

ルゲン反応性 T 細胞が、好酸球活性化因子 IL-5 を過剰産生することによって、気道粘膜において好酸球性炎症が惹起されるという、pathogenesis が推測される。非アトピー型喘息群においては、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るが (30.8 ± 6.8 pg/ml)、ダニ抗原に反応した IL-5 産生は誘導されない (0.7 ± 0.0 pg/ml)。興味深いことに、ダニアレルゲンに対する IgE 抗体のない Mixed type 喘息群において、ダニアレルゲンに反応した IL-5 産生が認められた (33.2 ± 23.0 pg/ml)。この研究結果は、IgE 抗体の認められない喘息症例においても、ダニ抗原を認識して IL-5 を産生する T 細胞が存在することを示し、好酸球性炎症の成立機序を考える上で重要である。

アトピー型喘息群に限定し、気道過敏性 (AchPC₂₀) が 20,000γ以上と以下の 2 群で比較すると、表 2 に示す如く、抗原非特異的活性化刺激 (PMA+ionomycin) に対する IL-5 産生は、気道過敏性を有する (20,000 以下) 症例で有意に高かった (30.8 ± 6.8 vs 14.5 ± 1.2 pg/ml)。ダニアレルゲン反応性の IL-5 産生においては、差はより顕著である (151.1 ± 81.6 vs 0.9 ± 0.5 pg/ml)。血中 total IgE 値には、有意差は認めなかった (600 ± 181 , $1,140 \pm 661$ IU/ml)。IgE 産生は、T 細胞の IL-4 産生に規定されることが知られている。この結果は、好酸球性炎症に結びつく T 細胞 IL-5 産生が、IL-4 産生と別個に制御されていることをうかがわせるものである。すなわち、ダニ特異的 IgE 抗体があるだけでは、気道過敏性にむすびつかないが、好酸球活性化作用を有する IL-5 の産生が誘導されると気道過敏性がもたらされるものと推測される。

表 2. アトピー型喘息における T 細胞 IL-5 産生と気道過敏性の関連

	AchPC ₂₀	
	<20,000	20,000<
N	30	3
P+I	30.8 ± 6.8	14.5 ± 1.2
Mite	151.1 ± 81.6	0.9 ± 0.5
ECP	23.6 ± 3.8	35.4 ± 19
FEV _{1.0}	76.9 ± 2.1	85.0 ± 2.8
Eo	543 ± 68.2	660 ± 141
Total IgE	600 ± 181	$1,140 \pm 661$

最後に、気道過敏性 (AchPC₂₀) が、2,000 以下 (高度)、2,000 以上 20,000 以下 (中程度) と 20,000 以上 (なし) の 3 群で、IL-5 産生について解析した (表 3)。1 秒率では、 74.6 ± 5.1 、 77.3 ± 2.1 、 $85.2 \pm 2.8\%$ と気道狭窄の程度と気道過敏性の程度 (AchPC₂₀) が、相関することが明らかである。histamin に対する気道過敏性 (HisPC₂₀) も概ね AchPC₂₀ と同じ分布をとっていた (669 ± 266 、 $1,280 \pm 384$ 、 $7,262 \pm 4,269$)。AchPC₂₀ が 20,000 以上の群では、抗原非特異的活性化刺激 (PMA+ionomycin) に対する IL-5 産生は、 11.0 ± 1.9 pg/ml と低値で、気道過敏性を有する群では高かった (32.9 ± 15.5 、 34.5 ± 7.5 pg/ml)。concanavalin A に対する IL-5 産生は、気道過敏性の程度順に、 35.0 ± 18.3 、 18.2 ± 3.0 、 12.5 ± 6.3 pg/ml であった。

表 3. 気道過敏性の程度別にみた免疫学的特徴

	AchPC ₂₀		
	<2,000	<20,000	20,000<
N	16	29	8
P+I	32.9±15.5	34.5±7.5	11.0±1.9
ConA	35.0±18.3	18.2±3.0	12.5±6.3
FEV _{1.0}	74.6±5.1	77.3±2.1	85.2±2.8
Eo	580.6±108.5	532.1±60.1	356.7±96
HisPC ₂₀	669±266	1280±384	7262±4269
Total IgE	387±111	557±203	521±287

以上の研究結果は、T 細胞 IL-5 産生が *in vivo* において、好酸球性炎症疾患の組織障害あるいは機能障害に関連することを示唆している。われわれは、原因不明の好酸球性肺炎症例における末梢血 T 細胞 IL-5 産生を解析した。臨床経過を図 2 に示す。典型的な肺浸潤と好酸球増多を初発症状とする症例で、ステロイドパルス療法にもかかわらず、末梢血好酸球は 40% 以上を維持していた。

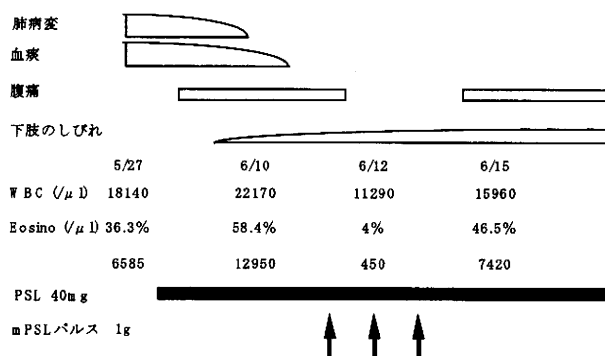


図 2. ステロイド抵抗性の好酸球性肺炎症例

in vitro におけるステロイド感受性を解析したところ、IL-5 産生はデキサメサゾン 100 nM

によっても抑制されず、ステロイド抵抗性の状態にあったことが判明した (図 3)。

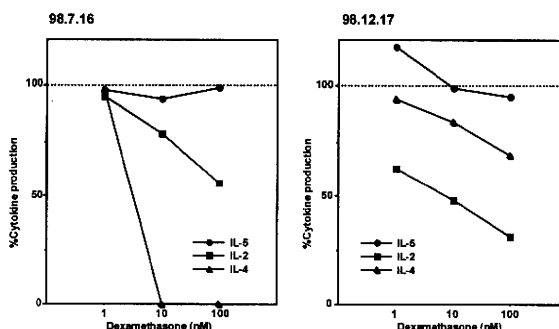


図 3. 好酸球性炎症症例における末梢血 T 細胞のステロイド抵抗性

好酸球性炎症は概ねステロイド治療に対するレスポンスが良好とされるが、このようにステロイド抵抗性の症例においては、治療に難渋することが多い。そこで、われわれは、ステロイド抵抗性の肺好酸球性炎症モデルの構築をめざして、マウス T 細胞クローン移入モデルを作成した。我々は、T 細胞クローンを無処理マウスに移入、抗原チャレンジを行うことにより、気道過敏性、肺好酸球浸潤を惹起する T 細胞依存性喘息モデルを報告してきた。今回は、さらに T 細胞クローンを 20 種類以上樹立し、 1×10^7 cells/head を無処理 BALB/c マウスに経静脈的に移入し、24 時間後に OVA 経鼻チャレンジを行い、移入 30 分前および移入 24 時間後に 0 (生理食塩水のみ), 1, 3 mg/kg のデキサメタゾンを経皮下投与した。チャレンジ 48 時間後に無拘束呼吸機能解析装置 (BUXCO) を用いて塩化メサコリンによる気道抵抗を測定し、Penh (enhanced pause) 値で表示した。BALF 好酸球の解析は、チャレンジ 48 時間後に BAL を施行、総細胞数をカウントし、サイトスピンを用いてスライドガラスに接着させ、ギムザ染色を行い、好酸球数をカウントした。

その結果、肺好酸球浸潤は概ね移入した T 細胞クローンの IL-5 産生能に依存するが、クローン毎に、サイトカインの産生能、浸潤細胞の種類、程度、気道過敏性の誘導の有無は異なることが明らかになった。また、デキサメサゾンによって好酸球浸潤が用量依存的に抑制されるクローンとそうでないクローンが存在することがわかった。

D. 考察

血清 ECP 値は、好酸球活性化の指標としての有用性が確立されている。喘息患者は非発作時においても、健常者に比べて、血清 ECP 値が有為に高く、発作時では、さらに高値である。また、1 秒率、ピークフロー値などの呼吸機能と逆相関する。気道過敏性が高い症例では血清 ECP 値が有為に高いことも明らかにされている。今回 IL-5 値と血清 ECP 値との間に正の相関が認められた結果は、T 細胞の IL-5 産生能が *in vivo* における好酸球活性化に関連することを示すものである。

現在までの国内外の研究成果から、気管支喘息の好酸球性炎症には 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。英国の Kay

らは、気管支喘息における T 細胞の関与を提唱したパイオニアであり、気管支粘膜生検、気管支肺胞洗浄の所見から、1) 気管支喘息患者の気道炎症局所には、活性化 CD4+ T 細胞（ヘルパー T 細胞）の浸潤が顕著にみられ、2) 喘息の重症度・気道過敏性の程度と活性化 T 細胞数との間に相関が認められ、3) 粘膜に浸潤する好酸球数と T 細胞数とが相関し、さらに 4) 喘息患者では末梢血中にも、活性化 T 細胞数が増加していることなどから、気管支喘息の好酸球性炎症はヘルパー T 細胞と関連するとのコンセプトを提唱してきた。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、喘息患者では、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、ダニアレルゲン刺激に反応した末梢 CD4+ 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+ T 細胞は、抗原非特異的刺激（ホルボーホルエステル+Ca²⁺イオノフォア）に反応した IL-5 産生が、健常者に比べて有意に亢進しているが、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IFN- γ 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+ 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。

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+、残りが CD8+）、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+、CD8+ 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。気管支肺胞洗浄（Broncho-alveolar lavage; BAL）液中に回収

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- γ 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、これらの海外の研究報告と異なり、好酸球性炎症の炎症局所を解析したものではないが、血液循環中においても喘息の病態毎に、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、気管支喘息が、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、気道過敏性と免疫システムの関わりが解明されるものと期待される

ステロイド抵抗性の問題は、好酸球性疾患の克服に向けての大課題である。今年度の研究成果として、ステロイド抵抗性肺好酸球浸潤モデルはじめて確立された。今後、そのメカニズムの解析を進め、治療介入の糸口を見出したい。

E. 結論

初年度の研究成果から、好酸球性炎症には、活性化 T 細胞により産生される IL-5 の役割が重要であることが明らかになった。今年度は、まず成人喘息症例（アトピー型 50 例・非アトピー型 50 例）を対象とし、*in vivo* における好酸球活性化の指標としての血清 ECP 値との関連につき検討した。24 時間培養上清中の IL-5 値と血清 ECP 値の間に正の相関が認めら

れた ($p=0.03$)。肺の好酸球浸潤には、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関連することが報告されているが、われわれの知見は、T 細胞の IL-5 産生能が *in vivo* における好酸球活性化に関連することを示している。次いで、臨床的にステロイド抵抗性の好酸球性肺炎症例について、免疫薬理的解析を行い、T 細胞レベルでのステロイド抵抗性の存在を裏付けた。ステロイド抵抗性の克服に向け、治療介入モデル構築を目指し、T 細胞移入モデルを作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Abe, A., Otomo, T., Koyama, S., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. 2011. Comparative analysis of steroid sensitivity of Th cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)

2) Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Hiroi, T., and Kaminuma, O. 2011. Zinc finger protein, multitype 1 suppresses human Th2 development via down-regulation of IL-4. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)

3) Otomo, T., Kaminuma, O., Yamada, J., Kitamura, N., Suko, M., Kobayashi, N., and Mori, A. 2010. Eosinophils are required for the induction of bronchial hyperresponsiveness in a Th transfer model of Balb/c background. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152 (Suppl 1):79-82.

4) Kitamura, F., Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Miyatake, S., Hiroi, T., and Kaminuma, O. 2010. Selective down-regulation of Th2 cytokines by C-terminal binding protein 2 in human T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152 (Suppl 1):18-21

5) Kaminuma, O., Suzuki, K., and Mori, A. 2010. Effect of sublingual immunotherapy on antigen-induced bronchial and nasal inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152 (Suppl. 1):75-78.

6) Katoh, S., Maeda, S., Fukuoka, H., Wada, T., Moriya, S., Mori, A., Yamaguchi, K., Senda, S., and Miyagi, T. 2010. A crucial role of sialidase Neul in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model. *Clin. Exp. Immunol.* 161 (2):233-241.

7) Ebisawa, T., Numazawa, K., Shimada, H., Izutsu, H., Sasaki, T., Kato, N., Tokunaga, K., Mori, A., Honma, K., Honma, S., and Shibata, S. 2010. Self-sustained

circadian rhythm in cultured human mononuclear cells isolated from peripheral blood. *Neurosci. Res.* 66:223-227.

8) Seki, M., Kimura, H., Mori, A., Shimada, A., Yamada, Y., Maruyama, K., Hayashi, Y., Agematsu, K., Morio, T., Yachie, A., and Kato, M. 2010. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* 52:e196-e199.

9) 森 晶夫：真菌アレルギー—最近の話題—自然免疫、獲得免疫と真菌、アレルギーの臨床;30 (1):30-32, 2010

10) 森 晶夫：重症喘息の機序とその対策、臨床免疫・アレルギー科;53(2):167-173, 2010

11) 森 晶夫：国際アレルギー学会(WAO)2009 報告、日本アレルギー協会関東支部だより;7:3-5, 2010

12) 森 晶夫：炎症性メディエータとアレルギー疾患、*Topics in Atopy*;9(2):37-43, 2010

13) 福富友馬、谷口正実、東 典孝、石井豊太、龍野清香、谷本英則、押方智也子、小野恵美子、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、中澤卓也、大友 守、前田裕二、森晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：成人喘息患者における持続的気流閉塞—臨床的見地か

ら—、

第 11 回喘息リモデリング研究会、呼吸;29(5):535-537, 2010

14) 神沼 修、加藤茂樹、森 晶夫：T細胞の遊走と CD44、臨床免疫・アレルギー科;53(6):551-555, 2010

15) 森 晶夫、北村紀子、安部暁美、山口美也子、谷本英則、関谷潔史、押方智也子、福富友馬、大友 守、前田裕二、谷口正実、長谷川眞紀、秋山一男、大友隆之、神沼修：わが国の重症難治性喘息の病態と治療、第 50 回日本呼吸器学会学術講演会ハイライト:2-4, 2010

16) 森 晶夫：非アトピー型喘息、The 17th Symposium of Asthma in Tokyo、ライフサイエンス出版、東京 p.62-68, 2010

17) 森 晶夫：コーヒーとぜんそく、コーヒーの医学(野田 光彦編)、日本評論社、東京 p.199-201, 2010

18) 森 晶夫：アレルギー性疾患関連の分子を標的とした治療、総合アレルギー学(福田 健編)、南山堂、東京 p.690-695, 2010

2. 学会発表

1) Kaminuma, O., Kitamura, N., Mori, A., Nemoto, S., Tatsumi, H., Miyoshi, H., Miyatake, S., Kitamura, F., Yamaoka, K., and Hiroi, T. Human Th2 cells produce IFN-gamma due to hyper-expression of T-bet. 2010

American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual Meeting.

J. Allergy Clin. Immunol. :S (New Orleans) 2010/2/26-3/2

2) Kaminuma O, Yang L, Takagi S, Ichikawa S, Hirose S, Mori A, Umezu-Goto M, Ohtomo T, Ohmachi Y, Noda Y, Okumura K, Ogawa H, Kitamura F, Hiroi T. Successful recovery from allergic airway inflammation by oral immunotherapy with allergen-expressing transgenic rice seed. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual meeting. (New Orleans) 2010/2/26-3/2

3) Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., Kaminuma O. Analysis of T cell-dependent bronchoconstriction using human cultured bronchial smooth muscle cells. Collegium International Allergologicum 27th SYMPOSIUM. Final program p.67 (Ischia) 2010/4/25-30

4) Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., Kaminuma O. T cell-dependent bronchoconstriction in vivo and in vitro. European Association of Allergy and Clinical Immunology 2010. Allergy 65 (Suppl. 92):69 (London) 2010/6/5-9

5) Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., Kaminuma O. IgE-independent, Role of T cells in late phase asthmatic response. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology 2010. Final program

p. (Singapore) 2010/11/6-9

6) Mitsui C., Taniguchi M., Higashi N., Ono E., Kajiwara K., Hikutomi Y., Tsuburai T., Sekiya K., Tanimoto H., Ishii T., Mori A., Mita H., Hasegawa M. and Akiyama K. Cysteinyl-Leukotriens overproduction and the asthma severity in patients with aspirin-induced asthma. World Allergy Organization International Scientific Conference. Final program p.100 (Dubai) 2010/12/5-8

7) 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、中澤卓也、齋藤博士、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、福富友馬、関谷潔史、谷口正実、大友守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、安枝浩、秋山一男：アトピー型成人喘息患者における環境中ダニアレルゲン量モニタリングの有用性の検討、第50回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 48 : 175, 2010. 4. 23 (京都)

8) 関谷潔史、谷口正実、谷本英則、龍野清香、福富友馬、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友守、森 晶夫、前田裕二、長谷川眞紀、秋山一男：若年成人喘息大発作入院症例における臨床的背景の検討、第50回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 48 : 335, 2010. 4. 25 (京都)

9) 福富友馬、谷口正実、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、押方智也子、小野恵美子、関谷潔史、釣木澤尚美、東 憲孝、中澤卓也、大友守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山

一男：成人喘息難治化因子の臨床的検討～特に性差に注目して～、第 50 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 48 : 336, 2010. 4. 25 (京都)

10) 龍野清香、粒来崇博、谷口正実、福富友馬、谷本英則、小野恵美子、押方智也子、関谷潔史、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、中澤卓也、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：副鼻腔炎の合併は気流制限なく臨床的に安定している喘息患者における呼気 NO 高値の予測因子である、第 50 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 48 : 363, 2010. 4. 25 (京都)

11) 関谷潔史、谷口正実、谷本英則、龍野清香、福富友馬、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、東 憲孝、大友 守、前田裕二、森晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：若年成人の喘息大発作はここ 10 年でどう変化したのか、第 22 回日本アレルギー学会春期臨床大会、アレルギー 59 : 376, 2010. 5. 8 (京都)

12) 谷本英則、谷口正実、竹内保雄、齋藤明美、武市清香、福富友馬、関谷潔史、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、中澤卓也、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、安枝 浩、秋山一男：ABPA-Seropositive の臨床的検討、第 22 回日本アレルギー学会春期臨床大会、アレルギー 59 : 378, 2010. 5. 8 (京都)

13) 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、中澤卓也、齋藤博士、粒来崇博、武市清香、谷本英則、関谷潔史、谷口正実、大友 守、前

田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、安枝 浩、秋山一男：成人喘息患者における超極細線維フロンカバーによる環境調整の有用性に関する検討、

第 22 回日本アレルギー学会春期臨床大会、アレルギー 59 : 385, 2010. 5. 8 (京都)

14) 齋藤明美、押方智也子、釣木澤尚美、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、福富友馬、関谷潔史、谷口正実、大友 守、前田裕二、森晶夫、長谷川眞紀、田中 昭、池田玲子、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男：過敏性肺炎における沈降抗体反応とイムノキャップ Ta の有用性、第 22 回日本アレルギー学会春期臨床大会、アレルギー 59 : 414, 2010. 5. 8 (京都)

15) 武市清香、粒来崇博、谷口正実、福富友馬、谷本英則、小野恵美子、押方智也子、関谷潔史、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、中澤卓也、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：副鼻腔炎の合併は気流制限なく臨床的に安定している喘息患者における呼気 NO 高値の予測因子である、第 20 回国際喘息学会日本・北アジア部会 プログラム・抄録集 p. 59, 2010. 7. 2-3 (東京)

16) 関谷潔史、谷口正実、福富友馬、武市清香、谷本英則、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：若年成人喘息大発作入院症例における臨床背景の変化、第 20 回国際喘息学会日本・北アジア部会 プログラム・抄録集 p. 61, 2010. 7. 2-3 (東京)

17) 谷本英則、谷口正実、竹内保雄、齋藤明美、武市清香、福富友馬、関谷潔史、森 晶夫、長谷川眞紀、安枝 浩、秋山一男：アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 43 例の臨床的検討、第 20 回国際喘息学会日本・北アジア部会

プログラム・抄録集 p. 62, 2010. 7. 2-3 (東京)

18) 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、齋藤博士、粒来崇博、谷本英則、関谷潔史、谷口正実、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男：アレルギー性気管支肺アスペルギルス症

(ABPA) とアスペルギルスに感作された成人喘息 (FSBA) のアレルギー特異的 IgE 抗体に関する比較検討、第 20 回国際喘息学会日本・北アジア部会 プログラム・抄録集 p. 69, 2010. 7. 2-3 (東京)

19) 神沼 修、北村紀子、北村ふじ子、巽英樹、根本莊一、宮武昌一郎、三好浩之、森晶夫、廣井隆親：ヒト Th1/Th2 分化に対する ZFPM1 の役割、アレルギー・好酸球研究会 2010、抄録集 p. 21, 2010. 6. 19 (東京)

20) 安部暁美、大友隆之、神山 智、北村紀子、神沼 修、森 晶夫：T 細胞クローン移入喘息モデルによるステロイド感受性解析、アレルギー・好酸球研究会 2010、抄録集 p. 36, 2010. 6. 19 (東京)

21) 森 晶夫、北村紀子、安部暁美、荒川真理子、山口美也子、神山 智、福富友馬、谷本英則、押方智也子、関谷潔史、大友 守、谷口正実、前田裕二、長谷川眞紀、秋山一男、大友隆之、神沼 修：ワークショップ 7「難治

性アレルギー疾患における真菌の役割」わが国の重症喘息の病態と真菌抗原による非 IgE 依存性喘息反応、第 60 回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1283, 2010. 11. 27 (東京)

22) 神沼 修、北村紀子、森 晶夫、巽英樹、根本莊一、廣井隆親：ZFPM1/CtBP1 コンプレックスは GATA-3 による Th2 分化を抑制する、第 60 回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1399, 2010. 11. 26 (東京)

23) 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、齋藤博士、粒来崇博、三井千尋、谷本英則、関谷潔史、谷口正実、大友 守、前田裕二、森晶夫、長谷川眞紀、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男：アレルギー性気管支肺アスペルギルス症とアスペルギルス感作成人喘息の臨床像と IgE 抗体産生に関する検討、第 60 回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1400, 2010. 11. 27 (東京)

24) 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、中澤卓也、粒来崇博、三井千尋、谷本英則、関谷潔史、谷口正実、大友 守、前田裕二、森晶夫、長谷川眞紀、西岡謙二、安枝 浩、秋山一男：環境中ダニアレルゲン量は成人喘息患者の臨床症状を反映する—2 臨床—、第 60 回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1424, 2010. 11. 27 (東京)

25) 三井千尋、谷口正実、東 憲孝、小野恵美子、梶原景一、福富友馬、粒来崇博、関谷潔史、谷本英則、石井豊太、森 晶夫、三田

晴久、長谷川眞紀、秋山一男：NSAIDs 過敏喘息の難治化と CysLTs 過剰産生、第 60 回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1446、2010.11.26 (東京)

26) 武市清香、粒来崇博、谷口正実、福富友馬、三井千尋、谷本英則、小野恵美子、押方智也子、関谷潔史、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、中澤卓也、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：喘息が臨床的に安定しているにもかかわらず呼気 NO 高値の症例の経過、第 60 回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1467、2010.11.27 (東京)

27) 関谷潔史、谷口正実、福富友馬、三井千尋、谷本英則、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：喘息大発作症例の臨床的検討、第 60 回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1477、2010.11.27 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原因不明の慢性好酸球性肺炎の病態解明、新規治療法、およびガイドライン作成に関する研究
好酸球増多に関連する IL-33, TSLP, IL-25 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：

本研究は慢性好酸球性肺炎の科学的病態解明を目的とする。近年、気道上皮細胞から分泌される TSLP, IL-33, IL-25 は好酸球性炎症に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。成人気管支喘息症例 599 例において末梢血好酸球数と遺伝子多型との関連を調べるため、TSLP (rs3806933, rs2289276, rs2289278), IL-33 (rs1929992), IL-25 (rs10143597, rs4553531)について検討を行なった。各遺伝子多型と好酸球数との相関は認められなかったが、TSLPについてはシークエンスを行い、rare variant の検索を現在行なっている。

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。TSLPはB細胞や樹状細胞の活性化を介し、Th2免疫応答を引き起こし、間接的に好酸球性炎症を引き起こす。近年ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の手法を用いて、好酸球性食道炎の原因遺伝子としてTSLPが同定された。また、TSLPと並び、IL-33、IL-25は、プロテアーゼの認識受容体であるPARや病原微生物認識受容体であるTLRを介し、気道上皮細胞より分泌され好酸球を誘導するサイトカインとして注目されている。マウスにおいてIL-25はIL-5依存的に好酸球増多を引き起こし、IL-33は好酸球の生存延長、浸潤および脱顆粒の促進を引き起こす。本研究では、TSLP, IL-33, IL-25の遺伝子多型のタイピングを行ない、成人気管支喘息1025例を用いて、末梢血好酸球数との相関の検討を行なった。

B. 研究方法

成人気管支喘息症例 599 例を対象とし、遺伝子型タイピングは、日本人集団の HapMap database より Tag SNP($r^2 > 0.9$)を抽出した。TSLP (rs3806933, rs2289276, rs2289278), IL-33 (rs1929992), IL-25 (rs10143597, rs4553531)について TaqMan 法を用いてタイピングを実施した。好酸球数との相関関係については Spearman's rank correlation coefficient を用いて検討を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

C. 研究結果

Spearman's test を行なったところ、TSLP (rs3806933, $r=0.05$, $P=0.25$; rs2289276, $r=0.03$,

P=0.52; rs2289278, r=0.10, P=0.02), IL-33 (rs1929992, r=0.04, P=0.36), IL-25 (rs10143597, r=0.02, P=0.57; rs4553531, r=0.02, P=0.60)いずれにおいても、遺伝子多型と末梢血好酸球数との間に有意な相関関係は認められなかった。

D. 考察

今後、慢性好酸球性肺炎の症例のゲノムを収集し、遺伝子多型について検討していく必要がある。今後、同じく気道の好酸球性疾患である、好酸球性中耳炎、好酸球性副鼻腔炎においても遺伝子多型との関連の検証も必要と思われる。現在これらの疾患についてはサンプルを収集中である。

E. 結論

成人気管支喘息症例を用いて、TSLP, IL-33, IL-25遺伝子多型と末梢血好酸球数との相関関係について検討したが、有意な相関は認められなかった。現在、TSLPについては気管支喘息患者で末梢血好酸球数1000/ μ l以上の症例28名についてエクソン部分を中心としたシーケンスを行いrare variantの検索を行なっている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.* 2010;151(3):255-261

2) 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.

3) 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.

4) Isada A, Konno S, Hizawa N, Tamari M, Hirota T, Harada M, Maeda Y, Hattori T, Takahashi A, Nishimura M. A functional polymorphism (-603A --> G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma. *J Hum Genet.* 2010 Mar;55(3):167-74..

5) Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with

allergen sensitization in the Japanese population. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2):498-500.

6) Undarmaa S, Mashimo Y, Hattori S, Shimojo N, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Kohno Y, Okamoto Y, Hirota T, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Replication of genetic association studies in asthma and related phenotypes. J Hum Genet. 2010 Jun;55(6):342-9.

7) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 in press.

日本語総説

8) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美: 遺伝子多型とアレルギー疾患. アレルギーの臨床 30:164-167, 2010

9) 玉利真由美、広田朝光: 基礎医学とのダイアログ、SNP解析を用いた稀少疾患の解明. THE LUNG perspectives 18:164-168, 2010

10) 玉利真由美、広田朝光: Topic/Science、慢性好酸球性肺炎の病態研究の現況. ヒューマンサイエンス誌 31:18-21, 2010

11) 玉利 真由美、広田 朝光: 呼吸器疾患感受性-遺伝的背景- 気管支喘息. 日本胸部臨床 69:687-694, 2010

12) 広田朝光、富田かおり、玉利真由美: 特集: アレルギー疾患に対するオーダーメイド医療、I. アレルギー疾患の遺伝子と遺伝学. アレルギー・免疫 17:1652-1660, 2010

13) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光: III. 診断の進歩、ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患. Annual Review 呼吸器 2011 140-146

14) 広田朝光、富田かおり、玉利 真由美: 特集: 小児アレルギー疾患の治療・管理の新しい展開、I. 基礎研究の進歩 2.アレルギー疾患と遺伝子多型. 小児科臨床 第63:2409-2415, 2010

2. 学会発表

1) 玉利真由美、広田朝光: 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. 愛媛県 ENT臨床セミナー 2010年1月松山全日空ホテル

2) 玉利真由美、広田朝光: 特別講演 遺伝子解析を用いた気管支喘息およびCOPDの病態の解明. 第42回北陸呼吸器シンポジウム(FITs) 2010年2月 金沢都ホテル

3) 玉利真由美、広田朝光: ランチョンセミナーI アレルギー疾患と遺伝子 遺伝子多型と機能解析. 第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2010年2月 福井AOSSA

4) 玉利真由美、広田朝光: アレルギー疾患の病態解析 遺伝子解析を中心に. 第1回 新都心呼

吸器セミナー 2010年4月 新宿ハイアットリージェンシー

5) 玉利真由美、広田朝光: アレルギー疾患の環境と遺伝のトピックス. 第62回 関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会 2010年4月 大阪薬業年金会館

6) 玉利真由美、広田朝光: シンポジウム「アレルギー疾患のオーダーメイド治療」研究者からの発信. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月 国立京都国際会館

7) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり: ランチョンセミナー 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析. 第20回 日本耳科学会総会 学術講演会 2010年10月 松山 ひめぎんホール

8) 竹内和秀、真下陽一、服部聡、下條直樹、富坂美奈子、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、佐藤一樹、鈴木修一、西牟田敏之、渡辺博子、星岡明、山出品子、渡邊美砂、土居悟、宮武明彦、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一: 一般演題(口演)4 関連解析・多因子遺伝1(小児疾患)・「小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連する遺伝子多型」. 日本人類遺伝学会第55回大会 2010年10月 大宮ソニックシティ

9) 広田朝光、玉利真由美、佐伯秀久、常深祐一郎、中村祐輔、鎌谷直之: 一般演題(口演)4 関連解析・多因子遺伝1(小児疾患)・「CCL22遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の関連解析」. 日本人類遺伝学会第55回大会 2010年10月 大宮ソニックシティ

10) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり: シンポジウム11 食物アレルギーをめぐる新たな進展・「食物アレルギーの遺伝子多型解析」. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

11) 竹内和秀、真下陽一、服部聡、下條直樹、富坂美奈子、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、佐藤一樹、鈴木修一、西牟田敏之、渡辺博子、星岡明、山出品子、渡邊美砂、土居悟、宮武明彦、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一: ミニワークショップMW3 サイトカイン・ケモカイン・MW3-5「小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連する遺伝子多型」. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

12) 広田朝光、佐伯秀久、玉利真由美: ミニワークショップMW6 アトピー性皮膚炎 up date・MW6-3「CCL22遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の関連解析」. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

13) 中村豊、長島広相、佐藤温子、佐々木信人、似内郊雄、中舘俊英、小林仁、宮本孝行、菅野祐幸、澤井高志、出原賢治、玉利真由美、広田朝光、井上洋西、山内広平: 一般演題「気管支喘息患者のIL-13遺伝子多型と気道リモデリング関連分子」. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

14) 坂下雅文、広田朝光、富田かおり、扇和弘、伊藤有未、岡本昌之、大澤陽子、山田武千代、玉利真由美、藤枝重治: 一般演題「小児気管支喘息関連領域17q21のSNPsとアレルギー性鼻

炎との関連解析. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

15) 増子裕典、金子美子、飯島弘晃、内藤隆志、坂本透、広田朝光、玉利真由美、檜澤伸之: 一般演題 「健常成人の呼吸機能におけるTSLP遺伝子多型の検討. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

16) 飯島弘晃、増子裕典、金子美子、坂本透、内藤隆志、広田朝光、玉利真由美、檜澤伸之: 一般演題 「血清総IgE値, 吸入抗原特異的IgE抗体(MAST)を用いた感作パターンの解析. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

17) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり: シンポジウム3 皮膚アレルギー学の未来. アレルギー疾患の遺伝子多型解析の現況 第40回日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会総会・学術大会 2010年12月 広島国際会議場 2010/12/11

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

玉利真由美、中村祐輔、人見祐基、広田朝光 :
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 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 秋田大学大学院医学系研究科 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 研究員

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

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。

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陰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。

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 LTB₄ 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・解析中である。

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。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:

<CysLT2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

LTC₄/D₄/E₄ 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。

(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:

<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。

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

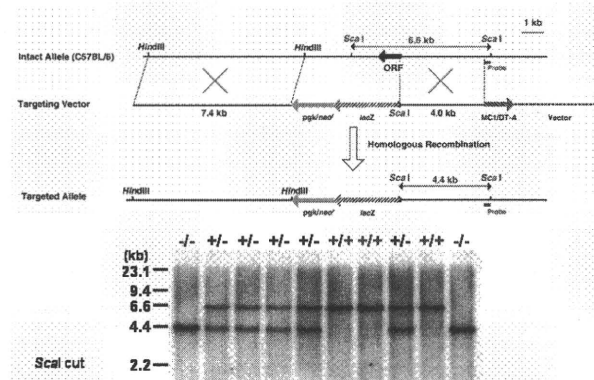


図 1 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

<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。

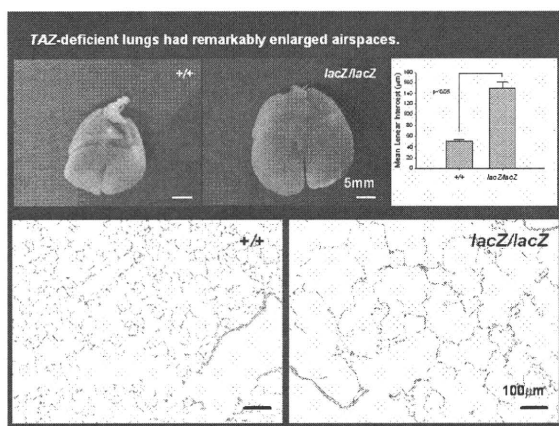


図2 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見

次に、胎生期から成体までの、野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見を検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスの肺は、胎生期においては、ほぼ正常の発育であるが、生後 5 日以降には気腔の拡張が認められ、その後、気腔の拡張が増大していた。

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) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2010; 337: 77-81.

2) Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H, Kamitani S, Desaki M, Takami K, Kawasaki S, Kato J, Nagase T. Tumor necrosis factor- α enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1. *Exp Lung Res* 2010; 36: 12-24.

3) Narumoto O, Horiguchi K, Horiguchi S, Moriwaki Y, Takano-Ohmuro H, Shoji S, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N. Down-regulation of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (slurp-1), an endogenous allosteric α 7 nicotinic acetylcholine receptor modulator, in murine and human asthmatic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398: 713-8.

4) Ihara Y, Kihara Y, Hamano F, Yanagida K, Morishita Y, Kunita A, Yamori T, Fukayama M, Aburatani H, Shimizu T, Ishii S. The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 TDAG8 facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 17309-14.

5) Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano M R, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 2010 in press.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘

発明の名称：筋ジストロフィー症の病態モデル
哺乳動物、及びその製造方法
(出願準備中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし