

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09549

研究課題名(和文)炎症性樹状細胞と好塩基球を基軸とした気管支喘息発症・増悪メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of bronchial asthma onset/exacerbation mechanism based on inflammatory dendritic cells and basophils.

研究代表者

若原 恵子 (Wakahara, Keiko)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00631433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息発症・増悪因子としての炎症性樹状細胞および好塩基球の役割を調べるために、喘息患者の誘発喀痰を使用し、以下の研究を行い一定の結果を得た。すなわち、1) 誘発喀痰のフローサイトメトリー法による解析法の確立、2) 誘発喀痰中の樹状細胞および好塩基球数の解析、3) 喀痰中好塩基球のフェノタイプ同定、4) 喀痰中好塩基球の臨床的意義。

成人気管支喘息患者において、喀痰中炎症性樹状細胞および好塩基球数が増加していることが明らかとなった。さらに、喀痰中好塩基球数は喀痰中好酸球と正の相関を示すのみならず、末梢血好塩基球と比較し活性化していることが示され、好酸球性喘息の増悪因子となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To analyze the role of inflammatory dendritic cells and basophils as bronchial asthma onset and exacerbation factors, we performed following studies using induced sputum from asthmatic patients. 1) Establishment of induced sputum analysis by flow cytometry, 2) Analysis of inflammatory dendritic cells and basophils in induced sputum, 3) Phenotype identification of sputum basophils, 4) Relationship between sputum basophils and clinical phenotype in adult asthma. The numbers of inflammatory dendritic cells and basophils in induced sputum were increased in adult asthmatic patients compared with those in normal controls. The number of sputum basophils was positively correlated with the number of sputum eosinophils. Furthermore, sputum basophils were activated compared with blood basophils from same patients. These observations suggest that basophils could be exacerbation factors of eosinophilic asthma.

研究分野：呼吸器学、アレルギー学、免疫学

キーワード：気管支喘息 好塩基球 炎症性樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患患者は近年増加傾向にあり、疾患の活動性コントロールに加え、発症予防や将来的な重症化の予防法確立が望まれている。申請者はこれまでに、マウス気道炎症モデルを作成し、喘息の発症や増悪に関わるメカニズムを解析してきた。その結果、気管支喘息病態モデル肺では抗原提示細胞である樹状細胞のうち、気道炎症性樹状細胞と好塩基球が増加し、これらの細胞群が Th2 性気道炎症の成立や増悪に重要で、ともに協働して炎症を増悪させることを見出した。しかし、その詳細なメカニズムや、ヒト病態成立過程においてこれらの細胞群が同様に重要な意味を持つかについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 獲得免疫成立期 (インダクションフェーズ) および慢性炎症期 (エフェクターフェーズ) における炎症性樹状細胞、好塩基球を基軸とした気道炎症発症・増悪メカニズムを解析すること、(2) ヒト気管支喘息病態における炎症性樹状細胞および好塩基球の関与について、臨床検体および臨床所見を使用し検討することにある。以上の知見をもとに、炎症性樹状細胞や好塩基球を標的とする新規アレルギー治療・予防戦略を提案することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウスモデルについては、マウス OVA (卵白アルブミン) 誘発気道炎症モデル、HDM (ダニ抗原) 誘発気道炎症モデルを作成し、炎症肺より分離した炎症性樹状細胞および好塩基球を分離し、OVA 特異的 TCRTg マウスよより分離したナイーブ T 細胞と共培養し、抗原提示能、Th2 細胞への分化について検討する予定であった。

(2) ヒト病態について検討するために以下の検討を行った。①誘発喀痰のフローサイトメトリー法による解析法の確立-5%生理食塩水吸入によつて誘発喀痰を得た後、0.05% dithiothreitol にて処理し細胞を分離した。各種抗体にて染色をした後、フローサイトメトリー法にて解析をした。好酸球および好中球については、Diff Quick staining で染色の後、検鏡して百分率を測定し、フローサイトメトリーによる測定結果と比較を行った。②誘発喀痰中の樹状細胞および好塩基球数の解析-フローサイトメトリー法にて喀痰中樹状細胞は CD45⁺ HLA-DR⁺ CD172a⁺ 細胞として、喀痰中好塩基球は CD45⁺ FcεRI^{high} CD172a^{low} CD114⁻ CD123⁺ 細胞として測定した。ゲーティングストラテジーについては末梢血液および気管支肺泡洗浄液検体においてもその妥当性について確認した。③喀痰中好塩基球のフェノタイプ同定-喀痰中好塩基球のフェノ

タイプの同定のために、喀痰と同時に同一患者より末梢血を採取し、末梢血中および喀痰中好塩基球の各種細胞表面マーカー発現と好塩基球活性化マーカー発現についてフローサイトメトリー法にて測定し、比較した。④喀痰中好塩基球の臨床的意義-喀痰中好塩基球数や活性化マーカーの発現と各炎症細胞数や、臨床所見について比較し、臨床的意義について探索的検討を行った。

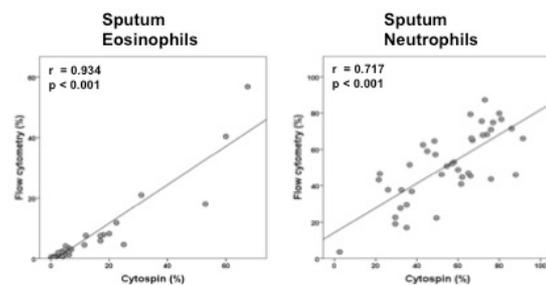
これらのヒト検体を使用した検討については、当院の生命倫理委員会で承認されたプロトコール (2012-0078) に従い、研究参加者からは書面による同意を得た。

4. 研究成果

(1) マウスモデルを使用した検討については、OVA 特異的 TCRTg マウスの動物実験施設への搬入手続きに難渋したこと、実験環境の整備が整わなことなどにより十分な検討ができなかった。また、同時に開始したヒト検体の検討で、当初予想していなかった良好な結果が得られたため、比較的早期にマウスモデルを使用した研究自体を断念し、方向性を変更することとした。

(2) ①誘発喀痰のフローサイトメトリー法による解析法の確立

誘発喀痰は、5%生理食塩水吸入により喀出させ、0.05% dithiothreitol にて処理し細胞を分離した。喀痰中各炎症細胞のゲーティングストラテジーは以下のとおり。好酸球: CD45⁺ CD14⁻ CD66b⁺ CD16^{low} Siglec8⁺ CCR3⁺ 細胞、好中球: CD45⁺ CD14⁻ CD66b⁺ CD16^{high} Siglec8⁻ CCR3⁻ 細胞、好塩基球: CD45⁺ FcεRI^{high} CD172a^{low} CD114⁻ CD123⁺ 細胞、マスト細胞: CD45⁺ FcεRI^{high} CD172a^{low} CD114⁻ CD123^{low} 細胞、炎症性樹状細胞: CD45⁺ HLA-DR⁺ CD172a⁺ 細胞。このゲーティングストラテジーは末梢血および気管支肺泡洗浄液細胞でも確認した。また、すでに好塩基球およびマスト細胞のゲーティングストラテジーはヒト肺細胞や腸管細胞にて確認している¹⁾が、これらの結果とも矛盾しないものであった。喀痰中好酸球および好中球については Diff Quick staining で染色の後、検鏡して百分率を測定し、フローサイトメトリーで測定した結果と比較した。

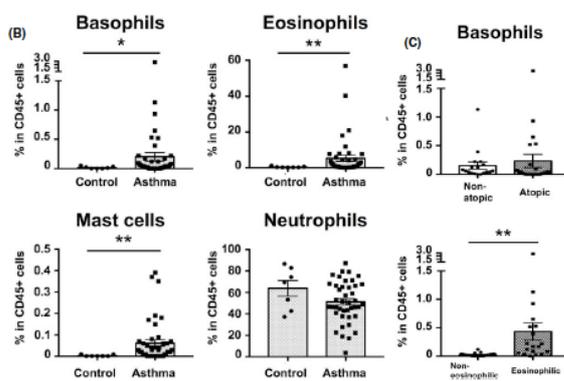


(図1) 喀痰中好酸球および好中球数、フローサイトメトリー法および検鏡法の比較²⁾

好酸球数、好中球数ともに測定結果に良好な相関が得られた（相関係数はそれぞれ $r=0.934, p<0.001$ 、 $r=0.717, p<0.001$ であった）（図1）。以上、本研究によりフローサイトメトリー法による誘発喀痰の分析法が確立された。

②誘発喀痰中の樹状細胞および好塩基球数の解析

名古屋大学医学部附属病院に、気管支喘息で通院中の患者のうち、吸入ステロイドで3ヶ月以上の治療歴があり、ステロイド内服や免疫抑制剤の内服がない安定期の患者のうち、研究に同意が得られた44例の誘発喀痰について解析を行った。また同時に、喫煙歴、呼吸器疾患歴がなく、研究に同意が得られた健常ボランティア7例の誘発喀痰について解析をし、比較検討を行った。気管支喘息患者においては、喀痰中炎症性樹状細胞、喀痰中好塩基球のいずれも増加していた。同時に、好酸球、マスト細胞の増加も観察された。喀痰中好中球については明らかな差異は認めなかった（図2）。喀痰中樹状細胞数は、サンプルによるばらつきが大きく、他の炎症細胞との関連や臨床所見との関連を検討することは難しいと考えられた。一方で、好塩基球については喀痰中好酸球数 $\geq 2\%$ の好酸球性喘息患者において、増加していたが、アトピー喘息あるいは非アトピー喘息患者において差異は認められなかった（図2）。以上の結果より、炎症性樹状細胞および好塩基球がともに、ヒト気管支喘息病態においても重要な意味を持つと判断をした。特に、好酸球性炎症における喀痰中好塩基球の増加については、炎症の発症や重症化との関連を示唆するものであった。一方で、炎症性樹状細胞のヒト気管支喘息に対する意義については、本研究では十分に検討できなかった。



（図2） 喀痰中炎症細胞²⁾

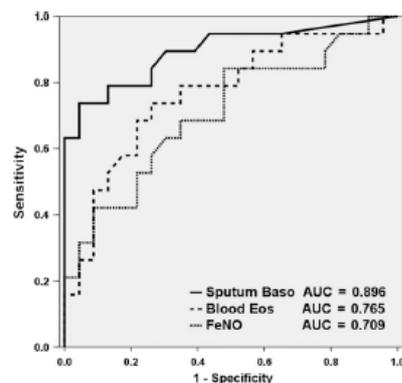
③喀痰中好塩基球のフェノタイプ同定

喀痰中好塩基球が好酸球炎症と関連している可能性が見出されたため、気道局所の好塩基球のフェノタイプについての同定を行った。これまでのマウス炎症モデルを使用した基礎的な検討では、炎症局所では、末梢と

異なる炎症性フェノタイプの細胞が出現することが示されていたからである。今回は、喀痰と末梢血を同一患者から同日に採取し、末梢血中好塩基球のフェノタイプと喀痰中好塩基球のフェノタイプを比較した。その結果、好塩基球の活性化マーカーである CD203c と CD63 の発現について末梢血と比較して、喀痰中好塩基球で発現の上昇が確認され、好塩基球が気道局所で活性化していることが示された。細胞表面マーカーの検討では、ST2 (IL-33R) 発現が喀痰中好塩基球で上昇する一方で、FcεRI、CD123 (IL-3R)、CD172a (SIRPα)、CD11b 発現の低下が確認された。TSLPR については明らかな傾向を認めなかった。以上の結果は、気道局所の好塩基球は末梢血中好塩基球とは異なったフェノタイプであることを示しているが、これらの結果が細胞の活性化によるのか、気道中には異なったフェノタイプが存在しているのか、という点についてはさらなる研究が必要である。

④喀痰中好塩基球の臨床的意義

喀痰中好塩基球数増加の臨床的意義を検討するために、各種臨床パラメーター（年齢、BMI、ACT（喘息コントロールテスト）score、FeNO（呼気一酸化窒素濃度）、肺機能、血清中総 IgE 値、血液中好酸球・好中球・好塩基球数）および喀痰中炎症細胞（喀痰中好酸球・好中球・マスト細胞数）と好塩基球数との関連を調べた。喀痰中好塩基球数は、FeNO ($r=0.449, p<0.05$)、血中好酸球数 (%) ($r=0.489, p<0.05$)、喀痰中マスト細胞数 ($r=0.631, p<0.001$)、喀痰中好酸球数 ($r=0.765, P<0.001$) とは正の相関、喀痰中好中球数 ($r=-0.386, p<0.05$) とは負の相関を示した。以上の結果をふまえ、喀痰中好酸球 $\geq 2\%$ を示す好酸球性炎症に対する喀痰中好塩基球数、血中好酸球数、FeNO のバイオマーカーとしての可能性を調べるために、ROCカーブを作成した（図3）。その結果、喀痰中好塩基球数の AUC は 0.896 であり血中好酸球数の 0.765 および FeNO の 0.709 と比較しても良好な結果であった。



（図3） 喀痰中好酸球 $\geq 2\%$ に対する喀痰中好塩基球、血中好酸球、FeNO の ROC カーブ²⁾

以前より、血中好酸球数や FeNO が喀痰中好酸球数を予測するバイオマーカーとして有用であるという報告^{3,4)}がなされており、本結果はそれと矛盾する結果ではなかったが、喀痰中好塩基球と好酸球がさらに強い関連を持つことが示された。加えて、喀痰中好塩基球数は単に感度・特異度が高いのみならず、陰性的中率、陽性的中率についても優れた結果を示し、好酸球性気道炎症のバイオマーカーとしても有用であることが明らかとなった。

以上、本研究において成人気管支喘息患者における気道局所の好塩基球の増加および活性化が示され、同時に好酸球性炎症との強い相関が確認された。また、これまでアトピー性喘息におけるエフェクター細胞と考えられていた、すなわちアトピー性喘息との関連が示唆されていた好塩基球が、IgE 値やアトピーとは関係なく、好酸球性炎症と直接関連している可能性が示された。一方で、炎症性樹状細胞のヒト気管支喘息における意義については、今回十分な検討はできなかった。

ヒト喘息病態における好塩基球の意義や重要性については、日常臨床検体を使用したリアルワールドのデータを示すことができ、本研究の結果はヨーロッパアレルギー学会誌へ投稿し、掲載された²⁾。また、同雑誌の Editorial においても取り上げられ、JM Must Read Articles にも選ばれたことから、一定のインパクトがあったものとする。今後、さらに、局所における好塩基球の役割や、好塩基球制御による気道炎症制御の可能性など検討が必要である。

引用文献

- 1) Wakahara K, Baba N, Van VQ, et al. Human basophils interact with memory T cells to augment Th17 responses. *Blood*. 2012;120:4761-4771.
- 2) Suzuki Y, Wakahara K, Nishio T, Ito S, Hasegawa Y. Airway basophils are increased and activated in eosinophilic asthma. *Allergy*. 2017; 72(10):1532-1539.
- 3) Westerhof GA, Korevaar DA, Amelink M, et al. Biomarkers to identify sputum eosinophilia in different adult asthma phenotypes. *Eur Respir J*. 2015; 46:688-696
- 4) Wagener AH, de Nijs SB, Lutter R, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophilis in asthma. *Thorax*. 2015; 70: 115-120.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Suzuki Y, Wakahara K, Nishio T, Ito S, Hasegawa Y. Airway basophils are increased and activated in eosinophilic asthma. *Allergy*. (査読有), 72(10), 2017, 1532-1539. DOI: 10.1111/all.13197.

[学会発表] (計 2 件)

① Wakahara K, Suzuki Y, Nishio T, Majima S, Hasegawa Y. Flow cytometric analysis of induced sputum to evaluate eosinophilic inflammation. アジア太平洋呼吸器学会、2017. 11. 24、シドニー (オーストラリア)

② Suzuki Y, Wakahara K, Nishio T, Ito S, Hasegawa Y. Airway basophils are activated and associated with eosinophilic inflammation in asthmatic patients. アメリカアレルギー学会、2016. 3. 5、ロサンゼルス (アメリカ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若原 恵子 (WAKAHARA, Keiko)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00631433

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

鈴木 嘉洋 (SUZUKI, Yoshihiro)
西尾 朋子 (NISHIO, Tomoko)