

行った。cDNAの合成には3'IVT Express kitを用いた。

(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

GWASの結果、 $\lambda_{GC}=1.016$ であり、population stratificationにより偽陽性の結果が得られる確率は低いと考えられた。メタ解析の結果、ゲノムワイド水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) を満たすSNPは認めなかったが、8個のSNPが $P < 1 \times 10^{-4}$ の強さの関連を示した。その内7個はHLA領域内のSNPであり、1個は2q21に存在していた。最も関連が強かったのはHLA領域に存在するSNP (rs2281389, $P=4.8 \times 10^{-6}$) であった。

マイクロアレイにより発現を検討した。気道上皮細胞において、アルテルナリア刺激によりIL8, 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。アスピリン喘息非合併好酸球性副鼻腔炎ポリープと非好酸球性副鼻腔炎ポリープ間で発現量の差が2倍以内、かつアスピリン喘息合併好酸球性副鼻腔炎のポリープで2倍以上のmRNAの発現上昇を認める2,764個 (うち273個がケモカイン・サイトカイン関連) の遺伝子群が同定された。

D. 考察

2013年に韓国のグループよりアスピリン喘息のGWASが報告された (Human genetics 2013;132:313-321)。この報告では、HLA-DPB1のrs1042151で $P=5.11 \times 10^{-7}$ の最も強い関連が報告されている。日本人の集団で最も関連が強かったSNP (rs2281389) はHLA領域に存在し、韓国のグループから報告されたHLA-DPB1領域のrs1042151の近傍(約

785kb) に存在していた。今後、これらの結果については、独立に収集したサンプルでの検証が必要である。

アルテルナリアは空中環境真菌の代表であり、近年好酸球性副鼻腔炎への関与が示唆されている。IL8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)。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IL8の誘導は1つの要因である可能性が考えられた。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)。これまで、難治性喘息の気道上皮細胞においてEDN1, IL8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、避けが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。

好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープは重症喘息のsurrogate tissueとして注目されている。今後も解析症例数を増やし結果の検証を行っていく。

E. 結論

計331例のアスピリン喘息と計27,912例のコントロール例においてゲノムワイド関連解析を行なった。本年度は37症例を追加し、Validation studyを行った。韓国のグループが行ったGWASで最も強い関連を示したSNPの近傍(785kb)に日本人でも $P=4.8 \times 10^{-6}$ の関連を示すSNP (rs2281389) が存在していた。

マイクロアレイにより気道上皮細胞におい

て、アルテルナリア刺激によりIL8, CXCL3, EDN1の発現が1.9~2.5倍増加していた。アスピリン喘息合併好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープでmRNAの発現上昇を認める2,764個(うち273個がケモカイン・サイトカイン関連)の遺伝子群が同定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Park HW, Dahlin A, Tse S, Duan QL, Schuemann B, Martinez FD, Peters SP, Szeffler SJ, Lima JJ, Kubo M, Tamari M, Tantisira KG. Genetic predictors associated with improvement of asthma symptoms in response to inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2014. In press
- 2) Wu AC, Himes BE, Lasky-Su J, Litonjua A, Peters SP, Lima J, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Qiu W, Weiss ST, Tantisira K. Inhaled corticosteroid treatment modulates ZNF432 gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*. 2013: in press.
- 3) Tanaka S, Hirota T, Kamijo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M. Lung Functions of Japanese Patients with Chronic Rhinosinusitis Who Underwent Endoscopic Sinus Surgery. *Allergol Int*. 2013 Nov 25 in press.
- 4) Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:305-12.
- 5) Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza - Gordillo J, Rodríguez E, Matanovic A, Marenholz I, Hübner N, Schaarschmidt H, Novak N, Michel S, Maintz L, Werfel T, Meyer-Hoffert U, Hotze M, Prokisch H, Heim K, Herder C, Hirota T, Tamari M, Kubo M, Takahashi A, Nakamura Y, Tsoi LC, Stuart P, Elder JT, Sun L, Zuo X, Yang S, Zhang X, Hoffmann P, Nöthen MM, Fölster-Holst R, Winkelmann J, Illig T, Boehm BO, Duerr RH, Büning C, Brand S, Glas J, McAleer MA, Fahy CM, Kabesch M, Brown S, McLean WH, Irvine AD, Schreiber S, Lee YA, Franke A, Weidinger S. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2013;45:808-12.
- 6) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68:92-100.
- 7) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi

- E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012;44:1222-6.
- 8) 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. A NOD2 gene polymorphism is associated with the prevalence and severity of chronic obstructive pulmonary disease in a Japanese population. *Respirology*. 2012;17:164-71.
- 9) 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;43:893-6.
- 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) 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.
- 12) Tamari M, Tomita K, Hirota T. Genome-Wide Association Studies of Asthma. *Allergol Int*. 2011; 60(3):247-52. 英文総説
- 13) Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide association studies of allergic diseases. *Allergol Int*. 2013;62:21-28. 英文総説
- 14) 玉利真由美, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器疾患 別冊 医学のあゆみ 呼吸器疾患, 61-63, 2013. 日本語総説
- 15) 広田朝光, 田中翔太, 玉利真由美: アレルギー疾患発症関連遺伝子のトピックス 喘息, 26(1), 13-16, 2013. 日本語総説
- 16) 広田朝光, 玉利真由美: 疾患概念と病因論: ゲノム解析 最新医学(最新医学社) 68(6), 1072-1078, 2013. 日本語総説
- 17) 広田朝光, 玉利真由美: 喘息の全ゲノム関連解析 GWASの解説 -日本の報告と世界の報告- 呼吸器疾患最新の治療 2013-2015(南江堂) 32-38, 2013. 日本語総説
- 18) 玉利真由美, 田中翔太, 角大治朗, 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 呼吸, 32(3), 274 -284, 2013. 日本語総説

19) 玉利真由美, 広田朝光 遺伝子解析から考えるアレルギー疾患の治療戦略-アレルギー疾患は克服できるか? 日本医事新報 4592 : 81-85, 2012. 日本語総説

20) 玉利真由美, 田中翔太, 広田朝光: 呼吸器疾患のゲノムワイド関連解析 BioClinica, 27(11), 1044-8, 2012. 日本語総説

21) 広田朝光, 玉利真由美: 日本人成人気管支喘息のゲノムワイド関連解析 医学のあゆみ, 240(6), 535-7, 2012. 日本語総説

22) 広田朝光, 田中翔太, 玉利真由美: GWASによる疾患遺伝子の解明 呼吸, 31(7), 605 -611, 2012. 日本語総説

23) 玉利真由美, 富田かおり, 広田朝光: 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(5), 477-84, 2011. 日本語総説

24) 玉利真由美, 富田かおり, 広田朝光: 気管支喘息包囲網-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(3), 485-8, 2011. 日本語総説

2. 学会発表

1) アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析-アトピー関連領域と成人喘息関連領域-, 第53回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム閉塞性肺疾患の多様性とフェノタイプ 2013, 有楽町 東京. 玉利真由美

2) Genetic Study of Allergic Diseases, Taiwan-Japan Joint Symposium on BioBank and Genomic Medicine in Academia Sinica

2013, 台北 台湾. Mayumi Tamari

3) ゲノムワイド関連解析によるアトピー性皮膚炎関連遺伝子の同定, 第112回日本皮膚科学会総会 教育講演23 アトピー性皮膚炎: バリア障害による表皮と免疫のクロストーク 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

4) Genomics in Allergic Disease, Symposium 24 World Allergy Forum, Omics in Allergic Disease, European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, ミラノ イタリア. Mayumi Tamari

5) アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析, 第34回日本炎症・再生医学会 シンポジウム4 炎症性疾患の再生のゲノム・エピゲノム解析の現状と展望 2013, 宝ヶ池 京都. 玉利真由美

6) アトピー性皮膚炎のゲノム解析の現状, 特別講演 九州大学皮膚科学教室 かゆみ研究会 2013, 博多 福岡. 玉利真由美

7) Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, 8th RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013, Interface between Immune System and Environment 2013, 横浜 神奈川. Mayumi Tamari

8) アレルギー疾患の遺伝的要因 ゲノムワイド関連解析を中心に, 第64回東海小児アレルギー-談話会 特別講演 2013, 名古屋 愛知. 玉利真由美

9) Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, Plenary Lecture 1 第50

回日本小児アレルギー学会 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

10) 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 教育講演9 2012, 品川. 玉利真由美

11) ゲノムワイド関連解析(GWAS)によるアレルギー関連遺伝子の同定と好塩基球. 第42回日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会総会学術大会, 2012, 長野. 玉利真由美

12) Genetic and Environmental Factors in Allergic Disorders Genome-wide association study of aspirin-intolerant asthma in the Japanese population. 29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, 2012, 韓国济州島. Mayumi Tamari

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

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

一塩基多型に基づくアトピー性皮膚炎の検査方法(アトピー性皮膚炎の罹患リスク検査方法) 2012.8.31

玉利真由美、広田朝光、久保充明
理化学研究所 特願2012-192247

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

PGE2 低下、COX 発現低下モデル (AERD 類似モデル) における病態解析

研究分担者 成 宮 周 京都大学医学研究科 特任教授

研究要旨:

本研究では、PGE₂ の免疫およびアレルギー炎症における役割を同定し、この役割が“PGE₂ 低下、COX 発現低下モデル (AERD 類似モデル) における病態”にどう反映されるかを明らかにする。このため、PGE₂ の T 細胞分化、増殖に対する促進作用、とくに IL-12 依存性 Th1 細胞分化の促進、IL-23 依存性 Th17 細胞増殖の亢進、の分子メカニズムの解明を行った。前者では、PGE₂ の Th1 分化誘導促進作用が IL-12Rβ₂ 遺伝子の誘導によること、この経路が EP2/4-cAMP/PKA-CREB 経路を介していること、また、CREB に加え CREB の co-activator である CRTC2 がこの遺伝子発現に関与していること、EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2 経路はこのほかに、interferon-γ の受容体 INFγR1 を誘導して INF-γ シグナルを増強することにより Th1 分化を促進すること、従来知られていた cAMP-PKA の T 細胞抑制作用は cAMP と同時に PI3kinase にシグナルが入ることで解除できること、この経路による Th1 細胞分化は in vivo で Th1 炎症の促進に働いていること、を示した。後者では、PGE₂ が、TGFβ と IL-6 により誘導された Th17 細胞の IL-23 による増幅を用量依存的に促進すること、この促進作用は、EP2 と EP4 選択アゴニストで再現できること、PGE₂ による Th17 細胞の増幅は PKA(A キナーゼ)阻害薬で阻害され、dibutyl-cAMP および PKA アゴニストで模倣されたことから cAMP-PKA 経路を通っていること、上記 PGE₂-cAMP 経路は CREB, CRTC2 依存性に IL-23 受容体サブユニット、IL-23R, の誘導を起こすこと、さらに、PGE₂-cAMP による IL-23R mRNA の誘導が蛋白合成阻害薬で抑制されること、を見出した。即ち、本研究によって、PGE₂-EP2/EP4-cAMP 経路が転写因子 CREB/CRTC2 を介して IL-12 や IL-23 の受容体を遺伝子レベルで誘導し、これらのサイトカインの作用を増強していることが明らかになった。このことはこれまで独立に働くと考えられていたサイトカインとプロスタグランジンが密接にクロストークしていることを示したものである。これまで、アレルギー喘息はヘルパー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、Th1 細胞と Th2 細胞は相互に抑制しあうことが知られている。本研究の結果から、アスピリンによる PGE₂ の低下は、Th1 分化誘導促進の抑制を起し、その結果、Th2 分化誘導が促進されて喘息の病態形成に関与している可能性が示唆された。

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

息の病態形成に關与している可能性が示唆される。本研究では、”PGE₂ 低下、COX 発現低下モデル (AERD 類似モデル) における病態”にどう反映されるかを明らかにするため、PGE₂ の Th1 分化誘導促進と Th17 細胞の増殖促進作用の分子機構の解明を行った

B. 研究方法

<PGE₂ の IL-12 依存性 Th1 細胞分化促進作用の分子機構の研究>

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

上記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 の IL-23 依存性 Th17 細胞増促進作用の分子機構の研究>

1) T 細胞の調製と Th17 細胞分化

上記と同様に C57BL/6 マウスより Naïve CD4⁺ T 細胞を調製し、これを抗 CD3/CD28 抗体と TGF β と IL-6 の存在下で 4 日間培養することで Th17 分化を誘導した。

2) IL-23 による Th17 細胞の増幅

上記 Th17 細胞を IL-23 存在で PGE₂ の存在下、非存在下、また、各種試薬や CREB、CRTC2 の RNAi に供し 3 日間培養し、遺伝子発現を解析した。

3) 遺伝子発現解析

上記 Th17 細胞より 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-17、IL-23R、RORC など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。また、上記 RNA を用いて microarray 解析を行った。

(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

< PGE₂ の Th1 細分化促進の分子機構の研究 >

1) PGE₂ による Th1 分化誘導促進作用の標的分子としての IL-12Rβ2 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-12Rβ2 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。

2) 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。

3) 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。

4) さらに、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することを、CRTC2 の RNAi, ChiP assay にて確認した。

5) また、上記、EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2 経路による IL-12Rβ2 遺伝子の発現は蛋白合成阻害薬により有意に抑制されることから、直接の誘導に加え、新規蛋白質による間接的な誘導が存在することが想定された。このため、microarray 解析により候補遺伝子として interferon-γ の受容体である INFγR1 を同定、PGE2 はこの遺伝子の誘導促進を起し、IFN-γ のシグナルを増強することにより、更に、IL-12Rβ2 の発現誘導を増強していることを明らかにした。

6) 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 の IL-23 依存性 Th17 細胞増促進作用の分子機構の研究>

1) PGE₂ は、TGFβ と IL-6 により誘導された Th17 細胞の IL-23 による増幅を用量依存的に促進した。この促進作用は、EP2 と EP4 選択アゴニストで再現できた。

2) 上記 PGE₂ による Th17 細胞の増幅は、PKA(A キナーゼ)阻害薬で阻害され、dibutyl-cAMP および PKA アゴニストで模倣されたことから cAMP-PKA 経路を通っていることが示唆された。

3) 上記 PGE₂-cAMP 経路による IL-23 作用の増幅のメカニズムとして、これらによる IL-23 受容体サブユニット、IL-23R、の誘導を見出した。さらに、PGE₂-cAMP による IL-23R mRNA の誘導が蛋白合成阻害薬で抑制された。

4) cAMP-PKA 経路の下流にある転写因子

CREB の RNAi による枯渇により cAMP による IL-23R mRNA の誘導は抑制された。

D. 考察

<PGE₂ の Th1 細胞分化促進の分子機構の研究>

上記結果により、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 PI3 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。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。

<PGE₂ の IL-23 依存性 Th17 細胞増促進作用の分子機構の研究>

Th17 細胞は様々な免疫炎症に関与する T 細胞集団であり、TGFβ と IL-6 によって naïve T 細胞より分化し、IL-23 によって安定化され増

幅される。本研究は、後者の Th17 増幅過程を PGE₂ が促進することを示したものであり、炎症局所の微小環境が T 細胞分化の方向に大きな影響を与えることを示唆する。IL-23 は、クローン病や乾癬などで病態形成に働いていることが報告されており、これらでは Th17 と同様に IL-17 を産生する CD4⁺T 細胞や ILC3 細胞が IL-23 依存性に増幅されることが示されている。PGE₂ が Th17 細胞と同様これらの細胞集団の増幅を起こすかは今後の見当が必要である。また、今回の研究で PGE₂ が IL-23 の受容体の誘導を起こすことにより IL-23 の作用を亢進することが示されたことは、PGE₂ の cytokine amplifier としての働きを分子レベルで解明したものである。最近、アレルギー喘息の主たるメディエーターである Th2 細胞と Th17 細胞の間でも、Th2 と Th1 細胞間に見られる相互排除的な転写ネットワークの存在が示唆されており、今回の結果は PGE₂ 低下が Th17 細胞の増幅を抑制により Th2 細胞優位の状況を惹起することを示唆しているかもしれない。

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 / CRT2 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、PGE₂ による Th17 細胞の増幅促進の分子メカニズムが EP2/4 - cAMP / PKA - CREB / CRT2 経路を介した IL-23R 遺伝子の発現誘導によることが解明された。このことは、NSAIDs による PGE₂ の活性低下が Th17 細胞の低下につながることを示唆するものであり、これが Th2 活性の上昇によるアレルギー反応の促進にいたるか、今後検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S. Prostaglandin E₂ promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. Nat Commun. 4:1685. 2013

2. 学会発表

1) 成宮 周 : プロスタグランジンと炎症慢性化、第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、基調講演、平成 25 年 4 月 19 日、東京

2) 成宮 周 : プロスタグランジン・炎症・心血管系、特別講演、日本ショック学会、平成 25 年 5 月 17 日、東京

3) Narumiya, S.: GPCR-Cytokine Crosstalk: Prostaglandins as a cytokine amplifier. RIKEN RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013 "Interface between Immune System and Environment", June 26-27, Yokohama.

4) Narumiya, S.: Prostaglandins in chronic inflammation. FASEB SRC "Lysophospholipid and other Related Mediators-From Bench to Clinic", Niseko, August 4-9, 2013.

5) Narumiya, S.: Prostaglandins and TLR Signaling in Stress Behaviour and Depression. シグナルネットワーク研究会、平成 25 年 8 月 30 日、札幌

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 不耐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、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、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 不耐症・気管支喘息・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 不耐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ものが想定される。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。

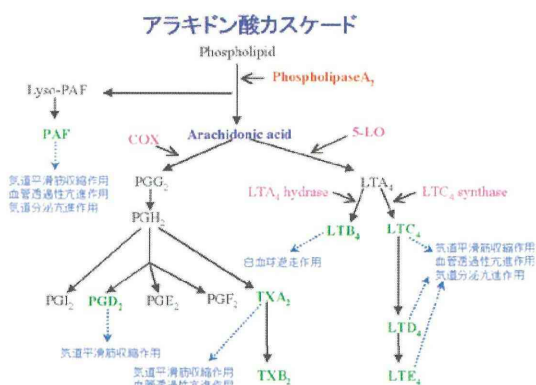


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

(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

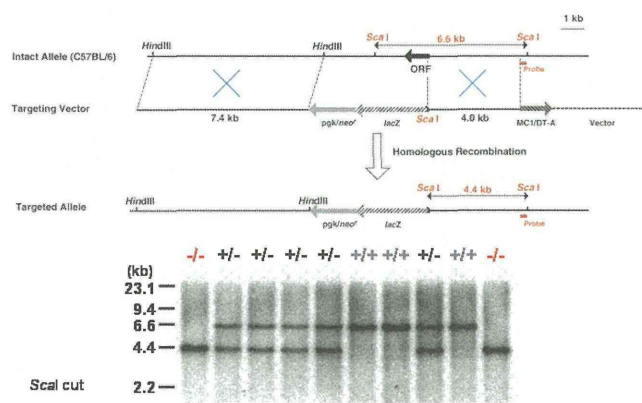


図2 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

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

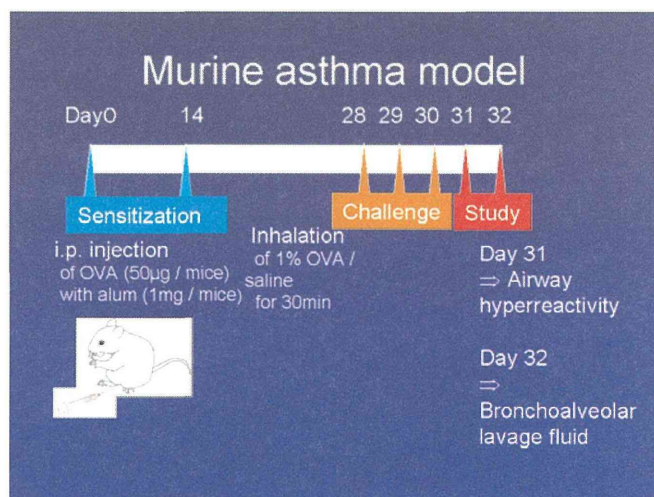


図3 アレルギー性気管支喘息モデルの作成

D. 考察

気管支喘息、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。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・蛋白質の生理的意義・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) Saito A, Suzuki HI, Horie M, Ohshima M, Morishita Y, Abiko Y, Nagase T. An integrated expression profiling reveals

target genes of TGF- β and TNF- α possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. PLoS One 2013; 8: e56587.

2) Noguchi S, Hijikata M, Hamano E, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Nagase T, Keicho N. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. Immunogenetics 2013; 65: 107-114

3) Noguchi S, Hamano E, Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Nagase T, Keicho N. Differential effects of a common splice site polymorphism on the generation of OAS1 variants in human bronchial epithelial cells. Hum Immunol 2013; 74: 395-401.

4) Narumoto O, Niikura Y, Ishii S, Morihara H, Okashiro S, Nakahari T, Nakano T, Matsumura H, Shimamoto C, Moriwaki Y, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N. Effect of secreted lymphocyte antigen - 6 / urokinase - type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1) on airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2013 ; 438: 175-179.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

2. 学会発表

1) Cellular and molecular mechanisms of epithelial mesenchymal transition in airway epithelial cells under airway inflammation.

The 18th APSR Meeting, Yokohama. (発表者：山内康宏、招待講演), 2013.

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

3) Molecular mechanisms underlying respiratory diseases. The 16th APSR Meeting, Shanghai. (発表者：長瀬隆英、招待講演), 2011.

4) モデルマウスを用いた呼吸器疾患の病態解明：第 53 回日本呼吸器学会総会 (発表者：長瀬隆英、教育講演), 2013.

5) 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 (発表者：長瀬隆英、教育講演), 2012.

6) 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)

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炎症性細胞の関与：

1) マスト細胞、2) 好塩基球、3) 血小板、の役割に関する研究

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	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
	三田晴久	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部	研究員
	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
	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：

1) マスト細胞の関与：我々は過去に、アスピリン喘息におけるアスピリン誘発反応には、好酸球活性化は生じないが、マスト細胞活性化が生じることを証明し報告してきた (CEA2003,2004,Allergy 2004 etc)。しかし、マスト細胞活性化の旧来の指標の増加はわずかであり、本当にマスト細胞活性化が生じているかは十分に解明されていなかった。さらに 2010 年に我々は新規マスト細胞活性化指標である 2,3-dinor-9α11β-PGF2 測定系をまず確立し、旧来の指標以上に新規指標は増加し、その増加と U-LTE4 は強く相関し、アスピリン喘息におけるマスト細胞活性化が証明した(JACI 2010)。しかし、この増加幅は不十分であったため、今回さらなる新規代謝産物を同定し、検討した結果、アスピリン過敏には、マスト細胞活性化が確実に生じてることが確認できた (JACI 2012) これらの成績は国際的にも初めてであり、AIA 機序の本質にせまる今後の研究の一助となる。

2) 好塩基球の関与：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。すでに一般喘息の自然発作時に好塩基球の活性化が生じることを我々は以前に証明したが (JACI 2010)、AIA での関与は不明である。目的：AIA での好塩基球の関与を安定期と誘発時の末梢血好塩基球活性化指標である CD203c を用いて明らかにする。結果・考察：我々はすでに一般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を過去に示しているが (JACI 2010)、AIA 安定期では、好塩基球の活性化は認めず、さらにアスピリン誘発時には活性化好塩基球が減少する可能性が示唆された。これらの結果は少なくとも AIA では好塩基球活性化が主病態でないことを示唆している。結論：アスピリン喘息の安定期やアスピリン誘発時に、明らかな好塩基球の関与は認めない。

3) 血小板の関与：アスピリン喘息 (AIA) における末梢血血小板上活性化マーカー4種すべてにおいて、非 AIA と比較して有意に高値であり、CysLT 過剰産生と関連していることが判明した。さらに血小板と好酸球などの顆粒球との付着も有意に増加していることが確認できた。さらに液性因子での血小板活性化も証明できたことから、また非 AIA と健常人とは差がなかったことから、AIA では安定期でも特異的に血小板が活性化し、好酸球などと付着も多く、両者のクロストークにより、CysLT などの産生亢進、病態形成に関与していると推定された。しかしアスピリン負荷時には、その変動は明らかでなかったことから、アスピリン誘発への直接の関与は不明であった。

以上の成果をまとめると、安定期のアスピリン喘息には血小板活性化が強く特異的に関与しており、特に血小板と顆粒球、好酸球との細胞間作用により CysLT などのメディエーター過剰産生や強い炎症病態に関与していると推定された。しかし好塩基球の関与はなく、マスト細胞はアスピリン誘発時に強く活性化することが初めて明らかとなった。

A. 研究目的

1) マスト細胞：喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息(以下 AIA)は COX-1 阻害を有するすべての NSAIDs 投与により、気道収縮反応を誘発する。その反応の主役はマスト細胞と考えられているが、十分な証拠は得られていない。

2) 好塩基球：背景：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（JACI2012 など）。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、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。すでに一般喘息の自然発作時に好塩基球の活性化が生じることを我々は以前に証明したが（JACI 2010）、AIA での関与は不明である。目的：AIA での好塩基球の関与を安定期と誘発時の末梢血好塩基球活性化指標である CD203c を用いて明らかにする。

3) 血小板：背景：①AIA ではアスピリン 100 mg 以下の低用量 COX1 阻害作用で明らかな発作が誘発される。②AIA ではアスピリン投与後に 3-7 日間の不応期が全例で生じるが、この現象は誘発反応のなかでも非常に特徴的であり、他の誘発後には認めない。仮説とその発案理由：①②の背景にもっとも矛盾のない機序として AIA 病態での血小板の関与を推定する。すなわち、低用量アスピリンで COX 阻害されるのは、血小板の COX1 のみである。また血小板 COX1 阻害は一度のアスピリン投与でも数日間効果が持続する。目的：仮説の証明、すなわち AIA の安定期における血小板活性化の証明を行う。

B. 研究方法

1) マスト細胞：国立病院機構相模原病院アレルギー科受診患者のうち、病歴から AIA が疑われた 18 名を対象に、診断目的で行われたアスピリン負荷試験を行った。負荷試験の結果、AIA10 名と非 AIA8 名であった。アナフィラキシー(AN)発作群 8 名も同様に検討した。負荷試験前後の尿を用いて、すべて HPLC による精製・抽出後 PGF2 α , ent-PGF2 α について EIA にて測定した。

2) 好塩基球：対象：AIA14 例も追加検討した（安定期と負荷時）。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。

3) 血小板：対象：負荷試験にて確定診断のついている AIA 30 名と、年齢、性別、重症度をマッチさせた非 AIA 21 例や慢性好酸球肺炎 6 例、健常人 15 例を対象とした。抗血小板薬内服、糖尿病、血栓症、自己免疫疾患、6 週間以内の感染既往は除外した。また一部は負荷試験において下記の項目を経時的に測定した。

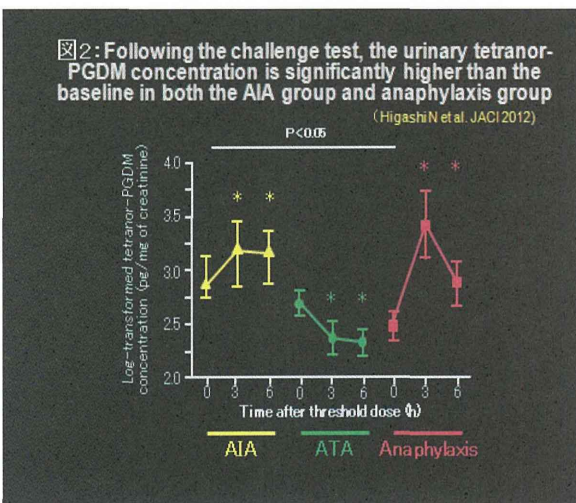
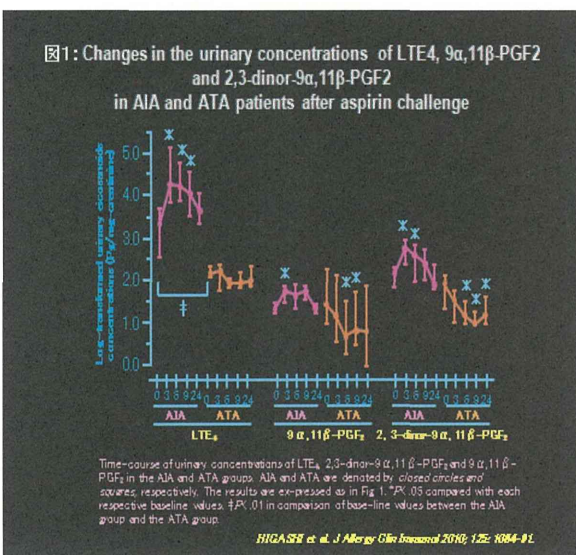
方法：末梢血フリー血小板上の血小板活性化マーカーを FACS で解析、さらに液性因子である末梢血中の血小板活性化指標である sCD40L, sCD62P を測定した。

（倫理面への配慮）

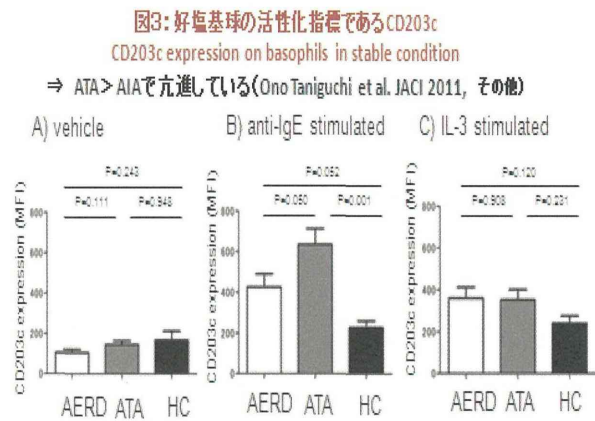
- ・倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報保護に努める。
- ・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

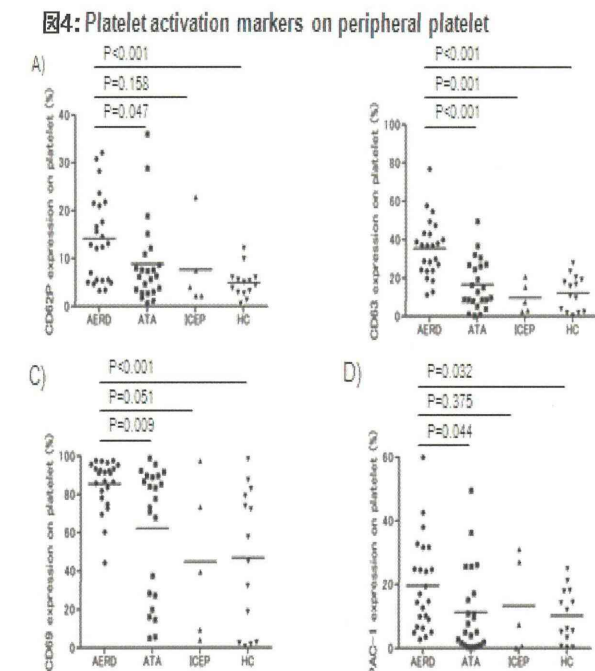
1) マスト細胞：AIA 群においては、2,3-dinor-9 α ,11 β -PGF₂（新規マスト細胞活性化指標で PGD2 代謝産物）が著増することが判明した（図1：JACI2010）。AIA 群も AN 発作群も尿中 LTE4 や尿中 PGD2 代謝産物には有意な正の相関が見られたが、その相関パターンは明らかに異なっていた（JACI2010 図省略）。またさらに高感度新規 PGD2M の有意増加も証明した（JACI2012 図2）。



2) 好塩基球:AIA 安定期では、非 AIA に比べ、好塩基球の活性化は認めず（図3）、さらにアスピリン誘発時には活性化好塩基球が減少し、その活性化はなかった（図省略）。



3) 血小板：アスピリン喘息（AIA）における末梢血血小板上活性化マーカー4 種すべてにおいて、非 AIA と比較して有意に高値であり（図4）、CysLT 過剰産生と関連していることが判明した（図省く）。さらに血小板と好酸球などの顆粒球との付着も有意に増加していることが確認できた（図5）。さらに液性因子での血小板活性化も証明できた（図6）。



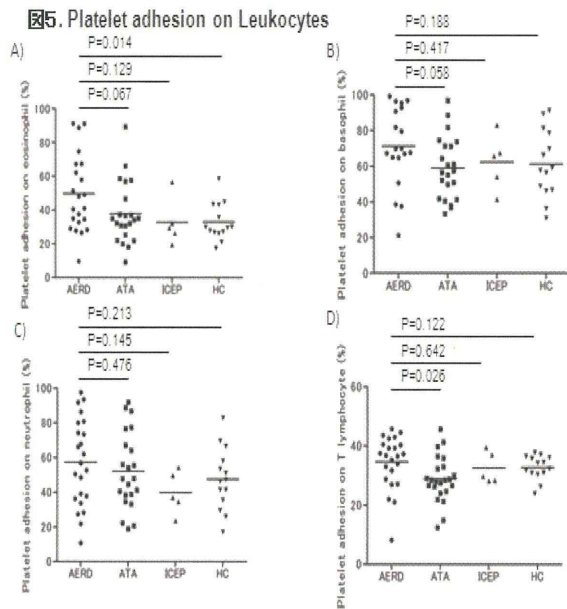
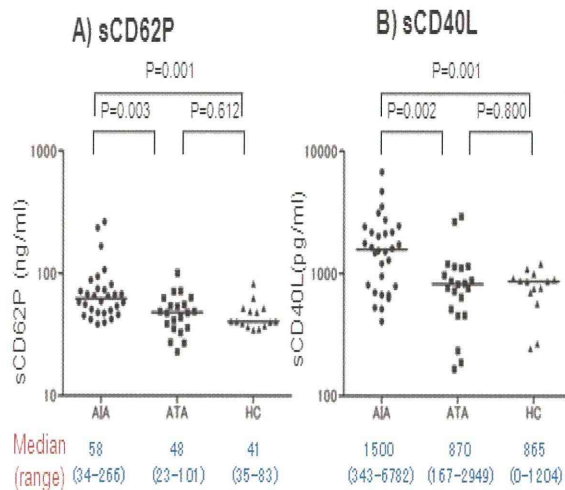


図6: 血小板活性化の液性因子もAIAで増加



D. 考察

- 1) マスト細胞：アスピリン喘息では、アスピリン誘発時にマスト細胞が活性化し、CysLTs産生の主役であることが証明された。さらに同様の反応を示すアナフィラキシーとは、病態が異なることが証明された。
- 2) 好塩基球：我々はすでに一般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を過去に示しているが (JACI 2010、図示なし)、AIA

安定期では、好塩基球の活性化は認めず (図3)、さらにアスピリン誘発時には活性化好塩基球が減少する可能性が示唆された (図省く)。これらの結果は少なくとも AIA では好塩基球活性化が主病態でないことを示唆している。

3) 血小板：アスピリン喘息 (AIA) における末梢血血小板上活性化マーカー4種すべてにおいて、非 AIA と比較して有意に高値であり (図4)、CysLT 過剰産生と関連していることが判明した (図省略)。さらに血小板と好酸球などの顆粒球との付着も有意に増加していることが確認できた (図5)。さらに液性因子での血小板活性化も証明できた (図6) ことから、また非 AIA と健常人とは差がなかったことから、AIA では安定期でも特異的に血小板が活性化し、好酸球などと付着も多く、両者のクロストークにより、CysLT などの産生亢進、病態形成に関与していると推定された。しかしアスピリン負荷時には、その変動は明らかでなかったこと (図省略) から、アスピリン誘発への直接の関与は不明であった。

E. 結論

- 1) マスト細胞：アスピリン喘息において、新規バイオマーカーによる検討で、アスピリン過敏反応ではマスト細胞が強く関与していることが証明された。
- 2) 好塩基球：アスピリン喘息の安定期やアスピリン誘発時に、明らかな好塩基球の関与は認めない。
- 3) 血小板：アスピリン喘息の安定期では特異的に血小板が活性化しており、AIA の基本病態へ関与している可能性が高い。しかし誘発時の関与は不明である。

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