

- 京)
- 15) 神沼修、北村ふじ子、北村紀子、巽英樹、根本壯一、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56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とプロスタグランディンD2代謝産物、第56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56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56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56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56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56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56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)
- 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

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

分担研究者 高橋 清（国立病院機構南岡山医療センター）

研究要旨

臨床に適した難治性喘息の分類基準を肺機能や画像、副腎機能などの各種指標を基に見直して、経口 PSL を毎日 10mg 以上必要とする現在の基準から経口 PSL5mg/日以上以上の症例に緩める新判定基準案を作成した。重症・難治化の機序に関わる炎症細胞機能の解析では、ヒト好塩基球は IL-16 の産生細胞の一つであり、CD4 陽性 T 細胞の浸潤、活性化の増強に寄与しており、かつアレルギー性炎症のエフェクター細胞としての機能以外にも、免疫・アレルギー反応の調節作用も担っている可能性が示された。リンパ球と気道平滑筋細胞の相互作用については、難治性喘息ではリモデリングに関与する MMP-9 の産生が亢進し、ロイコトリエン受容体拮抗薬が抑制する傾向が認められた。以上の成果をもとに、重症難治化の予防と治療の対策を検討したい。

研究協力者

宗田 良（国立病院機構南岡山医療センター内科） 金廣有彦（岡山大学病院呼吸器内科）
岡田千春（国立病院機構南岡山医療センター内科） 谷本 安（岡山大学病院呼吸器内科）
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（国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科）

A. 研究目的

難治性喘息の予防と治療の対策を目的として、臨床と基礎の両面から検討した。まず JGL2006 等の各ガイドラインを参考にして、難治性喘息の臨床（重症度）分類を見直す為に、重症・難治性喘息の病像・病態に基づいて治療に直結する重症度分類基準を再検討した。今年度は気道の閉塞性換気障害や器質的所見 remodeling に基づいて臨床的難治の基準設定を試みた。次いで、かかる病態に重要な役割を果たす気道の炎症細胞の関与を明確にする為に、アレルギー性炎症の遅発相に関与している好塩基球がステロイド薬で抑制できない機能（特に気道リモデリングに関わる分子表現）を担っている可能性を検討する為に、喘息患者の気管支肺胞洗浄液中に検出されることが報告されている CD4 陽性 T 細胞に対し強力な遊走活性を有する IL-16 の好塩基球への発現を検討した。さらにステロイド薬に抵抗性を示す難治性喘息患者末梢血単核球の要因を検討し、その抑制作用を持つ薬剤の探索を行った。

B. 方法

（1）臨床（重症度）検討：JGL2006 で規定されたステップ 1～4 [(症状ステップと現在の治療ステップの組合せで規定された軽症間欠型から重症（最重症を含む）持続型までの 5 段階) に重症度区分された 84 例(従来の難治性喘息 8 例を含む) を対象に、今年度はスパイロメトリーで呼吸機能を、HRCT 画像による計測 (Okazawa, M. et al. Am J Respir Care Med 1996;154:1557) で気管支壁肥厚を、及び副腎皮質機能を血清コーチゾール値により検討した。
（2）好塩基球機能の検討：既報の如く、悪性リンパ腫や肺癌の治療において末梢血幹細胞移植の目的で採取された幹細胞を豊富に含む末梢血単核球の一部を、IL-3 (5ng/ml) の存在下で 3 週間培養し、immunomagnetic beads (Basophil Isolation Kit, Miltenyi Biotec) を用いた negative selection により高純度 (95%以上) の好塩基球を得た (Tanimoto, Y. et al. Clin Exp Allergy 2003; 33: 1561)。この培養好塩基球における IL-16 の発現、産生を RT-PCR、Flow cytometry、Confocal microscopy、Western blotting、ELISA にて検討した。
（3）リンパ球

機能の検討：リンパ球機能の検討：難治症例においてリンパ球活性化を Flow cytometry で、サイトカイン産生パターンを ELISA 法で測定することにより、気道炎症の重要細胞である正常気管支上皮細胞とリンパ球との相互反応を解析した。さらに、難治化に対する治療法を探求する目的で、これらのリンパ球の反応系におけるロイコトリエン拮抗薬 (Montelukast) の効果を検討した。今年度は同様の実験系に培養ヒト正常気管支平滑筋細胞を追加して気管支平滑筋細胞とリンパ球との相互反応を検討した。

C. 結果

(1) 臨床 (重症度) 検討：中枢気道の気流制限 (PEF 値) (図 1)、肺実質の障害 (Residual rate) (図 2)、気管支壁肥厚 (%WA) (図 3)、血中コーチゾール値 (図 4) 等の指標は、軽症間欠型、軽症持続型、中等症持続型、および重症持続型のうちの治療ステップ 4a (経口 PSL0~5mg/日未満) の群間では有意差が認められなかった。しかしそれら各群と重症持続型のうちの 4b 群 (5mg 以上~10mg 未満) 並びに 4c 群 (10mg 以上) の間には有意差がみられた。なお末梢気道 (V50/V25) は 4b 群よりも軽症の各群と 4c 群の間に有意差があった (図 5)。当院における喘息患者 547 例の重症持続型で 4b+4c 群 (経口 PSL を 5mg/日以上服用) 患者の占める比率は 4.6% で、4c 群の 1.6% に比してかなり高率であった。(2) 好塩基球機能の検討：培養好塩基球には IL-16 mRNA が恒常的に発現していた (図 6)。かかる IL-16 蛋白は、Flow cytometry では未刺激の細胞内に検出され (図 7)、Confocal microscopy による検討ではその局在は細胞質であった (図 8)。また Western blotting により、前駆型 IL-16 と活性型 IL-16 の両蛋白の発現が確認された (図 9)。さらに PMA 並びに calcium ionophore で刺激すると、培養上清中に IL-16 蛋白の遊離が認められた (図 10)。(3) リンパ球機能の検討：正常気管支上皮培養細胞と喘息患者 PBMC との相互作用を検討し、その MMP-9 の産生を難治性喘息群とそれ以外の喘息群とに分けて検討したところ、難治性喘息群では MMP-9 産生がより増加していた (図 11)。さらに Mite 抗原, Candida 抗原に対するリンパ球の反応性に対するロイコトリエン受容体拮抗薬 Montelukast の直接抑制効果の検討では、リンパ

球活性化には明らかな抑制効果は認められなかったが、気道上皮細胞との相互反応による MMP-9 産生に対して Montelukast は抑制傾向を示した (図 12)。なお気管支平滑筋細胞とリンパ球の相互反応に関しては、気管支喘息患者において今年度の検討では有意な所見は得られなかった (図 13, 14)。

D. 考察

今回改訂された JGL2006 の最重症持続型と従来の難治性喘息では、重症度を規定する目的がそれぞれ異なっていることから、臨床に適した難治性喘息の分類基準に見直す意義は大きい。今回の検討では、経口 PSL5mg/日以上を必要とする症例は 5mg/日未満の症例に比べて、肺機能検査や HRCT 所見等の臨床検査所見上で中枢気道の閉塞性換気障害と気道壁の肥厚、末梢気道から肺野全領域の障害、血中コーチゾール値の低下等に有意な差が認められた。従って、かかる臨床病態を根拠として、経口 PSL を日 10mg 以上必要とする現在の基準を経口 PSL5mg/日以上に緩めると、当院のような専門特化された施設の成人喘息では難治例が 1.6% から 4.6% に増加する。しかし一般病院では従来難治例は 1% 以下と言われている為、少しでも多くの重症症例が難治性喘息として認識されて注意深い観察と治療の対象となるよう、新基準に変更することを提案したい。

かかる難治病態を構成する炎症細胞のうち、血液マスト細胞と位置づけられている好塩基球について今年度はサイトカイン産生の観点から検討したところ、末梢血幹細胞培養好塩基球には恒常的に IL-16 が発現し、活性化により IL-16 蛋白が遊離されることが判明した。すなわち、ヒト好塩基球は IL-16 の産生細胞の一つであり、CD4 陽性 T 細胞の浸潤、活性化の増強に寄与していることが示唆された。また、好塩基球はアレルギー性炎症のエフェクター細胞の一つであるが、免疫・アレルギー反応の調節作用も担っている可能性が考えられた。かかる IL-16 蛋白の産生制御により喘息の重症難治化を抑制できるかという視点で今後の検討課題としたい。またリンパ球の関与については、気道上皮細胞とリンパ球を主体とした単核球との相互作用を検討したところ、少数例の有意差はなかったものの難治性喘息では MMP-9 などのリモデリン

グに関与していると考えられる酵素産生が亢進している可能性が認められた。さらにこの産生亢進はロイコトリエン受容体拮抗薬で抑制される傾向が示唆された。これは、Tリンパ球にはCysLT1レセプターが証明されていないため、リンパ球への直接抑制効果は認められないものの、単球・マクロファージ系細胞などには存在することがわかっており、これらの細胞との相互作用をロイコトリエン受容体拮抗薬が抑制することによりMMP-9などによるリモデリングを抑制する可能性が判明した。なお今回の検討では、培養ヒト気管支平滑筋細胞への喘息患者のリンパ球の関与は確認されなかった。

E. 結論

臨床に適した難治性喘息の分類基準を肺機能や画像、副腎機能などの各種指標を基に見直して、経口PSLを毎日10mg以上必要とする現在の基準から経口PSL5mg/日以上以上の症例に緩める新判定基準案を作成した。重症・難治化の機序に関わる炎症細胞機能の解析では、ヒト好塩基球はIL-16の産生細胞の一つであり、CD4陽性T細胞の浸潤、活性化の増強に寄与しており、かつアレルギー性炎症のエフェクター細胞としての機能以外にも、免疫・アレルギー反応の調節作用も担っている可能性が示された。リンパ球と気道平滑筋細胞の相互作用については、難治性喘息ではリモデリングに関与するMMP-9の産生が亢進し、ロイコトリエン受容体拮抗薬が抑制する傾向が認められた。以上の成果をもとに、重症難治化の予防と治療の対策を検討したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 谷本 安：特集 気管支喘息：診断と治療の進歩 III. 診断へのアプローチ 日本内科学会雑誌 95: 1437-42, 2006.

2) 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.

3) 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

4) 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

5) 高橋 清 成人喘息診療の pitfalls. *アレルギーの臨床* 26: 501, 2006

6) 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

7) 平野 淳, 高橋 清 喫煙と喘息. *臨床と研究* 83: 1679-1682, 2006

8) 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

9) 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

10) 高橋 清 成人喘息診療の pitfalls. *アレルギーの臨床* 26: 501, 2006

11) 岡田千春 *カンジダと成人気管支喘息. アレルギー科* 20: 525-531, 2005

12) 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

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) Tanimoto Y, Suzuki 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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

11) 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

12) 谷本 安, 高尾和志, 須崎規之, 佐久川 亮,

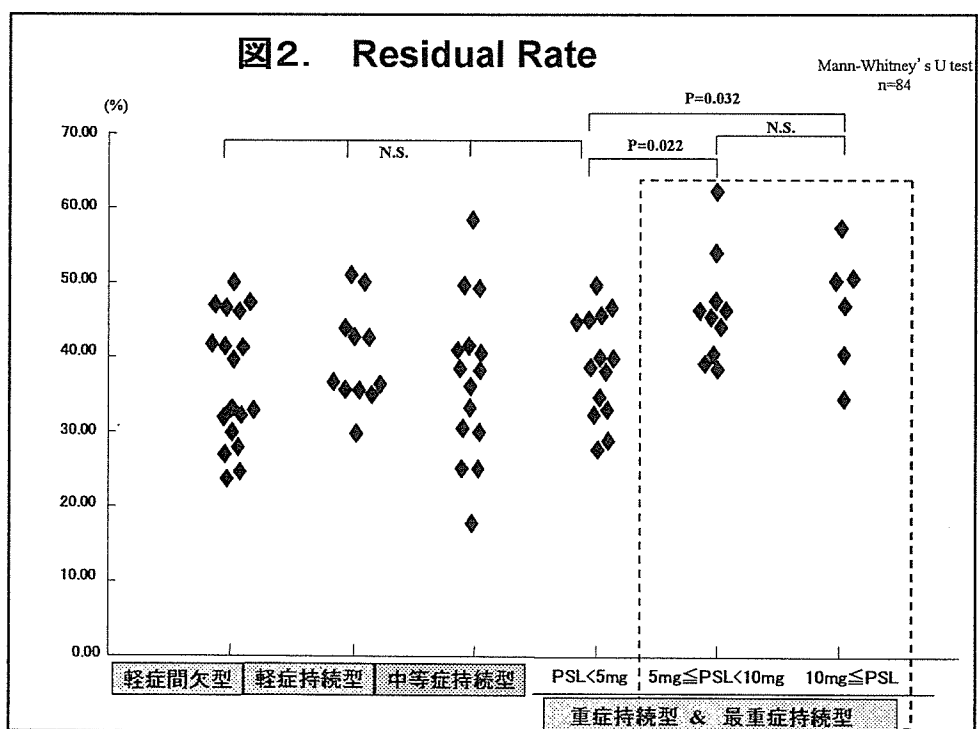
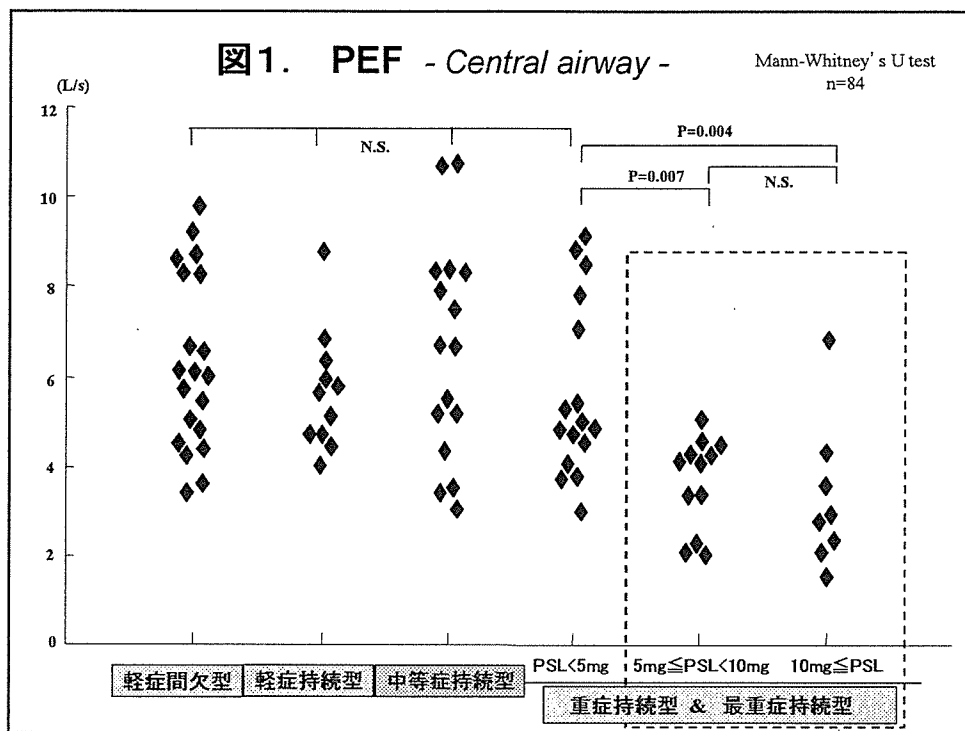
濱田 昇, 高橋 清, 谷本光音 アレルギーと炎症細胞 -好塩基球細胞とのクロストーク-. -喘息難治化病態と好塩基性細胞-. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2005. 6, 岡山

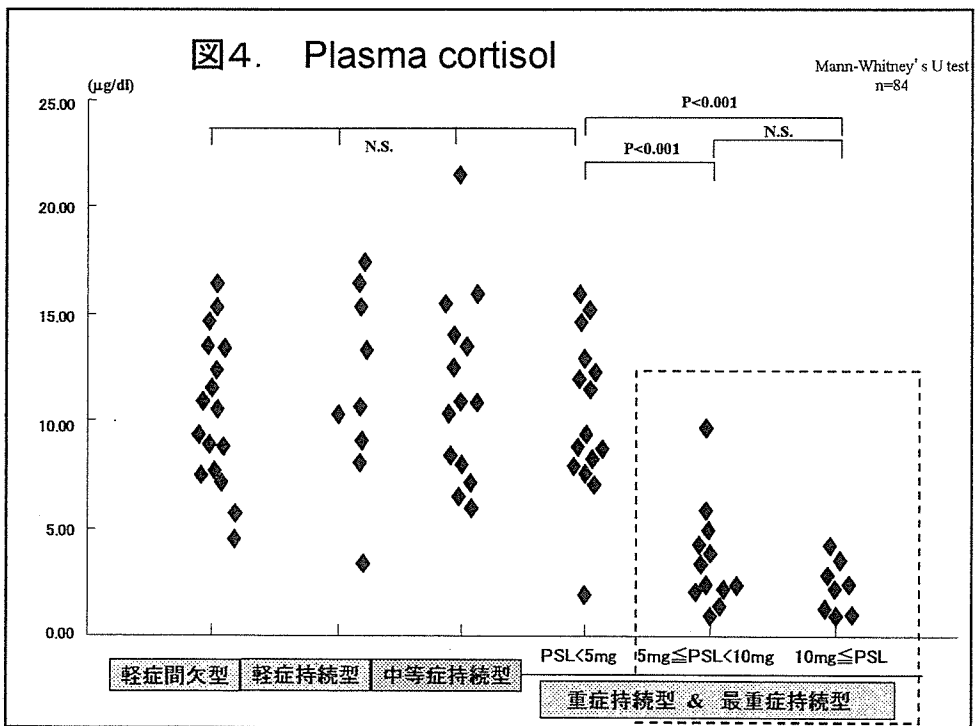
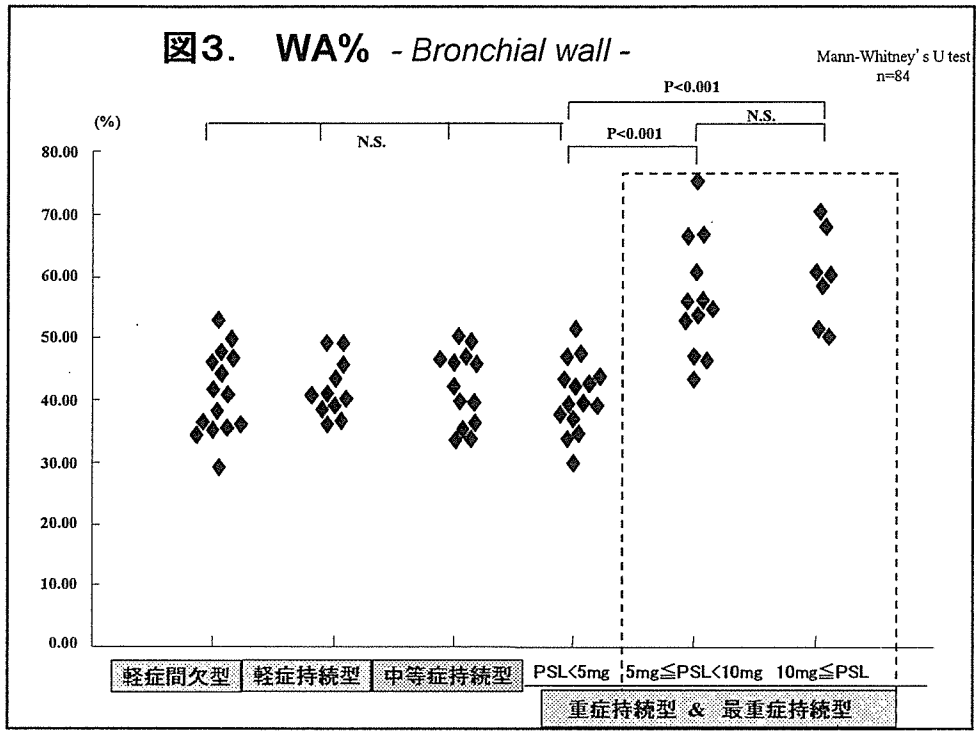
13) 谷本 安, 金廣有彦, 高橋 清, 谷本光音 アレルギー疾患の発症と重症化を防ぐために -成人喘息発症と重症化を防ぐために-. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2005. 6, 岡山

14) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし





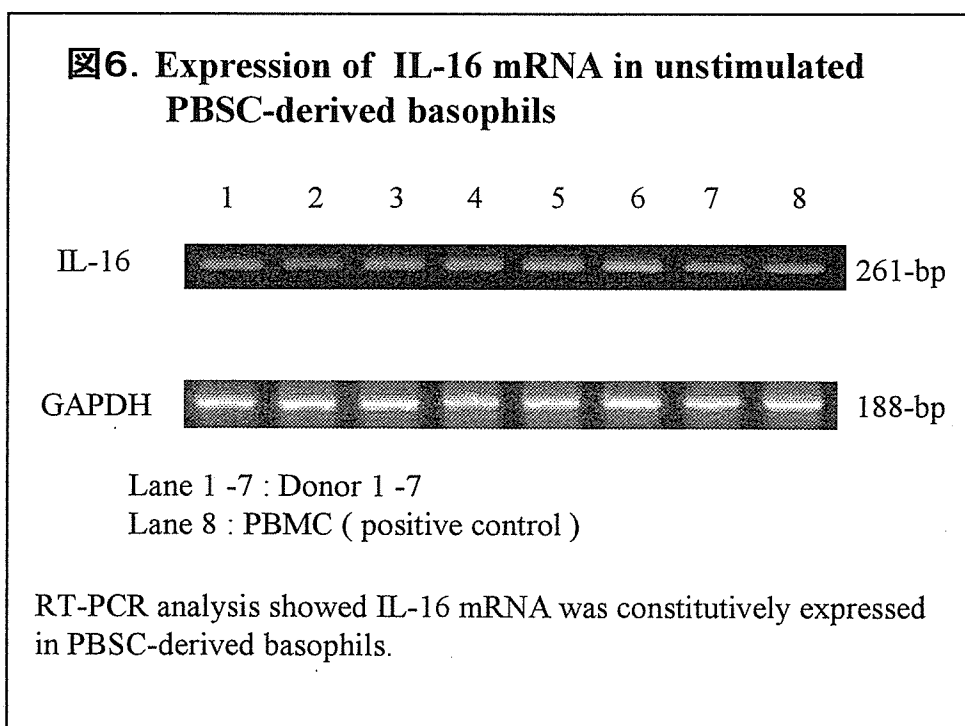
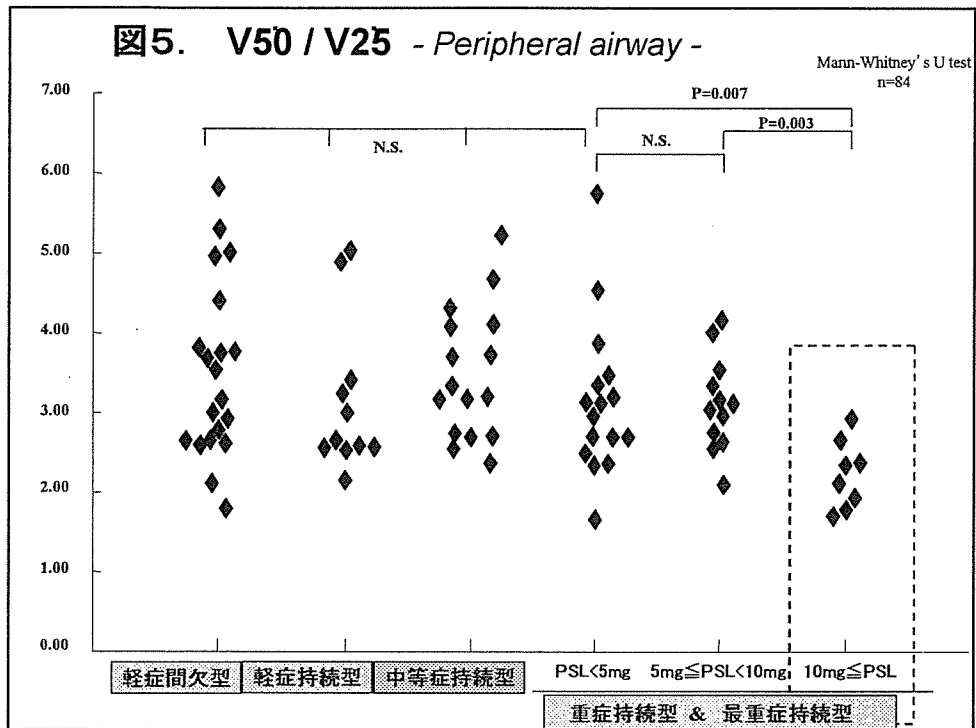
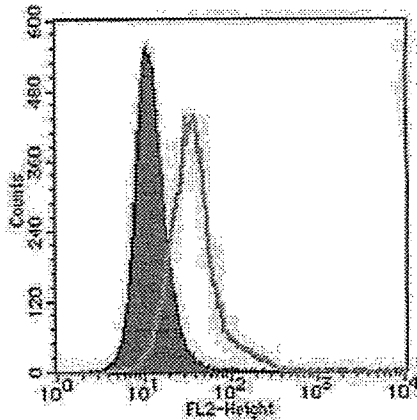
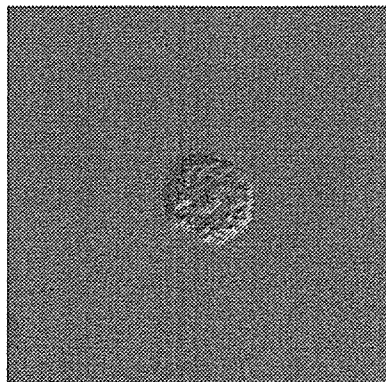


图7. Detection of intracellular IL-16 in unstimulated PBSC-derived basophils by flow cytometry

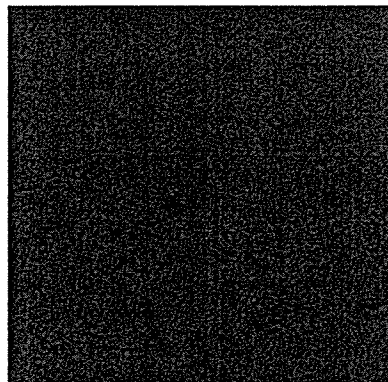


Flow cytometry showed constitutive expression of intracellular IL-16 protein in PBSC-derived basophils.

图8. Expression of intracellular IL-16 in unstimulated PBSC-derived basophils



contrast phase



PE-anti-IL-16 (x360)

Confocal microscopy revealed localization of IL-16 in the cytoplasm of unstimulated PBSC-derived basophils.

图9. IL-16 Western blot analysis of lysates from unstimulated PBSC-derived basophils

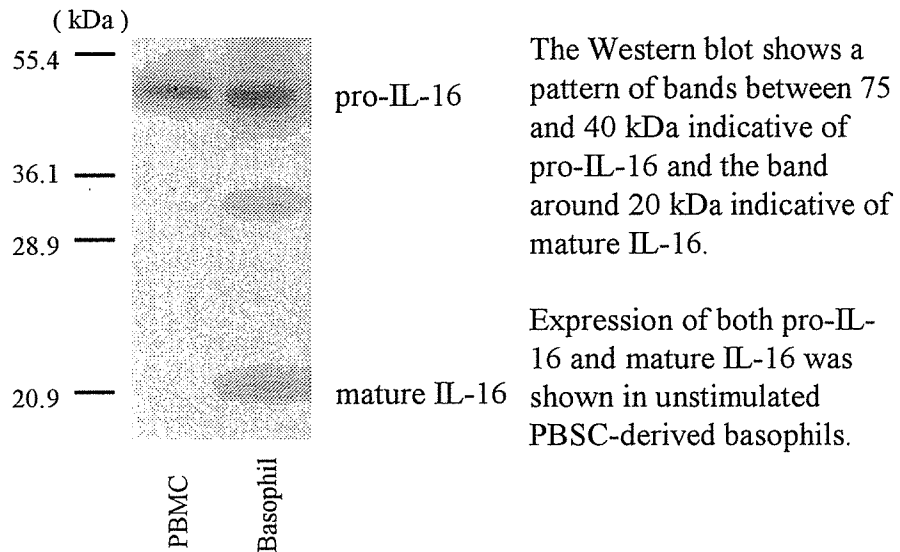
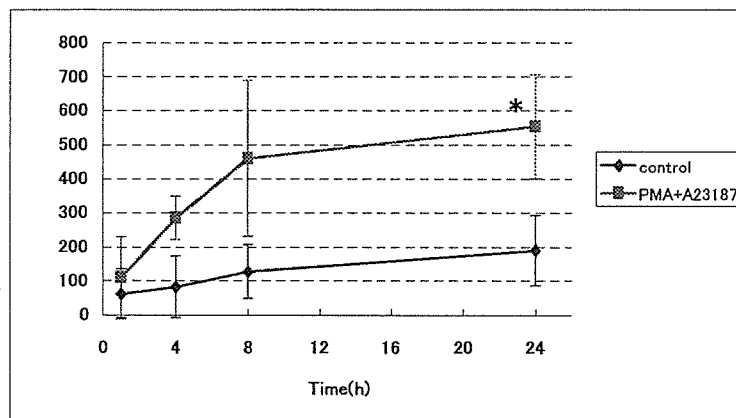


图10. Kinetics of IL-16 release from PBSC-derived basophils



IL-16 protein was detected in the supernatants of PBSC-derived basophils by ELISA. PMA (10ng/ml) plus ionophore A23187 (1 μ M) induced IL-16 release from PBSC-derived basophils. (* $p < 0.05$ versus control, $n = 5$)

図11. 気管支上皮培養細胞と気管支喘息患者の PBMC の相互作用培養上清中MMP-9 濃度

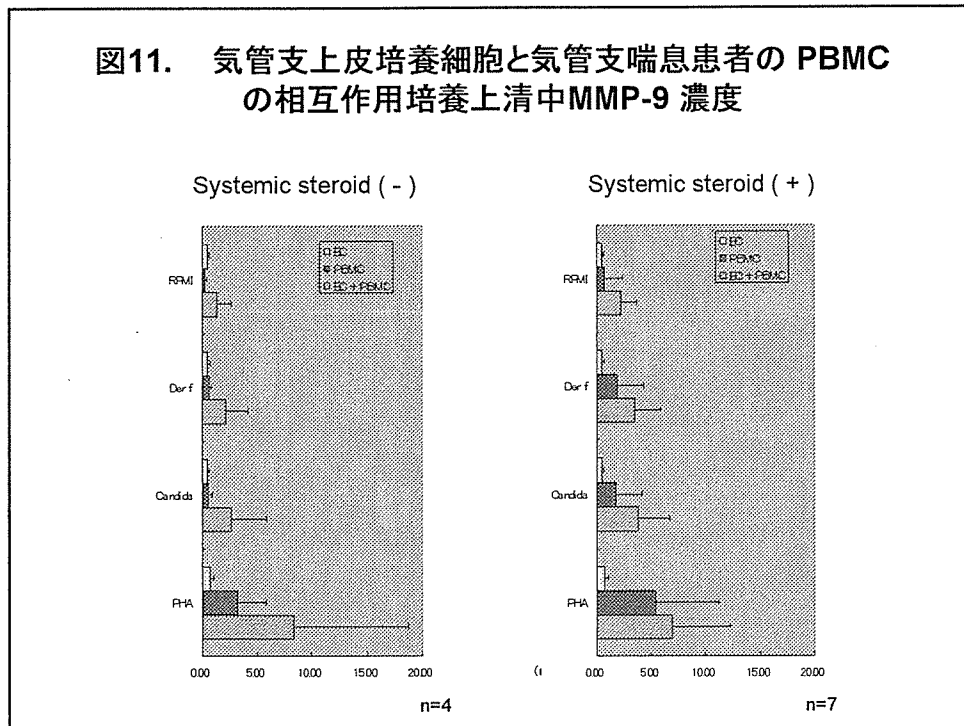


図12. 気管支上皮培養細胞と気管支喘息患者の PBMC の相互作用培養上清中MMP-9 濃度に対するMontelukastの影響

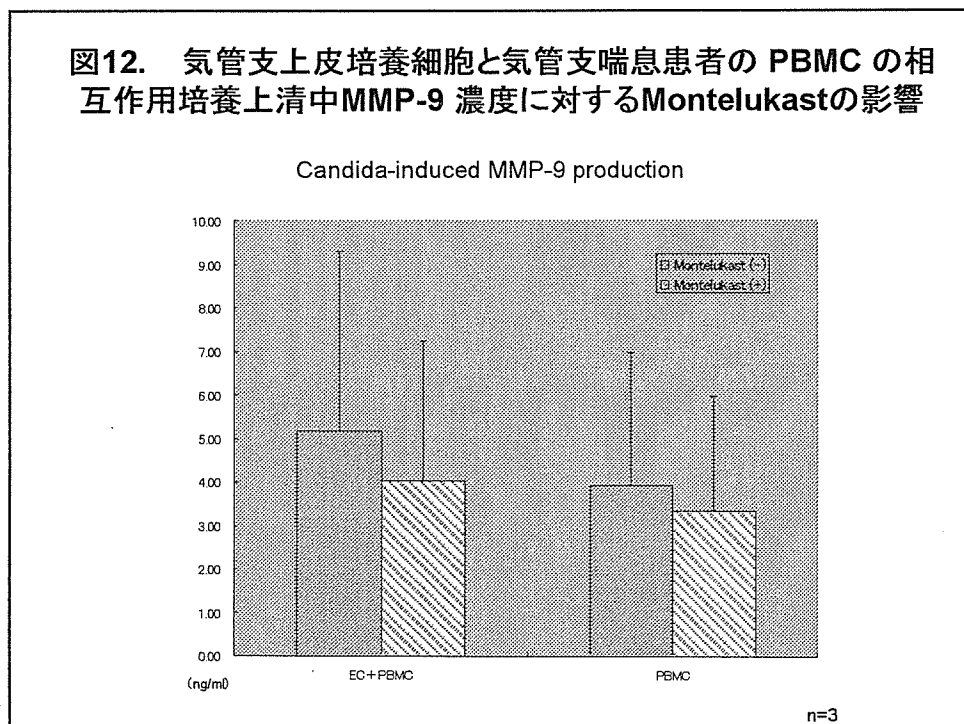


図13. 気管支平滑筋細胞と気管支喘息患者のPBMCの相互作用培養上清中IL-13濃度

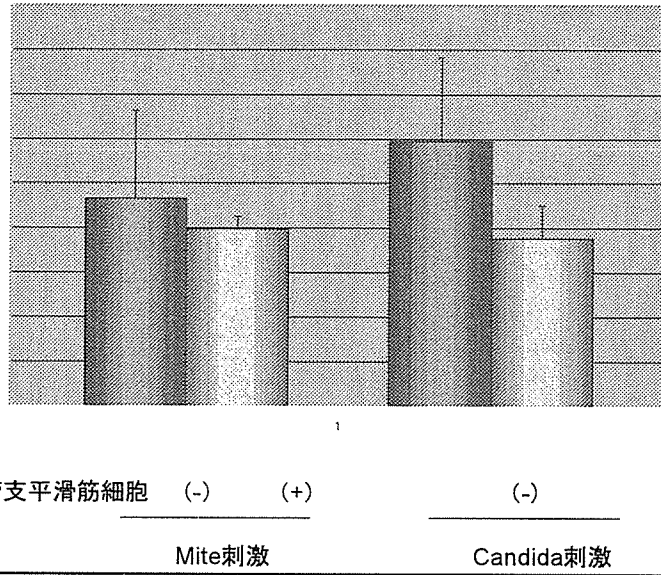
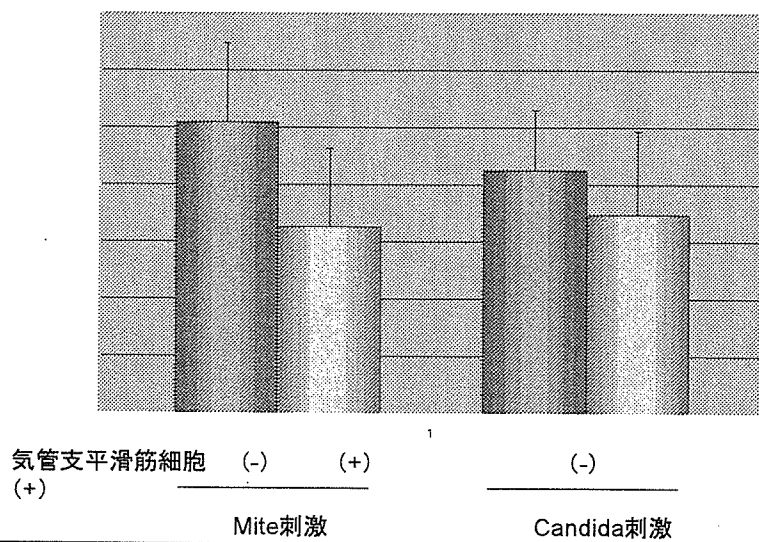


図14. 気管支平滑筋細胞と気管支喘息患者のPBMCの相互作用培養上清中MMP-9濃度



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
分担研究総合研究報告書
平滑筋リモデリング機序の実験的検討

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

基底膜下への間質コラーゲン・フィブロネクチンの沈着及び平滑筋の肥厚は難治性喘息における気道リモデリングの病理組織学的特徴である。本研究では気管支平滑筋細胞が気道リモデリングに伴い平滑筋から結合組織へと遊走するとの仮説を立て、培養正常ヒト細胞を用いてその遊走機序を検討した。実験の結果、肺線維芽細胞培養上清に気管支平滑筋細胞の遊走因子が含まれることが確認された。更に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ところ、バンドが認められた。これらの知見は気道リモデリングに伴い、気管支平滑筋細胞が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す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。気道リモデリングの病理組織学的特徴には、平滑筋の肥厚、基底膜下への細胞外マトリックス（間質コラーゲン、フィブロネクチン）の沈着が含まれる。このうち平滑筋の肥厚については、平滑筋を構成する平滑筋細胞の増殖及び肥大に起因すると考えられている。一方基底膜下への細胞外マトリックスの沈着については、喘息の重症度だけでなく結合組織内のPR2D3免疫陽性/平滑筋 α アクチン陰性細胞の増加と相関していることが報告されている（Brewster CE, et al, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1990）。このPR2D3免疫陽性/平滑筋 α アクチン陰性細胞は筋線維芽細胞であろうと考察されている。しかしPR2D3は筋線維芽細胞だけでなく平滑筋細胞にも陽性所見を与えることから、この細胞が平滑筋から遊走した平滑筋細胞である可能性も示唆されてきた。気道平滑筋細胞の遊走に関する報告はこれまで殆ど行われていなかったが、この2～3年増加してきた。

分担研究者は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基質因子であるラミニン、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。このことは気道リモデリングに伴い、気管支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、そこで更に平滑筋細胞遊走因子を産生・放出して近傍の平滑筋に存在する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。このうち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構を更に検討したところ、本上清にフィブロネクチンが含まれ、これが気管支平滑筋細胞に対する遊走因子として作用すること、気管支平滑筋細胞培養上清中のフィブロネクチンに対する気管支平滑筋細胞の遊走に関与している受容体が $\beta 1$ サブユニットを有するインテグリンである可能性が示唆された。そこで本研究では引き続き培養ヒト正常気管支平滑筋細胞を用いて気管支平滑筋細胞が平滑筋から結合組織へと遊走する機序を解析した。

B. 研究方法

気道由来の細胞として、正常ヒト気管支平滑筋細胞及び正常ヒト肺線維芽細胞（米国クロネティクス社）を培養した。そして気管支平滑筋細胞は遊走実験の標的細胞として用い、肺線維芽細胞は細胞培養上清を採取する為に用いた。

気管支平滑筋細胞に対する肺線維芽細胞培養上清の遊走活性は48穴ボイデンチャンバーを用

いて測定した。チャンバーの下室には遊走活性を測定する肺線維芽細胞培養上清を入れ、上室には 1×10^6 cells/ml に調整した気管支平滑筋細胞の浮遊液を入れて 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で6時間インキュベートした。インキュベート終了後、遊走膜の下室側に遊走した細胞のみを Diff-Quik で染色した。染色された細胞を光学顕微鏡を用いて倍率400倍にて10視野測定し、その合計数を遊走活性とした。

更に気管支平滑筋細胞の遊走因子である可能性が示唆されているフィブロネクチンが肺線維芽細胞培養上清にも存在するのか否かを検討する為、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。この時の細胞培養上清は48時間培養後採取したものを使用した。

C. 結果

- 1) 正常ヒト肺線維芽細胞培養上清に気管支平滑筋細胞の遊走因子が含まれることを確認した。気管支平滑筋細胞に対する本上清の遊走活性は、濃度及び細胞培養時間依存的に上昇した。(Fig.1)
- 2) 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い、培養上清中にフィブロネクチンを確認した。(Fig.2)

D. 考察

平滑筋細胞は収縮型から合成型へと形質転換することで平滑筋 α アクチンの発現を大幅に減少させると共に、増殖能、遊走能及び細胞外マトリクス産生能を大きく亢進する。また平滑筋細胞の形質転換に伴うこれらの能力の亢進が動脈硬化などの病態形成に寄与することも広く知られている。更にアレルギー曝露後の喘息患者より採取した気管支生検の電子顕微鏡像において、筋線維芽細胞は平滑筋細胞に似た超微細構造を有するとの報告がある(Gizycki MJ, et al, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1997)。これらの報告は喘息患者の気管支において、平滑筋細胞が平滑筋から結合組織へと遊走する可能性を支持するものである。

今年度の研究結果は、気道リモデリングに伴い気管支平滑筋細胞が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する可能性を示唆するものである。肺線維芽細胞のフィブロネクチン産生につい

ては多数報告がなされているが、これが気管支平滑筋細胞に対する遊走因子として作用するか否かは未だ検討が行われていなかった。今後肺線維芽細胞培養上清中のフィブロネクチンが気管支平滑筋細胞遊走因子として作用するのか、抗フィブロネクチン抗体を用いた遊走阻害実験により検討する予定である。

E. 結論

気道リモデリングにおいて、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する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)

G 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他

無し

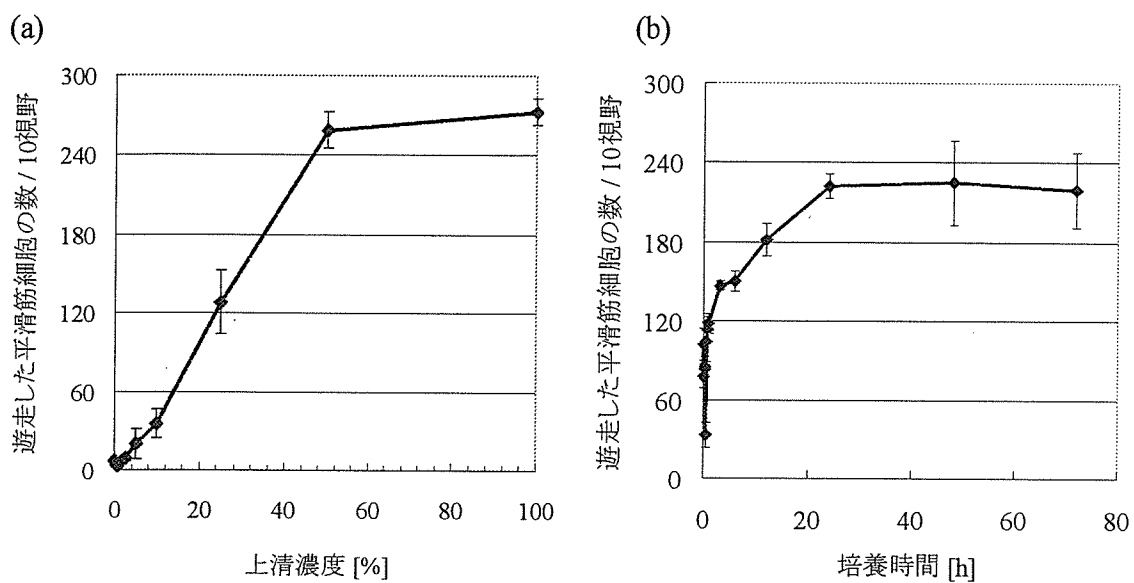


Fig.1 肺線維芽細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走

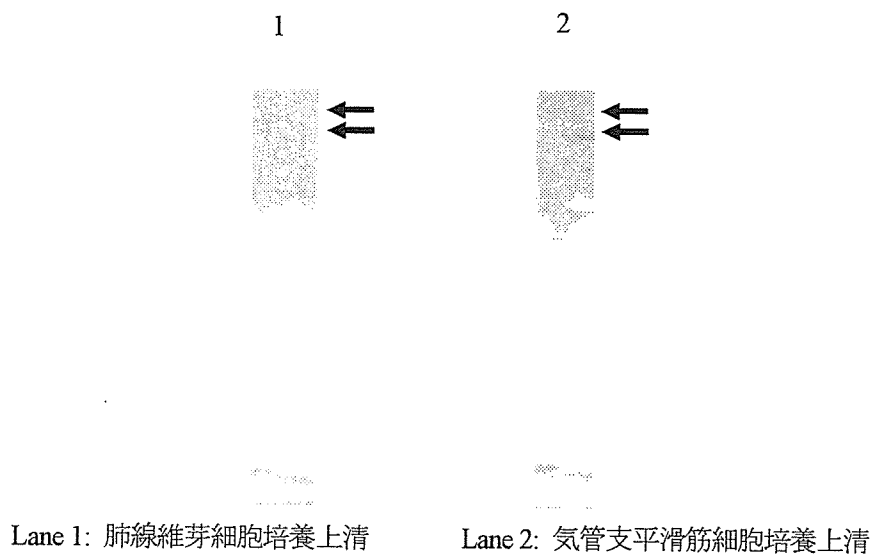


Fig.2 抗フィブロネクチン抗体を用いた肺線維芽細胞及び気管支平滑筋細胞培養上清のウエスタンブロッティング

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

分担研究者 柳原行義

所属機関 国立病院機構相模原病院臨床研究センター遺伝子診断・治療研究室長

研究要旨:本研究では、気道平滑筋 (ASM) 細胞とT細胞間の相互作用について、ASM細胞におけるB7-H2の発現とその機能を中心に検討した。ASM細胞は、CD40とOX40Lに加えて、B7-H2を構成的に発現していたが、B7-H2スプライズバリエーション、B7-1、B7-2の発現は検出されなかった。また、B7-H2の発現はTNF- α やpoly I : Cの刺激によってNF- κ B依存的に増強された。一方、抗CD3抗体やPMA/ionomycinで活性化したT細胞には、CD40LとOX40のみならず、ICOSの発現も誘導された。活性化T細胞をASM細胞に添加すると、細胞接着は著しく促進された。この細胞接着は、抗CD40L抗体や抗OX40抗体のみならず、抗ICOS抗体や可溶性B7-H2の添加によっても強く抑制された。ASM細胞をICOS、CD40L、OX40で刺激すると、IL-6とIL-8の産生はCD40LやOX40の刺激によって強く誘導されるのに対し、増殖反応はICOSの刺激によって強く誘導された。以上の結果から、ASM細胞と活性化T細胞とのB7-H2/ICOS依存性の細胞接着はASM細胞の過形成に関与していると考えられた。

A. 研究目的

気管支喘息の病態の進展にはT細胞、好酸球、好塩基球などの炎症細胞の局所浸潤による気道の慢性炎症や器質的変化などが関与していると考えられている。また、気道平滑筋 (ASM) 細胞や気道上皮細胞も炎症細胞として機能している。本研究では、ASM細胞とT細胞との相互作用について、補助刺激分子のB7ファミリーとCD28/CTLA-4ファミリーのうち、B7-H2とinducible costimulator (ICOS) の相互作用を中心に検討した。

B. 方法

ASM細胞は健常者由来の市販培養細胞 (Clonetics) を用いた。ASM細胞におけるB7ファミリー、CD40、OX40リガンド (OX40L)、LFA-3の発現はRT-PCRやFACS、NF- κ Bの活性化はEMSA、サイトカイン/ケモカインの産生はELISA、増殖反応は³H-thymidine uptakeで測定した。また、インフォームドコンセントが得られた健常者の末梢血単

核細胞からnegative selectionによりT細胞を分離精製した。抗CD3抗体やPMA/ionomycinで活性化したT細胞におけるICOS、CD40L、OX40の発現はFACSで解析した。また、活性化T細胞を³H-thymidineでパルスした後、ASM細胞に添加して細胞接着の定量解析を行った。

C. 結果

ASM細胞は、CD40、OX40L、LFA-3に加えて、B7-H1とB7-H2を構成的に発現していたが、B7-H2スプライズバリエーション (hGL50)、B7-1、B7-2の発現は検出されなかった。また、B7-H2に関しては、気道上皮細胞株 (BEAS-2B) にもその発現が認められた。ASM細胞におけるB7-H2の発現はIFN- γ やIL-13の刺激では増強されなかったが、TNF- α やpoly I : Cの刺激によって増強された。これらの刺激によるB7-H2の発現増強はNF- κ B阻害剤 (MG132) によって強く抑制され、またpoly I : C刺激によるそれはPI3K阻害剤 (LY294002) によって

も部分的に抑制された。

T細胞を抗CD3抗体やPMA/ionomycinで活性化すると、CD40LとOX40のみならず、ICOSの発現も誘導された。また、活性化T細胞をASM細胞に添加すると、細胞接着は著しく促進された。この細胞接着は、抗CD40L抗体、抗OX40抗体、抗CD2抗体を添加した場合と同様、抗ICOS抗体や可溶性B7-H2の添加によって強く抑制されたが、抗CD28抗体や可溶性B7-1の添加では抑制されなかった。

ASM細胞をICOS、CD40L、OX40で刺激すると、いずれの刺激によってもIL-6とIL-8の産生は誘導されたが、TGF- β やeotaxinなどは産生されなかった。IL-6/IL-8産生に関しては、ICOSの刺激に比べて、CD40LやOX40の刺激によって強く誘導された。また、これらの刺激によってASM細胞の増殖反応も誘導されたが、この増殖反応は、CD40LやOX40の刺激に比べて、ICOSの刺激によって強く誘導された。しかし、ICOSによる増殖反応はCD40L/OX40の共存下でも有意に増強されなかった。

D. 考察

本研究の結果から、ASM細胞は、B7ファミリーのうち、抑制性のB7-H1と補助性のB7-H2を発現していること、またB7-H2、CD40、OX40Lの発現を介してICOS⁺、CD40L⁺、OX40⁺活性化T細胞に接着することが明らかとなった。ASM細胞におけるB7-H2の発現はTNF- α やpoly I : Cの刺激によってNF- κ B依存的に増強されるので、ウイルス感染もB7-H2の発現増強に寄与している可能性が示唆される。また、poly I : CによるB7-H2の発現増強にはPI3Kが一部関与していると推察される。

一方、ASM細胞をICOSで刺激すると、IL-6/IL-8産生のみならず、増殖反応も誘導された。同様の結果はCD40LやOX40の刺激によっても得られたが、IL-6/IL-8産生はCD40LやOX40の刺激によって強く誘導されるのに対し、増殖反応はICOSの刺激によって強く誘導された。しかし、ICOSによる細胞増殖はCD40L/OX40によって有意に増強されなかった。したがって、ASM細胞と活性化T細胞とのB7-H2/ICOS依存性の細胞接着はASM細胞

の過形成に関与していると考えられた。

E. 結論

ASM細胞におけるB7-H2シグナルは、CD40L/OX40シグナルとは異なり、細胞の過形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagihara Y: Regulatory mechanisms of IgE synthesis by human B cells. Clin. Exp. Allergy Rev. 6, 101-105, 2006.
- 2) 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.
- 3) 柳原行義: IgE産生の分子機構. アレルギー科 21, 524-532, 2006.
- 4) 柳原行義: IgE産生の分子機構. アレルギー 55, 522-527, 2006.
- 5) 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

2. 学会発表

- 1) 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-H2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.
- 2) 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.
- 3) 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Fc ϵ RIを介したマスト細胞のMIP-1 α 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.

G. 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

研究協力者

梶原景一、森嶋大貴、大路バク、稲葉奈緒美、生澤公一(国立病院機構相模原病院臨床研究センター)

難治性好酸球性炎症の発症メカニズム解明による気管支喘息の重症化予防に関する研究

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

重症喘息には好中球浸潤が著しいサブタイプがあることが知られている。本年度の研究では好中球性炎症と好酸球性炎症との病態的関連を解明するため、好中球の主要なメディエーターであるエラスターゼの好酸球に対する作用を検討して、複合的炎症制御の治療法開発の基礎とすることをめざした。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。さらに、上清中の各種サイトカインをビーズアレイシステムにて測定するとともに、リアルタイム PCR 法にて遺伝子発現を検討した。その結果、エラスターゼは好酸球からの活性酸素産生を濃度依存的に誘導することを観察した。好中球エラスターゼ阻害薬 (sivelestat sodium hydrate) はこの反応を完全に抑制した。サイトカイン産生では、エラスターゼによって好酸球から IL-8、GRO- α 、TNF- α 、IL-6 などの産生が誘導されることを蛋白レベル、遺伝子レベルで確認した。以上、好中球由来エラスターゼが好酸球のエフェクター機能を増強するとともに、好中球集積に関与するケモカインおよび炎症性サイトカインの産生を誘導することを明らかとした。好中球性炎症を合併する重症喘息では好中球と好酸球の相互作用による炎症増悪のサイクルが存在し、エラスターゼがその中心的役割を果たす可能性が考えられた。難治性喘息に対しては好中球エラスターゼをターゲットとした治療も考慮すべきである。

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組織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。喘息における主要なエフェクター細胞は好酸球であるが、難治例では好中球の浸潤が著明であることが多い。一般的に好酸球性炎症はステロイド応答性であり、アポトーシスもステロイドで比較的容易に誘導されるのに対して、好中球はステロイドによって細胞生存が延長されるなど少なからず不応性の性質を有する。実際、好中球性炎症が主体である COPD で吸入ステロイドが有効でないことはよく知られている通りであるが、難治性喘息も高用量の吸入ステロイドでコントロール困難なことが特徴である。したがって、好中球浸潤という難治喘息の病理学的特徴を考えると、好中球が難治性病態に関与している可能性は高い。とくに、好酸球性炎症に対する好中球の関与が解明されるべきであろう。

好中球は様々なメディエーターを産生するが、なかでもエラスターゼは COPD、急性肺障害などで中心的に働く細胞障害性分子として注目されている。喘息においても、気管支肺胞洗浄液でのエラスターゼ

濃度の上昇が報告されている。そこで本研究では難治性喘息の病態形成に果たす好中球の役割を明らかにすることを目的として、エラスターゼが好酸球機能に及ぼす作用を検討した。好酸球と好中球の複合的炎症のメカニズム解明によって、難治性喘息に対する新しい治療開発が期待できる。

B. 研究方法

好酸球は正常ボランティアの末梢血から CD16 negative selection 法により精製した。分離した好酸球を各種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還元法にて経時的に測定した。さらに、この反応系に好中球エラスターゼ特異的阻害薬である sivelestat sodium hydrate を加えて、同様に活性酸素産生を検討した。

サイトカイン産生については、好酸球をエラスターゼ存在下で 24 時間培養した後に上清を採取して、ビーズアレイシステム (Luminex; 日立ソフト) により、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、MCP-3、GRO- α 、RANTES、Eotaxin を同時に測定した。蛋白産生が認められたサイトカ

インについてはそれぞれの遺伝子発現を 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。

C. 研究結果

好中球由来エラスターゼは好酸球から濃度依存的に活性酸素産生を誘導した (図 1)。好中球が含有するその他の蛋白分解酵素として、カテプシン G の効果も検討したが、エラスターゼと比較するとその作用は強くなかった (図 2)

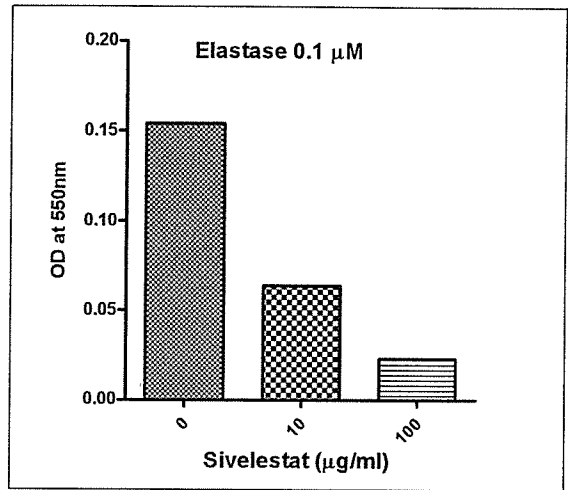


図3 エラスターゼ阻害薬による活性酸素産生抑制

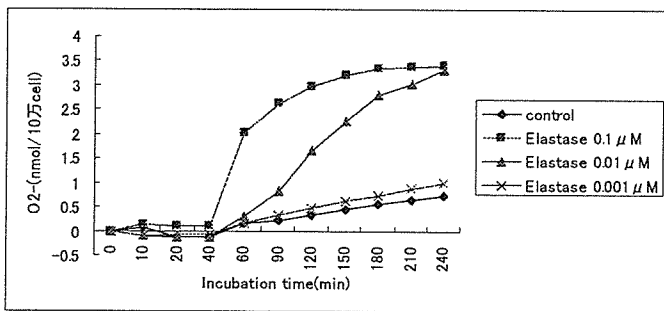


図1 エラスターゼによる好酸球活性酸素産生

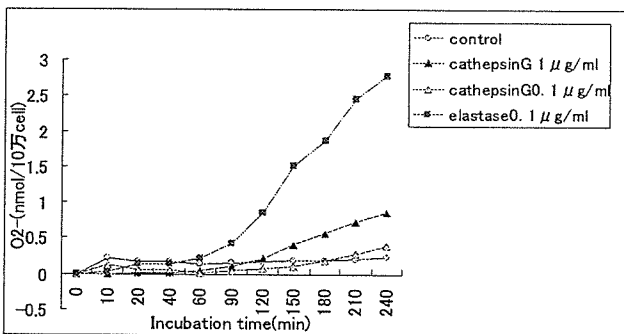


図2 Cathepsin Gによる好酸球活性酸素産生

一方、エラスターゼ阻害薬 sivelestat sodium hydrate はエラスターゼによる好酸球からの活性酸素産生を濃度依存的に抑制した (図 3)。同様にタンパク分解酵素阻害作用を有する α 1 アンチトリプシンで同様の検討を行ったが、効果は認められなかった。

次に、エラスターゼによる好酸球からのサイトカイン及びケモカインの産生誘導作用について検討した。エラスターゼは濃度依存的にいくつかのサイトカインの産生を誘導した。図 4 に IL-6 と TNF- α の産生を示す。同様に、GM-CSF、IL-1 β の産生も誘導された。IL-4、IL-5 その他のサイトカインの産生は認められなかった。

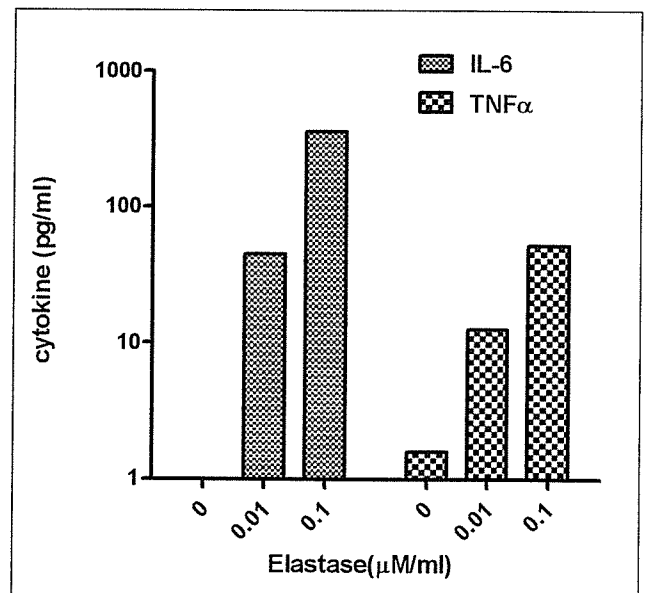


図4 エラスターゼによる好酸球からのサイトカイン産生

ケモカインでは IL-8、GRO- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β の産生が認められた。図 5 に IL-8 と GRO- α の産生を示す。Eotaxin、RANTES などでは明らかな産生誘導は認められなかった。