

(LTC4, LTD4, LTE4)で速やかな細胞内 Ca 濃度の上昇が惹起され(図 9), CysLT1 受容体の特異的拮抗薬により抑制された(図 10)。CysLTs は培養好塩基球のアポトーシスを軽度ながら抑制し(図 11), LTD4 (10⁻⁸ M) で最大となる遊走反応を誘導した(図 12)。

D. 考察

JGL 規定の難治性喘息と重症群(経口PSL5mg/日以上)の間には末梢気道指標以外に有意差がないことから、臨床上注意を喚起する為に少なくとも両群を区別するよりも難治としての基準を拡大すべきであろう。また、軽症、重症、難治群の各症例には炎症と器質化指標に個別性がある。それを参考に、炎症優位の Burning type と器質化優位の Burn out type という病態別分類法を設けて、治療指針の一助としたい。今後、日常臨床上検討可能な指標と症例数を増やして、確たる基準を設定しなければならない。

気道上皮細胞と単核球との相互作用による MMP-9 等リモデリング関連酵素の産生増加が、難治性喘息で亢進し、抗ロイコトリエン薬で抑制される可能性がある。その理由は、CysLT1 レセプターが証明されていない T リンパ球には直接抑制効果は認められないものの、証明済の単球・マクロファージなどとの相互作用を抗ロイコトリエン薬が抑制することが想定される。今後、CysLTs やグルココルチコイドによる好塩基球や単核球等の遺伝子発現、並びに各機能に関する蛋白発現制御も解析することで、喘息の慢性化・難治化病態の解明と克服を目指したい。また、ヒト好塩基球には CysLT1 受容体が発現し、好塩基球の生存延長や遊走を誘導していることが判明した。CysLTs はステロイドで抑制されない炎症経路で産生されると考えられており、ステロイド存在下でも好塩基球が自身の産生する CysLTs によって活性化され、いわゆる autocrine mechanism によって喘息の増悪・難治化に関与していることが示唆された。従って、抗ロイコトリエン薬がステロイド薬との併用によって喘息の難治化を抑制し得ることが想定される。

E. 結論

各種臨床指標を基に臨床的に意義のある難治性喘息の規定と、治療に直結する病態に基づいた炎症優位と器質化優位を表現する為の分類法を作成した。炎症細胞機能の解析で、リンパ球と気道上皮細胞は MMP-9 を介して難治化に係り、LTRA がそれを抑制する可能性もある。またヒト好塩基球にも機能的な CysLT1 受容体が発現し、autocrine mechanism により喘息の増悪・難治

化に関与することが示唆された。以上の如き機序とそれを防止する抗喘息薬を探索し、病態に即した治療法を確立して喘息の慢性化・難治化病態克服の一助としたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 高橋 清. 重症度を規定する因子 社会的要因を含む一成人一. 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. 患者背景

臨床指標	軽症群 (ステップ1~2)	重症・難治群 (ステップ4)	
症例数	24例	18例	
男女比	11:13	9:9	
現年齢	61.0±8.3才(44~72)	63.4±13.3才(41~88)	N.S.
発症年齢別分類	全例成人発症型	全例成人発症型	
成人発症年齢	48.1±10.9才(18~61)	40.6±14.4才(23~74)	N.S.
罹病期間	13.9±9.0年(1~39)	23.9±9.5年(11~41)	N.S.
BDP(内服+吸入)	302.1±98.3(200~400) μg/日	2216.7±659.0 (1000~3400) μg/日	
病型			
アトピー型	11例	7例 (重症群 4例, 難治群 3例)	
混合型	1例	2例 (重症群 2例, 難治群 0例)	
橋本型	12例	9例 (重症群 5例, 難治群 4例)	

表2. IgE値

炎症指標	軽症群 (ステップ1~2)	重症・難治群 (ステップ4)	
IgE RIST(u/ml)	402.1±433.7 (30~1852)	245.4±245.3 (13~916)	N.S.
CAP-RAST(≥score2)			
HD-mite陽性率	50.0% (11/22例)	58.3% (7/12例)	
Candida陽性率	9.1% (2/22)	25.0% (3/12)	
スギ花粉陽性率	57.1% (12/21)	45.5% (5/11)	
ネコ陽性率	16.7% (3/18)	9.1% (1/11)	

図1. 喀痰中好酸球出現率%

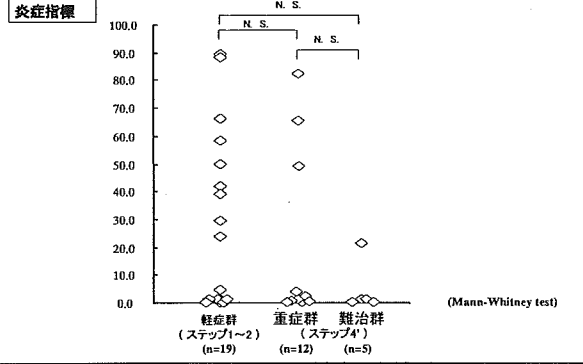


図2. 呼吸化指標 肺機能検査 (Mann-Whitney test)

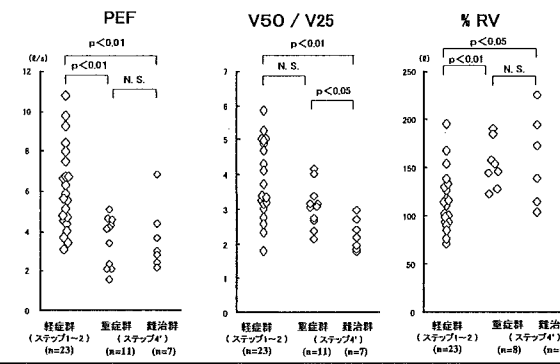


図3. 呼吸化指標 気管支壁の肥厚

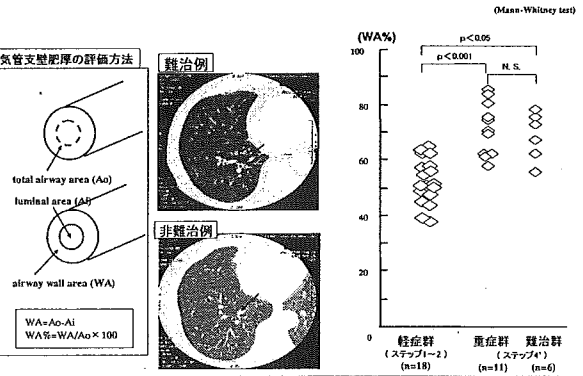
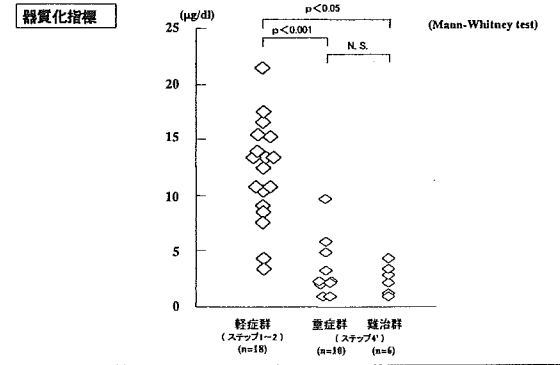


図4. 血中コルチゾール値

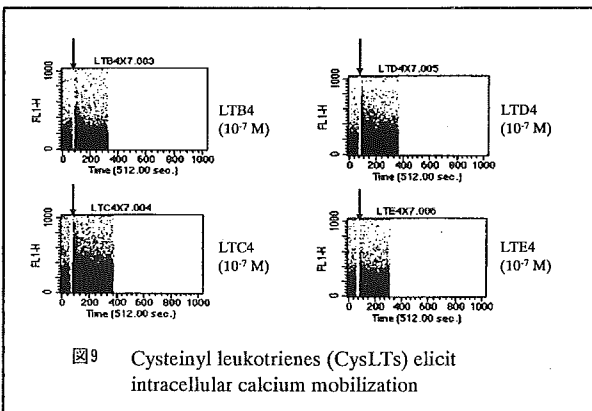
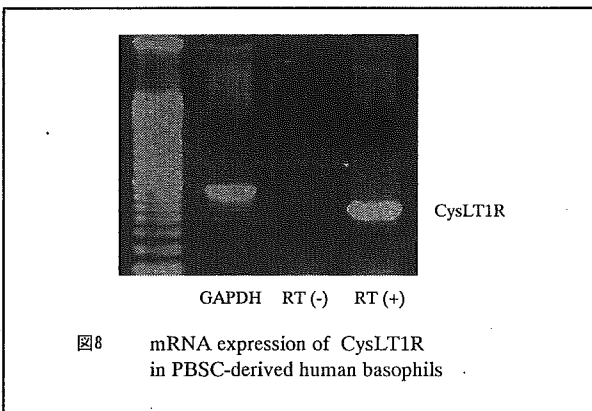
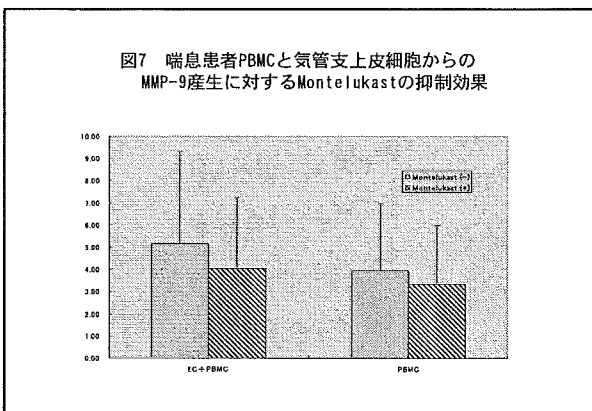
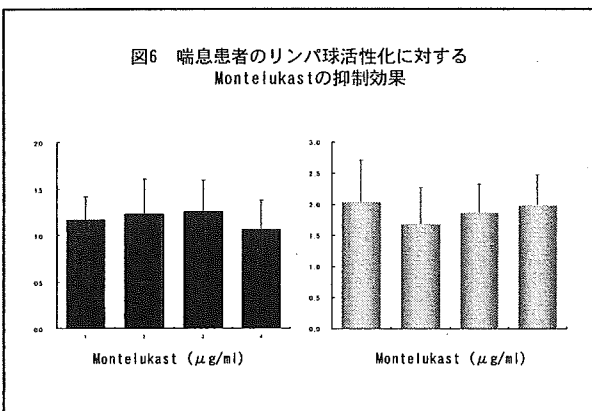
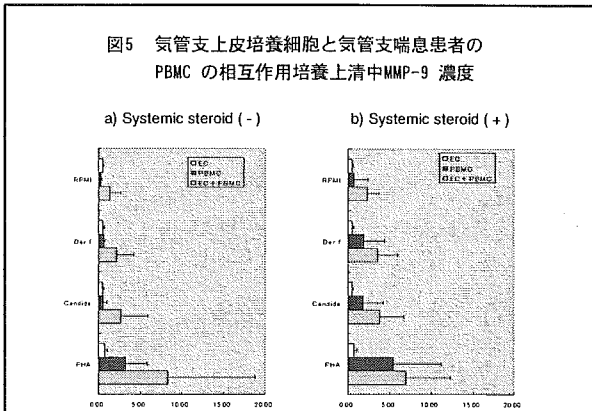


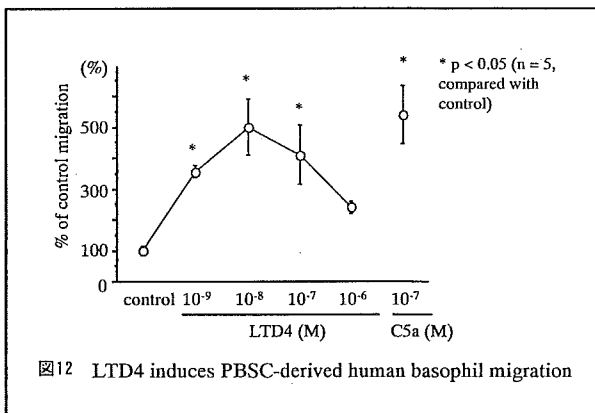
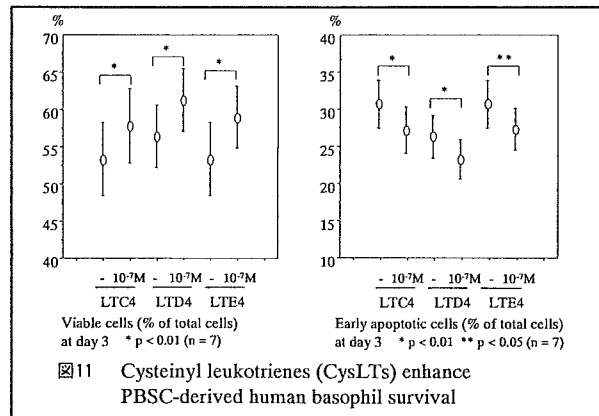
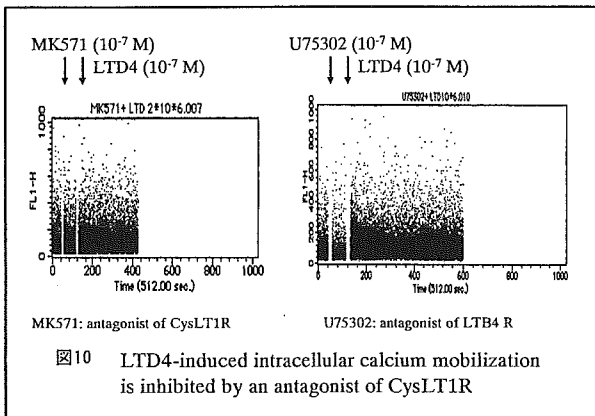
2. 病態を把握し、治療に直結する分類法

表3. 軽症群 (ステップ1~2) 重症・難治群 (ステップ4')

症例 (患者年齢)	呼吸器群				消化器群				呼吸器消化器	重症・難治
	呼吸器	消化器	呼吸器	消化器	呼吸器	消化器	呼吸器	消化器		
1 48 (50)			X	X	X	X	X	X		
2 68 (43)	X	X	X	X	X	X	X	X		
3 70 (46)	X	X			X	X	X	X		
4 60 (53)								X		
5 49 (57)			X	X	X	X	X	X		
6 45 (60)			X	X	X	X	X	X		
7 58 (54)	X	X	X	X	X	X	X	X		
8 57 (54)	X	X	X	X	X	X	X	X		
9 54 (50)			X	X	X	X	X	X		
10 47 (57)	X	X						X		
11 54 (43)			X	X	X	X	X	X		
12 54 (48)			X	X	X	X	X	X		
13 50 (55)			X	X	X	X	X	X		
14 60 (54)			X	X	X	X	X	X		
15 49 (44)	X	X	X	X	X	X	X	X		
16 47 (43)			X	X	X	X	X	X		
17 64 (57)			X	X	X	X	X	X		
18 46 (42)			X	X	X	X	X	X		
19 44 (44)			X	X	X	X	X	X		
20 72 (54)			X	X	X	X	X	X		
21 70 (53)			X	X	X	X	X	X		
22 72 (55)			X	X	X	X	X	X		
23 62 (50)			X	X	X	X	X	X		
24 57 (53)	X	X	X	X	X	X	X	X		

症例 1~11 (重症群): 5 PSL<10mg
症例12~18 (難治群): 10mg 空SL





厚生労働科学研究補助金（研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 相 沢 久 道 久留米大学医学部第一内科教授

研究協力者	星 野 友 昭	久留米大学医学部第一内科講師
	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

研究要旨

難治性喘息の一因であるリモデリングに対する治療の検討を行った。Thioredoxin (TRX)は酸化還元制御に携わるレドックス制御因子として働くため、TRX が気道リモデリングを抑制するかどうか、また、一旦出来た気道リモデリングに対して治療効果があるかどうかを検討した。卵白アルブミン(OVA)を Balb/c マウスに長期曝露し作製した慢性抗原曝露喘息モデルを用いてリコンビナントヒト TRX が気道のリモデリングと気道過敏性や気道炎症等を抑制するか検討した。雌 Balb/c マウスに OVA10 ug を 2 日おきに day 0 から 12 の計 7 回腹腔内投与し、Day19 から 33 の計 6 回 5% OVA を吸入曝露し慢性抗原曝露喘息モデルを作製した。最終チャレンジの Day33 の 24 時間後にマウスの気道過敏性を測定し肺組織を得た。リコンビナントヒト TRX の OVA チャレンジ時の Day 19 から Day33 の隔日投与(40 ug)群は、気道過敏性の有意な抑制や気道の炎症細胞浸潤、粘液の産生細胞増加、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。TRX を含むレドックス蛋白は気道リモデリングを抑制することで重症喘息の新規治療薬になる可能性がある。

A. 研究目的

これまでの臨床的な検討において、難治化の因子として気道リモデリングの関与が大きいことが推定され、Thioredoxin (TRX)が気道炎症、気道過敏性を抑制し、新しい喘息治療薬となりうる可能性を示した。そこで今年度は、TRX がリモデリングを抑制しうるか否

かを、動物実験において確認することを目的とした。まず、気道のリモデリングを作成し、TRX がリモデリングを抑制するかどうか検討した。次に、リモデリングが形成された後から TRX を投与し、一度できたりリモデリングが改善するかどうか検討した。

B. 方法

雌 Balb/c マウスに OVA10 ug を水酸化アルミニウム 4 mg にエマルジョンさせ 2 日おきに day 0 から 12 の計 7 回腹腔内投与し、感作をおこなった。感作成立後の Day18 から Day33 まで隔日に 6 回 5% OVA をネブライザーでチャレンジし、リモデリングを作成した。そのうち 1 群はヒトリコンビナント TRX (40 μ g / head) を隔日投与し、1 群は生食を投与しコントロールとし、TRX のリモデリング抑制効果を観察した。

次に、リモデリングの成立した Day33 からヒトリコンビナント TRX (40 μ g / head) または生食の隔日投与を開始し、Day45 までさらに 3 回 5% OVA をネブライザーでチャレンジした群の 2 群を作製し、一旦生じたりモデリングに対する TRX の治療効果を観察した。

評価はいずれも最終チャレンジの 24 時間後に行い、気道過敏性を Penh にて測定し、BALF を測定し、肺の組織学的検討を行った。

C. 研究結果

リコンビナントヒト TRX の OVA チャレンジ時の Day 19 から Day33 の隔日投与(40 ug)群は、気道過敏性の有意な抑制や気道の炎症細胞浸潤、粘液の産生細胞増加、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 (図 1)。

さらに、リモデリングが生じた後の Day33 から 9 回まで OVA チャレンジ時を継続したときに、Day44 においてリコンビナントヒト TRX の隔日投与(40 ug)群では気道過敏性と気道のリモデリングは有意に抑制されていた (図 2)。

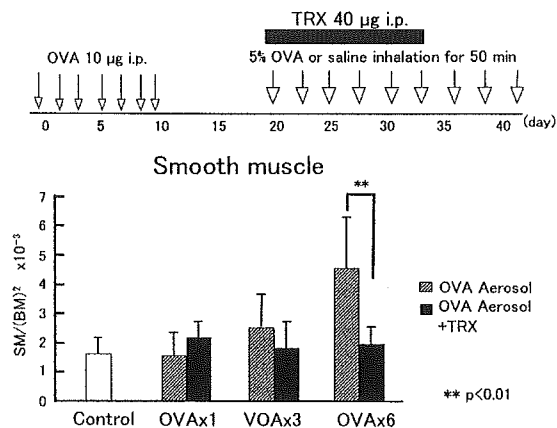


図 1. TRX 前投与の効果。上段のプロトコールにて、OVA チャレンジ時に TRX 投与を行った群では、気道平滑筋の肥厚は有意に抑制されていた。

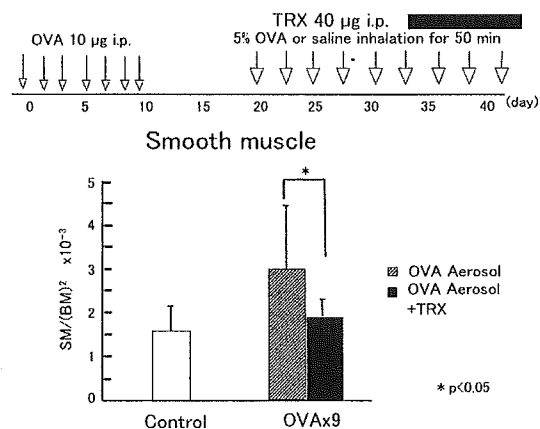


図 2. TRX 後投与の効果。上段のプロトコールにて、リモデリング成立後 TRX 投与を行った群では、Day44 において気道平滑筋の肥厚は有意に抑制されていた。

D. 考察

今回の検討において、TRX は慢性喘息モデルにおいて、リモデリングの予防効果と、一旦生じたりモデリングを改善させる効果を発

揮した。気管支喘息は可逆性の気道狭窄を特徴とする疾患である。しかしながら、喘息患者では肺機能の経年的な低下が健常者よりも大きいことが報告されている。また、患者によっては β_2 刺激薬に抵抗性の非可逆的な気道狭窄や、吸入ステロイドによっても改善しない持続的な気道過敏性の亢進も知られ、これらの変化は気道壁のリモデリングが原因と考えられている。気道にリモデリングが生ずると、壁の肥厚による内腔の狭窄だけでなく、伸展性の減弱のため、持続的非可逆的な気道狭窄へと進行する。さらに、気道抵抗に対する影響は普通の状態よりも収縮時に非常に大きくなり、これが気道過敏性につながる。現在、気道リモデリングの予防効果が臨床的に認められている薬物は吸入ステロイドのみであり、一旦生じたりモデリングを治療する薬物はない。したがって、TRX は難治性喘息の新しい治療薬として大きな

E. 結論

喘息のコントロール不良は気道リモデリングを促進し、喘息の難治化の原因になると考えられた。TRX は酸化還元制御に作用し、アレルギーにより引き起こされる気道の過敏性と好酸球性炎症を、改善させる。さらに、TRX は気道リモデリングを抑制するだけでなく一度できあがった気道リモデリングの改善にも効果があることがわかった。これは TRX 新しい難治性喘息治療薬となりうる可能性を示している。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 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.
2. Yokoyama T, Sato R, Rikimaru T, Hirai R, Aizawa H. Tuberculosis associated with gastrectomy. *J Infect Chemother*. 2004;10:299-302.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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]
7. 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.
8. 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.
9. 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

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

分担研究者 永井 博弐（岐阜薬科大学 臨床薬理学研究室 教授）

研究要旨 本研究では、マウス気道リモデリングモデルを用いて、抗原曝露により気道局所において産生されるサイトカインのうち、種々の臓器における線維化形成と関連性が示されている TGF- β 1 の基底膜下の線維化形成ならびにアレルギー性気道炎症における役割をその中和抗体を用いて検討した。その結果、抗 TGF- β 1 抗体を抗原曝露期間中全期間投与した場合には、気道過敏性には影響を及ぼさず、基底膜下の線維化形成を用量依存的かつ有意に抑制したが、BALF 中好酸球数、気道上皮における杯細胞の過増生は増悪した。一方、基底膜下の線維化形成は、抗 TGF- β 1 抗体の用量に依存した有意な抑制が観察された。これに対し、好酸球が主たる TGF- β 1 の産生細胞である時期、すなわち抗原曝露開始後 10 日間に中和抗体を投与したところ、好酸球増多ならびに杯細胞の過増生は有意に増悪したが、気道過敏性ならびに基底膜下の線維化形成には影響を及ぼさなかった。また、好酸球に代わり筋線維芽細胞が主たる産生細胞となる抗原曝露開始 10 日後から 11 日間、中和抗体を投与した場合には、好酸球あるいは杯細胞の過増生には影響を及ぼすことなく、基底膜下の線維化形成を用量依存的かつ有意に抑制した。以上の成績より、好酸球が抗原曝露後に生ずる基底膜下の線維化形成に重要であることが明らかとなり、その機序の一つとして好酸球由来の TGF- β 1 が関与していることが強く示唆された。しかし、線維化形成の治療ターゲットとして TGF- β 1 の作用を中和することは、TGF- β 1 が有する免疫制御の側面から困難であることも示唆された。一方、本年度は難治化の喘息病態の再現を試み、より臨床に近い動物モデルの作成を目的とし、代表的な室内抗原であるダニ抗原を用いて、新規喘息モデルの作成ならびにその病態、特に気道リモデリング形成に関して解析を行った。すなわち、ダニ抗原(*Der f*)をマウスの気管内に投与することにより、ダニ抗原の投与用量に依存した気道過敏性、BALF 中 Th2 サイトカイン産生、血清中抗原特異的 IgG1 産生ならびに気道上皮における杯細胞の過増生ならびに基底膜下の線維化形成が観察された。また、同様のプロトコールで卵白アルブミンを気道内に投与した場合、ほとんど上述のようなパラメーターの変化は認められないため、本モデルで観察された喘息様病態形成には、ダニ抗原が有する抗原特異性が重要であることが示唆された。今後、本モデルにおける気道リモデリング形成ならびに気道過敏性発症に関与する細胞・機能分子・遺伝子群を解析することにより、ダニ抗原に特異性の高い治療標的が見いだせるものと思われる。

研究協力者

稲垣直樹（岐阜薬科大学薬理学教室・教授）

田中宏幸（岐阜薬科大学薬理学教室・講師）

A. 研究目的

気管支喘息は、呼気性呼吸困難、気道内好酸球

を中心とする気道炎症ならびに気道反応性亢進、すなわち気道過敏性を特徴とする慢性閉塞性呼吸器疾患である。近年、気管支喘息の難治化・重症化に気道リモデリングの関与が推察されている。すなわち、遷延化する気道炎症の結果、気道の組織学的再構築 (Airway Remodeling) が生じ、

結果として気道内腔が狭小化し、気道抵抗が増大しているものと思われる。近年の様々な検討、特に組織学的・病理学的検討により、気管支喘息における気道リモデリングには、1)気道上皮細胞のリモデリング(杯細胞の増生・肥厚)、2)上皮下の線維化(網状層および基底膜下の肥厚)、および3)気道平滑筋の増生・肥厚などの変化が、主として報告されてきた。しかし、それぞれの器質の変化が症状とどの程度関連しているのか、あるいはどのような細胞や機能分子がそれぞれの変化に関与しているのかについては不明である。そこで教室では、遺伝的背景が明確で、かつ、種々の実験材料ならびに遺伝子改変動物も豊富なマウスを用いて抗原反復暴露による気道リモデリングモデルを作成し、その形成に関与する細胞および機能分子を検索するとともに、症状、特に気道過敏性との関連性について検討を行ってきた。その結果、本モデルにおける気道リモデリングはTh2依存性であり、特に気道内好酸球数と基底膜下の線維化に有意な相関が観察されている。そこで、昨年度は、IL-5受容体 α 鎖欠損マウス、IL-5 Tgマウスならびに抗IL-5抗体を用いて、好酸球増多と気道リモデリング、特に基底膜下の線維化形成との関連性について検討した。その結果、気道リモデリングのうち、特に基底膜下の線維化形成に対し好酸球がTGF- β 1産生を介し重要な役割を有することを見出した。そこで、本年度は抗原暴露により気道局所において産生されるサイトカインのうち、種々の臓器における線維化形成と関連性が示されているTGF- β 1の基底膜下の線維化形成ならびにアレルギー性気道炎症における役割をその中和抗体を用いて検討した。

さらに本年度は、難治化の喘息病態の再現を試み、より臨床に近い動物モデルの作成を目的とし、代表的な室内抗原であるダニ抗原を用いて、新規喘息モデルの作成ならびにその病態、特に気道リモデリング形成に関して解析を行った。

B. 研究方法

実験は、当教室の気道リモデリングモデルならびにダニ抗原誘発喘息モデルのプロトコールに従って行った。

1) 気道リモデリングモデル

雌性BALB/cマウスを、抗原として卵白アルブミンおよび水酸化アルミニウムゲルを用いて2回免疫し、その後、抗原を3週間連日曝露し反応を惹起した。また、本反応におけるTGF- β 1の意

義を検討する目的で、抗TGF- β 1抗体を用いて検討した。なお、抗TGF- β 1抗体は、抗原曝露期間中21日間(全期間投与)、抗原曝露開始後10日間(前半投与)、抗原曝露開始10日後から11日間(後半投与)の時期に腹腔内投与した。

3) ダニ抗原誘発喘息モデル

吸入麻酔下にてマウスの気管内に*Dermatophagoides farinae* (Derf)の抽出物を複数回投与して反応を惹起した。最終抗原投与48時間後に種々の測定を上述のモデルに準じて行った。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物の取り扱いならびに実験方法に関しては、本学バイオセーフティー委員会の承認を受け、その規約を遵守した。

C. 研究結果

1) 気道リモデリングモデル

本モデルでは、抗原反復曝露によりアセチルコリンに対する気道過敏性、気道内好酸球増多、BAL液中TGF- β 1量の増加、肺組織中ヒドロキシプロリン量の増加ならびに基底膜下の線維化が観察される。

そこで本年度は、TGF- β 1の線維化形成における意義を検討する目的で、中和抗体を抗原曝露時に投与し検討した。その結果、抗TGF- β 1抗体を抗原曝露期間中全期間投与した場合には、気道過敏性には影響を及ぼさず、基底膜下の線維化形成を用量依存性的かつ有意に抑制したが、BALF中好酸球数、気道上皮における杯細胞の過増生は増悪した。一方、基底膜下の線維化形成は、抗TGF- β 1抗体の用量に依存した有意な抑制が観察された。これに対し、好酸球が主たるTGF- β 1の産生細胞である時期、すなわち抗原曝露開始後10日間に中和抗体を投与したところ、好酸球増多ならびに杯細胞の過増生は有意に増悪したが、気道過敏性ならびに基底膜下の線維化形成には影響を及ぼさなかった。また、好酸球に代わり筋線維芽細胞が主たる産生細胞となる抗原曝露開始10日後から11日間に中和抗体を投与した場合には、好酸球あるいは杯細胞の過増生には影響を及ぼすことなく、基底膜下の線維化形成を用量依存性的かつ有意に抑制した。

2) ダニ抗原誘発喘息モデル

ダニ抗原(Derf)をマウスの気管内に投与することにより、ダニ抗原の投与用量に依存した気道過敏性、BALF中Th2サイトカイン産生、血清中

抗原特異的 IgG1 産生ならびに気道上皮における杯細胞の過増生ならびに基底膜下の線維化形成が観察された。また、同様のプロトコールで卵白アルブミンを気管内に投与した場合には、対照の PBS 投与群とほとんど差が認められず、喘息様病態形成は認められなかった。そこで、代表的な吸入ステロイド薬であるフルチカゾンプロピオネートの影響を検討したところ、気道過敏性に対しては部分的な抑制を示すに過ぎなかったが、その他のパラメーターについては用量依存的かつ有意な抑制作用を示した。

D. 考察

1) 気道リモデリングモデル

本モデルでは、抗原曝露による好酸球性気道炎症と気道リモデリング形成との間に有意な相関が認められている。そこで、本研究では気道リモデリング、特に基底膜下の線維化形成における好酸球の意義を遺伝子改変マウスならびに中和抗体を用いて検討した。その結果、好酸球は TGF- β 1 産生を介しアレルギー反応による線維化に重要な役割を有することが明らかとなった。

TGF- β 1 は、これまでも種々の臓器における線維化に重要なサイトカインであることが知られているが、その一方で免疫制御作用が知られている。また、実際にアレルギー反応による線維化形成に関与しているか否かは不明である。そこで、最終年度に中和抗体を用いてその影響を検討した。その結果、中和抗体を抗原曝露期間中に投与した場合には、基底膜下の線維化形成を用量依存的かつ有意に抑制したが、BALF 中好酸球数、気道上皮における杯細胞の過増生は逆に増悪した。従って、TGF- β 1 は抗原曝露により生ずる気道炎症の制御ならびに線維化形成の両者に重要である可能性が推察された。

そこで次に、TGF- β 1 の主たる産生細胞が抗原曝露期間中に変わることに着目し、曝露期間を二分し、前半のみと後半のみの中和抗体の投与による影響を検討した。その結果、好酸球が主たる TGF- β 1 の産生細胞である前半に投与した場合、好酸球増多ならびに杯細胞の過増生は有意に増悪した。一方、好酸球に代わり筋線維芽細胞が主たる産生細胞となる後半に投与した場合には、好酸球あるいは杯細胞の過増生には影響を及ぼすことなく、基底膜下の線維化形成を用量依存的かつ有意に抑制した。

本研究結果から、好酸球が抗原曝露後に生ずる

基底膜下の線維化形成に重要であることが明らかとなり、その機序の一つとして好酸球由来の TGF- β 1 が関与していることが強く示唆された。しかし、線維化形成の治療ターゲットとして TGF- β 1 の作用を中和することは、TGF- β 1 が有する免疫制御の側面から困難であることも示唆された。従って、今後、臨床研究においても線維化形成と症状との関連性が証明された場合、その治療ターゲットの一つとして、IL-5 あるいは好酸球の遊走に関与する CCR3 が重要であると思われる。

2) ダニ抗原誘発喘息モデル

吸入ステロイド薬ならびに長時間作動型吸入 β 2 刺激薬の普及に伴い、気管支喘息患者の症状のコントロールに対しある程度それらの効果が認められているにもかかわらず、気管支喘息患者を含め、アレルギー疾患患者数は増加の一途を辿っている。この主要な原因として、遺伝的要因に対し環境要因が重要であると考えられており、特に室内環境抗原であるダニ抗原の重要性が指摘されている。

ダニ抗原については、これまでに *in vitro* の実験による解析により、その抗原性ならびに各種細胞に対する作用機序の一端が明らかにされてきたが、*in vivo* での検討は世界的にも十分に行われているとは言い難い。従来、モデル動物は卵白アルブミンなどの外来タンパク抗原とアラムのような、いわゆる Th2 誘導性のアジュバントを用いて全身感作し、その後、抗原を局所的に曝露する方法がとられ、この方法によってアレルギー反応の根底にある免疫反応の理解が進んだと思われる。しかし、実生活における抗原を用いた、より臨床に近いモデルによる検討は十分に行われていないのが現状である。そこで、本研究ではダニ抗原をマウスの気管内に反復投与した際の変化を検討し、これまでのマウス気道リモデリングモデルとの比較を試みた。

その結果、ダニ抗原を反復投与することにより、気道過敏性、気道内好酸球増多、BALF 中 Th2/Th1 インバランスならびに気道リモデリング形成が、それぞれダニ抗原投与量に依存して観察された。本モデルでは、特に Th2 誘導性のアジュバントを使用していないため、より臨床に近いモデル動物が確立されたと思われる。また、同様のプロトコールで卵白アルブミンを気道内に投与した場合、ほとんど上述のようなパラメーターの変化は認められないため、本モデルで観察さ

れた喘息様病態形成には、ダニ抗原が有する抗原特異性が重要であることが示唆された。

今後、本モデルにおける気道リモデリング形成ならびに気道過敏性発症に関与する細胞・機能分子・遺伝子群を解析することにより、ダニ抗原に特異性の高い治療標的が見いだせるものと思われる。また、エンドトキシン・ウイルス・排ガス・カビなどの環境因子による発症リスクファクターとしての意義はもとより、増悪因子としての意義を明らかにすることにより、環境因子を含めた難治性喘息の病態解明ならびに治療薬の標的探索に寄与すると思われる。

E. 結論

マウス気道リモデリングモデルを用いて、TGF- β 1 の基底膜下の線維化形成ならびにアレルギー性気道炎症における役割をその中和抗体を用いて検討した。その結果、TGF- β 1 は抗原曝露により生ずる基底膜下の線維化形成に重要な役割を有することが明らかとなったが、線維化形成の治療ターゲットとして TGF- β 1 の作用を中和することは、TGF- β 1 が有する免疫制御の側面から困難であることも示唆された。一方、代表的な室内抗原であるダニ抗原を用いて、新規喘息モデルの作成ならびにその病態、特に気道リモデリング形成に関して解析を行ったところ、ダニ抗原 (*Der f*) の気管内投与により、その投与用量に依存した気道過敏性、BALF 中 Th2 サイトカイン産生、血清中抗原特異的 IgG1 産生ならびに気道上皮における杯細胞の過増生ならびに基底膜下の線維化形成が観察された。本モデルでは、いわゆる Th2 誘導性のアジュバントを使用していないため、種々の環境因子による難治性喘息の病態解明ならびに治療薬の標的探索に寄与すると思われる。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文

1) 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.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

気道炎症の難治化に果たす好酸球の役割に関する研究

分担研究者 藤澤隆夫

国立病院機構三重病院臨床研究部長

研究要旨

気管支喘息の気道炎症は多くの場合、吸入ステロイドにより制御可能であるが、難治例においては高用量のステロイドに対しても不応となり、治療上の大きな問題である。ステロイド不応のメカニズムについては多くの考え方があるが、近年、多機能の炎症性メディエーターである Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)の役割が注目されている。本研究では、好酸球が多量の MIF を含有すること、固相化した分泌型 IgA、血清 IgA、IgG がそれぞれ好酸球からの有意な MIF 遊離を誘導することを明らかにした。IL-5 (1ng/ml) はこれらの反応を増強するとともに単独でも時間依存性に MIF 遊離を誘導した。一方、Dexamethasone は IL-5 による MIF 遊離を抑制しなかった。さらに PAR2 アゴニストであるトリプシンは好酸球の MIF 遺伝子発現を誘導した。以上、好酸球は MIF の重要なソースであり、生理的な刺激によって容易に MIF を遊離または産生することが明らかとなった。MIF はグルココルチコイド拮抗物質としても知られており、気道の好酸球性炎症において喘息の重症化、難治化に強く関与する可能性がある。新しい治療ターゲットとして今後さらに検討が必要である。

A. 研究目的

気管支喘息の気道炎症は多くの場合、吸入ステロイドにより制御可能であるが、難治例においては高用量のステロイドに対しても不応となり、治療上の大きな問題である。ステロイド不応のメカニズムについては多くの考え方があるが、近年、多機能の炎症性メディエーターである Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)の役割が注目されている。すなわち、MIF は敗血症性ショックなどの急性炎症における主要なメディエーターとして機能すると共にグルココルチコイドの炎症抑制作用に拮抗する。気管支喘息でも MIF 欠損マウスで Th2 型気道炎症が抑制されること、MIF 低産生の遺伝子多型を持つ喘息患者がより軽症であることが見いだされ、喘息難治化にも重大な役割を果たす可能性が考えられている。我々はこれまで気道炎症の主要なエフェクターである好酸球の気道炎症遷延化に果たす役割を解析、ヒスタミンによる遊走、アレルギーとの直接反応による IL-9 産生など新たな役割を明らかにしてきた。

本年度はこの細胞が MIF の主要な産生源であることを明らかにすると共に、その制御機構について解析を行った。

B. 研究方法

1) Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) の測定

MIF は市販のキット (R&D) を用いて、ELISA 法により測定した。

2) 白血球各分画の MIF 含量

末梢血から Ficoll 遠心法により単核球を分離、顆粒球分画から CD16 immunomagnetic beads を用いて negative 分画の好酸球と positive 分画の好中球を分離した。それぞれの分画は細胞浮遊液の塗沫標本ギムザ染色によって定量した。その後、凍結融解によって得られた Cell lysate の MIF 濃度を測定した。

3) 好酸球からの MIF 遊離

分離した好酸球を固相化 IgA、IgG または IL-5 と反応させ、上清中に遊離された MIF を測定した。さらに、IL-5 刺激の系には各種濃度の Dexamethasone を作用させて、MIF 遊離に対する効果を検討した。

3) Trypsin による好酸球からの MIF 産生

PAR2 アゴニストである Trypsin で好酸球を刺激して、ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いた定量的 PCR 法によって MIF 遺伝子発現を定量した。MIF のプライマーは Applied Biosystems 社の Primer Express ソフトウェアを用いて設計した。

C. 研究結果

1) 白血球各分画の MIF 含量

末梢血より分離した好酸球分画 (E)、好中球分画 (N)、単核球分画 (M) の MIF 含量を図 1 に示す。好酸球分画は純度 100%、好中球分画は $96.4 \pm 1.5\%$ (混入細胞は好酸球)、単核球分画はリンパ球 $72.2 \pm 4.1\%$ 、単球 $26.4 \pm 4.3\%$ 、好中球 $1.3 \pm 1.5\%$ 、好塩基球 $1.5 \pm 0.4\%$ 、好酸球 $0.3 \pm 0.1\%$ の組成であった。

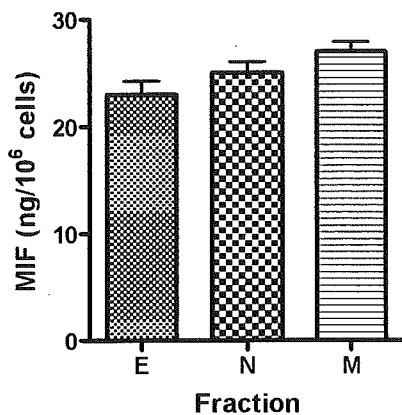


図 1 白血球各分画の MIF 含量

図 1 にみられるように、好酸球はその他の白血球と同等の MIF を含有していた。

2) 好酸球からの MIF 遊離

次に、好酸球をこれまでに知られている好酸球の脱顆粒アゴニストで刺激して、遊離される MIF を定量した。Sephacrose beads に固相化したヒト血清アルブミン (HSA)、分泌型 IgA (secretory IgA)、血清 IgA (serum IgA)、血清 IgG (serum IgG) と好酸球を 4 時間培養後、上清中に遊離した MIF を測定し、cell lysate の測定による細胞内総 MIF 量で除した遊離率を求めた。その結果、免疫グロブリンの刺激ではいずれも有意な MIF 遊離が認められた (図 2)。さらに、IL-5 (1ng/ml) の存在下で同様に刺激すると、遊離率の増強が認められた (図 3)。

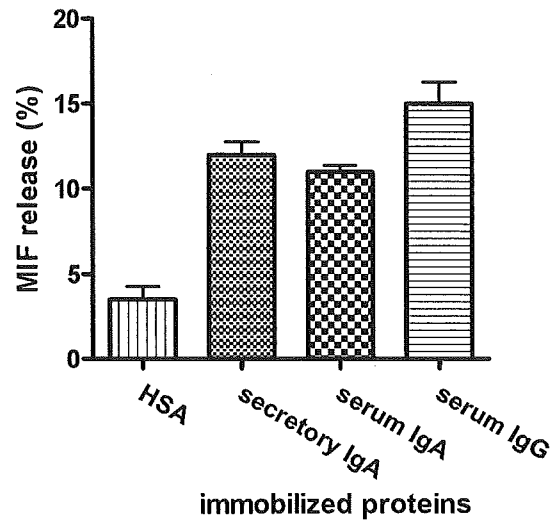


図 2 固相化免疫グロブリンによる好酸球の MIF 遊離

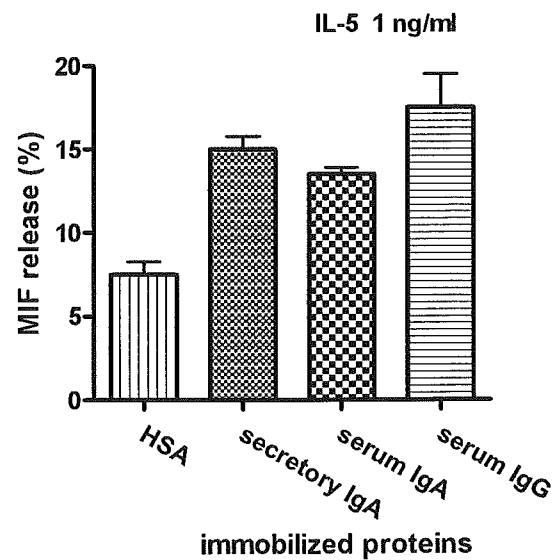


図 3 IL-5 存在下での固相化免疫グロブリンによる好酸球の MIF 遊離

次に、IL-5 単独で好酸球と培養したところ、96 時間まで MIF の遊離が時間依存性に誘導された。好酸球の生存率は 96 時間まで 95% 以上であり、IL-5 による能動的な遊離が比較的長時間にわたって続くことが明らかとなった (図 4)。

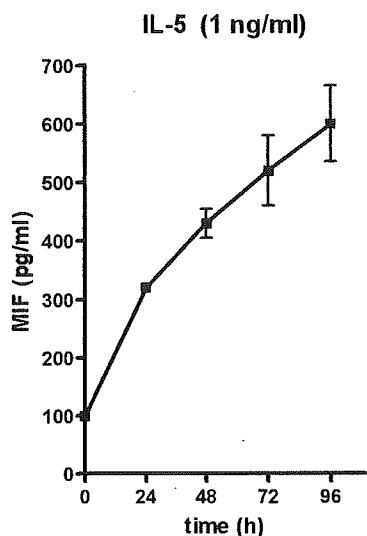


図4 IL-5による好酸球からのMIF遊離

好酸球はグルココルチコイドに感受性があり、IL-5による脱顆粒 (EDN など) は著明に抑制されることはこれまでよく知られているが、IL-5によるMIF遊離に対しては、全く作用が認められなかった (図5)。

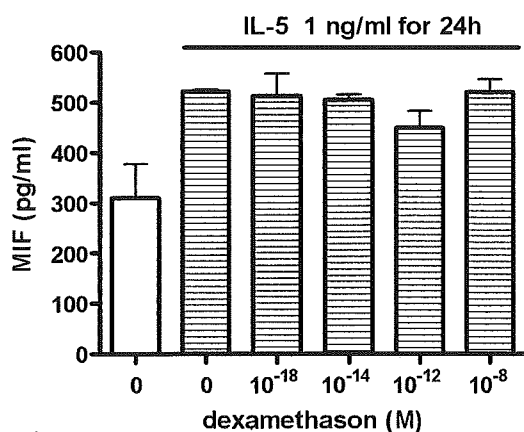


図5 IL-5によるMIF遊離に対するDexamethasoneの作用

3) Trypsinによる好酸球からのMIF産生

これまでの検討から、好酸球がPreformedのMIFを各種刺激で遊離することが明らかとなったが、de novoでの産生を検討するため、IL-5と24時間培養を行い、MIF遺伝子発現の定量PCRを行ったところ、

発現は認められなかった。そこで、好酸球はProtease-activated receptor 2 (PAR2)を発現するので、PAR2アゴニストであるトリプシンで刺激したところ、有意な遺伝子発現が認められた (図6)。

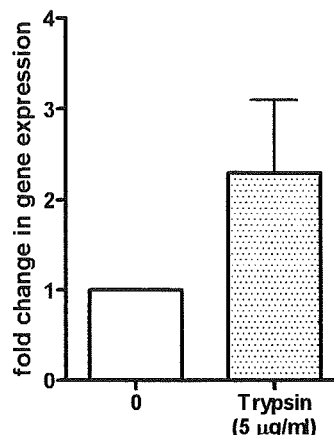


図6 トリプシンによるMIF遺伝子発現

D. 考察

本年度の研究では、好酸球が最近注目されている炎症のメディエーターであるMacrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)を含有し、これまで知られている各種の脱顆粒刺激によって、MIFを遊離することを明らかにした。また、通常はグルココルチコイド感受性のある好酸球がMIF遊離については不応であることも観察し、難治喘息にみられるステロイド不応性の炎症に関与している可能性も示唆された。遊離したMIFはおもにPreformedの蛋白由来であるが、PAR2アゴニストの刺激では成熟好酸球でもde novoで産生することも示した。

MIFは1966年にマクロファージの遊走を抑制する因子として同定されたが、長らくその機能は不明であった。ところが、1990年代にLPSなどによるエンドトキシンショックの動物モデルで、MIFが炎症を増強すること、MIF阻抗体投与によりLPSまたは細菌性敗血症によるショックが予防できることが報告された。さらに、MIFがグルココルチコイドによるショック抑制効果に拮抗すること、MIF産生もグルココルチコイドによって誘導されることも報告され、ステロイドの抗炎症作用を拮抗する炎症のメディエーターとして、注目されるに至った。気

管支喘息においても、患者の肺胞洗浄液中の MIF 濃度が上昇していること、MIF のノックアウトマウスではアレルギー感作による Th2 型の気道炎症が抑制されること、MIF 遺伝子多型が喘息の重症度と関連することなどが最近報告され、喘息においても重要なメディエーターとされている。

難治性喘息は高用量の吸入ステロイドでも好酸球を中心とする気道炎症が制御できないことを臨床的特徴とする。これまで我々は遷延する好酸球炎症に関わる諸因子について明らかにしてきたが、今回は、好酸球が多量の MIF を含有して、好酸球活性化刺激によって遊離すること、そして、これがステロイドによって抑制できないことを明らかにした。MIF がどのような機序で、Th2 型炎症の増強や喘息重症化に関与しているかはまだ明らかではないが、気道に浸潤した好酸球はこの MIF の重要なソースであり、難治化病態に強く関わることを示唆するものである。好酸球を制御すること、あるいは好酸球由来の MIF を標的にすることで難治喘息治療の新しい展望が開ける可能性がある。

E. 結論

難治性喘息の特徴である好酸球性炎症において、新しい炎症のメディエーターである MIF が好酸球から多量に産生・遊離されることを明らかとした。MIF は新たな治療ターゲットになり得るものであり、今後さらに解析を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文

- (1) Takao Fujisawa. New positioning of eosinophils in asthma. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol* 2005; 25:1-7
- (2) 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
- (3) Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*

2005; 4:505-9

- (4) 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
- (5) 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
- (6) 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
- (7) 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
- (8) 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
- (9) 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
- (10) 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
- (11) 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
- (12) 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
- (13) 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

2. 学会発表

- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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
- (4) 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
- (5) Takao Fujisawa New positioning of eosinophils in asthma. International Symposium for Asthma of Inje University. 2005.5.12, Seoul, Korea
- (6) 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
- (7) 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
- (8) 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期臨床大会. 岡山市 2005年6月2-4日 アレルギー54:250, 2005.
- (9) 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る治療薬開発の展望」 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
- (10) 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
- (11) 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
- (12) 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

研究協力者

加藤佳子（国立病院機構三重病院臨床研究部）

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
気管支喘息の難治化の病態機序の解明と難治化の予防・治療法開発に関する研究
研究報告書

難治性喘息のリモデリング機序 細胞要因と治療に関する研究

分担研究者 庄司 俊輔（国立病院機構福岡病院 副院長）

研究要旨

難治性喘息における気道リモデリングの治療法は、この病態形成機序の解明無くしては確立できない。本研究ではこの気道リモデリングの形成に平滑筋細胞の平滑筋から結合組織への遊走が寄与する、との仮説を提案した。そして気管支におけるリモデリングを想定し、培養ヒト気管支平滑筋細胞を用いてその遊走機序を検証した。実験の結果、気管支平滑筋細胞は $\beta 1$ サブユニットを有するインテグリンを介して気管支平滑筋細胞培養上清中のフィブロネクチンへと遊走する可能性が示された。更に気管支平滑筋細胞培養上清には MMP-1, 2 及び 3 が存在することが明らかになった。これらの知見は喘息患者の気管支において、平滑筋細胞が MMP-1, 2, 3 を含むメタロプロテナーゼを産生・放出して平滑筋から結合組織へと遊走した後、そこでフィブロネクチンを産生・放出して近傍の平滑筋細胞を結合組織へと遊走させる可能性を示している。

研究協力者 岡元 孝二（九州工業大学大学院生命体工学研究科 教授）
西原 麻千子（同上 大学院生）

A. 研究目的

難治性喘息患者に見られる気道の構造変化である「リモデリング」は気道が傷害から修復に向かう過程での 1 つの病態である。気道の修復やリモデリングにおいては気道の構成細胞が活性化され傷害部位に遊走し、増殖しながら細胞外マトリックス、サイトカイン、プロテアーゼ等を産生していると考えられる。分担研究者は平成 12-14 年度の本班研究にて、ヒト正常気管支平滑筋細胞がウシ気管支上皮細胞、ヒト胎児 2 倍体線維芽細胞株(HFL-1)、ヒト正常肺微小血管内皮細胞及びヒト正常気管支平滑筋細胞の培養上清や細胞外マトリックスであるラミニン、フィブロネクチン、I 及び IV 型コラーゲンに対して遊走することを報告している。このことは喘息患者の気管支において、平滑筋細胞が上皮細胞・線維芽細胞・血管内皮細胞より産生・放出された遊走因子により平滑筋から結合組織へと遊走した後、ここで更に平滑筋細胞遊走因子を産生・放出し近傍の平滑筋細胞を結合組織へと遊走させる可能性を示している。またこの際の気管支平滑筋細胞遊走因子はフィブロネクチン等の細胞外マトリックスであるかもしれない。

気道リモデリングにおける病理組織学的特徴の 1 つとして、基底膜下へのフィブロネクチンの沈着が報告されている。更に *in vitro* にて気道平滑筋細胞によるフィブロネクチンの産生が報告さ

れている。そこで平成 15-17 年度の本研究では気管支平滑筋細胞より産生・放出される気管支平滑筋細胞遊走因子がフィブロネクチンである可能性を考え、気管支平滑筋細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走機序を検討してきた。一昨年度及び昨年度の研究では、気管支平滑筋細胞培養上清中には 127, 62, 57 及び 41kDa のメタロプロテアーゼが存在すること、気管支平滑筋細胞培養上清にはフィブロネクチン及び MMP-2 が存在すること、遊走実験に用いる気管支平滑筋細胞培養上清に抗フィブロネクチン抗体を添加することにより、本上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走が抑制されることを報告した。本年度は気管支平滑筋細胞培養上清への遊走に関与している気管支平滑筋細胞の受容体を検討した。更に気管支平滑筋細胞培養上清に含まれているメタロプロテナーゼの同定を引き続き行った。

B. 研究方法

本実験に使用した細胞は正常ヒト気管支平滑筋細胞細胞(クロネティクス社より購入)である。遊走実験ではこの細胞をサブコンフルエントにまで培養した後、トリプシン処理により回収して使用した。細胞培養上清はこの気管支平滑筋細胞を培養ディッシュにコンフルエントまで培養した後、ディッシュ中の培地を無血清培地に置換し、37°C、5%CO₂ 条件下で一定時間培養したものを採取し

た。

気管支平滑筋細胞培養上清に MMP-2 以外のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が含まれているか否かを検討する為、抗 MMP 抗体を用いて本上清のウエスタンブロッティングを行った。

更に気管支平滑筋細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性を 48 穴ボイデンチャンバーにより測定した。チャンバーの下室に遊走活性を測定する気管支平滑筋細胞培養上清、上室に 1×10^6 cells/ml に調整した気管支平滑筋細胞の浮遊液を入れ、37°C、5%CO₂ 条件下で 6 時間インキュベートした。インキュベート終了後、遊走膜の下室側に遊走した細胞のみを Diff-Quik で染色した。この染色細胞を倍率 400 倍に設定した光学顕微鏡で 10 視野測定し、その合計数を遊走活性とした。

C. 結果

- 1) 気管支平滑筋細胞培養上清には MMP-1, 2 及び 3 が存在していた。(Fig.1)
- 2) 遊走実験に用いる気管支平滑筋細胞を抗 $\beta 1$ インテグリン抗体で前処理することにより、気管支平滑筋細胞培養上清に対する遊走が抑制された。(Fig.2)

D. 考察

平滑筋細胞には収縮型と合成型という異なる形質が存在することが知られている。合成型平滑筋細胞は収縮型に比べ、増殖能、遊走能及び細胞外マトリックス産生能を大きく亢進している。更に平滑筋細胞は通常収縮型の形質を取り、疾患に伴って合成型へと形質転換することが知られている。合成型平滑筋細胞の電子顕微鏡像における細胞内小器官の増加や細胞質フィラメントの配行などの特徴は、筋線維芽細胞に似ているとの報告がある (Gizycki MJ, et al, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1997)。喘息気道で確認される筋線維芽細胞は形質転換した気道平滑筋細胞かもしれない。

分担研究者は一昨年度及び昨年度の研究により、気管支平滑筋細胞培養上清にフィブロネクチンが含まれており、これが気管支平滑筋細胞遊走因子として作用する可能性を示している。血管平滑筋細胞においてもフィブロネクチンに対する遊走が報告されており、これを介する受容体として $\beta 1$ 及び $\beta 3$ サブユニットを有するインテグリンが報告されている (Cyman RI, et al, Exp. Cell Res., 1992)。そこで気管支平滑筋細胞においても、これらの β サブユニットを有するインテグリンを介してフィブロネクチンへと遊走している可能性

を考えた。遊走実験に用いる気管支平滑筋細胞を抗 $\beta 1$ インテグリン抗体で前処理したところ、本上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走は抑制された。この実験結果は気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる気管支平滑筋細胞遊走因子がフィブロネクチンである可能性を支持するものである。

更に抗 MMP 抗体を用いた本上清のウエスタンブロッティングにより、ここに抗 MMP-1, 2 及び 3 が含まれることが明らかになった。気管支平滑筋細胞同士の細胞間結合はカドヘリンを介している。血管平滑筋細胞では、N-カドヘリンを介する細胞間結合が MMP 等のメタロプロテナーゼにより解離すると報告されている (Ugnow EB, Circ. Res., 2003)。気管支平滑筋細胞における MMP の産生・放出は遊走経路を作製だけではなく、細胞間結合の解離にも寄与しているのかもしれない。

以上の知見により、喘息患者の気管支において平滑筋細胞がメタロプロテナーゼ産生・細胞遊走・フィブロネクチン産生を繰り返すことにより、平滑筋から結合組織へと次々に遊走する可能性が示された。このことは気管支平滑筋細胞の遊走が気道リモデリングの治療標的となり得る可能性を示している。

E. 結論

喘息患者の気管支において、平滑筋細胞は MMP-1,2,3 等のメタロプロテナーゼを産生・放出し平滑筋から結合組織へと遊走した後、ここでフィブロネクチンを産生・放出し近傍の平滑筋細胞を結合組織へと遊走させることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
 - 1) 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)
 - 2) 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)
 - 3) 気管支喘息の気道リモデリング形成機構: 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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

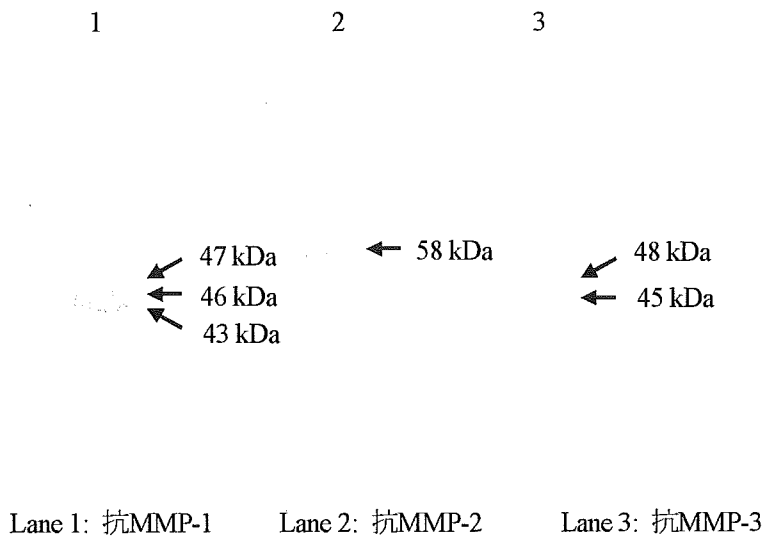


Fig.1 マトリックスメタロプロテアーゼ抗体を用いた気管支平滑筋細胞培養上清のウエスタンブロッティング

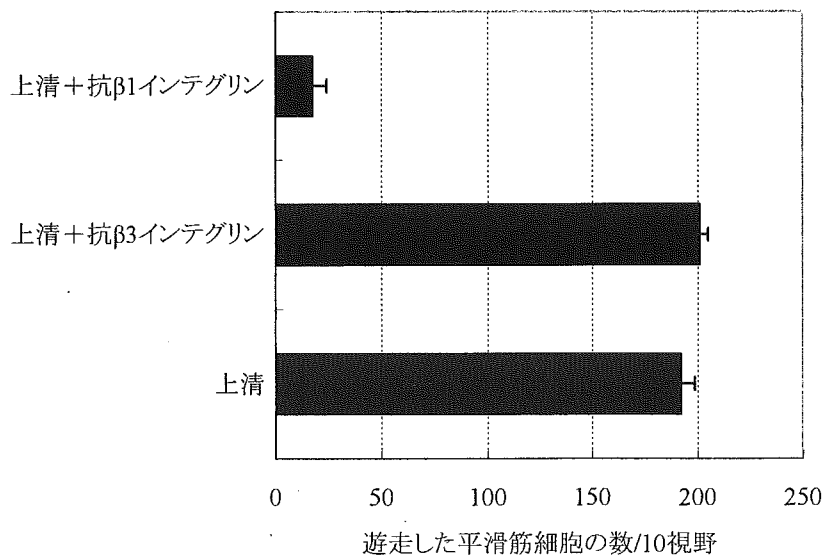


Fig.2 抗β1及びβ3インテグリン抗体で前処理した気管支平滑筋細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性