

I-1 気管支ぜん息の発症リスク低減に関わる因子の検索と管理・指導への応用に関する調査研究

代表者：滝澤 始

【研究課題全体の目的、構成】

ディーゼル車両から排出される大気汚染物質、とくに微粒子物質は都市部における微小粒子状物質の主要なものとして、その呼吸器系への健康影響が懸念され調査研究が進められてきた。その結果、近年増加する気管支ぜん息などのアレルギー性呼吸器疾患の増悪や発症への影響が示されてきたが、その機序の詳細については不明な点が残されている。私たちは、実際の大気環境中でありうる低い濃度で、かつ長期間継続的にディーゼル排気(Diesel Exhaust, DE)に曝露するマウスの系を確立し、気道の過敏性が亢進するとともにアレルギー炎症に関連の深いサイトカイン群の発現・産生が増強することを明らかにした。さらにぜん息モデル動物における急性期の増悪影響、慢性期での気道リモデリングへの影響、さらに発症への影響について報告してきた。これらの健康影響に対する有効な対策を講じる上で不可欠な課題が、個人における DE に対する感受性の差である。私たちは異なる 2 つのマウス系の比較検討から、その感受性要因として、抗オキシダント酵素、特に heme oxidase (HO)-1 とその発現調節因子 Nrf-2 を見出した。本調査研究では、以上の研究成果をふまえ、

1) まず実験モデルにおけるぜん息発症・増悪にかかわる感受性遺伝子を、種々の手法を用いて同定し、

2) さらにこれらを危険因子としてスクリーニングするために適切なバイオマーカー開発を試みる。

3) 次に、感受性のある系統マウスに抗オキシダント物質を各種予防的に投与することにより、DE による喘息は症リスクが低減できるか否かを検証する。

以上の研究により、ディーゼル排気曝露に対する高リスク群のスクリーニングのためのバイオマーカーの開発と、健康被害のリスク低減のための化学予防を含む諸対策が、効率的かつ科学的根拠に基づいて実施するための基礎が確立されると期待する。

1 研究従事者（○印は研究リーダー）

○滝澤 始（帝京大学溝口病院第四内科）工藤 翔二（日本医科大学呼吸器感染腫瘍内科）
吾妻 安良太（日本医科大学呼吸器感染腫瘍内科）李 英姫（日本医科大学衛生学公衆衛生学）菅原 勇（結核研究所分子病理学）幸山 正（東京大学呼吸器内科）山内 康宏（東京大学呼吸器内科）

2 平成18年度の研究目的

前年度までの成果を踏まえ、DEP 単独曝露に対する感受性が異なることが判明した遺伝背景の異なる 2 つの純系、すなわち C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを用い、低濃度かつ長期間継続的（DE 曝露：100ug/m³、1日7時間、週5日間。2ヶ月～6ヶ月間）曝露を行った。そして、DE 単独曝露による 2 つの系統間での反応性、気道炎症、肺局所でのサイトカイン群、抗酸化酵素群の発現などの差を定量的に評価する。今年度は、その系統差を確定するために、生後すぐの幼弱マウスを用い、6ヶ月間曝露する。

3 平成18年度の研究の対象及び方法

動物：生まれた直後の純系マウス雌 C57BL/6 と BALB/c を用いた。

実験群：コントロール群(Cont)、DE曝露群(DE)

DE曝露：100ug/m³、1日7時間、週5日間持続的に2ヶ月～6ヶ月間吸入させた。

実験スケジュール：

生まれた直後の C57BL/6 マウスと BALB/c マウスをランダムにコントロール群、DE曝露群に分ける。コントロール群の飼育は結核研究所内の specific pathogen free (SPF) で行い、DE曝露群は 100ug/m³ にDEチャンバーに入れてDE曝露を施行しながら飼育した。DE曝露 2、4、6ヶ月後、以下の項目について検討した。

① 気道過敏性(Airway Hyperresponsiveness, AHR)の測定：既報のような無拘束下での気道収縮測定を、Buxco 社の whole body plethysmography にて行う。この際、気道反応性(reactivity)は一定濃度のメサコリン吸入による気道収縮の強さから評価し、気道の過敏性(sensitivity)は Penh で評価した。DE曝露後の気道過敏性の評価はそれぞれ系統のマウスのベースラインレベルでの Penh のパーセンテージを指標とした。

② 病理組織学検討：全身麻酔下にて脱血 sacrifice し、肺病理組織標本を作製し、HE染色を行い、病理組織学検討を行った。

③ 気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL)：気管を全身麻酔下に露出し、カニューレシオンし、既報に準じて気管支肺洗浄を行い、遠心分離により細胞を回収し、細胞総数、細胞の分画算定を行った。気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) の上清の、MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13 などのサイトカインのタンパク濃度は ELISA 法にて測定した。

④ RNA抽出と Real Time PCR：全身麻酔下にて脱血 sacrifice し、速やかに肺を取り出し、液体窒素にて急速冷凍後 -80℃にて凍結保存し、RNA抽出に提供した。TRIzol Reagent にてRNA抽出を行い、逆転写により cDNA を合成し、肺組織をの抗酸化酵素である heme oxygenase (HO-1)、glutathione-S-transferase(GST)-M1 mRNA 発現について Real Time PCR 法にて定量的に検討した。

4 平成18年度の研究成果

① 気道過敏性：低濃度・長期 DEP 単独曝露により、C57BL/6 マウスでは曝露 2ヶ月後、気道過敏性 (メサコリン 24mg/ml) が亢進したが、長期曝露によりベースラインレベルに戻ることが確認された。BALB/c マウスでは気道過敏性の変化は認められなかった。

② 病理組織学検討：低濃度 DEP 単独曝露 2ヶ月と 4ヶ月後、いずれのマウスにおいても病理組織学的に明らかな変化は認められなかった。曝露 6ヶ月後、C57BL/6 マウスでは、気管支周囲においてリンパ球を主体とする明らかな炎症細胞の浸潤を伴う気道炎症病変が見られた。BALB/c マウスでは肺病理組織学的に明らかな変化は認められなかった。

③ BALF 中の総細胞と細胞分画算定：低濃度 DEP 単独曝露 2ヶ月後、BALF 中の総細胞とマクロファージ数は、C57BL/6 マウスでは BALB/c と比較し、上昇する傾向が見られたが、有意差は得られなかった。DEP曝露 4ヶ月後では、いずれのマウスにおいても明らかな BALF 中細胞数の変化は認められなかった。DE曝露 6ヶ月後、BALB/c マウスでは、C57BL/6 マウスと比較し、総細胞数とマクロファージ数は有意に上昇した。キムザ

染色の細胞標本では、両系統のマウスともマクロファージの粒子の貪食像が見られた。C57BL/6 マウスは BALB/c マウスと比較し、リンパ球と好酸球が有意に上昇した (図 1)。

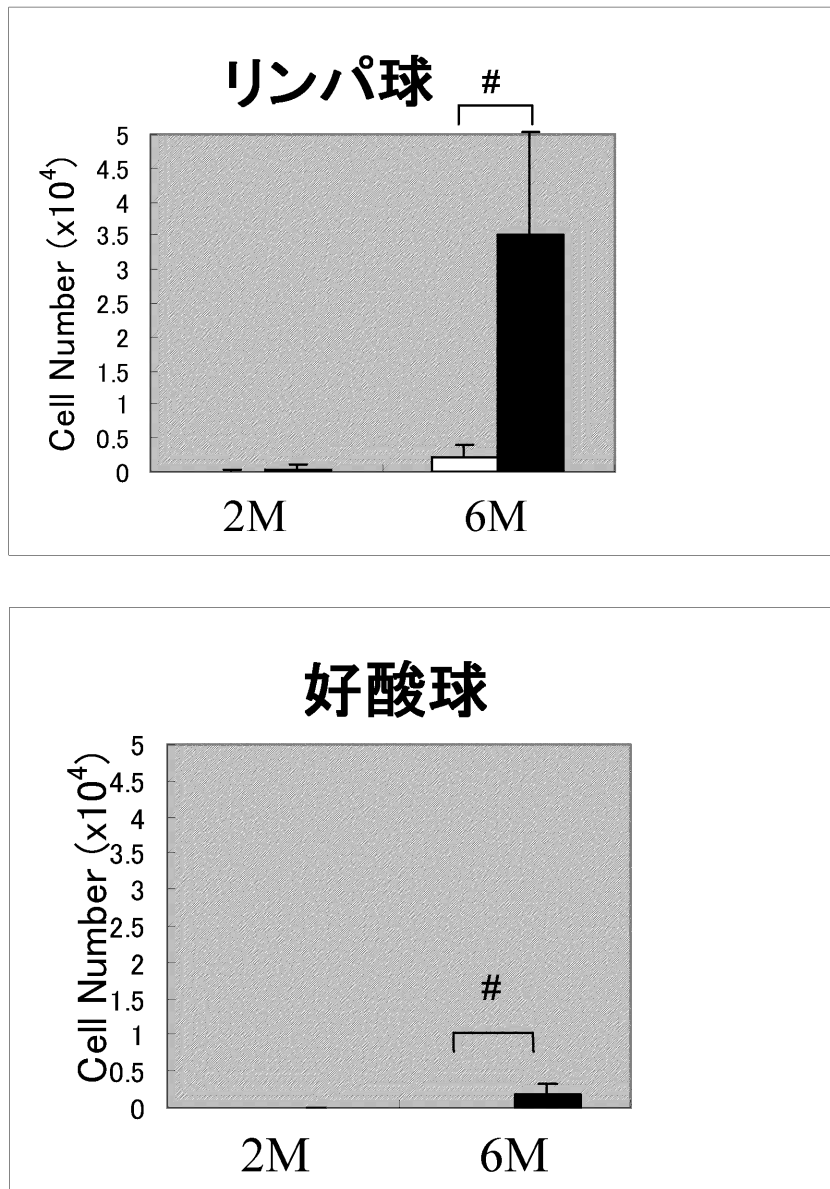


図 1

- ④ BALF 中サイトカイン測定：低濃度 DEP 単独曝露 6 ヶ月後、BALB/c マウスでは、マクロファージの遊走因子である MCP-1 は有意に上昇した。C57BL/6 マウスでは TNF- α と IL-1 β が有意に減少したが、IL-12 と IL-13 は有意に上昇した (図 2)。IFN- γ 、IL-4、IL-10 はいずれのマウスにおいても明らかな変化は認められなかった。

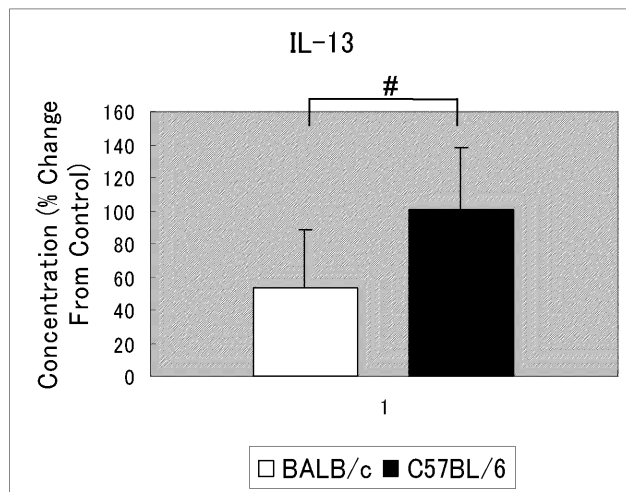
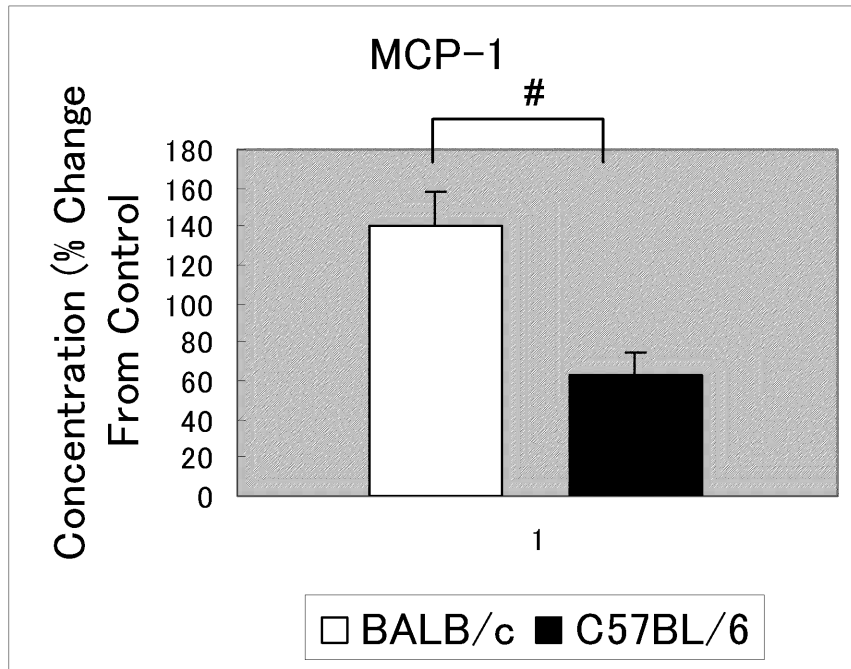


図 2

- ⑤ HO-1、GST-M1 mRNA 発現：低濃度 DEP 単独曝露 6 ヶ月後、BALB/c マウスでは、抗酸化酵素である GST-M1 の遺伝子の発現が有意に増強したが、C57BL/6 マウスでは有意に減少した。HO-1 の発現は両系統のマウスにおいても明らかな変化は認められなかった (図 3)。

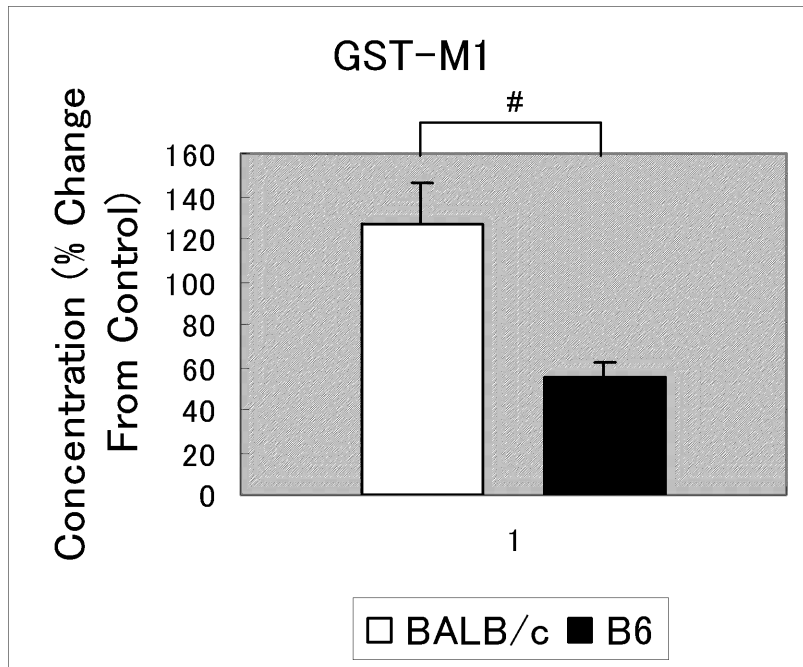


図 3

5 考察

前年度までの2つの系統マウスでの比較は、7日から最長56日間の暴露によるものであり、今年度はよりヒトの長期暴露の影響を想定して、最大6ヶ月間の影響を詳細に検討した。低濃度・長期（6ヶ月）DEP単独曝露により、BALB/cマウスでは、BALF中マクロファージの遊走因子であるMCP-1が有意に上昇するとともに、DEPを貪食した肺胞マクロファージの気腔内への浸潤が増多し、明らかな炎症病巣は見られなかった。肺組織の抗酸化ストレス酵素であるGST-M1の発現がコントロール群と比較し増強していることにより、BALB/cマウスでは、DEPの酸化ストレスに対する抗酸化防御反応により自然免疫反応段階に止まっている可能性が示唆された。

一方、低濃度・長期DEP単独曝露により、C57BL/6マウスでは、リンパ球の浸潤を伴う明らかな気道周囲の炎症病巣が見られた。BALF中特異的免疫をリンクする重要なサイトカインであるIL-12の産生が有意に上昇し、DEに対する感受性はIL-12に依存する可能性が示唆された。抗酸化酵素の発現は、コントロール群（非暴露群）と比較し低下していることから、C57BL/6ではDEPの酸化ストレスに対する抗酸化防御反応が弱く、リンパ球を動員した反応によって生体のバランスをとっている可能性が示唆された。また、低濃度・長期DEP単独曝露により、C57BL/6マウスでは暴露期間6ヶ月の時点で、気腔内への好酸球浸潤が認められBALFでも確認されたが、この反応がさらに暴露を継続すると喘息類似のアレルギー性炎症病態に進展していくのか否かは不明である。昨年度の短期曝露で認められた気道過敏性の亢進と同様、DE曝露による酸化ストレスと生体の抗酸化防御反応のダイナミックなバランスにより時期によって異なる反応が観察されるのかもしれない。前年度の短期間曝露でも認められたIL-13の増加が6ヶ月間という長期にわたる曝露によっても認められたことは、この影響が慢性曝露によって恒常的に及ぼされる影響であることを強く示唆する。DE曝露により、気管支局所においてはIL-13によってもたらされる「喘息準備状態」と抗酸化防御機構による「ネガティブフィードバック」とが微妙なバランスをとっていることが類推される。

生体に対する酸化ストレスは一次的、二次的に TNF- α と IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現を誘導する。このことは、一面において炎症を惹起して組織障害を起こす可能性があるが、他方生体の防御反応としても機能している。DE 単独長期暴露により、C57BL/6 マウスでは BALB/c と比較し、BALF 中の TNF- α と IL-1 β の誘導が有意に弱かった。これら炎症性サイトカインはマクロファージの刺激因子として重要な役割を演じており、肺胞マクロファージの DE 貪食能や処理能力に関連が予想される。マクロファージの前駆体の単球を遊走させ活性化させる MCP-1 の発現の差も相まって、相対的に C57BL/6 マウスでは、DE 曝露後の肺局所での処理能が低下し、結果として IL-13 などの喘息病態に関連するサイトカイン発現につながっている可能性もある。このように系統による DEP への反応性の差は、単一遺伝子によって決定されるとは言えず、複雑なネットワークをもつ生体反応によっているものと考えられた。

来年度の予定しているアレルギー性喘息モデルでの感受性の差についても一部検討した。その結果、低濃度 DEP の長期（6 ヶ月）曝露は、BALB/c マウスでの喘息炎症病態の増悪作用を示した一方で、喘息自体が軽い C57BL/6 マウスではほとんど影響がないという結果が得られた。

6 次年度以降の計画

以上の結果の機構を解明するために、アレルギー性気道炎症に関わる因子である BALF 中の IL-5, Eotaxin, RANTES および抗酸化ストレス関連酵素である NQO1 (Quinone reductase; NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1) mRNA and Protein assay、HO-1, GST-1 の Protein assay、GSH/GSSG (reduced glutathione/glutathione disulfide) assay、酸化ストレス指標である 8-OHdG/8-oxo-dG/8-hydroxy-2'-deoxyguanosine を測定する予定である。

今年度、一部前倒して行った検討、すなわち低濃度かつ長期間継続的 DEP の曝露によるアレルギー性気管支ぜん息モデルでの気道炎症反応の系統差の検討をさらに推進する。

これらの検討を通じて、健常状態の個体における感受性因子、及びすでに喘息病態にある個体の感受性因子について、DE の酸化ストレスに対する抗酸化反応という観点で追求し、その反応を制御するキーファクターとして抗酸化酵素をコードする重要な転写因子である NF-E2-related factor-2 (Nrf2) に注目して、Nrf2 ノックアウトマウスを用いた研究により、DE の高リスク群をスクリーニングできる分子機構を明らかにしたいと考えている。

7 社会的貢献

低い濃度でかつ長期間継続的にディーゼル排気(Diesel Exhaust, DE)に曝露するマウスの系においては、ぜん息の発症・増悪に対する増強作用が認められ、かつその感受性決定因子として抗オキシダント酵素群とその転写調節因子がクローズアップされてきた。従来の実験系に比べより実際の大气環境に近い条件で得られたこれらの知見は、DE による健康影響の低減を試みる必要性を強く示唆するものであると思われる。そこで、本研究の目的は、この実験系においてぜん息発症・増悪の原因となる標的分子を明らかにし、そして高リスク群をスクリーニングするためのバイオマーカーを開発し、さらにこれら高リスク群の健康被害を低減するための対策を発見することとする。私たちの実験系はその目的達成に最適な研究システムであると考えられる。

以上の利点を有する本研究計画により、DE 曝露に対する高危険群のスクリーニング、さらには健康被害低減のために必要な諸対策が、科学的根拠に基づいて、かつ効率的に実施することを可能にすると期待される。

【発表学会・論文】

[発表]

1. 幸山正(東京大学 呼吸器内科), 滝澤始, 加藤順, 菊地和彦, 高橋宏行, 高見和孝, 岡崎仁, 出崎真志, 石井彰, 長瀬隆英: 老化肺線維芽細胞機能の検討 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)44 巻増刊 Page324(2006.06)
2. 松本亜紀(日本医科大学 第四内科), 李英姫, 平松久弥子, 宇田川忠, 菅原勇, 滝澤始, 吾妻安良太, 工藤翔二: 低濃度ディーゼル排気暴露が喘息発症に及ぼす影響 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)44 巻増刊 Page323(2006.06)
3. 李英姫(日本医科大学 衛生学・公衆衛生学教室), 松本亜紀, 滝澤始, 吾妻安良太, 菅原勇, 川田智之, 工藤翔二: 低濃度 DEP 曝露によるマウス炎症性サイトカインの系統差 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)44 巻増刊 Page197(2006.06)
4. 李英姫(日本医科大学 衛生学・公衆衛生学教室), 松本亜紀, 吾妻安良太, 滝澤始, 川田智之, 菅原勇, 工藤翔二: 低濃度 DEP 曝露によるマウス炎症性サイトカインの系統差 日本衛生学雑誌(0021-5082)61 巻 2 号 Page246(2006.03)
5. Kohyama T, Takizawa H, Kato J, Kikuchi K, Yamauchi Y, Takami K, Okazaki H, Ishii A, Nagase T: clarithromycin inhibits migration of lung fibroblast. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of respiratory, Kyoto, 2006. 11. *Respirology* 11(suppl5):A173, 2006.
6. Li YJ, Takizawa H, Azuma A, Matsumoto A, Kawada T, Sugawara I, Kudoh S. Mouse strain differences in airway inflammatory responses caused by long-time low-dose diesel exhaust exposure. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of respiratory, Kyoto, 2006. 11. *Respirology* 11(suppl5):A276, 2006.
7. Yamauchi Y, Okazaki H, Desaki M, Kohyama T, Takizawa H, Nagase T: Methotrexate induces proinflammatory cytokines production by human bronchial and alveolar epithelial cells. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of respiratory, Kyoto, 2006. 11. *Respirology* 11(suppl5):A279, 2006.

[論文]

1. 滝澤 始: 気管支喘息・セミナー どんなときに喘息を疑うか 症状・病歴・問診・身体所見とそのとりかた。 *Medical Practice* 2006;23(2):233-236.
2. 滝澤始: 内科疾患最新の治療 専門家からのアドバイス 内科(0022-1961)97 巻 6 号 Page978-979(2006.06)
3. 滝澤始: 呼吸器系の生物学 ディーゼル排気微粒子と気道上皮細胞 *Annual Review 呼吸器* 2006 巻 Page51-55(2006.01)
4. 滝澤始: 【大気汚染と呼吸器】 ディーゼル排気微粒子と呼吸器疾患 *日本胸部臨床* (0385-3667)65 巻 3 号 Page234-242(2006.03)
5. 滝澤始: 気管支喘息・セミナー どんなときに喘息を疑うか 症状・病歴・問診・身体所見とそのとりかた *Medical Practice*(0910-1551)23 巻 2 号 Page233-236(2006.02)
6. 滝澤始: 成人気管支喘息はどのように診断するのか 診察・診断のコツ アレルギー・免疫 (1344-6932)13 巻 2 号 Page166-169(2006.01)
7. Matsumoto A, Hiramatsu K, Li Y, Azuma A, Kudoh S, Takizawa H, Sugawara I. Repeated exposure to low-dose diesel exhaust after allergen challenge exaggerates asthmatic responses in mice. *Clin Immunol.* 2006 Nov;121(2):227-35. Epub 2006 Sep 18.