

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462668

研究課題名(和文) 2型 innate lymphoid cellsによる気道好酸球炎症の解明

研究課題名(英文) The roles of type 2 innate lymphoid cells (ILC2) in chronic rhinosinusitis

研究代表者

松脇 由典 (Matsuwaki, Yoshinori)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60287290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ILC2が副鼻腔炎における好酸球性炎症を誘導していると仮説し検討を行った。鼻茸内のILC2は好酸球性副鼻腔炎(ECRS)において非好酸球性副鼻腔炎(NECRS)と比べ有意に細胞数が増加しており、鼻茸内のILC2数は鼻茸内のEDN(好酸球炎症)と強い相関を示した。鼻茸内より分離したILC2は、IL-2/IL-33両存在下でIL-5、IL-13の産生を認め、非刺激、IL-2/IL-33単独刺激と比較して有意に高値を示した。免疫染色においてILC2はECRSで観察された。ILC2はECRSにおいて鼻茸内で増殖し、IL-5/IL-13を産生することにより好酸球炎症を惹起している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that ILC2s are enriched in blood and nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) and are associated with its pathology. EDN and Th2 cytokines are significantly higher in ECRS than non-ECRS (NECRS). EDN had strongly correlated with the numbers of ILC2s in NPs. The counts of ILC2s in NPs were significantly higher in ECRS than NECRS. Immunostained ILC2 were showed accumulated in nasal polyps of ECRS, but not in NECRS or normal subjects. ILC2's CD25 surface expression in PBMC was significantly higher in ECRS than NECRS. ILC2's IL-17RB surface expression in NPs was significantly higher in NECRS than ECRS. Lineage negative cells from ECRS' NP, but not from NECRS', produced IL-5 and IL-13 in both IL-2 and IL-33 stimulation. ILC2 are considered as candidate of the commander in ECRS, which strongly induce Th2 inflammation. There are possibility that ILC2s have several subtypes and the characteristic of ILC2s are differ from their environment.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：ILC2 自然リンパ球 好酸球 好酸球性副鼻腔炎 慢性副鼻腔炎 IL-5 IL-33 IL-13

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) は難治性の副鼻腔炎であり、特徴として鼻副鼻腔粘膜に著明な好酸球浸潤を認めるが、その病態に関しては不明な点が多い。近年、新たなリンパ球集団として自然リンパ球 (ILCs) が同定され、ILC1、ILC2、ILC3 のグループに分類されている。なかでも ILC2 は強力な好酸球性炎症を誘導することが報告されている。

ILC-2 はマウスの腸管の脂肪から発見され、獲得免疫を介さずに IL-5、IL-13 を大量に産生することが知られている。末梢血や気道にも存在することが確認されている。既知のリンパ球や血液系細胞に発現している特徴的な表面抗原 (Lineage marker) が陰性であることから、これまでの Th2 細胞とは異なる細胞腫と考えられている。

好酸球性副鼻腔炎の鼻茸中に多く浸潤している好酸球に関してもいまだ不明な点が多い。好酸球は単にエフェクター機能の他に、抗原提示細胞としてあるいは炎症性サイトカインを介した免疫調整機能も併せ持ち、Th2 有意なアレルギー疾患において重要な役割を演じていると考えられている。好酸球の中でもサブタイプあるいはステージ (1. Resting, 2. Partial activation/Priming, 3. Full activation) があり、その役割にも違いがあると考えられている (Kita H, Immunol Rev 2011)。

2. 研究の目的

今回我々は鼻副鼻腔内の ILC2 が慢性副鼻腔炎における好酸球性炎症を誘導し、好酸球性/非好酸球性炎症の病態を決定すると仮説し、鼻茸 (鼻粘膜)、末梢血内の ILC2 の発現と分布、鼻茸内のサイトカイン環境に関する検討を行った。

仮説: Innate lymphoid cells 2 (ILC2) が慢性副鼻腔炎の好酸球性/非好酸球性炎症の病態を決定している。血中 ILC2 を計測することにより慢性副鼻腔炎の病態、気管支喘息の病態が推測できる。

課題 1: 鼻茸内、血中 ILC2 数を病態別に検討する。

課題 2: 鼻茸内 ILC2 に対しサイトカイン (IL-2, IL-33) 刺激に対する IL-5, IL-13, IFN γ 産生能を病態別に比較検討する。

課題 3: 鼻茸内 ILC2 発現の分布を蛍光免疫染色にて比較検討する。

課題 4: 慢性副鼻腔炎に浸潤した好酸球のステージおよびその活性化のメカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

当院で手術した好酸球性副鼻腔炎、非好酸球性副鼻腔炎 (NECRS) の患者を対象とした。

まず、末梢血単核細胞と鼻茸を採取し、フローサイトメトリーを用いて鼻茸内、末梢血中の ILC2 数を病態別に検討した。

次に鼻茸内のサイトカインを測定し、鼻茸内の ILC2 数との相関を調べた。

さらに鼻茸内の ILC2 に対し、サイトカイン (IL-2, IL-33) で刺激をして、IL-5, IL13, IFN γ の産生能を病態別に比較検討した。

鼻茸 (鼻粘膜) 内における ILC2 の分布を調べるため、蛍光免疫染色を行った。

鼻茸を採取し、フローサイトメトリーを用いて鼻茸内好酸球と表面発現を病態別に検討した。

鼻茸内の EDN および各種炎症性サイトカイン (IL-2, 5, 13, 33, TSLP, IFN γ) を ELISA にて測定し互いの相関を調べた。

4. 研究成果

鼻茸内の Innate lymphoid cells 2 (ILC2) は非好酸球 (NECRS) 性と比べ好酸球性 (ECRS) において有意に細胞数は増加していた。

末梢血中の ILC2 は非好酸球 (NECRS) 性と比べ好酸球性 (ECRS) において細胞数が増加している傾向があった。

ILC2 の表面発現 IL-17RB (IL-25R) は、鼻茸中・末梢血とも ECRS において有意に低発現であった。

末梢血 ILC2 の表面発現 CD25 (IL-2R) は、ECRS において有意に高発現であったが、鼻茸中の ILC2 では ECRS/NECRS と同等であった。

鼻茸内 ILC2 数は鼻茸内 EDN (好酸球炎症) と強い相関を示した。

免疫染色において CD45 (+), CD127 (+), CD294 (+) 3 重陽性細胞 (ILC2) は好酸球性副鼻腔炎において確認され、存在するところには集合して観察された。

好酸球性副鼻腔炎鼻茸内より分離した Lineage negative cells は、IL-2/IL-33 両存在下で IL-5, IL-13 の産生を認め、非刺激・IL-2/IL-33 単独刺激と比較して有意に高値を示した。

2 型自然リンパ球 (ILC2) は、好酸球性副鼻腔炎において鼻茸内で増殖し、IL-5/IL-13 を産生することにより好酸球炎症を惹起している可能性が示唆された。

ECRS 鼻茸内 EDN, ILC2 数, IL-5, IL-13 は NECRS と比較して有意に上昇していた。鼻茸内 EDN (好酸球炎症) は、IL-5 ($r=0.610$), ILC2 数 ($r=0.594$), IL-13 ($r=0.550$), CT スコア ($r=0.539$), IFN γ ($r=0.400$), TSLP ($r=0.315$) と有意差をもって相関を示した。鼻茸内好酸球の CD69, CD11b (活性化マーカー) および CD63 (脱顆粒マーカー) は ECRS において有意差をもって高発現しており、これら両者が陽性 (full activation) の好酸球は、NECRS では 0/4 に対し、ECRS では 9/13 で有意差を認めた。NECRS 内好酸球は 4/4 で resting であった。

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) における鼻茸内好酸球は浸潤している数が多いだけではなく、活性化 (full activation) しており、そのメカニズムとして ILC2 による IL-5 および IL-13 を介した制御の可能性が示唆された。

またそのソースのひとつに ILC- 2 が関与していることが示唆された。

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 3件)

(1) Uchimizu H, Matsuwaki Y, Kato M, Otori N, Kojima H. Eosinophil-derived neurotoxin, elastase, and cytokine profile in effusion from eosinophilic otitis media. Allergol Int. 2015 Sep;64 Suppl:S18-23.

(2) Ueki S, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Hirokawa M, Matsuwaki Y, Honda K, Ohta N, Yamamoto S, Takagi Y, Wada A, Weller PF. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. J Allergy Clin Immunol. 2016 Jan;137(1):258-67.

(3) Mori E, Merkonidis C, Cuevas M, Gudziol V, Matsuwaki Y, Hummel T. The administration of nasal drops in the "Kaiteki" position allows for delivery of the drug to the olfactory cleft: a pilot study in healthy subjects. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2016 Apr;273(4):939-43.

[学会発表](計 6件)

(1) 宇野匡祐 松脇由典 大村和弘 林映伽 小島博己 鴻信義 紀太博仁。慢性副鼻腔炎における 2 型自然リンパ球 (ILC2) の関与についての検討。第 116 回日本耳鼻咽喉科学会 総会・学術講演会 東京国際フォーラム

(2) 宇野匡祐 松脇由典 大村和弘 林映伽 小島博己 鴻信義 紀太博仁。慢性副鼻腔炎における 2 型自然免疫リンパ球 (ILC2) の関与についての検討。第 64 回日本アレルギー学会学術大会

(3) 宇野匡祐 松脇由典 大村和弘 林映伽 小島博己 鴻信義 紀太博仁。慢性副鼻腔炎における 2 型自然リンパ球 (ILC2) の関与についての検討。第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会。広島国際会議場

(4) 松脇由典 宇野匡祐 辰巳徳史 大村和弘 林映伽 鴻信義 小島博己。2 型自然リンパ球 (ILC2) に

よる IL-5 および IL-13 を介した鼻茸内好酸球増多・活性化のメカニズム。第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会。広島国際会議場

(5) Keisuke Uno, Yoshinori Matsuwaki, Kazuhiro Omura, Eika Hayashi, Norifumi Tatsumi, Hirohito Kita, Nobuyoshi Otori, Hiromi Kojima. The roles of type 2 innate lymphoid cells (ILC2) in chronic rhinosinusitis (CRS). XXIV World Allergy Congress (WAC 2015). Seoul, Korea

(6) Keisuke Uno, Yoshinori Matsuwaki, Kazuhiro Omura, Eika Hayashi, Norifumi Tatsumi, Hirohito Kita, Nobuyoshi Otori, Hiromi Kojima. The roles of type 2 innate lymphoid cells (ILC2) in chronic rhinosinusitis (CRS). Japan-Taiwan Otorhinolaryngology joint meeting. Tokyo

[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:無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松脇由典 (MATSUWAKI, Yoshinori)
東京慈恵会医科大学 耳鼻咽喉科学講座
講師
研究者番号：60287290

(2) 研究分担者

宇野匡祐 (UNO, Keisuke)
東京慈恵会医科大学 耳鼻咽喉科学講座
講師
研究者番号：90629544