

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18749

研究課題名（和文）活性化組織好酸球に発現するCD69の機能的役割の解明

研究課題名（英文）Functional role of CD69 expressed on activated eosinophils

研究代表者

尹 泰貴（YUN, Yasutaka）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60620755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：好酸球性副鼻腔炎（Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis：ECRS）は、鼻内に炎症組織として好酸球が高度に浸潤する鼻茸を有し、高頻度に喘息を合併する難治性疾患である。今課題の研究成果として、ECRS鼻茸組織中で炎症のKey playerである好酸球が血球系活性化マーカーであるCD69を高発現し、ECRSの鼻症状や呼吸器症状の重症度とCD69の発現量が相関することを見出した。さらに好酸球に発現するCD69を直接刺激することにより、炎症を惹起する組織障害性タンパクであるEosinophilic peroxidase（EPX）が放出されることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ECRSは難治性の好酸球性炎症性疾患で指定難病となっており、その疾患メカニズムや治療法の解明は現在の最重要課題である。本研究の結果より、血球系の活性化のマーカーとして用いられているCD69は好酸球の活性化の指標として有用であり、症状の重症度に強く関連していることがわかった。さらに、活性化のマーカーとしてのみならず、EPXを放出し炎症を惹起させるという機能的役割を解明したことで、CD69を制御し活性化を抑制するというECRSへの新たな治療薬への開発の足がかりとなった。

研究成果の概要（英文）：Eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) is an eosinophilic inflammatory disease with a high infiltration of eosinophils in the nasal polyps, and is highly associated with asthma. In this study, we found that eosinophils highly express CD69 and that the severity of nasal and respiratory symptoms of ECRS is correlated with the expression level of CD69. Furthermore, we found that direct stimulation of CD69 expressed on eosinophils releases Eosinophilic peroxidase (EPX).

研究分野：好酸球

キーワード：好酸球 好酸球性副鼻腔炎 CD69

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎(Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis: ECRS)は、高頻度に喘息を合併し、好酸球が高度に浸潤する鼻茸を有する難病指定疾患である。活性化した好酸球が組織にて炎症を惹起・遷延することで、上気道においては鼻茸組織の増大や、下気道においては気管支粘膜の肥厚や炎症を引き起こすと考えられている。好酸球は、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患において炎症局所に集積・活性化し、組織傷害性タンパクを放出したり、種々のサイトカインやケモカインを産生したりすることで、その病態形成に重要な役割を果たしている。好酸球性副鼻腔炎では、局所に浸潤した活性化好酸球が、好酸球以外の血球系細胞や気道上皮細胞、線維芽細胞などとともに鼻茸形成などの病態形成に深く関与していると考えられている。しかし、この活性化好酸球の制御方法は未だ不明であり、ECRS に治療法の開発は最重要課題である。

CD69分子は、c-type lectin familyに属する2型の膜分子であり、好酸球を含めた活性化した血球系細胞に発現することが知られている。Hayashizakiらは、T細胞のCD69シグナルは、T細胞の炎症組織への浸潤ならびに維持に重要な役割を果たすことを明らかにしている。また、CD69ノックアウトマウスを用いた実験では、肺胞洗浄液中の好酸球数の低下が認められ、アレルギー性喘息の発症が抑制されたとした報告がある(Hasegawa A, et al. 2010 Jpn.J.Clin.Immunol;33(4):189-195)。しかし、好酸球に発現するCD69分子の詳細なシグナル伝達やその機能的役割については、まったく解明されていない。

2. 研究の目的

我々は血球系の活性化マーカーであるCD69に着目し、活性化好酸球においてどの程度発現しているのか、またそれ自身に何かしらの機能的役割がないのかどうかを解明することを目的とした。この機能を解明することにより、CD69を通じた活性化好酸球の制御というECRSへの新たな治療法開発のマイルストーンとなる研究となることを目的とした。

3. 研究の方法

CD69が実際にECRS患者の好酸球に発現しているのかどうかを、同一患者での末梢血および組織を用いて解析した。今まで、患者組織から高純度で好酸球を単離する方法は報告がなかったため、我々は独自に好酸球単離方法を開発した。実際にはECRS患者からの鼻茸組織を、酵素を用いて細胞分離をおこなったのち、比重分離法を用いて好酸球分画を分離した(図1)。その後、各種の蛍光抗体にて染色し、Flow cytometerをもちいて好酸球をGatingし、cell sorterにて細胞単離をおこなった。この方法によって高純度に好酸球をECRS鼻茸組織から単離することが可能となり、末梢血好酸球とともにCD69の発現をFlow cytometerをもちいて平均蛍光強度(MFI)を測定した。また、qPCR法を用いてCD69mRNAの発現を比較した。

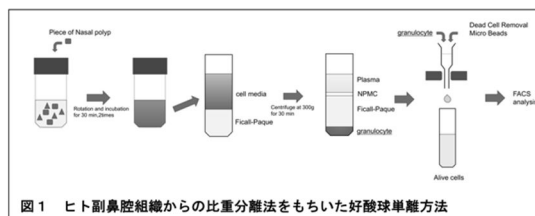


図1 ヒト副鼻腔組織からの比重分離法をもちいた好酸球単離方法

次に、好酸球に発現するCD69の機能的役割を解明するため、マウスを用いたCD69刺激実験をおこなった。好酸球のCD69に特異的なLigandは同定されていないため、抗CD69抗体をもちいた架橋刺激(クロスリンク法)をおこなった。また、ヒト末梢血好酸球はCD69を常時には発現しておらず、対してヒト組織中好酸球は非常に不安定のため、マウスを用いての実験で解析をおこなった。好酸球増多マウスであるIL-5 transgenic(IL-5 Tg)マウスの脾臓組織中では、一定数の好酸球がCD69を発現している。遺刺激の評価として、好酸球特異的組織障害性タンパク質の一つであるEosinophilic Peroxidase(EPX)の放出を測定した。

4. 研究成果

1. 組織に移行した好酸球はCD69を発現し活性化している。

ECRSの鼻茸組織に浸潤した好酸球は、同一患者の末梢血好酸球と比較してCD69 mRNAを高発現し、さらにはFlow cytometerによるCD69の蛍光強度であるMFI発現も増強している結果であった(図2)。

2. 活性化好酸球のCD69発現量は疾患の重症度と相関する。

ECRSの上気道炎症の重症度の評価として、鼻茸組織の大きさを数値化するNasal Polyp Score、および副鼻腔CT画像を用いて炎症の程度を評価するLoud-Mackey CT scaleを用いた。下気道炎症の重症度の評価としては、呼吸機能検査を

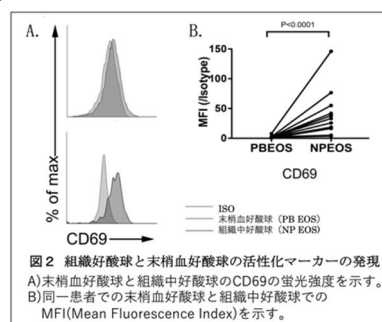


図2 組織好酸球と末梢血好酸球の活性化マーカーの発現
A)末梢血好酸球と組織中好酸球のCD69の蛍光強度を示す。
B)同一患者での末梢血好酸球と組織中好酸球でのMFI(Mean Fluorescence Index)を示す。

用い一秒率および末梢気道抵抗値を解析に用いた。結果、組織中好酸球の発現する CD69 の MFI 発現量(末梢血好酸球に発現する値との比)に比例して、上下気道ともに重症度が悪化しているという結果が得られた。さらに、組織中に浸潤する好酸球数も CD69 の MFI 発現量と正の相関が得られ、活性化が増強すればするほど組織への浸潤数が上昇するとの結果であった(図3)。

3 . CD69 の刺激により好酸球は EPX を放出する。

脾臓組織中好酸球を抗 CD69 抗体にて架橋刺激したところ、抗体濃度依存性に好酸球特異的組織傷害性タンパク質の一種である EPX を放出する結果が得られた(図4)。

本研究結果から、ECRS 鼻茸組織に浸潤した好酸球は、同一患者の末梢血と比較して CD69 を強度に発現し、高度に活性化しているということを解明した。さらに、その発現量が ECRS の上下気道症状と相関し、重症度と関連することより、組織中好酸球の CD69 の発現量は ECRS の重症度バイオマーカーとなることが示された。

さらに、CD69 がバイオマーカーとしてだけでなく、マウス組織中好酸球に発現する CD69 を架橋刺激すると、EPX を放出するという機能的役割を解明できた。この EPX は好酸球より放出されると、そのタンパク質の性質として組織傷害を引き起こす好酸球に特異的なタンパク質である。これらのことは、組織中で好酸球が活性化することにより CD69 の発現が増強し、CD69 に特異的な Ligand 刺激により EPX を放出し、炎症を惹起、遷延させるということを示している。これらのことより、CD69 は血球の活性化マーカーとしてとしてだけでなく、気道炎症の制御や増悪において重要な役割を担っていることが示唆された。そのため CD69 は、好酸球性気道炎症において新たな治療ターゲットとなりうると考えられる。

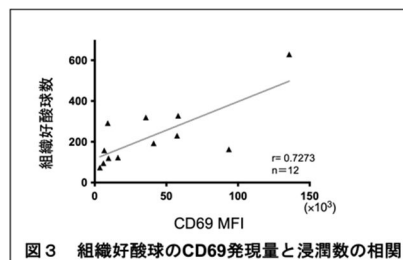


図3 組織好酸球のCD69発現量と浸潤数の相関

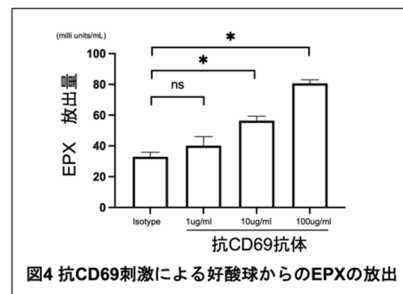


図4 抗CD69刺激による好酸球からのEPXの放出

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 4件）

1. 著者名 Kanda Akira, Yun Yasutaka, Bui Dan Van, Nguyen Linh Manh, Kobayashi Yoshiki, Suzuki Kensuke, Mitani Akitoshi, Sawada Shunsuke, Hamada Satoko, Asako Mikiya, Iwai Hiroshi	4. 巻 70
2. 論文標題 The multiple functions and subpopulations of eosinophils in tissues under steady-state and pathological conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 9~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2020.11.001	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 Kanda Akira, Yasutaka Yun, Van Bui Dan, Suzuki Kensuke, Sawada Shunsuke, Kobayashi Yoshiki, Asako Mikiya, Iwai Hiroshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Multiple Biological Aspects of Eosinophils in Host Defense, Eosinophil-Associated Diseases, Immunoregulation, and Homeostasis: Is Their Role Beneficial, Detrimental, Regulator, or Bystander?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 20~30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00892	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 Yun Yasutaka	4. 巻 69
2. 論文標題 Increased CD69 Expression on Activated Eosinophils in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis Correlates With Clinical Findings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergology international	6. 最初と最後の頁 232-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.11.002	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 Yun Yasutaka, Kanda Akira, Kobayashi Yoshiki, Bui Van Dan, Suzuki Kensuke, Mitani Akitoshi, Asako Mikiya, Iwai Hiroshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Role of activated eosinophils on Eosinophilic chronic rhinosinusitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Kansai Medical University	6. 最初と最後の頁 17~21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5361/jkmu.72.17	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尹 泰貴
2. 発表標題 活性化好酸球におけるCD69分子の機能的役割の解明
3. 学会等名 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尹 泰貴
2. 発表標題 活性化好酸球におけるCD69分子の機能的役割の解明
3. 学会等名 日本アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尹 泰貴
2. 発表標題 組織好酸球の活性化マーカー
3. 学会等名 日本鼻科学会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------