

201126004B

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

重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究

(H21-免疫-一般-004)

平成21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 森 晶夫

平成24(2012)年4月

目 次

I. 総合研究報告

(総括)

- 重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究 _____ 1
森 晶夫

(分担)

1. 重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究 _____ 38
森 晶夫
2. 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 (平成 21 年度) _____ 56
高橋 清
3. 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 (平成 22, 23 年度) _____ 62
谷本 安
4. 喘息死患者の気道リモデリングと炎症細胞の解析に関する研究
(平成 21, 22 年度) _____ 75
相沢 久道
5. 難治性好酸球性炎症の発症メカニズム解明による
気管支喘息の重症化予防に関する研究 _____ 89
藤澤 隆夫
6. 難治性喘息におけるリモデリング形成機序の解明に関する研究 _____ 100
庄司 俊輔
7. 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 _____ 107
大田 健
8. マウス喘息モデルを用いた気道過敏性および
気道リモデリング形成に関する基礎的研究 _____ 117
田中 宏幸
9. 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 _____ 123
烏帽子田 彰
10. 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 _____ 129
中村 裕之

総合総括研究報告

重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究

研究代表者 森 晶夫

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長

研究分担者

高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター院長） 庄司俊輔（国立病院機構東京病院統括診療部長）
相沢久道（久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部門教授）
藤澤隆夫（国立病院機構三重病院臨床研究部長）
大田 健（帝京大学医学部呼吸器・アレルギー内科主任教授）
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）
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）
田中宏幸（岐阜薬科大学機能分子学大講座准教授） 谷本 安（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科）

研究協力者

秋山一男（独）国立病院機構相模原病院長） 安部暁美（同センターリサーチレジデント）
山口美也子（同センター研究員） 神山智（同センター研究員）
榎美香（同センター研究員） 飯島葉（同センター研究員）
北村紀子（東京都臨床医学総合研究所研究員） 神沼修（東京都臨床医学総合研究所主任研究員）
大友隆之（東京薬科大学総合医療薬学助教）
宗田 良（独）国立病院機構南岡山医療センター院長） 木村五郎（同アレルギー科医長）
平野 淳（同アレルギー科医員）
岡田千春（国立病院機構本部人材育成キャリア支援室長）
片岡幹男（岡山大学大学院保健学研究科） 金廣有彦（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科）
能島大輔（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） 早稲田公一（同左）
陳 妍妍（同上） 宮原信明（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科）
星野友昭（久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科教授）
川山智隆（同講師） 木下隆（同助教）
坂崎優樹（同大学院生） 武井仁子（同大学院生）
澤田昌典（同大学院生） 小田華子（同上大学院生）
平口雪子（独）国立病院機構三重病院臨床研究部研究員） 細木興亜（同院臨床研究部）
岡元 孝二（九州工業大学大学院・名誉教授） 橋本充恵（独）国立病院機構東京病院臨床研究部）
西原麻千子（久留米大学医学部皮膚生物学研究所）
山口正雄（帝京大学医学部呼吸器・アレルギー内科教授） 鈴木真穂（同助手）
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）
人見嘉哲（金沢大学医学系研究科准教授） 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）

研究要旨

わが国の重症喘息を特徴付ける 1. ステロイド抵抗性、2. 非アトピー型（非 IgE 依存性、T 細胞依存性）喘息、3. リモデリングの 3 大要因を解析した結果、1) 難治性喘息の特徴である T 細胞レベルのステロイド抵抗性は、T 細胞の存在する微小環境（microenvironment）中の costimulatory signal（補助刺激シグナル）およびサイトカインシグナルによって誘導されること、costimulatory signal 阻害、シグナル伝達制御によりステロイド感受性が回復可能であることが、*in vitro*、*in vivo* の両レベルで明らかになった。本知見を前臨床データとして臨床試験入りをめざす。加えて、2) 重症喘息の大部分を占める非アトピー型喘息の気流閉塞を

担う、T 細胞由来の新たなメディエータを同定した。また、3) 好酸球は細菌感染を介し活性化され、重症化に関与するが、PAF 受容体阻害薬がこのプロセスを抑制すること、4) 好酸球は上皮間葉移行 (EMT) を介して気道リモデリングを引き起こす可能性があり、好酸球の制御が気道リモデリングの予防につながること、5) ウィルス感染は実験喘息病態を重症化し、CD8 陽性 T 細胞、LTB₄、IL-13 が重要であること、6) 気管支平滑筋細胞は MMP-2 等のプロテアーゼを分泌し、リモデリング形成に寄与すること、7) 気道平滑筋細胞が肺線維芽細胞より放出されたフィブロネクチンに反応し、遊走すること、8) 気道平滑筋細胞より放出される遊走因子に反応して気道上皮細胞が遊走すること、9) 喘息死の肺病変部には IL-18 陽性、IL-18 受容体陽性 CD8 T 細胞が著増し、治療ターゲットと考えられること、10) 好塩基球を介する、IgE 依存性及び IgE 非依存性 (レプチン、AGE) の新たなアレルギー性炎症増悪メカニズムがあること、11) PSL 5 mg/day 以上を要する Step 4b 群では、呼気濃縮液中マーカーなど様々な臨床指標が重症度と関連し、治療反応性あるいは病態の違いにより、ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群といった異なるフェノタイプが存在すること、12) 好塩基球が HLA-DR、CD80 を発現し、抗原提示細胞として気管支喘息の病態に関与すること、13) NQO1 とアルギナーゼ 2 の遺伝子多型が、重症喘息と関連すること、14) GSTM1、アルギナーゼ 1、Nrf2 遺伝子多型と喫煙 (抗酸化ストレス応答) との相互作用によって喘息重症化が引きこされること、15) 非晶質鉄フィルターと活性炭フィルターを組み合わせて構成されている新規フィルターは PAHs によるアレルギー反応を抑制できることから、従来のフィルターと違って喘息の重症化の予防に有効であること、16) その物理的機序として、Ferrihydrite の吸着の特性に基づくこと、が明らかになった。これらの新規の知見は、世界に先駆けて喘息の難治化、重症化を早期診断、予知、予防、治療する目的に、きわめて価値が高いと考えられる。

A. 研究目的

喘息管理ガイドライン、吸入ステロイド療法の普及により、軽症ないし中等症喘息の症例に対しては十分な予後・QOL の向上がもたらされた。しかしながら、重症患者に対する治療効果は満足な水準に達していないことが、国内の AIRJ、海外の GOAL study 等の大規模登録調査によって明らかにされた。特に、経口ステロイド薬を常時使用するステロイド依存性の重症喘息患者は、喘息死の予備軍とも位置づけられ、必ずしも近年の治療成績向上の恩恵には浴していないこと、頻回の救急受診・長期入院・社会不適応を理由とする直接・間接の医療費に占める比重の高いことが指摘されている。人数では約 1 割の重症喘息に対する支出が喘息医療費全体の過半を占めることは医療経済的には解決すべき大課題である。喘息の重症、難治化の病態・発症機序を解明し、治療・予防法を確立することができれば、年間数千人の喘息死を未然に防止でき、喘息を理由に家庭や社会から疎外されている患者、患者家族の QOL を改善し、なお増大しつつある医療費の削減につながると期待される。

われわれは、厚生科学研究「気管支喘息の難治化の病態機序の解明と難治化の予防・治療法開発に関する研究」(主任研究者 森 晶夫、平成 12~14 年)、厚生労働科学研究「気管支喘息の難治化機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究」(同、平成 15~17 年)、厚生労働科学研究「気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究」(同、平成 18~20 年)において、難治性喘息の今日的診断基準を提唱し、まずステロイド依存性喘息 100 症例の登録調査を実施した。現在のわが国における重症喘息の実態、病態、治療内容を把握した。同時期の米国 NIH の大規模研究 SARP (Severe Asthma Research Program) study、欧州 12 カ国共同研究の ENFUMOSA (European Network

For Understanding Mechanisms Of Severe Asthma) study が、重症喘息 250 例、163 例を登録しているものの、ステロイド依存性喘息はそのうちの約 3 割を占めるだけとの事実を考慮すると、われわれの調査の意義は大きい。喘息の重症・難治化の要因について、以前は、早期介入の失敗によって長年の間に高度のリモデリングが蓄積された結果と認識されてきたが、われわれの調査によって、重症喘息の半数が喘息発症 1~2 年と短期間にステロイド依存状態に陥っていることがはじめて明らかになり、これら相当数の重症喘息の機序は、発症時から通常の喘息と異なっていることが示唆されている。

国際学会における、アレルギー疾患の重症化、慢性化の通説は、長期の罹病期間の間にリモデリングが筑西することが最重要課題と認識されており、われわれが指摘した発症早期の難治化はまったくオリジナルな概念といえる。そこで、本研究班では、メカニズム研究の観点からは、わが国の重症喘息調査から浮かび上がった、1. ステロイド (治療) 抵抗性、2. 非アトピー型喘息機序、3. リモデリング (炎症の重症化を含む)、の 3 大特徴を追求した。

われわれは、まず臨床レベルで、高用量のステロイド使用にもかかわらず、高度の炎症反応が持続していることを明らかにした。難治性喘息における T 細胞レベルのステロイド抵抗性は、国際的に最も注目されている研究分野でもあり、欧米の一流研究者によって「ステロイド抵抗性喘息」の概念が規定され、研究されてきたものの、彼らの研究ではステロイド薬投与で改善しない軽症例をも対象としており、真に重症喘息のメカニズム研究とは言えない。彼らは、c-fos 過剰発現、glucocorticoid receptor β 鎖過剰発現、histone deacetylase 異常等の T 細胞に intrinsic な異常を提唱してきたが、われわれがこれまでの厚生労働科学研

究班においてわが国の難治症例を解析した研究結果からは、T細胞自身でなく、むしろT細胞を取り巻くmicroenvironment (微小環境) 側の要因によってステロイド抵抗性が生じている可能性が強く示唆されている。本研究では *in vivo*、*in vitro* の両アプローチにより、ステロイド依存性喘息 (=難治性喘息) を含む真に重症な喘息の病態・機序解明をめざす。

重症・難治化の分子生物学的要因の解明は、予防、治療へ向けての突破口と期待される。ステロイド抵抗性は、炎症局所での costimulatory シグナルとサイトカインにより誘導され、PI-3 kinase 依存性であることを見いだしてきたので、さらに本研究では、治療応用に向けて CTLA4-Ig (ORENCIA®、CD28 とそのリガンドである CD80、CD86 との結合を競合し阻害する薬物) による costimulatory シグナル阻害のステロイド感受性回復効果を *in vitro*、*in vivo* で検証し、臨床応用への突破口としたい。

次いで、リモデリングのメカニズム解析、治療ターゲットの同定に向けては、難治化に関連する好酸球過剰活性化、平滑筋細胞を主体とした気道リモデリング、重症例の炎症細胞 (T細胞、好酸球、好塩基球)、気道上皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞における、細胞表面分子、シグナル伝達分子、サイトカイン遺伝子転写機構の異常の詳細を分子レベルで特定する。*in vitro* の実験と平行して、わが国のアレルギーモデル研究で最先端に位置する研究グループの手で、*in vivo* でのステロイド低応答性、気道過敏性、リモデリングの責任分子を検証する。

当研究班の登録調査により、わが国の重症喘息の大多数が IgE 抗体のない非アトピー型喘息で、高用量吸入ステロイド、長時間作用型・刺激薬、ロイコトリエン拮抗薬など既存の喘息治療薬をすべて使用してもなお抵抗性の気流閉塞を特徴とすることが明らかになった。喘息で気流閉塞が生じるメカニズムについては、IgE を介する即時型アレルギー反応以外には明かにされていない。そこで、われわれは、IgE 以外の経路でいかに気流閉塞が生じるのか、非アトピー型の気流閉塞機序の解明を試みた。

重症喘息の早期診断、予知マーカーの確立をめざして、呼気NO、呼気凝縮液 (EBC) 中の ECP ならびに IL-8、その他の炎症マーカーと重症度との関連について検討した。加えて、重症化関連遺伝子多型を複数見出ししてきたので、早期発見、予知、予防への応用をめざす。

喘息を特徴づける好酸球性炎症、粘膜組織リモデリングはアレルギー疾患全般に共通するプロセスであり、好塩基球活性化や平滑筋遊走を介した喘息の重症化因子が、アレルギー性鼻炎、結膜炎、花粉症など他のアレルギー疾患の慢性化、治療抵抗性因子と共通することは臨床医学的に想定されており、本研究の成果はアレルギー学全般に波及するものと期待される。ステロイドの効果不全をきたす分子機構の解明は、難治性喘息および他のステロイド抵抗性の難治性炎症疾患 (リウマチ、SLE、自己免疫性血管炎等) の病因・

治療ターゲットの解明に道をひらくもので医学的意義が大きい。

B. 方法

1) 森 (研究代表者) らは、わが国の重症喘息症例の過半で、T細胞レベルのステロイド抵抗性が特徴的に認められることを、*ex vivo*、*in vitro* で証明した。T細胞をとりまく微小環境の costimulatory シグナル阻害によるステロイド感受性回復治療法の実現に向けて、その前臨床モデルが存在しない障害を克服するため、まず、ステロイド抵抗性喘息モデルの樹立を試みた。さらに、本モデルを用いて、治療応用に向けて、CTLA4-Ig (ORENCIA®、CD28 とそのリガンドである CD80、CD86 との結合を競合し阻害する薬物) による costimulatory シグナル阻害のステロイド感受性回復効果をはじめ *in vivo* で証明し、臨床試験実施に向けたエビデンスとした。

加えて、わが国の重症喘息の大部分を占める非アトピー型喘息に対して、起因アレルゲンの診断法を樹立することと、IgE 非依存性の気道閉塞メカニズムを解明する目的に、T細胞由来の気管支平滑筋収縮活性の characterization を進めた。

● 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の成人喘息症例より、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、1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。

● アレルゲン

粗抗原として用いたダニ、スギ、イヌ、ネコ、カンジダ、アルテルナリア、アスペルギルスなど各種アレルゲン診断用エキスの原末は鳥居薬品 (株) より供与された。精製ダニアレルゲン Der f 1、Der f 2 はアサヒビール薬品 (株) より、精製カンジダアレルゲン Secretory aspartic prorease 2 (SAP2)、Superoxide dismutase (SOD)、cyclophilin、enolase、mannan A は宝酒造 (株) より購入した。Stock solution として、Hank's buffered saline solution (HBSS) に2 mg/ml の濃度で溶解し、使用時まで -20°C にて凍結保存した。

● 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 μM 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。粗抗原エキス、精製アレルゲンの最終濃度 0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて6日間培養し、上清をハーベストした。サイトカイン産生の評価には、上清中の IL-2、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、IFN- γ をそれぞれ特異的サンドイッチ ELISA 法にて測定した。リンパ球の増殖反応は $10^5/\text{well}$ の細胞を6日間培養した後、16時間 ^3H -Thymidine パルスにて測定した。実験によっては、negative selection 法により CD4 細胞を enrich した。

アトピー型喘息症例の PBMC を Der f 2 と培養し、得られたリンパ芽球を限界希釈法によりクローニングし、ダニアレルゲン Der f 2 特異的ヘルパー T (Th) 細胞クローンを樹立した。さらに、autologous の PBMC を抗原提示細胞とし、抗原を加えて共培養することで subcloning、増殖させて、種々の活性化刺激に応答したサイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。末梢血 CD4⁺細胞、Der f 2 特異的ヒトヘルパー T (Th) 細胞クローンをを用い、固相化抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、rIL-2 を活性化刺激とし、サイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。培養中に各濃度の dexamethasone (Dex)、各種シグナル伝達阻害薬を加え、Dex 用量反応曲線より IC₅₀ 値を求めた。

● OVA 特異的マウス Th クローン樹立と *in vitro* ステロイド感受性の解析

既報の如く Balb/c マウスを OVA で感作し、所属リンパ節より感作リンパ球を回収、*in vitro* での抗原刺激、限界希釈を行って、OVA 特異的 Th clone を樹立した (Kaminuma O. et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:448, 1997)。Irradiated spleen cell を抗原提示細胞とし、subcloning、さらに増殖させて、実験に使用した。また、T cell receptor transgenic mouse (DO11.10) の脾細胞から CD4⁺ T 細胞を精製し、同様に抗原刺激、限界希釈を行って、OVA₃₂₃₋₃₃₉ 特異的 Th clone を樹立した。

Th clone ($10^5/\text{well}$) を抗原提示細胞 ($4 \times 10^5/\text{well}$)、OVA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とともに 96 well culture plate にて 72 時間培養し、細胞増殖応答を最後の 18 時間 ^3H -thymidine パルスにて評価した。サイトカイン産生は 48 時間後の培養上清を特異的サンドイッチ ELISA にて測定した。培養中に Dex 最終濃度 1~1000 nM を加え、IC₅₀ 値を評価した。

● Th 細胞移入喘息モデルと *in vivo* ステロイド感受性の解析

5×10^6 個の Th clone を無処置マウスに尾静脈より注入し (Day 0)、翌日 OVA を経気道的に抗原チャレンジした。さらに 48 hr 後、BUXCO にて気道抵抗を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。Day 1、2 に Dex 1、3 mg/kg、および vehicle を皮下投与した。

● T 細胞依存性気流閉塞メカニズムの解析 (*in vitro*)

OVA 特異的マウス T 細胞クローンを固相化抗 CD3 抗体で刺激し、24 時間後に上清を回収、透析し、収縮アッセイのサンプルとした。また、SAP2 に反応して IgE

非依存性に遅発型喘息反応が惹起される非アトピー型喘息症例より、PBMC を得、SAP2 と培養し、上清を回収後、透析、保存した。

3-4 週齢の Balb/c マウスより気管支を採取し、細片を 37°C、3 時間半コラゲナーゼ (1 mg/ml) 処理、10% FBS 加 DMEM/F-12 に懸濁し 24 well culture plate にて培養した (マウス気管支平滑筋細胞の初代培養)。4 日後に継代し、さらにその 3 日後に、マウス気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンゲルを作成した。コラーゲンゲルは、24 well culture plate にて、Cellmatrix type1-A (新田ゼラチン) に、 3×10^5 cells/well のマウス気管支平滑筋細胞を封入した。培養 6 日後に、バッファー交換後、T 細胞クローン培養上清を加え、デジタル画像を経時的に記録した。画像解析ソフトウェア ImageJ (NIH) により、ゲルの面積を計測し、収縮率を算出した。実験によっては、ヒト気管支平滑筋細胞 (Cambrex 社) をコンフルエント条件に培養し、コラーゲンゲルに封入した後、サンプルをアプライし、収縮を経時的に記録、解析した。

● T 細胞依存性気流閉塞メカニズムの解析 (*in vivo*)

前述の T 細胞移入喘息モデルを用いた。Th clone を無処置マウスに尾静脈より注入し、翌日 OVA を経気道的に抗原チャレンジした後、経時的に気道抵抗を BUXCO 社製非拘束下呼吸解析装置により測定した。実験群によっては、麻酔下にレスピレータ装着し、気道抵抗解析装置にてモニターした。

2) 藤澤 (三重病院) らは、好酸球性炎症の増悪機構および好酸球とリモデリングとの関連を解析した。

● 細菌感染に際した好酸球活性化メカニズム

正常ボランティア及びアレルギー症例の末梢血から CD16 negative selection により精製した好酸球を用い、Clostridium difficile (CD)、Bifidobacterium bifidum (BB)、Staphylococcus aureus (SA) を加熱処理後、各種濃度で添加し、好酸球の活性酸素産生、EDN 遊離、サイトカイン産生、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) を測定した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫染色による形態観察を行った。加熱処理により細菌は死滅するが、形態は保持されていることを確認した。好酸球エフェクター機能誘導の反応系に対して、EDTA、百日咳毒素、抗 dectin 1、CD18、CD35、CD36、TLR2、TLR4 抗体、および PAF 受容体ブロッキングペプチドを添加して、抑制の有無を調べ、責任分子を同定した。

● 好酸球による上皮間葉系移行の誘導

気道リモデリングにおける上皮間葉系移行 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) の役割が注目されている。好酸球の EMT における役割を明らかにするため、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を定量した。

3) 田中 (岐阜薬大) らは、ダニ抗原気管内投与によるアジュバントフリーの喘息モデルを確立し (Wakahara et al, 2008)、喘息の重症化要因と想定さ

れるウイルス感染様刺激を加えて、重症化メカニズムを *in vivo* で解析した。

吸入麻酔下に、マウスの気管内に *Dermatophagoiodes farinae* (Der f) 粗抗原を複数回投与して反応を惹起し、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。本モデルを用いて、喘息の難治化因子と想定されている RNA ウィルス (類似物質としてライノウィルスなどの一本鎖 RNA ウィルスが増殖する際に生じる二本鎖 RNA の模倣品である poly IC) を前投与する重症化モデルを構築し、抗 CD8 抗体 (clone: 2.43)、BLT₁ 受容体拮抗薬、抗マウス IL-13 抗体の効果、加えて TLR9 KO マウス、chloroquine 投与の影響につき解析した。通常型の卵白アルブミン (OVA) 誘発喘息モデルは、OVA 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、OVA 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。

4) 庄司 (東京病院) らは、重症喘息のリモデリングに必須の要素である細胞遊走に関わる遊走因子とプロテアーゼの病態生理を研究した。ヒト気管支平滑筋細胞、ヒト肺線維芽細胞、ヒト気管支上皮細胞 (Lonza 社) を培養し、肺線維芽細胞、気管支平滑筋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、気管支上皮細胞を遊走実験の標的細胞に使用した。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。上清を濃縮・電気泳動した後、泳動蛋白を転写膜へ転写・染色し、蛋白質バンドを切り出して一次構造解析を行った。フィブロネクチンが主要な細胞遊走因子であると仮定し、抗フィブロネクチン抗体を添加した。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も検討した。

5) 相沢 (久留米大学) らは、喘息死の病理組織学的研究を行った。喘息死症例の肺組織における、CD4、8 陽性 T 細胞 IL-18 産生の検討を行った。昭和 48 年以降に久留米大学病院で病理解剖を行った喘息死 12 症例、肺癌切除術を施行した非喫煙の軽症喘息 5 症例及び非喫煙者 10 名の肺病理組織を用いた。肺病変部の免疫組織染色は、抗ヒト IL-18 モノクローナル抗体 (clone 8)、抗ヒト IL-18 受容体モノクローナル抗体 (H44)、抗ヒト CD4 モノクローナル抗体 (4B12)、抗ヒト CD8 モノクローナル抗体 (C8/144B) を用いた。

6) 大田 (帝京大学内科) らは、好塩基球が IgE・FcεRI 依存性刺激を受けた際に、直接の活性化以外に生じる変化を検出するため、細胞機能を詳細に解析した。また、臨床的な喘息増悪因子である肥満や糖代謝異常に関わる因子が、好塩基球の生存及び活性化に及ぼす影響を解析した。健康人から書面の承諾を頂いた上で 18

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

7) 高橋 (南岡山医療センター)、谷本 (岡山大学) らは、重症喘息の臨床診断マーカー確立を目的に、喘息 339 症例、健常者 15 名を対象として、NIOX MINO® (Aerocrine AB) を用いて呼気 NO 濃度を測定し、JGL2006 の症状、治療ステップ別に検討した。また、成人喘息 81 名を対象に、非発作時に R-tube (Respiratory Research, Inc) を用いて 10 分間呼気濃縮液 (EBC) を採取し、血清、EBC 中の ECP、IL-8、IL-4、TSLP、TNF-α、histamine 等を測定し、JGL2009 の症状、治療ステップ、重症度、呼吸機能 (%FEV_{1.0}) との関連を検討した。

● 好塩基球の抗原提示細胞機能の解析

健常者の末梢血から比重遠心法により末梢血単核球を分離し、IL-3 や抗 IgE 抗体の存在下・非存在下で培養した。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 の発現を検討した。また、末梢血単核球の一部を IL-3 (5 ng/ml) 下で 3 週間培養し、immunomagnetic beads (Basophil Isolation Kit II, Miltenyi Biotec) を用いた negative selection により高純度の末梢血幹細胞培養好塩基球を得た。末梢血単核球から immunomagnetic beads を用いて CD4⁺ T 細胞を分離し、CFSE (10 μM) で標識した後、IL-3 (10 ng/ml) 下で 5 日間、同種末梢血幹細胞培養好塩基球と共培養 (1:1) し、flow cytometry で CD4⁺ T 細胞の増殖反応を解析した。

8) 烏帽子田 (広島大学) らは、喘息重症化にかかわる遺伝子多型を解析した。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。3 群間に年齢、喫煙者比率に差はなかった。重症群と軽症群は、いずれも健常群と比較して総 IgE 値 (RIST) が有意に高かったが、重症群と軽症群間には有意差は認められなかった。

調べた遺伝子多型は、環境中の様々な酸化ストレスに対して抗酸化作用を有する NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) の Pro187Ser および Ser187Ser、Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) の null 型、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)、および環境中化学物質の代謝と密接な関係がある Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) のプロモーター領域における Tag 遺伝子の rs6726395 (G/A) と rs6721961 (G/T)、Microsomal epoxide hydrolase (mEH) の Tyr113His と His139Arg であった。それぞれの多型の割合を、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、喘息重症化における遺伝子多型の役割を検討した。

9) 中村 (金沢大学) らは、喘息、アレルギーの予防、軽症化をめざして環境フィルターを開発した。in vitro 研究として、A549 細胞に、自動車排気物質 (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) のナフタレン、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트라セン、ベンゾ (a) ピレン、p-ニトロフェノールベツを添加し、18-48 hr 培養した後、上清の IL-8 濃度をサンドイッチ ELISA 法で測定した。In vivo 研究としては、アレルギーモデルマウスにて、これらの物質を投与し、気管支の好酸球および好中球の浸潤と気道過敏性を評価した。

化学物質除去を目的として非晶鉄および活性炭を含む除去フィルター (aFe) を新たに開発した。DEP 抽出物あるいはその成分の除去率について、既存のフィルターと比較するため、DEP あるいはその成分を含む水を、それぞれ aFe と既存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。aFe の PAHs に対する吸着メカニズムを解明するため、特に粒状活性炭 AGC フィルターとの間で吸着特性に有意差が認められたベンゾ a ピレンに対する吸着メカニズムをフロンティア理論に基づいて検証した。

(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。実施に先立って各研究者の施設ごとに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する。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. 結果および D. 考察

1-1) ステロイド抵抗性喘息モデル治療の研究 (森ら)

● ステロイド抵抗性喘息モデルの開発

成人重症喘息でみられる T 細胞レベルのステロイド抵抗性のメカニズムを解析するとともに、CTLA4-Ig 臨床応用の前提となる前臨床データ治療実験を行う目的に、ステロイド抵抗性喘息モデルの樹立を目指した。OVA で感作した BALB/c マウスや DO11.10 マウスから脾細胞を採取し、ナイロンファイバーを用いて T 細胞を選択的に単離した。抗原提示細胞 (irradiated spleen cell)、OVA とともに共培養し、1 週間後に限界希釈を行い、T 細胞をクローニングした (図 1-1)。

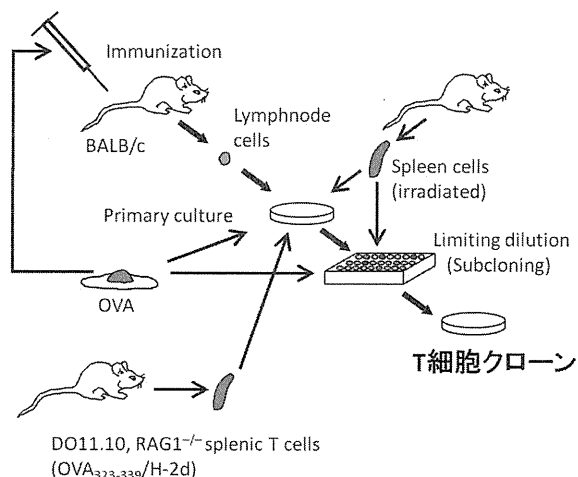


図 1-1. マウス helper T (Th) 細胞クローンの樹立

次いで、96 ウェルマイクロプレートに抗原提示細胞、OVA とともに Th クローンを培養し、各濃度の dexamethasone (Dex) を添加した。72 時間培養の最後 18 時間に ³H-thymidine をパルスし、細胞増殖を評価した (in vitro ステロイド感受性、図 1-2)。48 時間培養の上清を回収し、サンドイッチ ELISA 法によりサイトカイン濃度を測定した。in vivo におけるステロイド感受性解析は、T 細胞クローンを無処置 BALB/c マウスに移入し、OVA チャレンジ、Dex の皮下投与を行った後、OVA チャレンジの 48 時間後に BALF を回収し、炎症細胞数を計測した。

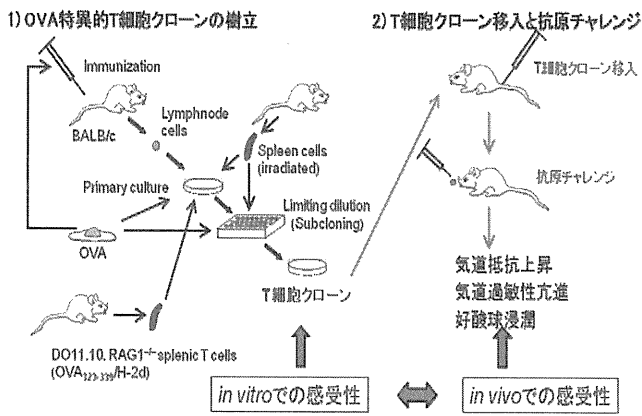


図 1-2. ステロイド抵抗性喘息モデル—*in vitro* と *in vivo* の T 細胞ステロイド感受性比較

T 細胞クローンの増殖応答 (*in vitro*) に対する Dex の効果については、Th クローン BF7、T6-2、T6-10 の増殖は用量依存的に抑制され(図 1-3a)、 IC_{50} 値はそれぞれ 27.2、34.3、2.4 nM であった(表 1)。これに対して、Th クローン T6-4、T6-7 の増殖は、用いた濃度の Dex では抑制されず、 IC_{50} 値は 1000 nM 以上となった(図 1-3b)。 I_{max} (Dex 0 nM 時の増殖を 100% とした、増殖最大抑制率)はそれぞれ 48%、31% であった。T5-1 の増殖は Dex によりやや抑制されたものの、 IC_{50} 値は 664.5 nM、 I_{max} は 67% であった(表 1-1)。

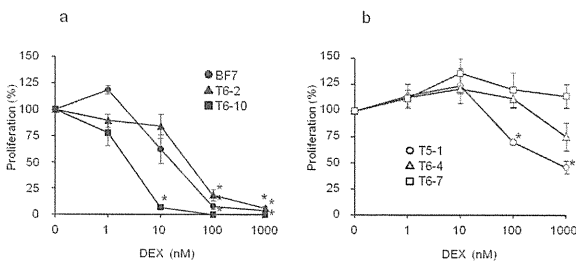


図 1-3. *in vitro* における T 細胞クローンの増殖 (*: $p < 0.05$)

表 1-1. T 細胞クローンの細胞増殖とサイトカイン産生に対する Dex の効果

		BF7	T6-2	T6-10	T5-1	T6-4	T6-7
Proliferative responses	IC_{50} (nM) ¹	27.2	32.3	2.4	664.5	>1000	>1000
	I_{max} (%) ²	92	93	100	67	48	31
IL-4 ³	$\times 10^3$ pg/ml	12.2	ND	ND	ND	ND	ND
	IC_{50} (nM)	31.9	-	-	-	-	-
	I_{max} (%)	90	-	-	-	-	-
IL-5 ³	$\times 10^3$ pg/ml	17.3	ND	23.2	ND	ND	ND
	IC_{50} (nM)	28.9	-	5.7	-	-	-
	I_{max} (%)	91	-	96	-	-	-
IL-13 ³	$\times 10^3$ pg/ml	48.5	3.3	7.2	0.4	0.7	ND
	IC_{50} (nM)	6.3	6.3	3.8	27.3	24.5	-
	I_{max} (%)	98	98	89	79	90	-
IFN- γ ³	$\times 10^3$ pg/ml	ND	86.2	ND	103.2	178.0	137.2
	IC_{50} (nM)	-	13.1	-	20.9	114.6	43.3
	I_{max} (%)	-	98	-	92	73	80

¹T 細胞クローンを 96 ウェルマイクロプレートに APC、OVA とともに 72 時間培養し、各濃度の Dex を添加した。培養最後の 18 時間に ³H-thymidine をパルスし、細胞増殖を評価した。 IC_{50} は、Dex 0 nM 時の細胞増殖を 100%

とした場合の、細胞増殖が 50% となる Dex 濃度とした。 I_{max} は、Dex 0 nM 時の細胞増殖を 100% とした細胞増殖最大抑制率とした。

³細胞培養 48 時間の上清中 IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ 濃度をサンドイッチ ELISA 法により測定した。検出限界は、IL-4 : 15.6 pg/ml、IL-5 : 31.1 pg/ml、IL-13 : 39.0 pg/ml、IFN- γ : 31.1 pg/ml である。ND ; not detectable

以上の結果により、実験に用いた 6 種類の T 細胞クローンのうち、BF7、T6-2、T6-10 の 3 クローンは、Dex により増殖が抑制されるステロイド感受性クローン、一方、T5-1、T6-4、T6-7 の 3 クローンは、抑制されないステロイド抵抗性クローンとされた。IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ の産生は全ての T 細胞クローンで用量依存的に抑制された(表 1-1)。 IC_{50} 値はステロイド抵抗性クローンの方が高い傾向が見られた。

次いで、T 細胞クローン移入喘息モデルを用いて、*in vivo* でのステロイド感受性を評価した。無処置 BALB/c マウスに各 T 細胞クローンを移入し、OVA チャレンジと Dex 皮下投与(0、1、3 mg/kg)を行った。気管支肺胞洗浄 (Broncho-alveolar lavage: BAL) は OVA チャレンジの 48 時間後に行い、BAL fluid (BALF) 中のマクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球数を計測した(図 1-4、1-5)。*in vitro* 実験においてステロイド感受性クローンに分類された BF7、T6-2、T6-10 を移入した場合、BALF 中好酸球数、リンパ球数は、Dex の用量依存的に低下した。一方、ステロイド抵抗性クローンの T6-4、T6-7 を移入した場合、BALF 中好酸球数、リンパ球数は有意な低下を認めなかった。T5-1 を移入した場合、3 mg/kg の Dex 投与により BALF 中好酸球数が約 30% 低下した。

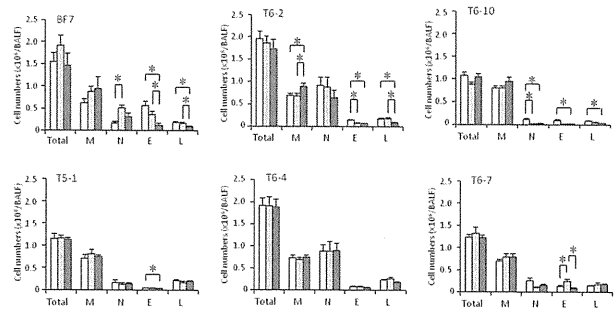


図 1-4. T 細胞クローン移入喘息モデル BALF 中炎症細胞数

T 細胞クローンを無処置 BALB/c マウスに移入し、OVA チャレンジした。各投与量の Dex を皮下投与した。チャレンジ 48 時間後に BALF を回収し、炎症細胞数を計測した。Dex 0 mg/kg : 白、Dex 1 mg/kg : 薄グレー、Dex 3 mg/kg : 濃グレー、Total : 総細胞数、M : マクロファージ、N : 好中球、E : 好酸球、L : リンパ球を示す。用いたマウス数は、BF7 (n=6)、T6-2 (n=7-11)、T6-10 (n=6-9)、T5-1 (n=6)、T6-4 (n=10-12)、T6-7 (n=5-13) であった。*: $p < 0.05$

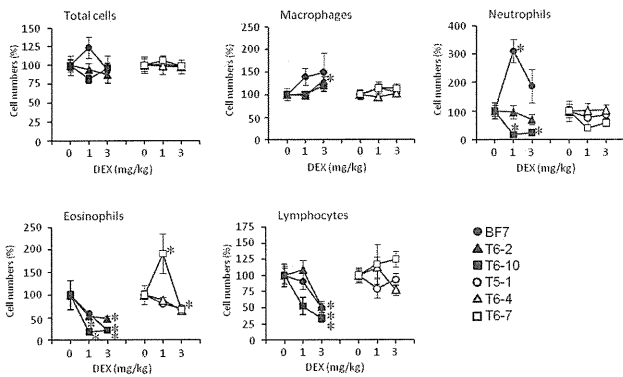


図 1-5. T 細胞クローン移入喘息モデル BALF 中の炎症細胞数 (相対変化)

T 細胞クローンを無処置 BALB/c マウスに移入し、OVA チャレンジした。各投与量の Dex を皮下投与した。チャレンジ 48 時間後に BALF を回収し、炎症細胞数を計測した。用いたマウス数は、BF7 (n=6)、T6-2 (n=7-11)、T6-10 (n=6-9)、T5-1 (n=6)、T6-4 (n=10-12)、T6-7 (n=5-13) であった。*: p < 0.05, Dex 0 mg/kg の時の細胞数と比較

以上の結果から、培養系 (*in vitro*) での Dex 効果によりステロイド感受性とステロイド抵抗性に分類された T 細胞クローンが、喘息モデル (*in vivo*) における Dex 効果においても、同じステロイド感受性とステロイド抵抗性に分類されることが明らかになった。ステロイド感受性クローンを移入したマウスの喘息はステロイド感受性であり、ステロイド抵抗性のクローンを移入したマウス喘息はステロイド抵抗性であった。すなわち、*in vitro* での T 細胞ステロイド感受性と、*in vivo* における喘息モデルのステロイド感受性とは、一対一で対応した。好酸球は、ステロイドに対して高感受性であることは良く知られているが、好酸球は、*in vivo* においてはサイトカインや様々な接着分子シグナル等の影響を受け、ステロイド感受性/抵抗性 T 細胞クローン移入マウスで、ステロイド反応性が異なるものと考えられる。

ステロイド抵抗性喘息の患者から採取された末梢血 T 細胞は、ステロイド感受性が極めて低く、Dex に対する IC₅₀ 値は 1000 nM 以上であり、ステロイド感受性の喘息患者の約 100 倍と報告されている。我々の T 細胞クローンのステロイド感受性解析では、ステロイド感受性の T 細胞クローンとステロイド抵抗性の T 細胞クローンの Dex に対する IC₅₀ 値は、20 倍から 500 倍の差となった。ステロイド感受性が大変低いという点において、本実験で用いたステロイド抵抗性クローンは、ステロイド抵抗性喘息患者の末梢血 T 細胞と類似しており、ステロイド抵抗性喘息の T 細胞の性質を反映していると言える。本研究によって世界ではじめて、T 細胞レベルの差違で生じるステロイド抵抗性喘息モデルが樹立できた。

T 細胞のステロイド感受性は、欧米の著名研究者が主張するように T 細胞内の異常によって起きるのではなく、T 細胞が存在する微小環境からの活性化シグナ

ルによって規定されることが示唆されている (図 1-6)。そこで、われわれのステロイド抵抗性喘息モデルを用いて、*in vivo* の治療実験を行い、ステロイド抵抗性治療薬開発をめざしている。

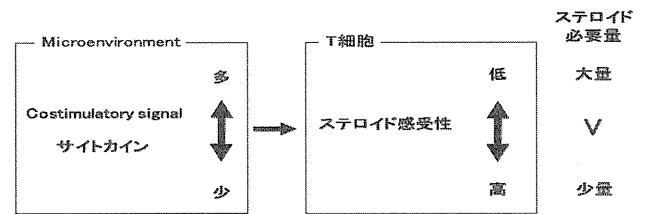


図 1-6. T 細胞のステロイド感受性は、微小環境における活性化シグナル、サイトカインの多寡によって規定される

1-2) 非アトピー型喘息機序の解明 (森ら)

● IgE 非依存性、T 細胞依存性気道閉塞機序の解明

当研究班が実施した難治性喘息症例登録調査において、わが国のステロイド依存性喘息は、90%以上が成人発症で、70%が IgE 抗体の認められない非アトピー型喘息で占められていた (表 1-2)。

表 1-2. 重症喘息に関する疫学研究プログラム

	ENFUMOSA ¹	SARP ²	難治性喘息 ³ 研究班
症例数	163	204	93
年齢 (歳)	42	41	62
性別 (女性の%)	81	64	38
発症年齢 (平均、歳)	-	25	38
成人発症 (%)	-	51	94
アトピー (%)	58	71	30
%FEV ₁	72	62	63
経口ステロイド常用者 (%)	33	32	100

¹ ENFUMOSA study group. Eur Respir J 22:470, 2003

² Moore et al. J Allergy Clin Immunol 119:405, 2007

³ 森晶夫ら 厚生科学研究 (平成 12-14 年) 「気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と難治化の予防・治療法の開発に関する研究」

われわれは、非アトピー型喘息症例においても、T 細胞レベルの IL-5 産生亢進が特徴的に認められ、IL-5 産生誘導抗原に対して、IAR を欠く IAR (isolated IAR) が認められることを報告している。IgE 抗体 (液性免疫) でなく、感作 T 細胞 (細胞性免疫) の免疫応答異常によって喘息反応 (アレルギー反応) が惹起されるという世界初のコンセプトを提唱した。そこで、まず本仮説を動物モデルで検証することを目指した。

T 細胞依存性気道閉塞機序の解明と治療法開発に向けて、T 細胞移入モデルを解析した。既に、T 細胞クローンを無処置マウスに移入、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 (Kaminuma O., et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 16:448, 1997, Nakata A., et al. Int Immunol. 13:329, 2001,

Kaminuma O., et al. *Eur J Immunol.* 31:2669, 2001)。
 今回は、T細胞クローン 1×10^7 cells/head を無処置 BALB/c マウスに経静脈的に移入し、24 時間後に OVA 経鼻または吸入（噴霧）チャレンジを行い、経時的に気道抵抗を測定した。気道抵抗は、国際的に認められている 2 通りの手法を用いて評価した（図 1-7）。まず長時間の測定に適した無拘束呼吸機能解析装置（BUXCO）を用いて Penh (enhanced pause) 値で評価した（図 1-7a）。次いで、麻酔下レスピレータ装着下に呼吸機能測定装置（BUXCO 社）を用いて、直接呼吸抵抗を測定した（図 1-7b）。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。

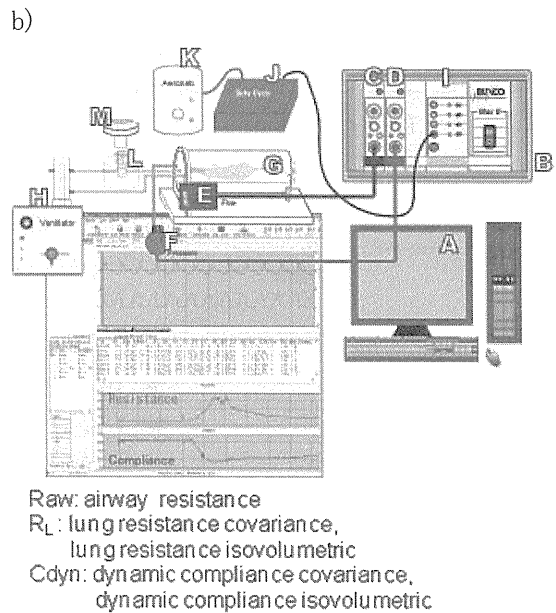
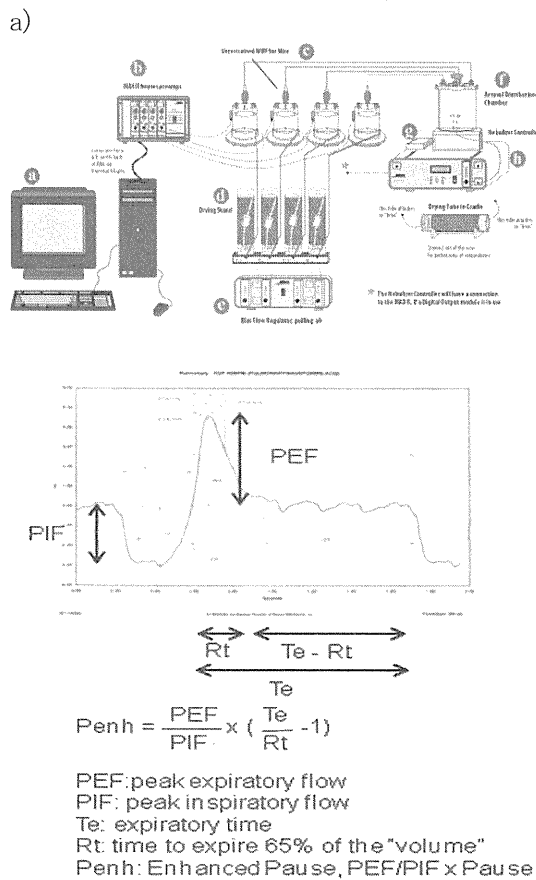


図 1-7. 2 通りの気流閉塞測定法

a) Unrestrained whole body plethysmography (BUXCO) for conscious animals、b) Resistance/compliance analyser (BUXCO) for anesthetized animals

図 1-8 に実験方法の概略を示す。DO11.10 transgenic mouse から OVA 特異的 Th クロンを樹立した。Th クロンを無処置マウスに移入後、抗原チャレンジし、経時的に気道抵抗をモニターすることで、喘息反応が起きていることを証明した。

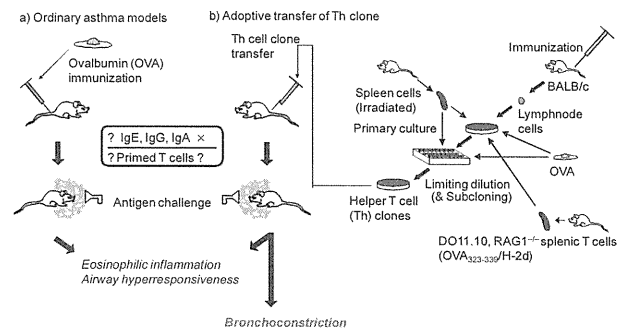
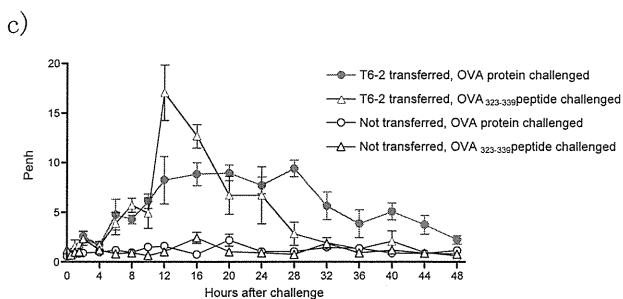
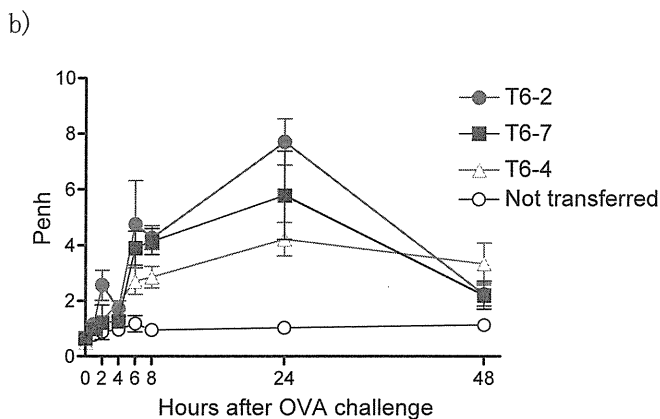
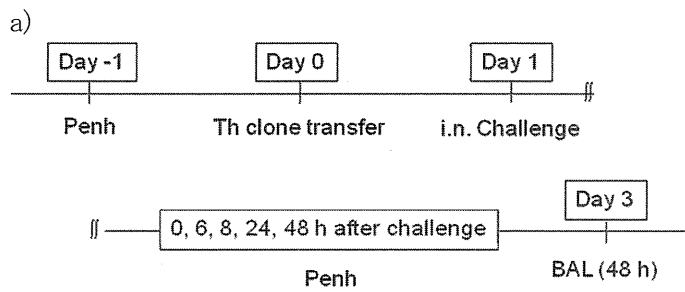


図 1-8. Th クローン移入喘息モデルによる非 IgE 依存性、T 細胞依存性喘息反応の証明

図 1-9 に実験プロトコルおよび結果を示す。Th クローン移入の 24 hr 後に OVA または抗原エピトープの p323-339 を経鼻的にチャレンジし、40 hr 後まで Penh 値を測定した（図 1-9a）。計 20 個のクローンを解析し、T6-2、T6-4、T6-7 の 3 個のクローンで、Penh 上昇を認めた（1-9b）。p323-339 の場合は、1 hr 後から、OVA の場合には 2 hr 後から、Penh 値が上昇し、40 hr 後まで持続した（図 1-9c）。



*, #, p < 0.05 vs not transferred mice

図 1-9. Th クローン移入後の Penh の推移
 DO11.10 transgenic mouse から OVA 特異的 Th クロンを樹立した。a) 実験スケジュール Th クローン移入の 24 hr 後に OVA または抗原エピトープの p323-339 を経鼻的にチャレンジし、40 hr 後まで Penh 値を測定した。b) 計 20 個のクローンを解析し、T6-2、T6-4、T6-7 の 3 個のクローンで、Penh 上昇を認めた。c) p323-339 の場合は、1 hr 後から、OVA の場合には 2 hr 後から、Penh 値が上昇し、40 hr 後まで持続した。

さらに、麻酔下にレスピレータを装着、拘束下にダイレクトに気道抵抗値を計測した (図 1-7b)。この場合も、約 6 時間後から気道抵抗値 (R_L) の上昇を認めた (data not shown)。

可逆性の気流閉塞は、喘息を特徴付ける重要な病態であり、従来は、IgE を介したマスト細胞の活性化によって化学伝達物質が放出されて気道抵抗が上昇する機序だけが知られていたが、今回のわれわれの研究成果から、液性免疫以外に、気流閉塞を生じさせる機構が存在し、Th 細胞がエフェクター細胞であることが、はじめて *in vivo* のレベルで明らかになった (図 1-10)。

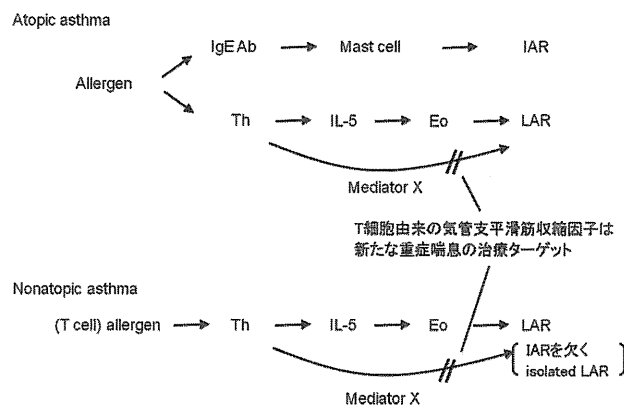


図 1-10. T 細胞は、気道炎症、過敏性、リモデリングに加えて、気流閉塞を惹起するエフェクター細胞である

● T 細胞由来気流閉塞物質の解明

T 細胞によって産生されるいずれの因子が気流閉塞に結びつくのかを解明する目的に、まず、T 細胞クローン移入喘息モデルにおいて、好酸球浸潤、気道過敏性、気流閉塞の関連を解析した (表 1-3)。約 20 個のクローンの解析からは、LAR、好酸球浸潤、気道過敏性の誘導は各々独立した現象と考えられた。

表 1-3. T 細胞依存性の好酸球浸潤、気道過敏性、気流閉塞の関連

Clone	Cell infiltration in BALF			AHR (%)	OVA-induced broncho-constriction	
	Total Cells (%)	Eo (%)	Neut (%)		Penh	RL
BT1	233	-	105	93	→	NT
BT2	NT	NT	NT	NT	NT	NT
BT3	230*	729	208	63	→	NT
BF3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
BF3.1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
BF4	344	4638	78	192*	→	NT
BF7	412	15438	61	116	→	NT
B5-6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
T5-1	349*	330	765*	349*	→	NT
T5-2	844*	22,660	303*	113	→	NT
T5-4	67	579	54	89	→	NT
T5-6	162	33,700	325*	116	→	NT
T6-1	198	114	97	381*	→	NT
T6-2	222	2,341*	857*	160	↑	↑
T6-3	232	33	20	45	→	NT
T6-4	572*	3,232*	1,448*	173*	↑	NT
T6-7	399*	1,481*	1,034*	111	↑	NT
T6-8	95	327*	118	246	→	NT
T6-9	83	14*	10*	100	→	NT
T6-10	71	10*	5*	117	→	NT

*: p < 0.05, NT: Not tested

IgE 非依存性、T 細胞依存性喘息反応の分子基盤を解明するために、*in vitro* 研究を実施した。若年マウスの気管支組織をコラゲナーゼ処理し、マウス気管支平滑筋細胞の初代培養を行った。2 継代目でコラーゲンゲルに封入し、ゲルを平滑筋に見立てて、収縮アッセイに用いた。T 細胞クローンを固相化抗 CD3 抗体で活性化し、24 時間後に上清を回収、透析し、収縮アッセイのサンプルとした。サンプルをアプライした後、マ

ウス平滑筋ゲルの収縮を経時的に記録、解析した。実験の流れを図 1-11 に、結果を図 1-12 に示す。

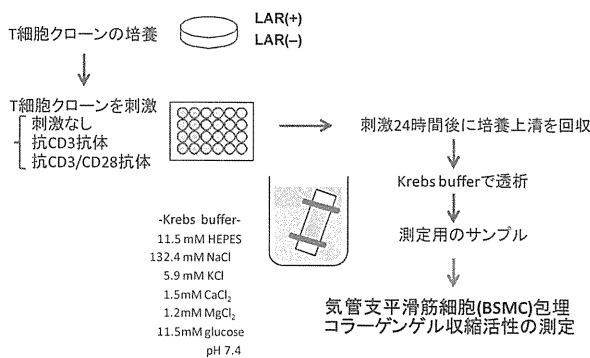


図 1-11. *in vitro* における T 細胞クローン由来気管支平滑筋収縮活性の測定実験の流れ

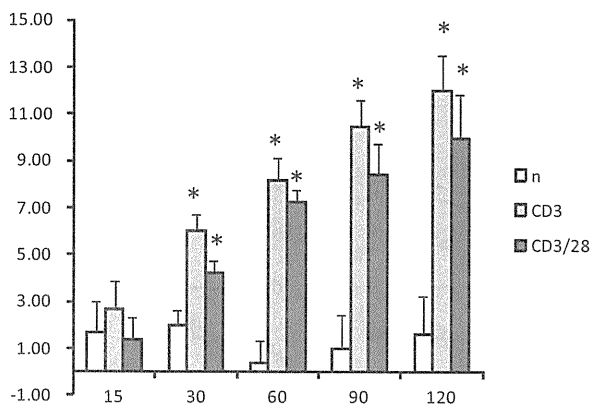


図 1-12. クローン T6-2 由来マウス気管支平滑筋ゲル収縮活性 (*:p<0.05, compared to n)

この結果から、T 細胞が気管支平滑筋収縮活性を産生していることがはじめて明らかになった(図 1-10)。

非アトピー型喘息症例における、IL-5 産生誘導抗原による遅発型喘息反応誘導メカニズムを解明するために、われわれは、commercially available なヒト正常気管支平滑筋細胞を用いた、3 次元 collagen gel による簡便な収縮測定系を確立している。このアッセイ系を用いて、characterization を進めた。従来は、ウシやモルモット等の気管リングをマグナス管に牽引する評価系がよく用いられたが (Beasley et al, J. Appl. Physiol. (1989) 66; 1685, Gosens et al, Br. J. Pharmacol. (2002) 137; 459)、動物種の違いによる収縮差が生じる可能性があり、ヒト気管リングの収縮実験系も報告されてはいるものの (Cerrina et al, Prostaglandins (1989) 37; 457, Norel et al, Br. J. Pharmacol. (1999) 126; 867)、手術摘出の気管支を用いることから、供給面からの制約がある。commercially available な培養ヒト正常気管支平滑筋細胞を用いると、アッセイ系としての安定性がおおいに向上するメリットがある。

SAP2 に反応した T 細胞 IL-5 産生がみられ、SAP2 の吸入誘発時に isolated LAR が認められる症例から、PBMC を分離し、SAP2 と培養 48 時間後の上清を、透析した後、本ゲルにアプライした。平滑筋ゲルの収縮活

性が認められた。遅発型喘息反応陽性者の PBMC 培養上清は、気管支平滑筋ゲルの収縮を惹起したが、陰性者の培養上清には収縮活性を認めなかった。

既知のアンタゴニストの効果を検討した。H1 アンタゴニストの pyrilamine (1 μM)、ロイコトリエンアンタゴニストの montelukast (1 μM)、M1 アンタゴニストの atropine (1 μ) と 30 分 preincubation した後に、それぞれ histamine 1 μM、LTD4 1 μM、methacholine 1 μM で収縮反応を惹起した場合には、90%以上抑制されたが、T 細胞上清による収縮反応は抑制されなかった (data not shown)。ヒスタミン、メサコリン、ロイコトリエンなど喘息分野の既知の平滑筋収縮物質とは異なることが強く示唆された。

T 細胞由来の平滑筋収縮物質を同定する目的に、LAR が惹起される症例の末梢血単核球より、T 細胞受容体を介する活性化に伴って、収縮活性を産生する T 細胞クローンを樹立した (図 1-13)。

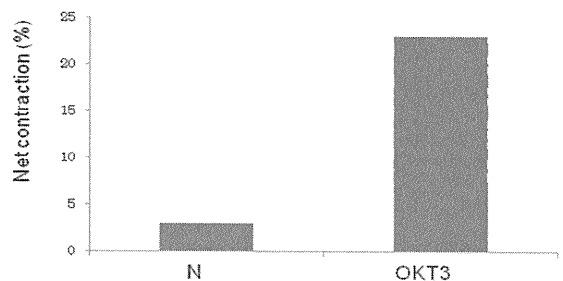
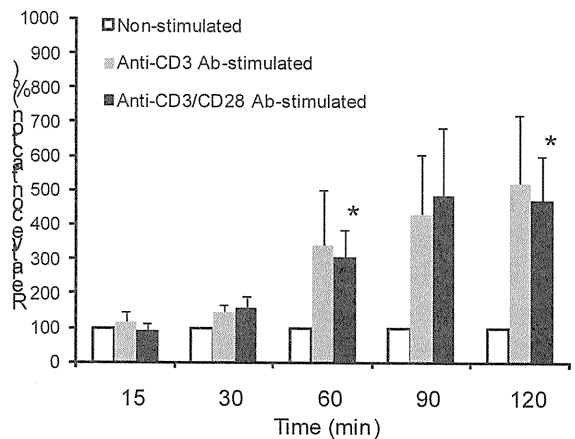


図 1-13. ヒト CD4⁺ T 細胞クローンによる活性化依存性の平滑筋収縮活性

マウス Th クローン上清にも、培養ヒト気管支平滑筋ゲルを収縮させる活性が存在する (図 1-14)。



N=4, * p<0.05, compared with non-stimulated

図 1-14. 培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルを用いたマウス T 細胞クローン T6-2 由来の平滑筋収縮活性

ゲル濾過による分子量分画、イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行い、最新のプロテオーム、ゲノム解析技術を駆使することで、タンパクを同定し、そのリコンビナント体に、平滑筋収縮活性が存在する

ことを証明した。喘息治療薬の新規ターゲットとして、分子標的薬開発に取り組む予定である。

2) 重症好酸球性炎症成立の機序 (藤澤ら)

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。疫学データからは、菌の種類によりアウトカムが異なることが考えられている。好酸球は気道炎症のエフェクター細胞であるとともに、第一線の自然免疫においても、喘息の増悪あるいは生体防御に機能する可能性がある。そこで、各種細菌と好酸球の相互作用を *in vitro* で検討し、自然免疫における好酸球の役割、喘息病態への関与について検討した。特に、難治性喘息の特徴である遷延性の好酸球性炎症機構を細菌感染の面から検討した。

● 好酸球による細菌の食食

腸管における病原性の *Clostridium difficile* (CD)、プロバイオティクスと呼ばれる *Bifidobacterium bifidum* (BB)、に加えて *Staphylococcus aureus* (SA) の各種細菌を好酸球と培養し、食食を観察した。細菌の 16S rRNA に対して蛍光 *in situ* hybridization を行って標識 (Cy3)、好酸球は自家蛍光 (FITC) を利用して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。2 時間の培養で好酸球が細菌を食食した (図 2-1)。用いたすべての菌で同様の所見が観察された。

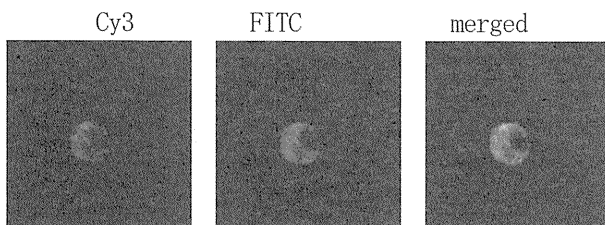


図 2-1. 好酸球の細菌食食

● CD と BB による活性酸素産生、脱顆粒、TGF- β 産生誘導

CD、BB ともに好酸球の活性酸素産生は誘導しなかった。CD、BB ともに脱顆粒 (EDN 遊離) を誘導したが、CD は BB よりも有意に高値であった (図 2-2)。GM-CSF あるいは TNF- α によるプライミングによって、CD 誘導脱顆粒はさらに増強されるのに対して、BB 誘導脱顆粒は影響を受けなかった (図 2-3)。サイトカイン産生の検討では、BB は CD よりも有意に多くの TGF- β 産生を引き起した (図 2-4)。

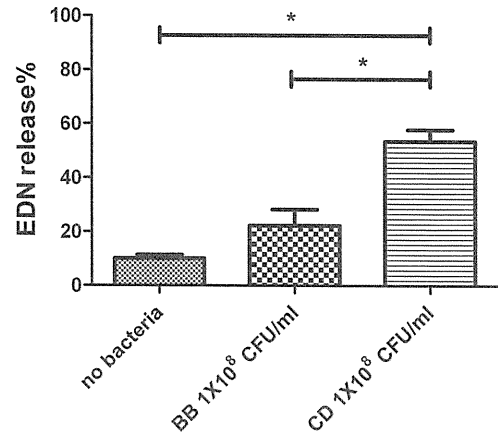


図 2-2. CD と BB による EDN 遊離

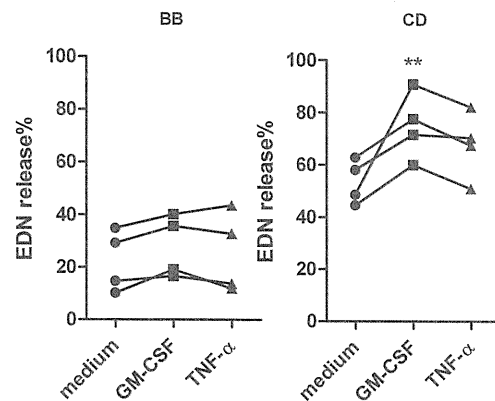


図 2-3. サイトカインによる EDN 遊離増強

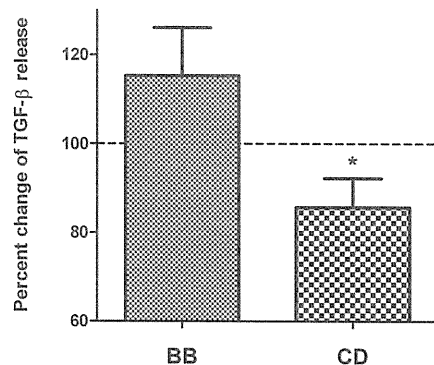


図 2-4. BB と CD による TGF- β 産生

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

● SA による活性酸素産生、脱顆粒

次に、*Staphylococcus aureus* (SA) による好酸球のエフェクター機能発現について検討した。まず、SA は好酸球より活性酸素産生を誘導した (図 2-5)。

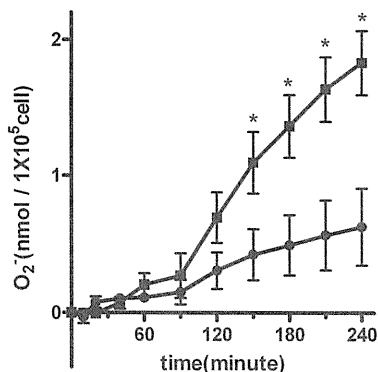


図 2-5. SA による活性酸素産生

この反応は IL-5、IFN- γ 、IL-17 によってそれぞれ有意に増強されたが、とくに IL-5 と IL-17 は早期に相乗的な増強効果を及ぼした (data not shown)。

好酸球を SA と培養すると、有意な EDN 遊離が誘導された (図 2-6)。この反応は EGTA により抑制されるため、カルシウム依存性である。TLR2、TLR4 に対する抗体では抑制されなかったが、脂質メディエーターの血小板活性化因子 (PAF) 受容体に対する抗体で有意に抑制され、SA は PAF と共通に認識される可能性が示唆された。PAF 受容体 (PAFR) 阻止ペプチドの添加により、菌の貪食、EDN 遊離、活性酸素産生、フィブロネクチン接着、サイトカイン産生 (TNF- α) のいずれも有意に抑制された (data not shown)。

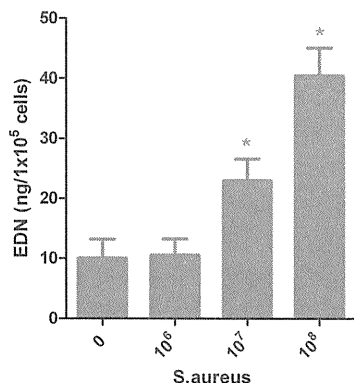


図 2-6. SA による好酸球脱顆粒

SA に対する好酸球のエフェクター機能としては、活性酸素産生と脱顆粒が誘導されることを明らかにした。重症喘息では高率に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。本結果は、好酸球が SA と直接反応して炎症を増強する可能性を示す。難治性喘息では Th2 型の炎症のみならず、Th17 型反応の関与もささやかれており、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。細菌感染に関連する重症、難治化のメカニズムの一つと考えられる。

● 好酸球による気道リモデリング形成、ENT 誘導

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、線維化と Type I collagen

の発現増加が認められ、BALF 中 TGF- β が上昇した。

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、これにともなって上皮系マーカー E-cadherin の低下と間葉系マーカー vimentin の上昇が認められた。培養上清中の TGF- β が上昇した。好酸球→TGF- β →EMT→線維化 (リモデリング) の経路が考えられる。

3) アジュバントフリー喘息モデルを用いたウイルス感染による喘息増悪メカニズムの解析 (田中ら)

RNA ウィルスが産生する二本鎖 RNA の mimic である poly IC を投与し、ウイルス感染時の喘息増悪における CD8 T 細胞および LTb₁ の意義を検討した。

● CD8 T 細胞および BLT₁ 受容体の解析

Poly IC を先行投与し、その後ダニ抗原を反復気管内投与することにより、ダニ抗原単独の投与に比し、気道過敏性、気道内好酸球増多、Th2 サイトカイン産生がいずれも有意に増悪した。抗 CD8 抗体の投与は、気道過敏性ならびに Th2/Th1 サイトカイン産生バランスには影響しなかったが、BALF 中総白血球数および好酸球数の増加を有意に抑制した。BLT1 拮抗薬は、BALF 中好酸球数の増加を用量依存的かつ有意に抑制した。

CD8⁺ T 細胞はウイルス感染に際し、感染細胞の認識、排除に重要な役割を果たす。ウイルス感染の際、樹状細胞が CD4⁺ T 細胞と同様に CD8⁺ T 細胞に対しても外来抗原を提示する (クロスプレゼンテーション) ことが知られている。本モデルにおいて、抗原曝露に先行してウイルス感染様刺激が宿主に入ることにより、喘息病態が促進される過程に CD8⁺ T 細胞が関与することを明らかにしたが、抗原提示の際に樹状細胞による CD8⁺ T 細胞へのクロスプレゼンテーションが行われた可能性が推察される。

● ウィルス感染による喘息増悪への IL-13 の関与

LTb₁ が CD8⁺ T 細胞上に発現する BLT₁ を介して CD8⁺ T 細胞からの IL-13 産生を促進することが報告されており、ステロイド抵抗性喘息との関与も示唆されている。LTb₁、IL-13 の役割を解析することは、ウイルス感染による喘息重症化・難治化メカニズムの解明に繋がる。

まず基礎検討として、従前の卵白アルブミンによる喘息モデルを用いて、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、OVA 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、気道上皮における杯細胞過形成が有意に減弱した。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、好酸球増多が抑制された。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。

次に、ダニ抗原反復投与マウス喘息モデルでは、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、杯細胞過形成および

基底膜下の膠原繊維の沈着をいずれも有意に抑制した。本モデルの気道過敏性は IL-4 および IL-13 依存性で、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かった。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検討した点に意義がある。本研究では、まず、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を有意に抑制した。従って、ダニ抗原反復刺激による喘息病態形成には 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。

次いで、ウイルス感染による喘息増悪における 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、喘息病態が促進・増悪することが明らかになっている。気道内では IL-13 産生が亢進し、喘息病態増悪には IL-13 が重要な役割を有することを IL-13KO マウスを用いて明らかにしている。しかし、IL-13KO マウスの場合、免疫応答自身が低下している可能性を認めないため、抗 IL-13 抗体を用いてその意義を再検討した。Poly IC を先行投与し、その後、ダニ抗原を反復投与するモデルにおいても、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、気道リモデリングを用量依存的かつ有意に抑制した。この結果は、先行ウイルス刺激による喘息病態の増悪（重症化）にも IL-13 が重要な役割を有し、かつ、その中和抗体投与により治療可能であることを示す。今後、IL-13 産生細胞がダニ抗原単独モデルと poly IC 投与モデルとで異なるか否かなどにつき、さらに詳細に検討する。

● TLR9 の意義と chloroquine の影響

市販のダニ抗原抽出物中にはダニ由来の DNA 成分が含まれている。その影響を TLR9 KO マウスを用いて検討した。野生型マウスに比し TLR9 KO マウスでは、アセチルコリンに対する気道過敏性、BAL 液中好酸球を主体とした炎症性細胞数の増加、気道上皮における杯細胞の過形成、基底膜下線維化のいずれも減弱していた。野生型マウスに chloroquine を腹腔内投与した際にも同様の減弱が観察された。一方、ダニ抗原あるいは卵白アルブミンとアラムを混合し、マウスを能動的に感作し、その後、抗原を気管内投与するモデルで、TLR9 の意義を検討した場合には、気管内投与モデルとは異なり、野生型と TLR9 KO マウスとの間に差は認め

られなかった。

ダニ抗原由来 DNA は、TLR9 が認識する非メチル化 DNA を配列中に含む。一般に、非メチル化 DNA が TLR9 を刺激すると、主として IL-12 などの Th1 誘導性サイトカイン産生が誘導されることから、TLR9 の遺伝子欠損により本喘息モデルは悪化すると予想される。しかしながら、野生型に比し、TLR9 KO マウスではむしろ反応が減弱していた。そこで、エンドソームの酸性化・成熟を阻害する chloroquine を用いて検討したところ、chloroquine は野生型マウスの喘息病態を減弱させた。この減弱は TLR9 KO マウスとほぼ同程度であり、TLR9 KO マウスに chloroquine を投与した場合、野生型マウスに chloroquine を投与した際の抑制の程度以下までは効果が認められないことから、ダニ抗原による喘息病態形成には TLR9 の関与が示唆された。ダニ抗原による気道感作において TLR9 が認識受容体として機能している可能性を示唆している。今後、他の TLRs やプロテアーゼの意義を検討することで、ダニ抗原による喘息発症機序の解明、ダニ抗原による喘息病態の難治化機序が解明されることが期待される。

4) 重症リモデリングにおける気管支平滑筋細胞の遊走 (庄司ら)

● 気管支平滑筋細胞由来のメタロプロテアーゼ同定
リモデリングのプロセスにおいて、細胞が結合組織内を遊走するためには、プロテアーゼが必須である。気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる 56 kDa メタロプロテアーゼについて N 末端側 10 残基の一次構造を解析した結果、候補配列 (APLP₁IKFPG) が MMP-2 のプロペプチドドメインにあたる 30-39 残基の配列 (APSP₁IKFPG) と 90% の相同性を有することが確認できた。62 kDa メタロプロテアーゼの N 端候補配列 (APLP) は 56 kDa メタロプロテアーゼの N 端候補配列中の 1-4 残基と一致したが、5 残基以降の N 末端一次構造は解析できなかった。MMP-2 の 1-29 残基はシグナルペプチドであり、トリプシンによる N 端のプロペプチドドメイン切断にて 62 kDa 型が生成された後、C 端のヘモペキシン様ドメイン切断にて 56, 52, 50 kDa 型が生成されると報告されている (Lindstad, R. I., et al, *J. Mol. Biol.*, 350:682, 2005)。潜在型 MMP-2 は 72 kDa とされる。MMP-2 のプロペプチド領域を認識する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、56 kDa のバンドのみが認められたことから、気管支平滑筋細胞培養上清に含まれる 62, 56 kDa の MMP-2 は、N 端のプロペプチドドメインを残したまま C 端のヘモペキシン様ドメインを 10 及び 16 kDa 切断したものである可能性が考えられる。

● 肺線維芽細胞による気管支平滑筋細胞遊走因子産生

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 (図 4-1)。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

スタンプロティング法にて、200 kDa 以上の分子領域に 2 本のバンドが確認された。

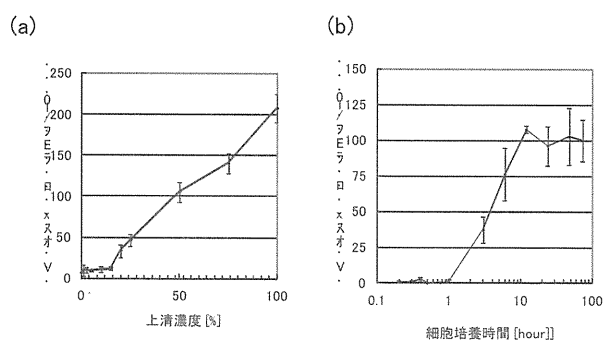


図 4-1. 肺線維芽細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性

● 気管支平滑筋細胞による気道上皮細胞遊走因子産生

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に、かつ、培養時間依存的に上昇した。抗フィブロネクチン抗体で中和されること、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を確認した。

喘息患者の気道リモデリングでは、平滑筋細胞が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産生する可能性が考えられる。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強く示唆する。

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かった。本研究結果は、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ことを示す。重症喘息病態にて、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はなく、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。

気道リモデリングは喘息の重症化及び持続化をもたらす重要な要素であるが、正常な気道上皮が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・放出する可能性が大きい。われわれの実験結果は、気道傷害直後の、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している。

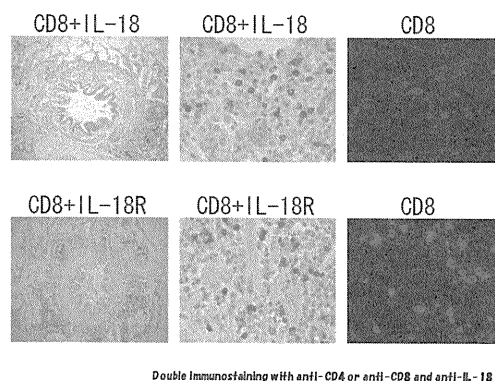
5) 難治化因子の基礎・臨床的検討 (相沢ら)

● 喘息死病理組織の IL-18 産生解析

喘息死患者の年齢は 5 才から 79 才で平均は 44.4 ± 7.4 才であった。12 名中 5 名が 24 時間以内の経過で死亡していた。喘息の罹病期間は 10 ヶ月から 50 年と広い範囲に分布したが、9 名が 6 年以上の罹病期間を持っていた。14 名中 8 名が死亡時にステロイドの全身投与を受けていた。2 名のみが吸入ステロイド beclometasone dipropionate (BDP) を使用していた。

喘息死患者 12 名全員、気道への著明な炎症細胞浸潤がみられ、中枢気道だけでなく末梢気道にも平滑筋の肥大、分泌腺過形成を伴った著明な気道リモデリング、粘液栓による気道の閉塞を認めた。著明な気道リモデリングと粘液栓による気道の閉塞が喘息死の直接の原因と考えられた。一方、軽症喘息患者及び非喫煙者では気道のリモデリングはほとんど認めなかった。細気管支における著明な気道リモデリング、粘液栓による気道の閉塞といった病理像は重症 COPD 患者の末梢気道における病理像と極めて類似していた。

喘息死患者の気道では、好酸球、リンパ球が有意に著明に増加していた。一方、喘息死患者の肺病変部の好中球はコントロール肺より有意に増えていたが、軽症喘息の肺と比べ有意な増加は認めなかった。喘息死患者の気道では、CD4 陽性 T 細胞は軽症喘息と同等に非喫煙者に比較して増加していた。一方 CD8 陽性 T 細胞は軽症喘息と非喫煙者に比べ著明に増加していた。炎症性サイトカイン IL-18 は喘息死患者の気道、肺上皮と炎症細胞に強く発現していた。一方、軽症喘息患者やコントロール正常肺では発現が弱かった。喘息死患者の肺病変部で増えている CD8 陽性 T 細胞は IL-18 受容体をほぼ 100% 発現していた (図 5-1)。



Double Immunostaining with anti-CD4 or anti-CD8 and anti-IL-18 or anti-IL-18R

図 5-1. 喘息死肺病変部における CD8 陽性細胞の IL-18、IL-18 受容体 α 発現

喘息死の肺病変部で、CD8 陽性 T 細胞は著明に増加している一方、CD4 陽性 T 細胞の増加は比較的軽度であった。気道上皮や炎症細胞は IL-18 を強く発現し、CD8 陽性 T 細胞は IL-18 受容体と IL-18 をともに強く

発現していた。これらの結果は、気道上皮や炎症細胞から産生された IL-18 が、CD8 陽性 T 細胞表面の IL-18 受容体を介して CD8 陽性 T 細胞を活性化することを示唆する。重症喘息の要因として、IL-18 産生 CD4 陽性 T 細胞や好中球のみならず、IL-18 産生 CD8 陽性 T 細胞も関与する可能性が考えられた。CD8 陽性細胞や IL-18 を抑制することが、喘息の難治化予防につながる可能性が考えられる。

6) 好塩基球を介した重症化機序の研究 (大田ら)

好塩基球は重症喘息の粘膜局所に浸潤することが知られている。IgE 受容体のクロスリンクにより活性化されるが、それ以外の活性化機序を探索した。

● 非脱顆粒性の IgE 刺激の解析

好塩基球に対してあらかじめ微弱な IgE・FcεRI 依存性刺激処理を行うことにより、種々の細胞機能の増強作用が見られた。具体的には抗 FcεRI 抗体(CRA-1) 1 ng/ml 1 時間処理を加えることにより、好塩基球脱顆粒作用を有するケモカイン MCP-1 刺激による脱顆粒が増強すると共に、ロイコトリエン LTB4 刺激による脱顆粒の誘導、FMLP 刺激による LTC4 産生の増強が認められた。

● レプチン、advanced glycation endproducts (AGE) の作用

肥満関連サイトカインとして知られるレプチン、および高血糖環境で生成する advanced glycation endproducts (AGE) の好塩基球機能への影響を検討した。好塩基球はこれら因子の受容体を細胞表面に発現しており、レプチンは好塩基球活性化マーカー CD63 表面発現の誘導、IgE・FcεRI 依存性の脱顆粒の増強、IL-4・IL-13 産生、eotaxin に対する遊走の増強、apoptosis 抑制を引き起こした。AGE-BSA は比較的高濃度 (1 mg/ml) で apoptosis 促進、IL-6・IL-8 産生を誘導した。

MCP-1 による好塩基球脱顆粒は、レプチンでは増強されなかったが、上述の抗 FcεRI 抗体(CRA-1)により好塩基球の前処理を行うと、レプチンの作用が増強して MCP-1 による脱顆粒を顕著に強めることも判明した。

IgE・FcεRI 依存性刺激が好塩基球に加わることにより、炎症局所に存在する種々の因子による好塩基球脱顆粒のみならずロイコトリエン産生も増強することが明らかとなった。また、肥満や糖代謝異常に関連する因子が好塩基球の活性化、生存、遊走に影響を与えることが判明した。これらの結果に基づくと、アレルギーが好塩基球に対して多様な機能修飾を発揮しうることを、代謝異常症の環境下でも好塩基球機能が増強することが明らかとなり、これらの機序が喘息病態の悪化に関与することが示唆された。

7) 臨床的重症度指標の検討 (高橋、谷本ら) : 重症喘息に特異的な臨床マーカーは現在までに知られていない。そこで、新しい臨床検査指標である呼気 NO、呼気濃縮液中のメディエータにつき、喘息症例の重症度別に、健常コントロールとの比較の上検討した。喘

息症例 (339 名) の呼気 NO 値は、平均 38 ppb であり、吸入ステロイドを含む治療下においても、健常人 (15 名) の呼気 NO 値 (平均 16 ppb) に比べて有意に高値であった。喘息症例の JGL2006 重症度分類の症状ステップ Step 1、2、3、4 別の平均呼気 NO 値は各々 37.9、37.8、26.9、48.6 ppb であった。症状 Step 4 の呼気 NO 値は Step 3 に比して有意に高値で、Step 1、Step 2 と有意差はないものの高値の傾向があった。治療ステップ別では、治療 Step 1、2、3、4 における平均呼気 NO 値は、各々 36.0、35.0、37.8、44.3 ppb であった。治療 Step 4 群において呼気 NO 値が高い傾向であったが、有意差は認めなかった。治療 Step 4 を経口 PSL 5 mg/日未満の治療 Step 4a 群、経口 PSL 5mg/日以上 10 mg/日未満の治療 Step 4b 群、経口 PSL 10 mg/日以上 の治療 Step 4c 群の 3 群に分けて検討したところ、治療 Step 4a 群で呼気 NO 値が高値の傾向であったが、統計学的有意差はなかった。また、高値を示した患者比率も各治療 Step 群で差は認められなかった。呼気 NO 値は治療下での喘息コントロール状態を反映し、十分な抗炎症療法が重症化予防に重要と考えられた。

炎症の病態は多様であり、個々の症例毎の病態に応じた抗炎症療法を考える必要が想定される。近年、喘息のフェノタイプ分類が注目され、好酸球性炎症が主体か否か、好酸球性炎症が残存しているのか否か、といった観点から、治療を考えることは意義がある。そこで、治療下の成人喘息 81 症例 (男性 32 例、女性 49 例) を対象に、呼気濃縮液中 ECP 値 (好酸球指標) と IL-8 値 (好中球指標) を測定した。年齢の中央値は 61 歳、最重症持続型は 8 例と全体の約 10% を占めた。呼吸機能に関しては、重症例では %FEV₁ が低値であった。呼気濃縮液中 ECP 値と重症度、症状ステップ、治療ステップ、%FEV₁ との間に相関はみられず、最重症持続型 8 例の中に ECP 高値例も低値例も存在した。最重症持続型 8 例のうち、6 例が非アトピー型であったが、アトピー型、非アトピー型別にも一定の傾向はなかった。さらに、呼気濃縮液中の ECP 値と血清 ECP 値との間にも相関は認められなかった。また、呼気濃縮液中 IL-8 値と重症度、症状ステップ、治療ステップ、%FEV₁ との間にも相関はみられず、無症状あるいは軽症例や治療ステップ 4 の症例のいずれにおいても IL-8 高値例が存在した。呼気濃縮液中 IL-8 値と血清 IL-8 値の間には正の相関傾向がみられたが、有意ではなかった。これらの結果は、症例毎に炎症の質的多様性、治療不足、治療薬の反応性低下などの因子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。

呼気濃縮液中 ECP 値と呼気濃縮液中 IL-8 値とは強い負の相関 ($r = -0.741$, $p < 0.001$) が認められた。この相関はアトピー型、非アトピー型にかかわらず認められた。そこで、ECP と IL-8 を各々 0.4 ng/ml、10 pg/ml を境界として低値、高値の 2 群に分けると、ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群に大別可能であった。なお、ECP、IL-8 とともに高値の群は 5 例であり、最重症持続型はこれらの 3 群いずれにも存在した。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、治療の影響を反映しているものと考えられた。米国の Severe Asthma Research Program (SARP) をはじめとして、複雑な重症喘息の病態をいくつかのタイプに分類（クラスター解析）し、それぞれに最適な治療や指導を行っていく必要があるという考え方が近年注目されている。我々の行った呼気濃縮液中の ECP 値と IL-8 値に関する検討からは、重症喘息は、好酸球性炎症が残存しているタイプと、好酸球性炎症は抑えられているタイプ（この中には好中球性炎症が主体のものも含まれる）に大別されることが分かってきた。従って、呼気濃縮液中の好酸球と好中球の活性度を調べることは、ステロイド薬を増量すべきか、むしろ減量して他の抗炎症療法等を追加すべきかの判断を可能とし、重症喘息の治療・管理に役立つかもしれない。成人喘息患者における呼気濃縮液中 ECP 値と IL-8 値は治療により修飾を受けるが、治療の反応性あるいは病態の違いにより、ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群の2つのフェノタイプに分けられる可能性が考えられる。今後、特に最重症持続型の症例を増やして、呼気濃縮液中の ECP と IL-8 を含めた臨床的特徴を明らかにし、テーラーメイドの治療介入をめざすことが必要である。

● 好塩基球の抗原提示細胞機能の研究

無刺激の末梢血好塩基球には HLA-DR の発現はみられず、IL-3 (10 pg/ml、10 ng/ml) の 30 分刺激でも誘導されなかった。IL-3 の 24 時間刺激で、HLA-DR の発現が濃度依存的に認められ、0.1~10 ng/ml の濃度で有意に誘導された。IL-3 (10 ng/ml) の 72 時間刺激でさらなる発現増強はみられなかった。IL-3 (10 ng/ml) の 24 時間刺激により CD80 はわずかに発現したが、CD86 の発現はみられなかった。末梢血幹細胞培養好塩基球（純度 > 98%）には 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。

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、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。我々はこれまでに、好塩基球が IL-16 や M-CSF を産生し、これらの分子を介して CD4 陽性 T 細胞や単球・マクロファージの関与する免疫・アレルギー反応を調節し、Th2 免疫応答の増強やリモデリング・血管新生に関与している可能性を報告してきた。IL-3 による 24 時間の刺激で、濃度依存的に好塩基球に HLA-DR、CD80 の発現が誘導され、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ことから、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、検討する必要がある。

8) 重症喘息の予知、早期診断をめざした重症喘息の遺伝子多型研究（烏帽子田ら）

Step 4 の重症群 15 例、Step 1-2 の軽症群 30 例、健常群 50 例の患者対照研究（相関解析）によって、重症群の NQ01 の遺伝子多型 Pro187Ser および

Ser187Ser を合わせた頻度 66.7%が対照群の 34.0%と比べ有意に高い値を示した。また、喫煙者に限って分析したとき、重症群の GSTM1 の遺伝子多型である null 型の頻度 81.8%は対照群の 43.3%に比べ有意に高いことが認められた。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) の頻度を比較した結果、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。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。喫煙者あるいは過去の喫煙者においてのみ、Nrf2 のプロモーター領域における Tag 遺伝子の多型 rs6726395 (G/A) が喘息症の重症化との関係が認められた。mEH の遺伝子多型と喘息の間には有意な相関は認められなかった。

大気汚染は、気管支喘息増加の重要な環境因子である。宿主側の因子として酸化ストレス応答遺伝子の多型が指摘されている。本相関解析によって、NQ01 の遺伝子多型 Pro187Ser および Ser187Ser と喘息重症化との関連が認められた。このことは、治療抵抗性と関係があるものと推測される。喫煙者あるいは過去の喫煙者においてのみ、GSTM1 の遺伝子多型 null 型が喘息重症化との関連が示された。GSTM1 遺伝子と喫煙との相互作用によって引きこされるものと考えられる。ニコチン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ものと推測される。

アルギニン経路が気道閉塞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示唆されている。喘息モデルの肺組織において、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するとの報告もされている。アルギナーゼは Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 により発現が誘導され、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) と喘息重症化との関連が認められ、アルギナーゼ 2 の遺伝子多型と治療抵抗性との関係が示唆される。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 と喘息重症化との関連が認められたことは、喫煙とアルギナーゼ 1 遺伝子との相互作用によって引きこされることが示唆される。ニコチン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。

喘息の重症化は喫煙と Nrf2 遺伝子との相互作用によって引きこされることも示唆された。ニコチン代謝における抗酸化ストレス応答活性の低下が喘息の重症化に寄与していると推測された。mEH の遺伝子多型と喘息の間には有意な相関は認められなかった。この