

200631024A

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

気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究
(H18-免疫-一般-001)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 晶夫

平成19(2007)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究	1
森 晶夫	

II. 分担研究報告書

1. 気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究	12
森 晶夫	

2. 重症難治性喘息の機序解明と臨床分類に基づく治療法の確立に関する研究	20
高橋 清	

3. 平滑筋リモデリング機序の実験的検討	31
庄司俊輔	

4. 気道平滑筋細胞における B7-H2 の発現とその機能解析に関する研究	34
柳原行義	

5. 気道炎症の難治化に果たす好酸球の役割に関する研究	37
藤澤隆夫	

6. 難治性喘息に対する治療法の開発に関する研究	41
相澤久道	

7. ダニ抗原誘発喘息モデルにおける Th2 サイトカインの意義	47
永井博式	

8. 難治性喘息の治療のターゲットとしての増殖因子の検討	51
大田 健	

9. 気管支喘息症の重症度に関連する好酸球関連蛋白の機能とその遺伝子多型	55
烏帽子田 彰	

気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究

主任研究者 森 晶夫

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長

分担研究者

高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター院長） 庄司俊輔（独）国立病院機構福岡病院副院長）
相沢久道（久留米大学医学部第一内科教授） 柳原行義（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長）
藤澤隆夫（独）国立病院機構三重病院臨床研究部長） 大田 健（帝京大学医学部内科教授）
永井博弼（岐阜薬科大学学長） 烏帽子田彰（広島大学公衆衛生学講座教授）

研究協力者

秋山一男（国立病院機構相模原病院臨床研究センター長） 谷口正実（同センター喘息研究室長）
後藤牧子（同センターリサーチレジデント） 橋本知実（同センター流動研究員）
梶山雄一郎（同センター研究生）
石井直人（東北大学大学院医学系研究科生体防御学助教授） 菅村和夫（同教授）
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（同左診療部長）
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） 平野 淳（同左）
金廣有彦（岡山大学医学部歯学部附属病院血液・腫瘍・呼吸器内科） 谷本 安（同左講師）
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（同左大学院生）
野間雪子（国立病院機構三重病院小児科医師） 井上博雅（九州大学大学院胸部疾患研究施設講師）
足立哲也（帝京大学医学部内科学講座講師） 長瀬洋之（同左講師）
稲垣直樹（岐阜薬科大学薬理学講座教授） 田中宏幸（同左助教授）
中村裕之（高知大学医学部医学科環境医学教室教授）

研究要旨

本研究班によって抗原レベル、免疫細胞レベル、好酸球レベル、リモデリング、遺伝子多型の諸要因が解析された結果、1) 重症喘息を特徴づけるT細胞レベルのステロイド抵抗性には、costimulatory signal が関与することが *in vivo* において示され、2) 非アトピー機序の気道閉塞メカニズムの解明は新規喘息治療薬、診断法開発のターゲットとして期待されること、3) Th細胞 IL-9 産生は、気道炎症、喘息病態に関与すること、4) 臨床的に意義のある難治性喘息の新規定を、肺機能や画像、副腎機能などの各種指標を基に作成し、5) ヒト好塩基球は免疫・アレルギー反応の調節作用も担っている可能性があること、6) 気管支平滑筋細胞は肺線維芽細胞の産生するフィブロネクチンの作用で遊走すること、7) ASM 細胞における B7-H2 シグナルは細胞の過形成に重要な役割を果たしていること、8) 難治性喘息では好中球と好酸球の複合した炎症が存在し、これらの相互作用によりステロイド不応性の炎症を形成している可能性があること、9) CLCA 阻害薬は気管支喘息に対する新しい治療薬として有望であること、10) ダニ抗原の気管内反復投与によるアジュバントフリーのリモデリング解析モデルでは、喘息の重症化と関連する病態形成には IL-13 が特に重要であること、11) 喘息難治化に EGFR シグナルが関与していること、12) CCL26 の遺伝子多型 T2563C は喘息難治化と関連すること、が明らかになった。

A. 研究目的

われわれは、厚生科学研究「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」（主任研究者 森 晶夫、平成12～14年）、厚生労働科学研究「気管支喘息の難治化機序の解明と

予防・治療法の開発に関する研究」（同、平成15～17年）において、難治性喘息の今日的診断基準を確立し、現在の我が国における実態、病態、治療内容を把握した。従来は、早期介入の失敗によって長年の間に高度のリモデリングが蓄積された結果、重症・難治

化に到るものと認識されてきたが、われわれの調査では、重症喘息の半数が喘息発症1~2年以内にステロイド依存状態に陥っており、この相当数のサブグループ患者の重症喘息の機序は、発症時から通常の喘息と異なることが示唆された。メカニズムの観点からは、高用量のステロイド使用にかかわらず、高度の炎症反応が持続していることが明らかになり、ステロイドに良好に反応する通常の喘息とは本質的な差異が認められることを報告した。重症・難治化の分子生物学的要因の解明は、予防、治療への突破口と期待される。過去3年間の機序に関する研究成果として、難治化関連要因としては、好酸球過剰活性化、平滑筋細胞を主体とした気道リモデリング、T細胞の細胞性免疫応答の異常を見い出してきたので、重症、難治性喘息症例の炎症細胞(T細胞、好酸球、気道上皮細胞、平滑筋細胞)において、特定できたこれらの細胞表面受容体、シグナル伝達分子、サイトカイン遺伝子転写機構の異常をさらに分子レベルで詳細に解明する。*in vitro*の実験と平行して、わが国のアレルギーモデル研究では最先端に位置する研究グループのマウスモデルにより、*in vivo*でのステロイド低応答性、気道過敏性、リモデリングに関与する責任分子を検証する。加えて、重症化、難治化に結びつく遺伝子多型を複数見出したので、今後、診断法として確立し、早期発見、予知、予防への応用をめざす。喘息を特徴づける好酸球性炎症、粘膜組織リモデリングはアレルギー疾患全般に共通するプロセスであり、喘息の重症化因子が、アレルギー性鼻炎、結膜炎、花粉症など他のアレルギー疾患の慢性化、治療抵抗性因子と共通することは臨床医学的に想定されている。本研究の成果はアレルギー学全般に波及するものと期待される。

B. 方法

1) 森(主任研究者)らは、これまでに指摘してきた costimulatory signal によるステロイド抵抗性を *in vivo* レベルで実証するため、まず Balb/c マウスを OVA で感作し、所属リンパ節より感作リンパ球を回収、*in vitro* での抗原刺激、limiting dilution を行って、OVA 特異的 Th clone を樹立した。Irradiated spleen cell を antigen-presenting cell とし、subcloning、さらに expansion し、細胞移入実験に使用した。5 x 10⁶ 個の Th clone を OX40L (+/+) または (-/-) マウスに尾静脈より注入し (Day 0)、翌日 OVA を経気道的に抗原チャレンジした。さらに 48 hr 後、BUXCO にて気道抵抗を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。Day 1、2 に dexamethasone (DEX) 1、3 mg/kg を皮下投与した。また、気道過敏性原因遺伝

子の一つに同定されている Th2 サイトカイン IL-9 のアレルギー応答性の産生機序を解析した。加えて、*Candida albicans* acid protease (Secreted aspartic proteinase 2: SAP2) に反応して IgE 非依存性に遅発型喘息反応が惹起される非アトピー型喘息症例の末梢血単核球 (PBMC) を、SAP2 と培養し、上清を濃縮、透析後、培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルにアプライした。加えて、アトピー型気管支喘息症例の末梢血単核球 (PBMC) に抗原特異的、非特異的活性化刺激を与え、産生される IL-2、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、IFN-gamma を特異的 sandwich ELISA にて測定し、産生量間、および臨床マーカーとの相関を解析した。アレルギー特異的 T 細胞クローンの IL-9 産生機構を解析した。

2) 高橋(南岡山医療センター)らは、JGL2006 で規定されたステップ1~4(軽症間欠型から最重症持続型まで)に重症度分類された84症例(従来の難治性喘息8例を含む)を対象に、呼吸機能、気管支壁肥厚、副腎皮質機能を検討した。末梢血幹細胞移植目的で採取された末梢血単核球を IL-3 (5 ng/ml) 存在下で3週間培養し、immunomagnetic beads を用いた negative selection により高純度(95%以上)の好塩基球を得、IL-16 の発現、産生を RT-PCR、Flow cytometry、confocal microscopy、Western blotting、ELISA にて検討した。難治例のリンパ球活性化とサイトカインを測定し、気管支平滑筋細胞との相互反応を検討した。

3) 庄司(福岡病院)らは、正常ヒト肺線維芽細胞(米国クロネティクス社)上清の気管支平滑筋細胞に対する遊走活性を48穴ボイデンチャンバーにより測定した。抗フィブロネクチン抗体を用いて肺線維芽細胞培養上清のウエスタンブロッティングを行った。

4) 柳原(相模原病院)らは、培養ヒト気管支平滑筋細胞(ASM)におけるCD40、OX40L、B7 family (B7-1、B7-2、B7-H1、B7-H2、hGL50)発現をFACSで、サイトカイン/ケモカイン産生をELISAで測定した。末梢血T細胞におけるCD40L、ICOS、OX-40発現をFACS解析し、³H-thymidine ラベル活性化T細胞とASM細胞の細胞接着を解析した。

5) 藤澤(三重病院)らは、好中球-好酸球の炎症細胞間相互作用を解析する目的に、末梢血から CD16 negative selection 法により分離した好酸球を好中球由来エラスターゼと反応させ、活性酸素産生量をチトクロムC還元法にて測定した。MIF、IL-8 の遺伝子発現ならびに蛋白量をリアルタイム PCR、特異的 ELISA 法にて定量した。セリンプロテアーゼ阻害薬ならびに特異的好中球エラスターゼ阻害薬による抑制効果を検討した。

6) 相沢(久留米大学)らは、6週齢の A/J マウスに

IL-13を投与してステロイド抵抗性の喘息モデルを作成し、ステロイドに替わる治療法開発の目的に、気道過敏性、気道炎症、気道分泌に対するNiflumic acidの効果を検討した。また、高用量吸入ステロイド+テオフィリンの併用療法でもコントロール不十分な重症喘息患者における、LABA追加投与の有用性と安全性について臨床的検討を行った。

7) 永井(岐阜薬大)らは、吸入麻酔下にマウスの気管内にダニ粗抗原を複数回投与して反応を惹起する、アジュバント free の喘息モデルを樹立し、IL-4、IL-4受容体、IL-5受容体、IL-13欠損マウスにおいて解析した。最終抗原投与48時間後に、アセチルコリンによる気道収縮反応を測定し、右肺は気管支肺胞洗浄(BAL)を、左肺は組織学的検討を行った。

8) 大田(帝京大学内科)らは、難治化病態におけるgrowth factorの関与を明らかにする目的に、A/JマウスをOA+alumで免疫後、14日間連日でOA吸入チャレンジを行い、連日の吸入2時間前に、EGFR阻害薬(AG1478, 10 mg/kg)、PDGFR阻害薬(AG1295, 10 mg/kg)を点鼻投与した。15日目にBALを施行し、肺を摘出し、Hematoxylin-Eosin (HE)、Elastica van Gieson (EVG)、Alcian Blue & Periodic Acid-Schiff (AB-PAS)染色を行った。

9) 烏帽子田(広島大学)らは、難治群としてStep 4を8例、非難治群としてStep 1-2を16例、対照として健常人24例リクルートし患者対照研究を実施した。IL4RA遺伝子 Exon 3 (I50V)、Exon 9 (E375A)、プロモーター領域(C-3223T、T-1914C、T-890C)、CXCR1 (A111G、R27C、R252E)、CCR1 (T947C)、CCR2 (V64I、T860C)、CCR3 (T51C)、CCR5 (R223Q)をシークエンスした。さらに、Eotaxin/CCL11、Eotaxin-2/CCL21、Eotaxin-3/CCL26を加えた。

C. 結果およびD. 考察

1) Th cloneの移入、抗原チャレンジによってOX40L(+/+), (-/-)のいずれにおいても、BALF好酸球増多、気道過敏性の誘導を認めた。DEX 3 mg/kg投与により、OX40L (-/-)においてのみ、有意にBALF好酸球数の低下を認めた(80%)。OX40-OX40L系は、*in vivo*でのステロイド感受性に関与することがはじめて示された。即時型喘息反応を欠く遅发型反応陽性者のPBMC培養上清は、気管平滑筋を収縮せしめたが、陰性者の培養上清には収縮活性が認められなかった。IgE非依存性に惹起される喘息反応に、T細胞由来の液性因子が関与する可能性が示された。抗原非特異的、抗原特異的IL-9産生は、アトピー型成人喘息患者において、健常コントロールに比して有意に亢進していた。IL-9

産生量は、IgE titerと相関するとともに、喀痰中好酸球数とも相関していた。IL-9の気道炎症、喘息病態への関与が明らかになった。

2) 中枢気道の気流制限(PEF値)、肺実質の障害(Residual rate)、気管支壁肥厚(%WA)、血中コーチゾル値等の指標は、軽症間欠型、中等症持続型、重症持続型のうちの治療ステップ4a(経口PSL0~5mg/日未満)の群間に差はなかったが、4b群(5mg以上~10mg未満)、4c群(10mg以上)との間には有意差を認めた。末梢気道(V50/V25)は4bよりも軽症の全群と4c群間に有意差を認めた。経口PSL 5mg/日以上と未満の間に病態的な差を認めたことから、難治の基準を緩めることを提案したい。培養好塩基球にはIL-16 mRNA発現、細胞質内IL-16蛋白の恒常的発現を認め、PMA、calcium ionophore刺激で上清中へのIL-16蛋白の遊離を認めた。ヒト好塩基球はIL-16を産生し、CD4陽性T細胞の浸潤、活性化の増強に寄与することが示唆された。

3) 正常ヒト肺線維芽細胞培養上清には気管支平滑筋細胞の遊走活性が存在し、細胞濃度及び培養時間依存的に上昇した。ウエスタンブロッティングにて、フィブロネクチンのバンドを確認した。気管支平滑筋細胞は肺線維芽細胞より産生・放出されたフィブロネクチンを認識して平滑筋から結合組織へと遊走した後、さらに自らがフィブロネクチンを産生・放出することにより近傍の平滑筋細胞のさらなる遊走を促進する可能性が示唆された。

4) ASM細胞は、CD40、OX40L、B7-H1、B7-H2を構成的に発現していたが、B7-H2 スプライスバリエント(hGL50)、B7-1、B7-2を発現しなかった。活性化T細胞とASM細胞との細胞接着は、抗CD40L抗体、抗OX40抗体、抗ICOS抗体、可溶性B7-H2により強く抑制されたが、抗CD28抗体、可溶性B7-1では抑制されなかった。ICOS、CD40L、OX40刺激はIL-6、IL-8産生を誘導したが、TGF- β 、eotaxinは産生されなかった。ASM細胞の増殖はICOSにより最も強く誘導された。

5) 好中球エラストアーゼは好酸球からの活性酸素産生を濃度依存性に誘導した。MIFはGM-CSFとの24時間培養で産生が誘導されたが、エラストアーゼは明らかな作用を示さなかった。一方、IL-8の遺伝子はエラストアーゼによって発現が誘導された。難治性気管支喘息における好中球性炎症において、好中球の主要なエフェクター分子であるエラストアーゼは、好酸球のエフェクター機能を誘導することで炎症増悪に働く可能性が考えられた。

6) Niflumic acidは気管支喘息におけるIL-13誘導

性の気道過敏性、気道炎症、気道分泌を抑制し、その過程の一部は JAK2/STAT6 系のリン酸化の抑制によるものと考えられた。COX-2 阻害の関与は否定された。高用量吸入ステロイド+テオフィリンを服用している喘息患者において、salmeterol の単回投与はプラセボと比較して FEV1, FVC, PEF を有意に改善させた。12 週間の Salmeterol (Open-label) は、FEV1, FVC, 朝晩の PEF 値を改善し、症状スコア、SABA の使用頻度を減少させた。高用量の吸入ステロイドとテオフィリンの併用療法でもコントロール不十分な喘息患者において、LABA 追加投与は有用かつ安全であると考えられた。

7) ダニ粗抗原をマウスの気管内に頻回投与することにより、気道過敏性、BALF 中好酸球増多、Th2 サイトカイン産生および TGF- β 1 産生の増加、気道上皮および基底膜下でのリモデリング形成が観察された。IL-4 KO マウスでは、基底膜下の線維化形成以外のいずれのパラメーターも、野生型マウスに比し有意な低下が観察された。IL-5 受容体 α 鎖 KO マウスでは、BAL 液中の好酸球は検出されなかったが、その他のパラメーターはいずれも差がなかった。IL-13 KO あるいは IL-4 受容体 α 鎖 KO マウスでは、いずれのパラメーターも有意な低下が観察された。

8) AG1478 は、BALF 好酸球浸潤を有意に抑制し ($p < 0.05$)、炎症細胞浸潤 (HE)、基底膜下肥厚 (EVG)、杯細胞増生 (AB-PAS) についても有意に抑制した。AG1295 は有意な変化をもたらさなかった。EGFR は喘息難治化に深く関与している可能性が示唆された。

9) BA の難治群と非難治群間の相関解析で、難治群における CCL26 T2497C 多型の T と T2563C 多型の C の頻度が、有意に高かった。これらの対立遺伝子の多型頻度は、非難治群と対照群では有意な差は認められなかった。重症化に対する CCR3 と CCL26 の相互作用を調べるために、それぞれの単独での診断感度と特異度を調べた結果、CCR3 の遺伝子多型 T51C は喘息症の発症との関係が、CCL26 の遺伝子多型 T2563C は喘息難治化との関係が示唆された。

E. 結論

本研究班によって抗原レベル、免疫細胞レベル、好酸球レベル、リモデリング、遺伝子多型の諸要因が解析された結果、1) 重症喘息を特徴づける T 細胞レベルのステロイド抵抗性には、costimulatory signal が関与することが *in vivo* において示され、2) 非アトピー機序の気道閉塞メカニズムの解明は新規喘息治療薬、診断法開発のターゲットとして期待されること、3) Th 細胞 IL-9 産生は、気道炎症、喘息病態に

関与すること、4) 臨床的に意義のある難治性喘息の新規定を、肺機能や画像、副腎機能などの各種指標を基に作成し、5) ヒト好塩基球は免疫・アレルギー反応の調節作用も担っている可能性があること、6) 気管支平滑筋細胞は肺線維芽細胞の産生するフィブロネクチンの作用で遊走すること、7) ASM 細胞における B7-H2 シグナルは細胞の過形成に重要な役割を果たしていること、8) 難治性喘息では好中球と好酸球の複合した炎症が存在し、これらの相互作用によりステロイド不応性の炎症を形成している可能性があること、9) CLCA 阻害薬は気管支喘息に対する新しい治療薬として有望であること、10) ダニ抗原の気管内反復投与によるアジュバントフリーのリモデリング解析モデルでは、喘息の重症化と関連する病態形成には IL-13 が特に重要であること、11) 喘息難治化に EGFR シグナルが関与していること、12) CCL26 の遺伝子多型 T2563C は喘息難治化と関連すること、が明らかになった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori, A., Ogawa, K., Kajiyama, Y., and Kaminuma, O. 2006. Th2 cell-mediated chemokine synthesis is involved in allergic airway inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 140:51-54.
- 2) Hashimoto, T., Kobayashi, N., and Mori, A. 2006. IL-12-induced IL-13 production by allergen-specific human helper T cell clones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 140:55-58.
- 3) Kitamura, N., Kitamura, F., Kaminuma, O., Miyatake, S., Tatsumi, H., Nemoto, S., and Mori, A. 2007. IL-4 gene transcription in human T cells is suppressed by T-bet. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 4) Umezu-Goto, M., Kajiyama, Y., Kobayashi, N., and Mori, A. 2007. IL-9 production by peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatics. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 5) Hashimoto, T., Kitamura, N., Kobayashi, N., Kaminuma, O., and Mori, A. 2007. Effect of Formoterol on allergen-induced cytokine synthesis by atopic asthmatics. *Int. Arch.*

- Allergy Immunol.* (in press)
- 6) Kajiyama, Y., Umezu-Goto, M., Kobayashi, N., Takahashi, K., Fukuchi, Y., and Mori, A. 2007. IL-2-induced IL-9 production by allergen-specific human helper T cell clones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
 - 7) 高橋 清 病態、発症機序・定義および治療薬剤の奏功機序等について. アレルギー疾患ガイド —発症から予防・治療まで. 62-74, 2006
 - 8) 高橋 清 成人喘息発症の予防と難治化対策. アレルギー 55 : 10-16, 2006
 - 9) 高橋 清 成人喘息診療の pitfalls. アレルギーの臨床 26 : 501, 2006
 - 10) 平野 淳, 高橋 清 薬剤性喘息患者における喘息治療 —特にアスピリン喘息について—. モダンフィジシャン 26 : 850, 2006
 - 11) 平野 淳, 高橋 清 喫煙と喘息. 臨床と研究 83 : 1679-1682, 2006
 - 12) 高橋 清 重症難治性喘息治療の再検討 —成人—. THE 26th ROKKO CONFERENCE 気管支喘息のよりよい治療のために—Pharmacokinetics, Pharmacodynamics からみた喘息治療の再考— 157-165, 2007
 - 13) 高橋 清 成人喘息の発症・病態におけるLT拮抗薬の役割 —One airway, One disease—. 新居浜市医師会報 590:11415-11419, 2006
 - 14) 高橋 清 成人喘息診療の pitfalls. アレルギーの臨床 26:501, 2006
 - 15) 高橋 清 重症度を規定する因子 社会的要因を含む —成人—. The 24th ROKKO CONFERENCE 喘息の重症度分類の再考 —長期・短期・成人・小児における各臨床症状・治療— 95-101, 2005
 - 16) Hirano A, Kanehiro A, Ono K, Ito W, Yoshida A, Okada C, Nakashima H, Tanimoto Y, Kataoka M, Gelfand EW, Tanimoto M. Pirfenidone modulates airway responsiveness, inflammation, and remodeling after repeated challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 366-77, 2006.
 - 17) Takayama G., Arima K., Kanaji T., Toda S., Tanaka H., Shoji S., McKenzie A. N., Nagai H., Hotokebuchi T., Izuhara K.: Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 98-104, 2006
 - 18) 古賀丈晴、津田 徹、大盛久光、矢野秀樹、渡辺憲太朗、相澤久道、福岡 COPD 研究会 (2006). “肺機能検査実施の動機が異なる 3 集団を対象とした潜在的 COPD の疫学調査.” 呼吸 25 (8).
 - 19) 福地義之助、相澤久道、平田一人、塩谷隆信、東田有智、藤村正樹、中島光好、鈴木謙二、大脇一郎、井尻章悟、植地泰之、永田 傳 (2006). “COPD 患者に対する長時間作動型吸入 β 2 刺激薬キシナホ酸サルメテロールの追加投与の効果—プラセボを対照とした多施設共同二重盲検並行群間比較試験—.” 呼吸 25 (2):186-199.
 - 20) T. Koga, K. F., H. Aizawa (2007). “Effect of smoking on lifestyle interventions to prevent diabetes.” *The Lancet* 369:365.
 - 21) T. Nakano, H. I., S. Fukuyama, K. Matsumoto, M. Matsuyama, M. Tsuda, T. Matsumoto, H. Aizawa, Y. Nakanishi (2006). “Niflumic Acid Suppresses Interleukin-13-induced Asthma Phenotypes.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (11):1216-1221.
 - 22) 戸田玲子、相澤久道 (2007). “喘息と末梢気道病変.” 呼吸と循環 55 (2):187-192.
 - 23) 相澤久道 (2007). “呼吸機能検査—日常診療で簡単に行えるスパイロメトリー、フローボリューム曲線.” 呼吸と循環 55 (1):97-104.
 - 24) 相澤久道 (2007). “気管支拡張薬.” 呼吸器疾患 最新の治療 2007-2009:82-85.
 - 25) 岡元昌樹、相澤久道 (2006). “喘息発作時の対応.” 臨床と研究 83 (11):17-21.
 - 26) 岩永知秋、相澤久道 (2006). “呼吸器疾患の問診ポイント—自覚症状.” 呼吸と循環 54 (8):875-880.
 - 27) 星野友昭、北里裕彦、今岡治樹、木下 隆、加藤誠也、渡辺健太朗、相澤久道 (2006). “COPD における炎症と新しい治療薬.” 呼吸と循環 54 (3):235-240.
 - 28) 川山智隆、相澤久道 (2006). “呼気凝縮液.” 呼吸と循環 54 (6):599-606.
 - 29) 川山智隆、南方良章、津田 徹、木下正治、松永和人、山縣俊之、一ノ瀬正和、相澤久道 (2006). “日本人を対象とした COPD 質問票の有用性についての検討.” 呼吸 25 (11):1083-1086.
 - 30) 川山智隆、木下 隆、相澤久道 (2006). “抗コリン薬.” COPD FRONTIER 5 (4):58-66.
 - 31) 相澤久道 (2006). “抗コリン薬.” 日本胸部臨床 65 (4):356-362.

- 32) 相澤久道 (2006). "COPDの疫学." *Mebio* 23 (5):32-47.
- 33) 相澤久道 (2006). "病診連携を踏まえた COPD 治療と Tiotropium の位置づけ." *Progress in Medicine* 26 (5):126-129.
- 34) 相澤久道 (2006). "ロイコトリエン B4." *喘息* 19 (3):41-45.
- 35) 相澤久道、野田和人 (2006). "COPD 患者の外来治療・管理のコツとポイント." *Medical Practice* 23 (6):1021-1030.
- 36) 相澤久道、野田和人 (2006). "ICS/LABA 合剤の効果とその機序." *呼吸と循環* 54 (7):745-750.
- 37) 相澤久道 (2006). "各種薬剤の副作用とその予防対策- 喘息治療薬." *臨床と研究* 83 (9):47-52.
- 38) 相澤久道 (2006). "プライマリケアのための喘息、COPD、アレルギー性鼻炎の診療指針の要点 - IPAG ハンドブック - ." *日本医事新報* (4296):53-63.
- 39) 相澤久道 (2006). "呼吸器疾患患者の海外旅行注意点." *成人病と生活習慣病* 36(8):837-840.
- 40) 相澤久道 (2006). "呼吸器疾患の問診のポイント- 質問票の利用." *呼吸と循環* 54 (10):1111-1116.
- 41) 相澤久道 (2006). "ガイドラインによる診断の実際." *総合臨床* 55(10):2445-2449.
- 42) 相澤久道 (2006). "慢性呼吸器疾患へのプライマリケアのアプローチ IPAG ハンドブックに基づく診断手順." *Medical ASAHI* 35 (10):53-55.
- 43) 相澤久道 (2006). "プライマリケアのための喘息、COPD、アレルギー性鼻炎の診療指針の要点 - IPAG ハンドブック - ." *日本医事新報* (4296):53-63.
- 44) 相澤久道 (2006). "最新の薬物療法." *日本胸部臨床* 65(12):1090-1098.
- 45) 濱田美奈子、相澤久道 (2006). "気道炎症とリモデリングの評価- その臨床的意義 - ." *Medical Practice* 23(2):251-253.
- 46) T. Koga, A. K., H. Aizawa (2006). "Physical activity and cardiovascular risk in children." *Lancet* 368:1326-1327.
- 47) 松井大作、北里裕彦、本多靖洋、上野敬子、田中篤利、枝國信貴、向野達也、西村宗胤、川山智隆、星野友昭、藤本公則、古賀丈晴、相澤久道 (2007). "器質化肺炎様の多発斑状影を呈した *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による細菌性肺炎の 1 例." *日本呼吸器学会雑誌* 45(1):36-42.
- 48) 吉田有吾、一木昌郎、田口和仁、南 秀和、今井伸恵、古賀英之、相澤久道 (2006). "中縦隔の Carcinoma with sarcomatoid elements の 1 剖検例." *日本呼吸器学会雑誌* 44(7):499-503.
- 49) 上村知子、相澤久道 (2006). "気管・気管支結核を合併した難治性喘息の一例." *International Review of Asthma* 8(1):90-96.
- 50) 上野敬子、川山智隆、枝國信貴、古賀丈晴、相澤久道 (2006). "*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による膿胸の 1 例." *感染症学会誌* 80(5):527-530.
- 51) 森松嘉孝、尾上陽子、日高道弘、猿渡功一、相澤久道 (2006). "同種造血幹細胞移植後の慢性呼吸不全に対し、プルモケアが有用であった症例." *Nutrition Support Journal* 7(2):32-33.
- 52) 川山智隆、今岡治樹、相澤久道 (2006). "ハイドロフルオロアルカン- プロピオン酸ベクロメタゾンの吸入療法が著効した気管支喘息の 1 例." *クリニカル プラクティス* 25(9):99-102.
- 53) 田尻守弘、森松嘉孝、相澤久道 (2006). "肺癌化学療法時の制吐管理が塩酸グラニセトロンよりも塩酸ラモセトロンの方が有効であった 1 例." *癌の臨床* 52(2):71-75.
- 54) H. Maruoka, T. K., Y. Jinnouchi, S. Honda, M. Takeo, K. Yuge, T. Fukuda and H. Aizawa (2006). "A refractory case of dermatomyositis complicated with multiple brain abscesses." *Asia Pacific League of Associations for Rheumatology* 9:275-277.
- 55) M. NAGAFUCHI, T. K., K. TAGUCHI, Y. NAGAFUCHI, M. HANADA, A. TAKAGI, H. MIZOTE AND H. AIZAWA (2006). "A Young Adult Patient with Septic Pulmonary Emboli of Undetermined Origin." *Kurume Medical Journal* 53(3,4):99-101.
- 56) T. KOGA, K. U., M. KAGE, M. ICHIKI, T. KITAJIMA, Y. NARITA, Y. MIZOGUCHI, M. HANADA, R. EHARA, M. NISHIMURA, S. TAKAMORI AND H. AIZAWA (2006). "Pulmonary Metastasis of Endometrial Stromal Sarcoma." *Kurume Medical Journal* 53(3,4):95-97.
- 57) Y. Morimatu, N. A., H. Akiyoshi, T. Kawazu, Y. Okabe and H. Aizawa (2006). "A FAMILIAL

- CASE OF VISCERAL LARVA MIGRANS AFTER
INGESTION OF RAW CHICKEN LIVERS: APPEARANCE
OF SPECIFIC ANTIBODY IN BRONCHOALVEOLAR
LAVAGE FLUID OF THE PATIENTS." *Am. J. Trop
Med. Hyg.* 75(2):303-306.
- 58) 大下祐一、相澤久道 (2006). "かぜ症候群、急性上気道炎." *内科外来診療実践ガイド*: 415-417.
- 59) 相澤久道 (2006). "閉塞性疾患- 気管支炎." *臨床病態学* 1: 300.
- 60) 加地正英、相澤久道 (2006). "インフルエンザ." *内科外来診療実践ガイド*: 418-421
- 61) 柳原行義: IgE 産生の分子機構. *アレルギー科* 21, 524-532, 2006.
- 62) 柳原行義: IgE 産生の分子機構. *アレルギー* 55, 522-527, 2006.
- 63) 柳原行義: アトピー患者における IgE 抗体産生とその調節. *臨床アレルギー学* 印刷中
- 64) Yanagihara Y: Regulatory mechanisms of IgE synthesis by human B cells. *Clin. Exp. Allergy Rev.* 6, 101-105, 2006.
- 65) Tsurikisawa N, Morita S, Tsuburai T, Oshikata C, Ono E, Taniguchi M, Saito H, Yanagihara Y, Akiyama K: Familial Churg-Strauss syndrome in two sisters. *Chest* 131, 592-594, 2007.
- 66) 藤澤隆夫: シスチニルロイコトリエンによる好酸球からの TGF- β 産生誘導炎症と免疫 *14(1):25-30, 2006*
- 67) 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
- 68) 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
- 69) 藤澤隆夫: 乳幼児のケモカイン-アレルギー疾患発症メカニズムとのかかわり *アレルギー科* 21(6):612-616, 2006
- 70) 藤澤隆夫: 免疫調節細胞としての好酸球 *臨床免疫* 45(6):607-613, 2006
- 71) 藤澤隆夫: 好酸球の 2 つの側面: アレルギー性炎症のエフェクター・レギュレーター *皮膚アレルギーフロンティア* 4:7-12, 2006
- 72) 藤澤隆夫: 小児アレルギー学の新しい展開 好酸球研究の進歩 *小児科臨床* 59:1215-1222, 2006
- 73) 藤澤隆夫: 気管支喘息における好酸球性炎症: その再評価 *日本内科学会雑誌* 95(8):1564-1571, 2006
- 74) 藤澤隆夫: 好酸球研究アップデート 耳鼻免疫アレルギー 24(3):11-18, 2006
- 75) Tamaki K, Kakinuma T, Saeki H, Horikawa T, Kataoka Y, Fujisawa T, et al. Serum levels of CCL17/TARC in various skin diseases. *J Dermatol* 2006; 33:300-2.
- 76) Yamashita N et al. Role of CCL21 and CCL19 in allergic inflammation in the OA-specific murine asthmatic model. *JACI* 117: 1040-6, 2006.
- 77) Yamashita N et al. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyper-responsiveness. *AJPLCMP* 290: L1045-51, 2006.
- 78) Kawakami Y, Inagaki N, Salek-Ardakani S, Kitaura J, Tanaka H, Nagao K, Kawakami Y, Xiao W, Nagai H, Croft M, Kawakami T. Regulation of dendritic cell maturation and function by Bruton's Tyrosine Kinase via IL-10 and Stat3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 153-158.
- 79) Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, McKenzie AN, Nagai H, Hotokebuchi T, Izuhara K. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118: 98-104.
- 80) Okamoto N, Murata T, Tamai H, Tanaka H, Nagai H. Effects of a tocopherol and probucol supplements on allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 141: 172-180.
- 81) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: 気道リモデリングと好酸球-マウスモデルを用いた検討一. *炎症と免疫* 14; 31-37: 2006.
- 82) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: マウス喘息モデルによる気道リモデリングの解析. *アレルギー科* 21; 542-548: 2006.
- 83) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: 喘息とトロノキサン A₂. *喘息* 19; 35-40: 2006.
- 84) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: 脂質メディエーターと気管支喘息. *呼吸* 25; 944-949:

2006.

- 85) Nakamura H, Higashikawa F, Nobukuni Y, Miyagawa K, Endo T, Imai T, Hatta K, Ozasa K, Motohashi Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Ogino K, Akimaru K, Eboshida A. Genotypes and Haplotypes of CCR2 and CCR3 Genes in Japanese Cedar Pollinosisnt Arch Allergy Immunol., 142, 329-334 (2006).
- 86) Matsuzaki I, Sagara T, Ohshita Y, Nagase H, Ogino K, Eboshida A, Sasahara S, Nakamura H Psychological factors including sense of coherence and some lifestyles are related to General Health Questionnaire-12 (GHQ-12) in elderly workers in Japan Environ Health Prev Med, 12(2) , 21-27 (2007)
- 87) Eboshida A, Kuno S, Kawaguchi T, Kakehashi M, Kobayashi T, Kimura T, Kuroiwa S, Moriwaki M, Hayashida K, Nakamura H, Yasutake S, Araki Y, Yamaguchi N, Nobukuni Y, Sone T Examination and speculation regarding policy and strategies for health promotion in the local community in Japan Int J Sport Health Sci, 4, 1-8 (2006).
- 88) Eboshida A, Sone T, Kuno S, Nakamura H, Hatono Y, Takemura S, Umeno H, Araki Y Health promotion policies and programs in various countries Int J Sport Health Sci. 4, 402-413 (2006).

2. 学会発表

- 1) 森 晶夫, 梶山雄一郎, 谷口正実, 大友 守, 前田裕二, 長谷川眞紀, 秋山一男: 難治性喘息の成因とそのフェノタイプ, 第46回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム8「難治性喘息の成因と治療」 J. Jap. Respir. Soc. 44 : 40, 2006. 6. 3 (東京)
- 2) 森 晶夫, 梶山雄一郎, 前田裕二, 谷口正実, 大友 守, 長谷川眞紀, 秋山一男, 神沼修: T細胞サイトカイン産生制御と気道好酸球浸潤、過敏性の関連, 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : S2-5, 2006. 11. 2 (東京)
- 3) 森 晶夫, 前田裕二, 谷口正実, 大友 守, 長谷川眞紀, 秋山一男: 非アトピー型喘息の発症機序—非IgE依存性遅発型喘息反応, The 14th Symposium of Asthma in Tokyo, 抄録集 p. 5, 2006. 12. 16 (東京)
- 4) 小野恵美子, 谷口正実, 三田晴久, 押方智也子, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 秋山一男: アナフィラキシー症状の際の尿中ロイコトリエンE4濃度, 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:443, 2006 (東京)
- 5) 押方智也子, 谷口正実, 小野恵美子, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 三富弘之, 中村万理, 小倉高志, 秋山一男: ステロイドとシクロフォスファミド抵抗性の著明な上腸間膜動脈狭窄を呈したChurg-Strauss症候群の一部検例, 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:443, 2006 (東京)
- 6) 小野恵美子, 前田裕二, 押方智也子, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 谷口正実, 大友 守, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 松野 治, 宮崎英士, 熊本俊秀, 朝比奈昭彦, 石井豊太, 秋山一男: 植物由来食品によるアレルギー症例の検討, 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:470, 2006 (東京)
- 7) 小野恵美子, 前田裕二, 押方智也子, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 谷口正実, 大友 守, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 朝比奈昭彦, 石井豊太, 秋山一男: 植物由来食品によるアナフィラキシー症例の検討, 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:471, 2006 (東京)
- 8) 谷口正実, 東 憲孝, 三田晴久, 伊藤伊津子, 押方智也子, 小野恵美子, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 東 愛, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 秋山一男: アスピリン喘息患者における自然発作時の尿中ロイコトリエンE4濃度, 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:475, 2006 (東京)
- 9) 押方智也子, 谷口正実, 小野恵美子, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 秋山一男: 高齢発症非喫煙喘息患者の臨床像, 第46回日本呼吸器学会学術講演会 44 : 286, 2006 (東京)
- 10) 谷口正実, 小野恵美子, 押方智也子, 山本一博, 石井豊太, 谷本英則, 福富友馬, 関谷潔史, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 三田晴久, 秋山一男: 喘息患者において鼻ポリープを治療すると尿中ロイコトリエンE4濃度は低下する, 第57回臨床アレルギー研究会、アレルギーの臨床 26:1068, 2006 (東京)

- 11) 後藤牧子、梶山雄一郎、森 晶夫：喘息症例の末梢血 T 細胞における IL-9 産生 1、アレルギー好酸球研究会 2006 抄録集 p. 27、2006. 6. 24 (東京)
- 12) 梶山裕一郎、後藤牧子、森 晶夫：喘息症例の末梢血 T 細胞における IL-9 産生 2、アレルギー好酸球研究会 2006 抄録集 p. 28、2006. 6. 24 (東京)
- 13) 北村紀子、橋本知実、森 晶夫、神沼修： β 2 作動薬による T 細胞サイトカイン産生制御、アレルギー好酸球研究会 2006 抄録集 p. 30、2006. 6. 24 (東京)
- 14) 神沼修、北村紀子、森 晶夫：ヒト Th1/Th2 分化における T-bet の機能、アレルギー好酸球研究会 2006 抄録集 p. 11、2006. 6. 24 (東京)
- 15) 神沼修、北村ふじ子、北村紀子、巽英樹、根本壮一、廣井隆親、森 晶夫、宮武昌一郎：アレルギー患者における Th2 シフトに対する特異的転写因子の役割、第 5 6 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : MS6-6, 2006 (東京)
- 16) 小野恵美子、谷口正実、東 憲考、東 愛、谷本英則、福富友馬、押方智也子、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、伊藤伊津子、三田晴久、秋山一男：アナフィラキシー患者における尿中ロイコトリエン E4 とプロスタグランジン D2 代謝産物、第 5 6 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : 78, 2006 (東京)
- 17) 福富友馬、前田裕二、谷本英則、押方智也子、小野恵美子、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、谷口正実、大友 守、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：当院における抗原吸入気道誘発試験の検討、第 5 6 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : 228, 2006 (東京)
- 18) 小野恵美子、前田裕二、谷本英則、福富友馬、押方智也子、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、森 晶夫、長谷川眞紀、三田晴久、秋山一男：夏型過敏性肺臓炎の家族内発症例についての検討、第 5 6 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : 252, 2006 (東京)
- 19) 谷本英則、谷口正実、関谷潔史、押方智也子、福富友馬、小野恵美子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：高容量 ICS や β 刺激薬の吸入で肺機能が改善しない重症喘息例—モデリングといえるのか、第 5 6 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : 272, 2006 (東京)
- 20) 前田裕二、小野恵美子、福富友馬、谷本英則、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：花粉および果物等植物由来食物抗原とハンノキ花粉との RAST 値の相関について、第 5 6 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : 296, 2006 (東京)
- 21) 谷口正実、東 憲考、小野恵美子、東 愛、谷本英則、福富友馬、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、伊藤伊津子、三田晴久、秋山一男：アスピリン不耐皮疹には少なくとも 2 つの病型がある—ロイコトリエン過剰産生型と非過剰産生型の提唱、第 5 6 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : 430, 2006 (東京)
- 22) 関谷潔史、谷口正実、東 憲考、東 愛、谷本英則、福富友馬、小野恵美子、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、伊藤伊津子、三田晴久、秋山一男：非アスピリン喘息では、アスピリン投与後に尿中ロイコトリエン E4 濃度は低下する、第 5 6 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : 431, 2006 (東京)
- 23) Kitamura N, Nagakubo D, Ogawa K, Kaminuma O, Hiroi T, Yoshie O, Mori A : Multiple chemokines are required for T cell-mediated lung inflammation、2006 日本免疫学会総会・学術集会記録 第 36 巻 : 77, 2006 (大阪)
- 24) 谷本 安、高橋 清、齋藤勝剛、佐藤利雄、名部誠、岸本卓巳、江田良輔、谷本光音：気管支喘息の成人発症に関与する因子の検討。第 46 回日本呼吸器学会学術講演会、2006. 6, 東京
- 25) 佐久川 亮、谷本 安、井上由佳理、尾形佳子、須崎規之、齋藤博久、谷本光音：ヒト培養好塩基球における Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の産生・遊離についての検討。第 46 回日本呼吸器学会学術講演会、2006. 6, 東京
- 26) 谷本 安、岡田千春、宗田 良、高橋 清、谷本光音：シンポジウム 2 小児から成人へのアレルギー疾患移行とその阻止 小児から成人へのアレルギー疾患の移行とその阻止—内科の立場から—。第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2006. 5, 東京
- 27) 高橋 清 ガイドラインの到達点と今後の展望—ガイドラインに求められるもの—。第 18 回日

- 本アレルギー学会春季臨床大会, 2006. 5, 東京
- 28) 岡田千春, 平野 淳, 木村五郎, 宗田 良, 高橋 清 各世代での喘息症状にどう対応するか—高齢者—. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2006. 5, 東京
 - 29) 高橋 清 重症難治性喘息治療の再検討 —成人—. 第 26 回六甲カンファレンス, 2006. 8, 京都
 - 30) 谷本 安, 高尾和志, 須崎規之, 佐久川 亮, 濱田 昇, 高橋 清, 谷本光音 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, 2005. 6, 岡山
 - 31) 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, 2005. 6, 岡山
 - 32) 平野 淳, 木村五郎, 岡田千春, 谷本 安, 金廣有彦, 宗田 良, 高橋 清 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, 2005. 6, 岡山
 - 33) Hirano A, Kanehiro A, Ito W, Ono K, Okada C, Takahashi K, Tanimoto Y, Kataoka M, Gelfand EW, Tanimoto M Pirfenidone modulates allergen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling. American Thoracic Society 2006 International Conference, 2006. 5, San Diego
 - 34) Takahashi K, Okada C, Kimura G, Hirano A, Soda R, Tanimoto Y, Kanehiro A, Tanimoto M The characteristics and problem of elderly asthmatic patients in Japan. 16th European Respiratory Society Annual Congress 2006. 9, Munich
 - 35) Tanimoto Y, Suzaki N, Sakugawa M, Ogata Y, Inoue Y, Hamada N, Takahashi K, Tanimoto M. Expression of cysteinyl leukotriene 1 receptor in peripheral blood stem cell-derived human basophils. 16th European Respiratory Society Annual Congress 2006. 9, Munich
 - 36) Inoue Y, Tanimoto Y, Sakugawa M, Ogata Y, Suzaki N, Matsumoto K, Saito H, Tanimoto M. Expression of cysteinyl leukotriene 1 receptor in peripheral blood stem cell-derived human basophils. 16th European Respiratory Society Annual Congress 2006. 9, Munich
 - 37) Sakugawa M, Tanimoto Y, Nakajima T, Suzaki N, Inoue Y, Ogata Y, Saito H, Tanimoto M. Expression and secretion of macrophage colony-stimulating factor by peripheral blood stem cell-derived human basophils. 16th European Respiratory Society Annual Congress 2006. 9, Munich
 - 38) 庄司俊輔 気管支喘息のリモデリングにおける気管支平滑筋細胞遊走の寄与第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2006 年 11 月)
 - 39) Shoji S. Chemotactic migration of bronchial smooth muscle cells to fibronectin for the process of airway remodeling in asthma 第 38 回日本結合組織学会学術大会 (2006 年 5 月)
 - 40) Shoji S. Smooth muscle cell migration induced by production of fibronectin and matrix metalloproteinases for the process of airway remodeling in asthma 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006 年 6 月)
 - 41) 森嶋大貴, 梶原景一, 稲葉奈緒美, 大路バク, 秋山一男, 柳原行義. 気道平滑筋細胞における B7-1/2 の発現とその機能解析. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2006.
 - 42) 梶原景一, 生澤公一, 森嶋大貴, 稲葉奈緒美, 品澤美樹, 秋山一男, 柳原行義. Anisomycin による IgE クラススイッチの誘導活性についての検討. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2006.
 - 43) 田知本寛, 小俣貴嗣, 佐藤さくら, 柳原行義, 海老澤元宏. TLR-3 刺激は FcεRI を介したマスト細胞の MIP-1α産生を増強する. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2006.
 - 44) 藤澤隆夫 イブニングシンポジウム「気管支喘息治療における併用療法の展望」小児科の立場から 第 46 回日本呼吸器学会学術講演会 2006. 6. 2 (東京)
 - 45) 藤澤隆夫 シンポジウム「好酸球:基礎と臨床のアップデート」好酸球性炎症の臨床 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2006. 11. 2-4 (東京)
 - 46) 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
- 47) 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
- 48) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博式：マウス喘息モデルを用いた気道リモデリング発症機序の解析。第56回日本アレルギー学会総会 イブニングシンポジウム8 (2006年11月、東京)
- 49) 橋本未樹子、田中宏幸、高橋 剛、若原恵子、那須礼史、広瀬 泉、高津聖志、稲垣直樹、永井博式：ダニ抗原誘発マウス気道炎症におけるTh2 サイトカインの意義 (1)。第56回日本アレルギー学会総会 一般演題385 (2006年11月、東京)
- 50) 三好康介、田中宏幸、高橋 剛、若原恵子、那須礼史、広瀬 泉、出原賢治、McKenzie ANJ、稲垣直樹、永井博式：ダニ抗原誘発マウス気道炎症におけるTh2 サイトカインの意義 (2)。第56回日本アレルギー学会総会 一般演題386 (2006年11月、東京)
- 51) Tanaka H：House dust mite-induced airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling in mice. 第56回日本アレルギー学会総会 Young Seminar 4 (2006年11月、東京)
- 52) 明石真幸、大矢幸弘、小嶋なみ子、二村昌樹、斎藤暁美、青田明子、井上徳浩、秋山一男、高橋清、中川武正、小林章雄、鳥帽子田彰、中村裕之、小田嶋博、足立雄一、赤澤晃 全国小中学生におけるアレルギー疾患有症率の現状 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、2006年5月30日-6月1日、東京
- 53) 斎藤暁美、青田明子、大矢幸弘、小嶋なみ子、明石真幸、二村昌樹、井上徳浩、秋山一男、高橋清、中川武正、小林章雄、鳥帽子田彰、中村裕之、小田嶋博、足立雄一、赤澤晃 電話法による全国全年齢階級別気管支喘息有症率調査 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 2006年5月30日-6月1日、東京
- 54) 二村昌樹、大矢幸弘、小嶋なみ子、明石真幸、青田明子、斎藤暁美、井上徳浩、秋山一男、高橋清、中川武正、小田嶋博、小林章雄、鳥帽子田彰、中村裕之、足立雄一、赤澤晃 アンケート調査によるアレルギー疾患有症率とペット飼育歴についての検討 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、2006年5月30日-6月1日、東京
- 55) 小嶋なみ子、大矢幸弘、二村昌樹、明石真幸、青田明子、斎藤暁美、秋山一男、高橋清、中川武正、小田嶋博、小林章雄、鳥帽子田彰、中村裕之、足立雄一、赤澤晃 小児のアレルギー疾患別QOL調査 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、2006年5月30日-6月1日、東京
- 56) 二村昌樹、大矢幸弘、小嶋なみ子、明石真幸、青田明子、斎藤暁美、井上徳浩、秋山一男、高橋清、中川武正、小田嶋博、小林章雄、鳥帽子田彰、中村裕之、足立雄一、赤澤晃 気管支喘息の屋内水泳歴と症状の関係についての検討 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会、2006年11月2-4日、東京
- 57) 中村裕之、秋丸国広、張達川、弘田量二、中村剛、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、鳥帽子田彰 スギ花粉症におけるMCP-1(monocyte chemoattractant protein 1, CCL2)の遺伝子多型ハプロタイプに関する相関解析 第4回日本予防医学会、2006年12月1-2日、さいたま
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究

主任研究者 森 晶夫（独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター先端技術開発研究部長）

研究協力者

秋山一男（国立病院機構相模原病院臨床研究センター長） 谷口正実（同センター喘息研究室長）
後藤牧子（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センターリサーチレジデント
北村紀子（同センター研究員） 橋本知実（同センター流動研究員）
梶山雄一郎（同センター研究生） 石井直人（東北大学大学院医学系研究科生体防御学助教授）
菅村和夫（同教授）

研究要旨

これまでのわれわれの調査研究の成果として、難治性喘息症例では高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない現状が確認された。重症喘息でのステロイド薬効果不全のメカニズムを解明し、ステロイド感受性、ステロイド薬本来の薬効を回復することは重症症例群に対する治療効果を格段に向上させるための鍵である。喘息重症難治化の機序のひとつに、*in vivo*のT細胞レベルでステロイド抵抗性を確認している。T細胞のステロイド抵抗性は、microenvironment中のcostimulatory signal およびサイトカインによって誘導される。本年度は、CD40L ノックアウトマウスを用いて、*in vivo*でステロイド感受性の変化を証明した。さらに、重症喘息の大部分を占める非アトピー型喘息の気道収縮メカニズムを明らかにするため、*in vitro*のヒト気管支平滑筋収縮モデルを確立し、characterizationを行った。IL-9は気道過敏性の原因遺伝子にあげられる重要なTh2サイトカインであるが、その産生メカニズムにつきクローン化ヒトT細胞を用いてはじめて解析した。

A. 研究目的

Th2型サイトカインが喘息病態に関与することが明らかになっている。IL-9はT細胞、マスト細胞の増殖因子として同定された分子であるが、気道過敏性の候補遺伝子とされ、IL-9を気管支粘膜に過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、血清IgE上昇、気道過敏性亢進など喘息の特徴がみられること、喘息患者の気管支粘膜生検中のIL-9 mRNAレベルが健常人に比べて上昇していること、抗原チャレンジで喘息患者のBALF中のIL-9レベルが上昇することなど、喘息における役割が集積されつつある。われわれが確立したIL-9測定系を用いて、アトピー型喘息患者のIL-9産生について解析を行った。

重症喘息の克服へ向け、ステロイド抵抗性の機序解明と制御法の開発を目指した。これまでの研究成果からは、高用量のステロイド薬投与にもかかわらず、気道粘膜の好酸球性炎症が持続する分子的基盤として、costimulatory signalによるT細胞レベルでのステロイド感受性低下を明らかにしてきた。今年度は、さらに*in vivo*レベルでcostimulatory

signalとステロイド感受性の関連を明らかにする目的に、T細胞上のcostimulatory signal分子OX40につき、そのリガンドOX40Lのノックアウトマウスを用いた喘息モデルにおいてステロイド薬の効果を解析した。

過去に実施した症例登録調査の結果から、我が国の重症喘息の8割以上が非アトピー型喘息であることを明らかにしているが、非IgE依存性の気道閉塞機序については未だ明らかでない。そこで、T細胞依存性の気管支平滑筋収縮メカニズムの解明をめざした。

B. 方法

1) 喘息、アレルギー症例のサイトカイン産生解析対象症例、臨床検査

国立病院機構相模原病院アレルギー科外来に通院中の成人喘息症例より、インフォームドコンセントを得たうえで対象とした。アセチルコリン、ヒスタミンに対する気道過敏性の測定、および抗原吸入負荷試験は、日本アレルギー学会の標準法によって

行った。β刺激剤、テオフィリン剤、インターール、抗コリン剤、ベクロメサゾン吸入は、12時間以上、抗ヒスタミン剤、ステロイド剤は24時間以上中止した。アトピー型は、吸入アレルゲン20種を含む皮膚テストにおいて、一つ以上の陽性を示すものと定義した。非アトピー型は皮膚テスト陰性のものとした。

アレルゲン

粗抗原として用いたダニ、スギ、イヌ、ネコ、カンジダ、アルテルナリア、アスペルギルスなど各種アレルゲン診断用エキスの原末は鳥居薬品より供与された。精製ダニアレルゲン Der f 1、Der f 2 はアサヒビール薬品(株)より、精製カンジダアレルゲン Secretory aspartic prorease 2 (SAP2)、Superoxide dismutase (SOD)、cyclophilin、enolase、mannan A は宝酒造(株)より購入した。Stock solution として、Hank's buffered saline solution (HBSS) に2 mg/ml の濃度で溶解し、使用時まで-20°Cにて凍結保存した。

細胞培養およびアッセイ

ヘパリン採血の後、Ficoll-paque 比重遠心法にて末梢血単核細胞(Peripheral blood mononuclear cells: PBMC)を得、 2×10^6 /ml の濃度にて、AIM-V 培地に懸濁した。20 nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と 1 μM の ionomycin (IOM) で24時間刺激した後、上清をハーベストした。一部のwellは、抗CD3抗体(OKT3、10 μg/ml)でcoatし、固相化抗CD3抗体刺激に用いた。抗CD28抗体は、1 μg/ml で培養中に添加した。Crude アレルゲンとしてダニアレルゲン、*Candida albicans*抗原などによるT細胞からのサイトカイン産生を調べるため *Dermatophagoides farinae* (Der f) extract、*Candida albicans* extract、その他のアレルゲン粗抗原エキス(鳥居薬品)の最終濃度0.1、1、10 μg/ml を加えて6日間培養し、上清をハーベストした。サイトカイン産生の評価には、上清中のIL-2、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、IFN-γをそれぞれ特異的サンドイッチELISA法にて測定した。リンパ球の増殖反応は 10^5 個の細胞を刺激後6日間培養した後、16時間 ^3H -Thymidine パルスにて測定した。実験によっては、negative selection 法によりCD4細胞をenrichした。アトピー型喘息症例のPBMCをDer f 2と培養し、得られたリンパ芽球を限界希釈法によりクローニングし、ダニアレルゲン Der f 2 特異的ヘルパーT (Th) 細胞クロー

ンを樹立した。さらに、autologous のPBMCを抗原提示細胞とし、抗原を加えて共培養することでsubcloning、増殖せしめ、種々の活性化刺激に応答したサイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。

2) Costimulatory signal とステロイド感受性の解析

既報の如く Balb/c マウスをOVAで感作し、所属リンパ節より感作リンパ球を回収、*in vitro*での抗原刺激、limiting dilutionを行って、OVA特異的Th cloneを樹立した(Kaminuma O. et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 16:448, 1997)。Irradiated spleen cellをantigen-presenting cellとし、subcloning、さらにexpansionし、細胞移入実験に使用した。 5×10^6 個のTh cloneをOX40L (+/+)または(-/-)マウスに尾静脈より注入し(Day 0)、翌日OVAを経気道的に抗原チャレンジした。さらに48 hr後、BUXCOにて気道抵抗を測定、気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、細胞数、分画を測定した。Day 1、2にdexamethasone (DEX) 1、3 mg/kg、およびvehicleを皮下投与した。

3) T細胞依存性気流閉塞メカニズムの解析

Candida albicans acid protease (Secreted aspartic proteinase 2: SAP2)に反応してIgE非依存性に遅発型喘息反応が惹起される非アトピー型喘息症例より、末梢血単核球(PBMC)を得、SAP2と培養し、上清を回収後、濃縮、透析、保存した。ヒト気管支平滑筋細胞(Cambrex社)をコンフルエント条件に培養し、コラーゲンゲルに封入アプライした後、サンプルをアプライし、収縮を経時的に記録、解析した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成15年厚生労働省告示第255号)を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実験動物を使用する場合、研究者の施設における動物実験に関する

倫理規定を遵守する。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論する最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

C. 結果

(1) アトピー型喘息患者における IL-9 産生の解析

アトピー型喘息患者の PBMC に抗原非特異的の刺激、PMA+IOM、固相化抗 CD3 抗体±抗 CD28 抗体を加えたところ、健常者に比較して有意に高い IL-9 産生の誘導を認めた。次に、*Der f* extract 刺激により誘導される PBMC からの IL-9 産生の kinetics について検討を行った。*Der f* extract 刺激により誘導される IL-9 は、刺激後 2 日目から統計学的に有意な産生増加がみられ、6 日目で最大の産生量を示すことがわかった(図 1)。

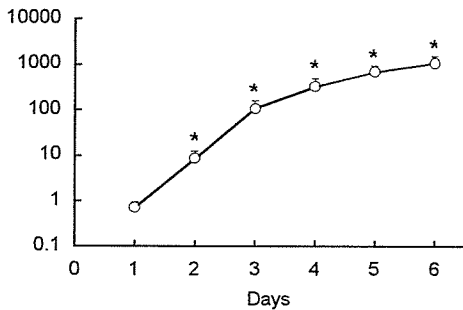


図 1、アトピー型喘息患者由来の PBMC におけるダニアレルゲン誘導 IL-9 産生の経時的変化

5 人のアトピー型喘息患者から分離した PBMCs を 10 $\mu\text{g/ml}$ *Der f* extract と共培養し、いくつかの time point で培養上清を回収した後、培養上清中の IL-9 レベルを測定した。(*: $p < 0.05$)

次に *Der f* extract 刺激により誘導される IL-9 産生の至適抗原濃度について検討した。アトピー型喘息患者由来の PBMC を種々の濃度 (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) の *Der f* extract と 6 日間共培養し、培養上清中の IL-9 を測定した。IL-9 産生は 1 $\mu\text{g/ml}$ *Der f* extract 刺激から検出可能となり、無刺激コントロールと比較して 10 $\mu\text{g/ml}$ *Der f* extract 刺激では有意に IL-9 産生が増加することがわかった(図 2)。

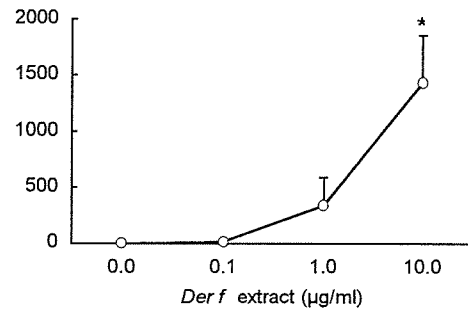


図 2、アトピー型喘息患者 PBMC における *Der f* extract 応答性 IL-9 産生

9 人のアトピー型喘息患者から分離した PBMC を各濃度の *Der f* extract と 6 日間共培養し、培養上清中の IL-9 を測定した。(*: $p < 0.05$)

アトピー型喘息患者 PBMC からのアレルゲン応答性 IL-9 産生を担う IL-9 産生細胞を明らかにするため、抗 CD2, CD4 あるいは CD8-coupled magnetic beads を用いて CD2⁺細胞-, CD4⁺細胞- あるいは CD8⁺細胞-depleted 画分を作成した。それぞれの depleted 画分を *Der f* extract (10 $\mu\text{g/ml}$) と 6 日間共培養し、培養上清中の IL-9 を測定した。CD8⁺細胞の depletion は PBMC からの IL-9 産生に影響を与えなかったが、CD2⁺細胞あるいは CD4⁺細胞の depletion により、PBMC からの IL-9 産生は完全に抑制された(図 3)。以上の結果からアトピー型喘息患者 PBMC からの抗原特異的 IL-9 産生は主に CD4⁺ T 細胞によることが明らかとなった。

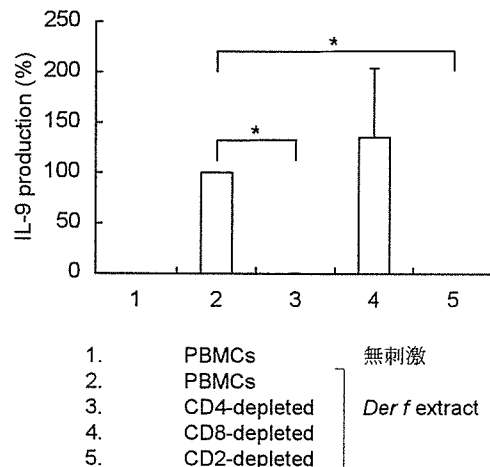


図 3、CD4⁺ T 細胞が IL-9 産生細胞である

抗 CD2, CD4 あるいは CD8-coupled magnetic beads を用いて CD2⁺細胞-, CD4⁺細胞- あるいは CD8⁺細胞

-depleted 画分を作成した。それぞれの depleted 画分は 10 µg/ml *Der f* extract と 6 日間共培養し、培養上清中の IL-9 レベルを測定した。(*: p<0.05)

さらに、アトピー型喘息患者 PBMC のアレルゲン応答性 IL-9 産生量と他のサイトカイン産生量、臨床マーカーとの関連について検討した。IL-9 産生量は IL-5、IL-13 産生量、抗原特異的 IgE 値や喀痰中好酸球スコアと正の相関を示すことが明らかになった。

次いで、アトピー型喘息患者の抗原特異的 T 細胞クローンを用いて種々の刺激に反応する IL-9 産生について検討した。アレルゲン特異的 T 細胞クローンに活性化刺激 (20 nM ホルボールエステル (PMA), 1 µM イオノマイシン (IOM), PMA + IOM, PMA + 1 µg/ml 抗 CD28 抗体, PMA + 100 µM cAMP, 固相化抗 CD3 抗体 (OKT3), OKT3 + 抗 CD28 抗体, 100 U/ml リコンビナント IL-2) を加えて 48 時間培養し、培養上清中のサイトカインを測定した。IL-9 産生は PMA 刺激のみでは誘導されなかったが、IOM 刺激では誘導され、さらに IOM + PMA 刺激により増強がみられた。いくつかの T 細胞クローンでは PMA + 抗 CD28 抗体および PMA + cAMP 刺激で IL-9 産生がみられた。また IL-9 産生は OKT3 刺激のみでも誘導され、抗 CD28 抗体刺激が加わることにより有意に増加した。さらにリコンビナント IL-2 刺激でも IL-9 産生の誘導がみられた (図 4)。これらの結果からヒト T 細胞からの IL-9 産生において Ca²⁺ シグナルや CD28 シグナル、IL-2 受容体シグナルが重要な役割を果たしていることが明らかになった。

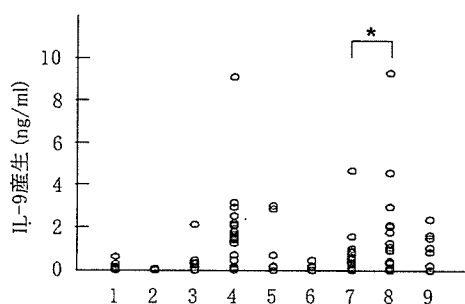


図 4、アトピー型喘息患者の抗原特異的 T 細胞クローンの IL-9 産生

無刺激 (lane 1) あるいは PMA (2), IOM (3), PMA + IOM (4), PMA + 抗 CD28 抗体 (5), PMA + cAMP (6), 固相化抗 CD3 抗体 (7), 固相化抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体 (8), リコンビナント IL-2 (9) 刺激下で 48 時間、抗原特異的 T 細胞クローンを培養し、培養上清中の IL-9 を測定した。(*: p<0.05)

次に、IL-2 刺激に対する T 細胞クローンからの IL-9 産生について検討した。アトピー型喘息患者由来の T 細胞クローンに種々の濃度 (0.1, 1, 10, 100, 1000 U/ml) のリコンビナント IL-2 を加えて 48 時間培養し、培養上清中の IL-9 レベルを測定した。IL-9 産生は 100 U/ml の IL-2 刺激から著しく誘導され、100 U/ml と 1000 U/ml の IL-2 刺激には大きな違いがなかった (図 5)。これはこれまでに報告のある IL-2 誘導 IL-5 および IL-13 産生と同様の結果であった。

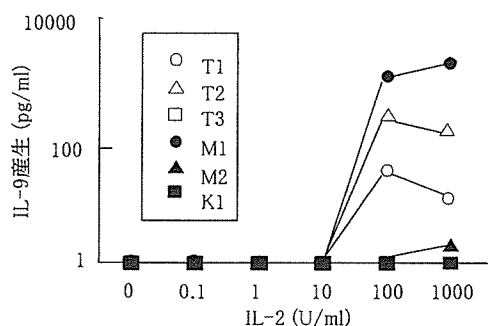


図 5、アトピー型喘息患者のアレルゲン特異的 T 細胞クローンの IL-2 による IL-9 産生誘導

アトピー型喘息患者から単離した T 細胞クローンをリコンビナント IL-2 と 48 時間共培養し、培養上清中の IL-9 を測定した。クローン T1, T2, T3 はドナー T、クローン M1, M2 はドナー M、クローン K1 はドナー K 由来。

われわれは、これまでに Th 細胞による IL-5 産生が IL-2 依存的であることを報告している。そこで、固相化 CD3 抗体刺激により誘導される IL-9 産生の IL-2 依存性について抗 IL-2 中和抗体を用いて検討した。アトピー型喘息患者由来の T 細胞クローンに OKT3 刺激と同時に種々の濃度 (1, 3, 10 µg/ml) の抗 IL-2 抗体を加えて 48 時間培養し、培養上清中の IL-9 およびその他の Th2 サイトカインレベルを測定した。また刺激から 48 時間後にトリチウムサイミジンを加え、17 時間後の細胞増殖を測定した。OKT3 刺激により誘導された IL-9 産生は 1 µg/ml の抗 IL-2 抗体により阻害され、3 および 10 µg/ml の抗 IL-2 抗体では OKT3 刺激のみと比較して有意に阻害された。このとき IL-5 産生は IL-9 産生と同様に抗 IL-2 抗体による阻害がみられたが、IL-13 産生および細胞増殖は阻害されなかった (図 6)。以上の結果から、T 細胞による IL-9 産生は IL-2 依存的であ

ることが示された。また抗原特異的 T 細胞からの IL-9 産生は、IL-5 産生と共通のメカニズムにより調節されている可能性が考えられた。

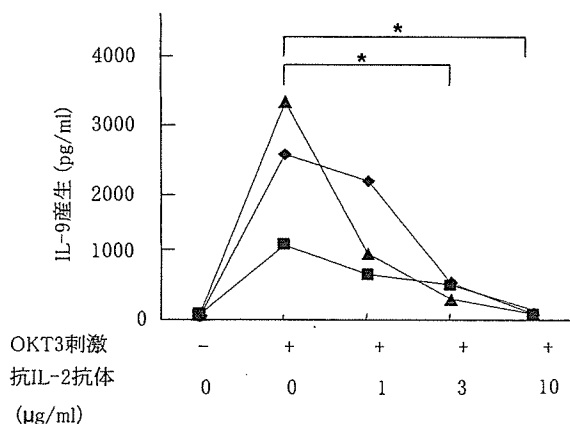


図6、アトピー型喘息患者のアレルゲン特異的 T 細胞クローンの IL-9 産生は IL-2 依存性である

アトピー型喘息患者由来の T 細胞クローンに固相化 CD3 刺激と同時に種々の濃度 (1, 3, 10 µg/ml) の抗 IL-2 抗体を加えて 48 時間培養し、培養上清中の IL-9 を測定した。(*: $p < 0.05$)

(2) OX40L ノックアウトマウスを用いたステロイド抵抗性についての検討

我々は、T 細胞クローンを無処理マウスに移入、抗原チャレンジを行うことにより、気道過敏性、肺好酸球浸潤を惹起する T 細胞依存性喘息モデルを報告してきた。今回は、T 細胞クローン 1×10^7 cells/head を OX40L ノックアウトマウスおよび無処理 BALB/c マウスに経静脈的に移入し、24 時間後に OVA 経鼻チャレンジを行い、移入 30 分前および移入 24 時間後に 0 (生理食塩水のみ), 1, 3 mg/kg のデキサメタゾンを皮下投与した。チャレンジ 48 時間後に無拘束呼吸機能解析装置 (BUXCO) を用いて塩化メサコリンによる気道抵抗を測定し、Penh (enhanced pause) 値で表示した。BALF 好酸球の解析は、チャレンジ 48 時間後に BAL を施行、総細胞数をカウントし、サイトスピンを用いてスライドガラスに接着させ、ギムザ染色を行い、好酸球数をカウントした。

肺好酸球浸潤はデキサメタゾンの用量依存的に抑制され、OX40L ノックアウトマウスではデキサメタゾン 0 mg/kg 群と比較して 3 mg/kg 群で 80% 抑制され統計学的有意差を認めた。Wild type では約 50% の抑制にとどまった。以上の結果から共刺激シグナ

ル分子が *in vivo* でステロイド抵抗性に関与することが明らかにされた。気道過敏性は OX40L ノックアウトマウスと BALB/c マウスとで差がみられなかった。

D. 考察

IL-9 は Th2 サイトカインの 1 つで、その遺伝子は 5q31-35 の Th2 サイトカインクラスター中に位置する。主に Th2 細胞、好酸球やマスト細胞などから産生される。気道過敏性亢進に関わる遺伝子の解析から気管支喘息との関係が示唆されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13175-13180, 1997)。IL-9 を気道粘膜に強制発現せしめたトランスジェニックマウスでは喘息様の phenotype がみられることが報告されている (J. Exp. Med. 188:1307-1320, 1998)。また、喘息患者の気管支生検中で IL-9 mRNA + 細胞数が上昇しており、IL-9 mRNA レベルと FEV1、PC20 との相関するとの報告もみられる (J. Allergy Clin. Immunol. 104:108-115, 2000)。アトピー型喘息患者では抗原チャレンジにより BALF 中の IL-9 mRNA 発現が増加し、IL-9 レベルと BALF 中の好酸球数に相関が認められている (J. Allergy Clin. Immunol. 111:1319-1327, 2003)。

これまで子供の喘息患者を対象とした報告はあるものの、成人の喘息患者を対象として T 細胞からの IL-9 産生を調べた報告はほとんどみられなかった。ダニ RAST+ の成人アトピー患者の PBMC では SPT-群に比べて HDM 特異的 IL-9 産生量が有意に高い、また、アトピー型喘息患者の PBMC は他のアトピー患者に比べて抗原特異的 IL-9 産生量が有意に高いことが報告されている (Devos S. et. al Clin. Exp. Allergy 36:174-182, 2006)。HDM-SPT+ の幼児の PBMC では SPT-群にくらべて HDM 特異的 IL-9 mRNA 発現が有意に高い (Macaubas C. et. al Clin. Exp. Allergy 29:1223-1231, 1999; Rubin A. et. al. Allergy 56:1042-1048, 2001)。アトピー型喘息の子供の PBMC では抗原刺激に対してコントロール群より有意に高い IL-9 産生が誘導される (Bottcher M. F. et. al. Pediatric Allergy Immunol. 14:345-350, 2003)。

今回のわれわれの解析では、成人アトピー型喘息患者の PBMC において、PMA+IOM 刺激により誘導される IL-9 産生は、健常コントロール群と比較して有意に高かった。IL-9 産生量は、IL-13 産生量および血中 total IgE 値と正の相関を示した。成人アトピー型喘息患者の PBMC におけるダニアレルゲン応答性 IL-9 産生は、健常コントロール群と比較して有意に高かった。また、ダニアレルゲン応答性 IL-9

産生量は IL-13 および IL-5 産生量、ダニアレルゲン特異的 IgE 値、喀痰中好酸球数と正の相関を示した。IL-9 産生は、IgE 産生や好酸球浸潤との関連が認められたが、気道過敏性との相関はみられなかった。以上の知見から、成人アトピー型喘息における IL-9 の役割が示唆される。

そこで、細胞レベルで IL-9 産生メカニズムを解明することをめざして、アレルゲン特異的ヒト T 細胞クローンのサイトカイン産生を解析した。その結果、成人アトピー型喘息患者由来の *Der f* 特異的 Th クローンにおいて、PMA+IOM、CD3 刺激により IL-9 産生が誘導され、CD3 刺激に CD28 刺激が加わることで IL-9 産生は約 3 倍に増加した。一部のクローンでは、IL-2 単独の刺激により IL-9 を産生した。CD3 刺激により誘導された IL-9 産生は、抗 IL-2 中和抗体の存在により有意に抑制された。以上の知見から、ヒトのアレルゲン特異的 Th 細胞は、単独で T 細胞レセプターシグナルにตอบสนองして、IL-9 を産生すること、IL-9 産生には Ca^{2+} シグナル、CD28 シグナル、IL-2 レセプターシグナルが重要であることが明らかになった。喘息患者の気道粘膜では、Th2 サイトカインに加え、Th1 サイトカインの IL-2 産生亢進も報告されており、IL-9 産生には、抗原特異的機序と IL-2 (サイトカイン) 依存性機序が存在することが推測される。

T 細胞活性化には T 細胞受容体 (TCR) を介する抗原特異的シグナルと共刺激分子を介する抗原非特異的シグナルが必要である。共刺激分子の 1 つである OX40 リガンド (OX40L) は抗原提示細胞上に発現しており、T 細胞上に発現している OX40 (CD134) と共に T 細胞増殖やサイトカイン産生を増強することが知られている。これまでに *in vitro* の実験から、TCR シグナルのみの活性化と比較して、TCR シグナルと共刺激シグナル両方を活性化するとステロイドに対する抵抗性が高くなる、という結果が得られている。今回得られた知見は、OX40L ノックアウトマウスを用いて、共刺激シグナルとステロイド抵抗性との関連を *in vivo* で証明するものである。T 細胞レベルのステロイド抵抗性は、T 細胞に intrinsic な異常でなく、T 細胞をとりまく microenvironment 中の costimulatory signal、サイトカインの多寡によってコントロールされるとのコンセプトを支持する。

E. 結論

これまでのわれわれの調査研究の成果として、難

治性喘息症例では高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない現状が確認されている。重症喘息でのステロイド薬効果不全のメカニズムを解明し、ステロイド感受性、ステロイド薬本来の薬効を回復することは重症症例群に対する治療効果を格段に向上させるための鍵である。これまでに、難治性喘息症例においては *in vivo* の T 細胞レベルでステロイド抵抗性を確認している。T 細胞のステロイド抵抗性は、microenvironment 中の costimulatory signal およびサイトカインによって誘導される。本年度は、CD40L ノックアウトマウスを用いて、*in vivo* でステロイド感受性の変化を証明した。さらに、重症喘息の大部分を占める非アトピー型喘息の気道収縮メカニズムを明らかにするため、*in vitro* のヒト気管支平滑筋収縮モデルを確立し、characterization を行った。IL-9 は気道過敏性の原因遺伝子にあげられる重要な Th2 サイトカインであるが、その産生メカニズムの解析をクローン化ヒト T 細胞を用いてはじめて実施した。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori, A., Ogawa, K., Kajiyama, Y., and Kaminuma, O. 2006. Th2 cell-mediated chemokine synthesis is involved in allergic airway inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 140:51-54.
- 2) Hashimoto, T., Kobayashi, N., and Mori, A. 2006. IL-12-induced IL-13 production by allergen-specific human helper T cell clones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 140:55-58.
- 3) Kitamura, N., Kitamura, F., Kaminuma, O., Miyatake, S., Tatsumi, H., Nemoto, S., and Mori, A. 2007. IL-4 gene transcription in human T cells is suppressed by T-bet. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 4) Umezu-Goto, M., Kajiyama, Y., Kobayashi, N., and Mori, A. 2007. IL-9 production by peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatics. *Int. Arch. Allergy*

Immunol. (in press)

- 5) Hashimoto, T., Kitamura, N., Kobayashi, N., Kaminuma, O., and Mori, A. 2007. Effect of Formoterol on allergen-induced cytokine synthesis by atopic asthmatics. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
- 6) Kajiyama, Y., Umezu-Goto, M., Kobayashi, N., Takahashi, K., Fukuchi, Y., and Mori, A. 2007. IL-2-induced IL-9 production by allergen-specific human helper T cell clones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 森 晶夫、梶山雄一郎、谷口正実、大友 守、前田裕二、長谷川眞紀、秋山一男：難治性喘息の成因とそのフェノタイプ、第46回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム8「難治性喘息の成因と治療」 J. Jap. Respir. Soc. 44 : 40, 2006. 6. 3 (東京)
- 2) 森 晶夫、梶山雄一郎、前田裕二、谷口正実、大友 守、長谷川眞紀、秋山一男、神沼修：T細胞サイトカイン産生制御と気道好酸球浸潤、過敏性の関連、第56回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 55 : S2-5, 2006. 11. 2 (東京)
- 3) 森 晶夫、前田裕二、谷口正実、大友 守、長谷川眞紀、秋山一男：非アトピー型喘息の発症機序—非 IgE依存性遅発型喘息反応、The 14th Symposium of Asthma in Tokyo、抄録集 p. 5, 2006. 12. 16 (東京)
- 4) 小野恵美子、谷口正実、三田晴久、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：アナフィラキシー症状の際の尿中ロイコトリエン E4 濃度、第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:443, 2006 (東京)
- 5) 押方智也子、谷口正実、小野恵美子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、三富弘之、中村万理、小倉高志、秋山一男：ステロイドとシクロフォスファミド抵抗性の著明な上腸間膜動脈狭窄を呈した Churg-Strauss 症候群の一剖検例、第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:443, 2006 (東京)
- 6) 小野恵美子、前田裕二、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、谷口正実、大友 守、森 晶夫、長谷川眞紀、松野 治、宮崎英士、熊本俊秀、朝比奈昭彦、石井豊太、秋山一男：植物由来食品によるアレルギー症例の検討、第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:470, 2006 (東京)
- 7) 小野恵美子、前田裕二、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、谷口正実、大友 守、森 晶夫、長谷川眞紀、朝比奈昭彦、石井豊太、秋山一男：植物由来食品によるアナフィラキシー症例の検討、第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:471, 2006 (東京)
- 8) 谷口正実、東 憲孝、三田晴久、伊藤伊津子、押方智也子、小野恵美子、粒来崇博、釣木澤尚美、東 愛、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：アスピリン喘息患者における自然発作時の尿中ロイコトリエン E4 濃度、第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 55:475, 2006 (東京)
- 9) 押方智也子、谷口正実、小野恵美子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：高齢発症非喫煙喘息患者の臨床像、第46回日本呼吸器学会学術講演会 44 : 286, 2006 (東京)
- 10) 谷口正実、小野恵美子、押方智也子、山本一博、石井豊太、谷本英則、福富友馬、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、三田晴久、秋山一男：喘息患者において鼻ポリープを治療すると尿中ロイコトリエン E4 濃度は低下する、第57回臨床アレルギー研究会、アレルギーの臨床 26:1068, 2006 (東京)
- 11) 後藤牧子、梶山雄一郎、森 晶夫：喘息症例の末梢血 T 細胞における IL-9 産生 1、アレルギー好酸球研究会 2006 抄録集 p. 27, 2006. 6. 24 (東京)
- 12) 梶山裕一郎、後藤牧子、森 晶夫：喘息症例の末梢血 T 細胞における IL-9 産生 2、アレルギー好酸球研究会 2006 抄録集 p. 28, 2006. 6. 24 (東京)
- 13) 北村紀子、橋本知実、森 晶夫、神沼修： β 2 作動薬による T 細胞サイトカイン産生制御、アレルギー好酸球研究会 2006 抄録集 p. 30, 2006. 6. 24 (東京)
- 14) 神沼修、北村紀子、森 晶夫：ヒト Th1/Th2 分化における T-bet の機能、アレルギー好酸球研究会 2006 抄録集 p. 11, 2006. 6. 24 (東京)