

図10 PAFR抑制ペプチドによるTNF- α 産生抑制

以上より、SAによる好酸球のエフェクター機能誘導はPAFRを介すると考えられた。

(6) 好酸球のSA貪食

SAの16S rRNAに対して蛍光 in situ hybridizationを行って標識 (Cy3:赤)、好酸球は自家蛍光 (FITC:緑)を利用して、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、2時間の培養で好酸球がSAを貪食していることが観察されたが、PAFR抑制ペプチドの添加により、貪食は抑制された。

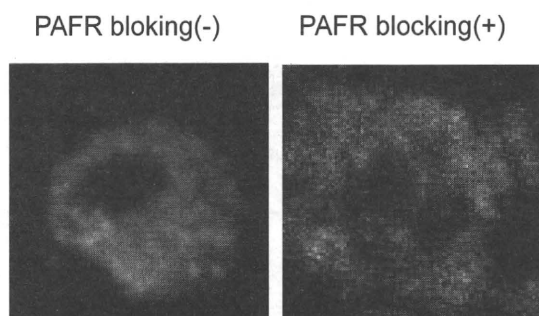


図11 好酸球のSA貪食

(PAFR抑制ペプチド非存在下では、SAが細胞質内に取り込まれている(黄色)が、存在下では細胞外にSAが存在(赤)している)

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報告されている。SAに関するこれまでの報告をみると、まず、思春期年齢で、SAに対するIgE抗体が高値であるほど喘息のリスクが高いこと、ま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。

本研究ではSAが好酸球に直接作用して、細胞接着、脱顆粒、活性酸素産生、炎症性(IL-17, TNF- α)ならびに線維化サイトカイン産生を引き起こすことを明らかにした。この事実は、ブドウ球菌が好酸球を介して、重症喘息にみられるTh17型炎症およびリモデリング増強に関与していることを示唆する。さらに、IL-5およびIL-17が活性酸素産生を著しく増強することは、これらの反応がTh2環境(アトピー型喘息に相当)、Th17環境(非アトピー型喘息に相当)いずれにあっても、増強されることを示している。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。

さらに、本研究ではSAによる好酸球活性化がPAF受容体を介するものであることも初めて明らかにした。PAFは多機能の脂質メディエーターで、好酸球や肥満細胞から産生され、炎症細胞の活性化、気道分泌亢進などを介して、アレルギー性炎症の増悪に関与するとされる。本研究ではこれらの機構に加え、細菌感染時にはPAF受容体を介したエフェクター機能誘導によっても喘息の重症化を引き起こす可能性も示した。今後、新たにPAF受容体拮抗薬を開発すれば、PAFを介するアレルギー性炎症抑制するのみならず、感染による増悪防止にも有効性が期待できる。

E 結論

好酸球はSA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。この反応はPAF受容体を介するものであり、同拮抗薬は重症喘息治療に有効性を発揮する可能性がある。

F 研究発表

論文

- 1) Kim, C. K., J. Choi, H. B. Kim, Z. Callaway, B. M. Shin, J. T. Kim, T. Fujisawa, and Y. Y. Koh. 2010. A randomized intervention of montelukast for post-bronchiolitis: effect on eosinophil degranulation. *J.Pediatr.* 156:749-754. (May)
- 2) Choi, J., Z. Callaway, H. B. Kim, T. Fujisawa, and C. K. Kim. 2010. The role of TNF-alpha in eosinophilic inflammation associated with RSV bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol.*
- 3) Hosoki K, Nakamura A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Wada H, Wada, H.Nobori, T.Fujisawa, T. Differential activation of eosinophils by 'probiotic' *Bifidobacterium bifidum* and 'pathogenic' *Clostridium difficile*. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 152:83-9.
- 4) 藤澤隆夫 好酸球の細胞生物学 総合アレルギー学(福田健 編)改訂2版 2010年 南山堂 東京
- 5) 藤澤隆夫 アレルギーを理解するための基礎知識:好酸球 アレルギー疾患イラストレイテッド メディカルレビュー社 東京 2010
- 6) 藤澤隆夫 最新の喘息ガイドラインのポイント:小児喘息のガイドライン 医学のあゆみ 233(1):19-24, 2010

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。喘息ガイドライン(JGL 2009)で示されている通り、喘息の発病・増悪には様々な因子が関与することが知られており、特に肥満や代謝異常が喘息の発病・増悪に関わることが疫学的に知られて注目を集めている。今回は代謝異常のうち、高血糖下で体内で生成してくるadvanced glycation endproducts (AGE)に着目して、アレルギー性炎症のeffector cellとしてはたらく好塩基球における受容体発現と細胞機能への影響を解析した。ヒト好塩基球はAGE受容体(RAGE)を発現するとともに、AGE-BSA刺激によりapoptosis亢進、サイトカイン(IL-6、IL-8)産生がみられることが判明した。このことより、高血糖下で好塩基球機能変化が生じ、サイトカイン産生の面からみると炎症誘導される結果を得た。今回の結果にもとづくと、代謝異常症とアレルギー疾患、特に喘息との関わり背景となるメカニズムの1つとして好塩基球機能変化が存在することが示唆された。

A.研究目的

重症・難治性喘息の病態解明は、患者自身のQOLの改善のためにも医療経済の面でも重要である。喘息ガイドライン(JGL 2009)で示されている通り、喘息の発病・増悪には遺伝的要素やアレルゲンの他にも様々な因子が関与することが知られているが、特に最近では肥満や代謝異常が喘息の発病あるいは増悪に関わることが疫学的に知られて注目を集めている。たとえばbody mass index(BMI)が高いほど喘息発病リスクが高く、肥満のある喘息患者が減量すると、呼吸機能や喘息症状が改善する。糖代謝異常に関しては知見の集積は多くはないが、肥満を有する小児喘息患者では、喘息を有さない小児と比べて糖代謝異常やインスリン抵抗性が多くみられることが報告されている。一方で、肥満や代謝異常が喘息に対してどのような機序で増悪方向に作用するのか、基礎的知見の集積は充分ではない。そこで、本研究では糖代謝異常のうちでも、高血糖下で体内で生成してくるadvanced glycation endproducts (AGE)に着目し

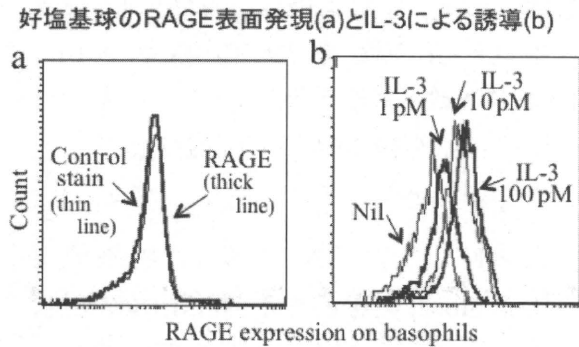
て、アレルギー性炎症のeffector cellである好塩基球における受容体発現と細胞機能への影響を解析した。

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。種々の濃度のAGE(試薬としてはAGE-BSA)または対照のBSAを添加し、好塩基球の脱顆粒、CD11b発現、遊走、生存を解析するとともに、AGEの受容体(RAGE)発現とその制御を検討した。

C. 結果

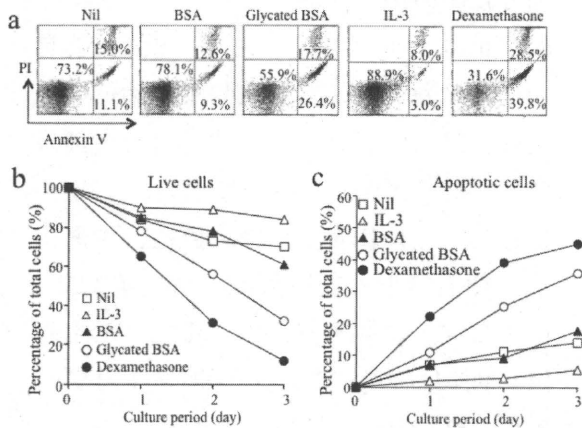
純化直後の好塩基球は RAGE をほとんど細胞表面に発現していないが、IL-3 の存在下で細胞表面 RAGE 発現量が増加した。



また、有意とはいえないものの AGE 自体の存在下でも RAGE 発現量が増加する傾向がみられた。

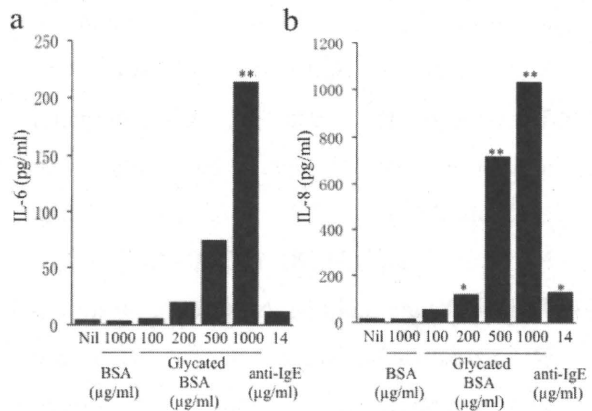
細胞の機能については、脱顆粒、CD11b 発現、遊走を詳細に解析したが、AGE-BSA により特に変化はみられなかった。生存については AGE-BSA 1mg/ml の存在下で生細胞の減少、apoptosis の増加がみられた。

AGEによる好塩基球の生存抑制とapoptosis誘導(a,b,c)



また、AGE-BSA 1mg/ml overnight 刺激により、好塩基球からのサイトカイン産生がみられ、上清中に IL-4、IL-13 は検出されないものの IL-6、IL-8 産生が認められた。

AGEによる好塩基球からの(a) IL-6、(b) IL-8産生誘導



D. 考察

ヒト好塩基球は AGE 受容体(RAGE)を発現するとともに、AGE-BSA 刺激により apoptosis 亢進、サイトカイン(IL-6、IL-8)産生がみられることが判明した。このことより、高血糖下で好塩基球機能変化が生じ、サイトカイン産生の面からみると炎症誘導される可能性が示唆された。ただし、生体内での AGE 濃度は mg/ml よりも低いオーダーと言われており、我々の得た知見がどの程度の血糖値で認めうる現象であるのか検討を要すると考えられる。また今後、他の代謝異常(脂質代謝異常)に関しても検討する予定であるが、今回の結果にもとづくと、代謝異常症とアレルギー疾患、特に喘息との関わり背景となるメカニズムの1つとして好塩基球機能変化が存在する可能性が示唆される。

E. 結論

喘息の発病・増悪に関する因子として近年注目されている代謝異常症について、好塩基球機能との関わりを解析した。糖代謝異常に伴って体内で生成される AGE が好塩基球機能に影響を与えることが判明し、代謝異常と喘息の関わりを説明するメカニズムの中で好塩基球機能制御の関与の可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 30(3):181-185,2010.
 - 2) Toda T, Yamaguchi M, Nakase Y, Sugimoto N, Suzukawa M, Nagase H, Ohta K. A case of anaphylactic reaction following Matsutake mushroom ingestion: Demonstration of histamine release reaction of basophils. *Allergol Int* 59(4): 417-419, 2010.
 - 3) Sano Y, Yamada H, Ogawa C, Yamaguchi M. Some asthmatics show elevation of the peripheral venous oxygen pressure (PvO₂). *Allergol Int* 60:109-110,2011.
 - 4) Han K, Suzukawa M, Yamaguchi M, Sugimoto N, Nakase Y, Toda T, Nagase H, Ohta K. The in vitro effects of advanced glycation endproducts (AGEs) on basophil functions. *Int Arch Allergy Immunol*, in press.
 - 5) 大田健。最新の喘息ガイドラインのポイント 成人喘息のガイドライン。医学のあゆみ 233(1):15-18,2010.
 - 6) 大田健。重症喘息と喘息死の現況と対策 わが国の喘息死の現況。Mebio 27(9): 27-33,2010.
 - 7) 大田健。最新の喘息予防・管理ガイドライン JGL2009。東京都医師会雑誌 63(5):596-600,2010.
 - 8) 大田健。最新の喘息予防・治療ガイドライン 2009(JGL2009)に沿った成人喘息の治療。日本薬剤師会雑誌。62(10):1305-1308,2010.
 - 9) 大田健。臨床最前線 最新の喘息予防・管理ガイドライン JGL2009。Allergia Trends 12(2):21,2010.
 - 10) 大田健。喘息予防・管理ガイドライン 2009 JGL2009のポイント。日本病院薬剤師会雑誌 46(9): 1237-1239,2010.
 - 11) 山口正雄。喘息の危険因子。p15-20。気管支喘息 こう診る・こう考える。日本医事新報社。2010。
 - 12) 山口正雄：気管支喘息。p927-931、新老年病学。第3版。東京大学出版会。2010。
 - 13) 山口正雄。気管支ぜんそく。からだの科学。268:75-79,2010。科学評論社。
2. 学会発表
- 1) 大田健。喘息治療の現状と将来展望 Best Strategy を考える;喘息治療の現状 Best Strategy を考える。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会。アレルギー 59(9-10):1290,2010.
 - 2) 大田健。アレルギー疾患診断・治療ガイドライン 今後の方向性と展望 喘息予防・管理ガイドライン 今後の方向性と展望。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会。アレルギー 59(9-10): 1228,2010.
 - 3) 大田健。アレルギー性呼吸器疾患の過去・現在・未来。日本呼吸器学会雑誌48(特別号):75,2010.
 - 4) 山口正雄。シンポジウム 3。気管支喘息の病態の新知見。新規生物学的治療の最前線。第50回日本呼吸器学会学術講演会。平成22年4月23～25日。
 - 5) 長瀬洋之、戸田貴子、杉本直也、中瀬裕子、神山麻恵、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、鈴木直仁、大田健。ミニワークショップ。JGL2009、GINA、EPR3 喘息コントロールテスト(ACT)における喘息コントロール評価の比較。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会。平成22年11月25～27日。アレルギー、59(9,10): 1366,2010.
 - 6) 鈴木真穂、Han Kaiyu、山口正雄、杉本直也、中瀬裕子、戸田貴子、原麻恵、小島康弘、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、長瀬洋之、鈴木直仁、大

田 健。ミニワークショップ。Advanced glycation endproducts(AGEs)がヒト好塩基球に及ぼす作用の解析。第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会。平成 22 年 11 月 25-27 日。アレルギー、59(9,10):1363,2010.

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

平滑筋リモデリング機序の実験的検討

分担研究者 庄司 俊輔（国立病院機構東京病院 統括診療部長）

研究要旨

基底膜下への間質コラーゲン・フィブロネクチンの沈着及び平滑筋の肥厚は難治性喘息における気道リモデリングの病理組織学的特徴である。分担研究者は気管支平滑筋細胞が気道リモデリングに伴い平滑筋から結合組織へと遊走するとの仮説を立て、培養正常ヒト細胞を用いてその遊走機序を検討している。実験の結果、この気管支平滑筋細胞が肺線維芽細胞培養上清に遊走することを確認した。そこで抗フィブロネクチン抗体を用いて肺線維芽細胞培養上清のウェスタンブロッティングを行ったところ、培養上清中にフィブロネクチンの存在が認められた。これらの知見はリモデリングを形成した気管支において、平滑筋細胞がフィブロネクチンを介し線維芽細胞と相互作用することで平滑筋から結合組織へと遊走する可能性を支持するものである。

研究協力者

西原 麻千子（久留米大学医学部 皮膚生物学研究所）

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。気道粘膜の結合組織中に存在する気管支平滑筋細胞および肺線維芽細胞は、細胞外マトリックス等を細胞間質に産生し、互いにオートクリン/パラクリン作用様式により遊走等の機能を調節している。今年度の研究では、肺線維芽細胞から産生される遊走活性物質により、気管支平滑筋細胞が気道リモデリング形成に伴い平滑筋から結合組織へと遊走するとの仮説を立て、その機序を検討した。

B. 方法

正常ヒト気管支平滑筋細胞及び正常ヒト肺線維芽細胞（瑞国 Lonza 社）を培養し、肺線維芽細胞は培養後に細胞培養上清を採取し、気管

支平滑筋細胞は遊走実験の標的細胞に使用した。肺線維芽細胞の培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走は 48 穴ボイデンチャンバーにより検討した。48 時間培養後回収した肺線維芽細胞培養上清を SDS-PAGE 法にて展開した後ニトロセルロース膜に転写し、抗フィブロネクチン抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

C. 結果

気管支平滑筋細胞に対する肺線維芽細胞培養上清の遊走活性は、上清の濃度依存性に、かつ、肺線維芽細胞の培養時間依存性に上昇した。(Fig1) 抗フィブロネクチン抗体を用いた肺線維芽細胞上清のウェスタンブロッティング法にて、200kDa 以上の分子領域に2本のバンドが確認された。これは、すでに本研究で報告した、気管支平滑筋細胞の培養上清に見られたバンドと分子量およびバンド数とも一致した。(Fig2)

D. 考察

リモデリングを形成した喘息患者の気管支では平滑筋細胞が結合組織へと遊走する前段階として、肺線維芽細胞が平滑筋細胞に対する

遊走因子を分泌している可能性がある。分担研究者はこれまでに肺線維芽細胞が気管支平滑筋細胞培養上清に対して遊走することを報告している。気管支平滑筋細胞が肺線維芽細胞培養上清に対して遊走し、本上清にフィブロネクチンが含まれるとの知見は、気道リモデリングに伴い気管支平滑筋細胞が、肺線維芽細胞より産生・放出されたフィブロネクチンを認識して平滑筋から結合組織へと遊走する可能性を示唆するものである。肺線維芽細胞によるフィブロネクチン産生については多数報告がなされているが、これが気管支平滑筋細胞に対する遊走因子として作用するか否かについてはこれまで報告されていない。今年度の研究結果は、肺線維芽細胞培養上清に含まれるフィブロネクチンが気管支平滑筋細胞遊走因子として作用する可能性を示唆している。喘息患者の気管支にて線維芽細胞はリモデリング形成に伴い、創傷治癒を目的とした気道上皮細胞が上皮を修復する方向の遊走だけでなく、フィブロネクチンに関連する平滑筋細胞の結合組織への遊走を誘導しているものと思われる。

E. 結論

以上の *in vitro* での結果から、リモデリングを形成した喘息患者の気管支においても、気道平滑筋細胞が肺線維芽細胞より産生・放出されたフィブロネクチンを認識し、結合組織から気道上皮下の基底膜方向へと遊走する可能性が推察された。

F. 文献

Machiko Nishihara-Fujihara, Shunsuke Shoji, Iori Maeda, Terufumi Shimoda, Sankei Nishina, Koji Okamoto:

Involvement of fibronectin and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell migration for the process of airway remodeling.

Allergology International 59(3): 267-275, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

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

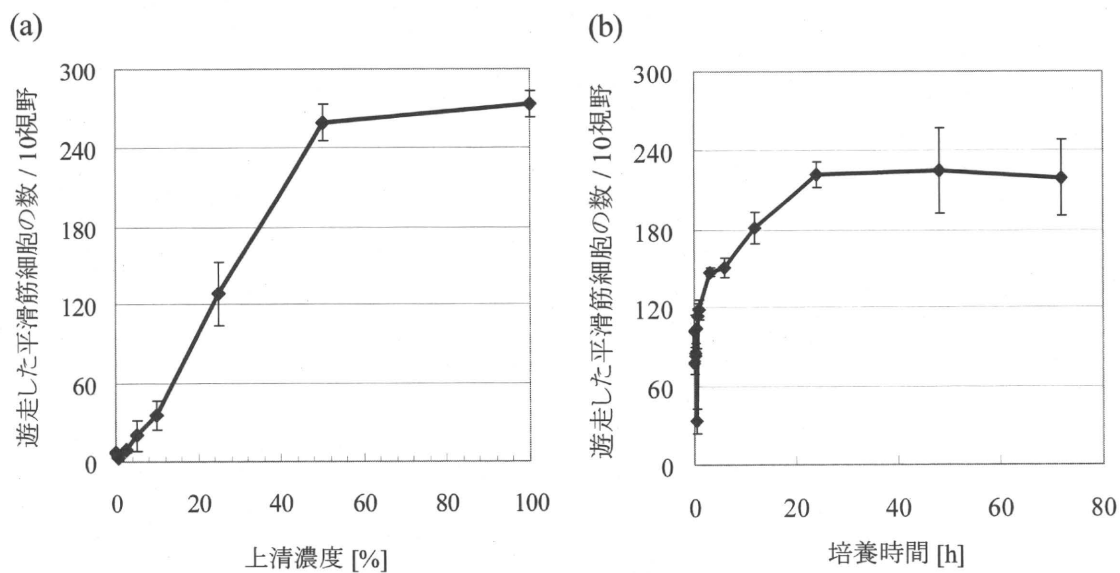


Fig.1 肺線維芽細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走

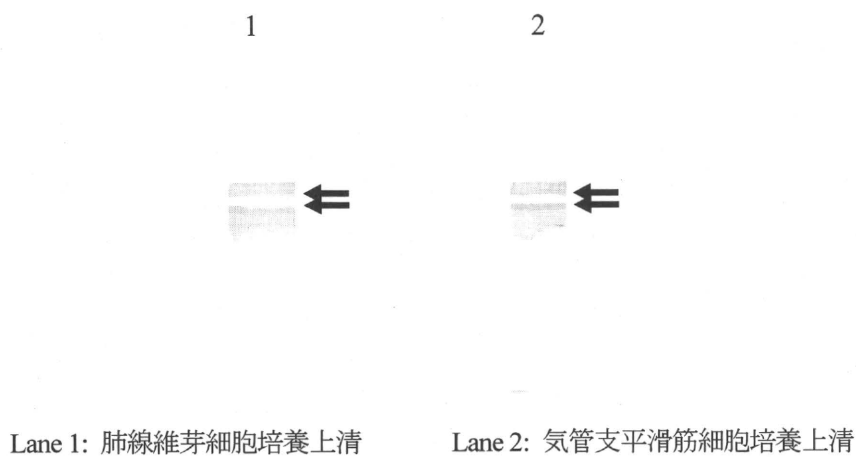


Fig.2 抗フィブロネクチン抗体を用いた肺線維芽細胞及び気管支平滑筋細胞培養上清のウェスタンブロッティング

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 これまでの研究において、マウスダニ抗原誘発による喘息様病態形成は、気道内好酸球増多は IL-5 依存性であるものの、気道リモデリング形成ならびに気道過敏性は IL-5 非依存性かつ IL-13 依存性であることをそれぞれの遺伝子欠損(KO)マウスを用いて明らかにしてきた。しかし、IL-13KO マウスでは一次免疫応答の段階からダニ抗原に対する免疫応答の低下が認められることから、治療標的としての意義は不明である。そこで、本研究ではダニ抗原による喘息病態形成および先行ウイルス感染による喘息発症の促進ならびに増悪における IL-13 の意義を中和抗体を用いて検討した。

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従った。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に *Dermatophagoides farinae* (Der f) の粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。二本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) は、初回抗原投与前にダニ抗原投与に先行して気管内投与した。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。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。

ダニ抗原(Der f)をマウスの気管内に頻回投与することにより、その用量に依存して喘息様病態形成および気道リモデリング形成が観察された。これに対し、poly IC を初回ダニ抗原投与前に投与した場合、ダニ抗原単独投与ではほとんど変化が認められなかったいずれのパラメーターについても有意な増強が認められ、ダニ抗原単独投与で十分に喘息様病態形成が認められる陽性対照群とほぼ同程度の反応を引き起こした。これに対し、気道内好酸球増多および軽微な気道過敏性が観察された時点から抗 IL-13 抗体を腹腔内投与すると、ダニ抗原による喘息様病態形成は用量依存性かつ有意に抑制された。また、同様の結果が poly IC 先行投与モデルの場合にも観察された。

以上の成績より、ダニ抗原誘発喘息様病態形成ならびに先行ウイルス感染による喘息発症の促進ならびに増悪機序には IL-13 が関与していること、また、治療標的としても極めて重要であることが示唆された。

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、平成 20 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 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。

さらに、昨年度はウィ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ことから、本反応の機序解明を目的とし、CD8 および LTB₄ の意義をそれぞれ中和抗体および受容体拮抗薬を用いて検討した結果、それぞれ一部関与していることが明らかとなった。

平成 18 年度研究では、ダニ抗原誘発マウス喘息様病態形成モデルでは、好酸球増多は IL-5 依存性に生ずるが、気道過敏性ならびに気道リモデリング形成は IL-5 非依存性かつ IL-13 依存性に生ずることをそれぞれの KO マウスを用いた結果から明らかにした。しかしながら、IL-13KO マウスではダニ抗原に対する一次免疫応答が減弱したことから、病態形成の意義を明らかにすることはできたが、治療標的としての意義は不明のままである。

そこで本年度の研究では、ダニ抗原気管内投与による喘息様病態形成における IL-13 の意義、ならびに先行ウィルス感染によるダニ抗原誘発喘息発症の促進ならびに増悪における IL-13 の意義を、それぞれ抗マウス IL-13 抗体を検討した。

B. 研究方法

①卵白アルブミン誘発喘息モデル

実験は、当教室の卵白アルブミン誘発喘息モデルのプロトコールに準じた。すなわち、卵白アルブミン(OA)およびアジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを用いてマウスを感作し、その後、OA 溶液を計 3 回吸入曝露した。最終抗原吸入 24 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。

②ダニ抗原誘発マウス喘息モデル

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 *Dermatophagoides farinae* (Der f) の粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。基礎検討の結果から、5 回目のダニ抗原投与後において気道内好

酸球増多ならびに軽微な気道過敏性が観察されることから、抗マウス IL-13 抗体の投与は 5 回目の Der f 投与直前から各抗原投与時に腹腔内投与した。最終抗原吸入 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。

③先行ウィルス様刺激モデル

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 poly IC を投与後、Der f 粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。なお、本モデルのダニ抗原量は、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。抗マウス IL-13 抗体の投与は②のプロトコール同様、5 回目の Der f 投与直前から各抗原投与時に腹腔内投与した。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。

④抗マウス IL-13 抗体

抗 IL-13 抗体は、ハイブリドーマをヌードマウスの腹腔内に投与後、腹水から精製し用いた。

(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

①卵白アルブミン誘発喘息モデル

まず基礎的検討として、従前の卵白アルブミンによる喘息モデルを用いて、本研究において使用する抗マウス IL-13 抗体の有効性ならびに用量決定を行った。対照として用いたラット IgG1 腹腔内投与群に比し抗 IL-13 抗体投与群では、OA 反復曝露による BALF 中好酸球増多、アセチルコリンに対する気道過敏性、血清中抗原特異的 IgE 値の上昇ならびに気道上皮における杯細胞の過増生の有意な減弱が観察された。

②ダニ抗原誘発マウス喘息モデル

PBS 投与群に比し、ダニ抗原反復投与群では、アセチルコリンに対する気道過敏性、気道内好酸球増多、血清中ダニ抗原特異的 IgG1 値の上昇、気道リモデリング形成などの喘息様病態が観察された。これに対し、抗 IL-13 抗体投与は、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇に対しては影響を及

ばさなかったが、気道過敏性、好酸球増多、気道上皮における肥厚、杯細胞の過増生および基底膜下の膠原繊維の沈着をいずれも有意に抑制した。

③先行ウイルス様刺激モデル

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、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇ならびに気道リモデリング形成がいずれも有意に増悪した。これに対し、抗 IL-13 抗体は血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇には影響を及ぼさなかったが、気道過敏性、気道内好酸球増多、気道リモデリング形成を用量依存性的かつ有意に抑制した。

D. 考察

本研究ではダニ抗原による喘息病態形成および先行ウイルス感染による喘息発症の促進ならびに増悪における IL-13 の意義を中和抗体を用いて検討した。その結果、抗 IL-13 抗体投与は、いずれのモデルにおいても、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇に対しては影響を及ぼさなかったが、気道過敏性、好酸球増多、気道上皮における肥厚、杯細胞の過増生および基底膜下の膠原繊維の沈着をいずれも有意に抑制した。

本研究では、まず、抗 IL-13 抗体の投与用量の決定を目的とし、従来から喘息モデルとして汎用されている OA 誘発マウス喘息モデルを用いて検討を行った。その結果、抗体を各抗原吸入 1 時間前に腹腔内投与することにより、用量依存性的かつ有意に血清中抗原特異的 IgE 値の上昇、気道過敏性、好酸球増多を抑制した。この結果から、抗 IL-13 抗体の投与量、投与ルートおよび投与タイミングを決定した。

そこで、次にダニ抗原誘発喘息様病態形成における IL-13 の意義を検討した。前述のように、本モデルの気道過敏性は IL-4 および IL-13、好酸球増多は IL-4、IL-5、IL-13 依存性、気道リモデリング形成も IL-4、IL-5、IL-13 依存性であることをそれぞれの KO マウスを用いて明らかにしている。しかしながら、IL-13KO マウスでは、抗原特異的 IgE 値の低下が一次免疫時に観察されたため、IL-13KO マウスの表現型の説明として外来抗原に対する免疫獲得の低下がその後の病態形成に影響を及ぼした可能性も否定できない。そこで、本研究では KO マウスを用いることなく、治療的観点から中和抗体を用いてその意義を検討することとした。本研究では、前述のように、気道内に好酸球増多が認められ、軽微な気道過敏性が観察され、かつ、脾細胞を抗原刺激した際に Th2 サイ

トカイン産生が観察される時期から中和抗体を投与し、その影響を検討したところ、抗 IL-13 抗体は抗原特異的 IgG1 値の上昇に影響を及ぼすことなく、気道過敏性、気道炎症ならびに気道リモデリング形成を有意に抑制した。従って、ダニ抗原反復刺激による喘息様病態形成には IL-13 が重要な役割を有すること、また、治療標的としても有用であることが明らかとなった。

最後に、先行ウイルス感染による喘息発症の促進ならびに増悪における IL-13 の意義を検討した。これまでの検討から、ダニ抗原の気管内投与に先行して poly IC を気管内に投与すると、ダニ抗原少量投与に比し、喘息様病態形成が促進・増悪することを明らかにしている。この際、気道内では IL-13 産生量の有意な亢進が認められ、また、本発症促進・増悪には IL-13 が重要な役割を有することを IL-13KO マウスを用いた結果から明らかにしている。しかし、IL-13KO マウスの場合、前述のように免疫応答自身が低下している可能性を否めないため、抗 IL-13 抗体を用いてその意義を検討した。その結果、前述のダニ抗原誘発喘息モデルと同様に、先行ウイルス刺激による喘息様病態形成の促進機構にも IL-13 が極めて重要な役割を有し、かつ、その中和抗体投与により治療も可能であることを明らかにした。今後、IL-13 産生細胞がダニ抗原単独モデルと polyIC 投与モデルとで異なるか否かなど、さらに詳細に検討する必要がある。

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 IL-13 の意義を検討した。その結果、抗 IL-13 抗体の投与により喘息様病態形成の減弱が観察された。ダニ抗原単独による喘息様病態形成も抗 IL-13 抗体により治療可能であった。従って、IL-13 はダニ抗原を原因とするアトピー型喘息の発症ならびに難治化、さらにウイルス感染様刺激による気管支喘息の難治化・重症化に重要な因子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) 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.* 110; 192-202: 2010.

2) Komai M, Tanaka H*, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Miura T, Ohashi H, 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.* 112; 203-213: 2010.

3) Tsuji F, Murai M, Oki K, Inoue H, Sasano M, Tanaka H, Inagaki N, Aono H: Effects of SA13353, a transient receptor potential vanilloid 1 agonist, on leukocyte infiltration in lipopolysaccharide-induced acute lung injury and ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *J. Pharmacol. Sci.* 112; 487-490: 2010.

2. 学会発表

1) 田中宏幸: シンポジウム アレルギー疾患のオーダーメイド治療 薬学者からの発信. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2010年5月、京都)

2) 田中宏幸: シンポジウム アレルギー疾患の薬物治療に役立つ基礎薬理学 アレルギー治療薬—免疫療法薬—の基礎. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2010年5月、京都)

3) 田中宏幸: ワークショップ 動物モデルによる病態解明の進歩 ウィルス感染による喘息発症の促進機構—マウスモデルを用いた検討—. 第60回アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム (2010年11月、東京)

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 烏帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究協力者 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アルギナーゼ1のrs2749935(A/T)とrs2781659 (A/G)、アルギナーゼ2のrs12885261 (C/T)、rs3742879 (A/G)の遺伝子多型の割合を、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、重症化におけるアルギナーゼ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、アルギナーゼ2の遺伝子多型 rs12885261 (C/T)、rs3742879 (A/G)の変異型 (TおよびG)と喘息症の重症化との関係が認められた。喘息症の重症化は、アルギナーゼ2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。以上の結果から、喘息症の重症化は、アルギナーゼ2の遺伝子多型および喫煙とアルギナーゼ1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。

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の発症との間あるいは気管支喘息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、ヘムオキシゲナーゼ-1、NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1)とGlutathione S-transferase M1 (GSTM1)の遺伝子多型と喫煙状況との相互作用を認めた。本年度は、喘息の重症化の要因と密接な関係があるアルギナーゼ活性を左右するとされるアルギナーゼ1とアルギナーゼ2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、重症化にその遺伝子の多型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、すべて男性で重症群としてJGL98で規定されたStep 4の15例 (53.1±4.22歳、平均値±標準誤差)、軽症群として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、また喫煙者の比もなかった。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。また、調べた遺伝子多型としてアルギナーゼ1のrs2749935(A/T)とrs2781659 (A/G)、アルギナーゼ2のrs12885261 (C/T)、rs3742879 (A/G) の遺伝子多型の割合を各群で調べた (表1)。

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。

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)

C 研究結果

1) 軽症間欠型・軽症持続型、重症持続型、対照群の間でアルギナーゼrs2749935(A/T)とrs2781659 (A/G) の頻度を比較した。rs2781659 (A/G) については全体では有意な差は認めなかったが、喫煙者の重症持続型のA/GあるいはG/Gを有する頻度81.8%は、対照群の40%に比べ有意な高値を示した (表2)。アルギナーゼ2のrs12885261 (C/T) とrs3742879 (A/G) では、全体におけるそれぞれの多型頻度60%および66.7%は対照群に比べ有意な高値を示した (表2)

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。またアルギニン経路が気道閉塞の発生に重要な

働きを及ぼしていることや、アルギナーゼ活性の調節が喘息治療に役立つ可能性があることが示唆されている。喘息モデルを使用し抗原負荷後の肺組織において、アルギナーゼ I、IIなどの酵素遺伝子の発現が著しく上昇した実験などがある。アルギナーゼはTh2 サイトカインであるインターロイキン (IL) -4やIL-13により発現が増加し、実験的喘息モデルや喘息患者においてmRNAや活性の上昇が認められている。アルギナーゼ1遺伝子の遺伝子変異と気管支拡張薬に対する反応の関連も知られている。

本相関解析によって、アルギナーゼ2の遺伝子多型 rs12885261 (C/T)、rs3742879 (A/G) の変異型 (TおよびG) と喘息症の重症化との関係が認められた。喘息症の重症化は、アルギナーゼ2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、アルギナーゼ1のrs2781659 (A/G) のGと喘息症の重症化との関係が示唆された。喫煙とアルギ

ナーゼ1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考えられた。

ナーゼ2の遺伝子多型および喫煙とアルギナー
 ゼ1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。

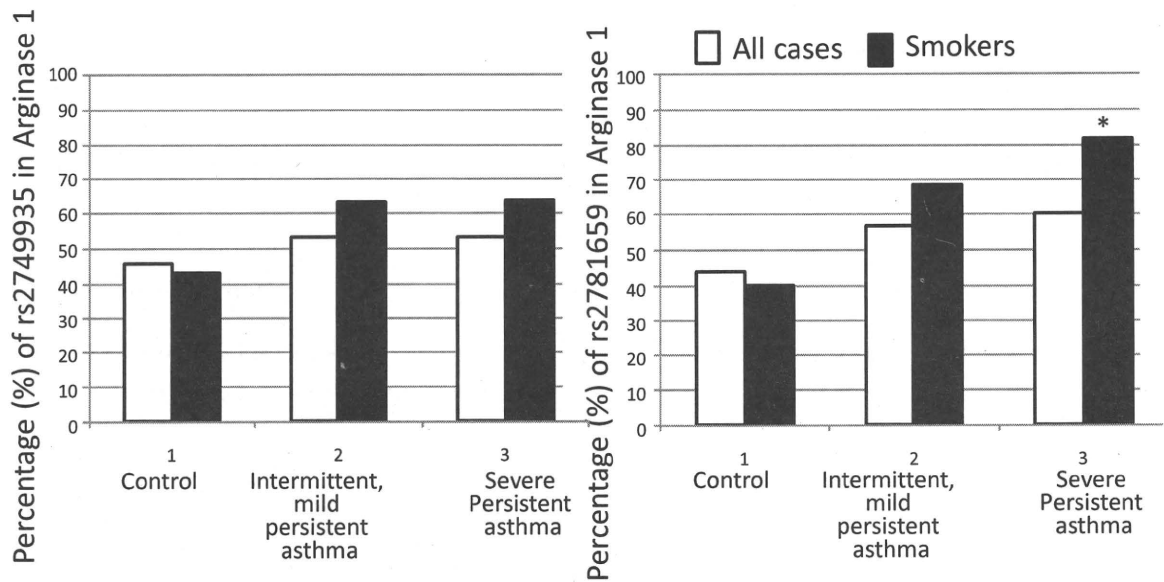
E 結論

以上の結果から、喘息症の重症化は、アルギ

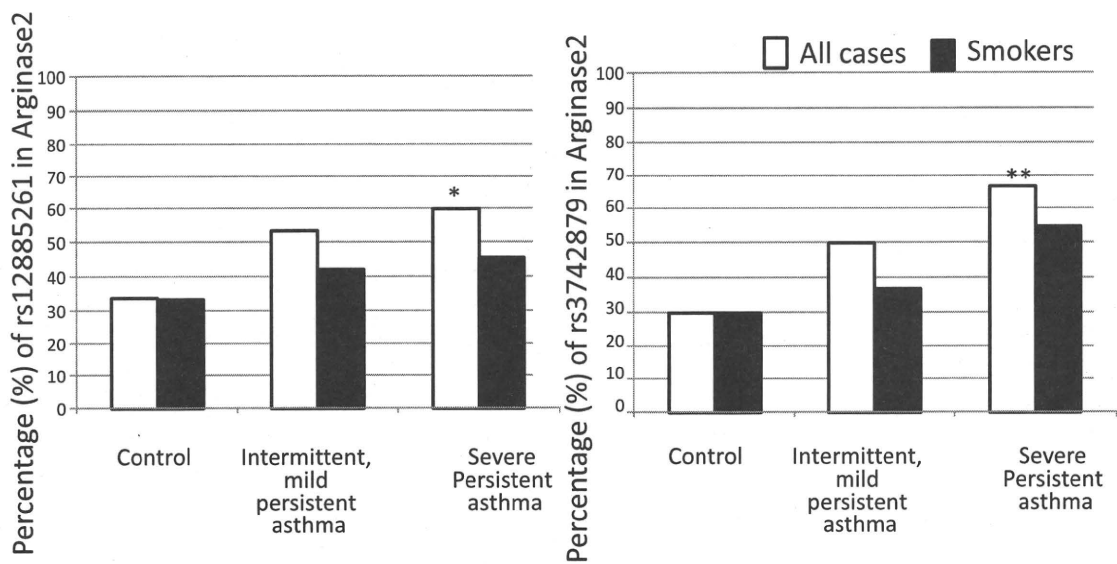
表2 軽症間欠型・軽症持続型、重症持続型、対照群におけるアルギナーゼ1および2の遺伝子多型につ
 いての相関解析

Gene	Genotype Subgroup	Control (N=50)		Intermittent, mild persistent asthma (N=30)		Severe persistent asthma (N=15)	
		No	Frequency(%)	No	Frequency(%)	No	Frequency(%)
		アルギナーゼ I rs2749935	A/A	27(17)	54.0(56.7)	14(7)	46.7(36.8)
	A/T						
	T/T	23(13)	46.0(43.3)	16(12)	53.3(63.2)	8(7)	53.3(63.6)
アルギナーゼ I rs2781659	A/A	28(18)	56.0(60.0)	13(6)	43.3(31.6)	6(2)	40.0(18.2)
	A/G						*
	G/G	22(12)	44.0(40.0)	17(13)	56.7(68.4)	9(9)	60.0(81.8)
アルギナーゼ II rs12885261	C/C	33(20)	66.0(66.7)	14(11)	46.7(52.7)	6(6)	40.0(54.5)
	C/T						*
	T/T	17(10)	34.0(33.3)	16(8)	53.3(47.3)	9(5)	60.0 (45.5)
アルギナーゼ II rs3742879	A/A	35(21)	70.0(70.0)	15(12)	50.0(63.2)	5(5)	33.3(45.5)
	A/G						
	G/G	15(9)	30.0(30.0)	15(7)	50.0(36.8)	10(6)	66.7**(54.5)

Figures in parentheses represent 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



Statistically significant difference as compared to the value of control: *p<0.05, **p<0.01

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukutomi Y, Nakamura H, Kobayashi F, Taniguchi M, Konno S, Nishimura M, Kawagishi Y, Watanabe J, Komase Y, Akamatsu Y, Okada C,

Tanimoto Y, Takahashi K, Kimura T, Eboshida A, Hirota R, Ikei J, Odajima H, Nakagawa T, Akasawa A, Akiyama K.

Nationwide cross-sectional population-based study on the prevalences of asthma and asthma symptoms among Japanese adults.

Int Arch Allergy Immunol. 2010;153(3):280-7.

Epub 2010 May 20.

2) 中村裕之、人見嘉哲、神林康弘、日比野由利、柴田亜樹、弘田量二、福富友馬、松崎一葉、烏帽子田彰. 環境衛生の面より考える思春期のアレルギー. 思春期学 29(1), 2011 (印刷中)

2. 講演等

1) 烏帽子田 彰 「アレルギーと健康」

服部流料理研究会 2010/03/11 東京

2) 烏帽子田彰, 鹿島小織里, 小泉武夫, 服部幸雄

「環境と健康」広島食育フォーラム/広島大学公開講座
2010/07/21 広島県廿日市市

2. 学会発表

なし

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

環境中化学物質の気管支喘息の重症化への影響と抗アレルギーフィルターの開発

分担研究者 中村 裕之（金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教授）

研究協力者 人見 嘉哲（金沢大学医学系准教授）、櫻井 克年（高知大学副学長）、
康 峪梅（高知大学農学部教授）、弘田 量二（高知大学医学部助教）、
菅沼 成文（高知大学医学部教授）、田中 宏幸（岐阜薬科大学准教授）、
日下 幸則（福井大学医学部教授）、烏帽子田 彰（広島大学医歯薬総合研究科教授）

研究要旨 近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。本研究では、大気汚染物質である浮遊粒子状物質大気汚染物質であるディーゼル排気粒子（Diesel exhaust particulate, DEP）の成分である芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）のアレルギーへの影響を *in vitro* および *in vivo* において系統的に評価し、さらにその影響を予防するためのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）抽出物あるいはその成分である芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）であるナフタレン、フルオレン、フェナントレン、フルオランテン、ベンゾ(a)アントラセン、ベンゾ(a)ピレン、p-ニトロフェノールについて、開発した化学物質の除去を目的とした非晶質鉄および活性炭を含むフィルターの除去能を評価するため、DEPあるいはその成分を含む水を、それぞれ非晶質鉄あるいは活性炭のフィルターを用いてろ過し、フィルター処理後のサンプルのPAHsをGC/MSにて測定した。またDEP試験機（自社製）でディーゼル発電機より発生したDEP中の重金属、PAHsのフィルター性能の評価を行った。また吸着メカニズムの解明のためにPAHsの非晶質鉄の吸着性能などを検討した。その結果、ベンゾ(a)ピレンに対しては非晶質鉄フィルターが効果的であった。非晶質鉄は10nm以下のナノ粒子からなるFerrihydrite構造を有する事が判明した。Ferrihydriteは一般的に重金属の吸着性に優れているが、我々の試験経過ではPAHsなどの有機物に対しても吸着性がある事が判明されつつ有り、今後の吸着熱計算等のモデル実験でPAHsの吸着効率の評価予定である。以上から、我々の開発したフィルターはDEP、特にPAHsによるアレルギー促進作用を抑制できることがわかった。

A. 研究目的

近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。さらには、気管支喘息症の増悪因子としても化学物質が関与することが考えられることから、化学物質における免疫毒性やアレルギー発症への影響を調べることは急務である。本研究では環境中の化学物質のアレルギーへの影響を *in vitro* および *in vivo* において系統的に評価し、さらにその影響を予防するた

めのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。

B. 研究方法

1. フィルターの除去能の評価

自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）抽出物あるいはその成分である芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）であるナフタレン、フルオレン、フェナントレン、フルオランテン、ベンゾ(a)アントラセン、ベンゾ(a)ピレン、p-ニトロフェノールについて、開

発した化学物質の除去を目的とした非晶質鉄および活性炭を含むフィルターの除去能を評価するため、DEPあるいはその成分を含む水を、それぞれ非晶質鉄あるいは活性炭のフィルターを用いてろ過し、フィルター処理後のサンプルのPAHsをGC/MSにて測定した（評価1）。またDEP試験機（自社製）でディーゼル発電

機より発生したDEP中の重金属、PAHsのフィルター性能の評価を行った。

2. 吸着メカニズムの解明

PAHsの非晶質鉄の吸着性能のメカニズムを検討した（評価2）。

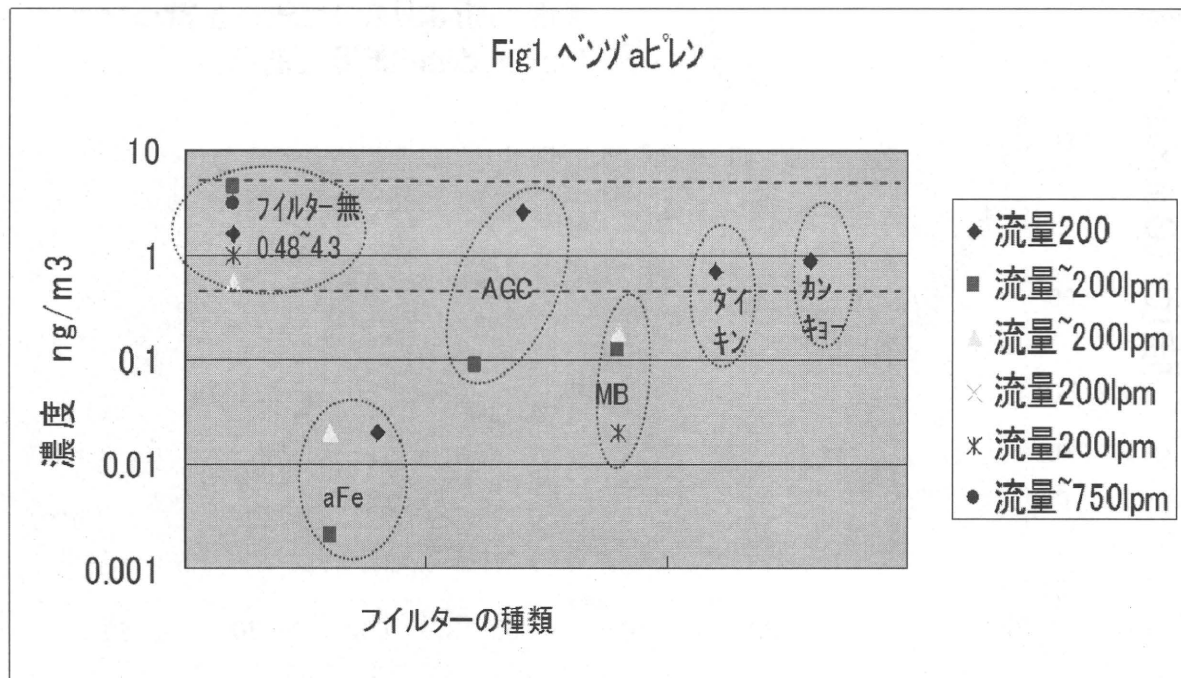


図1 ベンゾ(a)ピレンに対する非晶質鉄 (aFe) などのフィルターの流量別の除去効率

C. 研究結果

除去能評価1実験では、フルオランテン、ナフタレンは、既存のフィルターで除去が可能であったが、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(a)アントラセンに対しては非晶質鉄フィルターが効果的であり、p-ニトロフェノールに対しては活性炭フィルターが効果的であった（図1）。

評価2で、非晶質鉄は10nm以下のナノ粒子からなるFerrihydrite構造を有する事が判明した（図2）。

D. 考察

非晶質鉄フィルターと活性炭フィルターを組み合わせ構成されている本フィルターはアレルギー反応を抑制できることから、喘息の重症化の予防に有効であることが示された。

Ferrihydriteはナノ粒子からなり比表面積が200m²/g前後と高く、プラスイオンの重金属などの吸着材として広く使用されている。有機化合物の官能基などと配位結合して凝集体を形成して補足固定・分解除去できることも示されている（特開2004-349519）。消臭、抗菌、防カビとして、空気中の酸化物質からラジカル（不対電子）を生成して吸着した物質を分解す