

喘息等アレルギー疾患の診断、治療、予防を目的とした新規医薬品の開発を目指した研究

研究期間 平成17年度～平成21年度(予定)

研究体制

総括 齋藤 博久[国立成育医療センター] 岡山 吉道[日本大学]

※平成21年度における研究体制

難治性喘息治療・診断薬の開発に大きく前進

Project
KeyWord
キーワード

気道リモデリング

平滑筋の肥厚など不可逆的な気道閉塞のことを指す。難治性喘息病態の重要な要素である。

マスト細胞

IgE抗体を介して即時型アレルギー反応や気道リモデリングをひきおこす細胞。

制御性T細胞

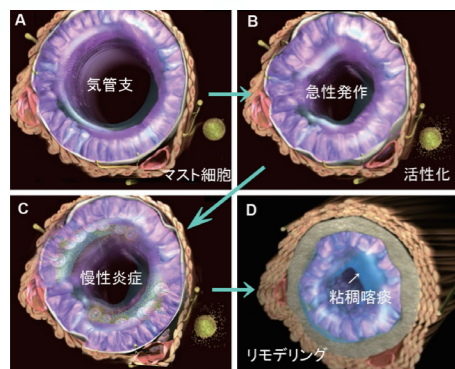
T細胞やマスト細胞の活性化を抑制する細胞。重症アレルギー疾患で著しく低下。

1 研究の背景・意義

喘息気道リモデリングとマスト細胞

気管支喘息(喘息)はアレルギー反応によって惹起される気道平滑筋収縮と好酸球などの浸潤による気道炎症によって特徴づけられる。近年の治療法の進歩により、年間死亡数は3千人以下に減少したが、それでも慢性的な炎症を完全に遮断することは困難で、徐々に気道リモデリングは進行し薬剤を使用し続ける必要がある。ステロイド薬は気道炎症を抑制するが、気道リモデリングはほとんど抑制しない。アレルギー反応の結果、マスト細胞から放出される種々の酵素やサイトカインが気道リモデリングの形成に最も重要である。従来、使用されていた抗アレルギー薬はラットのマスト細胞の活性化を抑制するが、ヒトのマスト細胞には作用しないこと、および、ヒトのマスト細胞は手術切除などの手段を用いない限り入手できないことが問題となっていた。

我々は2004年度までに、ヒトマスト細胞を培養する方法を開発し、マスト細胞を含む46種類の細胞の全発現遺伝子を比較解析することにより、マスト細胞特異的分子を同定したので、本プロジェクトでは、これらを標的とした難治性喘息治療・診断薬の開発に着手した。



▲気道マスト細胞活性化により、喘息発作(A→B)が出現、その後、慢性炎症(C)を経て、気道リモデリング(D)がおこる。

2 研究プロジェクトの目標

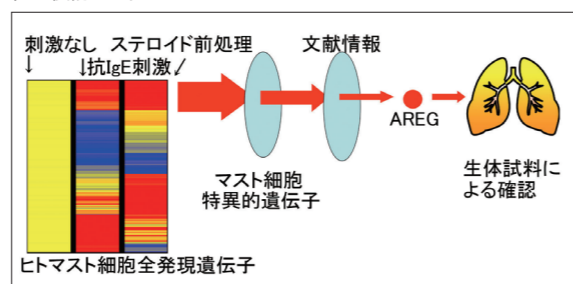
難治性喘息治療・診断薬の開発

新規マスト細胞特異的遺伝子として同定したもので、①ステロイド薬前処理によって抑制されず、試験管内アレルギー反応で増強し、気道リモデリング作用の予測されたアンフィレギュリン(AREG:図参照)を、②新規なG蛋白共役型受容体(GPCR)-MC(仮名)を、③アレルギー疾患発症関連遺伝子であることを見いだしたインターロイキン(IL-)33受容体、以上の3つの分子を標的として難治性喘息治療・診断薬の可能性を検討した。

①AREGに関しては、アレルギー性喘息マウスモデルを作成し、遺伝子欠損マウスをもちいてアンフィレギュリンの喘息における役割を検討した。また、喘息発作で入院した患者の喀痰などのAREGを定量した。さらに、ヒト気道上皮細胞などをもちいて、AREGを標的とした喘息治療薬、診断薬の可能性を検討した。

②GPCR-MCに関しては、文献より特異的リガンドを同定し、培養ヒトマスト細胞や喘息マウスモデルにおけるGPCR-MCを標的とした難治性喘息治療薬の可能性について検討した。

③IL-33受容体に関しては培養ヒトマスト細胞や喘息マウスモデルにより、IL-33受容体を標的とした難治性喘息治療薬の可能性を検討した。

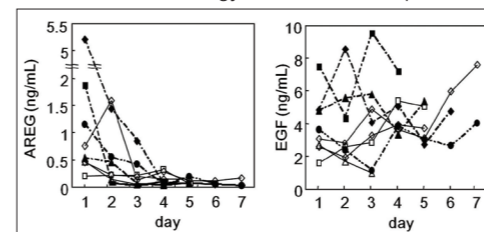


▲マスト細胞を活性化した場合、その発現がステロイドで抑制されない遺伝子を網羅的に探索、組織特異性などによりAREGを選択した。

3 研究プロジェクトの成果

アンフィレギュリンの診断薬としての有用性

喘息マウスモデルにおける検討で、AREG欠損の影響は見いだせなかった。AREGはepidermal growth factor(EGF;他の細胞より産生)と受容体を共有することが原因であると解釈された。そこで、喘息発作で入院した患者喀痰中のAREGとEGFを定量した。両者とも発作時に増加したが、AREGが発作消失後すぐに低下するのに対し、EGFは一週間以上高値を維持した。EGFは気道平滑筋増殖作用がみられたが、AREGには認めなかった。両者とも著明な気道上皮杯細胞(粘稠な喀痰産生細胞)過形成を示した(J Allergy Clin Immunol, in press 2009)。

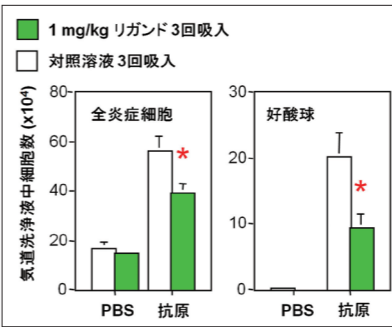


▲アンフィレギュリンAREGは喘息発作入院後4日で低下するのに対し、EGFは入院後7日目でも高値を示すことがあった。

マスト細胞特異的GPCRを標的とした治療法

GPCR-MCはβ2アドレナリン受容体と同様Gsαと会合する。アゴニストであるリガンドによる前処理は、ヒトマスト細胞のIgE依存性の活性化を抑制した。この抑制作用はβ2作動薬と同等であった。しかし、長期間の前処理によりβ2作動薬の効果は失活するのに対し、GPCR-MCアゴニストによる効果は失活することはなかった。また、GPCR-MCリガンド前処理は、副作用症状も生じることなく、喘息マウスモデルにおける炎症反応を抑制した。以上により、GPCR-MCリガンドは、従来知られていなかったヒトマスト細胞活性化に対して有効な初めての抗アレルギー薬として期待される。

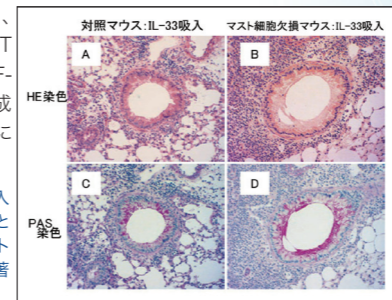
▶試験管内でマスト細胞脱顆粒を抑制したGPCR-MCリガンドはマウスの喘息反応(好酸球炎症のみ図示)も抑制した。



新規な機序による制御性T細胞の増殖

マスト細胞をIL-33で刺激すると、単独でIL-13やIL-2などの他のサイトカイン産生が誘導されたが、顆粒内のヒスタミンや組織障害性の酵素の放出はみられないというユニークな作用がみられた。IL-33を吸入したマウスは喘息病態に近似した著しい好酸球性炎症を示したが、予想に反してマスト細胞欠損動物ではこの好酸球性炎症は減弱していた。種々の検討により、IL-33で処理したマスト細胞は制御性T細胞を強く増殖させることがわかった。この増殖は従来の知見と異なり、抗原提示細胞や制御性T細胞増殖因子であるTGF-βに依存しなかった(平成21年度より厚労科研費にて研究継続)。

▶正常マウスにIL-33を吸入させると喘息様の気道炎症と杯細胞増殖を認めた。マスト細胞欠損マウスではさらに著しい反応であった。



参考文献

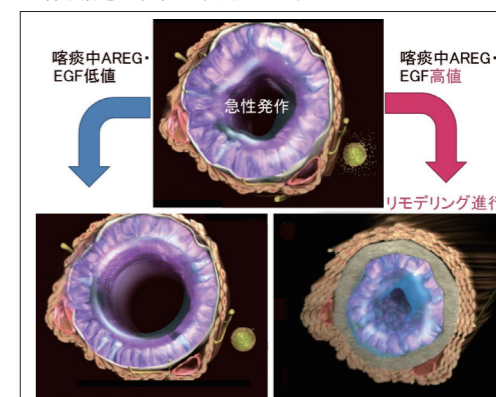
Saito H, et al. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. Nat Protoc. 2006; 1(4): 2178-2183.
Okayama Y, Ra C, Saito H. Role of mast cells in airway remodeling. Curr Opin Immunol. 2007;19(6): 687-693.
Enomoto Y, et al. Tissue remodeling induced by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway following an acute asthma attack. J Allergy Clin Immunol. In press.

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

アンフィレギュリンの診断薬としての有用性

我々の発見を契機としてステロイド薬抵抗性喘息治療薬標的としてAREGは大いに注目されていた(Curr Opin Immunol. 2007;19: 687)。本プロジェクトにおいて、AREGは粘稠喀痰産生増加を介して喘息病態に関与することが明らかとなった。しかし、あらゆる角度から検討した結果、少なくとも肺構成細胞、喘息モデルマウスにおいては、一部受容体と共有するEGFにはみられないユニークな作用は発見できなかった。以上、創薬という面ではEGFとの作用重複のため、期待した結果は得られなかったが、喘息病態におけるAREGの位置づけを明確にすることができた。

発作中の喀痰AREG定量はステロイド薬抵抗性上皮リモデリングマーカーとして期待される。また、喀痰中EGF高値の持続は気道リモデリングの進行の指標となりうる。以上により、喀痰中のAREG/EGF測定は喘息病態の把握に有用である。



▲喀痰中のAREGやEGFが持続的に高値を示す症例では、その後、高度の気道リモデリングを生じやすいかどうか検証する必要がある。

GPCR-MCを標的とした抗アレルギー薬

ヒトマスト細胞に選択的に高発現するGPCR-MCに対するリガンドは、ヒトマスト細胞活性化に対して有効な初めての抗アレルギー薬として期待される。しかし、予備実験の段階で、共同研究先の協和発酵キリン株式会社により提供されたGPCR-MCに対する選択的アンタゴニストで処理した後、GPCR-MCリガンドのマスト細胞活性化抑制作用をみたところ、この抑制作用は完全に抑制されなかった。つまり、このGPCR-MCリガンドはGPCR-MC以外の標的にも作用し、効果を発揮している可能性もある。

そこで、今後の研究課題としては、まず、より選択的なGPCR-MCリガンド化合物を同定する。そして、選択的新規化合物をもちいて、喘息マウスモデルやヒト培養マスト細胞に対する効果を検討することを計画している。また、ゲノム創薬の主旨とはずれるが、GPCR-MC以外の標的についても文献情報などをとって同定し、その標的に対する選択的リガンドを同定することも意義があると思われる。

▶マスト細胞に特異的に発現するGPCR-MCに対するリガンドはヒトマスト細胞に有効な初めての抗アレルギー薬となる可能性がある。

