

# 論文要旨

## Increased expression of TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 3 on eosinophils in Churg-Strauss syndrome

〔 Churg-Strauss 症候群における好酸球細胞は TRAIL receptor3 を多く発現している 〕

三 山 英 夫

### 【背景】

Churg-Strauss 症候群 (CSS) は好酸球増多症と組織内への好酸球浸潤をきたす全身性の血管炎である。好酸球は多くのサイトカインを分泌し組織障害をきたす。組織や血液内における好酸球の長期生存が著明な好酸球増多をきたし、CSS の病態に大きく関与すると考えられる。CSS における好酸球の生存やアポトーシスについてはいくらか報告があるが、その詳細なメカニズムはいまだ不明である。

### 【目的】

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、TRAIL receptor を発現する種々の細胞にアポトーシスを引き起こす。それは多くの腫瘍細胞のみならず、好中球などの non-malignant cell についても知られている。好酸球においても TRAIL receptor の発現が報告されている。しかし、CSS の好酸球における TRAIL の役割はまだ知られていない。我々は CSS の好酸球における TRAIL-TRAIL receptor の役割について研究を行った。

### 【材料と方法】

CSS、喘息、好酸球血症 (寄生虫感染症)、健常人の好酸球における TRAIL receptor の発現を flow cytometry analysis を用いて調べた。これらの四群で血清 TRAIL と TRAIL receptor3 濃度を ELISA を用いて比較し、更に CSS においてステロイド治療前後の血清濃度を比較した。CSS と Wegener 肉芽腫症の生検組織を用いて TRAIL receptor3 の免疫染色を行った。CSS と喘息患者の好酸球に Recombinant TRAIL を加えて培養し、アポトーシスにおちいる好酸球数を比較した。また、細胞内のアポトーシスシグナルの一つである caspase-3 を比較した。自己由来の T リンパ球と好酸球を培養し、T リンパ球の好酸球に対する細胞障害性を CSS と喘息間で比較した。CSS 患者の好酸球をステロイドと培養し TRAIL receptor3 発現の変化を Western blotting を用いて調べた。TRAIL receptor3 siRNA を用いて、CSS 患者の好酸球の TRAIL receptor3 発現をノックダウンし、Recombinant TRAIL による好酸球アポトーシスへの影響を検討した。

## 【結果】

CSS、喘息、好酸球血症(寄生虫感染症)、健常人の好酸球では、すべての TRAIL receptor (R1~4) が発現していた。アポトーシス抑制に働くデコイレセプターである TRAIL receptor3 は、他群と比較して CSS の好酸球において有意に発現していた ( $P<0.01$ )。血清の TRAIL receptor3 濃度は CSS において有意に高く ( $P<0.05$ )、末梢血好酸球数と有意な正の相関を示した ( $P<0.05, r=0.412$ )。CSS と喘息、好酸球血症(寄生虫感染症)の鑑別のための血清 TRAIL receptor3 値の感度は 60.9%、特異度は 94.8%であった (*cutoff serum TRAIL receptor3 value: 841.9pg/ml*)。CSS においてステロイド治療を3ヶ月間行なうと血清 TRAIL receptor3 値は有意に低下した ( $P<0.05$ )。CSS の皮膚組織では浸潤した好酸球が TRAIL receptor3 免疫染色陽性に染まった。一方、Wegener 肉芽腫症の腎病変の炎症細胞では陽性には染まらなかった。血清 TRAIL 値は四群において有意な差はみられなかった。CSS において血清 TRAIL 値は末梢血リンパ球数と有意な正の相関を認めた ( $P<0.01, r=0.521$ )。CSS 治療前後の血清 TRAIL 値は変化なかった。Recombinant TRAIL を好酸球に加えて培養し、好酸球アポトーシスを誘導すると、喘息と比較して CSS ではアポトーシスに落ちる好酸球数が有意に低下していた ( $P<0.01$ )。また、好酸球の caspase-3 level も CSS において有意に低下していた ( $P<0.05$ )。CSS と喘息の T リンパ球では共に細胞表面に TRAIL を発現しており差はなかった。CSS と喘息患者において T リンパ球と好酸球を培養させると、CSS においてアポトーシスに落ちる好酸球が有意に少なかった ( $P<0.05$ )。CSS 患者の好酸球をステロイドと培養すると、TRAIL receptor3 の発現が抑制された。TRAIL receptor3 siRNA を用いて CSS 患者の好酸球の TRAIL receptor3 発現をノックダウンすると、Recombinant TRAIL によりアポトーシスに落ちる好酸球数は有意に増加した ( $P<0.05$ )。

## 【考察】

我々は CSS 患者における好酸球では、アポトーシス抑制的に働くデコイレセプターである TRAIL receptor3 の発現が多いことを初めて報告した。Recombinant TRAIL の投与や、TRAIL 発現 T リンパ球の作用下でもアポトーシスに落ちる好酸球は低下していた。好酸球細胞内のシグナルレベルでも TRAIL 由来のアポトーシスシグナルの低下が認められた。siRNA を用いて好酸球の TRAIL receptor3 発現をノックダウンすると好酸球アポトーシスは増大した。これらの結果より、CSS における好酸球の TRAIL receptor3 の発現増大が、好酸球アポトーシスを抑制し、末梢血や組織内の好酸球増多に関与すると考えられた。CSS の重要な治療薬であるステロイドは好酸球の TRAIL receptor3 の発現を抑制する作用があり、ステロイド投与による好酸球減少の分子学的メカニズムの一つと考えられた。血清 TRAIL receptor3 値は、CSS と喘息または好酸球血症(寄生虫感染)の鑑別において、特異度の高い血清マーカーと考えられた。

好酸球は ECP のような蛋白を放出して組織障害をきたし、CSS の病態において重要な役割を果たすと考えられる。それゆえ、好酸球の長期生存の原因を解明することは重要である。今回我々は、CSS における好酸球増多に TRAIL receptor3 が関与するという新たな知見を報告した。

(Arthritis & Rheumatism 掲載予定)

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第	648	号	氏名	三山英夫
審査委員	主査	丸山征郎			
	副査	出雲周二		黒野祐一	

## Increased expression of TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 3 on eosinophils in Churg-Strauss syndrome

〔 Churg-Strauss 症候群における好酸球細胞は TRAIL receptor 3 を多く発現 〕

Churg-Strauss 症候群(CSS)は好酸球増多症と組織内への好酸球浸潤をきたす全身性の血管炎である。しかし、その原因は不明である。TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)は、TRAIL receptor を発現する種々の細胞にアポトーシスを引き起こす。しかし、CSS の好酸球における TRAIL の役割はまだ知られていない。本研究は CSS の好酸球における TRAIL-TRAIL receptor の役割について解明することを目的としている。

CSS、喘息、好酸球血症(寄生虫感染症)、健常人の好酸球における TRAIL receptor の発現を flow cytometry analysis を用いて調べ、これらの四群で血清 TRAIL と TRAIL receptor 3 濃度を ELISA を用いて比較している。CSS と Wegener 肉芽腫症の生検組織を用いて TRAIL receptor 3 の免疫染色を検討している。CSS と喘息患者の好酸球に Recombinant TRAIL を加えて培養し、アポトーシスにおちいる好酸球数を比較し、また、細胞内のアポトーシスシグナルの一つである caspase-3 を比較している。CSS 患者の好酸球をステロイドと培養し TRAIL receptor 3 発現の変化を Western blotting を用いて調べ、TRAIL receptor 3 siRNA を用いて、CSS 患者の好酸球の TRAIL receptor 3 発現をノックダウンし、Recombinant TRAIL による好酸球アポトーシスへの影響を検討している。

本研究で得られた新知見は次のとおりである。

1. CSS の好酸球では TRAIL receptor 3 が多く発現していた。
2. 血清 TRAIL receptor 3 値は、CSS と喘息または好酸球血症(寄生虫感染)の鑑別において、特異度の高い血清マーカーと考えられた。(感度: 60.9% 特異度: 94.8%)
3. CSS 患者の好酸球では、Recombinant TRAIL の投与にてアポトーシスが起こりにくかった。アポトーシスのシグナル伝達も低下していた。
4. CSS の重要な治療薬であるステロイドは好酸球の TRAIL receptor 3 の発現を抑制した。
5. CSS 患者の好酸球において、TRAIL receptor 3 をノックダウンすると、Recombinant TRAIL の投与で好酸球のアポトーシスが增強した。

好酸球は Eosinophilic Cationic Protein (ECP)のような蛋白を放出して組織障害をきたし、CSS の病態発現において重要な役割を果たすと考えられる。それゆえ、好酸球の長期生存の原因を解明することは重要である。本研究では、CSS における好酸球増多に TRAIL receptor 3 が関与するという新たな知見を報告していた。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 <span style="margin-left: 100px;">648</span> 号	氏名	三山英夫
審査委員	主査	丸山征郎	
	副査	出雲周二	黒野祐一
<p>主査および副査の3名は、平成19年2月28日、学位請求者 三山英夫 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 血清 TRAIL receptor 3 のソースは何と考えていますか。  (回答) CSS 患者の末梢血好酸球数と血清 TRAIL receptor 3 値の間に有意な正の相関が認められており、好酸球の overproduction により血清 TRAIL receptor 3 値が増加したと考えています。</p> <p>質問 2) 喘息などのアレルギー疾患では Th2 産生のサイトカインが関与しますが、CSS では Th1 と Th2 ではどちらにシフトするのですか。  (回答) CSS における Th1 と Th2 のバランス異常については、両者とも増大しているとの報告がありますが、明らかなことは分かっていません。</p> <p>質問 3) ステロイド投与で血清 TRAIL receptor 3 値は低下しているが、好酸球数も低下していますか。ステロイドの治療効果と TRAILreceptor 3 の相関はありますか。  (回答) CSS 患者の好酸球数はステロイド治療によって減少傾向がみられました。臨床症状もステロイド投与で改善傾向がみられ、血清 TRAIL receptor 3 値と臨床症状は相関があると考えました。</p> <p>質問 4) CSS と喘息での好酸球では何が違うのでしょうか。  (回答) 好酸球の細胞障害性のサイトカインの放出する程度などは、CSS と喘息では差があるようですが詳しいことは分かっていません。今後、検討が必要と思われます。</p> <p>質問 5) TRAIL receptor 2 が正常人のみで高く喘息では増加していないようです。TRAIL-receptor 2 について遺伝多型は知られていますか。  (回答) TRAIL receptor 2 の発現が正常人での好酸球の survival を調整しているのではと考えます。遺伝多型についてはよく分かっておりません。</p> <p>質問 6) CSS 患者の年齢がやや高めようですが。  (回答) 一般的には prodromal phase が 20 歳台、eosinophilic phase が 30 歳台で、vasculitic phase は 40 歳台と考えられます。しびれといった common な神経所見での受診が多く高齢になるまで診断がつかなかった可能性が考えられます。</p> <p>質問 7) 一般的に好酸球血症の時に好酸球が作られるメカニズムはどうでしょうか。  (回答) IL-5, GM-CSF による好酸球の増殖分化の誘導等があげられます。</p> <p>質問 8) CSS での骨髄での産生の研究はありますか。  (回答) CSS 患者の骨髄穿刺で eosinophilia がみられたという症例報告はありますが、産生の機序ははっきりしたことは分かっていません。</p> <p>質問 9) 血清中の sTRAIL-receptor 3 は function があるのですか。  (回答) 末梢好酸球数との相関が認められたため、血清中の sTRAILreceptor 3 は好酸球の overproduction によるものと考えています。血清中の sTRAIL receptor 3 値は ELISAKit で測定したため function するものかどうかは分かっておらず、今後検討していきたいと思えます。</p> <p>質問 10) 細胞障害について、CSS では細胞障害性の mediator をリリースしやすい傾向があるのでしょうか。好酸球数と相関しない可能性はないですか。</p>			

(回答) CSS の好酸球が細胞障害性の mediator をリリースしやすいかどうかは不明ですが、長期生存した好酸球が他の疾患の好酸球と比べて新たな機能をもった可能性は考えられます。今後検討したいと思います。

質問 11) CSS は好酸球が原因と考えていますか。

(回答) 電子顕微鏡写真で見られたように好酸球細胞内の mediator を放出することが、血管炎を引き起こす原因であると考えます。

質問 12) CSS 患者の中でも血清 TRAIL receptor 3 濃度が高い人と低い人がいますが。

(回答) そのような視点では着目しておりませんでした。今後、検討したいと思います。

質問 13) CSS 患者の好酸球をラットに投与すると CSS 類似の病態を再現できますか。

(回答) 今のところそういった研究報告はないようです。今後、検討したいと思います。

質問 14) TRIL receptor 3 のノックアウトマウスはありますか。

(回答) 今のところ TRAIL receptor 3 のノックアウトマウスの報告はありません。

質問 15) RANTES, IL-5 の関与はどうですか。

(回答) 今回は提示しておりませんが、CSS 患者の病理組織では好酸球が IL-5 に染まることを確認しました。今回は RANTES の関与は検討しておりませんが、今後、好酸球遊走についてケモカインの関与も検討したいと思います。

質問 16) 長期生存した好酸球が高分化しているのでしょうか。

(回答) TRAIL receptor 3 によって長期生存を獲得した好酸球が高分化し、新たな function を獲得し

他の好酸球増殖性疾患とは違う病態を呈する可能性が考えられますが、はっきりしたことは分かりません。

質問 17) 耳鼻科領域ではアトピー性が多いが、本研究の喘息患者はどうですか。

(回答) CSS 患者さんの多くは非アトピー性の症例がほとんどでした。

質問 18) 本研究における今後の展望はなんですか。

(回答) CSS 血清のプロテインアレイで他にも差が見られた因子があり、それらの検討を行いたいと思います。また、好酸球が CSS の病変部位にどうやって集まるかということについてケモカイン等の関与を検討したいと思います。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた