

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19559

研究課題名（和文）好酸球に種類はあるのか

研究課題名（英文）Are there different types of eosinophils?

研究代表者

藤枝 重治（Fujieda, Shigeharu）

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：30238539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：好酸球が臓器・器官に強く浸潤し、難治性の疾患を発症する疾患では、おそらく浸潤している好酸球は、すべて同一ではなく、いくつかの炎症パターンを誘導する異なった好酸球が存在するのではないかと考えられる。本研究では、好酸球性副鼻腔炎鼻茸をホモジナイズ後、好酸球を分離し、同一患者の末梢血好酸球とSingle-cell RNA-seqで比較検討した。好酸球のSingle-cell RNA-seqによる正しい解析はどうしても成功しなかったが、鼻茸中T細胞、B細胞、ILC2細胞は分離でき、single-cell RNA-seqを行えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎鼻茸から好酸球を様々な方法で分離するも、2つの細胞が結合していたり、複数の細胞が群をなしていたりして、細胞自体が単細胞化できず、single-cell RNA-seqを行うには不適の状態であった。single-cell RNA-seqを行っている研究室と情報交換すると、世界中どの研究室も好酸球のsingle-cell RNA-seqには成功していなかった。そこで鼻茸中T細胞、B細胞、ILC2細胞は分離することにし、single-cell RNA-seqを行い、有意義な遺伝情報を取得することができた。

研究成果の概要（英文）：In diseases in which eosinophils strongly infiltrate organs and organs and cause refractory disease, perhaps the infiltrating eosinophils are not all the same, but there are different eosinophils that induce several inflammatory patterns. In this study, eosinophils were isolated after homogenization of eosinophilic sinusitis nasal polyps and compared with peripheral blood eosinophils of the same patients by Single-cell RNA-seq. Although correct analysis of eosinophils by single-cell RNA-seq was inevitably unsuccessful, T cells, B cells, and ILC2 cells in the nasal polyps could be isolated and single-cell RNA-seq was performed.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：副鼻腔炎 好酸球性副鼻腔炎 好酸球 single cell RNAseq 単細胞解析 T細胞 B細胞 ILC-2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好酸球は酸性エオシンで顆粒が赤く染色される免疫担当細胞で、多くのアレルギー疾患の炎症部位に集積する。集積した好酸球は、慢性炎症やリモデリング形成において主要な役割を担っているとされるが、定常状態でも好酸球は、末梢血中の100倍程度が、皮膚、肺、腸管などに存在する。好酸球は、好中球と異なり貪食能が弱く、エフェクター細胞としての機能の中で最も重要なのが、顆粒放出(脱顆粒)である。脱顆粒によって細胞を障害するとともに、血小板やマスト細胞を活性化する。またハロゲン化物(塩化物や臭化物)を H_2O_2 と共同して酸化し、次亜塩素酸を産生することで細菌や寄生虫の殺傷に寄与する。組織中の好酸球は、増殖することもなく、脱顆粒後は、マクロファージに貪食されることもアポトーシスを起こすこともなく、その一生を終える。現在ではアポトーシスやネクローシスと異なるプログラム死、Etosis (extracellular trap cell death)で終えることが判明している(J Allergy Clin Immunol, 2016)。この好酸球によるEtosisが望まれない部位でクラスター爆弾のように過剰に起こすことが、アレルギー炎症を増悪していると考えられている。

このような好酸球が臓器・器官に強く浸潤し、難治性の疾患を発症する指定難病がいくつか存在する。しかしそれらは、好酸球性副鼻腔炎と好酸球性中耳炎以外に指定難病同士が合併している疾患はなく、それぞれの病態や病理像に一致性も認めない。各疾患において、報告されている好酸球の働きも異なっており、浸潤している好酸球は、すべて同じではなく、いくつかの炎症パターンを誘導する異なった好酸球が存在するのではないかという仮説が立てられる。本研究では、組織に強い好酸球浸潤を起こしている好酸球と末梢血中の好酸球は同じであるのか、違った組織に浸潤している好酸球は同じであるのか、それらをSingle-cell RNA-seqを用いて明らかにする。本研究の結果、臓器浸潤している好酸球が、末梢血とは異なり、臓器(器官)特異的な遺伝子発現をきたし、いくつかの種類が存在することが判明すれば、単に最前線の兵士であり、作戦を立てれない細胞が好酸球だと考えられている免疫学に大きな衝撃を与えることになると思われる。

2. 研究の目的

最近、好酸球性副鼻腔炎(鼻)、好酸球性中耳炎(耳)、好酸球性肺炎(肺)、好酸球性食道炎(食道)、好酸球性胃腸炎(胃・腸)、好酸球性筋膜炎(皮膚・筋)、好酸球性膿疱性毛包炎(顔面皮膚)など好酸球浸潤が強く、原因不明、病態解明不十分、治療法未確立の疾患が増加している。この中で、申請者は好酸球性副鼻腔炎を専門としているが、好酸球性副鼻腔炎患者において合併している疾患は、好酸球性中耳炎のみで、他の好酸球性疾患の合併は全くない。同様に好酸球性膿疱性毛包炎や好酸球性筋膜炎でも他の好酸球性疾患の合併はない。さらに対象臓器は異なるが、すべて好酸球浸潤による疾患発症であるとするならば、病態や病理像にかなりの一致性を認めても良いと思われるが、強い好酸球浸潤のみが一致し、過剰な免疫反応像は、すべて異なっている。また、組織に集積した好酸球は、慢性炎症やリモデリング形成において主要な役割を担っているとされる。しかし、好酸球は好中球と異なり、貪食能が弱く、数種類の顆粒放出(脱顆粒)によって細胞を障害するとともに、血小板やマスト細胞を活性化したり、凝固系因子や脂質メディエーターを放出することで他の免疫担当細胞に影響を及ぼしたりしていると考えられる。

これらのことから推察されることは、浸潤している好酸球は、すべて同じではなく、いくつかの炎症パターンを誘導する異なった好酸球が存在するのではないかという点である。

すなわちT細胞、Innate lymphocyte cell (ILC)、マクロファージのようにType 1、Type 2、Type 3のような分類が可能なのかもしれない。本研究では、組織に強い好酸球浸潤を起こしている好酸球と末梢血中の好酸球は同じであるのか、違った組織に浸潤している好酸球も同じであるのか、好酸球は単一でT細胞のように種類がないのかをSingle-cell RNA-seqを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

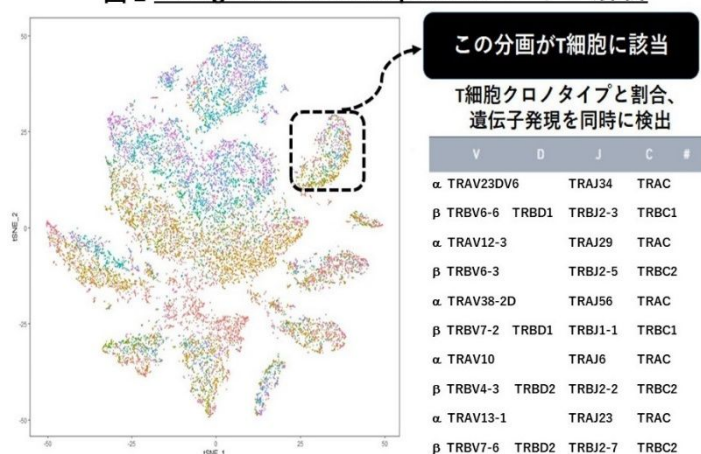
サンプルが得やすい好酸球性副鼻腔炎鼻茸と好酸球性副鼻腔炎に合併している好酸球性中耳炎の耳漏から好酸球を分離する。耳漏にはアポトーシスやネクローシスと異なるプログラム死、Etosis (extracellular trap cell death)を起こしていない大量の好酸球が存在していることを確認している。同時に末梢血から好酸球を分離し、遺伝子発現の違いを検討する。遺伝子発現は、他の細胞を含んだサンプルを解析しても全く意味がないので、シングルセルにして解析するsingle cell RNAseqを行い、比較検討する。Single-cell RNA-seqは、単離した1つの細胞それぞれの遺伝子発現を解析できる画期的な方法である。同一患者の鼻茸組織中好酸球、耳漏中好酸球、末梢血中好酸球を対象にそれぞれ解析し、比較検討する。

4. 研究成果

手術で摘出した好酸球性副鼻腔炎鼻茸を直ちにホモジナイズして単細胞にする。パーコールに乗せ遠心し、単核球の層を回収した。まずはそのままsingle-cell RNA-seqを行った。鼻茸組織中のT細胞分画は容易に判別でき、その種類を解析し、遺伝子発現を解析したところデータが得られた。好酸球分画に関して、同定を試みた。すると好酸球分画では、細胞自体が単細胞化できず、2つの細胞が結合していたり、複数の細胞が群をなしていたりして、single-cell RNA-seqを行うには不適の状態であった。そこで好酸球のみを分離すべく、多層のパーコールで分離を試みたが、得られた好酸球の数が少なすぎて、これもまたsingle-cell RNA-seqを行うには、細胞同定が難しい状態であった。そこでフローサイトメ

トリーにて好酸球を分離しようとした。フローサイトメトリーでは好酸球マーカである抗体で分離が可能であったが、前の状態と同じで、単細胞できない状態であった。そこで一旦、末梢血から好酸球を分離して、single-cell RNA-seqを行おうとした。そうすると好酸球を分離し、最後の細胞浮遊液を作成するとやはり細胞同士が接着していたり、群をなしたりして、解析に不向きであった。そこで酵素処理を行うと、今度は好酸球が消失してしまい解析できなかった。single-cell RNA-seqを行っている研究室と情報を交換すると、世界中どこも好酸球のsingle-cell RNA-seqには成功していなかった。もちろん論文発表も現在までない。そこで鼻茸からT細胞、B細胞、ILC2細胞を分離し、single-cell RNA-seqを行った。現在解析中であり、特徴的な遺伝子発現の細胞群が数種類それぞれの細胞で認められた。

図1: Single-cell RNA-seqとTCRレパトア解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Izuhara K, Fujieda S, Ohta N.	4. 巻 30
2. 論文標題 The functional role and the clinical application of periostin in chronic rhinosinuitis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Expert Rev Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1744666X.2023.2192928.	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 Sakashita M, Takabayashi T, Imoto Y, Homma T, Yoshida K, Ogi K, Kimura Y, Kato A, Stevens WW, Smith SS, Welch KC, Norton JE, Suh LA, Carter RG, Hulse KE, Seshadri S, Min JY, Pothoven KL, Conley DB, Tan BK, Harris KE, Kern RC, Haruna S, Matsuwaki Y, Ochiai R, Fujieda S, Schleimer RP.	4. 巻 150(5)
2. 論文標題 Retinoic acid promotes fibrinolysis and may regulate polyp formation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1114-1124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2022.05.021.	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 該当する

1. 著者名 Imoto Y, Ueki S, Kato Y, Yoshida K, Morikawa T, Kimura Y, Kidoguchi M, Tsutsumiuchi T, Koyama K, Adachi N, Ito Y, Ogi K, Sakashita M, Yamada T, Schleimer RP, Takabayashi T, Fujieda S	4. 巻 12
2. 論文標題 Elevated Serum Leptin Levels in Patients With Eosinophilic Chronic Rhinosinuitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 793607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.793607	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 該当する

〔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
研究 分担者	木戸口 正典 (Kidoguchi Masanori) (30880132)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特命助教 (13401)	
研究 分担者	野口 恵美子 (Noguchi Emiko) (40344882)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究 分担者	吉田 尚弘 (Yoshida Naohiro) (90291260)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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