

6群での有意差はなかった。また eoxin C4 濃度は、CysLTs 濃度や 15-HETE 濃度よりも数 10 分の1程度の濃度であり、有意に低濃度であった。

・図 3 は BALF 中の eoxin C4、CysLTs、15-HETE 濃度と好酸球性%の相関をみたものである。15-HETE は好酸球性炎症との関連が示唆されたが、CysLTs、eoxin C4 との関連は認めなかった。

#### D. 考察

今回はじめて、ヒト検体において eoxin C4 を同定した。今回の結果では、CysLTs 濃度と 15-HETE は相関し(図なし)、15-HETE と BALF 中好酸球%は強く相関したが、eoxin C4 は、BALF 中非常に低濃度で病態との関連も認めなかった。今後、さらなる症例集積が必要である。

#### E. 結論

ヒト BALF 中に新規好酸球活性化メディエーターである eoxin C4 が同定できることをはじめて証明した。しかし、その濃度はきわめて低く、その意義解明にはさらなる検討を要する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

別添3「総括研究報告書」

研究発表 1. 論文発表参照のこと

##### 2. 学会発表

別添3「総括研究報告書」

研究発表 2. 学会発表参照のこと

#### 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:HPLCによるeoxin C4、D4、E4、CysLTsの分離

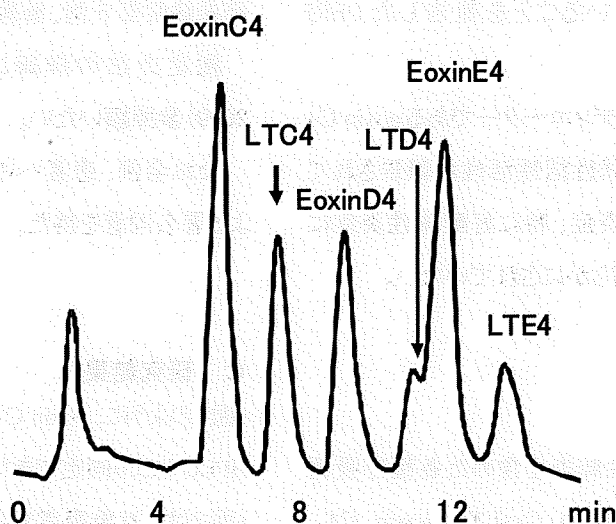
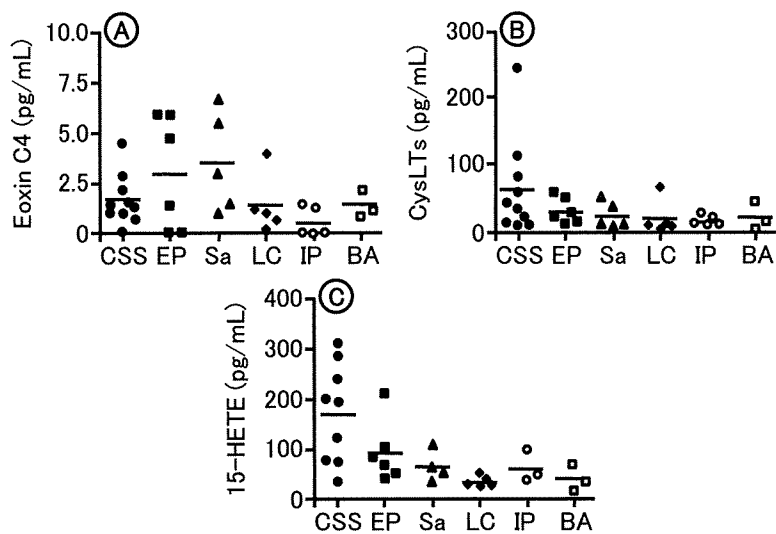
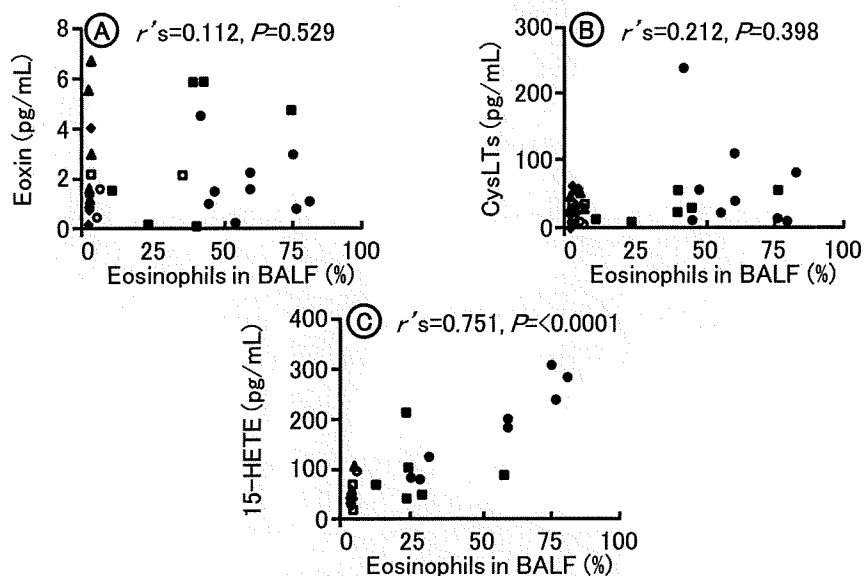


図2: 6群におけるBALF中のeoxin C4、CysLTs、15-HETE濃度



E. Ono et al. *Clinical & Experimental Allergy*, 2009 (39) 1348-1352.

図3: BALF中eoxin C4、CysLTs、15-HETE濃度とBALF好酸球%の関連



E. Ono et al. *Clinical & Experimental Allergy*, 2009 (39) 1348-1352.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

気道および全身における好酸球活性化のメカニズムの研究

研究分担者 森 晶夫 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 先端技術開発研究部長  
研究協力者 北村紀子 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 研究員  
山口美也子 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 研究員  
安部 暁美 国立病院機構相模原病院臨床研究センター リサーチレジデント  
神 沼 修 東京都臨床医学総合研究所 主任研究員

**研究要旨：**  
慢性好酸球性肺炎（以下 CEP）の病因・病態には未だ不明な点が多く、病態解明が進めば根治的治療や標準的治療法の開発につながるものと期待されている。CEP の主たる炎症の場である肺胞を反映すると考えられる BALF および全身の免疫異常を反映する末梢血中の T 細胞サイトカイン産生、活性化マーカーにつき解析した。CEP 症例の治療前には、末梢血中 T 細胞の IL-5 産生が著しく亢進していた。ステロイド治療は、好酸球数を減少させるのみならず、T 細胞 IL-5 産生も低下せしめた。CEP 病態には、T 細胞レベルの免疫応答異常が関与する可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

慢性好酸球性肺炎（以下 CEP）の病因・病態には未だ不明な点が多く、病態解明が進めば根治的治療や標準的治療法の開発につながるものと期待されている。研究レベルでは、好酸球性炎症は T 細胞依存性であることが知られており、殊に IL-5 は好酸球特異的な活性化因子として重要視されている。われわれは、これまでに気管支喘息患者の末梢血、bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 細胞を用いた、T 細胞サイトカイン産生を解析してきた。今回、谷口班の研究の一環として、CEP の主たる炎症の場である肺胞を反映すると考えられる BALF および全身の免疫異常を反映する末梢血中の T 細胞サイトカイン産生、活性化マーカーにつき解析する。病勢把握のためのバイオマーカーが明らかとなり、よりの確な診断と管理が可能となるとともに、新規治療薬（抗 IL-5 抗体、スプラダスト）の再燃予防効果の前向き検討にも役立つものと期待される。

**B. 研究方法**

対象症例、臨床検査

国立病院機構相模原病院アレルギー科外来に通院中または入院中の成人症例より、インフォームドコンセントを得たうえで対象とした。アセチルコリン、ヒスタミンに対する気道過敏性の測定、

および抗原吸入負荷試験は、日本アレルギー学会の標準法によって行った。β 刺激剤、テオフィリン剤、インターール、抗コリン剤、ベクロメサゾン吸入は、12 時間以上、抗ヒスタミン剤、ステロイド剤は 24 時間以上中止した。アトピー型は、吸入アレルゲン 20 種を含む皮膚テストにおいて、一つ以上の陽性を示すものと定義した。非アトピー型は皮膚テスト陰性のものとした。

細胞培養およびアッセイ

ヘパリン採血の後、Ficoll-paque 比重遠心法にて末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を得、 $2 \times 10^6/\text{ml}$  の濃度にて、AIM-V 培地に懸濁した。20 nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と  $1 \mu\text{M}$  の ionomycin (IOM) で 24 時間刺激した後、上清をハーベストした。一部の well は、抗 CD3 抗体 (OKT3、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で coat し、固相化抗 CD3 抗体刺激に用いた。抗 CD28 抗体は、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  で培養中に添加した。

FACS 解析

リンパ球活性化マーカーとして、CD3、CD4、CD8 陽性細胞における、CD25、CD69 の陽性率を、負荷前後で比較する。上記の末梢血単核球を FITC

あるいはPEラベル抗体で2重染色し、FACS測定する。

#### (倫理面への配慮)

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って研究者の施設における倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論する最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

### C. 研究結果

CEP症例1の末梢血単核球およびBALF細胞のサイトカイン産生につき解析した。まず、治療前のPBMCおよびBALF細胞の24時間培養上清中のサイトカイン値を測定した。予想通り、IL-5産生は、PBMCで342 pg/mlと健常人(< 20 pg/ml)のレベルに比べて10倍以上高かった。特筆すべきは、BALF細胞サイトカイン産生について、無刺激(n)でも、IL-4、IL-5、IL-13、IFN-gammaの産生が認められ、in vivoの状態ですでに活性化されていることを反映するものと考えられる。いわゆるTh2サイトカインのみならず、Th1サイ

トカインの産生もみられることも明らかになった。

次に、全身性ステロイド薬治療を1週間行った後、PBMCのサイトカイン産生を解析した(表3)。これまでに、われわれが喘息症例を対象に報告した結果と同様に、IL-2、IL-4、IL-13、IFN-gammaの産生には大きな変化はみられないが、IL-5産生は大きく低下していた。その傾向はさらに2週間後に、著明になっていた(表4)。今回の結果は、全身性ステロイド薬の効果が、単に好酸球に対する直接作用に留まらず、T細胞のIL-5過剰産生を低下させ、in vivoにおける好酸球活性化を制御することを示唆するものである。

表1. CEP症例1 (PBMC)

Cytokine	n	P+I	ConA	CD3	CD3+ CD28
IL-2	8.9	5457.5	383.1	31.9	1127.0
IL-4	12.8	20018.1	1372.9	77.4	1224.4
IL-5	1.2	342.7	374.9	16.4	251.1
IL-13	18.4	2358.9	2958.5	1115.3	3117.7
IFN- $\gamma$	28.5	3442.5	277.2	75.5	191.2

表2. CEP症例1 (BALF)

Cytokine	n	P+I	ConA	CD3	CD3+ CD28
IL-2	7.9	1343.8	2952.9	23.9	2683.2
IL-4	214.0	1204.5	3564.2	1467.0	2399.6
IL-5	287	417.2	848.5	689.8	751.4
IL-13	3160.7	2948.1	3772.2	3624.0	3691.1
IFN- $\gamma$	326.7	929.2	4435.6	1606.1	2772.5

表3. CEP症例1 (PBMC) 治療中 (1 wk)

Cytokine	n	P+I	ConA	CD3	CD3+ CD28
IL-2	20.8	4154.9	950.9	143.7	1602.0
IL-4	14.1	1929.0	1570.1	123.9	972.1
IL-5	2.4	137.1	262.5	32.9	195.4
IL-13	38.8	2239.6	2838.5	1190.1	3037.9
IFN- $\gamma$	64.7	258.3	141.5	104.5	73.7

表 4. CEP 症例 1 (PBMC) 治療中 (3 wk)

Cytokine	n	P+I
IL-2	15.0	3277.8
IL-4	19.1	535.5
IL-5	1.7	26.6
IL-13	9.6	1135.5
IFN- $\gamma$	26.1	6140.2

症例 2 においても、治療前の末梢血単核球および BALF 細胞のサイトカイン産生につき解析した (表 5, 6)。症例 1 と同様に、フォルボールエステル (P) + カルシウムイオノフォア (I) 活性化による IL-5 産生は、著しく亢進していた。また、BALF 細胞では、無刺激において、IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  の産生が認められ、in vivo の状態ですでに活性化されていた。

表 5. CEP 症例 2 (PBMC)

Cytokine	n	P+I	ConA	CD3	CD3+ CD28
IL-2	5.5	5680.3	13.1	24.8	834.8
IL-4	7.4	2465.3	775.1	322.6	2741.8
IL-5	8.2	201.2	128.0	71.8	589.0
IL-13	0.2	13827.7	14699	13230.6	15429.8
IFN- $\gamma$	0.3	2849.1	34.4	10.7	114.6

表 6. CEP 症例 2 (BALF)

Cytokine	n	P+I	ConA	CD3	CD3+ CD28
IL-2	26.7	3321.2	98.5	52.8	79.1
IL-4	111.8	2500.9	251.8	224.5	425.1
IL-5	35.6	242.2	96.7	60.7	114.3
IL-13	2266.6	25161.5	16711.2	16711.2	14021.4
IFN- $\gamma$	87.6	6004.4	nd	nd	nd

最後に、リンパ球活性化マーカーの解析を行った (表 7)。末梢血中の T 細胞マーカー解析からは、CD3、CD4、CD8 陽性細胞のいずれの分画においても、CD25、CD69 の活性化マーカー陽性細胞は少数であった。

表 7. FACS 解析 (PBMC)

Case	CD3		CD4		CD8	
	CD25	CD69	CD25	CD69	CD25	CD69
1 (pre)	4.85	0.45	6.39	0.24	1.16	0.91
1 (3 wk)	10.59	0.82	15.88	0.66	1.30	1.34

#### D. 考察

現在までの国内外の研究成果から、好酸球性炎症には T 細胞と T 細胞により産生されるサイトカインが重要であることが確立されている。殊に、活性化 T 細胞により産生される IL-5 は、好酸球に選択的に作用して、好酸球系前駆細胞の分化・成熟を促進すると同時に、成熟好酸球の生存延長・機能増強作用を有し、モデル動物のレベルにおいても、IL-5 ノックアウトマウスでは好酸球増多が起きないことや、抗 IL-5 中和抗体の投与によって、実験喘息モデルの好酸球浸潤・気道過敏性亢進が抑制されることから、好酸球性炎症に必須の因子であることが示されている。加えて、種々の実験事実から、好酸球性炎症はヘルパー T 細胞と関連することが知られている。たとえば、気管支粘膜の好酸球浸潤には、気道局所における T 細胞の数、活性化指標 (CD25 など) や、IL-5 mRNA、蛋白の発現が関連するのみならず、末梢血中の T 細胞の活性化指標が相関することが報告されている。好酸球に対して増殖促進、活性化作用を有するサイトカインは、IL-5 の他に、GM-CSF、IL-3 等が存在するが、生体内では主として IL-5 が好酸球活性化を担っていることも明らかになっている。われわれの研究結果は、これらの報告に合致するのみならず、T 細胞サイトカインの IL-5 が好酸球を in vivo で制御していることを示す点に価値がある。

われわれはこれまでに、1) アトピー型気管支喘息患者では、ダニアレルギー刺激に反応した末梢 CD4<sup>+</sup> T 細胞の IL-5 産生が、健常人に比べ亢進していること、2) アトピー型と非アトピー型の両病型の気管支喘息患者末梢 CD4<sup>+</sup> T 細胞は、抗原非特異的刺激 (ホルボールエステル + Ca<sup>2+</sup> イオノフォア) に反応した IL-5 産生が、健常人に比べて有意に亢進しているが、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、

IFN- $\gamma$ の産生には差がないこと、3) 有症状の喘息患者ではIL-5産生が特に亢進しているが、吸入ステロイド治療の治療効果に併行して、末梢T細胞のIL-5産生が著明に低下すること、さらに4) 無処置マウスにCD4<sup>+</sup>T細胞クローンを移入すると、T細胞のIL-5産生能に依存して、液性免疫の関与なしに、抗原吸入負荷に引き続いて気管支粘膜の好酸球性炎症および気道過敏性が生ずること等を明らかにしてきた。アトピー型・非アトピー型の喘息の2大病型は、ともに持続性の好酸球性炎症を特徴とし、IgE抗体以外の点では、臨床的・病理学的に区別しえないほど酷似した病像を呈するが、われわれの研究成果から、非アトピー型(内因性喘息)では、血中にIgE抗体の存在が認められなくても、T細胞(IL-5産生)のレベルにおいてはhypersensitive(過敏症)であることが示唆される。従来、IgE抗体の有無(B細胞レベル)で、アトピー型と非アトピー型の2型に分けて把握されてきた気管支喘息は、T細胞レベル(IL-5産生)において統一的に理解することが可能である。

そこで、本研究においては、CEPにおけるサイトカイン産生とT細胞マーカーについて検討した。表1に示す如く、CEP症例においては、抗原非特異的活性化刺激(PMA+ionomycin)により、IL-5産生が顕著に誘導された。アトピー型、非アトピー型喘息症例でIL-5産生が亢進しているが、数10 pg/mlのレベルであることを考慮すると、CEPでは、末梢血中にIL-5産生細胞が桁違いに多く誘導されていることが推測される。細胞内サイトカイン染色技術により、末梢血中のIL-5産生T細胞数同定を試みたが、その比率はきわめて低く(喘息、アトピー性皮膚炎と同様に)、有意の同定には至らなかった。

諸外国における免疫組織学的解析からは、喘息患者の気道粘膜には、IL-5のmRNAを発現するTh細胞が増加しており、その程度は好酸球浸潤の程度と相関することが知られている。IL-4、IL-5産生細胞は、主としてTh細胞であり(70%はCD4<sup>+</sup>、残りがCD8<sup>+</sup>)、好酸球・マスト細胞のcontribution

は約1/5とされる。アトピー型・非アトピー型でCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>の割合に違いはみられない。IL-4のmRNA陽性細胞は、アトピー非喘息患者においても増加しているが、IL-5のmRNA陽性細胞は、喘息患者に特異的である。T細胞中にはサイトカイン蛋白は長時間とどまらないため、IL-4、IL-5蛋白レベルの発現を検索すると、好酸球・マスト細胞がむしろより陽性となる。BALF中に回収されるTh細胞には、IL-3、IL-4、IL-5、GM-CSF mRNAの発現が増加している。ステロイド治療は、BAL液中のIL-4、IL-5 mRNA陽性細胞数を減少させる一方、IFN- $\gamma$  mRNA陽性細胞数を増加させる。さらに、IL-4、IL-5、GM-CSF mRNA陽性細胞数と、気道狭窄・気道過敏性の程度との間に相関がみられる。segmental challenge後のBAL液中IL-5濃度と好酸球数、活性化T細胞数との間に相関が認められている。

われわれの研究結果は、これら喘息における好酸球性炎症を対象とした海外の研究報告と異なり、好酸球性炎症の局所を解析したものではないが、血液循環中においても、T細胞サイトカイン産生の指標において、大きな違いが観察されることは、CEPが単なる肺の局所病変にとどまらず、全身的な病態を基盤に発症することを反映したものと考えられる。今後さらに、免疫学的な検索をおこなうことで、原因不明のCEP病態における免疫システムの役割が解明されるものと期待される。

## E. 結論

原因不明のCEP病態を、T細胞サイトカイン産生異常の観点から解析した。末梢血レベルでT細胞IL-5産生亢進が確認された。CEP病態には、好酸球活性化をコントロールするT細胞、サイトカインの役割が重要と考えられる。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yoshioka, M., Sagara, H., Takahashi, F., Harada, N., Nishio, K., Mori, A., Ushio, H., Shimizu, K., Okada, T., Ota, M., Ito, Y., Nagashima, O., Atsuta, R., Suzuki, T., Fukuda, T., Fukuchi, Y., Takahashi, K. 2009. Role of multidrug resistance-associated protein 1 in the pathogenesis of allergic airway inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296:L30-L36.

2) Kitamura, N., Motoi, Y., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Kitamura, F., Miyatake, S., and Kaminuma, O. 2009. Suppressive role of C-terminal binding protein 1 in IL-4 synthesis in human T cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 382:326-330.

3) Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., Miyoshi, H., Inokuma, S., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, H. 2009. T-bet is responsible for distorted Th2 differentiation in human peripheral CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123:813-820.

4) Suzuki, K., Kaminuma, O., Yang, L., Motoi, Y., Takai, T., Ichikawa, S., Okumura, K., Ogawa, H., Mori, A., Takaiwa, F., and Hiroi, T. 2009. Development of transgenic rice expressing mite allergen for a new concept of immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):21-24.

5) Yamaoka, K., Okayama, Y., Kaminuma, O., Katayama, K., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., and Hiroi, T. 2009. Proteomic approach to Fc $\cdot$ RI aggregation-initiated signal transduction cascade in human mast cells. *Int.*

*Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):73-76.

6) Kitamura, N., Kaminuma, O., Otomo, T., Kiyokawa, N., Kobayashi, N., Suko, M., and Mori, A. 2009. Evaluation of cysteinyl leukotriene-induced contraction of human cultured bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):83-86.

7) Otomo, T., Kaminuma, O., Kitamura, N., Suko, M., Kobayashi, N., and Mori, A. 2009. Murine Th clones confer late asthmatic response upon antigen challenge. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):2-6.

8) Kitamura, N., Katagiri, Y., Itagaki, M., Miyagawa, Y., Onda, K., Okita, H., Mori, A., Fujimoto, J., and Kiyokawa, N. 2009. The expression of granulysin in systemic anaplastic large cell lymphoma in childhood. *Leuk. Res.* 33:908-912.

9) Ebisawa, T., Numazawa, K., Shimada, H., Izutsu, H., Sasaki, T., Kato, N., Tokunaga, K., Mori, A., Honma, K., Honma, S., and Shibata, S. 2009. Self-sustained circadian rhythm in cultured human mononuclear cells isolated from peripheral blood. (in press)

10) 森 晶夫: 喘息と CD8<sup>+</sup>細胞 (CTL)、Annual Review 呼吸器 2009 (工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健編)、中外医学社、東京 p. 84-90, 2009

11) 森 晶夫: 現在の喘息治療状況の中での難治性喘息の疫学、病態と診断、治療法は?、EBM アレルギー疾患の治療 2010-2011 (秋山一男、池澤善郎、岩田力、岡本美孝編)、中外医学社、東京 p. 10-17, 2009

12) 森 晶夫: 喘息の病態の分子学的研究

update、Progress in Medicine;29(1):41-44, 2009

13) 森 晶夫:最近の喘息研究の動向—非アトピー機序へのフォーカス、アレルギー・免疫;16(2):7-8, 2009

## 2. 学会発表

1) Mori, A., Kitamura, N., Otomo, M., Akiyama, K. and Kaminuma, O. 2009. T cell response to *Candida albicans* acid protease is associated with the isolated late asthmatic response. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology. Symposium CL-01 Allergic fungal infections. Abstract book p. 209. (Tokyo) 2009/5/25-29

2) Mori A, Otomo T, Kitamura N, Kaminuma O. 2009. Cloned Th cells confer airway obstruction upon antigen challenge in the absence of IgE antibody - a model for nonatopic bronchoconstriction. EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY VIENNA 2009. Final program p.375 (Vienna) 2009/09/12-16

3) 森 晶夫、北村紀子、大友隆之、谷本秀則、福富友馬、押方智也子、小野恵美子、関谷潔史、前田裕二、谷口正実、大友 守、長谷川眞紀、秋山一男、神沼修:リンパ球、第58回日本アレルギー学会秋季学術大会ワークショップ3「基礎:炎症細胞の分離と機能解析」、アレルギー 58:1326, 2008.11.27 (東京)

4) 森 晶夫、山口美也子、北村紀子、大友隆之、大村武雄、須甲松信:成人喘息のQOL—厚生労働科学研究須甲班調査から、第21回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム3「アレルギー患者のQOLの評価と活用と展望」、アレルギー 58:301, 2009.6.4 (岐阜)

5) 森 晶夫、北村紀子、大友隆之、前田裕二、谷口正実、大友 守、福富友馬、長谷川眞紀、秋山一男、神沼 修:重症喘息の機序とその対策、第21回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム8「重症喘息の病態と患者に優しい治療とその開発」、アレルギー 58:313, 2009.6.5 (岐阜)

6) 大友隆之、神沼 修、北村紀子、森 晶夫:T細胞依存的な気道過敏性亢進における好酸球の影響、アレルギー・好酸球研究会 2009、抄録集 p. 6, 2009.6.20 (東京)

7) 神沼 修、北村紀子、本井祐二、北村ふじ子、宮武昌一郎、三好浩之、巽英樹、根本莊一、森 晶夫、廣井隆親:ヒト T 細胞の IL-4 に対する C-terminal binding protein の役割、アレルギー・好酸球研究会 2009、抄録集 p. 12, 2009.6.20 (東京)

8) 鈴木一矢、神沼 修、森 晶夫、廣井隆親:マウスを用いた舌下免疫療法のモデル実験系の開発、アレルギー・好酸球研究会 2009、抄録集 p. 17, 2009.6.20 (東京)

9) 神沼 修、大友隆之、森 晶夫、長久保大輔、稗島州雄、義江 修、鈴木一矢、廣井隆親:T細胞依存性の好酸球気道炎症に対するCCR4拮抗薬の作用、第59回日本アレルギー学会秋期学術大会、アレルギー 58(8・9):1206, 2009.10.29 (秋田)

10) Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, T. T-bet の高発現がヒト Th2 分化における不完全性の要因である/Hyperexpression of T-bet is responsible for incomplete human Th2 differentiation. 日本免疫学会総会 2009 proceedings of the Japanese Society for Immunology 39:150, 2009.1.2-4 (大阪)



## 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（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

好酸球増多に関連する VEGFR1 遺伝子多型の検討

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

研究要旨：

VEGF はライノウイルスおよび LPS 刺激により気道において産生される血管増殖因子であり、これまで Churg-Strauss 症候群の血清において上昇していることが報告されている。成人気管支喘息症例 500 例において末梢血好酸球数との関連を調べるため、VEGF 受容体である VEGFR1 遺伝子多型について検討を行なった。VEGFR1 遺伝子多型 rs3794399 と末梢血好酸球増多との間に関連を見いだした（末梢血好酸球数 10% < vs. 10% >=,  $P=0.000092$ ）。

A. 研究目的

慢性好酸球性肺炎は気道や血管壁への好酸球浸潤をきたし、一部は既存の治療法に反応が乏しく重症化することからその病態解明が待たれている。VEGF (vascular endothelial growth factor) はライノウイルス感染や LPS 刺激により気道により産生され、抗原と VEGF が共存すると Th1 および Th17 免疫応答を引き起こすことが知られている。一部、慢性好酸球性肺炎を合併する Churg-Strauss 症候群において血清 VEGF が高いことも報告されている。本研究では、VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1) (=FLT1) 遺伝子に注目し、その多型と成人気管支喘息における末梢血好酸球数との関連を検討した。

B. 研究方法

成人気管支喘息症例 500 例を末梢血好酸球数 10% 以下 (410 名)、および 10% > (90 名) の 2 群に分け検討を行なった。VEGFR1 遺伝子型タイピングは、日本人集団の HapMap database より抽出した VEGFR1 遺伝子の 14 個の Tag SNP を対象に TaqMan 法を用いて実施した。有意な関連を示した SNP については Jonckheere-Terpstra trend test を用いて genotype-phenotype (末梢好酸球数) の関連について検討した。

C. 研究結果

VEGFR1 遺伝子の intron 24 に存在する SNP rs3794399 と末梢好酸球数との間に有意な関連が認められた ( $P=0.000092$ , OR=2.22, 95%CI 1.48-3.35, 末梢血好酸球数 10% < vs. 10% >=)。また、Jonckheere-Terpstra trend test をお用いた検討においても好酸球数と genotype との間に相関を認めた ( $P=0.031$ )。VEGFR1 遺伝子周辺のゲノム領域に rs3794399 遺伝子多型と強い連鎖不平衡にある SNP ( $r^2 > 0.8$ ) は Hapmap database 上は存在しなかった。ヒト末梢血より単離した単球細胞を用いた VEGFR1 遺伝子発現を検討した結果、LPS により VEGFR1 は強く誘導され、グルココルチコイド (Dexamethasone) を同時に投与するとその発現量はやや低下 (約 70%) を示した。

D. 考察

VEGFR1 遺伝子多型 rs3794399 が成人気管支喘息における末梢血好酸球数増多に強い相関を認めた。今後、慢性好酸球性肺炎患者においてこの多型と発症との関連を検討するとともに rs3794399 と連鎖不平衡にある SNPs の検索を行なう必要がある。さらに、多型の VEGFR1 遺伝子の発現量への影響など検討を行っていく。近年、VEGF はライノウイルスにより上皮細胞から誘導され、上皮細胞の増殖を促進し、鼻ポリープの形成に関与することや、ダニ抗原にも

含まれている LPS により気道において産生誘導されることが示されている。ウイルス感染またはダニなどの LPS 刺激により活性化される VEGF シグナル伝達系の好酸球増多の病態における重要性が示唆された。VEGF の過剰、またシグナル伝達の異常が病態と関連する事が科学的に示されれば、現在大腸がんや肺癌治療に用いられている抗 VEGF 抗体等も難治性好酸球性肺炎に対する新規治療法の一つとして考慮できる可能性がある。

## E. 結論

VEGF 受容体である VEGFR1 遺伝子多型について検討を行い、rs3794399 SNP と末梢好酸球数との間に有意な関連が認められた( $P=0.000092$ , 成人気管支喘息症例, 末梢血好酸球数  $10\% < \text{vs. } 10\% > =$ )。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Imada Y, Fujimoto M, Hirata K, Hirota T, Suzuki Y, Saito H, Matsumoto K, Akazawa A, Katsunuma T, Yoshihara S, Ebisawa M, Shibasaki M, Arinami T, Tamari M, Noguchi E. Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population. *BMC Res Notes*. 2009 Mar 31;2:54.
- 2) Tamari M, Harada M, Hirota T, Nakamura Y. Host defense molecular mechanisms against *Chlamydomypha pneumoniae* and genetic studies of immune-response-related genes in asthma. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 2009;3:17-35
- 3) 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;40:368-74

4) 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

5) Otsuka K, Takeshita S, Enomoto H, Takahashi T, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Otsuka F, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E. SMAD3 as an atopic dermatitis susceptibility gene in the Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2009 Sep;55(3):200-2.

6) Kawai T, Takeshita S, Imoto Y, Matsumoto Y, Sakashita M, Suzuki D, Shibasaki M, Tamari M, Hirota T, Arinami T, Fujieda S, Noguchi E. Associations between decay-accelerating factor polymorphisms and allergic respiratory diseases. *Clin Exp Allergy*. 2009 Oct;39(10):1508-14.

7) Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichia R, Tsunoda T, Osawa Y, Kojima A, Okamoto M, Suzuki D, Kubo S, Imoto Y, Nakamura Y, Tamari M, Fujieda S. Prevalence of Allergic Rhinitis and Sensitization to Common Aeroallergens in a Japanese Population *Int Arch Allergy Immunol*. 2009 Sep 29;151(3):255-261

8) Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct 124(4):779-85.

9) Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K,

Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Dec 1;180(11):1048-55.

<日本語総説>

10) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基: アレルギー疾患関連遺伝子の全ゲノム解析. 最新医学, 64:894-898, 2009

11) 人見祐基, 原田通成, 広田朝光, 玉利真由美: 成人喘息の関連遺伝子. アレルギーの臨床, 29:216-220, 2009

12) 原田通成, 広田朝光, 人見祐基, 玉利真由美: 遺伝とアレルギー. 小児科診療, 72:123-1243, 2009

13) 広田朝光, 原田通成, 人見祐基, 坂下雅文, 玉利真由美: 日本人における気管支喘息関連遺伝子. 呼吸, 28:603-608, 2009

14) 広田朝光, 原田通成, 人見祐基, 玉利真由美: 小児呼吸器疾患とゲノム解析. 小児科, 50:861-866, 2009

15) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基: 気管支喘息の病態と自然免疫関連遺伝子. アレルギー. 58:766-771, 2009

16) 増山敬祐, 玉利真由美, 藤枝重治: アレルギー疾患の遺伝子多型、鼻アレルギーフロンティア. 9:7-14, 2009

17) 原田通成, 広田朝光, 人見祐基, 玉利真由美: 小児気管支喘息と遺伝子多型. 喘息. 22:154-158, 2009

18) 原田通成, 広田朝光, 人見祐基, 玉利真由美: アレルギーの遺伝要因. 実験医学. 羊土社 (2009

年 増刊 27 巻 20 号 3360-3371)

19) 原田通成, 広田朝光, 玉利真由美: 気管支喘息と自然免疫関連遺伝子. 感染炎症免疫 (2009 年 in press)

2. 学会発表

1) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基: 上気道・下気道リレーショナルシップ わかりやすい遺伝子研究の最先端. 感染とアレルギーの謎に迫る 第 8 回 Kinki Hokuriku Airway disease Conference (KIHAC) 2009 年 4 月 リーガロイヤルホテル大阪

2) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基: 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析. 独立行政法人理化学研究所「ゲノム医学研究センター」/文部科学省「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」SNP から疾患遺伝子解明へ. 2009 年 4 月 品川インターシティーホール

3) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基: シンポジウム 7 アレルギー免疫における分子生物学. 分子遺伝学の臨床応用 Translational Research TSLP とアレルギー疾患. 第 21 回 日本アレルギー学会春季臨床大会. 2009 年 6 月 岐阜都ホテル

4) 坂下雅文, 広田朝光, 大澤陽子, 人見祐基, 原田通成, 善本知広, 中西憲司, 玉利真由美, 藤枝重治: 一般演題. 花粉症 2. 142 アレルギー性鼻炎と IL-33 との関連について. 第 21 回 日本アレルギー学会春季臨床大会. 2009 年 6 月 岐阜都ホテル

5) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基: 特別講演. 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析. 第 8 回 愛知免疫アレルギーを語る会. 2009 年 7 月 ホテルキャッスルプラザ

- 6) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基:  
特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の  
病態解析  
第 54 回大分耳鼻咽喉科臨床研究会  
2009 年 9 月 大分東洋ホテル
- 7) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基:  
一般演題 口演 12 免疫遺伝学 OC102 IL-13  
遺伝子多型と成人気管支喘息発症との関連解析  
日本人類遺伝学会第 54 回大会  
2009 年 9 月高輪プリンスホテル
- 8) 人見祐基, 海老澤元宏, 広田朝光, 原田通成,  
鈴木洋一, 中村祐輔, 玉利真由美:一般演題 口演  
12 免疫遺伝学 C115 Inflammasome 形成に関与  
する NLR family 遺伝子多型と食物アナフィラキシー  
との関連解析  
日本人類遺伝学会第 54 回大会  
2009 年 9 月高輪プリンスホテル
- 9) 真下陽一, 佐藤正子, 下条直樹, 広田朝光, 土  
居悟, 宮武明彦, 岡本美孝, 河野陽一, 玉利真由  
美, 羽田明, 鈴木洋一:ポスター発表 PA148  
MMP-13 遺伝子と喘息発症との相関  
日本人類遺伝学会第 54 回大会  
2009 年 9 月高輪プリンスホテル
- 10) 広田朝光, 原田通成, 人見祐基, 玉利真由美,  
坂下雅文, 藤枝重治:ポスター発表 PA055 17q21  
locus の遺伝子多型とスギ花粉症の相関解析  
日本人類遺伝学会第 54 回大会  
2009 年 9 月高輪プリンスホテル
- 11) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基:  
特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の  
病態解析  
水戸地区耳鼻科医会  
2009 年 10 月 ホテル テラス ザガーデン水戸
- 12) Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota, Michishige  
Harada, Yuki Hitomi, Akihiko Miyatake, Yoichi  
Suzuki, and Yusuke Nakamura: Poster Board #512  
Genetic association studies of IL-13 gene in adult  
asthma in Japanese populations  
The 59th Annual Meeting of The American Society of  
Human Genetics  
2009 年 10 月 The Hawaii Convention Center,
- 13) Yuki Hitomi, Motohiro Ebisawa, Tomomitsu  
Hirota, Michishige Harada, Yoichi Suzuki, Yusuke  
Nakamura, Mayumi Tamari: Poster Board #518  
Associations of functional polymorphisms in NLR  
genes with susceptibility to food-induced  
anaphylaxis  
The 59th Annual Meeting of The American Society of  
Human Genetics  
2009 年 10 月 The Hawaii Convention Center,
- 14) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基:  
Poster 教育セミナー10 ウイルス感染による喘息増  
悪の機序と SFC の作用 遺伝子研究の立場から  
第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2009 年 10 月秋田ビューホテル
- 15) 原田通成, 広田朝光, 人見祐基, 玉利真由美:  
Poster ワークショップ12 アレルギー病態解析のジェ  
ノミクスとサイトミクス  
W12-2 ジェノミクス 各論-遺伝子多型を用いたア  
レルギー疾患の解析  
第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2009 年 10 月秋田ビューホテル
- 16) 藤田きみゑ, 宮武明彦, 中野直子, 大月道夫,  
笠山宗正, 玉利真由美: Poster MS-4-12 初診の  
咳喘息患者および気管支喘息患者の背景因子の  
比較検討  
第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2009 年 10 月秋田ビューホテル

17) 城道絢, 広田朝光, 原田通成, 人見祐基, 宮武明彦, 土居悟, 中村豊, 井上洋西, 玉利真由美: Poster MS-10-7 IL-13 遺伝子多型と気管支喘息との関連解析

第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2009 年 10 月秋田ビューホテル

18) 鈴木洋一, 真下陽一, 佐藤正子, 下条直樹, 広田朝光, 土居悟, 宮武明彦, 岡本美孝, 河野陽一, 玉利真由美, 羽田明: MS-10-9 MMP13 遺伝子の気管支喘息との相関と気道上皮における役割

第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2009 年 10 月秋田ビューホテル

19) 広田朝光, 原田通成, 人見祐基, 玉利真由美, 江部康二, 土居悟, 宮武明彦, 佐伯秀久, 常深祐一郎, 古江増隆: MS-21-16 日本人集団におけるアトピー性皮膚炎と乾癬の GWAS の検証

第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2009 年 10 月秋田ビューホテル

20) 長島広相, 中村豊, 鹿内俊樹, 佐々木信人, 佐藤温子, 似内郊雄, 菅野祐幸, 澤井高志, 玉利真由美, 広田朝光, 出原賢治, 山内広平, 井上洋西: MS31-8 気管支喘息患者における IL-13 遺伝子多型と気道リモデリング

第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2009 年 10 月秋田ビューホテル

21) 人見祐基, 海老澤元宏, 富川盛光, 今井孝成, 小俣貴嗣, 広田朝光, 原田通成, 鈴木洋一, 下条直樹, 河野陽一, 玉利真由美: MS39-#5 NLR family 遺伝子多型と食物アナフィラキシーとの関連解析

第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2009 年 10 月秋田ビューホテル

22) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基: 特別講演 1 気管支喘息と COPD の病因病態につ

いて 疾患遺伝子の観点より

第 54 回山口アレルギー疾患研究会  
2009 年 11 月 宇部全日空ホテル

23) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光, 人見祐基: II. シンポジウム: 喘息の難治化機序を考える 2) 喘息難治化に関与する遺伝子

アスピリン不耐症・難治性喘息研究会 2009  
2009 年 11 月ベルサール西新宿

24) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光: 特別講演 気管支喘息の遺伝子解析-SNP 解析と発現解析、気道上皮細胞を中心に

アレルギー・気道上皮細胞研究会  
第 13 回学術大会

2009 年 12 月 シェーンバッハ・サボー

25) 玉利真由美, 原田通成, 広田朝光: プレナリー シンポジウム「喘息サブタイプ」 1. 喘息サブタイプと遺伝子多型

The 17th Symposium of Asthma in Tokyo  
2009 年 12 月 千代田放送会館 2 階ホール

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

NLRP3 遺伝子の多型に基づくアレルギー疾患劇症化の検査方法

玉利真由美、中村祐輔、人見祐基、広田朝光  
2009-173252(平成 21 年 7 月 24 日出願)

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（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

慢性好酸球性肺炎の病態に関する基礎研究

研究分担者 長瀬隆英 東京大学大学院医学系研究科 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  
幸山 正 東京大学医学部附属病院 講師  
三谷明久 東京大学医学部附属病院

研究要旨：

慢性好酸球性肺炎は、呼吸不全を呈する呼吸器疾患であり、根治治療の困難さや発症頻度から、社会的にも重大な疾患である。本疾患の病態機序・治療標的は未だに不明であるため、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、発生工学を駆使した基礎研究を遂行することにより、慢性好酸球性肺炎の病態解明、治療標的の同定、および新治療法の開発を目指す。その結果、以下の新知見が得られた。

- 1) 脂質性メディエーターに着目し、炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索した。
- 2) 肺の発生・機能への関与が示唆されている新規転写コアクチベーターTAZに着目し、炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索した。その結果、各々のメディエーターが、肺疾患病態に重要な役割を呈している可能性が示された。

以上の知見は、呼吸不全を呈する慢性好酸球性肺炎や難治性呼吸器系疾患に対する新しい治療薬・治療法開発の実現化に寄与することが期待される。

A. 研究目的

好酸球性肺炎は、好酸球浸潤による肺野陰影を呈する疾患群の総称である。病態より、①慢性好酸球性肺炎(chronic eosinophilic pneumonia)、②単純性肺好酸球症、③急性好酸球性肺炎に分類されるが、広義には、好酸球増多を伴う肺疾患として、④アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA: allergic broncho-pulmonary aspergillosis)、⑤寄生虫や薬剤誘起性の好酸球増多も含まれる。なお以前より、好酸球増多と一過性の肺浸潤影を来す疾患として、Löfller 症候群および PIE 症候群 (pulmonary infiltration with eosinophilia) が定義されてきたが、現在、臨床的には上述のように分類されることが多い。

慢性好酸球性肺炎は、肺野末梢の浸潤影(特に上肺野)および好酸球増多を認め、遷延性で再発しやすいことが特徴である。報告原著(1969年、Carrington)では、中年女性に好発するとされているが、臨床現場では年齢を問わず発症が認められている。自覚症状として咳、呼吸困難、発熱を認める。

慢性好酸球性肺炎は、呼吸不全を呈する呼吸器疾患であり、根治治療の困難さや発症頻度から、社会的にも重大な疾患である。本疾患の病態機序・治

療標的は未だに不明であるため、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、発生工学を駆使した基礎研究を遂行することにより、慢性好酸球性肺炎の病態解明、治療標的の同定、および新治療法の開発を目指す。

発生工学を駆使した基礎研究：

慢性好酸球性肺炎発症に関しては、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられ、特に IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 等のサイトカインなどが関与している可能性が報告されている。しかし、サイトカイン以外のメディエーターとの関連については、十分な検討がなされていない。また、治療の標的が不明確であるため、根本的治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている脂質性メディエーター、さらに発生への関与が示唆されている転写コアクチベーターTAZに着目し、慢性好酸球性肺炎をふくめた炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索する。

脂質性メディエーター：

本研究では、発生工学的手法を応用し、脂質性メ

ディエーターの炎症性肺疾患発症機序における重要性について検討する。脂質性メディエーターであるプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどはエイコサノイドと総称され、アラキドン酸を起点とする代謝経路の代謝産物である。アラキドン酸は、炭素数20よりなる構造をもち、生体ではリン脂質から細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(cytosolic p-hospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>)によって切り出される。この際に、同時にリゾPAF(lyso-PAF)が生成され、リゾPAFから血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF)が作られる。アラキドン酸は、図1に示すように、アラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て様々なエイコサノイドを生成する。その2つの大きな経路が、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX)系および、5-リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase, 5-LO)系である。プロスタグランジン、トロンボキサンはシクロオキシゲナーゼ系の代謝物であり、ロイコトリエンは 5-リポキシゲナーゼ系の代謝物である。

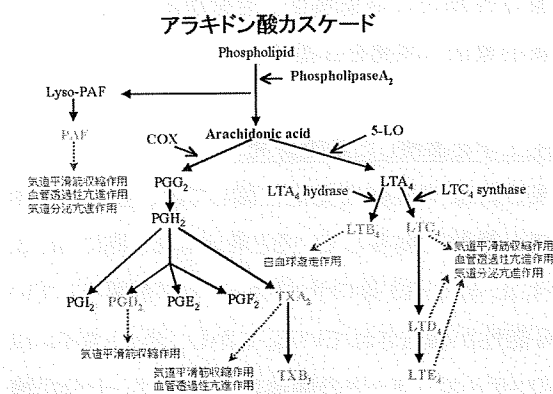


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

アラキドン酸カスケードの代謝産物であるエイコサノイドは、ごく微量で多彩な生理活性作用を呈するのが特徴である。呼吸器系においても、エイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが示唆されている。例えば気管支喘息は、気道平滑筋収縮、血管透過性亢進、血管拡張等による気管支収縮を主体とする病態であり、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられるが、近年、特にトロンボキサン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドが重要な発症

因子とされ、有効な治療標的となりつつある。

特にロイコトリエン(LT)系は、好中球遊走因子としての LTB<sub>4</sub>受容体(BLT1, BLT2 の 2 種類)や、炎症・免疫関連疾患に関わることが想定されている CysLT受容体(CysLT1-R, CysLT2-R, の 2 種類)が発見され(*Nature*, 1997, 1999)、現在、本グループが遺伝子改変マウスを作成中である。

本研究では、発生工学的手法を応用し、脂質性メディエーターの高齢者肺疾患発症機序における意義を明らかにし、治療薬の開発および実用化を目指す。

### 転写コアクチベーターTAZ:

転写コアクチベーター TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) は、14-3-3 proteinをはじめとする、PDZ domainを持つ転写因子と結合しその活性を制御する分子として同定・報告されたものである(*EMBO J* 19: 6778-91, 2000)。TAZは、WW domainを有しており、PPXYモチーフと結合することにより、転写コアクチベーターとしての機能を発現する。

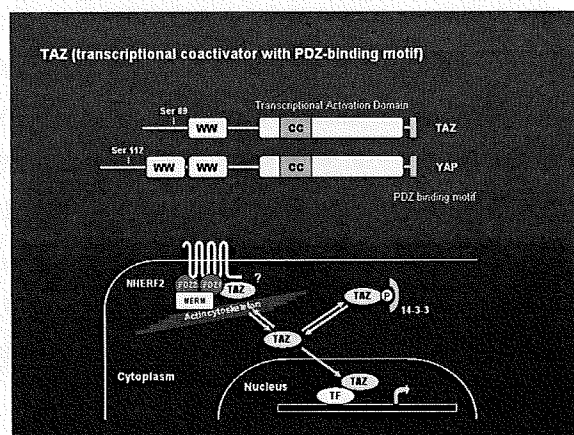


図2 転写コアクチベーターTAZは、WW domainを有し、PPXYモチーフと結合して機能を発現する。また最新の研究により、転写コアクチベーターTAZが、TTF-1(thyroid transcription factor-1)やPax3と協調的に働くことにより、発生に大きく関わる事が明らかにされつつある(*J Biol Chem* 279: 17384-90, 2004) (*Biochem Biophys Res Commun* 339: 533-9, 2006)。



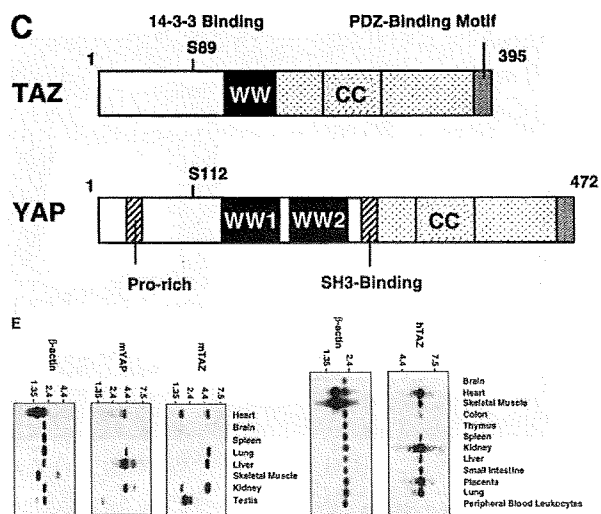


図3 転写コアクチベーターTAZは、Yes-associated protein (YAP)とホモロジーを有する。また、肺にも強く発現している (EMBO J 19: 6778-91, 2000)。

また、神経管、神経堤、骨格筋などの発生に重要な役割を持つ Pax3 と協調的に働く因子を探す目的で、酵母 Two hybrid 法により Pax3 に結合する分子をスクリーニングした結果、TAZ タンパクが同定されている。さらに in vitro アッセイの結果、Pax3-TAZ の結合には、Pax3 C 末端側の PPXY モチーフ及び TAZ N 末端側の WW domain が深く関わっていることが示された。TAZ の発現を in situ hybridization で調べると、胎生 10.5 日マウス胚において神経管内側、鰓丘の外胚葉性間葉、体節で発現が見られており、TAZ は Pax3 などの転写因子と相互作用して形態形成に関わっている可能性が考えられる。転写コアクチベーターTAZ は、発見当初より、腎臓および肺において強く発現していることが報告されている。本研究では、転写コアクチベーターTAZの遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を検討する。

## B. 研究方法

### 脂質性メディエーター:

#### <LTB<sub>4</sub>受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

1997年、東京大学の横溝らは、世界ではじめてロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体のクローニングに成功し (Nature 1997) した。そこで本研究グループは、LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子ノックアウトマウス (以下

LTB<sub>4</sub>R-KO マウス) の作成に着手した。

本年度は発生工学的技術を用いて LTB<sub>4</sub>R-KO マウスを完成させ、LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索することを目指した。

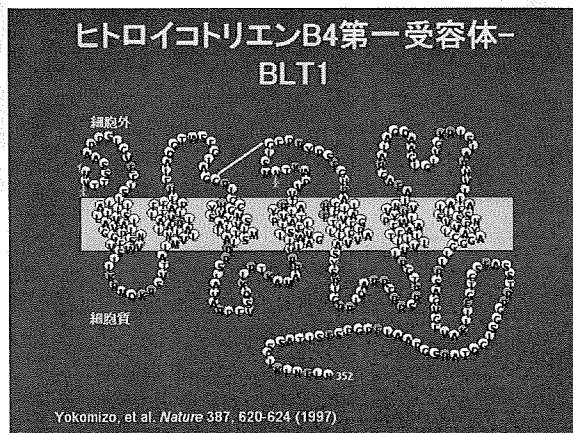


図4 ロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 第1受容体 (BLT1) の構造。

#### <炎症性肺疾患における LTB<sub>4</sub> 遺伝子発現の関与>

炎症性肺疾患モデルとして、抗原感作などの処置を行い、生理学的、生化学的、免疫組織化学的、分子生物学的検討により、LTB<sub>4</sub> 遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加える。

#### <CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> など 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 KO、Tg マウスの新規作成にも着手する。これらのマウスを用いて、脂質性メディエーターと炎症性肺疾患との関連について評価・検討を加える。

#### <転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZの遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を探索した。まず、TAZ ノックアウトマウスの作成を行い、次にその解析に着手した。

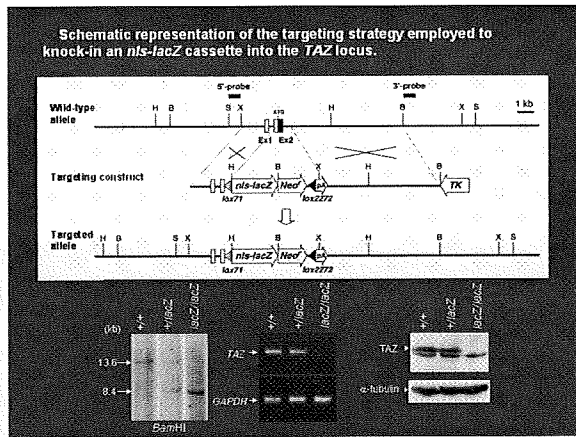


図5 TAZ ノックアウトマウスの作成

### 倫理面への配慮

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究における危険の排除、説明と理解(インフォームドコンセント)について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)に基づき、研究を進める。

本研究で行う予定の遺伝子組換え実験は、平成 16 年 9 月 10 日の東京大学医学部組換え DNA 実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエーター受容体、合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられる。

### C. 研究結果

#### 脂質性メディエーター:

#### <LTB<sub>4</sub>R-KO マウスの作成>

キメラマウスの中で、germ line にノックアウトDNA コンストラクトが移行したのを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体 LTB<sub>4</sub>R ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体 LTB<sub>4</sub>R ノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。

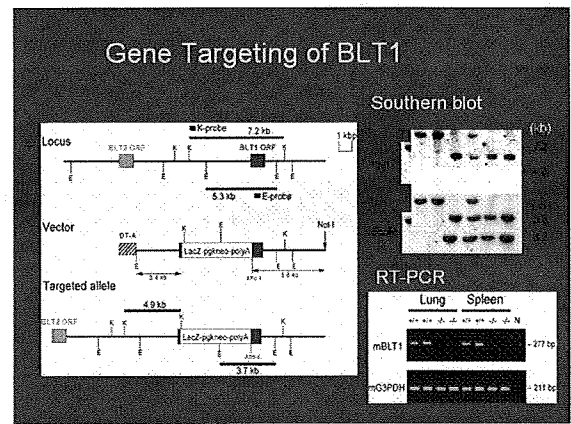


図6 ロイコトリエン B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>) 第1受容体(BLT1)ノックアウトマウスの作成

確立された BLT1 ノックアウトマウス(ホモ接合体)と、その littermate コントロールの野生型マウスを用いて、気管支喘息モデルにおける検討を行った。アレルギー性気管支喘息モデルとして、ovalbumin による抗原感作・吸入負荷を施行した。その結果、LTB<sub>4</sub> ノックアウトマウスでは、感作されたノックアウトマウス群は、野生型群と比べて MCh 気道反応性が低下していることが示唆された。BALF 解析において、ノックアウトマウス群では eosinophilia が著明に軽減していることが認められた。BALF 中の Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減していた。

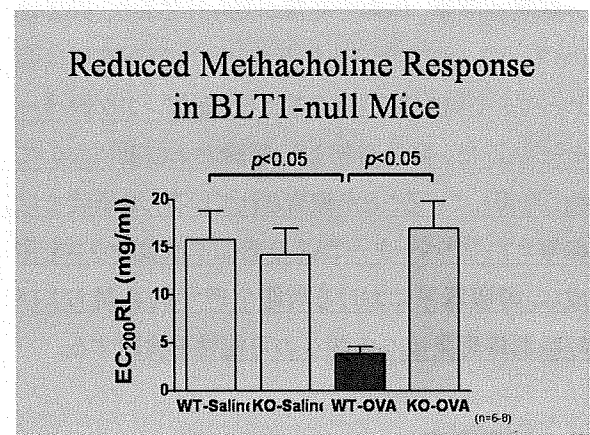


図7 Methacholine (MCh) 気道反応性。OA 感作・野生型群で認められる気道過敏性が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では有意に抑制されている。

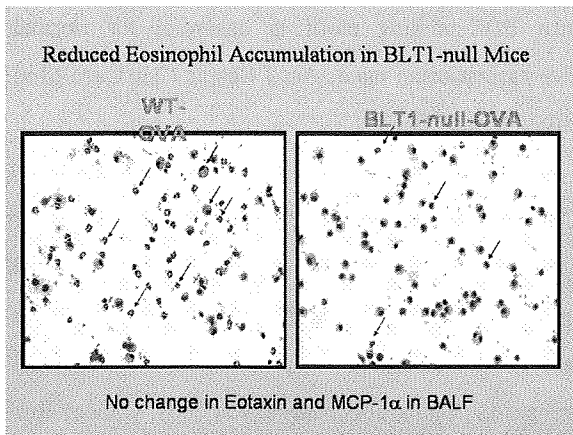


図8 BALF 中の細胞。OA 感作・野生型群では好酸球が著明。OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では好酸球を認めるが少ない。

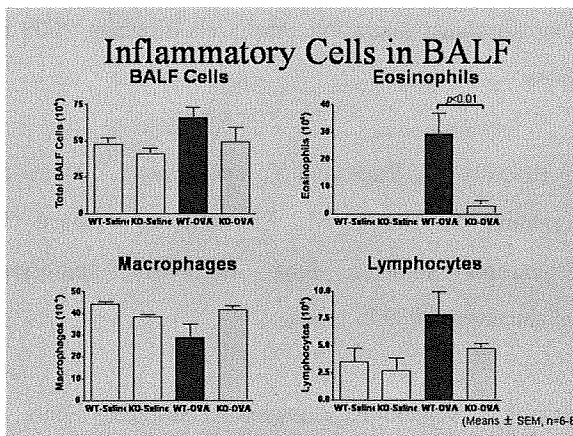


図9 BALF 中の白血球細胞分画。OA 感作・野生型群で認められる好酸球浸潤が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では抑制されている。

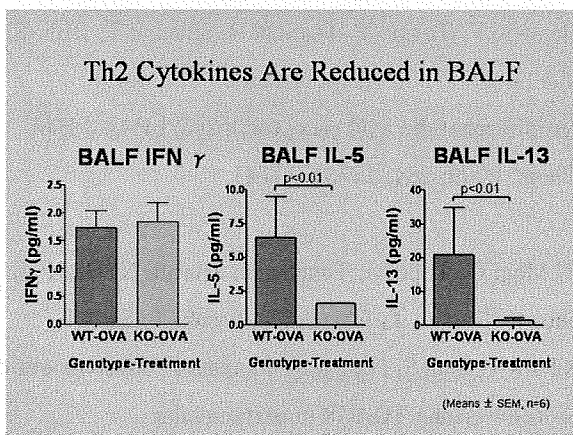


図10 Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減。

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

キメラマウスの中で、germ line にノックアウトDNA

コンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た(図4)。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体 CysLT2-R ノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めていない。目下、バッククロスによる遺伝的純化が完了し、疾患モデルを用いた解析が進行中である。

Targeted Disruption of Mouse CysLT<sub>2</sub> Gene in C57BL/6 ES Cells

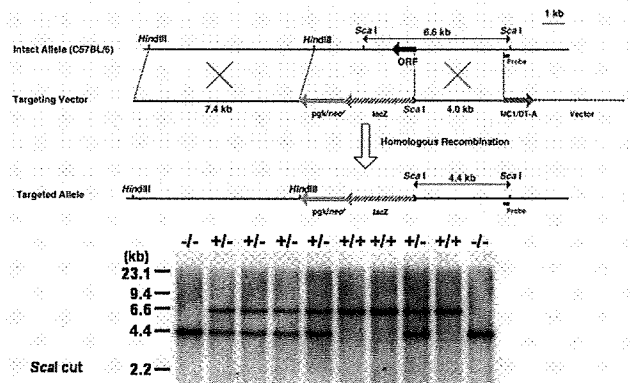


図11 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

<転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成に着手した。キメラマウスの中で、germ line にノックアウトDNAコンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体 TAZ ノックアウトマウスが得られた。なお外表所見上では重大な奇形を生じていないが、9ヶ月令 TAZ ノックアウトマウス個体の肺の組織標本において、肺胞の異常が示された。

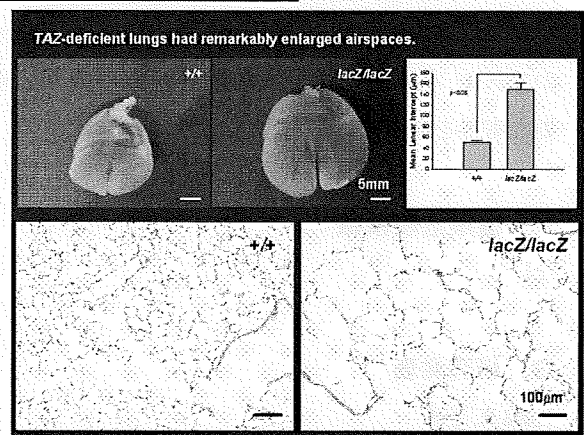


図12 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見

#### D. 考察

慢性好酸球性肺炎は、呼吸不全を呈する呼吸器疾患であり、根治治療の困難さや発症頻度から、社会的にも重大な疾患である。本疾患の病態機序・治療標的は未だに不明であるため、画期的な新治療法の開発が急務とされている。

慢性好酸球性肺炎は、重要な炎症性呼吸器疾患であり、その発症には喫煙など外的刺激物質の関与が想定されている。しかしながら、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。一方、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。

本研究の成果により、脂質性メディエーター、転写コアクチベーターTAZなどをはじめとして、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いと思われる。発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供する独創的なものであり、本研究の成果は炎症性肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。また発生工学的技術を用いた研究は、薬剤開発のプロセスを短縮し、実用化に大きく寄与することが予想される。

#### E. 結論

発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性肺疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供する独創的なものであり、本研究の成果は肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, Aburatani H, Makita R, Kurihara H. Transcriptional coactivator

with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 326-338.

2) Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2009; 69:2783-91.

3) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2009 in press.

4) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Desaki M, Kawasaki S, Nagase T. Procaterol inhibits lung fibroblast migration. *Inflammation* 2009 in press.

5) Ishii S, Noguchi K, Yanagida K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009; 89: 57-65.

6) Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii, S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA<sub>6</sub>. *J Biol Chem.* 2009; 284: 17731-17741.

7) Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He X-d, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A Okajima F. Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of pro-inflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J Immunol.* 2009; 182: 3243-3251.