

主論文

Association between impaired IL-10 production following exposure to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B and disease severity in eosinophilic chronic rhinosinusitis

(好酸球性副鼻腔炎における黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B の刺激による IL-10 産生障害と重症度との関連について)

[緒言]

鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎(CRSwNP)、特に好酸球性副鼻腔炎(ECRS)は難治性の上気道炎症疾患である。その病因についてはまだ未解明なことが多く、その原因としては、外的因子としては細菌、真菌、バイオフィルムなどの微生物コンポーネント、内的因子としてはアスピリン不耐などのアラキドン酸代謝異常などがある。これらの因子は自然免疫、獲得免疫にそれぞれ影響し、上皮バリアの機能障害等と相まって、好酸球性炎症の増悪をきたすと考えら、その結果、鼻茸形成、ムチン産生、薬物療法への耐性、術後の易再発性など臨床的に問題となる難治性の副鼻腔炎をきたすと考えられている。それらの微生物コンポーネントの中でも、黄色ブドウ球菌の外毒素である黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B(SEB)に我々は着目して検討を行った。また、IL-10 はサイトカイン産生の抑制や好酸球のアポトーシスなどに関与する制御性サイトカインとして知られている。今回、我々は、慢性副鼻腔炎における鼻茸分離細胞において SEB により誘導される IL-10 産生を解析し、好酸球性副鼻腔炎における IL-10 の病態への関与や IL-10 による好酸球性炎症の制御についても解析した。

[材料と方法]

患者

本研究では、28 人の日本人の鼻茸を伴う副鼻腔炎(CRSwNP)患者(22 歳-71 歳、平均 56.6 歳)について検討を行った。CRSwNP の診断は、ヨーロッパにおける position paper の副鼻腔炎および鼻茸の診断基準に基づき行った。また、CRSwNP 患者を JESREC(Japanese Epidemiological Survey of Refractory Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis) 基準に基づき、20 人の好酸球性副鼻腔炎(ECRS)、8 人の非好酸球性副鼻腔炎(non-ECRS)に分類した。対照としては、13 人の鼻茸を伴わない副鼻腔炎(CRSsNP)患者(28 歳-77 歳、平均年齢 55.4 歳)を用いた。また、これらの患者における、臨床徴候(末梢血好酸球数、400 倍視野での組織中好酸球数、CT スコア、FEV1.0%)を検討項目として用いた。なお、本研究は岡山大学病院の倫理委員会の承認を得て行ったものである。

鼻茸(NP)細胞と鉤状突起(UT)細胞の培養

鼻茸および鉤状突起は、CRSwNP および CRSsNP 患者よりそれぞれ採取したものと使用した。

鼻茸細胞および鉤状突起細胞は、その鼻茸および鉤状突起組織を酵素で処理を行い 37°Cで 2 時間培養し分離した。これらの分離した細胞($1 \times 10^6/\text{mL}$)を、0.01ng/ml, 0.1ng/ml, 1.0ng/ml の SEB (Toxin Technology, Sarasota, FL)で 37°C、5%CO₂ 下で刺激し培養し、24 時間後、72 時間の培養上清を回収した。鼻茸細胞を、10%の熱で不活化した FCS(Invitrogen, Carlsbad, CA)と L-グルタミン-ペニシリン-ステレプトマイシン溶液(Sigma)を加えた RPMI 1640 溶液中で、5%CO₂ 下、37°Cで 120 分培養を行い、付着細胞と浮遊細胞に分離した。付着細胞はマクロファージや樹状細胞などの CD68 陽性細胞により構成されており、浮遊細胞は T 細胞、B 細胞により構成されている。

サイトカインの検出

IL-10、IL-5、IL-13、IFN-g、IL-17A の濃度を ELISA 法を用いて検出した。

免疫組織化学的検討

組織中の IL-10 の免疫染色は Goat の抗ヒト IL-10 抗体(R&D Systems)と対照抗体(Universal Negative Control, Dako Japan, Tokyo, Japan)を用いて行った。

統計学的検討

群間のデータの比較検討は、ノンパラメトリックの Mann-Whitney U 検定を用い、群内でのデータの比較検討は、Wilcoxon の符号順位検定を用いた。多群間でのデータの検討は、Dunn 検定および Kruskal-Wallis 検定を用いた。相関係数の分析については、Spearman 順位相関検定を用いた。P<0.05 を有意な差と考えた。

[結果]

SEB 刺激による鼻茸細胞、鉤状突起細胞における IL-10 産生

SEB 刺激により 24 時間の培養では、鼻茸細胞からは IL-10 の有意な産生の増加はみとめなかった。一方、72 時間の培養では、1ng/ml の SEB 刺激により、有意な IL-10 産生をみとめた (P=0.045) (Fig. 1A)。さらに鼻茸細胞を付着細胞と浮遊細胞に分離して検討したところ、付着細胞では SEB の存在の有無で IL-10 の有意な産生増加はみとめなかったが(P=0.096)、浮遊細胞においては SEB の存在下で IL-10 の有意な産生増加をみとめた(P < 0.001)(Fig. 1B)。さらには、鉤状突起細胞(n=13)と比較して、鼻茸細胞(n=28)では SEB 刺激により有意な IL-10 産生をみとめた (P=0.003) (Fig. 1C)。このことから鼻茸細胞は SEB 刺激により IL-10 を有意に産生することがわかった。

鼻茸細胞における SEB 刺激で誘導される IL-10 産生の臨床徴候との相関

鼻茸組織中好酸球数と SEB 刺激により誘導された IL-10 産生量は有意な負の相関、すなわち IL-10 産生の少ないものほど、鼻茸組織中の好酸球数が多いという結果となった(r=-0.401, P

=0.029, Fig. 2A)。末梢血好酸球数についても同様の結果となった。すなわち、IL-10 産生の少ないものほど、末梢血中の好酸球数が多いという結果となった($r=-0.464$, $P=0.016$, Fig. 2B)。さらに、JESREC 基準に基づき、好酸球性副鼻腔炎群 (ECRS) (400 倍視野での組織中好酸球数 ≥ 70 , $n=20$)と非好酸球性副鼻腔炎 (non-ECRS) (70 $>$ 400 倍視野での組織中好酸球数, $n=8$)に分けて検討したところ、鼻茸を伴わない副鼻腔炎 (CRSsNP)の鉤状突起細胞と比較して、non-ECRS の鼻茸では SEB 刺激により有意に高い IL-10 産生量のみとめた。一方、non-ECRS の鼻茸と比較したとき、ECRS の鼻茸では、SEB 刺激で IL-10 産生は有意に低いという結果となった (Fig.3A)。副鼻腔炎において、喘息の合併は難治化の要因の一つとされており、呼吸機能との関連について検討した。1秒率と SEB 刺激により誘導される IL-10 産生について検討したところ、有意な正の相関、すなわち、IL-10 産生の多い症例では、1秒率において良好な結果となった ($r=0.465$, $P=0.016$, Fig. 2C)。副鼻腔 CT における陰影の程度のスコアと IL-10 産生量は有意な相関は示さなかった ($r=-0.065$, $P=0.725$, Fig. 2D)。さらに、JESREC 基準に基づき、ECRS を重症度別に分類して検討したところ、重症タイプの ECRS においては、non-ECRS の鼻茸と比較して、IL-10 産生が有意に低いという結果となった ($P=0.022$) (Fig. 3B)。

SEB 誘導サイトカイン産生に対する抗 IL-10 抗体の効果

鼻茸細胞における IL-10 の免疫制御作用をみるために、抗 IL-10 抗体により IL-10 の作用をブロックし、SEB により誘導されるサイトカイン産生について検討した。抗 IL-10 抗体によるブロックにより、IL-13 ($P=0.0036$)、IFN- γ ($P=0.012$)は有意な産生の増強のみとめた。一方、抗 IL-10 抗体によるブロックにより、IL-5 ($P=0.208$)、IL-17A ($P=0.484$)においては、それぞれ有意な産生の増強はみとめなかった (Fig.4)。

鼻茸細胞における局所での IL-10 発現

鼻茸細胞において、IL-10 を免疫染色したところ、鼻茸中の T 細胞、B 細胞、マクロファージ、マスト細胞、好酸球、および好中球など種々の細胞で IL-10 の発現はみとめた (Fig.5)。それぞれの細胞における発現率において、ECRS と non-ECRS では統計学的に有意な差はみとめなかった。

[考察]

昨今の研究で SEB の刺激で鼻茸より IL-10 が産生されると考えられており、今回の研究でも、CRSsNP の鉤状突起細胞よりも CRSwNP の鼻茸細胞において SEB 刺激により有意な IL-10 産生のみとめた。しかしながら、今回の研究では、ECRS の鼻茸において、non-ECRS の鼻茸と比較して IL-10 産生量は有意に少ないという結果となった。加えて、IL-10 産生の少ない症例ほど、鼻茸組織中および末梢血好酸球数が多いという結果や、IL-10 産生の多い症例では、1秒率において良好であるという結果のみとめた。さらには、抗 IL-10 抗体でブロックすることで、SEB 刺激による鼻茸細胞からの IL-13 および IFN- γ の産生は有意に増加した。IL-10 は好酸球性気道炎症を制御し抑制する重要なサイトカインであるが、今回の結果からは、SEB への長期の暴露によって、鼻茸組

織において IL-10 産生障害が起こり、このことが好酸球性炎症の増悪に関与し ECRS の病態に密接な影響を与えている可能性が示唆された。すなわち、IL-10 は鼻茸における免疫制御に一役買っており、IL-10 が炎症に対するカウンターレギュレーターとして好酸球などの炎症細胞の働きを抑制するという役割を担って炎症を制御していると考えられるが、ECRS の鼻茸では、IL-10 の産生障害が起こっており、IL-10 による免疫制御が障害されるとともに、炎症性サイトカインとの不均衡も生じ、好酸球性炎症が増悪する可能性が示唆される。ECRS の鼻茸において IL-10 産生の阻害が起こる理由については未解明なところが多く、また今回の研究では、IL-10 産生細胞は T 細胞、B 細胞により構成される浮遊細胞だと考えられたが、SEB 刺激による浮遊細胞における IL-10 産生障害が ECRS の病態と関わっているかどうかは今後の検討課題と考える。

[結論]

SEB への暴露による鼻茸組織における IL-10 産生障害が好酸球性副鼻腔炎の病態および気道炎症の増悪に関与する可能性がある。