

活性化好酸球におけるCD69の機能的役割の解明

尹泰貴 神田晃 小林良樹 Dan Vui Ban 鈴木健介 澤田俊介 三谷彰俊 Nguyen Manh Linh 朝子幹也 岩井大

関西医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

はじめに

好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis: ECRS) は、喘息を効率に合併する難治性好酸球性気道炎症である¹⁾。疾患の特徴である鼻内に充満する鼻茸組織中には、多数の好酸球の浸潤を認める。炎症局所に浸潤している組織好酸球は、活性化し病態形成に重要な役割を果たしているが、その活性化の程度と病態との関係は不明である。

組織に浸潤した好酸球には血球系の活性化マーカーであるCD69分子が発現している。CD69分子はActivation Inducer Moleculeとして知られているが²⁾、活性化マーカーとしてだけでなく、その機能的な役割にも注目されている。T細胞や血小板などでは、種々のメディエーターの放出に関係している報告があるが³⁾、好酸球においてのCD69分子の機能的役割は十分に解明されていない。

我々は組織に浸潤した活性化好酸球のCD69分子に注目し、その発現と病態との相関解析、および好酸球における機能的役割の解明をおこなった。

対象と方法

1. 対象患者

	non-ECRS	ECRS	P value
Patients, n	8	12	
Age (y), median	45.5±19.7	58.7±10.2	
Male / female, n	3 / 5	9 / 3	
Blood eosinophils counts (/μl)	245.5±151.9	374.8±192.6	
Total IgE	358.5±461.72	761.2±1332.8	
Asthma, n	1	10	P<0.05
Tissue eosinophils counts (/HPF)		227.1±146.6	

各医学倫理委員会承認済み(関西医科大学 承認番号: 1313、医仁会武田総合病院 承認番号: 2016002)

ECRSの診断は、JESREC studyを用いて診断した。ECRS患者より、鼻茸組織(Nasal polyp: NP)と末梢血(Peripheral blood: PB)、非ECRS患者からは末梢血を研究に使用した。

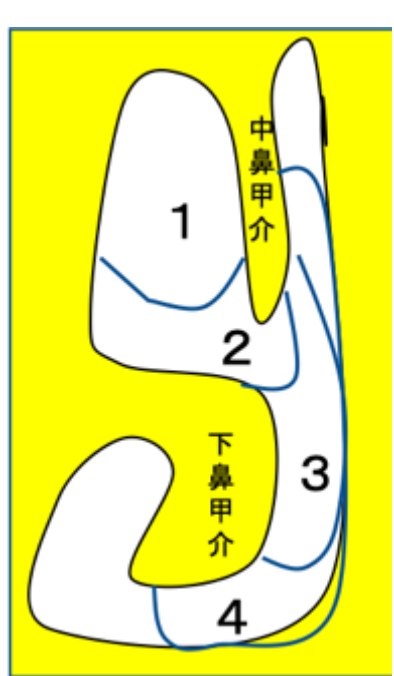
2. 臨床所見

① 鼻茸組織への好酸球の浸潤数

400倍視野 (HPF) での3視野における好酸球の平均数

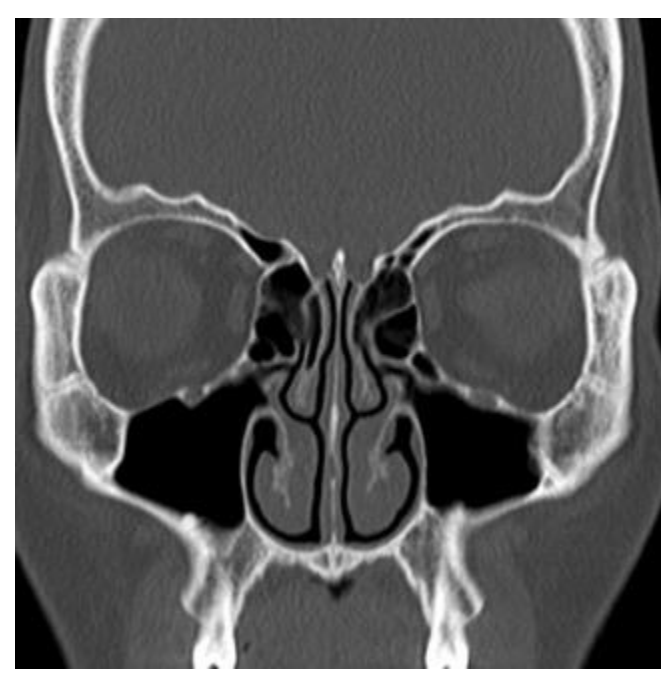
② 上気道所見

・Nasal polyp score



鼻内内視鏡で観察し、両側で点数化

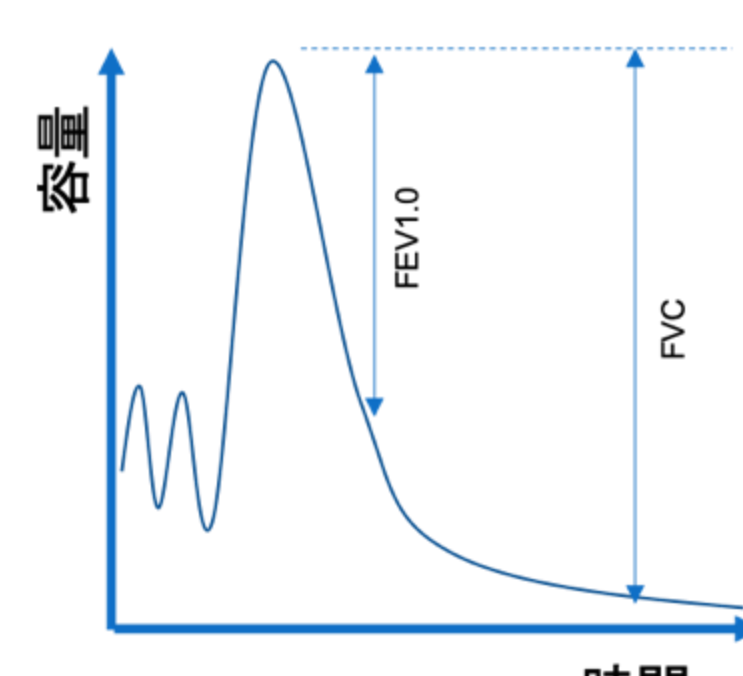
・L-M CT scale



各副鼻腔の陰影を0-2点でスケール化

③ 下気道所見

・肺機能検査



- ・%PEF 努力性最大呼気流量
- ・FEV_{1.0}% 1秒率
- ・%FEV₂₅₋₇₅ 末梢気道抵抗

3. CD69分子発現の解析方法

① 蛍光免疫染色法

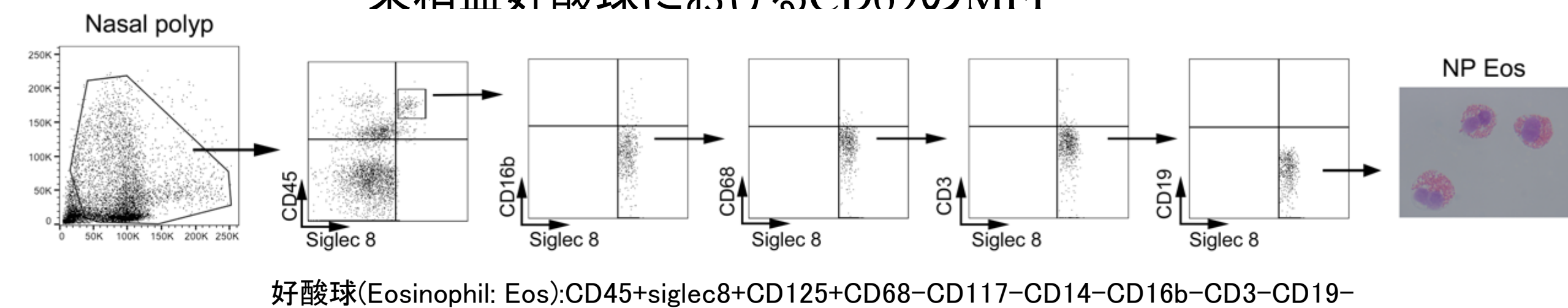
好酸球表面マーカー Siglec 8 活性化マーカー CD69

② Quantitative PCR

③ Flow cytometer

CD69の平均蛍光強度 (MFI) の測定

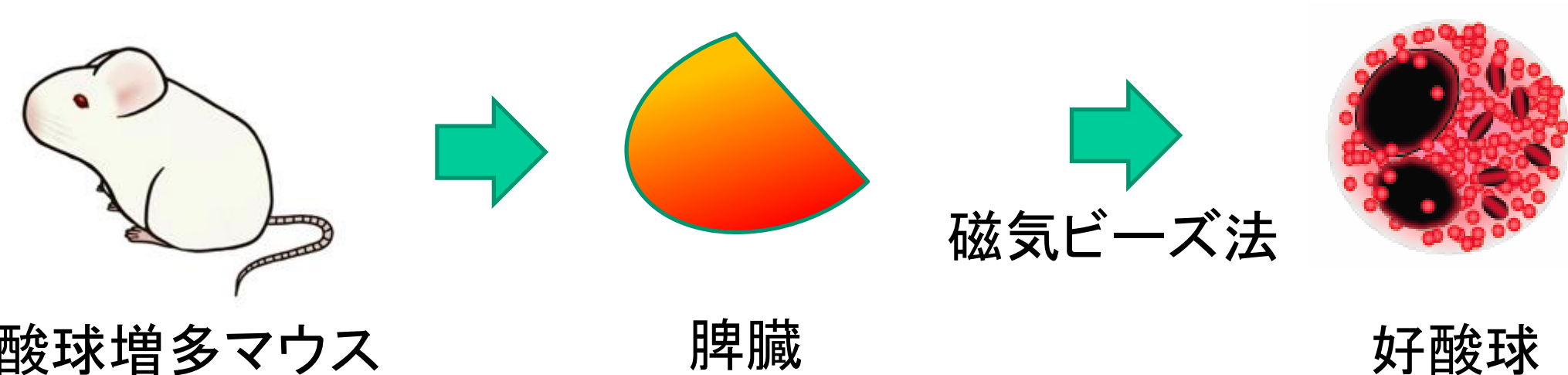
$$CD69 \text{ MFI Ratio} = \frac{\text{組織好酸球におけるCD69のMFI}}{\text{末梢血好酸球におけるCD69のMFI}}$$



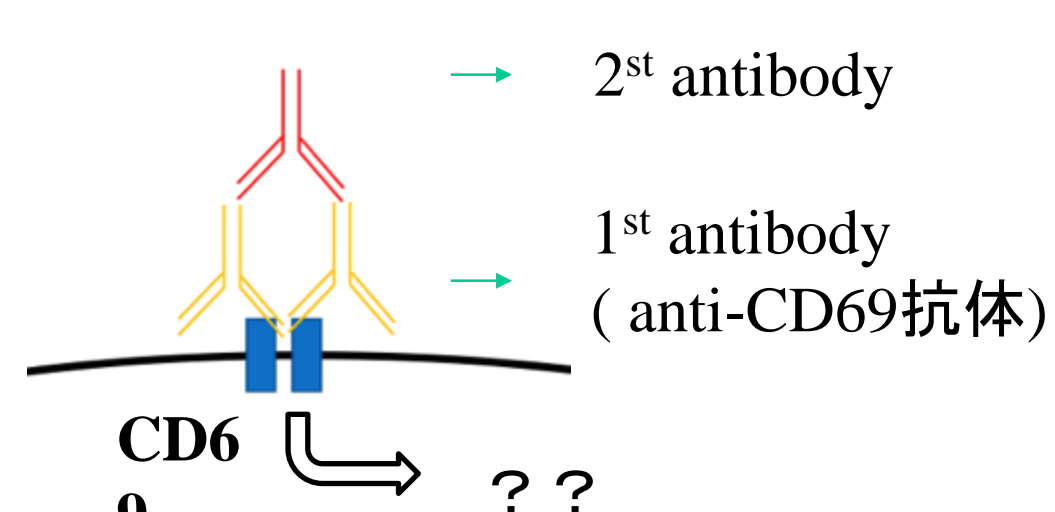
4. CD69シグナルを介した機能的役割の解析方法

① 好酸球単離方法

好酸球増多マウス (IL-5 transgenic mouse) の組織より磁気ビーズ法にて好酸球を単離。



② CD69刺激による好酸球特異的組織傷害性タンパク質 EPXの測定

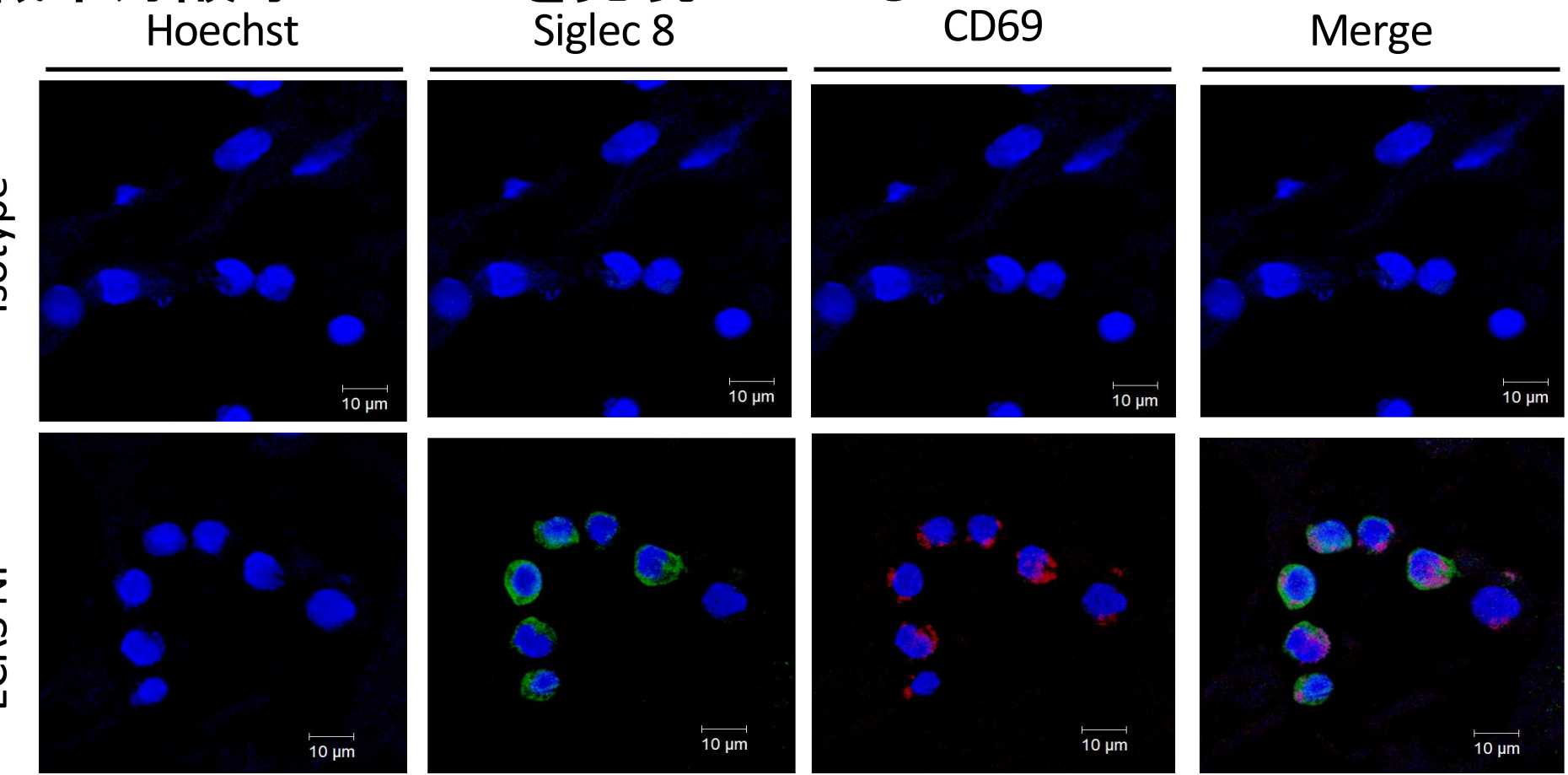


CD69を架橋刺激にて直接刺激し、好酸球特異的組織傷害性タンパク質の放出を測定

学内動物実験委員会承認済み(承認番号: 17-003)

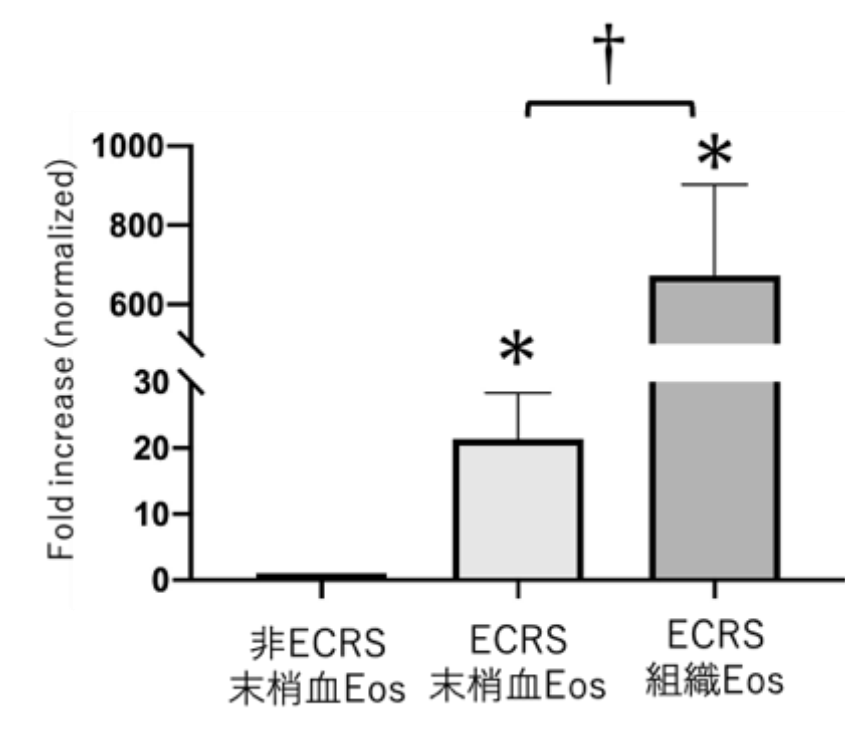
結果

1. ECRS鼻茸組織中好酸球はCD69を発現している



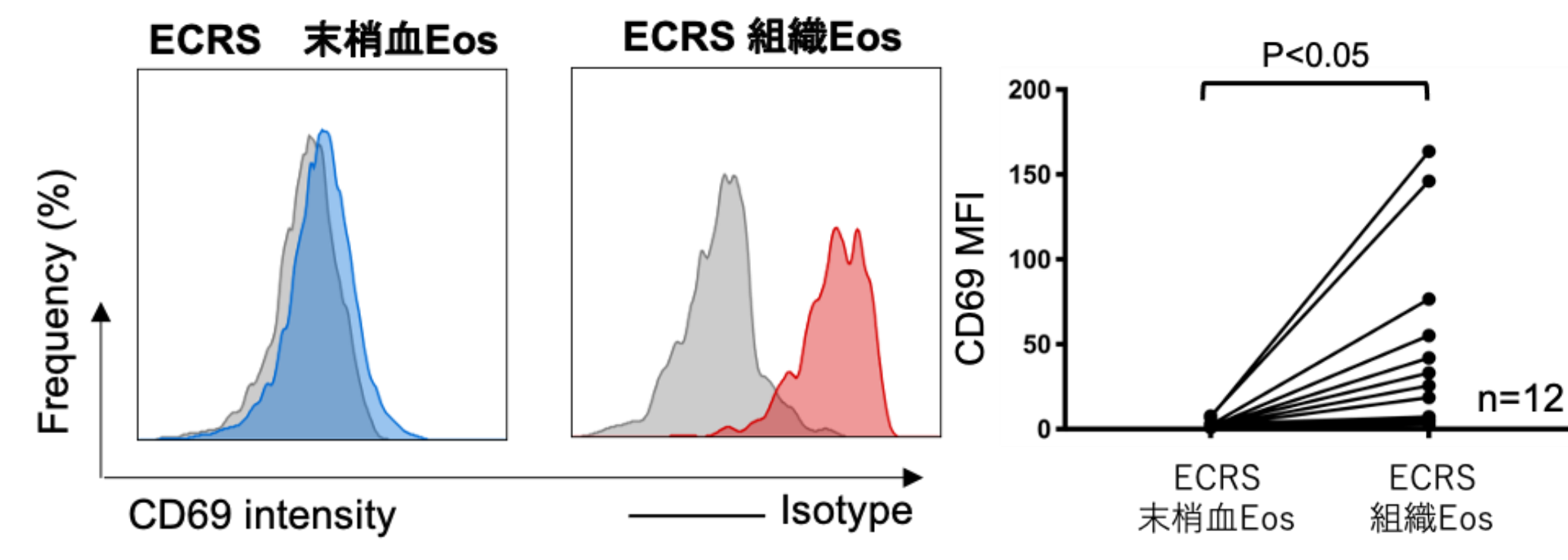
2. ECRS鼻茸組織中好酸球は末梢血好酸球と比べ活性化している。

① CD69mRNA発現



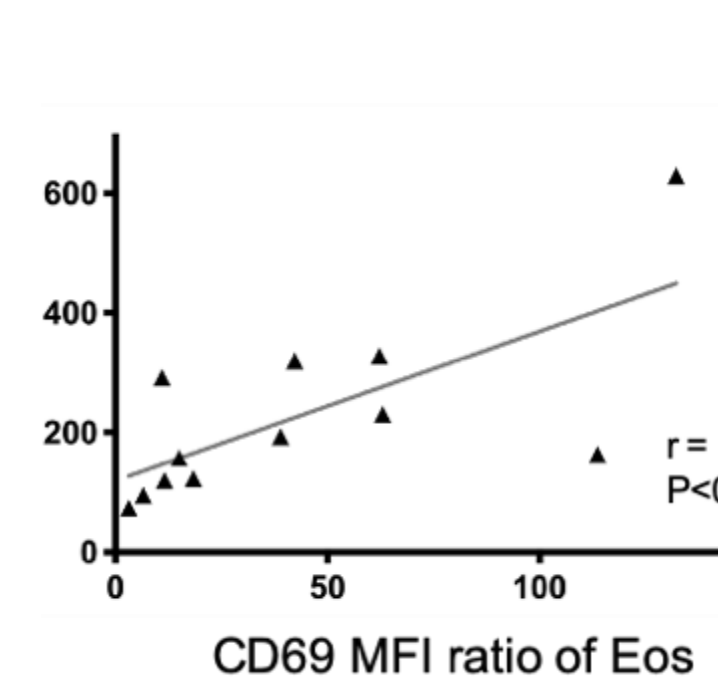
* 非ECRS 末梢血Eosと比較 (* † P<0.05, n=12)

② ECRS患者でのCD69発現

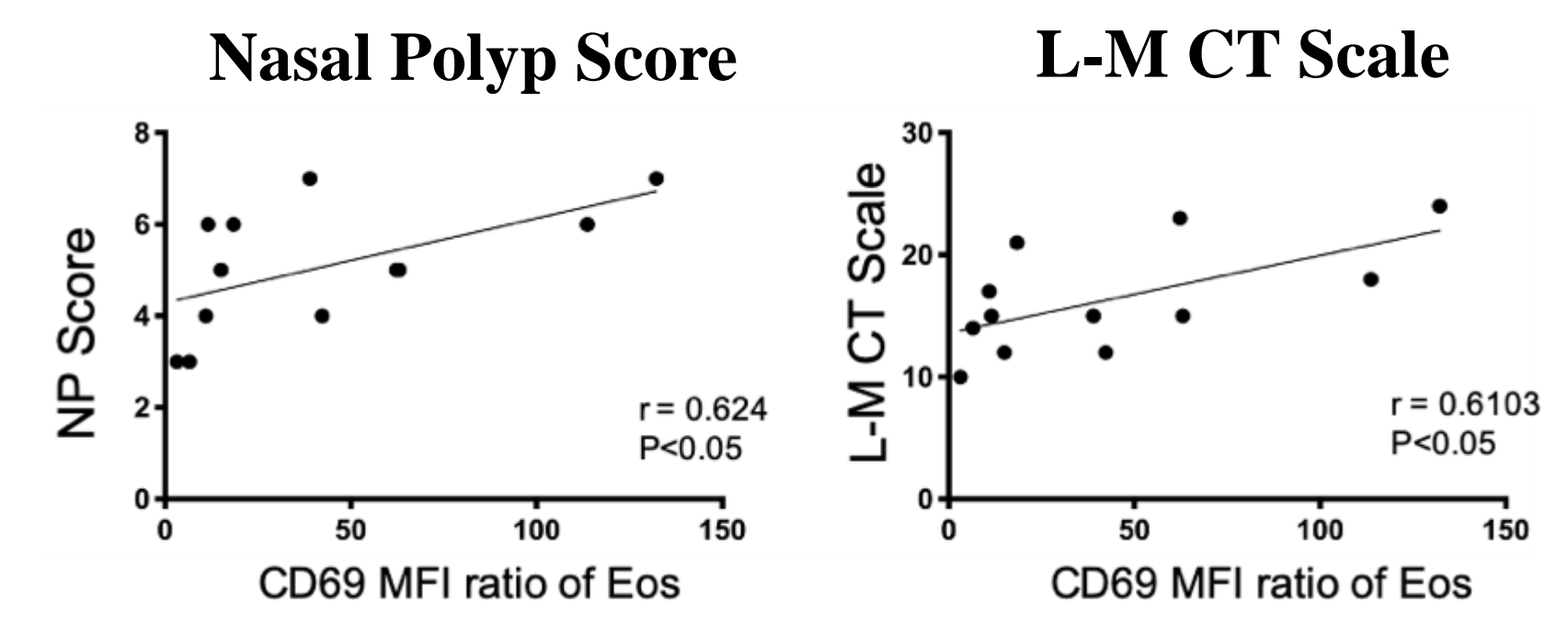


3. 活性化好酸球におけるCD69発現と臨床所見との相関

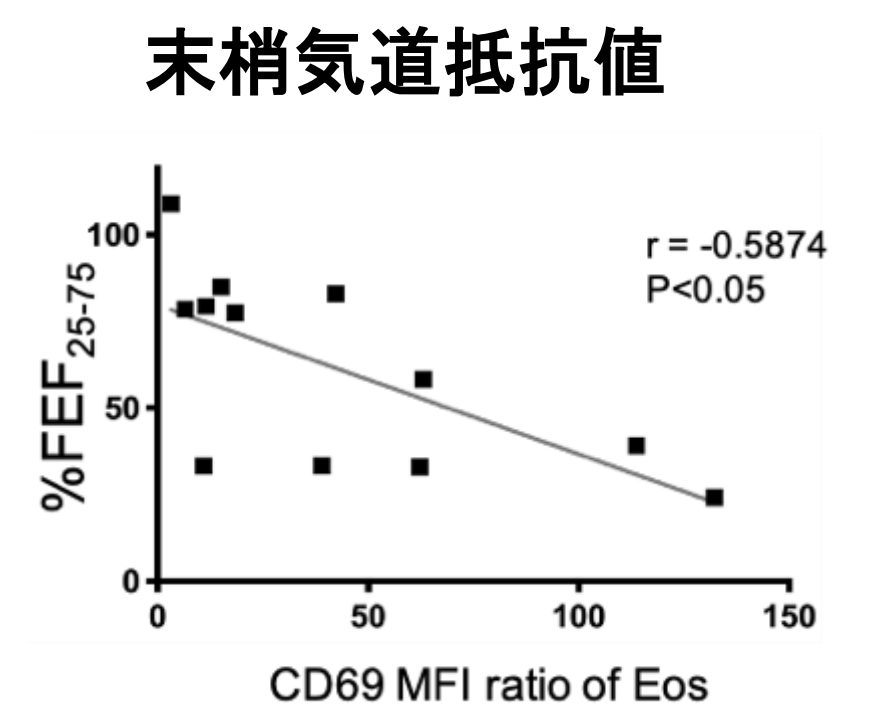
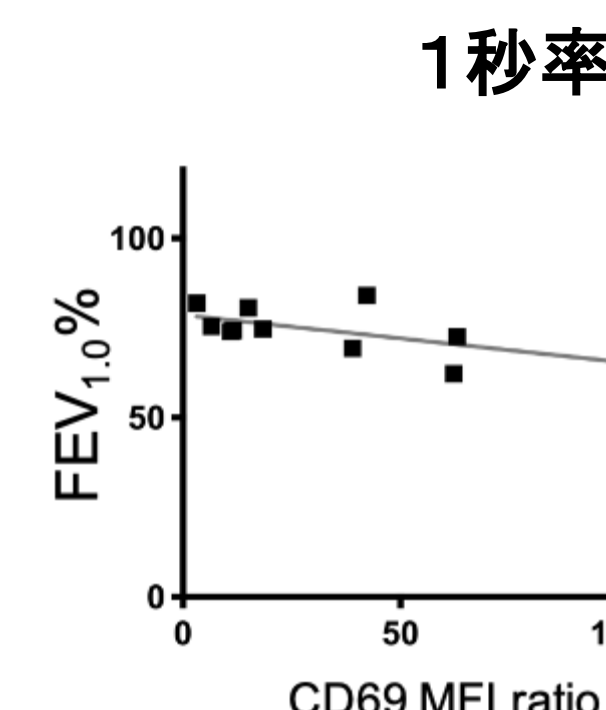
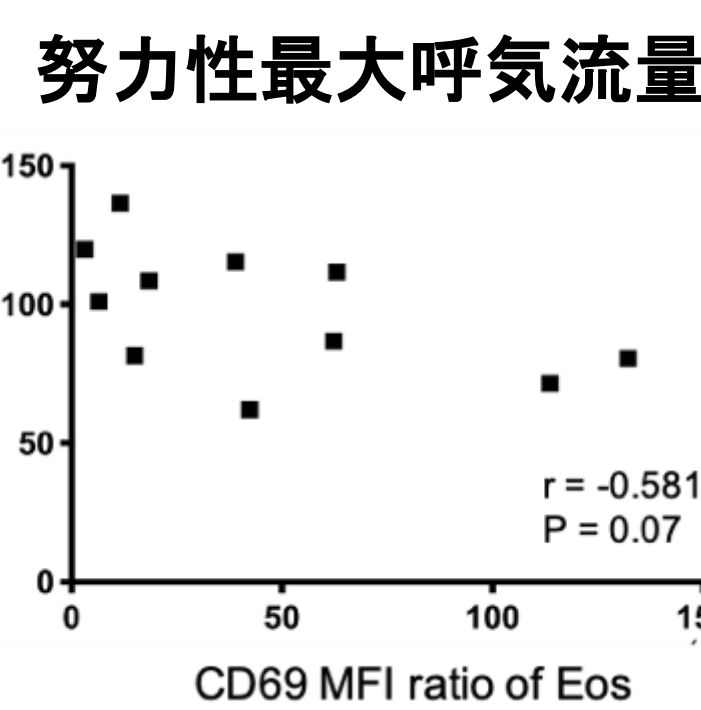
① 組織好酸球数



② 上気道所見

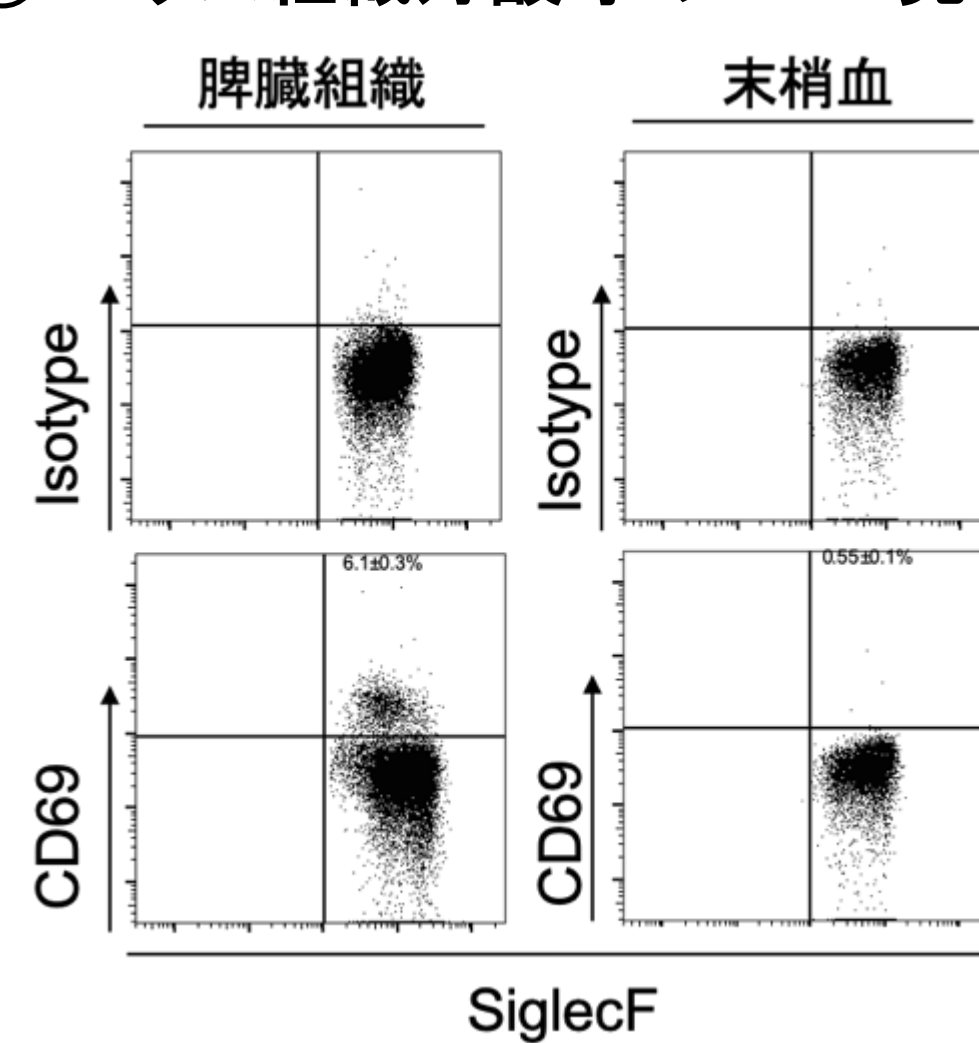


③ 下気道所見 (肺機能)

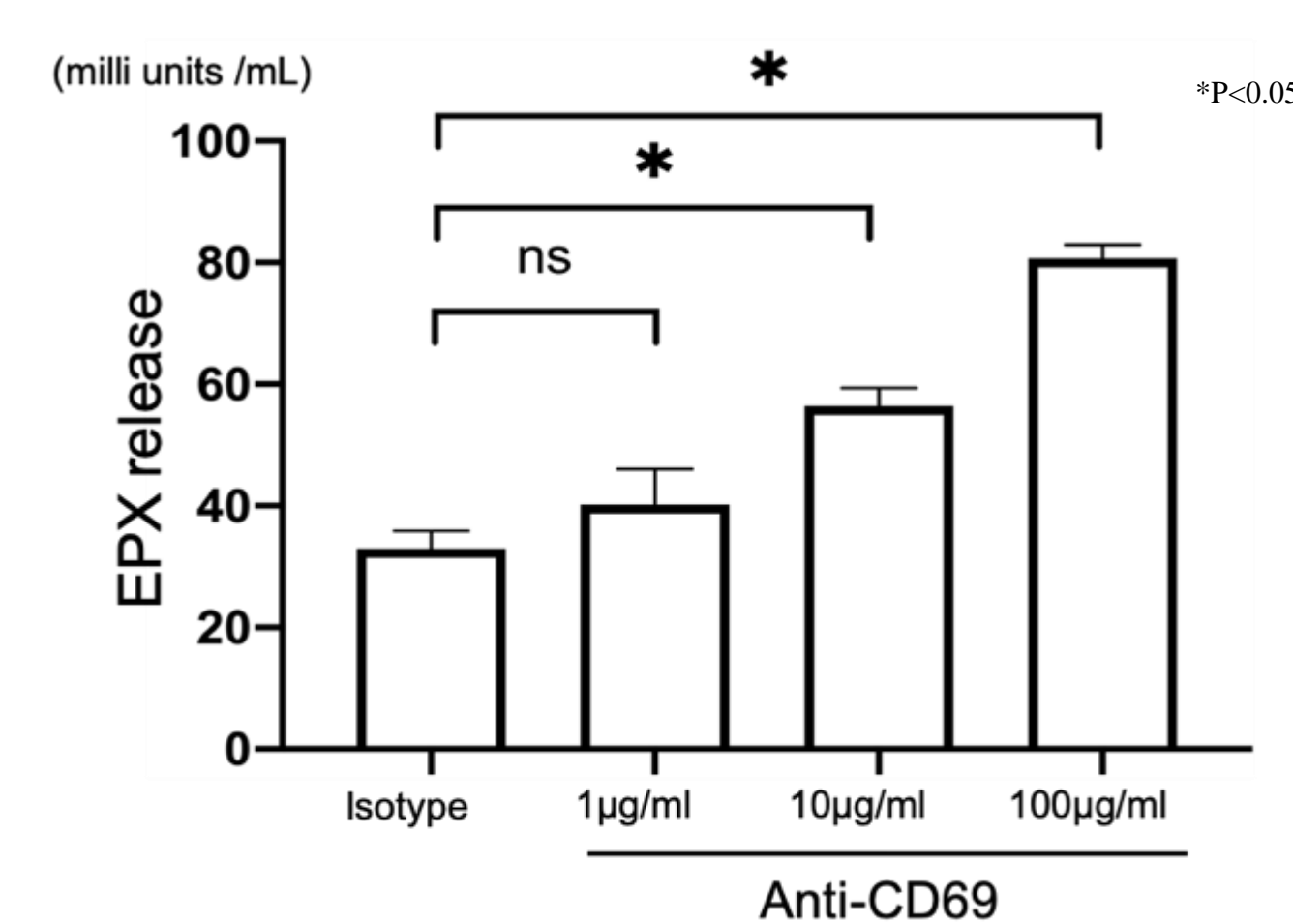


4. 活性化好酸球におけるCD69の組織傷害メカニズム

① マウス組織好酸球のCD69発現



② CD69刺激による組織傷害性タンパク質の放出



考察

CD69分子は白血球の活性化マーカーであるが、鼻茸組織に浸潤した好酸球における発現を評価した研究は今までなかった。我々は、末梢血好酸球と比較して、鼻茸組織に浸潤した組織中好酸球のCD69の発現は同一患者内で増強しており、その増強の程度は呼吸機能と鼻腔内所見と相関関係にあることを見出した。このことは、組織に浸潤した好酸球が活性化することにより、種々の作用により組織障害を引き起こしていること示唆している。さらにはCD69シグナルを介して、好酸球特異的組織傷害性タンパク質であるEPXが放出されることを発見した。

以上より、CD69は活性化のマーカーとしてだけでなく、活性化を制御するための新たな治療ターゲットとなると考えている。

参考文献

- 1) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, Ninomiya T, Tokunaga T, Tsutsumiuchi T, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. Allergol Int 2019.
- 2) Cibrian D, Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. Eur J Immunol 2017;47:946-53.
- 3) Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, et al. Rhinosinusitis: developing guidance for clinical trials. J Allergy Clin Immunol 2006;118:S17-61.

謝辞

本研究は、文部科学省 私立大学ブランディング事業によって施行された。また、下記論文として報告済みである。

Yun Y, Kanda A, Kobayashi Y, et al. Increased CD69 expression on activated eosinophils in eosinophilic chronic rhinosinusitis correlates with clinical findings. Allergol Int 2020;69:232-238.