

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：19K07949
研究課題名（和文）好酸球ペルオキシダーゼ抗体の存在から難治性好酸球性気道炎症の新たな治療戦略を探る

研究課題名（英文）Exploring a new therapeutic strategy for refractory eosinophilic airway inflammation by eosinophil peroxidase antibody

研究代表者
小林 良樹（KOBAYASHI, Yoshiki）
関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：10375298
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：難治性好酸球性気道炎症の病態メカニズムの一つとして好酸球性ムチンの形成（分解異常）に着目した。好酸球性ムチン中には好酸球ペルオキシダーゼ（EPX）に対する自己抗体（EPX抗体）が存在し、その分解異常や好酸球の活性化に関与していることがわかった。低濃度のEPXでEPX抗体を中和することでムチンの分解が促進され、難治性好酸球性気道炎症に対する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
好酸球性ムチンの気道局所への蓄積は、喘息・好酸球性副鼻腔炎などの難治性好酸球性気道炎症において治療抵抗性の主要な原因となっている。自己抗体EPX抗体がムチン中に存在し、好酸球の活性化とムチンの分解異常に関与すること、EPX抗体の中和がムチンの分解に有効であることがわかり、病態解明および新しい治療薬開発の一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We focused on the formulation (defect in degradation) of eosinophilic mucin as one of mechanisms of refractory eosinophilic airway inflammation. Autoantibodies against eosinophil peroxidase (EPX Ab) are located in eosinophilic mucin, which may be involved in defect in degradation of mucin and activation of eosinophils. Neutralization of EPX Ab by low dose of EPX enhance degradation of mucin, indicating that it has the potential to be a new therapeutic strategy for refractory eosinophilic airway inflammation.

研究分野：気道炎症

キーワード：好酸球ペルオキシダーゼ抗体 好酸球性ムチン

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎(ECRS)は、篩骨洞優位の病変(鼻ポリープやムチン)と気管支喘息の高率な合併を特徴とする難治性の好酸球性気道疾患である。コントロール不良の症例においては治療抵抗性の鼻ポリープやムチンの制御が問題であり、ECRSの病態の解明及び新しい治療戦略の開発が喫緊の課題となっている。

ECRSに特徴的なムチンの中には、数多くの活性化好酸球とそれらから形成・分泌される好酸球細胞外トラップが存在する¹⁾。再発を繰り返すようなECRSにおいては、鼻ポリープの病態形成と自己抗体(特にdsDNAに対する抗体)産生の関連性が示唆されている²⁾。好中球細胞外トラップの場合には、DNAとともに細胞外に放出されたmyeloperoxidase(MPO)などの好中球顆粒タンパクが自己抗原となり、MPO-ANCAに代表されるような抗細胞質抗体の産生が誘導される³⁾。そこで、好中球の場合と同様に、好酸球性ムチンの形成にはeosinophil peroxidase (EPX)などの好酸球顆粒タンパクに対する自己抗体の産生が関与しているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、好酸球性ムチンの形成メカニズムを切り口として難治性好酸球性気道炎症の病態を解明し、新しい治療戦略を開発することを目的としている。好酸球性ムチンにおけるEPX抗体の存在を証明し、それを標的にして研究を進めていく。(1)EPX抗体の局在を明らかにするために独自の検出・測定法を確立させること、(2)EPX抗体の好酸球機能に及ぼす機能的役割を検討すること、さらに(3)EPX抗体の中和効果を狙ってムチン形成阻害(分解促進)させるという新たな治療戦略を見出すことが本研究の主な目的である。

3. 研究の方法

好酸球性ムチンにおける抗EPX抗体の存在を明らかにし、その測定方法を確立させる。喘息合併ECRS症例からの気道局所サンプリングおよびサンプル処理方法(鼻副鼻腔および中耳からのムチンおよびムチン塊の採取・保存・溶解方法)を画一化し、ELISAや免疫染色を用いてEPX抗体の測定方法を開発・至適化する。また、実際の症例における測定・定量を蓄積し、病勢マーカーとしての実用性について検証する。さらに、EPX抗体の中和による好酸球性ムチン分解促進効果を調べ、治療オプションとしての可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) 好酸球性ムチン中の抗EPX抗体の存在

Recombinant EPXを固相化したプレートにサンプル(ムチン上清や血清)を反応させて、EPXに結合したIgG抗体をBiotin-IgGを用いて検出する方法を確立した。サンプルを希釈すると検出濃度が希釈濃度依存性に減少すること、予めrecombinant EPXで処理したサンプルを用いると検出濃度が使用したEPX濃度依存性に減少することを確認し、ELISAによる検出方法の信憑性を評価することができた(図1)。

また、recombinant EPXにbiotinを結合させたものを用い、適切な抗原賦活化を行ったムチン標本と反応させることで抗EPX抗体を免疫染色法で視覚的にも捉えることができた(図2)。

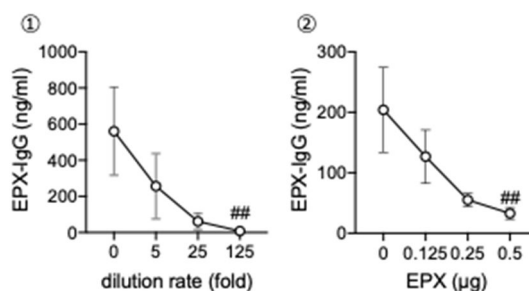


図1. 抗EPX抗体の検出 (ELISA)

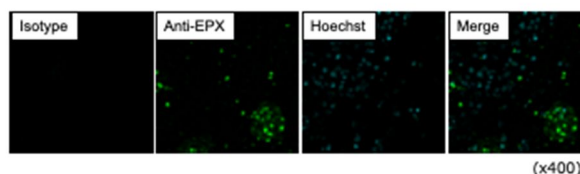


図2. 好酸球性ムチン中に存在する抗EPX抗体 (免疫染色)

(2) 抗EPX抗体のdsDNA放出効果

好酸球性ムチン上清からIgGを免疫沈降させたものでプレートコーティングして、末梢血分離好酸球を添加すると、活性化好酸球からdsDNA(好酸球性etosisの誘導)の放出が亢進した(図3左)。好酸

球を添加する前に予めEPXを投与しておくことでdsDNAの放出が減少することがわかった(図3右)。この現象は、他の好酸球顆粒タンパク(MBP, EDN, ECP)ではみられなかったため、好酸球性ムチンに含まれるIgGは主としてEPX-IgG抗体である可能性が示唆された。

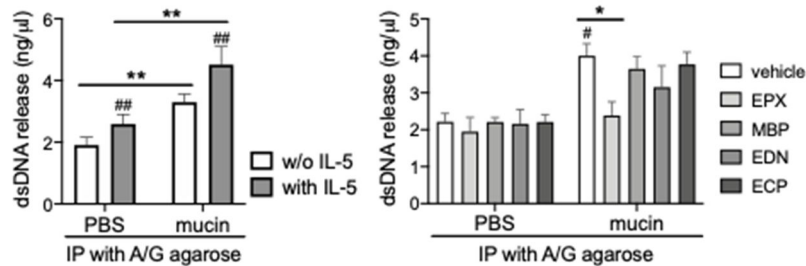


図3. ムチン中IgG抗体によるdsDNA放出効果 (活性化好酸球)

(3) 低濃度EPXの好酸球性ムチン溶解促進効果

好酸球性ムチンサンプルを用いて粘稠度の経時的な測定を行った。低濃度(0.1 μg/ml)のEPXで十分なムチン溶解が可能であることがわかった(図4左)。一方で、興味深いことに、ムチンサンプルと気道上皮細胞 BEAS-2B を共培養すると経時的な粘稠度の低下が阻害されることが確認された(図4右)。

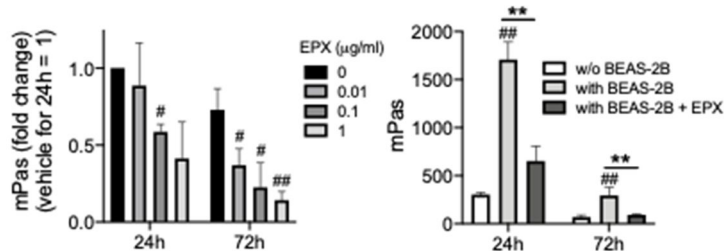


図4. EPXのムチン溶解に及ぼす影響

また、高濃度の末梢血好酸球と共培養した際にはムチンの溶解は著明に抑制されたが、低濃度の好酸球と共培養した際には逆に溶解が促進される現象がみられ、低濃度 EPX による効果と一致した。これは、低濃度 EPX による EPX-IgG 抗体の中和および DNase 活性の亢進による効果であることが推測された。

(4) 血清 EPX-IgG 抗体の臨床応用の可能性

最終的に、血清 EPX-IgG 抗体の病勢マーカーとしての有用性の検証を行った。血清 EPX-IgG 値は病勢コントロール不良(active)な ECRS 症例において有意に上昇していた(図5左)。興味深いことに血清 EPX-IgG 値は副鼻腔 CT スコアと正の相関関係を示し好酸球性ムチンとの関連性を支持する結果となった(図5右)。

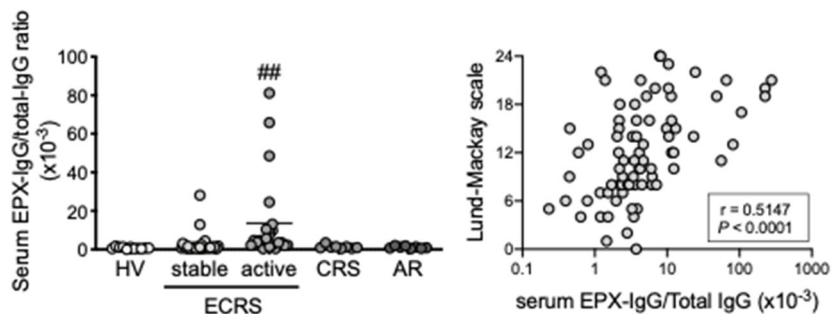


図5. ECRS症例における血清EPX-IgG値

低濃度 EPX によるムチン溶解効果と併せて鑑みると、好酸球性ムチン中に存在する EPX-IgG がムチン形成に関与していることが示唆された。また、喘息を合併する難治性好酸球性副鼻腔炎に対して生物学的製剤による治療を行った症例を対象として、治療前後で血清 IgG 値の変動を検討したところ、治療後には有意に血清 EPX-IgG 値が下がることを確認することができ、病勢把握および治療効果の判定マーカーとしての有用性が期待される。

< 引用文献 >

1. Ueki S, et al., J Allergy Clin Immunol 2016;137(1):258-267
2. Tan BK, et al., J Allergy Clin Immunol 2011;128(6):1198-1206
3. Nakazawa D, et al., Clin Exp Nephrol 2013;17(5):631-633

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kobayashi Yoshiki, Kanda Akira, Bui Dan Van, Yun Yasutaka, Nguyen Linh Manh, Chu Hanh Hong, Mitani Akitoshi, Suzuki Kensuke, Asako Mikiya, Iwai Hiroshi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Omalizumab Restores Response to Corticosteroids in Patients with Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis and Severe Asthma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biomedicines | 6. 最初と最後の頁 787 ~ 787 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9070787 | 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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林良樹 |
| 2. 発表標題 “One airway, one disease” Up-to-date ~Airway Medicineの歩み~ |
| 3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022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 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 神田 晃 (KANDA Akira) (70375244) | 関西医科大学・医学部・准教授 (34417) | |

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 |
|---------|---------|