

令和元年6月19日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09228

研究課題名(和文)喘息増悪の予防及び治療を目指す研究

研究課題名(英文) Establishment of prevention and treatment strategy of asthma exacerbation

研究代表者

中込 一之 (Nakagome, Kazuyuki)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60401113

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)：好酸球は喘息増悪に関与し、IL-5は好酸球炎症の誘導や維持に最も重要な役割を果たす。しかしIL-5以外の機序が関与する可能性も指摘されている。

重症喘息では好酸球だけでなく好中球も病態に関与するが、本研究では、重症喘息患者の好中球は、好酸球の基底膜通過遊走反応を誘導した。またペリオスチンは、細胞外マトリックス蛋白であり、かつ2型炎症優位喘息におけるバイオマーカーであるが、本研究では、ペリオスチンが好酸球を直接活性化させた。またウイルス、特にライノウイルス(RV)による感染は、喘息増悪の重要な原因であり、CDHR3はRV-Cに対する受容体であるが、本研究では、CDHR3が好酸球を活性化させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、好酸球活性化には様々な機序が関与することが確認された。我々は以前より、IL-5非依存性の好酸球活性化機序として、GM-CSFなどの他の2型サイトカイン システイニルロイコトリエン ウィルス感染時に発現亢進するCXCR3 ligandsなどが直接好酸球を活性化し、喘息増悪の誘導に関与しうることを明らかにしてきた。今回の研究でさらに 活性化好中球 細胞外マトリックス蛋白ペリオスチン RV-Cの受容体であるCDHR3が好酸球を直接活性化し、喘息増悪における気道炎症の成立に関与しうることを明らかにした。これら好酸球活性化機序の解明は、喘息増悪の予防および治療戦略の立脚に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Eosinophils are involved in the development of asthma exacerbation.

Interleukin (IL)-5 is most important cytokine to induce eosinophilic inflammation. However, other mechanism than IL-5 may play roles in the induction or maintenance of eosinophilic airway inflammation.

In the case of severe asthma, both eosinophils and neutrophils contribute to its pathogenesis. In this study, we found that neutrophils from severe asthmatics can induce the transbasement membrane migration of eosinophils. Periostin is an extracellular matrix protein regulated by Th2 cytokines, such as IL-13, and is a biomarker of Th2-mediated immune responses in bronchial asthma. In this study, we found that periostin activates eosinophil functions. A major cause of asthma exacerbation is viral infection, especially rhinovirus (RV) infection. Cadherin-related family member (CDHR) 3 is a receptor for RV-C, which is closely linked to wheezing illnesses. In this study, we found that CDHR3 activates eosinophil functions.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：喘息増悪

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

喘息はコントロール良好な疾患となったが、喘息増悪は今でもしばしば見られ、増悪の予防及び治療法の確立は重要と考えられる。

喘息増悪の誘因で、最も頻度の高いものとして、ライノウイルス(rhinovirus; RV)感染があげられる。また好酸球は喘息増悪に関与することが知られる。末梢血または喀痰中好酸球比率高値の喘息では増悪の頻度が高いことが知られ、抗 interleukin(IL)-5 抗体治療で末梢血好酸球をほぼゼロにすると喘息増悪が有意に抑制される。さらに重症喘息では「治療下でもしばしば増悪」するが、その過程で好酸球性だけでなく好中球性炎症が発動し、連関して、治療抵抗性を獲得すると考えられている。

ペリオスチンは細胞外マトリックス蛋白の一つであり、気道リモデリングに関与し、IL-4 や IL-13 などの 2 型サイトカインにより発現が増強する。血清ペリオスチン濃度は、2 型炎症または好酸球性炎症優位型喘息におけるバイオマーカーとして知られ、高値では一秒量が低下しやすいなどリモデリングのマーカーとしても評価されている。さらにマトリセルラー蛋白としても働くことが知られ、ある種の細胞に接着し、直接活性化させることも報告されている。

Cadherin-related family member 3(CDHR3)は、cadherin superfamily に属する膜貫通の糖蛋白で、気道上皮細胞に発現するが、その機能はよくわかっていない。近年、CDHR3 の遺伝子変異は、小児喘息における重度な増悪と関連することが報告された。さらに CDHR3 は、RV の中で重篤病態を引き起こすとされる、C 型ライノウイルス(RV-C)の受容体であることが判明し、喘息増悪に関与する可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

本申請研究は、RV 感染や好酸球性/好中球性炎症の制御に重点をおき、喘息増悪の予防及び治療戦略を立てることを目的とする。具体的には重症喘息患者の好中球と健常人好中球の好酸球基底膜通過反応の誘導能の違い、ペリオスチンの好酸球機能に対する影響、CDHR3 の好酸球機能に対する影響について検討した。

### 3. 研究の方法

重症喘息患者の好中球と健常人好中球の好酸球基底膜通過反応の誘導能の違い

重症喘息患者及び健常人の末梢血好中球・好酸球を使用した。好中球・好酸球は、デキストラン、Percoll 液、及び immunomagnetic beads による negative selection にて分離した。好酸球基底膜通過反応(trans-basement membrane migration; TBM)は、Boyden chamber 変法を用い、下室に LPS 及び好中球を配置し、好酸球の上室からの遊走反応を測定した。

ペリオスチン及び CDHR3 の好酸球機能に対する影響

健常人及びアレルギー患者の末梢血好酸球を使用した。好酸球は、デキストラン、Percoll 液、及び immunomagnetic beads による negative selection にて分離した。ペリオスチン及び CDHR3 をプレートに coat し、好酸球と incubate した。好酸球接着反応は、残存好酸球ペルオキシダーゼ測定法で測定した。好酸球の活性酸素産生は、チトクローム C 還元法により測定した。培養上清における eosinophil-derived neurotoxin (EDN)濃度とサイトカイン濃度を測定し、前者を好酸球脱顆粒の指標とした。

### 4. 研究成果

重症喘息患者の好中球と健常人好中球の好酸球基底膜通過反応の誘導能の違い

健常人末梢血の好中球それ自身は、好酸球 TBM を誘導しないが、LPS で刺激すると、好酸球 TBM を誘導した。また重症喘息患者の末梢血好中球は、それ自身で、好酸球 TBM を誘導した。また LPS 刺激で、好中球による好酸球 TBM は亢進し、健常人と比べ、より低濃度の LPS 刺激で好酸球 TBM を増強した。

ペリオスチンの好酸球機能に対する影響

ペリオスチンは、好酸球の接着を誘導し、活性酸素産生及び EDN 放出を亢進させた。これらの反応は抗 M integrin 抗体及び抗 2 integrin 抗体の前処置で抑制された。ペリオスチンは、好酸球からの transforming growth factor (TGF)- 1 産生を亢進させた。

CDHR3 の好酸球機能に対する影響

CDHR3 は好酸球の接着を誘導し、IL-5 は好酸球の CDHR3 への接着を増強した。さらに CDHR3 は好酸球からの活性酸素産生を誘導し、脱顆粒を誘導した。

#### 考察

今回の研究では、喘息増悪の病態に中心的な役割を果たすとされる好酸球性気道炎症の形成に、様々なメカニズムが関与することが確認された。

好酸球の活性化に重要な役割を果たすのが IL-5 である。IL-5 は T helper (Th) 2 細胞、マスト細胞、さらに近年発見された II 型自然リンパ球(ILC2)などから産生される。Humbert らは、BAL 細胞の免疫組織学的解析を行い、喘息患者の気道炎症局所には、活性化 T 細胞がみられ、IL-4、IL-5、GM-CSF などの mRNA を発現することを報告した。2000 年頃には、IL-5 を中和することで、好酸球性気道炎症を抑制し、喘息を治療する試みが行われた。Mepolizumab (SB-240563) は、初期に開発された抗 IL-5 ヒト化モノクローナル抗体である。初期の軽症喘息を対象とした研究では、抗 IL-5 抗体の喘息に対する効果を証明できず、いわゆる「好酸球無関係論」が出現

する契機となった。例えば、Leckieらは気管支喘息患者にSB-240563を投与すると、血液や痰の中の好酸球数は抑制されるにもかかわらず、気道過敏性や遅発型気道反応が抑制されなかったことを報告した。しかしその後、重症喘息における病態の多様性が指摘されるようになり、近年では、臨床像からの病型分類(フェノタイプ分類)に加え、炎症病態をも含めた病型分類、更には病態そのものによる病型分類(エンドタイプ分類)が行われるようになった。これらを考慮して、抗IL-5抗体の臨床研究は、対象を持続性好酸球増加型の重症喘息に絞り、さらにエンドポイントを喘息増悪の抑制に設定するようになった。そしてこのようなフェノタイプ/エンドタイプにおいては、抗IL-5抗体は効果を発揮することがわかってきた。例えばHalдарらは、高用量ICS治療にも関わらず喀痰好酸球比率が3%以上かつ年2回以上の経口ステロイドを必要とする増悪歴のある重症喘息患者を対象とした場合、Mepolizumabの経静脈投与(750mg/month)は、重篤な発作の回数を有意に減少させ、QOLスコアを改善させることを報告した。その後もMepolizumabは好酸球型喘息の増悪を抑制するとの論文が多数報告され、我が国においても(好酸球型)重症喘息でMepolizumabが使用可能となった。その後抗IL-5受容体抗体(Benralizumab)も同様に好酸球型重症喘息における増悪抑制効果が報告され、現在実臨床で使用可能である。IL-5及び好酸球が喘息増悪に強く関与することが、抗IL-5療法の知見により証明されたといえる。

しかし抗IL-5抗体治療で、好酸球優位型重症喘息の増悪比率は半減するが、完全に制御することはできない。抗IL-5抗体を用いても、好酸球は依然として喘息患者の気道に残存し、好酸球活性化は抑制できない可能性がある。例えばKellyらは、抗IL-5抗体(Mepolizumab 750mg iv/month)を投与しても、気道における好酸球活性化を抑制できなかったことを報告した。気道の好酸球はIL-5受容体の発現が低下しており、IL-5に対する反応が低下している可能性も考えられている。

IL-5非依存性の好酸球活性化機序として、我々はGM-CSFなどの他の2型サイトカイン システイニルロイコトリエン ウィルス感染時に発現亢進するCXCR3 ligandsなどが直接好酸球を活性化し、好酸球性炎症の形成及び喘息増悪の誘導に関与することを明らかにしてきた。今回の研究でさらに我々は 活性化好中球 細胞外マトリックス蛋白ペリオスチン RV-Cの受容体であるCDHR3が好酸球を直接活性化し、喘息、特に喘息増悪における気道炎症の成立に関与することを明らかにした。

CDHR3は、RV-Cに対する最近発見された受容体である。これと関連して、CDHR3の遺伝子変異(一塩基多型; SNP)は、幼児期喘息における重度な増悪と関連する。さらにCDHR3の遺伝子変異がある細胞では、CDHR3の細胞表面の発現が亢進し、RV-Cの接着能及び複製能が増強されることが明らかとなった。すなわちCDHR3の遺伝子変異がある小児では、重篤な病態を引き起こすことが指摘されているRV-Cに感染しやすく、その結果、重度な喘息増悪を引き起こしやすくなることが考えられる。遺伝子変異とウィルス感染の関連が、喘息増悪に関与することを証明したモデルは今までに存在せず、喘息増悪における大変重要な pathway と考えられる。今回我々はCDHR3が好酸球を直接活性化することを明らかにした。前述の様に好酸球は喘息増悪の病態で重要な役割を果たすことが知られており、この好酸球活性化の誘導はCDHR3が喘息増悪に関与する別の機序と考えられる。ただし実際の組織でのCDHR3発現濃度等は不明であり、今回の研究のlimitationの一つとしてあげられる

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14件)

1. [Nakagome K](#), Nakamura Y, Kobayashi T, Ohta S, Ono J, Kobayashi K, Ikebuchi K, Noguchi T, Soma T, Yamauchi K, Izuhara K, Nagata M. Elevated Periostin Concentrations in the Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Eosinophilic Pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;178:264-271. 査読有
2. Ueda Y, [Nakagome K](#), Kobayashi T, Noguchi T, Soma T, Ohashi-Doi K, Tokuyama K, Nagata M. Dermatophagoides farinae Upregulates the Effector Functions of Eosinophils through M 2-Integrin and Protease-Activated Receptor-2. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;178:295-306. 査読有
3. Noguchi T, [Nakagome K](#), Kobayashi T, Ueda Y, Soma T, Nakamoto H, Nagata M. Effects of 2-adrenergic agonists on periostin-induced adhesion, superoxide anion generation, and degranulation of human eosinophils. *Allergol Int*. 2018;67S:S48-S50. 査読有
4. Soma T, Iemura H, Naito E, Miyauchi S, Uchida Y, [Nakagome K](#), Nagata M. Implication of fraction of exhaled nitric oxide and blood eosinophil count in severe asthma. *Allergol Int*. 2018;67S:S3-S11. 査読有
5. [Nakagome K](#), Nagata M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front Immunol*. 2018;9:2220. 査読有
6. Gern JE, Lee WM, Swenson CA, [Nakagome K](#), Lee I, Wolff M, Grindle K, Sigelman S, Liggett SB, Togias A, Evans M, Denlinger L, Gangnon R, Bochkov YA, Crisafi G. Development of a Rhinovirus Inoculum using a Reverse Genetics Approach. *J Infect Dis*. 2018 (in press). 査読有

7. Nakagome K, Shoda H, Shirai T, Nishihara F, Soma T, Uchida Y, Sakamoto Y, Nagata M. Eosinophil transendothelial migration induced by the bronchoalveolar lavage fluid of acute eosinophilic pneumonia. *Respirology*. 2017;22:913-921. 査読有
8. Kobayashi T, Nakagome K, Noguchi T, Kobayashi K, Ueda Y, Soma T, Ikebuchi K, Nakamoto H, Nagata M. Elevated uric acid and adenosine triphosphate concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of eosinophilic pneumonia. *Allergol Int*. 2017;66S:S27-S34. 査読有
9. Noguchi T, Nakagome K, Kobayashi T, Uchida Y, Soma T, Nakamoto H, Nagata M. Periostin upregulates the effector functions of eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:1449-1452. 査読有
10. Noguchi T, Nakagome K, Kobayashi T, Ueda Y, Uchida Y, Soma T, Nakamoto H, Nagata M. Effect of LTRA on IP-10-induced eosinophil adhesion to ICAM-1. *Allergol Int*. 2016;65 Suppl:S62-4. 査読有
11. Takaku Y, Kurashima K, Kobayashi T, Nakagome K, Nagata M. Eicosanoids in exhaled breath condensate of airway inflammation in patients with asthma. *Allergol Int*. 2016;65 Suppl:S65-6. 査読有
12. Nishihara F, Nakagome K, Kobayashi T, Noguchi T, Araki R, Uchida Y, Soma T, Nagata M. 2015. Trans-basement membrane migration of eosinophils induced by LPS-stimulated neutrophils from human peripheral blood in vitro. *ERJ Open Res*. 2015;1. 査読有
13. Noguchi T, Nakagome K, Kobayashi T, Ueda Y, Soma T, Nakamoto H, Nagata M. 2015. Effect of beta2-adrenergic agonists on eosinophil adhesion, superoxide anion generation, and degranulation. *Allergol Int*. 2015;64 Suppl:S46-53. 査読有
14. Kobayashi T, Soma T, Noguchi T, Nakagome K, Nakamoto H, Kita H, Nagata M. 2015. ATP drives eosinophil effector responses through P2 purinergic receptors. *Allergol Int*. 2015;64 Suppl:S30-6. 査読有

〔学会発表〕(計 35件)

学会・研究会

1. Nakagome K, et al. Cadherin-related family member 3 upregulates the effector functions of eosinophil. 第 47 回日本免疫学会学術集会ワークショップ. 2018 年 12 月 11 日. 福岡市
2. Nakagome K, et al. Formoterol attenuates periostin-induced eosinophil adhesion, superoxide anion generation, and degranulation. XXIV World Congress of Asthma. 2018 年 10 月 5 日. 東京都
3. Nakagome K, et al. Elevated periostin concentrations in the bronchoalveolar lavage fluid of eosinophilic pneumonia. XXIV World Congress of Asthma. 2018 年 10 月 4 日. 東京都
4. 中込 一之, 他. Cadherin-related family member 3 は, M 2 integrin を介して, 好酸球のエフェクター機能を活性化する第 67 回日本アレルギー学会学術大会ミニシンポジウム. 2018 年 6 月 23 日. 幕張市
5. 中込 一之, 他. アレルゲン免疫療法は, 直接ターゲットとしていないアレルゲンに対する免疫反応も抑制する第 67 回日本アレルギー学会学術大会ミニシンポジウム. 2018 年 6 月 23 日. 幕張市
6. 中込 一之, 他. 埼玉医科大学アレルギーセンターにおける “チーム・アップ”. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会シンポジウム. 2018 年 6 月 23 日. 幕張市
7. Nakagome K, et al. Elevated periostin concentrations in the bronchoalveolar lavage fluid of eosinophilic pneumonia. ATS Conference 2018. 2018 年 5 月 20 日 サンディエゴ, USA
8. 中込 一之, 他. Cadherin-related family member 3 は, 好酸球のエフェクター機能を活性化する. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会学術部会賞選考講演会. 2018 年 4 月 27 日. 大阪市
9. 中込 一之. 重症喘息治療と IgE. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会ランチョンセミナー. 2018 年 4 月 27 日. 大阪市.
10. 中込 一之. 主な薬剤のアレルギー(局所麻酔薬、抗菌薬). 第 4 回 総合アレルギー講習会. 2017 年 12 月 17 日. 横浜市
11. 中込 一之. 免疫療法 喘息. 第 4 回 総合アレルギー講習会. 2017 年 12 月 16 日. 横浜市
12. Nakagome K, et al. Elevated periostin concentrations in the bronchoalveolar lavage fluid of eosinophilic pneumonia. 第 46 回日本免疫学会学術集会ワークショップ. 2017 年 12 月 12 日. 仙台市
13. 中込 一之. 気管支喘息におけるアレルゲン免疫療法の有効性. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会. 2017 年 6 月 18 日. 東京都
14. 中込 一之, 他. 好酸球性肺炎の気管支肺胞洗浄液におけるペリオスチン及びサイトカイン濃度の解析. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会ミニシンポジウム. 2017 年 6 月 16 日. 東

京都

15. 中込 一之, 他. 好酸球性肺炎の気管支肺胞洗浄液ではペリオスチン濃度が上昇している. 東京都. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会ミニシンポジウム. 2017 年 4 月 23 日.
16. 中込 一之, 他. スギ花粉症合併ダニアレルギー性喘息における純化アレルゲン急速同時免疫療法. 第 114 回日本内科学会総会. 2017 年 4 月 15 日. 東京都.
17. Nakagome K, et al. Periostin up-Regulates the Effector Functions of Eosinophils. 2017 AAAAI Annual Meeting. 2017 年 3 月 6 日. アトランタ, USA.
18. 中込 一之. 成人の免疫療法. 第 3 回 総合アレルギー講習会. 2016 年 12 月 17 日. 横浜市
19. Nakagome K, et al. Periostin up-regulates the effector functions of eosinophils. 第 45 回日本免疫学会学術集会. 2016 年 12 月 7 日. 宜野湾市.
20. 中込 一之, 他. 急性好酸球性肺炎の気管支肺胞洗浄液におけるサイトカイン・ケモカイン濃度の解析. 第 78 回臨床アレルギー研究会. 2016 年 11 月 12 日. 東京都
21. 中込 一之, 他. ペリオスチンは好酸球のエフェクター機能を誘導する. 第 26 回国際喘息学会日本・北アジア部会. 2016 年 9 月 18 日. 福岡市.
22. 中込 一之, 他. スギ花粉症合併ダニアレルギー性喘息に対する純化ダニ・スギアレルゲンをを用いた急速同時免疫療法の検討. 第 77 回臨床アレルギー研究会. 2016 年 7 月 2 日. 東京都
23. 中込 一之, 他. LPS 刺激好中球による好酸球基底膜通過反応の誘導(健常人と重症喘息患者の比較). 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016 年 6 月 19 日. 東京都
24. 中込 一之. 免疫寛容による気管支喘息治療の展望. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016 年 6 月 19 日. 東京都
25. 中込 一之, 他. 重症喘息患者の末梢血好中球は、単独で好酸球基底膜通過反応を誘導する. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演. 2016 年 4 月 10 日. 京都市
26. Nakagome K, et al. Trans-basement membrane migration of eosinophils induced by LPS-stimulated neutrophils from human peripheral blood in vitro. 2016 AAAAI Annual Meeting. 2016 年 3 月 5 日. ロサンゼルス, USA.
27. Nakagome K, et al. Effects of rhinovirus species on viral replication. 2015. 第 44 回日本免疫学会学術集会. 2015 年 11 月 18 日. 札幌市.
28. 中込 一之, 他. LPS 活性化好中球による好酸球基底膜通過反応の誘導. アレルギー・好酸球研究会 2015. 2015 年 10 月 24 日. 東京.
29. 中込 一之, 他. ライノウィルス A, B, C のウィルス複製能及びサイトカイン産生能の違いに関する検討. 2015. 第 25 回国際喘息学会日本・北アジア部会. 2015 年 9 月 4 日. 横浜市.
30. 中込 一之. アレルゲン免疫療法の意義とその実際. 第 9 回相模原臨床アレルギーセミナーランチョンセミナー. 2015 年 8 月 8 日. 横浜市
31. 中込 一之, 他. 免疫療法 Up to date 喘息での免疫療法. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会. 2015 年 5 月 28 日. 東京都
32. 中込 一之. ダニアレルギーにおけるアレルゲン免疫療法の実際 成人喘息でのダニアレルゲン免疫療法の実際. 2015 年 5 月 26 日. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会. 東京都.
33. Nakagome K, et al. Effects of Human Rhinovirus Species on Cytokine Production and Cellular Cytotoxicity in Differentiated Sinus Epithelial Cells. The 64th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology. 2015 年 5 月 26 日. 東京都
34. 中込 一之, 他. ライノウィルス A, B, C のサイトカイン・ケモカイン産生能及び細胞傷害性の違いに関する検討. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会. 2015 年 4 月 18 日. 東京都
35. Nakagome K, et al. Effects of Human Rhinovirus Species on Cytokine Production and Cellular Cytotoxicity in Differentiated Sinus Epithelial Cells. 2015 AAAAI Annual Meeting. 2015 年 2 月 23 日. ヒューストン, USA.

〔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:

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。