

200832001B

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

(H18-免疫-一般-001)

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 森 晶夫

平成21(2009)年4月

目 次

I. 総合研究報告

(総括)

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

(分担)

1. 気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究 ————— 33
森 晶夫
2. 重症難治性喘息の機序解明と臨床分類に基づく
治療法の確立に関する研究 ————— 52
高橋 清
3. 難治性喘息の機序の解明と治療法に関する研究 ————— 64
相沢 久道
4. 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 ————— 72
藤澤 隆夫
5. 平滑筋リモデリング機序の実験的検討 ————— 80
庄司 俊輔
6. 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 ————— 85
大田 健
7. 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 ————— 92
烏帽子田 彰
8. マウス喘息モデルを用いた気道過敏性および
気道リモデリング形成に関する基礎的研究 ————— 98
田中 宏幸
9. 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 ————— 110
中村 裕之

気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究

研究代表者 森 晶夫

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長

研究分担者

高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター院長） 庄司俊輔（独）国立病院機構東京病院臨床研究部長）
相沢久道（久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科教授） 藤澤隆夫（独）国立病院機構三重病院臨床研究部長）
大田 健（帝京大学医学部内科教授）
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）
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）
中村裕之（金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教室教授）

研究協力者

秋山一男（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センター長） 前田裕二（同センター室長）
谷口正実（同センター室長） 大友 守（同センター室長）
後藤牧子（同センターリサーチレジデント） 北村紀子（同センター研究員）
梶山雄一郎（同センター研究生） 橋本知実（同センター流動研究員）
大友隆之（同センターリサーチレジデント） 神沼修（東京都臨床医学総合研究所主任研究員）
石井直人（東北大学大学院医学系研究科生体防御学助教授） 菅村和夫（同教授）
宗田 良（独）国立病院機構南岡山医療センター副院長） 岡田千春（同診療部長）
木村五郎（同アレルギー科医員） 平野 淳（同アレルギー科医員）
金廣有彦（岡山大学医学部歯学部附属病院血液・腫瘍・呼吸器内科） 谷本 安（同講師）
片岡幹男（岡山大学大学院保健学研究科）
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（同大学院生）
平口雪子（独）国立病院機構三重病院臨床研究部研究員） 細木興亜（同小児科医師）
星野友昭（久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科講師） 川山智隆（同講師）
坂崎優樹（同大学院生） 澤田昌典（同大学院生）
井上博雅（九州大学大学院胸部疾患研究施設講師）
足立哲也（帝京大学医学部内科学講座講師） 長瀬洋之（同講師）
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）
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（同准教授）
秋丸国広（同助教） 弘田量二（同助教）
菅沼成文（高知大学医学部教授） 日下幸則（福井大学医学部教授）

研究要旨

難治性・重症喘息の病態解明と有効な治療法の開発は、喘息研究分野に残された重要課題である。米国 NIH の大規模研究 SARP (Severe Asthma Research Program) study、欧州 12 カ国共同研究の ENFLMOSA (European Network For Understanding Mechanisms Of Severe Asthma) study、Novartis のスポンサード研究である TENOR (The epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Resimens) study が近年開始された国際研究で、特に前 2 者の評価が高いが、それぞれ重症喘息 250 例、163 例を登録した調査で、そのうちの約 3 割がステロイド依存性喘息と公表されている。われわれが厚生労働科学研究として実施した全国 100 症例のステロイド依存性喘息症例登録調査の意義は実に大きいものと考えられる。この調査では、難治性喘息の大部分は非アトピー型で、半数が喘息発症 1~2 年以内にステロイド依存状態に陥っており、この相当数のサブグループ患者の重症喘息の機序は、発症時から通常の喘息と異なることが示唆された。メカニズムの観点からは、高用量のステロイド使用にかかわらず、高度

の炎症反応が持続していることが明らかになり、ステロイドに良好に反応する通常の喘息とは本質的な差異が認められることを報告している。従来の学説では、長期間にわたるコントロール不良の結果として高度のリモデリングが蓄積され、重症・難治化に到るものとされてきたが、かなりの割合の重症・難治性喘息では、病初期よりそれ以外の喘息とは異なる機序で進行しているものとはじめて認識されることになった。

重症化の分子生物学的要因の解明は、予防、治療への突破口と期待される。これまでの研究成果としては、難治化関連要因として、従来説の好酸球過剰活性化、平滑筋細胞を主体とした気道リモデリングに加えて、T細胞の細胞性免疫応答の異常を見出ししてきたので、重症、難治性喘息症例の炎症細胞（T細胞、好酸球、気道上皮細胞、平滑筋細胞）において、特定できたこれらの細胞表面受容体、シグナル伝達分子、サイトカイン遺伝子転写機構の異常について、治療応用の観点を常に念頭におき、詳細に解析した。本研究班は難治性・重症喘息の診療・研究の分野ではわが国のエキスパートとして名高い臨床医、研究者で構成され、理想的な研究体制となっている。臨床分野から重症喘息診療のエキスパートである森、高橋、相沢、大田、庄司、藤澤が、臨床データ、サンプルを提供し、臨床医学的、細胞生物学的研究を共同研究チームとして遂行した。基礎研究分野のエキスパートとして田中、烏帽子田、中村が、実績のある動物モデル、シグナル伝達、分子疫学、環境医学の観点から参加した。難治化要因がT細胞、好酸球、平滑筋細胞に担われているとの知見を得たので、それぞれ森、藤澤、庄司が、分子・細胞生物学的解析を進め、costimulatory signalによるステロイド抵抗性誘導、その結合阻害、シグナル阻害によるステロイド感受性の回復、TSLPによるステロイド抵抗性の好酸球活性化、気管支平滑筋細胞の遊走などの新規知見を世界に先駆けて見出した。遺伝子の観点からは、烏帽子田、中村が candidate gene approach によって分子疫学、遺伝子多型解析を実施し、難治化関連遺伝子が数個同定できた。これも世界初の知見として高く評価される。難治化機序の仮説検証と治療介入には動物モデルの役割が不可欠であるが、この分野でわが国のトップ研究室に位置づけられる田中、大田、相沢らにより、リモデリング解析のための新規モデル、アジュバントフリーの感作モデルが考案され、環境因子、感染因子などの増悪、難治化因子が研究された。当研究班の目標である重症・難治化機序の解明については、順調に成果が得られたものと考えられる。

予防・治療の応用面に向けて、Niflumic acidによるステロイド抵抗性気道過敏性の治療効果（相沢）、PTENフォスファターゼによる強い炎症抑制効果（大田）、costimulatory signal 阻害によるステロイド感受性の回復（森）を見出したことは、喘息難治化の予防・治療法の分野では極めて斬新な発見であり、大いに期待される。CTLA4-Igを含め本研究で扱った一連の薬物は、わが国で現在、喘息以外の免疫疾患を対象とした臨床試験が進行中で、本研究班の成果は、重症喘息分野へ対象を拡大する根拠となる。森は、難治性喘息の大部分を占める非アトピー型喘息の起因抗原推定法を開発した。薬物治療の効果が限定的な難治性・重症喘息に対しては、抗原特異的治療アプローチの実現に期待がかけられる。予知・早期診断に向けては、難治化遺伝子は世界的にも例がなく、烏帽子田、中村が見出した重症化関連遺伝子はバイオニアリングな成果といえる。このように、われわれの班研究からは実用をにらんだ成果が数多く得られており、研究がきわめて順調に遂行できたものと考えられる。

A. 研究目的

慢性喘息の本態が好酸球性炎症にあることが解明され、吸入ステロイドをファーストチョイスとする抗炎症療法が普及した結果、比較的軽症な症例に対しては十分な予後・QOLの向上がもたらされた。一方で、重症者に対する治療効果は満足な水準に達していない。国内のAIRJ、海外のGOAL study等の大規模調査も、重症者の治療効果に未だ改善の余地が大きいことを示している。なかでも、経口ステロイド薬を常時使用するステロイド依存性の重症喘息患者は、喘息死の予備軍とも位置づけられ、必ずしも近年の治療成績向上の恩恵には浴していないこと、頻回の救急受診・長期入院・社会不適応を理由とする直接・間接の医療費に占める比重の高いことが指摘されている。カナダ、オーストラリアで行われた調査では、患者数では1割の重症群が喘息全体の医療費の直接コストで4割以上、間接コストで6割を占めることが報告されている。喘息の重症化、難治化の病態・発症機序を解明し、

治療・予防法を確立することができれば、年間5-6,000人の喘息死を未然に防止するのみならず、喘息を理由に家庭や社会から疎外されている患者、患者家族のQOLを改善し、なお増大しつつある医療費の削減にもつながることが期待される。われわれは、厚生科学研究「気管支喘息の難治化の病態機序の解明と難治化の予防・治療法開発に関する研究」（主任研究者 森 晶夫、平成12～14年）、厚生労働科学研究「気管支喘息の難治化機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究」（同、平成15～17年）において、まずステロイド依存性喘息100症例の登録調査の実施し、現在の我が国における重症喘息の実態、病態、治療内容を把握してきた。同時期に開始した米国NIHの大規模研究SARP (Severe Asthma Research Program) study、欧州12カ国共同研究のENFUMOSA (European Network For Understanding Mechanisms Of Severe Asthma) studyが、重症喘息250例、163例を登録しているものの、ステロイド依存性喘息はそのうちの

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

B. 方法

1) 森（研究代表者）らは、前年度までに、重症喘息症例の過半数で、T細胞レベルのステロイド抵抗性が特徴的に認められることを、*in vivo*、*in vitro*で証明してきた。微少環境における costimulatory signal とサイトカインによって、T細胞にステロイド感受性が誘導されることを示したので、Th2系応答に重要とされるOX40 ligand (OX40L)のノックアウトマウスのT細胞クローン移入モデルを利用して、costimulatory シグナルとステロイド感受性の関連について初めて *in vivo*で解析した。

加えて、わが国の重症喘息の大部分を占める非アトピー

一型喘息に対して、起因アレルゲンの診断法を樹立することと、IgE非依存性の気道閉塞メカニズムを解明する目的に、T細胞由来の気管支平滑筋収縮活性の characterization を進めた。

● 対象症例、臨床検査

国立病院機構相模原病院アレルギー科外来に通院中の成人喘息症例より、インフォームドコンセントを得たうえで対象とした。アセチルコリン、ヒスタミンに対する気道過敏性の測定、および抗原吸入負荷試験は、日本アレルギー学会の標準法によって行った。β刺激剤、テオフィリン剤、インタール、抗コリン剤、ベクロメサゾン吸入は、12時間以上、抗ヒスタミン剤、ステロイド剤は24時間以上中止した。アトピー型は、吸入アレルゲン20種を含む皮膚テストにおいて、一つ以上の陽性を示すものと定義した。非アトピー型は皮膚テスト陰性のものとした。

● アレルゲン

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

● 細胞培養およびアッセイ

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

ニングし、ダニアレルゲン Der f 2 特異的ヘルパーT (Th) 細胞クローンを樹立した。さらに、autologous の PBMC を抗原提示細胞とし、抗原を加えて共培養することで subcloning、増殖せしめ、種々の活性化刺激に応答した サイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。末梢血 CD4⁺細胞、Der f 2 特異的ヒトヘルパーT (Th) 細胞クローンをを用い、固相化抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、rIL-2 を活性化刺激とし、サイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。培養中に各濃度の dexamethasone、各種シグナル伝達阻害薬を加え、dexamethasone 用量反応曲線より IC₅₀ 値を求めた。

● OX40L ノックアウトマウスのステロイド感受性

既報の如く Balb/c マウスを OVA で感作し、所属リンパ節より感作リンパ球を回収、*in vitro* での抗原刺激、limiting dilution を行って、OVA 特異的 Th clone を樹立した (Kaminuma O, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 16:448, 1997)。また、OVA 特異的 T cell receptor を持つ DO11.10 transgenic mouse の脾リンパ球より CD4 T 細胞を回収し、同様に抗原刺激を行って、Th clone を樹立した。Irradiated spleen cell を antigen-presenting cell とし、subcloning、さらに expansion し、細胞移入実験に使用した。5 x 10⁶ 個の Th clone を OX40L (+/+) または (-/-) マウスに尾静脈より注入し (Day 0)、翌日 OVA を経気道的に抗原チャレンジした。さらに 48 hr 後、BUXCO にて気道抵抗を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。Day 1, 2 に dexamethasone (DEX) 1, 3 mg/kg、および vehicle を皮下投与した。

● T 細胞依存性気流閉塞メカニズムの解析 (*in vitro*)

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

● T 細胞依存性気流閉塞メカニズムの解析 (*in vivo*)

前述の T 細胞移入による喘息モデルを用いた Th clone を無処置マウスに尾静脈より注入し (Day 0)、翌日 OVA を経気道的に抗原チャレンジした後、経時的に気道抵抗をモニターした。

2) 高橋 (南岡山医療センター) らは、難治性喘息の定義、難治化の臨床マーカー確立を目指して、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最重症を含む重症持続型までの 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、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。各重症度別に気道炎症を検討する目的に、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 5 mg 未満) 31 名と (4b: PSL 内服量 10 mg 未満) 1 名] の合計 90 名を対象に、既報の方法 (Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. Eur Respir J. 2005; 26: 523) により、呼気水を採取し、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、肺機能との相関や試案の難治基準 (経口 PSL 5 mg 以上/日) との関連を含めた重症度との比較検討を行った。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。

好塩基球機能の検討として、既報 (Tanimoto, Y. et al. Clin Exp Allergy 2003; 33: 1561) 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 (5 ng/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。IL-16 の発現と産生を RT-PCR、Flow cytometry, Confocal microscopy, Western blotting, ELISA にて検討した。また M-CSF の mRNA については RT-PCR により、また蛋白の発現を confocal microscopy ならびに flow cytometry にて検討した。FcεR1 架橋刺激による M-CSF の遊離は ELISA 法を用いて、細胞表面の M-CSF 蛋白を flow cytometry にて検討した。さらに、末梢血単核球から比重遠心と negative selection で得た高純度好塩基球も FcεR1 架橋刺激による M-CSF の遊離を検討した。

リンパ球と気道上皮細胞との相互作用の検討として、難治症例において気道炎症に重要な役割を果たす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、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。

3) 相沢 (久留米大学) らは、前年までの研究で、IL-13 気管内投与による喘息モデルが、ステロイド抵抗性の気道過敏性を特徴とすることを報告したので、重症喘息に対する治療介入をめざして、CLCA (calcium-activated chloride channel) に選択性の高い Cl⁻ チャンネル阻害薬である Niflumic acid の効果について検討した。

6 週令の A/J マウスに 50 μl のリコンビナント IL-13 あるいはビークルを 1, 3, 5 日に気管内投与した。デキサメサゾン 0.5 mg/kg を最初の IL-13 (またはビークル) 投与 24 時間後より 4 日間投与した。気道過敏性、気管支肺胞洗浄 (BAL)、組織学的検査、肺組織からの RNA 定量を最終の IL-13 投与より 24 時間後の 6 日目に行った。

臨床研究としては、喘息死症例の肺組織における、CD4、

8 陽性 T 細胞 IL-18 産生の検討を行った。昭和 48 年以降に久留米大学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。このうち 6 名の肺病変部における 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。

次いで、頻度の高い喘息難化因子である COPD とアレルギー性鼻炎につき検討した。COPD 合併重症喘息に対する長時間作用性抗コリン薬の効果 (1)、および、鼻炎合併例に対する鼻炎治療により喘息症状も改善するか (2) を検討した。(1) 対象として、BDP \geq 1200 $\mu\text{g}/\text{d}$ + LABA 使用してもコントロール不良の喘息+COPD 患者で、喘息発作の病歴、可逆性、喘息の加療歴、喀痰中好酸球増多歴、喫煙歴 (\geq 20 pack-year)、post-bd-FEV1/FVC $<$ 70%、 $\%DLco$ $<$ 80%、HR-CT にて LAA のある患者を選択した。n = 20 (平均年齢 64.6 歳、13 例はテオフィリン併用中)。急性効果として、Double blind, crossover にて placebo または Tiotropium 18 μg を投与し、FEV₁、FVC、PEFR、IC を測定した。長期効果として、open-label にて Tiotropium 18 μg od, 12 週投与し、FEV₁、FVC、PEFR、IC、喘息症状、PFR 自己測定、short-acting β 2-agonist の使用頻度、COPD 症状 (MMRC) を評価した。

(2) 九州沖縄地区 217 施設を対象に、患者アンケート調査を実施した。喘息症状と治療内容、アレルギー性鼻炎の有無とその症状・治療内容を含む。2 回以上実施出来た患者では、その経過と治療内容も検討した。アンケート実施例数は 3270 例で、アンケート解析例数は 3014 例であった。

4) 田中 (岐阜薬大) らは、ダニ抗原気管内投与によるアジュバントフリーの喘息モデルを確立した (Wakahara et al, 2008)。吸入麻酔下に、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、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。さらに、本モデルを用いて、喘息の難化因子と想定されている環境汚染物質ディーゼル排気粒子 (DEP) および RNA ウィルスの作用を解析した。

● DEP の影響

ダニ抗原量は、それ自体ではわずかに気管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。DEP は、環境基準値の約 1/2 倍 (30 μg)、1.5 倍 (100 μg) および 5 倍 (300 μg) 換算量を、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、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。

● ウィルス感染様刺激による影響

ライノウィルスなどの一本鎖 RNA ウィルスが増殖する際に生じる二本鎖 RNA の模倣品である poly IC を投与した後、Der f の粗抽出物を複数回投与して喘息反応を惹起した。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 fluticasone propionate (FP) を投与し、ウィルス様刺激によるステロイド抵抗性を検討した。

喘息重症化に関連する新たな遺伝子の同定を目指して、喘息モデルにおけるステロイド投与による変動遺伝子を DNA マイクロアレイにより解析した。好酸球性炎症に関係した難化遺伝子と独立した難化遺伝子とを区別して解析するため、IL-5 受容体 α 鎖欠損マウス、IL-5 トランスジェニックマウス、抗 IL-5 中和抗体を用いて気道過敏性、気道炎症、リモデリングを比較検討し、抗原曝露ならびに IL-5 の過剰産生あるいは中和による変動遺伝子を解析した。

5) 藤澤 (三重病院) らは、重症好酸球性炎症の原因に関して、近年 Th2 応答アジュバントと指摘されたサイトカイン TSLP の好酸球に対する作用、好中球-好酸球クロストークにつき解析した。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。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による) で検討した。サイトカイン添加による受容体の発現制御も検討した。次いで、好酸球をヒトリコンビナント TSLP、各種好中球由来エラスターゼ、カテプシン G 及び PR3 (proteinase 3) 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。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、セリンエステラーゼ阻害薬 phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) を加えて、活性酸素産生を検討した。Fluo-3AM を用いて、エラスターゼによる好酸球のカルシウム流入を蛍光分光光度計にて測定した。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。脱顆粒は各種刺激による培養後 4 時間で、上清を採取して、EDN を ELISA 法にて定量した。サイトカイン産生については、好酸球を TSLP ならびにプロテアーゼ存在下で 24~48 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 20 種のサイトカイン・ケモカイン、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、eotaxin、GRO- α 、IP-10、MCP-1、RANTES、MCP-2、MCP-3、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIG を測定した。蛋白産生が認められたサイトカインはさらに定量的 PCR 法によって遺伝子発現を解析した。

6) 庄司 (東京病院) らは、気道由来の細胞として、正常

ヒト気管支平滑筋細胞を遊走実験の標的細胞として用い、正常ヒト肺線維芽細胞（米国クロネティクス社）を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穴ボイデンチャンパーを用いて測定した。チャンパ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%CO₂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。気管支平滑筋細胞に発現している α 、 β インテグリン・サブユニットをIntegrin α/β -Mediated Cell Adhesion Array Combo Kit（米国Chemicon社）で解析した。ウェルに細胞を同量ずつ播種した後、抗体を介して底面に接着した細胞のみを染色・溶解し吸光度測定（波長540nm）することにより、ウェル抗体に対応するインテグリン・サブユニットの細胞での発現を解析した。

7) 大田（帝京大学内科）らは、喘息難治化の有力な原因と考えられている非可逆的な気道リモデリングに関して、増殖因子（PDGF、TGF- β 、IGF-1）の役割を明らかにしたので、予防・治療法の開発を目的として、増殖因子受容体阻害薬の効果を検討した。A/JマウスをOA+alumで免疫後、OA吸入を繰り返して、リモデリングモデルを作成した。EGFR阻害薬（AG1478）あるいはPDGFR阻害薬（AG1295）をOA吸入前に点鼻投与し、BALFあるいは肺病理にてその効果を検討した。新規治療に向けて、PhosphataseであるPTEN cDNAに細胞内移行ドメインであるTAT sequenceを付加し、大腸菌内でTAT-PTENタンパクを作製した。好酸球機能に対するTAT-PTENの効果を*in vitro*で検討した後、喘息モデルマウスを用いた*in vivo*でのTAT-PTENの効果を検討した。

8) 鳥帽子田（広島大学）らは、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 \pm 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康群50例（48.8 \pm 2.45歳）である。3群間に年齢差、性差はなく、また重症群と軽症群は、いずれも健康群と比較して総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。同時に、血清MCP-1値を比較した。調べた遺伝子座位は、Eotaxin/CCL11のAla23Thr、Eotaxin-2/CCL24のIle29Leu、G1387A、G1520A、C1923A、G1926A、Eotaxin-3/CCL26のG-57A、C77T、G140A、T2497G、

T2563C、MCP-1（CCL2）のA-2518G、T901CとC1543Tである。HO-1遺伝子については、遺伝子上流の繰り返しGT反復配列の数が33以上のアレルをLアレルとし、これを有する人の割合を各群で調べた。

9) 中村（金沢大学）らは、*in vitro*研究として、内源性エストロゲン除去処理をしたMCF-7細胞に試験試料添加、IL-1で刺激後3日間培養し、培地中に産生されたMCP-1（CCL2）濃度をサンドイッチELISA法で測定した。DEP存在下、2日間培養後の上清のサイトカインをRayBio Human Cytokine Array III kitで測定した。DEP抽出物の好酸球遊走能への影響についても調べた。

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DEPを含む水をろ過し、サイトカインおよび好酸球遊走能を調べた。*In vivo*研究としては、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。マウスは各群6匹で、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、カンユーレによる経気道的に投与（1回投与量；ダニ抗原4 μ g、DEP 62.5 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を本フィルター45cm²でろ過した。

（倫理面への配慮）

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って各研究者の施設ごとに倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論しうる最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

C. 結果およびD. 考察

1) 重症喘息におけるステロイド抵抗性（森ら）

● OX40L ノックアウトマウスを用いた costimulatory

signal とステロイド抵抗性の関連

我々は、T 細胞クローンを無処理マウスに移入、抗原チャレンジを行うことにより、気道過敏性、肺好酸球浸潤を惹起する T 細胞依存性喘息モデルを報告してきた。共刺激分子の1つである OX40 リガンド (OX40L) ノックアウトマウスおよびコントロールの BALB/c マウスに、T 細胞クローン 1×10^7 cells/head を経静脈的に移入し、24 時間後に OVA 経鼻チャレンジを行い、移入 30 分前および移入 24 時間後に 0 (生理食塩水のみ)、1, 3 mg/kg のデキサメタゾンを皮下投与した。チャレンジ 48 時間後に無拘束呼吸機能解析装置 (BUXCO) を用いて塩化メサコリンによる気道抵抗を測定し、Penh (enhanced pause) 値で表示した。BALF 好酸球の解析は、チャレンジ 48 時間後に BAL を施行、総細胞数をカウントし、サイトスピンを用いてスライドガラスに接着させ、ギムザ染色を行い、好酸球数をカウントした。

肺好酸球浸潤はデキサメタゾンの用量依存的に抑制された (図 1-1)。OX40L ノックアウトマウスではデキサメタゾン 0 mg/kg 群と比較して 3 mg/kg 群で 80% 抑制され、統計学的有意差を認めた。Wild type では約 50% の抑制にとどまった。デキサメタゾンの 3 mg/kg 投与においては、両群の好酸球数の抑制率に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

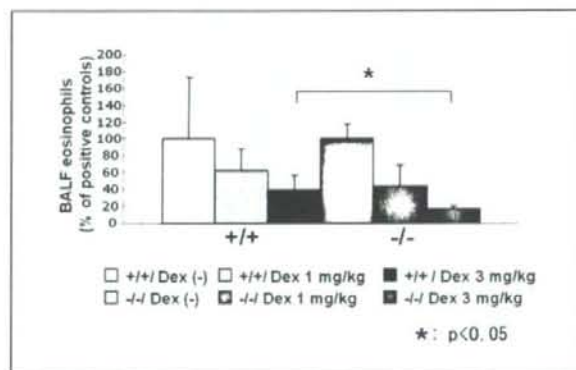


図 1-1、OX40L $-/-$ マウスではステロイド薬投与による好酸球浸潤抑制効果が増強される

以上の結果から共刺激シグナル (costimulatory signal) 分子が *in vivo* でステロイド抵抗性に関与することが明らかにされた。T 細胞活性化には T 細胞受容体 (TCR) を介する抗原特異的シグナルと共刺激分子を介する抗原非特異的シグナルが必要である。共刺激分子の1つである OX40 リガンド (OX40L) は抗原提示細胞上に発現しており、T 細胞上に発現している OX40 (CD134) と共に T 細胞増殖やサイトカイン産生を増強することが知られている。これまでに *in vitro* の実験から、TCR シグナルのみの活性化と比較して、TCR シグナルと共刺激シグナル両方を活性化するとステロイドに対する抵抗性が高

くなる、という結果が得られている。今回得られた知見は、OX40L ノックアウトマウスを用いて、共刺激シグナルとステロイド抵抗性との関連を *in vivo* で初めて証明したものである。T 細胞レベルのステロイド抵抗性は、T 細胞に intrinsic な異常でなく、T 細胞をとりまく microenvironment 中の costimulatory signal、サイトカインの多寡によってコントロールされているとのコンセプトを支持する。われわれのこれまでの研究では、難治性喘息症例における *in vivo* の T 細胞レベルのステロイド抵抗性を確認しているが、T 細胞のステロイド抵抗性は、微小環境中の costimulatory signal およびサイトカインをコントロールすることで、制御可能であるとの考え方を支持する (図 1-2)。CTLA4-Ig、CD28 シグナル伝達阻害剤である PI-3 kinase 阻害剤の臨床応用を視野に入れ、さらに、*in vitro*、*in vivo* におけるステロイド抵抗性克服の可能性につき検討中である。



図 1-2、T 細胞のステロイド感受性は、微小環境における活性化シグナル、サイトカインによって規定される

● 非 IgE 依存性、T 細胞依存性気道閉塞機序

重症喘息の大部分は非アトピー型喘息が占めることが、われわれの研究班が実施した難治性喘息症例登録調査の結果明らかになっている。IgE-マスト細胞による即時型アレルギー反応で説明可能なアトピー型喘息と異なり、非アトピー型喘息の気道収縮メカニズムは明らかでない。原因抗原診断法、抗原特異的治療法開発、新規気道閉塞治療薬開発を目指して、*in vitro* のヒト気管支平滑筋収縮モデルを確立し、T 細胞由来の気管支平滑筋収縮物質の characterization を行った。気管支平滑筋の収縮を評価する実験系としては、ウシヤモルモット等の気管リングをマグヌス管に牽引する評価系がよく用いられるが (Beasley et al, J. Appl. Physiol. (1989) 66; 1685, Gosens et al, Br. J. Pharmacol. (2002) 137; 459)、動物種の違いによる収縮差が生じる可能性がある。ヒト気管リングの収縮実験系も報告されているが (Cerrina et al, Prostaglandins (1989) 37; 457, Norel et al, Br. J. Pharmacol. (1999) 126; 867)、手術摘出臓器を用いることから、入手が困難であり、実験計画が立てにくいなどの問題が多い。われわれは、commercially available なヒト正常気管支平滑筋細胞を用いた、3次元 collagen gel による簡便な収縮測定系を確立した (図 1-3)。

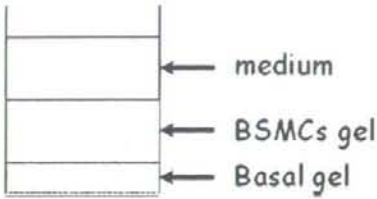


図 1-3、ヒト正常気管支平滑筋細胞を用いた、3 次元 collagen gel

24 well culture plate に、basal gel layer を形成し、さらにヒト正常気管支平滑筋細胞 (BSMC) を封入した gel layer を重層する。6 日間培養した後、medium をアッセイバッファーで置換し、ゲルを well 側壁から剥離して、経時的に収縮を測定する。

収縮物質を添加した後、ImageMaster VDS-CL (Amersham) で gel 画像を撮影し、top gel の面積を算出し、収縮率を計算した (図 1-4)。

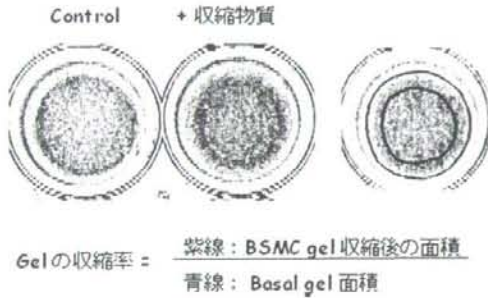


図 1-4、ゲル収縮の撮影像と収縮率の算出

まず、既知の収縮物質による気管支平滑筋収縮を評価した。0.01-100 μM の histamine および methacholine を加えて、収縮率を計測した。いずれの場合も、dose-dependent に収縮が観察された (図 1-5)。

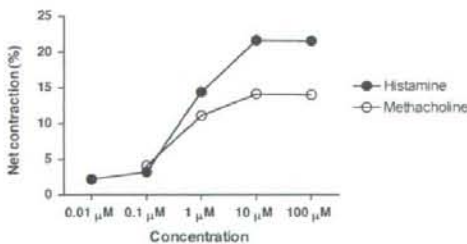


図 1-5、Histamine, methacholine による dose-dependent な培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルの収縮

従来、培養ヒト気管支平滑筋細胞を用いた実験系では、ロイコトリエン (LT) C4, D4 に対する収縮反応を検出す

ることが困難であった。培養条件を検討することで、histamine, methacholine に比較して弱いながらも、有意な収縮を再現性よく観察することができた (図 1-6)。

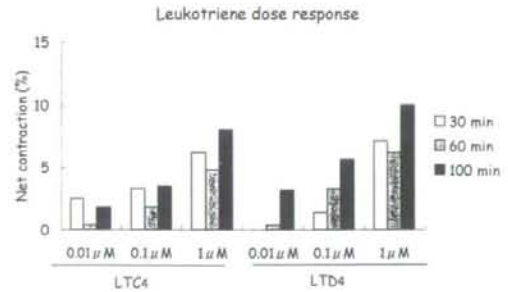


図 1-6、LTC4, LTD4 による培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルの経時的収縮

次に、既知のアンタゴニストの効果を検討した。H1 アンタゴニストの pyrilamine と 30 分 preincubation した後に、Histamine, methacholine を加えて、収縮反応を惹起した。Pyrilamine 1 μM は、histamine 1 μM の収縮を 90% 抑制したが、methacholine による収縮反応を抑制せず、拮抗薬の特異性が確認できた (図 1-7)。

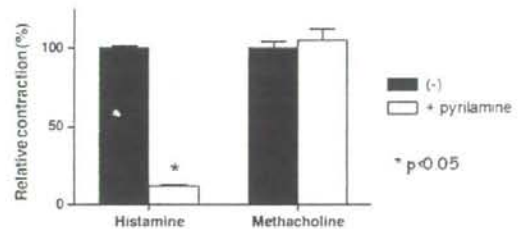


図 1-7、H1 アンタゴニスト pyrilamine による収縮反応の抑制

気管支拡張効果を有する薬物の効果についても確認した。いったん histamine, methacholine で収縮させたゲルに、formoterol を加え、弛緩効果を確認した (図 1-8)。

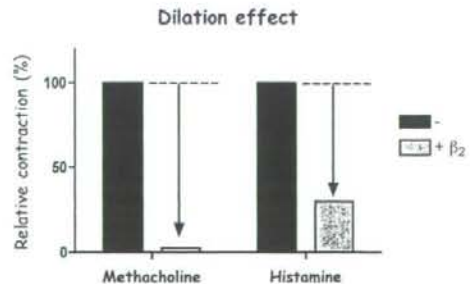


図1-8, Formoterol 添加による methacholine, histamine 収縮の弛緩

以上の結果から、本研究で用いた培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルは、*in vivo* の収縮特性和薬物反応性を反映したモデルと考えられた。そこで、末梢血 T 細胞の SAP2 (*Candida albicans* 由来の精製抗原) に反応した IL-5 産生、SAP2 吸入誘発時に isolated LAR が認められる症例から、PBMC を分離し、SAP2 と培養 48 時間後の上清を、濃縮、透析後に、本ゲルにアブライした。SAP2 反応症例 Case 1, 2 の T 細胞培養上清には、平滑筋ゲルの収縮活性が明らかに認められた (表 1-1、図 1-9)

表 1-1. T 細胞依存性の LAR を示す非アトピー型喘息ドナー (1, 2) とコントロールの喘息ドナー (3)

| Case | IL-5 production in response to SAP2 | % Fall in FEV _{1.0} | |
|------|-------------------------------------|------------------------------|-----|
| | | IAR | LAR |
| 1 | + | 0 | 34 |
| 2 | + | 0 | 42 |
| 3 | - | 0 | 0 |

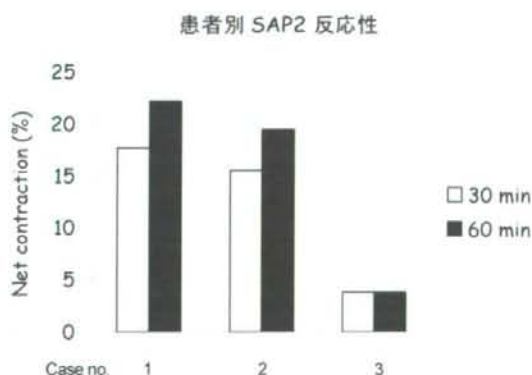


図 1-9, 末梢血単核球の SAP2 培養上清におけるゲル収縮活性

収縮物質の同定を進めるために、Case 1, 2 の末梢血 T 細胞から、SAP2 特異的 T 細胞クローンを樹立し、活性化に伴って、平滑筋の収縮活性を産生するクローンを選択した。われわれは、アトピー型喘息症例の末梢血からダニアレゲン特異的 T 細胞クローンを樹立している。これらのクローンの 1-2 割のクローンも、培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルの収縮活性を産生する。この活性は、抗ヒスタミン薬、抗ロイコトリエン薬、抗コリン薬で阻害されない、新規の平滑筋収縮物質である可能性が高い

(Data not shown)。T 細胞クローン培養上清中の気管支平滑筋収縮物質の詳細な characterization、同定を進めている。

● T 細胞依存性気流閉塞モデルの確立

次に、T 細胞依存性気流閉塞機序の解明と治療法研究に向けて、T 細胞移入モデルを解析した。既に、T 細胞クローンを無処理マウスに移入、抗原チャレンジを行うことにより、気道過敏性、肺好酸球浸潤を惹起する T 細胞依存性喘息モデルを報告してきた (Kaminuma O., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:448, 1997, Nakata A., et al. *Int Immunol.* 13:329, 2001, Kaminuma O., et al. *Eur J Immunol.* 31:2669, 2001)。今回は、T 細胞クローン 1×10^7 cells/head を無処理 BALB/c マウスに経静脈的に移入し、24 時間後に OVA 経鼻あるいは吸入 (噴霧) チャレンジを行い、経時的に気道抵抗を測定した。無拘束呼吸機能解析装置 (BUXCO) を用いて Penh (enhanced pause) 値で表示した。また、麻酔下レスピレータ装着下に呼吸機能測定装置 (BUXCO 社) を用いて、直接呼吸抵抗を測定した。BALF 好酸球の解析は、チャレンジ 48 時間後に BAL を施行、総細胞数をカウントし、サイトスピンを用いてスライドガラスに接着させ、ギムザ染色を行い、好酸球数をカウントした。

図 1-10 に実験スケジュールを示す。DO11.10 transgenic mouse から OVA 特異的 Th クローンを樹立した。Th クローン移入の 24 hr 後に OVA または抗原エピソードの p323-339 を経鼻的にチャレンジし、40 hr 後まで Penh 値を測定した p323-339 の場合は、1 hr 後から、OVA の場合には 2 hr 後から、Penh 値が上昇し、40 hr 後まで持続した。

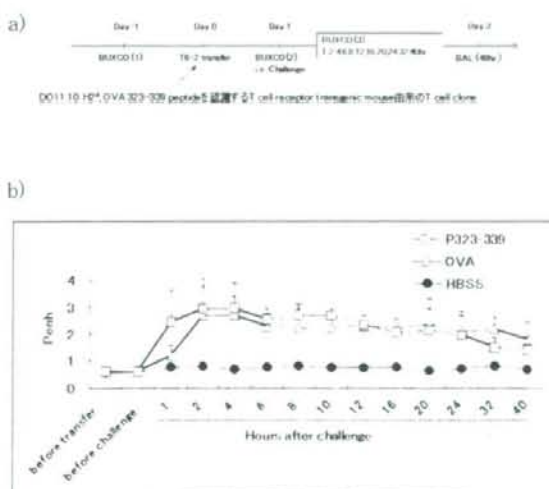


図 1-10, Th クローン移入後の Penh の推移 DO11.10 transgenic mouse から OVA 特異的 Th クローンを樹立した。a) 実験スケジュール Th クローン移入の 24

hr 後に OVA または抗原エピトープの p323-339 を経鼻的にチャレンジし、48 hr 後まで Penh 値を測定した。b)OVA の場合 6 時間後から、Penh 値が上昇し、28 hr 後まで、p323-339 の場合 4 時間後から上昇し、48 hr 後まで持続した。

気流閉塞は喘息を特徴付ける病態であり、従来は、IgE を介したマスト細胞の活性化によって化学伝達物質が放出されて気道抵抗が上昇する機序だけが知られていたが、今回のわれわれの研究成果から、液性免疫以外に、気流閉塞を生じさせる機構が存在し、Th 細胞がそのエフェクター細胞であることが、はじめて明らかにされた (図 1-11)。

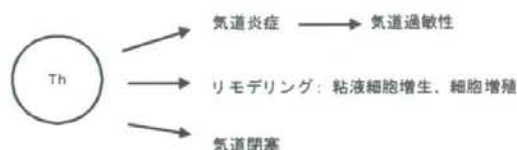


図 1-11、T 細胞は、気道炎症、気道過敏性、リモデリングに加えて、気流閉塞も担う

これまでのわれわれの調査研究の成果として、難治性喘息症例では高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない現状が確認されている。新たな治療ターゲットを見出すことが、治療面でのブレイクスルーにとって必須の課題と考えられる。hBSCM ゲルでは、既知収縮物質 Histamine, Methacholine の濃度依存的な収縮が認められ、気管リングによる収縮での報告とほぼ同等の成績であった。拮抗剤および β2 作動薬の前処置による収縮抑制を認めた。本実験系のメリットとしては、1. 特別な測定機器を必要とせず、取り扱いが簡便であること、2. 培養細胞を用いることから、実験計画が立てやすいこと、3. 24 well plate での培養であり、サイトカイン等の添加培養に適していること等があげられる。一方、デメリットとしては、現時点では、灌流処理ができないので、測定項目数分の gel の作製が必要になることがあるものの、hBSCM の収縮実験系では、既知の気管支収縮物質の活性が検出でき、新たな収縮要素の同定および新規収縮抑制剤の開発に向けたツールとして有用と考えられる。加えて、喘息患者 PBMC および mite 特異的 Th2 clone 培養上清で、gel 収縮が認められ、*in vitro* での収縮強度は、*in vivo* での LAR の有無と相関していた。今後、喘息患者 T cell での収縮物質の同定および平滑筋細胞への作用の解明に向けて、有力なツールとなる。この気管支平滑筋収縮活性を産生する T 細胞の characterization (表面マーカー、産生誘導 cytokine

など)を明らかにしたい。

Th clone 移入による非アトピー型喘息モデルの確立においては、T 細胞が気流閉塞を惹起する必要十分な要因であることがはじめて見出された。気流閉塞のメディエータ同定とその産生制御機構の解明は、最大の課題である。また、気流閉塞を生じさせる T 細胞のマーカーを明らかにすることは、診断、治療に向けた第一歩となる。T 細胞依存性、IgE 非依存性の喘息メカニズムは、非アトピー型喘息に限らず、感作 T 細胞が存在するアトピー型喘息においても共通に働いているものと推測される。重症・難治性喘息症例では、現行の喘息治療薬の効果がきわめて限定的であることが複数の調査研究によって指摘されているが、現行の気管支拡張治療で効果が十分に得られない症例群にとっては、新規気流閉塞メカニズムの解明は、新たな治療法開発へ向け、大いなる福音となる。

2) 臨床的重症度検討 (高橋ら) : 中枢気道の気流制限 (PEF 値)、肺実質の障害 (Residual rate)、気管支壁肥厚 (%WA)、血中コーチゾール値等の指標については、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 PSL0~5 mg/日未満) の群間では有意差が認められなかった。しかし各群と重症持続型のうちの 4b 群 (5 mg 以上~10 mg 未満) 並びに 4c 群 (10 mg 以上) の間には有意差がみられた。末梢気道数値 (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。喘息患者 547 例中の重症持続型 4c 群は 1.6%であったが、今回提案した難治性喘息の基準である 4b+4c 群 (経口 PSL を 5 mg/日以上服用) 患者の占める比率は 4.6%で、難治群に比し非アトピー型が 77.8%と高率を占め、罹病期間も非難治の 12.2 年に比して 25.8 年と有意に長期であった。呼気水中の各種炎症指標の検討では、喘息患者は健康者に比して CRP, H₂O₂, Nitrite/Nitrate が上昇しており、有意差はないものの、Albumin は健康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、健康者よりも高い傾向が認められた。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。Cytokine については、Th2 サイトカイン以外にも各種 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。また H₂O₂, Nitrite/Nitrate は、FEV1/PEFR と有意の負の相関が認められた。重症持続型、特に難治例 (4b) では各種サイトカインはいずれも低値であった。また H₂O₂, Nitrite/Nitrate と FEV1, PEFR は有意な負の相関を示し、重症持続型 (難治) では NO は低値であったが、H₂O₂ は認められた。

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。IL-16 蛋白は、Flow cytometry では未刺激の細胞内に検出され、Confocal microscopy

では、細胞質に局在していた。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。PMA+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。Gene Chip を用いて培養好塩基球に発現する遺伝子を網羅的に解析した結果、M-CSF 遺伝子が恒常的に発現しており、IgE 刺激によって発現が増強することが示唆された。real-time RT-PCR により培養好塩基球における M-CSF の mRNA を定量したところ、その発現が知られている他の細胞株である fibroblast や KL812 と同等あるいはそれ以上の恒常的な発現を認めた。なお、末梢血好塩基球においても同程度の発現がみられた。さらに IgE 刺激によって培養好塩基球の M-CSF mRNA 発現は増強し、そのピークは刺激後 2 時間であった。M-CSF には分泌型と膜型の isoform の存在が知られているが、培養好塩基球には分泌型、膜型、いずれの mRNA も恒常的に発現していた。confocal microscopy により、培養好塩基球には M-CSF 蛋白も発現していることが確認された。2 種類の抗 M-CSF 抗体を用いた flow cytometry による検討では、細胞内ならびに細胞表面における蛋白の発現が認められ、分泌型、膜型両者の M-CSF 蛋白の存在が示唆された。さらに Fc ϵ RI 架橋を刺激することにより培養好塩基球から M-CSF の遊離が認められ、細胞表面の M-CSF 発現も増強した。また培養好塩基球には分泌型および膜型の M-CSF の mRNA が恒常的に発現し、Fc ϵ RI 架橋刺激により M-CSF の mRNA 発現が増強し、細胞内と細胞表面に蛋白の発現も認められた。一方、末梢血好塩基球でも、Fc ϵ RI 架橋刺激で M-CSF 遊離がみられた。

リンパ球と気道上皮細胞との相互作用の検討：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、MMP-9 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 産生が増加していた。気管支平滑筋細胞とリンパ球の相互反応に関しては、難治性喘息群以外の症例における PBMC からの MMP-9 の産生能には、重症度による差があることが判明した。治療ステップ 4 の群でもっとも高値を示し、ついで治療ステップ 2、3、難治性喘息群の順に低値であった。なお、喘息患者末梢血 PBMC に気管支上皮培養細胞を追加し相互作用を検討すると、MMP-9 産生の増加率は難治性で最も高値であった。また TGF- β 1 では、治療ステップ 4 でもっとも産生が高値である点は MMP-9 産生とも同様の結果であったが、さらに TGF- β 1 では難治性喘息群でも産生が高値であり、気管支上皮培養細胞を追加した際の相互作用は難治性において顕著であった。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。一方、気道上皮細胞との相互反応による MMP-9 並びに TARC の産生能に対しては抑制傾向を示した。

3) 難治化因子の基礎・臨床的検討 (相沢ら)

Niflumic acid は、気管支喘息における IL-13 誘導性の気道過敏性、気道炎症、気道分泌を抑制し、その作用の一部は JAK2/STAT6 系のリン酸化の抑制によるものと考えられた (図 3-1)。今回の動物実験に用いた Niflumic acid をはじめとする CLCA 阻害薬は、新しい難治性喘息の治療薬となりうると考えられた。

2logPC200-Ach

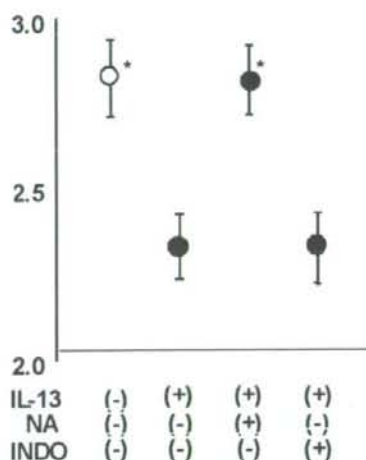


図 3-1、Niflumic acid (NA)は、IL-13 によるステロイド抵抗性気道過敏性を改善する。(*P<0.05 compared with IL-13 instillation)

● 喘息死病理組織の IL-18 産生解析

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。CD4 陽性 T 細胞、肺胞上皮細胞、好中球は IL-18 を産生していた。興味深いことに肺病変部では CD4 陽性 T 細胞のみならず IL-18 産生 CD8 陽性 T 細胞も著明に浸潤していた。重症喘息の要因として、IL-18 産生 CD4 陽性 T 細胞や好中球のみならず、IL-18 産生 CD8 陽性 T 細胞も関与している可能性が考えられた。CD8 陽性細胞や IL-18 を抑制することにより、喘息の難治化を予防できる可能性がある。

● COPD、アレルギー性鼻炎合併重症喘息の解析

Tiotropium add-on 療法は、高用量 ICS+LABA 併用中の喘息+COPD 患者における FEV₁、FVC、PEFR、IC を有意に改善し、短期効果が確認された。また、長期効果に関しても、有意な FEV₁、FVC、PEFR、IC、PFR の改善、喘息症状の減少、short-acting β 2-agonist の使用頻度の減少、COPD 症状 (MMRC) の改善をもたらした。既に ICS+LABA で治療されているにもかかわらず重症である喘息患者において、長時間作用性抗コリン薬は呼吸機能を急性に改

善し、また長期間にわたって呼吸機能、自覚症状、気管支拡張薬の頓回回数を有意に改善した。

福岡県 55 施設、佐賀県 21 施設、大分県 17 施設、長崎県 52 施設、熊本県 21 施設、宮崎県 30 施設、鹿児島県 14 施設、沖縄県 7 施設で行った喘息調査 3270 例中解析可能例数は 3014 例であり、アレルギー性鼻炎合併率は約 50% であった。鼻の調子と喘息の調子は有意に相関し、さらに、鼻の調子の変化と喘息の調子の変化も有意に相関した。合併群では、鼻症状と喘息症状との間に有意の相関が見られた。鼻症状の悪化に伴い喘息症状も有意に悪化した。これらの成績より、1) COPD 合併が難治化因子となっている喘息患者に対する、長時間作用性抗コリン薬の投与は臨床上に有用である、2) アレルギー性鼻炎合併喘息患者では、アレルギー性鼻炎の治療により喘息も改善する可能性がある、と結論づけられた。

4) アジュバントフリー喘息モデルによる増悪因子の解析 (田中ら)

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、気道過敏性、好酸球増多、Th2 サイトカイン産生および TGF- β 1 産生量の増加、気道リモデリング形成を惹起した。IL-4 遺伝子欠損 (KO) マウスでは、基底膜下の線維化以外のいずれのパラメーターも、野生型マウスに比し有意な低下が観察された。IL-5 受容体 α 鎖 KO マウスでは、好酸球浸潤はみられなかったが、気道過敏性、リモデリングには差はなかった。IL-13 KO あるいは IL-4 受容体 α 鎖 KO マウスでは、いずれのパラメーターも有意な低下が観察された。ダニ抗原については、これまでに *in vitro* の解析により、抗原性ならびに各種細胞に対する作用が明らかにされてきたが、*in vivo* での検討は世界的にも十分とは言えない。従来の喘息モデルは、OA などの外来タンパク抗原と Alum に代表される Th2 誘導性のアジュバントを用いて全身感作する方法が用いられてきた。われわれは、実生活における抗原としてのダニ抗原を経気道的に反復投与する、より臨床に近いモデルを検討した。

ダニ抗原反復曝露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も、Th2 依存性であることが明らかになった。一方、OA モデルでは IL-5 受容体 α 鎖 KO マウスにおいて気道過敏性は全く誘導されず、好酸球由来の TGF- β 1 が基底膜下の線維化に重要であったが、今回のダニモデルの場合、好酸球の基底膜下の線維化における意義は小さいと思われた。また、ダニモデルにおいても気道過敏性、リモデリングには IL-13 が重要であることが明らかとなった。今後、KO マウスにおけるこれらの検討に加え、IL-13 中和抗体を用いて、治療的観点から検討を加える予定である。

● 喘息増悪因子としての DEP の効果

ダニ抗原投与に DEP を併用すると、気道反応性の亢進、

好酸球数浸潤の増悪、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かつ有意な増強が認められた。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、DEP 投与群で用量依存的に増強された。DEP はダニ抗原誘発気道炎症、リモデリングに対しアジュバント作用を示すことが明らかである。初回抗原投与時のみ DEP を併用投与した場合、気道炎症、リモデリングが増強された。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。

これまでの多くの研究は DEP と抗原の併用投与が多く、喘息病態の発症以前や初期における DEP の影響は不明である。そこで、初回抗原投与時のみ併用投与し、喘息病態の発症初期における DEP の影響を検討した。加えて、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も投与した。両検討とも DEP の併用によりダニ抗原誘発気道炎症、リモデリングが増強された。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。

DEP のアレルギー疾患発症の亢進作用に関しては、DEP の含有成分であるピレンによる IL-4 mRNA の発現増強と IFN- γ 産生の抑制が報告されている。また、DEP は抗原と結合可能であり、抗原のキャリアとして働いている可能性も示唆されている。しかしながら、本研究において初回抗原投与時および投与前に DEP を投与したところ、抗原投与期間中の DEP 併用投与の表現型と同等の表現型が得られた。すなわち、初めて抗原が体内に侵入する際、または、それ以前に DEP が存在することが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。このアジュバント作用の詳細をさらに検討する必要がある。

● RNA ウィルスモデル (poly IC)

ダニ抗原をマウスの気管内に頻回投与すると、用量依存的に気道過敏性、好酸球増多、Th2 サイトカイン産生、TGF- β 1 産生、気道リモデリングが惹起される。Fulicasonone propionate (FP) の気道内投与により、いずれの反応も有意に抑制された。poly IC を先行投与した後、ダニ抗原を反復投与したモデルでは、ダニ抗原の少量単独投与群に比し、気道過敏性、好酸球増多、Th2 サイトカイン産生がいずれも有意に増悪した。異なる二本鎖 RNA の poly adenylic polyuridylic acid (poly AU) や一本鎖 RNA の polycytidylic acid (poly C) では再現できないことから、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が明らかである。TLR4 KO マウスでも同等の結果が得られたことから、LPS の混入による反応は否定される。二本鎖 RNA による喘息増悪モデルに対する FP の影響を検討したところ、FP は好酸球増多、IL-13 産生を有意に抑制したが、気道過敏性、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。乳幼児期の RNA ウィルス感染、特に RS ウィルス、ライノウィルスが喘息発症、重症・難治化の要因となることは古くから報告されてきたが、詳細なメカニズムは不明である。我々のモデルでは、一本鎖 RNA ウィルス感染に際してウィルス複製時に産生・放出される二本鎖 RNA の模倣刺激である poly IC をマウスの気管内に先行投与することにより、ウィルス感染を模倣した。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、好酸球増多、リモデリング形成が観察された。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 とダニ抗原のコンビネーション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が考えられたので、ステロイド反応性を両モデル間で比較検討した。ダニ抗原単独による気管内投与群では、FP により気道過敏性、炎症性細胞浸潤が抑制されたのに対し、poly IC とダニ抗原のコンビネーションによる喘息モデルでは、FP は、好酸球増多を抑制したものの、マクロファージ・好中球・リンパ球数の増加を抑制せず、気道過敏性を改善しなかった。ウィルス感染が先行すると、その後の抗原曝露によって生ずる喘息様病態形成は、ステロイド抵抗性になる可能性が示唆された。

5) 重症好酸球性炎症成立の機序 (藤澤ら)

● TSLP の好酸球への直接作用

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

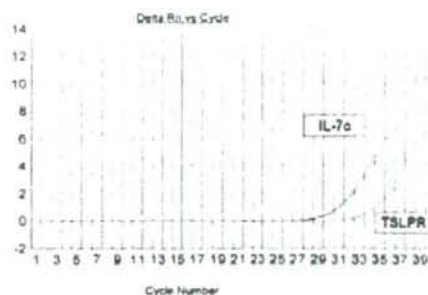


図5-1 IL-7 α 、TSLPR 発現 (定量PCR)

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。

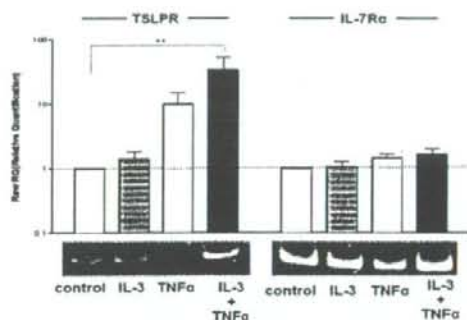


図5-2 IL-7 α 、TSLPR 発現に対する IL-3, TNF- α の作用

TSLPR 蛋白の存在についても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。

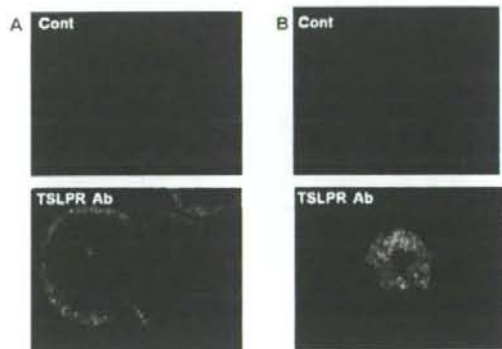


図5-3 IL-7 α 、TSLPR 発現 (A:好酸球、B:樹状細胞)

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。

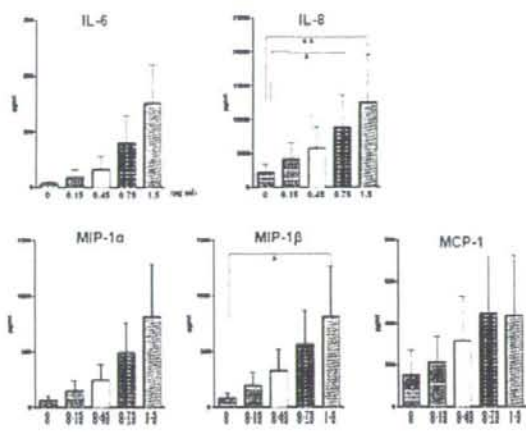


図5-4 TSLPによるサイトカイン産生

IL-6, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1はTSLP濃度依存的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。受容体発現を増強するTNF- α とIL-3の存在下では相加的に産生が増加した。

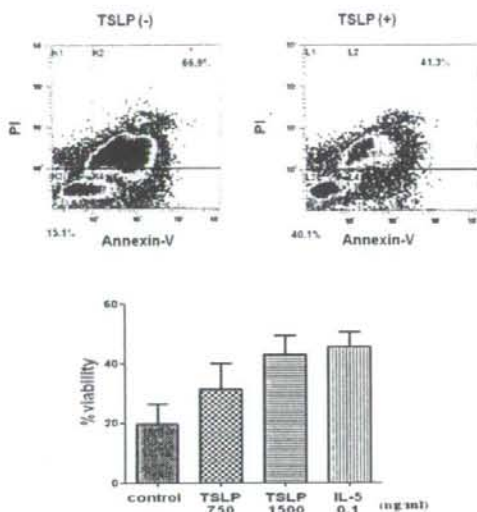


図5-6 TSLPの好中球生存延長作用 (陽性対照 IL-5)

TSLPは好酸球の脱顆粒(EDN遊離)ならびに活性酸素産生は誘導しなかった。

● 好中球由来プロテアーゼの作用

好中球由来プロテアーゼのうち、エラスターゼとカテプシンGは好酸球から濃度依存的に活性酸素産生を誘導した。なかでもエラスターゼが最も強力であり、PR3は効果を持たなかった。

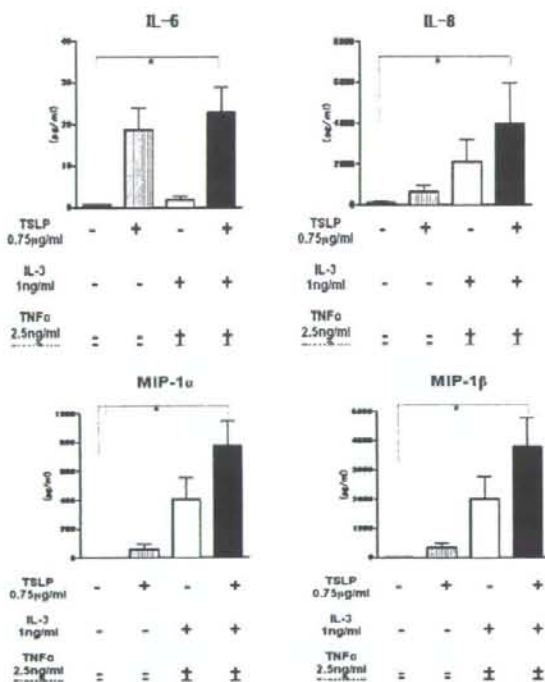


図5-5 TSLP誘導サイトカイン産生に対するIL-3, TNF- α の作用

また、TSLPは好酸球のアポトーシスを抑制して、生存を延長した。

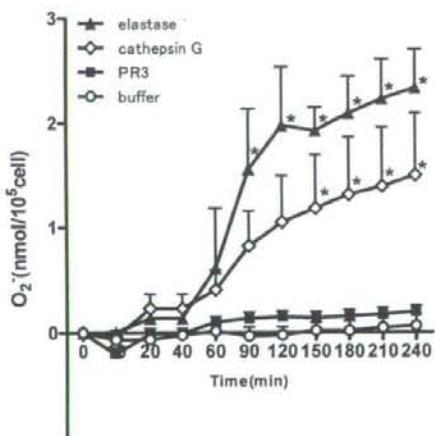


図5-7 好中球由来プロテアーゼによる好酸球活性酸素産生

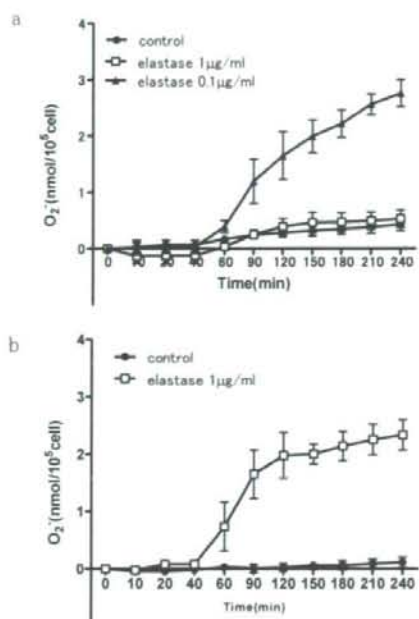


図5-8 エラスターゼによる好酸球活性酸素産生

一方、エラスターゼに対する反応はドナーにより差を認め、図7のように、0.1 μg/ml が至適濃度の例と 1 μg/ml が至適濃度の例が存在した。そこで、以下の検討では、ドナーにより最大の反応を示す濃度を用いることとした。

次に、阻害薬の効果を検討したところ、エラスターゼ阻害薬 sivelestat soAdium hydrate はエラスターゼによる好酸球からの活性酸素産生を有意に抑制した。

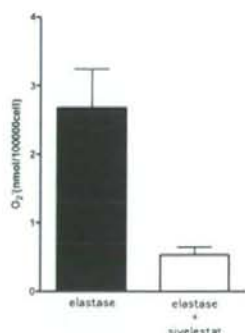


図5-9 エラスターゼ阻害薬による活性酸素産生抑制

セリンプロテアーゼ阻害薬 PMSF によっても有意な抑制を認めた。PMSF 自体の細胞毒性効果により、低濃度のみで用いたため、抑制作用は部分的であった。実験に用いたエラスターゼをはじめとする好中球プロテアーゼはセリンプロテアーゼであり、好酸球活性化のメカニズムとしては、Protease activated receptor 2 (PAR2) を介するものである可能性が考えられた。

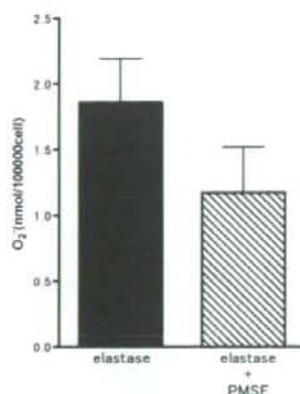


図5-10 セリンプロテアーゼ阻害薬による活性酸素産生抑制
エラスターゼが好酸球の細胞内カルシウムの上昇を引き起こすことも確認した。

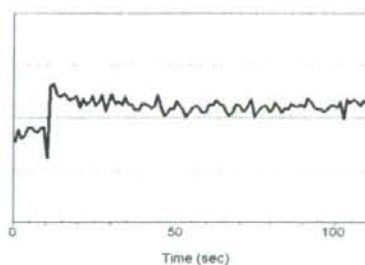


図5-11 エラスターゼによる細胞内カルシウムの変化

次に、好中球由来プロテア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。20種類のサイトカイン・ケモカインを同時に測定したが、有意な産生誘導が確認されたのは IL-6、TNF-α、IL-8、GRO-α のみであった。

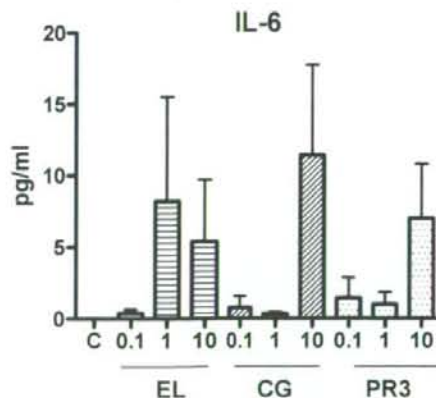


図5-12 好中球プロテアーゼによる好酸球からのIL-6産生

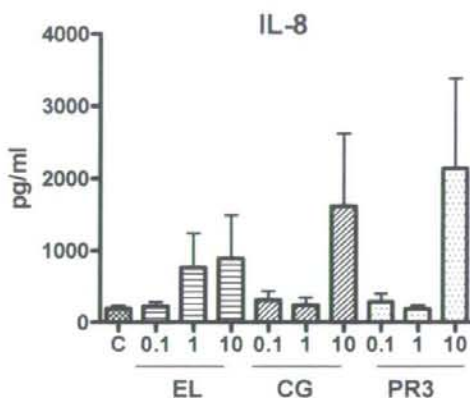


図5-13 好中球プロテアーゼによる好酸球からのIL-8産生

PR3は活性酸素産生を誘導しなかったにもかかわらず、サイトカインについてはその他のプロテアーゼと同様に産生を誘導した。

それぞれ蛋白が検出されたサイトカイン・ケモカインについては定量的PCR法にて遺伝子発現も確認した。

以上、好中球由来プロテアーゼは好中球の遊走および活性化に関与する分子の産生を特異的に誘導した。

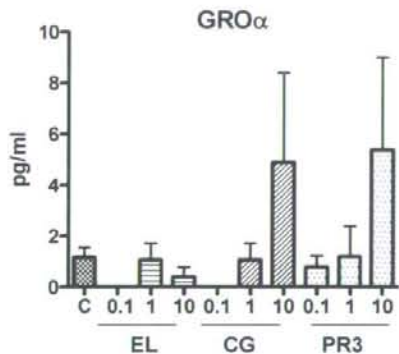


図5-14 好中球プロテアーゼによる好酸球からのGRO-α産生

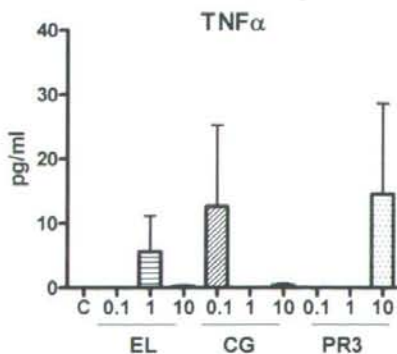


図5-15 好中球プロテアーゼによる好酸球からのTNF-α産生

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見出した。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。好酸球が、自然免疫系の産生するTSLPに反応して新たに炎症を誘導する機能をもつことが示唆される。ウイルス感染後、喘息はしばしば増悪し、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されるが、現在のところ感染性の喘息増悪に有効な治療薬はない。TSLPをターゲットとする治療は有望である。

好中球由来のセリンプロテアーゼが好酸球の主要なエフェクター機能の一つである活性酸素の産生、好中球遊走・活性化に関わるサイトカイン、ケモカイン産生を誘導することを明らかにした。活性酸素は好酸球の組織傷害性メディエーターの中で最も重要であり、顆粒蛋白のEosinophil peroxidase (EPO)と共同して、蛋白、脂質、核酸などの変性をおこし、細胞機能を障害する。これまでの報告では、IL-5、GM-CSF、固相化IgG、固相化IgAなどが好酸球からの活性酸素産生をおこすとされてきたが、好中球由来メディエーターとくにエラスターゼによる誘導については我々が初めて見出した。Th2環境下のみならず、好中球浸潤を招くTh1環境下でも好酸球が活性化し、組織傷害に関与する可能性が考えられた。好中球由来セリンプロテアーゼは、特に好中球活性化と遊走に関与するサイトカイン・ケモカインの産生を誘導した。我々はこれまでの研究でダニ抗原が好酸球に直接作用してIL-9産生を誘導することを報告したが、好酸球がエフェクターとして機能するだけでなく、サイトカイン・ケモカインを産生して、免疫反応の修飾にも関わることが示唆される。今回検討したプロテアーゼのうち、エラスターゼは最も強力であるが、ステロイド不応性の難治性喘息ではエラスターゼをターゲットとした治療も検討すべきと考えられる。現在、臨床で用いることができるエラスターゼ阻害薬 sivelestat sodium hydrate は全身性炎症反応症候群に伴う急性肺障害が適応であるが、重症喘息の補助的薬剤としての効果も期待できる。

好中球をターゲットとした治療としては、抗TNF-α療法がステロイド依存性の重症喘息に有効と報告されているが、結核の再燃など重篤な副作用も観察されている。TNF-αは感染防御にも機能するサイトカインであるため、副作用としての易感染性誘発をどうしても避けられないと考えられる。比較すると、単一メディエーターたるエラスターゼを標的とする治療であれば、副作用発症の可能性を大いに減らすことが可能である。

6) 重症リモデリングにおける気管支平滑筋細胞の遊走 (庄司ら)

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。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。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気管支平滑筋細胞上の β インテグリンとして $\beta 1$ 及び $\beta 2$ サブユニットが発現していた。同細胞上の α インテグリンについては、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 及び αv サブユニットの発現が確認できた。気管支平滑筋細胞培養上清は肺線維芽細胞に対する遊走活性を有していた。肺線維芽細胞に対する本上清の遊走活性は、濃度及び上清回収までの細胞培養時間依存的に上昇した。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を添加することにより低減した。

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。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。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。

我々は、気管支平滑筋細胞培養上清にフィブロネクチンが含まれ、気管支平滑筋細胞の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に対する気管支平滑筋細胞の遊走が抗 $\beta 1$ インテグリン抗体による細胞前処理で抑制されることを報告している。今回の研究で、気管支平滑筋細胞表面における、 β インテグリンの $\beta 1$, $\beta 2$ サブユニット、 α インテグリンの $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv サブユニットの発現を確認した。血管平滑筋細胞においては、フィブロネクチンへの遊走に $\beta 1$ 及び $\beta 3$ インテグリンが関与している可能性が報告されている (Clyman, R. I., et. al., *Exp. Cell Res.*, 200, 1992)。抗 $\beta 3$ インテグリン抗体による細胞前処理が抗 $\beta 1$ インテグリン抗体とは異なり、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を抑制しなかったのは、遊走細胞上の $\beta 3$ インテグリン発現が $\beta 1$ に比べて低いことが原因と考えられる。

7) 喘息モデルマウスにおける EGFR および PDGFR 阻害薬

の効果 (大田ら)

PBS 群と比して OA 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。OA 群、AG1478 投与群、AG1295 投与群における総細胞数はそれぞれ 264 ± 164 , 95 ± 62 , 130 ± 83 ($\times 10^4$ cells) であり、阻害薬投与群で減少傾向を認めるものの有意ではなかった。一方それぞれの群における好酸球数は 209 ± 151 , 46 ± 36 , 100 ± 70 ($\times 10^4$ cells) であり、OA 群と AG1478 群との間で有意差を認めた (図 7-1)。

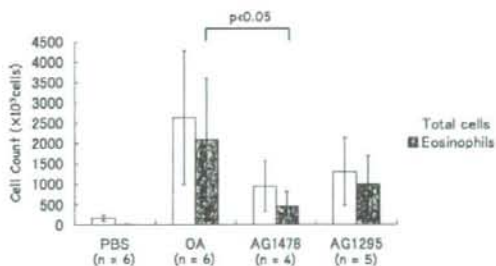


図 7-1 BALF での細胞分画

HE 染色では、コントロールである生食群と比して OA 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、AG1478 前投与により明らかに抑制された。また AG1295 投与群でも、同様な抑制効果を認めた (図 7-2)。

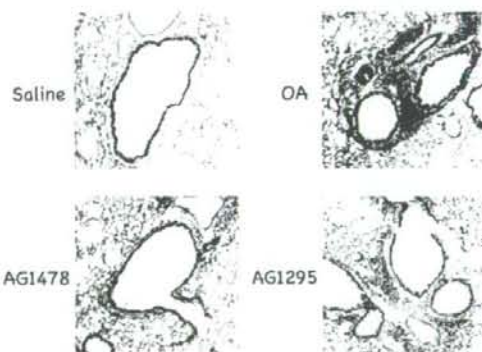


図 7-2 HE 染色

EVG 染色により、リモデリング指標の気道壁肥厚を検討した。生食群と比して OA 群では基底膜下の肥厚を認め、ピンク色に染色されるエラスチンの沈着が著明であった。この現象は、AG1478 により明らかに抑制された。一方 AG1295 の抑制効果は、部分的であった (図 7-3)。

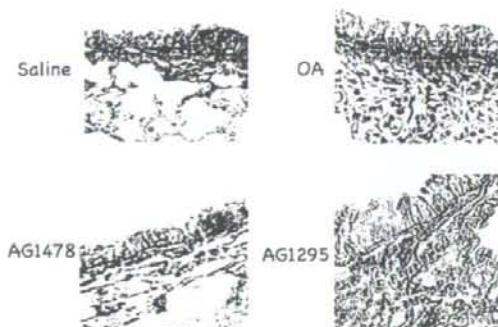


図 7-3 EVG 染色

慢性持続性喘息では、杯細胞などによる粘液の産生が亢進する。そこでAB-PAS 二重染色を行い、粘液産出に対する AG1478 の効果を検討した。生食群と比して OA 群では、有意に粘液産出細胞の増生を認めた。AG1478 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 AG1295 の抑制効果は、部分的であった (図 7-4)。

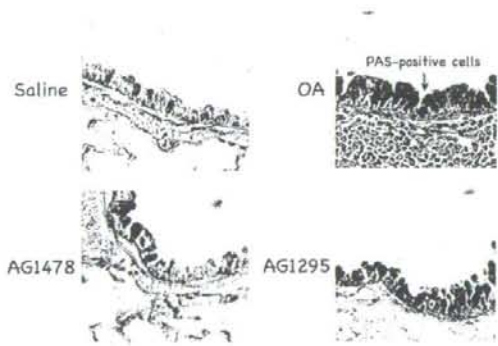


図 7-4 AB-PAS 二重染色

2) TAT-PTEN を用いた in vitro および in vivo での好酸球性炎症の制御

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 7-5)。



図 7-5 作製した TAT-PTEN の構造

TAT-PTEN の細胞内移行と局在を検討するために、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 7-6)。



図 7-6 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 7-7)。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。

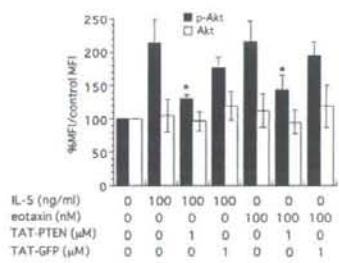


図 7-7 Akt リン酸化に対する TAT-PTEN の効果

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、健康人の好酸球ではその効果を認めなかった (図 7-8)。TAT-GFP に関しては、いずれも効果を認めなかった。

