

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4月30日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591354

研究課題名（和文）末梢血線維細胞による気道リモデリング機序の解析と臨床応用

研究課題名（英文） Analysis and clinical application of the mechanisms involved in airway remodeling by using peripheral blood fibrocytes.

研究代表者

大嶋 勇成 (OHSHIMA YUSEI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40303391

研究成果の概要（和文）：損傷組織の修復と線維化に関与する線維細胞は、喘息の気道リモデリングにも関与していると推測されている。一方、気管支喘息の病態形成に中心的役割を果たしている Th2 細胞の分化誘導にかかわるサイトカインとして IL-33 が注目されている。本研究では、IL-33 の線維細胞機能に及ぼす作用を解析した。線維細胞は IL-33 のレセプターである ST2 を発現していた。IL-33 刺激により線維細胞は濃度依存性に増殖が亢進し、 α 平滑筋アクチン、MMP9 の発現を増強した。デキサメサゾン は IL-33 刺激の有無に関わらず線維細胞の増殖と MMP9 発現を抑制した。IL-33 は樹状細胞を介して Th2 細胞の分化にかかわるだけでなく、アレルギー性炎症の修復過程における気道リモデリングに対しても線維細胞を介して重要な役割を持つと考えられた。また、線維細胞機能の抑制にはステロイドが有効と考えられた。

研究成果の概要（英文）：It has been presumed that fibrocytes are involved in airway remodeling in asthmatics as well as repair of damaged tissues and fibrosis. Recently, IL-33 has been attracting attention as an important cytokine that induces the differentiation of Th2 cell, which plays a pivotal role in the pathophysiology of bronchial asthma. In this study, we analyzed the effects of IL-33 on the function of fibrocytes. Fibrocytes expressed IL-33 receptor, ST2. IL-33 enhanced cell proliferation, α -smooth muscle actin expression and MMP9 production of fibrocytes. Dexamethasone suppressed cell proliferation and MMP9 expression of fibrocytes regardless of the presence or absence of IL-33-stimulation. IL-33 not only induces the differentiation of Th2 cells through modulating the function of dendritic cell function but also may play an important role in airway remodeling, a repairing process of allergic inflammation. Steroid seems to effectively inhibit the function of fibrocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

小児気管支喘息の発症にはアトピー素因に加え、気道過敏性を含めた呼吸機能の異常が関与すると考えられる。成人喘息では呼吸機能の異常に気道リモデリングが重要な役割を持つことが指摘されている。小児気管支喘息の病態における気道リモデリングの役割には不明の点が多いが、喘息発症前の段階で既に気道リモデリングが生じている症例があることが報告され、気道リモデリングの制御を目的としての喘息の早期介入治療の重要性が指摘されている (Pohunek PJ, *Pediatr Allergy Immunol* 2005, Saglani S, *Am J Respir Crit Care Med* 2007)。

気道リモデリングの進展予防には気道のアレルギー性炎症を抑制することが重要との考えから、わが国や欧米の喘息治療ガイドラインでは吸入ステロイドによる早期治療が推奨されてきた。しかし、吸入ステロイドでは呼吸機能の低下を完全に防げず、喘息の自然歴そのものを大きく変えることが出来ないことが明らかとなった (Expert Panel Report 3, 2007, PRACTALL consensus report 2008)。この原因としては、吸入ステロイドには吸入抗原に対する免疫寛容を誘導する効果がないことや、通常量ではアレルギー性炎症を抑制しきれず気道リモデリングが進行してしまう可能性が考えられる。しかしその一方で、気道組織の構成要素である平滑筋細胞や線維芽細胞自体が持つ固有の性状が、正常児と喘息患児では異なっているため気道リモデリングが進行しやすい可能性も考えられる。

気道リモデリングでは気道平滑筋の肥大や気道上皮基底膜の肥厚、さらには気道粘膜下の毛細血管増生に筋線維芽細胞が重要な役割を持つと考えられる。一方、その前駆細胞と考えられている線維細胞は末梢血単核細胞の一部から分化すると考えられている (Philling DJ *J Leukoc Biol* 2006)。

末梢血の非付着性非 T 細胞分画を自己血清存在下で培養すると線維細胞が誘導され、慢性の気道閉塞症状を呈する成人喘息患者では、気道閉塞症状を呈さない喘息患者や健常者に比べ誘導される線維細胞の数が多いことが報告されており (Wang CH, *Am J Respir Crit Care Med* 2008)、末梢血の単核細胞分画中の線維細胞前駆細胞と気管支喘息のリモデリングと関係が示唆される。

2. 研究の目的

小児喘息患者の大半が乳児期に発症することから、気道リモデリングの発生とその進行を防ぐには、乳児患者を対象として早期介入を行う必要がある。しかしながら、乳児期に喘鳴を呈する患者は喘息患者だけでなく、

感染に伴い喘鳴を呈するが年齢とともに喘鳴を呈することが無くなるような一過性喘鳴患者がかなりの割合で存在する (Martinez, *Lancet* 2006)。そのため、過剰な治療を避ける上で、気道リモデリングが進行し呼吸機能が障害されていく狭義の喘息患者を同定することが重要となるが、現時点ではアトピー家族歴、アトピー性皮膚炎の既往歴、吸入抗原への感作が参考となる程度である (Ohshima Y, *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002, *JPGN* 2005)。これらの指標は主にアレルギーの有無をみたものであり、気道リモデリングに関連した指標がないのが現状である。本研究では、末梢血単核球から誘導した線維細胞の性状を解析し、喘息発症と気道リモデリングに関連した線維細胞の特性を明らかにすることで乳児喘息患者の診断に応用するための基礎的検討を行うことを目的とする。また、吸入ステロイドやロイコトリエン拮抗薬など喘息長期管理薬の線維細胞機能に及ぼす影響を解析し、長期管理の治療効果の予測にどの程度応用可能かを検討する。

気管支喘息の病態形成に中心的役割を果たしている Th2 細胞の分化誘導には、気道上皮細胞の自然免疫応答により産生される IL-33 が関与していることが推測されている。IL-33 が線維細胞にどのような影響を与えるかは不明である。そこで、本研究では、IL-33 の線維細胞機能に対する作用を中心に解析した。

3. 研究の方法

(1) 末梢血線維細胞の分離培養誘導法

Chesney ら (*Proc Natl Acad Sci U S A* 1997)、Yang らの方法 (*Lab Invest* 2002) を参考に、末梢血単核球をフィブロネクチンをコートしたプレートで培養する。培養 7 日目に非付着細胞を除去、PDGF-BB を添加し、1 週間後に付着細胞を回収し高純度の線維細胞を分離した。

(2) 線維細胞の ST2 の発現解析

分離した線維細胞が IL-33 のレセプターである ST2 を発現するか否かをフローサイトメーターで細胞表面の発現を、RT-PCR で mRNA の発現を測定した。また、あわせて IL-33 のデコイレセプターである可能性が指摘されている可溶性 ST2 の mRNA も測定した。

(3) 末梢血線維細胞の機能解析法

分離した線維細胞を、IL-33 など、各種サイトカインなどを添加した。細胞増殖は MTT アッセイおよび BrdU 取り込み能により測定した。線維細胞から筋線維芽細胞への分化は α 平滑筋アクチンやカルポニンの発現をフロ

ーサイトメーターで測定し評価した。

培養上清中のマトリックスプロテナーゼ活性をゼラチンザイモグラフィーにより測定した。

(4) 末梢血線維細胞数の評価

患者末梢血単核細胞を分離し、フィブロネクチンをコートしたプレートで培養する。培養7日目に紡錘状の形態を呈する細胞の割合を求めた。

4. 研究成果

(1) 線維細胞の ST2 発現

末梢血単球より誘導された線維細胞は IL-33 のレセプターである ST2 を細胞表面上に発現していた。また、線維細胞は ST2 の mRNA を発現するとともに、デコイレセプターの可能性が指摘されている可溶性 ST2 の mRNA も発現していた。

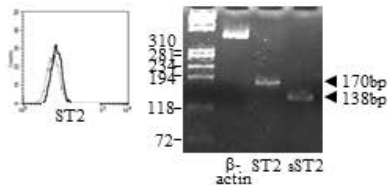
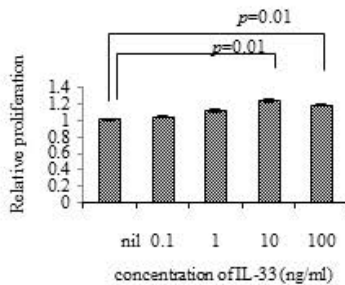


図 1 線維細胞のST2と可溶性ST2発現

(2) IL-33 の線維細胞増殖に与える効果

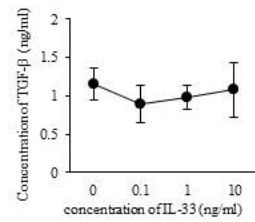
IL-33 は添加 72 時間後に MTT アッセイにより正細胞数を測定したところ IL-33 の濃度依存性に細胞数が増加していた。BrdU 取り込み能の測定でも IL-33 は濃度依存性に DNA 合成能を増加させており、IL-33 は線維細胞の生存延長より細胞増殖を増強させる作用を持つと考えられた。

図 2 IL-33は線維細胞の細胞増殖を抑制する



TGF-β 1 は線維芽細胞の増殖分化を誘導することが報告されているが、線維細胞の培養上清中の TGF-β1 濃度は IL-33 刺激によっても増加しておらず、IL-33 による線維細胞の増殖増強作用は TGF-β 1 を介する作用の可能性は低いと考えられた。

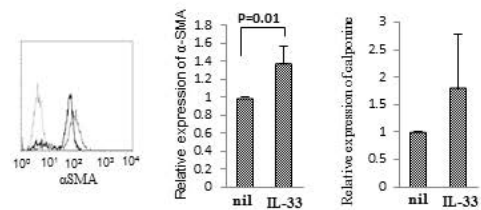
図 3 線維細胞によるTGF-βの産生



(3) IL-33 のα平滑筋アクチン、カルポニン発現に及ぼす影響

カルポニンの発現は増加傾向を認めたが有意ではなかった。しかし、α平滑筋アクチンの発現は IL-33 刺激により有意に増加したことより、IL-33 は線維細胞の分化成熟を増

図 4 IL-33はα平滑筋アクチンの発現を増強する

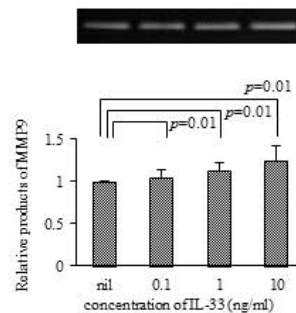


強すると考えられた。

(4) IL-33 の MMP9 産生に及ぼす影響

線維細胞の間質組織への移動や組織損傷にはマトリックスメタロプロテナーゼ MMP の産生が重要と考えられている。ゼラチン剤モグラフィーによる検討では線維細胞は、線維芽細胞と異なり、MMP2 をほとんど産生せず、MMP9 を主に産生していた。また、MMP9 の産生量は IL-33 の濃度依存性に増強された。

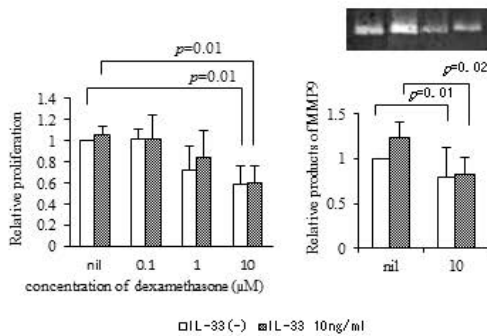
図 5 IL-33はMMP9の産生を増強する



(5) デキサメサゾンが線維細胞機能に及ぼす作用

線維細胞の増殖と MMP9 の発現は IL-33 刺激の有無にかかわらず、デキサメサゾンにより濃度依存性に抑制された。しかし、ロイコトリエン拮抗薬の前処理は有意の効果を示さなかった。線維細胞はシステイニルロイコトリエン刺激で増殖が増強されると報告されているが、IL-33 はオウトクラインの増殖因子として有意のシステイニルロイコトリエンを産生を誘導しないと考えられた。

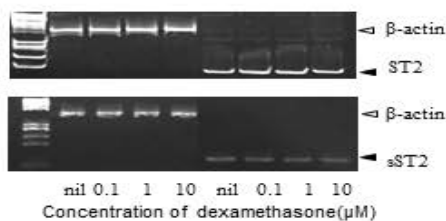
図5 dexamethasoneは線維細胞の増殖とMMP9発現を抑制する



(6) デキサメサゾンが線維細胞の ST2 発現に及ぼす作用

IL-33 による線維細胞機能の増強効果はデキサメサゾンにより抑制されることから、デキサメサゾンが ST2 の発現を抑制するか否かを検討した。その結果、デキサメサゾンは ST2 および可溶性 ST2 の mRNA 発現には有意な影響を与えなかった。

図7 DexamethasoneはST2, sST2のmRNAを抑制しない



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16件)

- ① Kawakita A, Shirasaki H, Yasutomi M, Tokuriki S, Mayumi M, Naiki H, Ohshima Y Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model. Allergy 査読有 Vol.67、2012、pp371-9 DOI:10.1111/j.1398-9995.2011.02777.x

- ② Osawa Y, Suzuki D, Ito Y, Narita N, Ohshima Y, Ishihara Y, Ishihara Y, Tsuchida S, Fujieda S Prevalence of inhaled antigen sensitization and nasal eosinophils in Japanese children under two years old. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 査読有 Vol. 76、2012、pp189-193 DOI:10.1016/j.ijporl.2011.10.024
- ③ 白崎仁幸子、河北亜希子*、吉川利英、安富素子、畑郁江、重松陽介、眞弓光文、大嶋勇成 厳格な食物除去療法中にクレーチンキナーゼ高値と低カルニチン血症を呈した食物アレルギーの1例 日本小児アレルギー学会雑誌 査読有 Vol. 25、2011、pp218-221
- ④ 大嶋勇成 抗アレルギー薬 新薬展望 2011 Vol. 47S1、2011、pp241-246
- ⑤ 大嶋勇成 アレルギー疾患発症に関わる免疫システム アレルギーの臨床 査読無 Vol. 31、2011、pp381-385
- ⑥ 大嶋勇成 アレルギー疾患～感作と発症のからくり～ 抗原感作とアレルギー性疾患発症予防 アレルギー・免疫 査読無 Vol. 19、2011、pp9-10
- ⑦ 大嶋勇成 アレルギー疾患の病態 免疫細胞の関与 小児内科 査読無 Vol. 43、2011、pp1825-1829
- ⑧ 大嶋勇成 アレルギー疾患発症に関わる免疫システム アレルギーの臨床 査読無 Vol. 31、2011、pp381-385
- ⑨ 大嶋勇成 周産期の環境と小児アレルギー疾患発症のリスク 免疫反応の発達 周産期医学 査読無 Vol. 41、2011、pp605-607
- ⑩ 玉村宗一、古畑律代、畑 郁江、大嶋勇成、眞弓光文 治療抵抗性の喘息様症状を呈した気管支支・分節型気管狭窄症の1歳女児例 日本小児呼吸器疾患学会雑誌 査読有 Vol. 21、2010、pp163-167
- ⑪ 安富素子、大嶋勇成、眞弓光文 内分泌攪乱物質とアレルギー 臨床免疫・アレルギー科 査読無 Vol. 53、2010、pp69-73
- ⑫ 大嶋勇成 食物アレルギー最新情報 食物アレルギーと腸管免疫 小児科診療 査読無 Vol. 73、2010、pp1093-1098
- ⑬ 大嶋勇成 食物アレルギーアップデート 食物アレルギーの治療機転 アレルギー・免疫 査読の無 Vol. 17、2010、pp1093-1028
- ⑭ 大嶋勇成 小児アレルギー 喘息、湿疹、ポリシーが必要だ 内科 査読無 Vol. 103、2009、pp577-582
- ⑮ 大嶋勇成 衛生仮説 2009 小児科診療 査読無 Vol. 72、2009、pp1219-1224

- ⑩ 小倉一将、大嶋勇成、土田晋也、眞弓光文 ヒスタミン H1 拮抗薬とロイコトリエン受容体拮抗薬の併用が有効であったアレルギー性外陰膣炎の一例 日本小児アレルギー学会雑誌 査読有 Vol. 23、 2009、 pp218-221

〔学会発表〕(計 3 1 件)

- ① 林仁幸子、河北亜希子、岡崎新太郎、徳力周子、安富素子、眞弓光文、大嶋勇成 IL-33 の線維細胞機能に及ぼす影響 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011/11/25-27 東京
- ② 大嶋勇成 シンポジウム 17: 小児のアトピー性皮膚炎 アトピー性皮膚炎の生活管理と指導法 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011/11/25-27
- ③ 大嶋勇成 特別講演 小児気管支喘息の病態と治療～新しい JPGL2012 の解釈と実践～ 栃木県小児アレルギー研究会 2011/11/16 宇都宮
- ④ Ohshima Y, Yasutomi M, Kawakita A, Hayashi H, Mitsufumi M Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model. Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology and Immunology 2011/10/28-30 Fukuoka
- ⑤ 大嶋勇成 食物アレルギーでの抗原除去は有用であるか? P r o の立場から 第 11 回 Early Intervention 研究会 2011/10/22 東京
- ⑥ 大嶋勇成 特別講演 小児アレルギー疾患診療の新しい展開 ～アレルギーマーチと小児喘息の多様性について～ 第 24 回北野小児学術講演会 2011/10/15 大阪
- ⑦ 大嶋勇成 特別講演 小児アレルギー疾患の耐性獲得機序と免疫療法 第 19 回大分アレルギー研究会 2011/10/14 湯布
- ⑧ 大嶋勇成 特別講演 小児喘息の多様性と長期管理第 6 回奈良小児喘息治療セミナー 2011/10/1 奈良
- ⑨ 大嶋勇成 特別講演 小児喘息の多様性と長期管理をどう考えるか? 敦賀市医師会学術講演会 2011/9/9 敦賀
- ⑩ 安富素子、白崎仁幸子、河北亜希子、眞弓光文、大嶋勇成 福井県における学校生活管理指導表(アレルギー疾患用)の使用状況と問題点 北陸小児喘息治療研究会学術講演会 2011/6/9 金沢
- ⑪ 安富素子、河北亜紀子、白崎仁幸子、大嶋勇成、眞弓光文、住本真一、福井徹哉、清益功浩、桶垣泰伸、南部光彦、谷口義

弘 JPGL の乳児喘息診断・治療基準の妥当性と問題点の検証(第 4 報):大発作反復要因の解析 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011/5/13-14 幕張

- ⑫ 大嶋勇成 シンポジウム 9 薬剤師教育講座 1 小児喘息・食物アレルギーの薬物療法のトピックス 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011/5/13-14 幕張
- ⑬ 大嶋勇成 特別講演: 小児喘息の多様性と長期管理の方向性 第 8 回三重気道アレルギー研究会 2011/3/10 津
- ⑭ 大嶋勇成 特別講演: 食物アレルギーの耐性獲得機序と耐性誘導の試み 第 7 回京都臨床アレルギー研究会 2011/3/8 京都
- ⑮ 大嶋勇成 特別講演: アレルギー性疾患の発症・進展・重症化の予防について 第 6 回日本改善学会北陸支部学術総会 2011/3/6 福井
- ⑯ 大嶋勇成 特別講演: 食物アレルギーの耐性獲得機序と免疫療法の今後 第 19 回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会 2011/2/12-13 京都
- ⑰ 大嶋勇成 特別講演: 小児アレルギー性疾患治療の落とし穴 福井アレルギーセミナー 2011/2/16 福井
- ⑱ 中村利美、足立雄一、村上巧啓、大嶋勇成、谷内江昭宏、眞弓光文 Pediatric Asthma Support System (PASS) によるコントロールレベルの評価に関する検討 n 第 47 回日本小児アレルギー学会 2010/12/3-5 横浜
- ⑲ 白崎仁幸子、河北亜希子、安富素子、大嶋勇成、眞弓光文 IL-17・IL-17F の線維細胞機能に及ぼす影響 第 47 回日本小児アレルギー学会 2010/12/3-5 横浜
- ⑳ 大嶋勇成、安富素子 ワークショップ: 動物モデルによる病態解明の進歩: 食物アレルギーモデルを用いた食物アレルギー耐性獲得機序の解析 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010/11/25-27 東京
- ㉑ 安富素子、河北亜希子、白崎仁幸子、大嶋勇成、眞弓光文 乳児喘息アンケート調査における発作反復要因の解析 第 37 回北陸アレルギー研究会 2010/11/21 金沢
- ㉒ 安富素子、河北亜希子、白崎仁幸子、大嶋勇成、眞弓光文 エリスロマイシンは PGN+CD40L 刺激による IL-23/IL-17 pathway を選択的に抑制する 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010/11/25-27 東京
- ㉓ Ohshima Y, Yasutomi M, Shirasaki H,

- Kawakita A, Mayumi M Intranasal administration of antigen entrapped into oligomannose-coated liposomes impedes development of oral antigen-induced allergic diarrhea. 14th International Congress of Immunology 2010/8/22-27 Kobe
- ②④ Yasutomi M, Ohshima Y, Shirasaki H, Kawakita A, Mayumi M Erythromycin inhibits IL-17 production through modulating monocyte-derived dendritic cell function 14th International Congress of Immunology 2010/8/22-27 Kobe
- ②⑤ 大嶋勇成 ランチョンセミナー：小児気管支喘息急性発作治療を考える－救急医療現場における課題と対策－ 第24回日本小児救急医学会 2010/5/29 京都
- ②⑥ 安富素子、大嶋勇成、磯崎由宇子、住本真一、福井徹哉、清益功浩、桶垣泰伸、南部光彦、谷口義弘、眞弓光文 JPGLの乳児喘息診断・治療基準の妥当性と問題点の検証(第3報) 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010/5/8-9 京都
- ②⑦ 大嶋勇成 シンポジウム IgEを介した即時型反応の意義 再考 調節性T細胞と即時型反応 第46回日本小児アレルギー学会 2009/12/5,6 福岡
- ②⑧ 中村利美、足立雄一、村上功啓、大嶋勇成、谷内江昭宏、眞弓光文 PASS (Pediatric Asthma Support System)の導入によるガイドラインに沿った小児の喘息治療の推進 第46回日本小児アレルギー学会 2009/12/5,6 福岡
- ②⑨ 大嶋勇成、安富素子、白崎仁幸子、小倉一将、眞弓光文 ミニシンポジウム 気道上皮細胞/線維芽細胞/血管内皮細胞とアレルギー病態1 IL-17/IL-17Fが線維細胞機能におよぼす影響 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009/10/29-31 秋田
- ③⑩ 大嶋勇成 気道リモデリング：線維細胞の視点から Club Leukotriene 2009/7/18 東京
- ③⑪ 大嶋勇成、眞弓光文、安富素子、住本真一、福井徹哉、清益功浩、桶垣泰伸、南部光彦、谷口義弘 ミニシンポジウム 小児気管支喘息の病態と治療 JPGLの乳児喘息の診断基準の妥当性と問題点の検証(第2報) 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009/6/4-6 岐阜

[図書] (計3件)

- ① Ohshima Y Roles of regulatory T cells in oral tolerance and food allergy. In "Regulatory T cells" (Hayashi R ed) Nova Science Publishers, Inc 2011, 268
- ② 大嶋勇成 喘息発症予防(一次)について教えてください。ドクターと保護者に訊いた 小児喘息のここが知りたい Q&A (勝沼俊男 編) 中外医学社 2011、229
- ③ 大嶋勇成 食品アレルギーの病態と発症機構 食品・免疫アレルギーの事典 (日本食品免疫学会 編集委員長 上野川修一) 2011、488

[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

大嶋 勇成 (OHSHIMA YUSEI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40303391