

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野))
分担研究報告書

NSAIDs 過敏喘息の病態における炎症性細胞の関与：

1) マスト細胞、2) 好塩基球、3) 血小板、の役割に関する研究

研究代表者	谷口正実	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部	部長
研究協力者	東憲孝	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	特別研究員
	三井千尋	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部	研究員
	三田晴久	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	特別研究員
	梶原景一	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部	研究員
	小野恵美子	ハーバード大学・ブリガムウィミンズホスピタル	研究員
	秋山一男	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	センター長

研究要旨：

1) マスト細胞の関与：我々は過去に、アスピリン喘息におけるアスピリン誘発反応には、好酸球活性化は生じないが、マスト細胞活性化が生じることを証明し報告してきた（CEA2003,2004,Allergy 2004 etc）。しかし、マスト細胞活性化の旧来の指標の増加はわずかであり、本当にマスト細胞活性化が生じているかは十分に解明されていなかった。さらに2010年に我々は新規マスト細胞活性化指標である2,3-dinor-9α11β-PGF₂測定系をまず確立し、旧来の指標以上に新規指標は増加し、その増加とU-LTE₄は強く相関し、アスピリン喘息におけるマスト細胞活性化が証明した(JACI 2010)。しかし、この増加幅は不十分であったため、今回さらなる新規代謝産物を同定し、検討した結果、アスピリン過敏には、マスト細胞活性化が確実に生じてることが確認できた(JACI 2012)これらの成績は国際的にも初めてであり、AIA機序の本質にせまる今後の研究の一助となる。

2) 好塩基球の関与：好塩基球は、その重要性が以前から指摘されながらも、その役割はほとんど不明であった。すでに一般喘息の自然発作時に好塩基球の活性化が生じることを我々は以前に証明したが(JACI 2010) AIAでの関与は不明である。目的：AIAでの好塩基球の関与を安定期と誘発時の末梢血好塩基球活性化指標であるCD203cを用いて明らかにする。結果・考察：我々はすでに一般喘息では安定期でも好塩基球の活性化があり、発作時にはその活性化が有意に顕著になることを過去に示しているが(JACI 2010) AIA安定期では、好塩基球の活性化は認めず、さらにアスピリン誘発時には活性化好塩基球が減少する可能性が示唆された。これらの結果は少なくともAIAでは好塩基球活性化が主病態でないことを示唆している。結論：アスピリン喘息の安定期やアスピリン誘発時に、明らかな好塩基球の関与は認めない。

3) 血小板の関与：アスピリン喘息(AIA)における末梢血血小板上活性化マーカー4種すべてにおいて、非AIAと比較して有意に高値であり、CysLT過剰産生と関連していることが判明した。さらに血小板と好酸球などの顆粒球との付着も有意に増加していることが確認できた。さらに液性因子での血小板活性化も証明できたことから、また非AIAと健常人とは差がなかったことから、AIAでは安定期でも特異的に血小板が活性化し、好酸球などと付着も多く、両者のクロストークにより、CysLTなどの産生亢進、病態形成に関与していると推定された。しかしアスピリン負荷時には、その変動は明らかでなかったことから、アスピリン誘発への直接の関与は不明であった。

以上の成果をまとめると、安定期のアスピリン喘息には血小板活性化が強く特異的に関与しており、特に血小板と顆粒球、好酸球との細胞間作用により CysLT などのメディエーター過剰産生や強い炎症病態に関与していると推定された。しかし好塩基球の関与は無く、マスト細胞はアスピリン誘発時に強く活性化することが初めて明らかとなった。

A．研究目的

1) マスト細胞：喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息（以下 AIA）は COX-1 阻害を有するすべての NSAIDs 投与により、気道収縮反応を誘発する。その反応の主役はマスト細胞と考えられているが、十分な証拠は得られていない。

2) 好塩基球：背景：すでに AIA でのマスト細胞活性化（安定期、アスピリン誘発時）を我々は証明した（JACI2012 など）。また好酸球からの CysLTs は少なくともアスピリン誘発時はほとんど生じていないことを、我々ら（Mita et al CEA 2005）は証明している。その一方で、好塩基球は、その重要性が以前から指摘されながらも、その役割はほとんど不明であった。すでに一般喘息の自然発作時に好塩基球の活性化が生じることを我々は以前に証明したが（JACI 2010）AIA での関与は不明である。目的：AIA での好塩基球の関与を安定期と誘発時の末梢血好塩基球活性化指標である CD203c を用いて明らかにする。

3) 血小板：背景：AIA ではアスピリン 100 mg 以下の低用量 COX1 阻害作用で明らかな発作が誘発される。AIA ではアスピリン投与後に 3 - 7 日間の不応期が全例で生じるが、この現象は誘発反応のなかでも非常に特徴的であり、他の誘発後には認めない。仮説とその発案理由： の背景にもっとも矛盾のない機序として AIA 病態での血小板の関与を推定する。すなわち、低用量アスピリンで COX 阻害されるのは、血小板の COX1 のみである。また血小板 COX1 阻害は一度のアスピリン投与でも数日間効果が持続する。目的：仮説の証明、すなわち AIA の安定期における血小板活性化の証明を行う。

B．研究方法

1) マスト細胞：国立病院機構相模原病院アレルギー科受診患者のうち、病歴から AIA が疑われた 18 名を対象に、診断目的で行われたアスピリン負荷試験を行った。負荷試験の結果、AIA10 名と非 AIA8 名であった。アナフィラキシー（AN）発作群 8 名も同様に検討した。負荷試験前後の尿を用いて、すべて HPLC による精製・抽出後 PGF_{2α}, ent-PGF_{2α} について EIA にて測定した。

2) 好塩基球：対象：AIA14 例も追加検討した（安定期と負荷時）。方法：末梢血好塩基球の CD63、CD69、CD203c の各発現を flow cytometry を用いて測定した。また、anti-IgE, Derp1, IL-3, 15R-MePGD₂ の各刺激に対する反応を測定した。

3) 血小板：対象：負荷試験にて確定診断のついている AIA 30 名と、年齢、性別、重症度をマッチさせた非 AIA 21 例や慢性好酸球肺炎 6 例、健常人 15 例を対象とした。抗血小板薬内服、糖尿病、血栓症、自己免疫疾患、6 週間以内の感染既往は除外した。また一部は負荷試験において下記の項目を経時的に測定した。

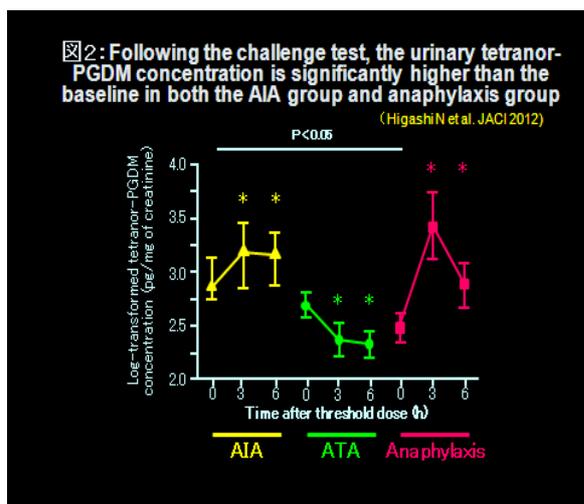
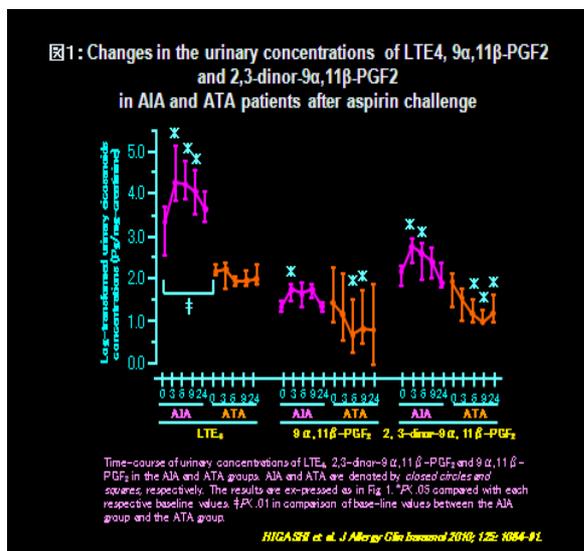
方法：末梢血フリー血小板上の血小板活性化マーカーを FACS で解析、さらに液性因子である末梢血中の血小板活性化指標である sCD40L, sCD62P を測定した。

（倫理面への配慮）

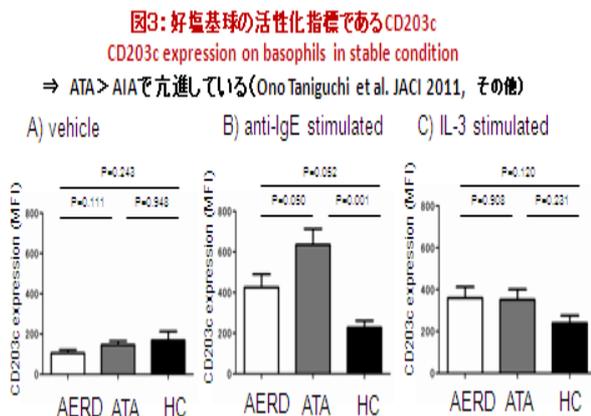
- ・倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報の保護に努める。
- ・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

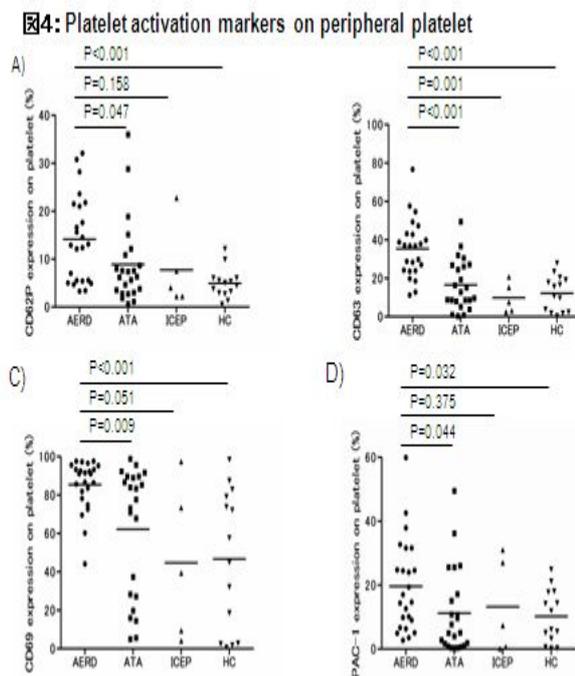
1) マスト細胞：AIA 群においては、2,3-dinor-9 α ,11 β -PGF₂（新規マスト細胞活性化指標で PGD₂ 代謝産物）が著増することが判明した（図 1：JACI2010）。AIA 群も AN 発作群も尿中 LTE₄ や尿中 PGD₂ 代謝産物には有意な正の相関が見られたが、その相関パターンは明らかに異なっていた（JACI2010 図省略）。またさらに高感度新規 PGD₂M の有意増加も証明した（JACI2012 図 2）。



2) 好塩基球:AIA 安定期では、非 AIA に比べ、好塩基球の活性化は認めず（図 3）。さらにアスピリン誘発時には活性化好塩基球が減少し、その活性化はなかった（図省略）。



3) 血小板：アスピリン喘息（AIA）における末梢血血小板上活性化マーカー 4 種すべてにおいて、非 AIA と比較して有意に高値であり（図 4）CysLT 過剰産生と関連していることが判明した（図省略）。さらに血小板と好酸球などの顆粒球との付着も有意に増加していることが確認できた（図 5）。さらに液性因子での血小板活性化も証明できた（図 6）。



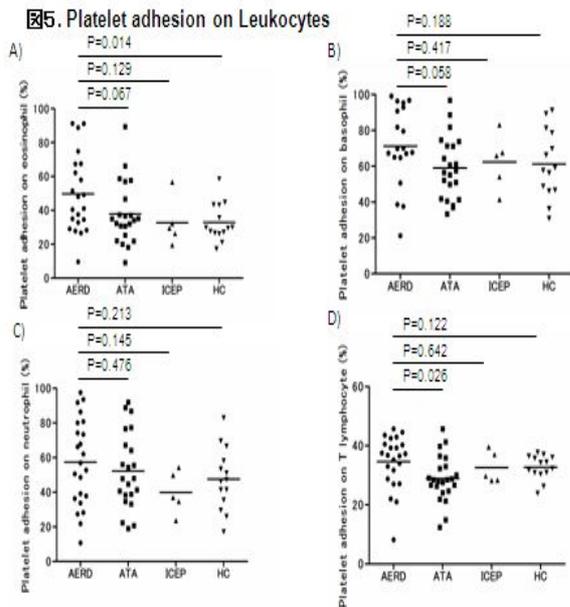
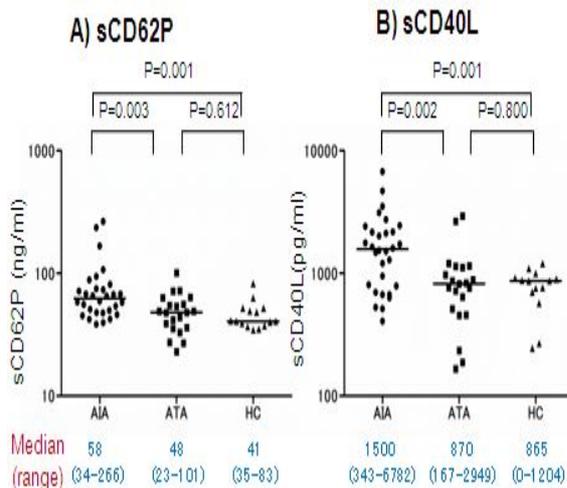


図6: 血小板活性化の液性因子もAIAで増加



D. 考察

1) マスト細胞：アスピリン喘息では、アスピリン誘発時にマスト細胞が活性化し、CysLTs産生の主役であることが証明された。さらに同様の反応を示すアナフィラキシーとは、病態が異なることが証明された。

2) 好塩基球：我々はすでに一般喘息では安定期でも好塩基球の活性化があり、発作時にはその活性化が有意に顕著なることを過去に示しているが (JACI 2010、図示なし) AIA

安定期では、好塩基球の活性化は認めず (図3) さらにアスピリン誘発時には活性化好塩基球が減少する可能性が示唆された (図省略)。これらの結果は少なくとも AIA では好塩基球活性化が主病態でないことを示唆している。

3) 血小板：アスピリン喘息 (AIA) における末梢血血小板上活性化マーカー4種すべてにおいて、非 AIA と比較して有意に高値であり (図4) CysLT 過剰産生と関連していることが判明した (図省略)。さらに血小板と好酸球などの顆粒球との付着も有意に増加していることが確認できた (図5)。さらに液性因子での血小板活性化も証明できた (図6) ことから、また非 AIA と健常人とは差がなかったことから、AIA では安定期でも特異的に血小板が活性化し、好酸球などと付着も多く、両者のクロストークにより、CysLT などの産生亢進、病態形成に関与していると推定された。しかしアスピリン負荷時には、その変動は明らかでなかったこと (図省略) から、アスピリン誘発への直接の関与は不明であった。

E. 結論

1) マスト細胞：アスピリン喘息において、新規バイオマーカーによる検討で、アスピリン過敏反応ではマスト細胞が強く関与していることが証明された。

2) 好塩基球：

アスピリン喘息の安定期やアスピリン誘発時に、明らかな好塩基球の関与は認めない。

3) 血小板：

アスピリン喘息の安定期では特異的に血小板が活性化しており、AIA の基本病態へ関与している可能性が高い。しかし誘発時の関与は不明である。

F. 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

「総合研究報告書」

G . 研究発表 1 . 論文発表 参照のこと

2 . 学会発表

「総合研究報告書」

G . 研究発表 2 . 学会発表 参照のこと

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし