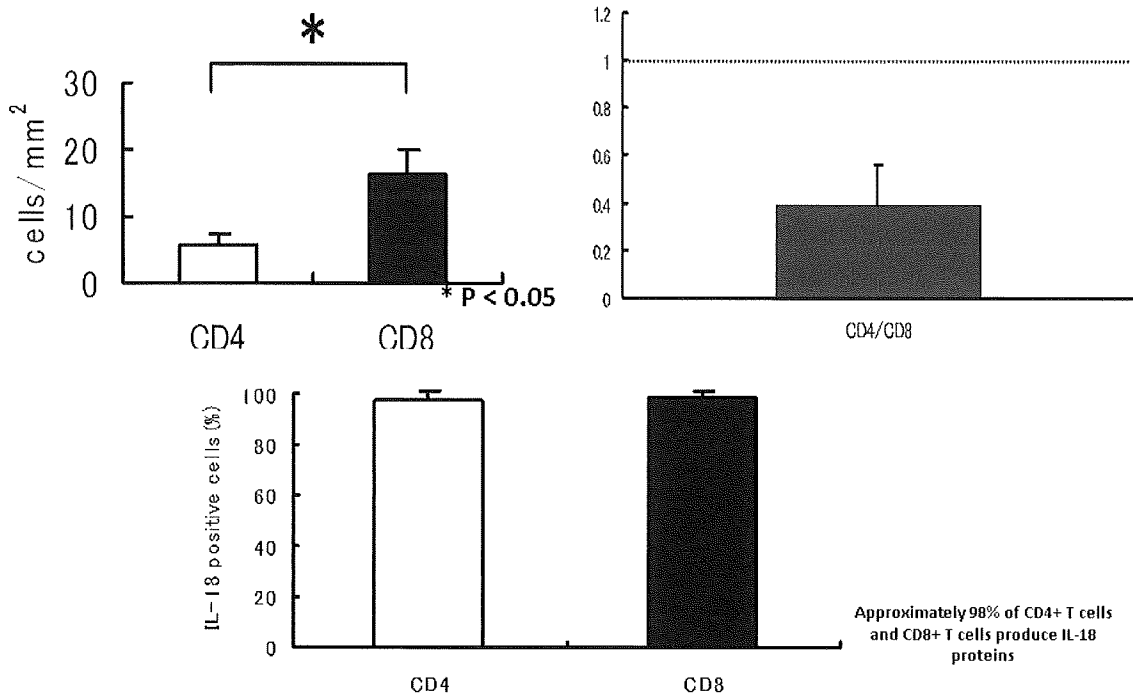


Figure 3



難治性喘息におけるリモデリング形成機序の解明に関する研究

研究分担者 庄司 俊輔（国立病院機構東京病院・総括診療部長（臨床研究部長兼任））
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）

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。本研究では気管支平滑筋細胞が気道リモデリング形成に伴い気管支平滑筋細胞自身により分泌される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との仮説を立て、培養正常ヒト細胞を用いてその機序を検討している。本年度は気管支平滑筋細胞より分泌されるプロテアーゼについて更に解析を行い、本細胞培養上清に含まれる 56kDa プロテアーゼの候補配列が MMP-2 のプロペプチドドメインにあたる配列と 90% の相同性を有することを確認した。更に同上清に含まれる 62kDa プロテアーゼの N 端候補配列が 56kDa プロテアーゼの候補配列中の 1-4 残基と一致することも確認した。本知見は気管支平滑筋細胞による MMP-2 等のプロテアーゼ分泌が喘息患者の気管支における本細胞の結合組織への遊走を支持し、リモデリング形成に寄与する可能性を示唆するものである。

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 アクチン陽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 アクチン陽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後再分化した平滑筋細胞である可能性も示唆されてきた。

平滑筋細胞の遊走が病態形成に寄与することはアテローム性動脈硬化症では広く知られており、血管内皮の傷害に伴う炎症反応の下で本細胞が形

質転換することにより起こる。興味深いことに、血管平滑筋細胞は収縮型から合成型への形質転換を経て増殖能、遊走能及び蛋白質産生能を大きく亢進すると共に平滑筋 α アクチン発現を著しく減少させる。平滑筋細胞の形質転換は細胞外マトリックス蛋白質や物理的刺激など様々な要因で生じる。血管と気管という器官の違いはあるものの、リモデリングの気管支においても発現増強した細胞外マトリックス蛋白質の刺激等の要因により、平滑筋細胞が形質転換を起こしている可能性も考えられる。このような背景をもとに、本研究ではリモデリングの気管支に存在する PR2D3 免疫陽性/平滑筋 α アクチン陽性細胞が平滑筋から結合組織へと遊走した後に、再分化した気管支平滑筋細胞ではないかと考えた。そしてこの結合組織へと遊走した平滑筋細胞が近傍に存在する平滑筋細胞の平滑筋から結合組織への遊走を促進するとの仮説を立て、培養ヒト細胞を用いて実験を行ってきた。

平成 15-17 年度の本班研究では、結合組織へと遊走する気管支平滑筋細胞がプロテアーゼを産生・放出して結合組織を分解し、遊走経路を形成するとの仮定に基づき、気管支平滑筋細胞のプロテアーゼ分泌を解析した。そして抗 MMP-1, 2 及び 3 抗体を用いた気管支平滑筋細

胞培養上清のウェスタンブロッティングでバンドが認められたこと (Fig. 1)、更に同細胞培養上清に含まれる 127, 62, 56 及び 42kDa のプロテアーゼ活性 (Fig. 2a) が、何れもメタロプロテアーゼ阻害剤である EDTA 及び 1,10-フェナントロリンにより阻害されることを報告した。尚この時 42 及び 56kDa のバンドはそれぞれ抗 MMP-1 及び 2 抗体を用いた同細胞培養上清のウェスタンブロッティングで認められたバンド分子量と一致したものの、最も強いゼラチナーゼ活性を示していた 62kDa のバンドについては分子量の一致するバンドは認められなかった。そこで本年度ではこの気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる 62kDa メタロプロテアーゼの同定を N 端一次構造解析により試みた。

B. 研究方法

本研究ではコンフルエントに達した正常ヒト気管支平滑筋細胞 (Lonza 社) の培地を無血清の DMEM に置換し、更に一定時間培養後回収した培養液を気管支平滑筋細胞培養上清として実験に使用してきた。今回は、48 時間培養後に回収した本上清を濃縮・電気泳動した後、泳動蛋白を転写膜へ転写・ボンソーS 染色し、62 及び 57kDa の蛋白質バンドを切り出して一次構造解析を行った。

C. 研究結果

気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる 56kDa メタロプロテアーゼについて N 末端側 10 残基の一次構造を解析した結果、候補配列 (APLPIIKFPG) が MMP-2 のプロペプチドドメインにあたる 30-39 残基の配列 (APSPIIKFPG) と 90% の相同性を有することが確認できた (Fig. 2b)。また同上清に含まれる 62kDa メタロプロテアーゼの N 端候補配列 (APLP) は 56kDa メタロプロテアーゼの N 端候補配列中の 1-4 残基と一致したが、5 残基以降の N 末端一次構造は解析できなかった。細胞培養上清の濃縮倍率を 500-1000 倍まで上げて解析を続けたが、状況は変わらなかった。

D. 考察

気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる 62kDa 及び 56 kDa メタロプロテアーゼの一次構造解析の結果、これらの N 端残基は何れも MMP-2

の 30 残基目にあたる Ala の可能性が示唆された。尚、MMP-2 の 1-29 残基はシグナルペプチドである。MMP-2 については、トリプシンによる N 端のプロペプチドドメイン切断にて 62kDa 型が生成された後、C 端のヘモペキシン様ドメイン切断にて 56kDa, 52kDa, 50kDa 型が生成されるとの報告もある (Lindstad, R.I., et al, *J. Mol. Biol.*, 350, 682 (2005))。潜在型 MMP-2 は 72kDa と報告されている。本研究に使用している気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる 62 及び 56kDa MMP-2 は、N 端のプロペプチドドメインを残したまま C 端のヘモペキシン様ドメインを 10 及び 16kDa 切断したものであるかもしれない。そしてこの考察は MMP-2 のプロペプチド領域を認識する抗体を用いて同細胞培養上清のウェスタンブロッティングを行った結果、56kDa の蛋白質バンドのみが認められたことにより支持された (data not shown)。

気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる 56 及び 62kDa プロテアーゼの N 端候補配列は、公表されているヒト MMP-2 の配列 (30-39 残基) と 32 残基目の Ser (Ser 32) のみ一致せず、その候補残基として Leu を示した。ヒト MMP-2 の Ser 32 をコードする DNA 配列は TCG (405-407, NCBI NM_004530.4) であり、これは Leu をコードする DNA 配列のひとつ: TTG と一塩基異なる。G=C→A=T 変異はヒトの細胞や癌細胞で最も頻発する点突然変異と報告されていることから (Lutsenko, E., Bhagwat, A.S., *Mutat. Res.*, 437 (1999), Parry, T.E., *Leuk. Res.*, 30 (2006))、本研究で用いた気管支平滑筋細胞の DNA においてもこの点突然変異が起こっているのかもしれない。

E. 結論

気管支平滑筋細胞による MMP-2 等のプロテアーゼ分泌が、喘息患者の気管支における本細胞の結合組織への遊走を支持し、リモデリング形成に寄与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- Involvement of fibronectin and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell migration for the process of airway remodeling Allergology International (印刷中)

2. 学会発表

- 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マトリックスメタロプロテアーゼの関与
第59回日本アレルギー学会秋季学術大会
(2009年10月31日)

H. 知的財産権の出願・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 |

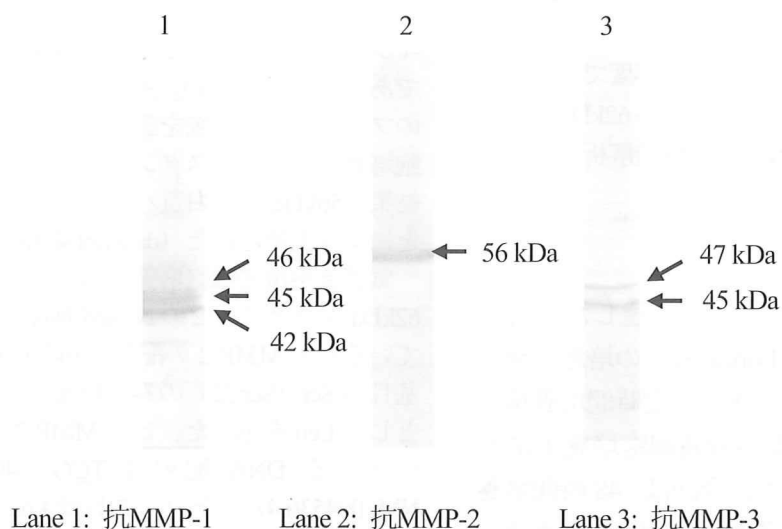
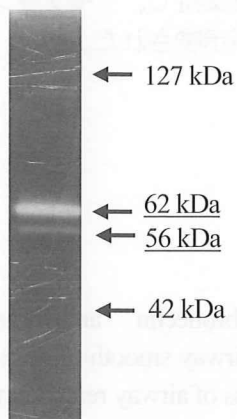


Fig. 1 マトリックスメタロプロテアーゼ抗体を用いた気管支平滑筋細胞培養上清のウエスタンブロッティング

(a) ゼラチン
ザイモグラフィ



(b) N末端一次構造解析

	N末端からの残基数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
62kDa プロテアーゼ	A	P	<u>L</u>	P					
56kDa プロテアーゼ	A	P	<u>L</u>	P	I	I	K	F	P	G
	30									39
MMP-2	A	P	<u>S</u>	P	I	I	K	F	P	G

Fig. 2 ゼラチンザイモグラフィで認められた気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる56及び62kDaプロテアーゼとそれらのN末端一次構造解析結果

分担研究者 藤澤隆夫 国立病院機構三重病院臨床研究部長

研究要旨

重症喘息では、正常な炎症終息機構の逸脱により、気道炎症が遷延化した状態が存在する。とくに気道感染による増悪が問題となっている。これまでウイルス感染で気道上皮から遊離される TSLP の好酸球への直接作用を明らかにしてきたが、今年度は細菌感染に着目して、好酸球との相互作用について検討した。好酸球は細菌を貪食後に機能発現した。まず、好酸球は高病原性の *Clostridium difficile* に反応して、プロバイオティクスとされる *Bifidobacterium bifidum* より有意に高度の脱顆粒を起こした。逆に後者によっては、免疫抑制性の TGF- β を産生した。*Staphylococcus aureus* によって活性酸素産生、脱顆粒が誘導され、IL-5 と IL-17 による早期の相乗的増強が認められた。以上、好酸球は細菌に対する生物活性発現を通して、重症喘息の病態に関わる可能性がある。

研究協力者

平口雪子 国立病院機構三重病院臨床研究部
研究員
細木興亜 国立病院機構三重病院小児科
医師

ことを明らかにしてきた。今年度は、喘息重症化の重要な要因のひとつである細菌感染に注目して、好酸球の細菌に対する反応性を解析した。細菌感染と好酸球性炎症との関連では腸管、皮膚、気道という3つのモデルを想定して、*in vitro* の実験系で検討を行った。

B 研究方法

好酸球は正常ボランティア及びアレルギー疾患患者の末梢血から CD16 negative selection 法により精製した。細菌に対する好酸球の反応性を解析するモデル確立のため、容易に入手しやすい腸内細菌である *Clostridium difficile*(CD) と *Bifidobacterium bifidum*(BB) を用いた実験を行った。続いて重症喘息患者で高頻度に合併する鼻茸に colonize する *Staphylococcus aureus* (SA) を用いた。それぞれの細菌は加熱処理を行い、各種濃度で添加して、好酸球からの活性酸素産生、脱顆粒のマーカーとしての EDN 遊離、サイトカイン産生を定量した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫染色による形態的観察も行った。加熱処理により細菌は死滅するが、細胞形態は保持されていることを確認した。

A 研究目的

重症喘息は炎症の観点からは、高用量のステロイドによっても気道粘膜の著しい好酸球浸潤が制御しがたいタイプと、好中球などの他の炎症細胞浸潤が著しいタイプ、のふたつの亜型に分類できる。前者については、ステロイド不応となった活性型好酸球の性質を解明することが新規治療開発につながり、好酸球が関与しないかにみえる後者に対しても、早期介入による好酸球制御を行えば、好酸球が誘導するリモデリングや好中球炎症への進展を防ぎ、重症化の予防が可能である。これまでに、私たちは好中球由来プロテアーゼ、およびウイルス感染時に気道上皮から産生される Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が好酸球を直接刺激して、難治性といわれる非 Th2 型炎症誘導に関わるサイトカイン産生をおこす

さらに T 細胞の機能制御に関わる indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 産生も定量した。

C 研究結果

(1) 好酸球による細菌の貪食

好酸球と各種細菌を培養すると、これらを貪食することを観察した。まず、細菌の 16S rRNA に対して蛍光 in situ hybridization を行って標識 (Cy3)、好酸球は自家蛍光 (FITC) を利用して、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、図 1 のように 2 時間の培養で好酸球が細菌を貪食することが観察された。用いたすべての菌で同様の所見が得られた。

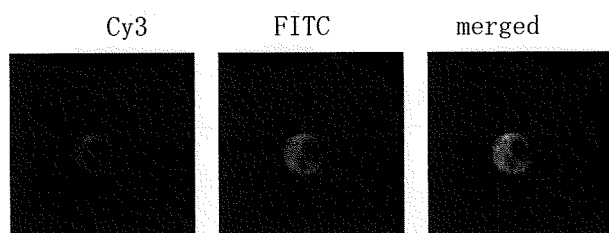


図 1 好酸球の細菌貪食

(2) CD と BB による活性酸素産生

腸管における病原性の CD とプロバイオティクスといわれる BB による好酸球活性酸素産生について検討したが、わずかな反応のみで有意差は認められなかった。

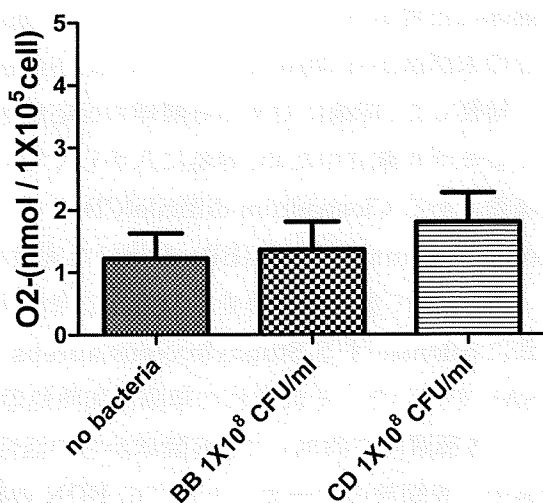


図 2 BB と CD による活性酸素産生

(2) CD と BB による脱顆粒

次に、好酸球脱顆粒の指標として EDN 遊離を測定したところ、CD、BB ともに脱顆粒を誘導したが、CD は BB よりも有意に高値であった (図 3)。さらに、GM-CSF あるいは TNF- α によるプライミングによって、CD 誘導脱顆粒はさらに増強されるのに対して、BB 誘導脱顆粒は影響を受けなかった (図 4)。

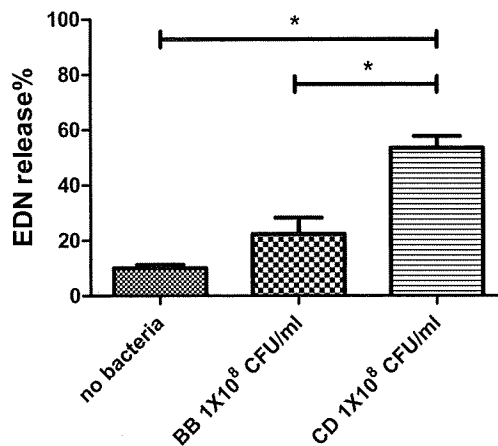


図 3 CD と BB による EDN 遊離

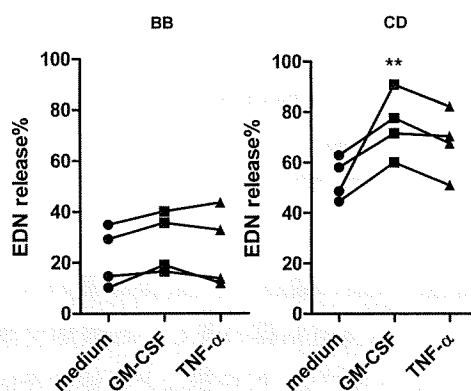


図 4 サイトカインによる EDN 遊離増強

(3) CD と BB による TGF- β 産生誘導

次に、両細菌による好酸球からのサイトカイン産生とくに TGF- β について検討を行ったところ、BB は CD よりも有意に多くの TGF- β 産生を引き起した。

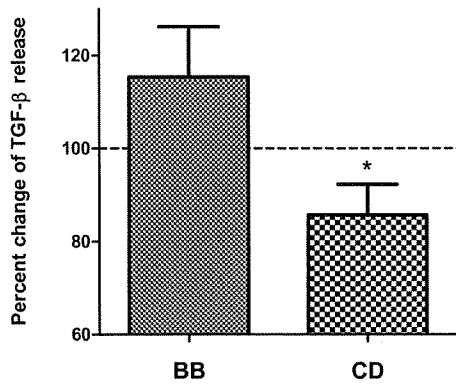


図4 BBとCDによるTGF-β産生

(4) SAによる活性酸素産生

次に、SAによる好酸球のエフェクター機能発現について検討したところ、まず、SAは好酸球より活性酸素産生を誘導した(図5)。

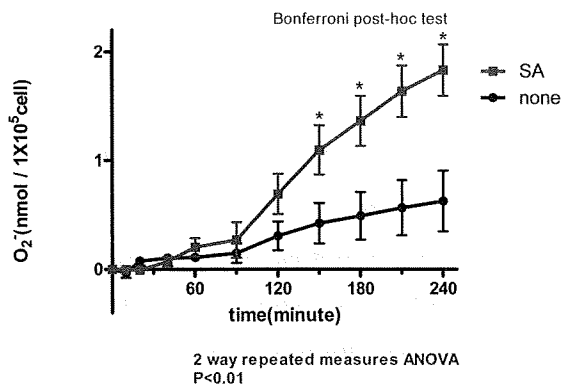
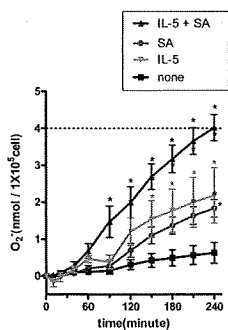
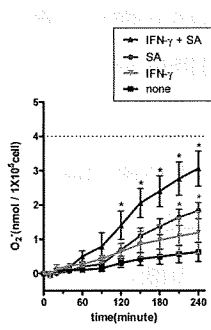


図5 SAによる活性酸素産生

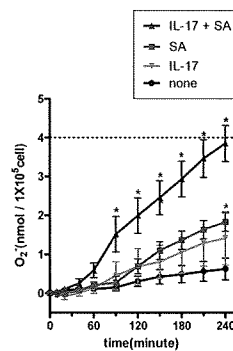
この反応はIL-5, IFN-γ, IL-17によってそれぞれ有意に増強されたが(図5 ABC)、とくにIL-5とIL-17は早期に相乗的な増強効果を及ぼした(図5 CD)。



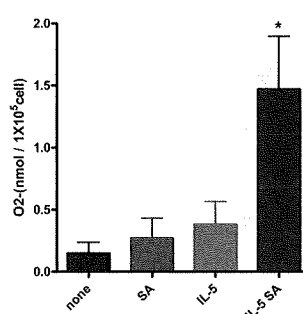
A) IL-5



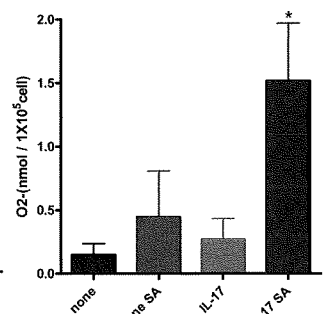
B) IFN-γ



C) IL-17



D) IL-5



E) IL-17

図5 サイトカインによるSA誘導活性酸素産生の増強

(4) SAによる脱顆粒

さらに、好酸球をSAと培養すると、有意なEDN遊離が誘導された(図6)。この反応はEGTAにより抑制されるため、カルシウム依存性であることを確認した。TLR2, TLR4に対する抗体では抑制されなかったが、脂質メディエーターである血小板活性化因子(PAF)受容体に対する抗体で有意に抑制され、SAはPAFと共通に認識される可能性が示唆された。

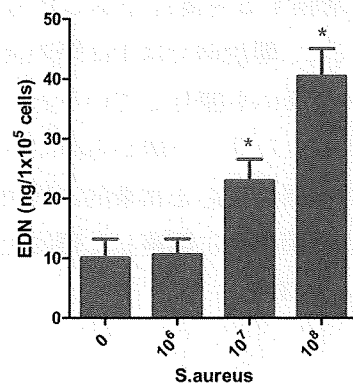


図6 SAによる好酸球脱顆粒

D 考察

ウイルス感染が喘息の増悪に関与することはよく知られているが、細菌感染も重要な役割を果たすことが考えられる。しかし、いくつかの疫学データは菌の種類により異なるアウトカムがおこることを示されている。好酸球は気道炎症のエフェクターであるとともに、第一線の自然免疫機構の中で、喘息の増悪あるいは生体防御に機能する可能性がある。そこで、各種細菌と好酸球の相互作用を *in vitro* で検討し、自然免疫における好酸球の役割、喘息病態への関与について明らかにすること、とくに難治性喘息に認められる遷延性の好酸球性炎症発症機構を細菌感染の面から解明するために、検討を行った。

まず、腸管における病原性の *Clostridium difficile* とプロバイオティクスである *Bifidobacterium bifidum* の比較を行ったところ、両者が脱顆粒を誘導するが、病原性の CD がより強く誘導することを明らかとした。好酸球は異なる細菌に対して、異なる機能を発現することを示す結果であり、興味深い。腸内細菌叢のバランスが免疫反応に及ぼす影響の一端を明らかにできたと考える。

次に、*Staphylococcus aureus* に対する好酸球のエフェクター機能は活性酸素産生と脱顆粒が誘導されることを明らかとした。重症喘息では多くの例で鼻茸を合併しているが、鼻茸には多くの SA が存在することが明らかにされており、かつ好酸球の浸潤も著しい。本研究の結果は、そのような病態において、好酸球が SA に直接反応して炎症を増強する可能性を示したものと考えられる。とくに、難治例では Th2 型の炎症だけでなく、Th17 型反応も関与しているといわれるが、感染時に Th17 リンパ球から産生される IL-17 が SA と好酸球の反応を相乗的に増強したことは興味深い。細菌感染に関連した難治化の病態を示唆するものである。

E 結論

好酸球は細菌に対する生物活性発現を通して、重

症喘息の病態に関わる可能性が示された。

F 研究発表

論文

1. Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kouno K, et al. Antigen-Induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol Int* 2009; 58:193-9.
2. Fujisawa T, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui S, et al. Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis. *Allergol Int* 2009; 58:163-70.
3. Fujisawa T, Nagao M, Hiraguchi Y, Katsumata H, Nishimori H, Iguchi K, et al. Serum measurement of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 in children with atopic dermatitis: elevated normal levels in infancy and age-specific analysis in atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20:633-41.
4. 細木興亜, 長尾みづほ, 平口雪子, 徳田玲子, 藤澤隆夫. RSウイルス感染症入院例における退院後の喘鳴についての検討. *アレルギー* 58:1521-1529. 2009.
5. 藤澤隆夫. 小児気管支喘息の病態生理. *小児科臨床* 62(3), 383-388, 2009

G 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

好塩基球を対象とした重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究

研究分担者 大田 健 帝京大学医学部内科 教授

研究協力者 山口正雄 帝京大学医学部内科 准教授

研究要旨

重症・難治性喘息の病態・病態解明は、患者自身の生命予後およびQOLの改善のためにも医療経済の面でも重要である。重症喘息において非アトピー型の比率が高い一方、吸入抗原への過敏を示すアトピー型重症喘息において抗IgE療法が施行されて有効性が報告されており、IgE自体が病態に関わっていることもまた明らかとなっている。我々はアレルギー性炎症細胞のうちでも、好塩基球を対象としてin vitroでIgE架橋依存性の機能解析を行った。好塩基球は、IgEおよびFcεRI依存性に活性化を起こすだけでなく、IgE・FcεRI非依存性刺激(MCP-1、FMLPなど)で生ずる活性化に先立って、好塩基球をあらかじめ微弱なIgE・FcεRI依存性刺激(CRA抗体 1ng/ml以下)を行っておくことが増強作用を発揮した。また、細胞前処理2時間に延長した後も反応性増強状態が保たれ、このような好塩基球の活性化増強効果は脱顆粒だけでなくLTC₄産生においても認められた。これらの結果から、微弱なIgE・FcεRI依存性刺激が脱顆粒・ロイコトリエン産生増強作用(priming)を発揮することが判明した。抗原が好塩基球機能に対して補助的に作用して機能増強を来するという新たなメカニズムの存在が想定され、喘息重症化の要因の1つとして臨床的にも関与しているものと考えられた。

A.研究目的

重症・難治性喘息の病態・病態解明は、患者自身の生命予後およびQOLの改善のためにも医療経済の面でも重要である。重症喘息において非アトピー型の比率が高いことが判明しているが、その一方、吸入抗原への過敏を示すアトピー型重症喘息において抗IgE療法が施行されて有効性が報告されており、IgE自体が病態に関わっていることもまた明らかとなっている。我々はアレルギー性炎症細胞のうちでも、IgEを細胞表面に多数結合していることから抗IgE療法のターゲット細胞の1つとして明らかに重要性が高いと想定される好塩基球を対象としてin vitroでIgE架橋依存性の機能解析を行い、今回はIgEと炎症との関わりについて新たな視点からの検討を試みた。

B.研究方法

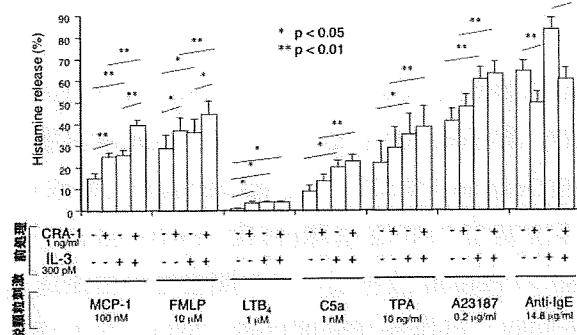
健康人から書面の承諾を頂いた上で18-

45mlの静脈血採血を行った。血液の1/9量のEDTA溶液(0.1M)を混合した後、低純度好塩基球(Dextranを添加し、上層の白血球を回収)、中等度純度の好塩基球(密度1.070および1.080のPercoll液を用いて中間密度の白血球層を回収。好塩基球純度は約15%)、および高純度好塩基球(Percoll純化に加えてMACSを施行。好塩基球純度は95%以上)を得て実験に供した。具体的にはデータ解釈に支障のない範囲で低い純度の細胞を用い、得られたデータは高純度細胞でも同等の結果が得られる確認を行う流れとした。好塩基球に対して、抗原あるいはIgEやFcεRIを架橋する抗体試薬による刺激と炎症性サイトカイン(好塩基球の脱顆粒活性を有するMCP-1など)の刺激を加えた。IgE・FcεRI依存性刺激を受けた際に活性化以外のメカニズムを好塩基球が有しているのではないかとの仮説の下、活性化状態の変化を詳細に解析した。

C. 結果

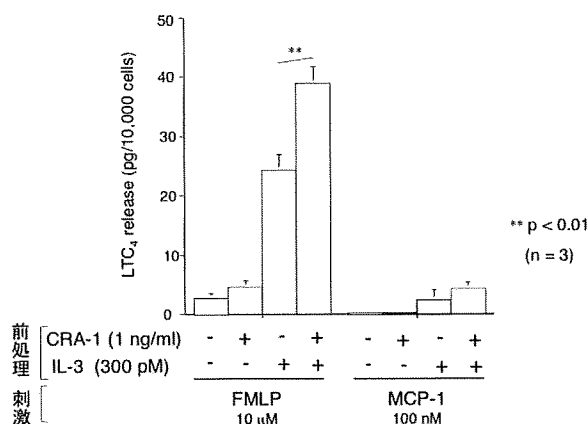
好塩基球は、IgE および FcεRI 依存性に活性化を起こすことは当然であるが、それだけでなく、IgE・FcεRI 非依存性刺激(MCP-1、FMLP など)で生ずる活性化に関して、好塩基球をあらかじめ微弱な IgE・FcεRI 依存性刺激を行っておくことが増強作用を発揮した。具体的には抗 FcεRI 抗体(CRA-1)の 1ng/ml 以下という低濃度にて好塩基球を処理しておくとそのみでは脱顆粒に至らないが、それに続く MCP-1 や FMLP 刺激による脱顆粒が増強した。好塩基球の様々な機能に対しては IL-3 が増強作用をもつことが知られているが、抗 FcεRI 抗体低濃度の作用は IL-3 による priming と相加効果がみられたことから、細胞内で両者は別個のメカニズムで好塩基球の反応性増強に関わっているものと考えられた。

CRA-1抗体前処理によるヒスタミン遊離の変化



このような抗 FcεRI 抗体の反応増強作用は抗体濃度が 10ng/ml 以上に高まると却って弱まることから、低濃度であることが極めて重要と考えられた。また反応増強効果の持続時間については、15~20 分で完結する脱顆粒とは異なり、細胞前処理 2 時間に延長した後でも反応性増強状態が保たれた。このような好塩基球の活性化増強効果は脱顆粒だけでなく LTC₄ 産生においても認められた。

CRA-1抗体前処理がLTC₄産生に及ぼす影響



D. 考察

ヒト好塩基球を活性化する刺激として大きく IgE・FcεRI 依存性刺激と IgE・FcεRI 非依存性刺激があり、I 型アレルギーの機序としてもつばら前者が中心的メカニズムと考えられている。しかし、本研究の結果から、IgE・FcεRI 非依存性活性化に対して微弱な IgE・FcεRI 依存性刺激が脱顆粒・ロイコトリエン産生増強作用(priming)を発揮することが判明した。我々は既に微弱な IgE・FcεRI 依存性刺激が好塩基球の遊走や活性化マーカー CD69 発現に対しても増強作用を示すことを報告しており、本研究の結果も総合すると、抗原刺激は直ちに強力に好塩基球を活性化するだけの作用ではなく、微弱な抗原刺激が様々な好塩基球機能を増強するという増強現象も存在するものと考えられる。

E. 結論

喘息の増悪および重症化に関わる様々な因子(抗原や各種炎症性メディエーター)に関して、抗原と好塩基球機能との関わり観点から解析し、抗原および IgE の作用に関して既知の好塩基球即時活性化以外の時相の反応も存在することを示した。抗原が好塩基球機能に対して補助的に作用して機能増強を来するという新たなメカニズムの存在が想定され、喘息重症化の要因の 1 つとして臨床的にも関与しているものと考えられた。

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Ohta K, Miyamoto T, Amagasaki T, Yamamoto M: 1304 Study Group. Efficacy and safety of omalizumab in an Asian population with moderate-to-severe persistent asthma. *Respirology*. 2009; 14(8): 1156-1165.
- 2) 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*. 2009; 149 Suppl1: 45-50.
- 3) Fujisawa T, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui S, Masuda S, Shinoda M, Hashiguchi A, Yamaguchi M: Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis. *Allergol Int*. 2009; 58(2): 163-170.
- 4) Suzukawa M, Yamaguchi M, Iikura M, Koketsu R, Komiya A, Nagase H, Nakae S, Matsumoto K, Saito H, Matsushima K, Yamamoto K, Ohta K: IL-33-induced activation of human basophils and eosinophils via ST2. *Inflammation and Regeneration*, in press.
- 5) 社団法人日本アレルギー学会喘息ガイドライン専門部会：大田健、秋山一男、西間三馨（監修）『喘息予防・管理ガイドライン 2009』作成委員（作成）. 喘息予防・管理ガイドライン 2009. 協和企画
- 6) 杉山公美弥、相良博典、足立満、美濃口健治、田中明彦、井上洋西、山内広平、小林仁、秋山一男、釣木澤尚実、谷口正実、棟方充、斉藤純平、佐藤俊、三嶋理晃、新実彰男、松本久子、大田健、足立哲也、長瀬洋之、中島裕史、加々美新一郎、岩本逸夫、福田健：気管支喘息の早期診断基準の提言. *アレルギー*. 2009; 57(12): 1275-1283.
- 7) 大田健：喘息死ゼロを目指して. *日本内科学会雑誌*. 2009; 98 Suppl 1: 90-91.
- 8) 宮本昭正、秋山一男、足立満、井上洋西、大田健：成人気管支喘息に対するモメタゾンフランカルボン酸エステル吸入用散剤とフルチカゾンプロピオン酸エステル吸入用散剤との非盲検、非劣性比較試験. *アレルギー・免疫*. 2009; 16(5): 716-731.
- 9) 宮本昭正、秋山一男、足立満、井上洋西、大田健：成人気管支喘息に対するモメタゾンフランカルボン酸エステル吸入用散剤長期投与時の安全性および有効性の検討 他剤吸入ステロイド薬を使用した中等症患者を対象とした 52 週間長期投与試験. *アレルギー・免疫*. 2009; 16(5): 732-745.
- 10) 大田健：世界のガイドラインにおける治療戦略(GINA、JGL) 成人. *医薬ジャーナル*. 2009; 45(5): 1349-1357.
- 11) 大田健：喘息予防・管理ガイドライン 2006(JGL2006). 成人病と生活習慣病. 2009; 39(6); 671-675.
- 12) 大田健：美濃口健治：喘息コントロールの理想と現実 医師と患者を対象にしたインターネットによる検討 ACTUAL-I: A Clinical survey To Understand real Asthma Life for Patients-I. *アレルギー・免疫*. 2009; 16(9): 1430-1440.
- 14) 長瀬洋之、山下直美、大田健：喫煙曝露がアレルギー性気道炎症と気道過敏性に及ぼす影響 喘息モデルマウスにおける検討. *Topics in Atopy*. 2009; 8(1): 46-52.
- 15) 大田健：アレルギー疾患の現況と今後の展望 特に喘息を中心に. *日本臨床*. 2009; 67(11): 2033-2038.
- 16) 大田健：気管支喘息ガイドライン 2009. *呼吸*. 2009; 28(10): 974-980.
- 17) 大田健：喘息の克服を目指して. *アレルギー*. 2009; 58(11): 1497-1501.

- 18) 山口正雄：胸部 X 線が注意を引いた膠原病症例/この 1 週間呼吸困難感が強いと訴えた気管支喘息症例/両側下腿浮腫と膝関節違和感で来院した若い女性例. 診断力をみがく イメージトレーニング. 内科. 2009: 103(5): 953-958.
- 19) 山口正雄：アレルギー検出法と皮膚反応. 看護学のための最新医学講座 監修 日野原重明、井村裕夫. 第 2 版 第 11 巻 免疫・アレルギー疾患. P96-101. 中山書店. 2009.
- 20) 山口正雄、大田 健：7) 吸入ステロイド薬の併用薬の選択順位とその効果のエビデンスは？. p33-36. EBM アレルギー疾患の治療. 中外医学社. 2009.
- 21) 山口正雄：アナフィラキシー (p243-244)、血清病 (p244-245)、薬物アレルギー (p245-248). 内科学書. 改訂第 7 版. 中山書店. 2009.
- 22) 山口正雄：気管支喘息. p927-931、老年病学. 第 3 版. 東京大学出版会. 2010.
2. 学会発表
- 1) 大田健：成人喘息に対する生物学的製剤の有効性. 第 21 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009：岐阜.
- 2) 大田健：日本人成人気管支喘息に対するブデソニド/ホルモデロール配合剤の第三相無作為化二重盲検比較試験結果. 第 21 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009：岐阜.
- 3) 大田健、足立満、秋山一男、井上洋西、宮本昭正：成人気管支喘息に対する Mometasone Furoate(MF)-DPI の長期投与時における安全性および有効性の検討. 第 21 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009：岐阜.
- 4) 鈴木真穂、川上綾子、小宮明子、木村美和子、二藤隆春、山口正雄、山本一彦、大田健：喉頭ファイバー施行直後にアナフィラキシーを発症した 3 症例の検討. 第 21 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009：岐阜.
- 5) 大田健：喘息治療における抗体治療の位置づけ. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会. 2009：東京.
- 6) Maho Suzukawa, M Iikura, M Yamaguchi, R Koketsu, A Komiya, H Nagase, S Nagae, K Matsumoto, H Saito, K Matsushima, K Yamamoto, K Ohta: IL-33 induces human eosinophil and eosinophil activation via ST2. The 9th World Congress on Inflammation. 2009: Tokyo.
- 7) 大田健：各種喘息治療薬のガイドラインでの位置づけ. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009：秋田.
- 8) 大田健：アレルギー性鼻炎合併喘息全国実態調査 (第一報). 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009：秋田.
- 9) 大田健：気管支喘息ガイドライン. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009：秋田.
- 10) 長瀬洋之、平井浩一、山口正雄、大田健：Expression and Function of Toll-like Receptors (TLRs) in Allergic Inflammatory Cells. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009：秋田.
- 11) 瀬戸力也、山口正雄、川上綾子、鈴木真穂、小宮明子、関谷 剛、飯倉元保、長瀬洋之、山田浩和、松本健治、斎藤博久、羅 智晴、山本一彦、大田 健：低濃度抗 FcεRIα 抗体によるヒト好塩基球・マスト細胞の活性化制御. 第 19 回国際喘息学会日本北アジア部会. 2009：東京.
- 12) 山口正雄、長瀬洋之、川畑仁人、神田浩子、瀬戸力也、小宮明子、山本一彦、大田 健：自己免疫疾患に伴う著明な閉塞性呼吸機能障害：抗コリン薬吸入の持続的効果. 第 46 回日本臨床生理学会総会. 2009：盛岡.
- 13) 大田 健、山口正雄：シンポジウム IgE を介した即時型反応の意義 再考. 抗 IgE 抗体療法により解明されたこと-小児へ

の可能性も含めて-。第46回日本小児アレルギー学会。2009：福岡。

- 14) 山口正雄：シンポジウム アレルギー疾患の治療最前線と将来展望。IgE抗体療法を含めた抗体療法。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会。2009：秋田。
- 15) 山口正雄、鈴木真穂、瀬藤力也、長瀬洋之、大田 健：臨床・研究のための技術・技能プラクティカルセミナー3 ヒト好塩基球の分離と機能評価の実際。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会。2009：秋田。
- 16) 原 麻恵、長瀬洋之、小島康弘、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、鈴木直仁、工藤宏一郎、小林信之、大田 健：喘息治療ステップダウン成功予測因子としての呼気凝縮液/FeNOの検討。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会。2009：秋田。
- 17) 山口正雄、瀬藤力也、鈴木真穂、川上綾子、小宮明子、山田浩和、長瀬洋之、山本一彦、大田 健：病院スタッフを対象としたアナフィラキシー講習会：参加者

アンケートの結果。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会。2009：秋田。

- 18) 戸田貴子、長瀬洋之、鈴木真穂、原 麻恵、小島康弘、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、大田 健：Th17系サイトカインが好酸球からのサイトカイン放出に及ぼす影響。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会。2009：秋田。
- 19) 杉本直也、原 麻恵、中瀬裕子、戸田貴子、小島康弘、竹澤智湖、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、長瀬洋之、山口正雄、鈴木直仁、大田 健：トロポニンI値が心病変評価に有用であったChurg-Strauss症候群(CSS)の1例。第188回日本呼吸器学会関東地方会。2010：東京。

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許登録 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

マウス喘息モデルを用いた難治化・重症化因子の探索
—ダニ抗原誘発マウス喘息様病態形成に及ぼすウイルス感染様刺激の影響—

分担研究者 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 これまでの厚労科学研究において、室内環境因子の意義を明らかにする目的で、ダニ抗原による喘息様病態形成に及ぼす影響を検討し、マウスの気管内にダニ抗原粗抽出物をアジュバント非存在下にて反復投与することにより、気道過敏性、気管内好酸球増多、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇、BALF 中 Th2 サイトカインならびに TGF- β 1 産生の増加、気道上皮杯細胞の過増生・肥厚ならびに基底膜下の線維化形成を特徴とするマウス喘息モデルを確立することに成功した。また、近年、様々な疫学調査により、乳幼児期の RNA ウィルス感染が喘息発症に促進的にはたらくことが示唆されている。そこで当研究室のダニ喘息モデルを用いて喘息様病態形成に及ぼすウイルス感染の影響を検討することを目的に、二本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) をウイルス感染様刺激として用い検討した結果、poly IC の先行投与によりダニ抗原誘発気道炎症の増悪が認められた。しかしながら、その機序の詳細は不明である。

一方、ウイルス感染細胞の認識ならびに排除には CD8⁺ T 細胞が重要な役割を有すること、CD8⁺ T 細胞の遊走にロイコトリエン B₄(LTB₄)が BLT₁ 受容体を介して関与する可能性が推察されている。そこで本年度は、本モデルの機序解明を目的とし、CD8 および LTB₄ の意義を検討した。実験は、当教室のダニ抗原誘発マウス喘息モデルのプロトコールに準じて行った。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に poly IC を投与した後に、*Dermatophagoides farinae* (Der f) の粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。なお、今回用いたダニ抗原の用量は、それ自体でわずかに気道内好酸球増多が認められる程度の用量とした。抗 CD8 抗体は、poly IC 投与時およびダニ抗原投与時に計 5 回腹腔内投与した。また、LTB₄ 受容体である BLT₁ の拮抗薬は、poly IC 投与時およびダニ抗原投与時のそれぞれ前日、当日および翌日に経口投与した。また、最終抗原投与 48 時間後に、アセチルコリンによる気道収縮反応を測定し、その直後に右肺は気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、左肺は組織学的検討を行った。

Poly IC を初回ダニ抗原投与前に投与した場合、ダニ抗原単独投与に比し、喘息様病態形成の有意な増強が認められた。これに対し、抗 CD8 抗体は BALF 中総白血球数ならびに好酸球数の増加を有意に抑制した。また、BLT₁ 拮抗薬も好酸球数の増加を有意に抑制した。

以上の成績より、初回抗原曝露前にウイルス感染様刺激を加えると、喘息様病態形成が増強され、この反応は一部、CD8 および LTB₄ が関与している可能性が示唆された。今後、本反応の作用機序を解明することにより、ウイルス感染による喘息発症促進機序ならびに難治化機序を明らかにすることが可能であると思われる。

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）

A. 研究目的

近年、アレルギー疾患患者数は漸増し、また、その病態も難治化・慢性化している。その背景には、室外および室内環境因子の影響が無視できな

いが、詳細については不明な点が多い。そこで、平成 18 年度研究では環境因子による喘息発症率の漸増ならびに難治化原因を探求するモデル確立を企図し、ダニ抗原をマウス気管内に反復投与することにより、いわゆるアジュバントを用いることなく、気道リモデリングを含む喘息様病態モデルを作成することに成功した。また、前年度は従前より疫学調査などで発症促進ならびに難治化因子として注目されているウイルス感染の影響を、一本鎖 RNA ウィルスが増殖する際に産生する二本鎖 RNA の模倣品である 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方法により検討した。その結果、poly IC の先行投与によりダニ抗原により誘発される喘息様病態の有意な増悪が認められ、本反応は LPS/TLR4 に非依存的であり、一部のパラメーターはステロイド抵抗性を示すことが示唆された。

一方、ウイルス感染細胞の認識ならびに排除には CD8⁺ T 細胞が重要な役割を有すること、その遊走にロイコトリエン B₄(LTB₄) が BLT₁ 受容体を介して関与する可能性が推察されている。そこで本年度は、本反応の機序解明を目的とし、CD8 および LTB₄ の意義を検討した。

B. 研究方法

実験は当教室のダニ抗原誘発マウス喘息モデルのプロトコールに準じて行った。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に poly IC を投与した。その後、*Dermatophagoides farinae* (Der f) の粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。なお、今回用いたダニ抗原の用量は、それ自体でわずかに気道内好酸球増多が認められる程度の用量とした。抗 CD8 抗体(clone: 2.43)は、ATCC からハイブリドーマを購入後、ヌードマウスの腹水から精製し、poly IC 投与時およびダニ抗原投与時に計 5 回腹腔内投与した。また、LTB₄ の受容体 BLT₁ 受容体拮抗薬は、poly IC 投与時およびダニ抗原投与時のそれぞれ前日、当日および翌日に経口投与した。いずれの実験においても、最終抗原投与 48 時間後にアセチルコリンによる気道収縮反応を測定し、その直後に右肺は気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、左肺は組織学的検討を行った。(倫理面への配慮)

本研究における実験動物の取り扱いならびに

実験方法に関しては、本学動物実験委員会の承認を受け、その規約を遵守した。

C. 研究結果

Poly IC を先行投与し、その後、ダニ抗原を反復投与することにより、ダニ抗原少量単独投与群に比し、気道過敏性、気道内好酸球増多、Th2 サイトカイン産生などがいずれも有意に増悪した。これに対し、抗 CD8 抗体は、気道過敏性ならびに Th2/Th1 サイトカイン産生バランスには影響を及ぼさなかったが、BALF 中総白血球数ならびに好酸球数の増加を有意に抑制した。また、BLT₁ 拮抗薬も BALF 中好酸球数の増加を用量依存的かつ有意に抑制した。

D. 考察

本研究では、RNA ウィルスが産生する二本鎖 RNA の模倣品である poly IC による喘息様病態形成促進および難治化における CD8 および LTB₄ の意義を検討した。その結果、poly IC の先行投与による気道内総白血球数ならびに好酸球数の増加を抗 CD8 抗体は有意に抑制した。また、BLT₁ 拮抗薬は、気道内好酸球増を有意に抑制した。

周知のように CD8⁺ T 細胞はウイルス感染の際に感染細胞の認識ならびに排除に重要な役割を有していることが知られている。一方、近年、ウイルス感染などの刺激により、樹状細胞が外来抗原の提示を CD4⁺ T 細胞と同様に CD8⁺ T 細胞に対しても行うこと(クロスプレゼンテーション)が明らかになりつつある。本検討では、抗原曝露に先行してウイルス感染様刺激が宿主に入ることにより、喘息様病態形成が促進され、その一部に CD8⁺ T 細胞が関与することを明らかにした。従って、本モデルにおいても抗原提示の際に樹状細胞による CD8⁺ T 細胞へのクロスプレゼンテーションが行われた可能性が推察される。

さらに、LTB₄ が CD8⁺ T 細胞上に発現する BLT₁ を介して CD8⁺ T 細胞からの IL-13 産生を促進することがマウス喘息モデルを用いた検討により報告されており、ステロイド抵抗性喘息との関与も示唆されている。本検討では、poly IC 前処置によるダニ抗原誘発喘息様病態形成の促進機構に LTB₄ が関与することが明らかとなった。このことは、昨年度の検討において、poly IC 前処置による喘息様病態形成の促進作用がステロイド抵抗性であることも考え合わせると大変興味深い。今後、poly IC の受容体の解明を始めと

して、poly IC 前処置による喘息様病態形成の促進機序の解明と、ステロイド抵抗性の原因を探求する予定である。

E. 結論

ウイルス感染による喘息発症ならびに難治化の機序を解明するため、ウイルス感染様刺激である二本鎖 RNA の先行投与による喘息難治化における CD8 および LTB₄ の意義を検討した。その結果、抗 CD8 抗体および BLT₁ 拮抗薬の投与により好酸球性気道炎症の減弱が認められた。従って CD8⁺ T 細胞および LTB₄ がウイルス感染様刺激による気管支喘息の難治化・重症化の要因の一部であることが示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文

- 1) Fukuyama S, Nakao T, Matsumoto T, Oliver BGG, Burgess JK, Moriwaki A, Tanaka K, Kubo M, Hoshino T, Tanaka H, McKenzie ANJ, Matsumoto K, Aizawa H, Nakanishi Y, Yoshimura A, Black A, Inoue H. Pulmonary suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 induced by IL-13 regulates allergic asthmatic phenotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179: 992-998.
- 2) Suda M, Okuda T, Ishimura M, Kurokawa S, Tokuoka S, Nakamura T, Takahashi Y, Tanaka H, Nagai H. The effects of inhaled KP-496, a novel dual antagonist for cysteinyl leukotriene receptor and thromboxane A₂ receptor, on allergic asthmatic responses in guinea pigs. *Pharmacology* 2009; 84: 249-56.
- 3) Takahashi G, Tanaka H, Wakahara K, Nasu R, Hashimoto M, Miyoshi K, Takano H, Yamashita H, Inagaki N, Nagai H. Effect of diesel exhaust particles on house dust mite-induced airway eosinophilic inflammation and remodeling in mice. *J. Pharmacol. Sci.* (in press)
- 4) Komai M, Tanaka H, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Miura T, Ohashi H, Haba T,

Kawakami K, Sawa E, Yoshie O, Inagaki N, Nagai H. A novel CC-chemokine receptor 3 antagonist, Ki19003, inhibits airway eosinophilia and subepithelial/Peribronchial fibrosis induced by repeated antigen challenge in mice. *J. Pharmacol. Sci.* (in press)

2. 総説

1) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博弼: アレルギー性炎症におけるリモデリングのメカニズム. 臨床免疫・アレルギー科, 52; 58-63: 2009.

3. 学会発表

- 1) 田中宏幸, 高橋 剛, 若原恵子, 橋本未樹子, 三好康介, 山下弘高, 稲垣直樹, 永井博弼: 気道リモデリング形成における環境因子の役割. 第 29 回気道分泌研究会 (2009 年 4 月, 東京)
- 2) 田中宏幸: アレルギー反応とプロスタグランジン D₂. 第 9 回愛知成人喘息研究会 特別講演 (2009 年 9 月, 名古屋)
- 3) 田中宏幸: 環境因子による喘息様病態形成への影響—マウスモデルを用いた検討から—. 第 59 回アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム (2009 年 11 月, 秋田)
- 4) 土性千恵, 田中宏幸, 梶原 悠, 村田健司, 樋口純一, 江崎友哉, 柳楽庸史, 稲垣直樹, 永井博弼: ダニ抗原誘発マウス気道炎症における Protease-activated receptor (PAR) 2 の意義. 第 59 回アレルギー学会秋季学術大会 一般演題 (2009 年 11 月, 秋田)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

気管支喘息症の重症度に関連する酸化ストレス応答遺伝子と環境との相互作用機能

分担研究者 鳥帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究協力者 中村 裕之 金沢大学大学院医学系研究科環境生態医学・公衆衛生学教授

研究要旨 様々な好酸球関連蛋白遺伝子多型と気管支喘息症との間あるいは気管支喘息症との重症度との間の関連を調べることによって、重症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。本年度は、患者対照研究（相関解析）によって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NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1)とGlutathione S-transferase M1 (GSTM1)の遺伝子多型を、喫煙者と非喫煙者について重症（重症持続型としてJGL2006で規定されたStep 4の18人）、軽症（軽症間欠型、軽症持続型の30人）、および健常人（対照として50人）間で比較し、重症化におけるNQO1とGSTM1の役割について検討した。対象はすべて男性で、喫煙、非喫煙の割合は各群で差はなかった。相関解析によって、重症群のNQO1の遺伝子多型 Pro187SerおよびSer187Serの頻度が対照群に比べ有意に高い値を示した。喫煙者に限って分析したとき、重症群のNQO1の遺伝子多型であるnull型の頻度は対照群に比べ有意に高いことが認められた。以上の結果から、喘息症の重症化は、NQO1の遺伝子多型および喫煙とGSTM1の遺伝子多型との相互作用によって引きこされることが示唆された。その詳細な病態の解明が今後の課題である。

A 研究目的

気管支喘息症の発症および重症化に関わる遺伝子を同定することで、重症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、様々な好酸球関連蛋白遺伝子多型と気管支喘息症との間あるいは気管支喘息症との重症度との間に有意な関連を認め、さらにごく最近、酸化ストレス遺伝子のヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子多型と喫煙状況との相互作用を認めた。本年度は、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NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1)とGlutathione S-transferase M1 (GSTM1)の遺伝子多型を、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NQO1とGSTM1の役割について検討した。

B 研究方法

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。

対象はすべて男性で、重症持続型としてJGL2006で規定されたStep 4の18例（53.1±4.22歳、平均値±標準誤差）、軽症間欠型、軽症持続型(Step 1-2)の30例（48.3±2.94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（49.5±2.36歳）である。これらの3群の間に年齢差はなく、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(t検定)。また、3群の間には喫煙者と非喫煙者の割合に有意な差は認められなかった(χ^2 検定) (表1)。また、調べた遺伝子多型として(NQO1) (Pro187Ser)とGlutathione S-transferase M1 (GSTM1) (null/present)の有する人の割合を各群で調べた。

なお本研究テーマの「気管支喘息症の重症度に関わる遺伝子解析研究」は、広島大学医学部倫理委員会、金沢大学医学部等医の倫理委員会、高知大学医学部倫理委員会において承認を受け、それぞれの倫理委員会規則にしたがって実施された。

C 研究結果

相関解析によって、重症群のNQO1の遺伝子多型

Pro187SerおよびSer187Serを合わせた頻度66.7%が対照群の34.0%と比べ有意に高い値を示した。また、これらの関係はNQO1の遺伝子多型においては認められなかったが、喫煙者に限って分析したとき、重症群のNQO1の遺伝子多型であるnull型の頻度81.8%は対照群の43.3%に比べ有意に高いことが認められた（表2, 図1）。

表1 対象の特性(すべて男性)

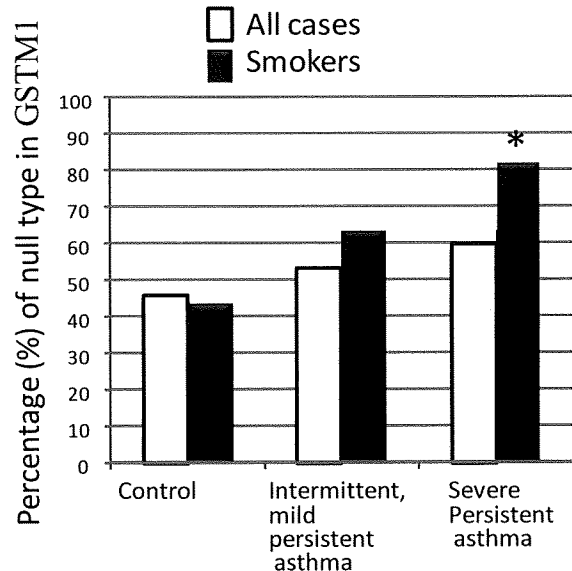
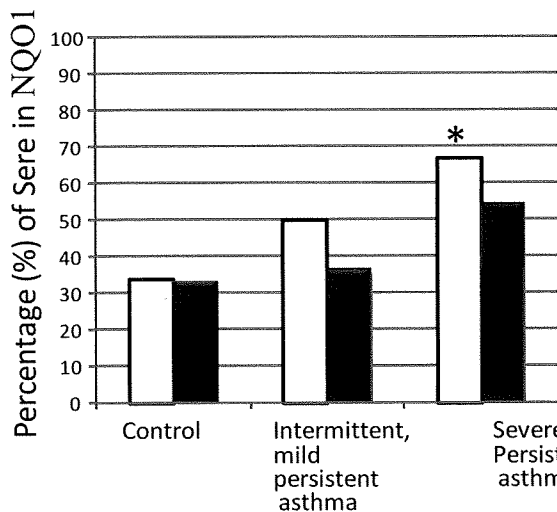
群	人数	(平均値±標準誤差)			
		年齢 (歳)	RIST (U/ml)	喫煙#1：非喫煙 (比)	合併症#2
対照	50人	49.5±2.36	76.0±12.5	27:23	(-)
軽症間欠型、軽症持続型 (Step 1-2)	30人	48.3±2.94	456±141**	16:14	(-)
重症持続型 (Step 4)	15人	53.1±4.22	503±112**	8:7	(-)

#1喫煙者には過去の喫煙者も含む。#2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NQO1とGSTM1遺伝子多型についての相関解析

Gene	Genotype Subgroup	Control (N=50)		Intermittent, mild persistent asthma (N=30)		Severe persistent asthma (N=15)	
		No	Frequency(%)	No	Frequency(%)	No	Frequency(%)
		NQO1	Pro/Pro	33(20)	66.0(66.7)	15(12)	50.0(63.2)
Pro/Ser, Ser/Ser	17(10)		34.0(33.0)	15(7)	50.0(36.8)	10(6)	66.7*(54.5)
GSTM1	Wild	27(17)	54.0(56.7)	14(7)	46.7(36.8)	6(2)	40(18.2)
	Null	23(13)	46.0(43.3)	16(12)	53.3(63.2)	9(9)	60(81.8*)

Figures in parentheses represents the number of the smoker males. Statistically significant difference as compared to the value of control: *p<0.05



Statistically significant difference as compared to the value of control: *p<0.05

D. 考察

大気汚染は気管支喘息などのアレルギー性疾患の昨今の増加の重要な環境因子である。宿主側の重要な因子として酸化ストレス応答遺伝子の多型が、大気汚染物質に対する炎症反応の感受性を決定することが指摘されている。本相関解析によって、NQO1の遺伝子多型 Pro187Serおよび Ser187Serと喘息症の重症化との関係が認められた。したがって喘息症の重症化は、NQO1の遺伝子多型に大きく依存しているのは、治療の抵抗性と関係があると推測された。

喫煙者あるいは過去の喫煙者においてのみ、GSTM1の遺伝子多型null型が喘息症の重症化との関係が示された。したがって喫煙とGSTM1の遺伝子との相互作用によって引きこされると示唆された。ニコチンなどの代謝における抗酸化ストレス応答活性の低下が喘息の重症化に寄与していると推測された。

D 結論

以上の結果から、喘息症の重症化は、NQO1の遺伝子多型および喫煙とGSTM1の遺伝子多型との相互作用によって引きこされることが示唆された。その詳細な病態の解明が今後の課題である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura T, Yokoyama A, Kohno N, Nakamura H, Eboshida A. Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma. *Allergol Int.* 2009 Mar;58(1):71-9.

日本語版自覚ストレス調査票の短縮版作成のための検討 (木村友昭, 津田康民, 内田誠也, 岩橋成寿, 烏帽子田彰, 山岡淳) *Research Reports From The MOA Health Science Foundation Vol.12* p21-25 2009

多様な温泉療法についての文献調査 (鏡森定信, 王紅兵, 烏帽子田彰) *環境省業務報告書平成20年度温泉利用に関する揭示内容等についての医学的検討調査 2009年* 研究代表者: 猪熊茂子 p147-155

アレルギー報告書 2009 (烏帽子田彰)

全国市町村における筋力トレーニング事業の実施の有無に影響する要因 (清水滉一, 横山典子, 村上晴香, 烏帽子田彰, 久野譜也) *日本臨床スポーツ医学会誌 Vol.17, No.2, 2009* p324-331

温泉療法を主体とした他療法との併用効果 2009
(王紅兵, 烏帽子田彰, 鏡森定信)

2. 学会発表

気管支喘息症の重症度に関連する酸化ストレス遺
伝子と環境との相互作用機能 (烏帽子田彰, 中村
裕之) 平成20年度 厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
研究報告会抄録集 p11,2009.1 東京

地域・職域保健の連携における保健所の取り組み
—事業所の健康調査と連携活動の実践— (小林敏

生, 荒木善光, 烏帽子田彰, 上野直美, 桐山美紀
子, 岡野吉晴, 新開洋一) 第68回日本公衆衛生学
会総会 (奈良)

アレルギーと都市環境 (講演: 烏帽子田彰) 2009.6.5
広島ロータリークラブ

H. 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