

dominant, and recessive models. After correcting for the number of variants investigated (Bonferroni correction), we found a significant association between the 3'UTR polymorphism at 94862 and childhood atopic asthma with an allelic model (OR, 0.67; 95%CI, 0.53–0.84, $P=0.00041$, corrected $P=0.0012$) (Table 4). The promoter polymorphism, $-109 \rightarrow$ ACAA ins, was also associated with child atopic asthmatics with a genotype model ($\chi^2=11.2$, $P=0.0037$, corrected $P=0.011$) (Table 4). There was no significant association between $-1615 \rightarrow$ CTTC ins and childhood atopic asthma (Table 4). Although we examined the genetic influence of haplotypes, we could not find any association between haplotypes and childhood atopic asthma.

We next determined associations between the three SNPs and asthmatic patients who had a high eosinophil count, high serum IgE level, and severe disease (case-only

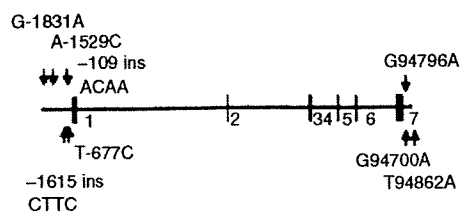


Fig. 1. Graphical overview of the polymorphisms identified in relation to the exon/intron structure of the human transforming growth factor (TGF)- β_2 gene. Seven exons are shown in the figure by black boxes with their numbers, and the positions for the polymorphisms are relative to the translation start site (+1). The underlined polymorphisms were genotyped in the whole samples.

association study). There was a positive association in the genotype frequency of 94862T of the TGF - β_2 gene and the asthmatic patients who had a high eosinophil count in a recessive model (TT+TA vs. AA, $P=0.044$) by the Mann-Whitney U -test. We could not find any association between the three SNPs and asthmatic patients who had a high serum IgE level or disease severity in this study.

Transforming growth factor- β_2 mRNA is significantly expressed in the human lung tissue

Because we found associations between the TGF - β_2 gene SNPs with childhood asthma, we compared the expression patterns of three closely related mammalian isoforms of TGF - β (TGF - β_1 , $-\beta_2$, and $-\beta_3$) expression in normal human tissues including the lung using quantitative real-time PCR. We used RNA from the bone marrow, brain, kidney, liver, lung, spleen, thymus, trachea, and small intestine. The results showed that mRNAs of all the three isoforms were expressed in the lung tissue, and TGF - β_2 mRNA expression of the lung was the highest among the tissues (Fig. 2).

Transforming growth factor- β_2 is expressed in human lung epithelium

Chu et al. [16] recently reported that TGF - β_2 protein was expressed in both the normal and asthmatic bronchial epithelium and that the epithelial TGF - β_2 expression also increased in asthmatics in comparison with normal subjects. We also confirmed their findings. Both normal and

Table 3. Pairwise linkage disequilibrium for all possible two-way comparisons among four polymorphisms in TGF - β_2 with 24 Japanese subjects

| r^2 | D' | SNP 1* | SNP 2 | SNP 3* | SNP 4* |
|-------|-------|-----------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------------|
| | | -1615 $-/CTTC$ ins 5'g | -677 T/C 5'g | -109 $-/ACAA$ ins Intron2 | 94862 T/A Intron2 |
| | SNP 1 | | 1.00 | 1.00 | 0.04 |
| | SNP 2 | 0.14 | | 1.00 | 0.30 |
| | SNP 3 | 0.14 | 1.00 | | 0.30 |
| | SNP 4 | 0.00 | 0.07 | 0.07 | |

*Polymorphisms were genotyped in this case-control study.
SNP, single-nucleotide polymorphism.

Table 4. Association between polymorphisms of TGF - β_2 and childhood atopic asthma

| Location M/m | | Genotype frequency (%) | | | Allele frequency (%) | | P-value | | | |
|-----------------|---------|------------------------|------------|-----------|----------------------|------------|----------|----------|-----------|---------|
| | | MM | Mm | mm | M | m | Genotype | Dominant | Recessive | Allelic |
| -1615 | Case | 156 (53.8) | 114 (39.3) | 20 (6.9) | 426 (73.4) | 154 (26.6) | | | | |
| $-/CTTC$ ins | Control | 273 (50.4) | 224 (41.3) | 45 (8.3) | 770 (71.0) | 314 (29.0) | 0.578 | 0.346 | 0.471 | 0.296 |
| -109 | Case | 108 (36.9) | 155 (52.9) | 30 (10.2) | 371 (56.1) | 215 (43.9) | | | | |
| $-/ACAA$ ins | Control | 240 (43.6) | 227 (41.3) | 83 (15.1) | 707 (56.1) | 393 (43.9) | 0.0037 | 0.057 | 0.049 | 0.695 |
| 94862 | Case | 168 (57.1) | 109 (37.1) | 17 (5.8) | 445 (75.7) | 143 (24.3) | | | | |
| T/A | Control | 247 (45.1) | 245 (44.7) | 56 (10.2) | 739 (67.4) | 357 (32.6) | 0.0018 | 0.00084 | 0.029 | 0.00041 |

M, major allele; m, minor allele; SNP, single-nucleotide polymorphism.

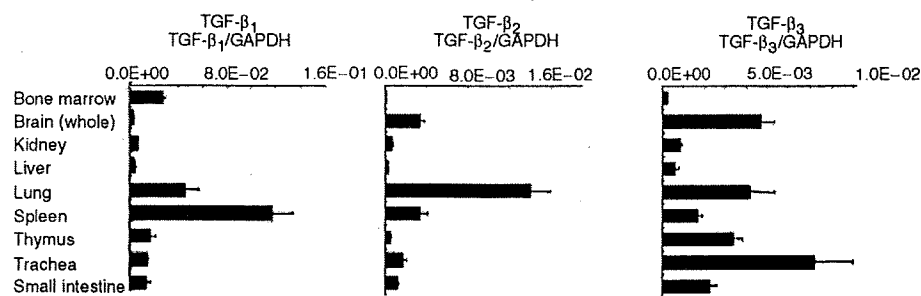


Fig. 2. Expression patterns of transforming growth factor (TGF)- β_1 , - β_2 , and - β_3 mRNA in various human tissues. The human tissue expression of mRNAs of the three TGF - β isoforms was quantitatively evaluated using quantitative real-time PCR. Each experiment was conducted in duplicate for each sample, and the values represent the mean \pm SD.

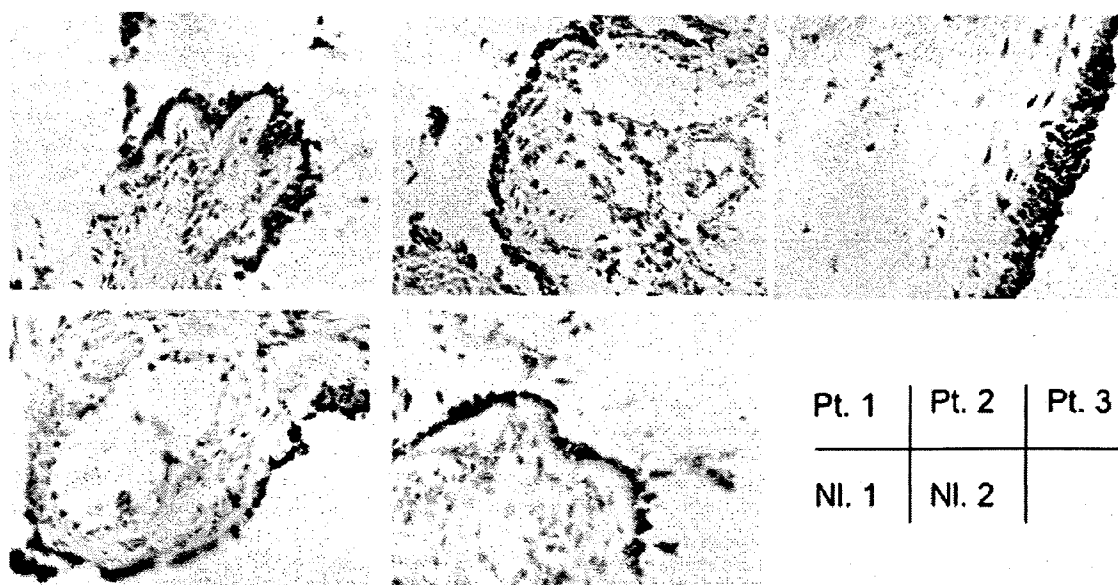


Fig. 3. Transforming growth factor (TGF)- β_2 protein is expressed in human lung epithelium. The human lung biopsy specimens obtained from adult asthmatics and normal adult subjects were immunohistochemically stained with an anti- TGF - β_2 antibody. Representative photomicrographs of TGF - β_2 immunostaining using endobronchial biopsy specimens from three moderate asthmatic patients (Pt. 1–3) and two normal subjects (NI. 1–2) are shown. Brown indicates positive staining.

asthmatic bronchial epithelium exhibited a uniform pattern of positive immunoreactivity for the TGF - β_2 in lung biopsy specimens obtained from asthmatics and normal subjects (Fig. 3).

Human bronchial epithelial cell line BEAS2B constitutively expresses transforming growth factor- β_2 , which is enhanced by transforming growth factor- β_1

We next examined whether different stimuli regulated the epithelial TGF - β_2 expression. A PCR analysis showed that human bronchial epithelial cell line BEAS2B constitutively expressed TGF - β_2 mRNA and, to a much less extent, TGF - β_1 mRNA (Fig. 4a). An ELISA assay also showed that BEAS2B cells constitutively produced TGF - β_2 protein (Fig. 4c). Among the stimuli we examined (TGF - β_1 , TNF - α ,

IL -13, TNF - α plus IL -13, IL -6, and GM -CSF), TGF - β_1 significantly enhanced the expression of TGF - β_2 mRNA and protein in BEAS2B cells (Figs 4b and c).

The -109- TGF - β_2 promoter reporter construct shows higher basal luciferase activity than the -109ACAA ins construct in BEAS2B cells

We attempted to identify the functional SNPs affecting the TGF - β_2 expression level in BEAS2B cells. To investigate the functional effects of the associated variants, we examined the transient expression of the -109 \rightarrow ACAA ins and 94862T $>$ A luciferase reporter constructs. The -109- construct had about 1.4-fold higher luciferase reporter activity than the -109ACAA ins construct (Fig. 5). Variant 94862T $>$ A had no effect on the

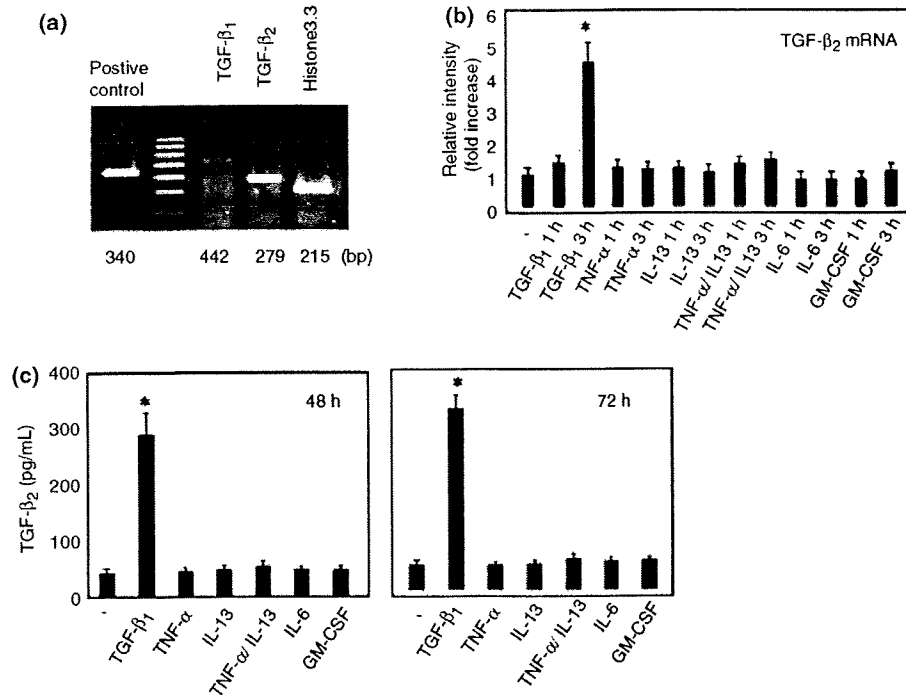


Fig. 4. The human bronchial epithelial cell line BEAS2B constitutively expresses transforming growth factor (TGF)- β_2 , which is enhanced by stimulation with TGF- β_1 . (a) RNA was extracted from BEAS2B cells and RT-PCR using specific primers for TGF- β_1 and TGF- β_2 , and Histone3.3. The expected DNA sizes (bp) for each PCR product are described below the picture. Positive control: 150 ng synthetic double-stranded DNA for TGF- β_2 detection. The PCR product from the positive control provided by the manufacturer shows the different DNA sizes. (b) BEAS2B cells were stimulated with 10 ng/mL TGF- β_1 , TNF- α , IL-13, and TNF- α plus IL-13, IL-6, and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) for 1 and 3 h. RNAs were then extracted from the BEAS2B cells and real-time PCR was performed using the specific primers and probes for TGF- β_2 and GAPDH. The ratio of each gene to that of GAPDH was calculated, and the value of 1.0 was assigned to the BEAS2B cells that were incubated without TGF- β_1 . (c) BEAS2B cells were cultured in the presence or absence of 10 ng/mL TGF- β_1 , TNF- α , IL-13, and IL13 plus TNF- α , IL-6, and GM-CSF for 48 and 72 h. The culture supernatants were then collected and the concentrations of total TGF- β_2 were estimated by ELISA. The values represent the mean \pm SD of triplicate samples per group. * $P < 0.05$. The representative results of three independent experiments are shown.

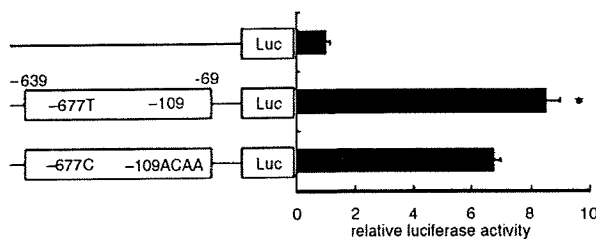


Fig. 5. Effect of $-109 \rightarrow$ ACAA ins polymorphism on the transcriptional activity of the human transforming growth factor (TGF)- β_2 promoter. The BEAS2B cells were transfected with the indicated TGF- β_2 promoter-reporter plasmid. Twenty-four hours after the transfection, the cells were harvested and the luciferase activity was measured with a luminometer. The relative activity was calculated by designating the relative luciferase activity of the empty vector (pGL3-basic) as 1. Each experiment was conducted in triplicate for each sample, and the results are expressed as the mean \pm SD. * $P < 0.05$. The representative results of three independent experiments are shown.

transcriptional activity (data not shown). These results suggested that the -109 - allele might thus increase the transcriptional activity of the TGF- β_2 gene *in vivo*.

Discussion

This study shows that the 3'UTR variant 94862T $>$ A and the promoter variant $-109 \rightarrow$ ACAA ins of the TGF- β_2 gene were associated with the risk of childhood atopic asthma. Although the functional significance of the 3'UTR variant 94862T $>$ A remains unknown, the promoter variant $-109 \rightarrow$ ACAA ins increased the TGF- β_2 promoter-reporter activity in bronchial epithelial cell line BEAS2B. Taken together with the findings that TGF- β_2 is significantly expressed in bronchial epithelium as observed in this study and also as described previously [16], these genetic, functional, and expression data suggest that TGF- β_2 may play an important role in the development of childhood atopic asthma.

In this study, we screened a minimum of 100 bases of the flanking intronic sequence and 3 kb of the 5' flanking region and identified eight biallelic polymorphisms in TGF- β_2 (Table 2 and Fig. 1). Among them, we found that two SNPs (3'UTR 94862T $>$ A and $-109 \rightarrow$ ACAA ins) were significantly associated with the risk of childhood atopic asthma. Furthermore, we showed that the promoter

variant $-109 \rightarrow$ ACAA ins increased the TGF- β_2 promoter-reporter activity in TGF- β_2 -producing bronchial epithelial cell line BEAS2B. We speculate that the promoter variant $-109 \rightarrow$ ACAA ins may therefore contribute to the development of childhood asthma by increasing the basal levels of TGF- β_2 gene transcription in the airways of susceptible individuals.

We found the most significant association of the 3'UTR polymorphism 94862A > T in TGF- β_2 with childhood atopic asthma (Table 4) although we have not been able to clarify the functional effects of 94862T > A polymorphism so far. A recent study has shown that 3'UTR polymorphism contributes to transcript stability [22]. The 94862T polymorphism might affect the stability of the TGF- β_2 gene *in vivo*. It is also possible that the association of 94862T > A polymorphism with childhood atopic asthma might not be causal but rather the result of another polymorphism in unsequenced regions, which is in LD with 94862T > A. Furthermore, other SNPs in unsequenced regions might also be associated with asthma or its related phenotypes.

In the case-only study, the 3'UTR variant of the TGF- β_2 gene was associated with the asthmatic patients who had a high eosinophil count. Wenzel et al. [27] reported that TGF- β and IL-13 synergistically increase the production of eotaxin-1, a potent eosinophil chemoattractant, in human airway fibroblast. Furthermore, Jagels et al. [28] demonstrated that TGF- β synergistically up-regulated the GM-CSF production with TNF- α in HBECs while TGF- β also enhanced RANTES production, which is a CC chemokine that causes the chemotaxis of eosinophils. It is therefore possible that TGF- β increases eosinophil chemotaxis and/or survival by affecting eotaxin, GM-CSF, and RANTES production. Functional variants of TGF- β_2 might therefore contribute to the high numbers of eosinophils through TGF- β_2 overproduction.

The roles of TGF- β_1 in asthma have been intensively studied, and several genetic association studies regarding the $-509C > T$ polymorphism of TGF- β_1 have been conducted. Silverman et al. [12] demonstrated that the T allele of $-509C > T$ of the TGF- β_1 gene is associated with the diagnosis of asthma in white adult asthmatics, and the variant alters TGF- β_1 promoter-reporter activity and promoter interactions with the transcription factor Yin Yang 1. Pulley et al. [11] surveyed four polymorphisms ($-509C > T$, 72insC, 869T > C, and 915G > C) in the promoter region and signal peptide of the TGF- β_1 and reported that the $-509T$ variant on a haplotype is the most informative marker of the TGF- β_1 contribution towards asthma severity. Furthermore, the $-509C > T$ variant is associated with higher circulating plasma TGF- β_1 concentrations [29] and higher serum IgE levels [10]. These data suggest that the variant in TGF- β_1 gene is functional while also contributing to the aetiology of asthma. Our results showed that TGF- β_2 was highly

expressed in bronchial epithelial cells and TGF- β_1 treatment significantly enhanced TGF- β_2 secretion from bronchial epithelial cells (Fig. 4). It would thus be interesting to investigate whether polymorphisms in TGF- β_1 are associated with childhood atopic asthma and to examine the gene-gene interaction between TGF- β_1 and TGF- β_2 variants to clarify the mechanisms of asthma development.

TGF- β_2 protein and mRNA were localized either immunohistochemically or by *in situ* hybridization to the bronchial epithelium [6, 8, 16, 17, 30, 31]. Recent reports have indicated that the bronchial epithelium of asthmatics has an increased susceptibility to injury in comparison with the normal epithelium [32, 33]. For example, asthmatic bronchial epithelial cells have an abnormal innate response to rhinovirus infections, which are frequently associated with exacerbations of asthma in children [34, 35], thus resulting in increased virus replication and cell lysis compared with cells from healthy normal controls. TGF- β inhibits the proliferation and induces the apoptosis of normal HBECs [36, 37]. Although it is unclear whether the 3'UTR 94862T > A and the $-109 \rightarrow$ ACAA ins variants regulate TGF- β_2 protein synthesis in bronchial tissue, the susceptible variants might thus contribute to increased epithelial shedding through the up-regulation of TGF- β_2 in childhood atopic asthma. The findings that the T allele of $-509C > T$ of the TGF- β_1 gene associated with asthma showed higher levels of circulating plasma TGF- β_1 than the C allele [29] may also support this speculation that higher levels of TGF- β may be harmful to asthma.

In this study, we could not recruit samples from healthy children as a control population. The prevalence rate of childhood asthma has increased over the past two decades [38]. It might act to reduce the power in detecting genetic associations. Unrecognized differences in other environmental exposures might exist between childhood asthma and healthy adult controls. Further replication studies of the association in other populations are desirable to confirm the relationship between the variant and susceptibility of asthma.

In summary, the current data suggest that TGF- β_2 plays an important role in childhood asthma, while also supporting the concept that TGF- β plays a regulatory role in airway inflammation and airway remodelling in asthma [39-41]. Further investigation regarding the connection between the genotypes and the functional roles of TGF- β_2 in the airway epithelium during allergic events may provide additional targets for therapeutic interventions and would also help to clarify the pathogenesis of the disease.

Acknowledgements

We thank all participants in the study. We are grateful to the members of The Rotary Club of Osaka-Midosuji District 2660 Rotary International in Japan for supporting

our study. We also thank Makiko Shimizu, Hiroshi Sekiguchi, Aya Jodo, and Nami Kawaraichi for technical assistance and Yuko Ohnuma, Michiyo Matsumoto, and Mutuko Hara for their valuable secretarial assistance. This work was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan, and from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan.

References

- Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:597-641.
- Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21:659-93.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor- β in human disease. *N Eng J Med* 2000; 342:1350-7.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocrine Rev* 2002; 23:787-823.
- Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K *et al.* Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15:404-9.
- Redington AE, Madden J, Frew AJ *et al.* Transforming growth factor- β_1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:642-7.
- Minshall EM, Leung DY, Martin RJ *et al.* Eosinophil-associated TGF- β_1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:326-33.
- Vignola AM, Chanez P, Chiappara G *et al.* Transforming growth factor- β expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:591-9.
- Batra V, Musani AI, Hastie AT *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), TGF- β_2 , interleukin (IL)-4, and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on α -smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:437-44.
- Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor- β promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1958-62.
- Pulley LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGF- β_1 allele association with asthma severity. *Hum Genet* 2001; 109:623-7.
- Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V *et al.* Transforming growth factor- β_1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:214-9.
- Meng J, Thongugarn T, Nakajima M *et al.* Association of transforming growth factor- β_1 single nucleotide polymorphism C-509T with allergy and immunological activities. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138:151-60.
- Nagpal K, Sharma S, B-Rao C *et al.* TGF- β_1 haplotypes and asthma in Indian populations. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:527-33.
- Mak JC, Leung HC, Ho SP *et al.* Analysis of TGF- β_1 gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:92-6.
- Chu HW, Balzar S, Seedorf GJ *et al.* Transforming growth factor- β_2 induces bronchial epithelial mucin expression in asthma. *Am J Pathol* 2004; 165:1097-106.
- Balzar S, Chu HW, Silkoff P *et al.* Increased TGF- β_2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:110-7.
- Wen FQ, Kohyama T, Liu X *et al.* Interleukin-4- and interleukin-13-enhanced transforming growth factor- β_2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon- γ . *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:484-90.
- Richter A, Puddicombe SM, Lordan JL *et al.* The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:385-91.
- Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2004; 202:175-90.
- National Heart, Lung, Blood Institute. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Asthma Education Program, Expert Panel Report. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:425-534.
- Hirota T, Suzuki Y, Hasegawa K *et al.* Functional haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:789-95.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402-8.
- Makino S, Furusho K, Miyamoto T, Ohta K. (eds.) Asthma prevention and management guidelines 1998, Japan (JGL1998). Report of the research group for asthma prevention and management guidelines, supported by the Immunology & Allergy Research Study Project, Ministry of Health and Welfare, Japan. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;121 (Suppl. 1):4-14.
- Sagara H, Okada T, Okumura K *et al.* Activation of TGF- β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:249-54.
- Ke Y, Reddel RR, Gerwin BI *et al.* Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation* 1988; 38:60-6.
- Wenzel SE, Trudeau JB, Barnes S *et al.* TGF- β and IL-13 synergistically increase eotaxin-1 production in human airway fibroblasts. *J Immunol* 2002; 169:4613-9.
- Jagels MA, Hugli TE. Mixed effects of TGF- β on human airway epithelial-cell chemokine responses. *Immunopharmacology* 2000; 48:17-26.
- Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M *et al.* Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type- β_1 . *Hum Mol Genet* 1999; 8:93-97.
- Hoffjan S, Ostrovnaia I, Nicolae D *et al.* Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:511-8.
- Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. TGF- β_1 , but not TGF- β_2 or TGF- β_3 , is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14:131-8.
- Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL, Holgate ST. Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:879-86.

- 33 Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F *et al*. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005; 201:937-47.
- 34 Corne JM, Marshall C, Smith S *et al*. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2002; 359:831-4.
- 35 Heymann PW, Carper HT, Murphy DD *et al*. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:239-47.
- 36 Bogdanowicz P, Pujol JP. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) hydrolysis by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) as a potential early step in the inhibition of epithelial cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 2000; 208:143-50.
- 37 Yanagisawa K, Osada H, Masuda A *et al*. Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF- β in human normal lung epithelial cells. *Oncogene* 1998; 17:1743-7.
- 38 Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New Eng J Med* 2002; 347:911-20.
- 39 Schmidt-Weber CB, Blaser K. The role of TGF- β in allergic inflammation. *Immunol Allergy Clin N Am* 2006; 26:233-44.
- 40 Groneberg DA, Witt H. Smads as intracellular mediators of airway inflammation. *Exp Lung Res* 2004; 30:223-50.
- 41 Nakao A. Is TGF- β 1 the key to suppression of human asthma? *Trends Immunol* 2001; 22:115-8.

小児アレルギー疾患における免疫調節療法の展望 ：スギ花粉症の急速免疫療法

藤澤 隆 夫

国立病院機構三重病院 臨床研究部

はじめに

アレルギー免疫療法は減感作療法とも呼ばれ、かつてわが国では気管支喘息やスギ花粉症、通年性アレルギー性鼻炎などに対して基本治療として広く行われていた。実際に、治療中の臨床効果¹のみならず、治療中止後の長期予後²も良いことが報告されていたが、効果発現までに長時間を要することやアナフィラキシーなど副作用への懸念、そして、より即効性がある薬剤の出現によって、最近、実施数が著しく減少した。一方、欧米ではアレルギー免疫療法の臨床的有効性に関するエビデンスが多数集積して^{3,4}、免疫学的奏功機序も明らかにされつつあり⁵、アレルギー専門医の重要な治療選択肢のひとつとなっている。現在の薬物治療は病態の基本たる炎症をターゲットとして疾患の良好なコントロールを可能としたが、多くは治療中止によって症状が再燃するため、いまだ対症療法の域を出るものとはいえない。それに比して、免疫療法は現在の治療法の中で唯一、根本に迫りえるといっても過言

ではない。そこで、私たちは、この古くて新しい治療に光を当て、わが国における新たなエビデンスをつくっていきたいと考えた。

現在、行われているアレルギー免疫療法には抗原（アレルギー）の投与経路により皮下注射法と舌下投与法（舌下免疫療法）の2つの方法がある。後者は欧米ではすでに実用化されているが^{6,7}、わが国では未だ研究段階であるため、現状での選択肢は皮下注射法のみである。また、皮下注射法にはアレルギーエキスを少量ずつ週に1、2回の間隔で漸増していく標準法（conventional immunotherapy）と1～2週という短期間に維持量まで投与抗原量を増やす急速法（Rush immunotherapy）がある。標準的方法は外来で手軽に施行できる利点があるが、効果が期待できる維持量に達するまでに約6ヵ月を要するなど即効性がなく、また必ずしも円滑に目標の抗原量まで到達し得ない。これらを解決する上において、入院管理下で抗原注射を反復して、数日間で維持量への到達過程を完遂する急速導入法が有用とされている（表1）¹。私たちは重

表1 急速免疫療法：従来法との比較

- | |
|---|
| <p>■ 従来法の免疫療法 Conventional immunotherapy</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 外来でアレルギー量を漸増しながら、週1-2回投与する。 <input type="checkbox"/> 効果発現に数ヶ月以上を要するため、客観的な効果判定がしばしば困難で、その間に症状の悪化がみられるなどすると、しばしば維持量に到達し得ないこともある。 <p>■ 急速減感作療法 Rush immunotherapy</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 入院管理下で注射を頻回にアレルギー投与を反復して、数日間で維持量への到達過程を完遂する。 <input type="checkbox"/> 確実にかつ短期間で目標のアレルギーを投与可能。 <input type="checkbox"/> 効果発現も早期にみられる。 <input type="checkbox"/> 初回の入院は必要であるが、その後の維持療法の通院は月に一度のみであり、長期に及ぶ治療として患者への負担は従来法より少ない。 <input type="checkbox"/> 免疫学的変化の測定が比較的容易であり、免疫療法の臨床的ポジショニングや奏効機序を考察する上でも有益と考えられる。 |
|---|

症のスギ花粉症患者に対して、急速免疫療法を行い、その臨床効果の評価とともに、新しいバイオマーカーとして末梢血好塩基球の CD203c 発現について検討したので報告する。

対象と方法

1. 患者

スギによる季節性アレルギー性鼻炎で、鼻アレルギー診療ガイドラインによる重症以上の患者を対象とした。2005年12月から2006年8月までに8例（男2，女6；年齢 6～38歳，中央値18歳8か月）に対して本治療法を施行した。

2. 急速免疫療法の実際

対象患者には期待される効果とともに局所反応やアナフィラキシーなど起こりえる副作用について説明して同意を得た。スギ標準化エキス（鳥居社製）を用い、0.02 JAU/ml 0.1mlを初回投与量とし、2時間毎に抗原量を増加させ、1日数回左右上腕伸側に交互によく揉みこみながら皮下注射を反復した。副作用予防目的で第2世代H1拮抗薬の内服と、サルブタモール+DSCG（インタール®）吸入（1日4回）を併用した。局所症状にはステロイド軟膏を塗布した。7～10日間で抗原を増量して、2000 JAU/mlの0.1ml（維持量）に到達したところで、翌日にH1拮抗薬と吸入とを中止して維持量を注射、注射部位を揉まずに数時間経過を観察した上で退院とした。その後、1ヵ月に1度、維持量の皮下注を外来にて継続した。

3. 効果判定の方法

効果判定の目的で2005年度版鼻アレルギー診療ガイドラインのアレルギー性鼻炎標準 QOL 調査票（JRQLQ No1）を用いて、花粉飛散期の QOL を治療の前後で比較した。また、血清総 IgE、スギ CAP-RAST を測定した。

スギ特異的血清 IgG4 値はサンドイッチ ELISA 法にて測定した。すなわち、鳥居社製スギ標準化エキスを96穴マイクロプレートに固相化、患者血清を添加して、4℃一晩反応、洗浄後HRP標識ヤギ抗ヒト IgG4 抗体を添加して、室温で2時間反応させた。洗浄後、基質液として tetramethylbenzidine を加えて、発色させ、吸光度を測定した。定量は陽性者4名分のプール血清による検量線を用いて行った。

スギ抗原刺激による末梢血好塩基球 CD203c 発現はベックマンコールター社製のキット（Allergenistry

kit）を用いて測定した。方法を簡便に記述すると、EDTA 加血液を各種濃度のスギ抗原エキス（鳥居）、FITC 標識抗 CRTH、PE 標識抗 CD203c、PC7 標識抗 CD3、活性化バッファー（EDTA によるカルシウムキレートを解除）を同時に添加、37℃で10分間反応させた後に、反応停止、溶血後、フローサイトメトリーにて単核球分画中の CD3-CRTH2 +細胞（好塩基球分画）の CD203c の蛍光強度を定量した⁸。（図1）抗 IgE 抗体刺激による CD203c 発現を陽性コントロールとしたが、抗 IgE 抗体に反応しなかった例は non-responder として解析から除外した。

4. 統計学的検討

治療前後の各パラメーターの比較はWilcoxon順位和検定を用いて行い、P値0.05以下を有意とした。

結 果

1 花粉飛散期の症状とQOLの変化

8例のうち6例は翌シーズン以降の花粉飛散期まで経過観察しえた。治療後の花粉飛散シーズンには、すべての例で症状が軽快し、QOLも向上した（図2）。飛散した花粉量はそれぞれの年で異なるが、1例は、治療前が花粉量の比較的少なかつた2004年、治療後は大量に飛散した2005年との比較であったが、著明な症状とQOLの改善がみられた。残りの5例は大量飛散の2005年と比較的飛散量が少なかつた2006年との比較であるが、いずれの患者も治療後は治療前のいずれのシーズンよりも軽快したと述べていた。

2 血清総 IgE とスギ特異 IgE 抗体価

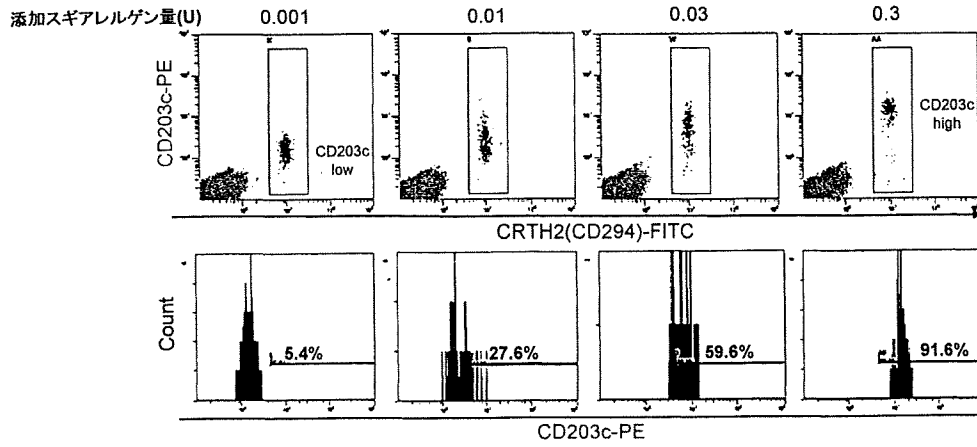
血清総 IgE は治療後1ヵ月で有意に上昇したが、その後の有意な変化は認められなかつた。スギCAP-RASTは治療後数ヶ月間で上昇例がみられたが、一定の傾向は認められなかつた（図3）。

3 スギ特異 IgG4 抗体価

スギ特異的 IgG4 抗体は治療後1ヵ月で有意に上昇した（図4）。その後は大きな変動はなく、維持療法中にも上昇した抗体価は維持された。

4 抗原刺激による好塩基球 CD203c 発現

8例中2例は抗IgE抗体刺激にて無反応であった non-responder で、1例は治療前の評価ができなかつたため、5例において解析した（うち治療後に飛散シーズンを迎えたのは4例）。代表的な2例の結果を示すと、各種濃度のスギ抗原刺激による CD203c 発現は治療後に低下して、反応曲線は経時的に左にシフトし



抗原刺激によりCD203c発現が濃度依存性に増加する

図1 スギ抗原刺激による好塩基球 CD203c の発現

上段は単核球のうち CD3 陰性の分画における CRTH2 (末梢血では好酸球, Th2細胞, 及び好塩基球に特異的に発現するため, 上記分画中の CRTH2 陽性細胞はすべて好塩基球となる) と CD203c のドットプロット図を示す。添加したスギ抗原の濃度依存的に CD203c の蛍光強度が増加する。下段は CD203c のヒストグラムを示す。無刺激の陰性コントロールにおける蛍光強度を基準として、発現が増加している細胞数を CD203c^{high}%として定量した。

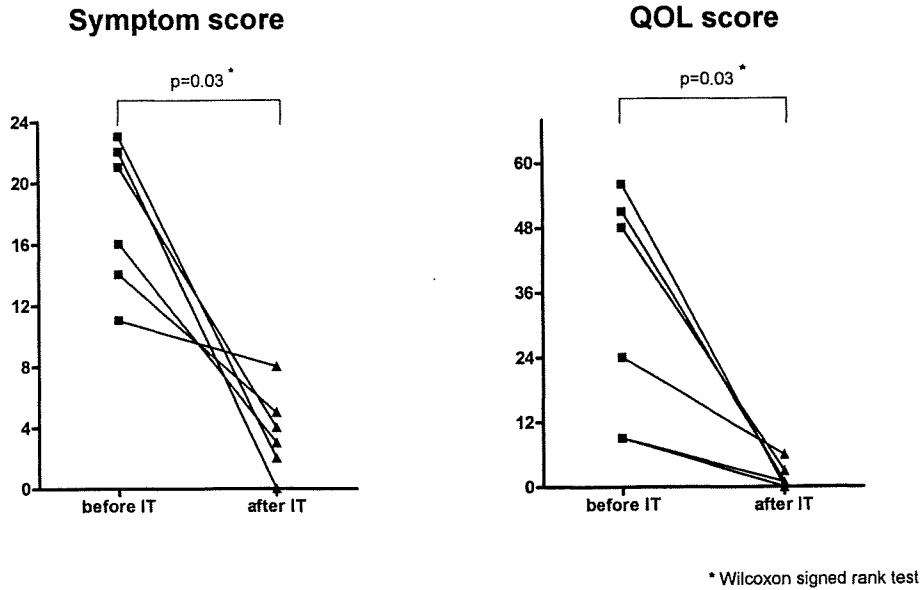


図2 花粉飛散期における症状スコアと QOL スコア：急速免疫療法前後での比較

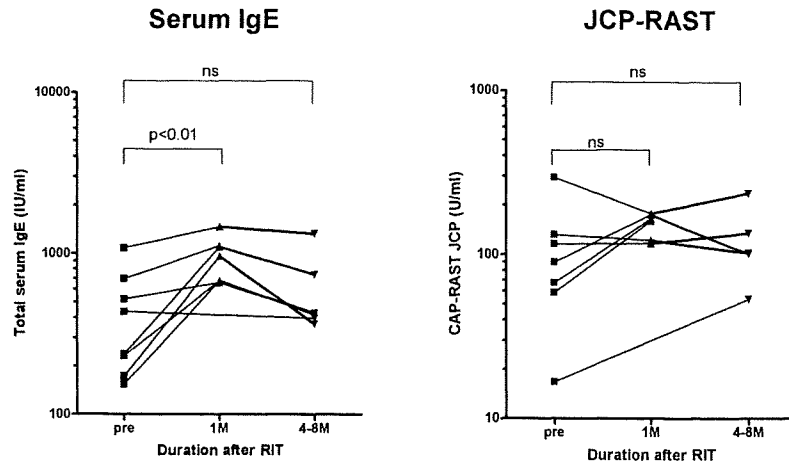


図3 急速免疫療法前後における血清総IgEとスギ特異IgE抗体の変化

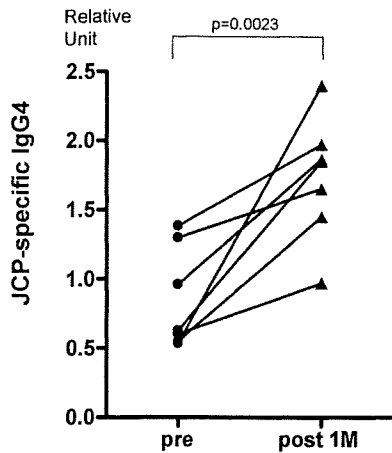


図4 急速免疫療法前後におけるスギ特異IgG4抗体の変化

た(図5)。その変化は症状とQOLスコアの改善に一致していると考えられた。そこで、CD203c^{high}%が20%を越える抗原濃度を反応域値として、その変化をプロットすると、治療後1ヵ月で閾値が上昇、3~6ヵ月以降でさらに上昇することが明らかとなった(図6)。

5 副反応

全例に注射局所の発赤腫脹が認められたため、ステロイド外用剤の塗布を必要とした。2例では投与抗原増量中に全身じんましんと軽度の呼吸器症状(胸部圧

迫感と軽度の喘鳴)を認めたが、副腎皮質ステロイドの全身投与と β 刺激薬の吸入を行ったところ、直ちに軽快した。それぞれ、1日間、アレルゲン投与を休止して、その後、低用量から再開したところ、維持量まで増量することが可能となった。局所反応は維持療法中に次第に軽減していく傾向が認められた。

考 察

今回の研究では、重症のスギ花粉症患者に対して入院による急速免疫療法を行い、治療後に花粉飛散シーズンを迎えた全例において、治療前に比べて、症状とQOLの著しい軽快を認めた。さらに、症状の改善に一致して、スギ特異IgG4抗体の上昇とスギ抗原による好塩基球CD203c発現の低下が認められ、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。

近年、アレルギー疾患に対しては抗炎症療法としての局所ステロイド治療などが普及して疾患のコントロールは著しく向上したが、治療中止によって再燃することが多く、現状の薬物療法では疾患の治療を導くことはできない⁹。それに対して、アレルゲン免疫療法は治療中止後にも効果が持続する¹⁰ことより疾患の自然歴を変える力、すなわち治療を導く力をもつ可能性がある。さらに、他のアレルゲンへの感作を予防したり、アレルギー性鼻炎に対する免疫療法でその後の喘息の発症を予防する¹¹などの報告もされており、アレ

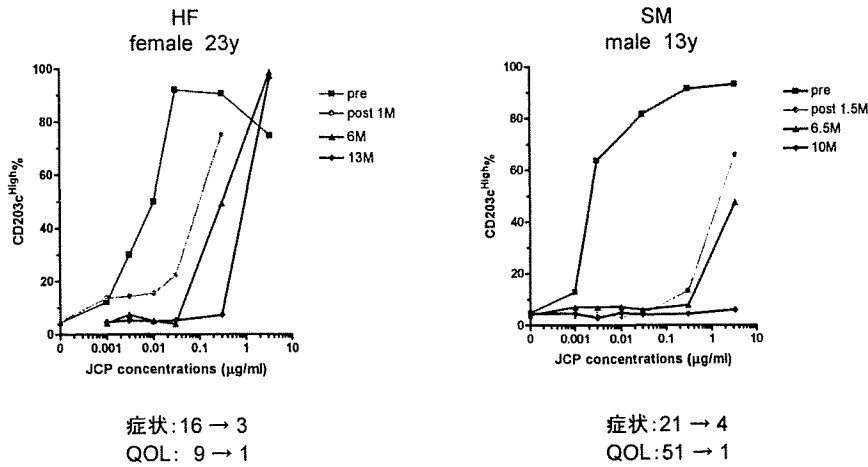


図5 急速免疫療法前後におけるスギ抗原刺激による好塩基球 CD203c 発現の変化

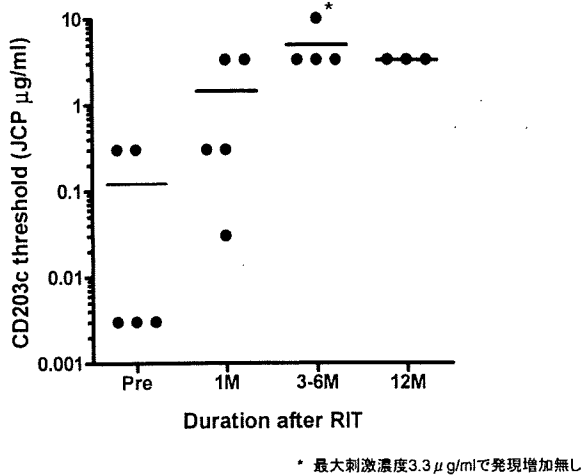


図6 CD203c 反応閾値 (CD203c^{high%}>20%となるスギ抗原濃度) の経時的変化

ルゲン特異的な反応の抑制にとどまらず、アレルギーに偏倚した免疫反応のバランス全体を正常化できる可能性も示唆される。実際に、免疫療法によりアレルギー特異的 (非特異的) 調節性T細胞および Th1 細胞が誘導されて、Th2 細胞反応が抑制される¹²が、これによって、症状発現に関わるエフェクター相、すなわち IgE 抗体を介した肥満細胞・好塩基球の活性化や好酸球性炎症が抑制されることが知られている¹³⁻¹⁵。

免疫療法の効果を検討する場合に、症状や QOL を

評価するのはいうまでもないが、客観的指標としては奏功機序を反映するバイオマーカーの測定も重要である。この点で、私たちはエフェクター相の細胞反応が、臨床症状をよりよく反映する *in vitro* 検査になると考えて、好塩基球の活性化抗原としての CD203c 分子に注目した。好塩基球は絶対数が少ないためにこれまでアレルギーの病態論の中ではほとんど目立たない存在だったが、最近、喘息死患者の肺組織で検出されたり¹⁶、多彩なサイトカイン産生が明らかになる¹⁷など、その役割が再認識されつつある。

CD203c 分子は細胞外のヌクレオチドを分解する ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 という膜型酵素で、肥満細胞、好塩基球とその前駆細胞に発現する^{18,19}。機能はまだ不明ながら、IgE を介する刺激によって短時間 (5 分間) に発現が増強するため、好塩基球の活性化指標としての臨床応用が進んでいる²⁰⁻²²。今回用いた Allergenicity キットは全血でアレルギーと反応させて、好塩基球特異的に CD203c 発現を検出するものであるが、血清成分やその他の血球の影響下での反応であるため、より *in vivo* に近い反応をみている可能性をもつ。実際に、今回の検討ではアレルギー免疫療法によって、経時的に反応域値が低下していくことを観察し、効果判定のバイオマーカーとしての有用性が示唆された。私たちは食物アレルギー患者でも CD203c 発現を測定しているが、経口負荷試験の結果とよく一致しており、耐性獲得診断に有用と考えている (投稿中)。

次に、私たちの観察した免疫療法後の CD203c 発現低下の機序を考えてみたい。調節性 T 細胞からの抑制性サイトカインの影響²³など様々な可能性が考えられるが、血清中の IgG4 抗体が関与する可能性は最も重要であろう。免疫療法によって誘導されるアレルギー特異的 IgG 抗体は「阻止抗体」として、ヒスタミン遊離などの即時型反応を抑制する²⁴だけでなく、IgE を介する T 細胞への抗原提示・活性化も抑制する²⁵ことが示されている。今回も、血清中のスギ特異 IgG 4 抗体が免疫療法後に上昇することを観察したが、この IgG4 抗体の生物活性についても、受動感作実験で確認することができた（論文作成中）。すなわち、正常者の好塩基球を患者血清で受動感作したのちに、抗原刺激してヒスタミン遊離を測定する実験系で、スギ抗原とともに治療後の患者血清を共存させるとヒスタミン遊離が有意に抑制されること、IgG の吸収でこの抑制効果が消失することを観察したのである。

好塩基球の反応性を評価する検査法ではヒスタミン遊離試験（HRT シオノギキット）がすでに実用化され、アレルギー免疫療法後に低下することが報告されている²⁶。これは好塩基球のみを分離して反応性をヒスタミン遊離率として評価する方法であり、好塩基球自体の反応性を評価するものである。CD203c 発現低下の機序もこの側面を含む可能性があり、さらに今後の検討を進めていきたい。

おわりに

重症スギ花粉症患者に対して急速免疫療法が有効であり、好塩基球 CD203c 発現測定がバイオマーカーとして有用である可能性を報告した。しかしながら、副反応は全例に局所の発赤腫脹が出現、一部にはじんましん、呼吸器症状など全身症状も引き起こされた。既存のアレルギーエキスをを用いる場合には IgE を介した副反応を多少でも伴うことは避けられず、今後、抗原の改良、ペプチド療法、アジュバンド療法など新しい手法の開発が強く望まれる。

文 献

1. 永田真, 田部一秋, 山本英明, 坂本芳雄, 松尾博司. ダニ抗原過敏性成人気管支喘息における抗原特異的免疫療法の臨床的意義. 一疾患重症度と医療費節減におよぼす効果について. アレルギー 1999; 48: 1316-21.
2. 奥田稔. スギ花粉症免疫療法の長期予後. アレルギー 2006; 55: 655-61.
3. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. Cochrane Database Syst Rev 2003; CD001186.
4. Calderon M, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. Cochrane Database Syst Rev 2007; CD001936.
5. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Nat Rev Immunol 2006; 6: 761-71.
6. Olaguibel JM, Alvarez Puebla MJ. Efficacy of sublingual allergen vaccination for respiratory allergy in children. Conclusions from one meta-analysis. J Investig Allergol Clin Immunol 2005; 15: 9-16.
7. Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. Allergy 2005; 60: 4-12.
8. Application Note 17; Allergenicityキットによる活性化好塩基球の検出. <http://www.bc-cytometry.com/application/appli17.html>; 2006.
9. 藤澤隆夫. 吸入ステロイドは喘息を治癒させるか?. 日本小児アレルギー学会誌 2004; 18: 131-6.
10. Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. N Engl J Med 1999; 341: 468-75.
11. Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Host A, Jacobsen L, et al. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 251-6.
12. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 2004; 113: 1025-34; quiz 35.
13. Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, et al. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the

- number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1356-65.
14. Durham SR, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Varga EM, Frew AJ, et al. Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1490-6.
 15. Shim JY, Kim BS, Cho SH, Min KU, Hong SJ. Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin E-mediated basophil histamine releasability. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 52-7.
 16. Kopley CL, McFeeley PJ, Oliver JM, Lipscomb MF. Immunohistochemical detection of human basophils in postmortem cases of fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1053-8.
 17. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 2000; 96: 4028-38.
 18. Bühring HJ, Simmons PJ, Pudney M, Müller R, Jarrossay D, van Aghoven A, et al. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; 94: 2343-56.
 19. Bühring HJ, Seiffert M, Giesert C, Marxer A, Kanz L, Valent P, et al. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood* 2001; 97: 3303-5.
 20. Hamilton RG. Diagnostic methods for insect sting allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 297-306.
 21. Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, et al. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 259-65.
 22. Binder M, Fierbeck G, King T, Valent P, Bühring HJ. Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 160-8.
 23. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:694-704.
 24. Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, Sperr WR, Krauth MT, Majlesi Y, et al. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1198-208.
 25. van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen A, Arned J, et al. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol* 1999; 163: 2944-52.
 26. 湯田厚司, 西村真治, 坂倉康夫, 間島雄一. スギ花粉症免疫療法でのHRTシオノギキットによる好塩基球ヒスタミン遊離率の変化. *アレルギー* 2002; 51: 634-8.

炎症メディエーター

Inflammatory mediators in allergy



藤澤 隆夫
FUJISAWA Takao

アレルギー疾患へのアプローチ Key words アレルギー性炎症 好酸球 肥満細胞 ヒスタミン トリプターゼ

「アレルギー疾患＝炎症性疾患」という概念が確立したのは、1990年以降であり、また「新しい」概念と言っても過言ではないかもしれない。CoomsとGellによって提唱されたI型からIV型までのアレルギー（過敏反応）の古典的分類は、免疫反応を説明する原理のひとつとして今も通用するものであるが、気管支喘息などの「狭義の」アレルギー疾患はI型、すなわち即時型に分類されるため、すなわち、IgE抗体を介した肥満細胞からの「即時型」メディエーターによる反応と理解されていたため、長らく「炎症」という概念と一致しにくかったのである。しかし、炎症の病態が解明されて以来、治療戦略は大きく変わり、疾患コントロールの格段の向上をもたらした。気管支喘息を例にとれば、即時型反応による気管支平滑筋の収縮という病態理解から、好酸球浸潤を主徴とする慢性気道炎症という概念に変わったことによって、気管支拡張剤中心の治療から、炎症制御を目標とした吸入ステロイド療法に転換され¹⁾、喘息死や発作入院の減少、症状の軽症化などの数々の成果が得られたのである²⁾ (図1)。このことは炎症メカニズムの解明をさらに進めることにより一層の治療進歩が可能になることを示している。

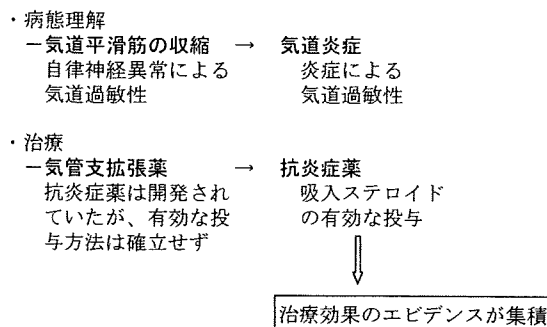


図1 気管支喘息の病態理解の変化と治療の進歩

国立病院機構三重病院臨床研究部 部長

0371-1900/07/¥50/頁/JCLS

本稿ではアレルギー疾患の病態形成に關与する炎症メディエーターについて概説する。アレルギー疾患は、肥満細胞、好酸球、Th2細胞などの相互作用が症状発現の基礎をなしており、それらの細胞作用をつなぐものがメディエーターである。非常に多くのメディエーターが關与しているが、ここでは主要なもののみを取り上げ、とくに臨床的マーカーとなりえるものについて考察したい。

アレルギー性炎症の基本概念(図2)

アレルギーは、環境抗原(アレルゲン)に対して反応しやすい遺伝素因が基礎となり発症する。抗原が樹状細胞に取り込まれると、樹状細胞はナイーブT細胞をエフェクターT細胞に分化させるが、この遺伝素因をもった個体にアレルゲンが侵入すると、T細胞のバランスはTh2に著しく偏倚した状態となる。Th1分化には、細菌やウイルス

スなどの抗原に反応した樹状細胞からのIL-12が重要である一方、Th2偏倚のスイッチは抗原と最初に接触する上皮細胞などが産生するTSLP(Thymic stromal lymphopoietin)によることが最近見い出されている³⁾。調節性T細胞の機能不全もTh2偏倚の要因として重要である。そして、Th2細胞の産生するIL-4、IL-5、IL-13などのいわゆるTh2サイトカインがIgE産生およびエフェクターである肥満細胞、好塩基球、好酸球の産生と活性化を起こす。これらのエフェクター

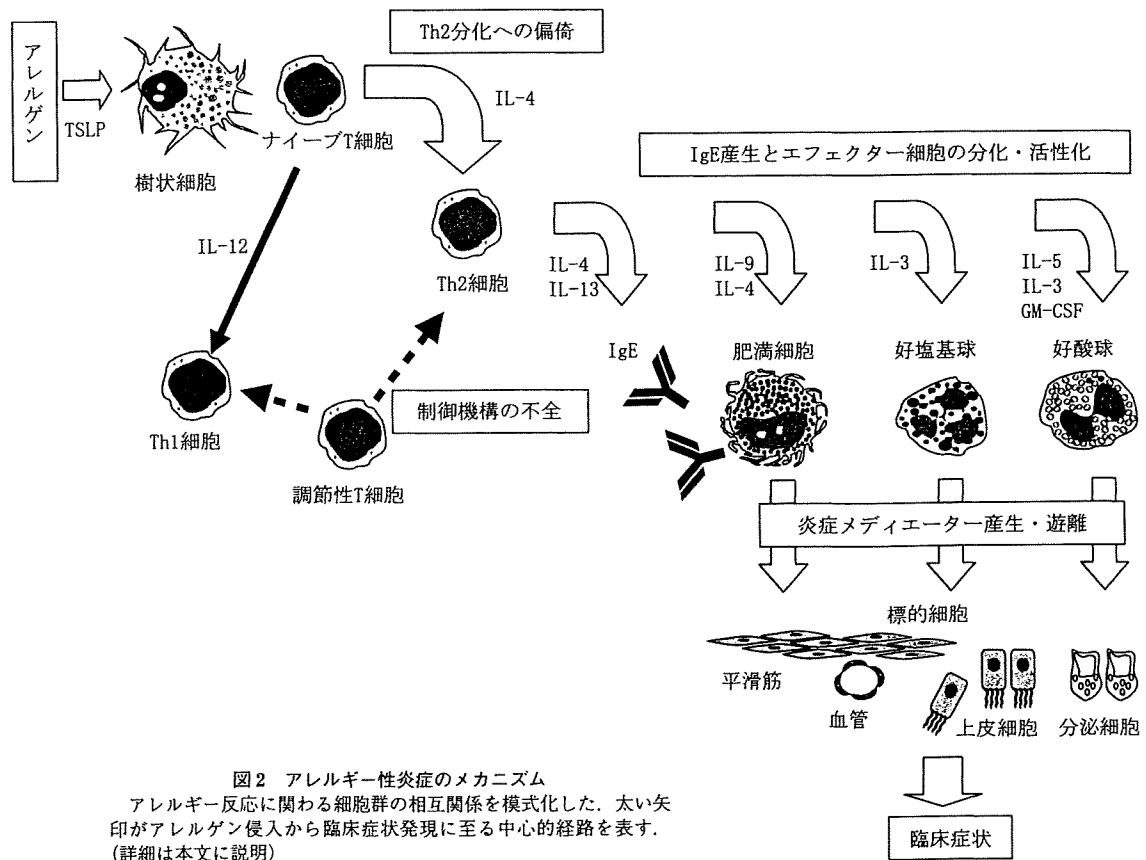


図2 アレルギー性炎症のメカニズム
アレルギー反応に關わる細胞群の相互關係を模式化した。太い矢印がアレルゲン侵入から臨床症状発現に至る中心的経路を表す。(詳細は本文に説明)

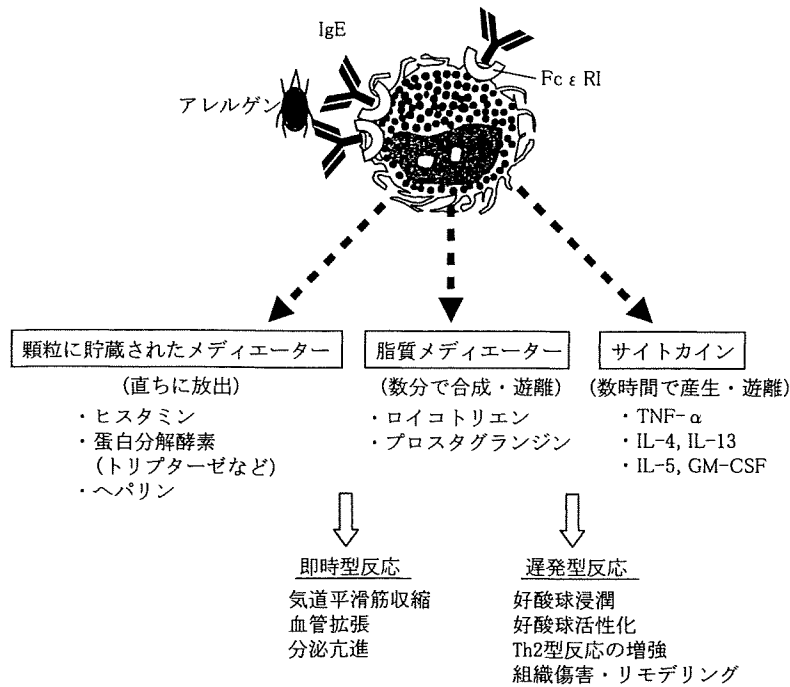


図3 肥満細胞からのメディエーター

肥満細胞表面の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に結合した IgE 抗体がアレルギーと反応して、2分子の IgE が架橋されると細胞内にシグナルが伝わり、種々のメディエーターが放出される。直ちに放出されるのは顆粒内に貯蔵されているヒスタミンならびにトリプターゼに代表される蛋白分解酵素である。次に、脂質メディエーターであるロイコトリエン、プロスタグランジンが合成・放出される。数時間後にサイトカインが産生・放出される。それぞれ、抗原誘発後にみられる即時型反応と遅発型反応を説明する生物活性をもつ。

から産生される種々のメディエーターが標的細胞に作用すると、アレルギー疾患でみられる種々の臨床症状が引き起こされるのである(図2)。

炎症メディエーターとは、これらの細胞から産生されて、細胞間相互作用に関わるサイトカイン、細胞をそれぞれの反応部位に集積させるケモカイン、そして最終的な臨床症状発現に関わるエフェクター分子を総称するものである。ここではとくに、2つの主要なエフェクターである肥満細胞と好酸球をとりあげて、それらの代表的メディエーターについて述べることにする。

肥満細胞のメディエーター

即時型アレルギーは IgE 抗体を介した肥満細胞の活性化から始まる。アレルギーが肥満細胞上の IgE と結合して、2分子が架橋されると高親和性 IgE 受容体の活性化に続いて、細胞内シグナルが

伝達され、図3に示すようなメディエーターが遊離される。まず、直ちに放出されるのは、細胞質の顆粒内に貯蔵されたヒスタミンおよびトリプターゼなどの蛋白分解酵素、そしてヘパリンである。

次に、膜のリン脂質からロイコトリエン、プロスタグランジンなどの脂質メディエーターが合成・放出される。さらに、遺伝子転写を経て、数時間後からサイトカインが遊離される(図3)。短時間で遊離されるメディエーターは主に即時型反応の症状発現に関わり、数時間後から遊離されるサイトカインは遅発反応と引き続く慢性炎症の形成に関わるとされるが、最近さらには多彩な作用が明らかにされている。

1. ヒスタミン

ヒスタミンは、肥満細胞と好塩基球から多量に産生される即時型反応の「古典的」メディエーター

表1 ヒスタミン受容体発現と生物活性

| | 発現細胞 | 生物活性 |
|----|---|--|
| H1 | 気道平滑筋 血管平滑筋 C線維 T細胞, 単球, マクロファージ, 顆粒球 | 気道収縮 血管透過性亢進 気道過敏性, 痒み Th1/Th2制御, 造血など |
| H2 | 胃粘膜細胞 T細胞 | 胃酸分泌, 胃粘膜増殖 Th1/Th2制御 |
| H3 | 中枢神経 | 睡眠・覚醒, 痛み, 食欲の制御 |
| H4 | 好酸球, 顆粒球, 肥満細胞, T細胞 | 遊走, サイトカイン産生 |

である。平滑筋収縮, 血管拡張, 分泌亢進など即時型アレルギーに特徴的な症状を引き起こすが, 最近の研究で, これら「古典的」作用以外にさまざまな活性が明らかとなり, 炎症性メディエーターとして, 再び注目されている。

ヒスタミン受容体は7回膜貫通ヘリックス構造をもつG蛋白共役型の受容体で, H1, H2, H3, H4の4つのサブタイプが存在する。これらの受容体が発現する組織・細胞とその活性については, 表1にまとめたが, 炎症という視点で注目すべき機能はH1/H2受容体によるTh1/Th2バランスの制御と, H4受容体による多くの免疫細胞への作用である。

ヒスタミンが樹状細胞に作用するとIL-12の産生を抑制して, Th1細胞分化を抑制, Th2細胞分化へとシフトさせることが報告されている⁴⁾⁵⁾。一方, 分化したヘルパーT細胞では, Th1細胞には主にH1受容体が, Th2細胞には主にH2受容体が発現し, 前者は促進的, 後者は抑制的に働くため, 樹状細胞における作用とは逆にヒスタミンがTh2細胞を抑制するように機能する⁶⁾。実際に, 疾患において肥満細胞からのヒスタミンがどのように働くのか解明されれば, 新たな免疫制御法の展望が開けるかもしれない。

H4受容体は⁷⁾⁸⁾, 骨髄, 脾臓, 胸腺, リンパ節, 肺, 好酸球, 好塩基球, 肥満細胞, 樹状細胞, T細胞などに発現し, 造血, 免疫系の調節に広く関与することが想定されている。好酸球などの細胞遊走活性⁹⁾とCD8陽性T細胞からのIL-16産生誘導¹⁰⁾はすでに観察されており, アレルギー疾患治療薬としてH4受容体拮抗薬の開発も行われてい

る。

2. トリプターゼ

トリプターゼは肥満細胞の総たんぱく量の20%をも占める主要な成分である。肥満細胞以外の細胞には発現しないことから, 血清など生体サンプル中のトリプターゼ濃度上昇は肥満細胞の活性化を直接的に証明する臨床マーカーでもある¹¹⁾。機能についてはまだよく理解されていない点も多いが, 蛋白分解酵素であることから, 組織障害またはリモデリングに関与している可能性がある¹²⁾。さらに, Protease-activated receptors (PARs)のリガンドとして, 炎症細胞の活性化を引き起こす機能も注目されている¹³⁾。PARはG蛋白結合7回膜貫通型受容体のひとつで, プロテアーゼ(蛋白分解酵素)によって活性化され, 細胞内にシグナルを伝達する。受容体細胞外ドメインのN末端から一定の部位が特定のプロテアーゼによって切断されると, 新しいN末端が形成され, それがりガンドとなって, 受容体の活性化を起こす(図4)。トリプターゼはセリンプロテアーゼであるが, これがPAR2を介して好酸球や気管支平滑筋細胞を活性化, サイトカイン産生を誘導することが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。

3. 脂質メディエーター

細胞質の膜分画に含まれるリン脂質はホスホリパーゼA2により分解されて, アラキドン酸となる。そして, 5-リポキシゲナーゼを介してロイコトリエン(LT)B4とシスチニルロイコトリエン(CysLT)と総称されるLTC4, LTD4, LTE4が,

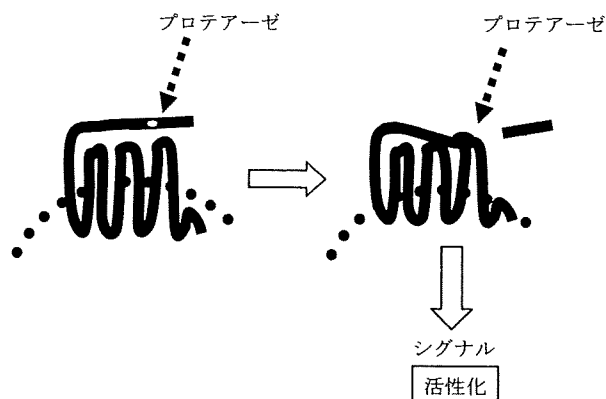


図4 Protease-activated receptor(PAR)の活性化のメカニズム
 PARは多くの細胞に発現しているが、肥満細胞由来のトリプターゼはPAR-2のリガンドとして、種々の炎症性サイトカイン産生誘導に関与している可能性がある。

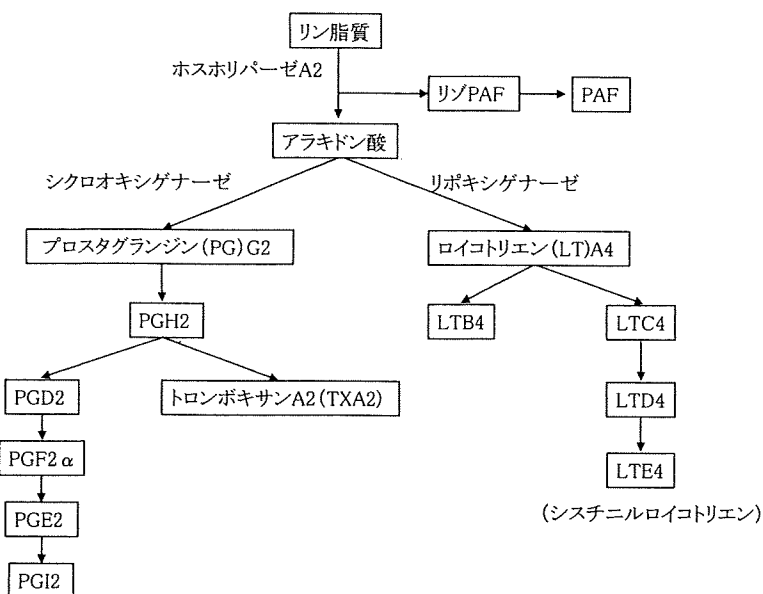


図5 アラキドン酸代謝経路

シクロオキシゲナーゼを介してプロスタグランジン類(PGE1, PGE2, PGF1, トロンボキサン(TX)A2)が産生される(アラキドン酸代謝経路：図5)。肥満細胞をはじめとして、好塩基球、好酸球などアレルギー炎症に関わる細胞が、いずれもこれら代謝産物を産生する。

LTB4は好中球遊走活性を有するとともに、マクロファージを活性化して感染防御に重要な役割を果たす¹⁶⁾。CysLTは、ヒスタミンの約1,000倍の平滑筋収縮活性や分泌亢進作用をもつ即時型反

応に関わる生理活性物質であるが、受容体として同定されたCysLT1(G蛋白結合7回膜貫通型受容体)は、気管支平滑筋や上皮細胞のみならず、好酸球などの炎症細胞にも発現しており、好酸球浸潤など炎症惹起作用も有する。

フォスホリパーゼA2により産生されるリゾフォスファチジルコリンのアセチル化産物PAF(Platelet activating factor)も、好酸球のエフェクター機能の増強に関わる¹⁷⁾プロスタグランジン類も多彩な作用を有するが、PGD2はDP受容体

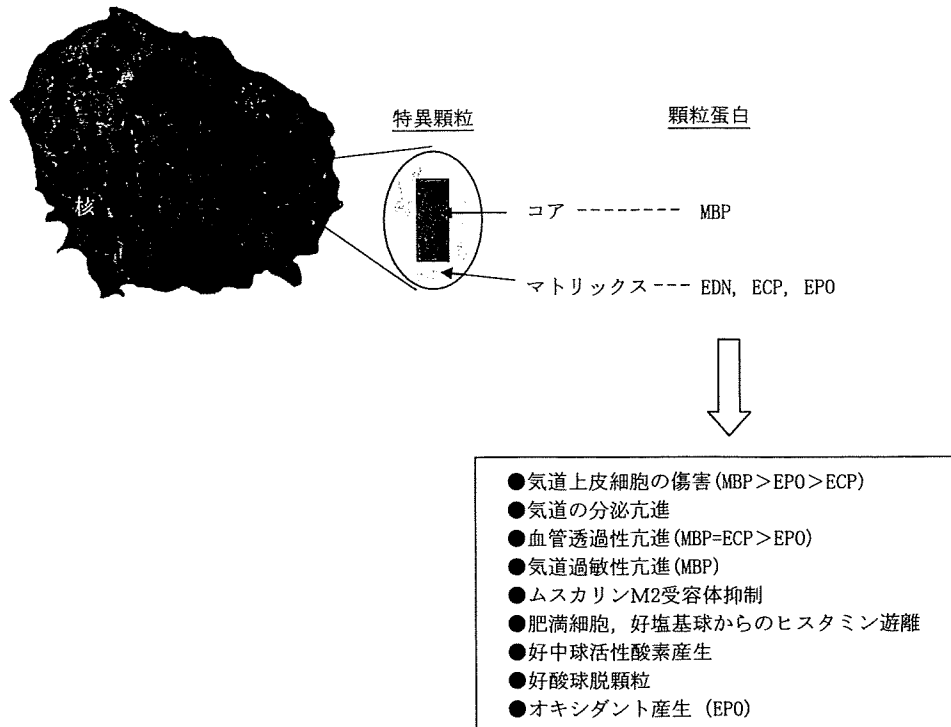


図6 好酸球特異顆粒の構造と顆粒蛋白の炎症惹起活性

のほか, Th2細胞や好酸球に発現して細胞遊走に関わる CRTH2のリガンドでもあり, アレルギー性炎症に病態への関与が注目されている¹⁸⁾.

好酸球のメディエーター

気管支喘息における気道炎症に関わる細胞群の中で, 最初にその関与が明らかにされたのが好酸球である. 好酸球顆粒蛋白の組織傷害性が明らかにされ, 多くの臨床的相関が証明されたことによって, 炎症概念の基礎が形成されたといってもよい. 好酸球を治療ターゲットとすることの有用性¹⁹⁾も実際に報告されている.

1. 特異顆粒蛋白(図6)

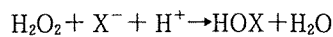
好酸球はエオジンで赤く染まる好酸性の特異顆粒に4種類の強塩基性蛋白, すなわち Major basic protein (MBP), Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), Eosinophil cationic protein (ECP),

Eosinophil peroxydase (EPO)を含有する(図6). いずれも正常細胞に対して強い毒性を有することが気道上皮や心筋などで証明されているが, 実際に喘息死の剖検肺組織や喘息患者の生検組織で, 気道上皮傷害部位に一致してMBPの沈着が認められる.

非毒性の活性としては, 気道の分泌亢進, 血管透過性亢進, 気道過敏性亢進, ムスカリンM2受容体抑制(迷走神経の末端でネガティブフィードバックに関わるM2受容体を, MBPが競合的に抑制して, 過剰なアセチルコリン産生から気道過敏性を引き起こす), 肥満細胞・好塩基球からのヒスタミン遊離, 好中球活性酸素産生, 好酸球脱顆粒などを起こす²⁰⁾. 喘息の多くの病態を顆粒蛋白の活性だけで説明し得るともいえるが実際, 臨床的にも血中, 分泌液中, 組織中のMBPやECP濃度と喘息の重症度・気道過敏性がよく相関することが観察されている²⁰⁾²¹⁾.

2. 活性酸素種

顆粒蛋白と並んで、強い細胞障害活性を有するのが、好酸球が産生する活性酸素種²²⁾である。好酸球は活性酸素 O_2^- 、 H_2O_2 を産生するとともに、顆粒蛋白 EPO がハロゲン類 (X) の臭素と反応して、



ハロゲン化オキシダント (HOX) を生成、この強力な酸化作用によって組織を構成する蛋白質中のチロシンが酸化されて、蛋白そして細胞の機能障害に至る²³⁾。

さらに、喘息では気道の一酸化窒素 (NO) 濃度が高く、気道過敏性と相関するだけでなく、治療選択の指標としても応用可能とされている²⁴⁾。NO 自体に細胞障害活性はないが、代謝産物の ONOO⁻ や ONOOCO₂⁻ は強力なオキシダントである。これらの分子の産生には好酸球由来の EPO が必須の酵素として働くことが確認されるとともに²⁵⁾、喘息患者の気管支肺胞洗浄液や組織で、蛋白酸化の指標である臭素化チロシンやニトロ化チロシンの著しい増加が認められている²⁵⁾。



おわりに：

炎症メディエーターの臨床評価

アレルギー疾患が炎症性疾患ならば、治療薬の選択、用量の設定などの治療指針は客観的な炎症の評価に基づくべきであろう。しかしながら、現状は症状に基づいて治療を選択することが多く、実地臨床での炎症はまだブラックボックスの中にあると言わざるを得ない。アレルギー疾患の病態には多くの因子が関わり、複雑な相互作用をなしているため、単一の炎症マーカーを測定することで病態を把握することが困難であるのが、最も大きな要因であろう。しかし、炎症マーカーと重症度、治療反応性などとの関連を解析する努力は続けられており、呼気 NO²⁴⁾ や呼気凝縮液中のメディエーター・サイトカイン測定などが期待されているところである。治療のテーラーメイド化のためにも今後さらに有用なマーカーの同定をするとともに、多因子の組み合わせによる診断基準の開発などが望まれる。

文 献

- 1) Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute. National Asthma Education Program. Expert Panel Report. *J Allergy Clin Immunol* 88 : 425-534, 1991.
- 2) Suissa S, Ernst P, Benayoun S, et al : Low-dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma. *N Engl J Med* 343 : 332-336, 2000.
- 3) Liu YJ : Thymic stromal lymphopoietin : master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* 203 : 269-273, 2006.
- 4) Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, et al : Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 108 : 1865-1873, 2001.
- 5) Caron G, Delneste Y, Roelandts E, et al : Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J Immunol* 167 : 3682-3686, 2001.
- 6) Jutel M, Watanabe T, Klunker S, et al : Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413 : 420-425, 2001.
- 7) Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, et al : Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun* 279 : 615-620, 2000.
- 8) Liu C, Ma X, Jiang X, et al : Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H4) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* 59 : 420-426, 2001.
- 9) O'Reilly M, Alpert R, Jenkinson S, et al : Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils-role in eosinophil chemotaxis. *J Recept Signal Transduct Res* 22 : 431-448, 2002.
- 10) Gantner F, Sakai K, Tusche MW, et al : Histamine H4 and H2 receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8⁺ T cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303 : 300-307, 2002.
- 11) Schwartz LB : Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin*