

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791004

研究課題名(和文)内因性 danger signal による好酸球の活性化のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of the eosinophilic activated by endogenous danger signal

研究代表者

小林 威仁 (KOBAYASHI, Takehito)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：90618266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞傷害時に産生される局所炎症や免疫反応に影響を及ぼす可能性がある danger signal の中で内因性に産生される尿酸とATPを用いて、アレルギー性炎症に深く関係のある好酸球の活性化機序における検証を行った。

ATPは好酸球の遊走を誘導した。尿酸は好酸球の接着能を誘導し、反応の一部はATPを介する可能性が示唆された。ATP・尿酸刺激にて好酸球の活性酸素産生は誘導されrh-ICAM-1にて相加的に増強される。ATPにて好酸球のサイトカイン産生は誘導される。好酸球性肺炎において肺局所的に尿酸・ATPは産生されている。

組織侵襲を伴う病態において局所的に好酸球の集積や活性を来たす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The damaged cell produces danger signal. Danger signal causes influence for inflammation and immunoreaction. There are endogenous danger signal uric acid and ATP.

The ATP induced an eosinophilic migration. The uric acid derived eosinophilic adhesion ability, and the possibility that a part of the reaction went through ATP was suggested. The eosinophilic active oxygen production is derived and is increased in ATP, uric acid stimulation additively in rh-ICAM-1. The eosinophilic cytokine production is derived with ATP. Uric acid, the ATP is produced the lungs in acidophile-related pneumonia locally.

The cell injury may cause eosinophilic accumulation and activity locally.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：danger signal 尿酸 ATP 好酸球 好酸球性肺炎

## 1. 研究開始当初の背景

呼吸器領域は多岐にわたる疾患を患うが、中でも感染症・悪性腫瘍などは肺組織に侵襲をきたし組織破壊をきたしうる。細胞傷害を受けた状況下で炎症や免疫反応が影響を受けうる可能性があることが報告されている (Medzhitov R., et al. Nature. 2008; 454: 428-435)。申請者はこれまでに高度の炎症にて傷害を受けた細胞から放出される物質 (danger signal) として数ある damage-associated molecular patterns (DAMPs) の中から UA を用いて、好酸球への影響を遊走実験系、脱顆粒実験系、産生サイトカイン測定実験系を用いて検証した。内因性の danger signal である尿酸は P2Y2 受容体と自己分泌性 ATP を介して好酸球の遊走およびエフェクター機能を誘導しうる。よって、UA は好酸球の遊走、サイトカイン・ケモカイン産生および脱顆粒を誘導し、danger signal である UA が喘息における好酸球性気道炎症の持続因子の一つとなりうることを示唆された (Kobayashi T., et al. Journal of Immunology. 2010; 184(11): 6350-8.)。これらの事象は喘息気道の炎症病態増悪の機序としてウイルス感染およびその他の感染による関与が示唆され、これらの免疫学的機序がさらに解明されれば、この病態の治療標的が見出され制御改善に寄与できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では健常者および喘息患者の末梢血好酸球を用いてその他の danger signal を用いて喘息気道での炎症病態の解明を進展させたいと考える。基本的な目的は外因性 danger signal として pattern-associated molecular patterns (PAMPs) の中から lipopolysaccharide (LPS)、DAMPs の中から ATP を用いて好酸球をはじめ難治化した気道上に好酸球と同様に認められる好中球を用

いて好酸球・好中球性炎症の関連を中心に、これらの免疫細胞の集積機序と病態における機能、関連エフェクター分子の反応の分析を進め最終的には喘息における炎症の増悪における効果的な治療標的の情報を見出すことである。

## 3. 研究の方法

### 好酸球分離法

好酸球は既報の方法に従い immunomagnetic beads による negative selection にて分離した。すなわち健常人末梢血をヘパリン処理したものと 4.5% デキストランを 50ml のポリプロピレンチューブに 4対1 の比率で混ぜ、血漿成分と赤血球とに分離した。この血漿成分を比重 1.085 の Percoll 液を用い比重遠心分離を行い、リンパ球ならびに低比重の顆粒球を除去後、蒸留水にて赤血球の溶血操作を行った。その後好中球除去を目的として抗 CD16 モノクローナル抗体ビーズを使用した negative selection 法で好酸球を選択的に分離した。活性酸素産生反応については 0.1% gelatin を含有する HBSS (HBSS/gel) に浮遊し  $1.25 \times 10^6$  cells/ml に調節して実験に供した。好酸球の分離純度は 98% 以上であり、また実験終了直後の cell viability は trypan blue 染色で 95% 以上であった。

好酸球の基底膜遊走反応 (trans basement membrane migration, 以下 TBM)

基底膜成分である基底膜再構成基質 (マトリジェル) を用いて  $1 \times 10^5$  cells/ml に調節した。24穴プレートの上層のトランスウェルにマトリジェルを 100  $\mu$ l ずつ分注し、confluent となるまで室温にて 24 時間保存した。好酸球 TEM は Boyden chamber 法の変法を用いて測定した。すなわち 24穴培養プレート (Becton Dickinson Labware) を用い、3  $\mu$ m ポアサイズのインサートフィルター (Becton Dickinson Labware) を装着し、ウェル上部を HBSS で一回洗浄後、好酸球浮遊液を 200  $\mu$ l ずつ分注した後、ウェル下部に遊走因子 500

μlを注入し37 °Cで2時間インキュベーションした。上部ウェルを除去した後、下部ウェル内に遊走した好酸球のペルオキシダーゼ活性をOPDを用いて発色し、IMMUNO - MINI(NJ-2300, 日本インターメッド株式会社, 東京, 日本) を使用し、波長490nmの吸光度を測定した。

#### 好酸球活性酸素産生反応

好酸球のスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 活性は我々が行ってきた96 穴プレートを用いたチトクロームC還元法により測定した。まずSODコントロールwellにSOD (0.2 mg/mL in HBSS/gel) を20 μlずつ加え、各wellに刺激物質を入れたのち100 μlとなるようHBSS/gelを加えた。好酸球浮遊液とチトクロームC (12 mg/ml) を体積比4 対1で混合し、これを各wellに100 μl ずつ加える。ブランクにはHBSS/gel 180 μlとチトクロームC20 μlを加えた。全て加え終わったら直ちに上記測定器を使用し、550nmの吸光度を経時的に測定した。測定の間はプレートを5%CO<sub>2</sub>、37 °Cのインキュベーターで保温した。これらの反応はduplicateで行い、SODを含んだ反応と比較した。O<sub>2</sub> 産生量は分子吸光度計数 $21.1 \times 10^3 M/L^{-1} cm^{-1}$ から、nmoles cytochrome C reduced/ $10^6$  cells-SOD control として算出した。試薬とのインキュベーション開始から240 分後の好酸球生存率はtrypan blue 染色にて97%以上であった。

#### 好酸球の接着実験

既報のごとく (Nagata M, Saito K, Tsuchiya T, Sakamoto Y: Leukotriene D4 upregulates eosinophil adhesion via the cysteinyl leukotriene 1 receptor. J Allergy Clin Immunol 2002; 109:676-70.) プレートのwell 内のHUVECsに接着した好酸球のペルオキシダーゼ活性をEPO substrate (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM O-phenylenediamine (OPD), and 0.1% Tritone X-100 in Tris Buffer, pH8.0) を用いて発色した。好酸球(100 μL (1 × 10<sup>5</sup> cell/mL, HBSS/0.1% gelatin)) はHUVECsでコートした

プレートに注入し、37 °Cで30分培養。その後、37 °CのHBSSを用いて3回洗浄を行う。洗浄後にHBSS/0.1% gelatin を100 μLづつ各wellに注入。基準として、100 μL毎に濃度勾配の基準を作成(1 × 10<sup>3</sup>, 3 × 10<sup>3</sup>, 1 × 10<sup>4</sup>, 3 × 10<sup>4</sup>, 1 × 10<sup>5</sup> cell/mL)。プレートのwell内に接着した好酸球のペルオキシダーゼ活性をEPO substrate (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM O-phenylenediamine (OPD), and 0.1% Tritone X-100 in Tris Buffer, pH8.0) を用いて30分室温にて発色させた後、4MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を50 μLづつ注入し反応を停止させた後 IMMUNO - MINI (NJ - 2300、日本インターメッド株式会社、東京、日本) を使用し、波長 490 nm の吸光度を測定した。好酸球の接着の評価はログ対数反応曲線にて算出した。好酸球の活性はtrypan blue 染色で98%以上の生存率を確認。( >99%の生存率)

#### 気管支肺胞洗浄上清測定

当院呼吸器内科に入院された患者のうち精査加療目的にて気管支肺胞洗浄 (BAL : bronchoalveolar lavage) を施行し気管支肺胞洗浄液 (BALF : bronchoalveolar lavage fluid)中の白血球分画を確認し好酸球比率が25%以上で好酸球性肺炎 (eosinophilic pneumonia ; EP) と診断とされた検体、およびBALF中の白血球分画に明らかな特徴を示さなかった過敏性肺炎 (hypersensitivity pneumonitis) サルコイドーシス (sarcoidosis) と診断された検体を用いてレトロスペクティブに検証した。

2001年から2012年までに当科で検査施行された患者を対象に、過去の患者記録簿や保存カルテより疾患名、BALF中の白血球分画比率などを検証し、該当患者のうち凍結保存されていた上清の検体を用いて、Alb、LDH、UAを院内の臨床検体測定器を用いて測定し、ATPは専用測定キットにて処理し luminometer を用いて測定。サイトカインはBioplex assay kitを用いて測定を行った。

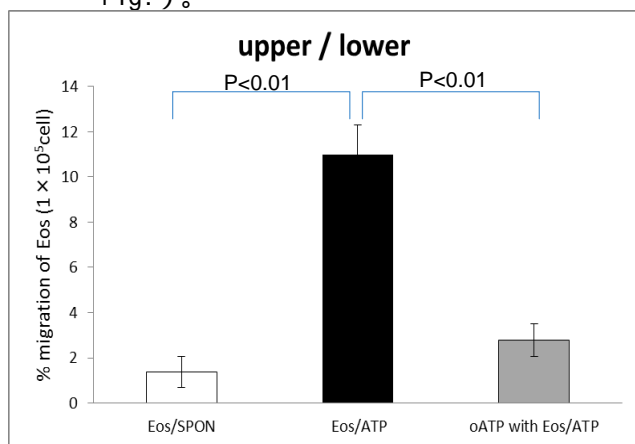
### 統計処理法

統計学的解析は two-way analysis of variance (ANOVA) を用い、Fisher 法 (post hoc 検定) にて解析した。危険率 5% 未満を有意とみなした。

### 4. 研究成果

(1) ATP は好酸球の基底膜通過遊走反応を誘導する。

Transwell を用いて基底膜成分(マトリジェル®)をコートしたフィルターを通過しての遊走反応をボイデン・チェンバー変法で測定する。Reaction kinetics をあらかじめ既知の data にて確認し、インキュベーション時間を 2hr に設定して実験を行なった。先の報告の時に尿酸はケモタキシスを誘導することを確認しており同様の実験系にて検証し ATP 濃度 100 μM にて有意に好酸球の遊走を誘導した。また、ATP のアンタゴニストである oxidized ATP (ATP receptor antagonist) にて ATP による好酸球の TBM は有意に抑制された (% migration of Eos(1 × 10<sup>5</sup> cell : control に対して各刺激; P<0.01, n = 5, Fig. )。

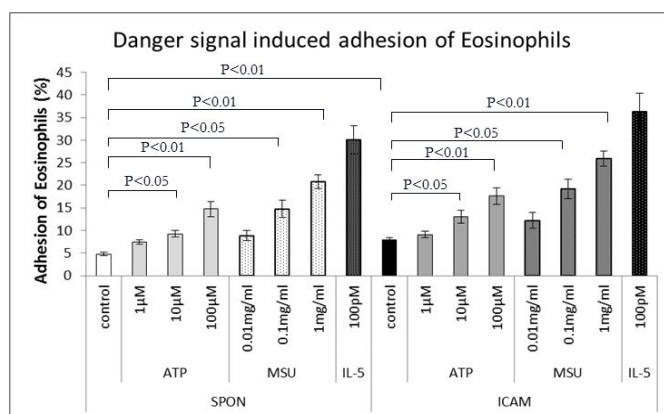


(2) 好酸球の接着能は MSU・ATP 単独刺激で濃度依存性に誘導された。

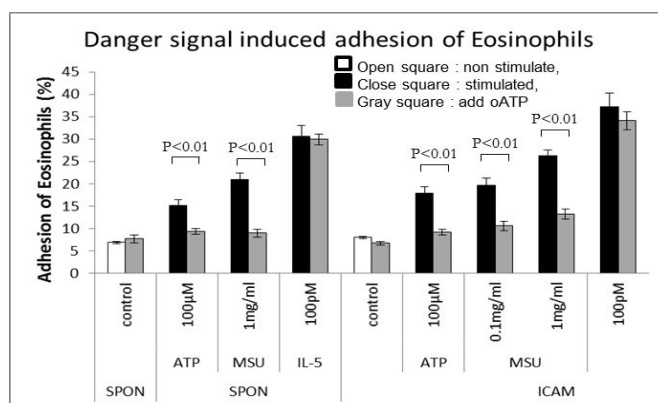
最初に ATP が好酸球接着能を修飾するか否かを検討した。併せて danger signal の一つであり報告者の使用経験のある尿酸 (尿酸塩酸塩 : mono sodium urate : MSU) を用いて同様の検証を行った。培養時間は当研究室にてこれまで行われてきた培養時間 20 分にて行い、EPO 発色吸光度測定法にて測定した。

好酸球に直接 ATP (1 ~ 100 μM), MSU (0.01

~1mg/ml) で刺激し、tissue culture plate (rh-ICAM-1 +/-) への好酸球接着能を検証した。(n = 5) ATP 刺激および MSU 刺激いずれの刺激においても濃度依存性に好酸球の接着反応は増強され、ATP は 10 μM より MSU は 0.1mg/ml より有意に増強を認めた。その反応は rh-ICAM-1 コーティングプレートにおいて更に相加的に増強を認めた。( % adhesion : control に対して各刺激; P<0.05 ~ 0.01, n = 6, Fig. )。



この反応が ATP を介するものかどうかについて検証するため ATP のアンタゴニストである oATP を用いて同様の実験系にて blocking 実験を行いいずれの反応も抑制された。併せて oATP 自体による細胞毒性は無いことを確認した。( % adhesion : control に対して各刺激; P<0.01, n = 6, Fig. )

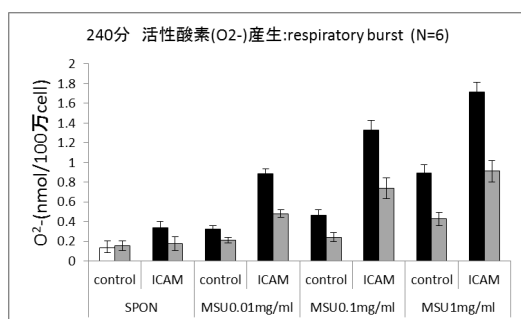
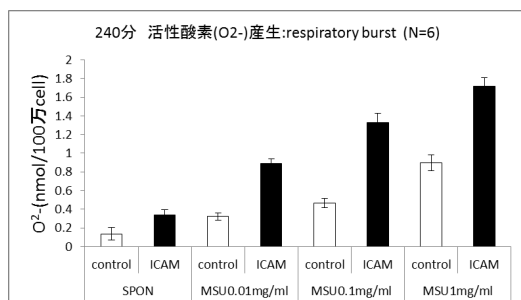


(3) MSU・ATP は好酸球の活性酸素産生能を誘導する。

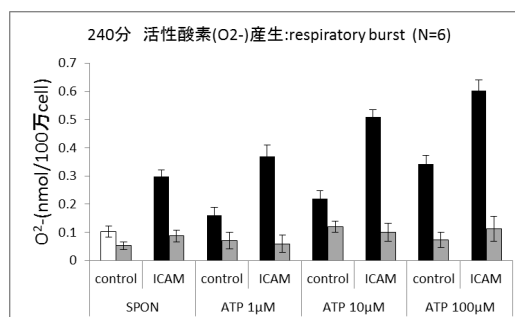
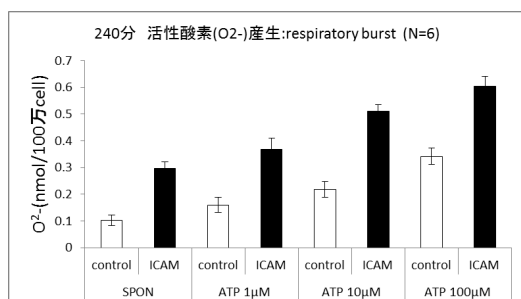
好酸球からの superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 産生に対する MSU・ATP の作用の検討を行った。測定はチトクローム C 還元法を用いた

superoxide anion 産生測定で測定し、その上清を用いて EDN 測定を ELISA 法にて行った。

0.01 ~ 1mg/ml MSUは好酸球のO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を誘導し、その反応は120分でほぼプラトーに達した (nmol/10<sup>6</sup>cells ; P < 0.05 ; N = 6)。また、rhICAM-1存在下においてはその作用は増強された。これらの反応はATP antagonist様作用を有するoATPにより有意に抑制された (nmol/10<sup>6</sup>cells ; P < 0.01 ; N = 6)。



次に、同様のシステムにおいて1 ~ 100 μM ATPは好酸球のO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を誘導し、その反応は210分でほぼプラトーに達した (nmol/10<sup>6</sup>cells ; P < 0.05 ~ 0.01 ; N = 6)。また、rhICAM-1存在下においてはその作用は増強された。これらの反応はATP antagonist様作用を有するoATPにより有意に抑制された (nmol/10<sup>6</sup>cells ; P < 0.01 ; N = 6)。



(4)ATPは好酸球のcytokine産生を誘導する。

ATP刺激による好酸球のサイトカイン産生をBioplex®, ELISA法をもちいて測定を行った。100 μM ATP刺激における好酸球のサイトカイン産生はTh2系 (IL-5, Eotaxin) および他IL-6・8・17、MIP-1などが認められた。(pg/ml/Eos100,000cells ; N=5)

average ± SEM	ATP	
	Medium	100 μM
IL-1	5.0 ± 1.9	162.6 ± 4.9
IL-1R	15 ± 0.3	197 ± 18
IL-5	15 ± 1.3	160 ± 30
IL-6	14.0 ± 4.3	268.1 ± 14.8
IL-8	90.4 ± 30.1	591.7 ± 74.4
IL-17	16 ± 0.3	154 ± 18
EOTAXIN	12 ± 0.6	134 ± 18
MIP-1	53.9 ± 17.5	328.9 ± 48.1

(5)好酸球性肺炎のBAL液においてもMSUおよびATPによる好酸球のサイトカイン産生に合致したサイトカインを認めた。

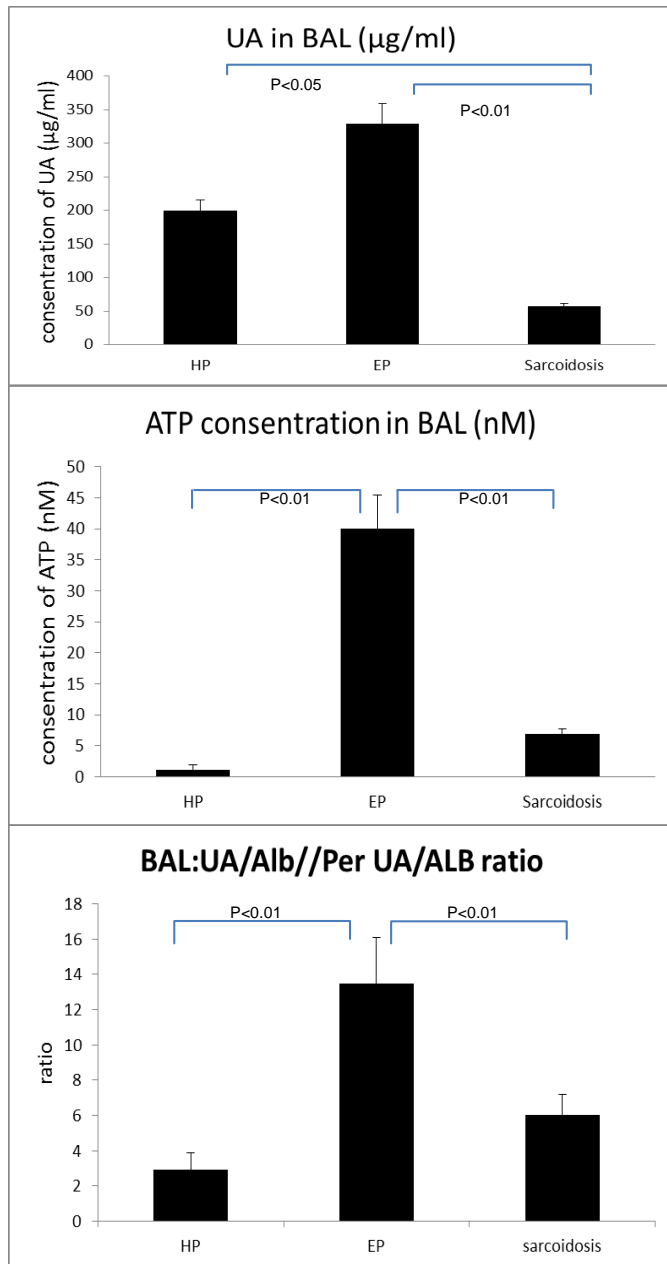
好酸球性肺炎 (eosinophilic pneumonia : EP, BAL液中の総細胞あたり好酸球比率25%以上) における回収BALF液より細胞分画および各種サイトカインの産生をBioplex®, ELISA法をもちいて測定を行う。上清中のサイトカインの種類は *in vitro*でのMSU・ATP刺激における好酸球のサイトカイン産生の組成に矛盾しない結果であった。

Increased in BAL			
IL-1	IL-1ra	IL-2	IL-4
IL-5	IL-6	IL-7	IL-9
IL-10	IL-12	IL-13	IL-15
IL-17	Eotaxin	G-CSF	GM-CSF
INF-	MCP-1	MIP-1	MIP-1
TNF-	TGF-	Cystenyl LT	IL-33

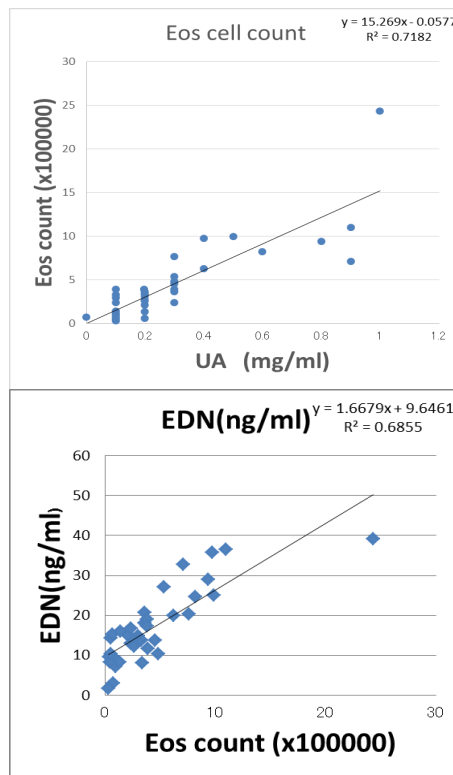
(6)好酸球性肺炎患者のBALF上清中には danger signalであるATP・UAの濃度が上昇している。

当院呼吸器内科に精査加療目的に入院された患者の好酸球性肺炎、過敏性肺炎、サルコイドーシスBAL上の細胞分画におい

て好酸球の割合が25%以上の好酸球性肺炎の患者のBAL上清中において尿酸・ATP濃度は他疾患に比して上昇している事がわかり、クリスタル・レイノルズらが提唱している換算式（BAL(UA/ALB)/Peri (UA/ALB)）を用いてこれらのDanger signalの産生由来について検証し好酸球肺炎の値（比率）は他の2疾患と比し有意に高値であった。あくまでも予測式にて可能性の域を超えないが局所産生であることが予測された。



また、更なる成分比較を行い検出物質における相関性を検証した。結果、好酸球数と尿酸、好酸球数とEDNで正の相関を認めた。他、尿酸とTh2サイトカイン（IL-5、Eotaxin、IL-33）、IL-5と33においても正の相関を認めた。



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)  
 〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) The 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology: APSR 2013, Uric Acid (, a Danger Signal,) Activates Human Eosinophils, T.Kobayashi, et al 横浜, 2013.11.11-14
- 2) The 23<sup>rd</sup> Congress of Interasma / North Asia, Uric Acid(a Danger Signal) Activates Human Eosinophils, Kobayashi, et al 東京, 2013.6.28-29
- 3) 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会、急性好酸球性肺炎における気管支肺胞洗浄液中の尿酸レベルの検討、小林威仁、他 横浜、2013.5.11-13
- 4) 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、内因性 danger signal である尿酸は好酸球の活性酸素産生を誘導する、小林威仁、他 東京、2013.4.19-21

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
 小林 威仁 (KOBAYASHI Takehito)  
 埼玉医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90618266