

- 5) M Nagao, R Tokuda, K Hosoki, Y Hiraguchi, T Fujisawa. Antigen-induced basophil CD203c expression differentially predicts status of tolerance in children with egg allergy. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2008.3.14-20, Philadelphia, USA
- 6) Y Hiraguchi, M Nagao, R Tokuda, K Hosoki, T Fujisawa. Neutrophil Proteases Activate Eosinophil Function In Vitro. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2008.3.14-20, Philadelphia, USA
- 7) Hosoki K, Nagao M, Tokuda R, Noma Y, Higashiura M, Akinaga Y, Fujisawa T. Antigen-induced histamine release from purified basophils as a novel in vitro test for egg allergy. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2008.3.14-20, Philadelphia, USA
- 8) S Masuda, S Usui, M Nagao, T Fujisawa : Interdisciplinary approach to prolonged cough in children. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2008.3.14-20, Philadelphia,
- 9) Masuda S, Fujisawa T, et al. High Prevalence of Sensitization to Japanese Cedar Pollen and House Dust Mite in Young Children in Japan. 2007 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, San Diego, USA, March 3-7, 2007 J Allergy Clin Immunol 119(1):s224, 2007
- 10) Noma Y, Nagao M, Fujisawa T Exhaled nitric oxide decreases during acetylcholine-induced bronchoconstriction in children with asthma. 2007 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, San Diego, USA, March 3-7, 2007 J Allergy Clin Immunol 119(1):s87, 2007
- 11) Nagao M, Katsunuma T, Kim CK, Fujisawa T. Efficacy and safety of intravenous aminophylline in children with acute exacerbation of asthma: A multicenter randomized trial. 2007 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, San Diego, USA, March 3-7, 2007 J Allergy Clin Immunol 119(1):s2, 2007
- 8 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし

平滑筋リモデリング機序の実験的検討

分担研究者 庄司 俊輔（国立病院機構東京病院 臨床研究部長）

研究要旨

基底膜下への間質コラーゲン・フィブロネクチンの沈着及び平滑筋の肥厚は難治性喘息における気道リモデリングの病理組織学的特徴である。分担研究者は気管支平滑筋細胞が気道リモデリングに伴い平滑筋から結合組織へと遊走するとの仮説を立て、培養正常ヒト細胞を用いてその遊走機序を検討している。実験の結果、本研究に使用している気管支平滑筋細胞の表面にインテグリンの $\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 及び αv サブユニットが発現していることを確認した。この気管支平滑筋細胞が肺線維芽細胞培養上清に遊走することも確認した。そこで抗フィブロネクチン抗体を用いて肺線維芽細胞培養上清のウェスタンブロッティングを行ったところ、培養上清中にフィブロネクチンの存在が認められた。更に肺線維芽細胞が気管支平滑筋細胞培養上清に対して遊走すること、この遊走が上清への抗フィブロネクチン抗体の添加により抑制されることも確認した。これらの知見はリモデリングを形成した気管支において、平滑筋細胞がフィブロネクチンを介し線維芽細胞と相互作用することで平滑筋から結合組織へと遊走する可能性を支持するものである。

研究協力者

岡元 孝二

（九州工業大学大学院生命体工学研究科・
教授）

西原 麻千子（同上 大学院生）

A. 研究目的

難治性喘息患者に見られる気道の構造変化である「リモデリング」は気道が傷害から修復に向かう過程での1つの病態である。気道リモデリングの病理組織学的特徴として、平滑筋の肥厚や基底膜下への細胞外マトリックス蛋白質（間質コラーゲン、フィブロネクチン）の沈着が挙げられる。このうち平滑筋の肥厚については、平滑筋を構成する平滑筋細胞の増殖及び肥大に起因すると考えられている。一方基底膜下への細胞外マトリックス蛋白質の沈着については、喘息の重症度だけでなく結合組織内の PR2D3 免疫陽性/平滑筋 α アクチン陰性細胞の増加と相関していることが報告されている (Brewster CE, et al. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 3 (1990))。この PR2D3 免疫陽性/平滑筋 α アクチン陰性細胞は筋線維芽細胞であろうと考察されている。しかし PR2D3 は筋線維芽細胞だけでなく平滑筋細胞にも陽性所見を与えることから、この細胞が平滑筋から遊走した平滑筋細胞である可能性も示唆されてきた。気道平滑筋細胞の遊走に関する報告はこれまで殆ど行われてい

なかったが、近年増加してきた。

分担研究者は本班研究において、平成 12-14 年度にヒト正常気管支平滑筋細胞がフィブロネクチン等の細胞外マトリックス蛋白質だけでなく、気管支平滑筋細胞自身の培養上清やその他の気管支構成細胞である上皮細胞等の培養上清に対して遊走すること、平成 15-17 年度には抗フィブロネクチン抗体を用いたウェスタンブロッティングより気管支平滑筋細胞培養上清中にフィブロネクチンが認められること、気管支平滑筋細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走が培養上清への抗フィブロネクチン抗体の添加、或いは抗 $\beta 1$ インテグリン抗体による細胞前処理により抑制されることを報告している。気管支平滑筋細胞培養上清に MMP-1, 2 及び 3 が含まれていることもウェスタンブロッティングにより確認された。これらの研究結果は喘息患者の気管支にて、平滑筋細胞が上皮細胞やその他の構成細胞より産生・放出された遊走因子により平滑筋から結合組織へと遊走し、更にフィブロネクチンを産生・放出することにより近傍の平滑筋細胞を結合組織へと遊走・集簇させる可能性を示唆するものである。

そこで平成 18-20 年度の本班研究では気管支平滑筋細胞表面に発現しているインテグリンの α 及び β サブユニットを解析した。また気管支平滑筋細胞と共に正常ヒト肺線維芽細胞を用い、気管支

平滑筋細胞培養上清に対する肺線維芽細胞の遊走や肺線維芽細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走も検討したので、併せて報告する。

B. 研究方法

気道由来の細胞として正常ヒト気管支平滑筋細胞及び正常ヒト肺線維芽細胞(瑞国 Lonza 社)を培養し、これらの細胞をインテグリン発現の解析、細胞培養上清の採取あるいは遊走実験の標的細胞に用いた。

気管支平滑筋細胞上に発現している各種 α 及び β インテグリンを $\alpha\beta$ Integrin-Mediated Cell Adhesion Array Combo Kit (米国 Chemicon 社)を用いて解析した。本キットは各種 α 及び β インテグリンを認識する抗体をプレートのウェル底面に結合させたものである。これらのウェルに細胞を 1.0×10^5 cells 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 540 nm)することにより、各種 α 及び β インテグリンの細胞上での発現を解析した。

細胞培養上清に対する細胞遊走は 48 穴ポ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気管支平滑筋細胞または肺線維芽細胞の培養上清、上室に 1×10^6 cells/ml に調整した気管支平滑筋細胞または肺線維芽細胞の浮遊液を入れて 37°C 、5% CO_2 条件下で 6 時間インキュベートした。インキュベート終了後、遊走膜の下室側に遊走した細胞のみを Diff-Quik で染色した。この染色細胞を倍率 400 倍に設定した光学顕微鏡にて 10 視野測定し、その合計数を遊走活性とした。

更に気管支平滑筋細胞の遊走因子であるフィブロネクチンが肺線維芽細胞培養上清にも存在するのか否かを検討する為、抗フィブロネクチン抗体を用いて肺線維芽細胞培養上清のウェスタンブロッティングを行った。この時の細胞培養上清は 48 時間培養後に採取したものをを使用した。

C. 結果

- 1) 気管支平滑筋細胞上に $\beta 1$ 及び $\beta 2$ インテグリンが発現していた。また同細胞上には $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 及び αv インテグリンの発現も確認できた。(Fig.1)
- 2) 肺線維芽細胞培養上清は気管支平滑筋細胞に対する遊走活性を有していた。気管支平滑筋細胞に対する本上清の遊走活性は、濃度及び上清回収までの細胞培養時間依存的に上昇し

た。(Fig.2)

- 3) 抗フィブロネクチン抗体を用いた肺線維芽細胞培養上清のウェスタンブロッティングにより、本上清中にフィブロネクチンが含まれることを確認した。(Fig.3)
- 4) 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。(Fig.4)
- 5) 肺線維芽細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性は、本上清に抗フィブロネクチン抗体を添加することにより低減した。コントロールとして用いた抗アルブミン抗体の添加は肺線維芽細胞に対する本細胞培養上清の遊走活性に影響しなかった。(Fig.5)。

D. 考察

平滑筋細胞は収縮型から合成型へと形質転換することで平滑筋 α アクチンの発現を大幅に減少させると共に、増殖能、遊走能及び細胞外マトリックス産生能を大きく亢進することが知られている。また平滑筋細胞の形質転換に伴うこれらの能力の亢進が動脈硬化などの病態形成に寄与することも広く知られている。更にアレルゲン暴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.*, 16 (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。

分担研究者は本研究に用いている気管支平滑筋細胞の表面に $\beta 1$ 及び $\beta 2$ インテグリンや $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 及び αv インテグリンが発現していることを確認した。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))。平成 15-17 年度の本班研究で報告したように、抗 $\beta 3$ インテグリン抗体による細胞前処理が抗 $\beta 1$ インテグリン抗体による前処理とは異なり、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 $\beta 1$ に比べて僅かであることが原因となっているかもしれない。

更に今回報告したように、気管支平滑筋細胞が肺線維芽細胞培養上清に対して遊走し、本上清にフィブロネクチンが含まれるとの知見は、気道リモデリングに伴い気管支平滑筋細胞が、肺線維芽細胞より産生・放出されたフィブロネクチンを認識して平滑筋から結合組織へと遊走する可能性を示唆するものである。肺線維芽細胞によるフィブロネクチン産生については多数報告がなされているが、これが気管支平滑筋細胞に対する遊走因子として作用するか否かについてはこれまで報告されていない。

肺線維芽細胞が気管支平滑筋細胞培養上清に対して遊走すること、更にこの遊走が培養上清への抗フィブロネクチン抗体の添加により抑制されることも確認できた。気管支のリモデリングにおいて、線維芽細胞は創傷治癒を目的として、上皮方向の遊走だけではなく平滑筋方向にも遊走・集簇し、そこでフィブロネクチンを分泌することで平滑筋細胞の結合組織への遊走を誘導しているかもしれない。

D. 結論

気管支のリモデリングにおいて、平滑筋細胞は平滑筋細胞自身だけではなく線維芽細胞より産生・放出されたフィブロネクチンを認識し平滑筋から結合組織へと遊走する可能性が示唆された。更にこの平滑筋細胞の平滑筋から結合組織への遊走が平滑筋細胞由来フィブロネクチンを認識した線維芽細胞の平滑筋方向への遊走・集簇により誘導される可能性も示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Takayama G, Arima K., Kanaji T., Toda S., Tanaka H., Shoji S., McKenzie A.N., Nagai H., Hotokebuchi T. and Izuhara K. Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 98-104, 2006

2. 学会発表

- 1) Chemotactic migration of bronchial smooth muscle cells to fibronectin for the process of airway remodeling in asthma
第38回日本結合組織学会学術大会
(2006年5月)
- 2) Smooth muscle cell migration induced by

production of fibronectin and matrix metalloproteinases for the process of airway remodeling in asthma

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress
(2006年6月)

- 3) 気管支喘息のリモデリングにおける気管支平滑筋細胞遊走の寄与
第56回日本アレルギー学会秋季学術大会
(2006年11月)
- 4) 気管支喘息のリモデリング形成における平滑筋細胞と線維芽細胞の相互作用
第57回日本アレルギー学会秋季学術大会
(2007年11月)
- 5) Autocrine and paracrine migration of smooth muscle cell in response to fibronectin in airway remodeling
ATS 2008 (2008年5月)
- 6) 気管支喘息でのリモデリング形成における平滑筋細胞遊走とインテグリンの関与
第58回日本アレルギー学会秋季学術大会
(2008年11月)

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | 無し |
| 2. 実用新案登録 | 無し |
| 3. その他 | 無し |

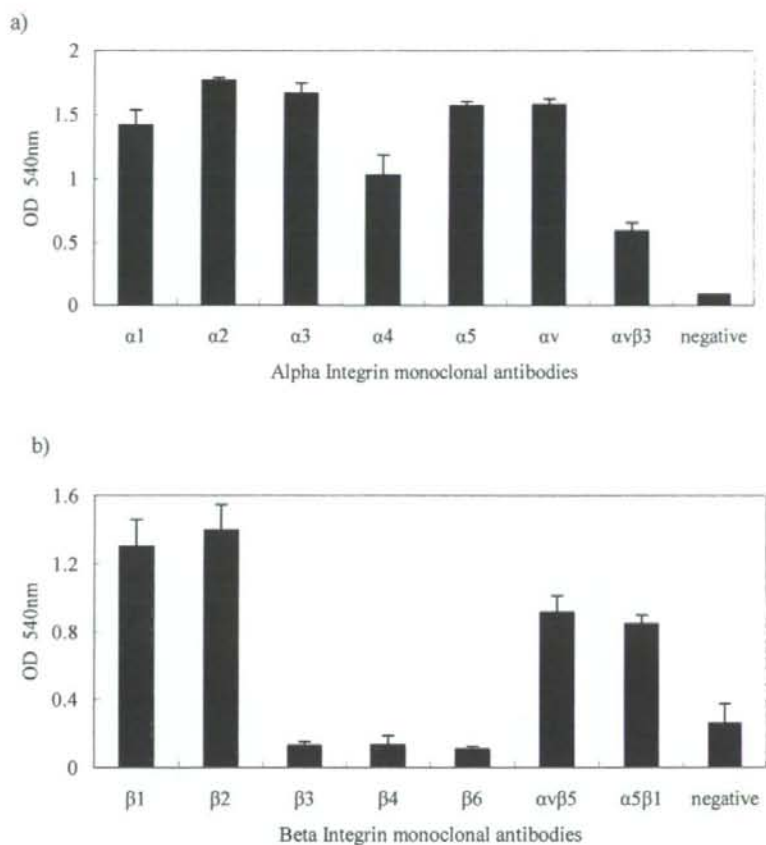


Fig.1 α/β Integrin-Mediated Cell Adhesion Array Combo Kit による気管支平滑筋細胞表面のインテグリン解析

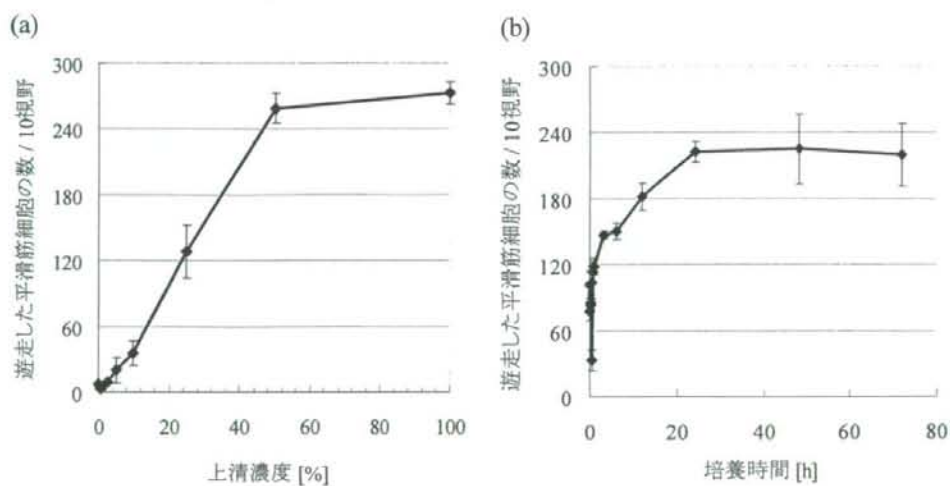


Fig.2 肺線維芽細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走



Lane 1: 肺線維芽細胞培養上清

Lane 2: 気管支平滑筋細胞培養上清

Fig.3 抗フィブロネクチン抗体を用いた肺線維芽細胞及び気管支平滑筋細胞培養上清のウェスタンブロッティング

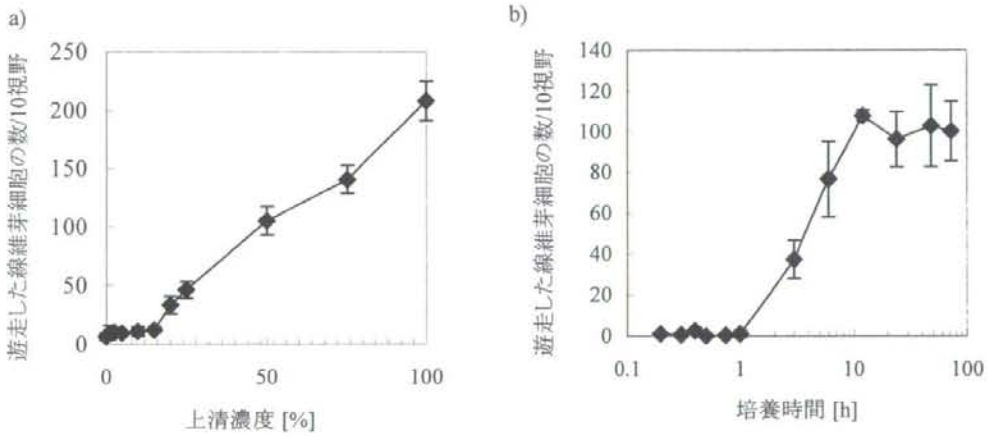


Fig.4 気管支平滑筋細胞培養上清に対する肺線維芽細胞の遊走

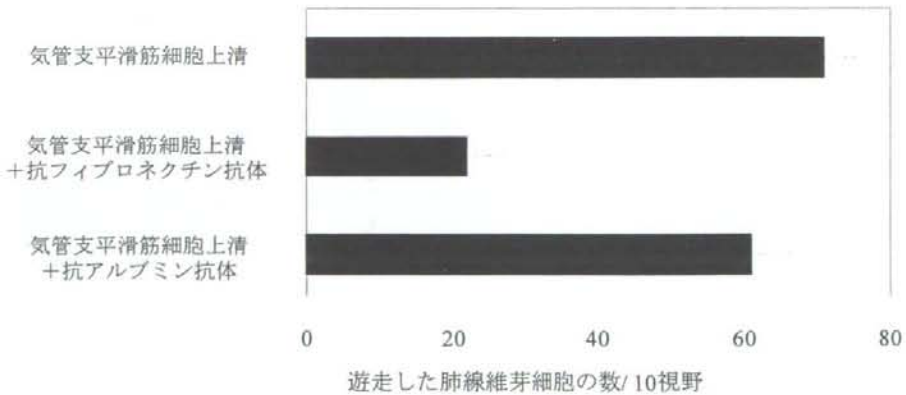


Fig.5 抗フィブロネクチン抗体を添加した気管支平滑筋細胞培養上清に対する肺線維芽細胞の遊走

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

研究分担者:大田 健(帝京大学医学部内科教授)

気管支喘息の病態は気道の慢性炎症であり、炎症の程度が重症度を規定すると考えられている。特に気道炎症が遷延するとリモデリングに至り、喘息難治化の要因として重要視されている。好酸球などの炎症細胞が浸潤すると気道上皮が傷害され、その後の修復課程で生じるリモデリングにより非可逆的な気道過敏性が惹起される。近年の研究により、リモデリングには気道上皮の増殖因子や好酸球そのものが重要な役割を担うことが分かってきた。本研究ではまず喘息におけるこれら増殖因子レセプターの役割を模索するため、リモデリングマウスにおけるEGFR阻害薬 (AG1478) の効果を検討した。OVA誘発性喘息モデルマウスにおける炎症細胞浸潤・基底膜下肥厚・粘液産生細胞増生は、AG1478により有意に抑制された。一方好酸球を標的とした戦略として細胞内に受動的に目的タンパクを導入できるTAT融合タンパクを用い、好酸球にPTENを強制導入させてその効果を検討した。作製したTAT-PTENを好酸球と培養することにより、好酸球の生存や遊走を抑制した。またOVA感作マウスにTAT-PTENを投与することで、OVA曝露後の気道組織の好酸球浸潤や粘液産生の抑制を認めた。以上のことからEGFRやPTENという細胞内シグナルを制御することにより、アレルギー性炎症やリモデリングを抑制しえることが分かった。気管支喘息の難治化の予防・治療法の開発という観点から、増殖因子や好酸球を標的とした戦略は非常に有望であると結論づけられる。

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

1. 研究目的

気管支喘息の病態は気道の慢性炎症であり、炎症の程度が重症度を規定すると考えられている。気道の慢性炎症はやがて非可逆的な変化であるリモデリングに至り、喘息難治化の有力な原因と考えられている。本研究班では難治化機序の解明と予防・治療法の開発を目的とし、以下の研究を行った。①喘息モデルマウスにおいて増殖因子受容体阻害効果を検討する。②シグナル伝達分子を標的とした新しい治療法を模索する。

2. 研究方法

1) A/Jマウスを卵白アルブミン(OA)とAlumで免疫後、OAで14日間反復吸入させることにより、喘息リモデリングマウスを作製した。増殖因子レセプターの役割を検討するために、連日の吸入2時間前にAG1478あるいはDMSOを点鼻投与し、1) DMSO点鼻/生食吸入、2) DMSO点鼻/OA吸入、3) AG1478点鼻/OA吸入、4) AG1295点鼻/OA吸入の3群に分類した。吸入開始後15日目に気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液(BALF)中の細胞数と細胞分画をカウントした。採取した肺組織をhematoxylin-eosin(HE), elastica van Gieson (EVG), alcian blue/periodic acid-schiff (AB-PAS)にて染色し、好酸球浸潤、基底膜の肥厚、粘液産生細胞の増生などの変化を検討した。

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

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

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

In vivoの系では、OA感作したA/JマウスにOAを4日間点鼻投与した。連日の点鼻2時間前にTAT-PTENあるいはTAT-GFPを点鼻投与し、1) PBS点鼻/PBS点鼻、2) PBS点鼻/OA点鼻、3) TAT-PTEN点鼻/OA点鼻、4) TAT-GFP点鼻/OA点鼻の4群に分類した。5日目にBALを施行後、肺を摘出し、病理のHE染色とAB/PAS染色を行った。

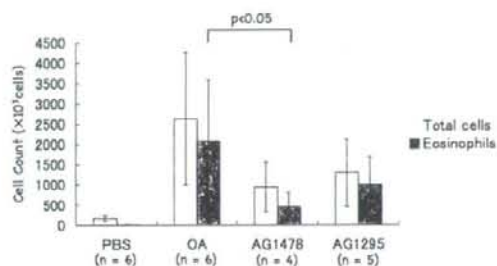
3. 研究結果

1) 喘息モデルマウスにおけるEGFRおよびPDGFR阻害薬の効果

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

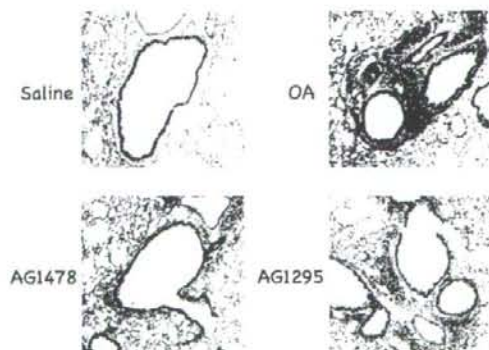
($\times 10^4$ cells)であり、阻害薬投与群で減少傾向を認めるものの有意ではなかった。一方それぞれの群における好酸球数は 209 ± 151 、 46 ± 36 、 100 ± 70 ($\times 10^4$ cells)であり、OA群とAG1478群との間で有意差を認めた(図1)。

図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2)。

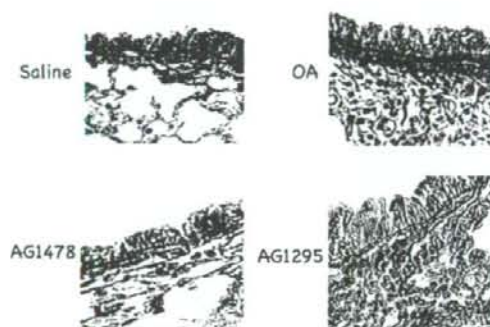
図2 HE染色



リモデリングの指標とされる気道壁の肥厚を、EVG染色により検討した。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

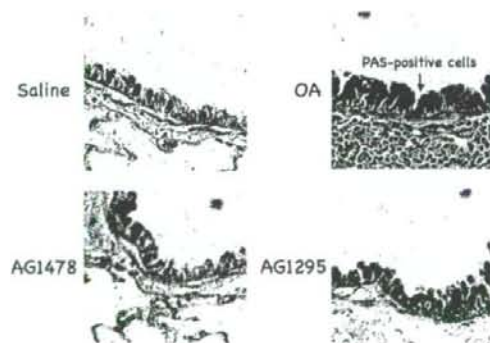
象は、AG1478により明らかに抑制された。一方AG1295の抑制効果は、部分的であった(図3)。

図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4)。

図4 AB-PAS二重染色



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5)。

図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6)。

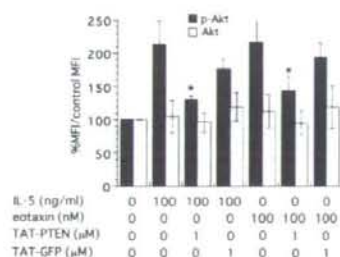
図6 TAT-PTENの細胞内局在



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)。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。

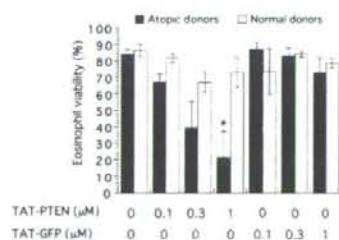
2) TAT-PTENを用いたin vitroおよびin vivoでの好酸球性炎症の制御

図7 Aktリン酸化に対するTAT-PTENの効果



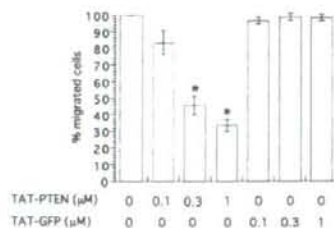
好酸球生存に対するTAT-PTENの効果を検討した。TAT-PTENを反応させた好酸球をIL-5存在下に24時間培養し、Annexin V/PI二重染色法にて生存率を算定した。興味深いことに、アレルギー患者から分離した好酸球ではTAT-PTENによりその生存が抑制されたのに対し、健常人の好酸球ではその効果を認めなかった(図8)。TAT-GFPに関しては、いずれも効果を認めなかった。

図8 好酸球生存に対するTAT-PTENの効果



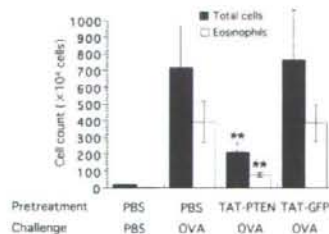
次に、好酸球遊走に対するTAT-PTENの効果を検討した。好酸球をTAT-PTENと培養した後、eotaxinに対する遊走をBoyden chamber法を用いて検討した。TAT-PTENは好酸球の遊走を有意に抑制したのに対し、TAT-GFPではその効果を認めなかった(図9)。この遊走の系では、好酸球のドナーとの関連は認めなかった。

図9 好酸球遊走に対するTAT-PTENの効果



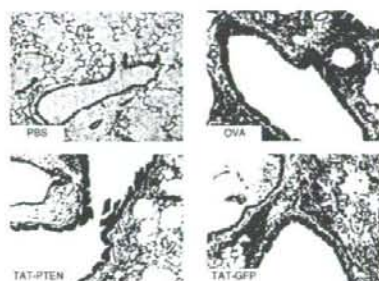
In vivoでのPTENの役割を検討するために、喘息モデルマウスにおけるTAT-PTENの効果を検討した。OA感作したマウスにTAT-PTENを点鼻にて前投与し、OA曝露後にBALFを採取した。OA曝露したマウスで認めたBALF中の総細胞数と好酸球数の増加は、TAT-PTENの前投与により有意に抑制された(図10)。TAT-GFPの前投与では、その効果は認められなかった。

図10 BALF中細胞分画に対するTAT-PTENの効果



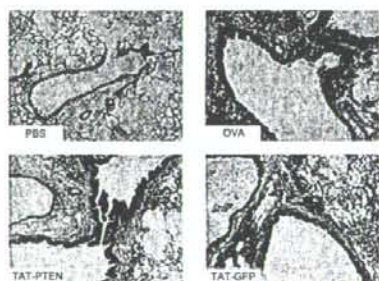
肺組織のHE染色では、コントロールであるPBS群と比してOA群において有意に傍気道組織への炎症細胞浸潤を認めた。この炎症細胞浸潤は、TAT-PTEN前投与により明らかに抑制された(図11)。一方TAT-GFPの前投与では、その効果は認められなかった。

図11 HE染色



AB-PAS二重染色では、PBS群と比してOA群において有意に粘液産出細胞の増生を認めた。TAT-PTEN前投与により、粘液産出細胞の陽性率は明らかに抑制された(図12)。一方TAT-GFPの前投与では、その効果は認められなかった。

図12 AB-PAS二重染色



4. 考察

当研究室ではこれまでマウス喘息モデルにTGF- β あるいはIGF-Iの中和抗体を適用し、これらの増殖因子が喘息難治化の主因である気道リモデリングに重要な役割を担っていることを報告した(Cell Immunol 235: 85, 2005)。今回は増殖因子レセプター側を阻害することにより同様の結果が得られ、これは増殖因子を標的にすることは喘息難治化に有望であることを改めて認識させるものである。増殖因子レセプターの阻害剤の治療応用に関しては、現在臨床の間では肺癌治療としてEGFR阻害薬(gefitinib)が

使用されている。今回の結果に基づいた今後の展望としては、気道リモデリングに至る喘息難治化の過程においてもgefitinibを適用するような治療戦略が期待される。

一方PTENは様々な細胞で機能を負に調節することが報告されているため、今回は好酸球の機能を制御すべく、細胞内に強制発現させるためのTAT-PTENタンパクを作製した。我々の結果でもPTENは好酸球機能を負に制御していることが判明し、好酸球におけるPTENの役割としては最初の報告である。またin vivo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。

5. 結論

本研究において我々は、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を行った。増殖因子レセプターや細胞内シグナル伝達分子を標的としたところ、喘息モデルマウスにおいて炎症細胞浸潤・基底膜下肥厚・粘液産生などを抑制することができた。本研究の成果が、今後の喘息難治化予防・治療法の開発に大きく貢献することが期待される。

6. 業績

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.

4) Adachi T, Hanaka S, Masuda T, Yoshihara H, Nagase H, Ohta K. Transduction of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 into eosinophils attenuates survival, chemotaxis, and eosinophilic inflammation. *J Immunol* 179: 8105-11, 2007.

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

6) Yamashita N, Tashimo H, Matsuo Y, Ishida H, Yoshiura K, Sato K, Yamashita N, Kakiuchi T, Ohta K. Role of CCL21 and

CCL19 in allergic inflammation in the OA-specific murine asthmatic model. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1040-6, 2006.

7) Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Tamauchi H, Terashima M, Yoshiwara I, Habu S, Ohta K. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyper-responsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L1045-51, 2006.

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、瀧藤力也、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

9) 足立哲也、花香里子、増田倫子、吉原久直、長瀬洋之、大田 健。喘息モデルマウスにおけるTAT-PTENの気道炎症抑制効果。第57回日本アレルギー学会秋季学術大会，平成19年11月，横浜市

10) 長瀬洋之、山口正雄、矢野智湖、吉原久直、山村浩一、鈴川真穂、倉持美知雄、石田博文、足立哲也、大田 健。ウイルス性気道炎症におけるマスト細胞の生体防衛的役割の検討。第57回日本アレルギー学会秋季学術大会，平成19年11月，横浜市 11) 山村浩一、足立哲也、増田倫子、長瀬洋之、大田 健。Luminex systemを用いた好酸球細胞内タンパクリン酸化の網羅的検討。第57回日本アレルギー学会秋季学術大会，平成19年11月，横浜市

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

13) Adachi T, Chihara J, Ohta K.
Expression of platelet-derived growth

factor in eosinophils. 第46回日本呼吸器学会学術講演会，平成18年6月，東京都

7. 知的所有権 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）

総合（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 烏帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究要旨 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CCRのLigandでもあるCC chemokine ligand (CCL)、Monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1, CCL2)、さらにはヘムオキシゲナーゼ-1 (heme oxygenase-1, HO-1)の遺伝子多型を軽症、重症および健常人で比較した。重症群のCCL26のT2497CのTとT2563CのCの多型頻度が、軽症群のそれに比べ、有意に高いことが認められた。また重症群のMCP-1A-2518GにおけるGのAllele頻度80.6%は、健常群に比し有意に高いことが認められた。HO-1遺伝子多型の相関解析によって、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の遺伝子多型の頻度が、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。CCL26のT2563CとMCP-1のA-2518Gが喘息症の難治化との関係が示唆された。また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。これら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、CC chemokine receptor (CCR) family遺伝子であるCCR3のT51C多型と喘息症との間に有意な関連を認めましたが、難治群と非難治群の間の差は認めることができなかった。そこで、CCRのLigandでもあるCC chemokine ligand (CCL)遺伝子および、単球、繊維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞などから、LPS、IL-1、TNF- α 等の炎症性刺激を受け産生されるMonocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1, CCL2)、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、重症および健常人で比較し、重症化における各蛋白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、HO-1の遺伝子多型については、喫煙者と非喫煙者について軽症、重症および健常人で比較し、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、重症群としてJGL98で規定されたStep 4の18例（52.9±4.33歳、平均値±標準誤差）、軽症群としてStep 1-2の34例（49.5±2.56歳）、これらの対照として、喘息、花粉症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー歴を有さない健常群50例（48.8±2.446歳）である。これらの3群の間に年齢差、性差はなく、また重症群と軽症群は、いずれも健常群と比較して総IgE値（RIST）は有意に高かったが、重症群と軽症群間には有意な差は認められなかった（表1）。また、同時に血清MCP-1値を比較した。

本研究テーマの「気管支喘息症の重症度に関わる遺伝子解析研究」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、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、これを有する人の割合を各群で調べた。

C. 研究結果

CCL遺伝子についての相関解析の結果、有意な関係が認められたのは、CCL26のT2497CとT2563Cであった。重症群のT2497CのTとT2563CのCの多型頻度が、軽症群のそれに比べ、有意に高いことが認められた。これらの対立遺伝子の多型頻度は、軽症群と健常群では有意な差は認められなかった（表2）。

MCP-1遺伝子多型については3群間でT901CとC1543Tの多型頻度には有意な差はなかったが、重症群のA-2518GにおけるGのAllele頻度80.6%は、健常群の55.0%に比し有意に高いことが認められた（表3）。

重症群と軽症群は、いずれも健常群と比較して有意に低い血清MCP-1値を認めた。A-2518GのGGおよびA/Gを呈する人の血清MCP-1値は、A/Aの人のそれより有意に低い値であることも認められた（図1）。

HO-1遺伝子多型の相関解析によって、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の遺伝子多型の頻度が、重症化したがつ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（図2）。

表1 対象の特性

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

#花粉症、アトピー性皮膚炎、**p<0.01（対照群と比較したとき）

表2 難治性喘息群、非難治性喘息群、対照群におけるCCL遺伝子群多型についての相関解析

Gene	Allele	Control (N=24)		Intermittent, mild persistent asthma (N=16)		Severe persistent asthma (N=8)	
		Number	Frequency ¹⁾	Number	Frequency ¹⁾	Number	Frequency ¹⁾
CCL11	Ala23Ala	19	12.5	11	15.6	7	6.3
	Ala23Thr	4		5		1	
	Thr23Thr	1		0		0	
CCL24	Ile29Ile	4	58.3	3	56.3	1	62.5
	Ile29Leu	12		8		4	
	Leu29Leu	8		5		3	
	18	16.7	10	18.8	6	12.5	G1387G
	G1387A	4		6		2	
	A1387A	2		0		0	
	G1520G	17	16.7	10	21.9	6	12.5
	G1520A	6		5		2	
	A1520A	1		1		0	
	C1923C	1	87.5	1	81.3	0	87.5
	C1923A	4		4		2	
	A1923A	19		11		6	
	G1926G	1	87.5	1	81.3	0	87.5
G1926A	4		4		2		
A1926A	19		11		6		
CCL26	G-57G	22	4.2	15	3.1	8	6.3
	G-57A	2		1		0	
	A-57A	0		0		0	
	C77C	11	31.3	7	31.3	4	25
	C77T	11		8		4	
	T77T	2		1		0	
	G140G	23	2.08	16	0	8	0
	G140A	1		0		0	
	A140A	0		0		0	
	T2497T	18	14.6	12	12.5	8	0*
	T2497G	5		4		0	
	G2497G	1		0		0	
	T2563T	23	2.08	16	0	5	25.0*
	T2563C	1		0		2	
	C2563C	0		0		1	

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

表3 重症群、軽症群、対照群におけるにおけるCCR遺伝子群多型についての相関解析

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

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

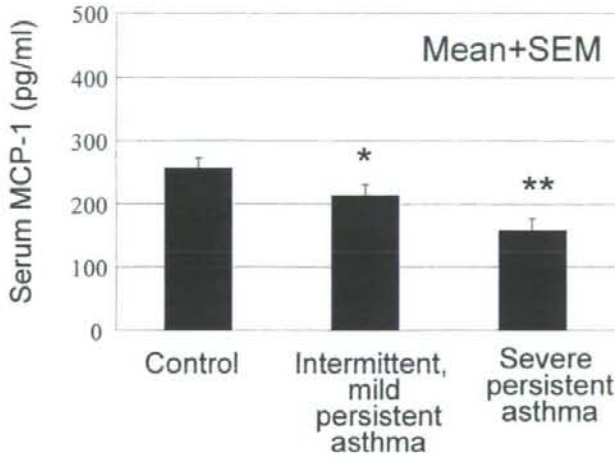
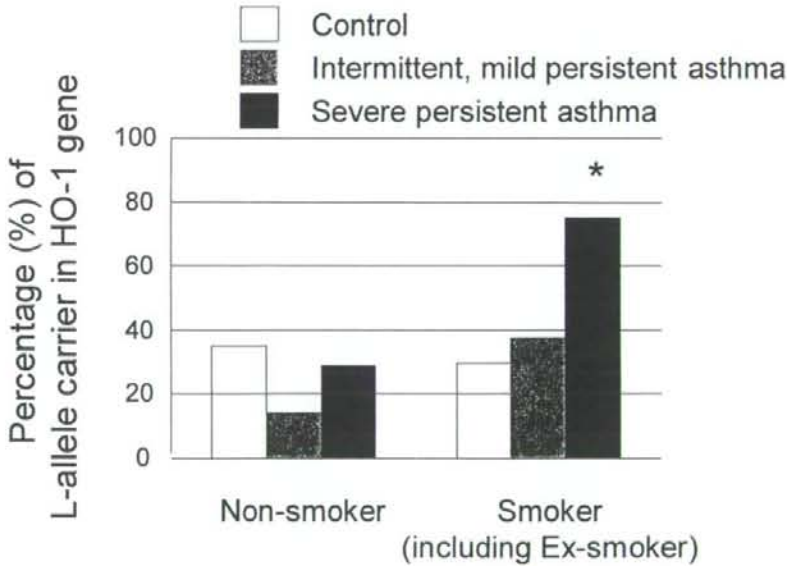


図1 重症群、軽症群、健常群における血清MCP-1値

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



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遺伝子アリルキャリアの頻度

D. 考察

CCL遺伝子多型の結果からCCR3との違いが見出せた。すなわち、CCR3の遺伝子多型T51C

は喘息症の発症との関係が、CCL26の遺伝子多型T2563Cは喘息症の難治化との関係が示唆された。

MCP-1遺伝子多型の相関解析によって、喘息の重症化の発症機序には、MCP-1遺伝子によって引き起こされる可能性が示唆された。特に promoter領域の多型によってMCP-1の産生量の低下が重症化の病態に関与していることが推測された。MCP-1の関与を中心とした喘息症における機能解析が今後の課題である。また、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。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起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

CCL26の遺伝子多型T2563CおよびMCP-1遺伝子多型A-2518G、は喘息症の難治化との関係が示唆されたとの相互作用によって引き起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。また、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起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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nakamura H, Higashikawa F, Nobukuni Y, Miyagawa K, Endo T, Imai T, Hatta K, Ozasa K, Motohashi Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Ogino K, Akimaru K, Eboshida A
Genotypes and haplotypes of CCR2 and CCR3 genes in Japanese cedar pollinosis.
Int Arch Allergy Immunol. 2007;142(4):329-334
- (2) Matsuzaki I, Sagara T, Ohshita Y, Nagase H, Ogino K, Eboshida A, Sasahara S, Nakamura H
Psychological factors including sense of coherence and some lifestyles are related to General Health Questionnaire-12 (GHQ-12) in elderly workers in Japan
Environ Health Prev Med. 2007; 12(2): 21-27.
- (3) Self-administered assessments of perceived stress and quality of life and their associations in

community-based and hospital-based surveys
Tomoaki Kimura

Akihito Yokoyama
Nobuoki Kohno
Hiroyuki Nakamura
Akira Eboshida

- (4) Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma

Tomoaki Kimura
Hiroyuki Nakamura
Akira Eboshida

Allergology International 2008

- (5) 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

- (6) Relationship between Lifestyle and psychosomatic health- Study on Japanese residents of 60 years old -
Kazuo Uebaba

Feng-Hao Xu
Hideki Origasa
Nobuo Yamaguchi
Delixiati Yimiti
Hisako Izumi
Akira Eboshida

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

Tomokazu Awaya,
Yasuyuki Yokosaki,
Kiminori Yamane,
Fumiko Higashikawa,
Nobuoki Kohno,
Akira Eboshida

- (8) 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, 烏帽子田彰

- (9) 中村裕之, 相良多喜子, 荻野景規, 長瀬博文, 大下喜子, 松崎一葉, 友常祐介, 吉野聡, 立川秀樹, 烏帽子田彰

高齢労働者における精神的健康度の向上のためのSOCを用いた健康プログラムの開発
産業医学ジャーナル 2006 29(4):93-98

2. 学会発表

(シンポジウム)

(1) 中村裕之、弘田量二、烏帽子田彰

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) 烏帽子田彰、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

(3) 中村裕之、弘田量二、烏帽子田彰

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

(4) 「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、烏帽子田彰

(一般発表)

(5) 明石真幸、大矢幸弘、小嶋なみ子、二村昌樹、斎藤暁美、青田明子、井上徳浩、秋山一男、高橋清、中川武正、小林章雄、烏帽子田彰、中村裕之、小田嶋博、足立雄一、赤澤晃

全国小中学生におけるアレルギー疾患有病率の現状

第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、2006年5月、東京

(6) 斎藤暁美、青田明子、大矢幸弘、小嶋なみ子、明石真幸、二村昌樹、井上徳浩、秋山一男、高橋清、中川武正、小林章雄、烏帽子田彰、中村裕之、小田嶋博、足立雄一、赤澤晃

電話法による全国全年齢階級別気管支喘息有病率調査

第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 2006年5月、東京

(7) 二村昌樹、大矢幸弘、小嶋なみ子、明石真幸、青田明子、斎藤暁美、井上徳浩、秋山一男、高橋清、中川武正、小田嶋博、小林章雄、烏帽子田彰、中村裕之、足立雄一、赤澤晃

アンケート調査によるアレルギー疾患有病率とペット飼育歴についての検討

第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、2006年5月、東京

(8) 小嶋なみ子、大矢幸弘、二村昌樹、明石真幸、青田明子、斎藤暁美、秋山一男、高橋清、中川武正、

小田嶋博、小林章雄、烏帽子田彰、中村裕之、足立雄一、赤澤晃

小児のアレルギー疾患別 QOL 調査

第18回日本アレルギー学会春季臨床大会、2006年5月、東京

(9) 二村昌樹、大矢幸弘、小嶋なみ子、明石真幸、青田明子、斎藤暁美、井上徳浩、秋山一男、高橋清、中川武正、小田嶋博、小林章雄、烏帽子田彰、中村裕之、足立雄一、赤澤晃

気管支喘息の屋内水泳歴と症状の関係についての検討

第56回日本アレルギー学会秋季学術大会、2006年11月、東京

(10) 中村裕之、秋丸国広、張達川、弘田量二、中村剛、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一朗、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰

スギ花粉症における MCP-1(monocyte chemoattractant protein 1, CCL2)の遺伝子多型ハプロタイプに関する相関解析

第4回日本予防医学会、2006年12月、さいたま

(11) 広島 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、烏帽子田彰

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

気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究
—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—

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

近年、喘息患者数の増加が顕著であり、また、喘息病態の難治化・重症化も問題となっている。これらの機序を解明する上で、臨床をより反映する動物モデルの確立が急務である。特に、感染や大気汚染などの喘息の難治化・重症化の原因を解明する上で、抗原性、抗原感作部位、アジュバントの使用などを考慮したモデル作成が重要である。分担研究者らは、これまでにマウスの気管内にダニ抗原粗抽出物を反復気管内投与することにより、喘息様病態形成が認められることを先の厚生労働科学研究にて報告した。

ダニ抗原誘発喘息様病態形成における Th2 サイトカインの意義

そこで本研究では、ダニ抗原誘発マウス喘息様病態形成における Th2 サイトカインの意義について遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結果、ダニ抗原(*Der β*)の気管内投与により生ずる喘息様病態形成は、いずれも Th2 依存性の反応であることが示唆された。一方、IL-5 は気道内好酸球増多には重要であるが、気道過敏性ならびに気道リモデリング形成にはその関与が少ないことが示唆された。これに対し、気道過敏性ならびに気道リモデリング形成など、喘息の重症化と関連する病態形成には IL-13 が特に重要であることが示唆された。

喘息様病態形成ならびに重症化に及ぼすディーゼル排気粒子曝露の影響

2年目の平成19年度はダニ抗原誘発マウス喘息モデルを用いて喘息様病態形成の難治化・重症化に及ぼすディーゼル排気粒子(Diesel exhaust particle, DEP)の影響を検討した。その結果、初回抗原投与時のみダニ抗原と DEP を併用投与した場合ならびに抗原投与期間内に DEP を複数回併用投与したいずれの場合においても、少量のダニ抗原曝露による喘息様病態形成ならびに気道リモデリング形成が DEP 併用投与により有意に増悪した。従って、DEP はダニ抗原によって誘発される気道炎症ならびに気道リモデリング形成に対し、アジュバント作用を示すことが明らかとなった。

気道リモデリング形成に関与する細胞および機能分子の探索

最終年度の平成20年度は、従前より疫学調査などで喘息の発症促進ならびに難治化因子として注目されているウィルス感染の影響を、二本鎖 RNA 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ことにより、その意義を検討した。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 toll-like receptors (TLRs) あるいは 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。

研究協力者
稲垣直樹（岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学
研究室・教授）

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

A. 研究目的