

H. 知的財産権の出願・登録状況（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

図 発症年齢の分布

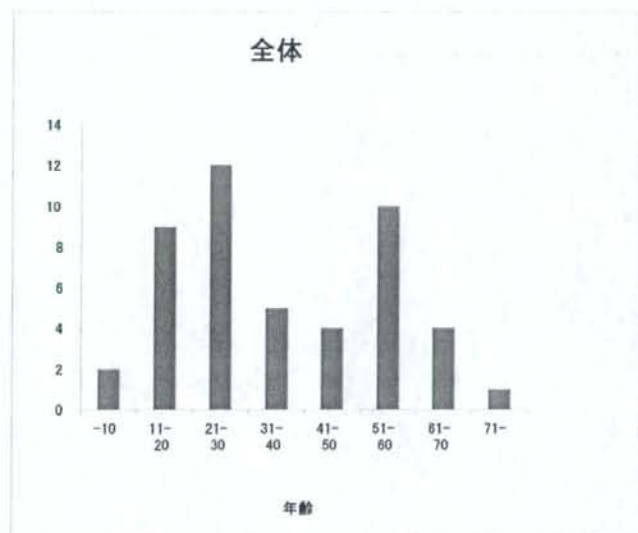


表 1 性別と平均年齢

	全体	A群	B群	C群
症例数	47	5	33	9
性別(男)	20	4	19	4
(女)	27	1	14	5
年齢(平均)	36	42	34	43

表 2 アレルギー検査結果

検査結果	全体(%)	A群(%)	B群(%)	C群(%)
血清中抗原特異的IgE陽性	31/39 (79.5)	4/5 (80)	19/25 (76)	8/9 (88.9)
SPT陽性*	23/29 (79.3)	4/5 (80)	16/19 (84.2)	5/7 (71.4)
HRT陽性	2/3 (66.6)	1/1 (100)	0/1	1/1(100)
上記試験陰性・負荷試験陽	6/44 (13.6)	0/4	5/31 (16.1)	1/9 (11.1)
負荷試験陰性	4/44 (9.1)	0/4	4/31 (12.9)	0/9

表3 FDEIAの誘発試験におけるアスピリンの
影響

誘発試験	症例 (%)
食物と運動負荷にアスピリンを加えて症状 が誘発	10/32 (31.3)
食物とアスピリン負荷のみで症状誘発	12/22 (54.5)
食物と運動負荷で軽度の症状 アスピリン負荷で症状増強	3/3 (66.6)

末梢血好酸球の CD11b 発現を指標としたアスピリン喘息の *in vitro* 診断の試み

研究分担者	榊原博樹	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I・教授
研究協力者	齊藤雄二	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I・准教授
	磯谷澄都	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I・研究員
	多田利彦	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I・助教

研究要旨:

末梢血好酸球の細胞膜表面に発現する接着分子 CD11b を指標として, *in vitro* におけるアスピリン喘息 (AIA) の診断方法を検討した。CD11b は FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識 CD11b モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーで測定した。CD11b 発現をフローサイトメトリーで測定することにより, AIA 群と非 AIA 群を弁別することが可能であった。すなわち, アスピリンの添加により, AIA の好酸球では CD11b の発現が増加したが, 非 AIA ではかえって減少した。AIA の末梢血好酸球にみられるアスピリンによる CD11b 発現増加は PGE₂ の添加により消失した。このことから, アスピリンによる CD11b の発現増加には PGE₂ の減少が関与していると推定される。本法により CD11b 発現が増加した場合を陽性と判定すると, AIA 群 20 例中 19 例が陽性 (感度 95.0%)、非 AIA 群では 19 例中 1 例のみ陽性 (特異度 94.7%) であった。本法はフローサイトメトリーを要するものの手技を簡素化することにより, 末梢血を用いた *in vitro* における AIA の診断法として応用できる可能性がある。

A. 研究目的

アスピリン喘息 (AIA) は, アスピリン様の薬効をもつほとんど全ての酸性の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) で喘息発作が誘発される。これらの NSAIDs の共通した薬理作用であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害作用が過敏反応の引き金になるものと考えられている。すなわち, AIA にはアラキドン酸代謝系路上あるいはアラキドン酸代謝産物が関わる生体反応に何らかの異常があり, それが NSAIDs の投与により顕在化し, 過敏反応として現れてくるものと考えられる。

AIA の確定診断は NSAIDs を用いた負荷試験によらざるを得ないが, 診断感度, 特異度ともに問題がある上に危険を伴うため, *in vitro* における AIA の診断方法が求められている。AIA の *in vitro* 診断に関する試みはいくつかあり, 末梢血多核白血球のペプチドロイコトリエン産生¹⁾, 15-HETE 産生^{2,3)}, リボキシン産生⁴⁾などを指標とする方法が検討されてきたが, 十分な追試・確認がされておらず, その有用性に関しては疑問である。

好酸球は AIA の発症や病態に関与する中心的な炎症細胞であり, AIA 患者の体内でアスピリンにより活性化することが知られている⁵⁾。末梢血好酸球のレベルで AIA に特異な反応を見出すことができれば AIA の診断や臨床研究に有用である。そこで, 好酸球の細胞膜表面に発現している接着分子 CD11b を指標として AIA の *in vitro* 診断の可能性について検討した。

B. 研究方法

1) 対象: 基礎的な検討のためには, 外来通院中の症状の安定した非 AIA 患者 8 名 (男性 3 名, 女性 5 名, 平均年齢 41.3 ± 16.0 歳), AIA 患者

8 名 (男性 4 名, 女性 4 名, 平均年齢 42.9 ± 10.1 歳) を対象とした。In vitro 診断法の検討に関しては, 外来通院中の症状の安定した非 AIA 患者 19 名 (男性 9 名, 女性 10 名, 平均年齢 49.4 ± 4.8 歳), AIA 患者 20 名 (男性 9 名, 女性 11 名, 平均年齢 51.1 ± 4.8 歳) を対象とした。

全例に本研究検査の意義を説明し, 同意を得た上で基礎肺機能検査および一般血液検査を施行後, 末梢静脈より研究用採血を行った。NSAIDs 過敏性の有無を診断するため, 全例にトルメチンおよびスルピリン吸入負荷試験をおこなった。これらの吸入負荷試験にて陽性で, なおかつ NSAIDs による喘息発作の既往のある患者を AIA とした。これらの全てが陰性の場合に非 AIA とした。

2) 末梢血好酸球の分離 (図 1)

対象患者の末梢静脈より血液を約 20 ml 採取し, 血液をモノ・ポリ分離溶液 (大日本製薬, 大阪) を用いた比重遠心法により多核白血球 (PMN: polymorphonuclear cells) を分離した。Phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄後, 10% fetal bovine serum (FBS) 添加 RPMI1640 培養液 (Sigma, St Louis, MO, USA) にて 2 × 10⁶ 個/ml に細胞数を調整した。

3) CD11b 発現量の測定 (図 1)

分離した PMN 浮遊液に 10⁻⁴M ~ 10⁻⁷M の濃度のアスピリンを加え, 30 分間, 37°C にてインキュベートした。遠心後 PBS を加え, FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識 CD11b モノクローナル抗体および PE (phycoerythrin) 標識 CD16 モノクローナル抗体を用いて氷冷下にて 45 分染色を行った。最後に 1% パラホルムアルデヒドにて固定後, フローサイトメトリー (Becton Dickinson, USA) を用いて CD16 発現の有無により

好酸球分画(CD16 陰性)と好中球分画(CD16 陽性)に分け、CD11b の発現量を mean fluorescence intensity (MFI)にて表した。また、vehicle のみを添加した無刺激状態をコントロールとした。さらに、プロスタグランジン E2 (10^{-7} – 10^{-6} M)が CD11b 発現に及ぼす影響についても検討した。

4)倫理面への配慮

上記のとおり、被験者には研究の目的や方法、意義に関して説明し、同意を得た上で研究対象とした。NSAIDs 過敏症の確定のためにスルピリンおよびトルメチン吸入負荷試験を実施したが、当科では気管支喘息患者に対してはばルーチンに実施している検査であり、通常の臨床行為の範囲内に止まるものである。

5)統計

一部を除き、数値は mean±S.E. で表記した。フローサイトメトリーの測定結果はコントロールを100%として変化率を以下のように求めた。すなわち、変化率=(対象 MFI-コントロール MFI)/コントロール MFI、である。統計処理は Mann-Whitney U 検定を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

1. 無刺激状態における好酸球 CD11b の基礎発現量の比較

無刺激状態の CD11b の MFI は、非 AIA 147.3 ± 12.1 、AIA 130.4 ± 4.7 であり、両者の間に有意な差を認めなかった(図2)。

2. CD11b の発現量に対するアスピリン添加の影響

好酸球の CD11b の発現は、アスピリン 10^{-7} M 添加にて、非 AIA $-5.7 \pm 3.2\%$ 、AIA $6.1 \pm 3.1\%$ ($p<0.05$)、 10^{-6} M で非 AIA $-3.5 \pm 2.2\%$ 、AIA $9.9 \pm 3.1\%$ ($p<0.05$)、 10^{-5} M で非 AIA $-1.2 \pm 2.2\%$ 、AIA $7.3 \pm 3.1\%$ ($p=0.07$)、 10^{-4} M で非 AIA $-8.0 \pm 2.6\%$ 、AIA $7.7 \pm 2.8\%$ ($p<0.05$)であった。いずれのアスピリン濃度でも AIA では CD11b の発現が増加し、逆に非 AIA では減少し、両群間に有意な差または傾向を認めた(図3)。

3. アスピリンによる CD11b の発現増加に及ぼすプロスタグランジン E2 の効果

アスピリン 10^{-4} M による AIA 群の好酸球の CD11b 発現増加は、PGE2 を添加すると濃度依存性に抑制される傾向を認めた。(PGE2 10^{-7} M $0.2 \pm 2.9\%$ 、 10^{-6} M $-0.6 \pm 2.9\%$ 、 10^{-5} M $-3.5 \pm 4.0\%$ で、PGE2 非添加時 $5.2 \pm 2.4\%$ と 10^{-5} M 添加時の間には $p=0.07$ と有意差のある傾向がみられた)。非 AIA 群に関しては明らかな変動は認めなかった(図4)。

4. アスピリンによる末梢血好酸球の CD11b 発現を指標にした AIA の in vitro 診断の可能性

末梢血好酸球にアスピリン 10^{-4} M を添加したとき

に CD11b 発現が増加した場合を陽性と判定すると、AIA 群 20 例中 19 例が陽性(感度 95.0%)、非 AIA 群では 19 例中 1 例のみ陽性(特異度 94.7%)であった(図5)。

D. 考察

AIA の in vitro 診断に関する試みはいくつかあり、末梢血多核白血球のペプチドロイコトリエン産生、15-HETE 産生、リポキシン産生などを指標とする方法が検討されてきたが、十分な追試・確認がされておらず、その有用性に関しては疑問である。本研究では末梢血好酸球の接着分子 CD11b 発現を指標にして、AIA の in vitro 診断の可能性を検討した。

CD11b 発現をフローサイトメトリーで測定することにより、AIA 群と非 AIA 群を弁別することが可能であった。すなわち、アスピリンの添加により、AIA の好酸球では CD11b の発現が増加したが、非 AIA ではかえって減少した。AIA の末梢血好酸球にみられるアスピリンによる CD11b 発現増加は PGE2 の添加により消失した。このことから、アスピリンによる CD11b の発現増加には PGE2 の減少が関与していると推定される。

本法により CD11b 発現が増加した場合を陽性と判定すると、AIA 群 20 例中 19 例が陽性(感度 95.0%)、非 AIA 群では 19 例中 1 例のみ陽性(特異度 94.7%)であった。AIA の診断のためには、病歴の聴取と in vivo での NSAIDs の負荷試験に頼らざるを得ないのが現状であるが、本法はフローサイトメトリーを要するものの手技を簡素化することにより、末梢血を用いた in vitro における AIA の診断法として応用できる可能性がある。

E. 結論

AIA の末梢血好酸球はアスピリンの添加により特異的に CD11b 発現が増える。AIA の in vitro における診断に応用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 榊原博樹, 齊藤藤二:アスピリン喘息, 発症機序を中心にした最近の話題. 呼吸と循環 2008;56:165-174.
- 2) 榊原博樹, 小橋保夫:アスピリン喘息. 成人病と生活習慣病 2008;38:327-334.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(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

※引用文献

- 1) 津田美奈子:アスピリン喘息患者の末梢白血球アラキドン酸代謝に関する研究:ヒト好酸球及び好中球ロイコトリエン生産能. 藤田学園医学会誌 1989; 8:299-328.
- 2) Kowalski ML, et al: Differential effects of aspirin and misoprostol on 15-hydroxyeicosatetraenoic acid generation by leukocytes from aspirin-sensitive asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol 2003;112:505-512.
- 3) Kowalski M, et al: Aspirin-triggered 15-HETE generation in peripheral blood leukocytes is a specific and sensitive Aspirin-Sensitive Patients Identification Test (ASPISTest). Allergy 2005;60: 1139-1145.
- 4) Sanak M, et al: Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin-intolerant asthmatics. Eur Respir J 2000;16:44-49.
- 5) Cowburn AS, et al.: Overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. J Clin Invest 1998;101:834-846.

図・表一覧

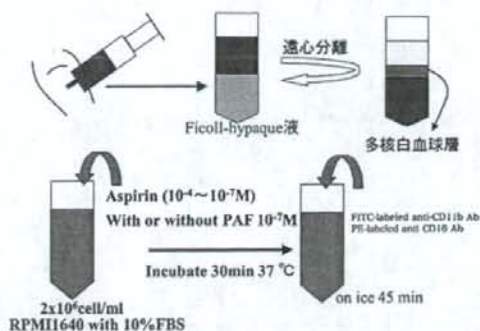


図1 多核白血球の分離および処理方法

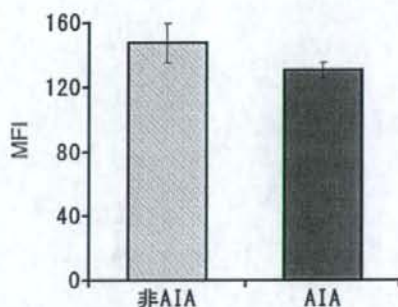


図2 無刺激状態(コントロール)における好酸球CD11b基礎発現量の比較
Mean ± SE, MFI: mean fluorescence intensity

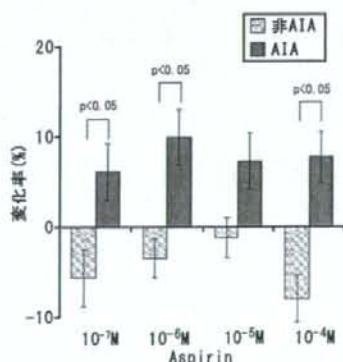


図3 好酸球のCD11b発現に及ぼすアスピリン(10⁻⁷M~10⁻⁴M)の影響
Mean ± SE

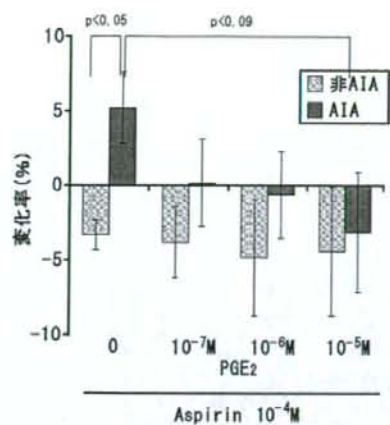


図4 アスピリン(10⁻⁴M)による好酸球のCD11b発現に対するPGE2の影響
Mean ± SE

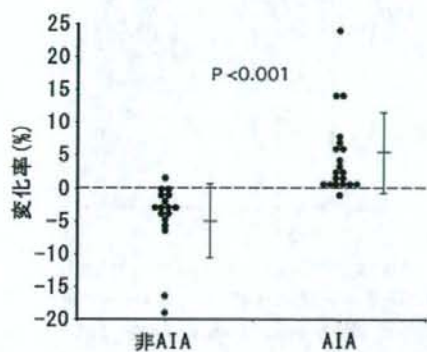


図5 アスピリン(10⁻⁴M)による好酸球のCD11b発現量の変化:AIAのin vitro診断に有用か
Mean ± SD

発生工学を用いたアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明

研究分担者 長瀬 隆 英 東京大学大学院医学系研究科呼吸器内科学・教授
研究協力者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨:

気管支喘息は極めて多数の因子から病像が形成されており、その発症機序については未だ解明されていないことも多い。なかでも、NSAIDs 不耐症の一種であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息、特にアスピリン喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。また、アスピリン喘息については、世界的にも動物モデルが報告されていない。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、アスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指す。今後、遺伝子改変マウスを活用することにより、さらに各々の遺伝子・蛋白質の病態生理学的意義・重要性が解明され、気管支喘息・アスピリン喘息治療への貢献が期待される。

A. 研究目的

気管支喘息は極めて多数の因子から病像が形成されており、その発症機序については未だ解明されていないことも多い。なかでも、NSAIDs 不耐症の一種であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息の病態的・生理学的特徴として、慢性的な気道炎症・気道過敏性・可逆的な気流制限の3つが挙げられる。気道過敏性の機序はこれまで不明の部分が多かったが、喘息特有の気道炎症に起因していることが明らかになってきた。気道炎症の機序は、炎症細胞と気道構成細胞が放出する炎症メディエーター・サイトカインなどの生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられている。しかしながら、気管支喘息、特にアスピリン喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。また、アスピリン喘息については、世界的にも動物モデルが報告されていない。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、アスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指す。

B. 研究方法

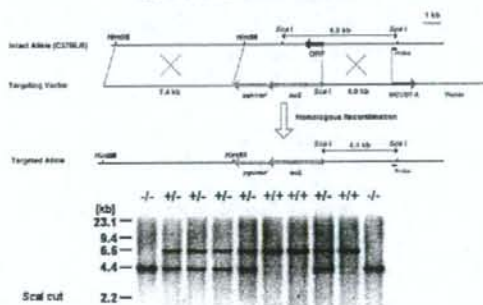
本研究では、本研究者が独自に開発した遺

伝子改変マウスを使用する。LTC₄/D₄/E₄ など cysteinyl LT は、気管支喘息における主要な炎症メディエーターであり、アスピリン喘息発症に大きく関与することが想定される。cysteinyl LT の受容体(CysLT₁-R, CysLT₂-R)は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。特に、CysLT₂-R は大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、この CysLT₂-R を標的としたノックアウトマウスの新規作成に着手する。このような遺伝子改変マウスを用いて、脂質性メディエーターと気管支喘息 (特にアスピリン喘息) との関連について評価・検討を加える。

C. 研究結果

発生工学的手法により CysLT₂-R ノックアウトマウスが作成された (図1)。

図1 CysLT₂ 受容体ノックアウトマウスの作成

Targeted Disruption of Mouse CysLT₂ Gene in C57BL/6 ES Cells

CysLT2-R ノックアウトマウスでは胎生致死が認められず、ホモ接合体の生存個体が得られた。また、外表所見上の著明な異常は認められず、発育・成長・生殖も正常と考えられた。また、遺伝的純化を行うためバッククロスを重ねた。すでに遺伝的純化が完了し、今後、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析を行う。

D. 考察

気管支喘息は、気道炎症を病態の特徴としており、その発症には多数の生理活性物質の関与が想定される。特に CysLT2 受容体は、肺・気管支に多量に存在することが示唆されているが、その機能はほとんど解明がなされていない。今回 CysLT2-R ノックアウトマウスのホモ接合体が得られたことにより、気管支喘息（特にアスピリン喘息）における気道過敏性・末梢気道炎症への関与を検証することが可能となった。気管支喘息・アスピリン喘息に関わる候補物質・遺伝子を評価する手段として、分子生物学・発生工学を駆使したトランスレーショナル・リサーチによる研究アプローチが有用と思われる。今後、さらに各々の遺伝子・蛋白系の生理的意義・重要性が解明されることにより、気管支喘息・アスピリン喘息に対する有効な治療法・管理法の開発および実用化が期待される。

E. 結論

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。CysLT2-R ノックアウトマウスのホモ接合体生存個体が得られたことにより、CysLT2 とアスピリン喘息との関連について評価・検討を行うことが可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakajima T, Jo T, Meguro K, Oonuma H, Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T. Effect of dexamethasone on voltage-gated Na⁺ channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci.* 82:1210-1215, 2008.

2) Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull* 31: 1434-1438, 2008.

3) Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K,

Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Multiple renal cysts with concentration defects and pulmonary emphysema in mice lacking TAZ. *Am J Physiol* 294: F542-53, 2008.

4) Kage H, Kohyama T, Kitagawa H, Takai D, Kanda Y, Ohishi N, Nagase T. Non-Infectious Bronchiolitis as an Early Pulmonary Complication of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Internal Medicine* 47: 61-64, 2008.

5) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Kato J, Nagase T. Clarithromycin inhibits fibroblast migration. *Respir Med.* 2008; in press

6) Kihara Y, Yanagida K, Masago K, Kita Y, Hishikawa D, Shindou H, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. *J Immunol* 181: 5008-5014, 2008.

7) Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Prog Lipid Res* 47: 107-126, 2008.

8) Kikuchi K, Kohyama T, Yamauchi Y, Kato J, Takami K, Desaki M, Okazaki H, Nagase T, Rennard SI, Takizawa H C reactive protein modulates human lung fibroblast migration. *Experimental Lung Research* 35: 48-58, 2009.

9) Nakajima T, Kubota N, Tsutsumi T, Oguri A, Imuta H, Jo T, Oonuma H, Soma M, Meguro K, Takano H, Nagase T, Nagata T. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol* 2009 in press

10) Kikuchi Y, Tateda K, Fuse ET, Matsumoto T, Gotoh N, Fukushima J, Takizawa H, Nagase T, Standiford TJ, Yamaguchi K. Hyperoxia exaggerates bacterial dissemination and lethality in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Pulm Pharmacol Ther* 2009 in press

2. 学会発表

1)慢性閉塞性肺疾患：第 50 回日本老年医学会
総会（発表者：長瀬隆英、教育企画）, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

（出願準備中 1 件）

発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口
泰弘

発明の名称：筋ジストロフィー症の病態モデル
哺乳動物、及びその製造方法

アスピリン喘息合併副鼻腔炎の治療法の確立とステロイド抵抗因子の検討

研究分担者 春名 眞一 獨協医科大学耳鼻咽喉科・教授

研究要旨:

AIA 合併副鼻腔炎の治療法として、内視鏡手術にて各副鼻腔を可及的に単洞化し、術後に生食による鼻洗浄、点鼻ステロイドと抗 LT 薬を用いることで、上気道のみならず下気道まで良好な効果が期待できた。しかし、AIA 合併副鼻腔炎の予後は最も悪く、その因子としてステロイド抵抗因子である Amphiregulin を検討したが、関与の有無の断定には至らなかった。

A. 研究目的

AIA ではアトピー型や内因型の喘息に比べ鼻疾患を合併する割合が高く、約 97% に副鼻腔炎を、約 72% に鼻茸を合併するとされ 1)、AIA と診断された場合にはほぼ全例に副鼻腔炎を合併していると言える。AIA 合併した副鼻腔炎は副鼻腔粘膜に著明な活性好酸球が浸潤し、好酸球性副鼻腔炎 2) の範疇に属する。好酸球性副鼻腔炎とは、副鼻腔粘膜に著明な活性好酸球が浸潤した副鼻腔炎で、従来の化膿性慢性副鼻腔炎とは異なる多くの臨床的特徴を有する。好酸球性副鼻腔炎では、気管支喘息や AIA を合併することが多く、one airway one disease と考えられている。気管支喘息や AIA で尿中 LTE4 濃度を計測すると、副鼻腔炎を合併した場合に高い濃度が認められ、かつ手術をすることで術前にくらべて優位に減少するとされる 3)。

現在、好酸球性副鼻腔炎の中でアスピリン喘息合併副鼻腔炎の内視鏡手術後の経過は不良で難治性副鼻腔炎と言われるが、術後下気道病態の安定化が報告されている 4)。しかし、術後の安定化にはステロイド薬の併用が重要で治療法の確立が期待されている。そこで、アスピリン喘息合併副鼻腔炎 (AIAsinusitis) に対する手術療法後の上下気道病変への臨床的な治療効果を非アスピリン喘息合併副鼻腔炎 (ATAsinusitis) のものと対比し、治療法の確立をめざすことを目的とした。同時に、術後の予後不良例に対し、ステロイド薬の抵抗因子を手術時に採取した副鼻腔粘膜を組織学的に検索した。

B. 研究方法

AIAsinusitis, ATAsinusitis と喘息合併なし副鼻腔炎 (sinusitis) の 3 群に分類し、内視鏡手術 (Endoscopic sinus surgery: ESS) 後治療として、約 1 ヶ月間ステロイド薬をセレスタミン® 2T/日から漸減して投与する。その後、生理食塩水と鼻洗浄を 2 回/日と鼻洗浄後の点

鼻ステロイド (リンデロン®, リノコート®) と抗ロイコトリエン拮抗薬を用い、術後 6 ヶ月で臨床的評価した。

上気道の評価には術前後の内視鏡下鼻内所見、CT 画像、自覚症状 (鼻閉、鼻漏、嗅覚障害) で確認する。これらの評価は Lund & Mackey の分類 5) を参考にする。すなわち、内視鏡所見は中鼻道にポリープなし (N0)、単発性ポリープあり (N1)、中鼻道・嗅裂に多発性ポリープあり (N2)、鼻腔充滿ポリープ (N3) で表し、CT 画像所見は片側の上顎洞、篩骨洞、前頭洞、蝶形骨洞の各副鼻腔陰影を 0-3 点の 4 段階として、片側副鼻腔陰影の合計点で重症度を評価する。自覚症状は、鼻閉、鼻漏、嗅覚障害それぞれを 0-3 点の 4 段階のスコア化して評価した。下気道では Peakflow 値、気道過敏性と呼気中 NO 濃度を計測する。手術時に採取した鼻ポリープ中の好酸球、肥満細胞数、杯細胞数と手術後の経過を比較する。鼻ポリープの採取および研究にあたっては、獨協医大倫理委員会の許可 (No.1917) のもとに患者の承諾を得た。3 群の中での手術不良例と良好例との間で組織中での Amphiregulin 発現および杯細胞数や mucin 遺伝子 (MUC2, MUC5A) を比較し、ステロイド抵抗因子の程度を比較する。

C. 研究結果

AIAsinusitis 45 例 (22-56 歳、平均 29.6 歳)、ATAsinusitis 69 例 (28-60 歳、平均 36.3 歳)、sinusitis 68 例 (25-67 歳、平均 34.2 歳) に対して ESS を試行した。

術前の内視鏡所見は、N0 0 例、N1 28 例

(AIAsinusitis: 1, TAsinusitis: 5, sinusitis: 22)、N2 93 例 (AIAsinusitis: 21, ATAsinusitis: 33, sinusitis: 39)、N3 61 例 (AIAsinusitis: 23, ATAsinusitis: 31, sinusitis: 7) を示した。CT 画像では AIAsinusitis 6-12 (平均 7.9)、ATAsinusitis 5.8-12 (平均 7.5)、sinusitis 5.4-11.3 (平均 7.3) であった。AIAsinusitis では鼻閉 3.8、ATAsinusitis 鼻漏 4.6、嗅覚障害

4.9、ATAsinusitisでは鼻閉4.9、ATAsinusitis鼻漏4.3、嗅覚障害4.5、sinusitisでは鼻閉3.6、ATAsinusitis鼻漏4.3、嗅覚障害3.9であった。内視鏡所見、CTでは3群とも高度副鼻腔炎を呈していた。自覚症状では鼻閉、鼻漏は3群とも高度であったが、嗅覚障害ではATAsinusitisとATAsinusitisでは高度だが、sinusitisでは中等度領域に属していた。

術後6ヶ月で、内視鏡鏡骨洞所見で、術前に比べ3群ともに鼻内所見の著明な改善が認められた。しかしながら、AIAsinusitisでは3群のなかで不良例を示す割合が高かった(図1)。術後のCT画像も同様に術前に比べ3群ともに有意な改善が認められたが、AIAsinusitis群で最も悪化が認められた。また鼻閉、鼻漏の改善も3群ではすべて著明に改善が認められた。しかしながら、術後6ヶ月で、peakflow値は術後、優位に改善効果が認められた。下気道過敏性と呼気NO濃度は、術前、AIAsinusitisとATAsinusitis群でsinusitis群に比べ優位に高いことが認められ、術後には減少する傾向が認められた。

手術で採取した鼻ポリープ中の好酸球数はAIAsinusitis>ATAsinusitis>>sinusitisの順に多かった(図2)。一方、肥満細胞は、正常に比べ増加していた。鼻ポリープでのAmphiregulin発現は認められたが、術後経過との比較は行っていない。

D. 考察

今回の症例から従来の報告のごとくAIAsinusitisは、多発性ポリープを伴い、汎副鼻腔炎を伴い、高度に自覚症状を呈していた。術後6ヶ月の時点で、自覚症状、鼻内所見、CT画像ともに有意な改善効果が得られ、今回の内視鏡手術とその後の局所治療の組み合わせによる治療法の有効性が示唆された。さらにPeak Flow値、気道過敏性およびNO値はすべて改善しており、上気道を改善効果は下気道の安定化に重要であることが認識された。Higashiらは、内視鏡手術後の尿中LE4の有意な減少を報告しており、ロイコトリエンの産生部位として鼻副鼻腔の存在を強調している。鼻ポリープ中の好酸球数は3群の中で最も多く、肥満細胞数の増加も認められた。ロイコトリエンの産生細胞として主に肥満細胞や好酸球であるが、AIAsinusitisでは多くの好酸球と肥満細胞の増加があり、多くのロイコトリエンを産生していると考えられた。下気道においては、吸入ステロイド薬と抗LT薬がスタンダードであり、上気道でも点鼻ステロイド薬と抗LT薬での改善効果が期待されるが、単剤での実際の臨床においての臨床効果が少ない(6)。したがって、内視鏡手術で徹底的に病変粘膜を

除去した後に点鼻ステロイド薬と抗LT薬を使用すべきであると考えられた。

しかしながら、今回の検討では、少なからず予後不良例が存在する。保存的治療に抵抗する重傷喘息において肥満細胞に存在するAmphiregulinが注目されている。またAmphiregulinの増加は、杯細胞の増加を促し、粘稠性分泌物を増加させていると報告されている(7)。そこで、今回の治療効果不良例にAmphiregulinの局在を検討した。免疫組織学的に検討すると副鼻腔粘膜の中で肥満細胞にAmphiregulinが局在した。現在、Amphiregulinの数と杯細胞数との比較および術後経過と比較しているが、明らかな関連は認めず、今後症例数を増やして検討を加える予定である。

E. 結論

AIAsinusitisでは、ESS後にて副鼻腔を大きく開放し、ステロイド薬の局所治療にて下気道に良好な効果が期待できると考えられた。術後上気道での予後不良の割合はAIAsinusitisで最も高く、その原因としてステロイド薬抵抗因子との関連が予想されたが、断定には行っていない。

※参考文献

- 1) 榎原博樹: アスピリン喘息、喘息の特殊病態、日本内科学会 85(2):67-73, 1996.
- 2) 春名眞一、鴻信義、柳清、森山寛: 好酸球性副鼻腔炎(Eosinophilic sinusitis)、耳展 44(3):195-201, 2001.
- 3) Higashi H, et al. Clinical features of aryl leukotriene E4 excretion: Involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol 2004;113:1277-83.
- 4) Ikeda K, et al.: Endoscopic sinus surgery improves pulmonary function in patients with asthma associated with chronic sinusitis. Ann Otol Rhinol Laryngol 108, 1999.
- 5) Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. Rhinology 1993;31:183-4.
- 6) 春名眞一: 好酸球性副鼻腔炎の概念. JONHS 23:839-834, 2007.
- 7) Okumura S, et al. FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. J Allergy Clin Immunol 115:272-279, 2005.

F. 健康危険情報

なし

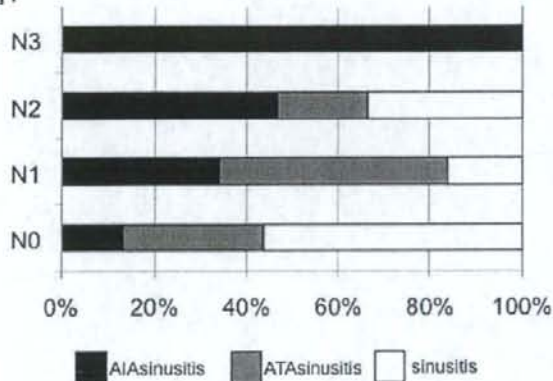
G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

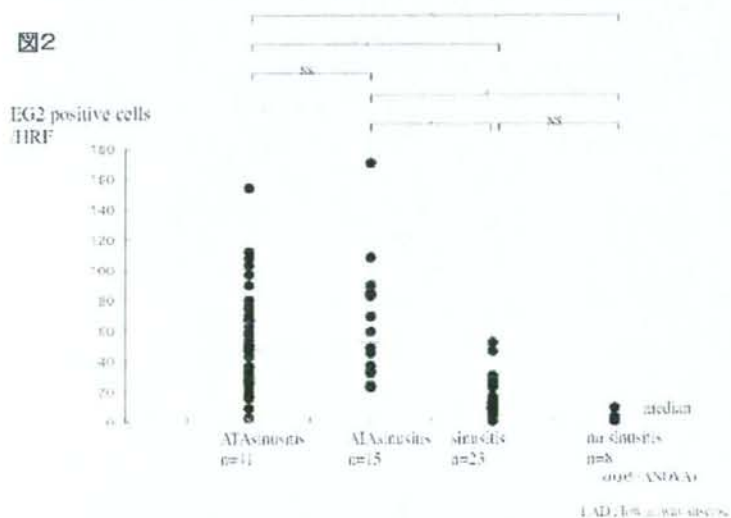
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1



術後内視鏡所見

図2



各副鼻腔炎の好酸球数

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

アスピリン喘息に合併する副鼻腔炎に関する研究

研究分担者 藤枝 重治 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授
研究協力者 山田武千代 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科講師
坂下 雅文 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科院生

研究要旨:

アスピリン喘息は女性が多く、鼻茸を伴う篩骨洞中心の慢性副鼻腔炎や嗅覚障害を認める。しかし一般的には、アスピリン喘息の診断は厳密になされておらず、気管支喘息の中にも含まれている。そこでまずアスピリン喘息の機序解明を行うために、副鼻腔炎と大きな分類での気管支喘息との疫学調査を行い、鼻茸や上気道粘膜の検討によってアスピリン喘息の本質に迫れるかどうか検討した。その結果、副鼻腔炎を認める耳鼻咽喉科側からは21.4%の気管支喘息の合併と認め、気管支喘息を認める内科側からは41.3%の慢性副鼻腔炎合併率を認めた。さらに副鼻腔レントゲンにて確認した気管支喘息の初診ならびにそれに準ずる患者では、73.2%と高率の合併を認め、気管支喘息の分類の軽いものは慢性副鼻腔炎合併率が有意に低いことが判明した。次に慢性副鼻腔炎の鼻茸から線維芽細胞を初代培養し、好酸球遊走因子である Eotaxin 量に着目し、IL-19 の影響を検討した。その結果 IL-19 の 24 時間前処置することにより Eotaxin 産生は有意に低下した。その現象は、IL-19 が SOCS-1 を介して STAT6 のリン酸化を抑制するためであった。これらのことから IL-19 が NSAIDs 不感性における鼻茸治療の標的分子の可能性が見出された。

A. 研究目的

NSAIDs 不感性であるアスピリン喘息に伴う慢性副鼻腔炎は難治性であり、とりわけ鼻茸は外科的に手術をしても何度も再発をきたす。組織学的には、好酸球浸潤が著明であり、臨床的には嗅覚障害と鼻閉が強く、回復はかなり困難を伴う特徴を有する。本研究では、臨床研究として気管支喘息患者に伴う慢性副鼻腔炎と鼻茸の頻度を内科側から、逆に慢性副鼻腔炎に伴う気管支喘息とアスピリン喘息の頻度を耳鼻咽喉科側から調べることにした。基礎研究としては、免疫抑制性サイトカインである IL-10 とそのファミリーである IL-19 に注目して、副鼻腔炎患者から採取した鼻茸の初代培養でえられた線維芽細胞からの好酸球遊走因子である Eotaxin の産生を指標にして IL-19 の影響を検討した。

B. 研究方法

臨床研究: ①福井大学、慈恵医科大学、広島大学、山梨大学、大阪医科大学の耳鼻咽喉科において、慢性副鼻腔炎と診断された患者に対して気管支喘息、アスピリン喘息の合併に関するアンケート調査(気管支喘息の発症時期、重症度、アスピリン過敏症の有無、気道・肺疾患の合併、好酸球数、治療)を行った。同時に同じ5大学の呼吸器内科において気管支喘息と診断された患者に対して慢性副鼻腔炎と鼻茸合併に関するアンケート調査(慢性副鼻腔炎の発症時期、耳鼻咽喉科通院の有無、手術歴、手術と喘息症状の関連)を行った。②金沢大学、近畿大学、

大阪市立大学呼吸器内科で気管支喘息と診断され初診患者、もしくは抗生物質を6ヵ月以上内服していない患者に対して副鼻腔レントゲンを撮影し、客観的に慢性副鼻腔炎の診断がつけられる頻度を求めた。

基礎的研究: 慢性副鼻腔炎患者の手術時に摘出された鼻茸から樹立した線維芽細胞に対し、IL-4 刺激で誘導される Eotaxin 産生系に IL-19 を添加して、影響を調べた。Eotaxin 産生は ELISA で検討した。Eotaxin 産生に関わるシグナル伝達分子発現への IL-19 の影響を real time PCR にて調べた。またシグナル伝達分子発現を siRNA を用いてノックアウトし、IL-19 の影響がどのように変化するか検討した。

C. 研究結果

臨床研究: 慢性副鼻腔炎患者 546 名(平均年齢 51.5 歳、罹病率 8.8 年、平均好酸球 5.7%、鼻茸合併率 57.6%、嗅覚障害 42.9%、手術歴 47.0%) において気管支喘息 21.4%、アスピリン喘息 5.8%、閉塞性肺疾患 4.1% の合併率であった。鼻茸ありの患者における気管支喘息合併 30% は鼻茸なしの 11% の合併に比べて有意に多かった。

気管支喘息患者 330 名(平均年齢 58.3 歳、罹病率 12.3 年、平均好酸球 7.0%、アスピリン過敏症 35 名、気道・肺疾患合併 10 名、軽症間欠型 30 名、軽症持続型 81 名、中等症持続型 147 名、重症持続型 70 名) においては、41.3% の慢性副鼻腔炎合併率であった。

発症に関し喘息が先か副鼻腔炎が先か検討すると耳鼻咽喉科側の調査では、喘息が先44%、鼻が先28%、同時27%であったが、内科側の調査では、喘息が先51%、鼻が先37%、同時12%となり、両者とも喘息発症が副鼻腔炎の発症よりも早い患者が多かった。気管支喘息症状別の副鼻腔炎頻度を調べると軽症間欠型48.3%、軽症持続型37.0%、中等症持続型44.2%、重症持続型35.7%と違いは認めなかった。

手術歴は耳鼻咽喉科調査対象患者中67名、内科対象患者中42名であったが、手術によって気管支喘息が改善した率は、耳鼻咽喉科調査対象患者では73%であり、内科調査対象患者では30%と著しい差が認められた。改善した者は耳鼻咽喉科に通院を続け、手術で改善しなかったものはやはり内科に戻ると考えると、全患者で約50%が副鼻腔の手術で気管支喘息が改善すると言えよう。

無治療ないしは抗生物質を長期に内服していない気管支喘息患者82例では、副鼻腔レントゲンにおいて副鼻腔炎の所見を認めたのは、73.2%であった。90%は両側に陰影を認めた。気管支喘息症状別の副鼻腔炎頻度を調べると軽症間欠型22.2%、軽症持続型76.9%、中等症持続型70.8%、重症持続型81.8%となり5大学でのアンケート調査とは異なっていた。

基礎研究：鼻茸由来の線維芽細胞においてIL-19受容体の存在を証明した。線維芽細胞にIL-4と同時にIL-19を添加してもEotaxin量は変化しなかった。IL-19を24時間前処理してIL-4刺激を行うと有意にEotaxin量が低下した。一方でIFN γ は線維芽細胞からRANTESを産生させるが、IL-19を同時もしくは24時間前処理してもRANTES量には変化なかった。

そこでIL-19の作用機序を検討することとした。IL-19の24時間前処理は、IL-4刺激で誘導されるSTAT6のリン酸化を抑制した。IL-19は、suppressors of cytokine signaling-1(SOCS-1)を誘導していることが判明し、IL-4刺激で誘導されるSTAT6のリン酸化をSOCS-1誘導にて抑制していた。

SOCS-1をRNAiにてノックダウンさせると、IL-19の24時間前処理によるEotaxin量の低下は解除された。IL-19の処理は、線維芽細胞のアポトーシスや増殖には何ら影響を及ぼさなかった。IL-10やIL-19と受容体を一部共有するIL-20では、IL-19のような作用は認められなかった。IL-19の産生は線維芽細胞でも認められたが、IL-4刺激でもその発現に差は、認めなかった。

D. 考察

アトピー型気管支喘息とアレルギー性鼻炎には深い関連があるとしてOne airway one diseaseの概念が出来上がったが、成人型気管支喘息と慢性副鼻腔炎においても深い関連があり、疾患とは異なった上気道と下気道の強いつながりがあることがわかった。

これらのことはNSAIDs不耐性において下気道粘膜を用いた研究は大変難しいが、上気道病変の鼻茸を用いることでサンプル収集が容易になり、その検体を使用することでNSAIDs不耐性の機序解明ができることにつながる。今回はこのことを証明できたことが大きい。

好酸球浸潤は、現在副鼻腔炎治療の上で大きな問題になっている。NSAIDs不耐性患者の副鼻腔粘膜も好酸球浸潤が著しい。すなわち好酸球浸潤を抑制できることがNSAIDs不耐性の治療に結びつく可能性がある。これまで好酸球浸潤を抑制する可能性があるのは、IFN γ しか報告がなかった。しかし今回の実験でIL-19は、SOCS-1を介してEotaxin産生を低下させることを示せた。これまでIL-19は、STAT3を活性化させ、SOCS-5を誘導すると血管内皮細胞では報告され、気道上皮でもIL-19の産生が証明されたが、細胞によるIL-19の効果に違いがあることが証明された。

E. 結論

IL-19がNSAIDs不耐性における鼻茸治療の標的分子の可能性が見出された。IL-19を誘導する方法や鼻粘膜における線維芽細胞以外のIL-19産生細胞を今後検討していく必要性がある。IL-19が関与したネットワークが上気道粘膜にも存在すると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okubo K, Gotoh M, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Morikawa H, Masuyama K, Okamoto Y, Kobayashi M. A randomized double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergol Int.* 2008 Sep;57(3):265-275.

2) Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E. Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population: a family and

case-control study. *J Hum Genet.* 2008;53(7):615-621.

3) Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura Y, Yasuda K, Nakanishi K and Tamari M. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy*, 2008;38:1875-1881.

4) Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(3):769-70.

5) 藤枝重治 花粉症の診断 日医雑誌 136(10):1971-1974, 2008.

6) 藤枝重治 職業性鼻炎 耳展 51(6):8-23, 2008

7) 藤枝重治, 秋山一男, 下条直樹 上気道・下気道のアレルギー その関連と年齢の影響 呼吸 27(8) 764-775, 2008

8) 山田 武千代: 上皮からの B_LyS 産生とアレルギー: 臨床免疫・アレルギー科, 49(4), 447-451, 2008.

2. 学会発表

1) Shigeharu Fujieda and Hideyuki Yamamoto. Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase Enhanced Human IgE Production. AAAAI 2008 annual meeting. 2008.3. Philadelphia

2) 藤枝重治 One airway one disease: 気管支喘息とアレルギー性鼻炎の関係 第25回日本小児難治性喘息・アレルギー疾患学会 2008.5. 天理

3) 藤枝重治 スギ花粉症における網羅的遺伝子・蛋白解析 第20回日本アレルギー学会 2008.6. 東京

4) 藤枝重治 アレルギー性鼻炎を考える: 感染はどのような影響を及ぼしているのか 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.11. 東京

5) 藤枝重治 アレルギー性鼻炎を考える: 遺伝子・蛋白解析から治療まで 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.11. 東京

6) 山田武千代, 藤枝重治: 気管支喘息患者における慢性副鼻腔炎の実態: KiHAC 2008, 2008, 4, 大阪

7) 山田武千代, 藤枝重治: One airway one disease としての上気道病態の重要なメディエーターは何か?: 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2008, 6.

8) 山田武千代, 窪誠太, 藤枝重治: 「鼻副鼻腔粘膜の炎症病態の基礎的解明と将来的展望」 B細胞とアレルギー・B細胞からみた免疫寛容と花粉症治療へのアプローチ: 第44回鼻科学会基礎問題研究会, 2008, 9, 名古屋

9) 山田武千代, 意元義政, 藤枝重治: Post nasal drip syndrome (後鼻漏症候群)は慢性咳嗽の診断治療に重要な疾患か? “後鼻漏症候群以外の疾患でも後鼻漏が重要”: 第10回日本咳嗽研究会, 2008, 11, 金沢

10) 山田武千代, 山本英之, 窪誠太, 小嶋章弘, 藤枝重治, 春名眞一, 増山敬祐, 竹中洋 平川勝洋, 池田勝久, 森山寛: 慢性副鼻腔炎と気管支喘息に対する疫学調査: 第11回好酸球と鼻茸の成因に関する研究会, 2008, 11.

11) 大澤陽子, 大嶋勇成, 藤枝重治: 2歳未満児のアレルギー性鼻炎の早期診断—いつ発症するのか?— 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.11. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (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

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

アスピリン喘息と NSAID s 蕁麻疹/血管浮腫における遺伝的背景 (遺伝子多型の検索)

研究分担者 玉利真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー
研究協力者 広田朝光 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・リサーチアソシエイト
人見祐基 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・特別研究員

研究要旨:

アスピリン喘息と NSAID s 蕁麻疹/血管浮腫の病態に関連する遺伝子多型の同定を目的とし、主に Danger signal 伝達に関連する遺伝子群、およびアラキドン酸代謝経路酵素および受容体遺伝子群について検討し、MDA5 遺伝子多型とアスピリン喘息との関連を見いだした。

A. 研究目的

アスピリン喘息と NSAIDs 蕁麻疹/血管浮腫に関与する遺伝素因について遺伝子多型を用いた症例対照相関解析を用いて明らかにする。特に自然免疫応答に重要な分子をはじめとする Danger signals に関連する遺伝子群を対象とし、それらの遺伝子多型について症例対照相関解析を行い、さらに相関の認められた遺伝子については機能解析を行い、遺伝子多型が病態に及ぼす影響について検討し、分子レベルでの病態解明を行う。アスピリン喘息と NSAID s 蕁麻疹/血管浮腫の機序を科学的に解明し、新しい治療法の開発や予防法の確立へ向けてエビデンスを提示していくことを目的とする。

B. 研究方法

本研究では自然免疫応答、感染応答など Danger signal 伝達に関連する遺伝子群、およびアラキドン酸代謝経路酵素および受容体遺伝子群を対象とする。

遺伝子多型情報は HapMap database (<http://www.hapmap.org>) を中心に入手し、Haploview 4.1 を用いて連鎖不平衡マップを作成し、Tag SNPs の選定を行う。TaqMan 法、及び Invader 法を用いてそれらのタイピングを行い、相関解析を行う。用いるサンプルはアスピリン喘息 78 例 (当研究班の参加機関において、現在もサンプル収集中)、およびアスピリン喘息のない成人喘息 400 例である。さらに独立に収集された (Biobank Japan) アスピリン喘息 103 例、アスピリン喘息のない気管支喘息 400 例で得られた相関の検証を行なう。

(倫理面への配慮)

本研究のヒトのゲノム DNA の解析は、文部科学省、厚生労働省、経済産業省の 3 省合同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて適正に実施されている。

C. 研究結果

本年度は MDA5 (melanoma differentiation associated gene 5) 遺伝子に着目し、研究を行った。MDA5 遺伝子上に 35 個の遺伝子多型を認めた。このゲノム領域は非常に連鎖不平衡が強く、3 つの Tag SNPs をタイピングした (アレル頻度 > 10%, $r^2 > 0.82$, mean $r^2 = 0.96$)。その結果、3 SNPs ともに成人喘息発症との相関は認めなかったが、アミノ酸の変化を伴う遺伝子多型 Ala946Thr とアスピリン喘息との相関を認めた ($P = 0.00064$, OR 2.29, 95% CI 1.41-3.72)。アスピリン喘息集団では Thr アレル頻度が 30%であったが、アスピリン喘息のない喘息集団は 20%であった。

D. 考察

MDA5 はウイルスに特異的な構造である二本鎖 RNA の細胞内センサーの 1 つであり、それらを認識することにより NFkB の活性化や IRF3/7 を介し Type1 インターフェロンの分泌に働く。今後、その多型の機能を検討し、アスピリン喘息のメカニズムの一端を解明することが重要と考えられた。ライノウイルス感染は気管支喘息の発作に重要な役割を果たす事が報告されているが、MDA5 はそのライノウイルスや肺炎起因ウイルスであるコクサッキーウイルス A 群 4 型 9 型、B 群 4 型 5 型など、ピコルナウイルス科に属するウイルスを認識する。アスピリン喘息症例におけるこれらの抗体価についても今後検討を行なう必要がある。

E. 結論

二本鎖 RNA の細胞内センサーである MDA5 遺伝子多型とアスピリン喘息発症リスクとの相関を認めた。今後、相関を認めた遺伝子多型の MDA5 の転写調節機構への影響について検討する必要がある。リパビリンは特に RNA ウイルスに対して強い抗ウイルス作用を

もち、Th2 に偏向した免疫系を Th1 の方へシフトさせる効果が報告され、海外では呼吸器ウイルス感染の治療にも用いられている。今後、RNA ウイルスの慢性感染が病態に関連するというエビデンスが蓄積されれば既存の薬剤が難治性アスピリン喘息の治療に応用出来る可能性が考えられる。引き続き、来年度以降もアスピリン喘息と Danger signal 伝達に関連する遺伝子群の多型解析を、独立に収集した 2 つの集団において検証していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate. *Eur J Pharmacol.* 2008; 578: 87-96.

2) Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 769-770.

3) Hirose I, Tanaka H, Takahashi G, Wakahara K, Tamari M, Sakamoto T, Kojima S, Inagaki N, Nagai H. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;147:6-16.

4) Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E. Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population: a family and case-control study. *J Hum Genet.* 2008;53:615-21.

5) Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Shimojo N, Hasegawa K, Hirota T, Doi S,

Kameda M, Miyatake A, Kohno Y, Okamoto Y, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Association study of the C3 gene with adult and childhood asthma. *J Hum Genet.* 2008;53:728-38.

6) Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Ohkubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura Y, Yasuda K, Nakanishi K, Tamari M. Association of serum IL-33 level and the IL-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1875-1881.

7) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. Functional analysis of the polymorphisms of the TSLP gene in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40:368-374.

8) Shimokawa N, Nishiyama C, Hirota T, Tamari M, Hara M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Functional analysis of a polymorphism in the promoter region of the IL-12/23p40 gene. *Clin Exp Allergy* 2009;39:228-235.

それ以外 (レビュー等) の発表

1) Matsumoto K, Tamari M, Saito H. Involvement of eosinophils in the onset of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 26-27.

2) Tamari M, Harada M, Hirota T, Nakamura Y. Host defense molecular mechanisms against Chlamydia pneumoniae and genetic studies of immune-response-related genes in asthma. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 2009;3:17-25.

3) 玉利真由美, 広田朝光, 原田通成: 小児気管支喘息の遺伝子多型. *喘息*, 21:35-39, 2008.

4) 玉利真由美 ゲノム医学の進歩とアレルギー疾患の解明 *アレルギー免疫*, 15:881-883, 2008.

2. 学会発表

1) 玉利真由美, 広田朝光, 原田通成: 中国地区上気道アレルギー研究会 特別講演 アレルギー疾患と感染症 2008年2月 リーガロイヤルホテル広島

2)玉利真由美、広田朝光、原田通成：第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 スポンサーレクチャー 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 2008年2月 大阪、ホテル阪神

3)玉利真由美、広田朝光、原田通成：日本アレルギー協会 アレルギー研修会2008トピックス アレルギー関連遺伝子研究と創薬 2008年3月 市ヶ谷私学会館

4)第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 2008年6月

(1) シンポジウム3 ウイルス感染とアレルギー TSLP 遺伝子多型とウイルス感染による気管支喘息発症への関与機構 原田通成、広田朝光、玉利真由美

(2) シンポジウム9 アレルギー疾患の遺伝子と分子生物学 遺伝子多型を用いた病態解析 (気管支喘息を中心に) 玉利真由美、原田通成、広田朝光

5)玉利真由美 原田通成 広田朝光 第8回喘息 Early Intervention 研究会 遺伝子多型・最近の話題 2008年6月東京ドームホテル

6)玉利真由美 原田通成 広田朝光 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会/第19回日本生体防御学会学術総会/第45回補体シンポジウム シンポジウム6 自然免疫と臨床疾患 II 成人気管支喘息重症度とIL-18遺伝子多型の相関解析 2008年7月 北海道大学学術交流会館

7)玉利真由美 原田通成 広田朝光 日本薬学会東海支部 特別講演 アレルギー体質の研究 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 適切な薬剤選択をめざして 2008年7月 岐阜薬科大学 大学院講義室

8)第53回日本人類遺伝学会 2008年9月パシフィコ横浜

一般演題 24. 多型 (多因子病)

(1) IL-18 遺伝子多型の成人気管支喘息における相関解析

玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基

9)玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基 第9回愛宕小児アレルギー研究会 2008年10月 東京慈恵会医科大学 感染症と気管支喘息、遺伝素因との関連

10)第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月 東京国際フォーラム

(1) 教育講演 8 気管支喘息の病態と自然免

疫関連遺伝子 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基

(2) 特別シンポジウム アレルギー疾患に関連する遺伝子の解明 SS5-4 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基

11)ATS 2008 The American Thoracic Society's International Conference, Poster Discussion Session, [C101] GENETIC ASSOCIATION AND NOVEL POLYMORPHISMS IN CHILDHOOD AND ADULT OBSTRUCTIVE LUNG DISEASES. 2008年3月 Metro Toronto Convention Centre

(1) Functional SNP in Promoter of TSLP Gene Is Associated with Susceptibility to Childhood Atopic Asthma, Harada M, Hirota T, Jodo AI, Ziegler SF, Tamari M.

(2) Polymorphisms in the IL-18 Gene Are Associated with Severity of Adult Asthma, Tamari M, Harada M, Hirota T, Miyatake A, Fujita K, Nakanishi K, Yoshimoto T, Nakamura Y.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (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

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Taniguchi, N. Higashi, E. Ono, H. Mita, K. Akiyama	Hyperleukotriemia in Patients with Allergic and Inflammatory Disease	Allergology International.	57	313-320	2008
E. Ono*, #, M. Taniguchi*, H. Mita*, N. Higashi*, Y. Fukutomi*, H. Tanimoto*, K. Sekiya*, C. Oshikata*, T. Tsuburai*, N. Tsurikisawa*, M. Otomo*, Y. Maeda*, O. Matsuno#, E. Miyazaki#, T. Kumamoto# and K. Akiyama* (*Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital, Sagamihara #Division of Third Dept of Internal Medicine, Oita University Faculty of Medicine, Yuhu, Japan.)	Increased urinary leukotriene E4 concentration in patients with eosinophilic pneumonia	Eur Respir J	32	437-442	2008
E. Ono*, M. Taniguchi, H. Mita, K. Akiyama	Salicylamide-induced anaphylaxis: increased urinary leukotriene E4 and prostaglandin D2 metabolite	ALLERGY Net		480-482.	2008.4.
Emiko Ono, Haruhisa Mita, Masami Taniguchi, Noritaka Higashi, Takahiro Tsuburai, Maki Hasegawa, Eishi Miyazaki1), Toshihide Kumamoto1), Kazuo Akiyama (1) Division of the Third Department of Internal Medicine, Oita University School of Medicine, Yuhu Oita.)	Increase in inflammatory mediator concentrations in exhaled breath condensate after allergen inhalation.	J Allergy Clin Immunol	122	768-773	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
E. Ono, H. Mita, M. Taniguchi, N. Higashi, T. Tsuburai, E. Miyazaki D, T. Kumamoto D, Kazuo Akiyama (1) Third Department of Internal Medicine, Oita University Faculty of Medicine, Yuhu, Oita, Japan.)	Comparison of cysteinyl leukotriene concentrations between exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage fluid.	Clinical and Experimental Allergy	38	1866-1874	2008
猪又直子, 池澤善郎	皮膚科領域における食物アレルギー	臨床免疫・アレルギー科	49巻5号	549-556	2008
榎原博樹, 齊藤雄二	アスピリン喘息, 発症機序を中心とした最近の話題.	呼吸と循環	56巻	165-174	2008
榎原博樹, 小橋保夫	アスピリン喘息.	成人病と生活習慣病	38巻	327-334	2008
Nakajima T, Jo T, Meguro K, Conuma H, Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T.	Effect of dexamethasone on voltage-gated Na ⁺ channel in cultured human bronchial smooth muscle cells.	Life Sci	82	1210-1215	2008
Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N.	Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema.	Biol Pharm Bull	31	1434-1438	2008
Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H.	Multiple renal cysts with concentration defects and pulmonary emphysema in mice lacking TAZ.	Am J Physiol	294	F542-53	2008
Kage H, Kohyama T, Kitagawa H, Takai D, Kanda Y, Ohishi N, Nagase T.	Non-Infectious Bronchiolitis as an Early Pulmonary Complication of Hematopoietic Stem Cell Transplantation.	Internal Medicine	47	61-64	2008
Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Kato J, Nagase T.	Clarithromycin inhibits fibroblast migration.	Respir Med		in press.	2008
Kihara Y, Yanagida K, Masago K, Kita Y, Hishikawa D, Shindou H, Ishii S, Shimizu T.	Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis.	J Immunol	181	5008-5014	2008