

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

慢性好酸球性肺炎の予後指標として尿中ロイコトリエン E4 は有用である

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 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
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室 研究員
谷 本 英 則 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
関 谷 潔 史 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師

研究要旨：

すでに我々は、原因不明の慢性好酸球性肺炎（以下 CEP）において、国内外で初めて CysLTs 過剰産生が起きていることを見出した。CysLTs は局所の強い炎症を惹起するが、その体内での産生量を表す尿中 LTE4 が再燃や病勢を予測する因子となりうるかは不明であるため明らかにする。

【研究方法】

CEP35 例を、診断から前向きに 2 年以上にわたって通常ステロイド治療で前向きに経過観察し、初診時の U-LTE4 が高値群と軽度高値群とにわけ、再燃の有無を検討した。また併せて、末梢血好酸球性%や IgE 値が予後因子となるか否かも検討した。

【研究結果および考察】

U-LTE4 著明高値（500pg/mg・cre 以上）は 25 例、軽度高値群（100～499pg/mg・cre）は 10 例、U-LTE4 正常例（80pg/mg・cre 以下）はなかった。著明高値群における再燃例は 22 例（88%）、軽度高値群からは 3 例（30%）であった（ $P<0.01$ ）。両者における初診時の画像所見や好酸球性%（BALF、末梢血）に差は無く、重症度や臨床背景にも差が無かった。

一方、初診時の無治療時の好酸球最高%や IgE 値と再燃とは関連を認めなかった。

【考察、結論】

CEP 初発時の U-LTE4 が著明高値例では、ステロイド維持療法中に再燃を 88%に認めたが、軽度高値例では 30%であった。しかし末梢血好酸球%や IgE 値と再燃とは関連を認めなかった。

この事実は、U-LTE4 が再燃予後指標になりうる可能性を示している。また CysLTs が CEP の病態活性化に深く関わっている可能性も示している。

A. 研究目的

(ERJ 2008)。

・すでに我々は、原因不明の慢性好酸球性肺炎（以下 CEP）において、国内外で初めて CysLTs 過剰産生が起きていることを見出した

・しかし、尿中 LTE4 が再燃を予測する因子となりうるかは不明であるため、本研究で明らかにする。

B. 研究方法

肺生検と典型的画像所見で確定診断した原因不明の CEP35 例を、診断から前向きに 2 年以上 2-8 年（平均 4.2 年）にわたって通常治療で前向きに経過観察し、初診時の U-LTE4 が高値群（500pg/mg・cre 以上）と軽度高値群（100~499pg/mg・cre）とにわけ、再燃の有無を検討した。再燃の定義は、画像の悪化+末梢血好酸球%が 20%以上とした。全例ステロイド治療は 40mg から開始し、4 ヶ月で 5mg まで減量し、その後 5mg/日で 2-3 年維持した。

また併せて、末梢血好酸球性%や IgE 値が予後因子となるか否かも検討した。

（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

U-LTE4 著明高値（500pg/mg・cre 以上）は 25 例、軽度高値群（100~499pg/mg・cre）は 10 例、U-LTE4 正常例（80pg/mg・cre 以下）はなかった。著明高値群における再燃例は 22 例（88%）、軽度高値群からは 3 例（30%）であった（ $P<0.01$ ）。両者における初診時の画像所見や好酸球性%（BALF、末梢血）に差は無く、重症度や臨床背景にも差が無かった。

一方、初診時の無治療時の好酸球最高%や IgE 値と再燃とは関連を認めなかった。

D. 考察

CEP 初発時の U-LTE4 が著明高値例では、ステロイド維持療法中に再燃を 88%に認めたが、軽度高値例では 30%であった。この事実は、U-LTE4 が再燃予後指標になりうる可能性を示している。また CysLTs が CEP の病態に深く関わっている可能性も示している。

E. 結論

U-LTE4 が著明高値の CEP は再燃しやすく、予後の指標となりうる。また CEP の病態活性化に CysLTs が関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

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

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

好酸球活性化メディエーターを唾液で検出する試み

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 小野恵美子 ハーバード大学 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
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室 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室 研究員

研究要旨：

すでに好酸球性走化性や活性化を強く有するメディエーターとして Cys-LTs と LTB4 が知られている。しかし、その測定は血中では失活が早く、尿中では不純物の混入で、不正確な値となり困難さがあった。今回の研究では、極めて非浸襲的検体採取法として、唾液を用いて、その測定が可能か、また好酸球性気道炎症を反映しているかを検討した。その結果、今回初めて唾液中の好酸球活性化メディエーターである Cys-LTs と LTB4 が十分に検出可能で、かつ気道好酸球性活性化を反映していることが証明された。今後は、この手法を用いて、慢性好酸球性肺炎のバイオマーカーとしてなりうるか、などを検討する。また唾液検体は極めて非浸襲的で、かつ尿検体などと異なり不純物が少なく、簡便で正確なメディエーター測定に非常に有利な検体と考えられた。

A. 研究目的

ヒトにおける好酸球性炎症の指標は、末梢血好酸球数や血清 ECP、尿中 EDN などがある。しかし、いずれも病勢を十分反映しておらず、また処理により ECP や EDN は不確実な測定値となりがちである。すでに好酸球性走化性や活性化を強く有するメディエーターとして Cys-LTs と LTB4 が知られている。しかし、その測定は血中では失活が早く、尿中では不純物の混入で、不正確な値となり困難さがあった。今回の研究では、極めて非浸襲的検体採取法として、唾液を用いて、その測定が可能か、また好酸球性気道炎症を反映しているかを検討した。

B. 研究方法

前研究として、HPLC 精製検体と未処理検体

でのまず検討した。唾液で十分な感度を持って測定可能と判明したため、好酸球性気道炎症例として、重度の好酸球性炎症であるアスピリン喘息（AIA）と中等度以下の好酸球性気道炎症である非 AIA、健常人の唾液を用いた。採取の方法は、約 4 ml の唾液を吸着しうるスポンジを口内に 5 分間含ませ、回収した。測定の詳細は、*Allergology International* 誌（Ono E, Taniguchi M, et al. *Allergol Int.* 2011, 24:60(1), 2010）を参照。

（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

図1: 唾液中LTC4、LTD4、LTE4濃度の比較

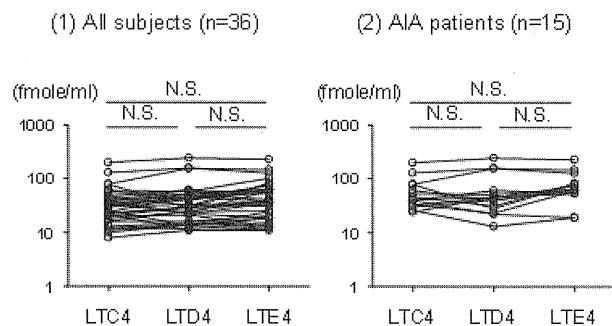


図1に示すようにCys-LTsのうちLTC4、D4、E4いずれも同程度唾液中に検出可能であった。

図2: AIA患者、ATA患者、健常人における唾液中CysLT濃度およびLTB4濃度の比較

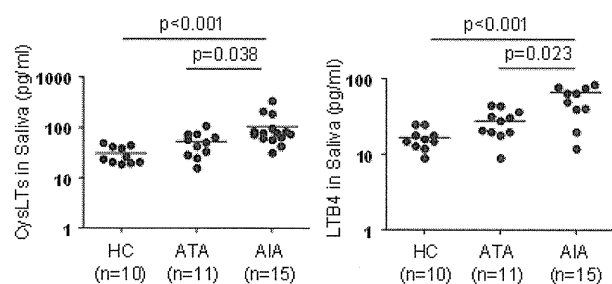


図2に示すように、高度好酸球性炎症病態(=AIA)では、中等度以下好酸球性炎症(ATA)に比し、有意に唾液中のCys-LTsだけでなく、唾液中のLTB4濃度も増加している。

D. 考察

今回初めて唾液中の好酸球活性化メディエーターであるCys-LTsとLTB4が十分に検出可能で、かつ気道好酸球性活性化を反映していることが証明された。今後は、この手法を用いて、慢性好酸球性肺炎のバイオマーカーとしてなりうるか、などを検討する。また唾液検体は極めて非侵襲的で、かつ尿検体などと異なり不純

物が少なく、簡便で正確なメディエーター測定に非常に有利な検体と考えられた。

E. 結論

今回初めて唾液中の好酸球活性化メディエーターであるCys-LTsとLTB4が十分に検出可能で、かつ気道好酸球性活性化を反映していることが証明された。今後の臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

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

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

慢性好酸球性肺炎における病態解析、システィニルロイコトリエンの関与

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	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
	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室	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室	研究員
	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室	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

研究要旨：

目的：すでに我々は、慢性好酸球性肺炎（CEP）の急性期にシスティニルロイコトリエン（CysLTs）産生亢進が生じていることを明らかにした（ERJ 2008, AI 2009 2012）。CEPにおいて、著明なCysLTs産生亢進が、CEP病態にどのような影響を与えているか全く不明である。そこで今回は、CysLTs産生亢進とCEP病態との関連を検討した。

方法：CEP17例の発症時のU-LTE4濃度を、各種肺機能（拡散能含む）、画像、および各種炎症細胞指標であるEDN（eosinophil derived neurotoxin）やPGD2代謝産物（2,3-dinor-9 α 11 β -PGF₂など）などとの関連を検討した。さらにモンテルカスト（CysLT1受容体拮抗薬）を投与し、その病態背景に影響があるかを検討し、CysLTs過剰産生による病態形成が、CysLT1受容体を介して生じているか、それ以外かを明らかにした。

結果と考察：慢性好酸球性肺炎の急性期には、非常に強いCysLTsの産生亢進が生じており、その主たる産生細胞は活性化好酸球であることが示唆された。またそのCysLTs過剰産生は、肺拡散能低下に強く関与していることが判明した。さらにこの拡散能低下にCysLT1受容体拮抗薬の効果が無かったことから、CEPの肺胞浮腫には、CysLTsがCysLT2受容体を介して病態形成している可能性が十分考えうる。

今後のCEPの治療薬として、CysLTs産生抑制薬（例えば5LO阻害薬）、もしくはCysLT2受容体拮抗薬の有効性が十分期待される（ただしいずれも開発段階）。

結論：ヒト慢性好酸球性肺炎の急性期や発症期には、非常に強いCysLTsの産生亢進が生じており、その主たる産生細胞は（気道に於ける）活性化好酸球であることが示唆された。またそのCysLTs過剰産生は、CysLT2受容体機能を介して、肺拡散能低下に強く関与していることが判明した。

A. 研究目的

すでに我々は、慢性好酸球性肺炎（CEP）の急性期にシステイニルロイコトリエン（CysLTs）産生亢進が生じていることを明らかにした（ERJ 2008, AI 2009-2012）。その産生度を尿中 LTE4（U-LTE4）濃度で表現し検討すると、喘息発作レベルよりも高値であり、アナフィラキシーと同等のレベルであることを明らかにした（AI 2009,2012）。

CysLTs は最も代表的な喘息最終メディエーターであることは確立しているが、CEP において、著明な CysLTs 産生亢進が、CEP 病態にどのような影響を与えているか全く不明である。そこで今回は、CysLTs 産生亢進と CEP の各種病態との関連を検討した。

B. 研究方法

CEP23 例の発症時の U-LTE4 濃度を、各種肺機能（拡散能含む）、画像、および各種炎症細胞指標である EDN（eosinophil derived neurotoxin）や PGD2 代謝産物（2,3-dinor-9 α 11 β -PGF₂ など）などとの関連を検討した。さらにモンテルカスト（CysLT 1 受容体拮抗薬）を投与し、その病態背景に影響があるかを検討し、CysLTs 過剰産生による病態形成が、CysLT 1 受容体を介して生じているか、それ以外かを明らかにした。

（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、文書同意を得た。

C. 研究結果

図 1 に、CEP17 例（喘息合併あるなし）の U-LTE4 と健常人、アナフィラキシー急性期の U-LTE4 と図示した。CEP では著明に U-LTE4 濃度が増加しており、その程度は、喘息急性期はもちろん、急性期のアナフィラキシー時よりも増加していた。

肺機能各種指標＋拡散能、および各種炎症細胞指標である EDN や PGD2 代謝産物などとの関連を検討した結果、U-LTE4 と尿中 EDN は、極めて強い相関を認めた（図 2）。しかしながら、他のマスト細胞活性化指標（2,3-dinor-9 α 11 β -PGF₂ など）や拡散能以外の肺機能、血液ガス所見などと U-LTE4 は相関しなかった。一方、拡散能障害と U-LTE4 は強い相関を認めた（図 3）。

図 3 に示すように、拡散能低下と CysLTs 過剰産生の関連が疑われたことから、これらの CEP 症例にモンテルカストを 1 週間投与し、その拡散能への影響を検討したが、効果は無かった（データ省略）。

図 1: 健常人、喘息(安定期と発作時)、アナフィラキシー、好酸球性肺炎における U-LTE4

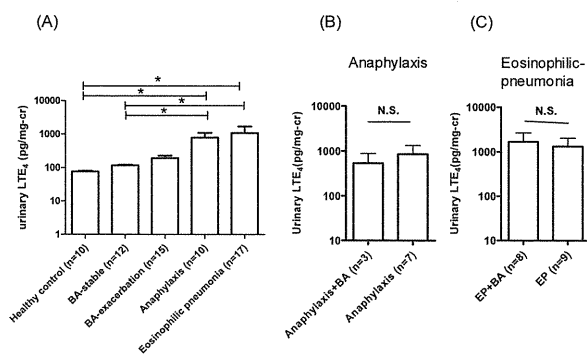


図2: Correlation between urinary LTE4 and EDN concentrations in CEP patients

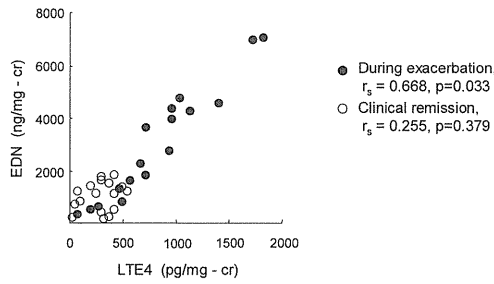
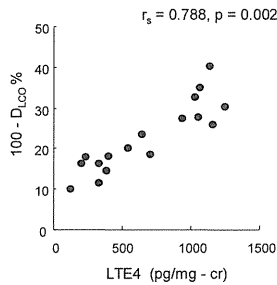


図3: Association between urinary LTE4 concentration and diffusion capacity (D_{LCO}) of CEP patients



D. 考察

慢性好酸球性肺炎の急性期や発症期には、非常に強い CysLTs の産生亢進が生じており、その主たる産生細胞は（気道に於ける）活性化好酸球であることが示唆された。またその CysLTs 過剰産生は、肺拡散能低下に強く関連していることが判明した。

肺におけるガス交換能（拡散能）は、肺胞壁における浮腫で傷害されることは周知の事実であり、この浮腫形成に、局所で産生された CysLTs が影響している可能性が十分考えうる。

また追加検討を行い、この拡散能低下にモンテルカスト（CysLT 1 受容体拮抗薬）の効果が無かったことから、肺胞レベルでの浮腫形成には、CysLT 1 受容体以外の系路（CysLTs 2 受

容体、もしくは新規の LTE4 受容体）の可能性が考えられた。すでに CysLT 2 受容体は、末梢血管にも豊富に存在し、血管透過性を調整していることが知られており、CEP の肺胞浮腫には、CysLTs が CysLT 2 受容体を介して病態形成している可能性が十分考えうる。

今後の CEP の治療薬として、CysLTs 産生抑制薬（例えば 5LO 阻害薬）、もしくは CysLT 2 受容体拮抗薬の有効性が期待される（ただしいずれも開発段階の薬剤である）。

E. 結論

慢性好酸球性肺炎の急性期や発症期には、非常に強い CysLTs の産生亢進が生じており、その主たる産生細胞は（気道に於ける）活性化好酸球であることが示唆された。またその CysLTs 過剰産生は、CysLT 2 受容体機能を介して、肺拡散能低下に強く関連していることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

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

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

好酸球性肺炎の肺局所における新規好酸球性活性化メディエーター、eoxin C4 濃度

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 小野恵美子 ハーバード大学 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
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
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室 研究員

研究要旨：

すでに我々は、脂質メディエーターであるシステニルロイコトリエン（CysLTs）が強く原因不明の CEP の肺炎症に関わっていることを報告した（ERJ 2008）。

・新規メディエーターである eoxin C4 に関しては、強い好酸球性活性活性か報告されているが、ヒトにおける肺炎症、特に好酸球性炎症における関与はほとんど明らかにされていない。

【研究方法】

原因不明の好酸球性肺炎を含めた各種呼吸器疾患における BALF 中の CysLTs、eoxin C4、15-HETE 濃度を測定し、その病態との関連を明らかにする。測定は CysLTs と eoxin C4 は HPLC で精製の後、EIA で、eoxin E4 と 15-HETE は、GC-mass で行った。対象は CEP6 例、CSS10 例、sarcoidosis5 例、肺癌健常部 5 例、肺線維症 5 例、喘息 3 例である。

【研究結果および考察】

eoxin C4 は、他の CysLTs と分離して HPLC により同定できた。また eoxin C4 濃度は、CysLTs 濃度や 15-HETE 濃度よりも数 10 分の 1 程度の濃度であり、有意に低濃度であった。15-HETE は好酸球性炎症との関連が示唆されたが、CysLTs、eoxin C4 との関連は認めなかった。

【考察】

今回はじめて、ヒト検体において eoxin C4 を同定できることを証明した。今回の結果では、CysLTs 濃度と 15-HETE は相関し、15-HETE と BALF 中好酸球%は強く相関したが、eoxin C4 は、BALF 中非常に低濃度で病態との関連も認めなかった。今後、さらなる症例集積が必要である。

【結論】

ヒト BALF 中に新規好酸球活性化メディエーターである eoxin C4 が同定できた。しかし、その濃度はきわめて低く、その意義解明にはさらなる検討を要する。

A. 研究目的

原因不明の CEP の肺炎症に関わっていること

・すでに我々は、脂質メディエーターであるシステニルロイコトリエン（CysLTs）が強く

を報告した（ERJ 2008）。

・最近報告された新規メディエーターである eoxin C4 に関しては、強い好酸球性活性活性が報告されているが、ヒトにおける肺炎症、特に好酸球性炎症における関与はほとんど明らかにされていない。

B. 研究方法

原因不明の好酸球性肺炎を含めた各種呼吸器疾患における BALF 中の CysLTs、eoxin C4、15-HETE 濃度を測定し、その病態との関連を明らかにする。測定は CysLTs と eoxin C4 は HPLC で精製の後、EIA で、eoxin E4 と 15-HETE は、GC-mass で行った。対象は CEP6 例、CSS10 例、sarcoidosis5 例、肺癌健常部 5 例、肺線維症 5 例、喘息 3 例である。

(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た。
・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得た。

C. 研究結果

・eoxin C4 は、他の CysLTs と分離して HPLC により同定できた。
・対象患者各種疾患における BALF 中の eoxin C4、CysLTs、15-HETE 濃度は 6 群での有意差はなかった。また eoxin C4 濃度は、CysLTs 濃度や 15-HETE 濃度よりも数 10 分の 1 程度の濃度であり、有意に低濃度であった。
・BALF 中の eoxin C4、CysLTs、15-HETE 濃度と好酸球性%の相関をみたものである。15-HETE は好酸球性炎症との関連が示唆され

たが、CysLTs、eoxin C4 との関連は認めなかった。

D. 考察

今回の結果では、CysLTs 濃度と 15-HETE は相関く、15-HETE と BALF 中好酸球%は強く相関したが、eoxin C4 は、BALF 中非常に低濃度で病態との関連も認めなかった。今後、さらなる症例集積が必要である。

E. 結論

ヒト BALF 中に新規好酸球活性化メディエーターである eoxin C4 が同定できることをはじめに証明した。しかし、その濃度はきわめて低く、その意義解明にはさらなる検討を要する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

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

3. その他

なし

好酸球増多に関連する遺伝子多型の検討

研究分担者 玉利真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター 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：

本研究は遺伝子多型を用いた関連解析により慢性好酸球性肺炎の科学的病態解明を目的とする。VEGFR1, TSLP, IL-33, IL-25, PPAR γ に注目し、検討を行なった。末梢血好酸球数とこれらの遺伝子多型との関連を調べるため、末梢血好酸球数の情報のある成人気管支喘息症例 503 例において関連解析を行なった。末梢血好酸球数 10%以上の群と未満の群とで関連解析を行なったところ、VEGFR1 (rs3794399, P=0.000092), PPAR γ (rs1175540, P=0.0055; rs3856806, P=0.0046)で有意な関連を認めた。Spearman's rank correlation coefficientによる好酸球数との相関ではVEGFR1, rs3794399 において rs0.14, P=0.031 と有意な関連を認めた。また PPAR γ , rs3856806 の genotype は lymphoblastoid cell line における PPAR γ 発現量において、 $r=-0.276$, $p=0.016$ とリスクアレルで有意な相関（発現増加）を認めた。今後は慢性好酸球性肺炎においてこれらの多型の関与について検討していく。

A. 研究目的

慢性好酸球性肺炎は気道や血管壁への好酸球浸潤をきたし、一部は既存の治療法に反応が乏しく重症化することからその病態解明が待たれている。

VEGF はライノウイルスおよび LPS 刺激により気道において産生される血管増殖因子であり、これまで Churg-Strauss 症候群の血清において上昇していることが報告されている。また、気道上皮細胞から分泌される TSLP, IL-33, IL-25 は好酸球性炎症に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。PPAR γ は主に脂肪細胞、免疫細胞に発現し、抗炎症作用を有する。特に好酸球において、アポトーシスを誘導すること、eotaxin による好酸球遊走や接着能増強の抑制効果が示されている。また、近年、

喘息合併鼻ポリープ組織の免疫組織染色による検討により、病変部に浸潤した T 細胞および好酸球に PPAR γ が強く発現している事が報告されている。本研究では、これらの遺伝子多型のタイピングを行ない、成人気管支喘息 503 例を用いて、末梢血好酸球数との関連について検討を行なった。

B. 研究方法

成人気管支喘息症例 503 例を対象とし、遺伝子型タイピングは、日本人集団の HapMap database より Tag SNP($r^2>0.9$)を抽出した。VEGFR1(rs3794399), TSLP (rs3806933, rs2289276, rs2289278), IL-33 (rs1929992), IL-25 (rs10143597, rs4553531),

PPAR γ (rs1175540, rs3856806, rs2292101) について Invader 法または TaqMan 法を用いてタイピングを実施した。好酸球数との関連解析は末梢血好酸球数 10%以上の群と未満の群との比較 (allelic model) で行なった。相関関係については Spearman's rank correlation coefficient を用いて検討を行なった。PPAR γ 発現量と genotype との相関については Genevar(<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/genevar/>) のデータベースを用いて検討した

(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

末梢血好酸球数 10%以上の群と未満の群とで関連解析を行なったところ、TSLP, IL-33, IL-25 の多型では関連が認められなかったが、VEGFR1、および PPAR γ の多型と有意な関連を認めた : rs3794399 (VEGFR1, P=0.000092, OR2.22, 95%CI 1.48-3.35), rs1175540 (PPAR γ , P=0.0055, OR1.58, 95%CI 1.14-2.19), rs3856806 (PPAR γ , P=0.0046, OR1.74, 95%CI 1.18-2.55)。Genotype と好酸球数との相関について Spearman's test を用いて検討し、rs3794399 の遺伝子多型と末梢血好酸球数との間に有意な相関関係を認めた($r=0.14$, $P=0.031$)。また、Genevar にて genotype と PPAR γ 遺伝子発現との関連を検討したところ、rs3856806 と

lymphoblastoid cell line における PPAR γ 発現量との相関において、 $r=-0.276$, $p=0.016$ と好酸球増多のリスクアレルで有意な発現増加傾向を認めた。

D. 考察

VEGF シグナル伝達系の好酸球増多における重要な役割が示唆された。慢性好酸球性肺炎を合併する Churg-Strauss 症候群において血清 VEGF が高いことも報告されている。また、VEGF はライノウイルスにより上皮細胞から誘導され、上皮細胞の増殖を促進し、鼻ポリープの形成に関与することが示されている。VEGF シグナル伝達の異常が病態と関連する事が科学的に示されれば、現在がん治療に用いられている抗 VEGF 抗体等も難治性好酸球性肺炎に対する新規治療法の一つとして考慮できる可能性がある。

PPAR γ は炎症局所に集積した好酸球において発現が報告され、IL5 により誘導される好酸球活性化マーカー CD69 の発現や脱顆粒の抑制に働く事が報告されている。今回、末梢血好酸球数増多との関連がみられた多型は gain of function として働く事が示唆された。今後、好酸球性炎症における PPAR γ の役割について詳細な検討を行なう必要がある。

現在、好酸球性疾患である、好酸球性副鼻腔炎のポリープや粘膜において、好酸球炎症に関わる遺伝子を特定するため、それらの組織を収集し、網羅的遺伝子発現解析を行なっている。

E. 結論

成人気管支喘息症例を用いて、多型と末梢血好

酸球数 10%以上の群と未満の群とで関連を検討し、VEGFR1、PPAR γ の遺伝子多型と好酸球数増多との有意な関連を認めた。VEGFR1(rs3794399) genotype と好酸球数との正の相関も認められた。また、PPAR γ (rs3856806) の末梢血好酸球数増多のリスクアレルは lymphoblastoid cell line における PPAR γ の発現量に対し gain of function として働く事が示唆された。TSLP, IL-33, IL-25 遺伝子多型については末梢血好酸球数と有意な関連は認められなかった。今後、慢性好酸球性肺炎症例のゲノムを収集し、遺伝子多型および rare variant についても検討していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichia R, Tsunoda T, Osawa Y, Kojima A, Okamoto M, Suzuki D, Kubo S, Imoto Y, Nakamura Y, Tamari M, Fujieda S. Prevalence of Allergic Rhinitis and Sensitization to Common Aeroallergens in a Japanese Population Int Arch Allergy Immunol. 2010;151(3):255-261

2) Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in

IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Dec 1;180(11):1048-55.

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

4) Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(2):498-500.

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

6) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG,

Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:787-93.

7) Tamari M, Tomita K, Hirota T. Genome-Wide Association Studies of Asthma. *Allergol Int*. 2011; 60(3):247-52.

8) Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. Lower FEV(1) in non-COPD, nonasthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV(1), total IgE levels, and TSLP genotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2011;6:181-9.

9) Okada Y, Hirota T, Kamatani Y, Takahashi A, Ohmiya H, Kumasaka N, Higasa K, Yamaguchi-Kabata Y, Hosono N, Nalls MA, Chen MH, van Rooij FJ, Smith AV, Tanaka T, Couper DJ, Zakai NA, Ferrucci L, Longo DL, Hernandez DG, Witteman JCM, Harris TB, O'Donnell CJ, Santhi K, Ganesh SK, Koichi Matsuda K, Tsunoda T, Tanaka T, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M, Yamamoto K, Kamatani N. Identification of nine novel loci associated with white blood cell subtypes in a Japanese population. *PLoS Genet* 2011;7(6):e1002067.

10) Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, Murphy A, Litonjua AA, Himes BE, Lange C, Lazarus R, Sylvia J, Klanderman B, Duan

QL, Qiu W, Hirota T, Martinez FD, Mauger D, Sorkness C, Szeffler S, Lazarus SC, Lemanske RF, Peters SP, Lima JJ, Nakamura Y, Tamari M, Weiss ST. Genome-wide association of GLCCI1 with asthma steroid treatment response. *N Engl J Med* 2011;365:1173-1183

11) Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai TK, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Soo-Jong Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Iwai N, Tomoike H, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet* 2011;7(7):e1002170.

12) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Doi S, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Miyagawa T, Adachi M, Tanaka H, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Taniguchi M, Lima JJ, C. G. Irvin, S. P. Peters, B. E. Himes, Litonjua AA, Tantisira KG, Weiss ST, Kamatani N, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nature Genetics*

2011;43(9):893-6.

13) Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. An interaction between Nrf2 polymorphisms and smoking status affects annual decline in FEV1: a longitudinal retrospective cohort study. *BMC Med Genet.* 2011;12(1):97.

14) Kinose D, Ogawa E, Hirota T, Ito I, Kudo M, Haruna A, Marumo S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Sakai H, Date H, Tamari M, Mishima M. NOD2 Gene Polymorphism was associated with prevalence and severity in Japanese COPD patients. *Respirology* 2012;17:164-71.

15) Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Ezaki H, Takeuchi S, Furue M, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M. Variants of C-C motif Chemokine 22 (CCL22) are Associated with Susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies. *PLoS One* 2011;6:e26987.

16) Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, His E, Hank Juo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M.

ORAI1 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One* 2012;7:e29387.

日本語総説

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

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

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

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

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

22) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集:遺伝子解析からアレルギー疾患の治療戦略を考える、アレルギー疾患と大規模遺伝子解析 小児科 52 : 817-822, 2011

23) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 総説:他領域からのトピックス、アレルギー疾患

の発症や重症化への遺伝子多型の関与 日本耳鼻咽喉科学会会報 114 : 477-484, 2011

24) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集:気管支喘息包囲網ー喘息死ゼロへ向けた最後の10年へ、トピックス:自然免疫と気管支喘息 内科 108 : 485-488, 2011

2. 学会発表

1) 玉利真由美、広田朝光:特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析. 愛媛県 ENT 臨床セミナー 2010年1月松山全日空ホテル

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

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

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

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

6) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり:ラン

チョンセミナー 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析. 第 20 回 日本耳科学会総会 学術講演会 2010年10月 松山 ひめぎんホール

7) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり:シンポジウム 11 食物アレルギーをめぐる新たな進展

・「食物アレルギーの遺伝子多型解析」. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

8) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり:アレルギー最新研究情報. アレルギー週間講演会 2011年2月 青山こどもの城

9) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり:アレルギー疾患、好酸球関連疾患の遺伝子解析研究の現況. 第 16 回免疫アレルギーアカデミー 2011年2月 愛知医科大学

10) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり:気管支喘息重症化のメカニズム 最新の知見から. 第 9 回大阪 Zensoku 懇話会 2011年3月 リーガロイヤルホテル大阪

11) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり:テーマ館フリータイムプログラム 鼻アレルギーの新たな知見 アレルギー疾患と遺伝子. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011年5月 千葉幕張メッセ

12) Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota. : Effects of genetic polymorphisms in allergic diseases. Open Speech in University 2011

年 9 月 Kaohsiung Medical University,
Taiwan

3. その他
なし

13) Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota :
Genetic analysis of bronchial asthma.
India-Japan Symposium on Global
Challenges in Health
and Environment 2011 年 10 月 Indian
Embassy Auditorium

14) 玉利真由美、広田朝光 : 教育講演 9 アレ
ルギー疾患関連遺伝子・ゲノムワイド関連解析
を中心に. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学
術大会 2011 年 11 月 グランドプリンスホ
テル新高輪国際館パミール

15) 玉利真由美、広田朝光 : シンポジウム 3-1
アレルギー関連遺伝子と感染. 第 48 回日本小
児アレルギー学会第 16 回アジア太平洋小児ア
レルギー呼吸器免疫学会合同学術大会 2011
年 10 月 福岡国際会議場

16) 玉利真由美 広田朝光 富田かおり 田
中翔太 : 基調講演 I 重症喘息のメカニズム
TSLP を中心に. 第 1 回重症喘息研究フォーラ
ム SARF 2011 年 10 月 経団連会館

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

気道および全身における好酸球活性化のメカニズムの研究

研究分担者	森 晶 夫	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	先端技術開発研究部長
研究協力者	安 部 暁 美	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	リサーチレジデント
	神 山 智	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	研究員
	榎 木 美 香	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	研究員
	飯 島 葉	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	研究員
	北 村 紀 子	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	研究員
	山 口 美 也 子	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	研究員
	大 友 隆 之	東京薬科大学総合医療薬学講座	助教
	神 沼 修	東京都臨床医学総合研究所	主任研究員

研究要旨：

好酸球性炎症には、活性化T細胞により産生されるIL-5の役割が重要であることが明らかになった。今年度は、まず成人喘息症例（アトピー型50例・非アトピー型50例）を対象とし、*in vivo*における好酸球活性化の指標としての血清ECP値との関連につき検討した。24時間培養上清中のIL-5値と血清ECP値の間に正の相関が認められた（ $p=0.03$ ）。肺の好酸球浸潤には、局所におけるT細胞の数、活性化指標（CD25など）や、IL-5 mRNA、蛋白の発現が関連するのみならず、末梢血中のT細胞の活性化指標が相関することが報告されているが、われわれの知見は、T細胞のIL-5産生能が*in vivo*における好酸球活性化に関連することを示している。次いで、臨床的にステロイド抵抗性の好酸球性肺炎症例について、免疫薬理学的解析を行い、T細胞レベルでのステロイド抵抗性の存在を裏付けた。初年度の研究成果から、肺の好酸球性炎症には、活性化T細胞とIL-5の役割が重要であることが明らかになったので、新たな治療介入をめざして、T細胞移入喘息モデルを確立し、サイトカインの役割を詳細に解析した。Thクローン移入により、液性免疫の関与なしに、気道の好酸球性炎症および過敏性が誘導された。IL-5産生T細胞は、気道過敏性の十分条件であることが示された。好酸球は、抗原特異的IgA, IgG, IgEといった免疫グロブリンが存在しないにもかかわらず、炎症局所に集積し、脱顆粒を含む活性化をすることが*in vivo*で証明された。*in vivo*における好酸球浸潤の程度と、*in vitro*におけるT細胞クローンのIL-5産生は強い相関がみられた。T細胞、IL-5産生を制御する薬物は、好酸球性炎症治療薬として有望である。さらに、ステロイド抵抗性の克服に向け、治療介入モデル構築を目指し、T細胞移入モデルを作成した。

A. 研究目的

（以下CEP）の病態にはT細胞IL-5産生が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。そこで、初年度は末梢血T細胞のIL-5産生と、*in vivo*における好酸球活性化の関連につき、臨床症例を対象として解析した。CEP

の病因・病態には未だ不明な点が多く、病態解明が進むことによって、疾患活動性マーカーが明らかとなり、よりの確な診断と管理が可能となるとともに、新規治療薬（抗IL-5抗体、スプラダスト）の再燃予防効果の前向き検討にも役立つものと期待される。また、ステロイド抵