

機関番号：82302

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591267

研究課題名 (和文) 脂質メディエーター遺伝子改変マウスを用いたウイルス感染喘息の増悪と発症の機序解明

研究課題名 (英文) The mechanism of development and exacerbation of virus-induced asthma analyzed by a lipid mediator gene knock-out mice

研究代表者

加藤 政彦 (KATO MASAHIKO)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号：30292593

研究成果の概要 (和文)： かぜをひくことにより、なぜ喘息が悪化するのかを明らかにするため、RS ウイルス (RSV) 感染させた喘息のモデルマウスを用い、人工呼吸器管理下に気道抵抗、肺胞洗浄液 (BALF) 及び血液中の炎症性細胞比率と多種類のサイトカイン/ケモカインを網羅的に測定した。対照群に比べて卵白アルブミン (OVA) 投与群及び OVA/RSV 投与群では、気道抵抗の有意な上昇と BALF 中と気道への好酸球浸潤を認めた。BALF では、OVA/RSV 投与群において、他群に比べ MIP-1 α のみが有意に増加した。一方、血清では、対照群に比べ、OVA 投与群で IL-5 が、OVA/RSV 投与群で IL-17 が各々有意に増加した。RS ウイルス感染喘息マウスでは、MIP-1 α 等を介して好酸球性炎症が引き起こされることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)： To clarify the pathogenesis of exacerbations of asthma due to viral infection, we examined bronchial resistance, peripheral blood and bronchial alveolar fluid (BALF) analyses and multiple types of cytokines/chemokines using an experimental asthma model mice infected with respiratory syncytial virus (RSV). The levels of BALF and tissue eosinophils showed significant increase in ovalbumin (OVA) and OVA/RSV groups compared with controls. MIP-1 α in BALF was significantly increased in OVA/RSV groups compared with RSV groups, OVA groups, and control groups. Serum IL-5 in OVA groups and serum IL-17 in OVA/RSV groups were also higher than in controls. These findings suggest that eosinophilic inflammation via MIP-1 α may play an important role in acute exacerbations of asthma model induced by RSV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学

1. 研究開始当初の背景

(1) 喘息の統計

喘息の患者数は、世界各国で増加の一途をたどっている。本邦においては、平成16年お

よび 17 年の文部科学省学校保健統計調査によると、喘息の罹患率は、幼稚園から高等学校のすべての年代において増加傾向にあり、しかも 10 年前の約 2 倍となっている。さらに、喘息による死亡者数については、年間約 3,000~4,000 人であり近年減少傾向が見られるものの、米国との比較では、いまだに約 2 倍である。

(2) 原因ウイルス

喘息を悪化させる可能性のあるウイルスとしては、ライノ、Respiratory syncytial (RS)、インフルエンザ、パラインフルエンザ、エンテロなどのウイルスが報告されているが、これらの中でも特に RS ウイルスは、喘息症状の増悪と喘息の発症に関与していると考えられている。

(3) 喘息に関連するメディエーター

喘息は、好酸球をはじめとしたリンパ球、肥満細胞などの炎症性細胞による慢性の気道炎症性疾患である。特に、好酸球から放出される組織傷害性顆粒蛋白、活性酸素および脂質メディエーターは、気道炎症を惹起することから喘息などのアレルギー性疾患の病因・病態に関して非常に重要である。

(4) 我々のこれまでの検討

我々は、これまでに 174 例の小児喘息患者発作時の原因ウイルス感染について解析を行ったところ、ライノおよび RS ウイルス両方で感染が約 60%を占めていることを明らかにした（平成 18 年度文科省科学研究費助成金による研究；平成 15-17 年度環境再生保全機構（前・環境省）研究費による研究；加藤）。また、ヒト好酸球活性化における接着分子の役割については、 $\beta 2$ インテグリン、 $\alpha M\beta 2$ (CD11b/CD18) が重要であり、好酸球が組織傷害性顆粒蛋白および活性酸素の機能を発揮するためには、好酸球の細胞接着が必須であることを明らかにした (Kato M et al. Am

J Respir Cell Mol Biol, 1998)。また、RS ウイルスはヒト好酸球を活性化し、その活性化の増強効果は接着分子である $\alpha M\beta 2$ に依存していることを明らかにした (Tachibana A, Kimura H, Kato M et al. Intervirology, 2002)。さらには、脂質メディエーターである血小板活性化因子 (PAF) やロイコトリエン (LT) の好酸球活性化とその特異的なシグナル伝達機構についても明らかにした (Kato M et al. J Immunol, 2002; Suzuki M, Kato M et al. J Asthma, 2002; Kato M et al. Immunology, 2005)。以上より、本研究ではウイルス感染喘息の増悪および発症と脂質メディエーターの関連性についてウイルス感染させた遺伝子改変マウスなどを用いた実験を行う。

2. 研究の目的

ライノおよび RS ウイルスなどの呼吸器ウイルス感染は、気管支喘息（喘息）の発症と増悪の双方に関与することが知られており、この病態には、慢性の好酸球性気道炎症が関与することが示唆されている。しかしながら、これらの機序の詳細については、よく分かっていない。そこで本研究は、マウスによる喘息モデルにウイルスを感染させて、その病態を検討することにより、ウイルス感染により引き起こされる喘息の発症および増悪にどのような因子が鍵となるのかを明らかにし、新たな喘息治療に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

喘息モデルマウスに対して単回のウイルス感染を実施し、気道過敏性の亢進および好酸

球性炎症が惹起されるかどうかを検討するため以下の実験を行う。

(1) 卵白アルブミン (OVA) 感作および暴露による喘息モデルマウスの作製

OVA を腹腔に反復感作させ (2.0 mg/Kg)、一定期間後 1%OVA を 30 分間 (3 日間) 吸入暴露させる。

(2) ウイルスの調整およびマウスへの接種
RS ウイルス (A-2 strain) を HEp-2 細胞で増殖させ、シヨ糖密度勾配法により分離調整する。PAF 受容体欠損マウス (C57BL/6N genetic background)、LTB4 受容体欠損マウス (C57BL/6N) および cPLA2 欠損マウス (C57BL/6J) と wild-type マウスに、(Schwarze J et al. J Clin Invest, 1997) らの方法に従ってウイルスを経鼻的に感染させる (10^5 PFU in 50μ l PBS)。

(3) 気道過敏性の測定

ウイルス感染後、一定期間飼育したマウスに挿管し、人工呼吸器管理下で気道抵抗などの種々のパラメーターを測定する。

(4) 肺胞洗浄液 (BALF) 中の各血球数測定
Fiona J, et al. (J Exp Med, 2004) の方法に従って、それぞれのマウスから BALF を採取し、好酸球を含めた炎症性細胞の比率を検討する。

(5) 肺組織の組織学的検討

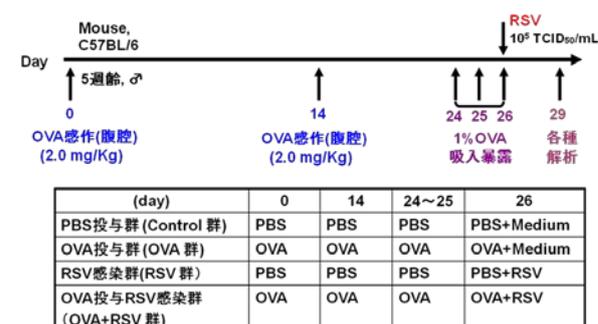
Matsuse H, et al. (J Immunol, 2000) の方法に従って、肺組織を採取・切片を作製し、さらに切片を H&E 染色し、好酸球を中心とした炎症性細胞をスコア一化し解析する。

(6) 末梢血および BALF 中の各種サイトカイン測定

末梢血および BALF のサイトカイン (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13,

IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α) を微量のサンプルから同時測定可能な方法を用いて測定する (Bio-Plex system, Bio-Rad)。なお、以上の方法の模式図を図 1 に示した。

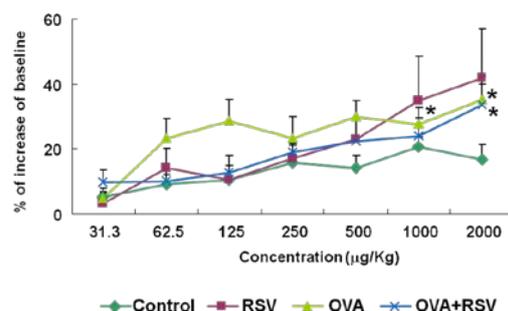
図 1. 実験方法



4. 研究成果

対照群のマウスに比べて OVA 投与群および OVA/RSV 投与群では、気道抵抗の有意な上昇 (*; $p < 0.05$, 図 2) および BALF 中の好酸球数の増加を認めた (図 3)。

図 2. 気道過敏性



肺の組織学的な検討では、対照群に比べ、OVA 投与群および OVA/RSV 投与群では、気道に明らかな好酸球浸潤を認めた (図 4)。

図 3. BALF および末梢血の細胞比率

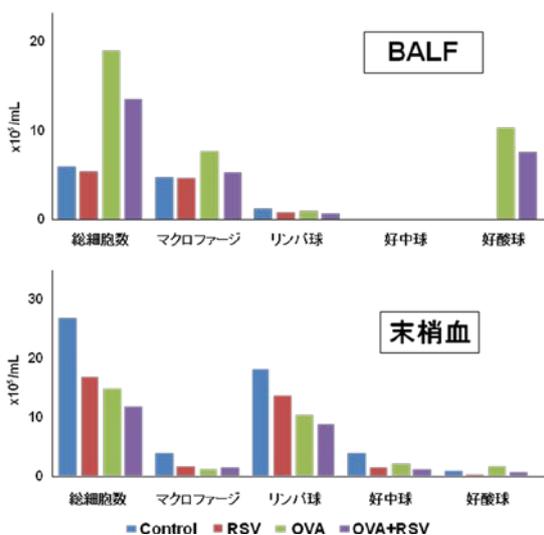
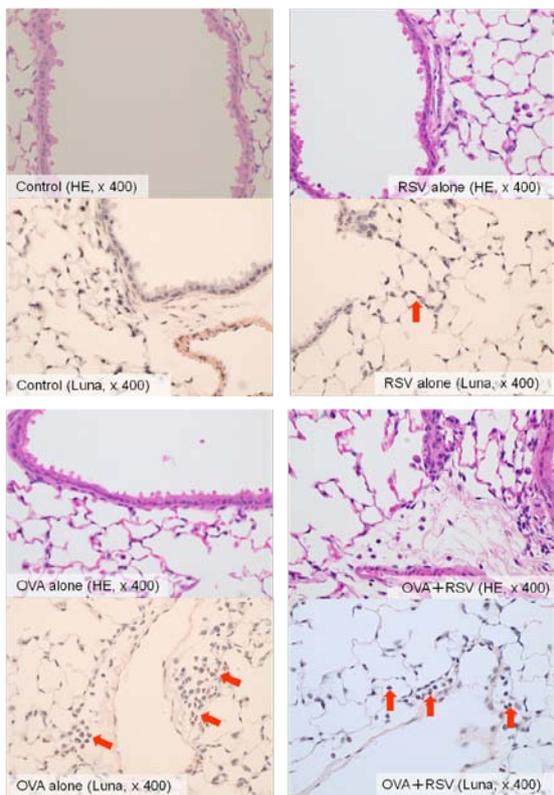


図 4. 肺組織



さらに、BALF 中では、対照群、RSV 投与群、OVA 投与群に比べ、OVA/RSV 投与群で MIP-1 α のみが有意に増加した(*; $p < 0.05$, 図 5)。一方、血清では、対照群に比べ、OVA 投与群で

IL-5 が有意に高く、OVA/RSV 投与群で IL-17 が有意に増加していた。また、IL-10 は、対照群に比べ RSV 投与群で有意に高く、その亢進は、OVA 投与群および OVA/RSV 投与群で有意に低下した(図 6)。

図 5. BALF 中のサイトカイン/ケモカイン

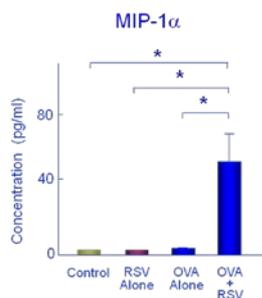
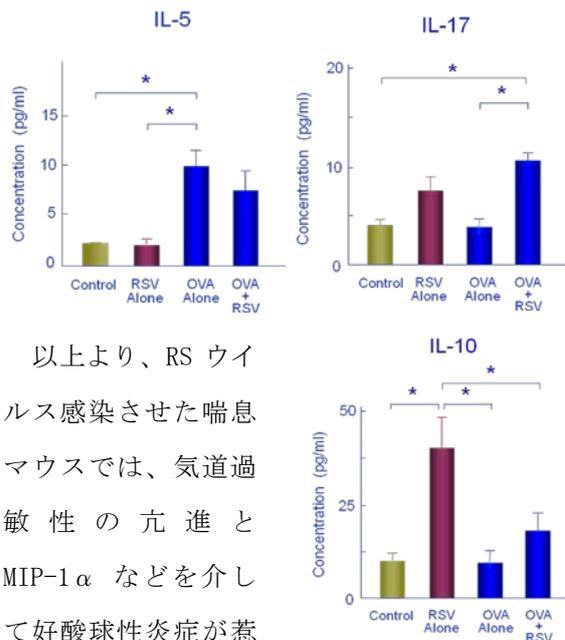


図 6. 末梢血中のサイトカイン/ケモカイン



以上より、RS ウイルス感染させた喘息マウスでは、気道過敏性の亢進と MIP-1 α などを介して好酸球性炎症が惹

起されること、また IL-10 は、RS ウイルス感染喘息の病態に抑制的に働いている可能性が示唆された。今後、これらの因子は、新たなウイルス感染喘息の治療ターゲットになる可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 32 件)

1. Yamaguchi T, Kimura H, Kurabayashi M, Kozawa K, Kato M. Interferon- γ enhances human eosinophil effector functions induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-5. *Immunol Lett.* 2008; 118: 88-95.
2. Okazaki K, Kondo M, Kato M, Kakinuma R, Nishida A, Noda M, Taniguchi K, Kimura H. Serum cytokines/chemokines profiles in neonates with meconium aspiration syndrome. *Pediatrics.* 2008; 121: e748-753.
3. Yoshizumi M, Nakamura T, Kato M, Ishioka T, Kozawa K, Wakamatsu K, Kimura H. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol Int.* 2008; 32: 1405-1411.
4. Yamada Y, Sanchez-Aguilera A, Brandt EB, McBride M, Al-Moamen NJ, Finkelman FD, Williams DA, Cancelas JA, Rothenberg ME. FIP1L1/PDGFR alpha synergizes with SCF to induce systemic mastocytosis in a murine model of chronic eosinophilic leukemia/hypereosinophilic syndrome. *Blood.* 2008; 112: 2500-2507.
5. Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, Morio T, Yachie A, Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr Int* 2010; 52: e196-e199.
6. Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 22: e87-e94.
7. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Serum eosinophil cationic protein and 27 cytokines/chemokines production in acute exacerbation of childhood asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 152(Suppl 1): 62-66.
8. Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int* 2010 Oct 27. [Epub ahead of print]
9. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Differential effects of corticosteroids on serum eosinophil cationic protein and cytokine production in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, in press.
10. 加藤政彦. 小児気管支喘息発作時の原因ウイルスとサイトカイン/ケモカイン産生および好酸球の活性化. *日本小児呼吸器疾患学会誌* 2010; 21: 134-142.

以上の全ての論文は査読有

その他、欧文 15 編、和文 7 編

〔学会発表〕（計 40 件）

1. 加藤政彦, 山田佳之, 中嶋直樹, 丸山健一, 林 泰秀. 小児気管支喘息発作時の原因ウイルスの同定とサイトカイン産生および好酸球活性化の検討. 第 45 回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2008. 12. 13.
2. Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Rhinovirus enhances eosinophil activation through the production of IL-5 in acute exacerbation of childhood asthma. 65th Annual meeting of American Allergy, Asthma and Immunology. Washington, DC, USA, 2009. 3. 17.
3. Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and respiratory syncytial virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. 6th Biennial International Eosinophil Symposium, Bruges, Belgium, 2009. 7. 10.
4. 加藤政彦, 山田佳之, 丸山健一, 林 泰秀. 小児気管支喘息発作時の原因ウイルスの同定とサイトカイン/ケモカイン産生および好酸球活性化の検討. 第 42 回日本小児呼吸器疾患学会, 高崎, 2009. 10. 18.
5. 加藤政彦, 山田佳之. 小児気管支喘息発作時の原因ウイルスの同定とサイトカイン産生および好酸球活性化の検討. 第 59 回日本アレルギー学会学術大会, 秋田, 2009. 10. 30.
6. 加藤政彦, 山田佳之, 丸山健一, 林 泰

秀. 気管支喘息発作時の原因ウイルスの同定とサイトカイン産生、好酸球活性化の検討(続報). 第 113 回日本小児科学会学術集会, 盛岡, 2010. 4. 23.

7. 加藤政彦, 山田佳之. ライノおよび RS ウイルスによる小児気管支喘息発作時の血清中サイトカイン産生と好酸球活性化の相違について. 第 60 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2010. 11. 25.
8. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Differential effects of systemic corticosteroids on serum eosinophil cationic protein and cytokine profile in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood asthma. 67th Annual meeting of American Allergy, Asthma and Immunology. San Francisco, USA, 2011. 3. 19.

その他、国際学会発表 3 題、国内発表 29 題

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 政彦 (KATO MASAHIKO)
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員
研究者番号：30292593

(2) 研究分担者

山田 佳之 (YAMADA YOSHIYUKI)
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員
研究者番号：80309252

林 泰秀 (HAYASHI YASUhide)
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員
研究者番号：30238133

(3) 連携研究者

なし