

アレルギー性気管支喘息発症における機能分子に関する研究

田中 宏幸

Functional Molecules in Allergic Bronchial Asthma

Hiroyuki TANAKA

Department of Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University,
5-6-1 Mitahora-Higashi, Gifu 502-8585, Japan

(Received May 29, 2002)

Bronchial asthma is considered to be a chronic airway inflammatory disease, characterized by airway obstruction, airway eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness (AHR) to a variety of stimuli. AHR is thought to be an important symptom, because the severity of the disease is generally correlated with the degree of AHR. Recent clinical studies have demonstrated the involvement of airway inflammation in the development of allergen-induced AHR, although, the mechanism of allergen-induced AHR has not been fully elucidated and remains controversial. *In vivo* animal models might provide important information on this point. We have established a mouse model of allergic asthma, which is characterized by airway eosinophilia, IgE production, T helper type 2 (Th2) cytokine production in the airway, and AHR, and investigated the role of inflammatory cells and functional molecules. Results from gene-knockout and mutant mice demonstrated the involvement of T cells, mast cells, prostanoids, and Th2 cytokines including interleukin (IL)-4 and IL-5 in the development of allergen-induced airway inflammation and AHR. In contrast, treatment with anti-IL-4 monoclonal antibody (mAb) or anti-IL-5 mAb during allergen inhalation did not inhibit allergen-induced AHR, although the combination of these mAbs clearly inhibited the enhanced responsiveness. These data indicate that it is a better strategy for control of the disease to inhibit or suppress multifunctional molecules like corticosteroids rather than to inhibit a single factor, because bronchial asthma is a multifactorial disease.

Key words——bronchial asthma; T cells; mast cells; Th2; prostaglandin; cytokines

1. はじめに

気管支喘息は、気道閉塞、気道内好酸球増多並びに気道反応性亢進、すなわち気道過敏性を特徴とする閉塞性呼吸器疾患である。このうち、特に気道過敏性は、種々の物理的・化学的刺激に対し気道が健常人に比し収縮しやすくなっている状態を指し、呼吸性呼吸困難症状の主たる発現要因となっている。気管支喘息は、血清中抗原特異的 IgE 値が高値でかつ抗原特異的な喘息症状の発現が認められるアトピー型気管支喘息と特異抗原が検出できない非アトピー型気管支喘息の2つに大きく分けられる。アトピー型気管支喘息に関しては、特異抗原による種々の反応の解析及び動物モデルを用いた病態の外挿に

より、これまでにその発症機序に関して多くの研究がなされてきたが、特に気道過敏性発症機序に関しては不明な点が多い。

著者らは、遺伝子背景が明らかなマウスを用いて、抗原誘発気道炎症及び気道過敏性モデルを作成し、その発症に関与する細胞及び機能分子に関して検討を行ってきた。ここでは、これまでに教室で得られた成績を中心に、気道過敏性発症機序に関与する細胞及び機能分子に関して論述する。なお、教室で得られているこれまでの成績は、紙面の都合上、Table 1 にまとめたので参考にしていただきたい。

2. 喘息モデルの確立とその特徴

従来、動物モデルとしては種々の刺激による気道の反応性の類似性からモルモットが頻用されてきたが、遺伝子背景が不明確であり、また、抗体などの解析用試薬も不十分であることから、患者の症状との類似性は認められても、より詳細な検討は困難であった。そこで教室では、遺伝子背景が明確かつ種

岐阜薬科大学薬理学教室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1)

e-mail: hirotnk@gifu-ppu.ac.jp

*本総説は、平成13年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Table 1. Role of Inflammatory Cells and Functional Molecules in the Development of Antigen-Induced Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in Mice

	IgE	Eosinophilia	IL-5	AR	Ref.
BALB/c	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	
athymic mice		—	—	±	4
c-kit mutant W/W ^V		↑↑	↑↑	±	6
DPKO	↑↑	↑/—	↑/—	±	7
IL-4 KO	—	↑/—	↑/—	±	10
IL-5R α chain KO	↑↑	↑/—	↑↑	±	13
BALB/c during Ag inhalation					
Cyclosporin A		↑/—	↑/—	±	4
FK-506		↑/—	↑/—	±	4
anti-allergic drugs		↑↑	↑↑	↑↑	6
anti-IL-4 mAb	↑/—	↑↑	↑↑	↑↑	11, 16
anti-IL-5 mAb	↑↑	↑/—		↑↑	6, 16
Soluble IL-5R		↑/—		↑↑	1
Combination	↑/—	↑/—		±	16

Ag: antigen, AR: airway responsiveness to acetylcholine, DP: prostaglandin D receptor, KO: gene knockout, mAb: monoclonal antibody, R: receptor.
 ↑↑: marked increase, ↑: moderate increase, ±: not observed, —: not observed or detected. blank: not determined.

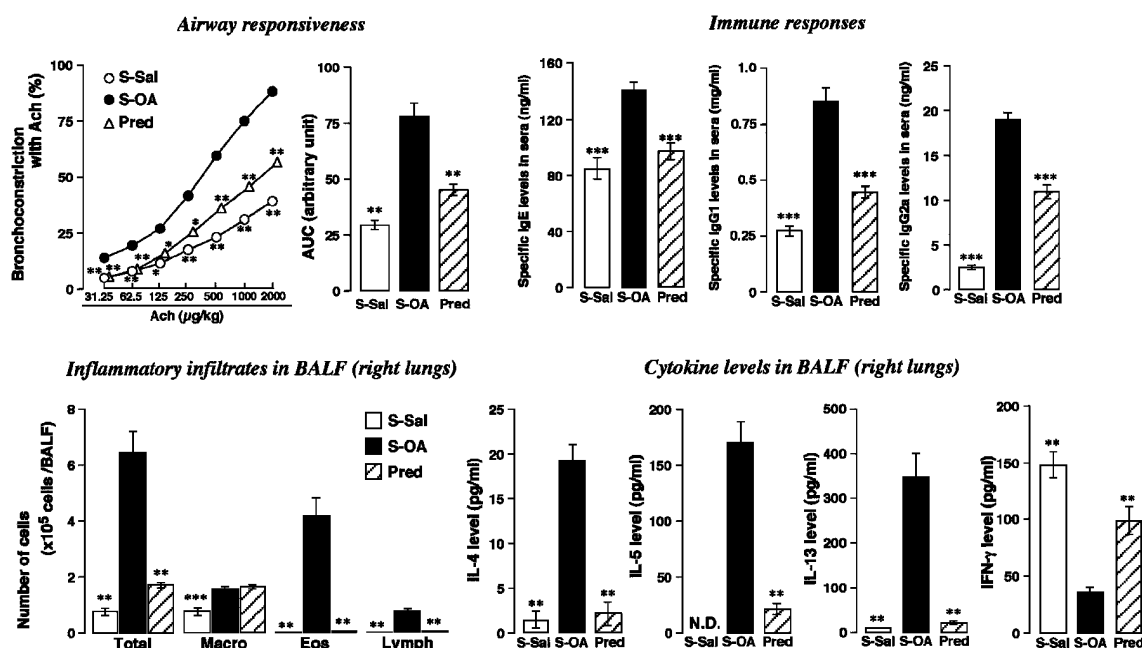


Fig. 1. Representative Data of Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperresponsiveness to Acetylcholine (Ach) in a Mouse Model of Allergic Asthma

AUC: area under the curve (range 31.25–2000 $\mu\text{g/kg}$), BALF: bronchoalveolar lavage fluid, Eos: eosinophils, IFN: interferon, Lymph: lymphocytes, Macro: macrophages, OA: ovalbumin-inhaled, Pred: prednisolone (p.o. during antigen inhalation for 10 days), S: sensitized, Sal: Saline-inhaled. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs S-OA).

々の試薬類も充実しているマウスを用いて喘息モデルの確立を行った。

すなわち、高 IgE 産生系マウスとして知られている BALB/c マウスを抗原として卵白アルブミン及びアジュバント（水酸化アルミニウム）により能

動的に感作し、その後、抗原（1%生理食塩水溶液）を3回吸入させた。その結果、Fig. 1に示すように最終抗原吸入24時間後では、気管支肺胞洗浄液（BALF）中に好酸球を主体とする炎症性細胞の増加、ヘルパー2型サイトカイン（Th2）である IL-

4, IL-5 及び IL-13 量の増加, 血清中抗原特異的 IgE 及び IgG1 値の上昇並びにアセチルコリンによる気道収縮反応の亢進, すなわち気道過敏性が認められた.¹⁾ これらの反応は, いずれもアトピー型喘息患者において認められることから, 本モデルは抗原暴露による好酸球性気道炎症及び気道過敏性の発症機序を解明する上で非常に有用なモデルであると思われる.

また, 1 ないし 3 回抗原吸入をした際の経時的な変化を検討したところ, BALF 中の好酸球の分化・増殖などに必須の Th2 サイトカインである IL-5 並びに好酸球数は, 2 回目の抗原暴露後から検出され, 3 回目の抗原暴露によりさらに上昇あるいは増加が認められた. また, 気道過敏性に関しても 3 回目の抗原暴露後に初めて観察されたことから, 気道過敏性発症にはこのような抗原の反復暴露が必要であることが明らかとなった.¹⁾

3. T 細胞の関与

T 細胞は免疫反応において中心的な細胞であり, 外来抗原の侵入後, 樹状細胞などによる抗原提示を受け, 抗原特異的 CD4⁺T 細胞が増殖・活性化される. この際, 産生するサイトカイン産生パターンにより, ヘルパー 1 型 T (Th1) 細胞と Th2 細胞に分類されることが知られている.²⁾ この分類が示されて以来, アレルギー性疾患の多くは Th2 依存性の反応であることが明らかにされている. 実際に, アトピー型気管支喘息の気道粘膜生検及び BALF 中には Th2 サイトカインに属する IL-4, IL-5 及び IL-13 が検出されている.³⁾ しかし, 抗原誘発気道過敏性の発症において T 細胞の役割は不明であった. そこで教室では, 本反応の T 細胞依存性を確認する目的で, 先天性胸腺欠損マウス及び種々の免疫抑制薬を抗原暴露時に投与しその影響を検討した. その結果, 先天性胸腺欠損マウスでは, 上述の反応はいずれも観察されず, 免疫抑制薬のうち, 特にサイクロスポリン A 及び FK-506 が BALF 中好酸球増多, IL-5 産生並びに気道過敏性を用量依存的に有意に抑制した.⁴⁾

以上の成績より, 本モデルにおける気道内好酸球増多及び気道過敏性発症には, T 細胞が必須の細胞であることが明らかとなった.

4. 肥満細胞の役割

肥満細胞は, その細胞膜表面上に IgE 抗体の Fc

部分に対し高親和性の FcεRI 受容体を発現しており, 抗原特異的 IgE 抗体の固着により感作状態が成立する. 周知のように, 抗原の再侵入及び IgE 抗体の Fab 部分における架橋により, 肥満細胞内に刺激が加わり, 細胞内顆粒の放出並びにアラキドン酸代謝産物の産生及びサイトカインの合成・産生が生ずる.⁵⁾ 気管支喘息における肥満細胞の役割は, 前述のように抗原抗体反応による脱顆粒により放出されたヒスタミンあるいはアラキドン酸代謝産物の産生により, 直接, 気道平滑筋の収縮に関与することが知られている. しかし, 抗原暴露後に生じる気道内好酸球増多並びに気道過敏性発症におけるその役割は不明であった. そこで, 肥満細胞の増殖因子である c-kit 遺伝子の突然変異マウスである WBB6F₁-W/W^v マウスを用いてその意義を解析した. その結果, 対照マウスに比し肥満細胞欠損マウスでは, BALF 中 IL-5 産生及び好酸球増多に関しては差が認められなかったが, 気道過敏性については発症が認められなかった.⁶⁾ 一方, これまでに臨床で用いられている肥満細胞からのメディエーター遊離抑制薬は, いずれの反応に対してもほとんど影響を及ぼさなかった.⁶⁾ 以上の成績は, 肥満細胞は気道過敏性発症に重要な細胞であることを示唆するものであるが, その一方で, これまでに開発されたメディエーター遊離抑制薬では気道過敏性の制御は困難であることが推察された.

そこで, さらに肥満細胞の気道過敏性発症における役割を検討する目的で, 肥満細胞から産生されるプロスタノイドのうち, 特にプロスタグランジン D₂ (PGD₂) に着目し, その受容体である DP 遺伝子欠損マウスを用いて検討を行った. PGD₂ は, 臨床においても抗原暴露後の肥満細胞活性化の指標にも用いられ, BALF 中にも大量に産生されることが知られているプロスタノイドである. 従来, 気道収縮物質として知られていたが, その選択的拮抗薬も開発されていなかったことから, 気道炎症並びに気道過敏性における意義については不明であった. 結果として, DP 遺伝子欠損マウスでは, 野生型マウスで観察された気道炎症, Th2 サイトカイン産生及び気道過敏性のいずれも減弱が認められた.⁷⁾ したがって, PGD₂ は気道収縮物質としてだけではなく, 恐らく Th2 サイトカイン産生を介しアレルギー性気道炎症の増幅にも関与しているものと思わ

れる。

また、PGD2の受容体に関しては、近年、ヒトのリンパ系細胞においてCRTH2という受容体がクローニングされ、PGD2とほぼ同程度の親和性を有することが示されている。⁸⁾ マウスに関する情報はまだ明らかにされていないが、PGD2がDP受容体とは全く異なるケモカイン受容体であるCRTH2にも結合し細胞遊走に関与する可能性があることは、非常に興味を持たれるところであり今後の研究成果が期待される。

5. IL-4の役割

IL-4は、上述のようにTh2サイトカインの1つであり、ナイーブCD4⁺T細胞（一度も外来抗原を認識していないCD4⁺T細胞）からTh2細胞への分化誘導、B細胞からのIgE産生などに関与することが主として*in vitro*の実験により報告されている⁹⁾が、*in vivo*でのアレルギー性炎症並びに気道過敏性発症における役割は十分に解析されていなかった。そこで、教室では2種類のIL-4遺伝子欠損マウス、すなわちBALB/c及びC57BL/6由来のマウスを用いてその意義を検討した。C57BL/6マウスの場合、IgE産生は1次免疫後一過性に上昇が認められるが、その後減少し、最終抗原暴露直前ではほとんど検出されないという特徴を有する。その結果、いずれの欠損マウスにおいても、IgE産生、気道内好酸球増多、BALF中IL-5産生並びに気道過敏性はほとんど認められなかった。¹⁰⁾ これらの成績は、IL-4は初回免疫後のTh2細胞の分化及びそれに引き続いて誘導されるアレルギー性炎症に必須であることを示すのと同時に、血清中の抗原特異的IgE値に関しては、両マウスの比較検討から気道過敏性発症と必ずしも連関していないことを示唆している。そこで、さらにIL-4並びにIgEの意義を検討する目的で、抗IL-4抗体を抗原暴露期間中に投与し、後天的にIL-4の作用を中和した際の影響を検討した。その結果、IgE産生は抗IL-4抗体投与により明らかに抑制されたが、気道内好酸球増多並びに気道過敏性にはほとんど影響を及ぼさなかった。¹¹⁾ 以上のことから、IL-4は*in vivo*においてもIgE産生、気道内好酸球増多並びに気道過敏性発症に重要な機能分子であるが、上述の成績はIL-4の作用をongoingな状態で抑制しても気道過敏性の制御は困難であることを示している。

6. IL-5の意義

IL-5もIL-4と同様、Th2サイトカインの1つであるが、IL-5は特に好酸球の分化・増殖・活性化に必須の機能分子¹²⁾であり、好酸球性炎症の発症において重要な役割を有することが知られている。しかし、抗原暴露による気道過敏性発症における役割は不明であった。そこで教室では、抗IL-5抗体、可溶性IL-5受容体並びにIL-5受容体 α 鎖欠損マウスを用いてその意義を検討した。IL-5受容体は、周知のように α 鎖と β 共通鎖からなる。このうち α 鎖はIL-5の刺激を特異的に伝達する受容体であるが、 β 共通鎖はIL-3やgranulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)と共通の受容体である。まず、この α 鎖欠損マウスでは、IgE産生並びにIL-5産生は野生型マウスと差は認められなかったが、気道内好酸球はほとんど認められず、さらに気道過敏性も発症しなかった。¹³⁾ したがって、IL-5は本モデルにおける気道内好酸球増多はもとより、気道過敏性発症においても重要な役割を有することが示唆された。一方、上述のIL-4での検討同様、抗原暴露時にIL-5の作用を中和抗体⁶⁾あるいは可溶性受容体¹⁾を投与し検討したところ、気道内好酸球増多は明らかに抑制されたが、気道過敏性にはほとんど影響を及ぼさなかった。以上の成績は、IL-4の場合と同様に、IL-5の場合もその作用をongoingな状態で抑制しても気道過敏性の制御は困難であることを示している。

この点に関しては、近年、欧米において抗IL-5抗体の臨床知見が行われた結果、ほぼ同様の成績が報告されている。¹⁴⁾ すなわち、抗IL-5抗体を喘息患者に投与した際、喀痰中の好酸球数並びに血中の好酸球数ともに有意な抑制が認められたが、気道過敏性に関してはほとんど効果が認められないことが示された。さらに、近年、同様のマウスモデルを用いた検討から、抗原暴露による気道過敏性が発現した時点から抗IL-5抗体を投与した場合、その効果がほとんど認められないことも報告されている。¹⁵⁾ 現在、この治験成績に関しては、症例数や測定項目などで現在もお論議がなされているところではあるが、その一方で、本論文は臨床においても吸入ステロイドなどのような複合的な作用を有する治療法に比し、単一の機能分子の抑制という治療法の限界を示しているのかも知れない。

7. 抗原暴露時における IL-4 並びに IL-5 の作用の中和

上述のように IL-4 あるいは IL-5 の作用を抗原暴露時に中和しても症状の改善は認められなかったことから、両者の中和を目的とし、それぞれの中和抗体を同時に投与しその影響を単独処置の場合と比較検討した。その結果、両者を同時に中和した際には、血清中抗原特異的 IgE 値の上昇、気道内好酸球増多並びに気道過敏性のいずれも有意に抑制された。¹⁶⁾したがって、少なくとも本モデルにおいて、アレルギー性気道炎症獲得後の症状の是正には、IL-4 及び IL-5 の両者の作用の抑制が重要であることが示唆された。

8. おわりに

以上、これまでに教室で得られた成績を中心にアレルギー性気管支喘息の好酸球増多並びに気道過敏性発症に関与する細胞並びに機能分子に関して概説した。Figure 2 は、教室で得られた成績及びこれまでの報告から、アレルギー性気道炎症及び気道過敏性発症に関与する細胞並びに機能分子をまとめたものである。上述のように、最近、アトピー型気管支

喘息の基礎研究は、特に遺伝子背景が明確であり、種々の遺伝子改変動物が作成されたことからマウスを用いた検討が主流となりつつあるが、これらのモデルにおいても問題点が指摘されている。すなわち、同一系統のマウス、すなわち遺伝子背景が同一のマウスを用いても、感作条件あるいは抗原暴露の条件が異なると、病態形成に関わる細胞や機能分子の度合いが異なる可能性が報告されている。^{17,18)}このことはヒトに外挿すれば、一卵性双生児においても環境によりターゲット細胞あるいは機能分子が異なる可能性を示唆しており、ここにも複雑な免疫反応をベースとするアレルギー疾患の多因子疾患としての病態解明及び標的機能分子の探索の難しさが示されている。また、遺伝子改変動物を用いた検討の場合にも、①使用したマウスの遺伝子背景、②戻し交配の必要性並びに③後天的制御の場合との比較、など最終的な結論を導き出すには問題点も多い。

しかしながら、近年、世界的に進められているマイクロアレイなどの網羅的遺伝子解析により、今後、マウス及びヒトにおいて、未知のあるいはこれまでにアレルギーとの関連性が報告されていないよ

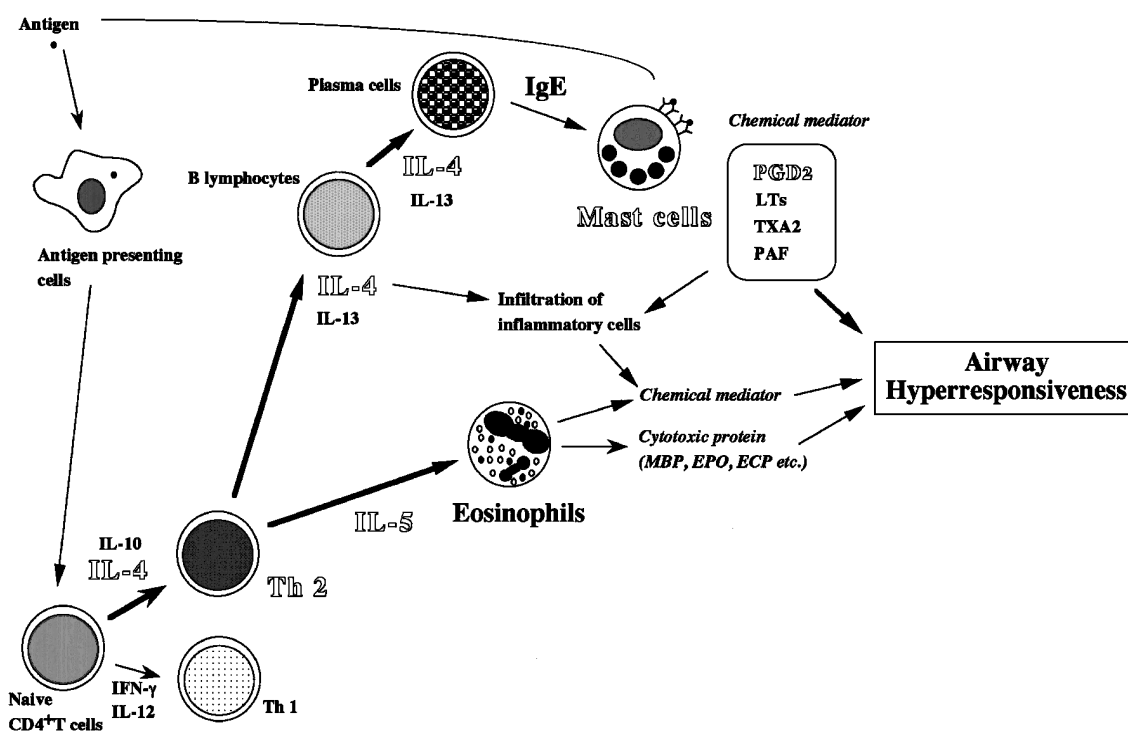


Fig. 2. A Proposal Schema for the Development of Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in Allergic Bronchial Asthma

ECP: eosinophil cationic protein, EPO: eosinophil peroxidase, IFN: interferon, LTs: leukotrienes, MBP: major basic protein, PAF: platelet activating factor, PGD2: prostaglandin D2, Th: T helper, TXA2: thromboxane A2.

うな遺伝子が発見される場合が多くなることが予想される。その際には、遺伝子改変動物あるいはウィルス等による気道における遺伝子の強制発現系を用いたマウス喘息モデルにおける解析が重要な手法になるものと思われ、今後の研究成果が期待される。

謝辞 本総説で紹介した研究成果は、岐阜薬科大学薬理学教室で行われたものであり、終始ご指導・ご鞭撻を賜りました永井博弼教授に深甚なる謝意を表します。また、研究を遂行するに当たり、IL-5 遺伝子改変動物を譲渡いただきました東京大学医科学研究所の高津聖志教授に深謝いたします。さらに、DP 遺伝子欠損マウスの成績は、京都大学大学院医学研究科の成宮 周教授との共同研究の成果であり、ここに深謝申し上げます。また、本研究において終始ご指導・ご協力いただきました教室の皆様は心より御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Yamaguchi S., Nagai H., Tanaka H., Tsujimoto M., Tsuruoka N., *Life Sci.*, **54**, PL471-475 (1994).
- 2) Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A., *Nature*, **383**, 787-793 (1996).
- 3) Robinson D. S., *Br. Med. Bull.*, **56**, 956-968 (2000).
- 4) Nagai H., Yamaguchi S., Tanaka H., Inagaki N., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **108**, 189-195 (1995).
- 5) Galli S. J., *New Engl. J. Med.*, **328**, 257-265 (1993).
- 6) Nagai H., Yamaguchi S., Maeda Y., Tanaka H., *Clin. Exp. Allergy*, **26**, 642-647 (1996).
- 7) Matsuoka T., Hirata M., Tanaka H., Takahashi Y., Murata T., Kabashima K., Sugimoto Y., Kobayashi T., Ushikubi F., Aze Y., Eguchi N., Urade Y., Yoshida N., Kimura K., Mizoguchi A., Honda Y., Nagai H., Narumiya S., *Science*, **287**, 2013-2017 (2000).
- 8) Hirai K., Tanaka K., Yoshie O., Ogawa K., Kenmotsu K., Takamori Y., Ichimasa M., Sugamura K., Nakamura M., Takano S., Nagata K., *J. Exp. Med.*, **193**, 255-261 (2001).
- 9) Brown M. A., Hural J., *Crit. Rev. Immunol.*, **17**, 1-32 (1997).
- 10) Tanaka H., Kawada N., Yamada T., Kawada K., Nagai H., *Allergol. Int.*, **49**, 253-261 (2000).
- 11) Nagai H., Maeda Y., Tanaka H., *Clin. Exp. Allergy*, **27**, 218-224 (1997).
- 12) Greenfeder S., Umland S. P., Cuss F. M., Chapman R. W., Egan R. W., *Respir. Med.*, **2**, 71-79 (2001).
- 13) Tanaka H., Kawada N., Yamada T., Kawada K., Takatsu K., Nagai H., *Clin. Exp. Allergy*, **30**, 874-881 (2000).
- 14) Leckie M. J., ten Brinke A., Khan J., Diamant Z., O'Connor B. J., Walls C. M., Mathur A. K., Cowley H. C., Chung K. F., Djukanovic R., Hansel T. T., Holgate S. T., Sterk P. J., Barnes P. J., *Lancet*, **356**, 2144-2148 (2000).
- 15) Mathur M., Herrmann K., Li X., Qin Y., Weinstock J., Elliott D., Monahan J., Padrid P., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **159**, 580-587 (1999).
- 16) Tanaka H., Nagai H., Maeda Y., *Life Sci.*, **62**, PL169-174 (1998).
- 17) Kobayashi T., Miura T., Haba T., Sato M., Serizawa I., Nagai H., Ishizaka K., *J. Immunol.*, **164**, 3855-3861 (2000).
- 18) Williams C. M., Galli S. J., *J. Exp. Med.*, **192**, 455-462 (2000).