

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461197

研究課題名(和文) 上下気道におけるステロイド抵抗性獲得機序の解明

研究課題名(英文) steroid resistance of upper and lower airways

研究代表者

福永 興吉 (Fukunaga, Koichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60327517

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)：今回申請者は本研究を行うにあたり、好酸球性副鼻腔炎の手術検体や重症喘息患者末梢血から好酸球、Group2自然リンパ球(ILC2s)を採取し検討した。まず各々の細胞を安定して検体から採取する方法を確立した。特に血液中に数が少ないILC2sに関しては一細胞から解析が可能なSingle cell解析法を用いた。これにより健常者と患者の表現型(増殖能やサイトカイン産生能)の違いを明らかにした。また好酸球についても網羅的解析を用いて検討したところ健常者に比べ酵素やメディエーターの産生能の違いがあることを明らかにした。ステロイドの抵抗性についても現在検討を重ねており引き続き研究を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：In conducting our research regarding steroid resistance of upper and lower airways, we collected eosinophils and Group 2 innate lymphoid cells (ILC 2s) from surgical specimens of chronic eosinophilic sinusitis and peripheral blood of severe asthmatic patients and examined them. First, we established a method to collect each cell stably from the specimen and blood. Especially, ILC2s with small number in blood was examined using single cell analysis method which can analyze from one cell. As a result, the difference between the healthy subjects and the patient's phenotype (proliferative ability and cytokine production capacity) has become clear. In addition, eosinophils were also examined using comprehensive analysis and revealed differences in productivity of enzymes and mediators as compared to healthy subjects. We are currently investigating the resistance of steroids of these cells and will continue to conduct current research.

研究分野：喘息

キーワード：ステロイド抵抗性 自然免疫リンパ球 好酸球

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫を担うリンパ球として近年新たに自然免疫系リンパ球 (Group2 Innate Lymphoid Cells: ILC2) が共同研究者である茂呂らにより発見され、“自然型アレルギー”という新しい概念が提唱されるようになった (Moro K et al. *Nature*, 2010)。ILC2s は IL-33 の刺激を受けて IL-5 や IL-13 を産生することで好酸球遊走・潤滑や杯細胞過形成を促進し、上下気道のアレルギー病態形成に関与している。さらにこの ILC2s は通常ではステロイド感受性であるが、申請者らはマウスモデルを用いて上皮細胞由来サイトカイン (TSLP) 存在下では ILC2s はステロイド抵抗性を獲得し、好酸球性気道炎症の増悪に関わることを明らかにした (Kabata H et al. *Nature Communication*, 2013)。一方、ヒト ILC2s は成人肺や腸管、慢性副鼻腔炎・鼻ポリープにその存在が確認されているが、未だ気道アレルギー病変に対する知見は少ない。

さらに申請者らは魚油に含まれる DHA より代謝され強力な抗炎症性作用を持つ脂質メディエーター、プロテクチン D1 (PD1) がヒト好酸球に対して遊走を阻害し、さらに好酸球自ら PD1 を産生することを初めて明らかにした。さらに高容量吸入ステロイドで治療されている重症喘息患者においてこの PD1 産生が減弱していることをリポドーム解析によって明らかにし、その原因のひとつとして代謝酵素である 15-Lipoxygenase の機能が障害されている可能性を示した (Miyata J et al. *J Allergy Clin Immunol*, 2012)。このことは喘息のフェノタイプ (重症化) の修飾の原因として好酸球の機能異常が関与している可能性を示唆している。

近年上気道と下気道とをひとつの器官と捉え、それぞれの気道上でおこる疾患を総合的に対処することにより治療効果が高められる “One airway, One disease” という概念が提唱されている。実際に吸入ステロイド

剤など既存の治療に抵抗を示す重症喘息患者には上気道疾患の合併も多い。その一例として好酸球性副鼻腔炎に併発する好酸球性鼻茸はは全国に約 3.5~5 万人存在すると言われ、治療としては鼻粘膜切除術が一般的に行われているが再発率も多く、薬物療法として点鼻ステロイドが用いられるがステロイド抵抗性を示し治療に難渋する患者も多いことが知られている。

申請者らの自験も含め、炎症局所に対するステロイド投与による抑制が困難な好酸球性炎症の原因として (1) 好酸球自身の機能異常 (2) 好酸球の活性化作用を持つ ILC2s 細胞のステロイド感受性低下が考えられる。そしてステロイド抵抗性の重症喘息のなかでもアスピリン喘息患者の多くが好酸球性鼻茸を合併していることを鑑み、慢性好酸球性副鼻腔炎に伴う好酸球性鼻茸における好酸球及び ILC2s 細胞の性質を明らかにすることで上下道におけるステロイド抵抗性の機序を解明できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

アレルギー性上下気道疾患において局所ステロイド剤投与は有効であるが、ステロイド抵抗性のため治療に難渋する難治性喘息や併存症として多く見られる慢性好酸球性副鼻腔炎が存在する。これまで申請者らは難治性喘息患者における好酸球機能の異常あるいは喘息動物モデルを用いて自然免疫系リンパ球におけるステロイド抵抗性機序を解明してきた。そこで本研究ではステロイド抵抗性獲得機序について好酸球およびこれを活性化する自然免疫細胞に着目し、好酸球性副鼻腔炎患者の生体試料を用いてステロイド抵抗性の機序を解明し、上下気道におけるアレルギー性難治性炎症の新たな治療戦略の可能性を探ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

当院あるいは他施設で呼吸器内科、耳鼻咽喉科を受診あるいは通院中の好酸球性慢性副

鼻腔炎の診断のついた患者あるいは重症喘息と診断された患者から同意のもと手術検体ならびに採血検体を収集する。検体からヒト ILC2 細胞の分離法を確立し、その増殖能やサイトカイン産生能などの解析およびステロイド抵抗性についての検討を行う。また好酸球についても検体から分離を行い高圧 UPLC システムと三連四重極型質量分析を連結した解析システムを用いてリピドーム解析を中心とした包括的メタボローム解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) ILC2s および好酸球採取の確立

それぞれの細胞を安定して採取できるような方法を確立した。

ILC2s については末梢血 20mL から Lymphoprep にて PBMC を分離し、Lin(-) CD45(+) CRTH2(+) CD127(+) CD161(+) cells 細胞を FACS でソートした。

鼻茸好酸球は採取した鼻茸をコラゲナーゼおよび DNAase で溶解し、単一細胞として懸濁液に入れその後 CD45+ negative markers (CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a, and c-kit)の細胞を FACS でソートした。末梢血においても同様の方法を用いて検討した。

##### 2. ILC2s に関する検討

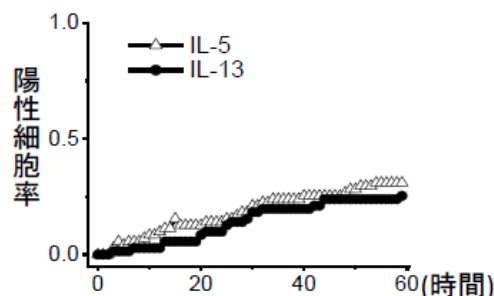
研究当初 ILC2s の細胞培養系の確立を検討したが、20mL 血液から得られる細胞数が 1000-3000 個程度と極めて少なく、サイトカイン産生などの評価が困難であった。

そこで新たに 1 細胞分泌実時間イメージング法を用いて評価をおこなった。

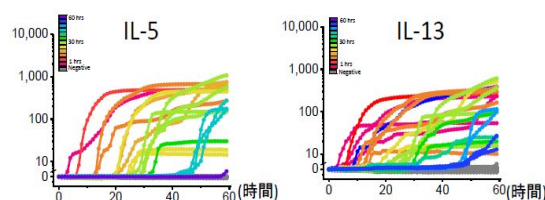
本法により単一細胞レベルでのサイトカインの分泌が半定量的に、高時間分解能で評価可能となりまた細胞それぞれの増殖能に関しても検討できるシステムである(東京大学大学院理学系研究科 上村想太郎教授)

結果ヒト健常者 ILC2s について本法を用いて解析したところ経時的に IL-5, IL-13 が分

泌されることを確認した(図 1)。さらにそれぞれの細胞のサイトカイン産生は細胞ごとに産生量や分泌開始の立ち上がり時間に差異があることを明らかにした(図 2)。

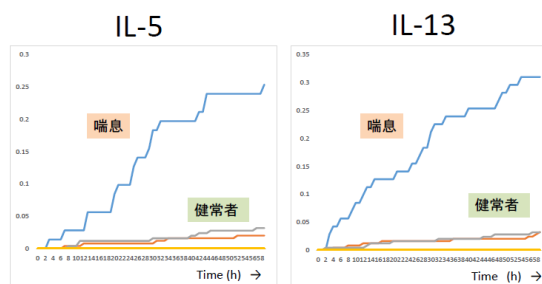


(図 1) サイトカイン産生細胞陽性率の経時的变化



(図 2) 単細胞ごとのサイトカイン分泌

次に我々は喘息患者の検体を用いて検討したところ図 3 に示すように明らかに喘息患者においてそれぞれのサイトカイン分泌の陽性細胞率が高いことを示した。



現在同様な手法で喘息患者および好酸球性副鼻腔炎患者の手術検体、末梢血検体において検討を行っている。さらにこの採取した細胞にステロイドを添加しその動態を現在解析中である。また本研究期間中に本法を用いて 1 細胞からの RNA シークエンスを施行す

ることが可能となったため、今後同一患者から採取した ILC2 の中で、表現型が異なる細胞を取り出し、RNA シークエンスを用いてその因子を検討することを進めて行く予定である。

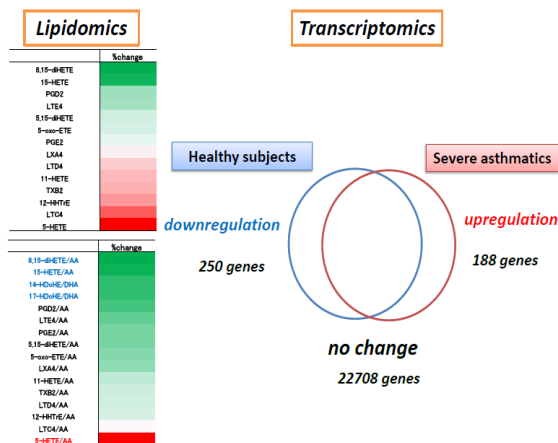
## 2. 好酸球に関する検討

ヒト末梢血ならびに鼻茸から安定した好酸球を採取する系を確立した。

それぞれの採取された好酸球を用いて OMICS 解析（プロテオミクス、トランスクリプトミクス、リポドミクス解析）を行った。

結果慢性好酸球性鼻茸患者鼻茸検体における好酸球において脂質産生およびその代謝酵素に関して特徴的なパターンを見出すことができた。さらに同一患者における鼻茸、末梢血検体の比較についても現在検討を重ねている。

また重症喘息患者の末梢血においても同様の解析を行った。その結果図 4 に示すように重症喘息と健常人の間でリポドミクスおよびトランスクリプトミクスでいくつかの因子の上昇ならびに低下を検出することができた。



(図 4：重症喘息患者好酸球の網羅的解析)

現在これらの知見から得られた代表的な好酸球活性化因子についてヒト好酸球を用いてその作用や抑制機序などについて検討中である。また好酸球についての結果については現在論文投稿準備中のため詳細な因子についての記載は割愛させて頂く。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

加畑宏樹、福永興壱 グループ 2 自然リンパ球 (ILC-2) と呼吸器疾患 分子呼吸器病, 2017, 1, 8-11. (査読なし)

馬場里英、福永興壱. 呼吸器疾患と慢性炎症: 呼吸器炎症と脂質メディエーター. 別冊 Bio Clinica. , 2017, 6(1), 16-21. (査読なし)

Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M, Fukunaga K, Asano K, Betsuyaku T and Koyasu S. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. Nature immunology. 2016, 17, 76-86. (査読あり)

Morita H, Moro K and Koyasu S. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. The Journal of allergy and clinical immunology. 2016, 138, 1253-1264. (査読あり)

Kabata H, Moro K, Koyasu S, Fukunaga K, Asano K, Betsuyaku T Mechanisms to Suppress ILC2-induced Airway Inflammation. Ann Am Thorac Soc. 2016, 13, Suppl 1:S95. (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

細胞分泌実時間イメージング法を用いたヒト末梢血 2 型自然リンパ球の検討  
馬場里恵, 福永興壱, 白崎善隆, 宮田楓, 松坂雅子, 加畑宏樹, 鎌谷高志, 奥隅真一, 田野崎貴絵, 持丸貴生, 上田壮一郎, 茂呂和世, 上村想太郎, 別役智子

第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017 年  
4 月 22 日 東京国際フォーラム(東京都千代  
田区)

重症喘息の最新治療を考える：ステロイド  
抵抗性の克服 シンポジウム 福永興壺  
第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017 年  
4 月 23 日 東京国際フォーラム(東京都千代  
田区)

ヒト末梢血 2 型自然リンパ球の検討  
馬場里英, 福永興壺, 白崎善隆, 宮田楓,  
松坂雅子, 加畑宏樹, 鎌谷高志, 奥隅真一,  
田野崎貴絵, 持丸貴生, 上田壮一郎, 茂呂  
和世, 上村想太郎, 別役智子 第 16 回  
Kinki Hokuriku Airway disease Conference  
(KiHAC) 2017 年 4 月 2 日 大阪国際会議場  
(大阪府大阪市)

福永興壺 シンポジウム 脂質メディエ  
ーターと気道アレルギー. 第 65 回日本アレ  
ルギー学会学術大会 2016 年 6 月 19 日 東京  
国際フォーラム(東京千代田区)

アレルギー性炎症：シンポジウム 分子  
病態の多様性 加畑宏樹, 茂呂和世, 福永興  
壺, 別役智子 第 56 回日本呼吸器学会学術講  
演会. 2016 年 4 月 9 日. 国立京都国際会館(京  
都府京都市).

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福永 興壺 (Fukunaga, Koichi)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：60327517

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

有田 誠 (ARITA, Makoto)  
慶應義塾大学・薬学部・教授  
研究者番号：80292952

茂呂 和世 (MORO, Kazuyo)

国立研究開発法人理化学研究所・総合生命  
医科学研究センター・チームリーダー  
研究者番号：90468489

(4) 研究協力者

なし