

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460670

研究課題名(和文) 細胞死を伴う好酸球の脱顆粒メカニズムの解明と病態評価への応用

研究課題名(英文) The mechanisms of eosinophil cell death-associated degranulation and their clinical implications

研究代表者

植木 重治 (UEKI, Shigeharu)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60361234

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)：白血球のひとつである好酸球は、アレルギーの起こっている部位で顆粒蛋白を放出(脱顆粒)し、炎症を慢性化させている。このような組織や分泌液中では、好酸球が脱顆粒を伴って細胞死をきたしていることが知られてきたが、この本態は長い間不明であった。研究の結果、好酸球は過剰な活性化によって顆粒を放出するとともに、核のDNAが網状に放出される(DNA traps)、Extracellular trap cell death(ETosis)と呼ばれる特殊な細胞死をきたすことを明らかにした。さらにDNA trapsは好酸球性副鼻腔炎などの分泌液中に大量に存在し、その強い粘性に寄与していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Eosinophils have been considered end-stage effector cells involved in allergic inflammation through their release of cytotoxic granule proteins. Eosinophil cytolysis is an activated phenotype that has been previously observed in biological specimens from patients with disease, and deposition of free eosinophil granules is readily observed in the affected tissues or secretions from these patients. Using pathological specimen and blood-derived human eosinophils, we reported that activated eosinophils undergo a distinct programmed pathway of rapid non-apoptotic cell death, extracellular trap cell death (ETosis). ETosis involves the cytolytic release of intact granules also in conjunction with filamentous chromatin structures (DNA traps). Further, we showed that ETosis-mediated DNA traps abundantly present in eosinophilic secretions from patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis and contributed to increase their viscosity and chronic inflammation.

研究分野：臨床検査医学、アレルギー学

キーワード：好酸球 アレルギー ETosis DNA traps 好酸球性副鼻腔炎 好酸球性中耳炎 脱顆粒

## 1. 研究開始当初の背景

白血球のひとつである「好酸球」は、血管内から炎症の起こっている部位に遊走反応により移動し活性化する。これにより組織を傷害する顆粒蛋白を放出(脱顆粒)し、アレルギー性炎症を慢性化させている。特に好酸球が関与している難治性喘息、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、好酸球性肺炎、好酸球増多症候群、好酸球性食道炎、好酸球性中耳炎・副鼻腔炎といった疾患は、既存の強力な抗炎症薬であるステロイドにもしばしば抵抗性である。これらの好酸球炎症の病態解明は、新しい治療戦略を確立する点からたいへん重要である。

興味深いことに、これらアレルギー炎症組織や分泌液中では、好酸球が脱顆粒を伴って細胞死をきたしていることが古くから知られ、lytic degranulationと呼ばれてきたが、この細胞死の本態は長い間不明であった。

## 2. 研究の目的

好酸球性炎症において重要かつ脱顆粒機構である lytic degranulation の詳細な機構を明らかにし、さらに実際の好酸球性炎症疾患における意義とその評価を目指す。

## 3. 研究の方法

ヒト末梢血分離好酸球を用いて、lytic degranulation の分子メカニズムを明らかにし、必要となるシグナル機構を明らかにするとともに、遊離した細胞外顆粒の性状と機能分析を行う。

アレルギーの炎症部位における遊離顆粒の評価と病態との関連を明らかにする。

## 4. 研究成果

病理組織と末梢血から分離した細胞を用いて検討を進めた結果、好酸球は活性化に伴って特殊な細胞死(Extracellular trap cell death: ETosis)をきたすことを解明した。

ETosis のメカニズムはカルシウム流入と NADPH oxidase を介しており、核内のクロマチン線維が網状に放出され(DNA traps)、細胞外顆粒を放出する特殊な細胞死であった。この知見は、過剰な好酸球の活性化により ETosis によるプログラムされた非アポトーシス細胞死をきたしうることを初めて細胞と生体レベルで明らかにしたものであり、学会・国際誌等で報告した。生体内では ETosis は lytic degranulation として脱顆粒の重要な形態であり、炎症を増強している可能性が示唆された。

さらに、研究協力者として国内複数の施設の耳鼻科研究者、ハーバード大学と連携をとってサンプルの収集や解析を行った。これにより、ETosis では特に好酸球性副鼻腔炎や中耳炎における分泌液の粘性に関与していることが明らかになり、学会・国際誌に報告し、プレスリリースを行い広く結果を公表した。そのほか、ヒト好酸球における細胞表面受容体による生存能への影響、細胞の遊走や接着のシグナルを明らかにし、国内外で報告した。

## 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12件)

1. Saito H, Honda K, Asaka C, Ueki S, Ishikawa K. Eosinophil chemotaxis assay in nasal polyps by using a novel optical device EZ-TAXIScan: Role of CC-chemokine receptor 3. 査読有 Allergol Int. 2016; Feb 10.
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.

- 査読有 J Allergy Clin Immunol. 2016;137(1):258-67.
3. Konno Y, Ueki S, Takeda M, Kobayashi Y, Tamaki M, Moritoki Y, Oyamada H, Itoga M, Kayaba H, Omokawa A, Hirokawa M. Functional analysis of free fatty acid receptor GPR120 in human eosinophils: implications in metabolic homeostasis. 査読有 PLoS One. 2015;10(3):e0120386.
  4. Itoga M, Konno Y, Moritoki Y, Saito Y, Ito W, Tamaki M, Kobayashi Y, Kayaba H, Kikuchi Y, Chihara J, Takeda M, Ueki S, Hirokawa M. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Agonist Suppresses Airway Inflammation in a Mouse Model of Asthma through IL-10. 査読有 PLoS One. 2015;10(3):e0123210.
  5. Tamaki M, Konno Y, Kobayashi Y, Takeda M, Itoga M, Moritoki Y, Oyamada H, Kayaba H, Chihara J, Ueki S. Expression and functional roles of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) in human eosinophils. Immunol Lett. 査読有 2014: 160(1),72-8 .
  6. Saito Y, Takeda M, Nishikawa J, Konno Y, Tamaki M, Itoga M, Kobayashi Y, Moritoki Y, Ito W, Chihara J, Ueki S. The effect of pharmacological PI3K inhibitor on eotaxin-induced human eosinophil functions. 査読有 Pulm Pharmacol Ther. 2014: 27(2), 164-169.
  7. 植木重治, 今野泰典, 廣川誠 プログラム ムされた細胞死: Extracellular trap cell death (ETosis) と病態. バイオメディカル 2014: 24, 26-30.
  8. Ueki S, Nishikawa J, Konno Y, Tamaki M, Takeda M, Moritoki Y, Chihara J. Eliciting eosinophil CCR3 expression by synthetic retinoids. 査読有 Allergol Int. 2014;63 Suppl 1:67-8.
  9. 植木重治, 今野泰典, 廣川誠. 難治性・好酸球性喘息に対する抗 IL-5 抗体治療. アレルギーの臨床 2014; 34(14), 29-32.
  10. Ueki S, Nishikawa J, Yamauchi Y, Konno Y, Tamaki M, Itoga M, Kobayashi Y, Takeda M, Moritoki Y, Ito W, Chihara J. Retinoic acids up-regulate functional eosinophil-driving receptor CCR3. 査読有 Allergy. 2013: 68(7):953-6.
  11. 植木重治, 今野泰典, 荻原順一. アディポサイトカインとアレルギー. 臨床免疫・アレルギー科. 2013: 60(1), 32-37.
  12. Ueki S, Melo RC, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. (2013) Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. 査読有 Blood. 2013 121(11):2074-83.
- [学会発表](計 23 件)
- 1, Ueki S. Novel Cell death ETosis is a Therapeutic Target for Eosinophilic Disorders. XXIV World Allergy Congress, October 14-17, Seoul (2015)
  - 2, Ueki S, Honda K, Takeda M, Hirokawa M. Cross-talk between adipocytes and allergic inflammation. The 25th Congress of Interasma Japan /North Asia, September 3-4, Japan (2015)
  - 3, 植木重治. 好酸球性ムチンの粘稠性に寄与する DNA traps. 第 54 回日本耳鼻科学会総会・学術講演会, 10 月, 広島(2015)
  - 4, 太田伸男, 鈴木祐輔, 二井一則, 石田晃弘, 中島小百合, 欠畑誠治, 植木重治. 好酸球性中耳炎における eosinophil extracellular DNA trap cell death (EETosis). 第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2 月, 東京 (2015)

5, 植木重治, 今野泰典, 守時由起, 竹田正秀, 山本志緒里, 高木由里, 和田淳, 面川歩, 廣川誠, Peter Weller. 好酸球のETosisにより生じるDNA trapsは微生物を捕捉する. 第55回日本呼吸器学会, 4月, 東京(2015)

6, 植木重治, 今野泰典, 竹田正秀, 守時由起, 中村由夏, 面川歩, 廣川誠, Peter Weller. 分離好酸球のETosisを検出する簡便な実験法の確立第64回日本アレルギー学会学術大会, 5月, 東京(2015)

7, 植木重治, 今野泰典, 竹田正秀, 面川歩, 嵯峨知生, 守時由起, 浅野真理子, 奥田佑道, 佐藤一洋, 佐野正明, 伊藤宏, 塩谷隆信, 廣川誠. 気道粘液中のExtracellular DNA trapsを観察したアレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)の一例. 第49回東北アレルギー懇話会, 7月, 秋田(2015)

8, 太田伸男, 鈴木祐輔, 二井一則, 窪田俊憲, 欠畑誠治, 岡本美孝, 植木重治. 好酸球性中耳炎におけるeosinophil extracellular DNA trap cell death(EETosis). 第49回東北アレルギー懇話会, 7月, 秋田(2015)

9, 植木重治, 今野泰典, 竹田正秀, 中村由夏, 廣川誠, 松脇由典, 太田伸男, 本田耕平. DNA trapsは好酸球性ムチンの粘性亢進に関与する. アレルギー・好酸球研究会2015, 10月, 東京(2015)

10, 中村由夏, 植木重治, 今野泰典, 竹田正秀, 玉木真実, 嵯峨知生, 面川歩, 守時由起, 鎌田由美子, 廣川誠. ヒト好酸球に発現する遊離脂肪酸受容体GPR120の機能的な役割について. 第62回日本臨床検査医学会学術集会, 11月, 岐阜(2015)

11, 植木重治, 今野泰典, 竹田正秀, 中村由夏, 嵯峨知生, 面川歩, 守時由起, 廣川誠. 好酸球性副鼻腔炎・中耳炎の分泌液におけるDNA trapsの存在と役割. 第62回日本臨床検査医学会学術集会, 11月, 岐阜(2015)

12, 小林良樹, 今野泰典, 竹田正秀, 神田晃,

友田幸一, 植木重治. MIP-1の好酸球性気道炎症における機能的役割について. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 5月, 京都(2014)

13, 今野泰典, 植木重治, 千田進介, 玉木真実, 守時由起, 竹田正秀, 廣川誠. 好酸球のETosisによる脱顆粒. 電子顕微鏡による形態学的特徴. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 5月, 京都(2014)

14, 植木重治, 今野泰典, 玉木真実, 竹田正秀, 守時由起, 廣川誠, Weller Peter. 好酸球 Extracellular DNA trapsの機能的特性. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 5月, 京都(2014)

15, 菊池悠太, 植木重治, 今野泰典, 玉木真実, 竹田正秀, 浅野真理子, 佐藤一洋, 佐野正明, 伊藤宏, 廣川誠. 治療により気道液中Extracellular DNA trapsの減少を認めたアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の一例. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 5月, 京都(2014)

16, 植木重治, 今野泰典, 守時由起, 竹田正秀, 千田進介, 面川歩, 廣川誠, Peter F. Weller. アレルギー性炎症部位にみられる好酸球細胞死 - EETosisの特徴. アレルギー・好酸球研究会2014, 10月, 東京(2014)

17, 今野泰典, 山内由美子, 植木重治, 面川歩, 守時由起, 伊藤亘, 小山田一, 廣川誠. ヒト好酸球に対する肝細胞増殖因子(HGF)の細胞外分泌能への影響. アレルギー・好酸球研究会2014, 10月, 東京(2014)

18, 植木重治, 今野泰典, 守時由起, 竹田正秀, 本田耕平, 千田進介, 面川歩, 廣川誠. アレルギー性炎症部位にみられる好酸球細胞死 - EETosisの特性について. 第48回東北アレルギー懇話会, 7月, 山形(2014)

19, 植木重治, 今野泰典, 玉木真実, 守時由起, 竹田正秀, Rossana CN Melo, Peter F Weller. 好酸球のExtracellular DNA trap cell deathにおける形態変化. 電子顕微鏡に

よる検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会, 4 月, 大阪 (2014)

20, 植木重治. 好酸球の ETosis:細胞死により獲得する新たな機能. 第 53 回日本耳鼻科学会総会ならびに学術講演会, 9 月, 大阪 (2014)

21, 植木重治. ETosis 「Extracellular DNA」第 24 回バイオメディカルフォーラム, 12 月, 東京. (2013)

22, 植木重治, 木原純子, 小林良樹, 玉木真実, 今野泰典, 糸賀正道, 竹田正秀, 守時由起, 茆原順一. レチノイドはヒト好酸球の機能的な CCR3 発現を誘導する. アレルギー・好酸球研究会 2013, 6 月, 東京 (2013)

23, Ueki S, Yamamoto R, Moritoki Y, Kobayashi Y, Oyamada H, Konno Y, Tamaki Y, Itoga M, Takeda M, Chihara J. Adiponectin attenuates human eosinophil adhesion and chemotaxis. 8<sup>th</sup> Biennial symposium of the international eosinophil society. July. Oxford. UK. (2013)

24, Ueki S, Melo RCN, Weller PF. Trapping capacity and stability of eosinophil extracellular DNA nets. 8<sup>th</sup> Biennial symposium of the international eosinophil society. July. Oxford. UK. (2013)

25, Shigeharu Ueki, Junichi Chihara, Rossana C.N.Melo, Ionita Ghiran, Lisa A.Spencer, Peter F.Weller Free secretion competent eosinophil granules are produced by eosinophil extracellular DNA trap cell death. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会, 4 月, 東京 (2013)

26, 植木重治, 今野泰典, 守時由起, 竹田正秀, 玉木真実, 糸賀正道, 小山田一, 本田耕平, 茆原順一, Peter. F Weller. ヒト好酸球の Extracellular DNA trap cell death (ETosis) によって放出される細胞外顆粒の特徴. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会, 11 月, 神戸 (2013)

〔図書〕(計 1 件)

1, 植木重治, 茆原順一. 好酸球増多症・好酸球増多症候群. 免疫・アレルギー疾患イラストレイテッド. 田中良哉 (編) 羊土社 (東京) pp350-353(2013)

〔その他〕

講座ホームページ

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~gimclm/index.html>

研究結果のプレスリリース

[http://www.akita-u.ac.jp/honbu/event/img/pro30364\\_01\\_dl.pdf](http://www.akita-u.ac.jp/honbu/event/img/pro30364_01_dl.pdf)

新聞のウェブサイトなど

<http://mainichi.jp/articles/20150618/ddl/k05/040/166000c>

<http://www.asahi.com/articles/SDI201511192638.html>

International Eosinophil Society の記事

[http://www.eosinophil-society.org/UserFiles/file/IESJournalHighlight\\_MM2016.pdf](http://www.eosinophil-society.org/UserFiles/file/IESJournalHighlight_MM2016.pdf)

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

植木重治 (UEKI Shigeharu)

秋田大学大学院・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 60361234