

令和元年6月16日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09188

研究課題名(和文)好中球関連アレルギー性気道炎症をきたす喘息へのプリン作動性シグナル伝達作用の研究

研究課題名(英文) The study of purinergic signaling in neutrophil-related allergic airway inflammation of asthma

研究代表者

杣 知行 (Soma, Tomoyuki)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40307921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、種々の外的刺激による細胞障害で放出されるDanger signalの一種、アデノシン三リン酸(ATP)の重症気管支喘息の気道炎症病態への寄与を臨床および基礎の両面で検討した。1)重症喘息患者の気道ではATPが増加し活性化好中球と関連して呼吸機能低下に寄与することが見出された。2)リポポリサッカライド(LPS)刺激による活性化好中球への好酸球組織間隙遊走能にP2Y2受容体を介してATPが関与することが見出された。3)OVAおよびブドウ球菌感作マウスにて、経気道OVA暴露後Th2及びTh17共存性気道炎症が誘導された。今後Th2/Th17気道炎症へのATPの寄与の検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息はTh2型免疫応答と2型自然免疫リンパ球が機能するType2炎症を主体とする慢性アレルギー性気道炎症疾患である。疾患の多様性が明らかになるに従い、その機序も一元的な説明が困難となっている。本研究ではATPというdanger signalが喘息の病態形成に関与することを示唆した新しい知見といえる。臨床的な関連性を示すとともに、既存の免疫応答とは異なる経路で炎症が進展することを細胞実験で見出している点で、意義があると推察する。また本研究の結果は好中球性喘息の病態解明の一助となると考えられる。将来的に、ATPを介した免疫応答を適正に抑制する機序が見出されると、治療につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Danger signals are known as players that have an ability to spread signal of inflammation in tissue. Those mediators are released from injured or dead cells. We, comprehensively, determined whether an adenosine triphosphate (ATP) contributes to pathophysiology in asthma. 1) Concentrations of ATP in sputum were increased in patients with severe asthma than those with non-severe asthma. Increases in sputum ATP concentration were correlated with increases in sputum neutrophil ratio, concentration of sputum neutrophilic elastase and deterioration of pulmonary function in patients with asthma, especially, severe asthma. 2) ATP were involved in trans-basement membrane migration of eosinophils induced by LPS-stimulated neutrophils from human peripheral blood through P2Y2 receptors. 3) Airway exposure of LPS and Staphylococcus aureus particles-sensitized mice to OVA induces Th2 and Th17-type immune responses. Further study is needed to determine involvement of ATP in this response.

研究分野：気管支喘息

キーワード：ATP 重症喘息 好中球 好中球エラストラーゼ 好酸球組織間隙遊走能 P2Y2受容体 呼吸機能 エンドトキシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年重症喘息を対象とした、臨床病型や気道炎症病型、遺伝子型に基づいたフェノタイピング解析により、気道炎症病型は好中球増加を中心とした好中球優位型や好酸球増加を伴う混合性顆粒球型のが着目されている。特に好酸球優位型喘息に関する研究の進展に比較し、好中球優位型や混合性顆粒球型の報告は少なく有効な治療法も見出されていない。

外界刺激因子としての pattern-associated molecular pattern に対して、生体内シグナル因子として認識される Danger signal で ATP がアレルギー性気道炎症を誘導することが報告されている (Idzko M, et al. Nat Med. 2007;13:913-9)。また ATP が fMLP で活性化好中球の遊走および集積を autocrine 的に制御すると推測されている (Science 2006; 31; 1792-1795)。申請者は過剰な ATP 刺激で好酸球が細胞内蛋白を放出することを見出している。好中球気道炎症をきたす COPD では BALF 中 ATP 濃度上昇と重症度との相関が認められている (Lommatzsch M, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181:928-934)。

申請者の所属研究室では、重症喘息気道に集積する好中球が好酸球活性化の調節因子として機能することを以前から報告している (Nagata M, et al. Am J Respir Mol Cell Biol 2006;34:760-5, Int Arch Allergy Immunol 2007;141(suppl1): 44-49)。

2. 研究の目的

本申請研究では、Adenyl purine の喘息病態への寄与を基礎と臨床的見地から包括的に研究し、臨床的活用性を見出すことを目的とする。以下に主たる実際的目的を示す。

- 1) 喘息患者における気道内 ATP を基軸に臨床的意義を検討しマーカーとしての活用性を検討する。
- 2) Adenyl purine に帰属する ATP の多因子修飾された Th2 カスケード性気道炎症への関与を細胞化学的に解析する。
- 3) Th2 カスケード以外の影響を受けたアレルギー性気道炎症への ATP の寄与をマウスで検討する。

3. 研究の方法

- 1) 安定喘息患者の喀痰を誘発喀痰法で採取する。喀痰中の ATP 濃度を Luminescence 法で測定し、呼吸機能などの臨床パラメーター、喀痰中気道炎症細胞、気道内炎症メディエーターなどとの関連性を検討し、臨床的意義を検討する。また気道中炎症細胞との関連性を検討し産生責任細胞を検索する。
- 2) 好中球依存性の好酸球遊走および組織集積への ATP の寄与を、LPS 刺激による活性化好中球への、好酸球の基底膜通過遊走反応として当施設で確立されているボイデン・チェンバー変法を用いて検討する。基底膜成分 (マトリジェル®) でコートしたフィルターの上層に末梢血好酸球、下層に 10 μ g/mL LPS 刺激後、末梢血好中球を置き、下層に存在する好酸球ペルオキシダーゼ測定法で遊走反応を測定する。また対応レセプターの抗体試薬および特異抗体で反応抑制効果を検討する。
- 3) OVA と *S.aureus* 粒子を経気道的に BALB/c マウス (6-8 週) に投与し Th2, Th17 型両型の慢性気道炎症感作モデルを作成する。そのモデルを使用してプリン作動性シグナル伝達作用の関与について検討した。感作マウスの BAL、組織中の ATP 及びサイトカインの測定をした。

4. 研究成果

- 1) 臨床観察研究では健常者 18 人、喘息患者 73 人を検討した。安定喘息患者では、健常者に比較し喀痰中 ATP 濃度が有意に増加していた (図 1)。

また ERS/ATS 重症喘息ガイドラインに基づく重症度別の比較では、喀痰中 ATP 濃度は重症群で有意に増加していた。

2)喘息患者の喀痰中 ATP 濃度は喀痰中好中球比率と相関($r=0.38$ 、 $p=0.001$)、FVC と逆相関をしていた。またさらに重症群では、ATP と喀痰中好中球比率あるいは FVC との関連性は強調されていた。以上から気道中 ATP は呼吸機能低下に寄与し重症化に関与することが推測された。

3)好中球を活性化させる環境因子としてエンドトキシンが想定される。喘息患者の喀痰中エンドトキシンを測定すると、重症群で有意に増加していた。またエンドトキシンは喀痰中好酸球+好中球合計比率と正の相関を示した。しかしながら喀痰 ATP との関連性は認められなかった。

4)活性化好中球および好酸球の指標として喀痰中好中球エラスターゼ(NE)および 喀痰中EDN を測定した。全喘息患者でNEは喀痰ATPと相関し($r=0.44$ 、 $p<0.0001$)、重症喘息においても認められた($r=0.43$ 、 $p<0.05$)。また喀痰中EDNとも同様の相関関係が示され、喀痰中好酸球+好中球比率($r=0.35$ 、 $p<0.03$)とも相関した。以上より喘息患者では活性化好中球による気道炎症進行にATPが寄与していることが推測された。

以上の臨床研究から、重症喘息患者の気道にはATPが増加しており、活性化好中球と関係し気道中炎症細胞の増加に関与し、呼吸機能低下に寄与していることが推測される。

5) 本研究のサブ解析で高齢者喘息(61才以上)の気道炎症に関して検討した。15人高齢者喘息(40歳未満)に比較し43人高齢者喘息では、喀痰中好中球数および喀痰中NEが増加し(各々 $p=0.03$ 、 $p<0.05$)、高齢者喘息では喀痰中NEとEDNが正の相関性($r=0.57$ 、 $p<0.0001$)、喀痰中EDNと呼吸機能低下の相関性を見出した。

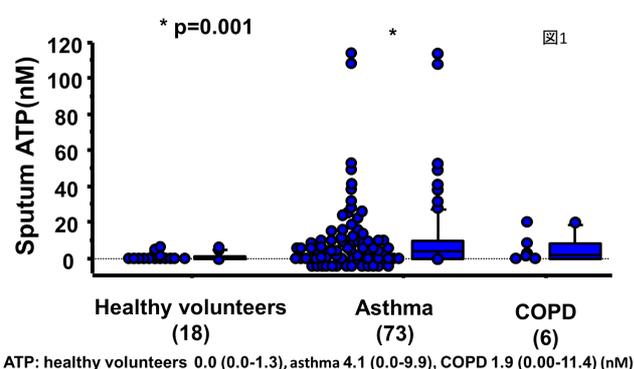
6)別のサブ解析で重症喘息患者を喀痰好酸球比率(2%)と呼気NO(25ppb)の値で4群分割した解析を行い、喀痰好酸球比率と呼気NOが高い患者は年間発作頻度増加を示すことを見出した。本知見は論文化をした。

7) LPS刺激活性化好中球への末梢血好酸球の基底膜通過遊走反応の検討では、無刺激好中球に比較しLPS刺激好中球に対して有意に好酸球基底膜通過遊走反応は亢進していた。また同事象はATP対応受容体であるP2受容体の汎受容体抗体薬である α ATPで約60%抑制された。更にP2Y2受容体抗体での検討でも同様に約90%有意に抑制された。以上からLPS刺激活性化好中球への好酸球基底膜通過遊走にATPが関与することが推定された。

8) 野生型マウスにOVAおよびS.aureus粒子の経気道的投与による感作を行い、第21 日から23日に OVA/PBS経気道投与すると、BAL中好酸球および好中球数が増加すること確認した。しかしながらこの事象にATPが関与するかの実験には進まなかった。

上記の研究から喘息、特に重症喘息では、ATPは気道中でエンドトキシンやLPSの刺激で活性化された好中球に関連し、好酸球の気道への集積のメカニズムに寄与することで、好酸球および好中球の集積をしている混合顆粒型重症喘息の病態を形成し、呼吸機能低下に寄与していることが推測された。本研究は一部を学会発表し、現在論文化を進めている。下記発表しているこの事象は、調査した範囲では世界的にもまだ見出されていない新知見と考えられる。既存のアレルギーカスケードとは全くこのなる新知見として意義は大きいと考えられる。

今後はほかの気道検体、例えば呼気凝縮液や血液中のATPとの関連性を検討することで、より容易にバイオマーカーとしての有用性が期待される。またATPが関与するカスケードを抑制することで喘息の治療としての可能性がある。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- 1) Uchida Y, Soma T, Nakagome K, Kobayashi T, Nagata M. Implications of prostaglandin D2 and leukotrienes in exhaled breath condensates of asthma. Ann Allergy Asthma Immunol. 2019 Apr 12. pii: S1081-1206(19)30292-3. doi: 10.1016/j.anai.2019.04.008.
- 2) Soma T, Iemura H, Naito E, Miyauchi S, Uchida Y, Nakagome K, Nagata M. Implication of fraction of exhaled nitric oxide and blood eosinophil count in severe asthma. Allergol Int. 2018 ;67S:S3-S11. doi: 10.1016/j.alit.2018.04.003.
- 3) Kobayashi T, Nakagome K, Noguchi T, Kobayashi K, Ueda Y, Soma T, Ikebuchi K, Nakamoto H, Nagata M. Elevated uric acid and adenosine triphosphate concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of eosinophilic pneumonia. Allergol Int. 2017;66S:S27-S34. doi: 10.1016/j.alit.2017.06.010.
- 4) 杣 知行. 好酸球性炎症、好中球性炎症 . 喘息・アレルギー 30 ; 19-25 : 2017
- 5) 杣 知行. 高齢者喘息の気道炎症 喘息・アレルギー 30 ; 132-138 : 2017
- 6) 杣 知行 . 環境因子中エンドトキシンとアレルギー . アレルギー・免疫 24 ; 1464-72 : 2017
- 7) Takaku Y, Soma T, Uchida Y, Kobayashi T, Nakagome K, Nagata M. CXC chemokine superfamily induced by Interferon- γ in asthma: a cross-sectional observational study. Asthma Res Pract. 2016 Mar 17;2:6. doi: 10.1186/s40733-016-0021-y.
- 8) Nishihara F, Nakagome K, Kobayashi T, Noguchi T, Araki R, Uchida Y, Soma T, Nagata M. Trans-basement membrane migration of eosinophils induced by LPS-stimulated neutrophils from human peripheral blood *in vitro*. ERJ Open Res. 2015 Dec 22;1(2). pii: 00003-2015.
- 9) Kobayashi T, Soma T, Noguchi T, Nakagome K, Nakamoto H, Kita H, Nagata M. ATP drives eosinophil effector responses through P2 purinergic receptors. Allergol Int. 2015;64 Suppl:S30-6. doi: 10.1016/j.alit.2015.04.009.
- 10) 杣 知行 . 喀痰分析に基づく喘息フェノタイプと治療への反映 . アレルギー・免疫 2015;22:816-825.

[学会発表](計 15 件)

- 1) Tomoyuki Soma, Yoshitaka Uchida, Takehito Kobayashi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Clinical impact of prostaglandin D2 in Exhaled Breath Condensates in Asthma XXIV World Congress of Asthma. 10.4. 2018 Japan
- 2) Yoshitaka Uchida, Tomoyuki Soma, Takehito Kobayashi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Different clinical features of pro-inflammatory eicosanoids in exhaled breath condensate and sputum from asthmatics. 2018 AAAAI Annual Meeting. 3.3.2018 USA
- 3) Yoshitaka Uchida, Tomoyuki Soma, Erika Naito, Hidetoshi Iemura, Sachiko Miyauchi, Rie Hoshi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Effect of eicosanoids on pulmonary function in asthmatics with concomitant allergic rhinitis during Japanese cedar pollen season. XXIV World Congress of Asthma. 10.4. 2018 Japan
- 4) 杣知行, 永田真 . 成人気道アレルギーにおけるエンドトキシンの意義 . 第 67 回日本アレルギー学会学術大会シンポジウム . 2018 年 6 月 22 日千葉市

- 5) 杣知行, 永田真 . 気道炎症からみた高齢者喘息の特徴 . 第 67 回日本アレルギー学会学術大会シンポジウム . 2018 年 6 月 23 日千葉市
- 6) Tomoyuki Soma, Yoshitaka Uchida, Erika Naito, Hidetoshi Iemura, Sachiko Miyauchi, Takehito Kobayashi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Clinical Investigation of Eicosanoids in Exhaled Breath Condensate from Patients with Asthma. The 27th Congress of Interasthma Japan/North Asia. 10.6. 2017 Japan
- 7) Yoshitaka Uchida, Tomoyuki Soma, Kazuyuki Nakagome, Yotaro Takaku, Rie Hoshi, Makoto Nagata. Seasonal effect of eicosanoids on pulmonary function in asthma with concomitant rhinitis caused by Japanese cedar pollinosis. 2017 AAAAI Annual Meeting. 3.6.2017. USA.
- 8) Yoshitaka Uchida, Tomoyuki Soma, Erika Naito, Hidetoshi Iemura, Sachiko Miyauchi, Yotaro Takaku, Rie Hoshi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Seasonal effect of eicosanoids on pulmonary function in asthmatics with concomitant allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. The 27th Congress of Interasthma Japan/North Asia. 10.6. 2017 Japan
- 9) Erika Naito, Tomoyuki Soma, Hidetoshi Iemura, Sachiko Miyauchi, Yoshitaka Uchida, Takehito Kobayashi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Characteristics of Severe Eosinophilic Asthma classified by Combination of Blood Eosinophil Ratio and Exhaled Nitric Oxide Levels. The 27th Congress of Interasthma Japan/North Asia. 10.6. 2017 Japan
- 10) 杣知行 . 日本人の好酸球型喘息のプロファイル . 第 57 回日本呼吸器学科学術講演会ランチオンセミナー . 2017 年 4 月 23 日東京都
- 11) 杣知行. 環境因子としてのエンドトキシン . 第 66 回日本アレルギー学会学術大会シンポジウム「喘息と環境因子—母体環境から大気汚染まで—」. 2017 年 6 月 17 日東京都
- 12) Tomoyuki Soma, Takehito Kobayashi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Clinical Implication of Adenosine Triphosphate in Sputum in Asthma. American Thoracic Society 2016 Annual Meeting. 2016.5.15. San Francisco
- 13) 杣知行, 中込 一之, 小林 威仁, 野口 哲, 内田 貴裕, 永田 眞. 気管支喘息における喀痰中 ATP の臨床的検討. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 2016 年 4 月 9 日. 京都市
- 14) Sachiko Miyauchi, Tomoyuki Soma, Yoshitaka Uchida, Toru Noguchi, Takehito Kobayashi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Clinical characteristics of neutrophilic asthma. The 25th Congress of Interasthma Japan/North Asia. 2015.9.3 Yokohama Japan
- 15) Sachiko Miyauchi, Tomoyuki Soma, Yoshitaka Uchida, Susumu Yamazaki, Toru Noguchi, Takehito Kobayashi, Kazuyuki Nakagome, Makoto Nagata. Clinical characteristics of neutrophilic asthma. XXIV World Allergy Congress. 2015.10.16. Korea

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

1)研究分担者氏名：中込 一之
ローマ字氏名：(NAKAGOMA, kazuyuki)
所属研究機関名：埼玉医科大学
部局名：呼吸器内科

職名：准教授
研究者番号（8桁）：60401113
2)研究分担者氏名：小林 威仁
ローマ字氏名：(KOBAYASHI, takehito)
所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名：総合診療内科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90618266
3)研究分担者氏名：原 健一郎
ローマ字氏名：(HARA, kenichiro)

所属研究機関名：群馬大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：70436301

(2)研究協力者

1)研究協力者氏名：内田 義孝
ローマ字氏名：(UCHIDA, yoshitaka)
2)研究協力者氏名：横手 明美
ローマ字氏名：(YOKOTA, akemi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。