

2. 学会発表

- 1) Takahashi K, et al.: Characteristic features of steroid-dependent intractable asthma in Japan. World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI, (Vancouver), 2003.
- 2) Kimura G, Takahashi K, et al.: The role of T-cell activation and cytokine in severe bronchial asthma. World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI, (Vancouver), 2003.
- 3) Suzaki N, Tanimoto Y, Takahashi K, et al. Effect of anti-asthma drugs on human basophil apoptosis. WAO Congress-XVIII ICACI (Vancouver), 2003.
- 4) Sakugawa M, Tanimoto Y, Suzaki N, Inoue Y, Ikeda K, Imajo K, Nakajima T, Saito H, Tanimoto M. Human basophils can release interleukin-18 upon Fc \cdot RI cross-linking. WAO Congress-XVIII ICACI (Vancouver), 2003.
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 谷本 安, 金廣有彦, 高橋 清, 谷本光音. 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
- 9) 大石秀香, 松本奈保, 高橋 清他. アレルギー疾患の自己管理向上のために —患者と医療関係者からの提言— —喘息患者のセルフマネジメント向上への取り組み—. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会(岡山), 2005. 6
- 10) 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
- 11) 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.
- 12) 木村五郎, 岡田千春, 高橋 清他. ホルムアルデヒド負荷テストで咳嗽を認めたシックハウス症候群の 3 例. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会(岡

山), 2005. 6.

- 13) 高橋 清: 年代別喘息治療の現況と問題点—高齢者—. The 14th Congress of Interasma Japan/ North Asia (第 14 回国際喘息学会日本北アジア部会)(横浜), 2004. 7.
- 14) 須崎規之, 谷本 安, 高橋 清他: ヒト好塩基球における CysLT1 受容体の発現と機能に関する検討. 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会(前橋), 2004. 5.
- 15) 岡田千春, 木村五郎, 高橋 清他: 慢性, 難治性喘息の臨床的特徴と対応 —気道炎症からみた特徴と対策—. 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会(前橋), 2004. 5.
- 16) 岡田千春, 平野 淳, 高橋 清他: 成人気管支喘息の難治化におけるリンパ球および樹状細胞の関与. 第 54 回日本アレルギー学会総会(横浜), 2004. 11.
- 17) 高橋 清: 重症度を規定する因子 —社会的要因を含む—. 1. 成人. 第 24 回六甲カンファレンス(京都), 2004. 7.
- 18) 須崎規之, 谷本 安, 佐久川 亮, 高尾和志, 金廣有彦, 池田和真, 片岡幹男, 今城健二, 高橋 清, 谷本光音: ヒト末梢血幹細胞培養好塩基球のアポトーシスに関する検討. 第 100 回日本内科学会講演会(福岡), 2003.
- 19) 岡田千春, 平野 淳, 高橋 清, 森 晶夫他: 成人気管支喘息の難治病態におけるリンパ球の活性化とサイトカインの検討. 第 53 回日本アレルギー学会総会(岐阜), 2003. 10.
- 20) 須崎規之, 谷本 安, 高橋 清他: 好塩基球における喘息治療薬のアポトーシス誘導効果に関する検討. 第 53 回日本アレルギー学会総会(岐阜), 2003. 10.

7. 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. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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)
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) 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) 金廣有彦(岡山大学医学部第二内科講師) 谷本 安(岡山大学医学部第二内科講師) 平野 淳(国立病院機構南岡山医療センター第一内科医師)

表1. 病型

	アトピー型	混合型	感染型
n=23例	1例	7例	13例

血清総IgE値

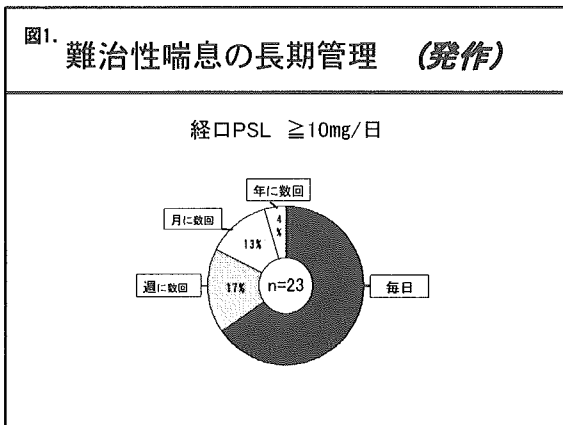
<100 μ g/mg	100-300	300-1000	>1000
12例	3例	6例	1例

表2. アスピリン喘息の合併

	あり	なし	不明
n=23例	7例	8例	8例

その他の合併症

アレルギー性鼻炎 5例、副鼻腔炎 5例
 肺気腫 2例、慢性気管支炎・拡張症 0例
 アトピー性皮膚炎 1例



- 表3. 喘息の重症度を規定する因子
1. 臨床指標
1. 年齢、発症年齢、罹病期間
 2. 病型、IgE (RIST, RAST)
 3. CS (経口、吸入) の投与量
 4. 合併症 (COPD, 副鼻腔炎 etc.)
 5. 気道過敏性試験

表4. 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	19例	
男女比	11:13	9:9	
現年齢	61.0 \pm 8.3才(44~72)	63.4 \pm 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 \pm 10.9才(18~61)	40.6 \pm 14.4才(23~74)	N. S.
罹病期間	13.9 \pm 9.0年(1~39)	23.9 \pm 9.5年(11~41)	N. S.
BDP(内服+吸入)	302.1 \pm 98.3(200~400) μ g/日	2216.7 \pm 659.0 (1000~3400) μ g/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)	
感染型	12例	9例 (重症群 5例、難治群 4例)	

表5. 合併症

臨床指標

	軽症群 (ステップ1~2)	重症・難治群 (ステップ4')
副鼻腔炎	5% (1/22例)	40% (4/10例)
AR	59% (13/22)	50% (5/10)
AD	5% (1/22)	0% (0/10)
AIA	23% (5/22)	50% (5/10)

重複あり

表6.
喘息の重症度を規定する因子

2. 炎症指標

1. Allergenの反応

- ① 皮内反応
- ② IgE-RIST, RAST
- ③ リンパ球反応性

2. 好酸球反応

末梢血、喀痰、ECP

3. リンパ球反応

- ① Blastogenesis
- ② Cytokine (IL-5, -4, -3, etc.)

4. 他の炎症細胞反応

- ① 好中球 LTB4, IL-8
- ② 樹状細胞
- ③ MMP-9産生能 (上皮細胞間連鎖)

5. その他

NO,

表7.
炎症指標

IgE値

	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)	

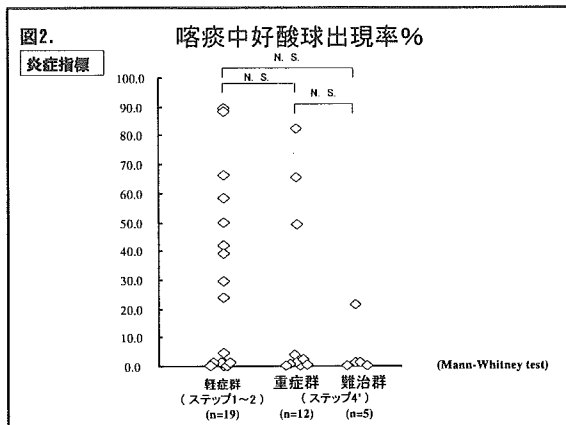
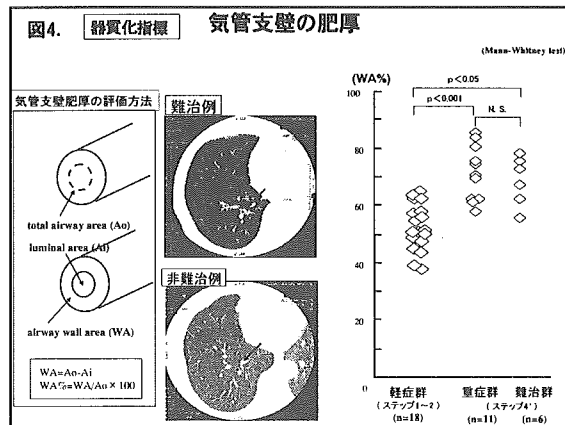
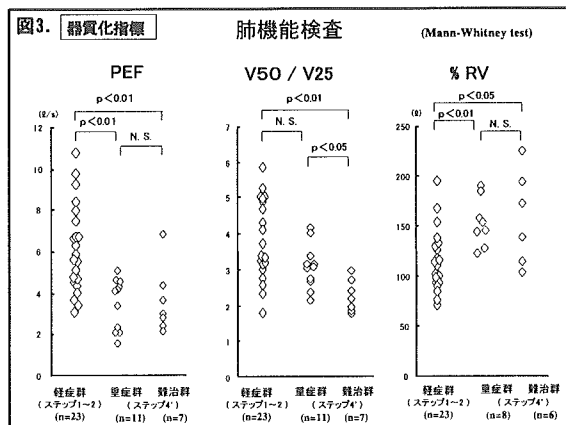


表8.
喘息の重症度を規定する因子

3. 器質化指標

1. 呼吸機能
 - ① PEFと低値安定
 - ② RV, 拡散能
2. 気道可逆性試験
3. 画像
 - ① 胸部Xp
 - ② HRCT
 - ③ 副鼻腔Xp
4. 喫煙歴
 - 能動と受動喫煙



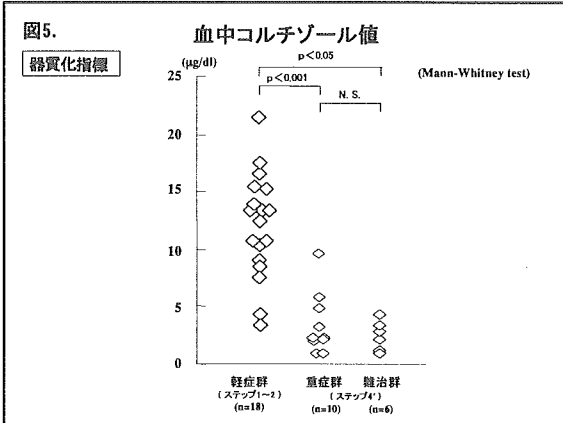


表6. 経口ステロイド投与量による重症度別にみた各指標の異同

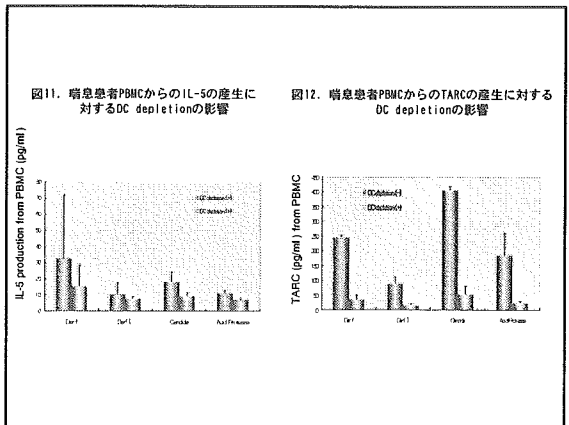
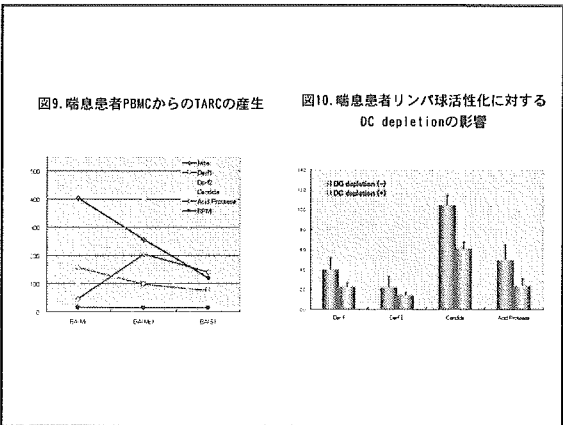
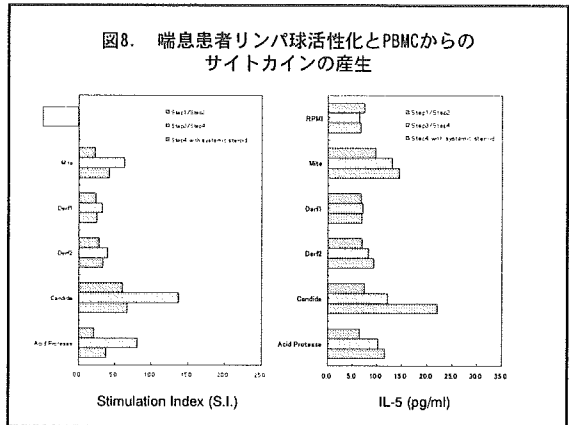
経口PSL量	炎症指標			腎臓化指標				副腎皮質機能
	非精血好酸球%	喀痰好酸球%	IgE	PEF	V50/V25	NRV	WAA	
5~10mg	4.05	20.33	294.20	3.42	3.05	151.73	71.37	3.44
10mg以上	2.72	4.40	175.84	3.53	2.21	156.60	68.60	2.48
p value	0.69	0.33	0.70	0.95	0.01	1.00	0.62	0.70

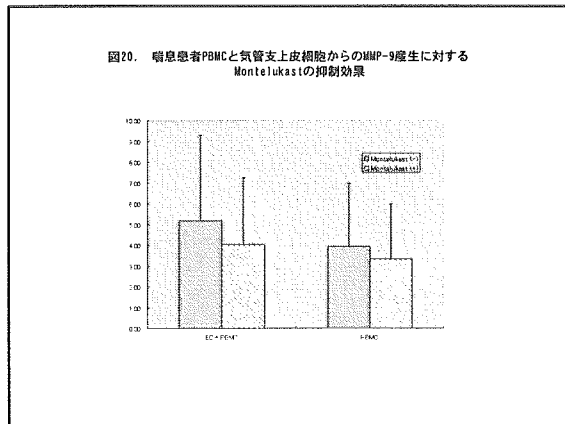
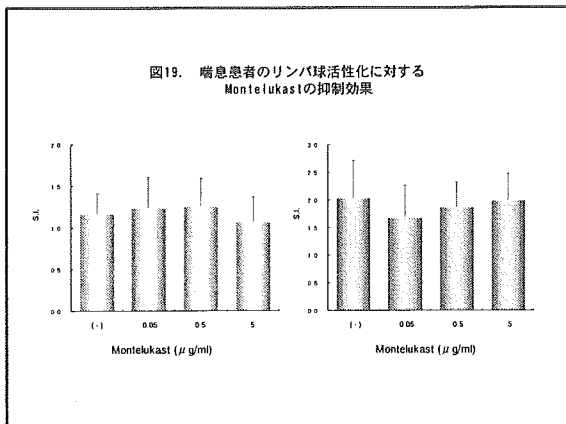
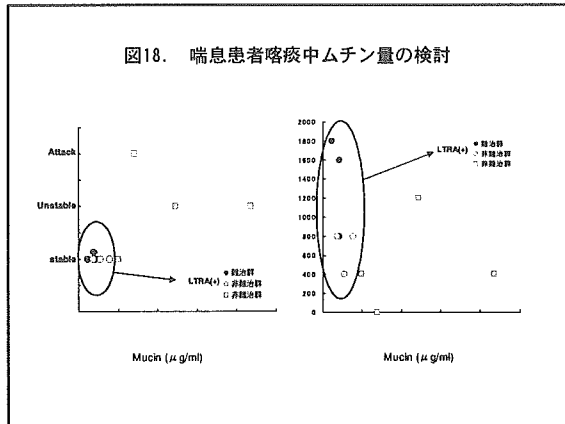
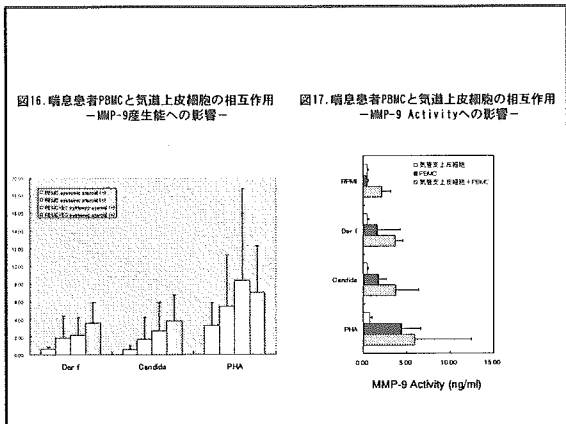
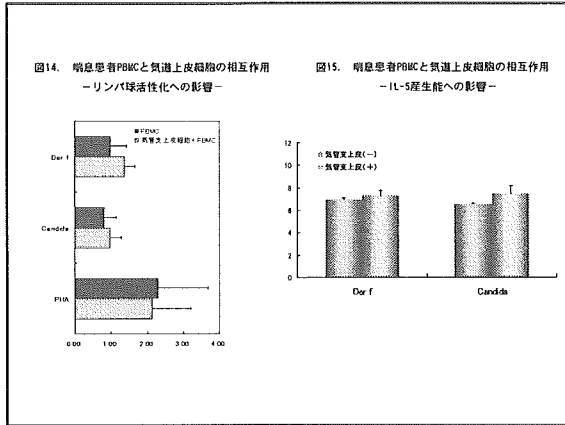
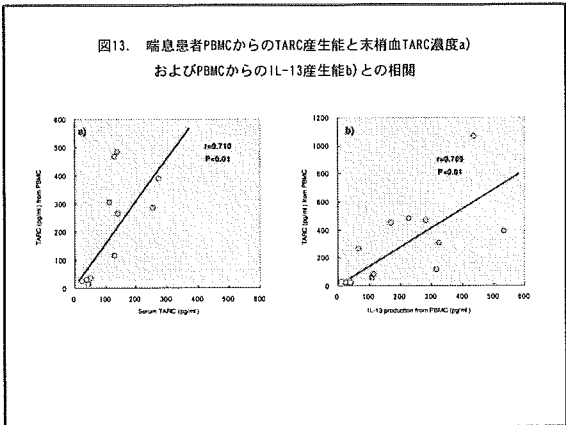
表7. 2. 病態を把握し、治療に直結する分類法

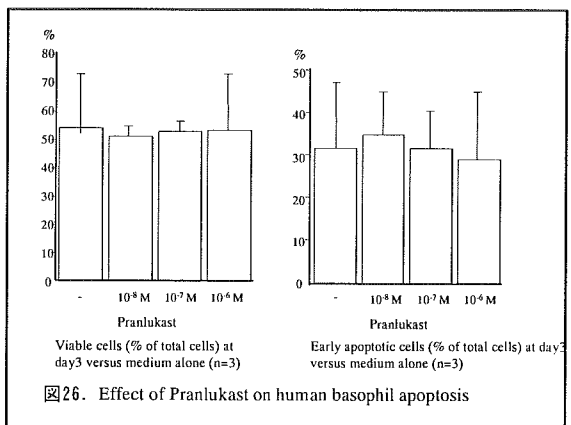
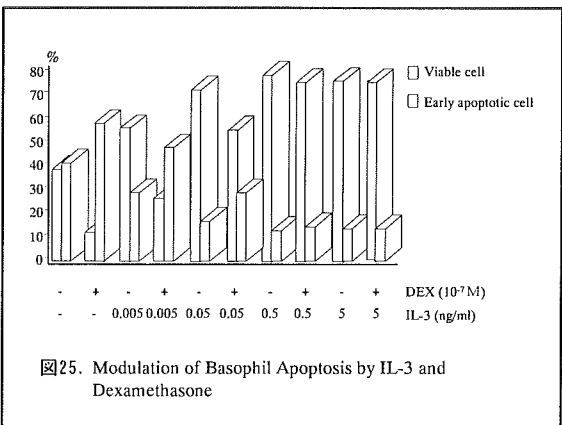
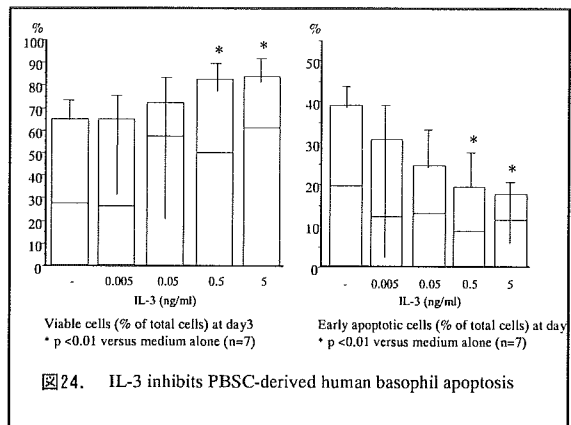
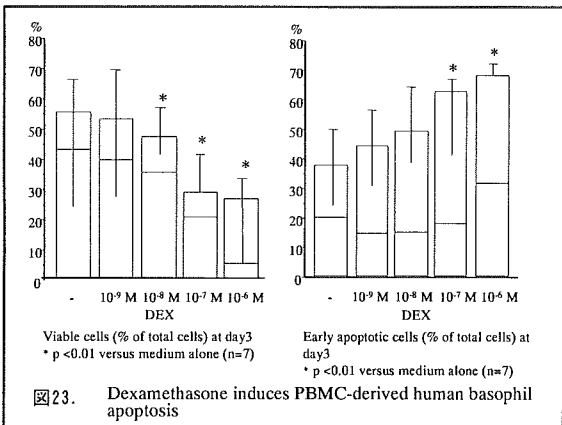
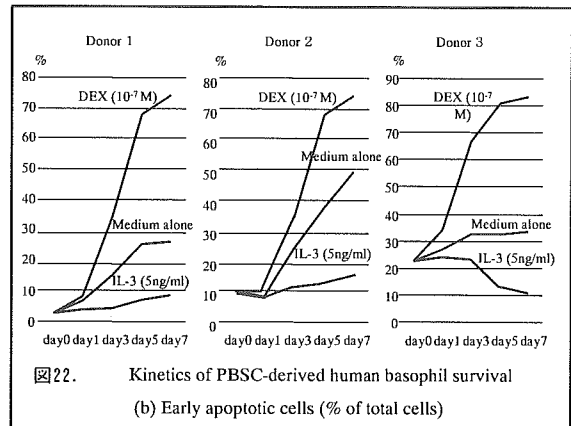
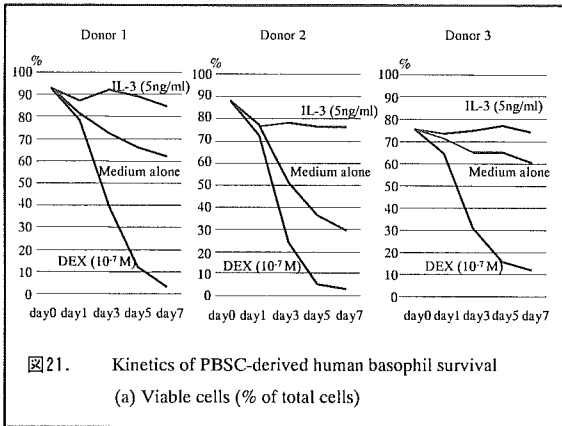
軽症群 (ステップ1~2) 重症・難治群 (ステップ4)

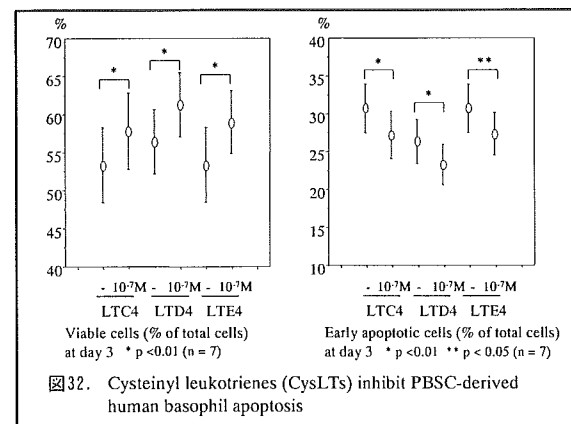
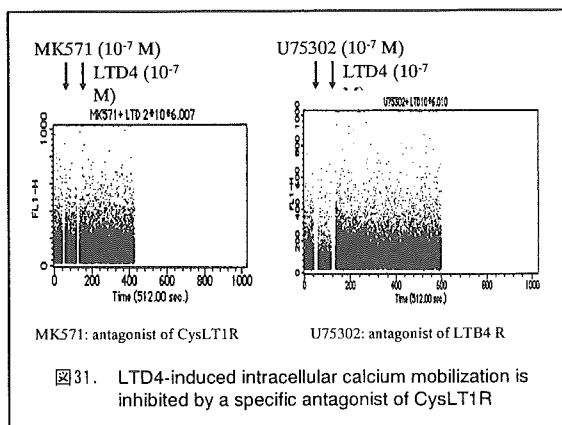
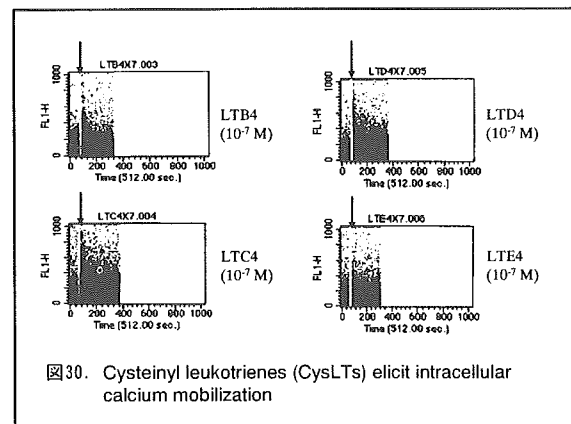
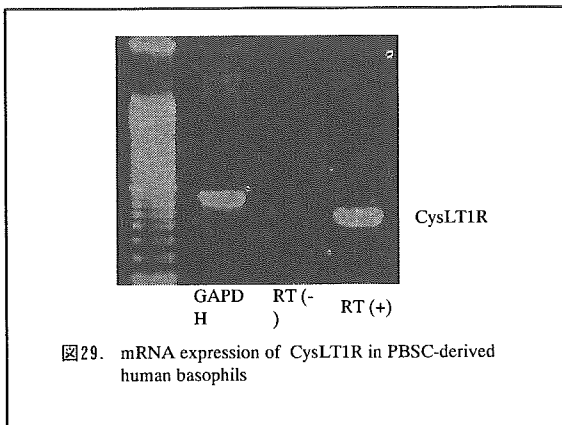
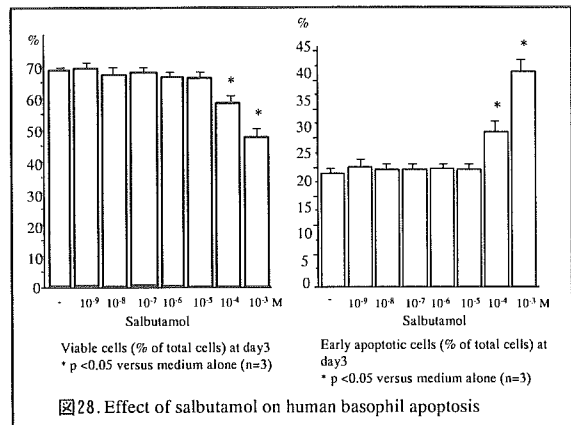
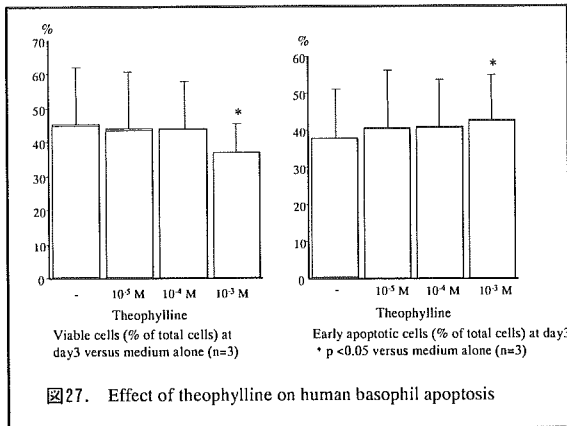
症例 (患者年齢)	炎症指標 IgE	腎臓化指標 Em	中粒好球球	末梢好球球	肺動脈圧低下	年齢 (患者年齢)	炎症指標 IgE	腎臓化指標 Em	中粒好球球	末梢好球球	肺動脈圧低下
1 48 (30)		●	X	X	X	1 60 (40)	●●	X	●	X	●
2 62 (42)	X	X	X	X	X	2 82 (42)	X	X	●	●●	X
3 70 (45)	X	X	●	X	X	3 75 (40)	X	●	●	●	●
4 50 (52)	●●	●●	X	X	X	4 81 (60)	●●	●●	●	●	X
5 45 (57)	●●	●●	X	X	X	5 88 (74)	X	X	X	X	●
6 45 (40)	●●	●●	X	X	X	6 47 (54)	X	●	●	●	X
7 54 (54)	X	●●	X	X	X	7 48 (50)	●	X	●	●●	●
8 57 (34)	X	X	X	●	●	8 75 (45)	X	X	●	●	●
9 58 (50)	●●	●●	X	X	X	9 59 (44)	●●	●●	●	●	●
10 47 (57)	X	X	●	X	X	10 55 (59)	X	●●	X	●	X
11 58 (41)	●●	●●	X	X	X	11 58 (24)	●●	X	●	X	X
12 56 (18)	●●	X				12 70 (45)	X	●	●	●●	●
13 50 (53)	●●	X	X	X	X	13 85 (53)	X	X	●	●	●
14 60 (34)	●	●	X	X	X	14 57 (23)	X	●	●	●	X
15 69 (58)	X	X	X	●	X	15 41 (24)	●●	X	●	●	●
16 67 (61)	●	X	●	X	X	16 58 (54)	X	X	X	X	●●
17 66 (57)	●●	●●	X	X	X	17 47 (50)	X	●	●	●	X
18 64 (47)	●●	●●	●	●	●	18 64 (24)	X	X	●	●	●
19 44 (44)	●●	●●	X	X	X						
20 72 (58)	●●	●●	X	X	X						
21 70 (55)	●●	●●	X	X	X						
22 72 (54)	●●	●●	X	X	X						
23 42 (50)	●●	●●	X	X	X						
24 57 (55)	X	●●	X	X	X						

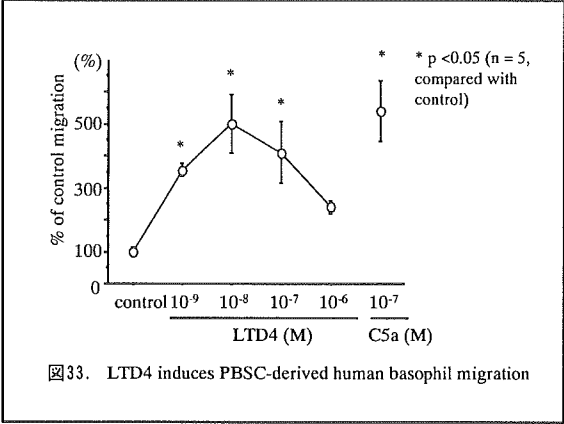
症例 1~11 (重症群) : 5 ≤ PSL < 10mg
 症例 12~18 (難治群) : 10mg ≤ PSL











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

研究要旨

初年度は、(1)難治性喘息の頻度とその背景因子の調査、(2)難治性の危険因子の一つである気道リモデリングの機序を健とするため、リモデリングのトリIGGERとなる MMP-9 の産生を気管支喘息患者で検討した。その結果、(1)難治性喘息患者は 15 例 (11.4%) であった。難治性喘息では非難治性喘息に比し、成人発症、ペット飼育、慢性副鼻腔炎/鼻茸の合併、アスピリン喘息の合併が有意に多かった。また、スパイロメトリーでは、FEV1/FVC が有意に低く、 β 2 刺激薬に対する反応も有意に悪かった。(2) MMP-9 は喘息発作時に有意に増加し、発作が緩解するとコントロールのレベルまで戻ることがわかった。これらの成績より、難治性喘息患者の臨床的な危険因子が明らかになった。また、難治性喘息患者では気道狭窄が持続するにもかかわらず気管支拡張薬に対する可逆性が低下しており、気道のリモデリングが存在することが考えられた。さらに、MMP-9 の成績より、気道リモデリングは喘息発作のたびに進行していく可能性が考えられ、日常の喘息コントロール不良がさらに難治化を進行させる要因になることが示唆された。

二年度より、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、まず、TRX の喘息モデルに対する効果を検討した。Balb/c マウスでの卵白アルブミン (OVA) 感作モデルの気道炎症、気道過敏性を指標に、ヒトリコンビナント TRX を 1 群に投与しその効果を評価した。その結果、ヒトリコンビナント TRX 投与群では OVA 投与による気道過敏性亢進と、気道炎症を著明に抑制した。これは TRX が気道の過敏性と好酸球性炎症を酸化還元制御に作用し改善させるためと考えられ、TRX は新しい喘息治療薬となりうる可能性があると考えられた。

三年度は、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

1. 難治性喘息患者の臨床像の解析とリモデリングの関与についての検討

難治性喘息は、「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出来ない重症、通年性の気管支喘息」と定義される。我々は難治性喘息の発症機序を解明するために、

(1)その危険因子を明らかにする目的で、難治性喘息患者の臨床像での特徴を当科受診中の難治性喘息患者・非難治性喘息患者で調査した。

(2)さらに、難治性の危険因子の一つと考えられる気道リモデリングの関与を検討するために、気道リモデリングのトリIGGERとされている MMP-9 を喘息患者の末梢血を用いて経時的に検討した。

2. 難治性喘息治療薬としてのチオレドキシシン (TRX) の可能性についての検討

難治性喘息は、「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出来ない重症、通年性の気管支喘息」と定義される。難治性喘息に対する治療は、現在用いられている薬物を多剤併用し、その患者の最良の状態にし、かつ出来るだけ副作用を少なくするしか現在治療法がなく、難治性喘息に有効な薬剤の開発が望まれる。我々は難治性喘息の新しい治療法を開発するために、従来の喘息治療薬と異なる薬剤の臨床応用を検討した。

生物において酸素は重要な役割を負うが化学的にはラジカルであり、生体内で還元されて最終的には化学的に安定な H_2O に変化する。この過程でスーパーオキシドアニオン

(O_2^-)、ヒドロキシラジカル(OH)、過酸化水素(H_2O_2)など様々な活性酸素種を生じる。これら活性酸素種は化学的に不安定で、その強力な酸化作用は近傍の脂質、タンパク質、核酸などの生体高分子物質に切断、重合、修飾などの傷害を与える。これらは結果として細胞の機能障害、異常増殖、細胞死を引き起こす。生体はこのような酸化ストレスに対して NADPH oxidases (NOXs), superoxide dismutase (SOD; O_2^- の除去)、catalase (H_2O_2 の分解)、glutathione (GSH)、thioredoxin (TRX)等の酸化還元サイクルを持つ。このようにして細胞内外の酸化還元のバランスを保っている。このような酸化、還元バランス制御をレドックス(redox: reduction/oxidation)制御と呼ぶ。なかでも TRX はそれ自身が酸化還元サイクルを持つ。ヒト TRX は京都大学の淀井らによって成人 T細胞白血病細胞株の培養上清中に存在する IL-2Ra 鎖(Tac; CD25)の誘導物質、ATL derived factor(ADF)としてクローニングされた(2)。ヒト TRX は 104 個のアミノ酸からなる約 12kDa のユビキタスな蛋白である。その活性に必要な Cys-Gly-Pro-Cys というコンサーブされた配列を持つ。この配列中の 2 個のシステイン残基は種を超えて保存されている。このシステイン残基からのプロトン供与により標的蛋白のジスルフィド結合(S-S bond)を開裂される強い還元活性を持つ。TRX はそれ自身が酸化されることにより、ジスルフィド結合を持つ他のタンパク質を還元する。一方、還元反応後のジスルフィド結合を形成した酸化型 TRX はチオレドキシシン・リダクターゼ(thioredoxin reductase)により再還元されて還元型 TRX に戻る。これによって酸化されたチオレドキシシン・リダクターゼ

はそのプロトドナーであるNADPHによって再還元される。これまでの我々の研究でTRXの過剰発現がマウス間質性肺炎モデルで炎症細胞浸潤を抑制することを明らかにしてきた。そこで、TRXが喘息にも有効か否かを検討するためにOVA感作マウスを用いてTRXの気道における作用をみた。

3. TRXによる気道リモデリングと気道過敏性の予防と治療の検討

初年度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た。さらに2年度の基礎的検討の結果、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3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を検討した。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も検討した。

B. 方法

1. 難治性喘息患者の臨床像の解析とリモデリングの関与についての検討

(1)対象は久留米大学第一内科通院中の132例の気管支喘息患者で、レトロスペクティブに診療録より調査した。調査項目は、病歴として現在の治療、家族歴、発症年齢、増悪回数・程度、入院歴、致死的発作の有無など。環境因子として喫煙、粉塵曝露、ペット飼育など。他疾患の合併の有無としてアトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎/鼻茸、湿疹、蕁麻疹、アスピリン過敏性など

である。さらに、スパイロメトリー、末梢血所見、IgEを調査した。

(2)喘息発作で受診した患者の末梢血を採取し、MMP-2, MMP-9, TIMP-1を測定した。これらの患者を経過観察し、完全に発作が緩解した時点で再度末梢血中のMMP-2、MMP-9、TIMP-1を測定した。

2. 難治性喘息治療薬としてのTRXの可能性についての検討

感作用の卵白アルブミンはOvalbumin (SIGMA社製; 以下、OVAと略す)を必要量秤量した後、生理食塩水で希釈し、これをアルミニウムゲル: Al(OH)₃ (Alu-Gel-S suspension, research grade, sterile; SERVA社製)を用いて、50 μg/mlとなるように用時調製して使用した。誘発用の卵白アルブミンは、OVAを必要量秤量し、生理食塩水を用いて5%溶液となるように調製して使用した。マウスへの麻酔は、塩酸ケタミンを使用した。気道過敏性測定用のアセチルコリンはACETYLCHOLINE CHLORIDE (SIGMA社製; 以下、Achと略す)を用い、PBSで希釈し使用した。Human recombinant Thioredoxin, mutant human Thioredoxin (C32S/C35S)は中村らの方法(Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):15143-8)で作成した。

Balb/cマウスでの卵白アルブミン(OVA)感作モデルを用い6群に分けた。群分けは、1)無処置群(non-treat)、2)感作群、3)感作+challenge群、4)感作+challenge+TRX投与群、5)感作+challenge+mutant TRX、6)感作時にTRX投与+感作+challengeの6群に分けた。具体的にはOVA腹腔内投与し感作したのみでchallengeは行わず気道

過敏性の測定とBALを行った群、次に感作し、OVA吸入によりairway challengeし同様に気道過敏性の測定とBALを行った群、感作、challenge ともに行い、ヒトリコンビナントTRX (40 μ g / head) もしくは 32S/35S mutant human TRX (40 μ g / head) をそれぞれ腹腔内投与し、気道過敏性の測定とBALを行った群、感作時にヒトリコンビナントTRX (40 μ g / head) を投与、感作とchallenge ともに行い、そしてcontrol群とに分けた。

気道過敏性は、whole body plethysmographyを用いた(Baxco社製)覚醒・自発呼吸下のマウスでPenhを気道収縮の指標として測定した。最初にPBSを吸入させPenhのbase lineの値を測定し、次いでAch 0.75 mg/mlから順次高濃度のものを吸入させPenhの変化を観察し、Penhがbase lineの2倍になったところのAch濃度をEC₂Penhと表現した。

3. TRXによる気道リモデリングと気道過敏性の予防と治療の検討

雌Balb/cマウスにOVA10 μ g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

1. 難治性喘息患者の臨床像の解析とリモデリングの関与についての成績

(1)ATSの診断基準に合致する難治性喘息患者は15例(11.4%)であった。これらの患者の、病歴、環境因子、合併症、スパイロメトリー、末梢血所見、IgEを調査したところ、難治性喘息では非難治性喘息に比し、成人発症が多く、ペット飼育、慢性副鼻腔炎/鼻茸の合併、アスピリン喘息の合併が有意に多かった。また、スパイロメトリーでは、FEV₁/FVCが有意に低く、 β 2刺激薬に対する反応も有意に低かった。

Pulmonary function tests

	non-RA	RA	p
%FEV ₁ (%)	81.0±22.3	72.8±26.8	0.42
%FEV ₁ (post)(%)	89.1±21.1	79.9±26.8	0.32
FEV ₁ /FVC(%)	68.1±13.7	57.7±13.8	0.013
FEV ₁ /FVC(post)(%)	89.1±21.1	79.9±26.8	0.012
Δ FEV ₁ (ml)	221±171	145±106	0.085
Δ FEV ₁ /AntiFEV ₁ (%)	12.2±10.5	11.4±10.1	0.81

表1. 難治性喘息(RA)と非難治性喘息(non-RA)での肺機能の比較。難治性喘息では気管支拡張薬吸入前後のFEV₁/FVCとも有意に低く、気管支拡張薬による改善も悪い傾

向にあった。

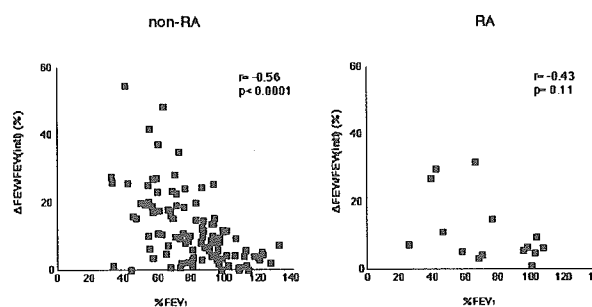


図1. 非難治性喘息では、%FEV1が小さいほど気管支拡張薬による改善率も大きくなるが（図左）、難治性喘息ではこの相関が無く、気道狭窄があっても改善率が悪い（図右）。

(2)末梢血中のMMP-2、MMP-9、TIMP-1の検討では、喘息発作時にMMP-9が有意に増加することが分かった。このMMP-9は発作が緩解するとコントロールのレベルまで戻った。

Serum MMPs and TIMP-1 concentrations

	Exacerbation (n=21)	Stable (n=21)	p-value*
MMP-2 (ng/ml)	998.9 (42.7)	1041.1	0.3585
MMP-9 (ng/ml)	202.9 (22.0)	(42.7)	0.0003
TIMP-1	285.0 (16.7)	107.7 (9.9)	0.0969
(ng/ml)		321.7 (15.2)	

Data are presented as mean (SE).

MMP = matrix metalloproteinase; TIMP = tissue inhibitor of

*metalloproteinase.

Mann-Whitney U non-parametric test.

表2. 気管支喘息発作時にはMMP-1が有意に高い。

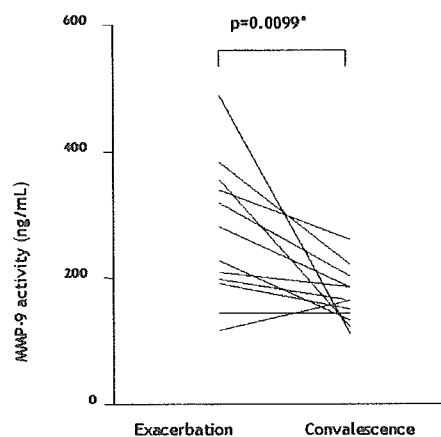


図2. 喘息発作が緩解するとMMP-9濃度は低下する。

2. 難治性喘息治療薬としてのTRXの可能性についての成績

感作とchallengeを行った群はcontrol群と比べ有意な過敏性の亢進とBAL液中の総細胞数と好中球の増加を認めたが、wild type human TRX投与群ではその気道過敏性亢進と、BAL液中の総細胞数と好酸球の増加はともに有意に改善していた（図3,4）。一方、mutant TRX投与群ではwild type TRX投与群でみられたような、気道過敏性や気道炎症の改善はみられなかった（図5）。病理学的にも感作、誘発群で認められた好酸球の浸潤は、wild type human TRX投与群では改善し、mutant TRX投与群ではcontrol群と比較しても変化がなかった（図6）。

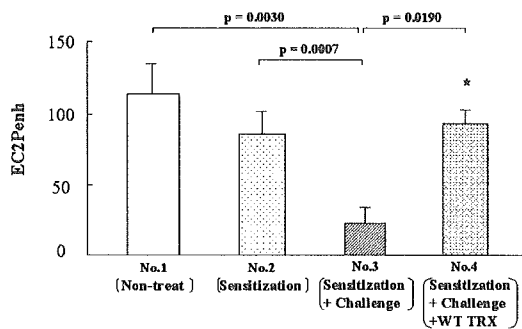


図3. WT TRX は気道過敏性を抑制する

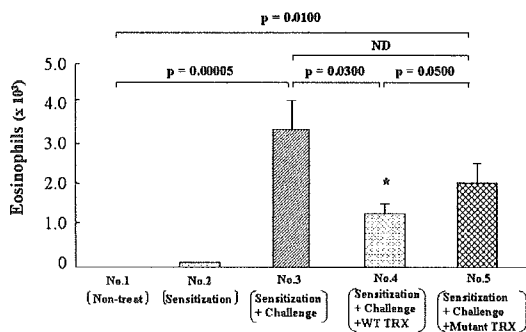


図4. WT TRXは好酸球を抑制する

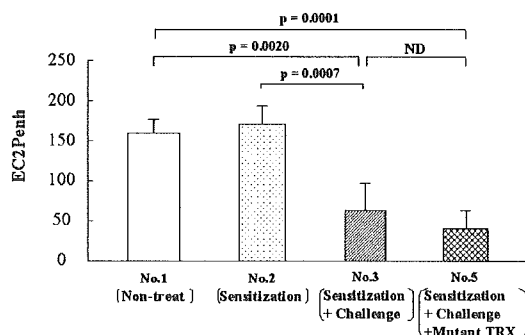


図5. Mutant TRXは気道過敏性を抑制しない

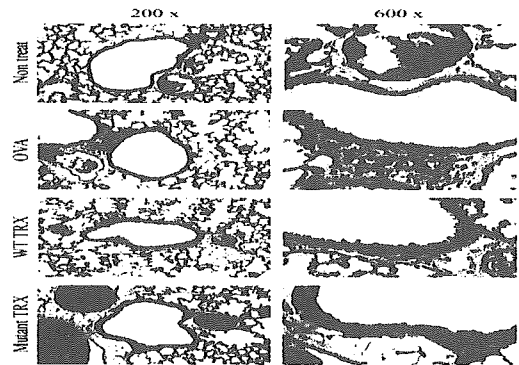


図6. 好酸球の浸潤は、wild type human TRX 投与群では改善し、mutant TRX 投与群では control 群と比較しても変化がなかった。(H E 染色)

3. TRX による気道リモデリングと気道過敏性の予防と治療の成績

リコンビナントヒトTRXのOVAチャレンジ時のDay19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7)。

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8)。

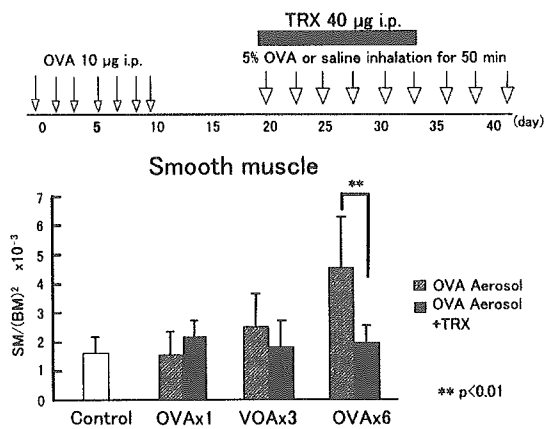


図7. TRX 前投与の効果。上段のプロトコールにて、OVA チャレンジ時に TRX 投与を行った群では、気道平滑筋の肥厚は有意に抑制されていた。

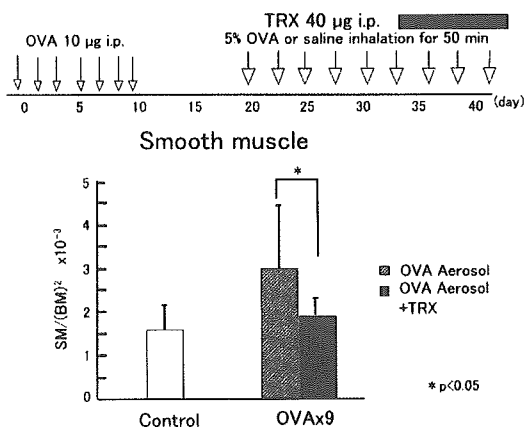


図8. TRX 後投与の効果。上段のプロトコールにて、リモデリング成立後 TRX 投与を行った群では、Day44において気道平滑筋の肥厚は有意に抑制されていた。

D. 考察

今回の検討においては、難治性喘息患者では成人発症、ペット飼育、慢性副鼻腔炎/鼻茸の合併、アスピリン喘息の合併が有意に多いことが特徴としてあげられると考えられた。

また、肺機能上の特徴としては気管支拡張剤の前後ともFEV1/FVCが有意に低いことから、恒に気道狭窄が持続しており、それにもかかわらず気管支拡張剤により十分には改善しないことがわかった。

これらの成績は、難治性喘息の特徴の1つとして気道のリモデリングの存在を強く示唆するものと考えられた。そこで、リモデリングに関与するMMP-2、MMP-9、TIMP-1の動態を検討したところ、MMP-9は喘息発作時に有意に増加することが分かった。したがって、喘息発作時はMMP-9が増加しリモデリングが進行する可能性が考えられた。これより、日常の喘息のコントロール不良はさらに難治化を進める可能性が考えられた。

次に、リモデリングの予防と治療について検討した。最初に、急性モデルでの気道炎症と気道過敏性をTRXが抑制しうるかどうかの検討を行った。酸化還元反応を制御するTRXは、アレルゲン曝露による気道炎症、気道過敏性の亢進を有意にかつ著明に抑制した。これまで、気道炎症や気道過敏性の亢進に気道への酸化ストレスが関与することは、実験的に示され、あるいは臨床的にも推定されてきた。しかしながら、SODをはじめとして、これまでin vitroの実験系において気道炎症や気道過敏性を有意に抑制する薬物はなかった。今回のTRXがマウス喘息モデルにおいて、アレルゲンによる気道反応を抑制したのは、その生体における持続的な作用によるものと考えられる。TRXのこの作用は、ステロイドとは異なる機序で気道の炎症と過敏性を抑制するものであり、新しい喘息治療薬となりうるものと考えられる。

さらに、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はなく、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、一旦生じたリ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.
 10. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, Adachi M, Nagai A, Kuriyama T, Takahashi K, Nishimura K, Ishioka S, Aizawa H, Zaher C. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology.* 2004;9:458-65.
 11. Kitasato Y, Hoshino T, Okamoto M, Kato S, Koda Y, Nagata N, Kinoshita M, Koga H, Yoon D, Asao H, Ohmoto H, Koga T, Rikimaru T and Aizawa H. Enhanced Expression of IL-18 and its Receptor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:619-25.
 12. Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Tsuda M, Ikegami T, Kibe A, Yoshiura Y, Komori M, Hamasaki N, Aizawa H and Nakanishi Y. Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 134: 295-302, 2004.
 13. Matsumoto K, Inoue H, Nakano T, Tsuda M, Yoshiura Y, Fukuyama S, Tsushima F, Hoshino T, Aizawa H, Akiba H,

- Pardoll D, Hara N, Yagita H, Azuma M and Nakanishi Y. B7-DC Regulates Asthmatic Response by an IFN-gamma-Dependent Mechanism. *J Immunol* 172: 2530-2541, 2004.
14. Fumimori T, Honda S, Migita K, Hamada M, Yoshimuta T, Honda J, Fukuda T, Suzuki R, Gotoh M, Eguchi K and Aizawa H. Erythromycin suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* 31: 436-441, 2004.
 15. Mine T, Gouhara R, Hida N, Imai N, Azuma K, Rikimaru T, Katagiri K, Nishikori M, Sukehiro A, Nakagawa M, Yamada A, Aizawa H, Shirouzu K, Itoh K and Yamana H. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. *Cancer Sci* 94: 548-556, 2003.
 16. Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, Machida K, Matsumoto K, Koto H, Ikegami T, Aizawa H and Hara N. Differential Regulation by Glucocorticoid of Interleukin-13-induced Eosinophilia, Hyperresponsiveness, and Goblet Cell Hyperplasia in Mouse Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 50-56, 2003.
 17. Kawayama T, Aizawa H, et al. High Concentration of (1-->3)-beta-D-Glucan in BAL Fluid in Patients With Acute Eosinophilic Pneumonia. *Chest* 123: 1302-1307, 2003.
 18. Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Kirii Y, Nishiwaki E, Maeda Y, Takeda J, Okamoto M, Kato S, Imaizumi T, Aizawa H and Yoshino K. Exacerbated and Prolonged Allergic and Non-Allergic Inflammatory Cutaneous Reaction in Mice with Targeted Interleukin-18 Expression in the Skin. *J Invest Dermatol* 121: 502-509, 2003.
 19. Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Nakamura M, Maeda Y, Nishiwaki E, Zenmyo M, Hiraoka K, Aizawa H and K. Y. Bone malformations in interleukin-18 transgenic mice. *J Bone Miner Res* 18: 975-983, 2003.
 20. Kawamoto N, Yamada A, Ohkouchi S, Maeda T, Tanaka S, Hashimoto T, Saijo Y, Saijo S, Nukiwa T, Shichijo S, Aizawa H and Itoh K. IgG reactive to CTL-directed epitopes of self-antigens is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigens* 61:

- 352-361, 2003.
21. Kaji M, Watanabe A and Aizawa H. Differences in clinical features between influenza A H1N1, A H3N2, and B in adult patients. *Respirology* 8: 231-233, 2003.
 22. Ichiki M, Gohara R, Rikimaru T, Kitajima T, Fujiki R, Shimada A and Aizawa H. Combination Chemotherapy with Irinotecan and Ifosfamide as Second-Line Treatment of Refractory or Sensitive Relapsed Small Cell Lung Cancer: A Phase II Study. *Chemotherapy* 49: 200-205, 2003.
 23. Ichiki M, Aizawa H., et al. Phase I and pharmacokinetic study of carboplatin and paclitaxel with a biweekly schedule in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 52: 67-72, 2003.
 24. Hoshino T, Aizawa H., et al. Redox-Active Protein Thioredoxin Prevents Proinflammatory Cytokine- or Bleomycin-Induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1075-1083, 2003.
 25. Aizawa H., Yoshida M, et al. Traditional oriental herbal medicine, Bakumondo-to, suppresses vagal neuro-effector transmission in guinea pig trachea. *J Asthma* 40: 497-503, 2003.
 26. Hoshino, T., Nakamura, H., Okamoto, M., Kato, S., Araya, S., Nomiya, K., Oizumi, K., Young, H. A., Aizawa, H., and Yodoi, J. Redox-active protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 168: 1075-1083., 2003.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 出願中の特許
1. 発明の名称：プロテアーゼ阻害剤及び慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤
 発明者：星野友昭、相澤久道
 出願人：学校法人 久留米大学
 出願日：2004/3/29
 出願番号：特願 2004-94065
 現状：審査未請求
 2. 発明の名称：アレルギー性疾患又は呼吸器系疾患の予防及び治療剤
 発明者 淀井淳司、相沢久道、星野友昭、孫安生、中村肇
 出願人: レドックス・バイオサイエンス株式会社
 出願日：2004/2/13
 出願番号：特願 整理番号 8442003JP
 現状：審査未請求

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
—マウス喘息モデルを用いた気道過敏性および気道リモデリング形成に関する基礎的研究—

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、難治化に関与すると考えられている気道過敏性あるいは気道リモデリング形成の病態機序を明らかにすることを目的として、種々のマウスモデルを用いて、以下の項目に関して検討を行った。

① 気道過敏性発症に関連する遺伝子探索

マウス気道過敏性モデルを用いて、抗原曝露により生ずる気道過敏性発症に関与する責任遺伝子の同定を目的とし、網羅的遺伝子解析を行った。すなわち、能動的に感作したマウスに抗原を2回吸入させ、その4および24時間後に気管・気管支および肺実質を採取し、得られたcDNAをサンプルとした。その結果、網羅的遺伝子解析においては、上述の条件を満たす遺伝子として、抗原曝露4時間後では発現増強遺伝子が2遺伝子、24時間後では発現低下遺伝子が5遺伝子検索された。今後、各個体レベルでの発現を再評価し、表現系との関連性について検討する必要があると思われる。

② 気道リモデリング形成に関与する細胞および機能分子の探索

気道リモデリングモデルでは、能動的に感作したマウスに抗原を3週間連日吸入曝露し、気道炎症ならびに気道リモデリング形成について、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抗体を用いて検討した。その結果、抗原長期曝露によって観察される気道内好酸球増多、肺組織中ヒドロキシプロリン量の増加、気管支肺泡洗浄液(BALF)中TGF- β 1量の増加、基底膜下の線維化は、いずれもIL-5に依存した反応であることが明らかとなった。さらに、TGF- β 1産生細胞は主として好酸球ならびに筋線維芽細胞であることが明らかとなった。また、基底膜下の線維化形成には好酸球由来の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。

③ ダニ抗原誘発喘息モデルの作製と気道リモデリング形成の解析

最後に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。その結果、ダニ抗原(Der β)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。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、室内環境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、呼吸性呼吸困難、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