

# 平成24年度-平成26年度アトピー関連脳脊髄・末梢神経障害の病態解明と画期的治療法の開発」分担研究報告書

## 非喫煙喘息死患者における炎症細胞・サイトカインに関する研究

研究分担者 星野 友昭 (久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部門)  
文責者 岡元 昌樹(久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部門)

### 研究要旨

**【目的】**過去の喘息死の報告では、喫煙歴が不明であり、非喫煙喘息死患者の肺、気道炎症のプロセスに関する詳細な報告はない。**【方法】**12人の非喫煙喘息死患者の剖検肺組織(喘息死群)、5人の外科的肺切除後の非喫煙軽症喘息の摘出肺組織(軽症喘息群)、10人の外科的肺切除後の非喫煙者の肺組織(コントロール群)を解析した。喫煙、COPDは厳密に除外した。さらに、各群で肺炎細胞、炎症性サイトカインIL18、IL18レセプター $\alpha$ の発現を評価した。**【結果】**喘息死群において好酸球、リンパ球は他の2群と比べ有意に増加していた。また肺好中球は喘息死群とコントロール群では有意差を認めなかった。CD8陽性T細胞は、喘息死群では他の2群と比べ有意に増加していた。さらにIL-18、IL-18Rは喘息死患者肺組織の炎症細胞、気道上皮細胞、平滑筋細胞において他2群と比べ強く発現していた。**【考察】**好酸球、CD8陽性T細胞、IL-18タンパクの過剰発現は致死的喘息の悪化において重要な役割を果たす可能性があり、また過去の喘息死の報告は、喫煙およびCOPDの影響が否定できない可能性がある。

### A. 研究目的

過去の喘息死に関する報告では、喘息死患者の気道において、好酸球の増加、多量の粘液栓、リモデリングの所見が認められる。更には発症24時間以内に死亡した超急性例では、好酸球浸潤よりも好中球浸潤が優位であることや喘息死患者においてCD8陽性T細胞、IFN- $\gamma$ の発現増加が認められることが報告されている<sup>1,2</sup>。すなわち、CD4陽性細胞やIL-4, 5, 13などのTh2サイトカインの増加が優位である安定期の喘息と異なる気道炎症の環境が存在することが示唆されている。しかしながら、これらの報告では、喫煙歴についての詳細が明らかではなく、COPDの症例が含まれている可能性を否定できない。

IL-18は、IFN- $\gamma$ などのTh1サイトカインの産生を誘導する一方で、Th2サイトカイン、IgEの産生も誘導する<sup>3,4</sup>。我々は、IL-18がCOPD、間質性肺炎、RAの病態に関与していることを明らかにしている<sup>5-8</sup>。アレルギー性気管支喘息においても、平滑筋細胞、気道上皮にもIL-18が発現してい

ること、血清IL-18が上昇していることが示されている<sup>9,10</sup>。また、IL-18の遺伝子多型が喘息の重症度に関連している<sup>11</sup>。さらに我々は、IL-18トランスジェニックマウスにおいて、気道過敏性と気道炎症が亢進していることを証明した<sup>12</sup>。しかし、喘息死の病態におけるIL-18の関与は明らかではない。

今回、我々は、COPDの合併のない非喫煙の喘息死における気道炎症のプロセス、喘息死におけるIL-18の関与を明らかにするため、研究を行った。

### B. 研究方法 対象症例

喘息死群(表1): 12例(男性9名、年齢:44.4 $\pm$ 7.4歳): 1973年から1998年の間に病理解剖を行われた12人の非喫煙喘息死患者肺組織

軽症喘息群: 5例(男性1名、年齢:66.8 $\pm$ 4.1歳): 肺癌切除術を施行された5人のコントロール良好な非喫煙喘息患者肺組織

コントロール群：10例（男性5名、年齢：62.5 ± 4.9歳）：肺癌切除術を施行された10人の非喫煙者肺組織

### 炎症細胞、炎症性サイトカインの解析

炎症細胞：メイ・ギムザ染色にて好酸球、好塩基球、リンパ球、好中球、肺胞マクロファージの定量的評価を行った。

### 免疫染色

抗 CD4 (4B12 [mouse IgG2a], Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)

抗ヒト CD8 (C8/144B [mouse IgG1], Dako)

抗ヒト IL-18 (clone8 [mouse IgG2a])

抗 IL-18 受容体 (H44 [mouse IgG1])

上記モノクローナル抗体にて CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、IL-18 発現細胞を定量的に評価した。

### （倫理面への配慮）

個人情報の尊重、検体の使用に関しては、2008年のヘルシンキ宣言に従い、同意書を取得し、当大学の倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果 (図1~4)

喘息死の気道では、組織学的に粘液栓形成、杯細胞増加、平滑筋過形成などの著明な気道炎症とリモデリングが認められた。全ての症例で組織学的に肺気腫はなかった。

喘息死の気道における好酸球、リンパ球数増加は著明であり、浸潤細胞数のカウントでは、喘息死における好酸球数、リンパ球数は軽症喘息群、コントロール群よりも高値であった。

過去の報告とは違い、喘息死群における好中球の増加は軽度であった。喘息死群における好中球は、コントロール群より有意に増加していたが、軽症喘息群とは差がなかった。

喘息死群、軽症喘息群において、気道におけるCD4陽性T細胞はコントロール群よりも有意に増加していたが、2群間に差はなかった。それに対して、CD8陽性T細胞は、喘息死群では、軽症喘息群、コントロール群よりも有意に増加していた。

気管支肺胞上皮細胞、炎症細胞はIL-18、IL-18受容体が強発現しており、CD8T細胞でもそれらの発現の増加が認められた。

以上の現象は年齢や性別に関係が無く12名のすべての喘息死患者でみられた。喘息死群の12例中5例は発作から24時間以内に死亡していた超急性群であったが、超急性群とそれ以外の症例で炎症細胞数に差はなかった。

表1. 喘息死症例の患者背景

番号	年齢	性別	死亡年	治療						発作からの時間
				全身ステロイド*	ICS	B2刺激薬	テオフィリン	抗LT薬	人工呼吸器	
1	32	M	1973	+	-	-	+	-	-	75 min
2	52	M	1974	+	-	-	-	-	-	5 days
3	5	M	1977	-	-	-	-	-	+	36 hrs
4	67	M	1980	-	-	-	-	-	-	5 hrs
5	43	M	1981	+	-	-	-	-	-	< 24hrs
6	75	M	1982	+	-	-	-	-	-	20 min
7	16	F	1984	-	-	+	+	-	-	DOA (6 hrs)
8	79	F	1986	+	-	-	-	-	+	7 days
9	57	M	1986	+	-	-	-	-	-	unknown
10	14	M	1994	-	-	-	-	-	-	DOA (13 days)
11	24	M	1998	+	+	+	+	-	-	4 days
12	68	F	1998	-	+	-	-	-	+	DOA (7 days)

ICS: inhaled corticosteroid

抗LT剤: 抗ロイコトリエン剤

DOA: death on arrival

図1. 各対象群における気道炎症

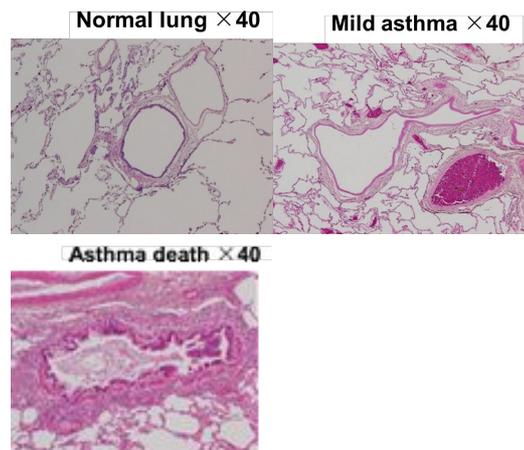


図2. 浸潤炎症細胞数

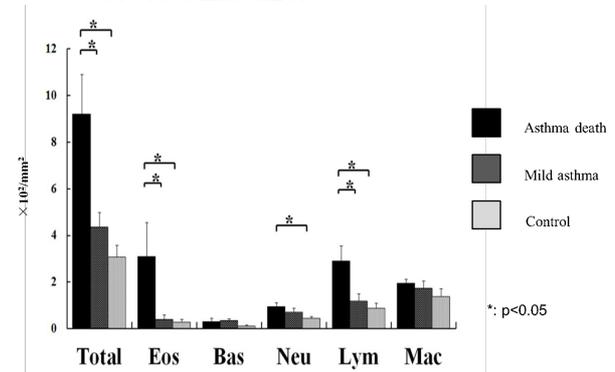


図 3. CD4, 8 陽性 T 細胞数

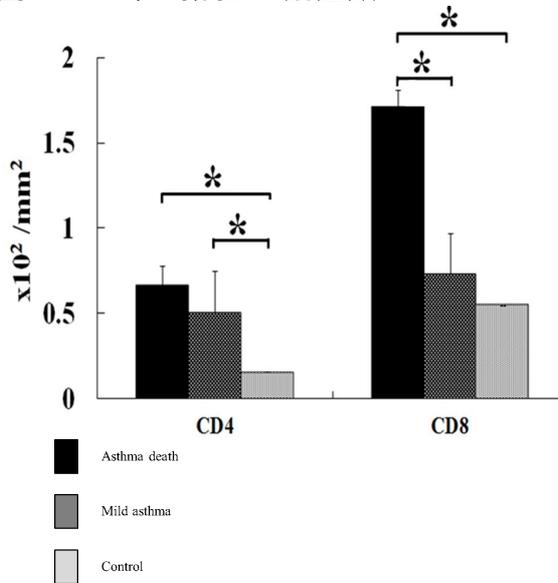
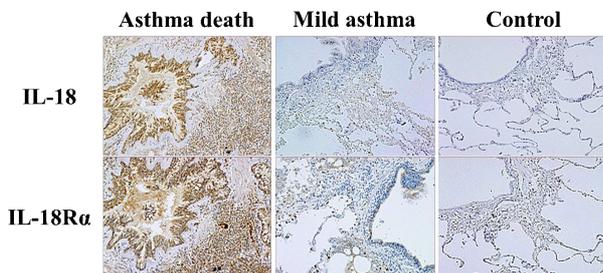


図 4. 抗 IL-18, IL-18 レセプターモノクローナル抗体による免疫組織学的分析



上段: Anti-hIL-18 mAb による免疫染色  
下段: Anti-hIL-18Rα mAb による免疫染色

#### D. 考察

過去の報告と異なり、本研究では喘息死群、軽症喘息群で肺組織中の好中球数の差がなかった。そのため、過去の報告は、喫煙、COPD の関与を否定できない。喘息死における CD8 細胞、IL-18 がなんらかの役割を果たしており、新規治療薬のターゲットとなり得る。さらに喘息死におけるそれらの細胞、蛋白の関与のメカニズムの解析が必要である。

#### E. 結論

喘息死においては、COPD を除外した上で、その病態を解明する必要がある。

#### F. 健康危険情報

問題となる健康危険情報はなかった。

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表 (14件)

1. Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, Ohoka Y, et al. Retinoic acid preve

nts mesenteric lymph node dendritic cells from inducing IL-13-producing inflammatory Th2 cells. *Mucosal Immunol.* 2014;7:786-801.

2. Yamada K, Takeoka H, Mizoguchi Y, et al. Feasibility re-evaluation of 75 mg/m<sup>2</sup> docetaxel in Japanese patients with previously treated non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2014;44:338-345.
3. Takeoka H, Yamada K, Azuma K, et al. Phase I study of carboplatin combined with pemetrexed for elderly patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2014;44:472-478.
4. Takenaka S, Kawayama T, Imaoka H, et al. The progression of comorbidity in IL-18 transgenic chronic obstructive pulmonary disease mice model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445:597-601.
5. Suetomo M, Kawayama T, Kinoshita T, et al. COPD assessment test scores are associated with exacerbated chronic obstructive pulmonary disease in Japanese patients. *Respir Investig.* 2014;52:288-295.
6. Oda H, Kawayama T, Imaoka H, et al. Interleukin-18 expression, CD8 (+) T cells, and eosinophils in lungs of nonsmokers with fatal asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;112:23-28 e1.
7. Kaku Y, Imaoka H, Morimatsu Y, et al. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2014;9:e87400.
8. Kaieda S, Zaizen Y, Nomura Y, et al. An autopsy case of refractory vasculo-Behcet's disease. *Mod Rheumatol.* 2014.
9. Kaieda S, Kobayashi T, Moroki M, et al. Successful treatment of rectal ulcers in a patient with systemic lupus erythematosus using corticosteroids and tacrolimus. *Mod Rheumatol.* 2014;24:357-360.
10. Ishii H, Azuma K, Yamada K, et al. Predictive factors in patients with EGFR mutation-negative non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Oncol Lett.* 2014;8:2699-2704.

11. Ishii H, Azuma K, Kawahara A, et al. Significance of programmed cell death-ligand 1 expression and its association with survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2014.
  12. Azuma K, Ota K, Kawahara A, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014;25:1935-1940.
  13. Azuma K, Komatsu N, Hattori S, et al. Humoral immune responses to EGFR-derived peptides predict progression-free and overall survival of non-small cell lung cancer patients receiving gefitinib. *PLoS One.* 2014;9:e86667.
  14. Azuma K, Kawahara A, Sonoda K, et al. FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor. *Oncotarget.* 2014;5:5908-5919.
2. 星野友昭, 坂崎優樹, 澤田昌典, 小田華子, 竹中慎一, 木下隆, 川山智隆, 相澤久道. 喘息死患者及び COPD における気道リモデリングの類似点と相違点. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010 年 11 月
  3. 坂崎優樹 星野友昭 武井仁子 今岡治樹 木下隆 岡元昌樹 川山智隆 岩永知秋 相澤久道. 喘息死患者の肺病変部における T 細胞サブセットとサイトカイン発現の解析. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京, 2008 年 6 月

## 学会発表

### A . 国際学会 (3件)

1. Sakazaki Y, Hoshino T, Takei S, Okamoto M, Kinoshita T, Imaoka H, Iwanaga T, Kato S, Aizawa H. Inflammatory cells strongly express IL-18 in lungs of asthma death. *ERS Annual Congress 2009, Vienna.*
2. Sakazaki Y, Hoshino T, Kawayama T, Imaoka H, Kinoshita T, Sawada M, Oda H, Takenaka S, Kitasato Y, Iwanaga T, Kato S, Aizawa H. Enhanced expression of IL-18 and increased CD8+ T cells and eosinophils in the airways of asthma death. *ERS Annual Congress 2010, Barcelona.*
3. Sakazaki Y, Hoshino T, Takei S, Okamoto M, Kawayama T, Kinoshita T, Imaoka H, Iwanaga T, Kato S, Aizawa H. Increased CD8 T cells and eosinophils but not CD4 T cells in small airways of asthma death. *ATS Annual Congress 2010, New Orleans.*

### B . 国内学会 (3件)

1. 竹中 慎一、坂崎 優樹、小田 華子、加來庸一郎、松岡 昌信、星野 友昭. 非喫煙喘息死患者の気道における炎症細胞・サイトカインの検討. 2013 年慢性閉塞性肺疾患研究会, 東京, 2013 年 1 月