

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08218

研究課題名（和文）重症好酸球性気管支ぜん息に対する個別化医療を目指した好酸球サブセットの基盤研究

研究課題名（英文）Basic research on eosinophil subsets to aim a precision medicine for severe eosinophilic asthma

研究代表者

川山 智隆（Kawayama, Tomotaka）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：80289389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：好酸球表面抗原の表現型によるサブセットの気管支ぜん息（以下ぜん息）群とコントロール群の比較では、誘発喀痰ではぜん息群のCD62L陽性、CD69およびCD62L陽性、CD34陽性、CD69およびCD34陽性、およびCD62LおよびCD34陽性細胞割合がコントロール群に比較していずれも有意に低下していた。末梢血ではぜん息群がコントロール群に比較してCD62L陽性細胞割合が有意に低かった。誘発喀痰好酸球中CD69陽性細胞割合は1秒率と有意な負の相関を認め、CD62L陽性、CD62LおよびCD69陽性、あるいはCD69およびCD34陽性細胞割合はぜん息コントロール状態との有意な負の相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ぜん息患者の誘発喀痰中CD62L、CD69、あるいはCD34陽性好酸球サブセットはいずれも健常人と比較して低下していた。またその好酸球サブセットはぜん息のコントロールレベルを反映していると考えられた。本好酸球サブセットはぜん息診断あるいはぜん息コントロール状況を把握するためのバイオマーカーになりえる可能性があり、治療の有用性の効果判定に利用できる可能性が示唆された。単に好酸球の実数や割合だけではぜん息病態を把握できない可能性があり、好酸球サブセットの解析がぜん息病態解明やぜん息治療の新規開発に貢献すると思われる。

研究成果の概要（英文）：In a comparison of subsets based on the eosinophil surface antigens differences between asthma and control groups, the percentages of induced sputum CD62L-positive, CD69 and CD62L-positive, CD34-positive, CD69 and CD34-positive, and CD62L and CD34-positive cells in eosinophils in the asthma group were significantly lower than those in the control group. In peripheral blood, the percentage of CD62L-positive cells in eosinophils in the asthma group was significantly lower than that in the control group. The percentage of CD69-positive cells in induced sputum eosinophils was significantly negatively correlated with FEV1/FVC ratio, and the percentages of CD62L-positive, CD62L and CD69-positive, or CD69 and CD34-positive cells were significantly negatively correlated with asthma control test scores in patients with asthma.

研究分野：呼吸器内科学関連

キーワード：気管支ぜん息 好酸球 表面抗原

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支ぜん息 (以下、ぜん息) の実情

ぜん息は未だ治癒が望めない疾患のひとつで、罹患者は全人口の 8 から 10%とされている<sup>1)</sup>。厚生労働省の報告<sup>1)</sup>による日本におけるぜん息死総数は“ゼロ”には至っておらず、2017年以降死亡者数は下げ止まりの様相を呈している。多種多彩な治療薬の開発がなされているにもかかわらず、ぜん息患者の 5 から 10%が難治性とされる<sup>2)</sup>。新たな難治性ぜん息の治療法の実現は急務と言える。一方で好酸球性炎症の制御は、好酸球性難治性ぜん息のコントロールレベルの向上に貢献すると期待されていた<sup>3, 4)</sup>。しかし好酸球の完全排除を可能とした抗 IL-5 受容体  $\alpha$  抗体療法はぜん息増悪を完全コントロールできず、その増悪抑制効果は、好酸球数を減少させるが完全排除しない抗 IL-5 療法や、好酸球を増加させる抗 IL-4 受容体  $\alpha$  抗体療法と同等の結果に留まったのである<sup>3, 5)</sup>。

(2) 好酸球の新たなサブセットの考え方

研究開始当初、マウスの好酸球には、inflammatory 型と resident 型の好酸球のサブタイプの存在が証明された<sup>6, 7)</sup>。inflammatory 型の好酸球は分葉核を持ち CD62 ligand (CD62L)かつ CD101 両陽性でアレルギー炎症に関与するとされ、一方 resident 型の好酸球は円形の核を持ち CD62L および CD101 が弱陽性とされ、寄生虫感染の制御や生体機能の恒常性への関与で生命維持に不可欠な好酸球として注目されていた<sup>8, 9)</sup>。しかしマウスと違いヒトでは inflammatory 型と resident 型の好酸球のサブタイプの存在は推察されていたが、その証明されるに至っていなかった。

(3) 本研究課題の作業仮説

申請者は、ヒトの誘発喀痰および末梢血から CD62L 陽性、CD69 陽性あるいは CD34 陽性の好酸球サブタイプの分離・同定に成功し、ぜん息患者と健康人では誘発喀痰や末梢血でそれぞれのサブタイプの分布が異なることも見出した。申請者はおそらく好酸球表面抗原の違いがヒトにおける inflammatory 型と resident 型の好酸球のサブタイプの存在を明らかにできるのではないかと考えた。またそのヒト好酸球サブタイプのバランスや臓器での分布の違いがぜん息の発症や重症化に関与しているとの作業仮説を建てた。

2. 研究の目的

(1) 主要目的

研究の目的は、誘発喀痰、末梢血あるいは骨髄の臨床検体から得られた好酸球の CD62L 陽性、CD69 陽性あるいは CD34 陽性のサブタイプがぜん息の難治化や病態にどのような影響を及ぼすか、重症度の異なるぜん息患者および健康人との比較において証明することとした。

(2) 副次目的

in vitro の研究で、喀痰および末梢血あるいは骨髄から単離して得られた CD62L 陽性または CD69 陽性好酸球を用いて、脱顆粒、産生サイトカインあるいは細胞死の形態を比較検討することで、それぞれのサブタイプの特性を見出すこととした。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者

説明同意を得たぜん息患者 (ぜん息群) および非ぜん息健康人 (コントロール群) それぞれ 34 名および 15 名から医療情報の収集、肺機能検査 (電子スパイロメータ HI-801, Chest, Japan) データ、呼気ガス一酸化窒素濃度 (FENO, NIOX vero, Aerocrine AB, Sweden)、誘発喀痰

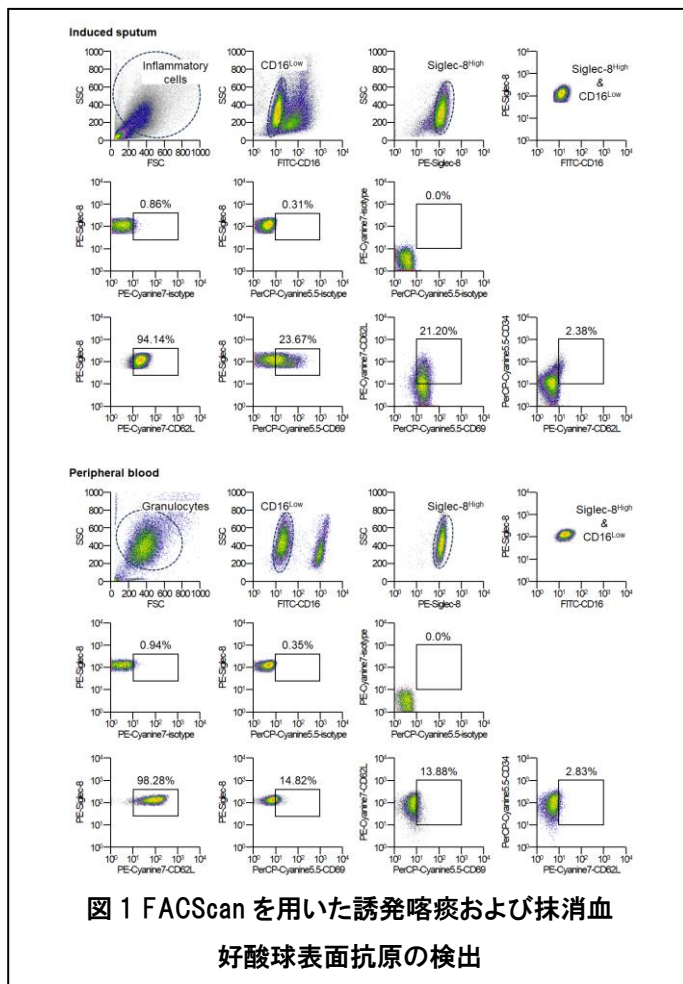


図 1 FACS を用いた誘発喀痰および末梢血好酸球表面抗原の検出

および血液を採取した。メタコリン吸入負荷試験は吸入前および生理食塩水吸入後にメタコリンは2倍希釈法の0.03、0.06、0.125、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、8.0および16.0mg/mLの濃度で吸入させ、吸入前の1秒量から20%低下させたメタコリン濃度をMCh-PC20として算出し、ぜん息群とコントロール群で比較した。ただし重症例あるいはパーセント1秒量対予測値<60%以外の研究対象者で実施した。ぜん息の診断および重症度はGlobal Initiative for Asthma<sup>10</sup>の基準に従い、ぜん息のコントロール状況は自己記入式asthma control test (ACT)の総合点数で判定した。

### (2) 好酸球表面抗原の検出方法

ぜん息群では臨床的安定期にぜん息吸入コントローラー薬を3日から14日間の休薬後に検体を採取した。採取すべき検体は誘発喀痰、末梢血および骨髓血であったが、コロナ禍で骨髓採取はできなかった。誘発喀痰と末梢血は同日採取した。誘発喀痰は5、6および7%高張食塩水をそれぞれ7分間吸入後に採取し、ジチオトレイトールで処理後に細胞成分を採取し、総細胞数とメイ・ギムザ染色サイトスピンスライドで細胞分画を確認した。末梢血ではEDTANa採血で全白血球数および細胞分画を算出し、ヘパリン採血では密度勾配溶液を用いて単核球と液性成分を除去後の赤血球と顆粒球成分にLysis bufferを用いて顆粒球のみを分離した。

誘発喀痰細胞成分と末梢血顆粒球成分は好酸球を認識するSiglec-8と好中球を認識するCD16を蛍光染色し、それぞれCD62L、CD69およびCD34を染色した後に、FACScanを用いて、Siglec-8高陽性およびCD16低陽性好酸球中CD62L陽性、CD69陽性、CD62LおよびCD69陽性、CD62LおよびCD34陽性あるいはCD69およびCD34陽性細胞率を算出した(図1)。

表1 研究対象者の背景とパラメーター

	Asthma n = 34	Control n = 15	P value
Women, n (%)	25 (73.5)	6 (40.0)	0.1
Age, yrs	58.0 ± 14.1	47.9 ± 11.0	0.0179
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	22.5 ± 4.1	22.0 ± 2.7	0.7
Disease severity, mild/moderate/severe, n	9/11/14	N/A	
Asthma control test, points	19.0 ± 5.4	N/A	
Comorbidity, n (%)			
Eosinophilic sinusitis	22 (64.7)	0 (0)	<0.0001
Neutrophilic sinusitis	2 (5.9)	1 (6.7)	0.9
Allergic rhinitis	1 (2.9)	4 (26.7)	0.0259
Eosinophilic otitis media	1 (2.9)	0 (0)	1.0
Lung function tests			
FVC, L	2.82 ± 0.83	4.13 ± 1.00	<0.0001
%FVC predicted, %	93.7 ± 15.9	107.8 ± 13.6	0.0045
FEV <sub>1</sub> , L	1.77 ± 0.72	3.26 ± 0.77	<0.0001
%FEV <sub>1</sub> predicted, %	72.9 ± 22.1	104.5 ± 15.3	<0.0001
FEV <sub>1</sub> /FVC ratio	0.62 ± 0.16	0.79 ± 0.07	0.0003
FENO, ppb	98.7 ± 67.2	22.1 ± 16.1	0.0002
serum total IgE levels, IU/mL	346.1 ± 419.1	139.2 ± 308.8	0.1
Sputum			
Total cells count, x10 <sup>6</sup> cells/mL	3.37 ± 5.39	1.93 ± 2.85	0.3
Eosinophils differentiation, %	41.2 ± 33.9	0.3 ± 0.5	<0.0001
Eosinophils count, x10 <sup>6</sup> cells/mL	9.77 ± 1.53	0.06 ± 0.09	0.0186
Blood			
White blood cells count, x10 <sup>6</sup> cells/mL	6.52 ± 1.92	5.53 ± 1.03	0.1
Eosinophils differentiation, %	12.7 ± 9.8	2.8 ± 1.9	0.0004
Eosinophils count, x10 <sup>3</sup> cells/mL	917.1 ± 1,078.8	160.1 ± 110.2	0.0097
MCh-PC <sub>20</sub> , mg/mL	0.52 ± 1.34	≥16.00	<0.0001

MCh-PC20はgeometric mean ± SEMで表記した。

略語の説明：%FEV1 predicted, percentage predicted value of FEV1; %FVC predicted, percentage predicted value of FVC; FENO, fractional exhaled nitric oxide; FEV1, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; MCh-PC20, provocative dose of methacholine causing a 20% fall in FEV1; N/A, not available; ppb, parts per billion; SEM, standard error of the mean.

### (3) 統計学的手法

ぜん息群とコントロール群の比較ではstudent T検定を用いた。ぜん息群において、重症度別解析はまずanalysis of variance (ANOVA)で比較した後に、それぞれの各2群間の重症度の比較で

は Tukey-Kramer 検定を用いた。さらに好酸球表面抗原と各ぜん息の臨床パラメーターとの相関に関しては Spearman rank 検定を用いて相関係数を算出した。危険度 (P) <0.05 の際には有意差ありと判定した。統計処理には Windows ソフト JMP pro 17 (JMP Statistical Discovery LLC, NC) を用いた。

表2 ぜん息とコントロール群における誘発喀痰と末梢血中好酸球サブセットの比較

% of eosinophils	Asthma n = 34	Control n = 15	P value
Induced sputum, %			
CD69 positive cells	76.5 ± 16.7	68.7 ± 20.3	0.2
CD62L positive cells	38.4 ± 19.9	71.1 ± 23.1	<0.0001
CD69 and CD62L positive cells	27.5 ± 15.3	55.5 ± 26.6	<0.0001
CD34 positive cells	9.2 ± 11.1	31.1 ± 21.7	<0.0001
CD69 and CD34 positive cells	22.5 ± 16.2	46.5 ± 26.9	0.0004
CD62L and CD34 positive cells	8.8 ± 11.0	35.8 ± 25.8	<0.0001
Peripheral blood, %			
CD69 positive cells	10.3 ± 6.1	8.7 ± 5.7	0.4
CD62L positive cells	96.7 ± 3.0	98.8 ± 0.2	0.0070
CD69 and CD62L positive cells	11.0 ± 6.8	10.3 ± 6.1	0.7
CD34 positive cells	2.8 ± 2.4	2.8 ± 2.1	0.9
CD69 and CD34 positive cells	2.9 ± 4.5	1.3 ± 1.9	0.2
CD62L and CD34 positive cells	4.1 ± 3.4	4.2 ± 2.6	0.9

#### 4. 研究成果

表3 好酸球サブセットとぜん息パラメーターとの相関

correlation coefficient, r (P value)	ACT, points	%FVC predicted, %	%FEV1 predicted, %	FEV1/FVC ratio	FENO, ppb	MCH-PC20 (log), mg/mL
	n = 34	n = 34	n = 34	n = 34	n = 18	n = 16
Induced sputum						
CD69 positive cells, %	0.00 (1.0)	0.22 (0.2)	-0.12 (0.5)	-0.37 (0.0308)	-0.35 (0.2)	-0.39 (0.1)
CD62L positive cells, %	-0.41 (0.0150)	-0.02 (0.9)	0.18 (0.3)	0.30 (0.1)	-0.32 (0.2)	-0.15 (0.6)
CD62L and CD69 positive cells, %	-0.45 (0.0071)	0.10 (0.6)	0.13 (0.5)	0.11 (0.5)	0.14 (0.6)	-0.31 (0.2)
CD34 positive cells, %	-0.35 (0.1)	-0.14 (0.4)	-0.02 (0.9)	0.14 (0.4)	0.21 (0.4)	-0.38 (0.2)
CD62L and CD34 positive cells, %	-0.35 (0.1)	-0.10 (0.6)	0.02 (0.9)	0.15 (0.4)	0.16 (0.5)	-0.35 (0.2)
CD69 and CD34 positive cells, %	-0.39 (0.0257)	0.09 (0.6)	0.17 (0.4)	0.18 (0.3)	0.12 (0.6)	-0.33 (0.3)
Peripheral blood						
CD69 positive cells, %	0.15 (0.4)	0.08 (0.7)	-0.03 (0.8)	-0.14 (0.4)	-0.46 (0.1)	-0.14 (0.6)
CD62L positive cells, %	-0.09 (0.6)	0.05 (0.8)	0.28 (0.1)	0.33 (9.1)	-0.44 (0.1)	0.25 (0.3)
CD62L and CD69 positive cells, %	0.14 (0.4)	0.20 (0.2)	0.04 (0.8)	-0.11 (0.5)	-0.47 (0.0482)	-0.18 (0.5)
CD34 positive cells, %	0.18 (0.3)	0.06 (0.7)	-0.15 (0.4)	-0.23 (0.2)	-0.31 (0.2)	-0.28 (0.3)
CD62L and CD34 positive cells, %	0.16 (0.4)	0.27 (0.1)	-0.04 (0.8)	-0.22 (0.2)	-0.30 (0.2)	-0.34 (0.2)
CD69 and CD34 positive cells, %	0.20 (0.3)	-0.03 (0.9)	-0.13 (0.5)	-0.17 (0.4)	-0.48 (0.0456)	-0.06 (0.8)

#### (1) ぜん息群とコントロール群の比較

研究対象者はぜん息群が 34 名とコントロール群が 15 名であった (表 1)。ぜん息群の方がコントロール群に比較して有意に年齢が高く、好酸球性副鼻腔炎の合併が多かったが、アレルギー鼻炎が少なく、肺機能が有意に低く、誘発喀痰と末梢血好酸球分画および実数ともに高かった。

### (2) 好酸球表面抗原の違いによるサブセットのぜん息群とコントロール群の比較

誘発喀痰ではぜん息群の CD62L 陽性、CD69 および CD62L 陽性、CD34 陽性、CD69 および CD34 陽性、および CD62L および CD34 陽性細胞割合がコントロール群に比較していずれも有意に低下し、末梢血ではぜん息群がコントロール群に比較して CD62L 陽性細胞割合が有意に低かった (表 2)。重症度との関連では末梢血好酸球 CD62L および CD34 陽性細胞率で有意差を認めた。

### (3) ぜん息のパラメーターと各好酸球サブセットとの相関 (表 3)

誘発喀痰好酸球中 CD69 陽性細胞割合 (%) は 1 秒率と有意な負の相関を認め、CD62L 陽性、CD62L および CD69 陽性、あるいは CD69 および CD34 陽性細胞割合は ACT との有意な負の相関を認めた (図 3)。末梢血好酸球中 CD62L および CD69 陽性、あるいは CD69 および CD34 陽性細胞割合は FENO との相関を認めた (図 3)。ただし血清 IgE レベルと好酸球サブセット割合はいずれのサブセットも相関関係を認めなかった。

### <引用文献>

- ① 厚生労働省ホームページ. URL: <https://www.mhlw.go.jp/index.html> 2024 年 5 月 29 日アクセス
- ② Nagase H, Oka H, Uchimura H, Arita Y, Hirai T, Makita N, Tashiro N, Matsunaga K. Changes in disease burden and treatment reality in patients with severe asthma. *Respir Investig.* 2024;62(3):431-437.
- ③ Kyriakopoulos C, Gogali A, Markozannes G, Kostikas K. Biologic agents licensed for severe asthma: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur Respir Rev.* 2024;33(172):230238.
- ④ Khaleva E, Rattu A, Brightling C, Bush A, Bourdin A, Bossios A, Chung KF, Chaudhuri R, Coleman C, Djukanovic R, Dahlén SE, Exley A, Fleming L, Fowler SJ, Gupta A, Hamelmann E, Koppelman GH, Melén E, Mahler V, Seddon P, Singer F, Porsbjerg C, Ramiconi V, Rusconi F, Yasinska V, Roberts G. Definitions of non-response and response to biological therapy for severe asthma: a systematic review. *ERJ Open Res.* 2023;9(3):00444-2022.
- ⑤ Farne HA, Wilson A, Milan S, Banchoff E, Yang F, Powell CV. Anti-IL-5 therapies for asthma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2022;7(7):CD010834.
- ⑥ Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirottin D, Janss T, Starkl P, Ramery E, Henket M, Schleich FN, Radermecker M, Thielemans K, Gillet L, Thiry M, Belvisi MG, Louis R, Desmet C, Marichal T, Bureau F. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3279-95.
- ⑦ Shah K, Ignacio A, McCoy KD, Harris NL. The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2020;13(4):574-583.
- ⑧ Rothenberg ME. A hidden residential cell in the lung. *J Clin Invest* 2016;126(9):3185-3187.
- ⑨ Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med.* 2017;4:101.
- ⑩ Global Initiative for Asthma. URL: <https://ginasthma.org/> 2024 年 5 月 29 日アクセス

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------