

過敏性気道疾患の発症メカニズムを以下のように仮定する。即ち、「気道上皮には免疫刺激による活性化を抑制的に制御するような機構が存在し、PGE₂-EP3 経路もその一つである。アスピリンを始めとする NSAIDs は、PGE₂ 合成を抑制することにより、この経路を遮断し免疫刺激への感受性を亢進する。しかし、正常人の場合には、EP3 経路の抑制のみでは、アレルギー炎症の発症には至らない。それは、PGE₂-EP3 経路以外にもアレルギー関連遺伝子の発現抑制に働く経路が存在する為である。NSAIDs 過敏性気道疾患では、この redundant な経路の異常があるため、EP3 経路への依存性が高まっており、この経路の遮断だけでアレルギー発症に至る。」本研究の第二の目的は、この仮説に基づき、培養気道上皮細胞を用い、免疫刺激によるアレルギー炎症関連遺伝子の誘導が NSAIDs 処理により亢進するような in vitro での NSAIDs 過敏疾患モデルの作成を図り、そのモデルにおける EP3 経路以外の抑制経路の同定に努める。これにより、NSAIDs 過敏性気道疾患患者におけるこれら経路の異常の検討に結びつける。

B. 研究方法

PGE₂ の Th1 細胞分化促進の分子機構の研究

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、INF γ R1、T-bet 各遺伝子の発現につき real time PCR 法により検討を行った。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 および CRTC2 の RNAi と western blot CREB と CRTC2 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 CRTC2 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。

5) Th1 炎症モデル

Th1 主体の炎症モデルとしてマウス接触性皮膚炎 contact hypersensitivity (CHS) および rag2^{-/-}マウスへの T 細胞移入による腸炎モデル adoptive transfer colitis を用いた。

PGE₂-EP3 経路の気道上皮に対する作用の研究

BEAS-2B 培養ヒト気道上皮細胞を用い、この細胞での EP3 受容体と GPR17 受容体の基底状態と Th2 サイトカイン刺激時、EP3 アゴニスト刺激時での発現を検討した。また、Th2 サイトカイン刺激時の BEAS-2B 細胞よりの PGE₂ 合成、MCP-1 誘導とこれにたいするアスピリン及び EP3 アゴニストの効果を検討した。

(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

PGE₂のTh1細胞分化促進の分子機構の研究

前年度見出した結果に加え、以下の結果を得た。

1. CREBのco-activatorであるCRTC2がcAMP-PKAの下で活性化され、CREBとともに働きIL-12Rβ2遺伝子の発現を促進した。

2. 上記、EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2経路は、IL-12Rβ2に加えinterferon γの受容体であるINFγR1の遺伝子の誘導促進を起こし、INFγのシグナルを増強すること、これにより、更に、IL-12Rβ2の発現誘導が更に増強した。

3. cAMP単独であると、従来明らかであったT細胞活性化の阻害が強く見られTh1分化は抑制されるが、これにCD28の共刺激やEP2/EP4からのPI-3-キナーゼ活性化が加わると、cAMPによるT細胞抑制が解除され、Th1分化促進作用が顕著になった。

4. T細胞特異的にEP4を欠損させたマウスを用いた接触性皮膚炎やRag2 KOマウスへのT細胞移入による腸炎症では、Th1細胞分化の阻害と炎症の減弱とが見られ、上記PGE₂経路が個体の病態でもTh1分化促進と炎症亢進に働いていることが確認された。

PGE₂-EP3経路の気道上皮に対する作用の研究

1. EP3受容体は基底状態のBEAS-2B細胞で発現が見られ、これはIL-4、IL-13、IL-4+IL-13(各20 ng/ml)のTh2サイトカイン刺激で半分程度に低下し、これにEP3作用薬ONO-AE248を加えることにより回復した。GPR17も基底状態のBEAS-2B細胞で発現が

見られたが、この発現に対するTh2サイトカインやAE248の効果は軽度であった。

2. BEAS-2B細胞をIL-4、IL-13、IL-4+IL-13(各20 ng/ml)で処理したところ、約10 pg/ml程度のPGE₂産生が見られた。基底状態でのPGE₂産生は検出限界以下であった。

3. IL-4、IL-13、IL-4+IL-13などのTh2サイトカインは、BEAS-2B細胞でケモカインMCP-1の発現を30%程度増加させた。IL-4とIL-13で相加効果は示さなかった。アスピリンは、Th2サイトカインの効果を軽度、有意に上昇させ、これにEP3作用薬を添加すると、Th2サイトカインとアスピリンの効果は抑制された。

D. 考察

PGE₂のTh1細胞分化促進の分子機構の研究

上記結果と前年度の結果を合わせ、PGE₂によるTh1分化促進がEP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2経路を介したIL-12Rβ2遺伝子とINFγR1遺伝子の転写誘導により担われていることが明らかになった。また、この作用が、CD28共刺激やEP2/4によるPI-3-キナーゼの活性化で保障されていることも明らかになった。また、in vivoのモデル実験からこの経路によるTh1分化が免疫炎症の発現に貢献していることも明らかとなった。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。

PGE₂-EP3経路の気道上皮に対する作用の研究

上記の結果は、気道上皮細胞でTh2サイトカインがPGE₂を産生し、このPGE₂がEP3受容体に働き、Th2サイトカインのMCP-1誘導

を抑制するという我々の仮説と一致するが、BEAS-2B 細胞での Th 2 サイトカインの MCP-1 誘導は、たかだか 30% 程度の増加に留まっている。今後、Th2 サイトカイン作用の指標となるより大きな誘導を起こす遺伝子の同定、或は、より大きな増加を示す新規細胞系の確立が、PGE₂-EP3 経路 やその他の抑制経路の相互作用の解析には重要であると考えられた。

E. 結論

PGE₂ の Th1 分化誘導促進作用を解析することにより、EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2 経路を介した IL-12Rβ2 遺伝子と INFγR1 遺伝子の転写誘導が Th1 分化を促進していること、この経路が個体での *in vivo* の Th1 炎症の発症に働いていること、を見出した。

また、気道上皮細胞を用いて、PGE₂ と Th2 サイトカインの *negative* な *cross talk* が見出された。これは、NSAIDs 過敏性の *in vitro* 実験系の予備的検討である。今後、このアッセイ系を確立して、PGE₂-EP3 経路以外の抑制経路の同定に用いる他、NSAIDs 過敏性気道疾患患者の鼻粘膜上皮を用いた過敏性の検討や、上記で同定される経路の NSAIDs 過敏性気道疾患患者での異常の有無などの検討に繋げたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomohiro Aoki, and Shuh Narumiya (2012) Prostaglandins and chronic inflammation. Trends Pharmacol. Sci., 33(6), 304-311.

2) Chengcan Yao, Takako Hirata, Kitipong Soontrapa, Xiaojun Ma, Hiroshi Takemori and Shuh Narumiya (2013) Prostaglandin E₂ promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signaling by cAMP and PI3-Kinase. Nature Commun., in press

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

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
(難治性疾患等克服研究事業 (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

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：

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。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が、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・蛋白質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わることを想定される。cysteinyl LT の受容体(CysLT1-R, CysLT2-R)は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。特に、CysLT2-R は大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、この CysLT2-R を標的としたノックアウトマウ

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。

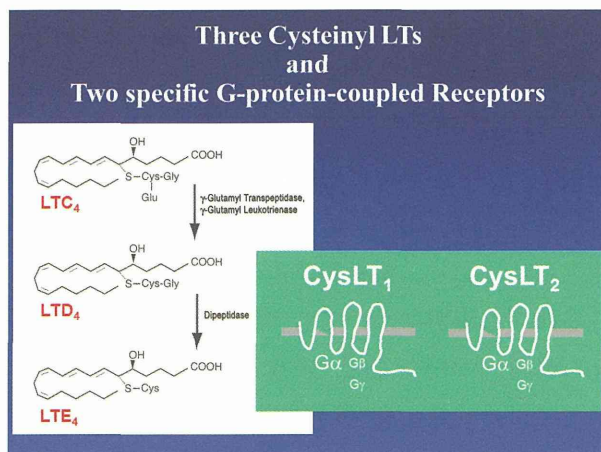


図1 cysteinyl LT 受容体の模式図

(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

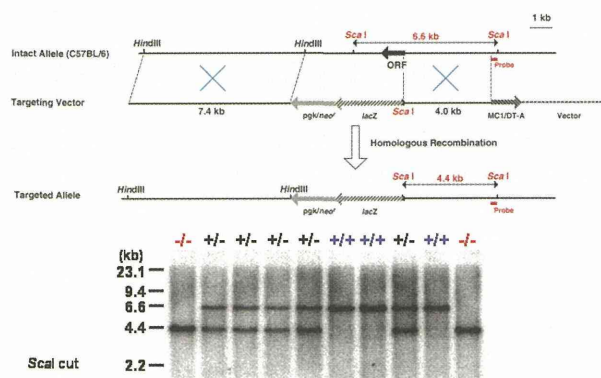


図2 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

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 cysteinyl LT 受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

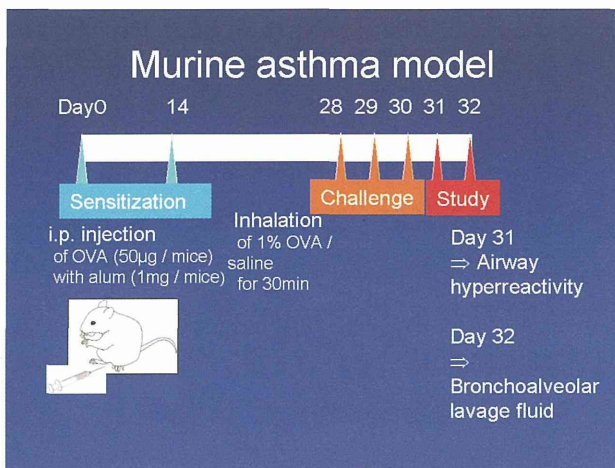


図3 アレルギー性気管支喘息モデルの作成

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・発生工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

発生工学的手法により 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) Mikami Y, Yamauchi Y, Horie M, Kase M, Jo T, Takizawa H, Kohyama T, Nagase T. Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces epithelial-mesenchymal transition in A549 human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428: 451-457.

2) Yamauchi Y, Kohyama T, Jo T, Nagase T. Dynamic change in respiratory resistance during inspiratory and expiratory phases of tidal breathing in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012; 7: 259-269.

3) Narumoto O, Matsuo Y, Sakaguchi M, Shoji S, Yamashita N, Schubert D, Abe K, Horiguchi K, Nagase T, Yamashita N. Suppressive effects of a pyrazole derivative of curcumin on airway inflammation and remodeling. *Exp Mol Pathol* 2012; 93: 18-25.

4) Kawakami M, Narumoto O, Matsuo Y, Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, Sakaguchi M, Lipp M, Nagase T, Yamashita N. The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure. *Cell Immunol* 2012; 275: 24-32.

2. 学会発表

1) Cellular and molecular models of lung diseases. The 17th APSR Meeting, Hongkong. (長瀬隆英、招待講演), 2012.

2) 高齢者の慢性閉塞性肺疾患の管理：第 54 回日本老年医学会総会 (長瀬隆英、教育講演), 2012.

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
(難治性疾患等克服研究事業 (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

CysLT 過剰産生病態は AIA 病態の必要条件であるが十分条件でない

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・ブリガムウィミンズホスピタル 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
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
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:

背景: CysLT は好酸球性気道炎症や気道アレルギーにおける強力な最終メディエーターと考えられている。すでに我々は、アスピリン喘息 (AIA) において、CysLT 過剰産生が AIA 病態の特徴であり、安定期でも非 AIA の数倍、COX1 阻害時にはさらに数 10 倍に U-LTE4 が増加することを報告してきた (JACI2002,2003,2004,2010,2011)。またその値と喘息難治化が有意に関連することを報告した (別項参照)。しかし、その一方で、U-LTE4 増加病態が AIA や喘息以外でも生じることを見出した。例えばアナフィラキシー (Allergy2008,CEA2009)、血管炎 (JACI2002) などにおける増加である。また NSAIDs 過敏蕁麻疹/血管性浮腫 (JACI2002) や肺局所での増加=好酸球性肺炎や過敏性肺炎での U-LTE4 増加 (ERJ2005,2008) も見出したが、実はこれらでは肺機能低下や喘息症状はほとんど伴わない。

目的: 今回の目的は我々の過去に蓄積された CysLTs 過剰産生病態の中から、「好酸球性炎症やマスト細胞活性化非喘息病態=好酸球性肺炎やアナフィラキシー症例の急性期 U-LTE4」と「AIA のアスピリン誘発時」、「非 AIA の自然喘息発作時」の 3 者の U-LTE4 の比較をし、CysLTs 過剰産生と喘息発作出現との関連を明らかにすることである。

結果・結論: 肺末梢での好酸球性炎症である好酸球性肺炎、さらに全身のマスト細胞活性化であるアナフィラキシーの両者において、U-LTE4 が著名に増加しても、喘息発作や肺機能低下は生じていなかった。この事実は、肺や全身で CysLTs 過剰産生が生じてても気道閉塞が誘発されないことを示唆している。この病態・機序は AIA の本質に関与しているため、今後の検討が必要である。

A. 研究目的

CysLT は好酸球性気道炎症や気道アレルギーにおける強力な最終メディエーターと考えられている。

すでに我々は、アスピリン喘息 (AIA) において、CysLT 過剰産生が AIA 病態の特徴であり、安定期でも非 AIA の数倍、COX1 阻害時にはさらに数 10 倍に U-LTE4 が増加することを報告してきた (JACI2002, 2003, 2004, 2010,

2011)。またその値と喘息難治化が有意に関連することを報告した (別項参照)。しかし、その一方で、U-LTE4 増加病態が AIA や喘息以外でも生じることを見出した。例えばアナフィラキシー (Allergy2008,CEA2009)、血管炎 (JACI2002) などにおける増加である。また NSAIDs 過敏蕁麻疹/血管性浮腫 (JACI2002) や肺局所での増加=好酸球性肺炎や過敏性肺炎での U-LTE4 増加 (ERJ2005,2008) も見出

したが、実はこれらでは肺機能低下や喘息症状はほとんど伴わない。

今回の目的は我々の過去に蓄積された CysLTs 過剰産生病態の中から、「好酸球性炎症やマスト細胞活性化非喘息病態＝好酸球性肺炎やアナフィラキシー症例の急性期 U-LTE4」と「AIA のアスピリン誘発時」、「非 AIA の自然喘息発作時」の 3 者の U-LTE4 の比較をし、CysLTs 過剰産生と喘息発作出現との関連を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象：アスピリン負荷試験で確定診断し、U-LTE4 を測定した AIA 45 例、および非 AIA 喘息発作時、好酸球性肺炎急性期、アナフィラキシー急性期 10～20 例の U-LTE4 を蓄積データから解析した。

(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

【AIA におけるアスピリン誘発時の U-LTE4 濃度推移】

図 1 に示すように AIA 41 例全てで前値（基礎値）の数倍から数 10 倍の U-LTE4 増加が確認された。

【健常人、喘息発作時、アナフィラキシー、好酸球性肺炎急性期における U-LTE4 濃度】
図 2 に示すように、アナフィラキシー、好酸

球性肺炎ともに非 AIA 喘息自然発作時の 5-10 倍以上の U-LTE4 増加を示し、図 1 の AIA 誘発時の増加程度とほぼ同等であった。しかしながら、これらの症例では、喘息合併例も含まれたが、臨床的に喘息発作は認めず、気道閉塞も生じていなかった。

図 1: AIA におけるアスピリン負荷時の U-LTE4 推移

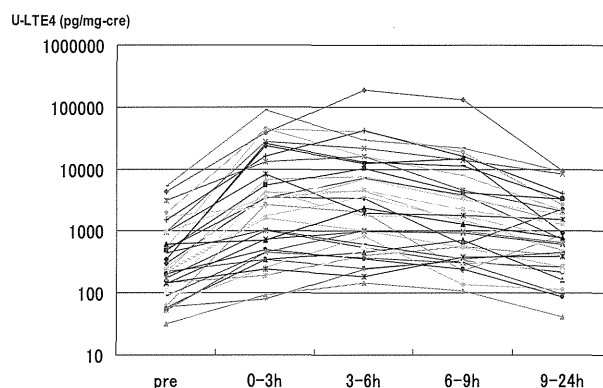
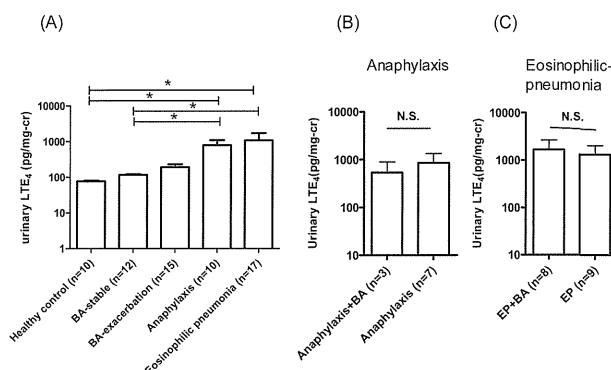


図 2: 健常人、喘息(安定期と発作時)、アナフィラキシー、好酸球性肺炎における U-LTE4



D. 考察

肺末梢での好酸球性炎症である好酸球性肺炎、さらに全身のマスト細胞活性化であるアナフィラキシーの両者において、U-LTE4 増加が非 AIA の発作時の 10 倍程度、AIA のアスピリン

誘発時と同程度観察されたが、喘息発作や肺機能低下は生じていなかった。この事実は、肺や全身で CysLTs 過剰産生が生じても気道閉塞が誘発されないことを示唆している。すなわち CysLTs だけでは喘息が生じないことが証明された。この病態・機序は AIA の本質に関与しているため、今後の検討が必要である。

E. 結論

肺末梢での好酸球性炎症である好酸球性肺炎、さらに全身のマスト細胞活性化であるアナフィラキシーの両者において、U-LTE4 が著名に増加しても、喘息発作や肺機能低下は生じていなかった。この事実は、肺や全身で CysLTs 過剰産生が生じても気道閉塞が誘発されないことを示唆している。この病態・機序は AIA の本質に関与しているため、今後の検討が必要である。

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

3. その他

アスピリン喘息における気道と全身の PGE2 産生低下：
 アスピリン喘息の最も基本的な必須病態は何か？

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
	三井千尋	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
	石井豊太	国立病院機構相模原病院耳鼻咽喉科	医長
	小野恵美子	ハーバード大学・ブリガムウィミンズホスピタル	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部	研究員
	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
	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：

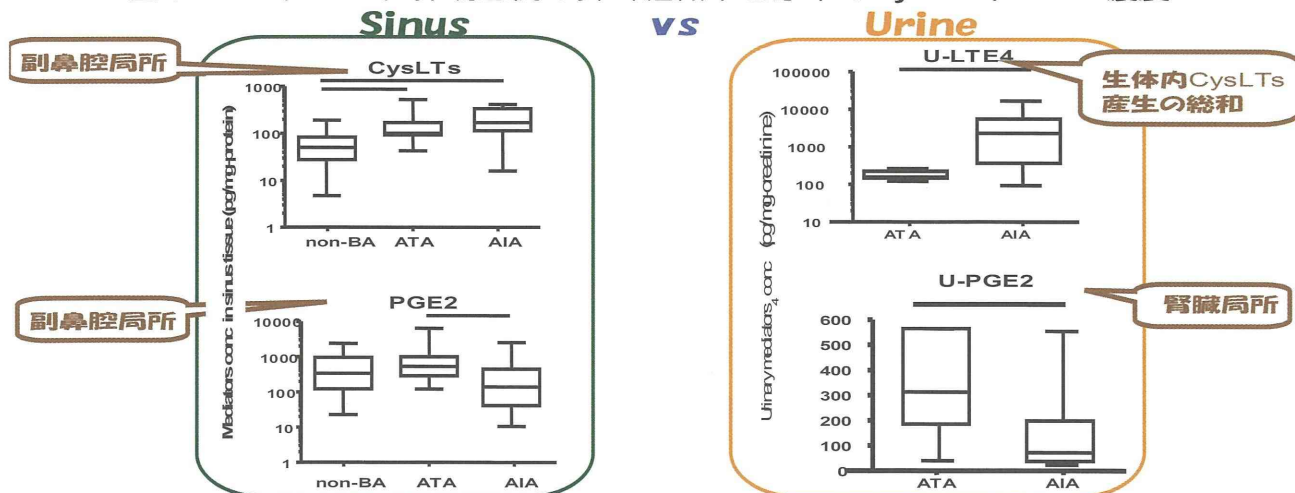
背景、目的：アスピリン喘息の特徴的病態として、CysLTs 過剰産生を我々は証明してきた (JACI 2004 2003 AI2007 2012 など)。しかし、その抑制因子である PGE2 の産生能については、結論が得られていない。そのため、本研究では、気道局所 (鼻茸組織中) と尿中 PGE2 代謝産物の濃度を AIA、非 AIA、非 AIA 喘息例で比較検討する。また根柢のメカニズムに関し、文献的考察 (過去文献 30 以上) も含め、行う。

結果：図 1 に示したように、副鼻腔炎組織ならびに尿中の PGE2 はアスピリン喘息で低下し、LTs は、アスピリン喘息において有意に両検体で増加していた。また文献的には、COX 2 低下が全ての不均衡に関与している可能性が最も矛盾ない基本病態と考えられた。

結論：

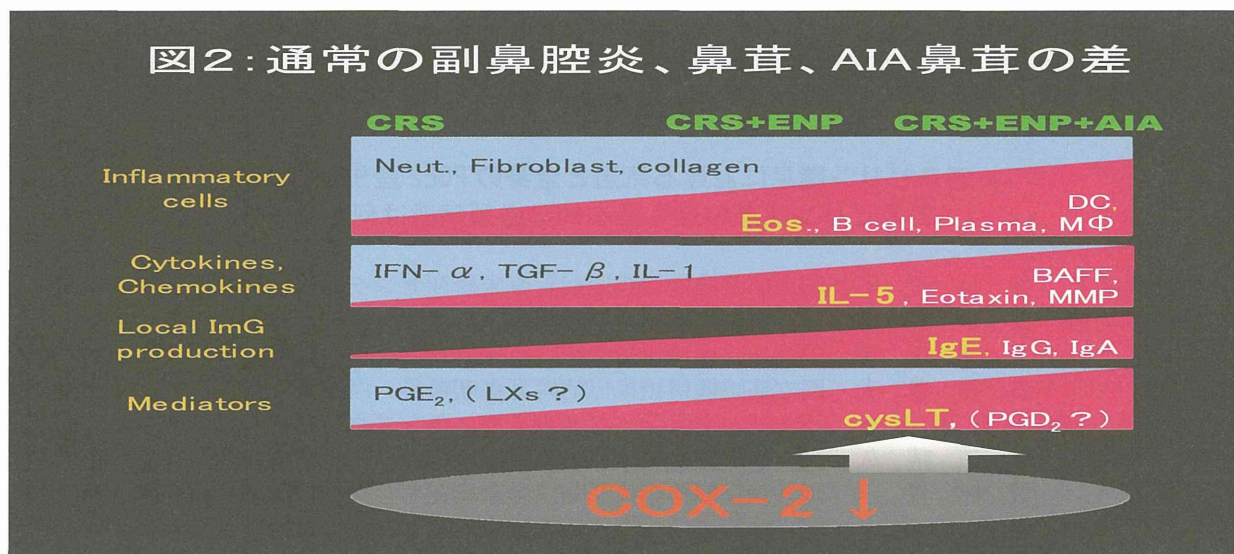
- 1) アスピリン喘息では、気道局所だけでなく、全身性の PGE2 産生低下が特徴的である。
- 2) AIA の基本病態は、PGE2 産生を制御する (気道における) COX 2 活性の低下を推察した。

図 1：AIA、ATA、非喘息例の鼻茸組織中と尿中の CysLTs、PGE2 濃度



Higashi N, Mita H, Taniguchi M, et al 投稿中データ

図2：通常の副鼻腔炎、鼻茸、AIA鼻茸の差



A. 研究目的

アスピリン喘息の特徴的病態として、CysLTs 過剰産生を我々は証明してきた (JACI 2004 2003 AI2007 2012 など)。しかし、その抑制因子である PGE₂ の産生能については、結論が得られていない。そのため、本研究では、気道局所 (鼻茸組織中) と尿中 PGE₂ 代謝産物の濃度を AIA、非 AIA、非 AIA 喘息例で比較検討する。

B. 研究方法

既報の方法 (JACI 2010) による測定方法で、鼻茸組織中と尿中の PGE₂ 濃度 (代謝産物含め) +CysLTs 濃度を測定した (図1)。また過去の研究論文 300 編以上から、AIA の基本病態を考察した (図2)。

(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

図1に示したように、副鼻腔炎組織ならびに尿中の PGE₂ はアスピリン喘息で低下し、LTs は、アスピリン喘息において有意に両検体で増加していた。

また文献的には、COX2 低下が全ての不均衡に関与している可能性が最も矛盾ない基本病態と考えられた。

D. 考察

図2に示したように、アスピリン喘息では、PGE₂ 低下病態が必須病態となり、各種炎症性化学伝達物質やサイトカインの増加を生じ (文献考察含め)、LTs の増加もきたしていると推定された。またその根底には、COX の低下、それも COX2 の低下が強く関与している可能性を推定した。

E. 結論

- 1) アスピリン喘息では、気道局所だけでなく、全身性の PGE₂ 産生低下が特徴的である。

2) AIA の基本病態は、PGE2 産生を制御する
(気道における) COX 2 活性の低下を推察し
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

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業 (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

アスピリン喘息では抗炎症性メディエーター、リポキシンの特異的産生低下がある

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 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
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
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
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：

背景：Lipoxin/15-epi-Lipoxin (LX/15-epi-LX)は、炎症細胞浸潤を抑制し、LT 受容体に対して拮抗作用を示すことから、抗炎症性脂質メディエーターとして注目されつつある。

さらに、近年、生体内における LX 産生能が低いことが重症喘息の喀痰・気管支肺胞洗浄液を用いた検討により報告されている。

目的：アスピリン喘息(AIA)での安定期の産生能を評価し、さらに診断に有用か否かも併せて検討した。

結果・結論：AIA においてはじめて尿中の LXs 代謝産物の産生抑制が初めて確認された。また炎症メディエーター(LT)産生亢進だけでなく、抗炎症メディエーター(LX/15epi-LX) 産生抑制の imbalance が アスピリン過敏体質に大きく関わっている可能性が示唆された。

この U-LTE4/LXs 比は、アスピリン喘息を負荷試験なしで診断できる可能性を初めて示した(CEA 2012)。この低下のメカニズムは不明であるが、非常に特異性が高いため、COX2 低下が関与している可能性があるが、さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

Lipoxin/15-epi-Lipoxin (LX/15-epi-LX)は、炎症細胞浸潤を抑制し、LT 受容体に対して拮抗作用を示すことから、抗炎症性脂質メディエーターとして注目されつつある。

さらに、近年、生体内における LX 産生能が低いことが重症喘息の喀痰・気管支肺胞洗浄液を用いた検討により報告されている。

今回は、アスピリン喘息(AIA)での安定期の産生能を評価し、さらに診断に有用か否かも併せて検討した。

B. 研究方法

- 1) アスピリン負荷試験にて陽性であった AIA16例を対象とした。対照群として 非AIA (ATA) 患者 15名 Healthy control (HC) 群 10名も検討した。
- 2) サンプルは 午前中に採取した随時尿とし、すべて HPLC による精製・抽出後に測定した。

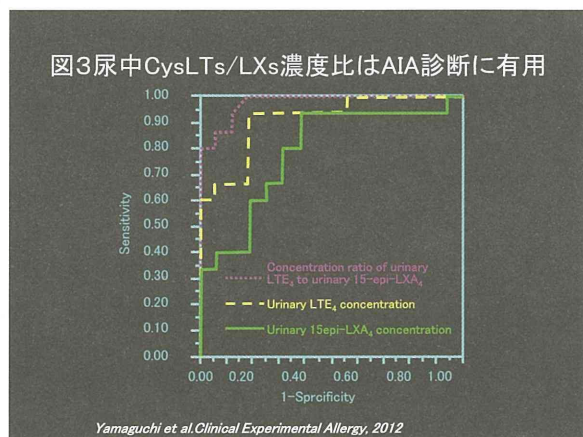
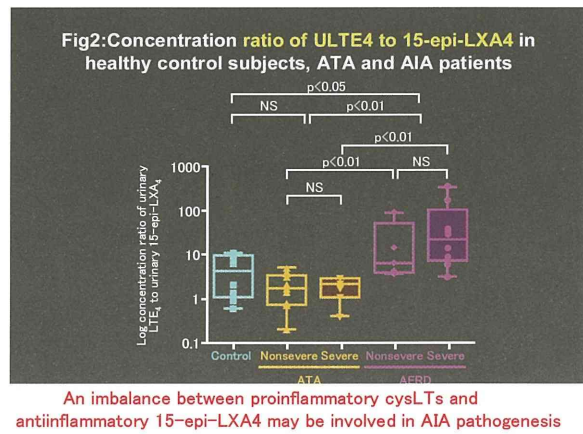
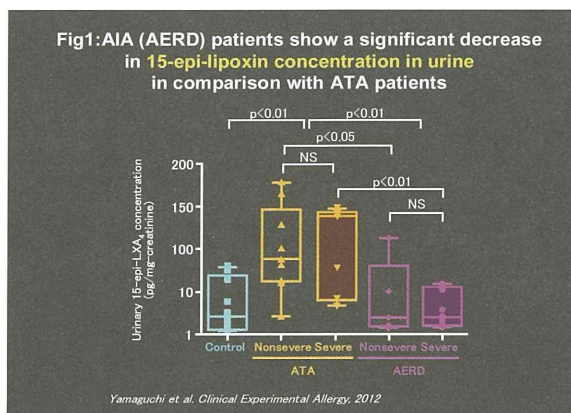
測定項目	マーカーの意義	Methods
LTE4	CysLTs の主要な代謝産物	Empore C18 >HPLC > EIA (Cayman chemical)
LX	腎臓由来	Empore C18 >HPLC > ELIA (NeogenI)

(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) 尿中 LX 濃度は尿中 15-epi-LXA4 と正の相関が見られるが、腎臓での 15-PGDH の代謝を受け有意に低値で 15-epi-LX の方が、感度の面で尿のバイオマーカーとして有用であった。
- 2) 尿中 15-epi-LX 濃度は、末梢血好酸球数と有意に負の相関を示した(図表省略)
- 3) 尿中 15-epi-LX 濃度は、AIA 群は非 AIA 群と比較して有意に低値 (median, 21.5 pg/mg-cre vs 95.3 pg/mg-cre, $p<0.05$,) Fig1、LTE4/15epi-LX 比は有意に高値であった (14.5 vs 1.9, $p<0.01$)Fig2。
- 4) 重症持続型の 2 群比較においても尿中 15-epi-LX 濃度は AIA 群で有意に低値であった。(26.7 pg/mg-cre vs. 100.7pg/mg-cre, $p<0.05$)(Fig1)
- 5) 図 2 などの成績からアスピリン喘息の診断に尿中 LTE4/15-epi-LXA4 が非常に有用である可能性がある (ROC 曲線などは図 3 参照)。



D. 考察

AIA においてはじめて尿中の LXs 代謝産物の産生抑制が確認された。また炎症メディエーター(LT)産生亢進だけでなく、抗炎症メディエーター(LX/15epi-LX)産生抑制の imbalance がアスピリン過敏体質に大きく関わっている可能性が示唆された。

この U-LTE4/LXs 比は、アスピリン喘息を負荷試験なしで診断できる可能性を示している (CEA 2012)。

この低下のメカニズムは不明であるが、COX2 低下が関与している可能性がある (別項)。

E. 結論

アスピリン喘息では CysLTs 過剰産生だけでなく、抗炎症性メディエーターであるリポキシンの産生低下も証明された。この両者の不均衡が AIA の病態に関与している可能性がある (CEA 2012)。

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

3. その他

なし

アスピリン喘息は LTC₄、D₄ よりも LTE₄ 優位の病態を呈する

研究分担者 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
三 井 千 尋 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室 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

研究要旨：

背景、目的：LTE₄ は従来は、活性化体である LTC₄,D₄ の安定代謝産物であり、不活性化代謝産物ととらえられていた。一方近年、CysLTs の受容体は CysLT₁、2 だけでなく、3 つ目の受容体系、すなわち LTE₄ 独自で強い気道好酸球性炎症を惹起させる経路が判明しつつある。我々は、ごく最近、尿中でも LTE₄ だけでなく、LTC₄,D₄ が検出可能であり、その比の検討が可能なことを見出した (Higashi ら投稿中)。この尿中比率を各種 CysLTs 過剰産生病態で検討し、アスピリン喘息では LTE₄ 優位病態がある、と仮説をたて検証した。

結果：尿中 LTE₄ 濃度と尿中 LTC₄+D₄ 濃度比率を図示すると、アスピリン喘息で優位にその比率が増加しており、アスピリン喘息は LTE₄ 優位病態を示すことが示唆された (図 2)。

考察、結論：AIA においてはじめて LTE₄ 優位病態が確認された。LTE₄,D₄ 濃度は差がないことから、LTE₄ 分解障害の可能性が推定される。すでにヒト気道において、LTE₄ が他の c s y L T s と異なり、強い Eos 炎症を惹起することが報告されている。AIA では強い気道好酸球性炎症病態があり、この機序として LTE₄ 優位病態が関与しているのかもしれない。今後さらなる症例や疾患群での検討が必要である。

A. 研究目的

LTE₄ は従来は、活性化体である LTC₄,D₄ の安定代謝産物であり、不活性化代謝産物ととらえられていた。我々は、ごく最近、尿中でも LTE₄ だけでなく、LTC₄,D₄ が検出可能であり、その比の検討が可能なことを見出した (Higashi ら投稿中)。近年、CysLTs の受容体は CysLT₁、2 だけでなく、3 つ目の受容体系、すなわち LTE₄ 独自で強い気道好酸球性炎症を惹起させる経路が判明しつつある。すなわち、LTE₄ 濃度も重要な病態形成にかかわっている可能性を想定した。この CysLT 尿中比率を各種 CysLTs 過剰産生

病態で検討し、アスピリン喘息では LTE₄ 優位病態がある、と仮説をたて検証した。

B. 研究方法

- 1) アスピリン負荷試験にて陽性であった AIA 8 例を対象とした。CysLTs 過剰産生を呈する対照群として好酸球性肺炎、アナフィラキシー患者群も検討した。
- 2) サンプルは 午前中に採取した随時尿とし、すべて HPLC による精製・抽出後に測定した。また同様に GC-MS での測定も比較検証した。

(倫理面への配慮)

個人情報の保護は、暗号化された検体であり、万全の注意を払っている。また患者情報も暗号化され、外部への流失も十分な注意を行っている。当院の倫理委員会承認済みであり、被験者の同意を得たのちに行っている。

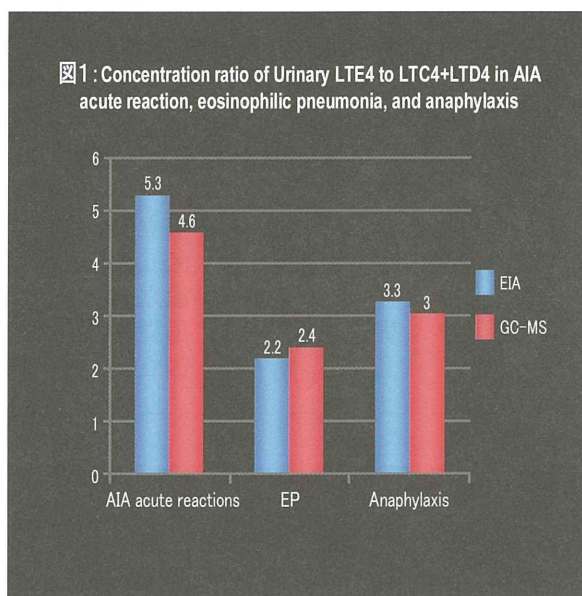
C. 研究結果

- 1) 尿中 LTC₄,D₄,E₄ はそれぞれ各群で検出可能であった。各 CysLTs の濃度は、各群で有意差はなかった (表 1)
- 2) 尿中 LTE₄ 濃度と尿中 LTC₄+D₄ 濃度比率を図示すると、アスピリン喘息で優位にその比率が増加しており、アスピリン喘息は LTE₄ 優位病態を示すことが示唆された (図 2)。
- 3) GC-MS での測定も比較検証したが、従来の我々の既報方法と結果は同様であった (表 1)。

表 1: AIA、好酸球性肺炎、アナフィラキシー患者の尿中LTC₄,D₄,E₄濃度

AIA group at baseline			
	LTC ₄	LTD ₄	LTE ₄
EIA	81.1 (49.9-136.4)*	42.0 (25.8-71.1)*	231.3 (122.3-14.9)*
GC-MS	113.2 (39.8-273.9)*	53.2 (25.7-134.0)*	196.4 (108.5-360.9)*
EP group			
	LTC ₄	LTD ₄	LTE ₄
EIA	452.9 (387.0-1069)	783.8 (644.3-1580)	2504 (1596-6222)*
GC-MS	156.5 (92.3-286.3)	801.60 (483.2-2262)	2899 (2442-6354)*
Anaphylaxis group			
	LTC ₄	LTD ₄	LTE ₄
EIA	94.9 (68.6-136.9)	33.2 (23.8-58.1)	508.7 (341.9-803.5)*†
GC-MS	54.6 (33.6-88.2)	57.2 (50.2-81.7)	535.5 (2442-6354)*†

Higashi et al.



D. 考察

AIA においてはじめて LTE₄ 優位病態が確認された。LTEC₄,D₄ 濃度は差がないことから、LTE₄ 分解障害の可能性が推定される。すでにヒト気道において、LTE₄ が他の c s y LT s と異なり、強い Eos 炎症を惹起することが報告されている。AIA では強い気道好酸球性炎症病態があり、この機序として LTE₄ 優位病態が関与しているのかもしれない。今後さらなる症例や疾患群での検討が必要である。

E. 結論

アスピリン喘息では CysLTs 過剰産生だけでなく、LTE₄ 優位病態があるかもしれない。LTE₄ の強い関与が AIA の病態を形成している可能性がある(投稿中)。

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

3. その他

なし

NSAIDs 過敏喘息の病態における好塩基球の関与

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	小野恵美子	ハーバード大学・ブリガムウィミンズホスピタル	研究員
	三井千尋	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室	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
	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

研究要旨：

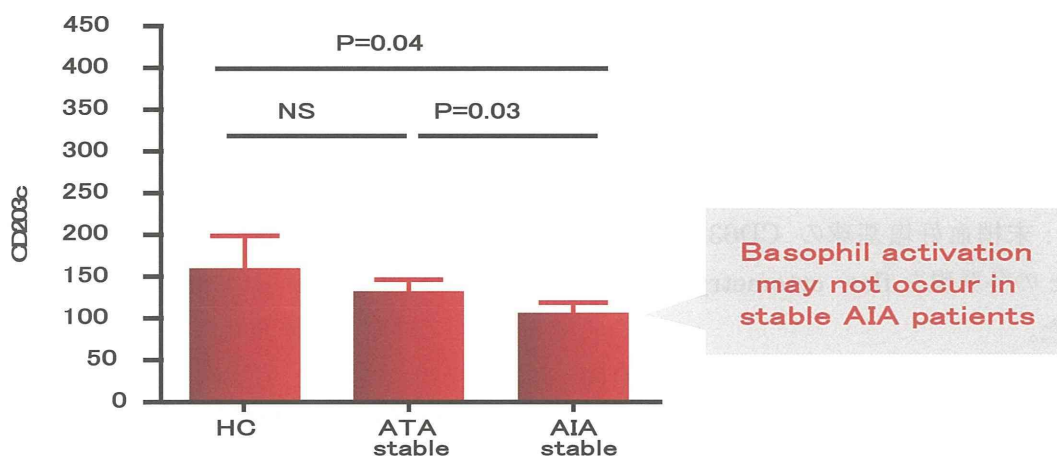
背景：アスピリン喘息（AIA）では、過剰な CysLTs 産生がその病態の中心である。CysLTs 産生細胞は、ヒトにおいて主にマスト細胞、好塩基球、さらに好酸球が主体と考えられている。

すでに AIA でのマスト細胞活性化（安定期、アスピリン誘発時）を我々は証明した。また好酸球からの CysLTs は少なくともアスピリン誘発時はほとんど生じていないことを Sanak ら、我々ら (Mita et al CEA 2005) は証明している。その一方で、好塩基球は、その重要性が以前から指摘されながらも、その役割はほとんど不明であった。

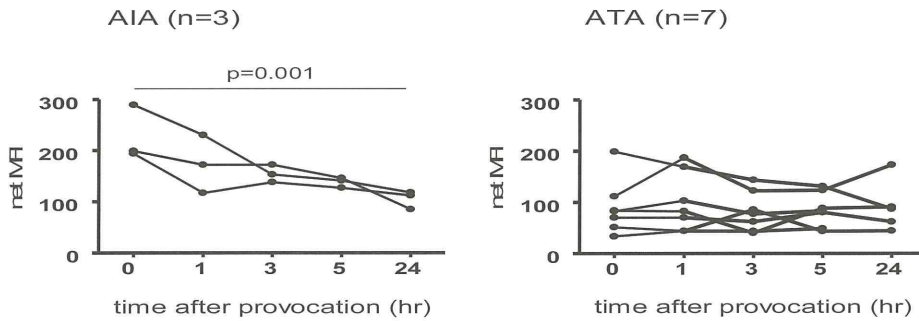
目的：好塩基球には活性化の特異的バイオマーカーが無いため、今回、細胞表面マーカーの変動からその活性化を検討した。

結果・考察：今回の前検討で、ヒト喘息では安定期でも好塩基球の活性化があり、発作時にはその活性化が有意に顕著になることがはじめて示された (JACI 2010、図示なし)。また AIA と非 AIA の比較においては AIA のほうが有意に好塩基球の活性化細胞が少なく (図上)、アスピリン誘発時にはさらに減少する可能性が示唆された (図下)。これらの結果は少なくとも、ヒト喘息において、好塩基球が関与していること、さらにアスピリン喘息では好塩基球活性化が抑制されている可能性を示唆している。

Fig1: Spontaneous CD203c expression on peripheral basophils in HC, ATA, and AIA patients in stable condition (unpublished data)



アスピリン負荷試験時のCD203c発現の推移



A. 研究目的

アスピリン喘息（AIA）では、過剰な CysLTs 産生がその病態の中心である。CysLTs 産生細胞は、ヒトにおいて主にマスト細胞、好塩基球、さらに好酸球が主体と考えられている。すでに AIA でのマスト細胞活性化（安定期、アスピリン誘発時）を我々は証明した。また好酸球からの CysLTs は少なくともアスピリン誘発時はほとんど生じていないことを Sanak ら、我々（Mita et al CEA 2005）は証明している。その一方で、好塩基球は、その重要性が以前から指摘されながらも、その役割はほとんど不明であった。

しかし、好塩基球には活性化の特異的バイオマーカーが無いため、今回、細胞表面マーカーの変動からその活性化を検討した。

B. 研究方法

1)対象：①喘息発作患者 24 例。安定喘息患者 16 例、健常者 11 例。②アスピリン喘息 14 例も追加検討した（安定期と負荷時）。

2)方法：末梢血好塩基球の CD63、CD69、CD203c の各発現を flow cytometry を用いて測定した。

また、anti-IgE, *Derp1*, IL-3, 15R-MePGD2 の各刺激に対する反応を測定した。

（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

今回の前検討で、ヒト喘息では安定期でも好塩基球の活性化があり、発作時にはその活性化が有意に顕著になることがはじめて示された（JACI 2010、図示なし）。また AIA と非 AIA の比較においては AIA のほうが有意に好塩基球の活性化細胞が少なく（図上）、アスピリン誘発時にはさらに減少する可能性が示唆された（図下）。これらの結果は少なくとも、ヒト喘息において、好塩基球が関与していること、さらにアスピリン喘息では好塩基球活性化が抑制されている可能性を示唆している。

D. 考察

AIA と非 AIA の比較においては AIA のほうが有意に好塩基球の活性化細胞%が少なく（図上）、アスピリン誘発時にはさらに減少する可能性が示唆された（図下）。これらの結果はアスピリン喘息では好塩基球活性化が抑制されている可能性を示唆している。