

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第 1 分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川 西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒 方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野 口 博 司 …… 25

## 第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望 月 直 樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田 上 昭 人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井 上 和 秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃 井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小 川 誠 司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花 田 賢 太 郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香 坂 隆 夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若 宮 伸 隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢 野 友 啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿 部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤 本 純 一 郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江 崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究



## 気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究

所 属 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部  
研究者 松本健治

研究要旨 気道上皮細胞、各種培養マスト細胞やヒト成人肺由来マスト細胞、マウス慢性好中球性炎症モデルやマウス OVA 感作喘息モデルを用いた網羅的な遺伝子の発現解析を行い、気管支喘息や COPD の病態に関する分子生物学的機序や各種薬剤の有効性の検討を行った。

### 分担研究者

- (1) 理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター アレルギー遺伝子研究ユニット 斎藤博久
- (2) 日研化学医薬研究所 山名研司郎
- (3) 第一アスピオ生物医学研究所 福田好晃

### A. 研究目的

近年、罹患率が増加している気管支喘息の病態の根本はアレルギー性炎症反応と呼ばれており、遷延化したアレルギー性炎症反応は組織の非可逆的な変化（リモデリング）を惹起する。リモデリングには気道粘液腺の過形成や気道上皮基底膜の肥厚、気道平滑筋細胞の過形成や肥大、気道粘膜下組織の繊維化などの多くの要素が含まれるが厳密な定義はない。重症化した気管支喘息の長期的な予後や生命予後に最も相関するのは気道のリモデリングであると考えられているが、現在までにリモデリングの臨床的な判定方法は気道の生検という非常に侵襲的な検査以外にない。

一方、慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者数も年々増加傾向にあり、2000年現在で推計22万人、疫学的には潜在患者も含めて530万人といわれている。その発症には喫煙や公害、感染、遺伝など様々な因子が関与することが報告されているが、その発症機序や病態には不明な点が多く残されている。COPDの病理学的な特徴は、気管支喘息のリモデリングと同じく、高度の慢性炎症像と非可逆性の肺組織の繊維化などである。アレルギー性炎症反応の形成には好酸球やマスト細胞、好塩基球の活性化が、リモデリングやCOPDの病態には気道上皮細胞や繊維芽細胞、気道平滑筋細胞の活性化が重要な役割を演じていると考えられている。

本研究では網羅的な遺伝子の発現解析に基づきこれらの細胞の活性化や機能に特異的で他の細胞群に発現していない分子群やシグナル伝達経路などを検索して、一分子ごとの検証ではなく、組織全体、細胞全体のシステムとして理解した上で、その分子群を制御することによって他の細胞に影響を与えることなく（安全な）これらの細胞の生存や機能を制御するようなアレルギー疾患の治療法を開発することを最終目標とする。さらに本研究では、患者からの生検組織や実験モデル動物からの組織などの網羅的な遺伝子発現解

析を通じて、リモデリングやCOPDの重症度を臨床的に判定する分子マーカーの検索を行い、それらを元にした新しい臨床評価方法の開発を行うことも目標とする。

初年度である昨年度は 1. 気管支喘息およびCOPDの *in vitro* model を用いての病態関連遺伝子の探索、2. 臨床的な気管支喘息のリモデリングのマーカーの探索（主任担当）、3. マスト細胞特異的リモデリング関連分子の探索（理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター担当）、4. マウス慢性好中球性炎症モデルの確立とその遺伝子発現の網羅的な解析（日研化学株式会社医薬研究所担当）および5. 好酸球性浸潤モデルの確立とマウス好酸球単離法の確立（第一サントリー生物医学研究所担当）を行った。

第二年度である本年度は、1. 感染が気道上皮細胞に及ぼす影響に関する網羅的な遺伝子発現解析系の構築（主任担当受託研究分）、2. ヒト各種培養マスト細胞とヒト肺由来マスト細胞の遺伝子発現パターンとの差の検討（理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター担当）、3. マウス好中球性炎症モデルのに対するステロイド剤およびテオフィリンの影響に関する網羅的な遺伝子発現解析（日研化学医薬研究所担当）および5. 気管支喘息における気道閉塞の原因と考えられるムチン（mucin）分泌に対する評価のための *in vitro* 評価系を構築した。また、加えて、マウス喘息モデルの構築を実施した。（第一アスピオ生物医学研究所担当）。

### B. 研究方法

1. 気道上皮細胞株 BEAS-2B をグラム陽性球菌の細胞膜成分である peptidoglycan (PGN)、グラム陰性桿菌の細胞膜成分である lipopolysaccharide (LPS) および double stranded RNA としての PolyIC で刺激して6時間培養後に Total RNA を抽出、GeneChip にて遺伝子発現を網羅的に解析した。
2. 気道上皮細胞株 A549 に未処理 RSV を1時間附着させて感染を惹起し、その後経時的に Total RNA を抽出、GeneChip にて遺伝子発現を網羅的に解析した。また対照として非刺激 A549 および UV 処理した RSV を添加した系を作成し、比較検討した。
3. 臍帯血由来造血幹細胞 (n = 4) と成人末梢血

由来造血幹細胞 (n = 4) を Stem cell factor (SCF) と IL-6 の存在下に 12 週間以上培養し、マスト細胞を得た。一部の細胞ではマクロファージの混入を認めためたために抗 CD117 (c-kit) 抗体を用いて更に純化を行った。結果としてほぼ 100%の純度でマスト細胞を培養し得た。

4. 成人肺癌患者の術中切除肺から、健常と思われる部位を採取し、細切、collagenase 処理して組織を消化した後、抗 CD117 (c-kit) 抗体を用いて肺マスト細胞 (n = 4) を得た。これらの細胞から total RNA を抽出、型のごとく cRNA を作成し GeneChip U133A probe array (Affymetrix)にて解析した。発現に差が認められた一部の遺伝子に関しては RT-PCR で mRNA を、Flow cytometry で蛋白の発現を検討した。

5. 6 週令の雌 BALB/c マウスに精製水に溶解した LPS をネブライザーを用いて霧化し吸入させた。曝露は 48 hr 毎に (30 mL/30 min を 2 回、合計 1 hr) 行ない、慢性の好中球性浸潤モデルを作成した。またこのモデルに対して 1 mg/kg Dexamethasone もしくは 10 mg/kg Theophylline を連日胃内投与して薬剤投与による影響を検討した。

6. LPS 吸入 20 回曝露の 24 hr 後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下、下大動脈より脱血させ肺を摘出した。摘出した肺は RNAlater 中に浸し、4°C にて保存した。摘出肺から型のごとく total RNA を抽出し、Affymetrix の推奨プロトコールに従い cRNA を合成後、GeneChip probe array Mouse Genome 430 2.0 chip を用いて網羅的な遺伝子の発現量解析を行った。また、個々のアレイ間において個体差による影響を削減するため、GeneChip 1 枚につき、n=2 の固体から抽出した RNA をプールして cRNA を合成した。結果は GeneSpring を用いて統計処理を行い、LPS によって誘導された遺伝子群が Dexamethasone もしくは Theophylline 投与によってどの程度影響を受けたかを検討した。

7. ヒト気道上皮細胞 NCI-H292 は ATCC から入手し、添付文書に従い培養した。ムチン産生は Kim らの方法 (Mol Pharmacol. 62:1112-1118, 2002) に従い実施した。NCI-H292 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/well の濃度で播種し、一晚培養した後、2.5, 5, 10 ng/ml の IL-1 $\beta$  または IL-13 を添加した。2, 6, 24 時間培養を行った後、細胞を回収し、定法に従い、mRNA を調製した。ムチン (MUC2, MUC5AC) 及び内部標準 GAPDH の mRNA は、既報と同じプライマーを用い、同条件で PCR を行うことにより増幅し、解析した。

8. 卵白アルブミン (OVA) (50  $\mu$ g/匹) と Imject® Alum の 1 : 1 混合液 0.2mL を BALB/c マウスに腹腔内投与 (Day 0 と 12 の 2 回) することによって感作した。Day22, 26, 30 (プロトコール 1) または Day22, 23, 24 (プロトコール 2) に 1% OVA/saline まは saline (計約 20mL) を 30 分間吸入させることにより気道炎症を惹起した。OVA 最終吸入の 24, 48, 72 時間後に気道過敏性を測定するとともに、測定後に肺胞洗浄液 (BALF) および血清を回収した。BALF については BALF 中の総細胞及び好酸球を計測した。また、血清につい

ては、OVA 特異的 IgE 量を測定した。気道過敏性は、抗原最終吸入 24, 48, 72 時間後に、メサコリンに対する気道収縮反応を BUXCO 社の plesthymo graphs system を用い PenH を測定することにより評価した。

(倫理面への配慮)

1. 臍帯血由来造血幹細胞と成人末梢血由来造血幹細胞の採取、および気管支生検に関しては「臨床試験に関する倫理指針 (平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)」に従い、各医療機関の倫理委員会の許可を得たのち、ボランティア及び患者から文書によるインフォームドコンセントを取得して行われた。倫理的な問題はなかった。

2. 次年度以降も同様に「臨床試験に関する倫理指針 (平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)」を遵守する。

### C. 研究結果

1. 気道上皮細胞株 BEAS-2B を LPS 刺激した場合には有意な遺伝子の発現変化はほとんど認められなかった。一方 PGN 刺激した気道上皮細胞では局所の炎症に係わる分子群 (特に転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化を介する) の強い発現誘導が認められ、グラム陽性球菌感染が気道局所での強い免疫応答と炎症を引き起こす可能性が示唆された。また、PolyIC 刺激では IFN 誘導性の抗ウイルス活性を有する分子群や Th1 細胞や NK 細胞の局所遊走を惹起するケモカインの発現亢進などが認められた。

2. ヒト気道上皮細胞における RSV 感染によって、約 770 種類の mRNA が強く発現誘導された。これらには、Mx1 や IFIT などの I 型 IFN 誘導遺伝子や IL-6, IL-8, RANTES などの炎症性サイトカイン・ケモカインが含まれており、UV-RSV と比較して 24~48 時間以降に強く発現していた。

3. 各マスト細胞に発現する遺伝子を網羅的に解析したところ、臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞が他のマスト細胞と最も大きく異なっていることが明らかとなった。

4. 他のマスト細胞と比較して臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞に強く発現している遺伝子群には MARCKS, KRT1, TIMP2, SERPINA1 や TLR2 など 132 の遺伝子が、また発現が弱い遺伝子群には LTBP3, CDC42BPA, DDO, DICER1 や FCER1A など 428 の遺伝子が含まれていた。

5. TLR2 の mRNA 発現を RT-PCR で、蛋白の発現を FACS で解析し、確かに臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞に TLR2 が強発現していることを確認した。

6. 臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞や成人末梢血造血幹細胞由来マスト細胞を TLR2 の ligand である peptidoglycan (PGN) で刺激、あるいはそれぞれ IgE で感作し、抗 IgE 抗体で刺激した際の上清中のヒスタミンを測定したところ、PGN によるヒスタミン遊離は臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞の方が強く、一方抗 IgE 抗体で刺激した際のヒスタミン遊離は成人末梢血造血幹細胞由来マスト細胞の方が強かった。

7. ヒト気道上皮細胞 NCI-H292 に IL-1 $\beta$  または IL-13 を添加し、ムチン (MUC2, MUC5AC) の mRNA 発現を PCR 法で解析した結果、IL-1 $\beta$  処理により MUC2 の mRNA 量が増加したが (MUC2 の増加のピークは 6 時間後)、MUC5AC の mRNA 増加は殆ど認められなかった (図 2)。一方、IL-13 は、MUC2, MUC5AC の両方の mRNA の発現を増加させ、各々の増加のピークは 6 時間後および 24 時間後であった。尚、内部標準 GAPDH はいずれのサイトカインの処理によっても殆ど影響を受けなかった。

#### 8. マウス喘息モデルの構築

いずれの吸入プロトコールにおいても 1% OVA/saline を吸入により、BALF 中の炎症性細胞数増加が認められた。但し、2つのプロトコールの中では、4 日間隔で暴露するプロトコール 1 の方が総浸潤細胞数、浸潤好酸球数ともに顕著であった。また、プロトコール 1 において、最終抗原曝露後の細胞浸潤は 24 時間後の方が多かった。抗原最終曝露の 24、48 または 72 時間後にメサコリン誘発の気道過敏性を検討した結果、いずれのプロトコールにおいてもメサコリンに対する気道過敏性の亢進が認められたが、プロトコール 1 で惹起し、24 時間後に評価を行った場合が最も気道過敏亢進の程度が顕著であることが明らかになった。また、最終抗原曝露後の血清中抗原特異的 IgE 量の変化を検討した結果、いずれのプロトコールにおいても、曝露後に抗原特異的 IgE 値の増加が認められ、この IgE 増加はプロトコール 1 の方がより顕著であった。

#### D. 考察

1. 気道上皮細胞は細菌感染とウイルス感染で異なった種類の Chemokine を産生して炎症細胞の局所浸潤を誘導し、さらに炎症を増悪させる事によって病態に関与する可能性が示唆された。
2. 気道ウイルス感染による生体防御や気道炎症細胞浸潤の病態に、気道上皮細胞の活性化が深く関与していることが示唆された。
3. ヒト培養マスト細胞はその由来する造血幹細胞によって性質が異なり、特に臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞は肺組織由来マスト細胞や成人末梢血造血幹細胞由来マスト細胞と遺伝子発現でも機能の上でも大きく異なることが明らかとなった。今後ヒト培養マスト細胞を行うに当たってはこれらの差異を考慮した上で結果を考察する必要があると考えられた。
4. 昨年度の本研究では COPD の動物モデルとして我々が構築したマウス LPS 慢性暴露モデルの肺がどの程度ヒト COPD 患者肺を mimic しているかを検討するため、GeneChip を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、LPS 慢性暴露モデルマウスの肺組織中には好中球、単球/マクロファージ、DC、B 細胞及び CD8<sup>+</sup>T 細胞の浸潤を示唆する遺伝子群の誘導が確認され、本モデルはヒト COPD 患者の肺に起きている現象を良く反映しているモデルであることが示唆された。しかし繊維化の原因遺伝子として報告されている数多くのプロテアーゼ及び増殖因子の誘導は弱く、マウス

LPS 慢性暴露モデルは COPD 様病態を形成する前段階を mimic したモデルであることが推測された。

本年度はこのモデルに対して臨床的に抗炎症作用を示す薬剤である Dexamethasone と Theophylline 投与の影響について検索した。その結果、Dexamethasone や Theophylline は各種のケモカイン及びケモカインレセプターの発現だけでなく、Metalloproteinase (特に MMP12) や cathepsin 遺伝子群の発現を抑制することが明らかとなった。

また、これまでにテオフィリンが COPD にどのようにして作用するかについては不明な点が多く残されていたが、今回の検討から Dexamethasone と比して程度は弱いケモカイン及びケモカインレセプターの発現を抑制して薬効を発揮している可能性が示唆された。

気管支喘息におけるリモデリングや COPD における線維化に好酸球が重要な役割を担っていることが知られている (Am J Respir Cell Mol Biol. 17(3):326, 1997)。このリモデリングや線維化に関与する原因分子の役割やその阻害剤の効果を検討する目的で、本年度は、ヒト気道上皮細胞を用いたムチン産生評価系及びマウス喘息モデルを構築した。

ムチンは気道や腸管等に存在する粘液物質であり、50%以上の糖を含む高分子蛋白である (分子量 100-1000 万) (Physiol Rev. 86(1):245-78, 2006)。粘液の過剰産生は気管支喘息や COPD 及び線維症に特徴的に見られる現象であり、この現象はリモデリングの一過程を形成する反応でもある (Curr Opin Pulm Med. 12(1):1, 2006)。ムチンには 12 種の遺伝子が存在するが、杯細胞においては MUC5AC が主要なムチンであり、その発現は健常人よりも気管支喘息患者で増加することが知られている (Am J Respir Crit Care Med. 164(10 Pt 2):S46, 2002)。

今回、Kim らの方法に従い、ヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 を用い、サイトカインによるムチン発現変化を解析した結果、IL-13 により MUC5AC の発現上昇が確認された。一方、IL-1 $\beta$  は、MUC2 の発現を誘導したものの、MUC5AC 発現への影響は軽微であった。気管支喘息においては IL-13 が重要な役割を担っていることが広く知られていることから (Curr Allergy Asthma Rep. 4(2):123-31, 2004)、ムチン産生評価系としては、NCI-H292 細胞を IL-13 で刺激し、MUC5AC の誘導に対する効果を見る系がより適切と考えられた。今後は、MUC5AC を蛋白レベルで定量できる評価系を構築する計画である。

今回さらに、Nagai らの方法 (プロトコール 1) 及び Okumura らの方法 (プロトコール 2) に従ってマウス喘息モデルを構築した。2つの方法の違いは抗原吸入惹起のタイミングである。すなわち、プロトコール 1 では、Day22 より 4 日間隔で 3 回抗原吸入を行うのに対し、プロトコール 2 では Day22 より連日 3 回暴露を行う。両プロトコールにおいて、細胞浸潤、気道過敏性亢進、血中 IgE 値を比較したところ、気道過敏性に関してはプロトコール 1 の方が顕著な亢進を示し、細胞浸潤及

び血中 IgE 上昇については両者で同等であった。以上の結果から、今後、モデルの解析や、喘息関連因子の関与、医薬品候補の評価を行う場合には、プロトコール1の方がより適していると考えられた。

喘息の動物疾患モデルとしては、一般にモルモットを用いたモデルが使用されているが、モルモットでは測定できるサイトカインに限られるなど、限界がある。今回構築したマウス喘息モデルは、この点において極めて有用であると考えられる。

## E. 結論

昨年度確立した気道上皮細胞株を用いた網羅的な遺伝子発現解析の系を用いて、感染が気道上皮細胞に及ぼす影響について網羅的な検索を行った。今後さらに詳細な検討を加える予定である。

また、培養マスト細胞を用いて機能解析や新規薬剤の開発を行う場合、そのマスト細胞の前駆細胞の由来によって結果が異なる可能性が示唆された。

ヒトの COPD 様病態を形成する前段階様のモデルであるマウス LPS 慢性暴露モデルを用いて Dexamethasone と Theophylline 投与の影響を検討し、これらの薬剤で抑制される遺伝子群と抑制されない遺伝子群を同定した。今後臨床的に COPD をステロイド剤の投与で治療を行う場合には、今回の結果を踏まえて、ステロイド剤で抑制されない遺伝子群を抑制するような他の薬剤を同時投与することによってより効率的に抗炎症効果を高めることが期待できる可能性が示唆された。

今後は別の肺繊維化モデルとして知られているブレオマイシン投与による系についても同様の検討を行い、肺繊維化の機序を詳細に検討して行きたいと考えている。

さらに気管支喘息におけるリモデリングや COPD における線維化に関与する分子の機能解析や阻害剤の評価のための、*in vitro* ムチン産生評価系、及び、マウス喘息モデルを構築した。今後、これらの系を用い、リモデリングや線維化の機序を解析するとともに、新規な標的分子の役割を調べていく予定である。

今年度の上記の成果は当初予定していた本研究の達成目標を満たしており、最終年度である次年度以降の更なる成果が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

① Saito H, Abe J, Matsumoto K. Allergy-related genes in microarray: an update review. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:56-9.

② Matsumoto K, Terakawa M, Fukuda S, Kato A, Toki S, Shinohara M, Wakiguchi H, Saito H. CpG oligodeoxynucleotide prolongs eosinophil survival

through activation of contaminating B cells and plasmacytoid dendritic cells *in vitro*. *Int Arch Allergy Immunol* 2006, In Press

③ Inomata N, Tomita H, Ikezawa Z, Saito H.: Differential gene expression profile between cord blood progenitor-derived and adult progenitor-derived human mast cells. *Immunol Lett.* 2005;98(2):265-71.

④ Takeshi Otani, Kenjiro Yamana, Motokazu Kato: Theophylline inhibits mobilization of eosinophil induced by interleukin-5 (IL-5) from femoral bone marrow into the blood. *Eur Respir J* 2005;26:465s.

## 2. 学会発表

① 第 108 回日本小児科学会学術集会(2005 東京)にて「気管支喘息児の非発作時の末梢気道閉塞に関与する因子についての検討」を発表

② 第 17 回日本アレルギー学会春期臨床大会(2005 岡山)「炎症によって気道上皮細胞に誘導される Chemokine や Metalloproteinase の網羅的な解析」を発表

③ 第 17 回アレルギー学会春期臨床大会(岡山、2005 年 6 月 2-4 日)にて「皮膚、肺、扁桃におけるマスト細胞の役割(シンポジウム 5)」を発表

④ American Academy Of Allergy, Asthma And Immunology (AAAAI) 61st Annual Meeting (San Antonio, Texas, March 18-March 22, 2005)にて「Induction of mucin gene expression in human airway epithelial cells by FcεRI-mediated-amphiregulin production from human mast cells」を発表

⑤ 16th Annual Congress of European Respiratory Society (Copenhagen Sep 17-21, 2005)にて「Theophylline inhibits mobilization of eosinophil induced by interleukin-5(IL-5) from femoral bone marrow into the blood.」を発表

⑥ American Academy Of Allergy, Asthma And Immunology (AAAAI) 62nd Annual Meeting (Miami, Florida, March 3-March 7 2006)にて「Gene Expression Profiling of Human Mast Cell Subtypes」を発表

⑦ 第 18 回日本アレルギー学会春期臨床大会(2006 東京)にて「ヒト気道上皮細胞における RSV 感染による遺伝子発現解析」発表予定

## G. 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

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社