

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

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
—ディーゼル粒子によるダニ抗原誘発マウス喘息様病態形成の増悪—

分担研究者 田中 宏幸（岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 准教授）

研究要旨 昨年度の厚労科学研究では、室内環境因子の意義を明らかにする目的で、ダニ抗原による喘息様病態形成に及ぼす影響を検討した。その結果、マウスの気管内にダニ抗原粗抽出物をアジュバント非存在下にて反復投与することにより、気道過敏性、気管内好酸球増多、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇、BALF 中 Th2 サイトカインならびに TGF- β 1 産生の増加、気道上皮杯細胞の過増生・肥厚ならびに基底膜下の線維化形成を特徴とするマウス喘息モデルを確立することができた。

本年度は、このモデルを用いて喘息様病態形成の難治化・重症化に及ぼす室外環境因子、特にディーゼル排気粒子(DEP)の影響を検討した。実験は、当教室のダニ抗原誘発マウス喘息モデルのプロトコールに従った。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に *Dermatophagoides farinae* (Der f)の粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。DEP は、種々のタイミングでダニ抗原と同時にあるいはダニ抗原投与に先行して気管内投与した。なお、今回用いたダニ抗原の用量は、それ自体でわずかに気道内好酸球増多が認められる程度の用量とし、陽性対象としてダニ抗原単独投与で喘息様病態形成が確実な用量も含めて検討した。一方、DEP の量に関しては、環境基準値の約 0.5、1.5 および 5 倍換算量とした。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、その直後に右肺は気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、左肺は組織学的検討を行った。

ダニ抗原(Der f)をマウスの気管内に頻回投与することにより、その用量に依存して喘息様病態形成および気道リモデリング形成が観察された。これに対し、DEP をダニ抗原投与時に投与した場合、ダニ抗原単独投与ではほとんど変化が認められなかったいずれのパラメーターについても、DEP の投与量に依存して反応の有意な増強が認められた。特に環境基準値の 1.5 および 5 倍量の DEP 併用投与群では、ダニ抗原単独投与で十分に喘息様病態形成が認められる陽性対照群とほぼ同程度の反応を引き起こした。この DEP の影響をさらに詳細に検討する目的で、DEP を初回ダニ抗原気管内投与時のみに投与した場合あるいは DEP を初回ダニ抗原投与に先行して投与した場合も検討したが、いずれの場合にも喘息様病態形成の有意な増悪が観察された。

以上の成績より、DEP は抗原と共存して存在する場合にアジュバント効果を示すことが明らかとなり、特に初回抗原曝露時に気道局所に高用量の DEP が存在すると喘息様病態形成の有意な増悪が認められることが明らかとなった。今後、本モデルを用いてこれらの増悪メカニズムを明らかにすることにより、喘息の難治化・重症化の治療標的を探索することが可能になるものと思われる。

研究協力者

稲垣直樹（岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室・教授）

従来、気管支喘息の発症・難治化・重症化の基礎研究には、in vitro 細胞培養実験および in vivo 動物モデルを用いた解析が行われてきた。このうち、代表的な in vivo 動物モデルとして知られているマウス喘息モデルは、卵白アルブミン(OA)と水

A. 研究目的

酸化アルミニウムゲル (アラム) を用いて全身的に感作し、その後、抗原を反復曝露することにより喘息様病態形成が認められることを特徴としている。これらのモデルは、いわゆる Th2 依存性の免疫反応の解明などに大きく寄与してきたが、近年の喘息患者数の増加およびその病態の難治化・重症化を解明する上で、臨床をより反映する動物モデルの確立が急務であると思われる。特に、感染や大気汚染などの喘息の難治化・重症化の原因を解明する上で、抗原性、抗原感作部位、アジュバントの使用などを考慮したモデル作成が重要である。

以上を鑑み、近年、当講座ではマウス気管内にダニ抗原 (Der f) の抽出物を頻回投与することによりマウス喘息モデルを確立した。すなわち、アラムなどのアジュバントを使用せず、喘息の主要抗原であるダニ抗原を気道内に反復投与することにより喘息様病態形成ならびに気道リモデリング形成が生ずることから、従来モデルに比し臨床に近いモデルであると思われる。

そこで、本年度はこのダニ抗原誘発マウス喘息モデルを用いて喘息様病態形成の難治化・重症化に及ぼす室外環境因子、特にディーゼル排気粒子 (DEP) の影響を検討した。すなわち、まず初めに DEP を抗原投与期間中に併用投与し、抗原による感作およびその後の喘息病態形成に及ぼす影響を検討した。次いで、抗原認識から感作成立までに DEP が及ぼす影響を初回抗原投与時に DEP を共存させることにより検討した。最後に、DEP があらかじめ気道局所に存在している場合を想定し、DEP を抗原投与前および初回抗原投与時に投与し影響を検討した。

B. 研究方法

実験は、当教室のダニ抗原誘発マウス喘息モデルのプロトコールに従った。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に *Dermatophagoides farinae* (Der f) の抽出物を複数回投与して反応を惹起した。なお、今回用いたダニ抗原の用量は、それ自体でわずかに気道内好酸球増多が認められる程度の用量 (低用量) とし、陽性対象としてダニ抗原単独投与で喘息様病態形成が確実な用量 (高用量) も含めて検討した。一方、DEP の量に関しては、環境基準値の約 1/2、1.5 および 5 倍換算量とした。DEP の投与は、以下のように行った。すなわ

ち、抗原投与期間併用投与の検討では、抗原と同時に 4 回気管内投与した。抗原初回投与時併用投与の検討では、抗原と同時に初回抗原投与日および翌日のみ気管内投与した。抗原投与前および初回投与時併用投与の検討では、初回抗原投与 2 週間前、1 週間前および初回抗原投与日の 3 日のみ気管内投与した。

それぞれのプロトコールにおいて、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、その直後に右肺は気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、左肺は組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物の取り扱いならびに実験方法に関しては、本学動物実験委員会の承認を受け、その規約を遵守した。

C. 研究結果

① 抗原投与期間併用投与の影響

まず、抗原投与期間内に DEP を併用投与することにより、喘息様病態形成ならびに気道リモデリング形成における DEP の影響を検討した。その結果、抗原によって誘発される気道反応性の亢進、BALF 中好酸球数の増加、Th2 サイトカイン量の増加、Th1 サイトカイン量の減少、eotaxin 量の増加ならびに血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇の用量依存性的かつ有意な増強が認められた。また、ダニ抗原投与による BALF 中 TGF- β 1 量の増加、肺中の hydroxyproline 量 (コラーゲンの特異的構成アミノ酸) の増加、気道上皮の杯細胞の過増生・肥厚および基底膜下の膠原線維沈着量の増加についても、用量依存的な増強が認められた。これらの成績から、DEP はダニ抗原によって誘発される気道炎症ならびに気道リモデリング形成に対しアジュバント作用を示すことが明らかとなった。

② 初回抗原投与時併用投与ならびに抗原投与前および初回投与時併用投与の影響

これまでの報告では DEP と抗原の併用投与による検討が多く、喘息病態発症以前および初期における DEP の影響については不明である。そこで、喘息病態発症初期における DEP の影響を検討する目的で初回抗原投与時のみ併用投与した。さらに、喘息病態発症以前における DEP の影響を検討する目的で抗原投与以前に投与した。その結果、両検討とも DEP の併用によりダニ抗原に

よって誘発される気道炎症ならびに気道リモデリング形成の増強が認められた。さらに、回収した BALF 中には DEP が認められ、肺組織中にも DEP の沈着が観察された。

D. 考察

本研究では、ダニ抗原誘発マウス喘息モデルを用いて喘息様病態形成の難治化・重症化に及ぼす室外環境因子、特に DEP の影響を検討した。その結果、DEP と抗原の併用投与により、BALF 中好酸球数の増加の増強が認められた。また、成熟好酸球の活性化およびまた前駆細胞の局所における分化、成熟、活性化に作用する IL-5 量の増加、さらに、前駆細胞および好酸球を刺激し、気道局所に遊走させる eotaxin 量の増加も認められた。この eotaxin は気道上皮細胞、平滑筋細胞および線維芽細胞から産生され、IL-4 および IL-13 のような Th2 サイトカインによって産生が増強される。本研究においても、これら Th2 サイトカイン量の増加が認められており、その結果として eotaxin 産生を増強させていると思われる。これまでに、ダニ抗原と DEP の併用気管内投与により肺組織中にケモカインである RANTES、eotaxin および GM-CSF タンパク量の増加が観察されることが報告されている。したがって、DEP による BALF 中好酸球増多の増強は Th2 サイトカインの産生増加およびそれに伴うケモカインの産生増強によるものと推察される。

本研究では、DEP によって気道過敏性の増強が観察された。これまでに、マウス喘息モデルを用いて、気道過敏性発症機序について様々な検討がなされているが、詳細に関しては明確になっていない。しかしながら、IL-4 KO マウス、IL-5 KO (受容体欠損も含む) マウスあるいは IL-13 KO では気道過敏性が発症しないことが確認されており、Th2 サイトカインが気道過敏性発症に主要な役割を担っていることが考えられる。したがって、本研究においても DEP による気道過敏性の増強は DEP と抗原の併用投与によるこれら Th2 サイトカイン産生量の増加による Th2 反応の増強が一因であると推察される。

また、DEP 併用によって抗原投与による気道リモデリング形成の増強が認められた。これまでに、*in vitro* においてヒト気道上皮細胞にディーゼル排気 (diesel exhaust: DE) を曝露すると TGF- β 1 の mRNA 発現の増強が認められ、さらに、この DE を DEP が通過できないフィルターに通し同様

に曝露させると発現増強は認められないことが示されている。すなわち、DE のうち DEP などの粒子物質がその発現増強には重要であると思われる。したがって、本研究においても DEP が気道上皮に作用し TGF- β 1 mRNA 発現量を増加させ、さらに抗原投与による Th2 反応への傾きにより相乗的に TGF- β 1 産生量が増加したと推察される。また、BALF 中 TGF- β 1 量と基底膜下の線維化形成については、基礎および臨床研究の両面において高い相関が認められており、TGF- β 1 量の増加および Th2 依存性の気道炎症の増強により線維化の増強が引き起こされたと推察される。

また、DEP のアレルギー疾患の増強に関しては、DEP の含有成分であるピレンによる IL-4 mRNA の発現増強が認められており、さらに DEP 投与により IFN- γ 産生が抑制されることが報告されている。さらに、DEP は抗原と結合可能であり、その結果として、DEP が抗原のキャリアとして働いている可能性が示唆されている。したがって、DEP は前述のようにそれ自体で炎症を誘発するばかりでなく、抗原との併用により抗原性を高め、炎症反応を相乗的に増強していると考えられる。

しかしながら、本研究において DEP を初回抗原投与時および抗原投与以前に投与し影響を検討したところ、DEP の抗原投与期間中の併用投与での表現型と同様の表現型が得られた。DEP の初回抗原投与時併用投与ならびに抗原投与前投与の検討は、DEP 投与の 30 日後に各種の測定を行っており、DEP の炎症誘発作用による相乗効果のみで増強されたとは考えにくい。すなわち、初めて抗原が体内に侵入する際、あるいはそれ以前に DEP が存在することがこのアジュバント作用に重要であると考えられる。一方、DEP 投与によりヒトにおいて抗原提示細胞上の CD80 の mRNA の発現増強が報告されている。この CD80 は T 細胞上の CD28 と高い親和性を持っており、相互作用により T 細胞に活性化シグナルを伝達し、サイトカイン産生を誘導する。したがって、本研究では、DEP が直接抗原提示細胞に作用し、アジュバント作用を示したとも考えられる。しかしながら、抗原提示における DEP の影響については不明な点が多く、今後、さらなる検討が必要であると思われる。

以上、ダニ抗原誘発気道炎症ならびに気道リモデリング形成における DEP の影響を検討した。その結果、DEP を抗原投与期間中、初回投与時ならびに抗原投与前に投与することにより、気道炎

症および気道リモデリング形成の増強が認められた。したがって、DEPは気道炎症および気道リモデリング形成に対しアジュバント作用を有することが明らかとなり、抗原提示の際に強く影響を及ぼすことが示唆された。臨床において、喘息の発症と大気汚染との間には強い関連性が示されており、喘息病態を増悪することが示されている。本研究では臨床に類似したマウスモデルを用いていることから、今後、このアジュバント作用の原因およびアジュバント作用の軽減を目的とし、さらに詳細に検討する必要があると思われる。

E. 結論

代表的な室内抗原であるダニ抗原を用いて、気管支喘息の難治化・重症化の一因である気道過敏性ならびに気道リモデリング形成における室外環境因子である DEP の影響を検討した。その結果、ダニ抗原(*Der* Ⅱ)の気管内投与により生ずる気道過敏性、好酸球性気道炎症ならびに気道リモデリング形成は、抗原投与期間中、初回投与時ならびに抗原投与前に DEP を併用投与することにより、気道炎症および気道リモデリング形成の増強が認められた。すなわち、DEPが主要な室内抗原であるダニ抗原によって生ずる喘息様病態形成の増悪因子であり、気管支喘息の難治化・重症化の要因であることが示唆された。今後、本モデルを使用して、その増悪メカニズムを解明することにより、難治化の機序ならびに治療標的の探索が可能になると思われる。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文

- 1) Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 578: 87-96.
- 2) Wirotasangthong M, Inagaki N, Tanaka H, Thanakijcharoenpath W, Nagai H. Inhibitory effects of *Piper betle* on production of allergic mediators by

bone marrow-derived mast cells and lung epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* 2008; 8: 453-457.

- 3) Hirose I, Tanaka H, Takahashi G, Wakahara K, Tamari M, Sakamoto T, Kojima S, Inagaki N, Nagai.: Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol. (in press)*.
- 4) Nakao I, Kanaï S, Ohta S, Matsushima H, Arima K, Yuyama N, Yamaya M, Nakayama K, Kubo H, Watanabe M, Sagara H, Sugiyama K, Tanaka H, Toda S, Hayashi H, Inoue H, Hoshino T, Nakajima A, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H, Hasegawa M, Fukuda T, Green ED, Izuhara K. Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstruction pulmonary disease. *J. Immunol. (in press)*.

2. 総説

- 1) 田中宏幸, 永井博式. 気道過敏性. 喘息, 2007; 20: 21-26.
- 2) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式. マウス喘息モデルの有用性とその限界. 喘息, 2007; 20: 32-37.
- 3) 坂田 孝, 宮本樹美代, 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式. ダニ抗原誘発気道炎症モデルへのフローサイトメトリー法の適用検討. アレルギーの臨床, 2007; 27: 61-65.
- 4) Nagai H, Tanaka H, Inagaki N, Teramachi H, Tsuchiya T: Possible role of prostaglandins in allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy Rev.* 2007; 7: 32-35.

3. 学会発表

- 1) 柳楽庸史, 田中宏幸, 三好康介, 橋本未樹子, 江崎友哉, 松本次郎, 稲垣直樹, 永井博式: アレルギー性気道炎症における protease-activated receptor (PAR)2 の意義. 第 57 回日本アレルギー学会総会 ミニシンポジウム MS10-7 (2007 年 11 月、横浜)
- 2) 橋本未樹子, 高橋 剛, 田中宏幸, 三好康介, 永平和広, 寺川真紀, 稲垣直樹, 永井博式: SCP200401 のアレルギー性気道炎症に及ぼす影響. 第 57 回日本アレルギー学会総会 一般演題 173 (2007 年 11 月、横浜)

3) 三好康介, 田中宏幸, 橋本未樹子, 江崎友哉, 柳楽庸史, 平井博之, 永田欽也, 中村正孝, 稲垣直樹, 永井博弑: ダニ抗原誘発マウス気道炎症における CRTH2 の意義. 第 57 回日本アレルギー学会総会 一般演題 177 (2007 年 11 月、横浜)

4) 江崎友哉, 田中宏幸, 三好康介, 橋本未樹子, 柳楽庸史, 平井博之, 永田欽也, 中村正孝, 稲垣直樹, 永井博弑: ダニ抗原誘発マウス気道炎症における CRTH2 の意義. 第 57 回日本アレルギー学会総会 一般演題 178 (2007 年 11 月、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

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

－細胞内シグナルを標的とした好酸球機能・気道炎症の制御－

分担研究者:大田 健(帝京大学医学部内科学教授)

研究協力者:足立哲也(帝京大学医学部内科学講師)、長瀬洋之(帝京大学医学部内科学講師)

研究要旨 気管支喘息の病態は気道の慢性炎症であり、炎症の程度が重症度を規定すると考えられている。特に気道炎症が遷延するとリモデリングに至り、喘息難治化の要因として重用視されている。好酸球は気道炎症に際して最も重要なエフェクター細胞であるが、近年リモデリングにおける役割が示唆されている。PTEN は種々の細胞機能を負に制御しているが、現在までのところ好酸球での機能解析の報告はない。本研究では細胞内に受動的に目的タンパクを導入できる TAT 融合タンパクを用い、好酸球に PTEN を強制導入させてその効果を検討した。作製した TAT-PTEN は好酸球と培養することで受動的に細胞質内に移行し、in situ で PTEN としての機能を惹起した。TAT-PTEN はアレルギー患者から分離した好酸球の生存を有意に抑制したが、健常人の好酸球ではその効果を認めなかった。一方好酸球のドナーにかかわらず、好酸球の遊走は TAT-PTEN により有意に抑制された。他の細胞での報告と同様に PTEN が好酸球の機能を抑制することが示され、難治化抑制の標的となる可能性が示唆された。臨床応用を踏まえ、今後マウスを用いた in vivo での検討を施行の予定である。

A. 研究目的

気管支喘息の病態は気道の慢性炎症であり、炎症の程度が重症度を規定すると考えられている。気道の慢性炎症はやがて非可逆的な変化であるリモデリングに至り、喘息難治化の有力な原因と考えられている。好酸球は気道炎症における最も重要なエフェクター細胞として考えられてきたが、近年の可溶性抗IL-5抗体を使用したヒトでの臨床試験では気道過敏性における好酸球の役割が疑問視された(Lancet 356:2144-8:2000)。しかしその後の研究にて喘息患者気道への好酸球浸潤と気道上皮基底膜下の細胞外基質沈着が抗IL-5抗体によって抑制されたことより、好酸球が気道リモデリングに関与することが示唆されている(J Clin Invest 112:1029-36:2003)。さらにこのことを裏付けるように、好酸球欠失マウスではリモデリングにみら

れる基底膜下線維化や平滑筋過形成が抑制される(Science 305:1776-9:2004)。以上のことを踏まえると、好酸球を標的とした治療戦略はなおも意義があると考えられる。

PTEN は PIP₃ を脱リン酸化する酵素であり、PI3K 経路を負に制御する分子として近年脚光を浴びている。PI3K-Akt の経路は細胞生存に関わることが知られており、特に腫瘍細胞では PTEN の変異がおきることによりアポトーシスの誘導がおこらないことが、癌化の機序の一つであるとされている(Cell 100:387-90:2000)。また同経路は細胞遊走にも深く関与しており、PTEN もその制御を担っていることが報告されている(Cell 109:541-4:2002)。またリンパ球などの免疫細胞でも、PTEN は増殖や生存を制御している(Immunol Rev 192:80-97:2003; Biochem Soc Trans 32:362-5:2004)。

さらに喘息モデルマウスの系では、PTEN cDNA の経気道的な投与により好酸球浸潤と気道過敏性が抑制されたと報告されている(J Clin Invest 111:1083-92: 2003)。これらの報告を考慮すると、PTEN が好酸球機能を通じてアレルギー性炎症に関わっていることが想定されるが、いまだ言及した報告はない。

B. 研究方法

(1) TAT-PTEN タンパクの作製

目的タンパクを細胞内に効率よく導入するための手法として、TAT 融合タンパクを利用した(Nat Med 4: 1449-52:1998)。PTEN の配列を含むコスミドベクターは、理研から供与を受けた。PCR を用いて PTEN に TAT の配列を伸張した後 pCRII ベクターに組み込み、大腸菌 (TOP10) に移入した。大腸菌により産生された His-TAT-PTEN を Ni カラムで分離し、透析をして精製した。

(2) TAT-PTEN の細胞内移行

作製した TAT-PTEN が細胞内に効率よく移行するかどうかを確認するために、以下の 2 通りの方法を試みた。好酸球を TAT-PTEN と培養した後に細胞抽出液を電気泳動後、抗 PTEN 抗体あるいは抗 His 抗体によるウエスタンブロットを施行した。また TAT-PTEN を FITC でラベルした後に好酸球と培養し、細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

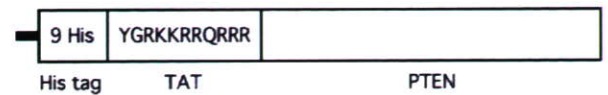
(3) TAT-PTEN の好酸球機能への効果

まず細胞内へ移行した TAT-PTEN の in situ での活性を評価するために、IL-5 あるいは eotaxin 刺激後の好酸球 Akt リン酸化に対する効果を検討した。好酸球生存と遊走に対する効果は、それぞれ Annexin V/PI 二重染色法、Boyden chamber 法により検討した。

C. 研究結果

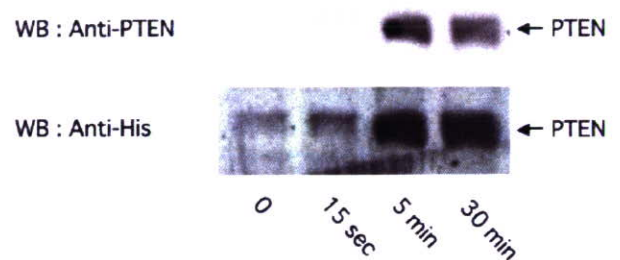
PTEN を細胞内に効率よく導入するために、N 末端側に TAT 配列(YGRKKRRQRRR)を付加した(図1)。

図1 作製した TAT-PTEN の構造



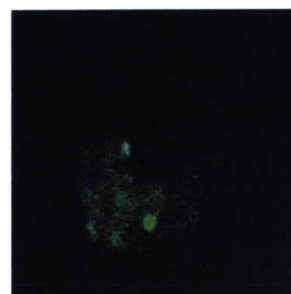
TAT-PTEN の細胞内移行を検討するために、まずウエスタンブロット法で確認した。好酸球と TAT-PTEN を培養した後に細胞抽出液を電気泳動し、抗 PTEN 抗体あるいは抗 His 抗体によるウエスタンブロットを行った。培養時間依存性に TAT-PTEN が細胞内に取り込まれていくことが示された(図2)。

図2 TAT-PTEN の細胞内移行



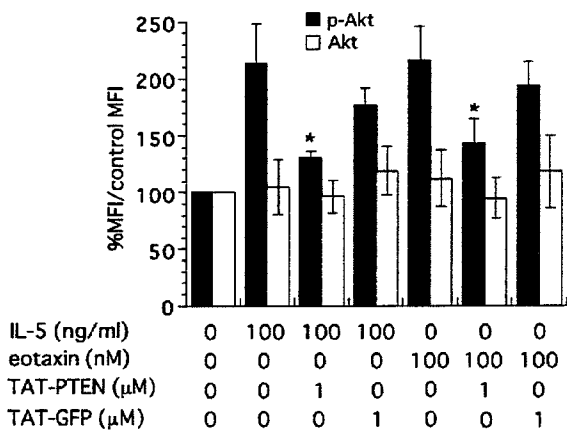
移行した TAT-PTEN の細胞内局在を確認する目的で、FITC でラベルした TAT-PTEN と好酸球を培養し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。その結果、培養 30 分で細胞質にびまん性に取り込まれることがわかった(図3)。

図3 TAT-PTEN の細胞内局在



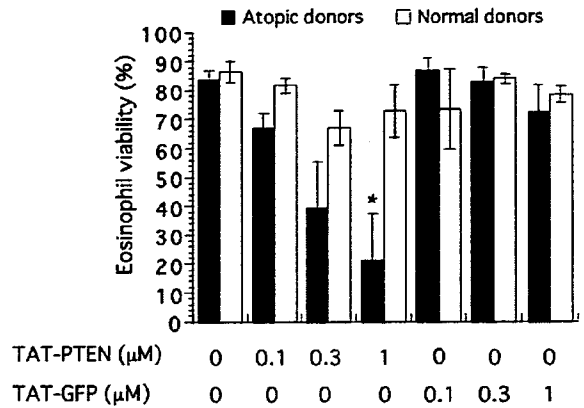
細胞内に導入された TAT-PTEN がフォスファターゼとして機能するかを評価するために、Akt リン酸化に対する影響を Bio-Plex Phosphoprotein Assay (BioRad) と Luminex System (Luminex) を用いて検討した。IL-5 あるいは eotaxin による好酸球 Akt のリン酸化が TAT-PTEN により有意に抑制されたことより、TAT-PTEN が in situ で機能することが示唆された(図4)。コントロールである TAT-GFP は、Akt リン酸化に対して影響を及ぼさなかった。

図4 Akt リン酸化に対する TAT-PTEN の効果



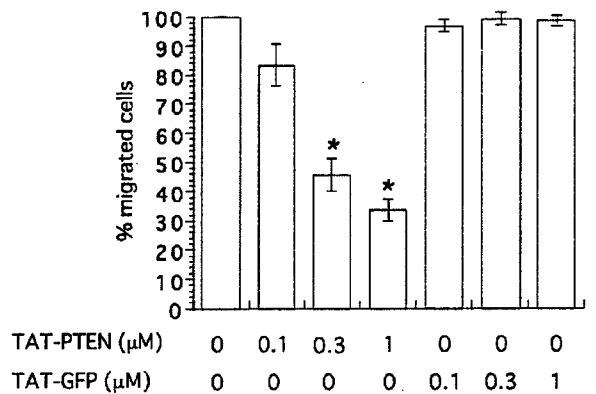
好酸球生存に対する TAT-PTEN の効果を検討した。TAT-PTEN を反応させた好酸球を IL-5 存在下に 24 時間培養し、Annexin V/PI 二重染色法にて生存率を算定した。興味深いことに、アレルギー患者から分離した好酸球では TAT-PTEN によりその生存が抑制されたのに対し、健常人の好酸球ではその効果を認めなかった(図5)。TAT-GFP に関しては、いずれも効果を認めなかった。

図5 好酸球生存に対する TAT-PTEN の効果



次に、好酸球遊走に対する TAT-PTEN の効果を検討した。好酸球を TAT-PTEN と培養した後、eotaxin に対する遊走を Boyden chamber 法を用いて検討した。TAT-PTEN は好酸球の遊走を有意に抑制したのに対し、TAT-GFP ではその効果を認めなかった(図6)。この遊走の系では、好酸球のドナーとの関連は認めなかった。

図6 好酸球遊走に対する TAT-PTEN の効果



D. 考察

細胞内に目的のタンパクを導入するための手法としての TAT 融合タンパクは、当初 HIV の TAT タンパクが細胞内に受動的に移行することの発見に端を発す

る(Cell 55:1179-93:1988)。好酸球でも TAT-dnRas などが細胞内シグナルを有効に阻害することが示され (Blood 98:2014-21:2001)、成熟細胞である好酸球での研究には非常に有望視されている。今回作製した TAT-PTEN は、好酸球内に効率よく導入され、また in situ で PTEN として機能することがわかった。

PTEN は腫瘍細胞・免疫細胞などで、アポトーシスに関与することが報告されている(Cell 95:29-39:1998; J Immunol 164:1934-9:2000; J Immunol 165:1300-6:2000)。本年度の研究にて TAT-PTEN がアレルギー患者の好酸球生存を抑制したことは、アポトーシス誘導という他の細胞での結果に合致するものである。健常人からの好酸球で効果を認めなかった機序は不明であるが、恐らくアレルギー患者と健常人では生存シグナル経路の違いが存在するものと思われる。

細胞遊走における PTEN の役割がマウスの好中球で明らかにされ、内因性の PI3K と PTEN は細胞内にそれぞれ局在化して分布することにより運動形態を保つとされている(Cell 114:215-27:2003)。一方 T 細胞に PTEN を強制発現させると、アクチン重合と細胞運動が抑制されるという報告がある(J Cell Sci 117:6207-15:2004)。本研究でも TAT-PTEN 導入により好酸球の遊走が抑制され、前述の強制発現系の結果に合致するものである。

E. 結論

本研究において我々は細胞内分子である PTEN を標的とし、好酸球機能を抑制するタンパクを作製した。TAT-PTEN を好酸球に導入することにより、好酸球の生存と遊走をそれぞれ抑制しえた。近年好酸球は気道リモデリングに関与するとされ、喘息難治化に際して重要な役割を担っていると考えられる。喘息の有病率が増加する一方で、難治化を抑制する標的分子を模索することは、喘息死の撲滅や医療コストの削減な

ど社会的な利益にもつながると考えられる。本年度の in vitro での結果をふまえ、来年度はマウスを用いた in vivo での効果を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1・論文発表

Tashimo H, Yamashita N, Ishida H, Nagase H, Adachi T, Nakano J, Yamamura K, Yano T, Yoshihara H, Ohta K. Effect of procaterol, a β_2 selective adrenergic receptor agonist, on airway inflammation and hyperresponsiveness. Allergol Int 56: 241-7, 2007.

2・学会発表

足立哲也、花香里子、増田倫子、吉原久直、長瀬洋之、大田 健. 喘息モデルマウスにおける TAT-PTEN の気道炎症抑制効果. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 19 年 11 月. 横浜市・長瀬洋之、山口正雄、矢野智湖、吉原久直、山村浩一、鈴木真穂、倉持美知雄、石田博文、足立哲也、大田 健. ウイルス性気道炎症におけるマスト細胞の生体防御的役割の検討. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 19 年 11 月. 横浜市

山村浩一、足立哲也、増田倫子、長瀬洋之、大田 健. Luminex system を用いた好酸球細胞内タンパクリン酸化の網羅的検討. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 19 年 11 月. 横浜市

矢野智湖、長瀬洋之、山村浩一、鈴木真穂、倉持美知雄、石田博文、足立哲也、大田 健. 低 pH が気道上皮細胞からサイトカイン・ケモカイン分泌に及ぼす影響. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 19 年 11 月. 横浜市

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）

分担研究報告書

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

分担研究者 烏帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究協力者 中村 裕之 金沢大学大学院医学系研究科環境生態医学・公衆衛生学教授

研究要旨：気管支喘息の重症化に関与する遺伝子を見いだすために単球、繊維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞などから、LPS、IL-1、TNF- α 等の炎症性刺激を受け産生されるMonocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1, CCL2)の遺伝子多型を、軽症、重症よび健常人で比較し、重症化におけるMCP-1の役割について検討した。対象は、難治群としてJGL98で規定されたStep 4の最重症の18例、非難治群としてStep 1-2の軽・中等症の34例、これらの対照としての健常人50例であり、これら3群において相関解析を実施した。その結果、3群間でT901CとC1543Tの多型頻度には有意な差はなかったが、重症群のA-2518GにおけるGのAllele頻度80.6%は、健常群の55.0%に比し有意に高いことが認められた。重症群と軽症群は、いずれも健常群と比較して有意に低い血清MCP-1値を認めた。A-2518GのGGおよびA/Gを呈する人の血清MCP-1値は、A/Aの人のそれより有意に低い値であることも認められた。以上の結果から、喘息の重症化の発症機序には、MCP-1遺伝子によって引き起こされる可能性が示唆された。特にpromoter領域の多型によってMCP-1の産生量の低下が重症化の病態に関与していることが推測された。MCP-1の関与を中心とした喘息症における機能解析が今後の課題である。

A. 研究目的

気管支喘息症(BA)の発症および重症化に関わる遺伝子を同定することで、重症喘息症の診断法を確立し、予防法および治療法の開発、特にTailor-made医療の実現の礎を築くことを目的とした。これまで、我々は、CC chemokine receptor (CCR) family遺伝子であるCCR3のT51C多型とBAとの間に有意な関連を認めたが、重症群と軽症群の間の差は認めることができなかった。本年度は、単球、繊維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞などから、LPS、IL-1、TNF- α 等の炎症性刺激を受け産生されるMonocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1,

CCL2)の遺伝子多型を、軽症、重症よび健常人で比較し、重症化におけるMCP-1の役割について検討した。

B. 研究方法

東京都品川区五反田地区、京都市、山梨県牧丘町地区、金沢地区、富山地区において行われたアレルギー検診および病院研究によって、以下の対象者をリクルートし、患者対照研究（相関解析）を実施した。

対象は、重症群としてJGL98で規定されたStep 4の18例 (52.9 \pm 4.33歳、平均値 \pm 標準誤差)、軽症群

としてStep 1-2の34例 (49.5±2.56歳)、これらの対照として、喘息、花粉症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー歴を有さない健常群50例 (48.8±2.446歳)である。これらの3群の間に年齢差、性差はなく、また重症群と軽症群は、いずれも健常群と比

較して総IgE値 (RIST) は有意に高かったが、重症群と軽症群間には有意な差は認められなかった (表1)。また、同時に血清MCP-1値を比較した。調べた遺伝子座位はA-2518G、T901CとC1543Tである (図1)。

表1 対象の特性

群	人数	(平均値±標準誤差、歳)			合併症#
		年齢	(RIST, U/ml)	男女 (比)	
対照	50 人	48.8±2.44	78.0±11.7	23:27	(-)
軽症群	34 人	49.5±2.56	492±124**	16:18	(-)
重症群	18 人	52.9±4.33	543±128**	9:9	(-)

#花粉症、アトピー性皮膚炎, **p<0.01 (対照群と比較したとき)

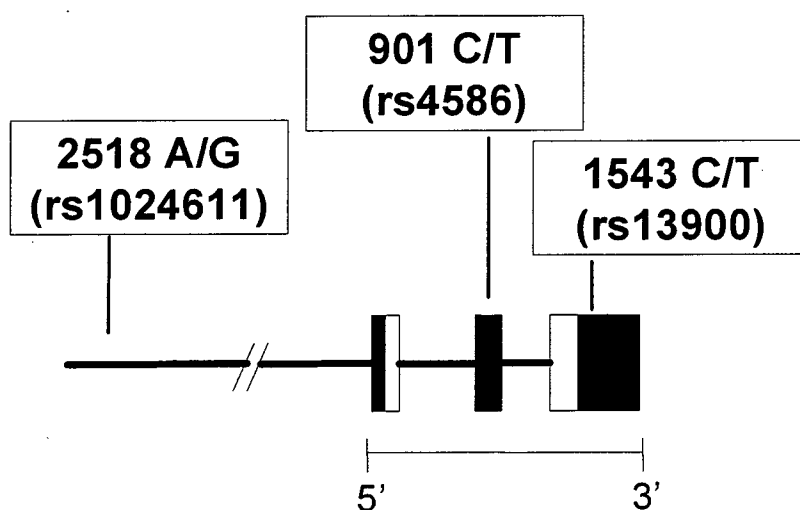


図1 MCP-1遺伝子における遺伝子多型

C 研究結果

- 1) 相関解析の結果、3群間でT901CとC1543Tの多型頻度には有意な差はなかったが、重症群のA-2518GにおけるGのAllele頻度80.6%は、健常群の55.0%に比し有意に高いことが認められた(表2)。
- 2) 重症群と軽症群は、いずれも健常群と比較して有意に低い血清MCP-1値を認めた。A-2518GのGGおよびA/Gを呈する人の血清MCP-1値は、A/Aの人

のそれより有意に低い値であることも認められた (図2)。

D 結論

以上の結果から、喘息の重症化の発症機序には、MCP-1遺伝子によって引き起こされる可能性が示唆された。特にpromoter領域の多型によってMCP-1の産生量の低下が重症化の病態に関与しているこ

とが推測された。MCP-1の関与を中心とした喘息症における機能解析が今後の課題である。

表2 重症群、軽症群、対照群におけるにおけるCCR遺伝子群多型についての相関解析

Locus	Allele	Control (N=50)		Slight Asthma (N=34)		Severe Asthma (N=18)	
		Number	Frequency ¹⁾	Number	Frequency ¹⁾	Number	Frequency ¹⁾
A-2518G	A/A	10	55.0	4	67.6	1	80.6*
	A/G	25		14		5	
	G/G	15		16		12	
T901C	T/T	6	58.0	6	50.0	4	47.2
	T/C	30		22		11	
	C/C	14		6		3	
C1543T	C/C	8	58.0	3	64.7	4	50.0
	C/T	26		18		10	
	T/T	16		13		4	

Frequency of minor allele (%), Statistical significance in odds ratio compared to that in control, *p<0.05.

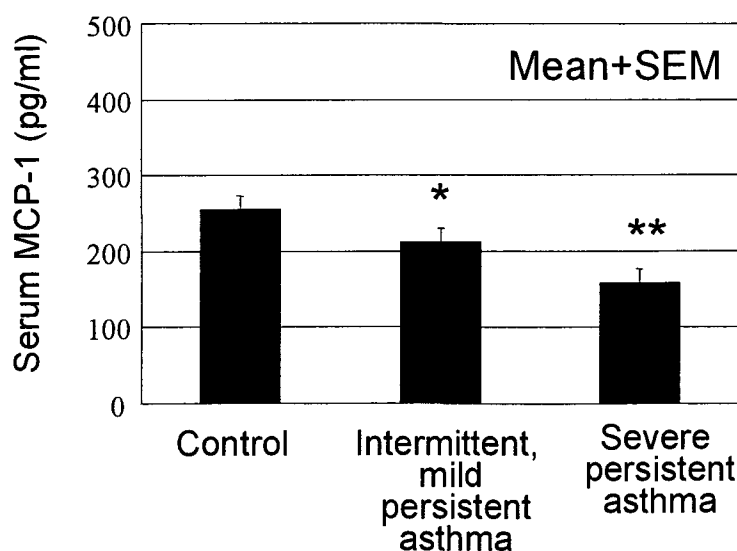


図2 重症群、軽症群、対照群における血清MCP-1値

Statistical significance in the serum MCP-1 level compared to that in control, *p<0.05. **p<0.01.

E. 研究発表

1. 論文発表

(原著)

- 1) 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 pollinosis.
Int Arch Allergy Immunol. 2007;142(4):329-34.
- 2) 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 2007; 12(2): 21-27
- 3) Kimura T, Yokoyama A, Kohno N, Nakamura H, Eboshida A.
Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma.
Allergology Int, (in press)
- 4) Ohya A, Kato Y, Kimura T, Onaka H, Ohzono H, Mikami K, Matsumoto H. P-F study can predict the psychiatric symptoms of patients confined to the germ-free unit. Tokai J Exp Clin Med. 32(1): 30-33, 2007.
- 5) A. Eboshida, T. Kimura, S. Uchida, Y. Tsuda
Computer-Assisted Measurement of Perceived Stress: An Application for a Community-Based Survey
Vol. 54, No. 3, 61-65, September, 2007 HIJM 54-10

(学会発表等)

- 1) 木村友昭、横山彰仁、河野修興、中村裕之、鳥帽子田彰 気管支喘息患者における自覚ストレス、重症度およびQOLとの関連 (ポスター発表) 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成19年6月(横浜)
- 2) 木村友昭、津田康民、内田誠也、山岡淳 PC版VASおよびFaceスケールの妥当性の検討(口

頭発表)

- 日本応用心理学会第74回大会、平成19年9月(奈良)
- 3) Kimura T, Yokoyama A, Nakamura H, Kohno N, Eboshida A. Perceived Stress and Quality of Life among Japanese Adults with Asthma. (Poster) ISOQOL 14th Annual Conference, Oct/2007 (Toronto)
 - 4) 木村友昭、荒木善光、鳥帽子田彰 広島県A町における成人喘息有症率に関する調査(ポスター発表) 第66回日本公衆衛生学会総会、平成19年10月(松山)
 - 6) 木村友昭 鳥帽子田彰 気管支喘息重症化因子に関する疫学調査について 西中四国テオフィリン講演会 平成19年11月(広島)
 - 19) 木村友昭 鳥帽子田彰 喘息の疫学調査結果の報告 臨床試験検討会 平成19年2月(広島)

以 上

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）

分担研究報告書

環境中化学物質の気管支喘息の重症化への影響と抗アレルギーフィルターの開発

分担研究者 中村 裕之 金沢大学大学院医学系研究科環境生態医学・公衆衛生学教授

研究協力者 人見嘉哲（金沢大学医学系研究科准教授）、櫻井克年（高知大学農学部教授）、
康峪梅（高知大学農学部准教授）、秋丸国広、弘田量二（高知大学医学部助教）、
菅沼成文（高知大学医学部教授）、田中宏幸（岐阜薬科大学准教授）、
日下幸則（福井大学医学部教授）、烏帽子田 彰（広島大学医歯薬学総合研究科教授）

A. 研究要旨：近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。さらには、気管支喘息症の増悪因子としても化学物質が関与することが考えられることから、化学物質における免疫毒性やアレルギー発症への影響を調べ、さらにその影響を予防するためのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。水道水のアレルギー発症への影響を明らかにする目的で、水道水固相抽出物を乳癌細胞株MCF-7に添加し、炎症性サイトカインIL-1によって誘導されるMonocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1, CCL2)産生への影響を検討した。水道水抽出物は、有意にIL-1誘導MCP-1産生を抑制した。一方、水道水を活性炭処理すると、MCF-7細胞におけるIL-1誘導MCP-1産生が有意に回復した。また、化学物質除去を目的として非晶鉄および活性炭を含む除去フィルターを新たに開発した。このフィルターで自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）を含む水をろ過し、アレルギーモデルマウスに投与し、気管支喘息の予防効果および軽減効果を検証した。DEPによって著しい杯細胞の過増生・浮腫部位への好酸球浸潤が観察されるが、フィルター処理によって杯細胞の過増生・好酸球浸潤、好中球浸潤が抑制され、肺の炎症が抑制されていることがわかった。以上から、水道水および大気中にはアレルギー反応を促進する化学物質が含まれていることが示された。それが今回、新たに開発されたフィルターによって除去できたことから、喘息の重症化の予防に本フィルターが有効であることが示唆された。

B. 研究目的

近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。さらには、気管支喘息症の増悪因子としても化学

物質が関与することが考えられることから、化学物質における免疫毒性やアレルギー発症への影響を調べることは急務である。本研究では環境中の化学物質のアレルギーへの影響をin vitroおよびin vivoにおいて系統的に評価し、さらにその影響を予

防するためのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。

C. 研究方法

1. in vitro研究

水道水のアレルギー発症への影響を明らかにする目的で、水道水固相抽出物を乳癌細胞株MCF-7に添加し、炎症性サイトカインIL-1によって誘導されるMonocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1, CCL2)産生への影響を検討した。また自動車排出物(Diesel exhaust particulate, DEP)の有機溶媒抽出物のアレルギー発症への影響を、好酸球様分化ヒト白血球細胞株HL-60 clone 15を用いて検討した。

2. in vivo研究

マウス; Balb/c(オス)各6匹

抗原; ダニ抗原4 μ g

アレルギー促進物質; DEP; 62.5 μ g

予防; 除去フィルター

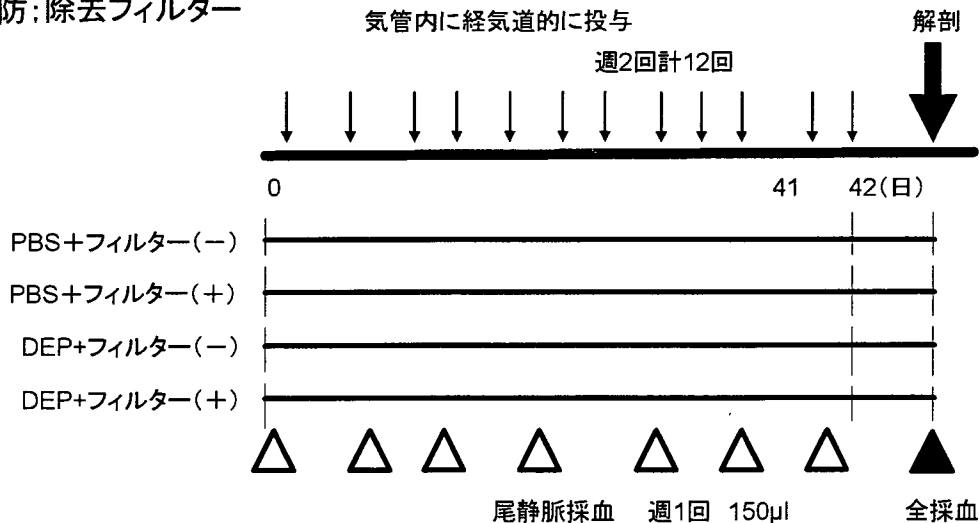


図1 DEPによるアレルギー反応と化学物質除去フィルターによる抑制作用を検証するダニ抗原誘発マウスモデルの実験デザイン

D. 研究結果と考察

水道水抽出物は、有意にIL-1誘導MCP-1産生を抑制した。一方、水道水を活性炭処理すると、MCF-7細胞におけるIL-1誘導MCP-1産生が有意に回復した(図2)。MCP-1は、炎症に伴い単球・マクロフ

化学物質除去を目的として非晶鉄および活性炭を含む除去フィルターを新たに開発した。このフィルターでDEPを含む水をろ過し、アレルギーモデルマウスに投与し、気管支喘息の予防効果および軽減効果を検証した。マウス1グループ6匹に対して、DEPに関して(-)、(+)、フィルターに関して(-)、(+)の4群作成し、週2回合計10回、カニューレによる経気道的に投与(1回投与量; ダニ抗原4 μ g、DEP62.5 μ g、総液量0.1ml)した。DEPフィルター溶液については、1250 μ g/mlのDEP 15mlを非晶鉄フィルター45cm²、活性炭フィルター 45cm²でろ過した(図1)。

ージの炎症部位への動員に関与するケモカインであり、Th2細胞への分化を抑制する作用がある。その産生量が水道水中物質によって低下したことは、水道水中にはアレルギー疾患発症に関係する化合物が含まれていることを示唆している。一方、

DEP存在下2日間培養後上清中へ産生されたサイトカインをRayBio Human Cytokine Array III kitで測定したところ、IL-8とMCP-1の産生を増加させることが判明した(図3)。

ダニ抗原で感作されたマウス脾臓細胞をin vitroで抗原刺激したところ、DEPによって脾臓細胞からのIL-5、IL-13およびMCP-1の産生量が増加したが、フィルター処理によって有意に抑制された(図4)。In vivoでは、DEP投与によって杯細胞の過増生・浮腫部位への好酸球浸潤が著しく観察されるが、フィルター処理によって杯細胞の過増生の抑制、好酸球浸潤、好中球浸潤も抑制され、肺の炎症が抑制されていることがわかった。ダニ抗原特異的

IgG1抗体価も有意に下がった(図5)。これらの結果、DEPによって生じるダニ抽出物誘導の感作・肺胞への好酸球浸潤・脾臓細胞からの抗原誘導Th2サイトカイン産生の増加が、有意に抑制され、本フィルターの抗アレルギー効果が実証された。

E. 結論

水道水および大気中にはアレルギー反応を促進する化学物質が含まれていることが示された。それが今回、新たに開発されたフィルターによって除去できたことから、喘息の重症化の予防に本フィルターが有効であることが示唆された。

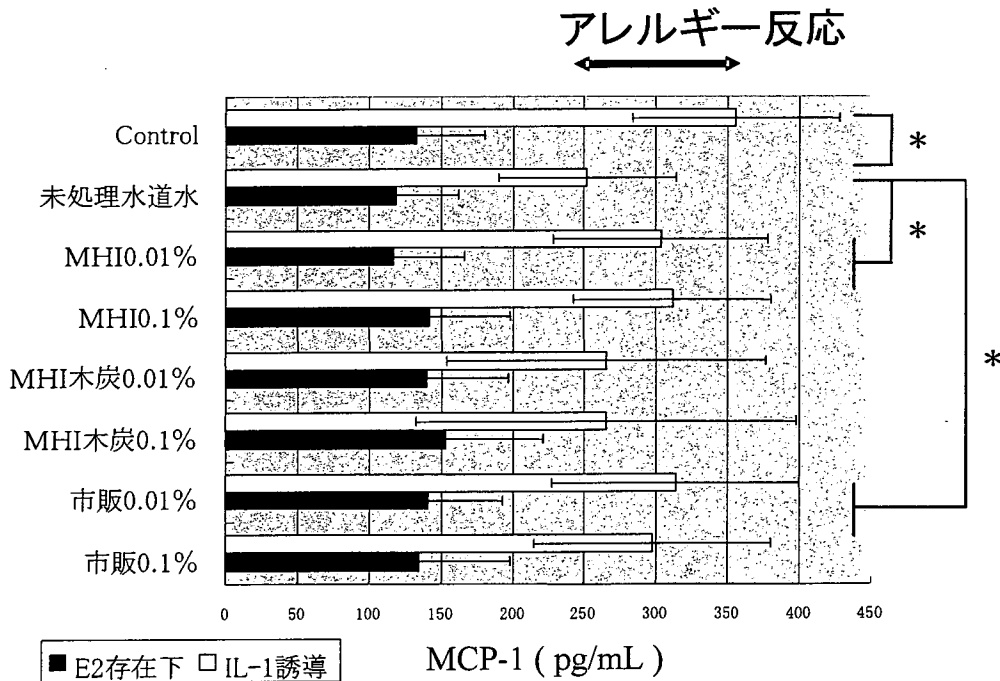


図2 超純粋(control)に比較したときの水道水によるIL-1誘導MCP-1産生の抑制と活性炭(MHI)によるreversal効果

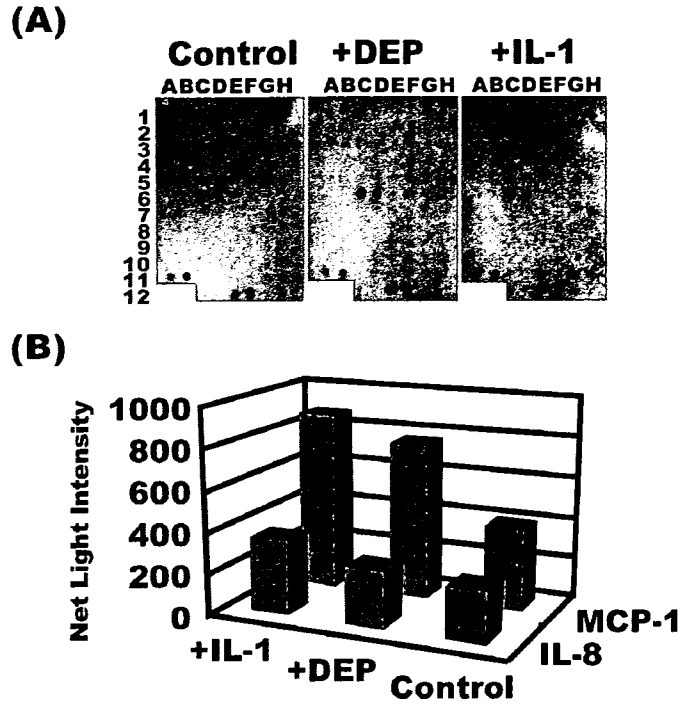


図3 DEP存在下2日間培養後上清中へ産生されたIL-8とMCP-1

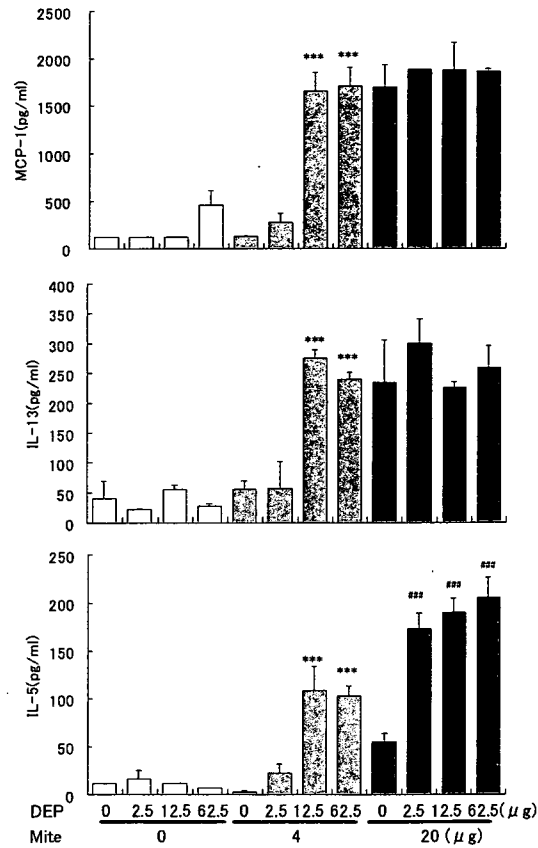


図4 ダニ抗原およびDEPにより誘導される培養マウス脾臓細胞からのIL-5、IL-13およびMCP-1産生

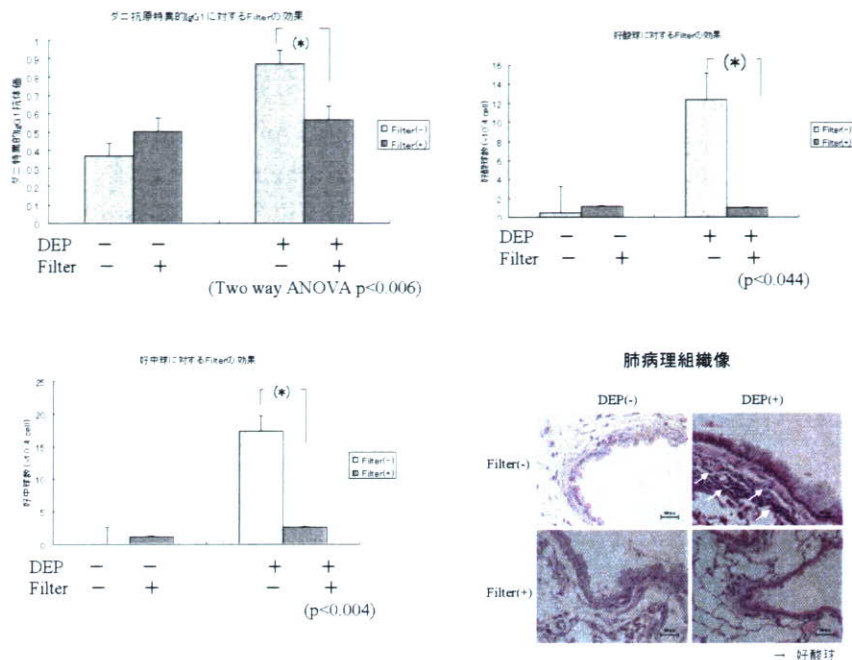


図5 ダニ抗原およびDEPによるダニ抗原特異的IgG1抗体価と、肺組織における好酸球浸潤(b)、好中球浸潤、肺病理への影響

E. 研究発表

1. 論文発表

(原著)

- 1) 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 pollinosis.
Int Arch Allergy Immunol. 2007;142(4):329-334.
- 2) 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. 2007; 12(2): 21-27.
- 3) Yoshino S, Sasahara S, Maeno T,

- Kitaoka-Higashiguchi K, Tomotsune Y, Taniguchi K, Tomita E, Usami K, Haoka T, Nakamura H, Matsuzaki I
Relationship between mental health of Japanese residents and the quality of medical service.
J Phys Fit Nutri Immunol. 2007; 7 (1): 3-11.
- 4) Hatta K, Miyakawa K, Ota T, Usui C, Nakamura H, Arai H.
Maximal response to electroconvulsive therapy for the treatment of catatonic symptoms.
J ECT. 2007 Dec;23(4):233-235.
- 5) Hatta K, Shibata N, Ota T, Usui C, Ito M, Nakamura H, Arai H
.Association between Physical Restraint and Drug-Induced Liver Injury.
Neuropsychobiology. 2008 Mar 7;56(4):180-184.
- 6) Hirota R, Akimaru K, Nakamura H

In vitro toxicity evaluation of diesel exhaust particles on human eosinophilic cell.

Toxicology in Vitro (in press)

2. 学会発表

(シンポジウム)

1) 中村裕之、弘田量二、秋丸国広、菅沼成文、康峪梅、櫻井克年

環境化学物質によるアレルギー発症を予防する
第6回グリーンサイエンス特別研究プロジェクト
公開シンポジウム、2008年3月、高知

2) 神林康弘、中村裕之、柴田亜樹、林宏一
能登半島地震被災後に仮設住宅で暮らす高齢者の
実状と健康問題に対する対策

第77回日本衛生学会総会、2008年3月、熊本

3) 日比野由利、関塚真美
能登半島地震からみた妊産婦への支援体制
第77回日本衛生学会総会、2008年3月、熊本

(一般発表)

1) 神林康弘、Nguyen Thanh Binh、人見嘉哲、日比野由利、中村裕之、荻野景規

簡便な血漿総抗酸化能測定法の開発
第29回日本フリーラジカル学会学術集会、日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第31回大会合同学会、2007年6月、名古屋

2) 神林康弘、人見嘉哲、日比野由利、中村裕之、荻野景規

好酸球活性化マーカーであるプロモチロシンに対する抗体の作成

第17回体力・栄養・免疫学会、2007年8月、東京

3) 日比野由利、神林康弘、人見嘉哲、中村裕之、弘田量二、秋丸国広、永野靖典、石田健司、谷俊一

三世代ふれあい健診による小・中学生の共感性の変化と健康観・向社会的活動

第26回日本思春期学会総会、2007年8月、東京
4) 日比野由利、秋丸国広、弘田量二、人見嘉哲、神林康弘、中村裕之

児童の共感性の発達および生活態度・身体計測値と関連性 - 三世代健診データから

第66回日本公衆衛生学会総会、2007年10月、松山

5) 神林康弘、Nguyen Thanh Binh、人見嘉哲、日比野由利、中村裕之、荻野景規

マイクロプレートを用いた血漿総抗酸化能測定系 (TEAC) の開発

第7回分子予防環境医学研究会、2007年10月、北九州

6) 神林康弘、人見嘉哲、日比野由利、中村裕之、荻野景規

好酸球活性化マーカーである (ジ) プロモチロシンを認識する抗体の作成

第5回日本予防医学会学術総会、2007年11月、指宿

7) 人見嘉哲、木崎節子、櫻井拓也、小笠原準悦、武政徹、神林康弘、日比野由利、中村裕之、白土健、今泉和彦、芳賀脩光、大野秀樹

カルシニューリン制御タンパク Rcn1 による骨格筋活動のモニター

文部科学省学術フロンティア研究プロジェクト「ライフステージに応じた健康増進と多様性保持」
第2回研究会、2007年12月、所沢

8) 神林康弘、中村裕之

能登半島地震による仮設住宅に住む高齢者の長期的な健康被害を予防する調査研究

金沢大学能登半島地震学術調査部会第2回報告会、2008年3月、金沢

9) 日比野由利、中村裕之

妊産婦への健康影響と支援体制

金沢大学能登半島地震学術調査部会第2回報告会、2008年3月、金沢

