道指標は重症より難治群が有意に悪かった。また、軽症群には炎症指標陽性例が、難治群には器質化指標が優位に多く、重症群は両指標が多かった。(2)難治性喘息患者 PBMC の MMP-9 産生は亢進し、抗LT薬が軽度抑制した。(3)好塩基球には CysLT1 受容体の m-RNA が発現し、CysLTs による活性化は拮抗薬で抑制された。CysLTs はアポトーシスを軽度抑制し、LTD4 による遊走反応を誘導した。以上、臨床的な難治性喘息の規定と、病態に基づく分類法を作成した。リンパ球が気道上皮細胞を介して、また好塩基球に発現した CysLT1 受容体が autocrine mechanism で喘息の増悪・難治化に関与する可能性が示唆された。

研究協力者

宗田 良(国立病院機構南岡山医療センター副院長)

金廣有彦(岡山大学医学部第二内科講師)

岡田千春(国立病院機構南岡山医療センター第一診療部長)

谷本 安(岡山大学医学部第二内科講師)

木村五郎(国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科医長)

平野 淳(国立病院機構南岡山医療センター第一内科医師)

A. 研究目的

難治性喘息の病態解明と治療法の確立を目的とした最終年度は、重症・難治性喘息の病像・病態を見直し治療に直結する重症度分類基準と病態別分類を提案した。また喘息難治化に係わる炎症細胞の特性と難治化を防ぐ治療法について、まず難治性喘息患者リンパ球の活性化や、抗原刺激によって気道上皮細胞と PBMC の相互反応で増加する MMP-9 産生に対する抗ロイコトリエン薬の抑制効果を検討した。また好塩基球の CysLT1 受容体発現とその機能を検討した。

B. 研究方法

(1)臨床検討：ステップ1～2（軽症喘息）の24例とステップ4（重症、難治性喘息）の18例を対象に、臨床・炎症・器質化の各指標項目について比較し、重症度区分と病態分類の妥当性を検討した。

(2)リンパ球機能の検討：難治症例のリンパ球活性化を Flow cytometry で、サイトカイン産生パターンを ELISA 法で測定し、正常気管支上皮細胞とリンパ球との相互反応を解析し、これらの反応系におけるロイコトリエン拮抗薬 (Montelukast) の効果を検討した。(3)好塩基球機能の検討：ヒト末梢血単核球培養好塩基球（純度>95%）の CysLT1 受容体発現と機能を、RT-PCR 法による m-RNA 発現、Fluo-3/AM を用いた Flow cytometry

法で細胞内 Ca 濃度レベルを、Annexin V と PI 染色の後 Flow cytometry でアポトーシスを、解析し、LTD4 による遊走反応も検討した。

C. 研究結果

(1)軽症と重症、難治群間の比較では、患者背景に差はなく(表1)、各炎症指標も有意差はなかったが(表2)、喀痰中好酸球は軽症群で高い傾向であった(図1)。PEFと気管支壁肥厚、%RV、血中コーチゾール値等器質化を示唆する指標は軽症より重症・難治群が、末梢気道指標の V50/V25 は重症より難治群が有意に悪かった(図2、図3、図4)。症例毎の検討で、軽症群は炎症指標陽性例が、難治群は器質化指標が優位に認められ、重症群は両指標が多かった(表3)。(2)正常気管支上皮培養細胞と喘息患者 PBMC との相互作用による MMP-9 の産生は、難治性喘息群で MMP-9 産生が非難治群に比べより亢進していた(図5)。Mite 抗原、Candida 抗原に対するリンパ球の反応性に対するロイコトリエン拮抗薬 Montelukast の直接抑制効果の検討では、リンパ球活性化には明らかな抑制効果は認められなかった(図6)。一方、気道上皮細胞との相互反応による MMP-9 産生に対しては Montelukast は抑制傾向を示した(図7)。さらに症例数を増やして検討する。(3)培養好塩基球には CysLT1 受容体の m-RNA が発現していた(図8)。CysLTs