

筑波大学

博士（医学）学位論文

ヒアルロン酸合成障害に伴う
気管支喘息発症、増悪メカニズムの解明

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科
角田義弥

目次

第1章 序章

1. 気管支喘息の疾患概念 4
2. 気管支喘息の病態 5
3. 気管支喘息の炎症細胞と炎症性メディエーター 7
4. 日本人集団における気管支喘息の GWAS 13
(Genome wide association study)
5. Hyaluronan synthase 2 (HAS2) 14
6. ヒアルロン酸合成障害と気道炎症 15
7. Siglecs 17
(sialic acid immunoglobulin-like lectins)

序章総括 19

第2章 ヒアルロン酸合成障害に伴う気管支喘息発症、 増悪メカニズムの解明

1. 目的 21
2. 対象と方法 21
3. 結果 28
4. 考察 33

表・図 40

第3章 総括 57

謝辞

参考論文

第1章 序章

1. 気管支喘息の疾患概念

気管支喘息は慢性の気道炎症性疾患である。発作性の呼吸困難、咳嗽、喘鳴などの症状は様々な刺激により起こる気道狭窄とそれに伴う気流制限によって引き起こされる。気道炎症は好酸球、好中球、リンパ球、マスト細胞などの増加により特徴づけられる。繰り返す炎症によって、気道上皮の剥離、損傷、上皮化生、線維化、平滑筋の肥厚や粘膜下腺の過形成、血管新生といった気道リモデリングが起こる。気道の炎症は可逆的だが、リモデリングは進行すると非可逆的な変化となる。気道の炎症やリモデリングは気道過敏性を亢進させる。気道炎症、気道リモデリング、気道過敏性及び気流制限は相互に関連しながら症状発現をもたらすと考えられている (Fig. 1)。

2. 気管支喘息の病態

アレルギー物質（ダニ・動物・カビ・ゴキブリなど）、ウイルス感染、大気汚染、タバコ、精神的要因（ストレス・疲労）が喘息の発症や増悪と強く関連している[1]。これらの外因によって引き起こされた気道炎症は気道平滑筋の収縮、気道の浮腫、気道分泌亢進、気道リモデリングなどを介して、気流制限を引き起こす。アレルゲンに曝露された喘息患者は抗原特異的な IgE 産生の増加が起こる。この IgE 産生を制御するために Th2 系 T 細胞が Th1 系 T 細胞より優位に増加する。IgE はマスト細胞の受容体に強く結合し、気道においてマスト細胞からヒスタミン、プロスタグランジン D2、ロイコトリエンなどのメディエーターが放出され（即時型喘息反応）、気道平滑筋の収縮や微小血管透過性亢進による気道の浮腫が起こる。さらに、気道刺激により杯細胞や粘膜下腺細胞の過形成が起こり、過度に分泌された粘液が気流制限の一因となる。気道粘膜の線維化、平滑筋の肥厚、粘膜下腺過形成などにより、ほぼ永続的な気道壁の肥厚が起こり、不可逆的な気流制限が生ずる（気道リモデリング）。リモデリングは気道炎症の遷延や修復機序に伴って生ずるだけでなく、気道収縮反応だけでも誘導されうる[2]。喘息患者の気管支は、いろいろな刺激物質に反応しやすく、健常人なら反応しないような弱い刺激に対しても容易に収縮する（気道過敏性）。気道上皮が傷害されるとバリアとしての機能が失われ、知覚神経が露出し迷走神経反射が起こりやすくなる。また物理的に刺激物質の粘膜透過性が増加するようになるために気道過敏性が増強される。また、気道壁が肥厚するとそのみで気道の反応性が増強することが知られている。アトピー型喘息ではアレルゲン吸入後に数分で気道狭窄が生じる。これを即時型喘息反応という。多くは一時的に軽快するが、3 から 8 時間後に再び気道狭窄が生じる。これを遅発型喘息反応という[3]。即時型アレルギー反応はいわゆる I 型

アレルギー反応で、マスト細胞から遊離されるケミカルメディエーターの作用と考えられている。一方遅発型喘息反応は好酸球から産生されるロイコトリエンなどのメディエーターの作用によると考えられている。その後、気道での好酸球、リンパ球の浸潤の持続が気道過敏性を引き起こす。

3. 気管支喘息の炎症細胞と炎症性メディエーター

喘息の気道の病理学的所見は Fig. 2 に示したように、好酸球など種々の炎症細胞、気道上皮細胞などの組織構成細胞が遊離する炎症性メディエーターやサイトカインの直接作用、あるいはほかの細胞、神経系、接着する分子を介した作用で生じている [4-6]。

[1] 気道炎症に関与する細胞

(a) 好酸球

喘息やアレルギー性炎症において、好酸球はもともと特徴的な細胞である。また重症度にも相関している [7]。好酸球はエオタキシンファミリーのインターロイキン (IL) -5 などにより、chemokine receptor (CCR) 3 や Toll-like receptors (TLR) を介して活性化させられる [8]。好酸球は活性化するとロイコトリエンや血小板活性化因子 (PAF) などのメディエーターを出し、気道平滑筋の収縮を促す。また Major basic protein (MBP) などの組織障害性の顆粒を出し、気道上皮や神経を障害する。さらに Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) や Transforming growth factor (TGF)- α 、TGF- β のようなサイトカインと、IL を産生し、気道の線維化やリモデリングにも影響を与えている。

(b) マスト細胞

マスト細胞は喘息の気道上皮に多く、また気道平滑筋細胞と関わりが深い [9]。マスト細胞はヒスタミン、プロスタグランジン、ロイコトリエンといったメディエーターを産生する。また Tumor necrosis factor (TNF)- α を貯蔵、放出することが知られている。TNF- α は炎症細胞を遊走、活性化させる。また

気道平滑筋を肥大させる[10] [11]。

(c) 好中球

好中球の喘息にかかわる役割は明らかではないが、一般的にステロイド依存性の重症喘息患者、致命的な喘息発作や喘息増悪時に気道上皮に多くなることが知られている[12] [13]。

(d) Th2 系 CD4 陽性 T 細胞 (Th2 細胞)

Th2 系 CD4 陽性 T 細胞は喘息患者の気道に浸潤しており、抗原刺激があったときに IL-3、IL-4、IL-5、IL-13 や GM-CSF などのサイトカインを放出する[14]。また、CD4 陽性 T 細胞は chemotactic chemokine receptor (CCR)4、CCR8 や chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells (CRTH2)、プロスタグランジン D2 レセプターを発現している。これらを介して、マスト細胞と相互作用を生じる一方で、好酸球や他の CD4 陽性 T 細胞にシグナルを送り、気道炎症を持続させている[15] [16] [17]。

[2] 本実験の炎症に関与するメディエーター

(a) IgE

アトピー型喘息では病因アレルゲンに対する特異的 IgE 抗体がマスト細胞表面の $Fc\epsilon R I$ 、および好酸球、マクロファージ表面の $Fc\epsilon R II$ に結合しており、病因アレルゲンが結合して架橋形成が起こるとマスト細胞が活性化されて、メディエーターが放出され即時型喘息反応が起こる[1]。

(b) IL-4

IL-4 は Th2 細胞、NKT 細胞、マスト細胞、好塩基球などから産生される [18]。IL-4 は抗原と反応した T 細胞の増殖を助ける。ナイーブ T 細胞から CD4 陽性 T 細胞への分化と B リンパ球の IgE 産生細胞へのスイッチを促す。IgE 産生は IL-5 の共存で増強される。CD8 陽性 T 細胞にケモカインレセプター CXCR3 を表出させ、炎症部位へと遊走させる。また、vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 の上皮細胞への発現を促すことにより、好酸球、好塩基球、T 細胞の炎症部位への遊走に関与する [19]。

(c) IL-5

IL-5 は活性化 T 細胞や自然リンパ球 (ILC : Innate lymphoid cell) 2、マスト細胞などが産生し、好酸球の骨髄での分化、増殖、気道への集簇、活性化などに深く関与する [1]。IL-5 は活性化された B 細胞の増殖をもたらす作用と、B 細胞からの IgM、IgG、IgA 産生を促進させる作用がある。B 細胞に IL-2 レセプターを表出させる作用もある。またナイーブキラー T 細胞に IL-2 レセプターを表出させ、IL-2 の作用でエフェクターキラー T 細胞に分化するのを補助する。GM-CSF と共同して未熟好酸球を増殖させ、好酸球に分化させる。また好酸球を活性化させる [18]。

(d) IL-6

IL-6 は炎症が起こった際に、IL-1 や IL-17 や TNF- α の刺激を受けて、線維芽細胞、内皮細胞、単球、マクロファージなどさまざまな細胞から産生される。

IL-6 は、白血球の輸送および活性化を促し CRP の産生を誘導する。IL-6 は T 細胞の生存延長や B 細胞の分化、生存と形質細胞の IgG、IgA、IgM の産生を促

す。さらにアレルゲンに誘発された IL-6 は Th2、Th17 の気道炎症を促す[18]。

(e) IL-10

単球や IL-10 のみ主に作る type 1 regulatory T 細胞 (Tr1 細胞)、制御性 B 細胞から産生される。多くの炎症性サイトカイン、ケモカインとそのレセプターを抑制する働きがある。CD28、CD2 を抑えることにより T 細胞の活動性を抑える。B 細胞に対しては分化を促し、生存を助け IgG4 の産生を増加させる作用がある。腫瘍細胞や移植細胞などの標的細胞の MHC class I 分子表出を低下させ、キラーT 細胞による細胞障害作用を受けにくくさせる[18]。

(f) IL-13

IL-13 は Th2 細胞、NKT 細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球などが産生し、B 細胞に作用して IgE 産生抗体を促し同時に血管内皮細胞の VCAM-1 発現を選択的に増強するとともに上皮細胞のエオタキシン発現を増強する[4, 20]。また CD40 分子への刺激と共同して、B 細胞の増殖及び免疫グロブリンクラススイッチと産生を誘導する (特に IgE)。ILC2 から産生される IL-5 と IL-13 は好酸球性喘息の病態に強くかかわる。重症の喘息患者の喀痰には多数の IL-5 陽性、IL-13 陽性 ILC2 があり、末梢血好酸球数が正常であっても気道の好酸球は 3% 以上みられる[18]。

(g) IL-23

IL-23 は活性化樹状細胞、マクロファージに産生される。メモリーT 細胞が IL-23 レセプターを多く発現しており作用する。IL-23 は Th17 細胞の成熟に必要である。IL-23 に反応する ILC は炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の発症

に重要な役割があると考えられている[18]。

(h) G-CSF

G-CSF は単球、マクロファージ起源の細胞によって産生される。顆粒球系に分化したものの、増殖支持と活性化の作用を持つ。骨髄系前駆細胞の増殖、顆粒球への分化を導き、顆粒球の生成を促進する。好中球の CXCR4 の表出を抑えることにより、それを骨髄にとどめる CXCL12 の作用から解放して骨髄からの遊出を助ける。G-CSF は単球による IL-1 β 、IL-12、IFN- γ 、IL-18 および TNF- α 産生を減弱させ、IL-4、IL-10、TGF- β 、MCP-1 などの産生を増加させる[21]。

(i) GM-CSF

GM-CSF は単球、マクロファージ、T 細胞、NK 細胞、線維芽細胞、表皮細胞、マスト細胞、好酸球などが産生する。T 細胞の GM-CSF 産生は IL-1 β や IL-23 に刺激される。マクロファージ、単球、好中球、好酸球、好塩基球や樹状細胞の分化誘導作用を有する。

樹状細胞の活性化を介して Th2 系のアレルギー性気道炎症に影響を与える。また好酸球の生存を延長させ、マウスモデルでは GM-CSF を中和するとアレルギー性の過敏反応が抑えられる[22]。

(j) TNF- α

活性化マクロファージだけでなく、B 細胞、T 細胞、NK 細胞、リンホカイン活性化キラー (LAK : Lymphokine-activated killer) 細胞、顆粒球・マスト細胞、線維芽細胞、表皮細胞も産生する。

TNF- α は炎症過程の持続と延長を制限し免疫のホメオスターシスを維持した

り、自己免疫疾患の発生や腫瘍発生を防いだりする免疫調整の役割と、炎症惹起という2つの役割を持っている。TNF- α はウイルス、細菌、真菌、寄生病原菌、とくに結核やリステリアのような細胞内感染菌の宿主防御に重要な役割を担っている。TNF- α はアトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー性疾患の発症にもかかわっている[18]。

(k) TGF- β

内皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、好酸球、リンパ球が産生する。TGF- β は制御性T細胞（Treg細胞）の抑制機能やTh17細胞やTh9細胞の分化や炎症前駆状態と関連する重要なサイトカインの一つである。TGF- β には胎生期の骨格形成や心血管系の発達にも重要な役割がある。またTGF- β は自己免疫疾患の発生にも関与している[18]。

TGF- β は線維芽細胞、骨芽細胞などを増殖させ、コラーゲンやフィブロネクチンの産生などの細胞外基質タンパクの産生を増加させることにより、線維化を誘導し、組織修復に重要な役割を果たしている。またB細胞、NK細胞、マクロファージの炎症性サイトカインを抑え、T細胞、樹状細胞の抗原提示機能を抑制することにより、抗炎症作用を示す[23]。

4. 日本人集団における気管支喘息の GWAS

(Genome wide association study)

気管支喘息は、環境要因と遺伝的要因とが複雑に関与して引き起こされる。これまでの研究により、喘息は単一の遺伝子異常のみで起こる病態ではなく、重症度、治療反応などにおいて種々の遺伝子異常が複雑に関連しあって病態を引き起こしていると考えられている。

当研究室では遺伝的要因解明のため、喫煙曝露の少ない日本人集団を対象に用いて喘息患者の遺伝的な決定因子の検討を近年行った[24]。同研究では 10 pack-years 未満の喫煙歴の、734 人のコントロールと 240 人の喘息患者群において 480098 か所の single-nucleotide polymorphisms (SNPs) を対象として Genome wide association study (GWAS) を実施した。

解析の結果、ヒアルロン酸合成酵素 HAS2 遺伝子上流にある SNP である、rs7846389 が強い統計的な関連を示した。その結果は独立した別のコホートでも同様に示された。メタアナリシスでも喘息の感受性遺伝子として rs7846389 はゲノム規模でも統計学的な有意差を認めた。正常人の臓器 13 か所より抽出した HAS2 mRNA 発現量の検討では肺で最も強く発現しており、細胞株を用いた実験では risk 変異を導入することにより HAS2 mRNA 発現量の減少を認めた。

以上より HAS2 を新たな成人喘息の感受性遺伝子として同定した。しかしながら、現在までにさまざまな人種で 30 件の GWASs が行われており、50 の遺伝子が喘息の原因遺伝子の可能性を示唆されているが、HAS2 を喘息の遺伝子と指摘しているものはなく、喘息における病態生理も明らかではない。

5. Hyaluronan synthase 2 (HAS2)

HAS2 はヒアルロン酸合成酵素 (HAS) のひとつで、HAS には、他に HAS1、HAS3 がある。HAS は細胞質側の細胞膜に存在するが、膜を貫通し細胞外にも交通している [25]。HA には高分子のもの (100-600kDa) と低分子のもの (10-50kDa) があり、高分子量ヒアルロン酸 (HMW-HA: High molecular weight Hyaluronan) は HAS1、HAS2 により主に作られ、低分子量ヒアルロン酸 (LMW-HA: Low molecular weight Hyaluronan) は HAS3 の作用によって合成されるか、もしくは HMW-HA が分解されて作られることが知られている [26]。しかし、HAS1 の活性は非常に低く [26] [27]、HAS1 欠損マウスでは野生型と同様に、発生や成長発達に異常を認めないことから [28]、HMW-HA の産生には HAS2 が主に携わっていると考えられている。HAS2 は胎生期の発生の過程でもっとも強く発現する [29] [30]。とくに心血管系の発達に重要であり、HAS2 欠損マウスは homo 欠損では心臓の弁や中隔を形成することができず、およそ胎生 9.5 日で胎児死する [31, 32]。hetero 欠損ではマウスは生存可能であるが、100 人の心室中隔欠損のある子供の DNA を調べた研究では、そのうち一組の親で HAS2 の機能を 40% に減らす、a c. A1496T mutation が同定され、HAS2 の部分欠損も先天性心疾患の原因になりうることを報告されている [33]。またヒトの 13 の臓器別の HAS2 分布を調べた報告では、特に肺での発現が多いことが示されている [24]。

6. ヒアルロン酸合成障害と気道炎症

ヒアルロン酸は直線状の硫酸化されていないグリコサミノグリカンで、細胞外マトリックスに豊富に存在している。前述のとおり、ヒアルロン酸は HAS1-3 によって合成される。その分解はヒアルロニダーゼ (HYAL) 1-3 によってなされる。ヒアルロン酸の半減期は組織によって異なり、たとえば血液では 2-5 分、皮膚では 2-5 日、軟骨では 18 日以内とされる [34]。30% のヒアルロン酸が局所的において分解される。残りの 70% はリンパに乗り、そこでそのうちの 90% が処理される [35]。残りは血液と肝臓で処理される [36]。さらに少量だが脾臓や腎臓 (低分子量のみ) で処理される [35]。

in vitro において、HA の吸収には HARE (stabilin-2)、CD44、LYVE-1 の関与が知られているが、それぞれのノックアウトマウスの検討において、HARE のノックアウトマウスのみ血中ヒアルロン酸濃度の上昇がみられたことから、HARE がヒアルロン酸の吸収に中心的な役割を果たしているのではないかと考えられている [37]。

ヒアルロン酸の生物学的な役割は分子量によって大きく異なる。高分子量ヒアルロン酸 (HMW-HA) は抗炎症反応を含む種々の制御系の役割と抗血管新生を果たし、組織修復のような構造的な反応も起こす [38] [39] [40] [41] [42]。

一方で低分子量ヒアルロン酸 (LMW-HA) は炎症の前駆状態を引き起こす [43] [44]。また組織障害の際などの免疫反応として活性化し、内因性の危険信号としてはたらくとされている [45]。

気管支喘息を主体とした気道炎症とヒアルロン酸、HAS に関連した過去の報告としては以下のようなものがある。

活動性のある喘息患者の気道平滑筋においては、HAS1, 2 のレベルの低下とヒアルロニダーゼ-1 のレベルの増加により、ヒアルロン酸の量が健常者と比

較して少ない[46]。健常人の気道平滑筋から分離されたヒアルロン酸は高分子量のものが多いのに対して、喘息患者から分離されたヒアルロン酸は低分子量のものも多く、さらに高分子量ヒアルロン酸はヒトの気道平滑筋細胞の増殖を抑制する[47]。喘息患者気道上皮のヒアルロニダーゼの量が健常者より多く、ヒアルロン酸の分解による HMW-HA の減少と LMW-HA の上昇が気道炎症の増悪・慢性化に関与している可能性がある[48]。

7. Siglecs (sialic acid immunoglobulin-like lectins)

Siglec はシアル酸結合基を細胞表面に発現する糖鎖結合タンパクである [49]。Siglec のほとんどがマクロファージ、好中球、リンパ球、好酸球などの気道炎症において重要な免疫担当細胞に発現している。Siglec がリガンドと結合した際には、細胞質内の immuno receptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) 構造や、SHP1、SHP2 といったチロシンフォスファターゼを介して、Siglec の発現している免疫担当細胞の興奮を抑えることが知られている [50]。Siglec ファミリーに属する一連のタンパク群は現段階ではヒトにおいては 14 種類、マウスにおいては 9 種類が同定されている [50]。

Siglec は Siglec-1、Siglec-2、Siglec-4、Siglec-15 といった哺乳類間共通の構造が維持されている群と哺乳類間で多様な変異を伴う CD33 関連 Siglec 群に大別される [51]。しかし、細胞外の N 末端にはシアル酸結合基である V-set domain と 2-17 個の immunoglobulin domain を伴う I 型膜タンパク質構造があるなど、共通の構造もみられる [50] [52]。Siglec はそれぞれ、主な発現細胞が異なる (Table 1)。また近年 Siglec が喘息、好酸球性気道炎症において重要な役割を果たしていることが報告されている [53] [54] [55]。

一部の Siglec のリガンドとしてムチンが重要な役割を果たしていることが、近年の免疫生化学的および糖鎖生化学的な解析により、明らかにされてきている。しかし、未だにすべての Siglec のリガンドが明らかになったわけではなく不明な点も多い。

前述の通り、HAS2 は HMW-HA の産生に関与しているが、近年の研究により HMW-HA が Siglec-9 との結合能を有しており、リガンドとなっている可能性が報告されている [56]。Siglec-9 は主にヒトの好中球に発現しており、マウスでそれに対応するのは Siglec-E とされている [57]。Secundino らは HMW-HA が

Siglec-9 に結合すると、抑制系の受容体に SHP-1 が動員され、好中球の酸化刺激、neutrophil extracellular trap (NET) の形成が抑えられることにより、好中球性炎症が終息するとしている [56]。また同論文では HMW-HA がマウスの Siglec-E に結合することも示されている。

序章総括

過去に我々の研究グループは、日本人集団における気管支喘息の GWAS からヒアルロン酸合成酵素である HAS2 が気管支喘息の発症に関与する可能性を見出した。本研究の目的はそれに基づき、HAS2 の機能異常がヒアルロン酸合成障害を介して気道炎症にどのようにかかわり、どういった機序で炎症を引き起こすのかを解明することである。

過去の文献報告によると、HAS2 はヒアルロン酸の中でも特に HMW-HA の産生にかかわっており、HMW-HA は種々のレセプターとの結合を介して、抗炎症作用をもたらしているとされる。その機序として、HMW-HA は CD44 のリガンド、または TLR2、TLR4 の negative regulator として主に抗炎症効果をもたらすという説もあるが、詳細な機序は明らかになっていない。そのような背景の中、Secundino らは多くの免疫細胞に発現しており、炎症に対して抑制的にはたらくレセプターである Siglecs-9 のリガンドとして HMW-HA が機能していることを見出した[56]。

よって、本研究において我々は、HAS2 の機能異常が気管支喘息を発症、増悪させるメカニズムとして、

- ① HAS2 はアレルギー性気道炎症病態出現時に発現が亢進する。
- ② HAS2 の発現が誘導されることで気道上皮に HMW-HA が誘導される。
または、特定の糖鎖構造が付加される。
- ③ HAS2 によって合成された HMW-HA は Siglec を介して気道炎症を終息させる。

- ④ HAS2 または HMW-HA に障害が発生した場合は気道炎症の重症化または難治化が出現する。
- ⑤ HMW-HA に発現している Siglec リガンド活性を持つ糖鎖構造が同定・定量可能であれば、喘息患者の難治化予測のバイオマーカーとしての運用や同糖鎖構造による新規標的治療薬の創薬といった臨床応用が期待される。

という仮説を立て、それに基づいた研究計画を立案、研究の実施に至った。

第2章 ヒアルロン酸合成障害に伴う

気管支喘息発症、増悪メカニズムの解明

1. 目的

HAS2 の機能異常が気管支喘息の発症・増悪に与える影響を、遺伝子改変動物を用いて明らかにすること。

2. 対象と方法

(a) 実験に使用する動物

サザンブロット法により HAS2 遺伝子のヘテロ欠損が示されている HAS2 ヘテロ欠損マウス (HAS2 Heterozygous deficient mice: HAS2^{+/-}) [31] を The Jackson Laboratory から導入、6 世代 (F6) 以上 C57BL/6J 系に戻し交配を実施し 6 から 10 週齢の雌を実験に使用した。対照群としては繁殖中に作出された C57BL/6J 背景を有する同胞を野生型マウス (Wild Type mice: WT) 群として使用した。

HAS2^{+/-}マウスの作成に際しては、まずターゲティングベクターを標的遺伝子領域においてネオマイシン耐性遺伝子で置換するように作成した。次に作成したターゲティングベクターを 129P2/01aHsd 由来の GK129 胚性幹細胞 (ES 細胞) にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入した。最後に、遺伝子導入された ES 細胞を C57BL/6J の胚盤胞にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作成している。

作成されたキメラマウスの子孫は C57BL/6J と交配維持されていた。しかしホモ欠損マウスは主に重篤な心臓および血管の形成異常を合併し、胎生 9.5-10.5 日で死亡する [31] ため、導入時点では 129P2 と C57BL/6J の雑種第 1 世代

(F1) と十分な戻し交配がなされていない状態で凍結受精卵保存されていたため、上述の戻し交配を実施した。

(b) 好酸球性気道炎症マウスモデルの作成

喘息がマウスに自然発症することはない。そのため喘息は人工的に疾患モデルとして作成する必要がある。Ovalbumin (OVA)などによって誘発されたアレルギー性呼吸器疾患マウスモデルは喘息の病因に関与する免疫学的、および非免疫学的機序を解明するために広く使用されている。現在急性および慢性の喘息モデルが開発されている[58]。

OVA を用いた急性の好酸球性気道炎症モデルは血清総 IgE の上昇、気道炎症、上皮細胞の肥大、杯細胞過形成、気道過敏性、そして早期、後期の気道収縮反応などの喘息の多くの特徴を良好に再現している。一方で喘息は慢性疾患であり、肺における炎症のパターンや分布は実際の喘息患者のものとはかならずしも一致していないことも指摘されている[58]。

マウス喘息の慢性モデルは急性モデルよりもさらにヒト喘息を再現することが示されている。その特徴として、気道粘膜への好酸球流入および気道過敏性を特徴とする Th2 依存性アレルギー性炎症や、成人ヒト喘息の重要な所見である気道リモデリングが挙げられる[58]。本実験では過去の報告をもとに、リモデリングを形成するレベルの慢性炎症モデルで検証した[59] [60]。

(I) 急性気道炎症モデル

マウスを day1 と day15 に OVA 100 μ g と Al(OH)₃ 1.6mg を腹腔内注射にて投与し感作を実施した。その後 day22 に OVA を 10 μ g の経鼻投与を 1 回行い、アレルギー性気道炎症を誘発した。

(II) 慢性気道炎症モデル

マウスを day1 と day15 に OVA 100 μ g と Al(OH)₃ 1.6mg を腹腔内注射にて投与し感作を実施した。day22 から day82 にかけて OVA 10 μ g の経鼻投与を週 5 回計 40 回行い、慢性アレルギー性気道炎症ならびに気道リモデリングを誘発した。

急性気道炎症モデル、慢性気道炎症モデルの両方とも最終経鼻投与から 24 時間後に検体採取を行った。対照群は生理食塩水で腹腔内投与、経鼻投与を行った。

(c) 気管支肺胞洗浄 (BAL : Bronchoalveolar lavage)

BAL はマウス気管を切開後にカニューレを挿入し、生理食塩水 0.6ml を注入、回収を計 5 回ずつ実施し採取した。最初の 2 回分であるおよそ 1.2ml の気管支肺胞洗浄液 (BALF: Bronchoalveolar lavage fluid) は遠心後に上清を回収し、サイトカインやケモカイン計測用として保存した。保存の際にサイトカイン、ケモカインを安定させるため 0.5% BSA を添加した。BALF の細胞数は当日中に血球計算盤で測定した。さらにサイトスピンを用いて細胞をスライドに接着後、Diff-Quick 染色を行い標準蛍光顕微鏡で細胞分画を算定した。

それとは別にヒアルロン酸測定用の BALF 検体は PBS(-)0.6ml を注入、回収を計 5 回ずつ実施し採取した。その後 200G で遠心後に上清を回収し保存した。

(d) 肺検体の採取

肺検体は BAL の影響を強く受けることから、BAL を行っていない肺のみを検体として使用した。検体採取の際には、肺検体は右上葉、右上葉以外の肺

葉、左肺の3つに分け、 -80°C で保存した。肺検体破砕液の作成は、 -80°C 凍結肺検体をすぐに COMPLETE solution (Roche, Basel, Switzerland) $500\ \mu\text{l}$ に浸し、ホモジェナイザー (POLYTRON PT10-35GT, KINEMATICA, Luzern, Switzerland) を用いて破砕した。その後破砕液を超遠心用チューブに移し 50000rpm 、30分で遠心を行いその上清を -80°C に保存した。

(e) HAS2 タンパクの発現の有無

肺検体破砕液の HAS2 の発現量の有無は Western blotting を用いて行った。 -80°C に保存されていた肺破砕液検体を、Lowry 法を用いてタンパク濃度を測定した。各検体のタンパク量が $60\ \mu\text{g}$ になるように調整後、2X sample buffer (Tris HCl, 2 wecaptethanol, glycerol, bromophenyl blue, sodium dodecylsulfate) と 1:1 の割合で混ぜ合わせ、 95°C で6分間反応させた。処理後の検体を SuperSep Ace Gel 5-20% (WAKO, Tokyo, Japan) の各 well に注入し、電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは iBlot Dry Gel Blotting Transfer System (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、そのプロトコールにしたがい、iBlot Gel Transfer Stacks PVDF membrane (Invitrogen, Carlsbad, CA) に転写した。membrane はその後 5% スキムミルク + TBS-tween に浸し、 4°C で一晩ブロッキングを行った。その後 membrane を洗浄後に Primary Ab: anti-HAS2 Ab (1:500 dilution, sc-66916, Santa Cruz, Dallas, TX)、2ndary Ab: Goat anti-Rabbit IgG HRP (1:2500 dilution, sc-2004, Santa Cruz, Dallas, TX) を反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Amersham, England) を用いて発色後、Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, Amersham, England) を用いて撮影を行った。

(f) HAS2 タンパクの測定

肺破砕液、血清、BALF の HAS2 測定は市販の HAS2 ELISA kit (Aviva Systems Biology, San Diego, CA) を用いて計測を行った。

肺破砕液は右上葉以外の肺葉検体をあらかじめ重量を測定したのちに破砕したものを使用した。上記 ELISA キットで HAS2 濃度を測定後に肺重量 1mg 当りに換算した。

(g) 分子量別のヒアルロン酸の測定

過去の検討に基づき [61]、ヒアルロン酸測定用の BALF 検体を proteinase (P4850) (SIGMA, St. Louis, MO) で 24 時間処理したのちに、遠心エバポレーター CE 1D (Hitachi Koki, Tokyo, Japan) を用いて 30 倍に濃縮した。その後各サンプル 20 μ l と 2M のスクロースを含む TAE バッファー 2 μ l を混ぜ、0.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを直ちに 0.005% Stains-All 含有 50% エタノールで染色、蒸留水で脱色し、撮影を行った。

(h) 免疫グロブリンの測定

血清 total IgE (1:100 希釈、detection range, 0.156-10 μ g/mL)、OVA specific IgE (1:20 希釈、detection range, 31.2-2000 ng/ml) は市販の ELISA kit (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて計測を行った。

(i) サイトカインとケモカインの測定

BALF 中のサイトカイン、ケモカインの濃度は MILLIPLEX MAP Kit (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) を用いて計測した。過去の検討よ

り、BALF 中のサイトカイン、ケモカインの濃度は非常に低濃度であることが予想されたため、サンプルを通常の 2 倍量使用し計測、計測値の 50%量を各検体の濃度とした。そのほかの実験プロトコールは同社のものに従った。

各サイトカイン、ケモカインの Min DC: Minimum detectable concentrations は以下の通りである。G-CSF (0.85 pg/ml)、GM-CSF (5.45 pg/ml)、IFN- γ (0.55 pg/ml)、IL-1a (5.15 pg/ml)、IL-1b (2.7 pg/ml)、IL-2 (0.5 pg/ml)、IL-4 (0.2 pg/ml)、IL-5 (0.5 pg/ml)、IL-6 (0.55 pg/ml)、IL-7 (0.7 pg/ml)、IL-9 (8.65 pg/ml)、IL-10 (1.0 pg/ml)、IL-12p40 (1.95 pg/ml)、IL-12p70 (2.4 pg/ml)、IL-13 (3.9 pg/ml)、IL-15 (3.7 pg/ml)、IL-17 (0.25 pg/ml)、IP-10 (0.4 pg/ml)、KC (1.15 pg/ml)、MCP-1 (3.35 pg/ml)、MIP-1a (3.85 pg/ml)、MIP-1b (5.95 pg/ml)、MIP-2 (15.3 pg/ml)、RANTES (1.35 pg/ml)、TNF- α (1.15 pg/ml)、IL-25 (178.65 pg/ml)、MIP-3a (4.7 pg/ml)、IL-21 (5.45 pg/ml)、IL-22 (0.25 pg/ml)、IL-28B (14.65 pg/ml)、IL-23 (35.2 pg/ml)、IL-27 (249.3 pg/ml)、IL-17A (9.4 pg/ml)、IL-17F (2.6 pg/ml)、IL-33 (7.45 pg/ml)、IL-31 (12.9 pg/ml)、TNF- β (68.5 pg/ml)、CD40L (7.3 pg/ml)。

(j) 統計解析

データは平均値±標準誤差 (SEM s) もしくは中央値を記載した散布図で示した。各群間の統計学的な有意差は ANOVA の一元配置分散分析の後に Tukey の多重比較テストを行った。統計解析ソフトは GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) を使用し、P 値<0.05 を統計学的に有意とした。

(k) 倫理遵守事項

組み換え DNA 実験実施の妥当性については、本学の遺伝子組換え実験安全委員会に実験計画書を提出し承認を得た上で HAS2 欠損マウスを導入している（「ヒアルロン酸を介したアレルギー性呼吸器疾患制御機構の解明」、本学承認番号：150009）。また、動物実験の内容についても毎年、動物実験委員会に研究報告書および研究計画書を提出・更新し、承認を得ている。

実験の実施に際しては筑波大学の動物実験倫理規定を遵守し、本学規定の講習を受けたものが実施している。

3. 結果

Western Blot 法による肺 HAS2 タンパクの発現量の評価

本研究を開始するにあたり、アレルギー性気道炎症病態における HAS2 発現変化の有無を明らかにするために、野生型マウスに OVA、あるいは生理食塩水による刺激を与え、Western Blot 法により肺破砕液検体中の HAS2 タンパクの発現を確認した (Fig. 3)。

生理食塩水を投与されたコントロール群では急性気道炎症モデル、慢性気道炎症モデルともに HAS2 の発現がほとんど見られないのに対し、OVA 群では特に慢性モデルで強く HAS2 の発現が認められた。

以上より OVA 刺激に伴うアレルギー性気道炎症病態下において、肺における HAS2 発現量が増加すると考えられた。

肺内の HAS2 蛋白の定量比較

OVA 刺激後に HAS2 ヘテロ欠損 (HAS2^{+/-}) マウスおよび野生型 (WT) マウスの HAS2 発現量の違いを明らかにするため、肺破砕液検体で ELISA による比較を行った (Fig. 4)。

HAS2 の発現量は生食コントロール群、OVA 刺激群ともに、HAS2^{+/-}群で低値な傾向が見られるものの両群間に有意差は見られなかった。

しかしながら本検討では検体数がやや少なく (n=5-6)、HAS2^{+/-}群で低値な傾向が見られることから、さらに検体数を蓄積し解析する予定である。

BALF および血清の HAS2 蛋白の定量比較

OVA 非刺激状態での HAS2 ヘテロ欠損 (HAS2^{+/-}) マウスおよび野生型 (WT) マウスの HAS2 発現量の違いを明らかにするため、BALF と血清検体で ELISA に

よる比較を行った (Fig. 5)。

HAS2 の発現量は BALF では HAS2^{+/-}群で低値な傾向が見られるものの有意差はなく、血清検体においても WT 群と HAS2^{+/-}群で有意な変化を認めなかった。

今後は BALF 検体数を蓄積し解析する一方で、OVA 刺激後の HAS2 発現量の解析を行う予定である。

分子量別ヒアルロン酸発現量の比較

急性気道炎症モデルにおける実際のヒアルロン酸の分子量の変化の有無をより詳細に評価するために、ヒアルロン酸の電気泳動を行い、その分画の確認を行った。

OVA 経鼻投与 24 時間後の BALF において、HAS2^{+/-}群は WT 群と比較し、ヒアルロン酸発現の分子量のピークが低分子量方向にあることを 1 検体ずつ比較した予備実験で認めた (Fig. 6)。しかし各群複数の検体を使用した本実験では、BALF の濃縮を高度に行ってもバンドの濃度が全体に薄く、また検体間のばらつきも強くみられ、HAS2^{+/-}群と WT 群で明らかな分子量別ヒアルロン酸発現量の差を指摘するのは困難であった。

以上より、HAS2 機能異常は OVA 刺激後急性期において、WT と比較し HMW-HA の発現量が低下し、LMW-HA の発現量が増加する可能性はあるが、さらなる追加実験が必要である。

BALF 中の総細胞数・各細胞分画の比較

WT マウスと HAS2^{+/-}マウス各群の好酸球性気道炎症の強度を比較するため、OVA を用いた急性アレルギー性気道炎症モデルを作成後、BAL を実施し炎症細胞数・分画を比較した (Fig. 7)。

OVA 経鼻投与 24 時間後の BALF において、HAS2^{+/-}群は WT 群と比較し有意な総細胞数の増加を認めた (Fig. 7a)。細胞増加の原因を評価するため各分画の細胞数を評価したところ、マクロファージ (Fig. 7b)、好中球 (Fig. 7d)、好酸球 (Fig. 7e) において有意な増加を認めていた。一方でリンパ球数は両群間で有意差を認めなかった (Fig. 7c)。

生食対照群の BALF においては、HAS2^{+/-}群および WT 群の間ではすべての BALF 細胞分画において統計学的な有意差は認めなかった。

以上より、HAS2 機能異常は OVA 刺激後急性期において、マクロファージ、好中球、好酸球の増加を主体とした、高度の好酸球性気道炎症をきたすことが示された。

血清総 IgE、OVA-specific IgE の比較

上記のように、HAS2^{+/-}群は WT 群と比較して、OVA 刺激後に高度の好酸球性気道炎症が生じていた。他臓器でのアレルギー性炎症の有無を検証するため、血清の免疫グロブリンの比較を行った (Fig. 8)。

血清 Total IgE、OVA-specific IgE は HAS2^{+/-}群および WT 群の両群で、OVA 刺激後に増加が認められたものの、OVA 刺激後の HAS2^{+/-}群と WT 群の比較では有意差を認めなかった。

Multiplex を用いたサイトカイン、ケモカインの解析

HAS2^{+/-}群が WT 群と比較し、OVA 刺激後により高度の好酸球性気道炎症を生じている病態を解明するために、BALF 中の各種サイトカイン、ケモカインを multiplex にて測定した (Fig. 9-14)。

1) Th1/Th2 関連サイトカイン

OVA 刺激後の BALF において、HAS2^{+/-}群は WT 群と比較し代表的な Th2 系のサイトカインである、IL-4、IL-5、IL-13、GM-CSF の有意な上昇を認め (Fig. 9a-d)、IFN- γ では有意差を認めなかった (Fig. 9e)。以上より BALF サイトカイン上も HAS2^{+/-}群が WT 群と比較し、OVA 刺激後により高度のアレルギー性気道炎症をきたしていたことが確認された。一方で、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-25、IL-31、IL-33 といったリンパ球を含む炎症細胞や Treg 細胞を誘導するサイトカインや上皮細胞由来のサイトカインにおいては WT 群と比較し有意差を認めず (Fig. 10A)、IFN- γ と共に naïve T cell を Th1 へと誘導する作用を有する IL-12 についても IL-12p40、IL-12p70 共に変化を認めなかった (Fig. 10B)。

2) Th17 関連サイトカイン

OVA 刺激後 24 時間後の急性期において有意な好中球の増加を認めたことより、Th17 細胞に関連するサイトカインである IL-17、IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22、IL-23 についても解析を行ったが、IL-17、IL-17A、IL-17F、IL-21 は BALF 検体中では両群共に測定感度以下であり、IL-22 についても両群共に OVA 刺激後に上昇を認めたものの両群間において有意差を認めなかった (Fig. 11a-e)。以上より Th17 細胞の病態への関与は乏しいものと考えられるが、抗原提示細胞で産生され Th17 細胞への誘導を促す IL-23 が生食投与 HAS2^{+/-}群において有意に低値であり HAS2^{+/-}群において抗原提示細胞由来の Th17 細胞への誘導が阻害されている可能性が示唆された (Fig. 11f)。

3) 単球・マクロファージに関連したサイトカイン、ケモカイン

最後にヒアルロン酸合成能の破綻に伴い炎症制御機構が破綻している可能

性を考慮し、各種炎症に関連したサイトカインやケモカインの解析を行った。その結果、興味深いことに OVA 刺激後の HAS2^{+/-}群において WT 群と比較し有意な G-CSF, IL-6, IL-10, TNF- α といった主に単球・マクロファージに由来するサイトカインの増加を認めた (Fig. 12a-d)。また、TNF- β においても OVA 刺激後の HAS2^{+/-}群のみ生食対照群と比較し有意な増加を認めた (Fig. 12e)。この傾向はケモカインにおいても同様であり、IP-10 (CXCL10)、KC (CXCL1)、MCP-1 (CCL2)、MIP-1 α (CCL3)、MIP-1 β (CCL4) においても、OVA 刺激後の HAS2^{+/-}群において WT 群と比較し有意な増加を認めた (Fig. 13a-e)。

なお、同時に測定した IL-7, IL-9, IL-15, IL-27, IL-28 β , CD40L についてはいずれも各群間で有意な差を認めなかった (Fig. 14)。

4. 考察

本研究は、当研究室が日本人集団における気管支喘息の GWAS から独自に見出した喘息関連遺伝子 HAS2 が気管支喘息の発症・増悪に関与するメカニズムを、世界で初めて HAS2^{+/-}マウスを用いてより直接的に検討した研究である。

一連の研究において、OVA 刺激によるマウスの好酸球性気道炎症モデルでは、当初の仮説通りアレルギー性気道炎症病態出現時に HAS2 発現が亢進することが確認された (Fig. 3)。また、C57BL6J 系に 6 世代以上戻し交配し作成された HAS2^{+/-}マウスは、野生型マウスと比較し、ヒアルロン酸分画において炎症を抑制的に働くとされる HMW-HA 量が低下し、炎症を惹起するとされる LMW-HA 量が増加している可能性があり (Fig. 6)、それに伴い OVA 刺激後に野生型群と比較し有意なマクロファージ・好中球・好酸球増加を伴う高度の好酸球性気道炎症を認めた。このことから HAS2 の発現低下、もしくは機能障害は HMW-HA の低下と LMW-HA の増加を介して気道炎症の重症化をきたしうることを示唆された (Fig. 7)。

さらに multiplex を用いた解析により、OVA 刺激後の HAS2^{+/-}群においては BALF 検体中の有意な好酸球増多を反映した Th2 系のサイトカインである (Table 2, [62])、IL-4、IL-5、IL-13、GM-CSF の高値のみならず (Fig. 9)、G-CSF、IL-6、IL-10、TNF- α といったサイトカインや IP-10、KC、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β といったケモカインも有意な高値を示していた (Fig. 12, 13)。過去の検討において、IL-6、IL-10、TNF- α や IP-10、KC、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β はヒアルロン酸が主にマクロファージと結合することにより誘導されることが報告されていること (Table 3, [63])、同じく単球・マクロファージ由来の細胞から分泌される G-CSF の有意な上昇が認められることを踏まえる

と、当初の仮説通り、HAS2 機能異常に伴うヒアルロン酸合成異常は単球・マクロファージを介した新たな喘息発症・増悪メカニズムである可能性が示唆された。

一方で、OVA 刺激後に高度の好酸球性気道炎症を呈する HAS2^{+/-}マウスにおいて、現段階では好酸球性気道炎症出現時の HAS2 発現量の低下の有無、ヒアルロン酸発現量および HMW-HA/LMW-HA の変化の有無、糖鎖修飾異常の有無については充分解明できていない。

肺破砕液検体において HAS2^{+/-}群は WT と比較し OVA 刺激の有無に関わらず有意な差は認めないものの、HAS2 タンパクの発現は低い傾向が認められており (Fig. 4)、本病態をきたす原因としては HAS2 の主な産生物である HMW-HA 量が少ない、または HAS2 タンパクの機能不全により分子量の十分な HA 産生ができず LMW-HA 量が増加している可能性が考えられた。肺破砕液検体による HAS2 の評価は検体数を追加し検証が必要と考える。

HMW-HA の抗炎症作用の機序としては、Bollyky らは HMW-HA は、転写因子 FOXP3 および CD4 陽性 CD25 陽性調節性 T 細胞をアップレギュレートする [38] [64] としている。また Wang らは、HMW-HA が早期の変形性関節炎患者の human fibroblast-like synoviocytes (FLS) による種々の炎症性サイトカインに影響を与えるということを報告している。彼らは HMW-HA により IL-1 刺激のあった FLS で aggrecanase-2, TNF- α 遺伝子発現が抑制されていることを報告しているが [65]、本研究においても HAS2^{+/-}群は WT 群と比較して OVA 刺激により TNF- α のより高い産生が認められている。

LMW-HA の炎症惹起作用を検討した報告には、LMW-HA が好酸球の形態変化および好酸球による TGF- β の mRNA 発現およびタンパク質分泌を増加させる

[66]、マウス肺胞マクロファージの活性化を誘発する[67]、さらにヒト樹状細胞の不可逆的表現型および機能的成熟を誘導するといった報告がある[68] [69]。サイトカイン、ケモカインに関連したものとしては、LMW-HA がマクロファージにおいて産生される MMP-12 や plasminogen activator inhibitor-1 [70] [71]、MIP-1 α 、MIP-1 β 、monocyte chemoattractant-1、keratinocyte chemoattractant、IL-8、IL-12 の発現やタンパクの産生を増やすという報告がある。本研究においても OVA 刺激後の HAS2^{+/-}群が WT 群と比較し MIP-1 α や MIP-1 β の増加が認められている。今後、TGF- β の測定や肺組織・BAL 中の HMW-HA、LMW-HA を測定し更なる病態解明を目指す。

HAS2 機能異常に伴うヒアルロン酸合成障害に伴う好酸球性気道炎症増悪メカニズムには、CD44、Toll-like Receptors (TLR)、および仮説として注目した Siglec などの関与の可能性が挙げられる。

CD44 抗原は type 1 膜貫通型の糖蛋白で、ヒアルロン酸の主たる受容体であり、ほとんど全ての細胞にある。CD44 は、HA 分解産物を細胞内に移行する。そのためマクロファージ表面上の CD44 を阻害すると炎症肺において治癒過程におけるヒアルロン酸断片のクリアランスの遅延が起こる[72]。また、CD44 受容体にヒアルロン酸が結合し細胞膜を被覆することで、アポトーシス受容体を保護し、その結果細胞死を防ぐことができる[73]。HMW-HA による作用は抗 CD44 抗体により阻害されることから[74]、HMW-HA による炎症制御に CD44 が重要な役割を果たしている可能性がある。また気道上皮においては HA と CD44 の結合により、TGF- β が活性型となり炎症反応を抑える一方、線維化を起こすという報告もある[23] [75]。反面、CD44 欠損マウスを使用した研究では CD44 欠損群は野生型と比較して、タバコとハウスダストによる刺激後には IL-4、

IL-5 など Th2 系のサイトカインや好酸球・好中球・CD4 陽性 Tcell 等の炎症細胞が抑制されており、Th1 系のサイトカインには変化を認めなかったが eotaxin-1 (CCL11), IL-1 β が有意に高値であった[76]。また、CD44 モノクローナル抗体投与により、好酸球の肺への集積や Th2 サイトカイン上昇を抑制する効果も報告されており LMW-HA の関与も示唆されている[63]。本研究においては eotaxin-1 の検討はなされていないが、ハウスダスト刺激による CD44 欠損マウス検討とほぼ逆の結果となっていること、リンパ球への影響が乏しかったことなど矛盾点が多く、HAS2 の機能障害が CD44 経路の上流で影響を及ぼすかについては慎重な検討が必要と思われる。

Toll-like receptors (TLR) は、免疫系が細菌およびウイルスを感知し、これらの病原体に対する初期の宿主防御を調整できるようにする分子の集合体である。近年 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) だけでなく、damage associated molecular patterns (DAMPs) でも TLR を活性化させることが明らかとなった。LMW-HA は TLR2 と TLR4 に認識され[45]、TLR と結合して、前炎症段階のサイトカインを導くカスケードを引き起こす[77]。岩田らは LMW-HA が TLR4 を介して B リンパ球を刺激し、IL-6 や TGF β 産生をもたらすことを示した[78]。我々の研究でも OVA 刺激後に HAS2^{+/+}群の方が WT と比較して IL-6 は有意に高値であり、本経路の関与は否定できない。

当初、我々が仮説にあげた Siglec については、序論で述べた通り、HMW-HA がヒトの単球や好中球に発現する Siglec9 との結合能を持ちリガンド活性を有することが近年報告されている[56]。また、ヒト Siglec-9 はマウス Siglec-E に相当し、好中球・単球・マクロファージ・樹状細胞に発現するが、Siglec-E 欠損マウスを用いた実験により、HMW-HA が Siglec-E を介して好中球と結合し

リガンド活性を有することが示されている[56]。本研究においても HAS2^{+/-}群が WT 群よりも OVA 刺激後にマクロファージ、好中球の有意な高値を伴う好酸球性気道炎症を認めており、単球・マクロファージ由来のサイトカイン・ケモカインの有意な上昇を認めている点も本仮説に矛盾しない。さらに Siglec-E 欠損マウス骨髄由来のマクロファージは、B 群連鎖球菌の刺激 24 時間後に野生型群と比較しより高度な IL-6, TNF- α の産生を行うという報告も本研究結果と同様であるが、証明には至っていない[79]。Siglec-E の関与をより直接的に証明するには、Siglec-E 欠損マウスを併用する実験系を構築することが望ましいが、同マウスは使用できる施設が限定されており本施設では困難である。よって、今後 Siglec-E の関与の検証を行う際には、組織切片を Siglec-E の細胞外構造を有するキメラタンパクと事前に反応後にヒアルロン酸の免疫染色を行い、本来ヒアルロン酸として染色される部位の染色欠損の有無を確認することや、野生型および HAS2 欠損マウスより抽出したヒアルロン酸分子にビオチン標識を行い Siglec-E との結合試験を行うことで、間接的に評価を行うことを考えている。

最後に、Bourguignon らは、LMW-HA が CD44 と TLR2, TLR4、および MyD88 との関係を刺激し、NF- κ B 特異的転写活性と、ヒト乳房細胞系における炎症促進性サイトカイン IL-1 β および IL-8 の発現を誘導すること報告しており[74]、ヒアルロン酸をリガンドとした複数の炎症制御経路が相互作用している可能性も考えられる。

本研究における限界としては以下の点が挙げられる。

第 1 に先に述べた通り HAS2^{+/-}マウスにおいて野生型と比較し、非刺激時および好酸球性気道炎症出現時の HAS2 発現量の低下の有無、ヒアルロン酸発現

量および HMW-HA/LMW-HA 分画の変化の有無が正確には確認されていない点が挙げられる。HMW-HA/LMW-HA 分画の変化については、過去の研究においても総ヒアルロン酸量は ELISA 等で定量可能なものの、分画ごとに定量化した報告はなく、検体中の総ヒアルロン酸量の定量と電気泳動による定性的な分画の変化を併用し評価を行う手法が主流である。今回我々は、過去の検討例に従い BALF 中の分子量別のヒアルロン酸測定を行ったが、有意なヒアルロン酸分画を検出することはできなかった[61]。この原因としては、過去の検討がオゾンにより急性肺障害を誘発するレベルの濃厚刺激であったのに対し、本実験は OVA の単回刺激であったため、刺激が弱かったことが第一に考えられる。サイトカイン、ケモカインでは BALF 検体により差がでたために BALF 検体で変化の差を出すことを目指したが、マウス 1 匹の検体量では客観的に有意差を示す十分な検体量が採取できていないものと考えられた。一方で、過去の報告ではゴキブリ抗原を使用した喘息モデルマウスの研究で、さらに工程を加えることにより肺実質からヒアルロン酸を抽出し、分子量別のヒアルロン酸発現量の差を示している報告がある[80]。今後我々も、同様の手法により肺実質からヒアルロン酸を抽出することにより解析を実施し、さらなる病態解明を試みる予定である。

第 2 に HAS2 ヘテロ欠損マウスを使用していることが挙げられる。本研究においては、遺伝子多型により HAS2 の発現が低下している喘息疾患群の表現型の解明が目的であったため、HAS2 ヘテロ欠損マウスを全身的に HAS2 の発現が低下しているモデルとして使用した。しかし、後述の通り、病態の直接的な解明には課題があるため、最終的には HAS2 の各臓器特異的な conditional ノックアウトマウスを使用した検討も必要になると考えられる。また HAS2 完全欠損マウスが胎生致死であるため、HAS2^{+/-}マウスにおいても炎症制御機構の障害とは別の、実験結果に影響を与えうる発達障害を合併している可能性も否定で

きない。現段階では結果に影響しうる明らかな障害は確認できていないが今後も HAS2^{+/-}マウスの成長・発達・繁殖状況を継続してモニタリングする必要がある。

第3に実験プロトコルの課題も挙げられる。本研究においては OVA 刺激による好酸球性気道炎症の経時変化・サイトカイン動態をより明確にするため、感作後は OVA の単回経鼻投与のプロトコルを採用し実験している。喘息・アレルギーの動物モデルとしては広く受け入れられているが、より実際の病態に近い慢性炎症モデルでの検証が今後必要である。

最後に、本研究は疾患動物モデルを用いて解析しているが、マウスとヒトの種の違いにより病態制御メカニズムが異なる可能性は完全には否定できない。しかしながら、本研究においてはヒトの遺伝子検体による GWAS により喘息関連遺伝子として同定された分子を標的としているため、疾患動物モデルを用いた本研究の成果が、ヒトの喘息病態患者におけるあらたな分子病態を明らかにする基盤的検討として役割を果たしうるものと考えている。

今回我々は HAS2 の機能異常が OVA による好酸球性気道炎症を強く惹き起こすことを HAS2^{+/-}マウスを用いて示した。HAS2^{+/-}マウスにおける HAS およびヒアルロン酸合成異常の詳細、それに伴う喘息発症・難治化の病態解明にはさらなる検討が必要であるが、HAS およびヒアルロン酸異常の原因が同定・定量可能であれば、喘息患者の難治化予測のバイオマーカーとしての運用や新規標的治療薬の創薬といった臨床応用への展開が期待されるものと考える。

Table 1 Siglec とその発現細胞

Siglec	別名	主な発現細胞
哺乳類共通のもの		
Siglec-1	sialoadhesin	単球、マクロファージ
Siglec-2	CD22	B細胞
Siglec-4a	MAG	オリゴデンドロサイト、シュワン細胞
ヒトで発現しているもの		
Siglec-3	CD33	骨髄前駆細胞、単球
Siglec-8		好酸球、好塩基球、肥満細胞
Siglec-9	CD329	単球、好中球、NK細胞
マウスで発現しているもの		
Siglec-E		単球、好中球、マクロファージ、樹状細胞
Siglec-F		好酸球、(肺胞マクロファージ)

(文献[50, 51] より抜粋引用、一部改変)

Table 2 好酸球が誘導するサイトカイン、
ケモカイン、成長因子

Cytokines	Chemokines	Growth factors
GM-CSF	CCL3(MIP-1 α)	HB-EGF-LBP
IL-1 α	CCL5(RANTES)	NGF
IL-1 β	CCL11(eotaxin)	PDGF-B
IL-2	CCL13(MCP-4)	SCF
IL-3	CCL17(TARC)	TGF- α
IL-4	CCL22(MDC)	TGF- β
IL-5	CCL23(MPIF-1)	VEGF
IL-6	CXCR1(Gro α)	
IL-10	CXCL5(ENA-78)	
IL-11	CXCL8(IL-8)	
IL-12	CXCL9(MIG)	
IL-13	CXCL10(IP-10)	
IL-16	CXCL11(I-TAC)	
IL-17		
IL-25		
IFN- γ		
TNF- α		

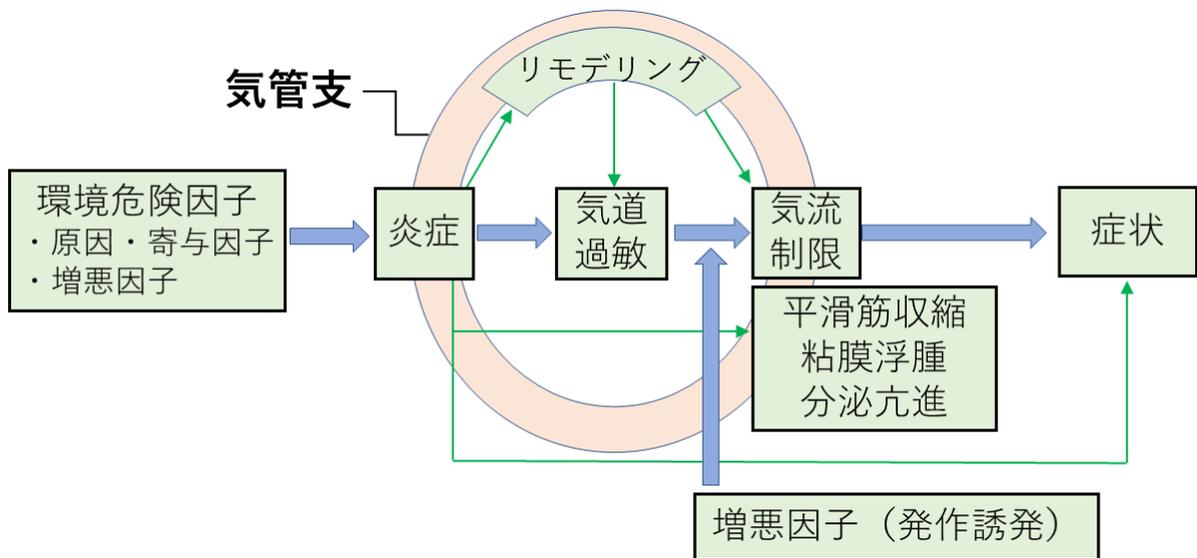
(文献[62]より引用、一部改変)

Table 3 HA 結合によって誘導される各細胞の
サイトカイン、ケモカインの概要

Category	Gene	cell type
Cytokines	IL-12	Macrophages
	TNF- α	Macrophages
	IL-1 β	Macrophages
	IL-6	Macrophages, Fibroblasts, B cells
	IL-8	Fibroblasts, airway epithelial cells
	IL-10	Regulatory T cells, B cells
	IFN β	Macrophages
Chemokine	MIP- α	Macrophages
	KC	Macrophages
	MCP-1	Macrophages
	CXCL2(MIP-2)	Macrophages
	CCL5(RANTES)	Macrophages
	CXCL9(MIG)	Macrophages
	CXCL10(IP-10)	Macrophages
	CXCL1(Gro α)	Endothelial cells
	CCL3(MIP-1 α)	Macrophages
	CCL4(MIP-1 β)	Macrophages
Growth factors	TGF- β 1	Eosinophils, macrophages, B cells
	TGF- β 2	Monocytes
	IGF-1	Macrophages

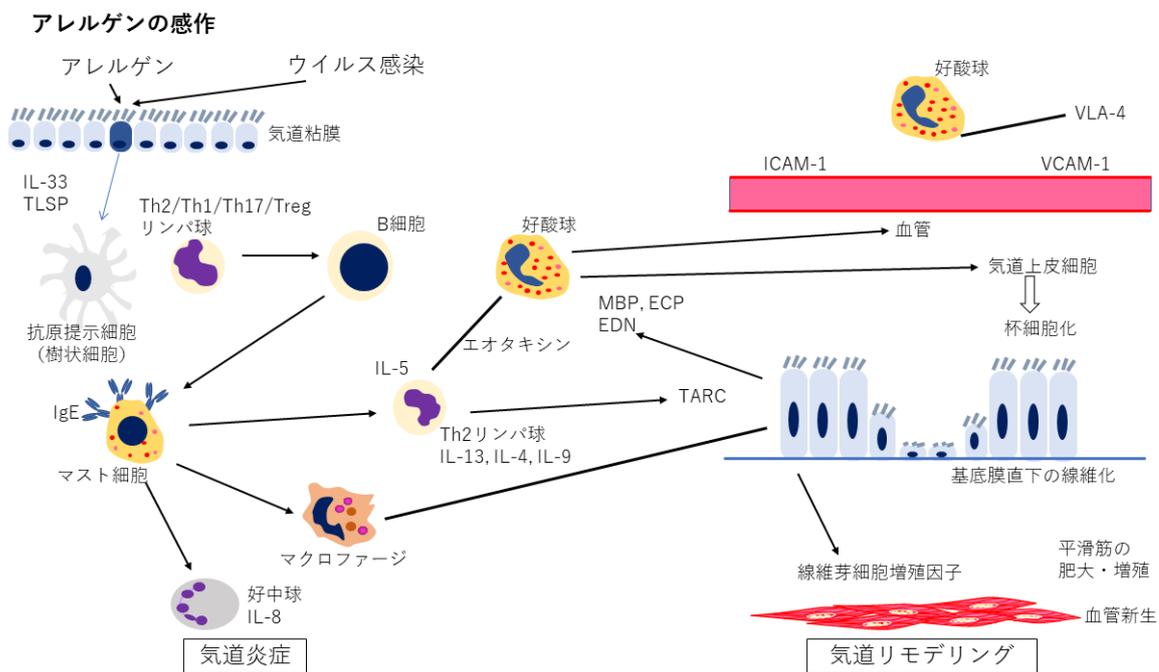
(文献[63]より引用、一部改変)

Fig. 1 喘息の発症メカニズム



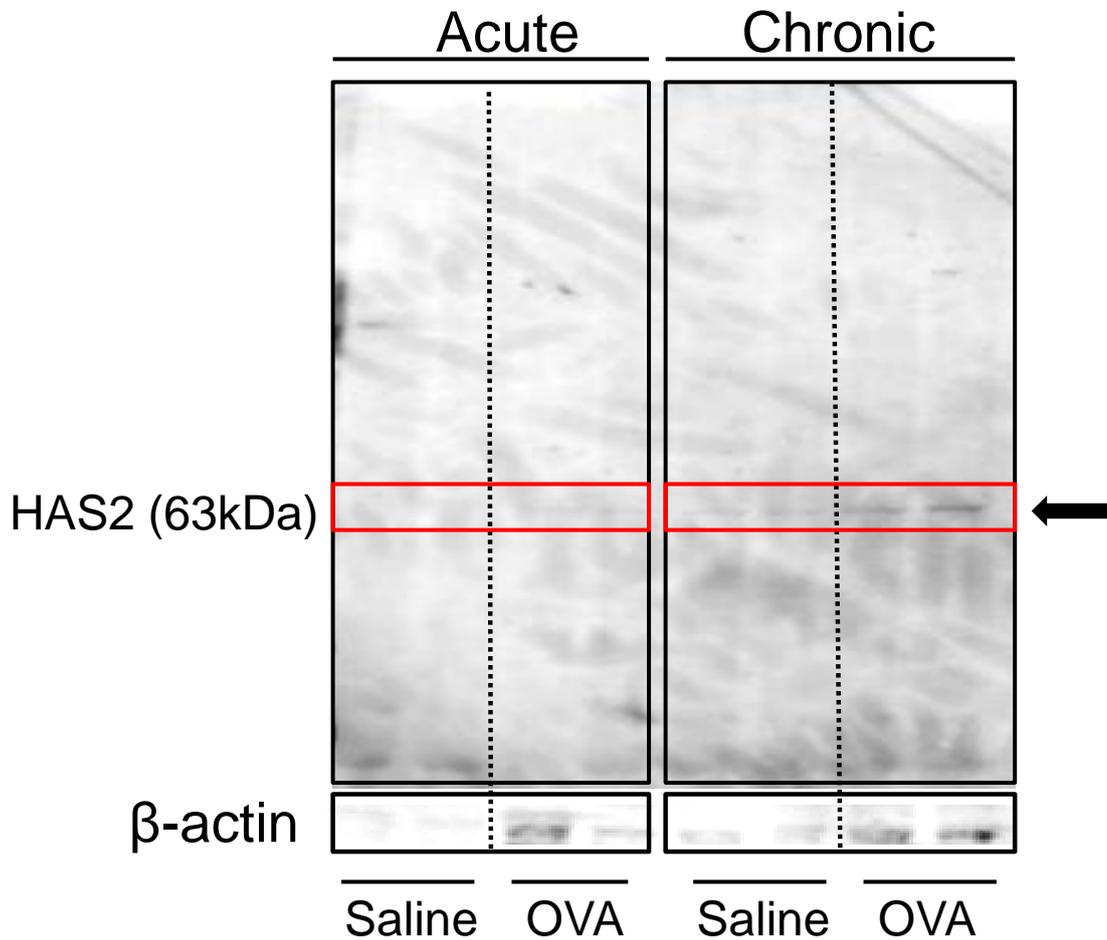
(角田義弥、檜澤伸之：Common disease と病態生理 (気管支喘息)；オーム社 (近日発刊予定) を改変して引用)

Fig.2 喘息の病態



(文献[1]を一部改変して引用)

Fig. 3 OVA 刺激による HAS2 タンパクの発現

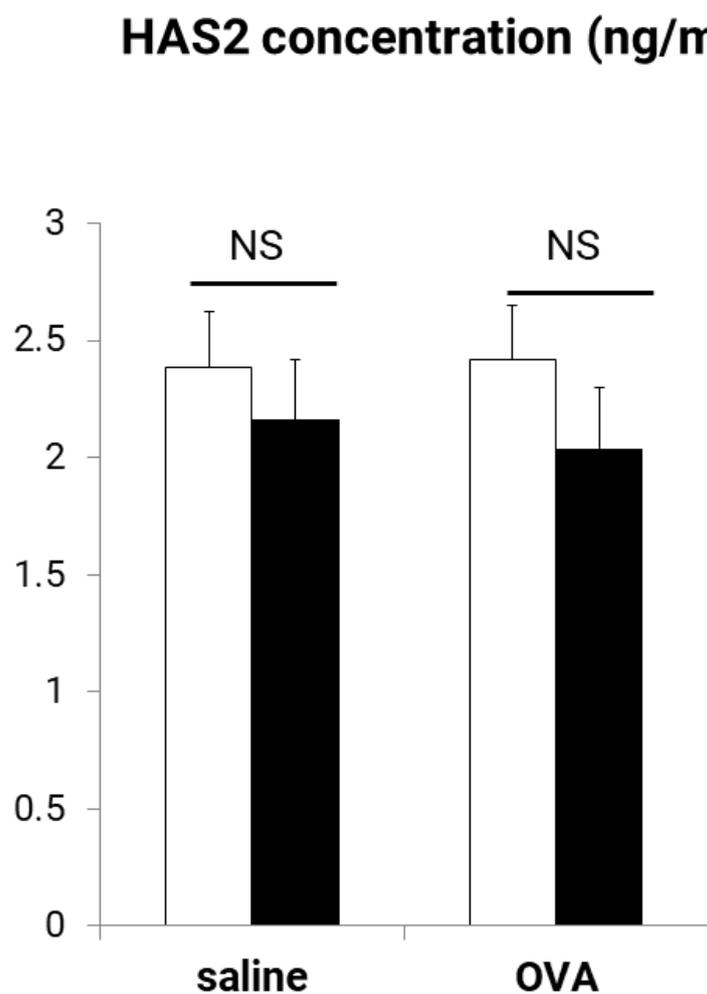


Acute : 急性好酸球性気道炎症モデル

Chronic : 慢性好酸球性気道炎症モデル

positive control として β アクチンを使用

Fig. 4 非刺激状態での HAS2 タンパク発現量の比較①



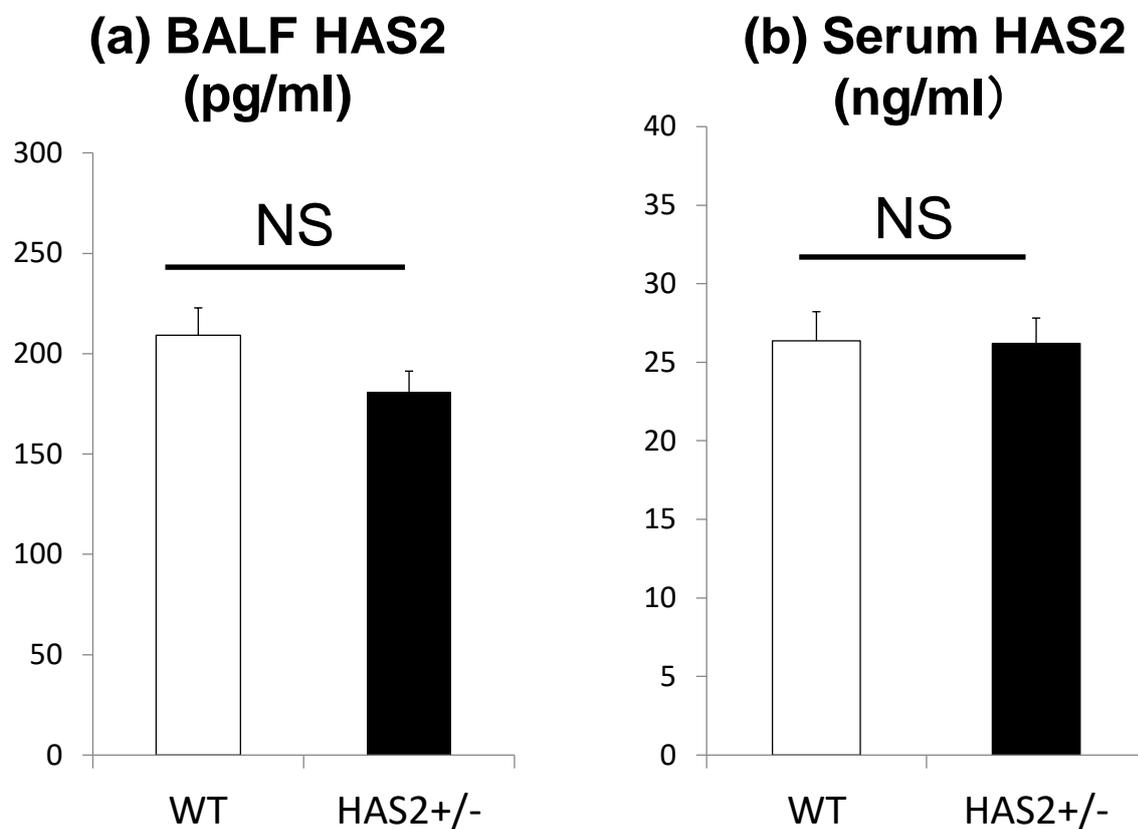
ELISA による HAS2 タンパク発現量の比較

NS: Not significant

n=5-6

右肺上葉以外の肺葉の重量 (53.1-106.9mg)

Fig. 5 非刺激状態での HAS2 タンパク発現量の比較②

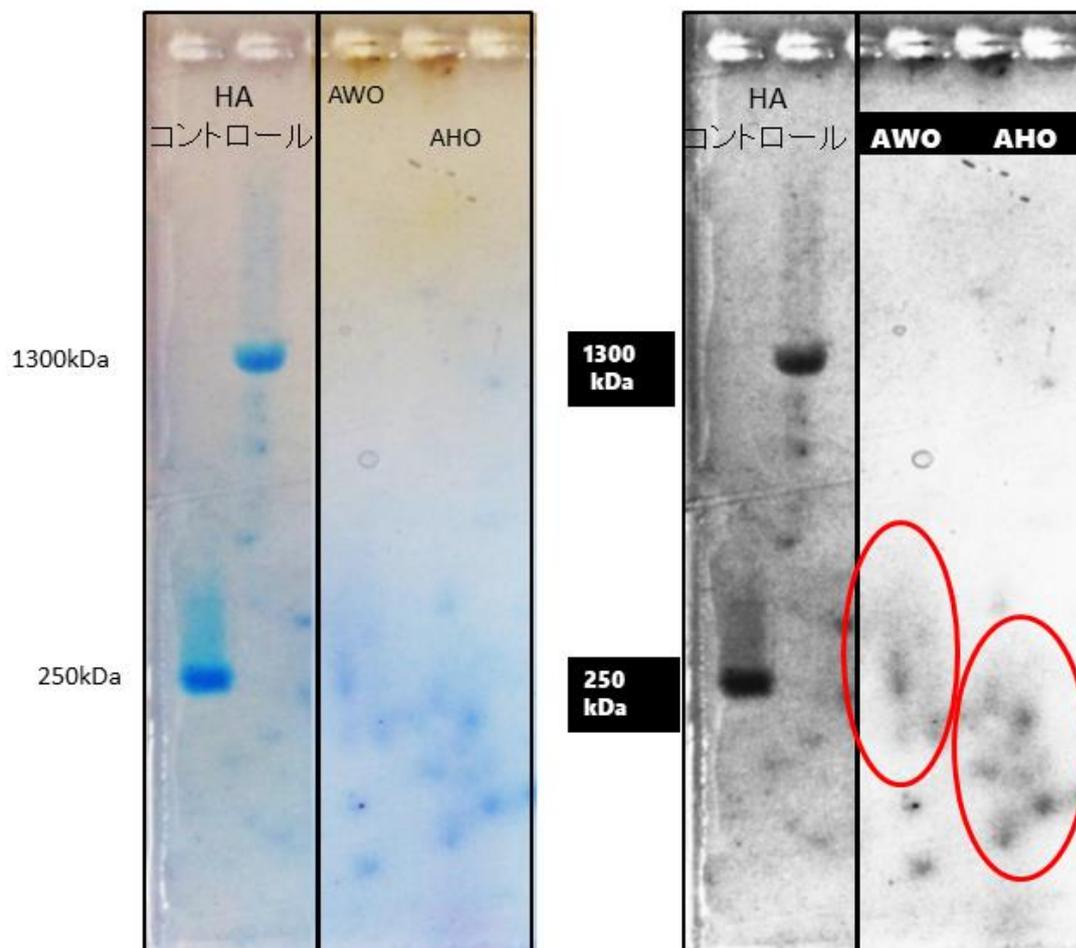


ELISA による HAS2 タンパク発現量の比較

NS: Not significant

Fig. 6 OVA 刺激後の分子量別ヒアルロン酸発現量の比較

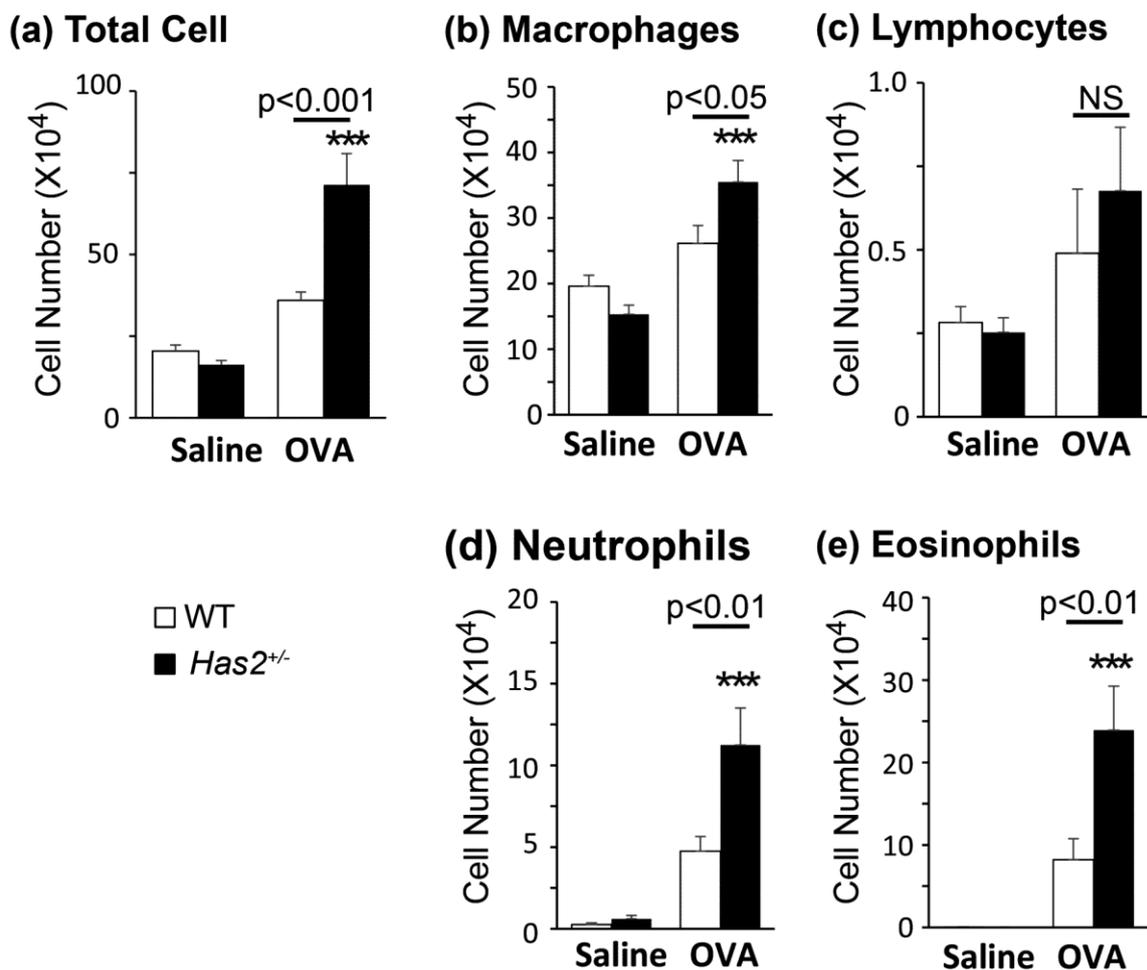
予備実験：OVA 刺激後の各群 1 検体ずつの分子量別ヒアルロン酸発現



AWO : Acute Wild OVA (WT 急性好酸球性気道炎症モデル)

AHO : Acute HAS2^{+/-} OVA (HAS2 ヘテロ欠損 急性好酸球性気道炎症モデル)

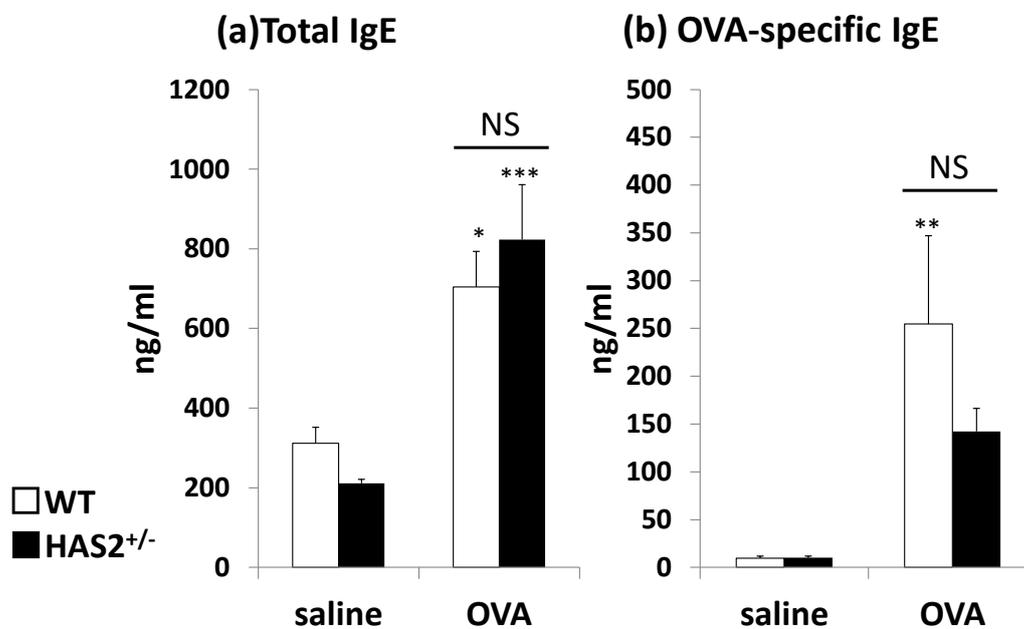
Fig. 7 OVA 刺激後の BALF による気道炎症の評価



*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001 は WT の生食対照群と比較

NS: Not significant (n=10-11)

Fig. 8 OVA 刺激後の免疫グロブリンの評価



* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ は WT の生食対照群と比較

NS: Not significant (n=10)

Fig. 9 Th1/Th2 に関連したサイトカイン①

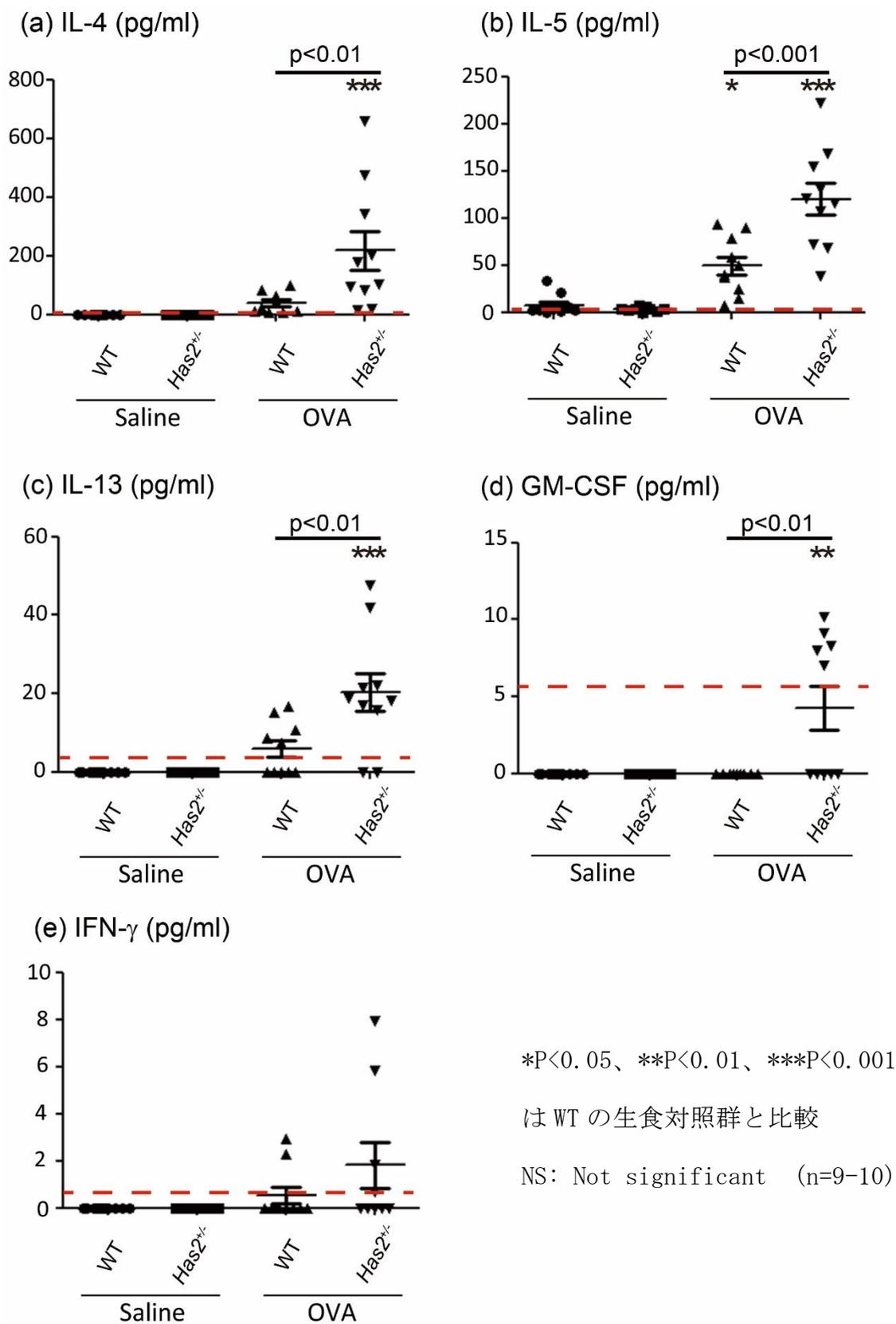
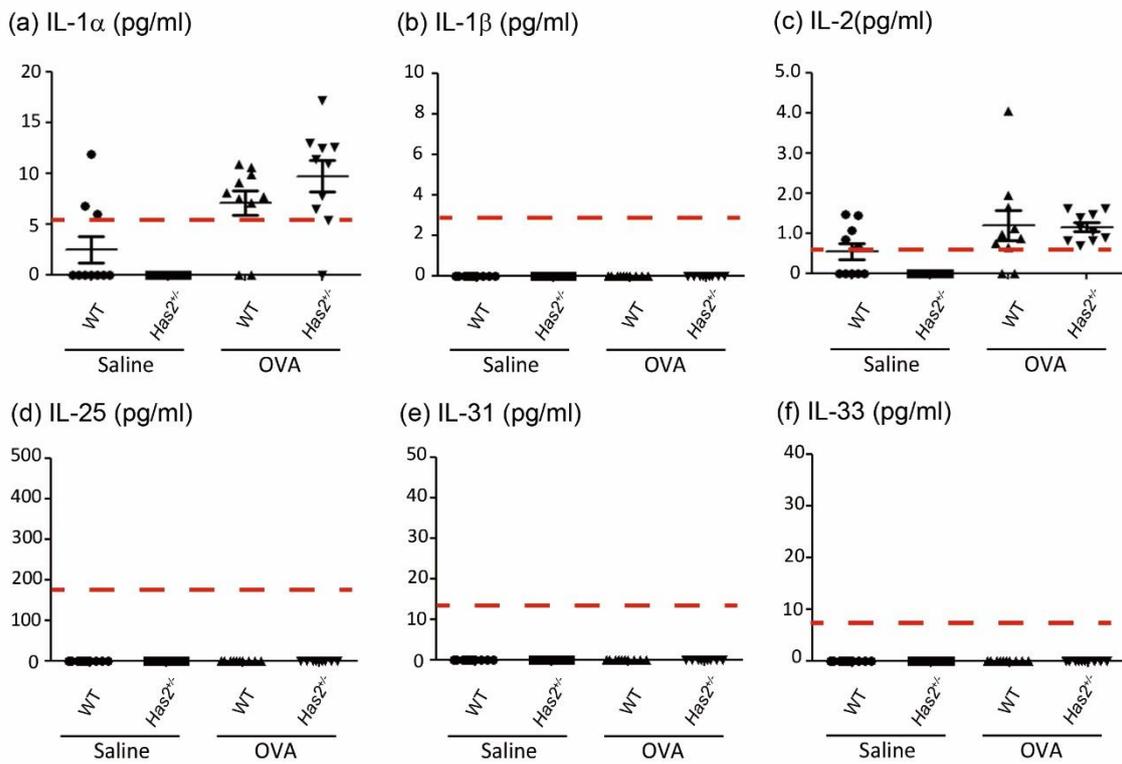
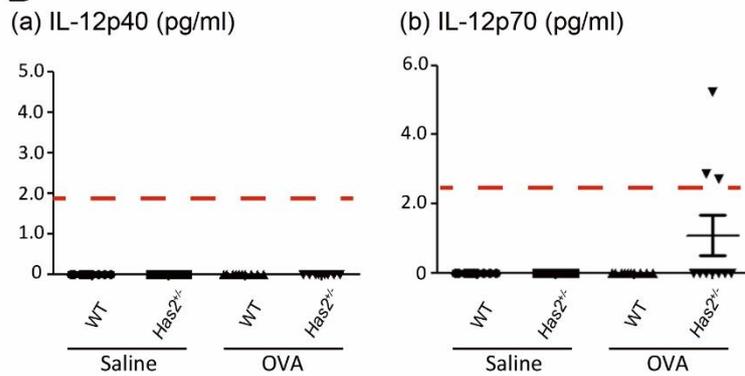


Fig. 10 Th1/Th2 に関連したサイトカイン②

A



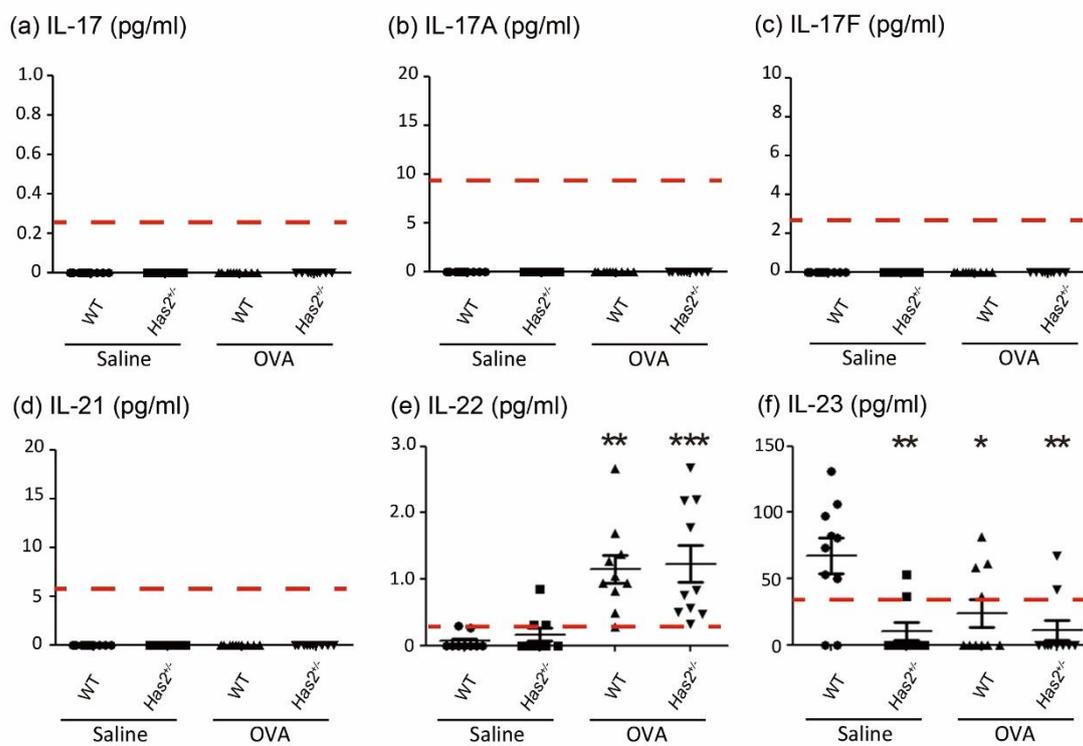
B



* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ は WT の生食対照群と比較

NS: Not significant (n=9-10)

Fig. 11 Th17 に関連したサイトカイン



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ は WT の生食対照群と比較

NS: Not significant (n=9-10)

Fig. 12 単球・マクローファージに関連したサイトカイン

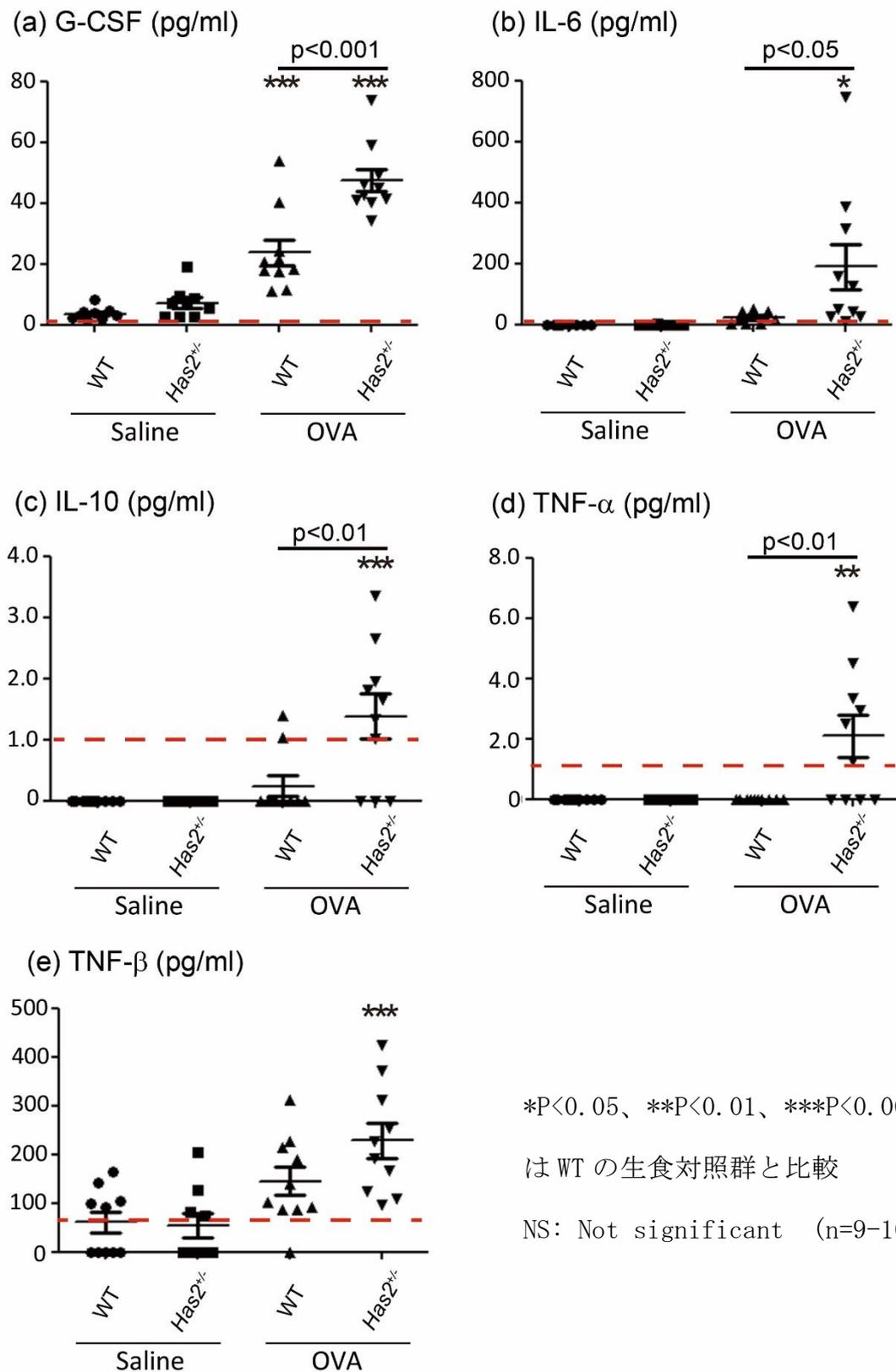
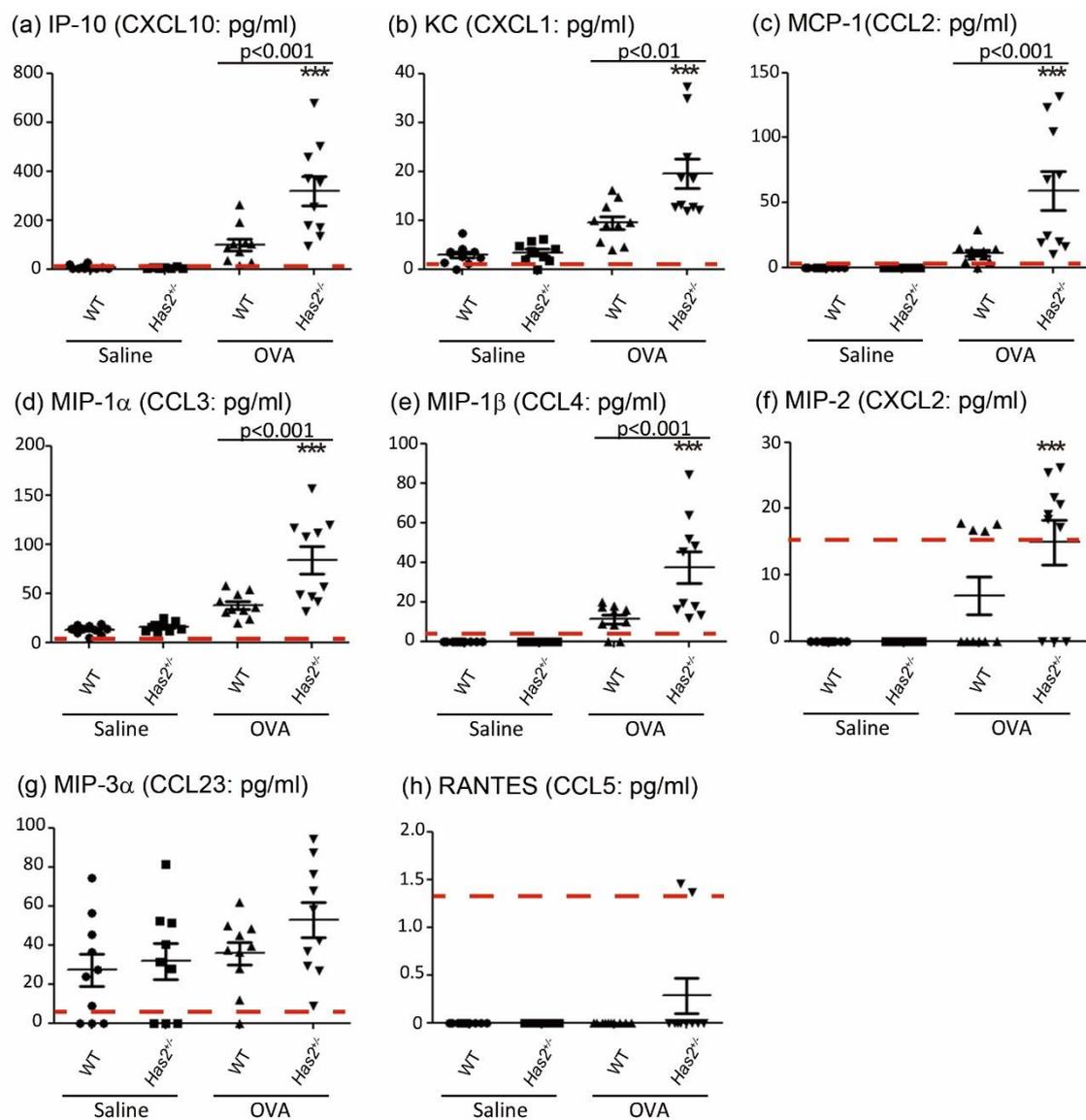


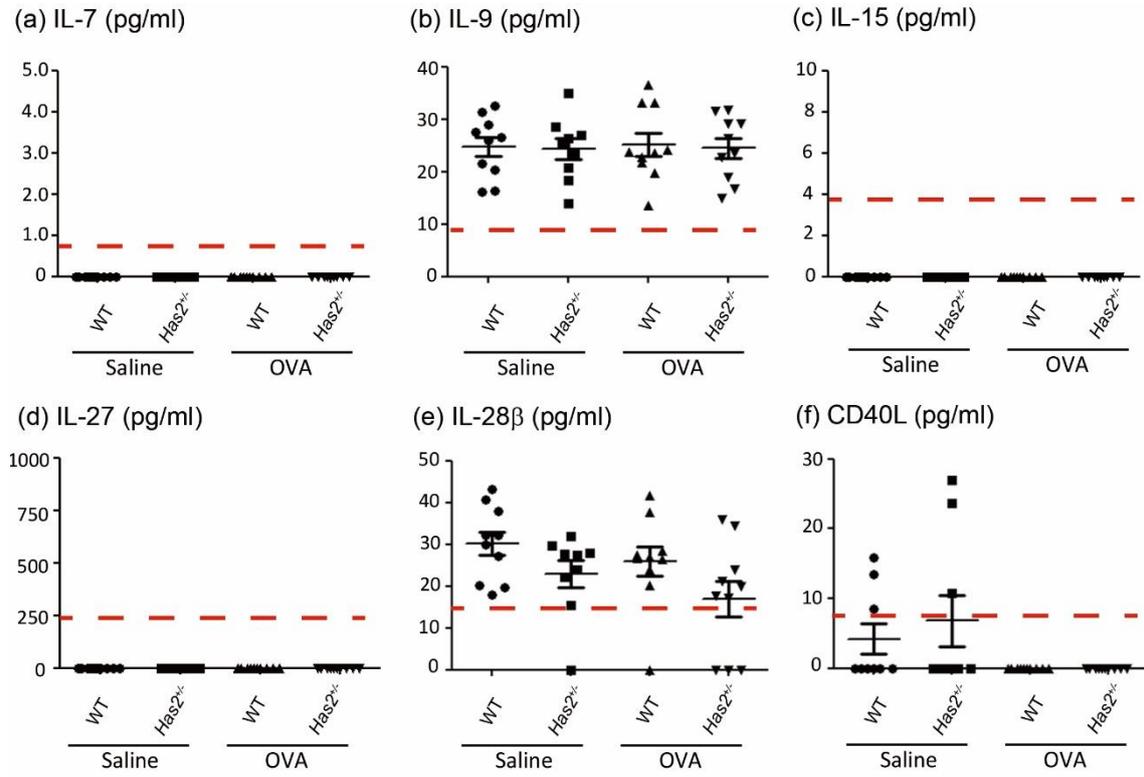
Fig.13 単球・マクロファージに関連したケモカイン



*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001 は WT の生食対照群と比較

NS: Not significant (n=9-10)

Fig. 14 その他のサイトカイン



* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ は WT の生食対照群と比較

NS: Not significant (n=9-10)

第3章 総括

気管支喘息はアレルギー反応を主とした慢性の気道炎症性疾患である。気道炎症は好酸球、好中球、リンパ球、マスト細胞などの増加により特徴づけられる。吸入ステロイド治療の登場により、多くの患者の病勢を抑えることができたが、吸入ステロイドをはじめとした既存の気管支喘息の治療に抵抗性を示す患者や、繰り返す炎症により気道リモデリング、気道過敏性を引き起こし、病勢をコントロールできていない患者も存在する。その原因としてさまざまな遺伝子研究がなされているが単一の遺伝子異常のみでの説明は困難で、多数の遺伝子の関与ならびにタバコやハウスダストなどをはじめとした環境要因により複合的な病態形成が指摘されている。

当研究グループはGWASによりHAS2の機能異常が気管支喘息の一因となる可能性を報告した。本研究ではHAS2の機能異常が出現しているモデルマウスを使用し、世界で初めて直接的にHAS2の機能異常がHMW-HA量の低下とLMW-HA量の増加を示し、マクロファージ、好中球、好酸球性気道炎症、またTh2系のサイトカインおよび単球・マクロファージに関連したサイトカイン・ケモカインを増強させることを見出した。HAS2の機能異常がヒアルロン酸動態と関係があることを今後証明する必要があるが、HAS2の機能異常によるヒアルロン酸動態の変化や、その炎症抑制機序がさらに明らかになればヒアルロン酸分画の変化や糖鎖構造を同定・定量することにより、喘息患者の難治化予測のバイオマーカーとしての運用や同糖鎖構造による新規標的治療薬の創薬といった臨床応用が期待できる。

参考文献

1. 「喘息予防・管理ガイドライン 2015」作成委員会: **喘息予防・管理ガイドライン 2015**. 2015.
2. Grainge CL, Lau LC, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, Holgate S, Davies DE, Howarth PH: **Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma**. *N Engl J Med* 2011, **364**:2006-2015.
3. Holgate S: **Mediator and cytokine mechanisms in asthma**. *Thorax* 1993, **48**:103-109.
4. Holgate ST: **Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches?** *J Allergy Clin Immunol* 2011, **128**:495-505.
5. Kay AB: **The role of T lymphocytes in asthma**. *Chem Immunol Allergy* 2006, **91**:59-75.
6. Liu MC, Bleecker ER, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Niv Y, McLemore TL, Permutt S, Proud D, Hubbard WC: **Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D2, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma**. *Am Rev Respir Dis* 1990, **142**:126-132.
7. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, et al.: **Eosinophilic inflammation in asthma**. *N Engl J Med* 1990, **323**:1033-1039.
8. Wong CK, Cheung PF, Ip WK, Lam CW: **Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils**. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, **37**:85-96.
9. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID: **Mast-**

- cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002, **346**:1699-1705.
10. Nakae S, Ho LH, Yu M, Monteforte R, Iikura M, Suto H, Galli SJ: **Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice.** *J Allergy Clin Immunol* 2007, **120**:48-55.
 11. Stewart AG, Tomlinson PR, Fernandes DJ, Wilson JW, Harris T: **Tumor necrosis factor alpha modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, **12**:110-119.
 12. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ: **Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **156**:737-743.
 13. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, Hunt LW, Gleich GJ: **Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa?** *Am Rev Respir Dis* 1993, **148**:713-719.
 14. Robinson DS: **The role of the T cell in asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **126**:1081-1091; quiz 1092-1083.
 15. Mikhak Z, Fukui M, Farsidjani A, Medoff BD, Tager AM, Luster AD: **Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T(H)2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2009, **123**:67-73.e63.
 16. Gyles SL, Xue L, Townsend ER, Wetthey F, Pettipher R: **A dominant role for chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 (Th2) cells (CRTH2) in mediating chemotaxis of CRTH2+ CD4+ Th2 lymphocytes in**

- response to mast cell supernatants.** *Immunology* 2006, **119**:362-368.
17. Xue L, Gyles SL, Wettey FR, Gazi L, Townsend E, Hunter MG, Pettipher R: **Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells.** *J Immunol* 2005, **175**:6531-6536.
18. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Crameri R, Duan S, Eiwegger T, Eljaszewicz A, Ferstl R, et al: **Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF α : Receptors, functions, and roles in diseases.** *J Allergy Clin Immunol* 2016, **138**:984-1010.
19. Steinke JW, Borish L: **Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists.** *Respir Res* 2001, **2**:66-70.
20. Fukuda T, Fukushima Y, Numao T, Ando N, Arima M, Nakajima H, Sagara H, Adachi T, Motojima S, Makino S: **Role of interleukin-4 and vascular cell adhesion molecule-1 in selective eosinophil migration into the airways in allergic asthma.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, **14**:84-94.
21. Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G: **Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance.** *J Immunol* 2005, **175**:7085-7091.
22. Shiomi A, Usui T: **Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation.** *Mediators Inflamm* 2015, **2015**:568543.
23. Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, Henson PM, Noble PW: **Resolution of lung inflammation by CD44.** *Science* 2002, **296**:155-158.
24. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, et al: **Genomewide association study identifies**

- HAS2 as a novel susceptibility gene for adult asthma in a Japanese population.**
Clin Exp Allergy 2014, **44**:1327-1334.
25. Philipson LH, Schwartz NB: **Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendrogloma cells.** *J Biol Chem* 1984, **259**:5017-5023.
26. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, et al: **Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties.** *J Biol Chem* 1999, **274**:25085-25092.
27. Rilla K, Oikari S, Jokela TA, Hyttinen JM, Karna R, Tammi RH, Tammi MI: **Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3.** *J Biol Chem* 2013, **288**:5973-5983.
28. Spicer AP, Tien JL, Joo A, Bowling Jr RA: **Investigation of hyaluronan function in the mouse through targeted mutagenesis.** *Glycoconj J* 2002, **19**:341-345.
29. Torronen K, Nikunen K, Karna R, Tammi M, Tammi R, Rilla K: **Tissue distribution and subcellular localization of hyaluronan synthase isoenzymes.** *Histochem Cell Biol* 2014, **141**:17-31.
30. Spicer AP, McDonald JA: **Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family.** *J Biol Chem* 1998, **273**:1923-1932.
31. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA: **Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme.** *J Clin Invest* 2000, **106**:349-360.
32. Camenisch TD, Schroeder JA, Bradley J, Klewer SE, McDonald JA: **Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of**

- ErbB2-ErbB3 receptors.** *Nat Med* 2002, **8**:850-855.
33. Zhu X, Deng X, Huang G, Wang J, Yang J, Chen S, Ma X, Wang B: **A novel mutation of Hyaluronan synthase 2 gene in Chinese children with ventricular septal defect.** *PLoS One* 2014, **9**:e87437.
34. Schiller S, Dorfman A: **The metabolism of mucopolysaccharides in animals. IV. The influence of insulin.** *J Biol Chem* 1957, **227**:625-632.
35. Fraser JR, Laurent TC: **Turnover and metabolism of hyaluronan.** *Ciba Found Symp* 1989, **143**:41-53; discussion 53-49, 281-285.
36. Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E: **Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit.** *Biochem J* 1981, **200**:415-424.
37. Hirose Y, Saijou E, Sugano Y, Takeshita F, Nishimura S, Nonaka H, Chen YR, Sekine K, Kido T, Nakamura T, et al: **Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:4263-4268.
38. Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT: **Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells.** *J Immunol* 2007, **179**:744-747.
39. Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ, Kumar S: **Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan.** *Int J Cancer* 1997, **71**:251-256.
40. Noble PW: **Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair.** *Matrix Biol* 2002, **21**:25-29.

41. Campo GM, Avenoso A, Nastasi G, Micali A, Prestipino V, Vaccaro M, D'Ascola A, Calatroni A, Campo S: **Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1812**:1170-1181.
42. Day AJ, de la Motte CA: **Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?** *Trends Immunol* 2005, **26**:637-643.
43. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW: **Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44.** *J Clin Invest* 1996, **98**:2403-2413.
44. Boodoo S, Spannhake EW, Powell JD, Horton MR: **Differential regulation of hyaluronan-induced IL-8 and IP-10 in airway epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, **291**:L479-486.
45. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR: **Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2.** *J Immunol* 2006, **177**:1272-1281.
46. Klagas I, Goulet S, Karakiulakis G, Zhong J, Baraket M, Black JL, Papakonstantinou E, Roth M: **Decreased hyaluronan in airway smooth muscle cells from patients with asthma and COPD.** *Eur Respir J* 2009, **34**:616-628.
47. Kanabar V, Hirst SJ, O'Connor BJ, Page CP: **Some structural determinants of the antiproliferative effect of heparin-like molecules on human airway smooth muscle.** *Br J Pharmacol* 2005, **146**:370-377.
48. Monzon ME, Manzanares D, Schmid N, Casalino-Matsuda SM, Forteza RM: **Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, **39**:289-295.

49. Crocker PR, Clark EA, Filbin M, Gordon S, Jones Y, Kehrl JH, Kelm S, Le Douarin N, Powell L, Roder J, et al: **Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins.** *Glycobiology* 1998, **8**:v.
50. Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC: **Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease.** *Nat Rev Immunol* 2014, **14**:653-666.
51. 際本 拓未, 檜澤 伸之: **Siglec とアレルギー性気道炎症制御.** *呼吸* 2015, **34**:21-24.
52. Crocker PR, Paulson JC, Varki A: **Siglecs and their roles in the immune system.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:255-266.
53. Kiwamoto T, Katoh T, Evans CM, Janssen WJ, Brummet ME, Hudson SA, Zhu Z, Tiemeyer M, Bochner BS: **Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis.** *J Allergy Clin Immunol* 2015, **135**:1329-1340.e1329.
54. Kiwamoto T, Brummet ME, Wu F, Motari MG, Smith DF, Schnaar RL, Zhu Z, Bochner BS: **Mice deficient in the St3gal3 gene product alpha2,3 sialyltransferase (ST3Gal-III) exhibit enhanced allergic eosinophilic airway inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2014, **133**:240-247.e241-243.
55. Farid S, Mirshafiey A, Razavi A: **Siglec-8 and Siglec-F, the new therapeutic targets in asthma.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012, **34**:721-726.
56. Secundino I, Lizcano A, Roupe KM, Wang X, Cole JN, Olson J, Ali SR, Dahesh S, Amayreh LK, Henningham A, et al: **Host and pathogen hyaluronan signal through human siglec-9 to suppress neutrophil activation.** *J Mol Med (Berl)* 2016, **94**:219-233.
57. Cao H, Crocker PR: **Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation?** *Immunology* 2011, **132**:18-26.

58. Aun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, Kalil J, Giavina-Bianchi P: **Animal models of asthma: utility and limitations.** *J Asthma Allergy* 2017, **10**:293-301.
59. Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Kikuchi N, Haraguchi N, Masuko H, Kawaguchi M, Nomura A, Sakamoto T, et al: **Blockade of cysteinyl leukotriene-1 receptors suppresses airway remodelling in mice overexpressing GATA-3.** *Clin Exp Allergy* 2011, **41**:116-128.
60. Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Maeda A, Ishizaki K, Iizuka T, Hegab AE, Matsuno Y, Homma S, et al: **Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174**:142-151.
61. Garantziotis S, Li Z, Potts EN, Kimata K, Zhuo L, Morgan DL, Savani RC, Noble PW, Foster WM, Schwartz DA, Hollingsworth JW: **Hyaluronan mediates ozone-induced airway hyperresponsiveness in mice.** *J Biol Chem* 2009, **284**:11309-11317.
62. Davoine F, Lacy P: **Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity.** *Front Immunol* 2014, **5**:570.
63. Ghosh S, Hoselton SA, Dorsam GP, Schuh JM: **Hyaluronan fragments as mediators of inflammation in allergic pulmonary disease.** *Immunobiology* 2015, **220**:575-588.
64. Bollyky PL, Falk BA, Long SA, Preisinger A, Braun KR, Wu RP, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT: **CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta.** *J Immunol* 2009, **183**:2232-2241.
65. Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM: **High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and**

- enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis.**
Osteoarthritis Cartilage 2006, **14**:1237-1247.
66. Ohkawara Y, Tamura G, Iwasaki T, Tanaka A, Kikuchi T, Shirato K: **Activation and transforming growth factor-beta production in eosinophils by hyaluronan.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, **23**:444-451.
67. Noble PW, McKee CM, Cowman M, Shin HS: **Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages.** *J Exp Med* 1996, **183**:2373-2378.
68. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC: **Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4.** *J Exp Med* 2002, **195**:99-111.
69. Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC: **Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells.** *J Immunol* 2000, **165**:1863-1870.
70. Horton MR, Olman MA, Bao C, White KE, Choi AM, Chin BY, Noble PW, Lowenstein CJ: **Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase by hyaluronan fragments in mouse macrophages.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L707-715.
71. Horton MR, Shapiro S, Bao C, Lowenstein CJ, Noble PW: **Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages.** *J Immunol* 1999, **162**:4171-4176.
72. Liang J, Jiang D, Griffith J, Yu S, Fan J, Zhao X, Bucala R, Noble PW: **CD44 is a negative regulator of acute pulmonary inflammation and lipopolysaccharide-TLR signaling in mouse macrophages.** *J Immunol* 2007, **178**:2469-2475.

73. Bourguignon LY, Zhu H, Chu A, Iida N, Zhang L, Hung MC: **Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation.** *J Biol Chem* 1997, **272**:27913-27918.
74. Bourguignon LY, Wong G, Earle CA, Xia W: **Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NFkappaB signaling leading to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast tumor invasion.** *Cytoskeleton (Hoboken)* 2011, **68**:671-693.
75. Li Y, Jiang D, Liang J, Meltzer EB, Gray A, Miura R, Wogensen L, Yamaguchi Y, Noble PW: **Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44.** *J Exp Med* 2011, **208**:1459-1471.
76. Kumar S, Lanckacker E, Dentener M, Bracke K, Provoost S, De Grove K, Brusselle G, Wouters E, Maes T, Joos G: **Aggravation of Allergic Airway Inflammation by Cigarette Smoke in Mice Is CD44-Dependent.** *PLoS One* 2016, **11**:e0151113.
77. Litwiniuk M GTea: **Chronic inflammation in venous leg ulcer—problems and perspectives.** *Cent Eur J immunol* 2009, **34**:247-251.
78. Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Bae S, Takenaka M, Yukami T, et al: **CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling.** *Am J Pathol* 2009, **175**:649-660.
79. Chang YC, Olson J, Beasley FC, Tung C, Zhang J, Crocker PR, Varki A, Nizet V: **Group B Streptococcus engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses in vivo.** *PLoS Pathog* 2014, **10**:e1003846.

80. Cheng G, Swaidani S, Sharma M, Lauer ME, Hascall VC, Aronica MA: **Correlation of hyaluronan deposition with infiltration of eosinophils and lymphocytes in a cockroach-induced murine model of asthma.** *Glycobiology* 2013, **23**:43-58.

謝辞

本研究にあたり終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学大学院呼吸病態医学分野の檜澤伸之先生に深い謝意を表します。

適切なお指導ご示唆をいただきました筑波大学大学院呼吸器内科際本拓未先生に深く感謝致します。

研究その他多方面にわたりご指導いただきました筑波大学附属病院土浦市地域臨床教育ステーション石井幸雄教授、水戸地域医療教育センター佐藤浩昭教授に深く感謝いたします。

日々の研究において様々なお協力、ご教授をいただきました、坂本透教授、森島祐子准教授、川口未央講師、松野洋輔講師、山本良子講師、増子裕典講師、中澤健介講師、塩澤利博病院講師、松山政史講師、大塚茂雄医学博士、谷田貝洋平医学博士、田村智宏医学博士、山田英恵医学博士、林士元医学博士、櫻井啓文医学士、金澤潤医学士、中嶋真之医学士、Mingma Sherpa 医学士、中村明代様に深く感謝いたします。

そして日々の研究、診療を続けていくうえで、常に心の支えとなり、暖かく励ましてくれた家族に感謝したいと思います。