

氏名・(本籍)	福地 峰世 (宮城県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1054 号
学位授与の日付	令和 3 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Eosinophil ETosis-mediated release of galectin-10 in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における好酸球 ETosis による galectin-10 の放出)

論文審査委員	(主査) 高橋 直人 教授
	(副査) 大森 泰文 教授 河野 通浩 教授

学位論文内容要旨

Eosinophil ETosis-mediated release of galectin-10 in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis

(好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における好酸球 ETosis による galectin-10 の放出)

申請者氏名 福地 峰世

研究目的

好酸球は 2 型炎症に重要な役割を持つ細胞であり、好酸球の脱顆粒のメカニズムは好酸球性疾患の病態解明に重要と考えられる。好酸球の脱顆粒メカニズムには古典的な exocytosis、piecemeal degranulation のほか崩壊型脱顆粒がある。この崩壊型脱顆粒は好酸球の ETosis と呼ばれる細胞死のプロセスであることが明らかとなった。好酸球 ETosis (extracellular trap cell death) とは活性化した好酸球が線維状のクロマチン線維 (Eosinophil extracellular traps :EETs) を細胞外に放出することであり、この EETs が微生物を捕捉し、同時に傷害性のある顆粒を放出することによって好酸球の自然免疫機能を果たしているが、過剰である場合には病的となる。EETs の粘性により好酸球性副鼻腔炎などのアレルギー疾患で分泌物の排出が困難となる可能性が示されている。また、ETosis の過程で好酸球の古典的な病理学的所見であるシャルコーライデン結晶が形成されることも分かっており、ETosis はアレルギー性炎症の病態に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis:EGPA) は好酸球増多を伴う全身の血管炎を特徴とする疾患であり、肺、皮膚、神経、消化器、心臓など多臓器を傷害する。EGPA 患者では好酸球性炎症が病態形成に重要であることが想定されているが、好酸球の脱顆粒様式や好酸球 ETosis との関連を報告した検討はこれまでなされていない。また、これまでに臨床的に好酸球 ETosis を反映するバイオマーカーは知られていない。

研究方法

健康人ドナーから提供された末梢血から、CD16 negative selection 法により高純度分離したヒト好酸球を用いた。ヒト好酸球にそれぞれアポトーシス(抗 Fas 抗体で 48 時間刺激)、ネクローシス (60 度で 7 分熱処置)、ETosis (PMA で 3 時間刺激) を誘導し、透過型電子顕微鏡にて細胞の形態観察を行った。また、末梢血好酸球に同様に細胞死を誘導し、シトルリン化ヒストン H3 に免疫染色を行い、ウエスタンブロッティングを行った。ヒト好酸球に ETosis を誘導するとともに NADPH オキシダーゼ阻害薬である DPI、又はヒストンのシトルリン化に関与する PAD4 を阻害する Cl-amidine にて刺激し、シトルリン化ヒストン H3 にて免疫染色を

行った。末梢血好酸球に ETosis を誘導し、好酸球に特徴的な蛋白である MBP と galectin-10 を免疫染色した。末梢血好酸球に ETosis を誘導した後、細胞上清における galectin-10、EDN、ECP を ELISA 法にて濃度を測定し、cytotoxicity detection kit にて LDH を測定した。続いて EGPA 患者より得られた生検組織にシトルリン化ヒストン H3 による免疫染色、MBP、galectin-10 による免疫染色、さらに電子顕微鏡による観察を行った。また、シトルリン化ヒストン H3 染色を行った同一切片に H-E 染色を行い、比較検討した。また、好酸球増多が認められ、少なくとも一つの臓器障害を認める active EGPA 群と治療後 3 ヶ月以上血管炎による症状がない remission EGPA 群、喘息群、健常群と分けて血清中の galectin-10、EDN、ECP、IL-5 濃度を ELISA 法にて測定し、臨床情報との関連を統計学的に比較検討した。

研究成績

ETosis を誘導した好酸球は電子顕微鏡像で核と細胞膜の崩壊が認められ、シトルリン化ヒストン H3 染色では線維状の DNA (EETs) が染色されたが、アポトーシスやネクローシスを誘導した好酸球ではこれらの特徴は認められなかった。ヒストンのシトルリン化に関与する PAD4 を阻害する Cl-amidine を用いると ETosis は抑制されることが分かった。NADPH オキシダーゼ阻害薬である DPI においてもヒストンのシトルリン化と ETosis は抑制されることから ETosis は活性酸素の産生に依存したヒストンのシトルリン化が関連することが示唆された。ETosis によって細胞崩壊をきたした好酸球に MBP、galectin-10 による免疫染色を行うと MBP のみが染色され、galectin-10 はほとんど染色されなかった。一方、無刺激で細胞死を起こしていない好酸球では細胞内に galectin-10 と MBP が染色される様子が観察された。免疫染色像を数値化して評価するため、galectin-10、MBP で染色された領域の面積を測定し、MBP/galectin-10 比 (Cytolysis index) を算出したところ、ETosis を誘導した好酸球では有意に Cytolysis index が増加した。ETosis を誘導した細胞上清においては galectin-10 濃度、LDH 濃度は著明に上昇する一方、顆粒蛋白である EDN の検出はほとんど認められなかった。EGPA 患者から得られた生検組織では、H-E 染色にて崩壊した好酸球に一致した部分にシトルリン化ヒストン陽性の線維状の EETs を認めた。EGPA の病理組織における MBP、galectin-10 染色では、崩壊した好酸球は MBP のみに染色され、intact な細胞は MBP、galectin-10 いずれも染色された。EGPA 患者の血清の顆粒蛋白濃度、galectin-10 濃度は疾患の重症度スコア (Brimingham vasculitis activity score :BVAS) に伴って上昇していた。血中好酸球数で補正を行うと galectin-10 のみ疾患重症度と正の相関を認めた。血清 IL-5 濃度は active EGPA 群で有意に上昇し、血清 galectin-10 濃度と正の相関が認められた。

結論

EGPA では組織に浸潤した好酸球に ETosis が生じており、炎症局所での好酸球活性化と崩壊型脱顆粒の原因になっていると考えられる。シトルリン化ヒストン H3 染色、MBP、galectin-10 による免疫染色を行うことにより病理組織から比較的簡便に ETosis を検出することができた。active EGPA の患者で認められる血清 galectin-10 濃度の上昇は、末梢血好酸球に影響を受けないバイオマーカーであり、ETosis で認められる細胞内 galectin-10 の放出を反映している可能性がある。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：高橋 直人
申請者：福地 峰世

論文題名：Eosinophil ETosis-mediated release of galectin-10 in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における好酸球 ETosis による galectin-10 の放出)

要旨

著者の研究は論文内容要旨に示すように、刺激した正常好酸球を用いて誘導された ETosis の形態学および galectin-10 の免疫組織学的所見と血清 galectin-10 値を示し、好酸球 ETosis では galectin-10 が細胞外に放出されることを示した。さらに、EGPA では組織に浸潤した好酸球に ETosis が生じていることを証明し、これが炎症局所での好酸球の活性化と崩壊型脱顆粒の原因であり、galectin-10 が好酸球数に影響を受けず EGPA の活動性を反映するバイオマーカーであることを示した。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

好酸球の崩壊型脱顆粒は ETosis と呼ばれる細胞死プロセスであることが最近明らかにされ、アレルギー性炎症の病態に重要な役割を果たしていることが示唆されている。EGPA は好酸球増多を伴う全身性血管炎であり、病態形成に好酸球性炎症が重要であることが想定されていたが、ETosis との関連は今まで不明であり、また疾患活動性を予測し得るバイオマーカーも知られていなかった。本研究は、EGPA の病態における ETosis の関連を初めて示した研究であり、基礎的検討にて得られ ETosis において重要な蛋白である galectin-10 が EGPA 臨床検体においても活動性を示すバイオマーカーであることを明らかにした。以上の点に本論文の斬新さが認められる。

2) 重要性

今まで知られている血清 IL-5 濃度は EGPA の活動性に依存するバイオマーカーであるが、本研究によって見出されたバイオマーカーである galectin-10 は好酸球数に依存せず EGPA の活動性を予測することができる可能性がある。今後、ELISA にて簡便に測定するキットなどができれば臨床応用につながる重要な知見である。

3) 研究方法の正確性

正常好酸球を刺激し誘導された ETosis に対して行った免疫染色を含む電子顕微鏡による検討や HE 染色と同じ切片にて示した免疫染色を示した confocal 顕微鏡所見など極めて繊細で正確な方法に精通しており、その研究方法は洗練されている。臨床検体を用いた組織学的評価でも多数の検体を検討しており、客観的な評価方法で研究の方法の正確性があると判断される。

4) 表現の明瞭さ

これまでの問題点の解決、すなわち EGPA の病態における ETosis の関連と EGPA の活動性を示すバイオマーカーを示すための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔に記載していると考えられる。

以上より本論文は学位を授与するに十分値する研究であると判定された。