

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：82710

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21590978

研究課題名（和文） 細胞性免疫を指標とする喘息起因抗原の新規診断法と気道閉塞機序の解明

研究課題名（英文） Clarification of causal antigens of bronchial asthma in terms of cellular immune responses and mediators of bronchoconstriction

研究代表者

森 晶夫（MORI AKIO）

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）

研究者番号：80251247

研究成果の概要（和文）：成人喘息の半数以上を占める非アトピー型喘息で、なぜ気管支収縮が生じるのかについて研究した。IgE 抗体のない非アトピー型喘息においても、ダニ、真菌抗原に応答した T 細胞レベルの応答が生じる症例が見つかった。これらのアレルゲンに対して IL-5 産生が誘導される症例では、吸入チャレンジ後、即時型喘息反応は生じないが、遅発型喘息反応が惹起された。本喘息反応のメカニズムを解明する目的に、抗原特異的 T 細胞クローンを樹立し、固相化 CD3 抗体で活性化した上清中に含まれるサイトカインを測定した。ヒト培養気管支平滑筋細胞封入ゲルを用いた平滑筋収縮アッセイ系を樹立し、本 T 細胞クローン培養上清に含まれる平滑筋収縮活性を解析した。その結果、ヒト T 細胞は気管支平滑筋収縮活性を産生することが証明された。

研究成果の概要（英文）：Mechanism of bronchoconstriction in nonatopic asthma is studied in the present study. T cell IL-5 production was induced in response to house dust mite or mold allergens despite lack of IgE antibodies. Upon bronchial provocation, late asthmatic response, but not immediate asthmatic response, was induced in IL-5-producing asthmatics. To delineate mechanisms of IgE-independent bronchoconstriction, T cell clones were established, and the bronchoconstriction activity of activated T cell clones was analyzed in terms of human bronchial smooth muscle cells-embedded collagen gels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患、気管支喘息、アレルゲン、T 細胞、遅発型喘息反応、細胞性免疫、IL-5

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、IgE 抗体を特徴とするアトピー型と IgE 抗体の認められない非アトピー型とに分

類される。従来 IgE-マスト細胞を介する即時型アレルギー反応として認識され、数多くのマスト細胞脱顆粒抑制薬が臨床に供されてきたものの、

効果は限定的である。アトピー型と非アトピー型の両病型は、IgE 抗体の有無以外では、臨床症状、検査データ、病理所見上ほとんど区別しないことから、IgE 以外に喘息共通の病因が存在するとの仮説も提唱されてきた。1990 年以降の吸入ステロイドの普及は喘息治療に大きな福音をもたらしたが、約 1 割の重症喘息群においては、吸入ステロイドの大量投与、抗ロイコトリエン薬、 $\beta 2$  刺激薬などの多剤併用療法を行っても、なお QOL に著しい障害を残している。吸入ステロイドで完治し得ない患者群に対していかに better な治療オプションを提供するかは、近未来的な大課題である。喘息病態に関わる責任分子としては、IgE、ヒスタミン、ロイコトリエンおよびそれらの受容体など数多くの分子が遺伝子クローニングされ、それらの阻害剤が臨床に供されてきたが、作用機序が未だ pinpoint には特定できないステロイド薬の臨床効果に遠く及ばない。ここで、アレルギー疾患はアレルギーという環境因子に対する応答異常症であるとの原点に立ち返って、まず慢性炎症の原因となるアレルギー分子が何かを明らかにし、crude なアレルギーエキスをを用いた研究結果により構築されてきたアレルギー患者の免疫応答、炎症反応機序を見直すこと、治療介入すべき病的プロセスを再確認する努力が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

可逆性の気流閉塞は気管支喘息を特徴づける最も重要な病態である。アトピー型喘息の気流閉塞を説明するメカニズムとして、抗原吸入誘発後の即時型喘息反応 (IAR) および遅発型喘息反応 (LAR) が知られている。IAR は、IgE 依存性にマスト細胞から産生されるヒスタミン、ロイコトリエンによって説明可能であるが、LAR のメカニズムは未だ不明な部分が多い。加えて、非アトピー型喘息は、IgE 抗体の存在が確認されない点でアトピー型喘息とまったく異なるものの、それ以外の症状、所見、検査データ、病理所見、薬物治療のほとんどにおいて両者はほぼ同等である。つまり、喘息の病因には IgE 抗体以外の要因があることが窺われる。われわれは、アトピー型、非アトピー型喘息の両者に共通して、T 細胞の IL-5 産生が亢進していることを報告している。IL-5 産生誘導抗原が、細胞性免疫を動員し、慢性炎症を惹起するとの仮説を検証する目的に、ダニ抗原、カンジダ抗原等より、T 細胞を活性化する分子を同定する。吸入負荷試験を実施し、喘息反応が誘導されるか否かを明らかにする。さらに、非 IgE 依存性の喘息反応のメカニズムを解明する目的に、T 細胞刺激上清中の平滑筋収縮活性を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1)アトピー型、非アトピー型気管支喘息症

例における家塵ダニ、真菌アレルギー応答性の T 細胞増殖・サイトカイン産生の測定

喘息症例を対象とし、インフォームドコンセントを得た後、ヘパリン採血を実施、Ficoll-paque 比重遠心法により末梢血単核球を分離し、無血清培地 AIM-V medium に懸濁した。抗原非特異的活性化刺激、抗原特異的刺激 (ダニアレルギー、カンジダ、アスペルギルス、アルテルナリア等の真菌抗原) によって活性化し、上清中サイトカインを、特異的サンドイッチ ELISA で測定した。

(2)T 細胞増殖誘導能、サイトカイン産生誘導能と吸入負荷試験におけるダニ、真菌アレルギーの役割の解析

in vitro における T 細胞の増殖・サイトカイン産生誘導と、臨床マーカーの関連、および、投与可能な抗原による吸入負荷試験を実施し、喘息反応惹起能について解析した。

(3)T 細胞アレルギーの生化学的精製、同定  
ダニ、真菌粗抗原を、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー等の手法を用い生化学的に分画した。次いで、1) の方法によって、アトピー型、非アトピー型喘息症例の T 細胞と培養し、IL-5 産生を誘導する活性を分離・精製した。

(4)ダニ由来 T 細胞アレルギー遺伝子クローニングおよびタンパク発現

培養 Der f より cDNA ライブラリーを作成し、これまでに報告されている Der p、Der f の IgE 抗体結合性の主要アレルギー Der p 1, 2, 3, ..., 16 等の cDNA 配列をもとに、PCR 反応によって cDNA を増幅し、発現ベクターにクローニングした。大腸菌で発現させ、1) の実験系でアトピー型、非アトピー型喘息症例の T 細胞と培養し、in vitro における T 細胞刺激活性を評価した。

(5)非 IgE 機序による気管支平滑筋収縮物質の characterization、同定—非アトピー型喘息症例末梢血 T リンパ球の培養、培養ヒト気管支平滑筋細胞のゲル内収縮実験

コンフルエントな培養ヒト気管支平滑筋細胞を、24 well plate 内でコラーゲンゲルに封入し、収縮活性のアッセイに用いた。培養液を Kreb' s buffer に置換し、T 細胞の培養上清を加えて、ゲルの収縮を経時的にデジタル式記録カメラで撮影し、収縮活性を測定した。T 細胞反応性 (サイトカイン産生など) と in vitro 気管支平滑筋収縮活性の関連を解析した。

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・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)、疫学研究に関する倫理指針 (平

成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って各研究者の施設ごとに倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論する最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

#### 4. 研究成果

(1) アトピー型、非アトピー型喘息症例の末梢血単核球を、crude mite extract, crude *Candida albicans* extract, secreted aspartic proteinase 2 (SAP2)等と培養し、<sup>3</sup>H-thymidine uptake、上清サイトカイン濃度を測定した。IgE抗体が認められない非アトピー型喘息症例においても、T細胞IL-5産生が誘導される症例では、吸入チャレンジ後、即時型喘息反応(IAR)を欠く遅発型喘息反応(LAR)が出現した(図1)。IL-13産生は必ずしもLARと関連しなかった。皮内反応においても、遅発型の発赤、腫脹を認めた。

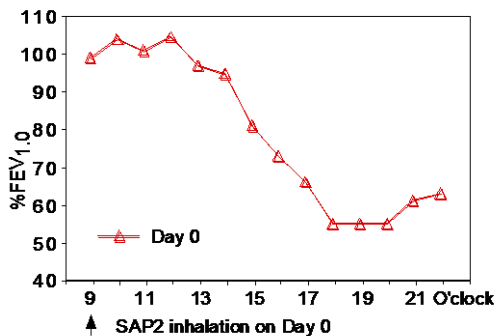


図1. IL-5産生誘導抗原に対する吸入負荷試験後LAR

(2) ダニ粗抗原中に含まれるIL-5産生誘導抗原を明らかにするため、ゲル濾過、イオン交換カラムによる分画を試みた(図2、3)。IgE抗体と結合するGroup 1, 2主要アレルゲンとは異なる分画に、IL-5産生誘導活性が存在することが明らかになった。LARは、液性免疫に依存するIARとは異なり、T細胞依存性の細胞性免疫応答に基づく反応と考えられる。

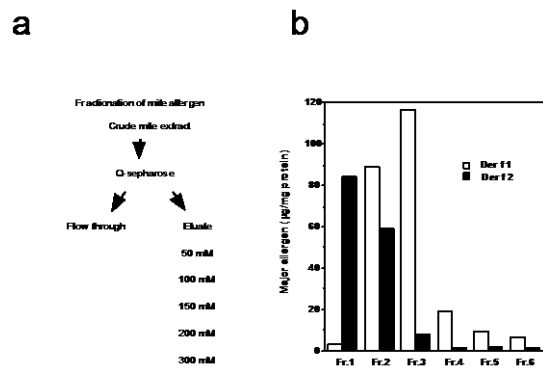


図2. 粗製ダニアレルゲンのイオン交換カラム分画

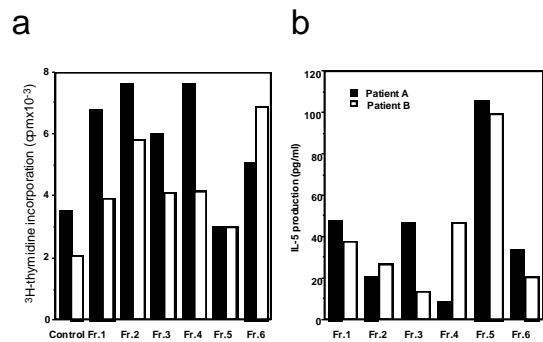


図3. 粗製ダニアレルゲン分画の細胞増殖誘導活性およびIL-5産生誘導活性

(3) さらに、本喘息反応のメカニズムを解明する目的に、SAP2特異的T細胞クローンを樹立し、固相化CD3抗体で活性化した上清中に含まれるサイトカインを測定した。平滑筋袖手活性のアッセイ系としては、ヒト培養気管支平滑筋細胞封入ゲルを用いた平滑筋収縮アッセイ系を樹立し、本T細胞培養上清に含まれる平滑筋収縮活性を解析した(図4)。

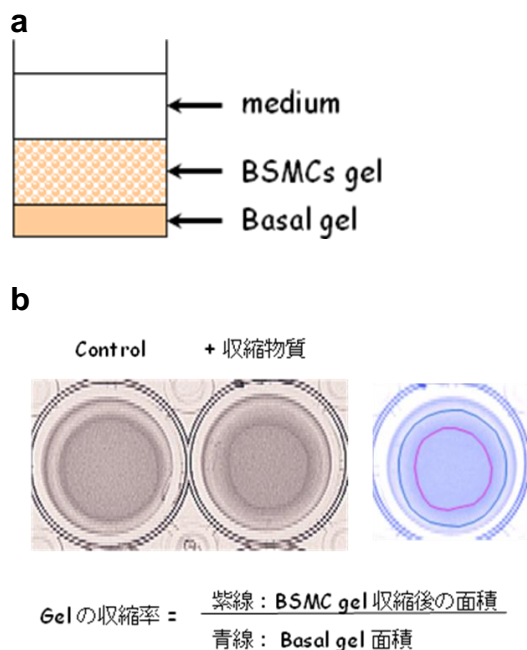


図4. ヒト正常気管支平滑筋細胞を用いた、3次元 collagen gel

a)ゲルの模式図、b)ゲル収縮の撮影像と収縮率の算出

(4) 細胞活性化が喘息反応すなわち気流閉塞にむすびつくことを証明するため、抗原吸入負荷後遅発型喘息反応が観察される患者の末梢血単核球を抗原と培養し、培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルアッセイにより、気流閉塞活性を検出した。単核球よりnegative selection法によりCD3、CD4、CD8陽性細胞集団をdepleteした場合、CD3、CD4 depletionによって収縮活性は消失した。したがって、CD4陽性のヘルパーT細胞が関与する可能性が強く示唆されたため、喘息患者末梢血単核球を、アレルゲンで抗原刺激し、限界希釈を経て、ダニアレルゲン特異的T細胞クローンを樹立した。CD4陽性細胞が99%以上の純粋な、clone化細胞であることを確認後、固相化CD3抗体で刺激し、上清をハーベストした。培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルアッセイにより、平滑筋収縮活性を確認した(図5)。

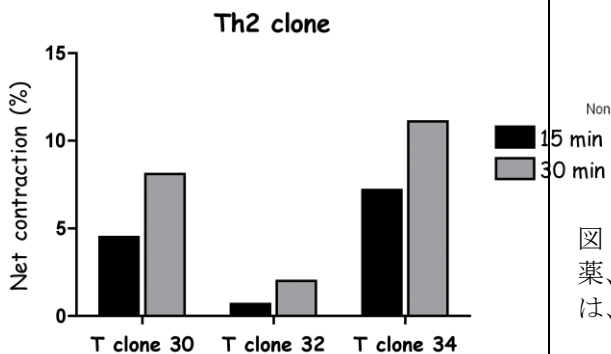


図5. T cell clone 培養上清中の培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルの収縮活性

本知見は、T細胞が平滑筋収縮活性を直接産生することを示す。産生サイトカインIL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IFN-gammaとゲル収縮活性との関連を解析したところ、IL-5、IL-13産生量と正の相関を認めた。すでに、*in vitro*での末梢血単核球の抗原特異的IL-5産生量が、*in vivo*での吸入負荷後遅発型喘息反応の指標となることを見出しているため、この知見と合致するものと考えられる。サイトカイン産生との関連を解析する目的に、デキサメサゾン、FK-506の抑制効果につき、検討したところ、IL-5産生は、低濃度のデキサメサゾン、FK-506によって抑制されたが、収縮活性は抑制されず、ユニークな産生制御機構が存在することが示唆された。

次いで、培養Der fよりcDNAライブラリーを作成し、これまでに報告されている主要アレルゲンDer p 1, 2, 3, ..., 16等のcDNA配列をもとに、PCR反応によってcDNAを増幅し、発現ベクターにクローニングした。大腸菌で発現させ、喘息症例の末梢血単核球と培養し、*in vitro*におけるT細胞刺激活性を評価した。最後に、これらのアレルゲンを非アトピー型喘息症例末梢血単核球と培養し、上清を、培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲル内収縮アッセイ系にアプライし、非IgE機序による気管支平滑筋収縮のcharacterizationを行い、T細胞反応性(サイトカイン産生)と*in vitro*気管支平滑筋収縮活性の関連を解析した。T細胞に由来する気管支平滑筋収縮活性は、IgE抗体の主要アレルゲンとは異なる分子によって産生誘導され、既知のサイトカインとは異なり、ステロイド、免疫抑制剤によって抑制されないことが明らかになった。

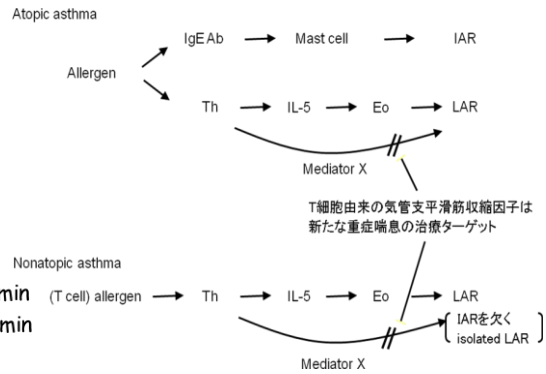


図6. 吸入ステロイド、ロイコトリエン拮抗薬、LABAに抵抗性のfixed airflow limitationは、重症喘息の特徴

### 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 38 件)

1. Ohtomo, T., Kaminuma, O., Yamada, J., Kitamura, N., Abe, A., Kobayashi, N., Suko, M., and Mori, A. Eosinophils are required for the induction of bronchial hyperresponsiveness in a Th transfer model of Balb/c background. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152 (Suppl 1):79-82, 2010. DOI: 10.1159/000312130
2. Abe, A., Koyama, S., Ohtomo, T., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. Murine T cell-derived contractile activity for human bronchial smooth

muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 158 (Suppl 1):7-10, 2012  
DOI: 10.1159/000337743

3. 森 晶夫：重症喘息の病態と真菌抗原による非 IgE 依存性喘息反応、臨床免疫・アレルギー科;56(1):44-50, 2011  
<http://www.kahyo.com/category/A1-M>  
A

[学会発表] (計 73 件)

- ① Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., and Kaminuma O. T cell-dependent bronchoconstriction *in vivo* and *in vitro*. European Association of Allergy and Clinical Immunology 2010. Allergy 65 (Suppl. 92):69 (London) 2010/6/5-9
- ② Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., and Kaminuma O. Role of T cells in late phase asthmatic response. The 8th Asia pacific Congress of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology 2010. Final program p. (Singapore) 2010/11/6-9

[図書] (計 8 件)

- ① 森 晶夫：非アトピー型喘息、The 17th Symposium of Asthma in Tokyo、ライフサイエンス出版、東京 p. 62-68, 2010
- ② 森 晶夫：アトピー型喘息と非アトピー型喘息の病態機序、第 30 回六甲カンファレンス 2010 年における気管支喘息のすべて (森川昭廣、足立満、秋山一男、大田健、東田有智編)、ライフサイエンス出版、東京 p. 33-40, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 晶夫 (AKIO MORI)

独立行政法人国立病院機構相模原病院・臨

床研究センター・部長  
研究者番号：80251247

### (2) 研究分担者

大友 隆之 (TAKAYUKI OHTOMO)

独立行政法人国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・特別研究員

研究者番号：90463108

### (3) 連携研究者

なし