

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

特願 2011-151111(平成 23 年 7 月 7 日出願)

一塩基多型に基づく免疫疾患の検査方法

※出願準備中

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

※出願予定

藤枝重治

アスピリン喘息における分子標的治療

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

※研究協力者

福 富 友 馬 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 研究員
関 谷 潔 史 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
谷 本 英 則 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
三 井 千 尋 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
三 田 晴 久 国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部 研究員
梶 原 景 一 国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部 研究員
東 憲 孝 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 特別研究員
小野恵美子 ハーバード大学 研究員
秋 山 一 男 国立病院機構相模原病院臨床研究センター センター長
粒 来 崇 博 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
山 口 裕 礼 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院呼吸器内科 医師
伊 藤 伊 津 子 国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部 研究員
石 井 聡 秋田大学大学院医学系研究科 教授
広 田 朝 光 理化学研究所ゲノム医科学研究センター呼吸器疾患研究チーム 研究員
鈴 木 弟 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員
田 中 幸 枝 福井大学医学部分子生命化学 助教
月 舘 利 治 獨協医科大学耳鼻咽喉・頭頸部外科 講師
相 良 博 典 獨協医科大学越谷病院呼吸器アレルギー内科 教授
吉 村 剛 獨協医科大学越谷病院耳鼻咽喉科 講師
山 口 由 衣 横浜市立大学医学部皮膚科 助教
松 倉 節 子 横浜市立大学附属市民総合医療センター 講師
小 森 絢 子 横浜市立大学医学部皮膚科 診療医
檜 垣 貴 哉 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学 医員
牧 原 靖 一 郎 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学 医員
今 泉 和 良 藤田保健衛生大学医学部 呼吸器内科学 I 主任教授
岡 澤 光 芝 藤田保健衛生大学医学部 呼吸器内科学 I 教授
林 正 道 藤田保健衛生大学医学部 呼吸器内科学 I 講師
岡 村 拓 哉 藤田保健衛生大学医学部 呼吸器内科学 I 助教
峯 澤 智 之 藤田保健衛生大学医学部 呼吸器内科学 I 助手

記載順不同

II. 分担研究報告書

NSAIDs 過敏喘息の難治性、難治化因子に関する研究

研究代表者	谷口正実	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 病態総合研究部	部長
研究協力者	福富友馬	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	研究員
	関谷潔史	国立病院機構相模原病院アレルギー科	医師
	谷本英則	国立病院機構相模原病院アレルギー科	医師
	三井千尋	国立病院機構相模原病院アレルギー科	医師
	三田晴久	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部	研究員
	梶原景一	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部	研究員
	東憲孝	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター	特別研究員
	小野恵美子	ハーバード大学	研究員
	秋山一男	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	センター長
	粒来崇博	国立病院機構相模原病院アレルギー科	医師

研究要旨：

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息(以下 AIA)は 臨床的に半数以上が重症難治性喘息であることが報告されている。この傾向に人種差はなく、欧州米国本邦いずれも同様の傾向であるが、成人喘息全体からみた AIA の位置づけは明らかでなく、どの程度重症化に関与しているかも不明であった。今回は①AIA が成人喘息の難治化因子や臨床的なりモデリング指標とされる気管支拡張薬吸入後の肺機能低下にどの程度関わっているかを、多数例の成人喘息の背景因子から統計学的手法を用いて証明した。また②AIA における重症化因子を多変量解析で証明した。その結果、1. 成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが日本人でも確認された 2. その重症化に関与する因子として好酸球性炎症と U-LTE4 が有意因子と判明した。これらの成績は国際的にも初めてであり、非常に価値が有ると考える。また AIA が重症である機序の本質にせまる今後の研究の一助となる

A. 研究目的

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息(以下 AIA)は 臨床的に半数以上が重症難治性喘息であることが報告されている。この傾向に人種差はなく、欧州米国本邦いずれも同様の傾向であるが、成人喘息全体からみた AIA の位置づけは明らかでなく、どの程度重症化に関与しているかも不明である。今回は①AIA が成人喘息の難治化因子や臨床的なりモデリング指標とされる気管支拡張薬吸入後の肺機能低下にどの程度関わっているかを、多数例の成人喘息の背景因子から統計学的手法を用い

て検討する。また②AIA における重症化因子を多変量解析で証明する。

B. 研究方法

1. 対象：

国立病院機構相模原病院にて通院中の 2112 例の成人喘息間患者のうち JGL による重症度分類が判明している 2012 例を対象とした。

2. 方法：

①難治化因子：step4 の治療をしても週に 1 回以上の喘息症状が持続する症例を難治性

喘息と定義。難治性喘息とそれ以外の喘息症例の背景因子を比較する。

②AIA72 例を用いてその背景と判事か因子を検討した。多重ロジスティック回帰分析で検討し、多因子の関与を検討した。

(倫理面への配慮)

- ・ 倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報の保護に努める。
- ・ 患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

1. 成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが日本人でも確認された (図上) (CEA 2012)。

2. その重症化に関与する因子として好酸球性炎症と U-LTE4 が有意因子と判明した (図中、下)

性別・年齢階級別の喘息難治化因子 (adjusted odds ratio (95% CIs))

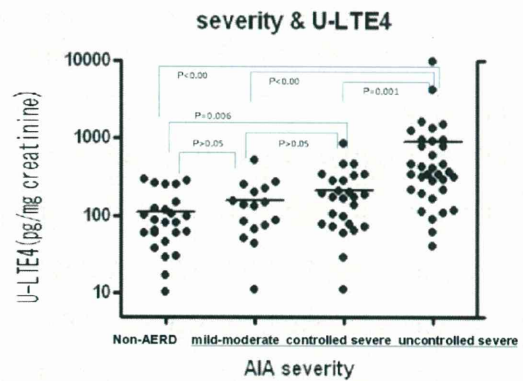
	男性			女性		
	若壮年期 15-44歳 N=140	中年期 45-64歳 N=136	高年期 65歳- N=140	若壮年期 15-44歳 N=216	中年期 45-64歳 N=234	高年期 65歳- N=196
罹病年数 (10年ごと)	3.08 (1.33-7.13)	1.65 (1.20-2.27)	1.41 (1.12-1.76)	1.81 (1.17-2.81)	1.72 (1.29-2.30)	1.42 (1.12-1.80)
AIA	-	3.48 (0.79-15.40)	6.03 (1.02-35.67)	-	6.14 (1.55-24.44)	3.54 (0.88-14.24)
BMI						
-18.5	4.36 (0.48-39.91)	1.48 (0.13-16.40)	0.46 (0.06-2.76)	0.50 (0.06-4.26)	0.88 (0.10-8.06)	3.75 (1.18-11.91)
18.5-25	1	1	1	1	1	1
25-30	0.18 (0.01-2.41)	1.91 (0.71-5.14)	0.57 (0.21-1.55)	0.37 (0.04-3.17)	0.36 (0.07-1.88)	3.64 (1.50-8.84)
30-	1.19 (0.09-15.27)	0.40 (0.04-4.18)	0.01 (0.00-10 ^{4.1})	2.40 (0.40-14.36)	3.56 (0.75-16.89)	4.43 (0.86-22.80)
Smoking						
Nonsmoker	1	1	1	1	1	1
Past smoker	2.61 (0.42-16.26)	3.05 (0.86-10.83)	1.48 (0.63-3.51)	3.50 (1.01-12.11)	0.82 (0.21-3.24)	0.92 (0.27-3.08)
Current smoker	0.23 (0.02-2.22)	4.20 (1.01-17.51)	1.90 (0.57-6.33)	2.22 (0.62-7.99)	1.98 (0.55-7.21)	1.18 (0.27-5.22)

赤字・・・P<0.05 太字・・・P<0.10

Multivariate logistic regression

Associations of body mass index and aspirin intolerance with risk of difficult-to-treat asthma stratified by gender and atopic phenotype

Gender	Phenotype	Risk factor	OR*	95% CI
Women (n=669)	Atopic (n=378)	Body mass index (kg/m ²)		
		<18.5	1.06	0.55-2.02
		18.5-24.9	1	
		25.0-29.9	1.04	0.64-1.71
		≥30	2.52	1.07-5.97
	Aspirin intolerance			
	Absent	1		
	Suspicious	0.72	0.23-2.28	
	Present	1.81	0.71-4.59	
	Non-Atopic (n=171)	Body mass index (kg/m ²)	<18.5	2.35
18.5-24.9			1	0.37-2.26
25.0-29.9			0.82	1.00-21.36
≥30			4.50†	
Aspirin intolerance				
Absent		1		
Suspicious		8.88	0.67-113.73	
Present		26.22*	3.21-213.96	



Eos. count and U-LTE 4 were strong predictors of uncontrolled severe asthma in AERD, independently. (by multiple regression analysis)

	OR (95% CI)
Log [Eos (/μl)]	8.4 (1.1-65.0)
Log [U-LTE 4 (pg/mg creatinine)]	7.3 (1.5-37.2)

D. 考察

成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが初めて日本人でも確認された (CEA 2012 印刷中)。さらに AIA では好酸球性炎症と CysLTs 過剰産生がその難治化に関与することが証明された。いずれもはじ

めでの成績であり、非常に価値が高いと考える。 3. その他
今後は、この機序を明らかにする必要がある。 なし
また Cys-LTs 過剰産生の制御が本症の安定化
に必須と考えられた。

E. 結論

成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹
病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難
治化因子であることが初めて日本人でも確認
された（国際誌投稿中）。さらに AIA では好酸
球性炎症と CysLTs 過剰産生がその難治化に
関与することが証明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総括研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総括研究報告書」

G. 研究発表 2. 学会発表 参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

難治性喘息、アスピリン喘息の臨床背景の検討

研究分担者	磯谷澄都	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	講師
研究協力者	今泉和良	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	主任教授
	岡澤光芝	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	教授
	林正道	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	講師
	岡村拓哉	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	助教
	峯澤智之	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	助手

研究要旨：

難治性喘息の一つにアスピリン喘息（AIA）がある。AIA 患者の臨床的な特徴としては、女性に多く、鼻茸・副鼻腔炎の鼻合併症を伴い、非アスピリン喘息(ATA)患者と比し重症例が多いと言われている。ただ、両者の臨床背景を中心に重症度別にみた報告は少ない。今回、両者を重症度別に、年齢、性別、投薬内容、肺機能、気道過敏性試験などを比較し、どのような相違があるか検討した。

ATA,AIA 全体で比較すると以前の報告同様 AIA 患者で鼻合併症が多く、全身ステロイド使用率が高く、肺機能(FEV1%)も有意に悪く、重症であった。重症喘息群（severe 群）にしぼり検討すると、AIA 患者では肺機能はさらに悪く、ロイコトリエン受容体拮抗剤の使用頻度が高くなる傾向を認めた。これらの事から AIA は重症化する前に、早期の治療（吸入ステロイド、ロイコトリエン受容体拮抗剤）が是非必要と思われた。

A. 研究目的

難治性喘息の一つにアスピリン喘息があり、その臨床的な特徴として、20 歳代から 50 歳代の多い女性に多く、重症例が多いと言われ、ときに意識障害をきたすほどの大発作を起こすことも報告されている。合併症としては鼻茸や副鼻腔炎の合併が多いといわれている。しかし、臨床背景を中心に重症度別にみた報告は少ない。今回、両者を重症度別に、年齢、性別、投薬内容、肺機能、気道過敏性試験などを比較し、どのような相違があるか検討した。

B. 研究方法

1) 診療録を基にして性別、年齢、喫煙状況、気管支喘息歴、投薬状況、重症度、肺機能など

について後方研究を行った。

2) 対象：外来通院中の症状の安定した非アスピリン喘息患者571名（男性282名、女性289名、平均年齢48.5±15.7歳）、アスピリン喘息患者108名（男性50名、女性58名、平均年齢45.1±16.0歳）を対象とした。

検査全施行例にインフォームドコンセントを得た上で、詳細な問診、肺機能、血液検査などを施行した。また、NSAIDs(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) 過敏性の有無を診断するため、トルメチンおよびスルピリン吸入負荷試験あるいはアスピリン内服試験をおこなった。これらの負荷試験にて陽性で、なおかつNSAIDsによる喘息発作の既往のある患者をアスピリン喘息（AIA:Aspirin intolerant Asthma）とした。これらの全てが陰性の場合

あるいはNSAIDs過敏の既往のない症例を非アスピリン喘息(ATA: Aspirin tolerant Asthma)とした。

またAIA,ATAとも重症度はintermittent, mild, moderate, severe群とに分類した。

(倫理面への配慮)

被験者には研究の目的や方法、意義に関して上記のとおり説明し、同意を得た上で研究対象とした。NSAIDs 過敏症の確定のためにスルピリンおよびトルメチン吸入負荷試験、アスピリン内服試験をガイドラインに準じた方法で実施した。また、当科ではスルピリンおよびトルメチン吸入負荷試験に関しては気管支喘息患者に対してはほぼルーチンに実施している検査であり、通常臨床で施行している方法である。

C. 研究結果

1) ATA患者とAIA患者の比較では、鼻炎の有病率はそれぞれ24.8%、34.0%で有意差は認めなかったが、副鼻腔炎では17.3%、38.3%($p < 0.0001$)で鼻茸では14.3%、41.0%($p < 0.0001$)でAIA患者で有意に高かった。投薬内容については吸入ステロイド剤、ロイコトリエン受容体拮抗剤などでは有意差は認めなかったが、全身ステロイド剤使用歴では11.4%、52.2% ($p < 0.0001$)で著明にAIA患者で使用頻度が高かった。肺機能では一秒率(FEV1%)が 72.7 ± 11.2 、 65.7 ± 14.6 ($p < 0.001$)でAIA患者で有意に低かった。メサコリンによる気道過敏性試験ではlogMch PC20($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$)において、それぞれ 2.8 ± 0.6 、 2.4 ± 0.6 ($p = 0.0007$)で、AIA患者において気道過敏性が亢進していた。(Fig.1,2)

2) 重症喘息群(severe群)でATA患者とAIA患者で比較検討した。副鼻腔炎17.3%、43.6%($p < 0.001$)とAIA患者で頻度が高かった。投薬内容については吸入ステロイド剤では両群間で差はなく、全身ステロイド剤使用歴は33.5%、61.4%($p = 0.0002$)でAIA患者で著明に高い結果であった。ロイコトリエン受容体拮抗剤使用歴は29.5%、42.1%($p = 0.07$)で明らかな有意差はないものの、AIA患者で高い傾向であった。肺機能では一秒率(FEV1%)が 70.2 ± 13.6 、 61.7 ± 15.5 ($p = 0.0003$)とAIA患者で低下を示し、メサコリン気道過敏性試験(logMch PC20)は、 2.8 ± 0.6 、 2.4 ± 0.6 ($p = 0.0003$)とAIA患者において気道過敏性が亢進していた。(Fig.3,4)

D. 考察

AIAは20歳代から50歳代の多い女性に多く、ATAと比し重症例が多いと言われている。当院の検討では平均年齢では45歳前後で、ATAと比し年齢・性別とも差を認めなかった。副鼻腔炎・鼻茸の合併率はやはりAIA患者で高い結果となったが、AIAにおいては約90%に鼻茸を高率に合併するという報告もあるが、当院の検討では重症喘息群(severe群)のAIAにおいても約45%と半分であった。肺機能ではAIA,ATAの両群間において、全体においても重症喘息群(severe群)だけにおいてもAIA患者では重症を示した。重症喘息群(severe群)ではAIA群においてロイコトリエン受容体拮抗剤の使用率が高い傾向であった。これは、ロイコトリエンがアスピリン喘息の難治性あるいはアスピリン過敏の原因に絡んでいる可能性が示唆された。

E. 結論

非アスピリン喘息の難治例、あるいは難治性喘息といわれているアスピリン喘息の臨床背景を検討していくことにより、難治性喘息、アスピリン過敏の病態が解明される可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 磯谷澄都：アスピリン喘息と難治性喘息の関わり . 第49回東海喘息研究会, 2011. 名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

<図表一覧>

Fig.1 ATAとAIAの臨床背景の比較 1

	ATA(全体)	AIA(全体)	p value
N	572	108	
Age at baseline (mean ± SD)	48.5±15.7	45.1±16.0	N.S.
Gender (M/F)	282/289	50/58	N.S.
Height, cm (mean ± SD)	160.3±8.5	159.4±8.3	N.S.
Smoking status 有/無	197/333	43/61	N.S.
Presence of allergic rhinitis, % (n)	24.8%(73)	34.0%(34)	N.S.
Presence of chronic rhinosinusitis % (n)	17.3%(49)	38.3%(38)	p<0.0001
Presence of nasal polyps %(n)	14.3% (41)	41.0% (41)	p<0.0001

Fig.2 ATAとAIAの臨床背景の比較 2

	ATA(全体)	AIA(全体)	p value
Current use of oral steroids %(n)	11.4%(61)	52.2%(35)	p<0.0001
Use of inhaled steroids (S.D.)	340±207.6	369.4±204.6	N.S.
Use of LT drugs % (n)	22.9%(123)	26.9%(29)	N.S.
FEV1 (L/s, S.D.)	2.3±0.8	2.1±0.7	N.S.
FVC (L/s, S.D.)	3.2±0.9	3.1±0.8	N.S.
FEV1%	72.7±11.2	65.7±14.6	p<0.0001
logPC20 S.D.)	2.9±0.7	2.6±0.6	p=0.0007
IgE, IU/mL (S.D.)	860.5±2336.1	436.5 ±837.1	N.S.

Fig.3 重症喘息におけるATAとAIAの臨床背景の比較 1

	ATA(severe)	AIA(severe)	p value
N	190	58	
Age at baseline (mean ± SD)	45.4±16.6	44.9±17.2	N.S.
Gender (M/F)	97/91	30/28	N.S.
Height, cm (mean ± SD)	160.4±8.6	159.3±8.8	N.S.
Smoking status 有/無	73/101	23/32	N.S.
Presence of allergic rhinitis, % (n)	22.9%(22)	30.9%(17)	N.S.
Presence of chronic rhinosinusitis % (n)	17.3%(16)	43.6%(24)	p=0.005
Presence of nasal polyps % (n)	13.8% (13)	36.3% (20)	P=0.002

Fig.4 重症喘息におけるATAとAIAの臨床背景の比較 2

	ATA(severe)	AIA(severe)	p value
Current use of oral steroids %(n)	33.5%(61)	61.4%(35)	p=0.0002
Use of inhaled steroids (S.D.)	460.8±255.9	466.9±219.4	N.S.
Use of LT drugs % (n)	29.5%(54)	42.1%(24)	# p=0.07
FEV1 (L/s, SD)	2.2±0.8	2.0±0.8	# p=0.06
FVC (L/s, SD)	3.2±0.9	3.1±0.8	N.S.
FEV1%	70.2±13.6	61.7±15.5	p=0.0003
logMch PC20 (μg/ml ±SD)	2.8±0.6	2.4±0.6	p=0.0003
IgE (IU/mL±SD)	962.5±2950.1	562.7 ±1087.5	N.S.

<引用文献>

- 1) 谷口正実、榊原博樹:アスピリン (NSAIDs) 不耐症の診断と問題点. アレルギー・免疫 2007; Vol.14, No.1, 14-22

- 2) 榊原博樹、末次勸:非アレルギー—気管支喘息の病型分類とアスピリン喘息—. 日本胸部疾患学会雑誌. 1995; 33:106-115

- 3) Mascia K, et al.: Aspirin sensitivity and severity of asthma: evidence for irreversible airway obstruction in patients with severe or difficult-to-treat asthma. J Allergy Clin Immunol. 2005; 116(5):970-5.

- 4) Celik GE, et al.: Lipoxin A4 levels in asthma: relation with disease severity and aspirin sensitivity. Clin Exp Allergy. 2007; 37(10):1494-501

PGE₂による Th1 分化誘導促進作用の分子機序の解明

研究分担者 成 宮 周 京都大学大学院医学研究科神経細胞薬理学 教授

研究要旨：

過去の検討からアスピリン喘息の病態は、PGE₂産生低下に伴う Th2 反応の亢進すなわち Th1 反応の抑制によると推測される。そのため、我々は PGE₂による Th1 分化誘導促進作用の分子機構につき検討を行った。まず、我々はマウス脾臓より調整した CD4⁺ T 細胞に対し選択的刺激薬を使用した検討により PGE₂の Th1 分化誘導促進作用は EP2 および EP 4 受容体を介したものであると確認した。さらに我々は、PGE₂の Th1 分化誘導促進作用が IL-12Rβ2 遺伝子の誘導によるものである事を確認するとともに、その細胞内情報伝達経路として cAMP/PKA と PI3K/Akt 経路の関与を確認した。また、IL-12Rβ2 遺伝子誘導を司る転写因子として cAMP/PKA 経路で活性化される CREB を同定した。これらの結果から PGE₂の Th1 分化誘導促進作用が少なくとも一部は EP2/4-cAMP/PKA-CREB経路を介したIL-12Rβ2遺伝子の転写誘導により行われていることを見出した。今後さらに、PGE₂による Th1 分化誘導促進作用の分子機構の詳細を明らかとすることによりアスピリン喘息の病態解明と治療薬開発に寄与したい。

A. 研究目的

NSAIDs 過敏気道疾患いわゆるアスピリン喘息は、成人発症重症喘息の代表であるとともに喘息死の主要な原因となる。そのため、アスピリン喘息の病態解明とそれを通じた治療法の開発は社会的に重要である。研究代表者らの一連の検討からアスピリン喘息の病態にアスピリンの標的である cyclooxygenase により産生される炎症性脂質メディエーターの prostaglandinE₂(PGE₂)の産生低下が深く関与することが示されてきた。一方、喘息はヘルパーT細胞 (CD4⁺T細胞)のうち Th2サブセットにより分泌されるサイトカイン (IL-4 など)により誘発される Th2 反応に依存した病態であることが広く知られている。これらの事実および Th1/Th2 細胞は相互に抑制しあうとの知見から、PGE₂による Th2 分化誘導抑制作用す

なわち Th1 分化誘導促進作用がアスピリン喘息の病態形成に関与している可能性が示唆される。

本研究の目的は、PGE₂による Th1 分化誘導促進作用の詳細を解明し、アスピリン喘息の薬物治療戦略を明確にすることである。

B. 研究方法

1) T細胞の調製

C57BL/6 マウスないしは各種遺伝子欠損マウスの脾臓を深麻酔下で摘出し、脾臓内の免疫細胞を調製した。その後、抗 CD4 抗体磁気ビーズを用いた細胞分離法にて CD4⁺ T 細胞を濃縮した。Naïve CD4⁺ T 細胞の活性化は抗 CD3/CD28 抗体刺激により行った。

2) IFN- γ 産生 Th1 の同定

IFN- γ 産生 Th1 の同定は、抗 IFN- γ 抗体を使用した FACS により行った。

3) 遺伝子発現解析

抗 CD3/CD28 抗体刺激による活性化 T 細胞に対し PGE₂ 刺激を行った後、total RNA を抽出し逆転写反応を行い cDNA を調整した。その cDNA をテンプレートとして使用し、IL-12R β 2 遺伝子ないしは T-bet 遺伝子の発現につき real time PCR 法により検討を行った (Roche LightCycler システム)。内因性コントロールとしては GAPDH 遺伝子の発現を使用した。

4) CREB RNAi と western blot 解析

CREB の RNAi は Invitrogen 社の siRNA をエレクトロポレーション法にて T 細胞へ導入することにより行った。CREB の western blot 解析は T 細胞の細胞抽出液を使用し一次抗体として抗 CREB 抗体、抗リン酸化 CREB 抗体、抗 GAPDH 抗体 (内因性コントロール) を用い化学発光法による検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においてヒトを対象とした検討は含まれていない。実験動物を使用した検討については、動物実験の実験計画は動物愛護法‘実験動物の飼養・保管・苦痛軽減に関する基準’に準拠し作製され、京都大学実験動物委員会にて審査を受け認証されている。また、遺伝子改変動物の使用については、カルタヘナ法に基づき計画され京都大学組換え DNA 実験安全管理委員会において審査を受け承認を受けている。

C. 研究結果

1) PGE₂ の Th1 分化誘導促進作用に対する各種 PGE 受容体の関与の検討。

脾臓由来の naïve CD4⁺ T 細胞を PGE 受容体 4 種類 (EP1 から EP4) の各選択的刺激薬により刺激し IFN- γ 産生 Th1 細胞の誘導を FACS により検討した。結果、選択的 EP2 刺激薬および EP4 刺激薬により用量依存的に naïve CD4⁺ T 細胞から Th1 細胞が分化誘導されることを見出した。これらの誘導は、各々の受容体欠損マウスからの naïve CD4⁺ T 細胞を用いた実験で抑制することができ、PGE₂ による Th1 分化誘導促進作用は EP2 および EP4 受容体を介したものであると確認した。

2) PGE₂ による Th1 分化誘導促進作用の標的分子としての IL-12R β 2 遺伝子の同定。

PGE₂ による Th1 分化誘導促進作用の機構を解析するために、PGE₂ 刺激により Th1 分化誘導に関与する転写因子 T-bet とサイトカイン IL-12 受容体の発現がどのように変化するか検討した。本検討は、抗 CD3/CD28 抗体刺激により活性化された CD4⁺ T 細胞を IL-12 添加により Th1 細胞へ分化誘導する条件下で行った。結果、PGE₂ 刺激は IL-12 刺激による IL-12 受容体の特異的サブユニットである IL-12R β 2 遺伝子の発現誘導を IL-12 刺激と協調的に増幅することを real time PCR 法により確認した。一方 IL-12 刺激による T-bet 遺伝子の発現誘導は PGE₂ 刺激により影響を受けなかった。この結果から、PGE₂ による Th1 分化誘導促進作用は IL-12 刺激による IL-12 受容体の誘導を増幅した結果として生じていることが示唆された。

3) PGE₂による IL-12Rβ₂ 誘導増幅効果に寄与する細胞内情報伝達経路の同定。

次に、PGE₂による IL-12Rβ₂ の発現誘導増幅効果の分子機構の解明を試みた。EP2 および EP4 は、下流の情報伝達経路として cAMP を介して protein kinase A (PKA) を活性化するとともに phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) を介して Akt を活性化することが知られている。そのため、PKA, PI3K, Akt それぞれの選択的阻害薬を使用して cAMP/PKA 経路と PI3K/Akt 経路の関与を検討した。活性化 CD4⁺ T 細胞において PGE₂ 依存的 IL-12Rβ₂ 発現誘導は、H-89 (PKA inhibitor), LY294002, Wortmannin (以上 PI3K inhibitor), Akt inhibitor の各種阻害薬により有意に抑制された。また、cAMP アナログである dibutyl-cAMP, Forskolin により PGE₂ による IL-12Rβ₂ 発現誘導作用が模倣できた。これらの結果から、PGE₂ による IL-12Rβ₂ の発現誘導は cAMP/PKA および PI3K/Akt の両者を介して行われることが示唆された。

4) PGE₂ 依存的 IL-12Rβ₂ 遺伝子発現誘導に対する転写因子 CREB の関与の同定。

引き続き PGE₂ による IL-12Rβ₂ の発現誘導を司る転写因子の同定を試みた。この PGE₂ による IL-12Rβ₂ の発現誘導経路に cAMP が関与することを見出しているため、我々は、cAMP 依存的転写因子である CREB に注目した。活性化 CD4⁺ T 細胞において、dibutyl-cAMP は CREB のリン酸化を亢進し、PKA 阻害薬 H-89 投与によりその効果は打ち消された。この結果から確かに活性化 CD4⁺ T 細胞では、cAMP/PKA 依存的に CREB が活性化していることが明らかとなった。さらに、

我々は PGE₂ 依存的な IL-12Rβ₂ の発現誘導に対する CREB の関与を明確にするために、CREB の RNAi を使用した検討を行った。結果、CREB を siRNA で抑制することにより PGE₂ 依存的 IL-12Rβ₂ の発現誘導は有意に抑制された。この結果から、PGE₂ は cAMP/PKA を介した CREB のリン酸化による活性化により IL-12Rβ₂ の発現を転写レベルで誘導していることが明らかとなった。

D. 考察

本検討より我々は PGE₂ による Th1 分化誘導促進作用が少なくとも一部は EP2/4-cAMP/PKA-CREB 経路を介した IL-12Rβ₂ 遺伝子の転写誘導により担われていることを見出した。一方 PGE₂ はしばしば他のサイトカインと協調的に機能し、サイトカインの働きを増幅する事で種々の生命現象に関与することが知られている。そのため、我々は今回同定した経路が例えば IL-12 や IFN-γ といった他のサイトカインと協調的に働きその情報伝達経路を増幅する事により、Th1 分化誘導作用をより強力に発揮する可能性を考えている。今後、今回同定された経路につき他のサイトカインとの協調作用に注目しさらなる解析を進めていきたい。

アスピリン喘息においては、研究代表者らの以前の検討により全身の PGE₂ 低下が確認されていることから、アスピリン喘息の病態に PGE₂ 低下による Th1 分化誘導促進作用の減弱とそれに伴う Th2 反応の亢進が関与していることが示唆される。このことから我々は、本検討から見出された PGE₂ による Th1 分化誘導促進作用を増強し、結果として Th2 反応を

抑制することがアスピリン喘息の新規の治療戦略となり得ると考えている。我々は、本年度の研究結果をもとにさらに PGE₂ による Th1 分化誘導促進作用の分子機序の解明を進め、アスピリン喘息の病態解明と薬物治療の標的分子の同定を目指したい。さらに、本検討から見出された知見をもとにアスピリン喘息の病態を模倣する新たな動物モデルの作出を目指したい。

E. 結論

本年度の検討から我々は、PGE₂ の Th1 分化誘導促進作用が EP2/4-cAMP/PKA-CREB 経路を介した IL-12Rβ2 遺伝子の転写誘導により行われていることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Chengcan Yao, Daiji Sakata, Kitipong Soontrapa, Xiaojun Ma, Takako Hirata, Shuh Narumiya: Prostaglandin E₂-cAMP signaling promotes Th1 cell differentiation through upregulation of the IL-12 receptor β 2 chain. 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan, 2011

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

発生工学を用いたアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明

研究分担者 長 瀬 隆 英 東京大学大学院医学系研究科呼吸器内科学 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

研究要旨：

NSAIDs 過敏症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。アスピリン喘息の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。また、アスピリン喘息については、国内外において動物モデルが報告されていない。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が、気管支喘息の発症分子機序の解明についても実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、喘息モデルを用いてアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指した。今後、遺伝子改変マウスを活用することにより、さらに各々の遺伝子・蛋白系の病態生理学的意義・重要性が解明され、NSAIDs 過敏症・アスピリン喘息治療への貢献が期待される。

A. 研究目的

NSAIDs 過敏症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息は極めて多数の因子から病像が形成されており、その発症機序については未だ解明されていないことも多い。さて、気管支喘息の病態的・生理学的特徴として、慢性的な気道炎症・気道過敏性・可逆的な気流制限が挙げられる。気道過敏性の機序はこれまで不明の部分が多かったが、喘息特有の気道炎症に起因していることが明らかになってきた。気道炎症の機序は、炎症細胞と気道構成細胞が放出する炎症メディエーター・サイトカインなどの生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられている。しかしながら、気管支喘息、特にアスピリン喘息の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。また、アスピリン喘息については、世界的にも動物モデルが報告されていない。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。気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、アスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指す。

B. 研究方法

本研究では、本研究者が独自に開発した遺伝子改変マウスを使用する。LTC₄/D₄/E₄ など cysteinyl LT は、気管支喘息における主要な炎

症メディエーターであり、アスピリン喘息発症に大きく関与することが想定される。cysteinyllt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を標的としたノックアウトマウスの新規作成に着手する。このような遺伝子改変マウスを用いて、脂質性メディエーターと気管支喘息(特にアスピリン喘息)との関連について評価・検討を加える。

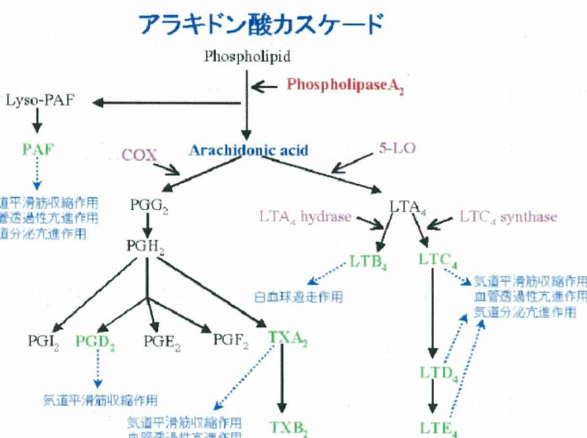


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

(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

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。

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

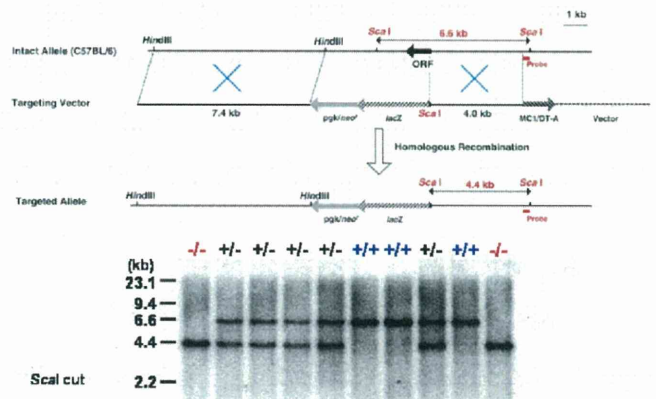


図2 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。CysLT2-R ノックアウトマウスでは胎生致死が認められず、ホモ接合体の生存個体が得られた。また、外表所見上の著明な異常は認められず、発育・成長・生殖も正常と考えられた。また、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析により、LTB₄受容体とcysteinyllt受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

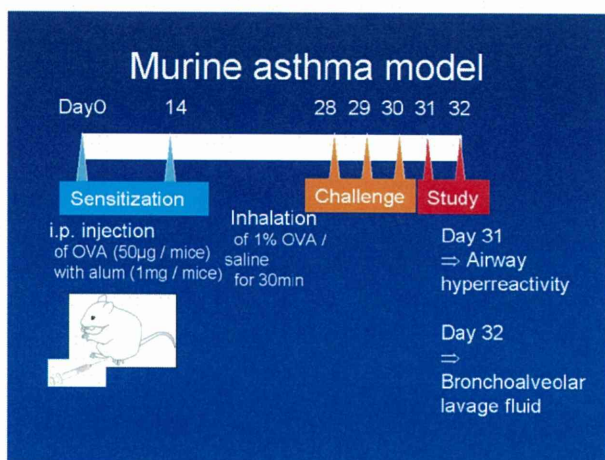


図3 アレルギー性気管支喘息モデルの作成

D. 考察

気管支喘息は、気道炎症を病態の特徴としており、その発症には多数の生理活性物質の関与が想定される。特に CysLT₂ 受容体は、肺・気管支に多量に存在することが示唆されているが、その機能はほとんど解明がなされていない。今回 CysLT₂-R ノックアウトマウスのホモ接合体が得られたことにより、気管支喘息（特にアスピリン喘息）における気道過敏性・末梢気道炎症への関与を検証することが可能となった。気管支喘息・アスピリン喘息に関わる候補物質・遺伝子を評価する手段として、分子生物学・発生病学を駆使したトランスレーショナル・リサーチによる研究アプローチが有用と思われる。今後、さらに各々の遺伝子・蛋白系の生理的意義・重要性が解明されることにより、気管支喘息・アスピリン喘息に対する有効な治療法・管理法の開発および実用化が期待される。

E. 結論

発生病学的手法により CysLT₂-R ノックアウトマウスが作成され、CysLT₂ とアスピリン

喘息との関連について評価・検討を行うことが可能となった。また、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析により、LTB₄ 受容体と cysteinyl LT 受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kage H, Sugimoto K, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Ohishi N, Takai D.

Suppression of transforming growth factor β 1 in lung alveolar epithelium-decells using adeno-associated virus type 2/5 vectors to carry short hairpin RNA.

Exp Lung Res 2011; 37: 175-185.

2) Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T.

Simultaneous stimulation with TGF- β 1 and TNF- α induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells.

Int Arch Allergy Immunol 2011; 155: 119-128.

3) Yanagida K, Ishii S.

Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research. (Invited Review)

J Biochem 2011; 150, 223-232..

2. 学会発表

1) Molecular mechanisms underlying respiratory diseases.

The 16th APSR Meeting, Shanghai. (発表者：長瀬隆英、招待講演), 2011.

2) 高齢者の呼吸器疾患: 第53回日本老年医学会総会 (発表者：長瀬隆英、教育講演), 2011..

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

(出願準備中 1件)

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

アスピリン喘息の遺伝的背景（遺伝子多型の検索）

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 呼吸器疾患研究チーム
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 呼吸器疾患研究チーム
研究員

研究要旨：

本研究はアスピリン喘息関連遺伝子群を同定し、病態の科学的な解明を通してより良い予防法、治療法を確立することを目的とする。今回、我々はヒト気管支上皮細胞を空中環境真菌であるアルテルナリアで刺激し、マイクロアレイ法により発現を検討したところ IL-8, CXCL3, EDN1 が強く誘導されることを見いだした。さらに、その遺伝子多型とアスピリン喘息発症との関連を検討したところ、EDN1 上の SNP において関連を認め、アスピリン喘息発症に遺伝要因として関与する可能性が示された。

A. 研究目的

アスピリン喘息はその多くに好酸球性副鼻腔炎を伴う。好酸球性副鼻腔炎は易再発、難治性であり、鼻粘膜および血中好酸球増多を特徴とし、ステロイドの内服にのみ反応する。アルテルナリアは空中環境真菌の代表であり、空調設備に生息し住宅でのクーラーの普及に伴い、気道疾患において避けがたい重要な抗原となってきた。最近、アルテルナリアは気道上皮細胞に作用し TSLP を誘導することが報告された。一方、網羅的遺伝子発現解析を用いた病態メカニズムの解明が急速に進んでいる。我々はアルテルナリアの気道上皮細胞に対する作用を解明するため、マイクロアレイの手法を用いて発現解析を行なった。さらに誘導される遺伝子群の多型について、症例対照関連解析を行い、それらの多型が遺伝要因としてアスピリン喘息に関与するかを検討した。

B. 研究方法

今回、我々はヒト正常気管支上皮細胞を空中環境真菌であるアルテルナリア (50 μ g/ml) で 4 時間および 10 時間刺激し、mRNA を抽出、3' IVT Express kit を用い cDNA を合成した。マイクロアレイ (Human U133 Plus2.0 Chip) により発現の変動を検討した。

症例対照関連解析に用いたアスピリン喘息症例は少なくとも 2 回以上の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) による喘息発作の既往のある症例とした。153 例のアスピリン喘息群 (AIA, aspirin induced asthma) に対し、NSAID による喘息発作の既往のない 940 例の気管支喘息患者 (ATA, aspirin tolerant asthma) および気管支喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の既往のない 901 人 (control) をコントロールとして関連解析を行なった。

(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

気道上皮細胞において、アルテルナリア刺激により IL-8, CXCL3, EDN1 の発現が 1.9-2.5 倍増加することが明らかとなった。IL-8 および CXCL3 はグルココルチコイド治療抵抗性(難治性)気管支喘息における気管支肺胞洗浄液(BAL)中の細胞におけるマイクロアレイ解析で 3 倍以上の発現増加が報告されている(JACI,120:130,2007)。また EDN1 は Laser Microdissection(LMD)法により、ステロイド抵抗性喘息患者の気道上皮細胞において mRNA および蛋白の発現増加が報告されている(JACI,120:130,2007)。これらの遺伝子領域に存在する SNPs にて関連解析を行なったところ、EDN1 遺伝子上の SNP rs994565 で関連を認めた(P=0.020, OR=1.49, 95%CI 1.06-2.09, AIA vs. ATA; P=0.034, OR=1.30, 95%CI 1.02-1.67, AIA vs. control)。

D. 考察

近年、好中球が気管支喘息の重症化に関与しているというエビデンスが増えつつある。アルテルナリアによる IL-8 の誘導は好中球炎症の 1 つの要因となる可能性が考えられた。これまで、難治性喘息の気道上皮細胞において EDN1、IL-8 が増加し、EDN1 の発現と平滑筋および線維過形成の程度は比例しているという報告

がある。これらの原因については不明だが、避けたい空中環境真菌であるアルテルナリアへの長期暴露はそのひとつの要因となる可能性が示唆された。さらに遺伝要因の検討において、未だ 1 集団ではあるが、EDN1 の遺伝子多型と AIA 発症との関連が示唆された。

E. 結論

気管支上皮細胞において空中真菌であるアルテルナリアにより誘導される遺伝子群(IL-8, CXCL3, EDN1)を同定した。EDN1 の遺伝子多型 rs994565 がアスピリン喘息発症に関連する可能性が示唆された。この関連については今後、異なる人種(韓国)において、結果の検証を予定している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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