

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	古川 俊貴
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第 1803 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
博士論文名	Characteristics of eosinophilic and non-eosinophilic asthma during treatment with inhaled corticosteroids (吸入ステロイド治療下における好酸球性および非好酸球性喘息の特徴)
論文審査委員	主査 教授 阿部 理一郎 副査 教授 成田 一衛 副査 教授 菊地 利明

博士論文の要旨

【背景と目的】気管支喘息は多様性のある疾患であり、正確な発現機序を同定することが困難である。気管支喘息は気道炎症プロファイル、すなわち好酸球性気道炎症の有無により好酸球性喘息、非好酸球性喘息に区別される。それらは通常、吸入コルチコステロイド (inhaled corticosteroids; ICS) による抗炎症治療前に診断され、疾患の重症度および治療に対する反応性と関連する。非好酸球性喘息では ICS に対する反応性が低下しているため、喘息コントロールが不良であるとされるが、その免疫学的特徴は知られていない。

調節性 T 細胞 (Treg) は抗炎症性に働き、免疫学的寛容を維持する。一方で、ヘルパー T (Th) 17 細胞は自己炎症およびアレルギー反応の進展において重要な役割を果たす。気道のインターロイキン (IL) -17 の上昇が気道過敏性および好中球増加と相関すること、Th17 細胞が喘息の卵白アルブミン感作マウスモデルにおける寛容の発達を阻害し、治療反応に関与する可能性があることが報告されている。したがって、Th17 細胞と Treg 細胞との不均衡は炎症性およびアレルギー疾患の一因となる可能性があり、この免疫学的プロファイルの同定は、病態生理学的機構を解明するためだけでなく、喘息の新規治療戦略を考案するために重要であると考えられる。

本研究の目的は、ICS 治療下の喘息コントロール状態と、気道および末梢血の免疫学的プロファイルを含む特徴を明らかにすることである。

【方法】新潟大学医歯学総合病院で治療を受ける成人気管支喘息患者 (n=22)、健常対照 (n=10) を対象とし、臨床所見、誘発喀痰中白血球分画および末梢血の T リンパ球プロファイルを検討した。ICS 治療下で、Global Initiative for Asthma (GINA) の定義に基づく "controlled" および "partly controlled" の患者を対象とした。全対象を非喫煙者もしくは 5 pack-years 以下の既喫煙者とした。誘発喀痰および末梢血を同時に採取し、既報に基づき、誘発喀痰全炎症細胞中の好酸球分画 2% 以上を好酸球性喘息、2% 未満を非好酸球性喘息に分類した。末梢血は遠心分離機で単核細胞を分離し、50 ng/ml phorbol myristate acetate, 1 m g/ml ionomycin, 10 m g/ml brefeldin A で 4 時間刺激後、cluster of differentiation (CD)4 で蛍光標識、固定後、IL-17A, interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-4, Foxp3 の各抗体で標識し、フローサイトメトリーを用いて評価した。CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>細胞, CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞, CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>細胞, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞をそれぞれ Th17 細胞, Th1 細胞, Th2 細胞, Treg 細胞とした。統計分析は、パラメトリック検定として  $\chi^2$

乗検定および検定, 非パラメトリック検定として Kruskal-Wallis検定を用い, 好酸球性喘息群, 非好酸球性喘息群の2群間 (末梢血のTリンパ球プロファイルは健常対照を加えた3群間) で比較し,  $p$ 値 $<0.05$ を有意とした。

【結果】臨床所見では, 年齢, 性別, body mass index, 罹病期間, 特異的 IgE 陽性数, The Asthma Control Test スコア, GINA の定義に基づく喘息コントロール状態, 治療内容について 2 群間に差は認められなかったが, 増悪に対する全身性ステロイド使用経験の割合は非好酸球性喘息群で多く (50%対 20%), 救急外来受診経験の割合は有意に多かった (40%対 0%;  $p = 0.027$ )。非好酸球性喘息群において, 誘発喀痰中好酸球分画は有意に低く (0.5%対 22.6%;  $p = 0.001$ ), 好中球分画は高かった (59.5%対 36.5%;  $p = 0.012$ )。末梢血中好酸球分画は非好酸球性喘息群で有意に低かったが (2.4%対 9.2%;  $p < 0.01$ ), 好中球分画に差は認められなかった。呼気 NO 濃度は好酸球性喘息群で高値であり (90.4 ppb 対 38.5 ppb;  $p = 0.037$ ), 気道好酸球増加を反映すると考えられた。血清高感度 CRP 濃度に両群間で有意差は認められなかった。末梢血中の Th17 細胞の割合は健常対照に比し非好酸球性喘息群で増加していたが, 好酸球性喘息群と有意な差は認められなかった。Treg 細胞の割合は 3 群間で差はなかったが, Th17 細胞と Treg 細胞の比は, 好酸球性喘息群と比較して, 非好酸球性喘息群で有意に高値であった (0.24 対 0.13;  $p < 0.05$ )。一方, Th1 細胞, Th2 細胞の割合に差はなく, 非好酸球性喘息における Th17 細胞は, Th1/Th2 バランスとは独立していると考えられた。

【考察】本研究の目的は, ICS 治療下の喘息コントロール状態と, 気道および末梢血の免疫学的プロファイルを含む特徴を明らかにするために実施された。本研究においても, 非好酸球性喘息は増悪の頻度が高い, すなわち喘息コントロールが不良で, 従来のアプローチでは治療困難な, 臨床的に重要なフェノタイプと認識された。

ICS 治療下の非好酸球性喘息群において誘発喀痰中好中球分画の増加が認められた。その理由として, 1 つ目に, そもそも好酸球性気道炎症がなく, 好中球性気道炎症が喘息を引き起こしていること, 2 つ目に, 好酸球性気道炎症が ICS により改善し, それに呼応し好中球性気道炎症が惹起されたことが考えられる。本研究の結果から, ICS 治療下の非好酸球性喘息において, 好中球性気道炎症は喘息コントロールを悪化させる要因であることが示唆される。

非好酸球性喘息群において, 健常対照と比較して末梢血中 Th17 細胞が有意に増加していた。末梢血中の好中球も増加しており, それが気道に動員されることが示唆される。Th17 細胞を移植したマウスにおいて好中球性気道炎症がみられることはよく知られており, ヒトにおいても, Th17 細胞は granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  の放出を介して直接的に好中球を動員する。これらの知見は, 末梢血中 Th17 細胞と, 全身性炎症を伴う非好酸球性喘息との関連性を示唆する。

Th17 細胞と活性化した好中球は自己炎症およびアレルギー反応において相互作用しており, いくつかの研究では, 気管支喘息における気道炎症の制御にそれらを抑制することが重要な役割を果たすことが示唆されている。ICS 非治療下の患者では, ICS 治療下の患者と比較して, Treg 細胞を分化誘導する転写因子である Foxp3 の発現が, 末梢血において少ないことが報告されている。これらの報告から, ICS は Foxp3 を誘導し, 喘息患者の免疫学的バランスを改善させていることが示唆される。好酸球性喘息と非好酸球性喘息では ICS に対する反応が異なり, 非好酸球性喘息においては, ICS による Foxp3 の発現が何らかの機序で減弱している可能性がある。本研究において, CD4<sup>+</sup>細胞における Foxp3 の発現は統計学的に有意でないものの非好酸球性喘息群で少なく, Th17 細胞/Treg 細胞比は好酸球性喘息群と比較して有意に増加していた。気管支喘息におけ

る免疫反応は（特にアレルギー性喘息において）Th17 細胞と Treg 細胞のバランスに左右され、ハウスダスト感作マウスにおいて Th17 細胞/Treg 細胞比が少ないことが気道炎症を改善させることが報告されている。これらの知見から、全身的な Th17 細胞と Treg 細胞のアンバランスが、ICS 治療下でもコントロール不良な非好酸球性喘息の重要な特徴であると考えられる。

#### 審査結果の要旨

本論文は、新潟大学医歯学総合病院に通院中の喘息患者を対象に、吸入ステロイド治療下の喘息コントロール状態と、気道および全身の免疫学的プロファイルの特徴を検討した前向き研究である。吸入ステロイド治療下の喘息患者 22 名、健常対照 10 名から、臨床情報、誘発喀痰および末梢血中の白血球分画、フローサイトメトリーを用いて末梢血のヘルパーT 細胞分画の特性が比較検討された。誘発喀痰中好酸球分画 2%以上および未満で喘息患者を好酸球性喘息群および非好酸球性喘息群の 2 群に分類した。非好酸球性喘息群では、好酸球性喘息群と比較して喘息増悪による救急受診の頻度が高く、誘発喀痰中の好中球分画が増加していた。末梢血のヘルパーT (Th) 17 細胞分画の増加と関連して、Th17 細胞/調節性 T (Treg) 細胞比は非好酸球性喘息群で増加していた。全身性の Th17 細胞と Treg 細胞の不均衡が、気道の好中球性炎症と関連して、吸入コルチコステロイド治療でもコントロール不良な非好酸球性喘息の病態に寄与している可能性が示唆された。本論文は非好酸球性喘息の病態解明ならびに治療戦略の確立に有用な見解を示し、博士論文としての価値に値する。