

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

3. その他

なし

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

重症難治性喘息の臨床的特徴と炎症細胞からみた基礎的要因に関する研究

研究分担者 谷本 安（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科 講師）

研究協力者

高橋 清、宗田 良、木村五郎、平野 淳（国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科）

岡田千春（国立病院機構本部人材育成キャリア支援室）

片岡幹男（岡山大学大学院保健学研究科）

能島大輔、早稲田公一、陳 妍妍（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科血液・腫瘍・呼吸器内科学）

宮原信明（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科）

研究要旨

難治性喘息の予防と治療の対策を目的として、臨床と基礎の両面から検討した。(1) 臨床面では、成人喘息患者における呼気凝縮液（EBC）中のECPならびにIL-8と重症度との関連について昨年度検討したが、今年度はその他の炎症マーカーについても検討を加えた。治療下の成人喘息症例を対象に、血清ならびにEBC中のECP、IL-8、IL-4、TSLP、TNF-a、histamine等を測定し、JGL2009に基づいた症状、治療ステップ、治療を考慮した重症度、呼吸機能との関連を検討した。治療下での成人喘息において、最重症持続型喘息には、アトピー型、非アトピー型、EBC中ECP高値例やEBC中IL-8高値例といった様々なフェノタイプの存在が示唆された。EBC中のECPやIL-8は重症度とは相関せず、血清中のIL-4やTSLPは治療ステップと弱い負の相関を認めた。重症度と相関する因子は主に呼吸機能であった。(2)炎症細胞からみた基礎的要因については、近年アレルギー性炎症のコンダクターとしての役割が示唆されている好塩基球の重症難治病態への関与を解明するために、昨年度に引き続いて好塩基球の抗原提示能について検討した。健常者の末梢血単核球をIL-3や抗IgE抗体の存在下・非存在下で培養した後、フローサイトメトリーを用いてCD203c陽性分画（好塩基球分画）におけるHLA-DR、CD80、CD86の発現を調べ、異なるドナーを用いた再現性について検討した。また、末梢血幹細胞培養好塩基球のHLA-DR発現も調べた。さらにCD4+ T細胞と同種（末梢血幹細胞培養）好塩基球との共培養によるCD4+ T細胞の増殖反応について検討した。末梢血好塩基球にはIL-3の24時間刺激によってHLA-DRならびにCD80の発現が認められ、異なるドナーでの再現性が確認された。24時間のFcεRI架橋刺激ではHLA-DRの発現はみられなかったが、架橋後短時間（30分）で発現が誘導されている可能性が示唆された。末梢血幹細胞培養好塩基球にもHLA-DRの発現が認められ、CD4+ T細胞との共培養により、CD4+ T細胞の増殖反応を惹起した。以上から、(1) 最重症持続型喘息には、アトピー型、非アトピー型、EBC中のECP高値例やIL-8高値例といった様々なフェノタイプの存在が示唆された。EBCや血清中の炎症マーカーは治療の影響を受けて重症度とは相関せず、重症度とは主に呼吸機能（残存する気流制限）が相関した。今後、治療（ステロイド）抵抗性の炎症マーカーについても探索していく必要がある。(2) IL-3で活性化された末梢血好塩基球や末梢血幹細胞培養好塩基球には、抗原提示に必要な細胞表面分子、特にHLA-DRの発現が認められ、ヒト好塩基球がCD4+ T細胞に対して抗原提示能を有する可能性が考えられた。

A.研究目的

重症難治性喘息の予防と治療の対策を目的として、その臨床的特徴と炎症細胞からみた基礎的

要因について検討した。昨年度の研究では、(1) 好酸球顆粒蛋白である ECP と好中球遊走因子である IL-8 に着目し、各々の呼気凝縮液（EBC）

中濃度を測定した。治療下の成人喘息症例を対象に、EBC 中の ECP と IL-8 を測定し、JGL2009 に基づいた症状、治療ステップ、治療を考慮した重症度、呼吸機能との関連を検討した。その結果、EBC 中の ECP や IL-8 は、症状・治療ステップ・治療を考慮した重症度や呼吸機能との間に有意な関連を認めなかった。また、各々血清中の ECP や IL-8 との間にも相関がみられなかった。一方、EBC 中の ECP は IL-8 との間に強い負の相関を示した。治療下での成人喘息において、EBC 中 ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群の 2 群に大別できた。そこで今年度は、他の炎症マーカー (IL-4、TSLP、TNF- $\alpha$ 、histamine 等) についても同様の検討を加えた。(2) 炎症細胞からみた基礎的要因については、近年アレルギー性炎症のコンダクターとしての役割が示唆されている好塩基球に着目し、重症難治病態への関与を解明するために、好塩基球の抗原提示能について検討してきた。昨年度の研究では、未刺激下の末梢血好塩基球には HLA-DR、CD80、CD86 の発現はみられないが、IL-3 の 24 時間刺激によって HLA-DR の有意な発現が IL-3 濃度依存性に認められることを明らかにした。また、IL-3 の 24 時間刺激により CD80 も軽度ながら発現すること、末梢血幹細胞培養好塩基球にも HLA-DR の発現が高率に認められることも確認した。今年度は、これらの分子発現における異なるドナーを用いた再現性について検討した。さらに T 細胞と好塩基球との共培養による T 細胞の増殖反応についても検討した。

## B. 方法

(1) 治療下の成人喘息症例を対象に、血清ならびに EBC 中の ECP、IL-8、IL-4、TSLP、TNF- $\alpha$ 、histamine 等を測定し、JGL2009 に基づいた症状、治療ステップ、治療を考慮した重症度、呼吸機能との関連を検討した。血清ならびに EBC 検体、呼吸機能データは昨年度のものを用いた。すなわち、外来通院治療中、書面で同意の得られた成人喘息患者 (81 名) を対象に、非発作時に R-tube (Respiratory Research, Inc) を用いて採取 (10 分間) した EBC と血清を使用した。

(2) 健常者の末梢血から比重遠心法により単核球を分離し、IL-3 や抗 IgE 抗体の存在下・非存在下で培養した。この単核球を用いて、好塩基球 (活性化) マーカーとされる CD203c (PE 標識) と HLA-DR、CD80、CD86 (FITC 標識) との 2-color flow cytometry (MACS Quant, Miltenyi Biotec) を行い、好塩基球 (CD203c 陽性分画) における HLA-DR、CD80、CD86 の発現を調べ、異なるドナーを用いた再現性について検討した。また、末梢血幹細胞培養好塩基球の HLA-DR 発現も調べた。末梢血幹細胞培養好塩基球は、既報のごとく悪性リンパ腫や肺癌の治療において末梢血幹細胞移植の目的で採取された幹細胞を豊富に含む末梢血単核球の一部を IL-3 (5 ng/ml) の存在下で 3 週間培養し、immunomagnetic beads (Basophil Isolation Kit II, Miltenyi Biotec) を用いた negative selection により高純度の好塩基球を得た。さらに CD4+ T 細胞と同種好塩基球との共培養による CD4+ T 細胞の増殖反応について検討した。健常者の末梢血単核球から immunomagnetic beads を用いた positive selection により CD4+ T 細胞を分離し、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (10 $\mu$ M) を標識した後、同種の末梢血幹細胞培養好塩基球と同数の細胞数で IL-3 (10 ng/ml) の存在下で 5 日間共培養した。その後、flow cytometry を用いて CD4+ T 細胞の増殖反応を解析した。

## C. 結果

(1) 今回検討した成人喘息症例は 81 例 (男性 32 例、女性 49 例) であり、年齢の中央値は 61 歳、JGL2009 に基づく症状、治療ステップ、治療を考慮した重症度の内訳は表 1 の通りであった。最重症持続型は 8 例と全体の約 10% を占めた。最重症持続型喘息には、アトピー型、非アトピー型、EBC 中 ECP 高値例や EBC 中 IL-8 高値例といった様々なフェノタイプの存在が示唆された (図 1)。EBC 中の ECP は重症度とは相関せず、血清ヒスタミンや末梢血白血球数と正の相関を、EBC 中の IL-8 とは強い負の相関を、血清中の IL-8 や TNF- $\alpha$  とは弱い負の相関を認めた (表 2)。

一方、EBC 中の IL-8 についても重症度とは相関せず、血清 TNF- $\alpha$  と正の相関を、血清ヒスタミンや末梢血白血球数とは負の相関を認めた (表 3)。血清中の IL-4 や TSLP は治療ステップと弱い負の相関を、呼吸機能は治療ステップと負の相関を認めた。また、末梢血白血球数は治療ステップと正の相関を認めた (表 4)。重症度と相関する因子は主に呼吸機能であり、末梢血白血球数は重症度と弱い正の相関を認めた (表 5)。(2) 末梢血好塩基球には IL-3 の 24 時間刺激によって IL-3 の濃度依存性に HLA-DR の発現が認められ、異なるドナーでの再現性が確認された (図 2-a)。IL-3 (10ng/ml) の刺激時間の検討では、30 分では発現は誘導されなかったが、24 時間ならびに 72 時間で誘導された (図 2-b)。CD80 の発現も HLA-DR と同様に IL-3 刺激後 24 時間ならびに 72 時間で誘導された (図 3-a)。CD86 の発現については IL-3 刺激 72 時間後まで有意な発現は認められなかった (図 3-b)。24 時間の Fc $\epsilon$ RI 架橋刺激では HLA-DR の発現はみられなかったが、架橋後短時間 (30 分) で発現が誘導されている可能性が示唆された (図 4)。末梢血幹細胞培養好塩基球にも HLA-DR の発現が認められた (図 5)。なお、末梢血好塩基球と異なり CD80 の明らかな発現はみられなかった。CD4+ T 細胞と同種 (末梢血幹細胞) 好塩基球との共培養により、CD4+ T 細胞の増殖反応が惹起された (図 6)。

#### D. 考察

(1) 治療下の成人喘息症例 (81 例) を対象に、血清ならびに EBC 中の ECP、IL-8、IL-4、TSLP、TNF- $\alpha$ 、histamine 等を測定し、JGL2009 に基づいた症状、治療ステップ、治療を考慮した重症度、呼吸機能との関連を検討した。治療下での成人喘息において、最重症持続型喘息には、アトピー型、非アトピー型、EBC 中 ECP 高値例や EBC 中 IL-8 高値例といった様々なフェノタイプの存在が示唆された。EBC 中の ECP や IL-8 は重症度とは相関せず、血清中の IL-4 や TSLP は治療ステップと弱い負の相関を認めた。EBC 中の ECP は血清ヒスタミン、末梢血白血球数と正の

相関を、EBC 中ならびに血清中の IL-8、血清 TNF- $\alpha$  とは負の相関を認めた。EBC 中の IL-8 は血清 TNF- $\alpha$  と正の相関を、EBC 中の ECP、血清ヒスタミン、末梢血白血球数とは負の相関を認めた。重症度と相関する因子は主に呼吸機能であり、末梢血白血球数は治療ステップ、重症度と正の相関を認めた。これらの結果は、炎症の質的多様性、治療効果、治療不足、治療薬の反応性低下などが複雑に絡み合っていることを反映しているものと考えられた。今後、治療 (ステロイド) 抵抗性の炎症マーカーについても探索していく必要がある。

(2) 好塩基球は遅発相の気道局所に集積し、アレルギー性炎症におけるエフェクター細胞と考えられていたが、免疫・アレルギー反応を調節する細胞としても捉えられるようになってきた。さらに近年、アレルギー性炎症のコンダクターとしての役割も注目されている。好塩基球の抗原提示能について検討したところ、IL-3 による 24 時間の刺激では濃度依存性に HLA-DR の発現が誘導されることが判明した。また、CD80 に関しても軽度の発現が認められた。さらに、末梢血幹細胞培養好塩基球にも HLA-DR の発現が確認され、CD4+ T 細胞との共培養により、CD4+ T 細胞の増殖反応を惹起した。今後、CD4+ T 細胞の増殖反応が Th2 免疫応答の増強につながるものであるかどうか、また、健常人と喘息患者における差異なども検討する必要がある。いずれにせよ、IL-3 で活性化された末梢血好塩基球や末梢血幹細胞培養好塩基球には、抗原提示に必要な細胞表面分子、特に HLA-DR の機能的発現が認められた。好塩基球はアレルギー性炎症のイニシエーター・コンダクターとしても機能し、気管支喘息の慢性化・重症化に関与している可能性がある。

#### E. 結論

(1) 最重症持続型喘息には、アトピー型、非アトピー型、EBC 中の ECP 高値例や IL-8 高値例といった様々なフェノタイプの存在が示唆された。EBC や血清中の炎症マーカーは治療の影響を受けて重症度とは相関せず、重症度とは主に呼吸機能 (残存する気流制限) が相関した。今後、

治療（ステロイド）抵抗性の炎症マーカーについても探索していく必要がある。

(2) IL-3 で活性化された末梢血好塩基球や末梢血幹細胞培養好塩基球には、抗原提示に必要な細胞表面分子、特にHLA-DR の発現が認められ、ヒト好塩基球がCD4+ T細胞に対して抗原提示能を有する可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Fukutomi Y, Taniguchi M, Nakamura H, Konno S, Nishimura M, Kawagishi Y, Okada C, Tanimoto Y, Takahashi K, Akasawa A, Akiyama K. Association between Body Mass Index and Asthma among Japanese Adults: Risk within the Normal Weight Range. *Int Arch Allergy Immunol* 157: 281-7, 2012.

2) Fuchimoto Y, Kanehiro A, Miyahara N, Koga H, Ikeda G, Waseda K, Tanimoto Y, Ueha S, Kataoka M, Gelfand EW, Tanimoto M. Requirement for CCR5 in the Development of Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness and Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011 Jul 14. [Epub ahead of print]

3) Waseda K, Tanimoto Y, Hasegawa K, Miyahara N, Nojima D, Ikeda G, Kanehiro A, Okada C, Kimata Y, Tanimoto M. Churg-Strauss syndrome with necrosis of toe tips. *Acta Med Okayama* 65: 215-8, 2011.

4) Waseda K, Miyahara N, Kanehiro A, Ikeda G, Koga H, Fuchimoto Y, Kurimoto E, Tanimoto Y, Kataoka M, Tanimoto M, Gelfand EW. Blocking the leukotriene B4 receptor 1 inhibits late-phase airway responses in established disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 851-7, 2011.

5) 尾長谷 靖, 金廣有彦, 谷本 安, 宮原信明, 岡三喜男, 江田良輔, 窪田哲也, 横山彰仁,

若林規良, 竹山博泰, 岡田千春, 木村五郎, 宗田 良, 高橋 清, 谷本光音. 吸入ステロイド治療を継続中の喘息患者の吸気流速と背景因子の関連性調査 - 中国, 四国地区多施設研究. *アレルギー* 60:1621-9, 2011.

6) 谷本 安. One airway, one disease (喘息・鼻炎合併患者) の包括的治療 総編集: 山口徹, 北原光夫, 福井次矢. *今日の治療指針* 2011年版 私はこう治療している pp. 705-6, 医学書院, 東京, 2011.

7) 谷本 安, 谷本光音. 特集 難病への取り組み 希少呼吸器疾患の治療・管理. *岡山医誌* 123: 49-52, 2011.

### 2. 学会発表

1) 谷本 安, 谷口暁彦, 能島大輔, 栗本悦子, 早稲田公一, 古賀 光, 宮原信明, 木浦勝行, 宗田 良, 片岡幹男, 谷本光音. オキサリプラチンアレルギーを獲得した大腸癌患者に対する減感作によるオキサリプラチン再投与の検討 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 (東京), 2011.

2) 谷本 安, 高橋 清, 岡田千春, 平野 淳, 山中隆夫, 木村五郎, 宗田 良, 佐藤利雄, 有田真知子, 谷本光音. シンポジウム12 増加するアレルギー疾患への対策を考える 気管支喘息を診療する医師の立場から (成人) 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 (千葉), 2011.

3) 谷本 安, 陳 妍妍, 張 丹, 瀧川奈義夫, 能島大輔, 早稲田公一, 平野 淳, 木村五郎, 岡田千春, 宗田 良, 高橋 清, 片岡幹男, 谷本光音. 成人気管支喘息における呼気凝縮液中のECP、IL-8と喘息コントロール状態に関する検討 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 (千葉), 2011. 4)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む) 特になし

1. 特許取得 特になし

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

表1

## 患者背景

(対象) 成人喘息患者: 81名(男性32名、女性49名)  
年齢: 20歳~89歳(中央値61歳)

症状	0/1なし/軽症間歇型相当: n=46	治療ステップ	1: n=6
	2 軽症持続型相当: n=24		2: n=26
	3 中等症持続型相当: n=9		3: n=24
	4 重症持続型相当: n=2		4: n=25

重症度	1 軽症間歇型: n=5
	2 軽症持続型: n=23
	3 中等症持続型: n=14
	4 重症持続型: n=31
	5 最重症持続型: n=8

(JGL2009)

表3

## EBC-IL-8と相関する因子

s-histamine	-0.495	p < 0.01
EBC-ECP	-0.741	p < 0.01
s-TNFa	0.324	p < 0.01
WBC	-0.324	p < 0.01

図1 EBC中のIL-8とECPからみた喘息フェノタイプ

r = -0.741, p &lt; 0.001

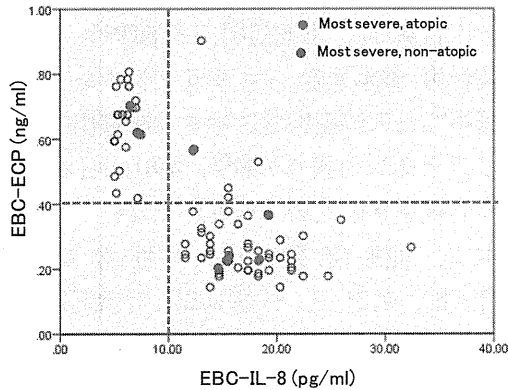


表4

## 治療ステップと相関する因子

s-TSLP	-0.281	p < 0.05
s-IL-4	-0.239	p < 0.05
WBC	0.301	p < 0.01
FEV1.0	-0.359	p < 0.01
PEF	-0.260	p < 0.05
V50	-0.337	p < 0.01
V25	-0.253	p < 0.05
ACT	-0.441	p < 0.01
LTRA	0.475	p < 0.01

表2

## EBC-ECPと相関する因子

s-histamine	0.477	p < 0.01
s-IL-8	-0.244	p < 0.05
EBC-IL-8	-0.741	p < 0.01
s-TNFa	-0.258	p < 0.05
WBC	0.313	p < 0.01

表5

## 重症度と相関する因子

WBC	0.292	p < 0.01
FEV1.0	-0.374	p < 0.01
PEF	-0.297	p < 0.01
V50	-0.369	p < 0.01
V25	-0.302	p < 0.01
ACT	-0.692	p < 0.01
LTRA	0.422	p < 0.01

図2-a IL-3による末梢血好塩基球のHLA-DR発現

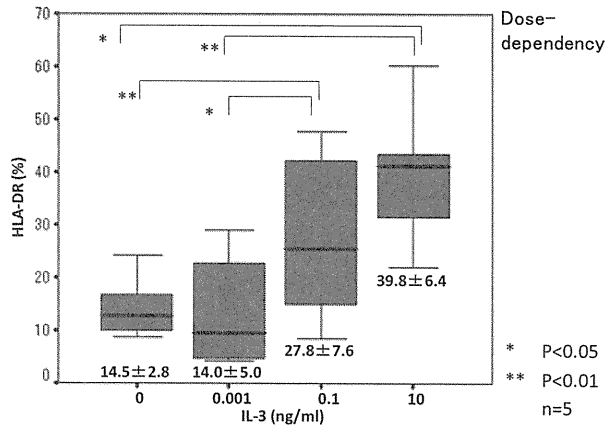


図3-b IL-3による末梢血好塩基球のCD86発現

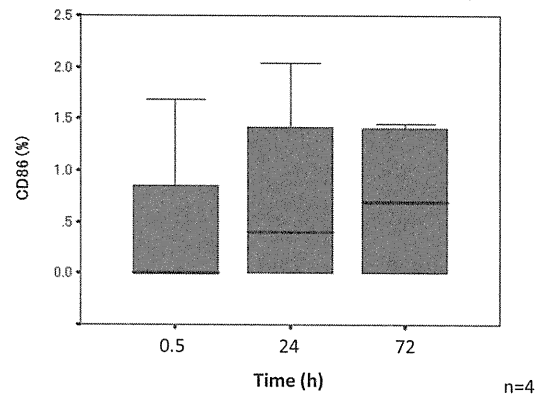


図2-b IL-3による末梢血好塩基球のHLA-DR発現  
Time course

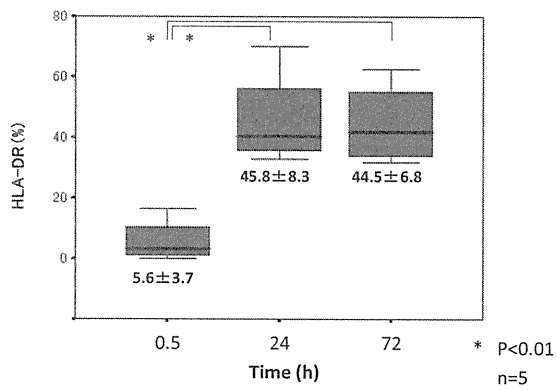


図4 FcεRI架橋による末梢血好塩基球のHLA-DR発現

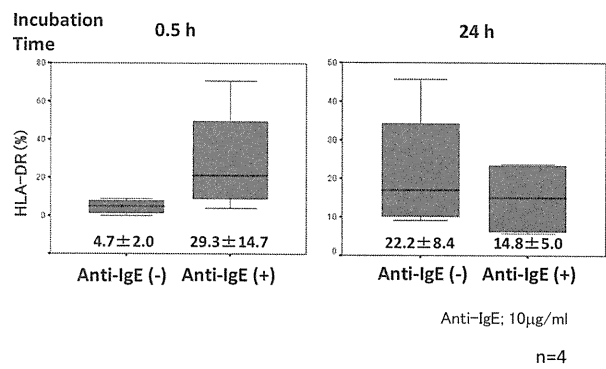


図3-a IL-3による末梢血好塩基球のCD80発現

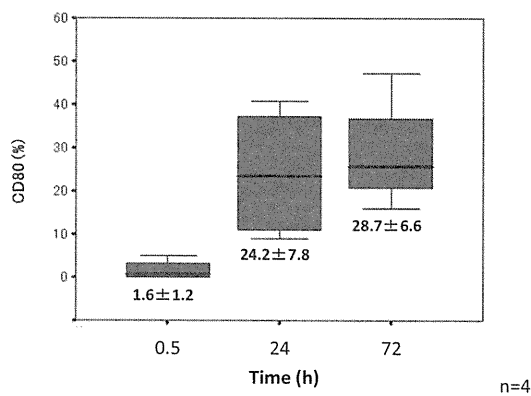


図5 末梢血幹細胞培養好塩基球における  
HLA-DR, CD80, CD86発現

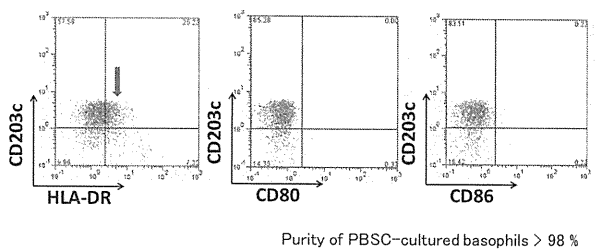
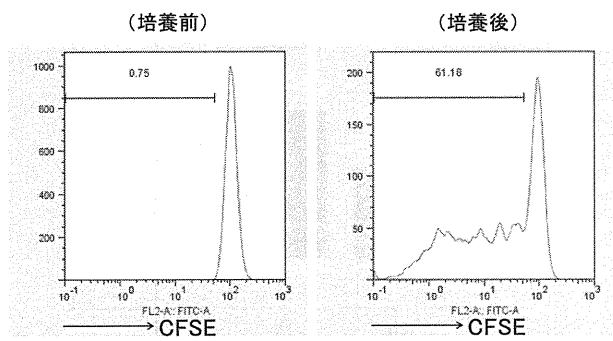


図6 同種好塩基球との共培養による  
CD4+ T細胞の増殖反応





## 気道リモデリングの発症機構解明に関する研究

: 好酸球による上皮間葉移行誘導作用

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

気管支喘息難治化の病態に気道リモデリングが大きく関わっているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。近年線維症の研究で上皮間葉系移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT) が重要であることが報告され、気管支喘息でもそのメカニズムの存在が示唆されている。そこで、本研究では難治喘息における慢性炎症の中心的エフェクター細胞である好酸球が、EMT にも直接関わる可能性について動物モデルならびに培養細胞系で検証した。マウスの気管に好酸球を投与することにより気道周囲の炎症細胞浸潤に加え、線維化、Type I collagen の発現増加が認められた。同時に BALF 中では TGF- $\beta$  の有意な上昇がみられた。一方、気道上皮細胞は好酸球との共培養にて、形態が敷石状から紡錘状に変化、これにともなって上皮系マーカーである E-cadherin の低下と間葉系マーカーである vimentin の上昇が認められた。この系においても培養上清中の TGF- $\beta$  の上昇がみられた。好酸球→TGF- $\beta$ →EMT→線維化 (リモデリング) の経路が存在する可能性が考えられ、好酸球は EMT を介して気道リモデリングを引き起こす可能性がある。

### 研究協力者

細木興亜 国立病院機構三重病院  
臨床研究部

間葉系移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT) が重要であることが報告され、気管支喘息でもそのようなメカニズムの存在が示唆されている。難治喘息における慢性炎症の中心的エフェクター細胞である好酸球は気管支喘息において TGF- $\beta$  の major source であることから、好酸球が EMT にも直接関わる可能性について動物モデルならびに培養細胞系で検証した。

### A. 研究目的

気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患であるが、その難治化の病態に気道リモデリングが大きく関わっている。気道リモデリングの発症抑制は難治化予防に役立つが、そのメカニズムには不明な点が多い。気道リモデリングとは、気道の傷害に対する修復の過程として位置づけられ、組織構成要素の変化を意味する。気道リモデリングの一つにある subepithelial fibrosis は基底膜直下にフィブロネクチン、I型、III型、V型コラーゲンからなる細胞外マトリックスが沈着し肥厚する所見を指すが好酸球の組織浸潤、TGF- $\beta$  の発現と相関しているため、気道リモデリングにおける線維化に好酸球が強く関わっていることが推察される。最近線維症の発症機構の研究で上皮細胞が間葉系細胞に変化し細胞外基質を産生する上皮

### B 研究方法

#### 1) マウスモデルでの検討

マウス骨髄細胞を stem cell factor, Flt3 ligand, IL-5 存在下で培養、得られた好酸球をマウスの気管内に反復投与して、21 日後に BALF 中の細胞数、サイトカインを測定、肺組織を Hematoxylin-Eosin、Masson trichrome で染色するとともに、Type I collagen 沈着を免疫組織学的に評価した。対象コントロールは生理食塩水を気管内投与した。

2) 培養気道上皮細胞での検討

健常成人ボランティアの末梢血より CD14, 16 negative selection 法にて分離した好酸球を気道上皮細胞株 BEAS-2B と共培養し、光学・蛍光顕微鏡による形態学的評価を行うとともに、培養上清中サイトカインの測定、PCR による気道上皮細胞の上皮・間葉系マーカー発現の定量をそれぞれ行った。

C. 研究結果

1) マウスモデル

マウスの気管に好酸球を投与することにより BALF 中の細胞数が増加した(図 1A)。その内訳は主にマクロファージとリンパ球だった(図 1B)

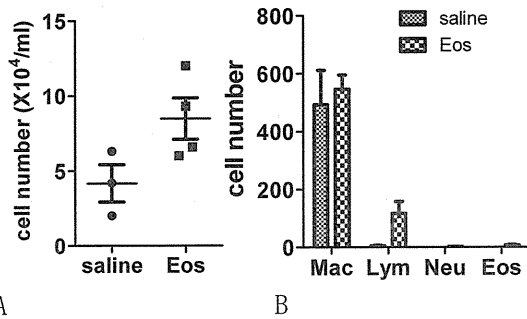


図 1 ; BALF 中細胞

A ; BALF 中細胞数、B ; BALF 中細胞分画

BALF 中サイトカインは好酸球投与群において上昇しており(図 2A; IFN- $\gamma$ 、図 2B; IL-13、図 2C; TGF- $\beta$ )、特に TGF- $\beta$  は統計学的にも有意であった。

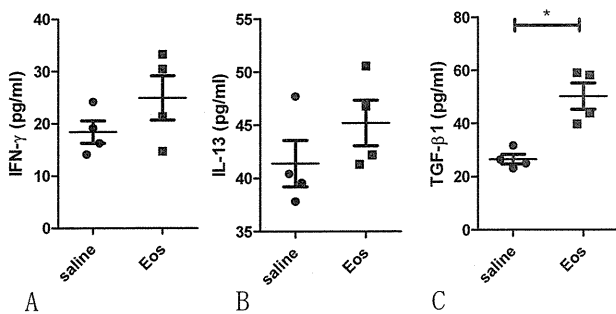


図 2 ; BALF 中サイトカイン

A; IFN- $\gamma$ 、B; IL-13、C; TGF- $\beta$

組織学的検討では、気道周囲の炎症細胞浸潤に加え(図 3; Hematoxylin-Eosin 染色)、気管周囲の線維化(図 4; Masson trichrome 染色)と Type I collagen の発現増加(図 5; 免疫染色)が認められた。

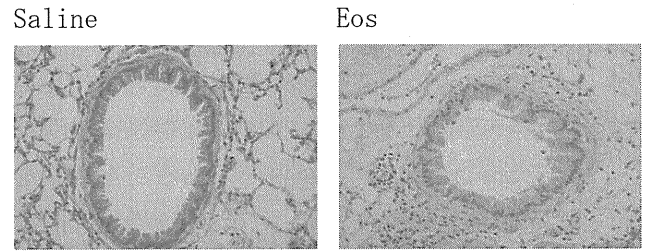


図 3 ; 肺組織 Hematoxylin-Eosin 染色

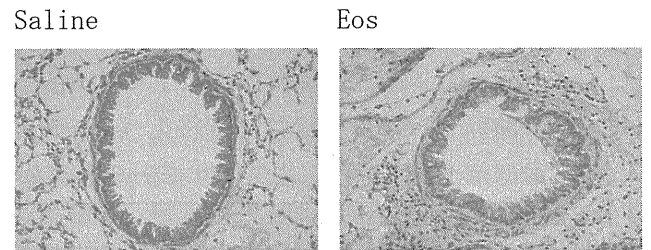


図 4 ; 肺組織 Masson trichrome 染色

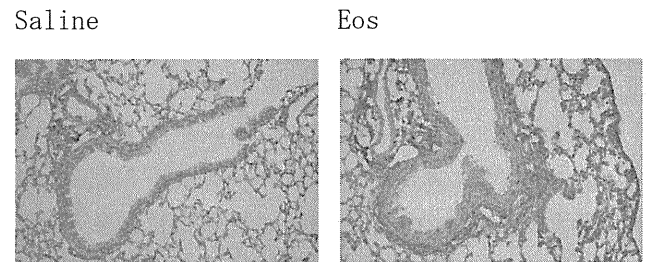
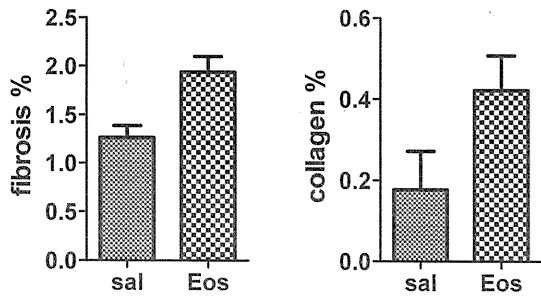


図 5 ; 肺組織 Type I collagen 染色

画像解析ソフト(WinROOF)を用いて取得した生検画像に2値化処理を行い、生検組織における線維化、Type I collagen の割合を定量化したところ、好酸球投与群で線維化、Type I collagen の割合は高い傾向を認めた(図 6)。



A B

図 6 ; 線維化、Type I collagen の定量化

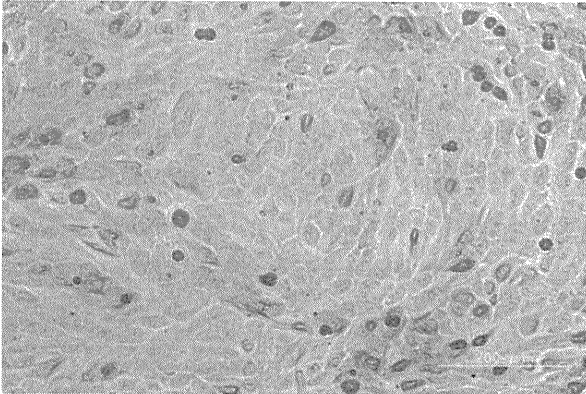
A; 生検組織における線維化の割合  
(Masson trichrome 染色)

B; 生検組織における Type I collagen の割合  
(Type I collagen 染色)

## 2) 培養気道上皮細胞

気道上皮細胞 BEAS-2B は好酸球との共培養にて、形態が敷石状から紡錘状に変化した(図 7、8)。

BEAS-2B



BEAS-2B+EOS

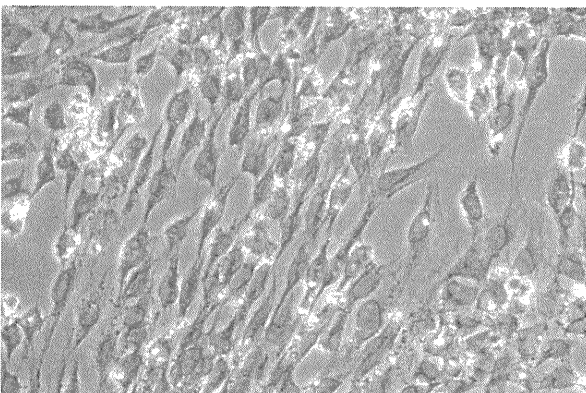
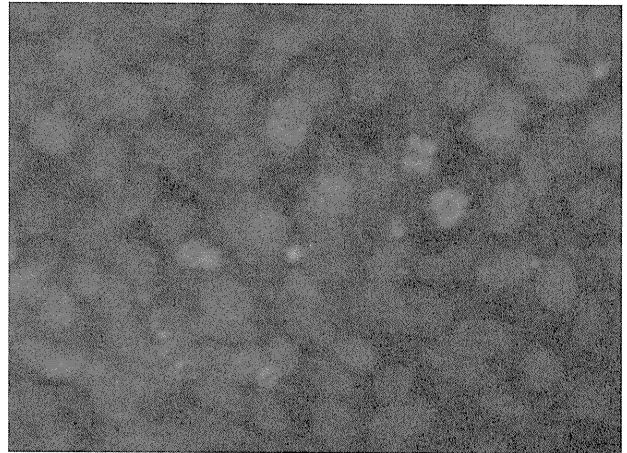


図 7 ; 気道上皮細胞単独(上段)と好酸球と共培養後の気道上皮細胞(下段)(光学顕微鏡)

BEAS-2B



BEAS-2B+EOS

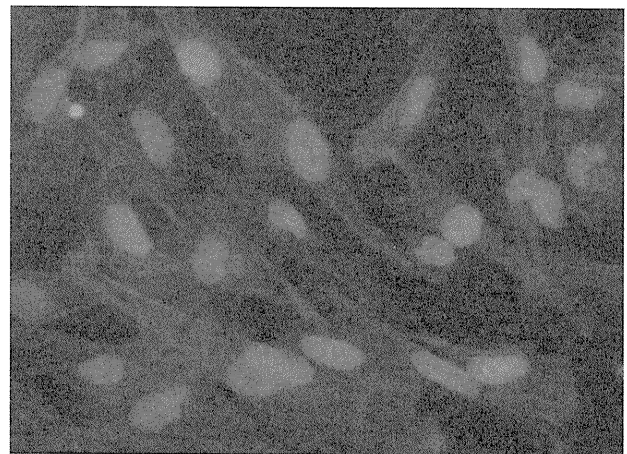


図 8 ; 気道上皮細胞単独(上段)と好酸球と共培養後の気道上皮細胞(下段)(蛍光顕微鏡)

Nuclei : DAPI staining (blue)

F-actin : Phalloidin staining (red)

気道上皮細胞 BEAS-2B と好酸球の共培養群は、気道上皮細胞単独群、好酸球単独群と比較して、明らかな培養上清中の TGF- $\beta$  濃度上昇がみられた(図 9)。

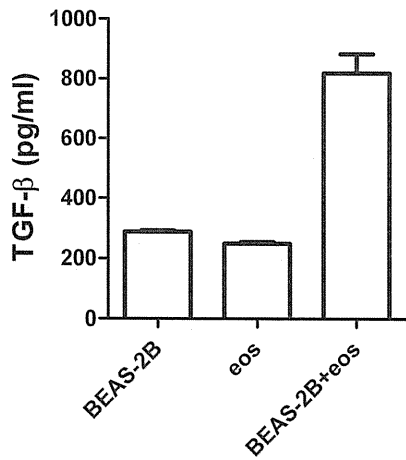


図 9 ; 培養上清中の TGF-β

これにともなって気道上皮細胞 BEAS-2B と好酸球の共培養群では、上皮系マーカーである E-cadherin の低下(図 10)と間葉系マーカーである Vimentin の上昇(図 11)が認められた。

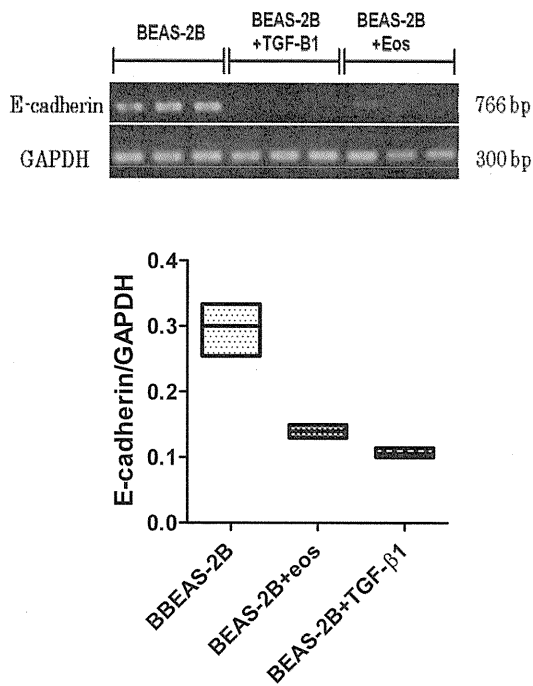


図 10; 気道上皮細胞の E-cadherin 発現 (PCR)

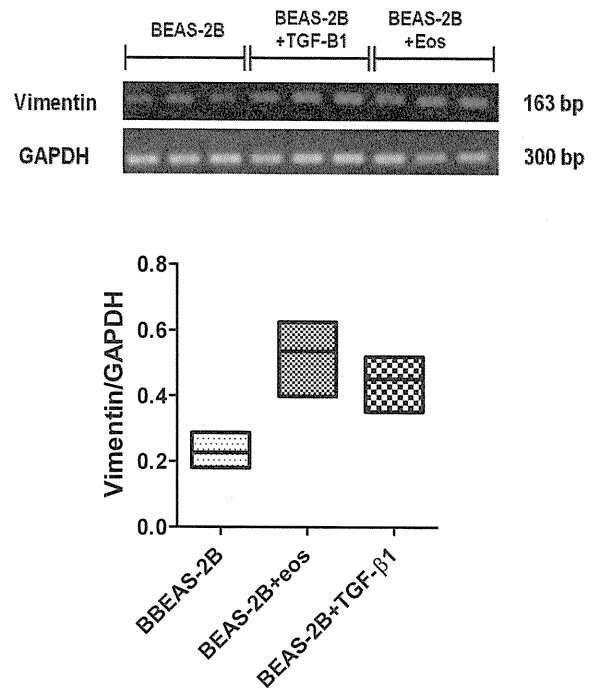


図 11; 気道上皮細胞の Vimentin 発現 (PCR)

#### D. 考察

気管支喘息では基底膜部の線維化、杯細胞化生、粘膜下腺過形成、毛細血管増生、平滑筋肥大といった気道のリモデリングが起きているが、そのメカニズム、特に間葉系細胞の増加、細胞外マトリックスの沈着についてはまだ不明な点が多い。現在考えられている機序として、fibroblast の増加、fibrocyte の全身循環からの帰着、血管内皮細胞の内皮間葉転換 (EndMT: Endothelial Methencymal Transition)、EMT が挙げられる。中でも EMT は近年注目が集まっており、気道上皮細胞は TGF-β 刺激にて Smad3 依存性に EMT を起こす、気管支喘息患者の気道上皮細胞は EMT を起こしやすく、気道修復に異常をきたしているといった報告がなされている。今回の研究では、動物モデルにおいて好酸球が直接作用として線維化を起こし得ること、培養系では明らかに EMT を誘導することをみいだした。いずれもこれら変化に伴い TGF-β の上昇を認めており、好酸球→TGF-β→EMT→線維化 (リモデリング) の経路が存在する可能性が考えられた。今後は

TGF- $\beta$  中和など、このプロセスの有効な抑制法を検討する予定である。

#### E. 結論

好酸球は EMT を介して気道リモデリングを引き起こす可能性がある。

#### F 研究発表

##### 論文

- 1) Hosoki K, Nagao M, Iguchi K, Ihara T, Yamada Y, Higashigawa M, Kephart GM, Kita H, Fujisawa T. An 8-year-old boy with hypereosinophilic syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;155 Suppl 1:117-122.
- 2) Hiraguchi Y, Tanida H, Hosoki K, Nagao M, Tokuda R, Fujisawa T. Inhibition of eosinophil activation mediated by a toll-like receptor 7 ligand with a combination of procaterol and budesonide. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155 Suppl 1:85-9.
- 3) Kim CK, Callaway Z, Koh YY, Kim SH, Fujisawa T: Airway IFN-gamma production during RSV bronchiolitis is associated with eosinophilic inflammation. *Lung* 2011
- 4) 藤澤隆夫 気管支喘息Update 小児喘息のガイドライン 別冊 医学のあゆみ p19-24, 2011
- 5) 藤澤隆夫 小児気管支喘息・アレルギー性鼻炎への免疫療法の現状と可能性 喘息 24(1):63-70, 2011
- 6) 藤澤隆夫 小児喘息のここが知りたい Q&A 勝沼俊雄編 p72-80, 2011 中外医学社 東京
- 7) 藤澤隆夫 重症喘息児のアレルギー素因についての横断的解析研究：血清総 IgE 高値は1秒率低下と関連する

International Review of Asthma & COPD 136-141, 2011

- 8) 藤澤隆夫 アレルギーをとりまく因子「アウトグロー」メディカル・テクノロジー63 (9) :12, 1301, 2011
- 9) 藤澤隆夫 喘息の発作入院はゼロにできるか? 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌 9(3):261-262, 2011

#### 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

難治性喘息のリモデリング機序:細胞要因と治療に関する研究  
—気管支平滑筋細胞由来因子に対する気道上皮細胞の遊走—

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

気管支喘息における気道粘膜の炎症においては、気道上皮は基底膜からの剥離を含む種々の傷害を被る。傷害を受けた気道粘膜は生体防御機能により修復の段階に入る。ここで気道炎症が持続すると組織の正常修復が妨げられ、気道組織は不全治癒であるリモデリングを生じるが、同時に修復機転も始まり、気道傷害直後より気道上皮細胞が傷害部位を覆うべく遊走を開始すると考えられる。我々は、遊走因子が同じく気道傷害により活性化された気管支平滑筋細胞より産生・放出されるとの仮説を立てヒト培養細胞を用いて検討を行った。その結果、気道上皮細胞に対する遊走活性因子が、気管支平滑筋細胞より産生・放出されることが判明した。この遊走活性は、抗フィブロネクチン抗体を添加することにより低下した。血漿フィブロネクチンは気道上皮細胞に対する遊走活性を有することも確認された。今回の結果は、気道傷害後の、気道修復及び気道リモデリングの最初の段階において、気管支平滑筋細胞がフィブロネクチンを含む遊走因子を産生・放出し、気道上皮細胞を傷害部位に遊走させる可能性を示唆している。

研究協力者

橋本 充恵（国立病院機構東京病院 臨床研究部）

藤原 麻千子（久留米大学医学部 皮膚生物学研究所）

A. 研究目的

気管支喘息における気道粘膜の炎症においては、気道上皮は基底膜からの剥離を含む種々の傷害を被る。傷害を受けた気道粘膜は生体防御機能により修復の段階に入るが、気道炎症が持続すると組織の正常修復が妨げられ、気道組織は不全治癒であるリモデリングを生じる。何れにせよ、気道傷害直後には気道上皮細胞が傷害部位を覆うべく遊走を開始すると考えられ、われわれはその遊走因子が同じく気道傷害により活性

化された気管支平滑筋細胞より産生・放出されるとの仮説を立てて検討を行った。

B. 方法

正常ヒト気管支平滑筋細胞及び正常ヒト気管支上皮細胞(米国 Lonza 社)を培養し、気管支平滑筋細胞培養後に細胞培養上清を採取し、気道上皮細胞(気管支上皮細胞)を遊走実験の標的細胞に使用した。気管支平滑筋細胞の培養上清に対する気道上皮細胞の遊走は 48 穴ポイデンチャンバーにより検討した。まず、気管支平滑筋細胞の培養上清を時間依存的に採取し、培養上清中の気道上皮細胞遊走活性を検討するとともに、培養上清を希釈して濃度依存性も検討した。次にこれまでの研究で種々の細胞遊走の主要な遊走因子であることが明らかとなったフィブロネクチンが、今回も主要な遊走

因子であると仮定し、培養上清中に種々の濃度で抗フィブロネクチン抗体を添加した後に遊走実験を行った。また、市販の血漿フィブロネクチンが気道上皮細胞遊走活性を有するかどうか検討した。

### C. 結果

気道上皮細胞に対する気管支平滑筋細胞由来の遊走活性は、気管支平滑筋細胞培養上清の濃度依存的 (Fig.1) に、かつ、培養時間依存的 (Fig.2) に上昇した。抗フィブロネクチン抗体を添加した気管支平滑筋細胞培養上清に対する気道上皮細胞の遊走は、培養上清中の抗フィブロネクチン抗体の濃度依存的に低下した (Fig.3)。血漿フィブロネクチンは気道上皮細胞に対する遊走活性を有することも確認された (Fig.4)。

### D. 考察

難治性喘息において、気道リモデリングは喘息症状の重症化及び持続化をもたらす重要な要素である。しかし、正常な気道上皮が気管支喘息での気道炎症により傷害を被った直後の最初の反応は生体防御機能による気道粘膜の修復であり、気道上皮細胞の遊走はその重要な要素であると推察される。気道傷害においては結合組織中の気管支平滑筋細胞も活性化され、気道修復のために遊走因子を産生・放出する可能性は大きい。今回のわれわれの実験結果は、気道傷害後の、気道修復及び気道リモデリングの最初の段階において、気管支平滑筋細

胞がフィブロネクチンを含む遊走因子を産生・放出し、気道上皮細胞を傷害部位に遊走させる可能性を示唆していると思われる。

### E. 結論

以上の *in vitro* での実験結果から、気道傷害後における気道修復及びリモデリングにおいて、気道平滑筋細胞より気道上皮細胞に対する遊走因子が産生・放出され、それにより難治性喘息を含む気管支喘息の病態変化に関与し、フィブロネクチンが重要な役割を果たす可能性が示された。

### F. 文献

Ohshima N, Matsui H, Matsui Y, Kawashima M, Shimada M, Higaki N, Shoji S, Wada H, Fujita A, Watanabe H, Yamaguchi N, Matsuoka R, Oki K, Takahashi H, Suzuki M, Yamazaki H, Yoshizawa M, Goto H.: Addition of Leukotriene Receptor Antagonists to Inhaled Corticosteroids Improved QOL of Patients with Bronchial Asthma Surveyed in Suburban Tokyo, Japan. *Allergol Int.* 60:473-81, 2011.

### 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 |

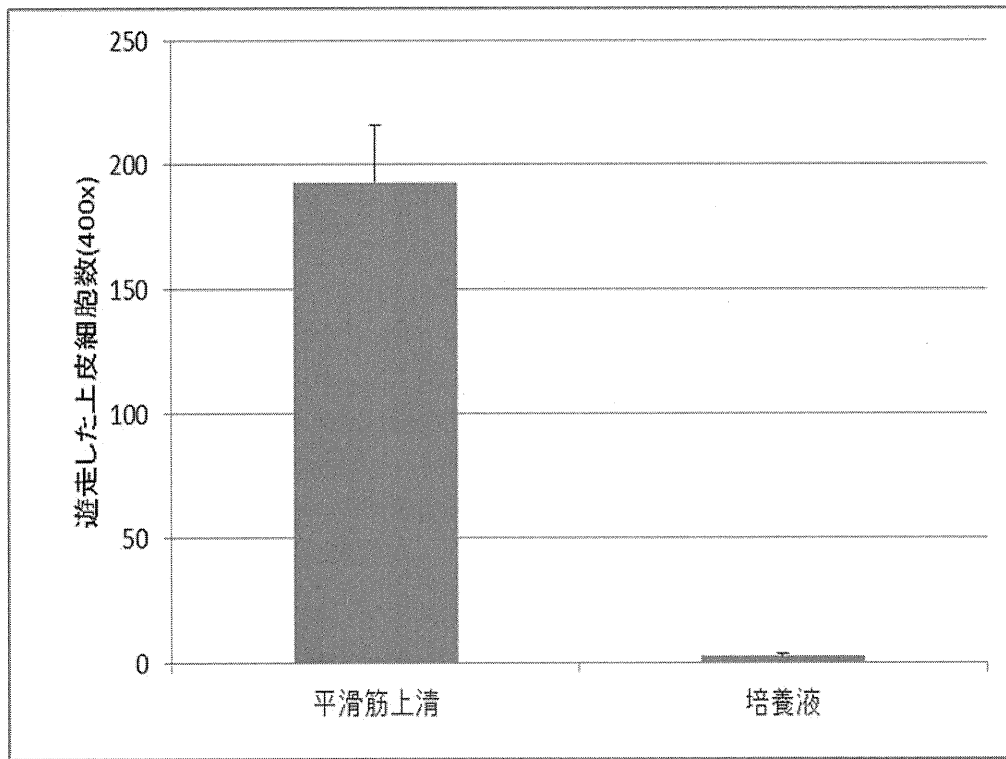


Fig.1 気管支平滑筋細胞由来の遊走因子に対する気道上皮細胞の遊走

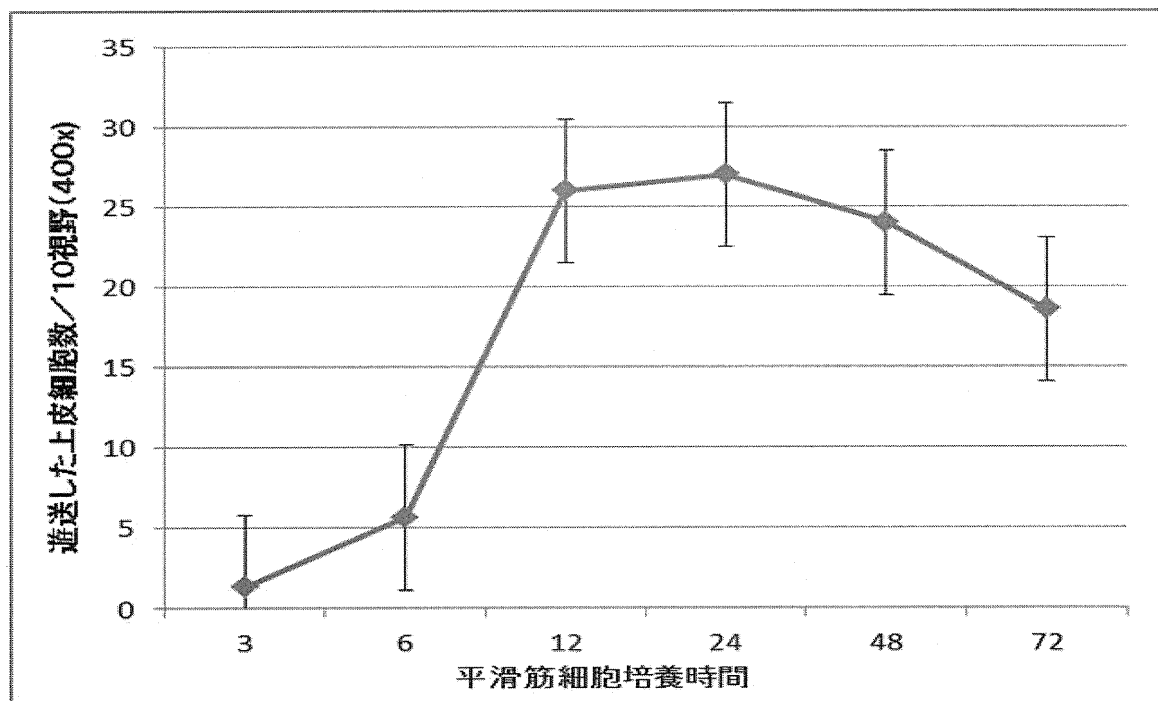
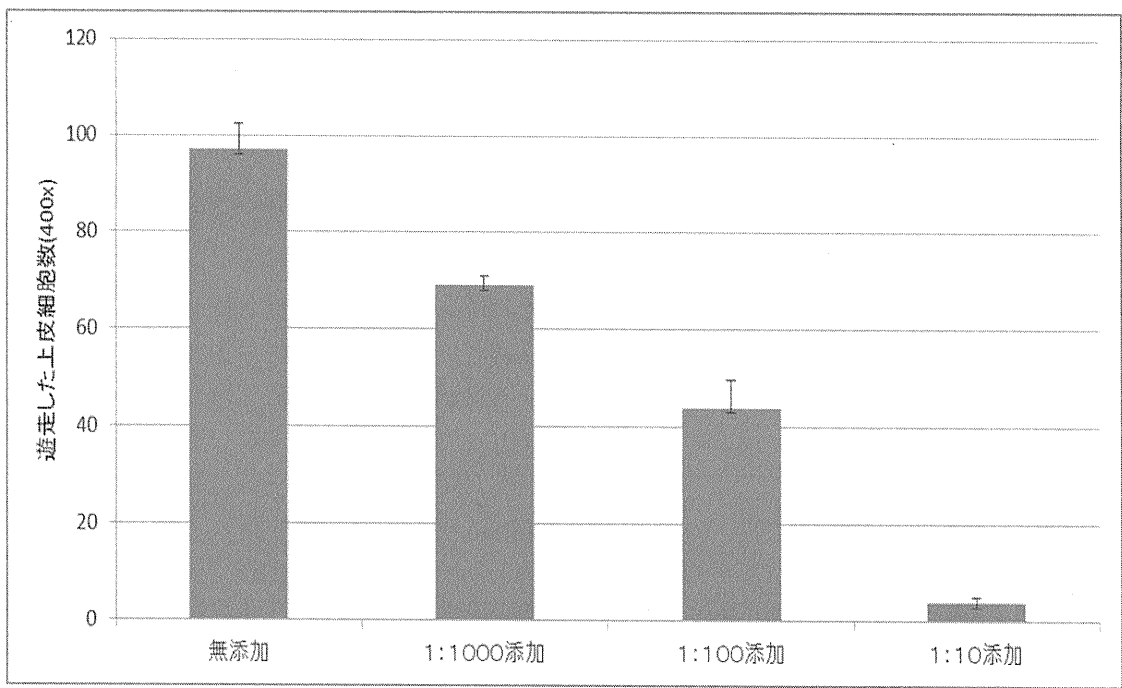


Fig.2 気道上皮細胞遊走因子産生の時間依存性





Fi.3 抗フィブロネクチン抗体による遊走活性の抑制

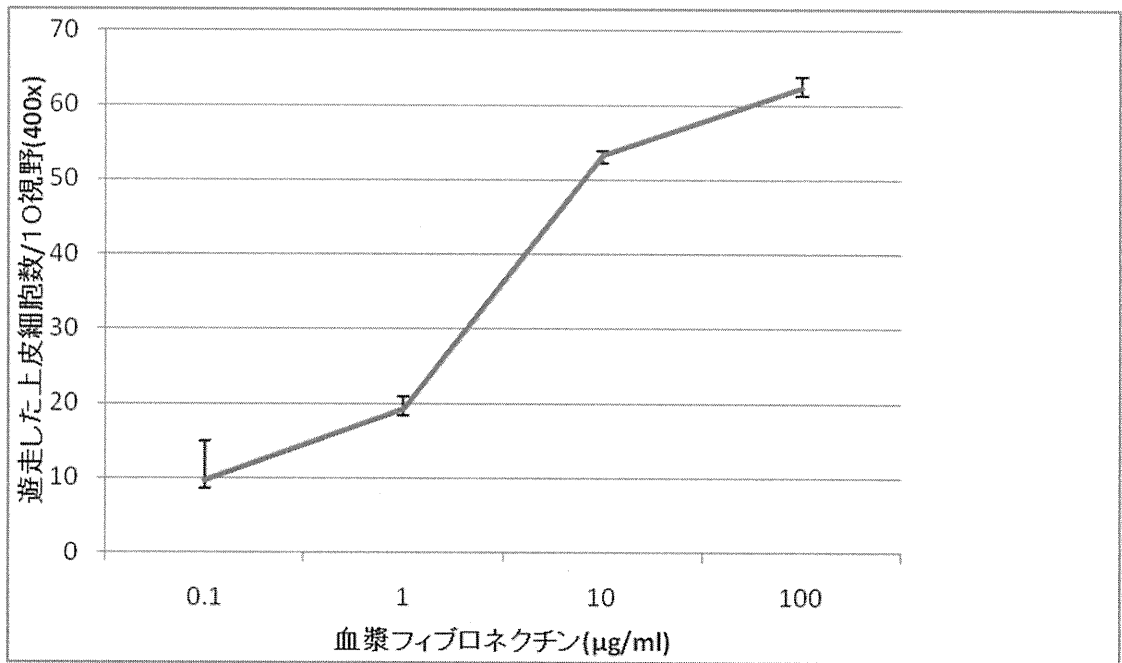


Fig.4 血漿フィブロネクチンによる上皮細胞の遊走

好塩基球を用いた重症・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 帝京大学医学部呼吸器・アレルギー内科 主任教授  
研究協力者 山口正雄 帝京大学医学部呼吸器・アレルギー内科 教授  
鈴川真穂 帝京大学医学部呼吸器・アレルギー内科 助手

研究要旨

重症・難治性喘息の病態解明は、患者の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、吸入抗原に感作された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、好塩基球を用いて新たな機能制御に関する解析を行った。

近年、肥満や代謝異常が喘息の発病・増悪に関与することが注目されているが、肥満に関連したサイトカイン（アディポカイン）のうち、炎症作用を有するレプチンの働きを検討したところ、好塩基球の種々の機能を増強することが判明した。すなわち、アポトーシスを抑制し生存を延長、好塩基球のeotaxinに対する遊走を増強すると共に、IgE架橋刺激による脱顆粒を強力に増強することが判明した。

喘息においてエフェクター作用を発揮すると考えられる好塩基球の機能を、肥満に関連するアディポカインの一つ（レプチン）が調節していることが明らかとなった。肥満が喘息の発症及び増悪を誘導する機序の一つとして、レプチンによる好塩基球機能増強が関与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知られているが、その一方、吸入抗原に感作されたアトピー型重症喘息において抗IgE療法の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。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。特に最近では肥満が喘息の発病あるいは増悪に関与す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。喘息のフェノタ

イプを解析した SARP (Severe Asthma Research Program) studyでも、BMI高値、成人発症喘息、ベースラインの一秒量が低値であり、喘息増悪を起こしやすく、治療として高用量ICSや経口ステロイド薬を必要とする割合が高い一群が存在することが報告されており、喘息の重症・難治化要因の一つとして肥満は重要と考えられる。

今回、肥満に関わるサイトカイン（アディポカイン）とアレルギー性炎症のエフェクター細胞としてはたらく好塩基球との関わりに着目して、好塩基球におけるレプチンの受容体発現と機能制御を検討した。

B.研究方法

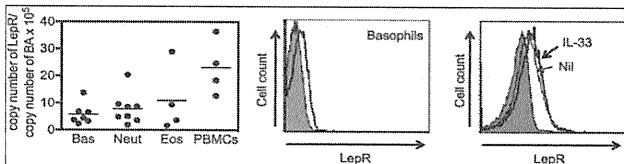
健常人から書面の承諾を頂いた上で 18-45ml の静脈血採血を行った。血液の 1/9 量の EDTA 溶液(0.1M)を混合した後、低純度好塩

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。好塩基球のレプチン受容体(LepR)発現はreal-time PCRおよびflow cytometry で解析した。好塩基球機能としては脱顆粒、CD63 発現、Th2 サイトカイン産生、遊走、生存を解析した。

### C.結果

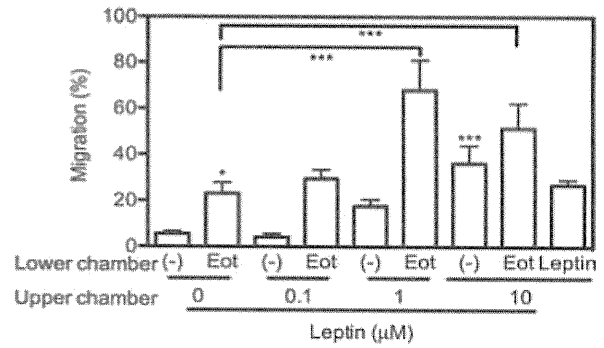
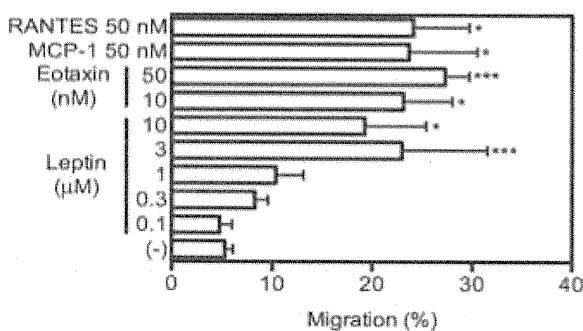
アディポカインのうちでも炎症作用を有するレプチン及びその受容体 (LepR) を解析したところ、好塩基球は mRNA および蛋白レベルで LepR を発現しており、IL-33 により LepR 表面発現が増強した。

#### 好塩基球におけるレプチン受容体発現



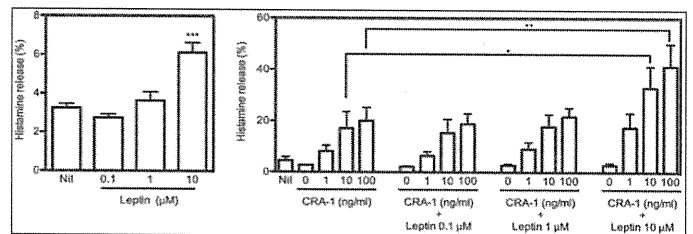
好塩基球はレプチンに対して遊走を起こすとともに、eotaxin に対する遊走を増強した。

#### レプチンによる好塩基球の遊走

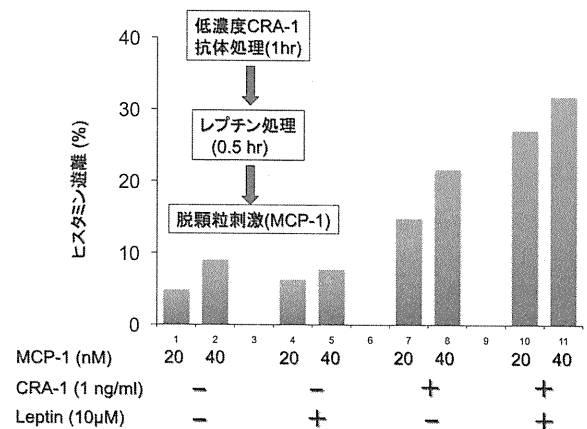


レプチンは好塩基球の活性化マーカーCD63表面発現を誘導し、さらに脱顆粒を弱く惹起すると共に、IgE・FcεRI 架橋刺激による脱顆粒を増強した。ケモカイン MCP-1 による脱顆粒に対してレプチンは増強作用を示さないが、好塩基球を低濃度 FcεRI 架橋刺激を行っておくと、レプチンは MCP-1 による脱顆粒に対して増強作用を示すようになった。また、好塩基球における Th2 サイトカイン IL-4, IL-13 産生に関してもレプチンは誘導しえた。

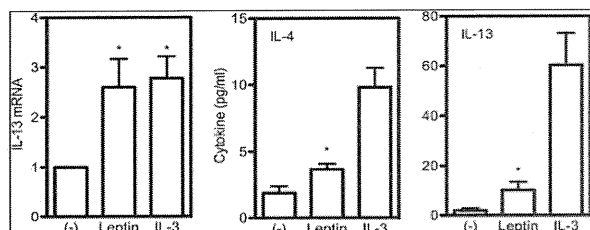
#### レプチンによる脱顆粒および脱顆粒増強



#### 脱顆粒に対する低濃度CRA-1抗体とレプチンの作用

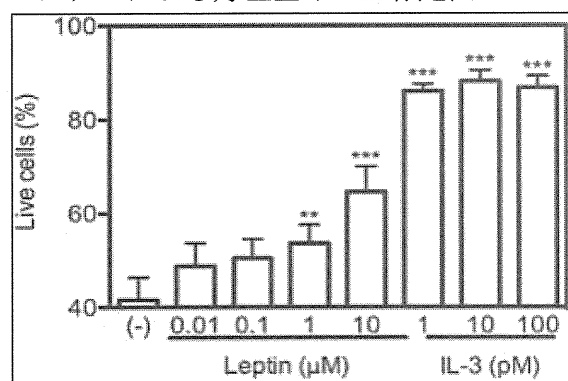


## レプチンによる好塩基球の IL-4・IL-13 産生



また、レプチンはヒト好塩基球の apoptosis を抑制する結果、生存を延長した。

## レプチンによる好塩基球の生存延長



## D. 考察

本研究の結果から、ヒト好塩基球はレプチン受容体(LepR)を発現するとともに、レプチン刺激により種々の機能が惹起・増強され、レプチンは強力な好塩基球活性化因子であることが判明した。肥満は喘息の増悪因子であることが知られており、喘息重症化と肥満を結びつける背景メカニズムとして、液性因子によるエフェクター細胞、特に好塩基球の機能増強が関与することが示唆される。また、喘息のフェノタイプを解析した SARP (Severe Asthma Research Program) study において、BMI 高値で喘息増悪を起こしやす濃厚な治療を要する一群が知られており、このフェノタイプの病態として、今回得られた知見が関与していることが推測される。

## E. 結論

喘息の増悪および重症化に関わる様々な因子に焦点を当てて好塩基球機能制御の観

点から解析し、従来から知られる活性化制御機構とは異なる新たな機序が判明した。レプチンは好塩基球の種々の機能を誘導・増強し、強力な好塩基球活性化因子であることが判明した。肥満と喘息増悪・重症化との関わりの背景に、アディポカイン、特にレプチンの好塩基球機能制御が関与することが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ohta K, Bousquet PJ, Aizawa H, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Ebisawa M, Tamura G, Nagai A, Nishima S, Fukuda T, Morikawa A, Okamoto Y, Kohno Y, Saito H, Takenaka H, Grouse L, Bousquet J. Prevalence and impact of rhinitis in asthma. SACRA, a cross-sectional nation-wide study in Japan. *Allergy* 2011; 66(10): 1287-1295.
- Suzukawa M, Nagase H, Ogahara I, Han K, Tashimo H, Shibui A, Koketsu R, Nakae S, Yamaguchi M, Ohta K. Leptin enhances survival and induces migration, degranulation and cytokine synthesis of human basophils. *J Immunol* 2011; 186(9): 5254-5260.
- Han K, Suzukawa M, Yamaguchi M, Sugimoto N, Nakase Y, Toda T, Nagase H, Ohta K. The in vitro effects of advanced glycation end products on basophil functions. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155(suppl 1): 64-70.
- Ohta K, Yamaguchi M, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Takahashi K, Nishimuta T, Morikawa A, Nishima S. Japanese guideline for adult asthma. *Allergol Int* 2011; 60(2): 115-145.
- Fukutomi Y, Taniguchi M, Watanabe J, Nakamura H, Komase Y, Ohta K, Akasawa A, Nakagawa T, Miyamoto T, Akiyama K. Time trend in the prevalence of adult asthma