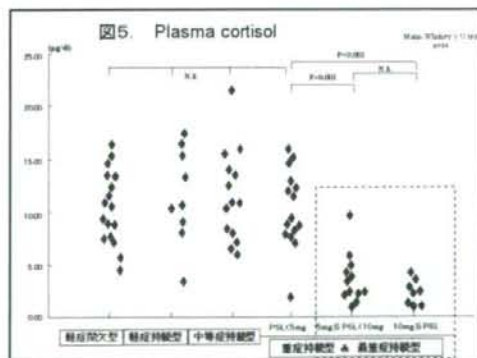
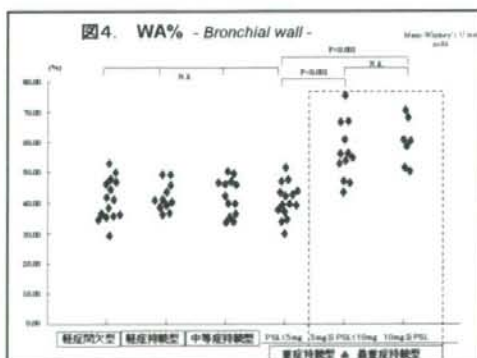
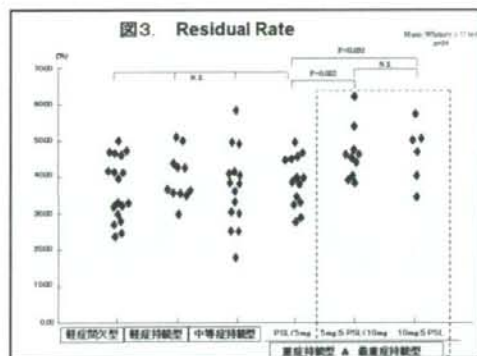
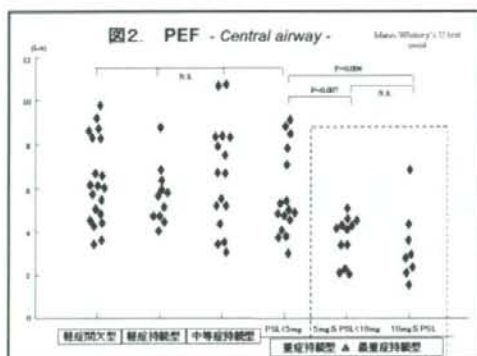
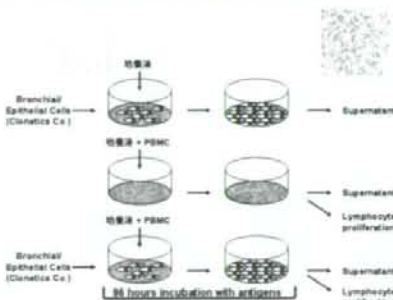
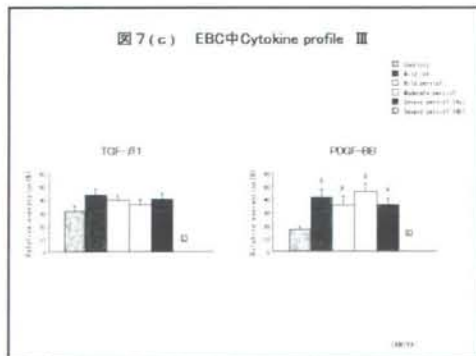
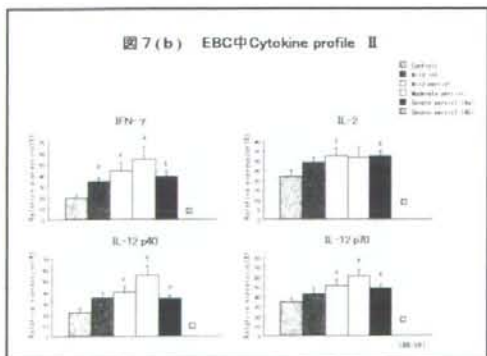
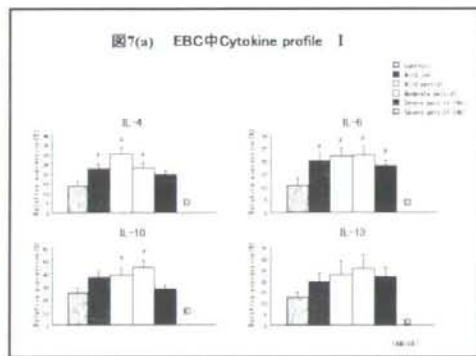
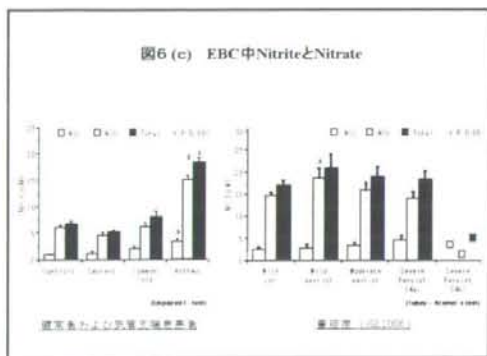
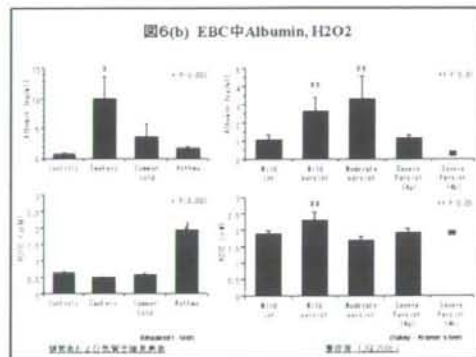
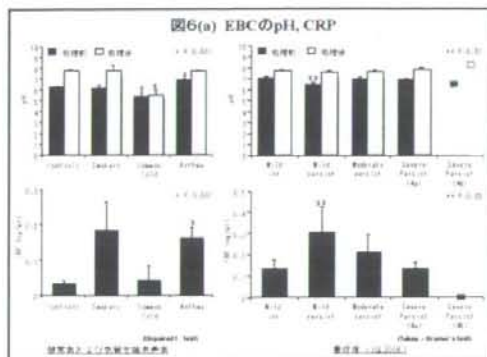


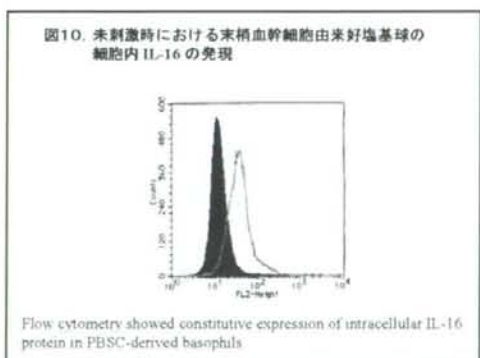
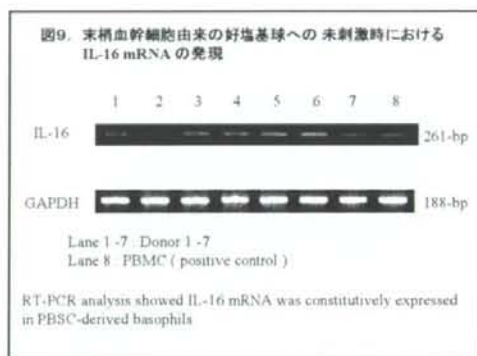
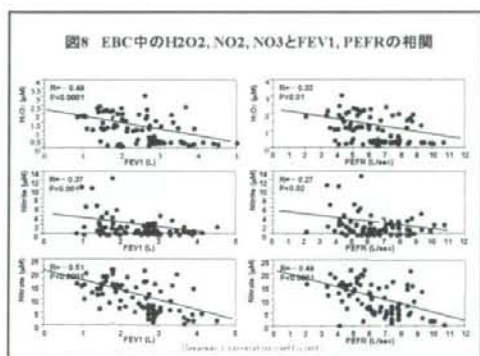
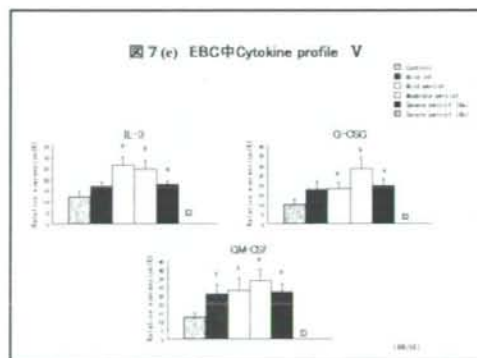
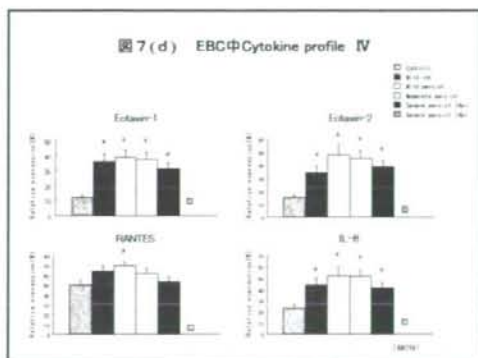
表1. 呼吸水検査の対象症例

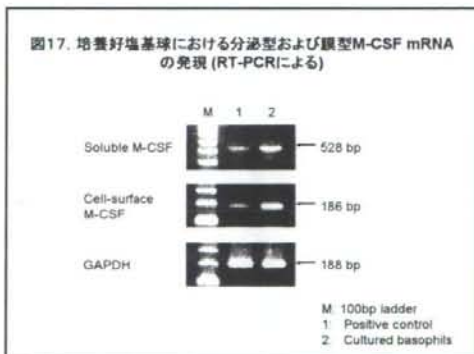
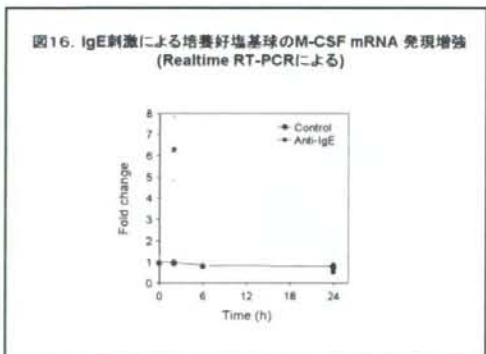
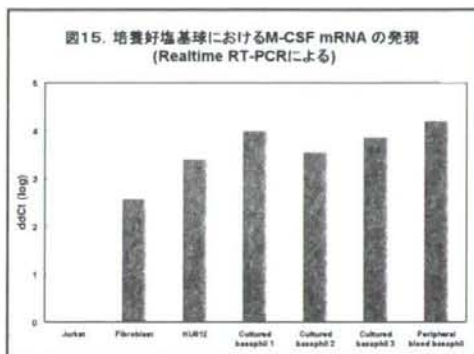
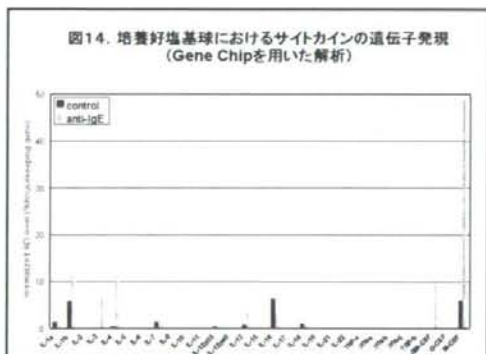
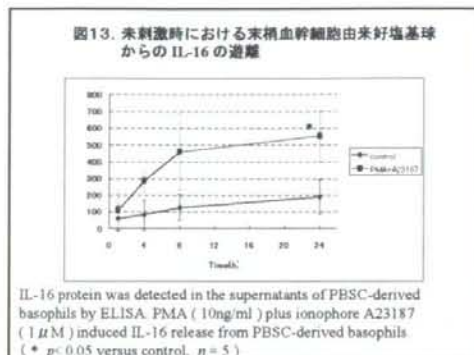
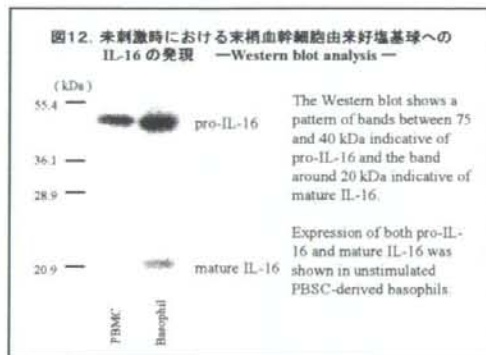
対象		
健康者	: 61名	(男性12名、女性49名)
喫煙者	: 7名	(男性6名、女性1名)
上気道感染	: 9名	(男性0名、女性9名)
気管支喘息患者	: 97名	(男性49名、女性48名)
軽症間欠型	: 27名	(男性13名、女性14名)
軽症持続型	: 14名	(男性7名、女性7名)
中等症持続型	: 17名	(男性8名、女性9名)
重症持続型(4a)	: 31名	(男性17名、女性14名)
重症持続型(4b)	: 1名	(男性17名、女性14名)

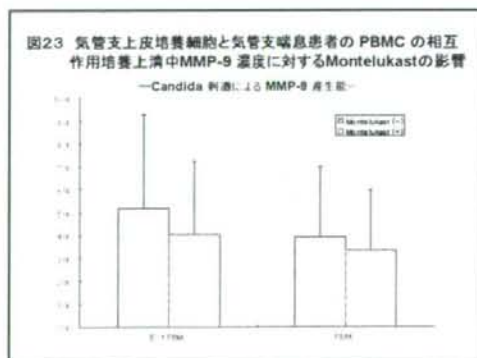
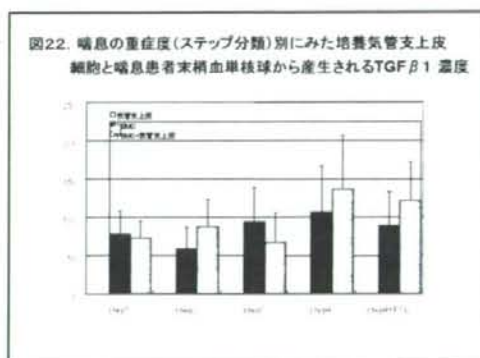
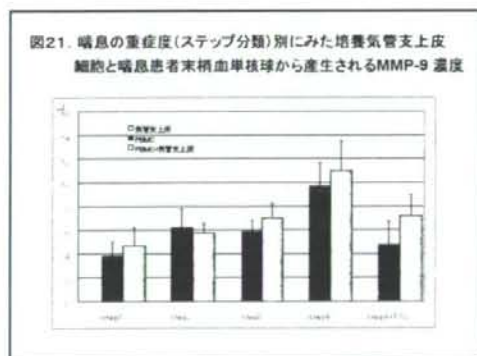
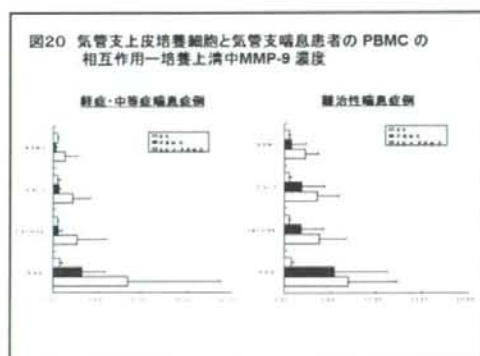
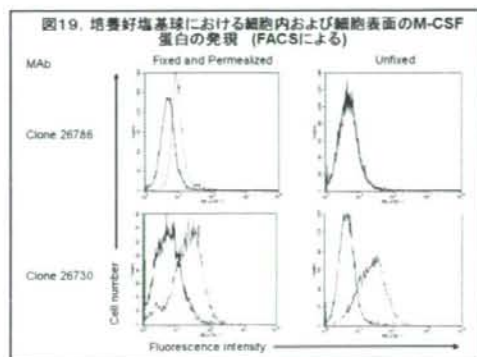
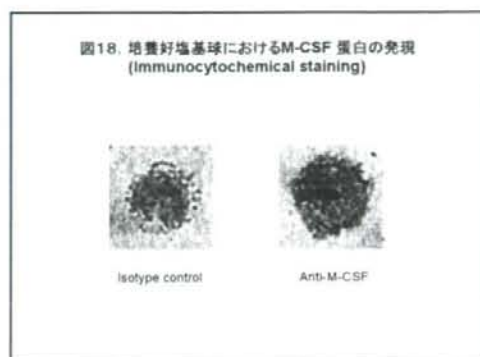
図1. 気管支上皮細胞と喘息患者末梢血単核球の培養実験の方法











気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究

－難治性喘息の機序の解明と治療法に関する研究－

分担研究者	相澤 久道	久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科教授
研究協力者	星野 友昭	久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科講師
	川山 智隆	久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科講師
	井上 博雅	九州大学大学院胸部疾患研究施設准教授
	坂崎 優樹	久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科大学院生
	澤田 昌典	久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科大学院生

研究要旨

I. 基礎研究

難治性喘息の機序の解明のため、IL-13 誘導性喘息に対する CLCA 阻害薬(Niflumic acid)の効果の検討を行った。その結果、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、その過程の一部は JAK2/STAT6 系のリン酸化の抑制によるものと考えられた。これより、CLCA 阻害薬は気管支喘息に対する新しい治療薬として有望と考えられた。

II. 臨床研究

① COPD とアレルギー性鼻炎の合併例の検討

Study 1) COPD を合併している重症喘息に対して長時間作用性抗コリン薬の効果を検討した結果、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、気管支拡張薬の頓用回数を有意に改善した。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的に有用であると考えられた。

Study 2) 鼻炎の症状と喘息症状は関連するか。また、鼻炎の治療により喘息症状も改善するか。3014 例の検討結果、アレルギー性鼻炎合併率は約 50%であった。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。

② 喘息死症例の検討

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完全には解明されていない。昭和 48 年以降に久留米大学病院で病理解剖を行った 15 人の喘息死患者の剖検肺を用いて検討した結果、喘息死患者の肺病変部は著明な気道リモデリング、分泌物等による気道の閉塞、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。この結果は喘息の病因に IL-18 産生 CD4 陽性 T 細胞や好中球だけではなく IL-18 産生 CD8 陽性 T 細胞も喘息の増悪に関与している可能性が考えられた。

I. 基礎研究

A. 研究目的

CLCA は、粘液産生/杯細胞化生、気道過敏性亢進に関与している可能性が高い。そこで、難治性喘息の

機序の解明のため、IL-13 誘導性喘息に対する CLCA 阻害薬(Niflumic acid)の効果の検討を行った。

B. 研究方法

マウスに IL-13 を気管内投与し、気道過敏性の測定、気管支肺胞洗浄、組織学的検討を行った。さらに、CLCA に選択性の高い Cl⁻ チャンネル阻害薬である Niflumic acid を用いて、IL-13 誘導性喘息における効果について検討した。

C. 研究結果

IL-13 気管内投与により、気道過敏性亢進、杯細胞増多、eotaxin 産生亢進、BALF における好酸球数増加、および mCLCA3 の発現増強が認められた。

CLCA 阻害薬である niflumic acid を投与すると、気道過敏性亢進、杯細胞増多、eotaxin 産生亢進、BALF における好酸球数増加は著明に抑制された。

D. 考察

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、その過程の一部は JAK2/STAT6 系のリン酸化の抑制によるものと考えられた。

E. 結論

CLCA 阻害薬は気管支喘息に対する新しい治療薬として有望と考えられた。

II. 臨床研究

① COPD とアレルギー性鼻炎の合併例の検討

A. 研究目的

喘息の難治化因子としては様々なものがあげられている。その中に、他疾患の合併や併存により喘息が悪化することが知られている。それらの疾患の中で特に多い物として、COPD とアレルギー性鼻炎があげられる。そこで、今回 COPD とアレルギー性鼻炎の喘息に対する影響を検討した。

Study 1: 喘息死の 85% は 65 歳以上の高齢者であること、喘息・COPD とともに高齢者に多い疾患であること、COPD 合併は喘息の増悪因子になること、などから COPD 合併喘息のコントロールは重要である。そこで今回、重症喘息に対して長時間作用性抗コリン薬の効果を検討した。

Study 2: 成人喘息患者の 70~80% は鼻炎や鼻過敏性亢進を合併していること、鼻炎患者の 30~40% は喘息を合併していること、

アレルギー性鼻炎は喘息に先行することが多く、アレルギー性鼻炎は喘息の危険因子であること、などが知られている。そこで今回、鼻炎合併喘息患者において、鼻炎の治療により喘息症状も改善するかを検討した。

B. 方法

以下の 2 つの検討を行った。

Study 1: COPD を合併している重症喘息に対して長時間作用性抗コリン薬の効果を検討した。

対象として、BDP \geq 1200 μ g/d + LABA 使用してい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)

1) 急性効果として、Double blind, Crossover にて Placebo または Tiotropium 18 μ g を投与し、FEV1、FVC、PEFR、IC を測定した。

2) 長期効果: Open-label にて Tiotropium 18 μ g od, 12 weeks 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。

Study 2) 鼻炎の症状と喘息症状は関連するか、鼻炎の治療により喘息症状も改善するかを、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。調査項目には、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。

C. 研究結果

Study 1:

① 急性効果:

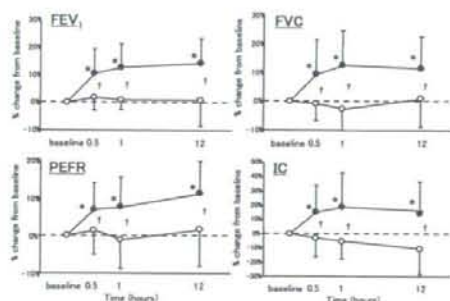


図1. 高用量ICS+LABA併用中の喘息+CPD患者における Tiotropium add-on 療法

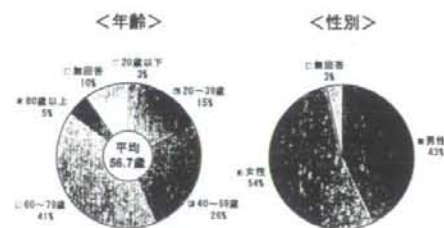


図4. 患者背景 (n=3014)

②長期効果；

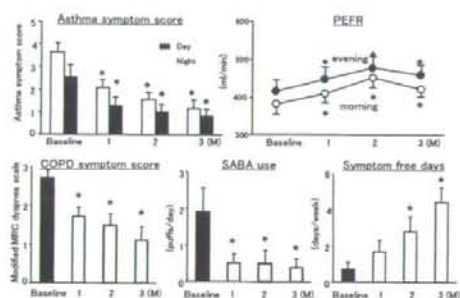


図2. 高用量ICS+LABA併用中の喘息+CPD患者における Tiotropium add-on 効果

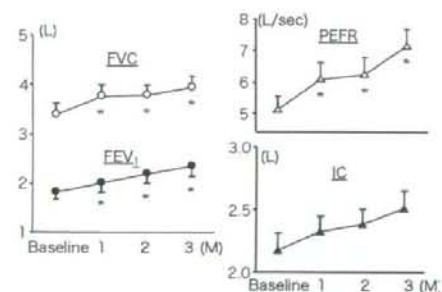


図3. 高用量ICS+LABA併用中の喘息+CPD患者における Tiotropium add-on 効果

<気管支喘息回答 3014例において>

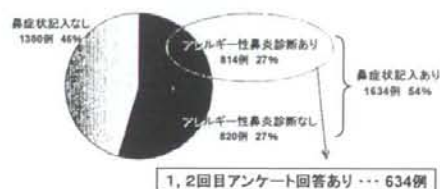


図5. 気管支喘息とアレルギー性鼻炎合併例の解析対象

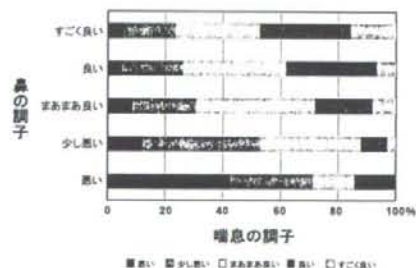


図6. 鼻の調子と喘息の調子の関係

Study 2: 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。



図7. 鼻症状の程度と喘息の調子の関係

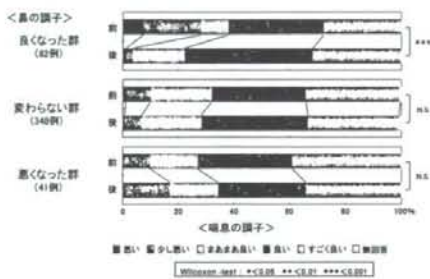


図8. 鼻の調子の変化と喘息の調子の変化の関係

D. 考察

Study 1: 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、気管支拡張薬の頓用回数を有意に改善した。

Study 2: 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。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。また、鼻症状の悪化に伴い喘息症状も有意に悪化した。

E. 結論

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的に有用である。

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。

②喘息死症例の検討

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。病理学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	β2受容体刺激薬	キサンテン誘導体
1	80	M	1971	—	—	—	—
2	32	M	1973	—	—	—	+
3	52	M	1974	—	—	—	+
4	55	M	1974	—	—	—	+
5	5	M	1977	—	—	—	—
6	47	M	1980	—	—	—	—
7	43	M	1981	—	—	—	—
8	75	M	1982	—	—	—	—
9	16	F	1984	—	—	+	+
10	79	F	1986	—	—	—	—
11	57	M	1988	—	—	—	—
12	14	M	1994	—	—	—	—
13	24	M	1998	—	吸入ステロイド	+	+
14	68	F	1988	—	吸入ステロイド	+	+
15	67	F	1999	—	吸入ステロイド	+	+
				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)。

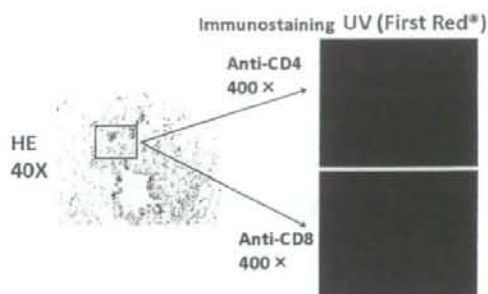


図2. CD8陽性T細胞の著明な浸潤

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)。

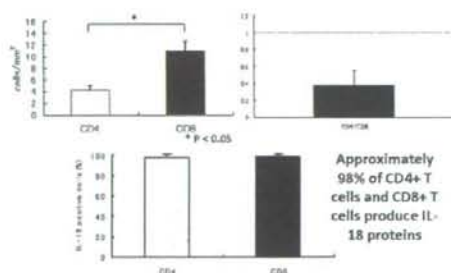


図3. 上左CD4、CD8細胞数、右CD4/CD8比、下IL-18産生CD8、CD4陽性T細胞の割合。

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)。

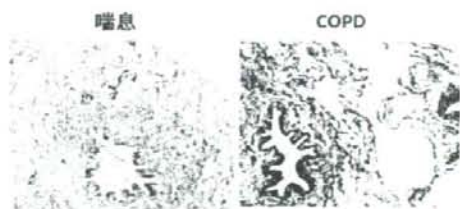


図4. 喘息とCOPDにおけるIL-18産生CD8陽性T細胞。

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。

F. 健康危険情報

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.
- 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.
- 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.
- 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 Izuhara 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.
13. Hoshino T, Kato S, Oka N, Imaoka H, Kinoshita T, Takei S, Kitasato Y, Kawayama T, Imaizumi T, Yamada K, Young HA, Aizawa H. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(1):49-62.
14. Koga T, Fujimoto K, Aizawa H. Effect of smoking on lifestyle interventions to prevent diabetes. *Lancet*. 2007;369:365; author reply 365-366.
15. Kinoshita T, Hoshino T, Imaoka H, Ichiki H, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Aizawa H. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. *Biochim. Biophys. Res Commun*. 2007;354:712-719.
16. Aizawa H. 3. COPD: non-pharmacologic treatment. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2007;46:85-86.
17. Azuma K, Komohara Y, Sasada T, Terazaki Y, Ikeda J, Hoshino T, Itoh K, Yamada A and Aizawa H. Excision repair cross-complementation group 1 predicts progression-free and overall survival in non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Sci*. 2007;98(9) 1336-1343.
18. Fujiki R, Kawayama T, Ueyama T, Ichiki M, Aizawa H. The risk factors for mortality of community-acquired pneumonia in Japan. *Infect Chemother*. 2007;13(3):157-165.
19. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Sakazaki Y, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Iwanaga T, Aizawa H. Effects of thioredoxin on established airway remodeling in a chronic antigen exposure asthma model. *Biochim. Biophys. Res Commun*. 2007, 360(3):525-530.
20. Inoue H, Komori M, Matsumoto T, Fukuyama S, Matsumura M, Nakano T, Tsuda M, Matsumoto K, Kanaya A, Moriwaki A, Aizawa H, Yoshida M, Nakanishi Y. Effects of Salmeterol in Patients with Persistent Asthma Receiving Inhaled Corticosteroid plus Theophylline. *Respiration*. 2007;74:611-616.
21. Chen M, Hisatomi Y, Furumoto A, Kawasaki K, Masaki H, Nagatake T, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Oishi K. Comparative Immune Responses of Patients with Chronic Pulmonary Diseases during the 2 Year Period after Pneumococcal Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007;14(2):139-145.
22. Edakuni N, Ikuta K, Yano S, Nakataki E, Muguruma H, Uehara H, Tani M, Yokota J, Aizawa H, Sone S. Restored Expression of the MYO18B Gene Suppresses Orthotopic Growth and the Production of Bloody Pleural Effusion by Human Malignant Pleural Mesothelioma Cells in SCID Mice. *Oncology Research* 2006, 16: 235-243
23. Ichiki M, Kawasaki M, Takayama K, Aizawa H et al. A multicenter phase II study of carboplatin and paclitaxel with a biweekly schedule in patients with advanced

- non-small-cell lung cancer:Kyusyu thoracic oncology group trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006, 58:368-73.
24. Koga T, Aizawa H. Pneumonia: ... and to tuberculosis as differential diagnosis in community acquired pneumonia. *Bmj* 2006, 332:1214.
25. Koga T, Oshita Y, Kamimura T, Aizawa H et al. Characterisation of patients with frequent exacerbation of asthma. *Respir Med.* 2006, 332:1214.
26. Morimatsu Y, Ishitake T, Irie K, Aizawa H et al. Acute pulmonary injury due to exposure to a high concentration of trichloroethylene vapor. *J Occup Health* 2006, 48:271-2.
27. Morimatsu Y, Kawano F, Aizawa H. Pneumopericardium following rupture of the oesophagus. *Lancet* 2006, 368:1991.
28. Mukaino T, Koga T, Oshita Y, Aizawa H et al. *Exophiala dermatitidis* infection in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Respir Med* 2006, 100:2069-71.
29. Nakano T, Inoue H, Fukuyama S, Aizawa H et al. Niflumic acid suppresses interleukin-13-induced asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006, 173:1216-21.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究者 藤澤隆夫 国立病院機構三重病院臨床研究部長

研究要旨

重症喘息では、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。この炎症は軽症例にみられるステロイド反応性の好酸球性炎症ではなく、ステロイド不応の遷延性好酸球性炎症と好中球性炎症よりなる。そして、これらは気道感染によって著しく増悪する。本研究で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る TSLP と好中球由来プロテアーゼの好酸球機能に対する作用を解析して、気管支喘息難治機序を解明、難治化予防戦略の基礎知見を得ることを目的とした。その結果、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ァイルはステロイド不応性の重症喘息にしばしばみられるものであった。また好中球由来プロテアーゼは好酸球からの活性酸素産生を誘導し、好中球の浸潤・活性化に関わるサイトカイン・ケモカインを産生させた。好酸球と好中球の複合的炎症の成立機序を示唆するものであった。以上より、TSLP および好中球プロテアーゼ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と考えられた。

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

TSLP (Thymic stromal lymphopoietin)の好酸球に対する直接作用 2) 好中球由来プロテアーゼの好酸球活性化作用、をそれぞれ検討して、ウイルス感染による増悪メカニズムおよび好中球による好酸球性炎症遷延化メカニズムを解明することを目的とした。

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が、この病態は主に2つの亜型に分類できると考えられる。高用量のステロイドによっても気道粘膜の著しい好酸球浸潤が制御しがたいタイプと、好中球などの他の炎症細胞浸潤が著しいタイプである。前者については、ステロイド不応となった活性型好酸球の性質を解明することが新規治療開発につながり、好酸球が関与しないかに見える後者に対しても、早期介入による好酸球制御を行えば、好酸球が誘導するリモデリングや好中球性炎症への進展を防ぎ、重症化の予防が可能である。そこで、本研究では、1) ウイルス感染をきっかけとした増悪という臨床的観察をもとに、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

B 研究方法

好酸球は正常ボランティアの末梢血から CD16 negative selection 法により精製した。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による) で検討した。また、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。

好酸球をヒトリコンピナント 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。さらに、この反応系に好中球エラスターゼ特異的阻害薬である sivelestat sodium hydrate またはセリ

ンエステラーゼ阻害薬 phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)を加えて、同様に活性酸素産生を検討した。Fluo-3AMを用いて、エステラ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、評価した。

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。

C 研究結果

1 TSLPの好酸球への作用

(1) 好酸球のTSLP受容体発現

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

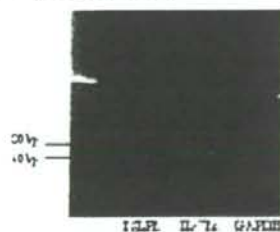


図1 IL-7 α , TSLPR発現 (PCR)

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。

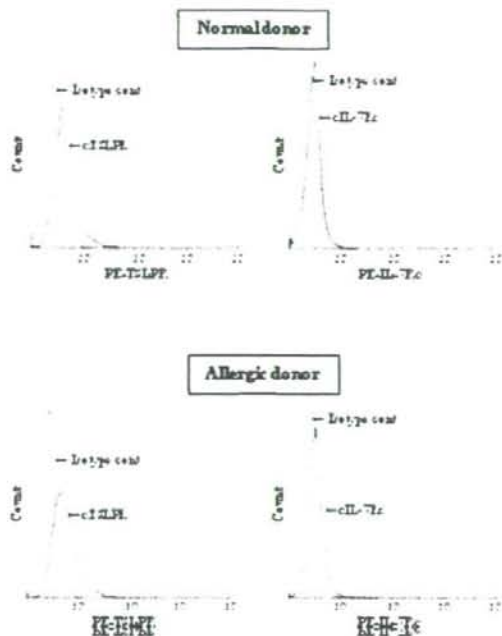


図2 IL-7 α , TSLPR発現 (PCR)

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。

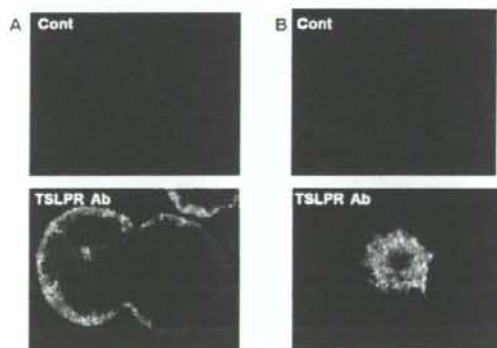


図3 IL-7 α , TSLPR発現 (A:好酸球, B:樹状細胞)

(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。

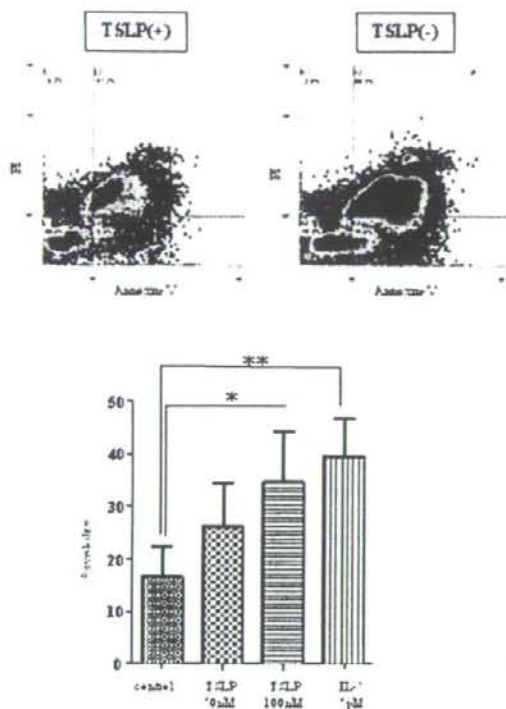


図4 TSLPの好酸球性損延長作用

(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。

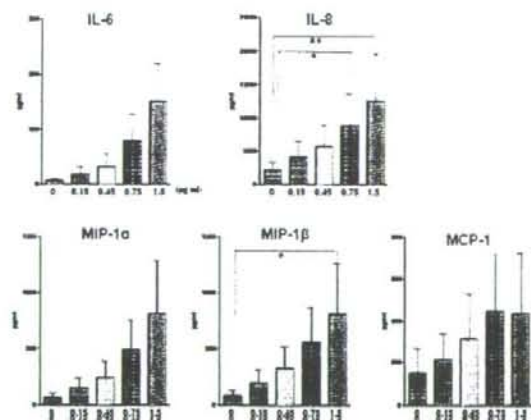


図5 TSLPによる好酸球からのサイトカイン産生

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。

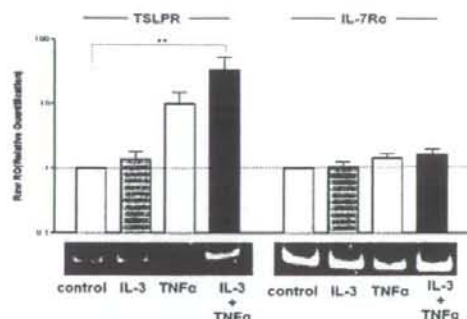


図6 IL-7 α 、TSLPR発現に対するIL-3、TNF- α の作用

：定量的PCR

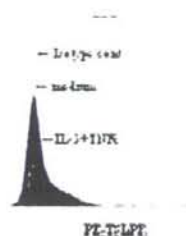
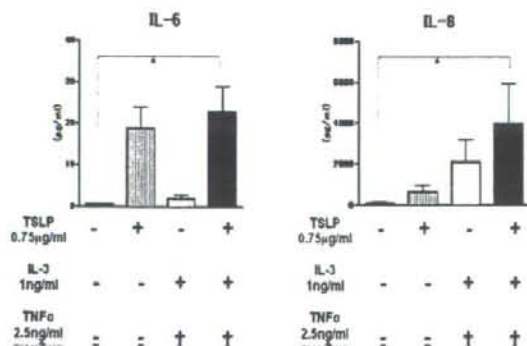


図7 TSLPR発現に対するIL-3、TNF- α の作用

：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。



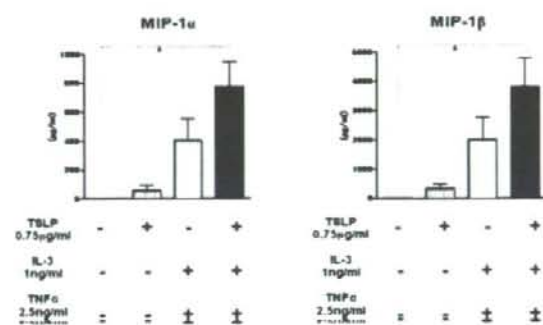


図8 TSLP誘導サイトカイン産生に対するIL-3, TNF-αの作用

2 好中球由来プロテアーゼの作用

(1) 活性酸素産生

好中球由来プロテアーゼのうち、エラスターゼとカタペシン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。

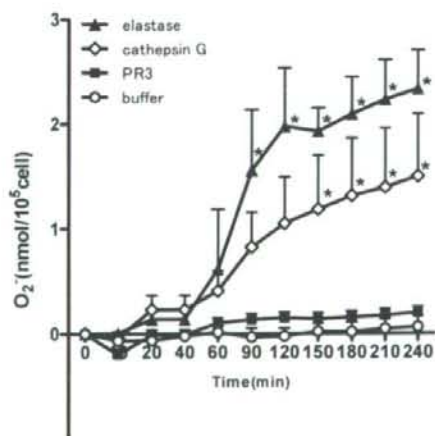


図9 好中球由来プロテアーゼによる好酸球活性酸素産生

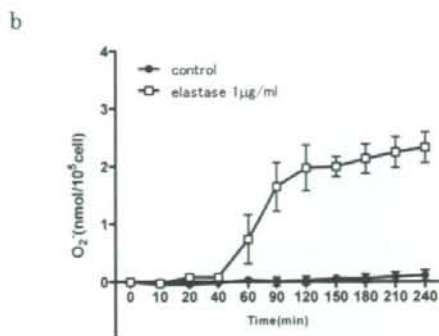
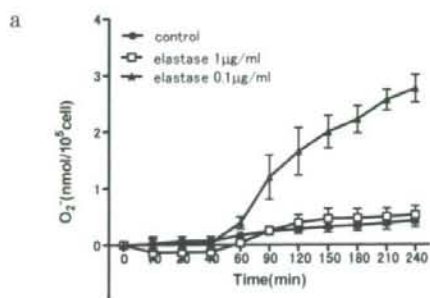


図10 エラスターゼによる好酸球活性酸素産生

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、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ が至適濃度の例と $1 \mu\text{g/ml}$ 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。

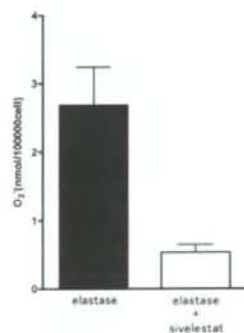


図11 エラスターゼ阻害薬による活性酸素産生抑制

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。

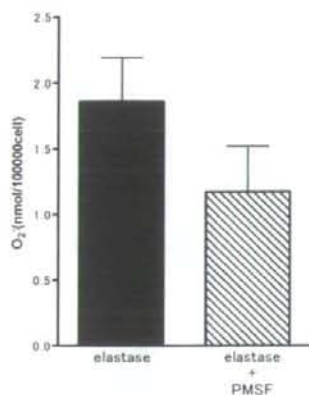


図12 セリンプロテアーゼ阻害薬による活性酸素産生抑制

(2) エラスターゼによる細胞内カルシウム動員
 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。

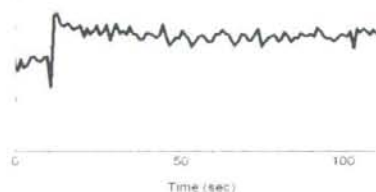


図13 エラスターゼによる細胞内カルシウムの変化

(3) 好中球プロテアーゼによるサイトカイン産生
 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。

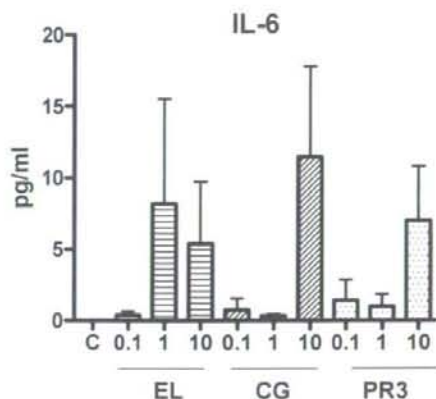


図14 好中球プロテアーゼによる好酸球からのIL-6産生

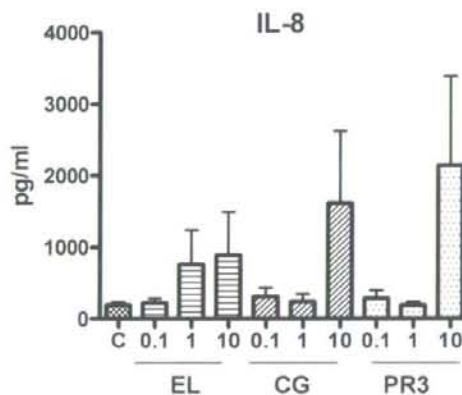


図15 好中球プロテアーゼによる好酸球からのIL-8産生

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。

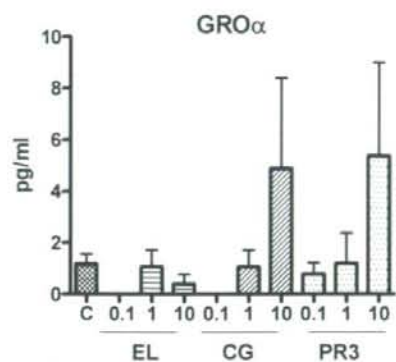


図 13 好中球プロテアーゼによる好酸球からの GRO- α 産生

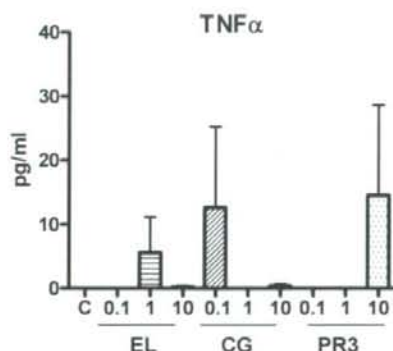


図 16 好中球プロテアーゼによる好酸球からの TNF- α 産生

4 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 および好中球由来プロテアーゼの好酸球に対する作用を解析した。

第一に好酸球は 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。こ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。

我々は第二に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ならびに好中球遊走・活性化に関わるサイトカインとケモカイン産生を誘導することを明らかとした。活性酸素は好酸球の組織傷害性メディエーターの中でもっとも重要なものであり、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観察した。これまで認められた Th2 サイトカイン環境下だけではなく、好中球浸潤を招く Th1 環境によっても好酸球が活性化を受け、組織傷害に関与することが考えられた。

また、好中球由来セリンプロテアーゼは好酸球からとくに好中球の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を示す。今回の研究では、さらに好中球性炎症の環境下においては、好酸球が好中球由来のプロテアーゼを介して、好中球性炎症をさらに増強させるように機能しえることを明らかにした。難治性炎症の病態に強く関わると考えられた。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と考えられたが、ステロイド不応性の難治性喘息ではエラスターゼをタ

ターゲットとした治療を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のみの適応であるが、重症喘息の補助的薬剤としての効果も大いに期待できるかもしれない。好中球をターゲットとした治療では、すでに抗 TNF- α 療法がステロイド依存性の重症喘息に有効であると報告されている。しかし、この治療では著しい臨床効果とともに、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のであろう。それに比べて、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。今後の臨床研究が待たれるところである。

E 結論

ウイルス感染によって気道上皮から産生される TSLP が好酸球を直接活性化し、サイトカイン産生を誘導すること、好中球由来セリンプロテアーゼが好酸球のエフェクター機能とともに好中球浸潤に関わるサイトカインの産生も誘導することを明らかにした。気道感染による増悪、ステロイド不応性の好中球性炎症による難治化のメカニズムの一端を解明した。

F 研究発表

1 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.

学会発表

- 1) T. Fujisawa. Non-invasive measurement of airway inflammation in asthma: Is it possible to visualize 'invisible' airways? , Special Lecture at 2008 Annual meeting of the Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology, Seoul, 2008.5.9.
- 2) T. Fujisawa. What is new in Eosinophil World: The Eos strikes back! Meet the Professor session at 2008 Annual meeting of the Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology, Seoul, 2008.5.9.
- 3) T. Fujisawa, M. Mochizuki, Respiratory Symptoms in Preschool-age Children: The results of a questionnaire conducted in Japan. International meeting of American Thoracic Society, 2008.5.18, Toronto, Canada
- 4) Iikura K, Katsunuma T, Ohya Y, Shibata A, Yuki K, Akashi K, Nagao M, Fujisawa T Epidermal growth factor levels in the exhaled breath condensate correlate clinical severity in children/adolescents with asthma. 2008 International Conference of American Thoracic Society, 2008.5.16-21, Toronto, Canada