

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

## 目 次

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 ……	589
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	脇田隆宇 ……	636
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 ……	656
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 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
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 ……	691
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 ……	707
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 ……	720
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 ……	728
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 ……	740
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 ……	761
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 ……	772
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 ……	783
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 ……	795
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 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
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 ……	836
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 ……	839
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 ……	919
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 ……	939
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 ……	951
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 ……	966

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 …… 979
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 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型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 …… 1021
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 …… 1042
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 …… 1054
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 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

## 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  
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 サイトカインやウイルスで刺激した各種気道上皮細胞や培養各種ヒトマスト細胞、マウス慢性好中球浸潤モデル、マウス肺繊維症モデル、マウス好酸球を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、気管支喘息や COPD の病態に関する分子生物学的機序を検討した。

### 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) 興和創薬株式会社 医薬研究所 山名研司郎
- (3) 第一アスピオファーマ株式会社 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。

実際に3年間の研究期間の間に、1. 各種気道上皮細胞を *in vitro* で各種サイトカインやウイルスなどで刺激した際に発現変動する分子群の網羅的な解析とステロイド剤の添加で抑制されない遺伝子群の探索(主任研究者担当)、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の差の検討と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)、3. 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、およびステロイド剤およびテオフィリンの影響に関する検討、およびプレオマイシン誘導肺繊維症における遺伝子発現の網羅的な解析(興和創薬株式会社医薬研究所担当)4. 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と純化されたマウス好酸球の網羅的な遺伝子発現解析、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* 評価系の構築を行った。(第一アスピオファーマ株式会社担当)

### B. 研究方法

1. 気道上皮細胞株 BEAS-2B を各種 Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) もしくは TNF- $\alpha$  + IL-4 あるいは TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  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。この系に Dexamethasone を添加して影響を解析した。

2. 気道上皮細胞株 A549 を低濃度の TNF- $\alpha$  + IL-4 もしくは TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  で 48 時間 prime した後に未処理 RSV を 1 時間付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. 16 名の気管支喘息患者および 11 名の対照者の肺生検組織を抗 TSLP 抗体と細胞特異的マーカーを認識する抗体で二重染色し、TSLP の発現と細胞局在を検討した。
4. 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。また、成人肺癌患者の術中切除肺から、健全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. 成人末梢血由来造血幹細胞を 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。このマスト細胞を IL-4 の存在下もしくは非存在下にヒト IgE で 24 時間感作し、抗 IgE 抗体で刺激したのち、total RNA および情勢を回収し、TSLP の mRNA およびタンパクの発現を Real-time PCR および ELISA にて測定した。
6. 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。
7. 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。

8. 6 週令の雌性 C57BL/6N マウスを用いた。ブレオマイシン(ブレオ、日本化薬)を生理食塩液で希釈し、0.1mg/25  $\mu$ L の割合でペントバルビタール麻酔したマウスの気道内に投与した。ブレオマイシン投与の、3 日後、7 日後、14 日後或いは 21 日後にマウスをペントバルビタール麻酔して下大動脈より放血した。一部の動物を用いて気道炎症を評価する目的で気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収し、遊走細胞の計数を行った。また別の動物では肺を摘出した後に遺伝子発現解析用に左肺上葉を RNAlater 中に浸して 4°C にて保存し、線維化の生化学指標であるヒドロキシプロリンの測定用に右肺を摘出して -80 度で凍結保存した。遺伝子発現解析用の肺サンプルは total RNA を抽出し、Affymetrix の推奨プロトコールに従って 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。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 の個体から抽出した RNA をプールして cRNA を合成した。

9. マウス好酸球浸潤モデルの作成

BALB/C マウス (雌性、8-10 週齢) に、ブタクサ花粉抽出液を、背部に皮下投与し感作した (Day 0 及び 1 には 0.1mL、また Day 5, 7, 13 には 0.2mL を接種)。Day 19 に、ブタクサ花粉抽出液を腹腔内投与し、腹膜炎誘発を行った。腹膜炎誘発 48-72 時間後に、PBS で腹腔内洗浄し、浸潤細胞を回収し、腹腔内の総細胞のカウントを行った。また同時に、ファーストグリーンを用いて好酸球の染色を行うことにより好酸球の割合を求め、浸潤好酸球数を算出した。

10. 腹腔内浸潤細胞からの好酸球の純化

PBS で腹腔内洗浄し回収した浸潤細胞群から T 細胞、B 細胞および Monocyte 系細胞を除去する目的で、抗 Thy1.2 抗体、及び B220 抗体を用いた MACS BEADS での negative selection を行った。その後さらに好酸球の純度を上げる目的で、抗 CCR3 抗体を用い FACS で sorting を行った。

11. マウス好酸球からの total RNA の抽出と発現遺伝子の網羅的な解析

純化した好酸球を Isogen に溶解し、PCA および RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。total RNA を型のごとく処理して Oligonucleotide Microarray 解析 (GeneChip Mouse Genome 430-2.0 array, Affymetrix) を行った。

12. 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。

(倫理面への配慮)

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。

### 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。一方、サイトカイン刺激では IL-4、IFN- $\gamma$  いずれの刺激においても異なった種類の好中球遊走性の Chemokine が誘導され、IFN 刺激では Th1 細胞遊走性の Chemokine の産生が強く認められた。IFN- $\gamma$  刺激時の Chemokine の産生は Dexamethasone では部分的な抑制しか認められなかった。また IL-4 刺激でより強い Metalloproteinase (MMP) 9 や MMP14 の産生が認められ、Dexamethasone はこれらの MMP の誘導を部分的に抑制した。さらに BEAS-2B を PolyIC および TNF- $\alpha$  + IL-4 刺激した際に非刺激に比して 2 倍以上増加した遺伝子群のうち、TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  刺激では誘導されなかった遺伝子群は 14 probe 認められた。この中には Notch の ligand である Jagged1 が認められた。一方、Jagged1 と逆の作用を有する Deltal の発現制御について検討したところ、Deltal の発現は Th1 環境で発現が誘導されることが見いだされた。

2. 低濃度の TNF- $\alpha$  + IL-4 で 48 時間 prime したヒト気道上皮細胞において RSV 感染によって、強く発現誘導された遺伝子群のうち、TNF- $\alpha$  +

IFN- $\gamma$  prime では誘導されなかった遺伝子群が約 10 probe 見いだされた。これらには、tissue Plasminogen activator や GRO- $\alpha$ 、MCP1 などが含まれていた。これらの分子群は局所における炎症反応を増強するだけでなく、炎症細胞の浸潤などにも強く関わることから、これらの分子群の制御 (たとえば抗体による中和など) が治療の新たな標的となる可能性が示唆された。

3. 気管支喘息患者の肺生検組織中の TSLP 陽性細胞の 90% は Tryptase 陽性細胞 (マスト細胞) であった。また、気管支喘息患者肺中には対照者に比して有意に多くの TSLP 陽性細胞が認められた。さらに血清中 IgE 値は TSLP 陽性細胞数と正の相関が認められた。

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。また、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。

5. 培養マスト細胞を IgE で感作後、抗 IgE 抗体刺激すると TSLP の mRNA 量は非刺激時の約 5 倍程度の増加が認められた。IL-4 の存在下で IgE 感作した場合には約 50 倍の mRNA 発現が認められた。

6. LPS 慢性暴露モデルの肺から RNA を抽出後、遺伝子の発現量を GeneChip を用いて定量し、疾患モデル動物の肺において変動のあった遺伝子を抽出した。Sham 群と比較解析した結果、LPS 慢性暴露により 2 倍以上誘導を受けた遺伝子として 214 genes (270 probe sets) が抽出された。誘導を受けた遺伝子の中にはヒト COPD の患者の肺組織もしくは BALF 中で誘導を受けていることが報告されているケモカイン、プロテアーゼだけでなく、CD 分子、補体、レクチン関連、immunoglobulin 関連、cytoskeleton 関連、転写・複製関連、免疫関連、トランスポーター関連、接着関連及び代謝酵素関連の遺伝子など多彩な遺伝子が存在していることが明らかとなった。

7. プレオマイシンの気道内投与後 3 日目及び 7 日目のマウスから回収された BALF では好中球、リンパ球及びマクロファージの増加が認められ、特に 7 日後の増加が顕著であった。一方 14 日目

及び 21 日目のマウスから回収された BALF では遊走細胞数はそれほど増加しておらず、21 日後の好中球数及びマクロファージ数は無処置動物と同程度であった。

8. エールリッヒ反応で定量した肺のヒドロキシプロリン量はプレオマイシン投与の 3 日後及び 7 日後ではほとんど変化していなかったが、それ以降は増加する傾向が認められ、21 日後の肺ヒドロキシプロリン含量は無処置群と比較して有意に高かった。

9. 遺伝子発現の網羅的解析は  $\beta$  アクチンと GAPDH で標準化した値を基にして行った。

①プレオマイシン投与後に発現量が 2 倍以上となる遺伝子は 3 日後に 209 Probe set、7 日後に 136 Probe set、14 日後に 7 Probe set、21 日目で 72 Probe set 抽出された。またいずれかの時点で増加が検出された Probe set は 280、全ての時点で増加が検出された Probe set は 4 (3 遺伝子) であった。

②それら 3 遺伝子は PLZF、Psrl (ヒトの G-2 and S-phase expressed 1) 及び Osteopontin であった。

③プレオマイシン投与後に発現量が 1/2 以下に低下した遺伝子は 3 日後で 52 Probe set、7 日後で 19 Probe set、14 日後で 6 Probe set、21 日後で 5 Probe set 抽出された。またいずれかの時点で低下が検出された Probe set は 63、全ての時点で低下が検出された Probe set は 1 遺伝子、CLCA3 (ヒトの hCLCA1) だけであった。

10. マウス好酸球の純化

ブタクサ花粉抽出液で感作したマウスの腹腔内に同抗原を投与 48 時間目に浸潤細胞を採取して好酸球を純化した。10 匹のマウスからそれぞれ  $1 \times 10^7$  程度の細胞を回収し、そのうち 8-10% を占める好酸球をほぼ 100% の純度で純化した。結果として  $3 \times 10^6$  および  $4 \times 10^6$  個の好酸球検体を得た。また比較対照として脾細胞  $4 \times 10^6$  個  $\times 2$  検体を得た。

11. total RNA の抽出と Microarray 解析

上記検体からそれぞれ約 76-90 ng の total RNA を抽出した。それぞれの OD 260/280 はすべて 1.99 以上であった。各検体より 10 ng の total RNA を用いて Affymetrix small sample protocol に従い、cRNA を作成し、Mouse Genome 430-2.0 チップに hybridize させた。遺伝子の発現は GeneChip® Operating Software によって数値化し、GeneSpring によって Normalization および clustering 解析を行った。

12. Microarray 解析結果

① Mouse Genome 430-2.0 array で検出可能な 45,101 probe sets のうち 20,615 probe sets について 4 検体いずれかで発現レベルが 100 (Average Difference) 以上もしくは発現が Present であった。  
②これらの遺伝子の内で好酸球 2 検体いずれもが

脾細胞 2 検体いずれもより 2 倍以上発現が高いと判定され、かつ好酸球で発現レベルが 100 以上である遺伝子を検索したところ、555 probe sets が該当する遺伝子であった。

③これらの中にはヒト好酸球で発現が他の細胞に比して亢進していることが報告されている ALOX15 や C3AR、PTGS2、などが含まれていた。

④これまでに報告の無かったサイトカインやケモカインの発現も検出された。

D. 考察

1. 気道上皮細胞は Th1 型の炎症反応 (たとえば COPD や Sarcoidosis) と Th2 型の炎症反応 (気管支喘息) で異なった Chemokine や MMP を産生して病態に関与し、ステロイドはこれらの一部を抑制して薬効を発揮する可能性が示唆された。また、Jagged と Delta という相反する作用をもつ Notch ligand の発現が Th1 および Th2 サイトカインにより reciprocal な制御を受けていたことから、Th1 および Th2 タイプの炎症において気道上皮細胞が Notch シグナルを介し病態に関与している可能性が示唆された。またこのサイトカインによる Notch リガンドの発現変化はステロイドにより影響を受けなかったことからステロイド抵抗性の病態に Notch シグナルが関与している可能性も示唆された。

2. 気道ウイルス感染に対する反応性は宿主によって異なっており、一部の High Risk 児のみが RSV 感染による細気管支炎などの重篤な病態を発症するとされている。今回の検討から、RSV による重症細気管支炎などの病態に、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. ヒト肺マスト細胞は IgE 抗体を介した刺激によって活性化されて TSLP を産生し、気管支喘息の病態に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

4. 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。

5. 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。また、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所、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。

6. プレオマイシン誘導肺繊維症モデルでは、プレオマイシンを投与することによって投与直後から7日後にかけて気道内の遊走細胞、特に好中球が増加したことから、障害惹起直後は好中球優位な気道炎症が発現するものと考えられた。これに引き続いて14日後、21日後と肺のヒドロキシプロリン含量が遅れて増加していたことから、組織の線維化は一連の炎症反応に引き続いて、或いはその収束に伴って形成されてくるものと考えられた。一方で全ての観察時点において発現の増加が観察された遺伝子のうち、PLZF は核内受容体制御タンパクとしてコラーゲン産成への関与が報告されており、また Psrc1 (ヒトの G-2 and S-phase expressed 1) は線維芽細胞の増殖に関与することが報告されている。さらに Osteopontin も線維芽細胞の遊走、接着及び増殖を亢進するサイトカインとして知られている。これらの結果は、線維化の形成過程はすでにプレオマイシンによる障害惹起当初から潜在的に始まっているものの、炎症によってその顕在化が妨げられている可能性を示唆するものかも知れない。最後に全ての観察時点において発現の現象が認められた CLCA3 (hCLCA1) の遺伝子産物は、杯細胞から遊離されるタンパクであることが報告されており、プレオマイシンによる障害惹起直後に認められる減少は気道上皮の脱落に伴う杯細胞の減少に依存した変化である可能性が考えられた。しかしプレオマイシン投与の21日後まで CLCA3 (hCLCA1) の発現減少が持続する生理的意義は今のところ不明である。

7. 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。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、マウス好酸球を高純度に精製する方法を確立した。そしてマウス好酸球に特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、マウスの純化した好酸球に発現し、脾細胞に発現の認められない遺伝子が約400余り見出された。今後はこれらの遺伝子群のヒト好酸球での発現を検討し、その差異について詳しく解析することが必要である。

8. 通常、好酸球を用いた研究は、入手しやすい

健康人の末梢血由来の細胞を用いて行われる。しかしながら、今後、病態に関与する分子の役割やその分子に対する阻害剤の薬理効果を in vivo で検討するためには、動物モデルを用いた試験が必須となる。その意味でもヒトとマウスの好酸球の遺伝子発現や機能の差を明らかにし、動物モデルの可能性と限界を詳細に見極めることは今後の創薬開発に是非とも必要なステップであると考えられる。

9. 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、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、その発現は健康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

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。

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。

#### F. 評価

各種の *in vitro* 実験系を用いた気道上皮細胞、各種ヒトマスト細胞の網羅的な遺伝子発現解析を通じて、ステロイド剤で抑制されない遺伝子群が抽出された。また、マウスの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、およびステロイド剤およびテオフィリンの影響に関する検討、およびブレオマイシン誘導肺繊維症における遺伝子発現の網羅的な解析から COPD に通じる肺繊維症に関連する遺伝子群が抽出された。さらにマウス好酸球浸潤モデルと好酸球の純化

方法が確立され、これまで報告の無かったマウス好酸球の網羅的な遺伝子発現解析が行われ、マウス好酸球に特異的な遺伝子群が見いだされた。さらに気管支喘息患者肺生検組織などを用いた検討も行うことができたことから、研究開始当初の目標をほぼ達成することができたと考えられる。残念ながら知的財産権の出願には至らなかったが、多くの学術論文や学会発表を行うことができた。今後、これらの成果を生かしてさらに新たな制御方法の確立に関しての研究を進めてゆきたいと考えている。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① **Matsumoto K**, Terakawa M, Fukuda S, Kato A, Toki S, Shinohara M, et al. CpG oligodeoxynucleotide prolongs eosinophil survival through activation of contaminating B cells and plasmacytoid dendritic cells *in vitro*. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140 Suppl 1:42-50.
- ② Kato A, Truong-Tran A, Scott A, **Matsumoto K**, Schleimer RP. Airway epithelial cells produce BAFF by an IFN-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 2006; 177:7164-72.
- ③ **Matsumoto K**, Terakawa M, Fukuda S, Saito H. Rapid and strong induction of apoptosis in human eosinophils by anti-CD30 mAb-coated microspheres and phagocytosis by macrophages. *Int Arch Allergy Immunol* 2007 In Press
- ④ Okayama Y, Kagaya S, Yuki K, Arai T, **Saito H**: Roles of the transmembrane domain and the cytoplasmic domain of FcεpsilonRIalpha in immunoglobulin E-mediated up-regulation of surface FcεpsilonRI expression. *Clin Exp Allergy* 2007;37: 451-458.
- ⑤ **Saito H**, Matsumoto K, Okumura S, Kashiwakura J, Oboki K, Yokoi H, Kambe N, Ohta K, Okayama Y: Gene expression profiling of human mast cell subtypes: an *in silico* study. *Allergol Int* 2006;55:173-179.
- ⑥ Yokoi H, Okayama Y, Niyonsaba F, Fujimori M, Enomoto F, Yoshikawa H, Ikeda K, **Saito H**: Comparison of human tonsillar mast cell localization and ultrastructural observations between IgE-mediated allergic and nonallergic donors. *Allergy Asthma Proc* 2006;27:415-421.
- ⑦ Yoshikawa M, Nakajima T, **Matsumoto K**, Okada N, Tsukidate T, Iida M, Otori N, Haruna S, Moriyama H, Imai T, Saito H: TNF-alpha and IL-4 regulate expression of fractalkine (CX3CL1) as a membrane-anchored proadhesive protein and soluble

chemotactic peptide on human fibroblasts. FEBS Lett 2004;561:105-110.

⑧Ogawa K, Itoh M, Miyagawa M, Nagasu T, Sugita Y, Katsunuma T, Akasawa A, **Matsumoto K**, Tsujimoto G, Saito H, Hashida R: Expression of a human SOCS protein, HSOCP-1, in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis. Int Arch Allergy Immunol 2004;134 Suppl 1:2-6.

⑨Nakajima T, Iikura M, Okayama Y, **Matsumoto K**, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H: Identification of granulocyte subtype-selective receptors and ion channels by using a high-density oligonucleotide probe array. J Allergy Clin Immunol 2004;113:528-535.

⑩**Matsumoto K**, Terakawa M, Miura K, Fukuda S, Nakajima T, Saito H: Extremely rapid and intense induction of apoptosis in human eosinophils by anti-CD30 antibody treatment in vitro. J Immunol 2004;172:2186-2193.

⑪Kato A, Ogasawara T, Homma T, Batchelor J, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, **Matsumoto K**: CpG oligodeoxynucleotides directly induce CXCR3 chemokines in human B cells. Biochem Biophys Res Commun 2004;320:1139-1147.

⑫Kato A, Ogasawara T, Homma T, Saito H, **Matsumoto K**: Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN-beta signaling pathway in human monocytes. J Immunol 2004;172:6185-6194.

⑬Homma T, Kato A, Hashimoto N, Batchelor J, Yoshikawa M, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, **Matsumoto K**: Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2004;31:463-469.

⑭Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito H, Okayama Y: FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. J Allergy Clin Immunol 2005;115:272-279.

⑮Saito H, Abe J, **Matsumoto K**: Allergy-related genes in microarray: an update review. J Allergy Clin Immunol 2005;116:56-9.

⑯**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

⑰Inomata 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.

⑱Takeshi 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18回日本アレルギー学会春期臨床大会(2006 東京)「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」口頭発表

②第25回 European Academy of Allergology and Clinical Immunology (2006, Vienna)「Th1/Th2 cytokines reciprocally regulate Delta1/Jagged1 expression in human bronchial epithelial cells in vitro」口頭発表

③第56回日本アレルギー学会総会(2006 東京)「Th1/Th2 サイトカイン prime したヒト培養気道上皮細胞におけるRSV感染による遺伝子発現の検討」口頭発表

④第36回日本免疫学会(2006 大阪)「Th1/Th2 cytokines reciprocally regulate Delta1/Jagged1 expression in human bronchial epithelial cells in vitro」ポスター発表

⑤ American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (2007, San Diego)「Respiratory Syncytial Virus-Induced Gene Expression Profiles in Human Respiratory Epithelial Cells: Effect of pretreatment with Th1/Th2-type cytokines」口頭発表

⑥ American Academy Of Allergy, Asthma And Immunology (AAAAI) 63rd Annual Meeting (San Diego, California, February 22-28 2007)にて「IL-4 Upregulates FcεRI-Mediated TSLP Expression by Human Mast Cells」を発表

⑦第56回日本アレルギー学会:「Chronic LPS exposure induces chronic inflammatory lung injury in the Guinea pigs」を発表

⑧第108回日本小児科学会学術集会(2005 東京)「気管支喘息児の非発作時の末梢気道閉塞に関する因子についての検討」発表

⑨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」発表

⑩第108回日本小児科学会学術集会(2005 東京)「気管支喘息児の非発作時の末梢気道閉塞に関する因子についての検討」発表

⑪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」発表

⑫ 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」発表

⑬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

⑭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

⑮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

⑯ 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

⑰ 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

⑱ 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

⑲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18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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