

吸器疾患である。本疾患の発症機序に関しては、これまでの多くの基礎および臨床研究により、主としてヘルパーT細胞のうち、特にIL-4、IL-5、IL-9、IL-13などのいわゆるTh2サイトカインを産生するTh2細胞、肥満細胞、好酸球ならびに気道上皮、気道平滑筋が種々の機能分子を介し病態形成に関与することが明らかにされているが、気道過敏性発症に関与する遺伝子ならびにその遺伝子産物に関しては不明な点が多い。

これまでに教室では、マウス抗原反復曝露により生ずる気道過敏性モデルを作成し、種々の検討を行ってきた。本モデルでは、抗原反復曝露により、気道内好酸球増多、血清中抗原特異的IgE値の上昇、アセチルコリンに対する気道過敏性などが認められ、これらのパラメーターの変化がいずれもステロイドにより抑制されることから、臨床のアトピー型気管支喘息のモデルとして有用であると思われる。また、本モデルで観察される気道過敏性については、これまでの検討から、抗IL-5中和抗体を抗原曝露期間に投与した場合においても、IL-5を全身的に過剰に発現させて場合においても影響を受けないことから、その発症は必ずしもIL-5に依存していないことが特徴である。従って、この点も近年の臨床知見と一致する。

そこで本研究では、気道過敏性発症に関与する遺伝子群の同定を目的とし、DNAマイクロアレイを用いて、まず初年度の平成15年度は抗原曝露により変動し、かつ、ステロイドによりその変動が抑制されている遺伝子を網羅的に解析した。次いで平成16年度は、上述の条件を満たす遺伝子のうち、抗IL-5中和抗体あるいはIL-5の全身的過剰発現では影響を受けない遺伝子を抗原曝露早期の4時間後と後期の24時間後に探索することを目的とした。

一方、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、それぞれの器質的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曝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、平成16年度に、IL-5受容体 $\alpha$ 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。また、平成17年度には、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- $\beta$ 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。

さらに平成17年度は、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、当教室のマウス気道過敏性モデル、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) マウス気道過敏性モデル

雄性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2回反復吸入し反応を惹起した。最終抗原曝露4時間および24時間後に、アセチルコリンによる気道収縮反応を測定し、その直後に気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。遠心後、BAL液中の炎症性細胞数はDiff-Quik染色液により染色後、各分画ごとにカウントした。また、血清中の免疫グロブリン量はELISAにより定量した。一方、上述の時間に気管・気管支および肺実質を含むサンプルを採取し、DNAマイクロアレイにより、抗原曝露による変動遺伝子、ステロイド投与による変動遺伝子、IL-5Tgマウスおよび抗IL-5抗体投与による変動遺伝子群を解析した。なお、抗IL-5抗体は、抗原曝露期間中10日

間連日腹腔内投与した。

## 2) 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 IL-5 ならびに好酸球の意義を検討する目的で、IL-5 受容体 $\alpha$ 鎖欠損マウスならびに IL-5 Tg マウスを用いて、それぞれ野生型マウスの表現系と比較検討した。また、抗 IL-5 抗体あるいは抗 TGF- $\beta$ 1 抗体を用いて、後天的な中和による影響を併せて検討した。なお、抗 IL-5 抗体は、抗原曝露期間中3週間連日腹腔内投与した。一方、抗 TGF- $\beta$ 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) マウス気道過敏性モデル

生理食塩水吸入群に比し OA 吸入群では、最終抗原曝露4時間後において、アセチルコリンに対する気道反応性亢進、すなわち気道過敏性が認められたが、BALF 中の炎症性細胞数の増加は顕著ではなかった。一方、24 時間後では、気道内好酸球増多ならびに気道過敏性が観察された。これに対し、ステロイドは、いずれの場合においても気道過敏性を有意に抑制した。

4 時間後のサンプルでは、生理食塩水吸入群に比し OA 吸入群において2倍以上変動し、かつ、ステロイドにより2倍以上変動した遺伝子数は646であった。また、24 時間後では、661 遺伝子が同定された。

そこで平成16年度は、上述の遺伝子群から、より気道過敏性に特異性の高い遺伝子群を検索することを目的とし、IL-5 Tg や抗 IL-5 抗体により変動しない遺伝子を抽出した。まず表現形につ

いては、IL-5 Tg マウスでは、気道内好酸球増多の有意な亢進が観察されるたが、気道過敏性のさらなる亢進は観察されなかった。また、抗 IL-5 抗体は好酸球増多をほぼ完全に抑制したが、気道過敏性には影響を及ぼさなかった。そこでこれらのマウスから得られたサンプルを下に解析した結果、抗原曝露4時間後では発現増強遺伝子として2遺伝子、24 時間後では発現低下遺伝子として5遺伝子検索された。

### 2) 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- $\beta$ 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。これに対し、IL-5 受容体 $\alpha$ 鎖欠損マウスでは、いずれも有意な低下が観察された (Fig. 1)。一方、IL-5 Tg マウスでは気道過敏性を除き、いずれのパラメーターも有意な亢進が観察された (Fig. 2)。さらに、抗 IL-5 抗体を抗原曝露期間中に投与することにより、気道過敏性を除き、いずれのパラメーターも有意な抑制が観察された (Fig. 3)。そこで、線維化反応に重要な因子である TGF- $\beta$ 1 の産生細胞を免疫染色により同定したところ、抗原曝露初期では好酸球が、曝露期間後期では $\alpha$ -smooth muscle actin 陽性の筋線維芽細胞がそれぞれ主たる産生細胞であることが明らかとなった。

そこで TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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的かつ有意に抑制した。

### 3) ダニ抗原誘発喘息モデル

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(Fig. 4)。また、同様のプロトコ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) マウス気道過敏性モデル

本研究では、抗原曝露2回目の4および24時間後の変動遺伝子を解析した結果、アレルギー反応によって生じる気道過敏性の発症に関与すると思われる遺伝子群を検索した。このうち、4時間後では、気道炎症に比較的依存していないと思われる遺伝子群が、24時間後では気道炎症に依存する遺伝子群が含まれていることが推察された。

そこで平成16年度は、気道過敏性発症に関与する遺伝子をさらに検索する目的で、気道過敏性発症に影響を及ぼさないIL-5 Tgマウスならびに抗IL-5抗体を用いて、IL-5に非依存的な遺伝子群の絞り込みを行った。その結果、抗原曝露4時間後では発現増強遺伝子として2遺伝子、24時間後では発現低下遺伝子として5遺伝子検索された。

本研究で得られたこれらの遺伝子は、気管支喘息の難治化・重症化に関連する気道過敏性の治療標的としての可能性もあることから、今後、各個体レベルでの発現をreal-time PCR等を用いて再評価し、表現系との関連性を併せて検討する必要があると思われる。

### 2) 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-β1

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-β1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-β1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。

そこで平成17年度に、TGF-β1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-β1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-β1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-β1の作用を中和することは、TGF-β1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。

### 3) 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β2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、平成 17 年度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・ウィルス・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

①マウス喘息モデルを用いた気道過敏性発症に関与する遺伝子群をスクリーニングした結果、気道過敏性に特異的な遺伝子として、抗原曝露 4 時間後ならびに 24 時間後において、計 7 つの遺伝子が同定された。

②マウス気道リモデリングモデルを用いた検

討から、アレルギー反応によって生ずる基底膜下の線維化には好酸球が重要な役割を有することが明らかとなった。また、TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 の作用を中和することは、TGF- $\beta$ 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) Komai M, Tanaka H, Masuda T, Nagao K, Ishizaki M, Sawada M, Nagai H. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 138: 912-920.
- 2) Masuda T, Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Nagai H. Mast cells play a partial role in allergen-induced subepithelial fibrosis in a murine model of allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33: 705-713.
- 3) Nagao K, Tanaka H, Komai M, Masuda T, Narumiya S, Nagai H. Role of PGI<sub>2</sub> in airway remodeling induced by repeated allergen challenge in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003; 29: 314-320.
- 4) Yasunaga S, Yuyama N, Arima K, Tanaka H, Toda S, Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Nagai H, Izuhara K. The negative-feedback regulation of the IL-13 signal by the IL-13

receptor  $\alpha 2$  chain in bronchial epithelial cells. Cytokine 2003; 24: 293-303.

5) Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, Delespesse G, Nagai H. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2004; 31: 62-68.

6) Nagao K, Akabane H, Masuda T, Komai M, Tanaka H, Nagai H. Effect of MX-68 on airway inflammation and hyperresponsiveness in mice and guinea-pigs. J. Pharm. Pharmacol. 2004; 56: 187-196.

7) 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.

特になし。

## 2. 学会発表

- 1) 田中宏幸、永井博式：気管支喘息とプロスタノイド。第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 シンポジウム6 (2003年5月、横浜)
- 2) 稲垣直樹、田中宏幸、永井博式：低分子メディアエーターを標的としたアレルギー治療薬。第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 シンポジウム7 (2003年5月、横浜)
- 3) 永井博式：アレルギー性炎症の機序解明と免疫薬理学的アプローチ。第53回日本アレルギー学会総会 会長講演 (2003年10月、岐阜)
- 4) 田中宏幸、永井博式：気道過敏性と気道リモデリング発症の分子メカニズム—マウスモデルを用いた検討—。第53回日本アレルギー学会総会 シンポジウム1 (2003年10月、岐阜)
- 5) 田中宏幸、永井博式：気道リモデリング治療の分子標的。第54回日本アレルギー学会総会 シンポジウム10 (2004年11月、横浜)
- 6) 稲垣直樹、田中宏幸、永井博式：モルモットおよびマウスを用いた気道過敏性の評価。第54回日本アレルギー学会総会 イブニングシンポジウム12 (2004年11月、横浜)
- 7) 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)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

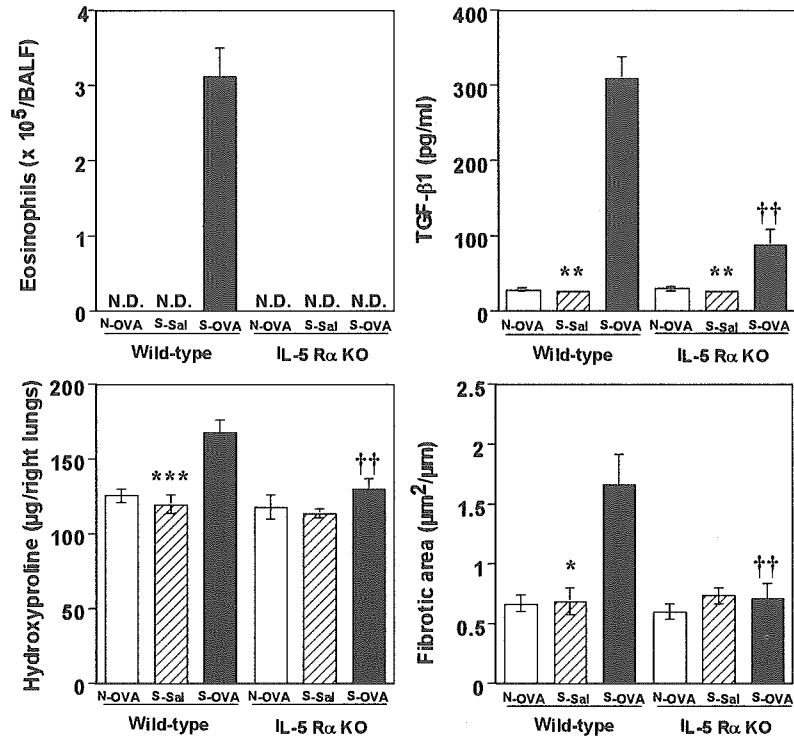


Fig. 1 Effect of IL-5R $\alpha$  gene deficiency on allergen-induced increases in the numbers of eosinophils in BALF, TGF- $\beta$ 1 production in BALF and the amount of HP in the right lungs in sensitized BALB/c background mice. N.D., not detected; N, non-sensitized; OVA, ovalbumin-exposed; S, sensitized; Sal, saline-exposed. \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 (vs. S-OVA group); †† $P$ <0.01 (vs. Wild-type).

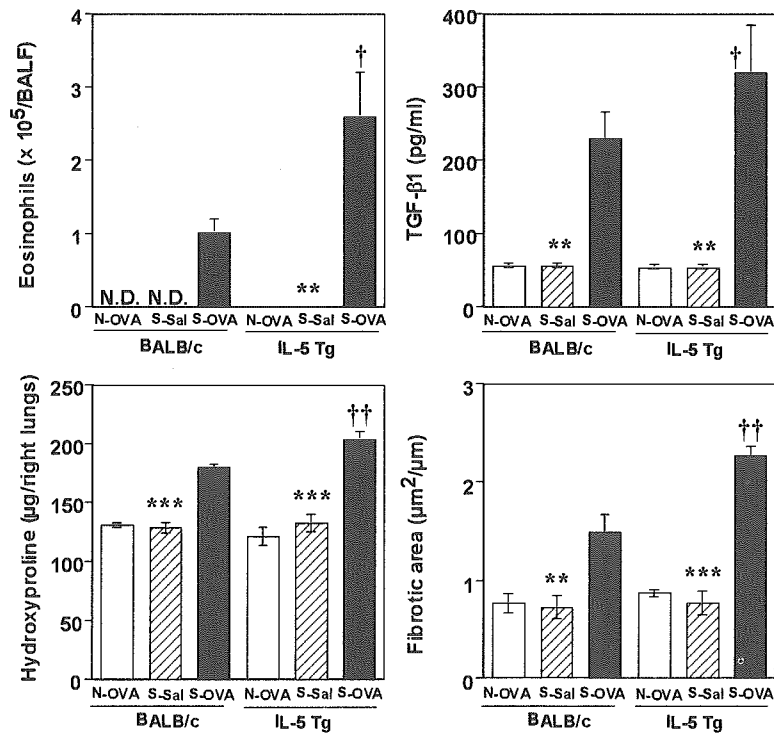


Fig. 2 Effect of systemic overexpression of IL-5 on allergen-induced increases in the numbers of eosinophils in BALF, TGF- $\beta$ 1 production in BALF and the amount of HP in the right lungs in sensitized BALB/c mice. N.D., not detected; N, non-sensitized; OVA, ovalbumin-exposed; S, sensitized; Sal, saline-exposed. \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 (vs. S-OVA group); † $P$ <0.05, †† $P$ <0.01 (vs. BALB/c).

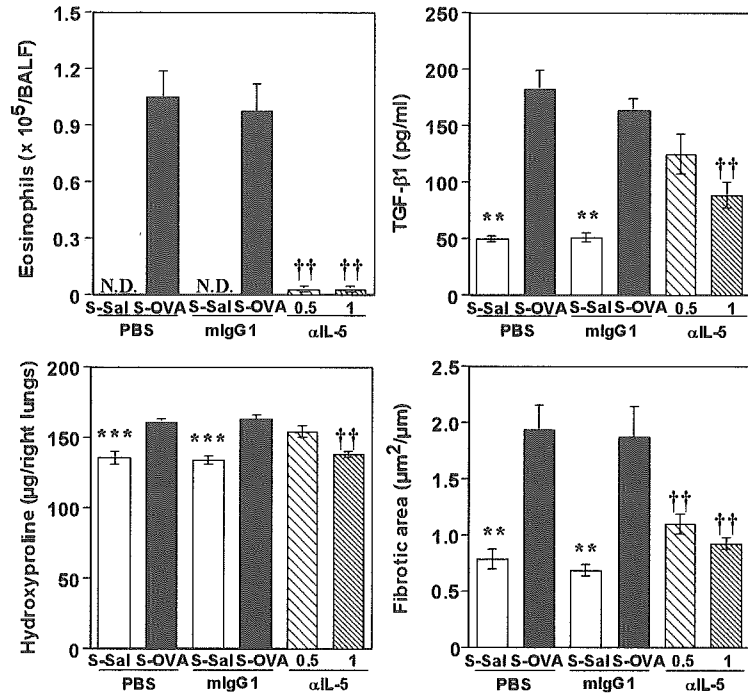


Fig. 3 Effect of a neutralizing mAb against IL-5 ( $\alpha$ IL-5; 0.5 or 1 mg/mouse) on allergen-induced increases in the numbers of eosinophils in BALF, TGF- $\beta$ 1 production in BALF and the amount of HP in the right lungs in sensitized BALB/c mice. mIgG1, mouse IgG1; N.D., not detected; OVA, ovalbumin-exposed; S, sensitized; Sal, saline-exposed. \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 (vs. S-OVA group); †† $P$ <0.01 (vs. mIgG1-S-OVA).

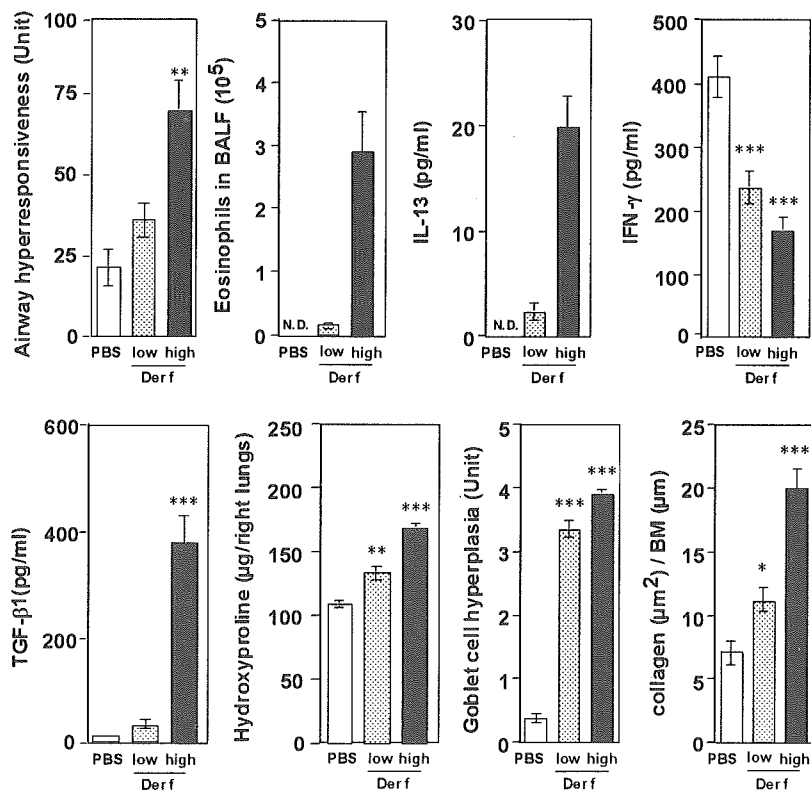


Fig. 4 Effect of repeated intratracheal instillation of allergen (*Dermatophagoides farinae*: *Der f*) on airway responsiveness to acetylcholine, numbers of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), cytokine production in BALF and airway remodeling in mice. low, low dose; high, high dose; BM, basement membrane. \*  $P$ <0.05, \*\*  $P$ <0.01, \*\*\*  $P$ <0.001 (vs. PBS-instilled group)

## 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

重症喘息では、正常な炎症終息機構の逸脱により、気道炎症が遷延化した状態が生じている。その結果もたらされた修復機構の破綻が非可逆的変化である気道リモデリングである。この病態における主要なエフェクター細胞は好酸球であるが、その機能についてはまだ解明されるべき点が多い。

本研究では、まず好酸球性炎症遷延化の機構として、炎症による組織障害で遊離する可溶性の細胞外基質蛋白がケモカインによる好酸球遊走を増強することを明らかにするとともに、関与する接着分子についても解析した。さらに、ヒスタミンがH4受容体を介して好酸球遊走を起こし、IL-5、GM-CSFがH4受容体を選択的に発現誘導することを示した。H4とH2受容体の拮抗的關係も解明した。

次に、好酸球の新たなエフェクター機能として、好酸球がPAR2を介してダニ抗原に直接反応し、IL-9を産生することも明らかにした。IL-9はTh2サイトカインの一種で気道過敏性、粘液過分泌など重症喘息の病態に深く関与することが知られているが、好酸球がアレルゲンを直接認識することにより、このTh2免疫反応を増強する作用を持つと考えられた。

難治喘息の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観察した。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。DexamethasoneはIL-5によるMIF遊離を抑制しなかった。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。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グルココルチコイド拮抗物質であるMIFを容易に遊離または産生し、難治化病態形成に関与すると考えられた。

最後に、リモデリングの病態として、好酸球がロイコトリエンの刺激によって、線維化サイトカインのひとつであるTGF- $\beta$ を産生すること、さらにこの産生がIL-5などの好酸球活性化サイトカインによって著しく増強されることも明らかにした。

以上、本研究では難治性喘息に対する今後の新規治療薬開発につながる好酸球の新たなエフェクター機能について解明した。

### A. 研究目的

重症喘息では、正常な炎症終息機構の逸脱により、気道炎症が遷延化した状態が生じている。その結果もたらされた修復機構の破綻が非可逆的変化である気道リモデリングである。そのなかでの主要なエフェクター細胞は好酸球であるが、詳細な機能についてはまだ解明されるべき点が多い。本研究では炎症遷延化・難治化とリモデリングに果たす好酸球の役割を解明し、その正常化を導く治療法の開発をめざすこととした。そのために、まず好酸球性炎症遷延化の機構として、炎症による組織障害過程で遊離する可溶性の細胞外基質蛋白が好酸球遊走に及ぼす影響、好酸球の遊走に関わるヒスタミン受容体の

動態、また、好酸球がTh2型炎症増強に働くメカニズムとしてアレルゲンによるIL-9産生、好酸球のリモデリング病態にかかわると考えられる好酸球由来線維化サイトカイン、TGF- $\beta$ 産生機構について検討した。

一方、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であり、治療上の大きな問題となる。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。そこで、本研究では好酸球がMIFの主要な産生源であることを明らかにすると共に、その産生・遊離機構についても解析を行った。

以上、好酸球が難治喘息の病態形成に関わるメカニズムの新しい視点から解析することにより、新規治療薬開発の基礎作りをめざした。

## B. 研究方法

### 1) 好酸球分離

好酸球は末梢血からCD16 negative selection法により分離した。

### 2) 細胞遊走

ケモタキシスはChemotaxigel™を用いて検討した。ヒスタミンまたはエオタキシンと各種濃度の細胞外基質蛋白(collagen I, collagen IV, laminin-1, laminin-10, fibronectin, fibrinogen)を下室に添加、上室には好酸球を添加した。一部の実験では遊走実験の前に好酸球を各種接着分子に対する抗体(CD29, 49d, 49f, 47, 18, 11a, 11b)またはisotype-matched control IgGと30分間反応させ、90分後に下室へ遊走した好酸球数を測定した。

### 3) 好酸球の活性酸素産生

活性酸素産生はチトクローム還元法によって定量した。

### 4) ヒスタミン受容体遺伝子発現

好酸球のヒスタミン受容体発現はABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems)を用いた定量的PCR法によって解析した。H1, H2, H3, H4受容体のプライマーはApplied Biosystems社のPrimer Expressソフトウェアを用いて設計した。

### 4) TGF-β1遺伝子発現

好酸球のTGF-β1遺伝子発現は細胞をLTD4またはIL-5, GM-CSFで刺激後、同様に設計したプライマーを用いて定量的PCR法によって測定した。

### 5) House dust mite抽出物による好酸球のサイトカイン遺伝子発現

好酸球をlipopolysaccharideおよびHouse dust mite抽出物(HDM)により刺激して、16-40時間後RNAを抽出、前述の定量的PCR法によって、12種類のサイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, TGF-β)発現を測定した。IL-9蛋白量は特異的ELISA法により定量した。一部の実験ではHDMをProtease阻害薬で処理したのちに好酸球と反応させてIL-9発現を定量した。

### 6) 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。

### 7) 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。

### 8) 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。

### 9) 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、定量的PCR法によってMIF遺伝子発現を定量した。

## C. 研究結果

### 1) 細胞外基質蛋白による好酸球遊走

collagen IV, laminin-1, laminin-10, fibronectin, fibrinogen、エオタキシンによる好酸球の遊走を有意に増強した(図1)。collagen Iは作用を持たなかった。これらの蛋白は単独では好酸球遊走を誘導せず、Eotaxinを介するシグナルを増強する(ERKリン酸化を確認)ものと考えられた。

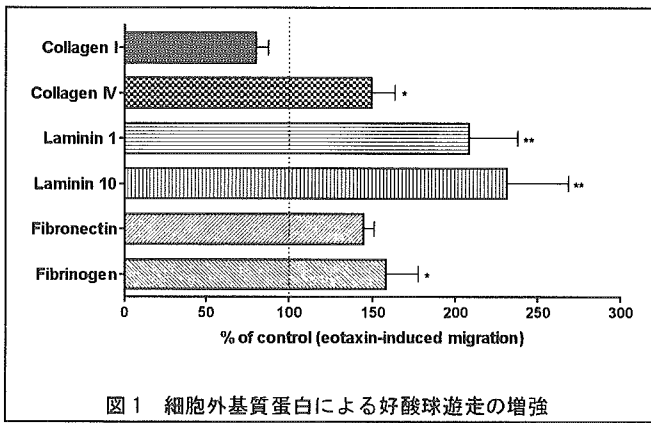


図1 細胞外基質蛋白による好酸球遊走の増強

この中でもっとも強い活性を持つ laminin について以後の検討を進めたが、遊走増強効果は eotaxin を介するものだけでなく、PAF、C5a による遊走も同様に増強することを観察した。

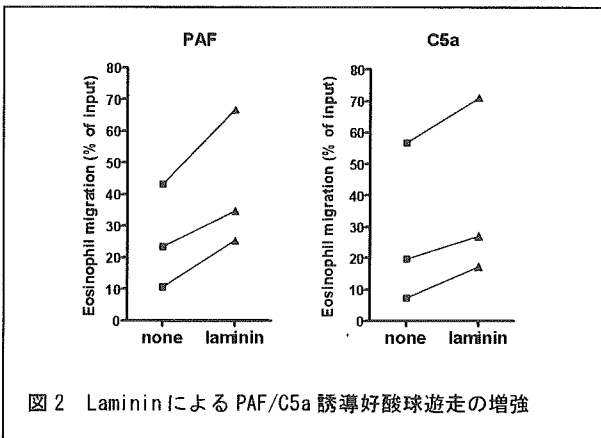


図2 Lamininによる PAF/C5a 誘導好酸球遊走の増強

次に、これらの作用がどの接着分子を介するかについても検討を加えた (図 3A、3B)。

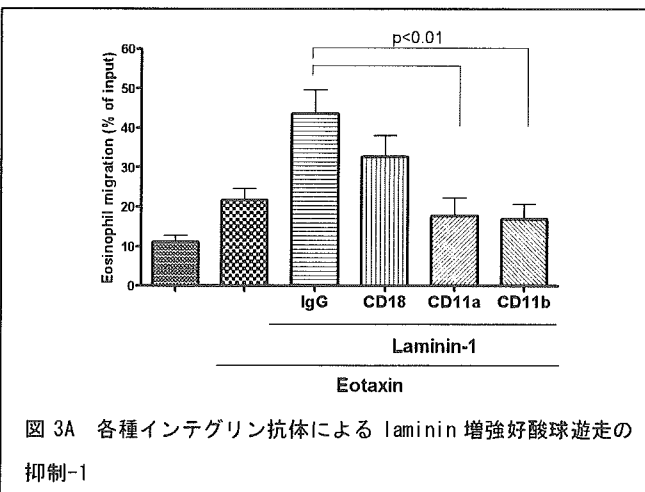


図3A 各種インテグリン抗体による laminin 増強好酸球遊走の抑制-1

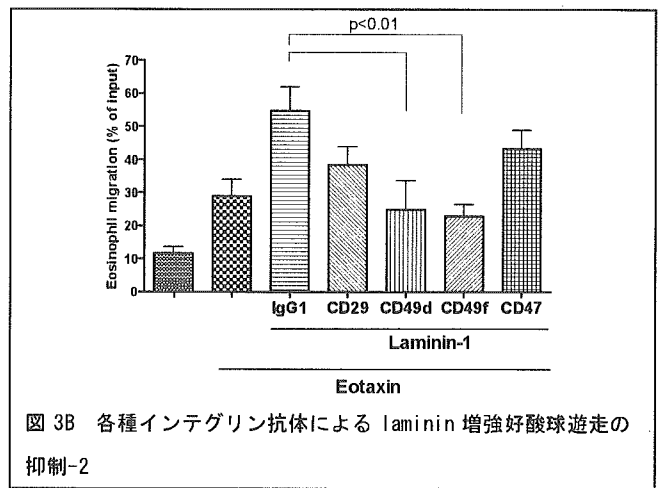


図3B 各種インテグリン抗体による laminin 増強好酸球遊走の抑制-2

その結果、laminin による遊走増強効果は  $\alpha L$ 、 $\alpha M$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 4$  に対する抗体で抑制されることが観察され、laminin は多種のインテグリンを介して好酸球遊走に関与することが示唆された。

## 2) 好酸球ヒスタミン受容体の動態

好酸球のヒスタミン受容体発現を定量したところ、H2 と H4 の発現が高いことが明らかとなった (図 4)。ヒスタミン受容体は G 蛋白共役受容体ファミリーに属するが、H2 は  $G\alpha$ 、H4 は  $G_i$  と共役する。一般的にこれらは互いに拮抗する作用を持つことが知られているので、好酸球において H2 と H4 作用の相互関係を解析した。

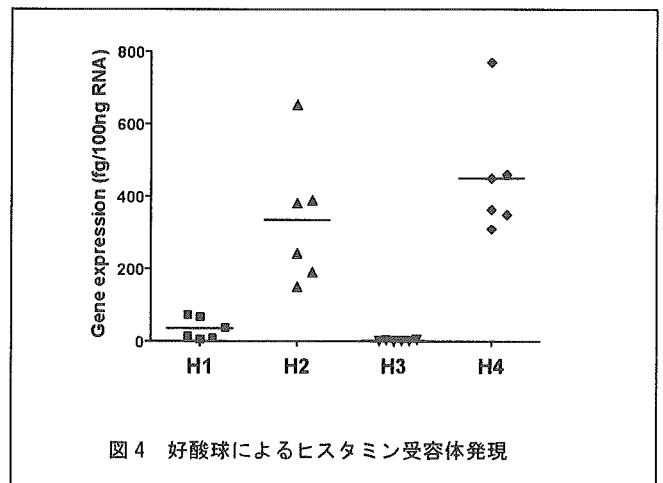


図4 好酸球によるヒスタミン受容体発現

まず、活性酸素産生能について検討したところ、ヒスタミン単独では好酸球の活性酸素産生を誘導しなかったが、H2 阻害薬である Famotidine で好酸球を前処理したところ、有意な活性酸素産生が誘導された (図 5)。

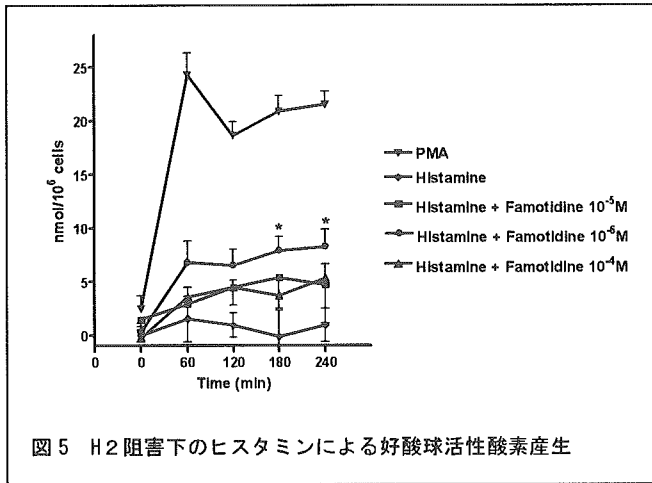


図5 H2阻害下のヒスタミンによる好酸球活性酸素産生

またこの反応はH4受容体阻害薬である Thioperamide によって抑制された(図6)。

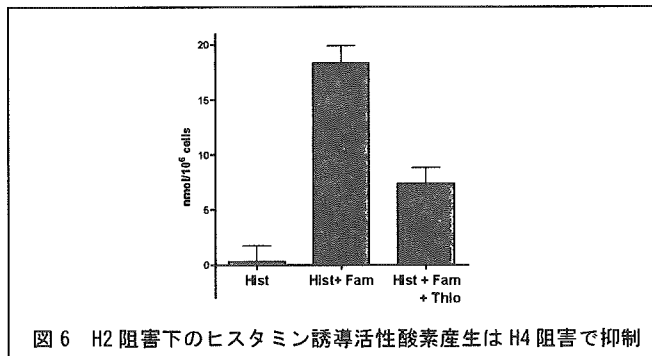


図6 H2阻害下のヒスタミン誘導活性酸素産生はH4阻害で抑制

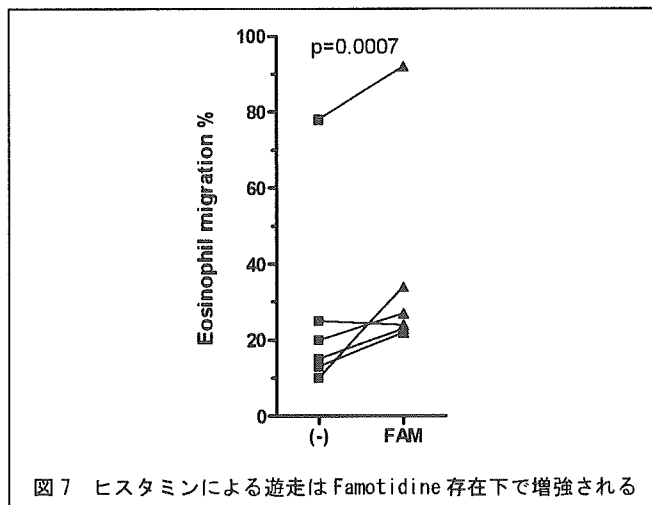


図7 ヒスタミンによる遊走はFamotidine存在下で増強される

さらにFamotidineによるH2阻害はヒスタミンによる好酸球遊走も増強した(図7)。以上より、H2とH4は拮抗的に作用し、H2阻害がH4による好酸球のエフェクター機能を増強する可能性が考えられた。

次に、IL-5, GM-CSFなどの好酸球活性化サイトカイン

がヒスタミン受容体発現に及ぼす影響をみた。IL-5, GM-CSFはいずれもH4発現を著しく増強するが、H1, H2, H3発現にはまったく作用を持たないことが明らかとなった(図8A)。

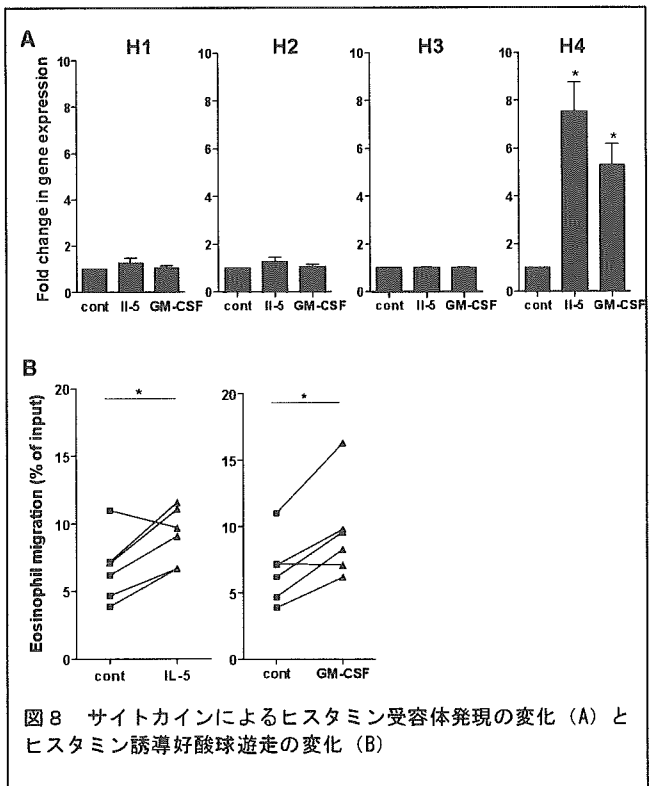


図8 サイトカインによるヒスタミン受容体発現の変化(A)とヒスタミン誘導好酸球遊走の変化(B)

さらにIL-5またはGM-CSF前処置により、実際にヒスタミン誘導の好酸球遊走が増強することも確認した(図8B)。

3) HDMによる好酸球からのサイトカイン産生  
好酸球が抗原に直接反応して、サイトカイン産生を行うことができるか検討した。抗原刺激としては、細菌由来のLipopolysaccharide(LPS)とアレルギーであるHouse dust mite抽出物(HDM)を用いた。12種のサイトカイン発現をスクリーニングしたところ、16時間刺激では著しく発現が増強されるサイトカインはなかったが、40時間刺激でIL-9遺伝子発現の著しい増強が認められた(図9)。

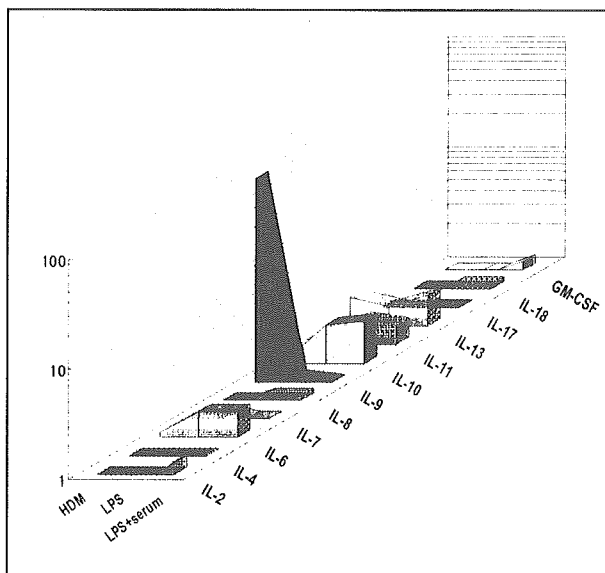


図9 抗原刺激による好酸球のサイトカイン遺伝子発現

この IL-9 産生は蛋白についても ELISA 法により測定して確認した。

そこで好酸球による抗原刺激 IL-9 産生メカニズムを明らかにするため、IgE の関与と Protease-activated receptor (PAR) の関与を検討した。まず、HDM による好酸球からの IL-9 発現は好酸球ドナーの HDM に対する IgE 抗体の有無には無関係であった。次に、HDM は蛋白分解酵素でもあるため、Protease 阻害薬で HDM を処理した後の反応を調べたところ、cysteine protease 阻害薬では変化がみられなかったが、serine protease 阻害薬である AEBSF 処理により IL-9 発現が完全に抑制された (図 10)。Serine protease は PAR2 のリガンドであり、好酸球は PAR2 を介して HDM と反応する可能性が考えられた。

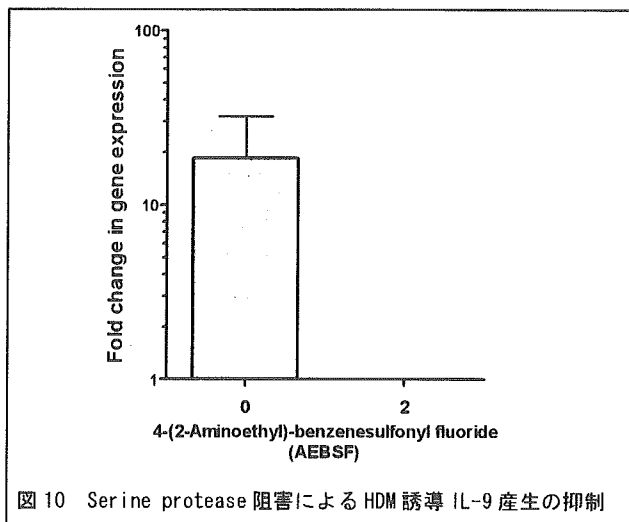


図 10 Serine protease 阻害による HDM 誘導 IL-9 産生の抑制

#### 4) 好酸球由来の MIF

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 11 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。

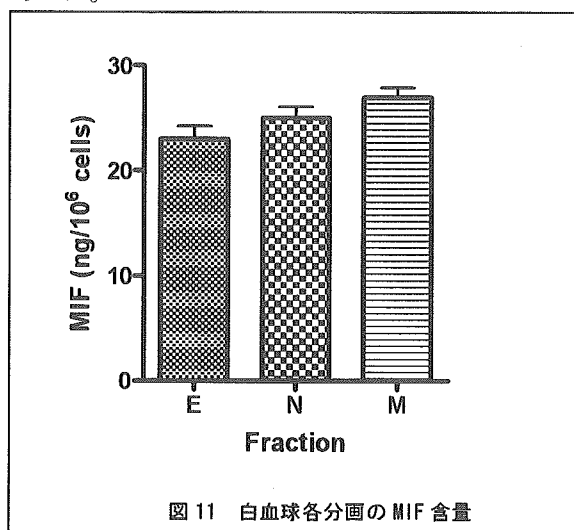
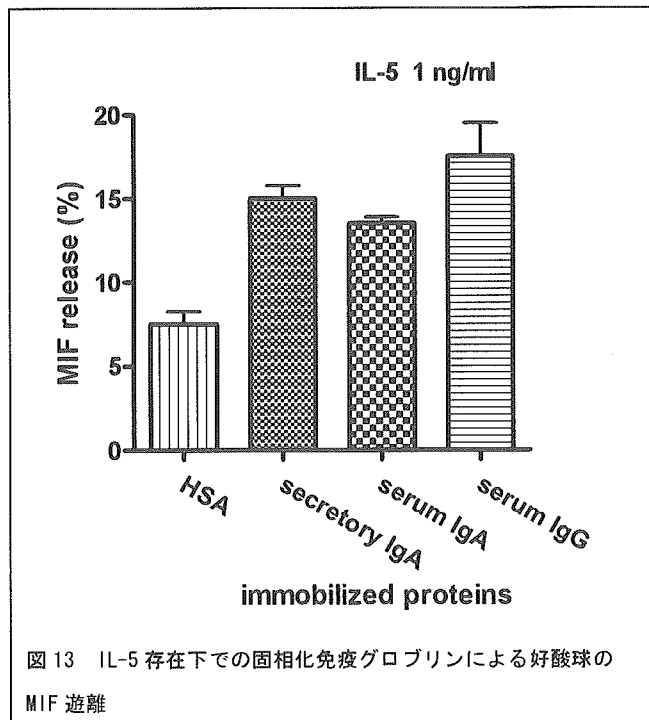
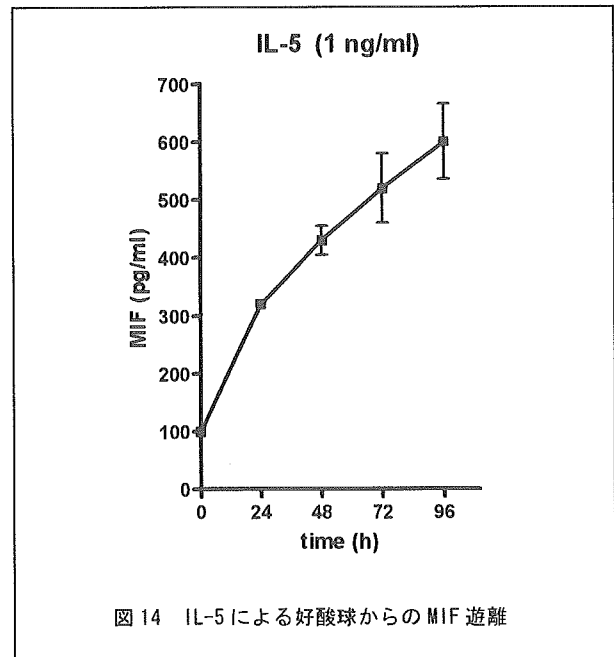
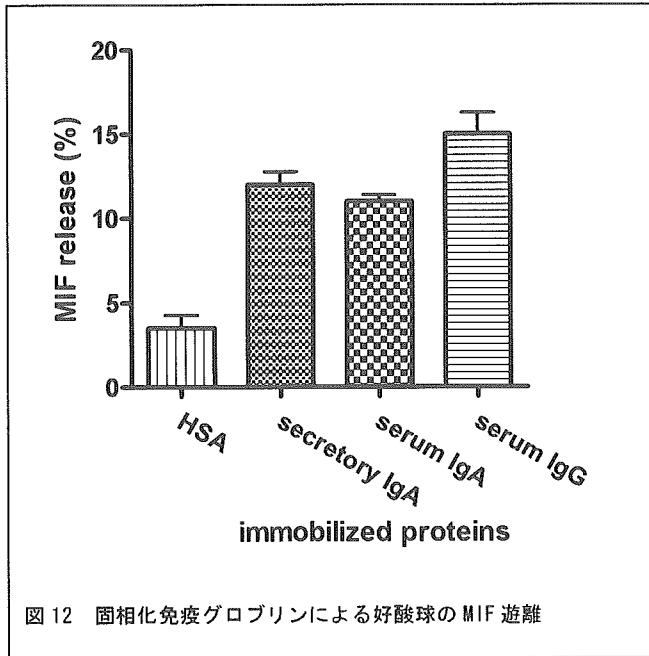


図 11 白血球各分画の MIF 含量

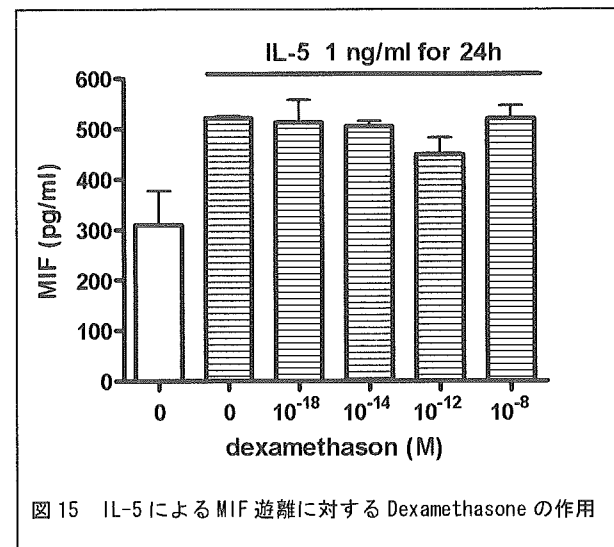
図 11 にみられるように、好酸球はその他の白血球と同等の MIF を含有していた。

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。Sephacryl 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 12)。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 13)。



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 14)。

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 15)。



以上のデータは、好酸球が Preformed の MIF を各種刺激で遊離することを観察するものである。続いて、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 16)。

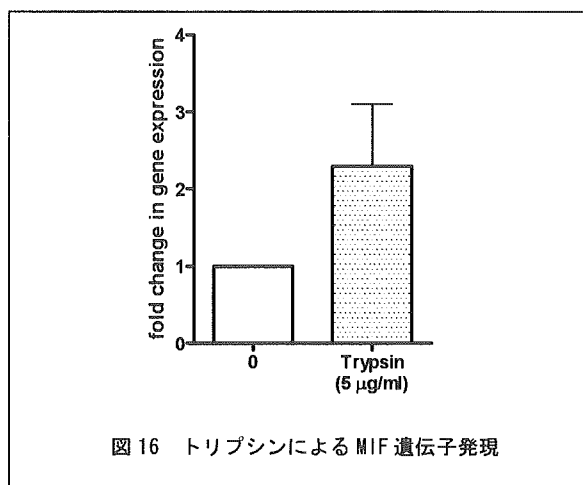


図 16 トリプシンによる MIF 遺伝子発現

#### 4) 好酸球からの TGF-β 産生機構

好酸球を LTD4、IL-5、GM-CSF またはそれらのコンビネーションにて刺激すると、いずれも TGF-β mRNA 発現が誘導された。とくに LTD4+IL-5、LTD4+GM-CSF の組み合わせで相乗的に遺伝子発現が増強されることが明らかとなり、好酸球活性化サイトカインとロイコトリエンの共存がリモデリング促進に関わる可能性が示唆された (図 17)。

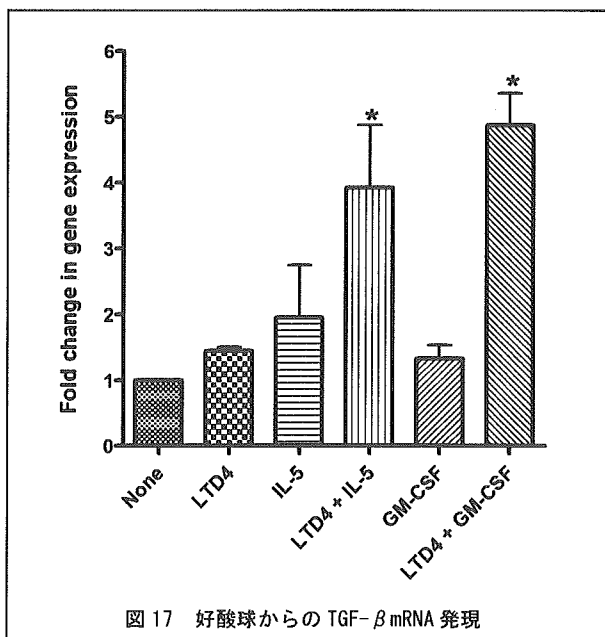


図 17 好酸球からの TGF-β mRNA 発現

また、LTD4 による TGF-β 発現は CysLT1 受容体拮抗薬 Montelukast により抑制されたが、Dexamethasone は効果をもたないことも観察した。これはリモデリングにはステロイド不応の局面が存在することを

示すものと考えられた。

#### D. 考察

本研究では、難治性喘息の重要な病態である遷延した好酸球性炎症のメカニズムを解明することをめざし、いくつかの重要な因子を同定した。

まず、ラミニンをはじめとする細胞外基質蛋白が、エオタキシン、PAF または C5a による好酸球遊走を著しく増強することを明らかにした。難治性気管支喘息患者の肺組織では、浸潤した炎症細胞からのメディエーターにより組織破壊が起こっているが、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの蛋白分解酵素がこの組織障害に強く関与することが報告されている。MMP は細胞外基質蛋白を分解して、リモデリングの形成に関わるとともに、炎症細胞の浸潤の誘導も促すとされている。MMP による細胞浸潤促進のメカニズムはこれまで知られていなかったが、今回のデータはプロテアーゼで分解を受け可溶化した細胞外基質蛋白が好酸球の遊走を増強し、炎症のさらなる増悪を誘導している可能性を示したといえる。喘息の動物モデルではプロテアーゼの阻害により、好酸球性炎症が抑制され、気道過敏性も改善すると報告されており、今回のデータと合わせると、細胞外基質蛋白の分解・遊離抑制=プロテアーゼ阻害が新しい治療戦略のひとつになり得ると考えられた。

次に、従来、即時型メディエーターと考えられていたヒスタミンが好酸球の遊走をおこすことは前年度に報告したが、本研究ではヒスタミンの好酸球に対する作用を制御するヒスタミン受容体の動態についても解析した。まず、好酸球は H1, H2, H3, H4 受容体を発現するが、遊走に関わるのは H4 受容体である。今回は、IL-5、GM-CSF がヒスタミン受容体のうち H4 を選択的に発現誘導して、ヒスタミンによる好酸球遊走を増強することを観察した。IL-5、GM-CSF 産生が亢進する難治性喘息患者では H4 を介した好酸球浸潤がさらに強く誘導されることを示唆するものである。

一方、好酸球には H2 受容体も多く発現している。本研究では H4 と H2 の拮抗的關係も明らかにした。すなわち、H2 を介する刺激がエフェクター機能誘導

に関わる H4 受容体に拮抗するのである。現在、アレルギー疾患に用いられる抗ヒスタミン薬は H1 拮抗薬のみであるが、今後、H4 特異的阻害薬が開発されるならば、好酸球炎症抑制の有効な治療薬となる可能性が期待できる。

次に、多くの喘息患者が感作される HDM アレルゲンに対して好酸球が直接反応して多量の IL-9 を産生することも明らかにした。この反応は PAR2 を介するものである可能性が示されたが、PAR2 は酵素リガンドに対しての好酸球上の主要な受容体であり、PAR2 リガンドの serine protease は HDM に多量に含まれることがよく知られている。これまでは好酸球は抗原と直接反応するのではなく、抗原刺激時に活性化されたリンパ球や肥満細胞からのサイトカインによって機能を発現する終末エフェクター細胞とされていた。しかし、今回の知見は好酸球が第一線の細胞として抗原を認識して、局所においては免疫反応のコンダクターとしての機能も有することが想定させる。この機構に対する有効な介入方法の開発も新しい治療薬の発見につながるものと考えられる。

さらに、われわれは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) を好酸球が含有し、これまで知られている各種の脱顆粒刺激によって MIF を遊離することも見いだした。また、通常はグルココルチコイド感受性のある好酸球も 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考えられた。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 で産生することを見いだした。

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 阻止抗体投与により 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ゲン感作による 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。好酸球は多量の MIF を含有して、好酸球活性化刺激によって遊離する。そして、これがステロイドによって抑制できないことは難治化の病態として常用と考えられる。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がこの MIF の重要なソースであることは確実である。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。

最後に、LTD4 が TGF- $\beta$  発現を誘導すること、IL-5、GM-CSF がこれを相乗的に増強することを初めて明らかにした。好酸球由来の TGF- $\beta$  が気道リモデリングに関与することは報告されているが、ロイコトリエンがこの過程に深く関わっていることを示すと考えられる。ロイコトリエン受容体拮抗薬の臨床的有用性はすでに認められているところであるが、今後は単なる症状抑制のみならず、リモデリング予防をも目的とした、より効果的な投与方法も検討されるべきであると考えた。

## E. 結語

難治性喘息の特徴である好酸球性炎症の遷延化、難治化機構を明らかにした。まず、好酸球浸潤に関わる因子としては細胞外基質蛋白、ヒスタミンとその受容体バランスが重要な役割を果たす。一方、好酸球は PAR2 を介する反応により IL-9 を産生し、Th2 型炎症増強にも関わる。さらに、炎症増悪とステロイド拮抗物質である MIF も多量に産生・遊離する。そして気道リモデリングに関わる TGF- $\beta$ 1 もロイコトリエンなどの刺激により産生・遊離される。好酸球性炎症に関わるこれらの因子はいずれも新たな治療ターゲットになり得るものであり、本研究は今後の治療薬開発の重要な基礎を築くことができた

と考える。

## F. 研究発表

### 1. 論文

- (1) Yoshimura-Uchiyama C, Yamaguchi M, Nagase H, Fujisawa T, Ra C, Matsushima K, et al. Comparative effects of basophil-directed growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302:201-6
- (2) Nakayama T, Kato Y, Hieshima K, Nagakubo D, Kunori Y, Fujisawa T, et al. Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16 attracts eosinophils by interacting with histamine H4 receptor. *J Immunol* 2004; 173:2078-83
- (3) Takao Fujisawa. New positioning of eosinophils in asthma. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol* 2005; 25:1-7.
- (4) Kato Y, Fujisawa T, Nishimori H, Katsumata H, Atsuta J, Iguchi K, et al. Leukotriene D4 induces production of transforming growth factor- $\beta$ 1 by eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137 Suppl 1:17-20
- (5) Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:505-9
- (6) 藤澤隆夫:学会サテライト聴講録:第58回米国アレルギー・喘息・免疫学会議 *International Review of Asthma* 4(3):96-107, 2002
- (7) 藤澤隆夫:アレルギー疾患における好酸球と気道上皮細胞のインターアクション. *アレルギー科* 15(3):245-250, 2003
- (8) 藤澤隆夫:アレルギー疾患の免疫学:好酸球の役割. *小児内科* 35(4):556-560, 2003
- (9) 藤澤隆夫:気管支喘息における好酸球の役割:好酸球悪玉説. *喘息* 16(4):21-26, 2003
- (10) 藤澤隆夫:気道炎症マーカーの選び方と解釈. *小児科外来診療のコツと落とし穴* 1) 小児喘息診療 p24-25, 柳沢正義、森川明廣 編、中山書店、東京、2003
- (11) 藤澤隆夫:抗アレルギー薬療法における薬剤選択について一症例による検討. *小児科外来診療のコツと落とし穴* 1) 小児喘息診療 p126-127, 柳沢正義、森川明廣 編、中山書店、東京、2003
- (12) 藤澤隆夫:アレルギー疾患増加の原因:Th1・Th2細胞とサイトカイン. *小児科診療* 66(8):1327-1331, 2003
- (13) 藤澤隆夫:薬剤による気道リモデリングのアーリーインターベンション:新たな治療法の展望. *アレルギーの臨床* 23(10):789-793, 2003
- (14) 藤澤隆夫:気管支喘息児の治療・管理の実際—非発作時. *小児看護* 26(11)1506-1510, 2003
- (15) 藤澤隆夫:喘息にかかわる炎症性細胞の特徴と役割 p25-41, 図説 小児喘息の特徴-病態と薬物療法を中心に 西間三馨、森川昭廣 編、メディカルレビュー社、東京、2003
- (16) 藤澤隆夫:診断:随伴症 p83-92, 小児のアレルギー性鼻炎 西間三馨、森川昭廣 編、現代医療社、東京、2003
- (17) 藤澤隆夫:科学的根拠に基づくアレルギー治療. *日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌* 2(1), 1-4, 2004
- (18) 藤澤隆夫:好酸球研究の最前線. *医学のあゆみ* 208(8), 697-701, 2004
- (19) 藤澤隆夫:好酸球の細胞生物学、その他の炎症細胞の細胞生物学 p104-115, 総合アレルギー学 福田健 編、南山堂、東京、2004
- (20) 藤澤隆夫:吸入ステロイドは喘息を治癒させるか? *日本小児アレルギー学会誌* 18:131-136, 2004
- (21) 藤澤隆夫:ゲノム情報とアレルギーの病態解析. *日本小児アレルギー学会誌* 18:145-150, 2004
- (22) 増田佐和子、藤澤隆夫:スギ花粉飛散が気管支喘息の呼吸抵抗、気道過敏性に与える影響. *アレルギー科* 17:36-42, 2004
- (23) 井口光正、藤澤隆夫、熱田純、神谷齊:小児慢性喘息が成人期にキャリアオーバーした患者の臨床経過. *アレルギーの臨床* 24:320-323, 2004
- (24) 藤澤隆夫:好酸球学の最近のトピックス *アレルギーの臨床* 24(10):760-765, 2004
- (25) 藤澤隆夫:アレルギー性炎症における好酸球の役割-善玉説と悪玉説の検証 *感染・炎症・免疫* 34:182-191, 2004
- (26) 藤澤隆夫、中山隆志、平井浩一、義江修:好酸球のヒスタミン受容体-ヒスタミンの新しい役割について *アレルギー科* 18(4):337-346, 2004
- (27) 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
- (28) 藤澤隆夫:好酸球と気道リモデリング *カレ*



- ントセラビー 23:88-89, 2005
- (29) 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
- (30) 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
- (31) 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
- (32) 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
- (33) 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
- (34) 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- $\beta$  産生誘導炎症と免疫 14(1):25-30, 2006
- (35) 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
- (36) 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
- 4) 藤澤隆夫 「シンポジウム 喘息における吸入ステロイドとの併用療法」LT受容体拮抗薬の併用療法. 第53回日本アレルギー学会総会. 岐阜市 2003年10月23-25日 アレルギー-52:782, 2003
- 5) 加藤佳子、藤澤隆夫、熱田純、勝又元、井口光正. 気道上皮細胞由来因子による好酸球トランスマイグレーションについて：Cysteinyl leukotrieneの関与. 第53回日本アレルギー学会総会. 岐阜市 2003年10月23-25日 アレルギー-52 : 838, 2003
- 6) 増田佐和子、藤澤隆夫、熱田純、勝又元、井口光正. 幼児用アレルギー日記を用いた用時すぎ花粉症観察の試み. 第53回日本アレルギー学会総会. 岐阜市 2003年10月23-25日 アレルギー-52 : 854, 2003
- 7) 藤澤隆夫. シンポジウム「小児気管支喘息治療の現状と展望」抗アレルギー薬. 第12回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会 2003年12月7日 名古屋市
- 8) Y. Kato, T. Fujisawa, H. Kamiya, O. Yoshie. Autocrine Activation of Eosinophil Transmigration With Cysteiny l Leukotrienes 60<sup>th</sup> Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2004. 3. 21 San Francisco, USA J Allergy Clin Immunol 113:s166, 2004
- 9) 藤澤隆夫 シンポジウム「吸入ステロイドのアドオン療法：どのように薬剤を選択するか？」ロイコトリエン受容体拮抗薬 第1回三重気道アレルギー研究会 2004. 4. 15 津市
- 10) 藤澤隆夫 「イブニングシンポジウム 小児気管支喘息の特徴とその治療・管理」新しい治療の試み. 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会. 前橋市 2004年5月12-14日 アレルギー-53 : 253, 2004.

## 2. 学会発表

- 1) 藤澤隆夫 「シンポジウム 好酸球」即時型反応と好酸球の関わり 第15回日本アレルギー学会春期臨床大会. 横浜市. 2003. 4. 21
- 2) 加藤佳子、藤澤隆夫、中山隆志、義江修. 細胞外基質蛋白による好酸球遊走の活性化. 第24回炎症・再生医学会 京都市 2003年11月26日 日本炎症・再生医学会雑誌 23 : 460, 2003
- 3) 藤澤隆夫 「シンポジウム ゲノム・21世紀型ポストゲノムを小児アレルギー診療にどのように展開するか」ゲノム情報とアレルギーの病態解析 第40回日本小児アレルギー学会. 岐阜市 2003年10月3, 4日 日本小児アレルギー学会誌 17 : 420, 2003

- 11) 藤澤隆夫 「シンポジウム 好酸球、肥満細胞の Cross talk とアレルギー発症」 好酸球性炎症におよぼす肥満細胞の役割. 第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 前橋市 2004 年 5 月 12-14 日 アレルギー 53:214, 2004.
- 12) 加藤佳子、勝又元、西森久史、熱田純、井口光正、藤澤隆夫. LTD4 による好酸球からの TGF- $\beta$  産生について. 第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 前橋市 2004 年 5 月 12-14 日 アレルギー 53:298, 2004.
- 13) 藤澤隆夫 気管支喘息における好酸球の役割: その再評価と新しい機能について 第 2 回西日本メディエーター研究会 大阪市 2004. 7. 24
- 14) 加藤佳子、藤澤隆夫. イブニングシンポジウム「好酸球は悪玉か? 善玉か?」 免疫調節細胞としての好酸球. 第 54 回日本アレルギー学会総会. 横浜市 2004 年 11 月 4-6 日 アレルギー 53:849, 2004
- 15) 長尾みづほ、加藤佳子、勝又元、西森久史、井口光正、藤澤隆夫 アトピー性皮膚炎児と正常児における血清 TARC(CCL17)濃度の検討. 第 54 回日本アレルギー学会総会. 横浜市 2004 年 11 月 4-6 日 アレルギー 53:972, 2004
- 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. 61<sup>st</sup> 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. 61<sup>st</sup> 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. 61<sup>st</sup> 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) 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 2004 年 6 月 2-4 日 アレルギー 54:250, 2005.
- 22) 増田佐和子、藤澤隆夫、井口光正、熱田純、南部光彦、末廣豊、勝又元、野間雪子、西森久史. 鼻アレルギーを合併する小児気管支喘息に関する多施設アンケート調査 第 17 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 岡山市 2004 年 6 月 2-4 日 アレルギー 54:352, 2005.
- 23) 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 高崎市、2005. 2. 19-20
- 24) 熱田純、藤澤隆夫、井口光正 スギ減感作療法施行症例におけるスギ花粉飛散シーズン前後での血中マーカーの変化 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 : 356, 2005.
- 25) 勝又元、加藤佳子、藤澤隆夫 ハウスダストによる好酸球からのIL-9産生 アレルギー好酸球研究会 2005 東京、2005年6月11日
- 26) 長尾みづほ、徳田玲子、野間雪子、勝又元、中山哲、藤澤隆夫 ワークショップ食物アレルギー「鶏卵アレルギーにおける好塩基球活性化マーカーCD203c発現について 第42回日本小児アレルギー学会 福井市、2005. 11. 19
- 27) 勝又元、加藤佳子、野間雪子、長尾みづほ、藤澤隆夫 ハウスダストによる好酸球からのIL-9発現について 第55回日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005. 10. 20-10. 22 アレルギー54 : 777, 2005
- 28) 藤澤隆夫、山本万里、後藤晶一 アトピー性皮膚炎に対するメチル化カテキン含有ベニふうき茶エキスクリームの有効性と安全性 第55回日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005. 10. 20-10. 22 アレルギー54 : 790, 2005
- 29) 増田佐和子、藤澤隆夫、他 小児におけるスギ花粉感作状況 第55回日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005. 10. 20-10. 22 アレルギー54 : 706, 2005
- 30) 長尾みづほ、徳田玲子、野間雪子、勝又元、中山哲、藤澤隆夫 フローサイトメトリーによる好塩基球活性化マーカーCD203cの検出 第55回日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005. 10. 20-10. 22 アレルギー54 : 779, 2005
- 31) 野間雪子、藤澤隆夫、長尾みづほ、井口光正 小児思春期喘息寛解時の気道過敏性：吸入ステロイド治療の影響について 第55回日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005. 10. 20-10. 22 アレルギー54 : 836, 2005
- 32) 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 新潟市
- 33) 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 岐阜市、2005. 12. 10
- 34) 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 鳥羽市
- 35) 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
- 36) 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

研究協力者

義江 修 (近畿大学細菌学)  
 中山隆志 (近畿大学細菌学)  
 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  
総合研究報告書  
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少なくとも 127, 62, 57 及び 41 kDa のメタロプロテアーゼ活性が含まれ、MMP-1, 2 及び 3 が存在することも明らかになった。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%CO<sub>2</sub> 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中にプロテアーゼが含まれているか否かを検討する為、細胞培養上清のゼラチンザイモグラフィを行った。この時、アクリルアミドゲル濃度は7.5%に設定した。

続いて気管支平滑筋細胞培養上清に含まれるプロテアーゼ及びフィブロネクチンを、抗マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)及び抗フィブロネクチン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより同定した。

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