

研究分担者 高橋 清 (国立病院機構南岡山医療センター)

研究協力者

宗田 良、岡田千春 (国立病院機構南岡山医療センター内科)
片岡幹男 (岡山大学大学院保健学研究科)
木村五郎、平野 淳 (国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科)
金廣有彦、谷本 安 (岡山大学病院血液・腫瘍、呼吸器・アレルギー内科)

研究要旨

喘息難治化の要因を解明する目的で、JGL2006 と本研究試案の重症度分類をもとに臨床と基礎の両面から検討した。本年度は簡便、非侵襲的で繰り返しの採取が可能な気道呼気水中の各種炎症指標を喘息重症度別に比較し、CRP および Albumin、各種 Cytokine は重症よりも軽症や中等症持続型が高値であり、治療の影響を加味すると重症に至る前の段階で炎症指標を参考にして症状に惑わされず確実に抑制する抗炎症療法を継続することが、重症化の予防に最も重要であると考えられた。特に H2O2、Nitrite/Nitrate は FEV1/PEFR と有意の負の相関が認められ、気道閉塞の指標にも有用であり気道炎症抑制の指標および治療状況の把握として有用であった。経口 PSL5mg/日以上難治性喘息例(試案)は罹病期間が長く、治療薬等の影響で抑制される炎症物質の中でも H2O2 が重症化抑制指標の一つとなりうると考えられた。次いで、重症化に関わる炎症細胞の役割に関する基礎研究から、ヒト好塩基球は IgE を介した免疫・アレルギー反応において M-CSF 産生細胞の一つであることが明らかとなり、好塩基球の活性化が、M-CSF の発現を介して単球・マクロファージの関与する免疫・アレルギー反応を調節し、リモデリングや血管新生に関与している可能性が示唆された。また、リンパ球と気道平滑筋細胞の相互作用についての検討では、気道局所において気道上皮細胞と浸潤してきたリンパ球からの MMP-9、TGF- β 1 等の酵素、サイトカイン、ケモカインや多種の炎症細胞が相互に関係して重症難治化する機序が想定され、LTRA の抑制効果が期待された。

A. 研究目的

喘息の重症化・難治化をを予防するための対策と難治性喘息の治療法確立を目的として、臨床的検討並びに炎症性細胞に関する基礎的検討の両面から検討した。(1)本研究で JGL2006 をもとに見直した難治性喘息の臨床(重症度)分類試案に従って、今年度は、難治性喘息の患者背景と気道呼気水中の炎症指標を比較し、重症度基準と病態の関連性を検証した。次いで、(2)炎症細胞のうちの好塩基球は、気管支喘息において遅発相の気道局所に集積し、アレルギー性炎症の慢性化・重症化に関与していると考えられている。また近年、好塩基球は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免疫・アレルギー反応の調節作用も担っていることが示唆されている。昨年度の研究で我々は、マクロファージの分化や活性化を誘導するサイトカインである M-CSF の mRNA が末梢血幹細胞培養好塩基球に発現しており、IgE 依存性刺激で増強

すること、細胞内ならびに細胞表面に M-CSF 蛋白の発現が認められることを報告した。今年度は IgE 依存性刺激によるヒト好塩基球からの M-CSF 遊離について検討した。また、(3)難治性例において気管支上皮存在下で PBMC からのサイトカイン、ケモカインなどの産生パターンを検討することにより、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が亢進していることを報告してきた。今年度は、気管支上皮と PBMC の相互反応を抑制することのできる薬剤の探索を継続して行った。

B. 方法

(1)JGL2006 の重症度分類による各ステップの喘息患者症例(軽症間歇型 27 名、軽症持続型 14 名、中等症持続型 17 名、重症持続型(4a: PSL 内服量 5mg 未満)31 名、(4b: PSL 内服量 10mg 未満)1 名 合計 90 名)を対象に呼気水を採用した(表 1)。また、健常者 61 名、喫煙者 7 名、

上気道感染者9名からも呼気水を採取した。気道の炎症指標となるpH(アルゴンガスにより呼気中のCO₂を除去する前後の双方で測定)、CRP、Alb、H₂O₂、Nitrite/Nitrate、および各種Cytokineの測定を行い、各群の比較検討を行い(Ueno, T. et al. *Respirology* 13:654-63, 2008)、肺機能との相関や試案の難治基準(PSL5mg以上/日)との関連を検討した。

(2)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の存在下で3週間培養し、immunomagnetic beadsを用いたnegative selectionにより高純度の好塩基球を得た(図1)。かかる培養好塩基球を用いて、Fc \cdot RI架橋刺激によるM-CSFの遊離をELISAで、また細胞表面のM-CSF蛋白をflow cytometry(FCM)にて検討した(図2)。さらに、末梢血単核球から比重遠心とimmunomagnetic beadsを用いたnegative selectionにより得られた高純度好塩基球についてもFc \cdot RI架橋刺激によるM-CSFの遊離をELISAで検討した(図3)。

(3)リンパ球機能の検討:難治症例における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するためにステップ1~4さらには経口ステロイドを内服している難治例まで症例を対象に培養上清中のMMP-9とTARCをELISA法で測定した(図4)。さらに、難治化に対する治療法を探索する目的で、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。

C. 結果

(1)喘息患者は健常者に比してCRP、H₂O₂、Nitrite/Nitrateが上昇していた。また、有意差はないものの、Albuminは健常者では半数が測定限界以下の値であったのに比し、喘息患者では、大半が測定可能で、喘息患者で高い傾向が認められた(図5)。喘息患者における重症度別の比較では、軽症持続型は他の重症度に比し、pHが有意に低く、CRP、H₂O₂、Nitrateが有意に高値であり、Albuminは中等症持続型、軽症持

続型が他の重症度より有意に高値であった(図5)。また、Cytokineでは、Th2サイトカインをはじめ、各種Cytokineの上昇が認められ、軽症持続型あるいは中等症持続型にピークを持つものが多かった(図6)。またH₂O₂、Nitrite/NitrateはFEV₁/PEFRと有意の負の相関が認められた(図7)。なお重症持続型(難治)の一例ではNOは低値であったが、H₂O₂は認められた(図5)。

(2)培養好塩基球をIgEで受動感作後、anti-IgEを用いてFc \cdot RI架橋刺激を行ったところ、刺激後2時間からM-CSFの遊離が認められた(図8)。また、FCMで細胞表面のM-CSF蛋白発現を検討したところ、M-CSFの遊離と同様の時間経過で発現が増強した(図9)。一方、末梢血単核球のHLA-DR陰性 \cdot CD123陽性分画(好塩基球分画)においても細胞表面にM-CSF蛋白が発現していることが確認された(図10)。さらに、末梢血単核球から比重遠心とimmunomagnetic beadsを用いたnegative selectionにより得られた高純度好塩基球をCRA-1(抗Fc ϵ RI α 抗体)を用いてFc ϵ RI架橋刺激を行ったところ、M-CSF遊離がみられた(図11)。

(3)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Candida抗原による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、ステップ1から3の症例群に比してステップ4及び経口ステロイド追加群においてMMP-9産生がより増加していた(図12)。さらにCandida抗原刺激によるこの反応系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、5 μ g/mlの濃度で抑制傾向が認められた(図13)。濃度を50 μ g/mlにあげたところ有意な抑制傾向が認められたが、この濃度では細胞への影響が疑われ現在追加実験中である。同様に正常気管支上皮培養細胞と喘息患者PBMCとの相互作用においてMMP-9産生並びにTARC産生を検討したところ、MMP-9産生は抑制傾向であったが有意ではなかった(図14)。またTARCにおいてもステップ1あるいは2において高い産生能を示し(図15)、この反応系に対するMontelukastの抑制効

果は有意な結果は得られなかった (図 16)。

D. 考察

(1) 呼吸水は簡便かつ非侵襲的で (Sont, J. K. et al. Thorax 1996; 51: 496) (Wong, H. H. et al. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 299)、繰り返し検査を行うことができ、各種炎症指標の測定を行うことが可能であった。呼吸水による気道の各種炎症指標、特に CRP および Albumin、Cytokine では、軽症持続型や中等症持続型が重症持続型 (PSL 投与量が 5mg 未満、10mg 未満の双方で) よりも高値であるものが多かった。今回検討した喘息患者の大半は吸入ステロイドを使用し、重症持続型では PSL の内服も併用している患者もあり、各種炎症指標の結果は、治療状況が反映されているものと考えられる。このことから、重症にいたる前の段階での確実な抗炎症療法が重症化の予防に重要であることが示唆された。また、H2O2、Nitrite/Nitrate は FEV1/PEFR と有意の負の相関が認められたことから、これらの指標は気道閉塞の程度を把握するのに有用であるものと考えられた。

(2) 好塩基球が $Fc\epsilon RI$ を介する反応で M-CSF を産生することから、ヒト培養および患者末梢血の好塩基球は IgE を介した免疫・アレルギー反応において M-CSF 産生細胞の一つであることが明らかとなり、遅発相の気道局所に集積した好塩基球の活性化が、M-CSF の発現を介して単球・マクロファージの関与する免疫・アレルギー反応を調節し、リモデリングや血管新生に関与し、アレルギー性炎症の慢性化・重症化に関与している可能性が示唆された。

(3) 重症群では、産生が亢進する MMP-9、を介して、重症難治化する機序が想定され、またロイコトリエン受容体拮抗薬のこの反応に対する抑制効果が示唆されたがさらなる検討を要する。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、難治性喘息では抗原刺激下で気道上皮細胞と PBMC の相互作用により MMP-9 や TGF- $\beta 1$ 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。

E. 結論

呼吸水は簡便、非侵襲的で繰り返し検査が可能な点から、喘息患者の病態および治療状況の把握が可能であり、喘息患者の気道炎症抑制の指標として有用で、経口 PSL5mg/日以上 の難治性喘息 (試案) は罹病期間が長く、治療薬等の影響で抑制される炎症物質の中で EBC の H2O2 が重症化抑制指標の一つとなりうると思われた。今後、PSL5mg/日以上 10mg/日未満の症例 (4b)、PSL10mg/日以上 (4c) の症例数を増やし、PSL5mg/日未満 (4a) 以下との比較検討を行いたい。

ヒト好塩基球は IgE を介した免疫・アレルギー反応において M-CSF 産生細胞の一つであることが明らかとなり、好塩基球の活性化が、M-CSF の発現を介して単球・マクロファージの関与する免疫・アレルギー反応を調節し、リモデリングや血管新生に関与している可能性が示唆された。

抗原刺激下で気道上皮細胞と PBMC の相互作用により産生される MMP-9、TGF- $\beta 1$ 等を介して、重症難治化する機序が想定され、LTRA の抑制効果が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueno T, Kataoka M, Hirano A, IIO K, Tanimoto Y, Kanehiro A, Okada C, Soda R, Takahashi K, Tanimoto M. Inflammatory markers in exhaled

- breath condensate from patients with asthma. *Respirology* 13: 654-63, 2008.
- 2) Adachi M, Ishihara K, Inoue H, Kudo K, Takahashi K, Morita Y, Masuda K, Sasaki S, Kato R, Miyamoto T. Safety and efficacy of inhaled Ciclesonide in long-term administration to adult patients with bronchial asthma. *Ther. Res.* 29:821-832, 2008.
- 3) Ito W, Tanimoto M, Ono K, Mizuno S, Yoshida A, Koga H, Fuchimoto Y, Kondo N, Tanimoto Y, Kiura K, Matsumoto K, Kataoka M, Nakamura T, Gelfand EW, Kanehiro A. Growth Factors Temporally Associate with Airway Responsiveness and Inflammation in Allergen-Exposed Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 145: 324-39, 2008.
- 4) 清水薫子, 今野 哲, 清水健一, 伊佐田 朗, 高橋 歩, 服部健史, 前田由起子, 高橋大輔, 高橋 清, 中川武正, 谷口正実, 秋山一男, 赤澤 晃, 檜澤伸之, 西村正治. 北海道土幌町における成人喘息, アレルギー性鼻炎有病率一特に喫煙及び肥満との関連について一. *アレルギー* 57:835-842, 2008.
- 5) 谷本 安, 陳 妍妍. 特集 免疫療法の将来展望. 2 喘息におけるポジショニング 米国ガイドライン (EPR3) 改訂をふまえて. *アレルギーの臨床* 28: 820-5, 2008.
- 6) 谷本 安. 高齢者喘息の病態の特徴 (1) 免疫・生理機能等の特徴 足立 満編: プライマリケア医のための咳のマネジメント~高齢者の長引く咳を中心にして~ 医薬ジャーナル社, 大阪, 78-80, 2008.
- 7) 谷本 安. 高齢者喘息の治療 (1) 長期管理の薬物療法 足立 満編: プライマリケア医のための咳のマネジメント~高齢者の長引く咳を中心にして~ 医薬ジャーナル社, 大阪, 88-91, 2008.
- 8) 岡田千春: 難治性喘息とはなにか 概念と要因の追求 *呼吸器科*: 13; 489-494, 2008.
- 9) 岡田千春: アレルギーはなぜ増加したかそしてその対策 環境の変化と対策 *アレルギー*: 37; 16-17, 2008.
- 10) 岡田千春: 高齢者喘息治療薬の選び方と使い方 *臨床免疫・アレルギー科*: 49; 280-285, 2008.
2. 学会発表
- 1) Takahashi K, Hirano A, Okada C, Kimura G, Soda R. A review of definition and diagnostic criteria of severe intractable asthma. XIX World Congress of Asthma, Monte-Carlo, 2008. 11.
- 2) 谷本 安, 淵本康子, 尾形佳子, 早稲田公一, 金澤聰, 宮原信明, 金廣有彦, 片岡幹男, 高橋 清, 谷本光音. 高齢者喘息の管理における喘息コントロールテスト (ACT) の有用性に関する検討. 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム, 2008. 6.
- 3) 谷本 安. 特別企画 Debate Session -ProとCon- III. アレルゲン免疫療法は必要か Proの立場から. 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 (東京), 2008.
- 4) 谷本 安, 淵本康子, 尾形佳子, 早稲田公一, 金澤 聰, 宮原信明, 金廣有彦, 片岡幹男, 高橋 清, 谷本光音. 高齢者喘息の管理における喘息コントロールテスト (ACT) の有用性に関する検討. 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 (東京), 2008.
- 5) 岡田千春, 平野淳, 木村五郎, 他: 気管支喘息患者 PBMC と培養気管支上皮細胞の相互反応に対するモンテルカストの抑制効果の検討 第58回日本アレルギー学会総会, 東京, 2008.
- 6) 岡田千春, 平野淳, 木村五郎, 他: 喘息患者のための医療連携 岡山市における病診連携の現状と問題点 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京, 2008.
- 7) 岡田千春, 平野淳, 木村五郎, 他: 喘息患者指導における医師、薬剤師の連携に関する調査研究 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京, 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 特になし

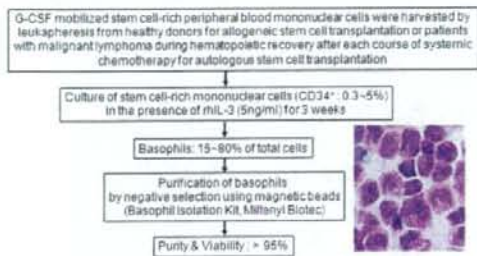
2. 実用新案登録 特になし
 3. その他 特になし

表1 呼吸気中における炎症性物質測定の対象者

対象	人数	(男/女)
健康者	61	(12/49)
喫煙者	7	(6/1)
上気道感染	9	(0/9)
気管支喘息患者	90	(46/44)
軽症型	27	(13/14)
軽症持続型	14	(7/7)
中等症持続型	17	(8/9)
重症持続型(4a)	31	(17/14)
重症持続型(4b)	1	(1/0)

図1. 末梢血単核細胞から高純度好塩基球を精製する方法

Generation and purification of cultured basophils



Trans. Cell. & Dev. Biol. 2002

図2. 培養高純度好塩基球における抗IgE抗体による反応性の検討

FcεRI-mediated stimulation of cultured basophils

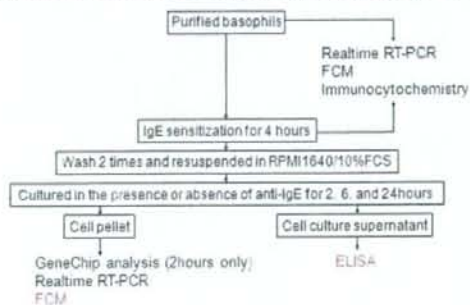


図3. 培養高純度好塩基球における抗IgE抗体による反応性の検討
 FcεRI-mediated stimulation of peripheral blood basophils

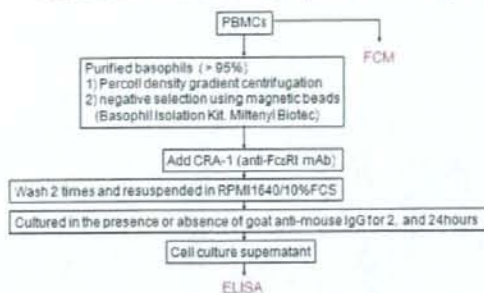


図4. ヒト末梢血単核球と気管支上皮細胞の培養法

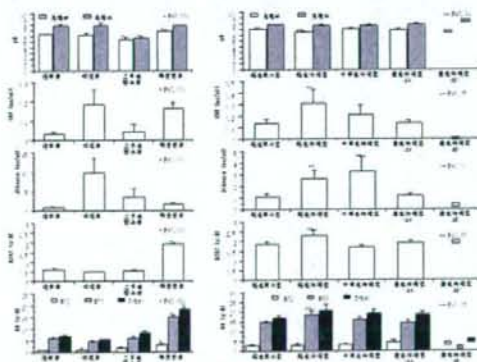


図5. 呼吸気中の各種炎症性物質

図6. 健康人及び気管支喘息患者における呼気水中のサイトカイン

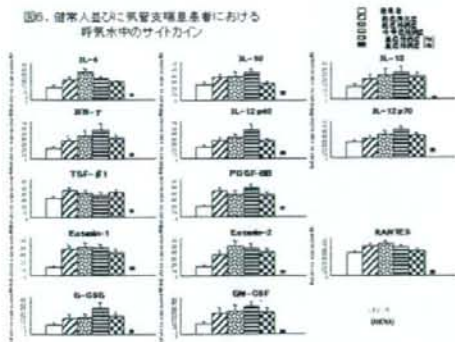


図7. 気管支喘息患者呼気水中のH2O2・NO濃度とFEV1・PEFRの相関

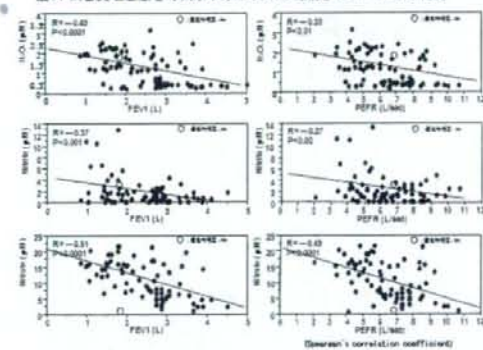


図8. M-CSF release by cultured basophils (ELISA)

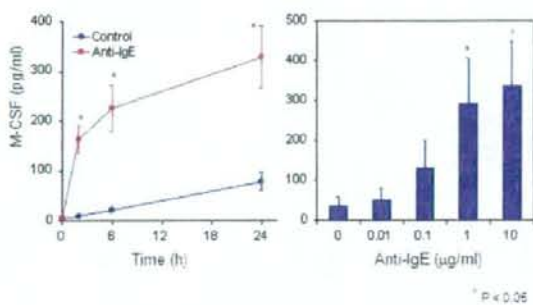


図9. Cell-surface M-CSF expression on cultured basophils (FCM)

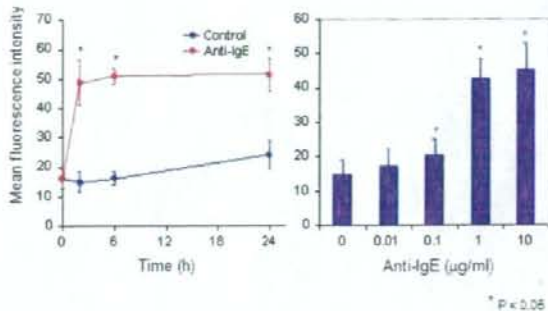


図10. Cell-surface M-CSF expression on peripheral blood basophils

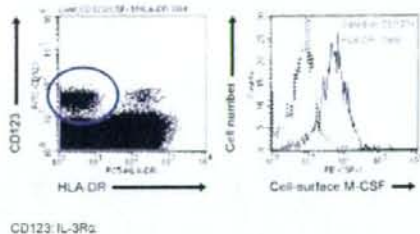


図11. M-CSF release by peripheral blood basophils

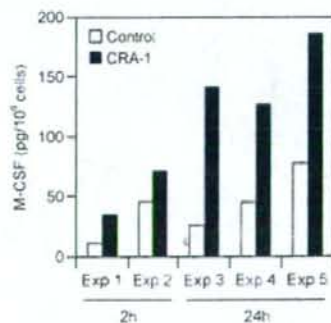


図12. 気管支上皮培養細胞と気管支喘息患者PBMCの相互作用 培養上清中MMP-9濃度

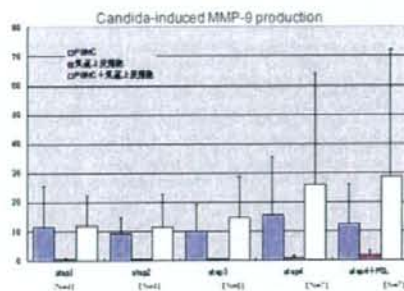


図15. 気管支上皮培養細胞と気管支喘息患者PBMCの相互作用 培養上清中TARC濃度

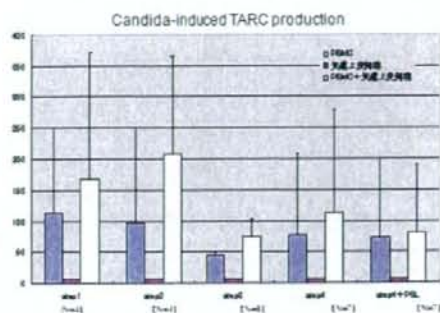


図13. 気管支上皮培養細胞と気管支喘息患者のPBMCの相互作用 培養上清中MMP-9濃度に対するMontelukastの影響

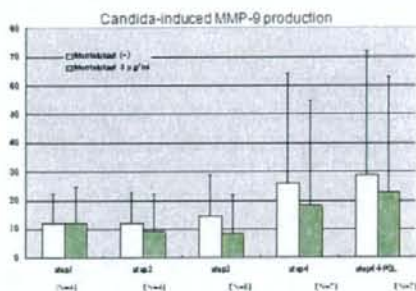


図16. 気管支上皮培養細胞と気管支喘息患者のPBMCの相互作用 培養上清中TARC濃度に対するMontelukastの影響

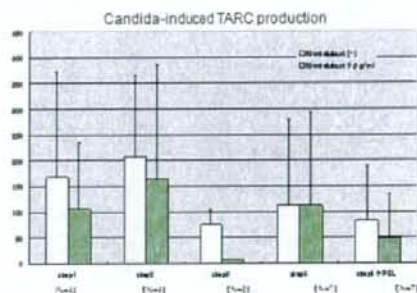
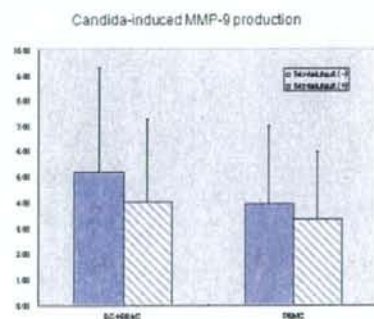


図14. 気管支上皮培養細胞と気管支喘息患者のPBMCの相互作用 培養上清中MMP-9濃度に対するMontelukastの影響



気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究

「喘息死に関する研究」

研究分担者 相澤久道 久留米大学 呼吸器・神経・膠原病内科部門 教授

研究協力者

星野友昭 久留米大学 呼吸器・神経・膠原病内科部門 講師
川山智隆 久留米大学 呼吸器・神経・膠原病内科部門 講師
坂崎優樹 久留米大学 呼吸器・神経・膠原病内科部門 大学院生
澤田昌典 久留米大学 呼吸器・神経・膠原病内科部門 大学院生

研究要旨

1971年から1999年まで久留米大学病院及び関連病院で病理解剖を行った15人の喘息死患者の肺病理組織を用い喘息死の病因を検討した。喘息死患者の肺病変部は気道平滑筋の肥大、過形成、分泌腺過形成を伴った著明な気道リモデリング、分泌物等による気道の閉塞、好酸球を主体とした炎症細胞浸潤炎症が見られた。これまでの報告と違いCD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞に比べ15名全例で肺病変部に著明に浸潤していた。CD4/CD8比は約0.4であった。また肺胞上皮細胞や炎症細胞はIL-18を強く産生していた。2重染色の結果CD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞、好中球、好酸球はほぼ100%IL-18を産生していた。

A. 研究目的

喘息は気道の慢性炎症と種々の程度の気道狭窄と気道過敏性、臨床的には繰り返して起こる咳、喘鳴、呼吸困難が特徴とされる。病態は好酸球、Tリンパ球、肥満細胞などの炎症細胞と、上皮細胞、分泌腺、線維芽細胞、気管支平滑筋などの気道を構成する細胞が、慢性気道炎症、気道構築変化（リモデリング）気道平滑筋の肥大、過形成、分泌腺過形成、血管新生さらには気道の過敏性によって特徴づけられる。喘息死は喘息の急性増悪における最たるものである。喘息死の病因にCD4陽性T細胞、Th2サイトカインが関与していると考えられるが未だ不明である。過去の研究で以下のことが示唆されている。喘息死に近い病歴を持つ患者では低酸素に対する化学応答の低下と呼吸苦と感じないことが報告されている。病

理的解析から喘息死では上皮細胞（goblet cell）の過形成、好中球浸潤が関与している。一方、急激な喘息死患者の気道では好酸球浸潤が少ないと考えられている。RVS等のウイルス感染が原因。しかしながらこれまでの研究に用いられた症例数はほとんどが10名にも満たない。かつ症例のうち一部はCOPDを含んでいる可能性が高い。

そこで本研究では以下のことを検討したい。

1. 病変部のT細胞の同定
2. 病変部の炎症細胞の同定、果たして好酸球は少ないのか？
3. 病変部の炎症性サイトカインの発現
4. 喘息死の病変の首座は中枢かそれとも末梢気道（small airway）か？
5. 喘息死とCOPDの類似点と相違点

B. 研究方法

1971年から1999年まで久留米大学病院及び関連病院で病理解剖を行った15人の喘息死患者の肺病理組織を用いた。報告している。本研究では喘息死患者の肺病変部のCD4、CD8陽性T細胞及びIL-18産生細胞の検討を行った。1971年から1999年まで久留米大学病院及び関連病院で病理解剖を行った喘息死患者の肺病理組織を用いた。肺病変部におけるCD4、CD8陽性T細胞のIL-18産生を2重免疫染色法で解析した。好酸球や好中球の解析は蛍光色素(FITC)を標識した抗IL-18抗体を用いて免疫染色し、UV下で蛍光顕微鏡を用いて解析した。

C. 研究結果

久留米大学病院及び関連病院で病理解剖を行った15人の喘息死患者の内訳を表1に示す。

1971年(昭和46)からの喘息死患者

番号	年齢	性別	死亡年	治療			
				全身ステロイド	吸入ステロイド	β受容体刺激薬	キサンタン誘導体
1	08	M	1971	-	-	-	-
2	32	M	1973	-	-	-	+
3	32	M	1974	-	-	-	-
4	55	M	1974	-	-	-	+
5	5	M	1977	-	-	-	-
6	67	M	1980	-	-	-	-
7	43	M	1981	-	-	-	-
8	75	M	1982	+	-	-	-
9	16	F	1984	-	-	+	+
10	79	F	1986	+	-	-	-
11	57	M	1986	-	-	-	-
12	14	M	1994	-	-	-	-
13	24	M	1995	-	+BDP	+	+
14	68	F	1998	-	+BOP	-	-
15	67	F	1999	-	-	-	-
				8/15	2/15	2/15	4/15

表1. 喘息死患者の内訳

喘息死患者の末梢気道は気道平滑筋の肥大、過形成、分泌腺過形成を伴った著明な気道リモデリング、分泌物等による気道の閉塞、好酸球を主体とした炎症細胞浸潤炎症が見られた(図1)。

末梢気道の強い炎症細胞浸潤、気道の粘液栓やリモデリング

52 Y male died in 1974 24 Y male died in 1998
Systemic steroid (+) ICS (-) Systemic steroid (-) ICS (+)

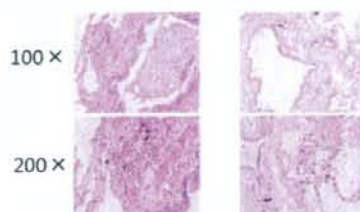


図1. 喘息死患者の末梢気道

これまでの報告と違いCD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞に比べ15名全例で肺病変部に著明に浸潤していた(図2)。

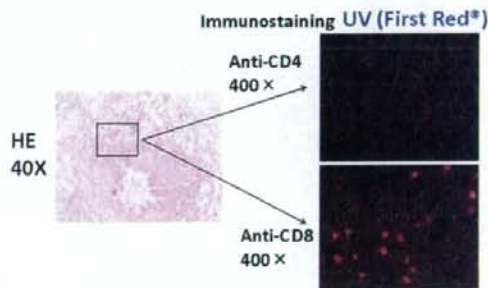


図2. CD8陽性T細胞の著明な浸潤

CD4/CD8比は約0.4であった。また肺胞上皮細胞や炎症細胞はIL-18を強く産生していた。2重染色の結果CD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞、好中球、好酸球はほぼ100%IL-18を産生していた(図3)。

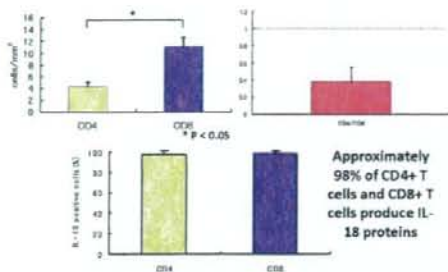


図3. 上左 CD4, CD8 細胞数、右 CD4/CD8 比、下 IL-18 産生 CD8, CD4 陽性 T 細胞の割合。

この IL-18 産生 CD8 陽性 T 細胞は最重症 COPD の肺病変部で多いことを我々は報告している (ERJ 2008)。加えて喘息死と最重症 COPD の肺病変部は肺気腫の有無の差はあるも非常に相違点が多かった (図4)。

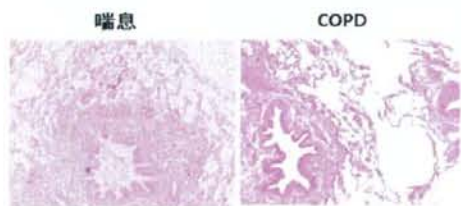


図4. 喘息と COPD における IL-18 産生 CD8 陽性 T 細胞。

D. 考察

喘息死及び最重症 COPD の病変部では IL-18 産生 CD8 陽性 T 細胞が多い。また組織学的にも喘息死と最重症 COPD の肺病変部は肺気腫の有無の差はあるも非常に相違点が多い。喘息死と最重症 COPD では病因に類似点があることが示唆された。

E. 結論

喘息死の病因に CD8 陽性 T 細胞が好中球、好酸球とともに関与していることが示唆された。

G. 研究発表

- Hoshino T, Okamoto M, Takei S, Sakazaki Y, Iwanaga T, Aizawa H. Redox-Regulated Mechanisms in Asthma. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. 2008;10(4): 769-783
- Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kato S, Iwasaki H, Watanabe K, Aizawa H. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *European Respiratory Journal* 2008;31(2):287-297.
- Inoue H, Hiraoka K, Hoshino T, Okamoto M, Iwanaga T, Zenmyo M, Shoda T, Aizawa H, Nagata K. High levels of serum IL-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis. *Bone* 2008;42(6): 1102-1110.
- Adachi M, Aizawa H, Ishihara K, Ohta K, Sano Y, Taniguchi H, Nakashima M. Comparison of salmeterol/fluticasone propionate (FP) combination with FP+sustained release theophylline in moderate asthma patients. *Respiratory Medicine*. 2008;102(7):1055-1064.
- Furumoto A, Ohkusa Y, Chen M, Kawakami K, Masaki H, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Nagatake T, Oishi K. Additive effect of pneumococcal vaccine and influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease. *Vaccine*. 2008;26:4284-4289.
- Kawayama T, Hoshino T, Ichiki M, Tsuda T, Kinoshita M, Takata S, Koga T, Iwanaga T, Aizawa H, Kurume COPD Study Group. Effect of add-on therapy of tiotropium in COPD treated with theophylline. *INTERNATIONAL JOURNAL OF COPD*. 2008;3(1):137-147.
- Kawayama T, Minakata Y, Matsunaga K, Yamagata T, Tsuda T, Kinoshita M, Iwanaga T, Ichinose M, Aizawa H. Validation of symptom-based COPD

- questionnaires in Japanese subjects. *Respirology*. 2008;13(3):420-426.
8. Minakata Y, Iijima H, Takahashi T, Miura M, Ogawa H, Kimura K, Koga T, Kinoshita M, Tsuda T, Aizawa H, Ichinose M. Efficacy and Safety of Formoterol in Japanese Patients with COPD. *Intern Med*. 2008; 47(4): 217-223.
9. Minami S, Kawayama T, Ichiki M, Nishimura M, Sueyasu Y, Gohara R, Kinoshita M, Koga H, Iwanaga T, Aizawa H. Clinical efficacy of the transdermal tulobuterol patch in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a comparison with slow-release theophylline. *Intern Med*. 2008;47(6):503-509.
10. Takeoka H, Koga T, Yano H, Ikeda J, Nishimura M, Kamimura T, Aizawa H. A Hybrid Lesion of Lung Cancer and Aspergillosis. *Clinical Medicine:Oncology*. 2008;2:115-118.
11. Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushita 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, Shiraki A, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H, Hasegawa M, Fukuda T, Eric D. Green, and Izuohara K. Identification of Pendrin as a Common Mediator for Mucus Production in Bronchial Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Journal of Immunology*. 2008; 180: 6262-6269.
12. Takata S, Washio M, Moriwaki A, Tsuda T, Nakayama H, Iwanaga T, Aizawa H, Arai Y, Nakanishi Y, Inoue H. Burden among Caregivers of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease with Long-Term Oxygen Therapy. *International Medical Journal*. 2008;15(1):53-57.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・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
分担研究報告書
平滑筋リモデリング機序の実験的検討

研究分担者 庄司 俊輔（国立病院機構東京病院 臨床研究部長）

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オートクリン/パラクリン作用様式にて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ている。本年度は肺線維芽細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性が本上清への抗フィブロネクチン抗体の添加により低減することを確認した。本知見はリモデリングを形成した気管支において平滑筋細胞がフィブロネクチンを介して線維芽細胞と相互作用することにより、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。

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として、平滑筋の肥厚や基底膜下への細胞外マトリックス蛋白質（間質コラーゲン、フィブロネクチン）の沈着が挙げられる。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蛋白質の沈着については、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.*, 3 (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、近年増加してきた。

分担研究者は本研究において、平成12-14年度にヒト正常気管支平滑筋細胞がフィブロネクチン等の細胞外マトリックス蛋白質だけ

でなく、気管支平滑筋細胞自身の培養上清やその他の気管支構成細胞である上皮細胞等の培養上清に対して遊走すること、平成15-17年度には抗フィブロネクチン抗体を用いたウェスタンブロッティングより気管支平滑筋細胞培養上清中にフィブロネクチンが認められること、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が培養上清への抗フィブロネクチン抗体の添加、或いは抗 $\beta 1$ インテグリン抗体による細胞前処理により抑制されることを報告している。気管支平滑筋細胞培養上清にMMP-1, 2及び3が含まれていることもウェスタンブロッティングにより確認された。これらの研究結果は喘息患者の気管支にて、平滑筋細胞が上皮細胞やその他の構成細胞より産生・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、更に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を結合組織へと遊走・集簇させる可能性を示唆するものである。

一昨年の本研究では、この気管支平滑筋細胞が正常ヒト肺線維芽細胞の培養上清に対しても遊走することを確認した。そこで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ェスタンブロッティングを行ったところ、気管支平滑筋細胞培養上清と同様にフィブロネクチンのバンドが認められた。また昨年度には肺線維芽細胞が気管支平滑筋細胞培養上清に対して遊走することも確認した。これらの実験結果は気管支のリモデリングにおいて、線維芽細胞が創傷治癒を目的として、上皮方向の遊走だけではなく平滑筋方向にも遊走・集簇し、

そこでフィブロネクチンを分泌することで平滑筋細胞の結合組織への遊走を誘導している可能性を示唆するものである。昨年度は更に本研究に使用している気管支平滑筋細胞の表面に発現しているインテグリンを解析し、 $\beta 1$, $\beta 2$ インテグリン及び $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv インテグリンを確認することができた。

本年度は気管支平滑筋細胞培養上清に含まれるフィブロネクチンが肺線維芽細胞遊走因子として作用するか否か、抗フィブロネクチン抗体を用いた遊走実験にて確認した結果を報告する。

B. 研究方法

正常ヒト気管支平滑筋細胞及び正常ヒト肺線維芽細胞(瑞国 Lonza 社)を培養した。その後、気管支平滑筋細胞の培養上清を採取し、肺線維芽細胞の遊走実験に使用した。

気管支平滑筋細胞培養上清に対する肺線維芽細胞の遊走を 48 穴ボイデンチャンパーにより解析した。チャンパーの下室には気管支平滑筋細胞培養上清、上室には 1×10^6 cells/ml に調整した肺線維芽細胞の浮遊液を入れ $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 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。この染色細胞を倍率 400 倍に設定した光学顕微鏡にて 10 視野測定し、その合計数を遊走活性とした。

C. 結果

肺線維芽細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性は、本上清に抗フィブロネクチン抗体を添加することにより低減した。コントロールとして用いた抗アルブミン抗体の添加は肺線維芽細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性に影響しなかった。

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ックス産生能を大きく亢進することが知られている。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。

今年度の研究にて、気管支平滑筋細胞培養上清に対する肺線維芽細胞の遊走が本上清への抗フィブロネクチン抗体の添加により抑制されることを確認した。この知見は線維芽細胞が気管支のリモデリングに伴い平滑筋方向に遊走・集簇し、そこでフィブロネクチンを分泌することで平滑筋細胞の結合組織への遊走を誘導する可能性を示唆するものである。

E. 結論

気管支のリモデリングにおける平滑筋細胞の平滑筋から結合組織への遊走は平滑筋細胞由来フィブロネクチンを認識した線維芽細胞の平滑筋方向への遊走・集簇により誘導される可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

- ・ Nishihara M, Shoji S, Maeda I, Shimoda T, Nishima S, Okamoto K: Autocrine and paracrine migration of smooth muscle cell in response to fibronectin in airway remodeling. ATS 2008 (2008 年 5 月 トロント) Am J Respir Crit Care Med 177: A496, 2008.
- ・ 西原麻千子, 庄司俊輔, 前田衣織, 下田照文, 西間三馨, 岡元孝二: 気管支喘息でのリモデリング形成における平滑筋細胞遊走とインテグリンの関与 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2008 年 11 月)

G. 知的財産権の出願・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

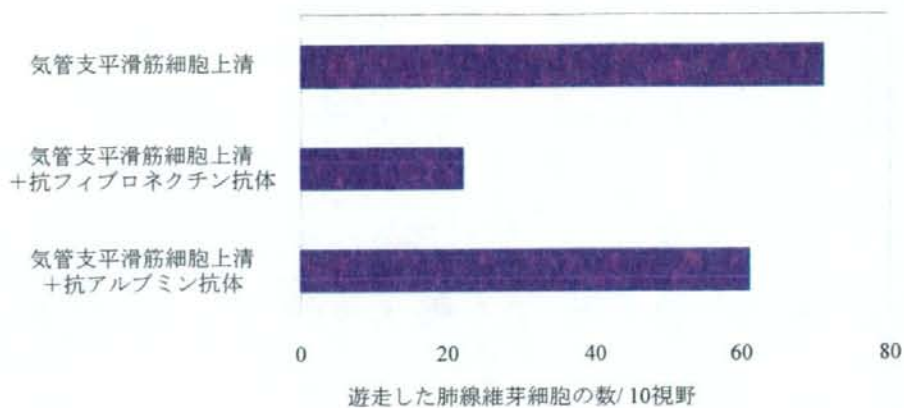
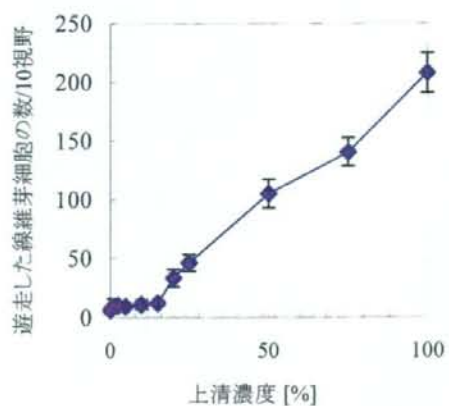
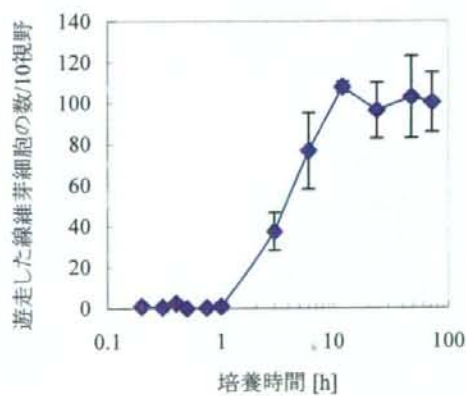


Fig.1 抗フィブロネクチン抗体を添加した気管支平滑筋細胞培養上清に対する肺線維芽細胞の遊走

a)



b)



(参考データ) 気管支平滑筋細胞培養上清に対する肺線維芽細胞の遊走

研究分担者 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存在する。また気道感染による増悪も少なくない。TSLP は気道感染やアレルゲン曝露により気道上皮から産生され、樹状細胞の分化・活性化を介して、炎症性 Th2 免疫反応を誘導するサイトカインであるが、好酸球への直接作用は知られていない。我々は好酸球が機能的 TSLP 受容体を発現することを初めて明らかにして、TSLP により Th2 型とは異なるサイトカイン群を産生することを観察した。これらサイトカインプロフィールはステロイド不応性の重症喘息にしばしばみられる。TSLP を標的とした治療が喘息の難治化・重症化を予防し得る可能性がある。

研究協力者

平口雪子 国立病院機構三重病院臨床研究部
研究員
細木興亜 国立病院機構三重病院小児科
医師

好酸球は正常ボランティア及びアレルギー疾患患者の末梢血から CD16 negative selection 法により精製した。まず、これまで知られていない好酸球における TSLP 受容体 (TSLPR と IL-7R α とのヘテロダイマー) の遺伝子発現を ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いた定量的 PCR ならびに免疫染色 (共焦点レーザー顕微鏡とフローサイトメトリー) により検討した。受容体の発現制御に関して、サイトカイン添加による変化も検討した。

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存在する。その成立要因には様々なものがあるが、気道感染は重要な因子である。気道感染、とくにウイルス感染により喘息は増悪して、その結果引き起こされる炎症はしばしば遷延化する。そして、ウイルス感染時には早期に好酸球が浸潤することが観察されている。一方、ウイルス感染によって気道上皮細胞から産生されるサイトカインの中で、TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) は樹状細胞の分化・活性化を介して、Th2 リンパ球の分化を引き起こすことより、感染後のアレルギー性炎症発症に深く関わるとされている。最近、TSLP は樹状細胞のみならず、肥満細胞や Th2 細胞にも直接作用することが報告されたが、好酸球に対する作用についてはまだ知られていない。そこで本研究では、ウイルス感染による増悪と好酸球性炎症遷延化メカニズム解明の一端として、TSLP の好酸球機能に及ぼす作用について検討した。

好酸球機能に対する作用は、まず好酸球をヒトリコンビナント TSLP と培養して、活性酸素産生量をチトクロム C 還元法にて、上清中に遊離する顆粒蛋白 EDN を ELISA 法により測定した。

好酸球アポトーシスは propidium iodide と Annexin V 染色後、フローサイトメトリーにて検討した。

サイトカイン産生については、好酸球を TSLP 存在下で 24~48 時間培養した後に上清を採取して、ピーズアレイシステム (Luminex; 日立ソフト) により 20 種のサイトカイン・ケモカインを測定した。IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF, eotaxin, GRO- α , IP-10, MCP-1, RANTES, MCP-2, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , and MIG である。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定量的 PCR 法によって解析した。

B 研究方法

C 研究結果

(1) TSLP 受容体の発現

好酸球が TSLPR と IL-7R α をともに発現していることを PCR 法で確認した。

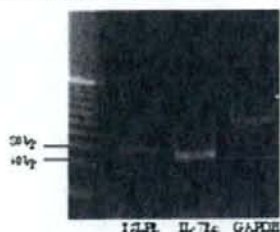


図1 IL-7 α 、TSLPR 発現 (PCR)

受容体蛋白の発現はまずフローサイトメトリーにて検討したところ、正常者、アレルギー疾患患者ともに発現がみられたが、後者は正常者に比べて、発現が増強している可能性が示唆された。

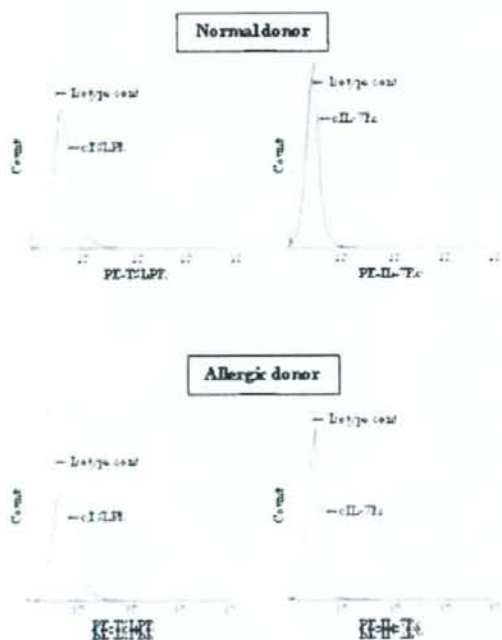


図2 IL-7 α 、TSLPR 発現 (PCR)

次に、免疫染色にて検討したところ、陽性コントロールとした培養樹状細胞による発現と比べて、やや低いものの明らかな発現を確認した。

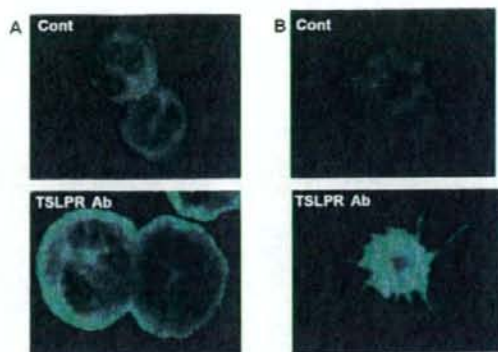


図3 IL-7 α 、TSLPR 発現 (A:好酸球、B:樹状細胞)

(2) 好酸球のエフェクター機能への作用

TSLP は好酸球からの活性酸素産生、脱顆粒をとともに誘導しなかった。しかし、有意な生存延長作用を示した。

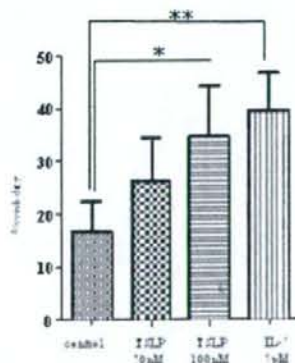
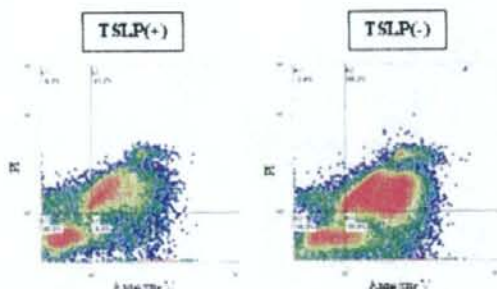


図4 TSLP の好酸球形損延長作用

(3) TSLP による好酸球からのサイトカイン産生次に、TSLP による好酸球からのサイトカイン・ケモカイン産生について検討したところ、IL-6, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 は TSLP 濃度依存

性に産生が誘導された。IL-4, IL-5, IL-13などのTh2サイトカインの産生は認められなかった。

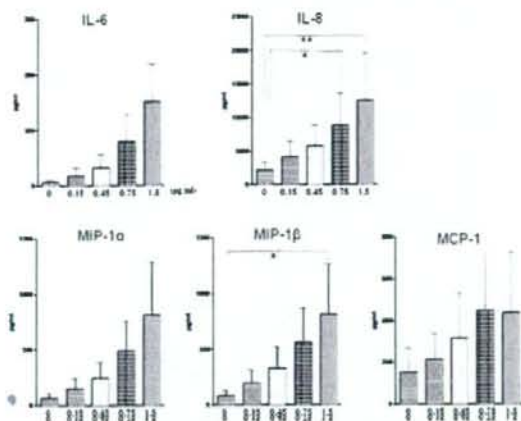


図5 TSLPによる好酸球からのサイトカイン産生

さらに、IL-3とTNF- α がTSLPRの発現を増強することを見いだした。IL-7R発現には影響を与えず、無刺激下では発現の低いTSLPRが炎症性サイトカインが存在する環境下で誘導され、機能発現に関わる可能性が示唆された。

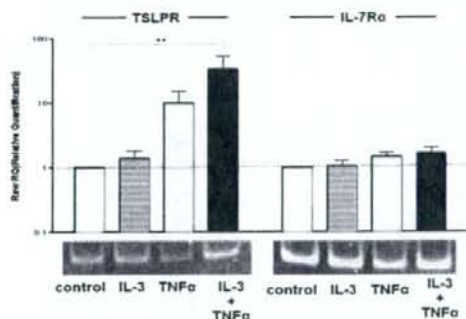


図6 IL-7 α 、TSLPR発現に対するIL-3、TNF- α の作用

：定量的PCR

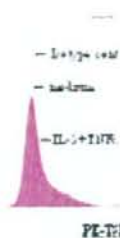


図7 TSLPR発現に対するIL-3、TNF- α の作用

：フローサイトメトリー

実際に、受容体発現を増強するTNF- α とIL-3の存在下ではTSLPによるサイトカイン産生が相乗的に増加した。

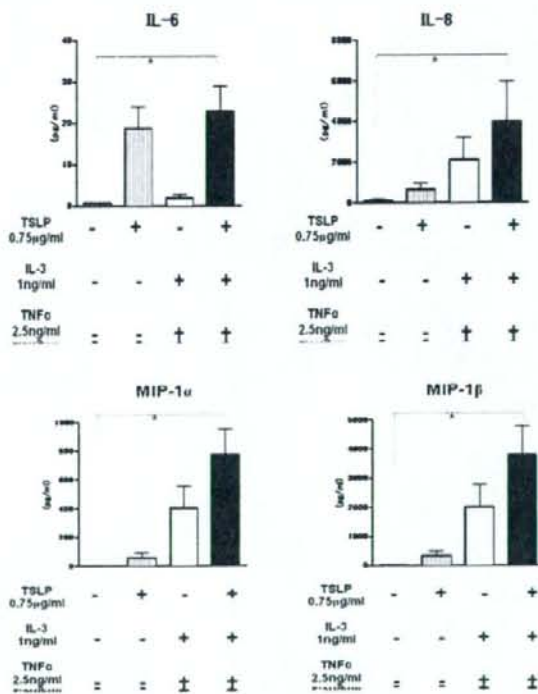


図8 TSLP誘導サイトカイン産生に対するIL-3、TNF- α の作用

D 考察

難治性喘息に認められる遷延性の好酸球性炎症発症機構を解明するために、TSLPの好酸球に対する作用を解析した。その結果、好酸球はTSLP受容体を発現してTSLPを介する機能を有することを明らかにした。TSLPはウイルスやアレルゲンなどにより主に

気道上皮から産生されるサイトカインで、樹状細胞の活性化・成熟を介して、炎症性の Th2 細胞を分化誘導、アレルギー炎症の発症に関わる。自然免疫系における Th2 炎症発症・持続をもたらす重要なサイトカインである。この機構の中で、これまで好酸球は Th2 細胞誘導ののち、二次的に集積・活性化すると考えられていたが、我々は TSLP が好酸球を直接活性化することを初めて明らかにした。TSLP は活性酸素産生や脱顆粒などの好酸球のエフェクター機能を誘導しなかったが、強力にサイトカイン産生を誘導した。産生されたサイトカイン・ケモカインは好中球、単核球の遊走・活性化に関わるものであり、Th2 型とは異なる炎症、とくに重症喘息にしばしば認められる炎症パターンに関連するものであった。また、TSLP は好酸球の脱顆粒などエフェクター機能は誘導しなかったが、有意に生存を延長して、好酸球性炎症の遷延化に関わる可能性が示唆された。以上の事実は好酸球が自然免疫系において、TSLP に反応して、新たに炎症を誘導する機能をもつことを示唆する。ウイルス感染後に喘息はしばしば増悪して好酸球性炎症の増悪とともに、ステロイドに反応しがたい好中球性炎症も引き起こすが、この病態の一部を説明するものと考えられた。現在のところ感染誘発の喘息増悪に有効な治療薬はないが、TSLP をターゲットとする治療が新しい可能性をもつと考えられる。

E 結論

好酸球が機能的 TSLP 受容体を発現していることを初めて明らかにした。TSLP による好酸球への主な作用は生存延長と特異なサイトカイン・ケモカイン産生誘導であり、難治性喘息の遷延する好酸球性炎症、共存する好中球性炎症の病態を説明すると考えられた。

F 研究発表

I 論文発表

- (1) Masuda S, Fujisawa T, Katsumata H, Atsuta J, Iguchi K. High prevalence and young onset of allergic rhinitis in children with bronchial asthma. *Pediatr Allergy*

Immunol 2008; 19:517-22.

- (2) Fujisawa T, Katsumata H, Kato Y: House dust mite extract induces interleukin-9 expression in human eosinophils. *Allergol Int* 2008;57:1-6.
- (3) Hiraguchi Y, Nagao M, Hosoki K, Tokuda R, Fujisawa T. Neutrophil Proteases Activate Eosinophil Function in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146:16-21.
- (4) Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui T, Masuda S, Fujisawa T. Allergen-induced basophil CD203c expression as a biomarker for rush immunotherapy in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146:47-53.
- (5) Kawakami A, Koketsu R, Suzukawa M, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Fujisawa T. Blocking antibody is generated in allergic rhinitis patients during specific immunotherapy using standardized Japanese cedar pollen extract. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146:54-60.

G 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 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・重症化の病因・病態の解明に関する研究
—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—

研究分担者: 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要視されている。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おり、例えば T 細胞選択的あるいは B 細胞選択的に PTEN が欠如しているマウスでも様々な機能が亢進している。昨年度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 を強制導入させて生存や遊走などの機能抑制を観察した。そこで本年度は *in vivo* のモデルとして OVA 感作マウスに TAT-PTEN を投与し、気道組織の好酸球浸潤と粘液産生の抑制を認めた。また BALF 中の IL-5 産生は TAT-PTEN に抑制された一方、RANTES 産生は TAT-PTEN により有意に増強された。このことから PTEN は、喘息の病態においても負の制御因子として機能していることが示唆された。気管支喘息の難治化の予防・治療法の開発という観点から、PTEN を標的とした戦略は非常に有望であると結論づけられる。

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 PIP_3 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。T 細胞選択的あるいは B 細胞選択的に PTEN が欠如しているマウスでは、自己反応クローンの出現やアポトーシスの抑制などの現象が観察されている。 (Immunity 14: 523-34:2001, J Exp Med 197: 657-67: 2003)。これらの結果から PTEN は免疫システムにおいて細胞機能を負に制御し、自己反応クローンの出現などを抑制していると考えられる。一方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)。昨年度の本研究において我々は、TAT 融合タンパクの手法で好酸球に PTEN(TAT-PTEN)を導入し、好酸球の生存と遊走が抑制されることを示した。本年度我々は、喘息モデルマウスにおける TAT-PTEN の効果を検討した。

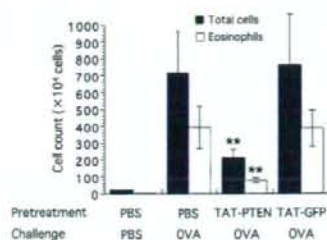
B. 研究方法

A/J マウスを卵白アルブミン(OVA)と Alum で免疫後、OVA を 4 日間点鼻投与させることにより、喘息モデルマウスを作製した。連日の点鼻 2 時間前に TAT-PTEN あるいは TAT-GFP を点鼻投与し、1) PBS 点鼻/PBS 点鼻、2) PBS 点鼻/OVA 点鼻、3) TAT-PTEN 点鼻/OVA 点鼻、4) TAT-GFP 点鼻/OVA 点鼻の 4 群に分類した。5 日目に気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液 (BALF) 中の細胞数と細胞分画をカウントした。一方 freeze-dry にて 10 倍濃縮した BALF 上清中のサイトカイン/ケモカインの測定には Luminex 200 (Luminex) を用い、測定キットとして Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad) を使用した。採取した肺組織を hematoxylin-eosin (HE), alcian blue/periodic acid-schiff (AB-PAS) にて染色し、好酸球浸潤、粘液産生細胞の増生などの変化を検討した。

C. 研究結果

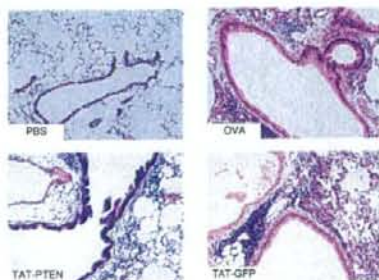
PBS 群と比して OVA 群では好酸球を中心とした総細胞数の著明な増加を認めた。OVA 群、TAT-PTEN 投与群、TAT-GFP 投与群における総細胞数はそれぞれ 718 ± 246 , 210 ± 52 , 762 ± 301 ($\times 10^4$ cells) であり、PTEN 投与群で有意な抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。一方それぞれの群における好酸球数は 391 ± 124 , 77 ± 14 , 385 ± 108 ($\times 10^4$ cells) であり、OVA 群と PTEN 群との間で有意差を認めた ($p < 0.05$) (図1)。

図1 BALF での細胞分画



HE 染色では、コントロールである PBS 群と比して OVA 群において有意に傍気道組織への炎症細胞浸潤を認めた。この炎症細胞浸潤は、TAT-PTEN 前投与により明らかに抑制された。またコントロールタンパクである TAT-GFP 投与群では、抑制効果は観察されなかった(図2)。

図2 HE 染色



AB-PAS 二重染色を行い、粘液産出に対する TAT-PTEN の効果を検討した。PBS 群と比して OVA 群では、有意に粘液産出細胞の増生を認めた。TAT-PTEN 前投与により、粘液産出細胞の陽性率は明らかに抑制された。一方 TAT-GFP による抑制効果は、観察されなかった(図3)。