

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

気道由来 ATP による重症喘息の病態解析とバイオマーカー臨床活用への検討

研究代表者 柚 知行 (大学病院 呼吸器内科)

諸 言

気管支喘息は様々な刺激への応答による慢性アレルギー性気道炎症に起因する、気道過敏性、可逆性気道狭窄をきたす疾患である。喘息のアレルギー性気道炎症は、Th2カスケードを基盤とした免疫応答といえるが、アスピリン喘息や非アレルギー性喘息、難治性喘息に認められるように通常のアレルギー性免疫応答とは異なった機構が病態を修飾していることが明らかとなっている¹⁾。

Th1, Th2, Th17カスケードに代表とされる獲得免疫応答、自然免疫応答以外に、生体のストレスや外傷で誘導される際に、炎症部位から放出されるメディエーターによって炎症を進行させるメカニズムが存在する。この伝達分子はDanger signalと命名されATP, HAGM-1, S100, UAなどが知られている²⁻⁵⁾。これらの中でATPは、好中球遊走の誘導機能のように自然免疫に深く関与していることが示され^{4, 6)}、アレルギー性気道炎症の関連性が報告され始めている。免疫反応の発端となる樹状細胞をATPは分化成熟、遊走させることで一連のTh2カスケードを誘導する⁷⁾。同様に、ATPはCa²⁺流入を介した直接の好酸球活性機能を有し、CD11b発現、活性酸素産生、IL-8産生、脱顆粒させることが明確にされている⁸⁾。当研究室でも、ATPによる好酸球遊走能や接着を誘導することを見出している⁹⁾。また気道上皮においては、アルテルナリアの刺激によるIL-33産生にATPが寄与していることが解明されている¹⁰⁾。

In vivoにおいても、ATPによるアレルギー性気道炎症の誘導、制御に関する研究が報告されている。OVA感作マウスをOVA刺激するとBAL中ATPが増加する。マウス中のATPを阻害すると、メサコリン負荷試験での気道抵抗とアレルギー性気道炎症の全ての特徴を備えた組織、BAL中のT細胞、好酸球浸潤、IL-5、IL-13の増加が消失した。またATP+OVA感作マウスではOVA感作マウスに比較し、アレルギー性気道炎症の増悪を認め、これらの現象が、ATPによる樹状細胞の活性化に続く炎症誘導に起因することが示された⁷⁾。これらの現象はP2Y2レセプター欠損マウスでは認められないことから、ATPはその受容体であるP2Y2レセプターの活性化を介してアレルギー性気道炎症を進展させることが報告されている¹¹⁾。

以上の細胞および実験的動物モデルにおける結果は、喘息患者にも反映されると期待できる。実際、COPDやCystic fibrosisとのATPの関連性が報告されている。COPDの気管支肺胞洗浄液(BAL)ではATPが高値を示し重症度と関連する。また健常者に比較し、COPDの末梢血好中球の遊走能やエラスターゼ分泌、BAL中Mφのサイトカイン産生やMMP(マトリックスメタプロテアーゼ)産生はATPにより亢進していることが解明されている¹²⁾。

現在までにヒトの気管支喘息におけるATPに関する検討はほとんど報告されていない。ATPは既存の免疫経路とは異なる過程を辿り炎症反応を促進させる。今回気管支喘息の病態へのATPの寄与を解明するために、喀痰中のATP濃度を測定し、気管支喘息の臨床像および喀痰中の細胞成分、炎症メディエーターと比較検討した。

対象と方法

当院呼吸器内科、アレルギーセンターを通院する、日本アレルギー学会喘息予防・管理ガイドライン2012¹³⁾の診断基準を満たす気管支喘息患者および健常者を対象とした。適格基準を満たす症例から説明後承諾書を取得し、症例の基本情報取得および誘発喀痰、呼吸機能検査を行った。本研究は埼玉医科大学病院IRB、埼玉医科大学倫理委員会から承認を得ている(IRB承認番号13-083、倫理委員会承認番号788)。

誘発喀痰はヨーロッパ呼吸器学会のタスクフォースに準じて行う。超音波ネブライザーを用いて4.5%食塩水の固定濃度で吸入後、咽喉頭部に絡んだ痰を軽い咳払いをして喀出し集痰した。採取した喀痰は、視覚的観察により唾液部分を除去した後、dithiothreitol (DTT) で処理した。次に遠心し、細胞成分と上清成分に分離した。細胞成分はサイトスピン後メイグムザ染色を行い、各細胞数をカウントした。上清成分は500 μl ~ 1 ml に分注し-70℃で凍結保存した。上清中のATP濃度を市販のEnzyLight™ (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) を使用して測定した。ATPの測定キットでの測定感度下限値は0.1 μMであった。呼吸機能は呼吸機能検査ガイドライン2004に従い、2回測定し最高値を採用した。

統計学的解析は一元配置分散分析を用い、Bonferroni検定法にてpost hoc検定解析した。p < 0.05を有意と判定した。値は平均値 ± SDで示した。

結 果

症例は、喘息 50 名、健常者 15 名であった。患者背景を表 1 に示す。2 群間の年齢、性別、喫煙歴の程度は同様であった。喀痰細胞分画では、健常者群で扁平上皮細胞が多いのに対して、喘息群でマロファージが多かった。また喘息群で好酸球が多い傾向を示した。誘発喀痰検査により喘息症状が増悪した症例は認められなかった。

喀痰中ATPは健常者に比較し喘息で有意に上昇していた(喘息群 379.1 ± 21.9 nM, 366.8 ± 7.9 nM, $p=0.375$, 図1)。また喘息予防・管理ガイドライン 2012 に基づく重症度に分類して解析すると、軽症持続型と中等症持続型では喀痰中ATPに差は認められなかったが、中等症持続型に比較し重症持続型喘息で有意に上昇していた(軽症持続型 372.6 ± 7.3 nM, 中等症持続型 372.0 ± 7.4 nM, 重症持続型 391.5 ± 32.1 nM, $p=0.003$ (中等症持続型 V.S. 重症持続

型), 図 2)。さらに喀痰中ATPは好中球と正の相関関係を示した ($R=0.3$, $p=0.01$, 図 3)。

考 察

本研究では喘息患者の喀痰中のATPを測定し、喘息の気道にはATPが増加し、特に重症の喘息で顕著であることが示された。また喀痰中ATPは喀痰好中球増加と関連していることを見出した。重症喘息では好中球性気道炎症を有する症例が多いことが報告されている¹⁴⁾。本研究に認められた気道中の好中球とATPが連関性を考慮すると、ATPが喘息の重症化に寄与していることが推測される。ATPは活性化好中球の遊走能を制御することが報告されている¹²⁾。さらにLommatzschらの研究ではCOPD患者の喀痰中好中球は、健常者に比較しATPによる遊走能、好中球エラスターゼが亢進していることが報告されている¹²⁾。好中球性気道炎症の関与による喘息の難治化

表 1. 患者背景. $p < 0.05$ を有意差ありとした。値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。N.S.; non specific (有意差なし)

	健常者	喘息	P 値
症例数, (人)	15	50	-
男性/女性, (人)	10/5	34/16	N.S.
年齢, (才)	52.4 $\pm$ 14.1	54.6 $\pm$ 17.1	N.S.
喫煙歴, (有り, 人)	0	5 (10%)	-
喘息重症度, (人)	-	7/25/18	-
(軽症持続型/中等症持続型/重症持続型)			
喀痰細胞比率			
総細胞数, (x 10 ⁵ / ml)	8.1 $\pm$ 9.4	7.7 $\pm$ 7.3	N.S.
扁平上皮, (%)	38.1 $\pm$ 19.6	22.9 $\pm$ 20.7	0.02
好酸球, (%)	1.3 $\pm$ 3.1	8.3 $\pm$ 13.4	0.07
好中球, (%)	55.5 $\pm$ 19.6	49.5 $\pm$ 23.7	N.S.
リンパ球, (%)	1.7 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 6.2	N.S.
マクロファージ, (%)	3.9 $\pm$ 5.3	17.0 $\pm$ 17.7	0.01

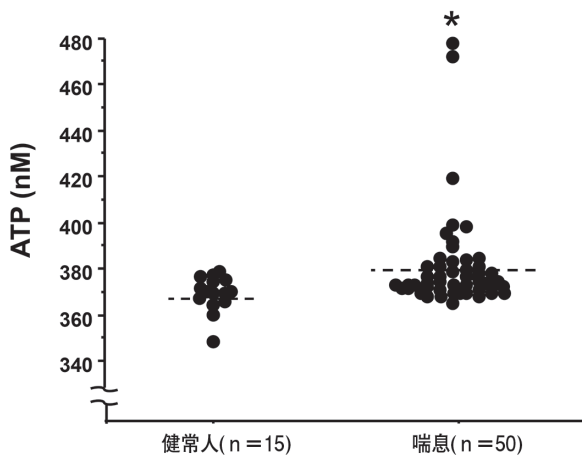


図 1. 喘息患者の喀痰中ATP濃度. *: $p=0.037$, 点線は平均値.

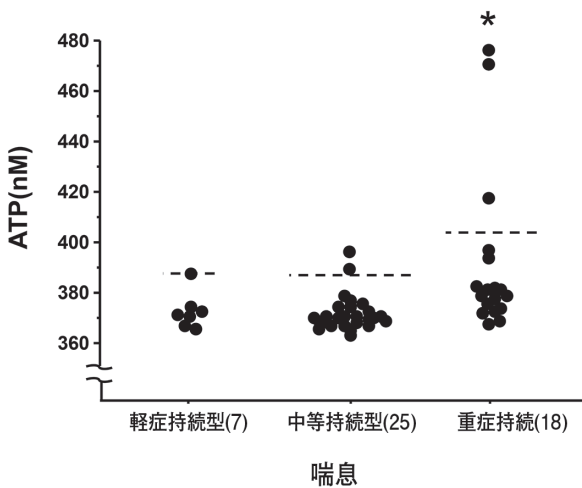


図 2. 重症度別喘息患者の喀痰中ATP濃度. *: $p=0.003$, 中等症持続型V.S. 重症持続型. 点線は平均値.

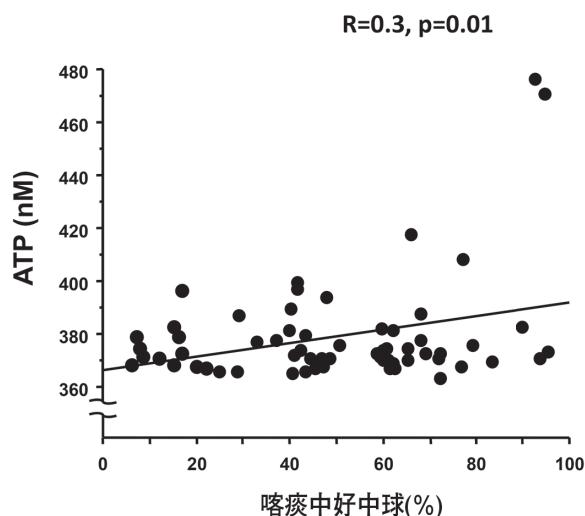


図 3. 喀痰中好中球比率と喀痰中ATP濃度の関係.

は以前より知見が集積されており、喘息においてもATPは好中球を活性化させることで、アレルギー性気道炎症を修飾していると推測される。

ATPの受容体はP2 レセプターである。COPDでは末梢血好中球のP2Y2 レセプター発現が亢進していることが示されている¹²⁾。今後喘息症例でも同レセプター発現が亢進しているかを検討することが課題の一つに挙げられる。また重症喘息に寄与するサイトカイン、ケモカインはまだ明確なものは示されていない。本研究からTh1 やTh17 関連のサイトカインが候補として考えられ、今後の検討していくことは有意義と考えられる。

研究成果リスト

学会発表

The 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 発表予定

参考文献

- 1) Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012; 18(5): 673-83.
- 2) Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5.
- 3) Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425: 516-21.
- 4) Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Junger WG, et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006; 314: 1792-5.
- 5) Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279-89.
- 6) Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 201-12.
- 7) Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Lambrecht BN, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007; 13: 913-9.
- 8) Ferrari D, Sala A, Panther E, Norgauer J, Idzko M, et al. Activation of human eosinophils via P2 receptors: novel findings and future perspectives. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 7-15.
- 9) Kobayashi T, Soma T, Nakamoto H, Kita H, Nagata M, et al. ATP drives eosinophil effector responses through P2 purinergic receptors. *Allergol Int* 2015 (in press).
- 10) Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, O'Grady SM, Kita H. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol* 2011; 186: 4375-87.
- 11) Müller T, Robaye B, Vieira RP, Ferrari D, Idzko M,

- et al. The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 2010; 65: 1545-53.
- 12) Lommatzsch M, Cicko S, Müller T, Lucattelli M, Idzko M, et al. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 928-34.
- 13) 日本アレルギー学会：喘息予防・管理ガイドライン 2012. 東京: 協和企画; 2012. p. 3-7.
- 14) Moore WC, Hastie AT, Li X, Meyers DA, Bleecker ER, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(6): 1557-63.