

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08173

研究課題名(和文)好塩基球の慢性気道炎症難治化因子およびバイオマーカーとしての可能性

研究課題名(英文) Basophils as potential refractory factors and biomarkers for chronic airway inflammation

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：好塩基球は、血液中1%未満の稀少細胞であるが、強力なサイトカイン・ケミカルメディエーター産生能を持つポテンシャルの高い細胞である。本研究では、慢性難治性気道炎症性疾患における好塩基球の難治化因子、バイオマーカーとしての可能性について検討を行った。気管支喘息では、喀痰中好塩基球数と喀痰中好酸球数に正の相関を認め、好酸球性炎症フェノタイプ(好酸球2%以上、好中球60%未満)で好塩基球が増加していた。また、副鼻腔炎のうち篩骨洞炎症との関連がみられた。COPDや関節リウマチの気道病変においても好塩基球性炎症がみられたが、呼気一酸化窒素濃度やIgE値との関連はなく、喘息とは異なった機序が想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、気管支喘息、COPD、関節リウマチの気道・肺病変に対する気道中好塩基球数に関して調査し、気道病変において好塩基球が増加する病態があることを明らかにした。また好塩基球性炎症フェノタイプは、喘息における好酸球性炎症フェノタイプや好酸球性副鼻腔炎に特徴的な篩骨洞の炎症と関連することを確認した。COPDや関節リウマチの気道病変でも好塩基球性炎症はみられ、その意義を検討していくことは疾患のフェノタイプ分類や治療・管理法の創出につながるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Basophils are rare cells, accounting for less than 1% of the blood, but they have high potential for producing potent cytokines and chemical mediators. In this study, we investigated the potential of basophils as refractory factors and biomarkers in chronic refractory airway inflammatory diseases.

In bronchial asthma, there was a positive correlation between the number of sputum basophils and the number of sputum eosinophils, and basophils were increased in eosinophilic inflammatory phenotypes (more than 2% eosinophils and less than 60% neutrophils). Basophilic inflammation was also found in COPD and airway diseases in rheumatoid arthritis, but it was not associated with exhaled nitric oxide concentration or IgE level, suggesting a different mechanism from that of asthma.

研究分野：アレルギー、膠原病、呼吸器

キーワード：好塩基球 気管支喘息 慢性副鼻腔炎 COPD 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

好塩基球は血液中1%未満の稀少細胞であるが、その強力なサイトカイン・ケミカルメディエーター産生能に加え、自然免疫細胞としての働きや、自己免疫性疾患などの慢性炎症における役割も明らかとなり始め、近年注目が集まっている。我々は、肺組織、喀痰中のフローサイトメトリーによる好塩基球の分離法を確立し、これまでに重症喘息の主要なフェノタイプである好酸球性喘息の気道において好塩基球が増加し、活性化されていることを示し報告してきた<sup>1)</sup>。

2. 研究の目的

本研究においては、慢性気道炎症性疾患のうち好塩基球が増加する病態・疾患を明らかにすること、喘息を始めとした慢性気道炎症性疾患について、好塩基球が疾患あるいは特定のフェノタイプのバイオマーカーになりうるのか検討すること、気道局所における好塩基球のフェノタイプを明らかにし、病原性好塩基球としての役割を探索すること、治療ターゲットとしての好塩基球の可能性を探索すること、の4点を目的とする。最終的には、慢性難治性気道炎症における好塩基球の役割とバイオマーカーおよび治療ターゲットとしての好塩基球の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 慢性気道炎症性疾患として、気管支喘息、慢性副鼻腔炎合併気道炎症性疾患、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、関節リウマチ関連気道病変および肺疾患について検討を行った。気道中好塩基球は、5%食塩水吸入により喀痰を誘発する誘発喀痰法により得られた喀痰を、0.05% dithiothreitol により処理し細胞を分離しフローサイトメトリー法により分離した<sup>1)</sup>。好酸球、好中球およびリンパ球は、Diff Quick staining で染色し、検鏡により判定した。抹消血液中の好塩基球数については、病院検査室で測定した値を使用した。画像評価として、胸部CTは16列あるいは64列のマルチディテクターCTスキャナー(Aquilion; Toshiba Medical, Tokyo, Japan)で撮影し、3Dワークステーション (Synapse Vincent version 4.3; Fujifilm Medical Systems, Tokyo, Japan) を使用して、気道壁厚を評価した。副鼻腔炎については副鼻腔CT画像からLund-Mackay score (LMS) を使用して評価し、LMS5点以上を副鼻腔炎と定義した。そのほか、臨床情報は診療録より収集した。

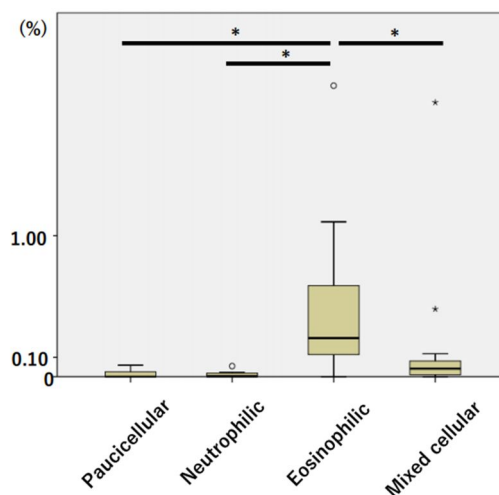
(2) 臍帯血よりCD34陽性細胞をマグネットビーズにて抽出し、IL-3存在下3週間培養し好塩基球を作成した。同時に、TSLP、IL-33を加え、好塩基球数、フェノタイプの相違について検討した。

4. 研究成果

(1) 慢性気道炎症性疾患における好塩基球

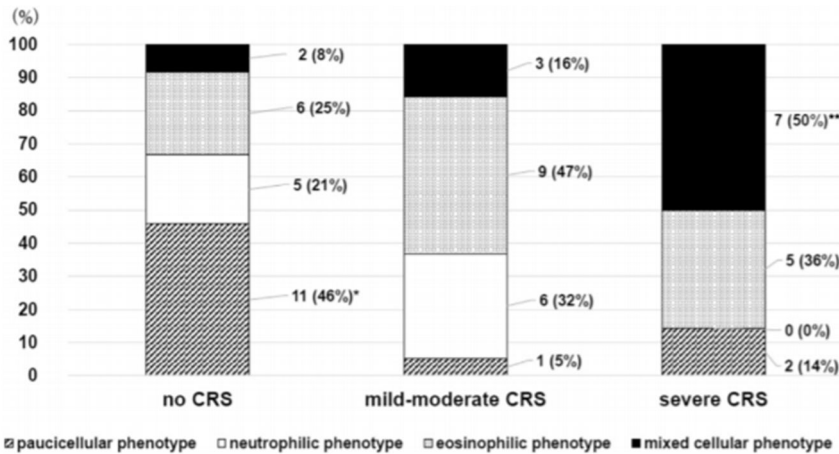
気管支喘息と好塩基球

名古屋大学医学部附属病院呼吸器内科通院中の68例の気管支喘息患者について、誘発喀痰を施行し、好塩基球数および下気道炎症フェノタイプを調べ、副鼻腔CTによる副鼻腔炎との関連を検討した(一部の症例は、科研費課題番号15K09549で報告したものと重複する)。平均年齢は60.8歳、女性66.2%、アトピー型63.1%であった。喀痰中好塩基球数は喀痰中好酸球数と相関を認めた。また喀痰中好酸球2%、喀痰中好中球60%を基準に下気道炎症フェノタイプを分類した場合、喀痰中好塩基球数は好酸球性炎症(好酸球2%以上、好中球60%未満)で有意に増加していることが明らかとなった(図1)。副鼻腔炎重症度をLMSにて評価し、下気道炎症フェノタイプの関連を検討すると重症副鼻腔炎(LMS12点以上)では、混合性炎症(好酸球2%以上、好中球60%以上)の頻度が多くなり<sup>2)</sup>(図2)喀痰中好塩基球数とは関連を認めなかった( $r=0.175$ ,  $p=0.193$ )が、喀痰中好塩基球数とLMSの篩骨洞スコアの相関が認められた( $r=0.310$ ,  $p=0.019$ )。以上の結果、好塩基球性炎症と好酸球性炎症の強い関連が明らかとなった。



\* $P < .05$  as determined by Kruskal-Wallis test followed by Steel-Dwass test (vs Eosinophilic).

(図1) 喀痰中好塩基球数と下気道フェノタイプ



(図2) 副鼻腔炎重症度と下気道炎症フェノタイプ<sup>2)</sup>

副鼻腔炎重症度はLMSにより0-4点を副鼻腔炎なし(no CRS)、5-11点を軽度から中等度副鼻腔炎(mild-moderate CRS)、12-24点を重症副鼻腔炎(severe CRS)とした。

#### 慢性副鼻腔炎合併気道炎症性疾患と好塩基球

名古屋大学医学部附属病院にて、2011年より2016年に副鼻腔CTおよび胸部CTを撮影した患者群を診療録より連続的に抽出し、副鼻腔CTによる副鼻腔炎と胸部CTによる気道壁肥厚について検討した。312例を抽出し、肺病変があり気道壁の評価が難しい症例、HRCT非撮影症例等を除外し、172例につき解析を行った。LMS5点以上を副鼻腔炎ありとし、右B1、B10の気道壁について評価した。副鼻腔炎群では、B1およびB10において第4分岐、第5分岐で気道壁の肥厚を認め、慢性副鼻腔炎における気道リモデリングが示された。これは診断されている下気道病変の有無とは関係がなかった。気道壁肥厚は、副鼻腔炎重症度、末梢血中好酸球数と正の相関、1秒率と負の相関を認めた<sup>3)</sup>が、末梢血中好塩基球数とは相関は認めなかった。本検討はレトロスペクティブな検討であり、喀痰中炎症性細胞の評価は行っていない。

#### 慢性閉塞性肺疾患(COPD)と好塩基球

名古屋大学医学部附属病院および関連施設より、呼吸器専門医が喘息の合併がないと判断するCOPD症例93例について炎症細胞および胸部CT画像所見の観点から検討を行った。そのうち喀痰解析を37例で行い、喀痰中好塩基球の平均は0.19%であった。本検討では、喀痰中好塩基球数と好酸球数には相関は認められなかった。末梢血好酸球数300以上のeosinophilic COPDにおいても、non-eosinophilic COPDとの比較で、末梢血および喀痰中好塩基球数に差異は認めなかった(それぞれ $p=0.215$ ,  $p=0.545$ )。一方で、血液中好酸球数は、血液中好塩基球数と弱い正の相関( $r=0.237$ ,  $p=0.023$ )、喀痰中好酸球数および好塩基球数と正の相関を認めた(それぞれ $r=0.480$ ,  $p=0.002$ ,  $r=0.467$ ,  $p=0.004$ )。胸部CTでCOPDを形態学的フェノタイプで分類した場合、気道壁が薄いグループにおいて血液中好酸球数と血液中好塩基球数および喀痰中好酸球数は正の相関を示し(それぞれ $r=0.464$ ,  $p=0.003$ ,  $r=0.619$ ,  $p=0.018$ )、喀痰中好塩基球数とは相関を示さなかった( $r=0.179$ ,  $p=0.558$ )。一方、気道壁が厚いグループでは血液中好酸球数と血液中好塩基球数および喀痰中好酸球数は相関を示さなかったが(それぞれ $r=0.060$ ,  $p=0.765$ ,  $r=0.332$ ,  $p=0.319$ )、喀痰中好塩基球数とは正の相関を示した( $r=0.825$ ,  $p=0.002$ )。COPDのフェノタイプは複雑で様々な病態が混在していること、喀痰解析症例が少ないことから解釈が難しくさらなる検討が必要であるが、COPDの中にも気道中好塩基球が増加するフェノタイプが存在することが明らかとなった。今後、さらなる検討を続ける予定である。

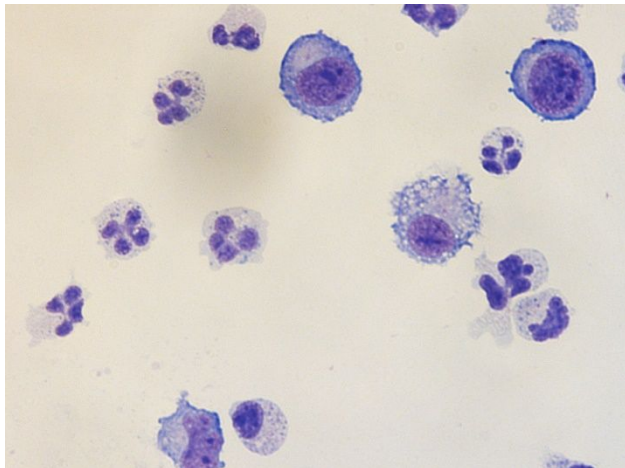
#### 関節リウマチ気道病変および肺病変と好塩基球

名古屋大学医学部附属病院呼吸器内科通院中の関節リウマチ患者さんのうち同意を得られた16例について喀痰中好塩基球の解析を行った。平均年齢は69.5歳、女性81.3%、平均罹病期間は12.9年であった。胸部CTによる炎症パターンは、正常/間質性肺炎/気道病変(気管支拡張あるいは粒状影)/混合性がそれぞれ1/6/8/1例であった。喀痰中好塩基球数は、喀痰中好中球、マクロファージ数とは相関を示さなかったが、リンパ球数、好酸球数とは相関を示した(それぞれ $r=0.609$ ,  $p=0.027$ ,  $r=0.806$ ,  $p=0.001$ )。臨床的には、胸部CTにおける気管支拡張葉数、粒状影様葉数と正の相関(それぞれ $r=0.636$ ,  $p=0.015$ ,  $r=0.595$ ,  $p=0.025$ )を示し、CRPや血沈と正の相関(それぞれ $r=0.594$ ,  $p=0.020$ ,  $r=0.663$ ,  $p=0.010$ )を示した。また、SP-Dとは負の相関傾向( $r=-0.472$ ,  $p=0.088$ )で、呼気一酸化窒素濃度やIgEとは相関を認めなかった。結論を出すには症例数が少ないが、関節リウマチにおいては気道病変において好塩基球数が増加して

いることが明らかになったが、2型炎症のマーカーである呼気一酸化窒素濃度やIgEとの相関が認められないことから、気管支喘息とは異なる病態が想定された。今後特に関節リウマチの重症度との関連性などさらなる検討をすすめる予定である。

#### (2) 臍帯血 CD34 陽性細胞由来好塩基球の作成とフェノタイプ

臍帯血より磁器ビーズを使用し CD34 陽性細胞を抽出し、各種サイトカインを加え好塩基球の培養を試みた。IL-3 存在下に 21 日間の培養を行うと好塩基性の顆粒を持つ分葉した小型の細胞が作成された(図3)。マウスとは異なり IL-3 非存在下 TSLP 存在下で細胞はほぼ増殖せず、ヒトにおいては好塩基球の分化に IL-3 が必須であると考えられた。



(図3) 培養好塩基球

現在、気道上皮由来サイトカインや炎症性サイトカインを加えフェノタイプやサイトカイン産生能を検討中で、今後も検討を続ける予定である。

#### 引用文献

- 1) 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.
- 2) Nishio T, Wakahara K, Suzuki Y, Nishio N, Majim S, Nakamura S, Teranishi M, Nakatochi M, Sone M, Hasegawa Y. Mixed cell type in airway inflammation is the dominant phenotype in asthma patients with severe chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019; 68(4): 515-520.
- 3) Majima S, Wakahara K, Nishio T, Nishio N, Teranishi M, Iwano S, Hirakawa A, Hashimoto N, Sone M, Hasegawa Y. Bronchial wall thickening is associated with severity of chronic rhinosinusitis. *Respir Med*. 2020; 170: 10624.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishio T, Wakahara K, Suzuki Y, Nishio N, Majima S, Nakamura S, Teranishi M, Nakatochi M, Sone M, Hasegawa Y	4. 巻 68 (4)
2. 論文標題 Mixed cell type in airway inflammation is the dominant phenotype in asthma patients with severe chronic rhinosinusitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergolo Int	6. 最初と最後の頁 515-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 若原恵子	4. 巻 25
2. 論文標題 重症喘息と気道炎症 好酸球性炎症を中心として	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本職業・環境アレルギー学会雑誌	6. 最初と最後の頁 37-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Isobe Y, Ito S, Matsuda T, Iwano S, Uchida A, Takahashi N, Kojima T, Wakahara K, Yamaguchi E, Hasegawa Y	4. 巻 261
2. 論文標題 Longitudinal changes in pulmonary function and respiratory impedance of rheumatoid arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respir Physiol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rep.2018.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Majima S, Wakahara K, Nishio T, Nishio N, Teranishi M, Iwano S, Hirakawa A, Hashimoto N, Sone M, Hasegawa Y.	4. 巻 170
2. 論文標題 Bronchial wall thickening is associated with severity of chronic rhinosinusitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respir Med	6. 最初と最後の頁 106024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2020.106024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Majima S, Wakahara K, Nishio T, Nakamura S, Sashio T, Asano S, Hasegawa Y
2. 発表標題 Relationship of physical activity level with musculoskeletal conditions and inflammation in COPD patients without comorbidities
3. 学会等名 American Thoracic Society international conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura S, Wakahara K, Majima S, Nishio T, Suzuki Y, Shiraki A, Abe T, Shindoh J, Sashio T, Ono J, Izuhara K, Hasegawa Y
2. 発表標題 Periostin levels in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)
3. 学会等名 European Respiratory Society Annual Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wakahara K, Nishio T, Suzuki Y, Majima S, Nakamura S, Hasegawa Y
2. 発表標題 Increasing sputum basophils is a marker for eosinophil-dominant airway inflammation in adult asthma
3. 学会等名 European Respiratory Society Annual Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若原恵子
2. 発表標題 気道炎症に対する細胞生物学的アプローチ 好塩基球
3. 学会等名 World Congress of Asthma (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishio T, Wakahara K, Suzuki Y, Majima S, Nishio N, Teranishi M, Sone M, Hasegawa Y
2. 発表標題 Mixed cellular inflammation is increased in adult asthma with severe chronic rhinosinusitis
3. 学会等名 American Academy of Allergy Asthma & Immunology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村さや、若原恵子、馬嶋俊、横井英人、橋本直純、長谷川好規
2. 発表標題 COPDの気道壁の解析
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬嶋俊、若原恵子、西尾朋子、中村さや、池田由香里、蛭名潤哉、原一洋、渡辺宏久、祖父江元、長谷川好規
2. 発表標題 COPDにおける脳容積と身体活動量に関する研究
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若原恵子
2. 発表標題 リウマチ診療の連携－呼吸器内科医の視点から
3. 学会等名 第34回日本臨牀リウマチ学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村さや、若原恵子、馬嶋俊、白木晶、安部崇、進藤丈、指尾豊和、木村智樹、小野純也、出原賢治、長谷川好規
2. 発表標題 COPDにおける血清ペリオスチンの意義
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬嶋俊、若原恵子、西尾朋子、中村さや、指尾豊和、浅野周一、長谷川好規、
2. 発表標題 慢性呼吸不全のないCOPD患者におけるMild cognitive impairment (MCI) 合併と関連因子
3. 学会等名 第29回日本呼吸器ケア・リハビリテーション学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若原恵子、西尾朋子、鈴木嘉洋、西尾直樹、馬嶋俊、寺西正明、中板昌宏、曾根三千彦、長谷川好規
2. 発表標題 重症慢性副鼻腔炎合併気管支喘息患者では混合性炎症が多い
3. 学会等名 第28回国際喘息学会日本・北アジア部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西尾 朋子  (Nishio Tomoko)		



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	馬嶋 俊  (Majima Suguru)		
研究協力者	中村 さや  (Nakamura Saya)		
研究協力者	横井 英人  (Yokoi Eito)		
研究協力者	福谷 衣里子  (Fukutani Eriko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関