

—平成15年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

気道組織修復における TGF- β 1 の役割 —マウス喘息モデルにおける検討—

田中宏幸

1. 緒 言

気管支喘息は、これまで可逆性気道閉塞、気道炎症および気道過敏性を特徴とする慢性呼吸器疾患であると定義されてきた。しかし、近年、喘息患者の中には吸入ステロイドの使用によっても症状の改善が認められない患者や、 β_2 刺激薬の使用によっても十分な気管支拡張作用が得られない患者が存在し、その原因として気道の器質的な変化、すなわち、気道リモデリングが推察されている。気道リモデリングは気道上皮構成細胞の変化(杯細胞などの粘液分泌細胞の増加)、上皮基底膜下の肥厚(コラーゲンなどの細胞外マトリックスの沈着)ならびに気道平滑筋細胞の増殖および肥厚などを特徴とする。これらの変化による気道壁の肥厚、つまり気道内腔の狭小化が収縮系の異常(気道過敏性)あるいは拡張系の異常(β_2 刺激薬による拡張障害)と関連することが推察されている¹⁾が、実際にこれらの器質的变化が臨床症状にどのように影響しているかに関しては不明である。また、臨床では、慢性多因子疾患の病態形成メカニズムの解析は困難であると思われる。

そこで、近年、著者らはマウスを用いた気道リモデリングモデルを作成し種々の検討を行ってきた²⁻⁶⁾。その結果、特に気道局所に集積した好酸球、TGF- β 1 産生量ならびに基底膜下の線維化との間に有意な相関が認められることを見いだした²⁾。これまでに、Transforming growth factor (TGF)- β 1 は種々の線維化形成において重要な増殖因子であることが知られている⁷⁾が、アレルギー反応による線維化形成における意義については不明である。そこで本研究では、TGF- β 1 のアレルギー性気道炎症ならびに気道リモデリング形成における意義を明らかにするために、その中和抗体を用いて検討した。

2. 実験方法

1) マウス抗原誘発気道リモデリングモデル

実験方法は、既報²⁾に従った。すなわち、マウスを卵白アルブミン(OA)およびアラムを用いて能動的に感作し、

その後、抗原を3週間連日暴露し、反応を惹起した。最終抗原暴露24時間後にアセチルコリンによる気道収縮反応を測定後、左肺は結紮し病理組織標本を作製し、右肺は気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、炎症性細胞数の計数およびサイトカインの定量に用いた。なお、BALF中のサイトカイン量および血清中の免疫グロブリン量はELISAにより定量した。

2) 抗 TGF- β 1 抗体

抗 TGF- β 1 抗体(マウスでは TGF- β 1 および 2 に対し中和活性を示す)は、市販(ATCC)のハイブリドーマから精製し、抗原暴露期間中、連日腹腔内投与(全期間投与)した。また、別の実験では、投与期間を抗原暴露開始から10日間(前半投与)とその後の11日間(後半投与)とし、それぞれの影響を全期間投与と比較検討した。

3. 結果・考察

1. 3週間連続投与(全期間投与)

マウス IgG1 を腹腔内投与した対照マウスでは、抗原反復暴露によりアセチルコリンに対する気道過敏性、BALF 中好酸球增多、Th2 サイトカイン産生量の増加、Th1 サイトカインである IFN- γ 産生量の低下ならびに血清中抗原特異的 IgE 値の上昇が観察された(Table 1)。また、組織的検討では気管支および細気管支において杯細胞の過増生および肥厚ならびに上皮基底膜下の線維化が観察された(Table 1)。これらの変化は、重症喘息患者においても認められ、喘息の難治化および重症化の一因であると考えられている。

これに対し抗 TGF- β 1 抗体は、気道過敏性には影響を及ぼさなかつたが、気道内好酸球增多、Th2 サイトカイン産生の亢進、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇、気道上皮の杯細胞の過増生を用量依存的かつ有意に亢進した。一方、抗 TGF- β 1 抗体は抗原長期反復曝露により生ずる基底膜下の線維化形成を用量依存的かつ有意に抑制した(Table 1)。

2. 前半および後半投与

抗 TGF-β抗体の前半投与は、気道内好酸球增多、Th2 サイトカイン産生の亢進、血清中抗原特異的 IgE/IgG1 値の上昇を用量依存的かつ有意に亢進したが、基底膜下の線維化形成には影響を及ぼさなかった(Table 1)。

一方、抗 TGF-β抗体の後半投与は、気道内好酸球数、サイトカイン産生、IgE 産生などには影響を及ぼすことなく、基底膜下の線維化を用量依存的かつ有意に抑制した(Table 1)。

Table 1 Effect of anti-TGF-β1 neutralizing antibody on allergen-airway remodeling in a mouse model of allergic asthma

mice	AR	Inflammation	IgE	IL-13	SEF
Control mice	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
anti-TGF-β Ab□ (from day 22 to day 42)	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑
anti-TGF-β Ab□ (from day 22 to day 31)	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑
anti-TGF-β Ab□ (from day 32 to day 42)	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑

↑↑: Marked increase

↑↑: Moderate increase

↑: Slight increase

AR: Airway responsiveness to acetylcholine SEF: Subepithelial fibrosis

これまでに各種臓器の線維化には TGF-β1 が重要な役割を有することが動物モデルを用いた研究により明らかにされてきた⁷⁾。本研究では、アレルギー反応によって生じる基底膜下の線維化反応においても TGF-β1 が重要であることを明らかにした。一方、TGF-β1 は近年注目されている制御性 T 細胞からも産生され⁸⁾、さらに interleukin (IL)-3、granulocyte-macrophage colony stimulating factor あるいは IL-5 などによる好酸球の生存延長作用を阻害し、apoptosis を誘導する⁹⁾ことも知られている。また、TGF-β1 の遺伝子欠損マウスは、生後まもなく免疫異常による多臓器不全で死亡する¹⁰⁾ことが報告されている。すなわち、炎症反応に対し制御的な側面も有することが知られている。本研究においても、特に抗原曝露期間初期に產生される TGF-β1 の作用が中和抗体の投与によって抑制されることにより、好酸球を主体とするアレルギー性炎症の亢進が認められた。これまでの検討において、抗原曝露期間中の TGF-β1 產生細胞を検討したところ、曝露期間初期では好酸球が、後期では筋線維芽細胞が主たる產生細胞であることを明らかにしている。従って、気道局所においてアレルギー性炎症発症の初期段階では好酸球から產生される TGF-β1 が、その好酸球性気道炎症の制御と組織修復との両面に、すなわち炎症終焉シグナルとして機能している可能性が示唆された。

4. 結 論

本研究では、アレルギー反応によって生ずる気道リモデリング形成における TGF-β1 の意義をその中和抗体を

用いて検討した。その結果、TGF-β1 は気道リモデリング形成、特に基底膜下の線維化形成において重要な役割を有することが明らかとなったが、その一方でアレルギー性炎症の制御にも関与することが明らかとなった。すなわち、TGF-β1 は遷延化するアレルギー性炎症の終焉シグナルとして機能していることが示唆された。

5. 引用文献

- 1) Busse, W.; Elias, J.; Sheppard, D., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 160, 1035.
- 2) Tanaka, H.; Masuda, T.; Tokuoka, S.; Komai, M.; Nagao, K.; Takahashi, Y.; Nagai, H., *Inflamm. Res.* 2001, 50, 616.
- 3) Tanaka, H.; Masuda, T.; Tokuoka, S.; Takahashi, Y.; Komai, M.; Nagao, K.; Nagai, H., *Inflamm. Res.* 2002, 51, 307.
- 4) Komai, M.; Tanaka, H.; Masuda, T.; Nagao, K.; Ishizaki, M.; Sawada, M.; Nagai, H., *Br. J. Pharmacol.* 2003, 138, 912.
- 5) Masuda, T.; Tanaka, H.; Komai, M.; Nagao, K.; Ishizaki, M.; Kajiwara, D.; Nagai, H. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33, 705.
- 6) Nagao, K.; Tanaka, H.; Komai, M.; Masuda, T.; Narumiya, S.; Nagai, H., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003, 29, 314.
- 7) Blobel, G.C.; Schiemann, W.P.; Lodish, H.F. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, 1350.
- 8) Maloy, K.J.; Powrie, F. *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. *Nature Immunol.* 2001, 2, 816.
- 9) Alam, R.; Forsythe, P.; Stafford, S.; Fukuda, Y., *J. Exp. Med.* 1994, 174, 1041.
- 10) Kulkarni, A.B.; Huh, C.G.; Becker, D.; Geiser, A.; Lyght, M.; Flanders, K.C.; Roberts, A.B.; Sporn, M.B.; Ward, J.M.; Karlsson, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, 770.