

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790696
研究課題名 (和文) 喘息患者好中球のFcεRIを介した活性酸素種の産生と炎症増幅因子としての役割
研究課題名 (英文) Extracellular superoxide released from neutrophil is a critical determinant of severity of asthmatic symptoms: Role of FcεRI in asthmatic patient.
研究代表者 吉丸 哲郎 (YOSHIMARU TETSURO) 日本大学・医学部・研究員 研究者番号：80424729

研究成果の概要：本研究は、気管支喘息罹患時の好中球に機能的なFcεRIが発現することに着目し、喘息症状の重症度とFcεRIを介した活性酸素種（ROS）の産生量が相関するかどうかを解析した。喘息患者の好中球は、ダニ抗原の刺激により数分以内に細胞外へROSを産生した。一方、健常人では全く認められなかった。これらの知見は、喘息の主要アレルゲンであるダニ抗原に曝露された即時相で、好中球のFcεRIを介した細胞外へのROS放出が気管支喘息の増悪に関与することを示唆した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	360,000	2,660,000

研究分野：生化学・アレルギー学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：FcεRI、活性酸素、好中球、気管支喘息

## 1. 研究開始当初の背景

最近の厚生労働省人口動態調査結果によると、喘息患者数は400万人以上と推定され、罹患率は年々増加の一途である。その予防と対策は喫緊の要務であり、予防医療・治療根拠が明確でQuality of Lifeを損なわないドラッグデザインが望まれる。

申請者は、これまでにマスト細胞の活性化における活性酸素（ROS）の生理学的意義について研究し、レセプター（FcεRI）刺激に応じてROSが生成し、細胞の刺激応答のためのシグナル伝達における分子シグナルとして機能

していることを報告してきた。

また、研究指導者である羅らは、健常者の好中球はその表面にFcεRIをほとんど発現していないにもかかわらず、喘息患者の好中球は機能的なFcεRIを発現していることを明らかにしている。

これらの知見から、申請者は、喘息の主要アレルゲンであるダニ抗原に曝露された即時相の最も初期の段階において、FcεRIを介してマスト細胞のみならず、好中球が活性化され、ROSを放出することが気管支喘息疾患の増悪に関与するとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、喘息罹患時に好中球に発現する高親和性IgEレセプター (FcεRI) を介した好中球の活性化機構を明らかにすることにより、特に炎症の気管支喘息に対して好中球をターゲットとした新規治療法の確立を目的とするものである。

## 3. 研究の方法

(1) 症状ならびに重症度で分類した喘息患者の血液から、Polymorphoprep を用いた比重遠心法により好中球を単離し、健常人一喘息患者間での好中球表面上の FcεRI 発現量をフローサイトメトリーにより比較検討し、好中球における FcεRI の発現を解析した。

(2) 気管支喘息患者から単離した好中球をダニ抗原 (ヤケヒョウダニ: Der f, コナヒョウダニ: Der p) で刺激して、細胞表面の FcεRI を架橋、凝集させて好中球を活性化する。その活性化におけるROSの産生を、ウミホタルルシフェリン誘導体MCLAを用いた化学発光法およびスコポレチン蛍光測定法より細胞外superoxideおよびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をモニターし、活性酸素種を明らかにした。また、健常人一喘息患者間での好中球活性化による細胞外ROS産生の動態を比較検討した。

(3) ヒト抗 FcεRI 抗体の Fab 断片などを用いて、好中球をダニ抗原で刺激したときの ROS 産生に及ぼすレセプター拮抗作用を検討した。また、細胞表面上の IgE を除去したときの ROS 産生能についても検討を加えた。

(4) Src-like kinase の選択的阻害剤 PP1、Syk kinase の選択的阻害剤 piceatannol、PI-3K の選択的阻害剤 wortmannin を用いて、レセプター構成鎖のリン酸化タンパク質が ROS 産生に及ぼす影響を検討した。

(5) ROSの産生源としてNADPH oxidaseが関与するかどうかを、特異的阻害剤apocyninならびにdiphenyleneiodoniumを用いたROS産生阻害効果により検討した。

(6) 申請者らは、細胞活性化反応のシグナル伝達において細胞内ROSが重要なシグナルとなることを提示している。そこで、酸化感受性プローブdichlorodihydrofluoresceinならびにsuperoxide選択的プローブdihydroethidineを用いて、細胞内のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>およびsuperoxideを各々モニターし、健常人一喘息患者間での好中球活性化による細胞内ROS産生の動態を比較検討した。

(7) 2 群間の有意差検定は Mann Whitney

U\_test を、2 群以上の有意差検定は一元配置分散分析を用い、5%以下を有意差とした。また、2 群における関連性に関しては、pearson の相関係数を用いた。

## 4. 研究成果

本実験は、十分なインフォームドコンセントを行い、同意書による了解を得た 18 名の気管支喘息患者 (男性 13 名、女性 5 名) と 21 名の健常人 (男性 15 名、女性 6 名) の血液を用いて (表 1)、下記の研究を遂行した。さらに、気管支喘息患者をその重症度に応じて、重症度/中等持続型 (総 IgE 量: 1282 ± 164 IU/mL) と軽症間欠/軽症持続型 (総 IgE 量: 532 ± 128 IU/mL) に分類した (健常人: 390 ± 94 IU/mL)。

表1 臨床検体の年齢および性別

	喘息患者		非喘息患者
	重症度/中等持続型	軽症間欠/軽症持続型	
n数	5	13	21
age	28.2 ± 1.6	40.5 ± 4.9	28.0 ± 1.7
Male	3	10	15
	28.3 ± 2.6	38.8 ± 5.7	30.1 ± 2.3
Female	2	3	6
	28.0 ± 2.0	43.0 ± 10.6	26.3 ± 1.5

まず、症状ならびに重症度で分類した気管支喘息患者ならびに健常人の血液から、比重遠心法により好中球を単離し、好中球表面上の FcεRI 発現量をフローサイトメトリーにより調査した。その結果、健常人の好中球はその表面に FcεRI をほとんど発現していなかったにも関わらず、気管支喘息患者の好中球は機能的な FcεRI を発現していることを確認した (図 1)。

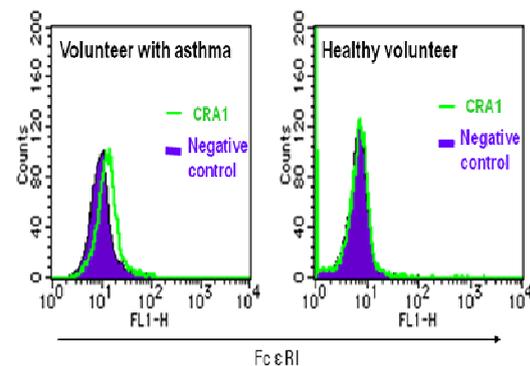


図1 FACSによるヒト末梢血好中球上のFcεRI発現量の解析  
ヒト末梢血好中球上のFcεRI発現量を抗FcεRI抗体(CRA-1)を用いて解析(FACS)

さらに、気管支喘息患者における重症度と FcεRI 発現の相関性を詳細に解析したとこ

ろ、重症度/中等持続型患者の好中球で  $Fc\epsilon RI$  の発現が顕著であり、血清中の総 IgE 量と  $Fc\epsilon RI$  の発現に有意な正の相関関係が存在することが明らかとなった (図 2)。

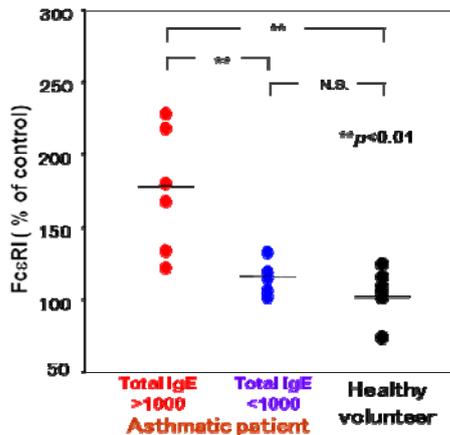


図2 ヒト好中球細胞表面上の  $Fc\epsilon RI$  の発現 (喘息患者重症度ならびに健康者との比較検討)

そこで、気管支喘息患者末梢血から単離した好中球がダニ抗原の刺激により ROS を産生するかどうか検討した。ウミホタルルシフェリン誘導体 MCLA を用いた化学発光法による解析から、ダニ抗原による刺激は、刺激後数分以内に顕著な細胞外へ ROS を産生することを明らかにした (図 3)。この反応は、superoxide のスカベンジャー SOD の存在下では著しく減少するが、カタラーゼの影響は全く受けなかったことから、ダニ抗原刺激により細胞外に superoxide が遊離されることが示唆された。なお、健康人の好中球では、上記の反応はほとんど見出せなかった (図 3)。そこで、気管支喘息の重症度と  $Fc\epsilon RI$  発現量と ROS 産生能の相関関係について ANOVA による統計学処理を行ったところ、重症度/中

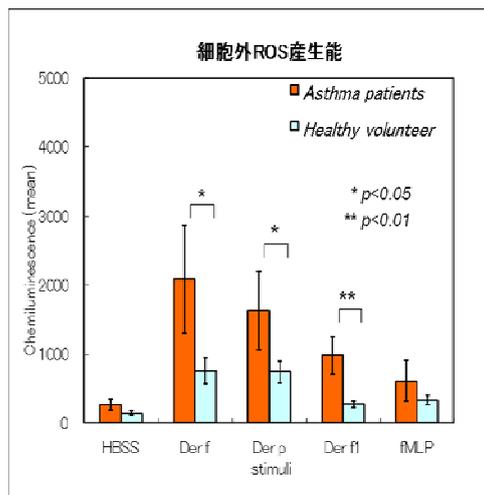


図3 ダニ抗原刺激による細胞外ROS (superoxide) 産生能 —喘息患者および健康者との比較検討—

等持続型患者では血清中の総 IgE 量が有意に高いだけでなく、Der f ならびに Der p 刺激による ROS 産生能も有意に高いことが明らかになった。以上の知見は、 $Fc\epsilon RI$  を介した ROS 産生能が気管支喘息の重症度診断の重要なファクターになり得る可能性を示唆するものである。

次に、この ROS 産生を制御する薬剤を探索した結果、NADPH oxidase の強力な阻害剤である diphenyleneiodonium が用量依存的に抑制した ( $30\ \mu M$  で 70% 以上の抑制効果)。また、 $Fc\epsilon RI$  の構成鎖である Src-like kinase、Syk kinase の選択的阻害剤によってもほぼ完全に抑制されたことから、気管支喘息の主要アレルゲンであるダニ抗原に曝露された即時相の段階において、マスト細胞の活性化と同様に、 $Fc\epsilon RI$  を介して好中球が活性化され、細胞外に ROS、特に superoxide を産生することが気管支喘息疾患の増悪や気道炎症の発症に関与することが示唆された。

さらに、申請者はマスト細胞活性化反応のシグナル伝達において、細胞内 ROS が重要なシグナルとなることを提示している。そこで、superoxide 選択的プローブ dihydroethidine を用いて好中球内の superoxide をモニターして、健康人と気管支喘息患者間での好中球活性化による好中球内の ROS 産生について検討した。その結果、ダニ抗原刺激により喘息患者の好中球内に superoxide が産生し、NADPH oxidase の阻害剤によりその superoxide が用量依存的に抑制されたことから、好中球内に産生された superoxide が好中球の刺激応答のシグナル伝達における分子シグナルとして機能することを示唆させた。

従来、気管支喘息の基礎病態は慢性の気道炎症であるものと理解されており、主たる浸潤細胞は、Th2 細胞、マスト細胞、好酸球であるとされ、とくに好酸球は気道収縮物質である  $LTC_4$  を豊富に産生するため、気管支喘息における重要なエフェクター細胞であると認識されてきた。しかしながら、抗 IL-5 抗体を使って血液中の好酸球や、気道に浸潤している好酸球をほとんどゼロレベルにしても気道過敏性は改善されないことが報告され、別の炎症細胞の関与が想定される。本研究では、個人差が大きく、日内および日差変動の変動係数も高いことから、気管支喘息における生理的意義については注目されることが少なかった気管支喘息患者末梢血の好中球に機能的な  $Fc\epsilon RI$  が発現することに着目し、喘息症状の重症度と  $Fc\epsilon RI$  を介した ROS の産生量を相関させることで、気管支喘息罹患の度合い、その重症度の判定ならびに ROS を標的とした新規の治療法の開発にも繋がっていくという点

で独創的な研究であり、ブレイクスルー型研究である。今回の研究では、気管支喘息患者の好中球に対するダニ抗原刺激によりFc・RIを介したROSの産生が有意に高値となっていることを見出しており、その産生量はその症状や重症度と相関すれば試験管内での症状予測が実現することになり、臨床的にも大きな意義があると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

(1) 福永牧子、平山倫子、権寧博、布村聡、吉岡美乃、吉丸哲郎、橋本奈緒美、服部知洋、伊藤玲子、小林朋子、橋本修、羅智靖、ダニ抗原刺激による気管支喘息患者末梢血好中球の活性酸素産生能の解析、第58回日本アレルギー学会秋季学術大会ミニシンポジウム、2008年11月29日、東京国際フォーラム

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉丸 哲郎 (YOSHIMARU TETSURO)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：80424729

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし