

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17898

研究課題名(和文)好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における好酸球のETosisを解析する研究

研究課題名(英文) Eosinophil ETosis-mediated release of galectin-10 in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis

研究代表者

上出 庸介(Kamide, Yosuke)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・アレルギー科・医師

研究者番号：90646811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA)は強い好酸球性炎症を特徴とする重症かつ難治性疾患である。近年、細胞死の一形態としてExtracellular trap cell death (ETosis)が注目される。我々はEGPA症例の病理組織検体でETosisが生じている事を確認し、galectin-10がETosisの評価に重要であることを見いだした。さらに、コントロールとして気管支喘息との比較を行い、EDN等顆粒蛋白と比較してもgalectin-10はEGPAに特徴的に高値である事を確認した。さらにEGPAの活動性指標であるBVASと相関することを確認した。これらの結果は論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGPAは原因不明の難治性疾患である。神経障害や心血管系障害の合併は時に致命的であり、寛解導入率は低い。罹病期間が長く、QOL、経済的負荷が強いため血管炎症候群の中でも疾病負荷が特に大きく、国の指定難病とされている。診断は欧米ではChapel Hill Consensus Conference(2012年改定)や米国リウマチ学会の分類基準(1990年)が用いられるが、日本では1998年の厚生労働省の診断基準が頻用されるなど、完全に統一されていないほか、典型的な経過や所見を呈さない症例も多く、診断が“グレー”となる症例が少なくない。本研究はEGPAの診断の一助となり、病態解明に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：Eosinophilic polyangiitis granulomatosis (EGPA) is a severe and refractory disease characterized by strong eosinophilic inflammation. Recently, extracellular trap cell death (ETosis) is attracting attention as a form of cell death. We confirmed that ETosis occurred in the histopathological specimens of active EGPA, and found that galectin-10 is important for the evaluation of ETosis. While comparison with bronchial asthma as a control was performed, and it was confirmed that the level of galectin-10 was high in serum of EGPA even when compared with granule proteins such as EDN. Furthermore, it was confirmed that it correlates with BVAS, which is an activity index of EGPA. These results were published in a treatise.

研究分野：アレルギー

キーワード：好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 ETosis 好酸球 galectin-10 IL-5

## 1. 研究開始当初の背景

好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: EGPA) は、気管支喘息などのアレルギー性疾患に引き続いて生じ、好酸球増多を伴う全身性の血管炎をきたす原因不明の疾患である。神経障害や心血管系障害の合併は時に致死的であり、寛解導入率は低く、国の指定難病とされている。診断は欧米では Chapel Hill Consensus Conference(2012年改定)や米国リウマチ学会の分類基準(1990年)が用いられるが、日本では1998年の厚生労働省の診断基準が頻用されるなど、完全に統一されていないほか、典型的な経過や所見を呈さない症例も多く、診断が“グレー”となる症例が少なくない。

活性化した細胞がネット状の DNA(クロマチン繊維)を放出する特殊な非アポトーシス細胞死を Extracellular trap cell death (ETosis) と呼ぶ。本来は感染防御に重要な役割を担った物質であるが、2009年 ANCA 関連血管炎に NETs が関与していることが報告された(Nat Med. 2009)。一方好酸球における ETosis (Eosinophilic ETosis: EETosis) は共同研究者の植木らによって初めて報告された。EETosis は好酸球性副鼻腔炎やアレルギー性気管支肺アスペルギルス症といった好酸球増多疾患の病態悪化機構の一つであることがわかってきた。

現時点で EGPA における EETosis の関与は全く不明である。そこで我々は、EGPA における EETosis を定量的に評価し、EGPA 診断への有用性、病態への関与を明らかにしたいと考える。

## 2. 研究の目的

本研究は EGPA の病態を、ETosis という免疫システムといった視点から解明し、診断につなげることを目的とする。“好酸球”増多を特徴とする EGPA において“好中球”上の抗原に対する自己抗体である ANCA の関与は、他の ANCA 関連血管炎と比べ解釈が困難である一方、ANCA 陽性 EGPA は、腎障害など他の ANCA 関連血管炎と類似点も多い。また EGPA 以外の ANCA 関連血管炎における NETs の関与については報告が増えているが、EGPA に関しては NETs、EETosis いずれも報告がまだない。EGPA における ANCA、ETosis の関係が判明する事で、EGPA の病態解明、及び治療・診断方法の確立に寄与する事が可能であると考えられる。

## 3. 研究の方法

病理学的な評価：気管支鏡検査、上部消化管、下部消化管、皮膚組織検体を用いて ETosis の存在を評価した。検体を秋田大学に搬送し、シャルコーライデン血漿や free granule を確認。また免疫染色によって ETosis を評価するとともに、ETosis の主病態を担っている galectin-10 を染色、評価した。さらに好酸球を電子顕微鏡にて評価し、galectin-10 の局在を調べた。

細胞死の評価：試験管内で健常成人の好酸球に ETosis を起こさせた。具体的には PAF+IL-5、IgG、IgA などの刺激を用いて誘発し、SYTOX にて細胞死の評価、メディアム中の LDH や EDN 評価を行った。

血清学的検査：当院で保管された血清検体を用いて galectin-10 や ECP、EDN、IL-5 を ELISA で測定した。

臨床情報の収集：カルテを用いて臨床情報の収集を行う。臨床情報は年齢、性別、身長、体重、気管支喘息発症年齢、喫煙歴、治療歴、自覚症状、身体所見、臓器障害の部位と程度、合併疾患とその副薬歴、および血液検査、呼吸機能検査、画像検査の情報を採取する。なおコントロールとして非 EGPA の気管支喘息患者の検体を検討する。

データ解析：EETosis を galectin-10 濃度によって定量化し、EGPA で生じる現象であることの確認、および診断への有用性を評価した。コントロールとしては健常成人、気管支喘息、治療後の EGPA 症例の血液検体を使用した。

## 4. 研究成果

### (1)細胞からの galectin-10 の放出

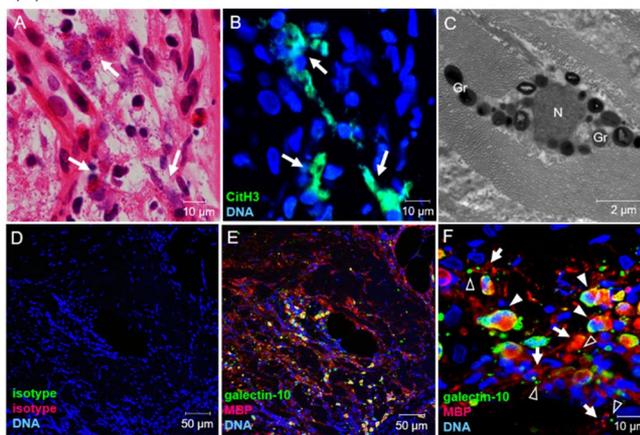
末梢血中の好酸球を分離し、ナノゴールドで標識した galectin-10 の局在を電子顕微鏡で評価したところ、細胞質への局在を確認した。また免疫染色で galectin-10 を染色したところ、DNA と共に細胞内に確認されたが、PMA 刺激によって ETosis を誘発したところ、galectin-10 は細胞外に放出され消失する事が確認された。PMA 刺激された好酸球は SYTOX 染色で細胞死が生じていることが確認され、LDH の上昇が確認された。メディアム中の galectin-10 は上昇したが EDN は上昇せず、顆粒蛋白放出といった脱顆粒とは違うメカニズムで galectin-10 が細胞外に放出されていることが示唆された。intact な細胞では細胞内に DNA、MBP、galectin-10 が染色されるが、ETosis を生じた好酸球では細胞内の galectin-10 が消失し、DNA、MBP 染色のみがのこる事が確認された。

### (2)EGPA 症例の病理検体における ETosis の確認

当院で得られた生検検体を免疫染色した。(1)の検討から、ETosis は galectin-10 染色の消失と MBP や DNA 染色部位の確認で得られることがわかったため、ETosis の評価としてこれらの染

色の差異を用いた。10人のEGPA症例から得られた14種類の組織検体を用いたところ、12検体でETosisが確認された(図1)。強拡大ではfree granuleも確認された。

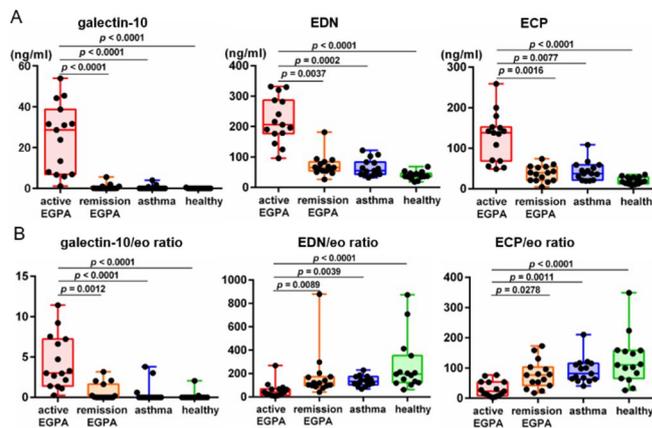
図1



(2)EGPA 症例の血清中 galectin-10 濃度

治療前のEGPA、治療中EGPA、気管支喘息、健常成人それぞれ15例の血清を用いて、血清中 galectin-10 を評価した。治療前のEGPAでは治療後、気管支喘息、健常成人と比べ galectin-10 濃度が有意に高値であった(図2)。またこの数値は好酸球数で除しても同様であった。EDN、ECPも同様に治療前EGPAで有意に高値だったが、好酸球で除した数値は活動期EGPAでは必ずしも高値ではなかった。このため、EDN、ECPと比べ galectin-10 ではより好酸球上昇に依存せず活動期EGPAで上昇する事が示唆された。

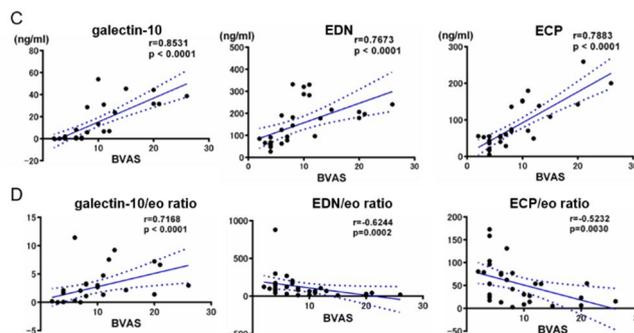
図2



(3)galectin-10 と EGPA 活動性の相関

EGPA 活動指標である BVAS をカルテ情報より抽出し、各種マーカーと比較した。galectin-10 では BVAS との強い相関が確認され(図3)、好酸球数で除した数値を用いても同様に BVAS との相関が確認された。一方で EDN、ECP も BVAS との相関が確認されたが、好酸球数で除した数値での正の相関は確認されなかった。

図3



活動期のEGPAでは血清中 IL-5 が高値であることをさらに我々は確認した。IL-5 は galectin-10 とも相関した。今回の検討では IL-5 が ETosis の原因となっているのか、好酸球性炎症としての結果なのかを判断するデータは得ていない。

(4)まとめとして

今回の検討では、好酸球の ETosis 評価として病理検体中の galectin-10 免疫染色が有用であることが確認され、また血清中 galectin-10 測定が有効であることが確認された。さらに活動性を有するEGPAでは血清中 galectin-10 が好酸球数に影響せず上昇する事が確認され、病勢マーカーとして有用であることが示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Mineyo Fukuchi, Yosuke Kamide, Shigeharu Ueki, Yui Miyabe, Yasunori Konno, Nobuyuki Oka, Hiroki Takeuchi, Souichi Koyota, Makoto Hirokawa, Takechiyo Yamada, Rossana C N Melo, Peter F Weller, Masami Taniguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Eosinophil ETosis-mediated release of galectin-10 in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis and Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41727	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上出庸介
2. 発表標題 血清中galectin-10は好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA)で高値を示す
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上出庸介
2. 発表標題 Galectin-10 is increased in the serum of active eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA) patients
3. 学会等名 第69回日本アレルギー学会学術大会・世界アレルギー機構 合同会議2020（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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