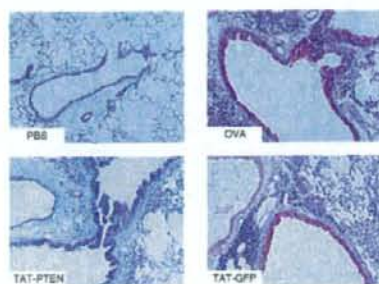
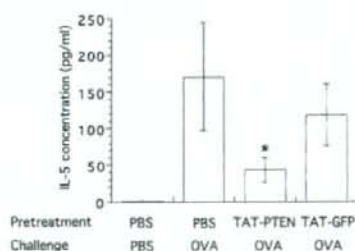


図3 AB-PAS 二重染色



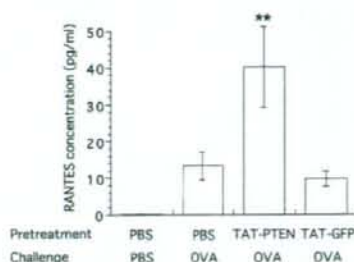
PBS 群と比して OVA 群では、BALF 中 IL-5 濃度の著明な上昇を認めた。OVA 群、TAT-PTEN 投与群、TAT-GFP 投与群における IL-5 濃度はそれぞれ  $170 \pm 74$ 、 $43 \pm 17$ 、 $118 \pm 43$  pg/ml であり、TAT-PTEN 投与群で有意な抑制効果を認めた ( $p < 0.05$ )。TAT-GFP 投与群でもやや低下傾向を認めたが、有意ではなかった(図4)。

図4 BALF 中 IL-5 濃度に対する TAT-PTEN の効果



PBS 群と比して OVA 群では、BALF 中 RANTES 濃度の上昇を認めた。OVA 群、TAT-PTEN 投与群、TAT-GFP 投与群における RANTES 濃度はそれぞれ  $13 \pm 4$ 、 $40 \pm 11$ 、 $9 \pm 2$  pg/ml であり、TAT-PTEN 投与群では RANTES 産生がさらに増強された ( $p < 0.05$ )。TAT-GFP 投与群では、RANTES 産生は OVA 群と差を認めなかった(図5)。

図5 BALF 中 RANTES 濃度に対する TAT-PTEN の効果



#### D. 考察

免疫学分野においては、マウスを用いた PTEN 機能解析の報告が散見されている。Suzuki らは Cre-loxP システムを用い、T 細胞選択的に PTEN が欠如している  $Pten^{lox/-}$  マウスを作成した(Immunity 14:523-34:2001)。Wild type と比較して  $Pten^{lox/-}$  はリンパ節腫脹・脾腫・腫大胸腺を呈し、CD4<sup>+</sup>T リンパ腫を発症していた。中心性トレランスでは胸腺陰性選択が障害され、末梢性トレランスではスーパー抗原反応 T 細胞クローンの排除機構が障害されていた。また PTEN 欠失 T 細胞は自己反応性を有し、増殖能の増強あるいはアポトーシスの抑制といった異常が認められた。更に Suzuki らは同様に B 細胞選択的に PTEN が欠如している  $bPten^{lox/lox}$  マウスを作成し、機能解析を行った(J Exp Med 197:657-67:2003)。

$bPten^{lox/lox}$  マウスでは B1a 細胞と血中自己抗体の増加を認め、また T 細胞と同様に PTEN 欠失 B 細胞は過増殖・アポトーシス抵抗性・遊走の増強などの異常が認められた。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。また喘息のモデルとしては、PTEN-cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターをマウスに経気道的に感染させると、アレルギー性の炎症が抑制されると報告されている(J

Clin Invest 111:1083,2003)。今回の我々も結果もそれを裏付けるものであり、PTEN を標的にすることは治療応用という点でも有望であると考えられる。

TAT-PTEN を含む TAT 結合タンパクの臨床応用に関しては、いくつかの問題点が想定される。まず目的タンパクに TAT を付加することでタンパク高次構造が変化する可能性がある。また TAT ドメインは塩基性が強く、実際に臨床投与した場合、細胞毒性や発癌性の問題など、クリアすべき様々な事案がある。ただ TAT タンパクは受動的に細胞内に移行できるメリットを考えると、今後の発展が期待される。

## E. 結論

本研究において我々は細胞内分子である PTEN を標的とした TAT-PTEN を OVA 感作マウスに投与することにより、*in vivo* でのアレルギー性炎症を抑制し得た。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。今後のさらなる研究が必要であると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1・論文発表

1) Yamamura K, Adachi T, Masuda T, Kojima Y, Hara A, Toda T, Nagase H, Ohta K. Intracellular protein phosphorylation in eosinophils and the functional relevance in cytokine production. *Int Arch Allergy Immunol* (in press).

2) Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, Nakae S, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. An IL-1 cytokine

member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol* 181: 5981-9, 2008.

3) Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H, Saito H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest* 88: 1245-53, 2008.

### 2・学会発表

1) Adachi T, Hanaka S, Masuda T, Yoshihara H, Nagase H, Ohta K. Transduction of PTEN into eosinophils attenuates survival, chemotaxis, and eosinophilic inflammation. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会. 平成 20 年 6 月. 神戸市

2) 山村浩一、足立哲也、増田倫子、長瀬洋之、鈴木直仁、大田 健. Luminex System を用いた好酸球細胞内タンパク酸化定量とサイトカイン産生における機能解析. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会. 平成 20 年 6 月. 神戸市

3) 小島康弘、長瀬洋之、原 麻恵、矢野智湖、鈴木真穂、石田博文、中野純一、足立哲也、鈴木直仁、大田 健. 喘息患者におけるピーズアレイシステムを用いた呼気凝縮液の検討. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 平成 20 年 6 月. 東京都

4) 原 麻恵、長瀬洋之、小島康弘、鈴木真穂、石田博文、中野純一、足立哲也、鈴木直仁、大田 健. 重症持続型喘息における胃食道逆流、睡眠時無呼吸症候群、心身症合併と QOL との相関. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 平成 20 年 6 月. 東京都

5) 長瀬洋之、高野裕久、井上健一郎、原 麻恵、小嶋康弘、倉持美知雄、石田博文、足立哲也、鈴木直仁、大田 健. 菌体成分による気道上皮細胞からのサイトカイン産生に及ぼすディーゼル排気微粒子 (DEP) の効果. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 20 年 11 月. 東京都

6) 原 麻恵、長瀬洋之、小島康弘、倉持美知雄、石田博文、足立哲也、鈴木直仁、大田 健. 喘息コントロール状態と気道炎症マーカーとの関連. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 20 年 11 月. 東京都

7) 鈴川真穂、飯倉元保、山口正雄、瀧澤力也、小宮明子、中江 進、長瀬洋之、足立哲也、松島綱治、山本一彦、大田 健. IL-33 によるヒト好塩基球化. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 20 年 11 月. 東京都

8) 戸田貴子、足立哲也、増田倫子、山村浩一、長

瀬洋之、大田 健. 気道上皮細胞内タンパクリン酸化とサイトカイン酸生におけるその機能的役割. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 20 年 11 月. 東京都

H. 知的所有権  
特になし

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

気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究  
—ダニ抗原誘発マウス喘息様病態形成に及ぼすウイルス感染様刺激の影響—

研究分担者 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** 昨年度までの厚生労働科学研究では、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、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- $\beta$ 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。また、本モデルを使用して室外環境因子であるディーゼル排気粒子の影響についても検討し、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にした。一方、近年、様々な疫学調査により、乳幼児期の RNA ウィルス感染が喘息の発症を促進的に示唆されているが、その機序は不明である。また、先行するウィルス感染による喘息発症後の予後についても不明である。

そこで本年度は、当研究室のダニ喘息モデルを用いて喘息様病態形成に及ぼすウイルス感染、すなわち、ウイルス感染様刺激である二本鎖 RNA 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。二本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) は、初回抗原投与前に種々のタイミングで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。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泡洗浄(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、poly IC を初回ダニ抗原投与前に投与した場合、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有意な増強が認められ、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。さらに、本モデルに対するステロイド薬の影響を検討したところ、poly IC による喘息様病態形成の増強反応はステロイドに抵抗性を示した。

以上の成績より、初回抗原曝露前にウイルス感染様刺激を加えると、喘息用病態形成が増強され、この反応はステロイドに対し抵抗性を示すことを明らかにした。今後、本反応の作用機序を解明することにより、ウイルス感染による喘息発症促進機序ならびに難治化機序を明らかにすることが可能であると思われる。

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）

A. 研究目的

近年、アレルギー疾患患者数は漸増し、ま

た、その病態も難治化・慢性化している。その背景には、室外および室内環境因子の影響が無視できないが、詳細については不明な点が多い。そこで、平成 18 年度研究では環境因子による喘息発症率の漸増ならびに難治化原因を探索するモデル確立を企図し、ダニ抗原をマウス気管内に反復投与することにより、いわゆるアジュバントを用いることなく、気道リモデリングを含む喘息様病態モデルを作成することに成功した。昨年度は引き続き室外環境因子の意義を明らかにする目的で、ディーゼル排気粒子(DEP)の影響を検討した結果、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。

そこで本年度は、従前より疫学調査などで発症促進ならびに難治化因子として注目されているウイルス感染の影響を、一本鎖 RNA ウィルスが増殖する際に産生する二本鎖 RNA の模倣品である polyinosinic polycytidylic acid (poly IC) をマウス気管内に先行投与し、その後、極少量のダニ抗原を投与する方法により検討した。

## 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準じて行った。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に poly IC を投与した。その後、*Dermatophagoides farinae* (Der f) の粗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。また、従来のダニ抗原単独による喘息様病態形成に及ぼすステロイドの影響に加え、ウイルス様刺激による喘息病態に及ぼす影響も検討した。すなわち、fluticasone propionate (FP) をダニ抗原による感作が成立し、好酸球が気道に認められる時期からダニ抗原投与の前後に FP を投与し、両モデルのステロイド反応性を比較検討した。いずれの実験においても、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

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気道過敏性、BAL 液中好酸球増多、Th2 サイトカイン産生および TGF- $\beta$ 1 産生量の増加ならびに気道リモデリング形成が観察された。また、いずれの反応も FP の気道内投与により、有意に抑制された。一方、poly IC を先行投与し、その後、ダニ抗原を反復投与したモデルでは、ダニ抗原少量単独投与群に比し、気道過敏性、気道内好酸球増多、Th2 サイトカイン産生などがいずれも有意に増悪した。さらに、本反応は別の二本鎖 RNA である polyadenylic polyuridylic acid (poly AU) や一本鎖 RNA である polycytidylic acid (poly C) では再現できなかったことから、toll-like receptor (TLR) 3、retinoic acid-inducible gene-1(RIG-I) あるいは melanoma differentiation associated gene 5 (MDA-5) 等を介する二本鎖 RNA に特異的な反応であることも明らかとなった。一方、本モデルにおける表現系は、LPS の混入によって起こる喘息病態の増悪機序と類似性が高いため、TLR4 KO マウスを用いて同様の検討を行ったが、表現系には影響を及ぼさなかった。最後に、この二本鎖 RNA による喘息様病態形成の増悪モデルに対する FP の影響を検討したところ、FP は気道内好酸球増多ならびに BALF 中 IL-13 量の増加を有意に抑制したが、気道過敏性ならびに BALF 中マクロファージ、好中球およびリンパ球数の増加に対しては、ほとんど影響を及ぼさなかった。

## D. 考察

本研究では、喘息様病態形成および難治化に及ぼすウイルス感染の影響を RNA ウィルスが増殖する際に産生する二本鎖 RNA の模倣品である poly IC をマウス気管内にダニ抗原投与に先行して曝露することにより検討した。その結果、poly IC を抗原曝露前にマウスの気管内に投与することにより、極少量のダニ抗原投与による反応が有意に亢進し、ダニ抗原単独では認められないような気道過敏性、気道内好酸球増多、気道リモデリング形成が観察された。本反応は、他の二本鎖 RNA の poly AU や一本鎖 RNA の poly C によって再現できないことから、おそらく TLRs

あるいは前述の RIG-I または MDA-5 などの受容体を介して生じている可能性が高い。近年、細胞内受容体については、二本鎖 RNA のうち鎖長が長い RNA は MDA-5 に、鎖長が短いもの、または 5'末端にリン酸基が 3 つ結合した構造を有する RNA は RIG-I に認識される可能性が指摘されていることから、おそらく本反応も TLR-3 あるいは MDA-5 依存的な反応であると思われる。

一方、poly IC とダニ抗原による喘息様病態形成は、高用量のダニ抗原単独投与による病態とは、発症機序の点から異なる可能性を示唆する成績を得たため、ステロイドに対する反応性を両モデル間で比較検討したところ、ダニ抗原単独による気管投与群では、FP により気道過敏性ならびに各種炎症性細胞の気道局所への浸潤が抑制されたが、poly IC とダニ抗原による喘息モデルでは FP は気道過敏性に対して影響を及ぼさず、また、BALF 中炎症性細胞数の変化についても、好酸球の増加に対しては抑制作用を示したものの、マクロファージ・好中球・リンパ球数の増加に対しては影響を及ぼさなかった。従って、ウィルス感染が先行する場合には、その後の抗原曝露によって生ずる喘息様病態形成は、一部、ステロイド抵抗性を示す可能性が示唆され、近年、臨床において報告されている成績とも関連することから興味深い。今後は、poly IC の受容体の解明を始めとして、喘息様病態形成の増悪機序の解明と、ステロイド抵抗性の原因を探索する予定である。

## E. 結論

喘息発症ならびに難治化の危険因子であるウィルス感染による影響を検討するため、二本鎖 RNA を用いて先行感染による喘息難治化への影響を検討したところ、ウィルス感染様刺激の先行投与により、通常、ダニ抗原単独では病態形成が認められない極少量のダニ抗原投与によっても、気道過敏性・気道リモデリング形成が観察された。また、この病態は、一部、ステロイド抵抗性を示すことから、ウィルス感染様刺激も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。

## 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 H. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008; 147: 6-16.

4) Nakao I, Kanaji 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.* 2008; 80: 6262-6269.

5) Ishizaki M, Tanaka H, Kajiwara D, Toyohara T, Wakahara K, Inagaki N, Nagai H. Nafamostat mesilate, a potent serine protease inhibitor, inhibits airway eosinophilic inflammation and airway epithelial remodeling in a murine model of allergic asthma. *J. Pharmacol. Sci.* 2008; 108: 355-363.

### 2. 総説

なし

### 3. 学会発表

1) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博式：アレレル

ギー性炎症におけるリモデリングのメカニズム、  
第 58 回日本アレルギー学会総会 特別シンポジ  
ウム 3 (2008 年 11 月、東京)

2) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博弼：実験喘息の  
立場から、第 58 回日本アレルギー学会総会  
シンポジウム 1 (2008 年 11 月、東京)

3) 柳楽庸史、田中宏幸、江崎友哉、三好康介、  
稲垣直樹、永井博弼：ダニ抗原誘発マウス気道炎  
症の解析 (1) 第 58 回日本アレルギー学会総会  
ミニシンポジウム 6-5 (2008 年 11 月、東京)

4) 梶原 悠、田中宏幸、江崎友哉、柳楽庸史、  
村田健司、三好康介、稲垣直樹、永井博弼：ダニ  
抗原誘発マウス気道炎症の解析 (2) 第 58 回日  
本アレルギー学会総会 一般演題 43 (2008 年 11  
月、東京)

5) 江崎友哉、田中宏幸、柳楽庸史、三好康介、  
稲垣直樹、永井博弼：ダニ抗原誘発マウス気道炎  
症の解析 (3) 第 58 回日本アレルギー学会総会  
一般演題 178 (2008 年 11 月、東京)

6) 村田健司、田中宏幸、東 明香、稲垣直樹、永  
井博弼：マウス骨髄由来肥満細胞 (BMMC) からの  
IgE 依存性ヒスタミン遊離に及ぼす  
prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) の影響、第 58 回日本ア  
レルギー学会総会 一般演題 52 (2008 年 11 月、  
東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

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）  
（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

研究分担者 鳥帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究要旨 気管支喘息症の発症および難治化に関わる遺伝子を同定することで、難治性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。患者対照研究（相関解析）においてヘムオキシゲナーゼ-1（heme oxygenase-1, HO-1）の遺伝子多型を、重症持続型としてJGL2006で規定されたStep 4の18例、軽症間欠型、軽症持続型（Step 1-2）の30例、これらの対照として健常群50例と比較した。対象はすべて男性で、喫煙、非喫煙の割合は各群で差はない。HO-1遺伝子の3'上流の繰り返しのGT反復配列の数を指標とし、33以上の反復配列を持つアレルをLアレルとし、27未満をSアレルとし、27-32をMアレルとした。Lアレルのキャリア（S/L, M/L, L/L）と非Lアレルのキャリア（S/S, S/M, M/M）の割合を各群で調べた。HO-1遺伝子多型の相関解析によって、喫煙者と非喫煙者のすべてを含めてLアレルのキャリアの割合を各群で調べると、有意な差は認められなかったが、喫煙者あるいは過去の喫煙者においては、Lアレルのキャリアの割合が、重症化にしたがって有意に高くなった。非喫煙者においては、その関係は認められなかった。以上より、喘息症の重症化は、喫煙とHO-1の遺伝子との相互作用によって引きこされると示唆された。その詳細な病態の解明が今後の課題である。

研究協力者 中村 裕之 金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教授

A. 研究目的

気管支喘息症の発症および難治化に関わる遺伝子を同定することで、難治性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、CCRのLigandでもあるCC chemokine ligand (CCL)およびMonocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1, CCL2)遺伝子多型と喘息症の難治化との関係を示してきたが、さらには、環境中の様々な酸化ストレスの状況において抗酸化作用を有するとされるヘムオキシゲナーゼ-1 (heme oxygenase-1,

HO-1) の遺伝子多型を軽症、重症および健常人と比較し、重症化におけるHO-1の役割の解明をも目的とした。喘息症の発症および難治化は、遺伝と環境の相互作用であるため、喫煙者と非喫煙者について軽症、重症および健常人と比較し、重症化におけるHO-1の役割について検討した。

B. 研究方法

1. 対象

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。

対象はすべて男性で、重症持続型としてJGL2006で規定されたStep 4の18例（53.1±4.22歳、平均値±標準誤差）、軽症間欠型、軽症持続型（Step 1-2）の30例（48.3±2.94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（49.5±2.36歳）である。これらの3群の間に年齢差はなく、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（t検定）。また、3群の間には喫煙者と非喫煙者の割合に有意な差は認められなかった（ $\chi^2$ 検定）（表1）。

本研究テーマの「気管支喘息症の重症度に関する遺伝子解析研究」は、金沢大学医学倫理委員会、高知大学医学部倫理委員会、広島大学医学部倫理委員会

において承認後、実施された。

## 2. 研究方法

調べた遺伝子座位は、HO-1遺伝子の5'上流の繰り返しGT反復配列の数を指標とし、33以上の反復配列を持つアレルをLアレルとし、27未満をSアレルとし、27-32をMアレルとした。Lアレルのキャリア（S/L, M/L, L/L）と非Lアレルのキャリア（S/S, S/M, M/M）の割合を各群で調べた。

## C. 研究結果

HO-1遺伝子多型の相関解析によって、喫煙者と非喫煙者のすべてを含めてLアレルのキャリアの割合を各群で調べると、有意な差は認められなかった。喫煙者あるいは過去の喫煙者においては、Lアレルのキャリアの割合が、重症化にしたがって有意に高くなった（表2）。非喫煙者においては、その関係は認められなかった（図1）。

表1 対象の特性(すべて男性)

群	人数	(平均値±標準誤差)			
		年齢 (歳)	RIST (U/ml)	喫煙#1: 非喫煙 (比)	合併症#2
対照	50人	49.5±2.36	76.0±12.5	27:23	(-)
軽症間欠型、軽症持続型 (Step 1-2)	30人	48.3±2.94	456±141**	16:14	(-)
重症持続型 (Step 4)	15人	53.1±4.22	503±112**	8:7	(-)

#1喫煙者には過去の喫煙者も含む。#2花粉症、アトピー性皮膚炎、\*\*p<0.01（対照群と比較したとき）

## D. 考察

HO-1遺伝子多型の結果から、喫煙者あるいは過去の喫煙者においてGT反復配列の長いHO-1の遺伝子多型が喘息症の重症化との関係が示唆された。したがって喘息症の重症化は、喫煙とHO-1の遺伝子との相互作用によって引きこされると示唆された。その詳細な病態の解

明が今後の課題である。

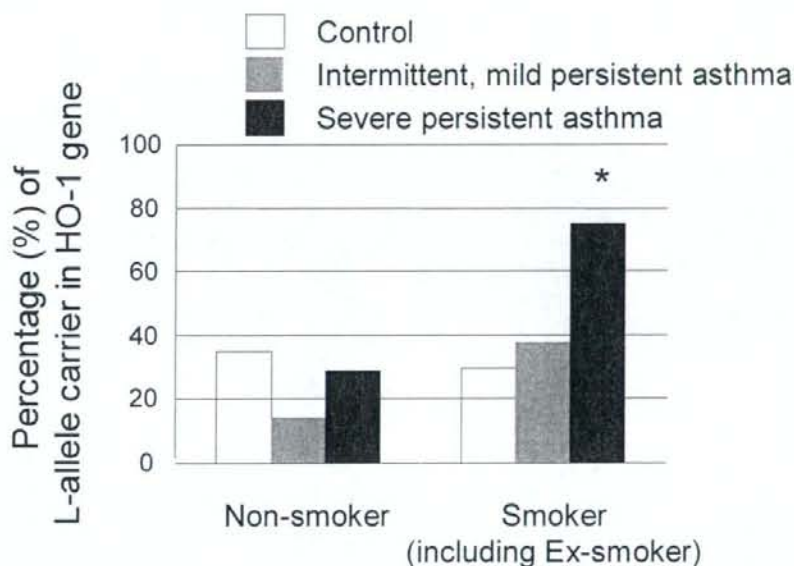
## E. 結論

喘息症の重症化は、喫煙とHO-1の遺伝子との相互作用によって引きこされると示唆された。その詳細な病態の解明が今後の課題である。

表2 難治性喘息群、非難治性喘息群、対照群におけるHO-1遺伝子多型についての相関解析

Gene	Allele	Control (N=50)		Intermittent, mild persistent asthma (N=30)		Severe persistent asthma (N=15)	
		Number	Frequency <sup>1)</sup>	Number	Frequency <sup>1)</sup>	Number	Frequency <sup>1)</sup>
L-allele carrier	L/L	3(2)	32.0(29.6)	2(2)	26.7(37.5)	3(2)	53.3(75.0*)
	L/M	7(3)		3(2)		3(2)	
	L/S	6(3)		3(2)		2(2)	
Non-L-allele carrier	M/M	13(7)	68.0(70.4)	6(3)	73.3(62.5)	2(1)	46.7(25.0)
	M/S	12(6)		10(4)		3(1)	
	S/S	9(6)		6(3)		2(0)	

Figures in parentheses represents the number of the smoker males. Frequency of minor allele (%). Statistical significance in odds ratio compared to that in control, \*p<0.05.



Statistically significant difference as compared to the value of control: \*p<0.05

図2 重症群、軽症群、健常群における喫煙別のHO-1遺伝子アレルキャリアの割合

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Association of Perceived Stress and Stiff Neck/Shoulder with Health Status: Multiple Regression Models by Gender  
Hiroshima J Med.Sci. Vol.55, No.4, 101-107  
December, 2006

Tomoaki Kimura  
Yasutomi TSUDA,  
Seiya UCHIDA,  
Akira Eboshida

2) Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma  
Allergy International Vol58, No1:71-79

March 2009

Tomoaki Kimura  
Hiroyuki Nakamura  
Akira Eboshida

3) Gene-environment Association of an ITGB2  
Sequence Variant With Obesity in Ethnic Japanese  
OBESITY vol.16 no.6 1463-1466 June 2008

Tomokazu Awaya  
Yasuyuki Yokosaki  
Kiminori Yamane  
Hiroshi Usui  
Nobuoki Kohno  
Akira Eboshida

4) Polymorphisms in the integrin super gene family  
associated with obesity and type 2 diabetes in  
Japanese American and Japanese population

Obesity (in print)  
Yasuyuki Yokosaki,  
Kiminori Yamane,  
Fumiko Higashikawa,  
Nobuoki Kohno,  
Akira Eboshida

5) 細胞内コレステロール代謝輸送の解明と予防医  
学への応用

日衛誌(Jpn. J. Hyg.)第63巻 第2号 346 2008  
年3月

信國好俊, 高橋佳代, 守田貴子, 沼本通孝, 鳥帽  
子田彰

2. 学会発表

(シンポジウム)

1) 中村裕之、弘田量二、鳥帽子田彰  
環境とアレルギー—環境中化学物質によるアレルギー  
発症機序の解明と予防—

第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2008年  
11月, 東京

2) 鳥帽子田彰、森川 (座長/モータ: [1] に準じる)  
環境とアレルギー—環境中化学物質によるアレルギー—

第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2008年  
11月, 東京

(一般発表)

1) 広島県 A 町における成人喘息有病率に関する調  
査

第67回日本公衆衛生学会、2008年、福岡市  
木村友昭、鳥帽子田彰

2) 「喘息患者における喫煙と関連する要因」

第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 一般演  
題 ミニシンポジウム1「喘息コントロール不良  
の要因」 2008年6月12, 13, 14日

木村友昭、鳥帽子田彰

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

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）  
（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

研究分担者 中村 裕之 金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教授

**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。本研究では環境中の自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）のアレルギーへの影響をin vitroにおいて系統的に評価し、さらにその影響を抑制するための予防法を開発し、その効果を検証した。DEPはp38MAPK経路の活性化を通じて、好酸球細胞の遊走能の増加を、またNF- $\kappa$ Bの活性化を通じて、好酸球のMCP-1の産生、IL-8産生を増加させた。したがってDEPは好中球、マクロファージ、好酸球の浸潤を過剰に促進させることにより、炎症の拡大を引き起こしていることが推測された。またBiwaエキスは、DEPによるアレルギー反応の増強を抑制することがin vivoの実験で示された。したがって、気管支喘息の重症化を抑制できることが示唆された。

**研究協力者** 人見嘉哲（金沢大学医薬保健研究域医学系准教授）、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（広島大学医歯薬総合研究科教授）

#### 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である自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）のアレルギーへの影響をin vitroで詳細に調べ、in vivoにおいてはBiwaエキスの予防効果を検証した。

#### B. 研究方法

##### 1. In vitro研究

0.03%のDEP存在下、10ng/mL IL-1存在下、もしくは両方を含まない（定常状態）の3実験区を作製し、RPMI1640培養液中で好酸球様HL-60#clone15細胞株

を37°C、1.5%CO<sub>2</sub>下で72時間培養した。

0.1mg/mLDEP存在下、非存在下において4時間培養した好酸球様HL-60#clone15細胞から核内タンパク質を精製し、NF- $\kappa$ Bの測定を行った。

好酸球様HL-60#clone15細胞を5nM MG132存在下もしくは非存在下において37°C60分プレインキュベーション後、0.1mg/mLDEP存在下もしくは非存在下において37°C24時間培養した。遠心して培養上清を得、MCP-1をELISA法で測定した。

5mMのNAC存在下もしくは非存在下で37°C60分プレインキュベート後、0.1mg/mLDEP存在下、非存在下の組み合わせで37°C60分インキュベートした好酸球様HL-60#clone15細胞（1x10<sup>7</sup>cells/mL）に、100ng/mLとなるようにEotxinを添加し、ケモカキンスチャンバーで遊走能測定を行った。またp38 MAP kinase活性をATF-2タンパクのリン酸化能で測定し

た。

## 2. In vivo研究

Biwaエキスの気管支喘息の予防効果を調べるために、DEPPを含む水およびBiwaエキスをアレルギーモデルマウスに投与した。すなわちマウス1グループ6匹に対して、DEPに関して(-)、(+), Biwaエキスに関して(-)、(+ )の4群を作成し、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  $\mu$ g、DEP62.5  $\mu$ g、総液量0.1ml)した。

増悪因子DEP  
抗原 ダニ抽出物  
BALB/c オス 6匹

Biwaエキスアレルギー予防実験

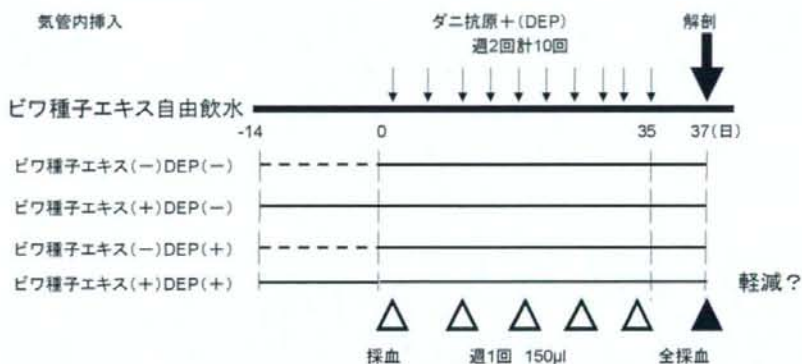


図1 DEPによるアレルギー反応とBiwaエキスによる抑制作用を検証するダニ抗原誘発マウスモデルの実験デザイン

## C. 研究結果

### 1. in vitro実験

1) DEPによる好酸球様HL-60#clone15細胞株のMCP-1、IL-8産生増強効果

DEP・IL-1非存在下(図2a、左)、DEP存在下(図2a、中)、IL-1存在下(図2a、右)いずれにおいてもIL-8、MCP-1の産生が認められた。DEP存在下では、MCP-1産生量は、定常状態と比べて1.9倍、IL-8産生量は、1.1倍、IL-1存在下では、それぞれ2.2倍、1.5倍であった(図2、B)。

2) DEP濃度依存的MCP-1産生の増加

MCP-1産生に与えるDEPの影響を0、0.03~1mg/mLまで5濃度検討したところ、0.1mg/mLまでは、濃度依存的にMCP-1産生量は増加し、それ以上の濃度では、細胞毒性が表れMCP-1産生量が減少した。MCP-1産生はControlと比較して最高で6.5倍増加した。

3) DEPによるNF- $\kappa$ Bの活性化

DEPフィルター溶液については、1250  $\mu$ g/mlのDEP 15mlを本フィルター45cm<sup>2</sup>でろ過した(図1)。全血の特異的IgG1抗体価、培養した脾細胞におけるIL-13値、TGF- $\beta$ 1値、気管支洗浄液中の好酸球を評価した。

本動物実験は、「高知大学医学部動物実験委員会」の承認を得て、「高知大学医学部動物実験指針」に従って行った。

核内タンパク質1 $\mu$ gあたりのNF  $\kappa$  B活性を図3に示した。P65 NF  $\kappa$  Bに対する特異性は、consensus配列に対するDNA (Wild) との競合反応によって確認した。その結果、DEP存在下では、非存在下と比べて活性化型NF  $\kappa$  B が1.4倍に増加していた。

4) MG132により阻害されたMCP-1産生

DEP存在下ではMCP-1産生が増加したが、MG132添加によりMCP-1産生の有意な低下が認められた(図4)。

5) DEPによりup regulateされた好酸球様HL-60#clone15細胞の遊走能

DEP添加では、controlと比べて有意な遊走能の上昇が認められた(p<0.05)。また、NACの添加により遊走能は有意(p<0.05)に低下した(図5)。

6) DEPにより活性化されたp38 MAP kinase (Thr180/Thr182)活性

Control と比べてDEP添加細胞では、明らかなバンドの増強が認められた。また、NAC添加した細胞では、バンドの明らかな減弱が認められた。NACおよびDEP添加細胞においても明らかなバンドの減弱が認めら

れた(図6)。

2. in vivo実験

ピワエキス投与マウスでは、DEPによって増加した全血の特異的IgG1抗体価、培養した脾細胞におけるIL-13値、TGF- $\beta$ 1値の有意な減少が認められた(図7)。

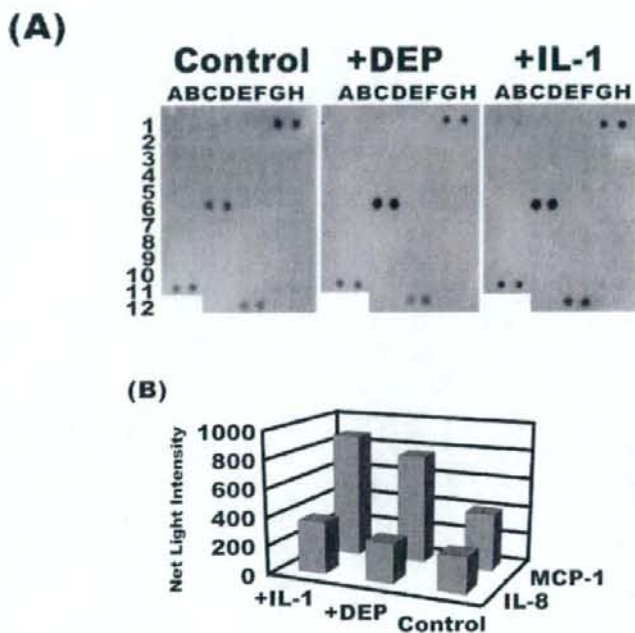


図2 DEPによる好酸球様HL-60#clone15細胞株のMCP-1、IL-8産生増強効果

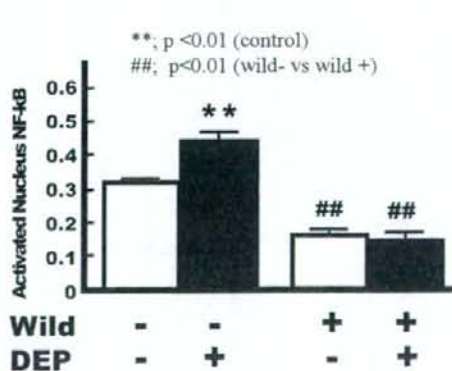


図3 DEPによるNF- $\kappa$ Bの活性化

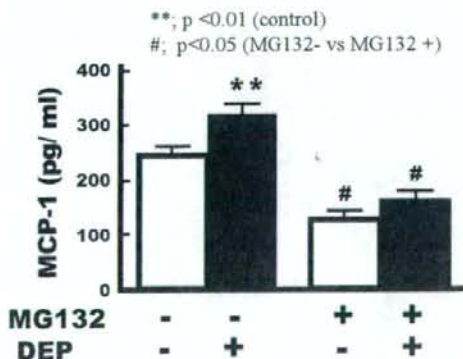


図4 MG132により阻害されたMCP-1産生

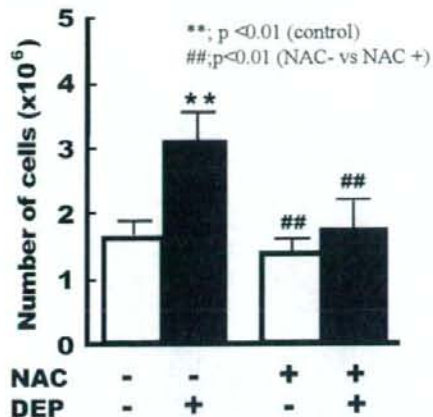


図5 DEPにより up regulateされた好酸球様HL-60#clone15細胞の遊走能

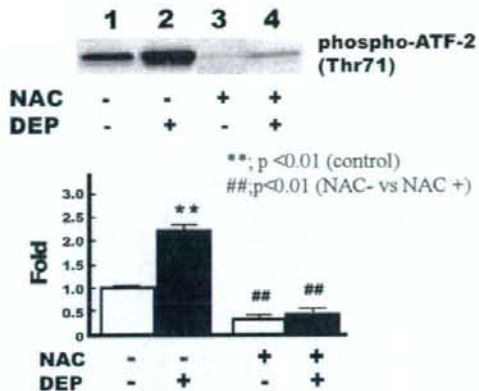
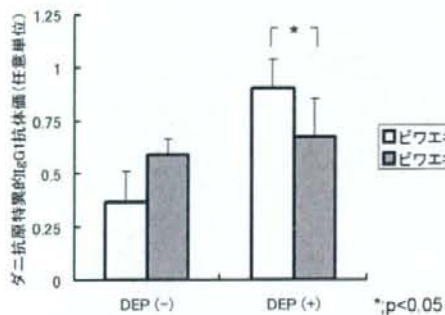
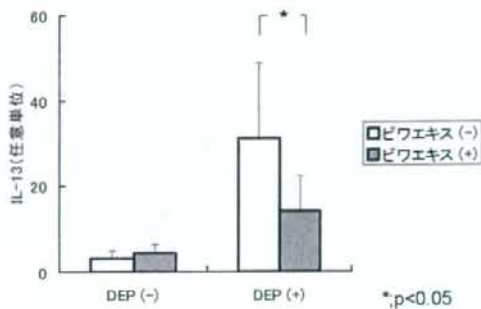


図6 DEPにより活性化された p 38 MAP kinase (Thr180/Thr182)活性

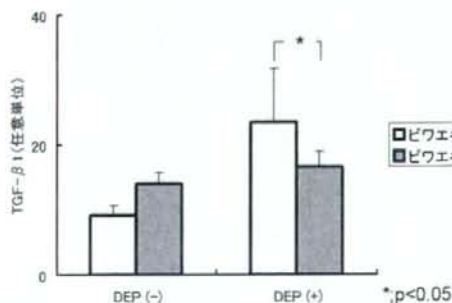
ビワエクスがダニ抗原特異的IgG1抗体価に与える影響



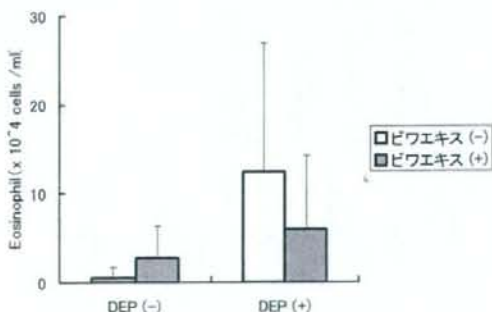
ビワエクスがダニ抗原誘導脾細胞IL-13に与える影響



ビワエクスがダニ抗原誘導脾細胞TGF-β 1に与える影響



ビワエクスが気管支洗浄液中の好酸球に与える影響



すべての組み合わせで有意差なし

図7 ダニ抗原誘発マウスモデルにおけるDEPによるアレルギー反応(特異的IgG1抗体価、IL-13値、TGF-β 1値、気管支洗浄液中の好酸球)とBiwaエクスによる抑制作用

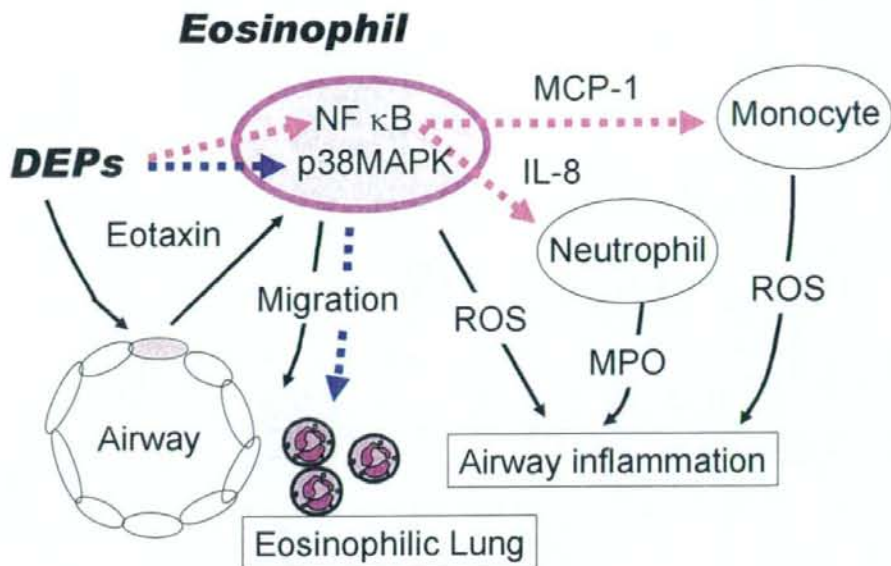


図8 DEPによる気管支喘息の増悪における機序



#### D. 考察

DEPがなぜ気管支喘息を起こすのかという明確な答えははまだ得られておらず、気管支喘息の特徴である好酸球の気管支上皮での増多の機序についてもまだ解明されていない。今回の検討では、DEPがIL-1存在下において好酸球様細胞株HL-60 clone#15のIL-8およびMCP-1の産生を増強し、NF $\kappa$ Bの活性化を促してMCP-1産生を増強していることがわかった。MCP-1は、CCケモカインに属するケモカインであり、単球・マクロファージの遊走・浸潤に必須であり(Cavaillon 1994)、IL-8は好中球の遊走に必要である。また、DEPは、P38 MAP kinaseを活性化することで、好酸球の走化性を向上させていることも明らかになった。

このことは、DEPによる気管支の炎症の後期において、好酸球が好中球やマクロファージの動員に関わり、集積したこれらの細胞が分泌したエオタキシンによりさらに好酸球を動員して、さらに炎症を拡大している機序が示されたものと考えられた。これはヒト末梢血リンパ球にDEPを暴露するとIL-8、MCP-1、RANTESのmRNA発現が上昇することや(Fahy, Hammad et al. 2000)、気管支上皮細胞のEotaxin mRNAレベルの上昇(Takizawa, Abe et al. 2003)やICAM-1産生が増強されること(Takizawa, Abe et al. 2000)、鼻粘膜細胞のヒスタミンmRNAの上昇を引き起こすこと(Terada, Hamano et al. 1999)などから、DEPによって好中球や好酸球、マクロファージ等が炎症部位へ集積すると同時に、炎症を起こした細胞からも炎症性サイトカインやケミカルメディエーターが放出されることで炎症が拡大していくものと考えられている。

このIL-8やMCP-1産生の増加はMitogen-activated protein (MAP) kinase のantagonistにより阻害されること(Fahy, Hammad et al. 2000)から、DEPはMAP kinase経路の活性化を通して炎症を拡大するものと考えられている。一方、DEPは、気管支上皮細胞のNF $\kappa$ Bの活性化を活性化し、IL-8産生を増強し好中球遊走を促すと同時に、抗菌性ペプチドであるbeta-defensin2の産生も誘導しており(Nam, Ahn et al. 2006)、生体内に取り込まれたDEPを細菌感染の防御系で修復・排除を試み

ていると思われる。さらに、未酸化のDEPが、ネズミ骨髄由来dendritic cellsの抗原特異的T細胞のIFN $\gamma$ の減少やIL-10の増加を引き起こし、nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2-mediated signaling pathwayを活性化し、IL-12産生を阻害するので(Chan, Wang et al. 2006)、DEPはTh1分化を抑制しTh2分化への移行に関わっていると考えられている。

このようにDEPは、他のアレルゲンの増悪因子として働き(Davies, Rusznak et al. 1998) (Salvi, Frew et al. 1999)、(Fahy, Hammad et al. 2000)、(van Zijverden and Granum 2000)この微粒子を含む汚染された大気に長期間暴露されたのちに花粉やハウスダストのような免疫源に暴露されると、細胞性免疫はIgE産生にむかう(Kanoh, Suzuki et al. 1996)と推測されている。

以上により、図8の如く、DEPが気管支喘息を増悪する機序が考えられる。DEPが、好酸球遊走因子であるエオタキシンで活性化されたヒト好酸球培養細胞のp38 MAPK経路の活性化を通じてさらに好酸球遊走を活発にすること、DEPがNuclear Factor kappa B(NF- $\kappa$ B)経路を活性化することで、マクロファージ遊走因子(MCP-1)やインターロイキン-8(IL-8)の発現を強くすることによって気管支喘息の重症化がもたらされるということが想定された。このようにアレルギー促進物質としてのDEPが肺への好酸球浸潤やマクロファージ・好中球浸潤に中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

またBiwaエキスをマウスへ投与を行ったところ、DEPによって促進されたアレルギー反応が有意に抑制された。このように、ピロ種子エキス投与マウスでは、気管支喘息の重症化の予防効果が期待される。今後の研究においては、ピロ種子エキスの有効成分について明らかにされなければならない。

#### E. 結論

DEPはp38MAPK経路の活性化を通じて、好酸球細胞の遊走能の増加を、またNF $\kappa$ Bの活性化を通じて、好酸球のMCP-1の産生、IL-8産生を増加させた。したがってDEPは好中球、マクロファージ、好酸球の浸潤を

過剰に促進させることにより、炎症の拡大を引き起こしていると推測された。またBiwaエキスは、DEPによるアレルギー反応の増強を抑制することがin vivoの実験で示された。したがって、気管支喘息の重症化を抑制できることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(原著)

(1) 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.

(2) Hirota R, Akimaru K, Nakamura H

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

Toxicology in Vitro 2008 Jun;22(4):988-994.

(3) Hatta K, Nakamura H, Usui C, Kobayashi T, Kamijo K, Hirata T, Awata S, Kishi Y, Arai H, Kurosawa H

Medical and psychiatric comorbidity at psychiatric beds in general hospitals: a cross-sectional study in Tokyo.

Psychiat Clin Neurosciences(in press)

(4) 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)

### 2. 学会発表

(シンポジウム)

(1) 中村裕之、弘田量二、鳥帽子田彰

環境とアレルギー—環境中化学物質によるアレルギー発症機序の解明と予防—

第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008年11月、東京

(2) 中村裕之、弘田量二、菅沼成文、康峪梅、櫻井克年

アレルギー発症予防用環境中化学物質除去フィルターの開発

第1回高知大学東京シンポジウム「グリーンサイエンスからの発言」、2009年1月、東京

(3) 中村裕之

アレルギーを予防する

第1回金沢大学未来開拓研究公開シンポジウム「病気を予防するための食と運動と環境」、2009年1月、金沢

## 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

