

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591092

研究課題名(和文)重症喘息におけるアレルギー性好中球性気道炎症の機序の解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Mechanism and therapy of neutrophilic allergic airway inflammation in severe asthma

研究代表者

金廣 有彦(KANEHIRO, ARIHIKO)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20243503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息の重症・難治化の機序に好酸球性気道炎症のみでなく、アレルギー性好中球性気道炎症が重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、そのメカニズムは非常に複雑でこれまで明らかにされていなかった。我々は、慢性喘息モデル、気道リモデリングモデル、さらに喘息の重症難治化に関与するCOPDモデルを作製し詳細に検討した結果、好中球エラスターゼが気道過敏性の亢進および気道炎症に極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。またロイコトリエン受容体拮抗薬がCOPD合併喘息において、好酸球性気道炎症および好中球性気道炎症、さらに気腫性病変に対する有意な抑制効果を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Severe asthma is often associated with neutrophilic allergic inflammation in the airways. Neutrophils contain elastase, a potent secretagogue in the airways, nonetheless the role for neutrophil elastase as well as neutrophilic inflammation in allergen-induced airway responses is not well defined. We have investigated the impact of neutrophil elastase inhibition on the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR) in previously sensitized and challenged mice. We indicate that neutrophil elastase plays an important role in the development of the neutrophilic and eosinophilic airway inflammation and hyperresponsiveness. Furthermore, we demonstrate that treatment with cysteinyl leukotriene receptor antagonist significantly suppressed the AHR, static compliance, and eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in OVA sensitization and challenge asthma model with porcine pancreatic elastase (PPE) instillation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：重症喘息 アレルギー 好中球性炎症 気道炎症 好中球エラスターゼ 好中球エラスターゼ阻害薬
ロイコトリエン受容体拮抗薬 IL-17

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、気道過敏性の亢進と慢性的なアレルギー気道炎症が特徴であり、IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカインを分泌する抗原特異的 CD4T 細胞と好酸球がその中心的役割を担っていると考えられてきた。これまで申請者らは種々の喘息モデルを作製し、世界ではじめて $\gamma\delta$ T 細胞が気道過敏性を制御している可能性を *Nature Med* (1999;5:1150-1156) に報告し、さらに $\gamma\delta$ T 細胞サブセットである $V\gamma 4^+$ T 細胞とくに $V\gamma 4^+CD8\beta^+$ T 細胞が、MHC class I 依存性に $\alpha\beta$ T 細胞と独立して気道過敏性を抑制的にコントロールしていることを明らかにしてきた。また CD4T 細胞だけでなく、CD8T 細胞が IL-13 を産生し気道過敏性とアレルギー性気道反応に促進的に働くことを明らかにした (*J Immunol* 2004;172:2549-2558. *Nature Med* 2004;10:865-869)。一方申請者らは気道リモデリングモデルを作製し、TGF- β 等の増殖因子が重要な役割を果たしており、再生治療としての hepatocyte growth factor (HGF) の有効性を報告した (*Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:268-280. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:366-377. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;145:324-339)。

また我々はすでに重症・難治性喘息患者の気管支生検および気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検討から、気道局所への好中球の有意な集積とロイコトリエン B4 (LTB4) レベルの有意な増加を報告してきたがその機序は未だ明らかではない。これまで国内外において喘息の発症、難治化における好中球性気道炎症の発現機序の詳細な検討は全くなされておらず、現在の喘息治療の根幹をなす吸入ステロイド薬は本病態に効果は認められない。申請者らの研究により好中球と T 細胞とくに CD8T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、Th17 細胞および制御性 T 細胞との相互作用を中心として、LTB4 や各種サイトカイン、ケモカイン、増殖因子

等による複雑なアレルギー性好中球性気道炎症のメカニズムが解明されれば重症・難治性喘息の機序の解明および早急な新規治療薬の開発が可能となる。

2. 研究の目的

気管支喘息はアレルギー性気道炎症と気道過敏性の亢進を特徴とするが、近年高齢化とともに高齢者喘息の増加と気道のリモデリング形成による非可逆性の重症・難治性喘息症例が増加している。これまで考えられていた Th2 リンパ球、好酸球を中心とした好酸球性気道炎症のみでなく、重症化の機序にステロイド薬の効果が認められないアレルギー性好中球性気道炎症が重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、そのメカニズムは非常に複雑で未だ明らかではないが、本研究によりターゲット細胞が同定できれば、分子生物学的に重症喘息の発症、増悪を制御し得る新たな治療薬が開発できる可能性があり、本研究は喘息死ゼロの達成を視野にいられた極めて重要な研究である。

3. 研究の方法

(1) 各種重症喘息マウスモデルの作製と評価
すでに申請者らのグループにより確立された気道リモデリングプロトコール (*Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;268-280. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:366-377) を基本として、CD8欠損マウス、 $\gamma\delta$ TCR欠損マウス、BLT1欠損マウスおよびCCR5欠損マウス、CXCR3欠損マウスなどに卵白アルブミン(OVA)で感作曝露後、OVAにて隔日で4週間持続曝露し重症喘息マウスモデルを作製し、気道過敏性、コンプライアンス、BALF中の炎症細胞数やサイトカイン、ケモカイン、増殖因子およびロイコトリエンレベルの測定、また気道粘膜下結合組織の線維化、気道平滑筋の増殖肥厚など肺組織の病理学的検討を行う。肺機能はマウスに気管内挿管後吸入メサコリンに対する lung resistance/ dynamic compliance を

dose-dependentかつtime course-dependentにコンピュータ処理による解析装置 (Scireq社: FlexiVent) にて詳細に検討する。さらにこれらのマウスモデルにLTB4、BLT1阻害薬 (CP105.696)、anti-CD8 mAbなどを投与しアレルギー性炎症、肺機能、肺組織を比較検討する。

(2) IL-17欠損マウス、IL-17R欠損マウス重症喘息マウスモデルを作製し、アレルギー性気道炎症、気道過敏性、肺組織の病理学的検討を行う。さらにLTB4、BLT1阻害薬 (CP105.696)などを投与し比較検討する。一方野生型マウスおよび各種欠損マウスモデルに recombinant IL-17 や anti-IL-17 mAbなどを投与し同様に好中球の集積および気道局所のアレルギー性好中球性炎症メカニズムにおける Th17 T細胞の役割を明らかにする。

(3) CD8T細胞に発現するケモカインレセプターCCR5の気管支喘息における役割は未だ明らかではない。CCR5およびCXCR3欠損マウスを使用して重症喘息モデルを作製し、BLT1とCCR5あるいはCXCR3を発現したCD8T細胞のアレルギー性好中球性気道炎症における役割について詳細に検討する。

(4)さらに近年、高齢化とともにCOPD合併気管支喘息の患者数は増加の一途をたどっているが、非可逆性でありかつ重症・難治化する症例が多く、本症の相乗的増悪メカニズムの解明および早急な新規治療薬の開発が望まれる。現在COPDの機序として好中球とともにCD8T細胞の関与が想定されているがその詳細は未だ明らかでない。本研究では重症喘息モデルにエラスターゼの気管内投与±喫煙曝露によりCOPD合併喘息モデルを作製し、好中球とCD8T細胞、Th17T細胞、制御性T細胞さらにIL-17、LTB4による複雑なメカニズムを解明する。

4. 研究成果

気管支喘息はアレルギー性気道炎症と気道

過敏性の亢進を特徴とするが、近年高齢化とともに高齢者喘息と重症・難治性喘息症例が増加している。これまで考えられていたTh2リンパ球、好酸球を中心とした好酸球性気道炎症のみでなく、重症化の機序にステロイド薬の効果が認められないアレルギー性好中球性気道炎症が重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、そのメカニズムは非常に複雑で未だ明らかではない。我々は慢性喘息モデル、気道リモデリングモデル、さらに喘息の重症難治化関与するCOPDモデルを作製し検討した。

好中球性気道炎症の機序において、好中球が産生する好中球エラスターゼが気道障害などに関与している可能性が想定されていたがその詳細は明らかではなかった。申請者らは好中球エラスターゼ阻害薬を慢性喘息モデルに投与することにより、好中球エラスターゼが気道過敏性の亢進および気道炎症において極めて重要な役割を果たしていることを明らかにし、「Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge」として *Respiratory Research* に報告した。

さらに、好中球性気道炎症の機序において重要なサイトカインであるIL-17についてIL-17欠損マウスを用いて検討し、IL-17が肺気腫の病態に非常に重要な役割を果たしていることを明らかにし、「IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice」として *Respiratory Research* に発表した。

我々は好中球の集積、活性化に極めて重要なメディエーターであるleukotriene B4 (LTB4)に特異的な細胞膜7回貫通型の受容体であるleukotriene B4 receptor 1 (BLT1)の気道炎症局所への好中球を中心とした炎症細胞の遊走および活性化について検討した。その結果、BLT1阻害薬がすでに完成された慢性気道炎

症および気道過敏性を抑制することにより抗原誘発遅発型気道反応を有意に抑制することを明らかにし、呼吸器・アレルギー疾患における基礎研究の top journal である *Am J Respir Cell Mol Biol* に、「Blocking the Leukotriene B4 Receptor 1 Inhibits Late Phase Airway Responses in Established Disease」として論文化した。さらに、CD8 T 細胞の気道局所への遊走に重要なケモカインである CCR5 について詳細に研究し、*Am J Respir Cell Mol Biol* に、「Requirement for CCR5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation」として報告した。引き続き IL-17 欠損マウス、IL-17R 欠損マウス、BLT1 欠損マウスなどを用いて好中球と CD8 T 細胞、Th17 T 細胞、制御性 T 細胞との相互作用および好中球の気道局所への集積と活性化における複雑なアレルギー性好中球性気道炎症のメカニズムを解明中である。

また、選択的ロイコトリエン受容体拮抗薬であるモンテルカストが、喘息のアレルギー性好酸球性気道炎症および気道過敏性に対する抑制効果のみでなく、肺気腫の好中球性気道炎症、気腫性病変に対する有意な抑制効果を有することが明らかとなった。さらに、近年著明に増加している肺気腫合併喘息における好酸球性および好中球性気道炎症、またこれらに起因する気道および肺組織の障害に対する有意な抑制効果を有することを世界で始めて明らかにし、*Am J Respir Cell Mol Biol* に、「Effect of a Cysteinyl Leukotriene Receptor Antagonist on Experimental Emphysema and Asthma Combined with Emphysema」として報告した。今後モンテルカストは、喘息のみでなく肺気腫および肺気腫合併喘息の新たな治療戦略になり得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)

(英文雑誌論文)(計23件)

1. Ikeda G, Kanehiro A, et al. Effect of a Cysteinyl Leukotriene Receptor Antagonist on Experimental Emphysema and Asthma Combined with Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50:18-29. 2014. 査読有. doi: 10.1165/rcmb.2012-0418OC.
2. Kurimoto E, Kanehiro A, et al. IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. *Respir Res* 14:5. 2013. 査読有. doi: 10.1186/1465-9921-14-5.
3. Koga H, Kanehiro A, et al. Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. *Respir Res* 14:8. 2013. 査読有. doi: 10.1186/1465-9921-14-8.
4. Ueno-Iio T, Kanehiro A, et al. Effect of fudosteine, a cysteine derivative, on airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling in a murine model of asthma. *Life Sci* 92:1015-1023. 2013. 査読有. doi: 10.1016/j.lfs.2013.03.022.
5. Kudo K, Miyahara N, et al. A definite case of (L)-carbocysteine-induced pneumonia with CATCH22 syndrome. *Intern Med* 52:97-100. 2013. 査読有.
6. Sagara H, Kanehiro A, et al. Evaluation of the usefulness of objective clinical tests for diagnosis of mild asthma in the early stage. *Allergol Immunol* 19 1310-1321. 2012. 査読有.
7. Kanehiro A, Atsuta R, et al. Survey on the instructions (action plans) prescribed by asthma

- experts in Japan. *Allergol Immunol* 19:1310-1321. 2012. 査読有.
8. Kanehiro A. Allergic rhinitis and comorbid asthma –Management (Medications)-. *Allergy in Practice* 32:32-37.2012. 査読有.
 9. Waseda K, Kanehiro A, et al. Churg-Strauss syndrome with necrosis of the toe tips. *Acta Med Okayama* 65:215-218. 2011. 査読有.
 10. Waseda K, Kanehiro A, et al. Blocking the leukotriene B4 receptor1 inhibits late asthmatic responses in establish disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:851-857. 2011. 査読有. doi: 10.1165/rcmb.2010-0455OC.
 11. Fuchimoto Y, Kanehiro A, et al. Requirement for CCR5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:1248-1255. 2011. 査読有. doi: 10.1165/rcmb.2010-0465OC.
 12. Waseda K, Kanehiro A, et al. Successful Extracorporeal Life Support for Life-threatening Hypercapnia with Bronchiolitis Obliterans after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Acta Med Okayama* 65:403-406. 2011. 査読有.
 13. Miyahara S, Miyahara N, et al. Measurement of early-phase, late-phase, and nonspecific nasal responses in allergic rhinitis mouse by whole body plethysmography. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 137:141-145. 2011. 査読有.
 14. Iio K, Kanehiro A, et al. Experimental pulmonary granuloma mimicking sarcoidosis induced by Propionibacterium acnes in mice. *Acta Med Okayama* 64:75-83. 2010. 査読有.
 15. Yuzurio S, et al. Interstitial lung disease during trimethoprim/sulfamethoxazole administration. *Acta Med Okayama* 64:181-187. 2010. 査読有.
 16. Takeda K, Miyahara N, et al. Effects of combination therapy with montelukast and carbocysteine in allergen-induced airway hyperresponsiveness and airway inflammation. *Br J Pharmacol* 160:1399-407. 2010. 査読有. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00797.x.
 17. Matsuda H, Miyahara N, et al. Plasticity of invariant NKT cell regulation of allergic airway disease is dependent on IFN-gamma production. *J Immunol* 185:253-262. 2010. 査読有. doi: 10.4049/jimmunol.0902301.
 18. Fujii M, Kanehiro A, et al. Diffuse alveolar hemorrhage with chronic thyroiditis in an advanced-age adult. *Respiratory Medicine CME* 2010;3: 90–92. 2010. 査読有.
- [和文雑誌論文](計22件)
1. 後藤田裕子、金廣有彦, 他. 縦隔リンパ節転移のみで術後再発した腎細胞癌にEBUS-TBNAが有効であった1例. 気管支学35:525-529. 2013. 査読有.
 2. 古賀 光、金廣有彦, 他. 大学職員における受動喫煙の認識と尿中コチニン濃度を指標とした受動喫煙に関する調査. 日本呼吸器学会誌 2:175-181. 2013. 査読有.
 3. 金廣有彦. 呼吸器疾患の診断と治療(II) 薬剤誘起性肺炎. 医学と薬学69:249-255. 2013. 査読有.
 4. 金廣有彦, 他. 客観的検査指標による発症早期の軽症喘息診断治療の有用性の検. *Allergy and Immunology* 19:124-135. 2012. 査読有.
 5. 金廣有彦, 他. IAA研究会. 喘息治療の専門医の治療指示実態調査. *Allergy and Immunology* 19:96-106. 2012. 査読有.

6. 金廣有彦. アレルギー性鼻炎と喘息の合併-治療-. アレルギーの臨床 32:32-37. 2012. 査読有.

〔学会発表〕(計36件)

1. Kurimoro E, Kanehiro A, et al. The effect of trehalose for the allergen-induced airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. 23th European Respiratory Society Annual Congress. 2013. (バルセロナ)
2. Taniguchi Y, Kanehiro A, et al. Requirement for the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in allergen-induced airway inflammation. 108th Annual International Conference of the American Thoracic Society International Conference. 2013. (フィラデルフィア)
3. Kurimoro E, Kanehiro A, et al. IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. 108th Annual International Conference of the American Thoracic Society International Conference. 2013. (フィラデルフィア)
4. Taniguchi Y, Kanehiro A, et al. Contrasting roles for the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in allergic airway inflammation versus airway hyperresponsiveness. 107th Annual International Conference of the American Thoracic Society International Conference. 2012. (サンフランシスコ)
5. Kurimoro E, Kanehiro A, et al. Trehalose alleviates allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. 107th Annual International Conference of the American Thoracic Society International Conference. 2012. (サンフランシスコ)
6. Waseda K, Kanehiro A, et al. Importance of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) to the development of

elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. 106th Annual International Conference of the American Thoracic Society International Conference. 2011. (デンバー)

7. Ikeda G, Kanehiro A, et al. Effect of Cysteinyl Leukotriene Receptor Antagonist on airway hyperresponsiveness, airway inflammation, and the development of emphysematous change in a murine model of COPD combined with bronchial asthma. 105th Annual International Conference of the American Thoracic Society International Conference. 2010. (サンディエゴ)

〔図書〕(計5件)

1. 金廣有彦. 呼吸療法・呼吸管理における5years文献レビュー2009-2013 (共著), 240(91-104). 克誠出版株式会社、東京、2014.
2. 金廣有彦. アレルギー性肺疾患 運動誘発喘息 別冊・医学のあゆみ 呼吸器疾患 ver.6 -state of arts (共著), 504(230-232). 医歯薬出版株式会社、東京、2013.
3. 金廣有彦. 4. 喘息死防止に残された課題 The 32nd ROKKO CONFERENCE喘息治療に残された課題 (共著), 122(66-71). ライフサイエンス出版株式会社、東京、2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金廣 有彦 (KANEHIRO ARIHIKO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：20243503

(2) 研究分担者

宮原 信明 (MIYAHARA NOBUAKI)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：70335610