

# 博士論文

---

論文題目      アスピリン喘息の病態解明に向けて

氏 名              三井 千尋

## 目次

目次	1
要旨	3
序文	4
方法	14

アスピリン喘息安定期における血小板活性化指標の検討

アスピリン負荷試験時における血小板活性化指標の検討

アスピリン喘息安定期における好塩基球上の CD203c 発現率の検討

アスピリン負荷試験時における好塩基球数および好塩基球上の CD203c 発現率の推移の検討

統計

結果	26
----	----

アスピリン喘息安定期における血小板活性化指標の検討

アスピリン負荷試験時における血小板活性化指標の検討

アスピリン喘息安定期における好塩基球上の CD203c 発現率の検討

アスピリン負荷試験時における好塩基球数および好塩基球上の CD203c 発現率の推移の検討

考察	32
----	----

略語リスト	41
引用文献	43
図表	63

## アスピリン喘息患者の病態解明に向けて

所属： 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター (論文博士課程)

指導教員名： 山本 一彦 (アレルギーリウマチ学)

藤尾 圭志 (アレルギーリウマチ学)

申請者名： 三井 千尋

## 要旨

アスピリン喘息 (Aspirin-exacerbated respiratory disease; AERD) は、Cysteinyl leukotrienes (CysLTs) 過剰産生を主病態とするが、その機序は完全には解明されていない。今回私は血小板および好塩基球の活性化指標を解析し、それらの細胞の AERD 病態への関与を検討した。その結果、喘息安定期の AERD 患者では非アスピリン喘息 (Aspirin-tolerant asthma; ATA) 患者と比較して有意に血小板の活性化が認められ、尿中 Leukotriene E<sub>4</sub> (uLTE<sub>4</sub>) 値や肺機能と相関関係を示した。一方、好塩基球上の活性化指標である CD203c 発現は ATA 患者と比較して亢進しておらず、好塩基球は AERD の病態に大きく関与していないと推測された。本研究結果は AERD の病態理解に貢献し、新規治療開発の一助になると考える。

## 1. 序文

### 1.1 アスピリン喘息 (Aspirin-exacerbated respiratory disease; AERD)

アスピリン喘息 (Aspirin-exacerbated respiratory disease; AERD) は中等度～重症喘息、慢性好酸球性副鼻腔炎、Cyclooxygenase (COX) -1 (COX-1) 阻害薬過敏を3徴とし、Cysteinyl leukotrienes (CysLTs) 過剰産生が主病態である (1)。従来はアスピリン喘息 (Aspirin-intolerant asthma; AIA) と称されてきたが、喘息のみでなく上気道症状も伴う事、アスピリン以外の NSAIDs にも反応する事より、近年は AERD もしくは NSAIDs 過敏喘息 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs-exacerbated respiratory disease; NERD) と呼称されることが多い。本症は成人喘息の 5～10% を占め、男女比は 1 : 2 と女性に多く、家族内発症は 1～6% 程度にとどまる。多くは 20～40 歳代に鼻炎や喘息を発症し、その後好酸球性副鼻腔炎を合併、ほぼ同時期にアスピリン不耐症を獲得するのが典型的である。好酸球性副鼻腔炎は 90% 以上の患者で合併するが、時に好酸球性中耳炎、皮膚症状、腹部症状、狭心痛などの随伴症状を呈する事がある (1-3)。さらに、AERD は成人喘息における難治化因子として知られ、TENOR study によると、AERD は非アスピリン喘息 (Aspirin-tolerant asthma; ATA) と比較し低肺機能であり、気管支拡張薬吸入後も低肺機能を示す持続的気流制限 (Persistent airflow limitation; PAFL) が認められる (4)。

AERD の主病態としてアラキドン酸代謝産物の炎症性メディエーターと抗炎症性メディエーターの不均衡が存在し(Figure 1)、AERD の尿、唾液、喀痰、呼気凝縮液にて CysLTs 高値を認める (5)。尿中 Leukotriene (LT) E<sub>4</sub> (uLTE<sub>4</sub>) 値は喘息安定期 AERD では ATA と比較して約 3 倍高値である (6, 7)。さらに AERD ではアスピリン誘発後に uLTE<sub>4</sub> 値がベースラインから数倍～数十倍に上昇する (6)。また、喘息重症 AERD の方が、喘息非重症 AERD よりも uLTE<sub>4</sub> 値は高値となりやすく (8)、CysLTs 過剰産生は AERD における喘息重症化にも関与していると考えられる。AERD における CysLTs 過剰産生の機序は不明であるが、AERD の気管支生検では好酸球およびマスト細胞における LTC<sub>4</sub> synthase (LTC<sub>4</sub>S) の発現亢進がみられ (9)、末梢血好酸球でも LTC<sub>4</sub>S の messenger RNA (mRNA) を多く含む事が知られている (10)。Sanak らは AERD における LTC<sub>4</sub>S の遺伝子多型を報告したが (11)、私の属するグループの報告では否定的であった (10)。さらに AERD の特徴として、ベースラインでの CysLTs 過剰産生のみでなくマスト細胞から主に産生される prostaglandin (PG) D<sub>2</sub> metabolite (PGD<sub>2</sub>M) の高値を認め、CysLTs および PGD<sub>2</sub>M はアスピリン誘発によりベースラインから更に上昇する (12-14)。アスピリン誘発時には CysLTs, PGD<sub>2</sub>M の他にトリプターゼやヒスタミンも上昇する事より、アスピリン誘発にはマスト細胞が大きく関与していると考えられてきた (15)。一方最近の報告で、

AERD 患者では ATA 患者および健常人と比較して、副鼻腔組織中の好酸球や末梢血好酸球において hematopoietic PGD synthase (hPGDS) の発現が亢進しており、AERD 由来の好酸球ではアスピリン刺激により  $\text{PGD}_2$  が多く産生される事が示された (16)。

AERD では炎症性メディエーターの過剰産生のみではなく、 $\text{PGE}_2$  や Lipoxin (LX) などの抗炎症性メディエーターの産生低下も見られる (17-19)。私の属するグループでは、AERD 患者の尿中  $\text{PGE}_2$  値が ATA 患者と比較して低値である事を報告したが (14)、Mastalerz らの報告では両群に有意差を認めなかった (20)。重症喘息では非重症喘息と比較して炎症細胞刺激時や、喀痰、Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) 中の  $\text{LXA}_4$  が低値である (21-24)。 $15\text{-epi-LXA}_4$  は  $\text{LXA}_4$  よりも白血球の接着を 2 倍強く抑制するが (25)、私の属するグループは AERD 患者の尿中  $15\text{-epi-LXA}_4$  値が ATA 患者と比較して低値である事を報告した (8)。近年 Liu らは、microsomal PGE synthase (mPGES)-1 欠損マウスではアスピリン誘発後に気道抵抗の増加、CysLTs 過剰産生、マスト細胞活性化が生じ、これらの反応には血小板付着白血球が関与する事を報告した (26)。さらに mPGES-1 欠損マウスにおけるこのようなアスピリン誘発反応は、 $\text{PGE}_2$  アナログや E prostanoid ( $\text{EP}$ ) $_2$  受容体アゴニスト、T prostanoid (TP) 受容体拮抗薬によって抑制される。また、AERD 患者由来の顆粒球では ATA 由

来の顆粒球と比較して CysLTs や LTB<sub>4</sub> 産生が亢進しているが、この事には EP<sub>2</sub> 受容体および EP<sub>4</sub> 受容体シグナルの下位にある protein kinase A (PKA) 機能の低下により 5-lipoxygenase (5-LO) 活性が抑制されず LT 過剰産生が生じる (27)。このように、AERD では炎症性メディエーターと抗炎症性メディエーターの不均衡が存在するが、その機序は完全には解明されていない。

## 1.2 Leukotrienes (LTs) について

膜リン脂質から Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)により切り離されたアラキドン酸は、5-LO + 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP)により LTA<sub>4</sub> となり、好中球では LTA<sub>4</sub> hydrolase により LTB<sub>4</sub> が、単球、マスト細胞、好酸球、好塩基球では LTC<sub>4</sub>S により LTC<sub>4</sub> が産生される (28, 29)。さらに、白血球は上皮細胞や血小板とのクロストークによっても LTC<sub>4</sub> を産生する事ができる (Figure 2)。上皮細胞や血小板は 5-LO / FLAP を持たないので単独では LTC<sub>4</sub> 産生能がないが、白血球より遊離した LTA<sub>4</sub> を自身の LTC<sub>4</sub>S により LTC<sub>4</sub> に代謝する事ができる (30, 31)。LTC<sub>4</sub> は細胞外で LTD<sub>4</sub> を経て最も安定な LTE<sub>4</sub> に速やかに代謝され、これらを総じて CysLTs と呼称される (32)。LTB<sub>4</sub> は好中球や好酸球の活性化、走化、寿命延長に関与する (33, 34)。一方、CysLTs は強力な気道収縮作用、血管透過性の亢進、炎症細胞活性化、平滑筋増殖や線維化促進により、気



道炎症やリモデリングに関与し、喘息病態でも重要な役割を果たしている (35)。

CysLTs の主要な受容体として CysLT receptor 1 (CysLTR<sub>1</sub>)と CysLT receptor 2 (CysLTR<sub>2</sub>)が存在し、CysLTR<sub>1</sub>には主に LTD<sub>4</sub>が、CysLTR<sub>2</sub>には主に LTC<sub>4</sub>および LTD<sub>4</sub>が作用する (36, 37)。LTE<sub>4</sub>は CysLTR<sub>1</sub> や CysLTR<sub>2</sub> への結合力が弱くその生物学的意味は長く不明であったが、近年 adenosine diphosphate (ADP) 受容体である P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> や GPR<sub>99</sub> が LTE<sub>4</sub> 受容体として注目され、LTE<sub>4</sub> のアレルギー炎症への関与も示唆されている (38, 39)。AERD の上気道に集簇した炎症細胞では CysLTR<sub>1</sub> および CysLTR<sub>2</sub> の発現が亢進しており、AERD では CysLTs 過剰産生のみならず受容体の発現亢進により、CysLTs 刺激による炎症が惹起されやすい状態と考えられる (40, 41)。

### 1.3 血小板と喘息

血小板は止血や凝固のみならず炎症でも中核をなし、喘息を含む様々なアレルギー疾患で重要な役割を果たしている。特に喘息においては、気道収縮、気道過敏性の亢進、気道リモデリング促進、気道炎症に関与している (42)。喘息におけるアレルギーチャレンジで血小板が関与していることを最初に示したのは 1981 年の Knauer らによる報告で、アトピー型喘息のブタクサの吸入負荷試験時に血漿中の Platelet factor 4 (PF4)の上昇を認め、Forced expiratory

volume in 1 second (FEV<sub>1</sub>)の低下と相関した (43)。さらに、ブタクサの吸入負荷試験 19 時間後に BALF 中の PF4 と beta-thromboglobulin (β-TG)の増加が報告された (44)。Dermatophagoides pteronyssinus (Dp) 吸入負荷試験では誘発早期での血漿 soluble P-selectin (sP-selectin), soluble CD40 ligand (sCD40L), PF4, β-TG 値上昇、血小板付着白血球の増加および血小板数の減少が認められた (45, 46)。

喘息死患者の剖検にて血小板の気道への集簇が認められ (47)、喘息発作においても血小板は非常に重要な役割を果たしている (48)。運動誘発喘息では血漿中の PF4, β-TG が上昇し、Peak expiratory flow (PEF) 値と相関する (49)。夜間発作でも同様に、血漿中の PF4, β-TG 値の上昇が認められ、PEF 値と関連を認めた (50)。

#### 1.4 血小板と白血球の相互作用

血小板はその表面に複数の接着分子を発現しており、P-selectin / P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1)、GPIIb / IIIa-Mac-1、CD40L / CD40 を介して白血球と付着する (51, 52)。血小板付着白血球では血小板の付着していない白血球と比較して、αMβ2 integrin macrophage 1 antigen (CD11b/CD18)の発現が亢進している (48, 53)。また、血小板の P-selectin を介

する好酸球への付着によって好酸球上の  $\alpha 4\beta 1$  integrin very late antigen 4 (VLA4; CD49d/CD29) の発現が亢進し、好酸球の血管内皮細胞への接着、組織へのリクルートが生じる (48, 54, 55)。

活性化血小板では細胞膜よりアラキドン酸が速やかに遊離され、12-lipoxygenase (12-LO)代謝産物であるヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸やCOX代謝産物であるThromboxane (TX) A<sub>2</sub>やPGD<sub>2</sub>などがつくられる (56, 57)。さらに前述のとおり、血小板は白血球との相互作用によってCysLTsを産生する。中でもP-selectinは血小板と好中球の相互作用によるCysLTs産生において最も重要な接着分子である (58)。

## 1.5 血小板活性化とAERD病態

LaidlawらはAERDの血中および鼻茸中で血小板付着白血球が増加し、CysLTs過剰産生に関与している事を報告した (59)。この報告より以前から、私の属するグループは血小板のAERD病態への関与を検討していた。私の属するグループがこのような仮説に至った経緯として、アスピリン誘発閾値がおおよそ60mg (45-100mg)と低用量であること (60, 61)、低用量アスピリンでもアスピリン減感作が可能であることより (62)、血小板がAERD病態に関連があるのではないかと考えていた。低用量アスピリンは上皮細胞や白血球のCOX-2は阻害

しないが、血小板の COX-1 を阻害し TXA<sub>2</sub> 産生が低下する事により抗血小板凝集効果が得られる (63, 64)。さらに、アスピリン誘発反応後には AERD で特異的なアスピリンに対する不応期が存在し、血小板寿命とおおよそ一致する (62, 65)。以上の事項より私は AERD 病態への血小板の関与を疑い、AERD の喘息安定期およびアスピリン誘発時における血小板活性化指標の検討を開始した。血小板活性化の指標として、4 種類の血小板表面マーカー (P-selectin, CD63, CD69, PAC-1) の発現率、血小板付着白血球 (好酸球、好中球、好塩基球、T リンパ球) の割合、血漿中の 2 種類の血小板活性化マーカー (sP-selectin, sCD40L) の値を用いた。さらに、それらの血小板活性化指標と AERD の臨床所見との関連を調査した。

## 1.6 好塩基球とアレルギー

好塩基球は多価抗原による immunoglobulin (Ig) E (IgE) の架橋やケモカインの刺激によりヒスタミンや LTC<sub>4</sub> などのメディエーター、interleukin (IL)-4 や IL-13 などのサイトカインを放出し、喘息を含むアレルギー炎症に関与している。喘息患者の気道では、健常人と比較して好塩基球数が増加しており、喘息増悪期には気道好塩基球数は更に増加する (66, 67)。以前より、IgE 刺激による好塩基球のヒスタミン遊離試験や LTC<sub>4</sub> 産生能テストは長らくアレルギー研

究に頻用されてきた (68)。メディエーターの遊離試験の他にも、好塩基球上の CD63、CD69 および CD203c は好塩基球活性化指標として有用であり、Basophil activation test に使用される (69, 70)。CD203c (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3; E-NPP3) は 875 個のアミノ酸で構成された E-NPP family の一つで、好塩基球およびマスト細胞の表面に発現している (71)。CD203c は不活性状態の好塩基球にも低レベルで持続的に発現しているが、アレルゲンや IL-3 の刺激により速やかに発現が増強し、好塩基球の活性化指標として最も有用であると考えられている (72, 73)。その機能については不明な部分が多かったが、E-NPP3 がアレルギー性炎症に対し抑制的に働くという報告がなされた (74)。すなわち、E-NPP3 欠損マウスでは IgE 刺激による ATP 産生を抑制できず、ATP 受容体を介する刺激により好塩基球やマスト細胞が更に活性化されアレルギー炎症に拍車がかかる。

私の属するグループでは、小野らが非アスピリン喘息の喘息安定期および喘息増悪期における末梢血好塩基球上の表面マーカーの検討を報告した (75)。同論文では CD203c に加えて、CD63 および CD69 の好塩基球上の発現率を測定したが、末梢血好塩基球上の CD203c 発現が喘息増悪時に喘息安定期や健常人と比較して有意に増加する事が示された。喘息増悪時の好塩基球では、特に anti-IgE 刺激による CD203c 発現が著明に亢進した。好塩基球も好酸球やマス

ト細胞同様 CysLTs 産生能を有するが、AERD 病態への関与を検討した報告は少ない。今回私は、AERD 患者および ATA 患者の喘息安定期およびアスピリン誘発時における好塩基球の関与を検討すべく、以前私の属するグループの報告した手法を用いて末梢血好塩基球上の CD203c 発現率を検討した。

## 2. 方法

### 2.1 アスピリン喘息安定期における血小板活性化指標の検討

#### 2.1.1 臨床データの採取

2002 年から 2014 年の間で国立病院機構相模原病院に通院していた患者で主治医により喘息安定とみなされた AERD 30 例と ATA 21 例を対象に臨床情報の収集と末梢血および尿の解析を行った。試験登録時に主治医により喘息安定と判断された患者のみをエントリーした。喘息の診断は GINA ガイドライン 2009 に従って行った。AERD はアスピリン全身負荷試験にて陽性基準を満たした場合に確定診断とした (76, 77)。登録した AERD 30 例のうち 24 例は当院の既報の方法に基づき lysine-aspirin (L-ASA) 静脈負荷試験を行ったが (76)、2012 年 3 月以降日本で L-ASA が入手不可能となったため、それ以降に受診した 6 例では経口アスピリン負荷試験を施行した (77)。ATA 患者はアスピリン全身負荷試験によるアスピリン不耐の否定、もしくは過去 12 か月以内に NSAIDs の安全な内服歴がある場合に ATA と診断した。健常対照群として 14 例の健康人 (Healthy control, 以下 HC) に加えて、疾患対照群として 10 例の慢性好酸球性肺炎 (Chronic eosinophilic pneumonia, 以下 CEP) を対照としてエントリーした。除外基準として、自己免疫疾患、虚血性心疾患、脳血管障害、さらに治療下でもコントロール不良な高血圧 (BP  $\geq$  140/90 mmHg)、脂質異常症

(low density lipoprotein level  $\geq 140$  mg/dl, Triglyceride level  $\geq 150$  mg/dl)、糖尿病、アスピリン、NSAIDs、COX-2 阻害薬の常用、過去 6 週間以内の下気道感染を定めた。

全患者は試験登録時に年齢、性別、body mass index (BMI)、喫煙歴、長期間管理薬、薬剤の使用歴、アスピリン誘発歴、合併症の有無を問診した。鼻茸合併慢性副鼻腔炎の診断は European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012 に従って行った(78)。また、肺機能検査(79)、気道可逆性試験、Fractional exhaled nitric oxide (FeNO)、末梢血血球分画、Uni-CAP system (Phadia, Uppsala, Sweden) による Total immunoglobulin (Ig) E (IgE)および specific IgE、アトピー素因の有無を評価した。CAP RAST もしくは吸入性抗原の皮膚試験のいずれかにて一項目以上陽性の場合をアトピー素因ありとした。本研究は全てのドナーから文書を用いてインフォームドコンセントを取得しており、倫理審査委員会で承認を受けている（倫理審査承認番号 143）。

#### 2.1.2 フローサイトメーター (FACS) を用いた末梢血血小板表面マーカーの検討

対象患者および健常人のクエン酸加血液 10  $\mu$ l を用い、一定の抗体量 (Table 1) で染色を行った。以下に詳細な方法を述べる。



①対象患者および健常人より 21G 針を用いて 3.2 % クエン酸ナトリウム含有採血管に血液 2.7 ml を採取。

②採血後 10 分以内に無刺激の全血 10  $\mu$ l ずつ Table 1 のように抗体を加えた Falcon tube に入れ、室温で 15 分間置いて染色を行った。

③15 分経過後、1 % ホルマリン含有 phosphate buffered saline (PBS)を加えて固定し、24 時間以内に解析した。

抗体は CD61(GPIIIa)-phycoerythrin-cyanine 7 (PC7) (Beckman Coulter)、CD63-phycoerythrin (PE) (Beckman Coulter)、CD69-PE (Beckman Coulter) CD62P (P-selectin)-PE (BD Biosciences)、PAC-1 (activated form of GPIIbIIIa)-FITC (BD Biosciences)、を使用した。それぞれの corresponding isotypes (Beckman Coulter)をコントロールとして使用した。解析は 3 カラーを用いた CellQuest (Becton Dickinson)により行った。なお、Fc-blocking は行っていない。

2.1.3 フローサイトメーター (FACS) を用いた末梢血血小板付着白血球の割合および付着血小板上の表面マーカーの発現率の検討 (Figure 3A)

対象患者および健常人の Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)  $\cdot$  2Na

加血液 100  $\mu$ l を用い、一定の抗体量 (Table 2, 3) で染色を行った。

以下に詳細な方法を述べる。

①対象患者および健常人より 21G 針を用いて EDTA・2Na 含有採血管に血液 7 ml を採取。

②採血後 30 分以内に無刺激の全血 100  $\mu$ l ずつ Table 2 もしくは 3 のように抗体を入れた tube に入れ、室温で 20 分間染色を行った。

③20 分経過後 Lysing/Fixative solution を tube に 1 ml ずつ加え、室温暗所にて 10 分間 incubation して溶血し、1300 rpm にて 7 分間遠心し上清を取り除いた。

④さらに PBS 1000  $\mu$ l 加えて混和後 1300 rpm にて 7 分間遠心して wash し、0.1 % ホルマリン含有 PBS 500  $\mu$ l を加えて固定、4  $^{\circ}$ C にて保存後解析した。

抗体は CD61(GPIIIa)-PC7 (Beckman Coulter)、CD3-FITC (Beckman Coulter)、CD16b(Fc $\gamma$ RIIIb)-FITC (Beckman Coulter)、CD63-PE (Beckman Coulter)、CD69-PE (Beckman Coulter) P-selectin (CD62P)-PE (BD Biosciences)、PAC-1 (activated form of GPIIb/IIIa)-FITC (BD Biosciences)、chemoattractant receptor-homologous molecule expressed by Th2 (CRTH-2)-FITC (Santa Cruz Biotechnology)、Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  chain (CRA-1)-FITC、Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  chain (CRA-1)-PE

(eBiosciences)を使用した。それぞれの corresponding isotypes (Beckman Coulter)をコントロールとして使用した。解析は 3 カラーを用いた CellQuest (Becton Dickinson)により行った。なお、Fc-blocking は行っていない。

#### 2.1.4 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)を用いた血漿中の血小板活性化指標の検討

①試験登録時に EDTA・2Na 含有試験管 (1.5 mg/ml) に採血した血漿を室温で 3000 rpm 10 分間遠心し、上清を-35 度で保存した。

②市販の sP-selectin ELISA kit および sCD40L ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)を用いて血漿中の sP-selectin および sCD40L 濃度を測定した。

#### 2.1.5 uLTE<sub>4</sub>測定

試験登録時朝 8 時から 10 時に、uLTE<sub>4</sub>測定のための採尿を行った。以下に詳細な測定方法を述べる。

①4-hydroxy-TEMPO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を含むポリプロピレン容器に最終濃度 1mmol/L となるように採尿し、-35 度にて保存した。

②2ml 尿を Empore C18 disk cartridge に通した後、NOVA-PACK C18 カラム

(Waters, Milford, MA) を装備した液体クロマトグラフィー (Shimadzu LC 6A) にて精製分離し、市販の ELISA kit (Cayman, Ann Arbor, MI) にて定量した。  
uLTE<sub>4</sub> 濃度は尿中のクレアチニン濃度で補正をし、pg / mg cre と表記した。

## 2.2 アスピリン負荷試験時における血小板活性化指標の検討

### 2.2.1 臨床データの採取

2002 年 4 月から 2012 年 3 月までに国立病院機構相模原病院アレルギー・呼吸器科にて L-ASA 静脈負荷試験を行った AERD 24 例と ATA 7 例を対象に臨床情報の収集および L-ASA 静脈負荷試験の際の血漿中の sP-selectin および sCD40L の推移を検討した。さらに、AERD 8 例ではアスピリン負荷試験時における末梢血血小板表面の P-selectin, CD63, CD69, PAC-1 の発現率の推移を FACS にて測定した。登録した AERD 8 例のうち 4 例は L-ASA 静脈負荷試験を行ったが、2012 年 3 月以降日本で L-ASA が入手不可能となったため、それ以降に受診した 4 例では経口負荷試験を施行した。

### 2.2.2 アスピリン負荷試験の方法

全ての患者はアスピリン負荷試験施行時喘息安定で、FEV<sub>1</sub> / forced vital capacity (FVC) 70 %以上であった。肺機能は 3 回施行し、最も良い値を採用し

た。経口ステロイド以外の喘息長期管理薬を試験の24時間以上前より中止した。試験日当日朝8時から10時の間にコントロール用の血液および尿を採取した。L-ASA 静脈負荷試験では、1ml 生理食塩水の静脈注射後に FEV<sub>1</sub> がベースラインから 5%以上低下しない事を確認した後、L-ASA 25mg より投与を開始、陽性所見が出現するまで2時間おきに倍量に増量（25-200mg）した。

経口アスピリン負荷試験では、プラセボ内服後に FEV<sub>1</sub> が 5%以上の低下がない事を確認した後、aspirin (ASA) 30mg より投与を開始し、陽性基準となるまで同様に倍量に増量した(30-480mg)。陽性基準として、FEV<sub>1</sub> がベースラインから 20%以上低下、もしくは FEV<sub>1</sub> が 10~20%低下し、明らかな臨床所見が出現した場合を陽性とした。

### 2.2.3 FACS および ELISA を用いた血小板活性化指標の評価

アスピリン負荷試験前、AERD では症状誘発した dose の投与から 0-1 時間、1-3 時間、3-6 時間、9-24 時間、ATA では最終投与後 0-1 時間、1-3 時間、3-6 時間、9-24 時間後に採血を行った。血漿中の sP-selectin および sCD40L 値を先述した市販の ELISA kit を使用して測定した。さらに、AERD 8 例ではアスピリン誘発前および誘発後 0-1, 1-3, 9-24 時間の血小板表面マーカーの評価を行った。また、一部の患者で血小板付着白血球の割合を評価した[血小板付着好酸

球(n = 4)、血小板付着好中球 (n = 3)、血小板付着 T リンパ球 (n = 3)、血小板付着好塩基球 (n = 2) ]。

#### 2.2.4 アスピリン負荷試験時の uLTE<sub>4</sub> 値測定

アスピリン負荷試験前および症状誘発後最終内服より 0-3, 3-6, 6-9, 9-24 時間で採尿を行い、先述の方法に従い uLTE<sub>4</sub> を測定した。

### 2.3 アスピリン喘息安定期における好塩基球上の CD203c 発現率の検討

#### 2.3.1 臨床データの採取

2009 年 12 月から 2015 年 12 月までに国立病院機構相模原病院に通院し、主治医により喘息安定とみなされた AERD 21 例と ATA 22 例を対象に臨床情報の収集と末梢血および尿の解析を行った。喘息患者は GINA ガイドライン 2009 による喘息の定義を満たす患者を登録した。AERD 患者は過去に当院にて L-ASA 静脈負荷試験で確定診断をされた患者とし (76)、ATA 患者はアスピリン全身負荷試験によるアスピリン不耐の否定、もしくは過去 12 か月以内に NSAIDs の安全な内服歴がある場合に ATA と診断した。健常対照群として 11 例の健常人 (Healthy control, 以下 HC) を登録した。除外基準として、自己免疫疾患、虚血性心疾患、脳血管障害、アスピリン、NSAIDs、COX-2 阻害薬の

常用、過去 6 週間以内の下気道感染を定めた。血小板活性化指標の検討では、数値に影響を与える可能性のある投薬下でもコントロール不良な高血圧、糖尿病、脂質異常を除外基準に含めたが、好塩基球表面マーカーの検討では、これらの項目は CD203c 発現率に影響を与えないため除外基準には含めなかった。

全患者は試験登録時に年齢、性別、BMI、喫煙歴、長期管理薬、薬剤の使用歴、アスピリン誘発歴、合併症の有無を問診した。鼻茸合併慢性副鼻腔炎の診断は European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012 に従って行った (78)。また、肺機能検査 (79)、Uni-CAP system (Phadia, Uppsala, Sweden) による Total IgE および specific IgE を評価した。CAP RAST もしくは吸入性抗原の皮膚試験のいずれかにて一項目以上陽性の場合をアトピー素因ありとした。なお、本研究は全てのドナーから文書を用いてインフォームドコンセントを取得しており、倫理審査委員会で承認を受けたものである（倫理審査承認番号 241）。

### 2.3.2 FACS を用いた末梢血好塩基球上の CD203c の発現率の検討 (Figure 3B)

対象患者および健常人の EDTA 2 Na 加血液を用い、一定の抗体量 (Table 4) で染色を行った。以下に詳細な方法を述べる。

①対象患者および健常人より 21G 針を用いて EDTA2Na 含有採血管に血液

7ml を採取。

②採血後 30 分以内に無刺激の全血 100  $\mu$ l ずつ Table のように抗体を加えた

Falcon tube に入れ、37°C で 15 分間置いて刺激、染色を行った。

③15 分経過後、lysis solution にて赤血球を溶血し、2ml PBS にて洗浄後、0.1%

ホルマリン含有 PBS 500  $\mu$ l にて固定した。

測定は allergenicity kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)を用いて行っ

た。キットには、PC7-conjugated anti-CD3 antibody, PE-conjugated

anti-CD203c antibody, FITC-conjugated anti-CRTH-2 antibody, mouse

monoclonal antihuman IgE が含まれた。さらに Recombinant human

interleukin (IL)-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)にて好塩基球を刺

激した。解析は 3 カラーを用いた CellQuest (Becton Dickinson)により行った。

なお、Fc-blocking は行っていない。

## 2.4 アスピリン負荷試験時における好塩基球上の CD203c 発現率の推移の検討

### 2.4.1 臨床データの採取

国立病院機構相模原病院アレルギー・呼吸器科にて L-ASA 静脈負荷試験を行った AERD 12 例と ATA 7 例を対象に臨床情報の収集および L-ASA 静脈負荷



試験の際の末梢血好塩基球上の CD203c 発現率の推移を評価した。L-ASA 静脈負荷試験の方法は前述のとおりに行った (76)。試験登録時に、年齢、性別、BMI、喫煙歴、アトピー素因の有無、長期管理薬の使用状況を確認した。喘息重症度は ATS の基準を用いた (80)。

#### 2.4.2 アスピリン負荷試験時の末梢血好塩基球上の CD203c 発現率の推移

アスピリン負荷試験前、AERD では症状誘発した dose の投与から 0-1 時間、1-3 時間、3-6 時間、9-24 時間、ATA では最終投与後 0-1 時間、1-3 時間、3-6 時間、9-24 時間後に採血を行い、末梢血好塩基球上の CD203c の発現率をフローサイトメトリーにて測定した。

#### 2.4.3 アスピリン負荷試験時の uLTE<sub>4</sub> 値測定

アスピリン負荷試験前および症状誘発後最終内服より 0-3, 3-6, 6-9, 9-24 時間で採尿を行い先述の方法に従い uLTE<sub>4</sub> を測定した。

### 2.5 統計

データ解析は Windows 版 SPSS にて行った。データは中央値 (範囲)、もしくは平均値±SD 値にて記載した。質的なデータはカイ 2 乗検定を用いて行

った。対応のない量的変数の 2 群間の差の検定は Student's t test もしくは Mann-Whitney U test、3 群以上の検定は Analysis of variance (ANOVA) もしくは Kruskal-Wallis test を行った。タイムコースのデータ比較には Wilcoxon signed-rank test を使用した。統計学的有意差を  $P < 0.05$  とした。多重比較の際は Bonferroni 法を用いて P 値の調整を行った。

### 3. 結果

#### 3.1 アスピリン喘息安定期における血小板活性化指標の検討

##### 3.1.1 臨床情報

AERD 30 例、ATA 21 例、CEP 10 例、HC 14 例を対象とした。臨床情報のまとめを Table 5 に示す。年齢、性別、喫煙歴、アトピー素因は 4 群で有意差がなかった。喘息重症度は AERD と ATA の間で同等度であった。一方、CEP 10 例のうち 5 例が喘息合併しており、AERD および ATA と比較すると喘息は軽症であった。AERD 25 例および ATA 18 例で気道可逆性試験を行い、気管支拡張薬吸入前後の肺機能は両群で差がなかった。CEP 患者では AERD 患者と比較すると気管支拡張薬吸入前後の%FEV<sub>1</sub> および%V<sub>50</sub> は良好であった。uLTE<sub>4</sub> 値は AERD 患者と ATA 患者, HC の間では差がなかった。CEP 患者と比較すると AERD 患者の方が高値ではあったが、有意ではなかった。

AERD, ATA, CEP 患者の末梢血血球分画を Table 6 に示した。血小板数、好酸球数、好塩基球数は 3 群で差がなかったが、T リンパ球数および単球数は AERD 患者では ATA 患者および CEP 患者と比較して高値であった。AERD 患者と ATA 患者を比較すると、白血球数、好酸球数、好中球数は AERD 患者の方が高値であった。

### 3.1.2 喘息安定期における血小板活性化指標

喘息安定期における血小板活性化指標の比較を Table 7 に示した。血漿中の sP-selectin および sCD40L は AERD 患者では ATA 患者( $P = 0.017$ ,  $P = 0.013$ ) および HC ( $P = 0.015$ ,  $P = 0.010$ )と比較して高値であった (Figure 4A, B)。

FACS 解析の結果では、AERD 患者の末梢血血小板では P-selectin, CD63, CD69, PAC-1 全ての表面マーカーの発現率が ATA 患者と比較して高値であった ( $P = 0.022$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.029$ ,  $P = 0.014$ ) (Figure 4C-F)。AERD 患者と CEP 患者を比較すると CD63, CD69 発現率は AERD 患者の方が高値であった ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.008$ ) (Figure 4D, E)。これらの 2 種の血漿マーカーおよび 4 種の表面マーカーは ATA 患者、CEP 患者、HC 間で有意差がなかった。

血小板付着白血球の割合を検討すると、AERD 患者では ATA 患者および HC と比較して血小板付着好酸球が有意に多く ( $P = 0.025$ ,  $P = 0.016$ )、血小板付着好中球および血小板付着好塩基球は多い傾向があった (Figure 5, Table 7)。更に、白血球に付着した血小板上の表面マーカーの発現率を検討したところ、AERD 患者では好塩基球付着血小板上の P-selectin の発現率が 4 群の中で最も高値であり ( $P = 0.019$ ) (Table 7)、その発現率と血小板付着好塩基球の割合は有意に相関していた ( $r = 0.582$ ,  $P = 0.004$ ) (Figure 6)。

### 3.1.3 喘息安定期における血小板活性化指標と uLTE<sub>4</sub> 値もしくは肺機能との相関関係

血小板活性化指標と血小板付着好酸球数もしくは uLTE<sub>4</sub> 値との相関係数を Table 8, Figure 7, 8 に示す。血小板活性化指標のうち、末梢血血小板上の P-selectin 発現率 ( $r = 0.308$ ,  $P = 0.019$ )、CD63 発現率 ( $r = 0.361$ ,  $P = 0.005$ )、血漿中の sP-selectin 値 ( $r = 0.276$ ,  $P = 0.036$ )、sCD40L 値 ( $r = 0.263$ ,  $P = 0.046$ ) は血小板付着好酸球の割合とそれぞれ正の相関を示した (Figure 7A, B, E, F)。

さらに、血小板上の P-selectin 発現率および血漿中の sP-selectin 値は uLTE<sub>4</sub> 値と正の相関を示した (P-selectin;  $r = 0.310$ ,  $P = 0.015$ , sP-selectin;  $r = 0.300$ ,  $P = 0.019$ , Figure 8A, E)。末梢血血小板上の CD63 発現率は uLTE<sub>4</sub> 値と弱い相関を示した ( $r = 0.240$ ,  $P = 0.063$ )。

血小板活性化指標と気管支拡張薬吸入前後の肺機能の相関係数を Table 9, Figure 9 に示した。血漿中の sP-selectin は気管支拡張薬吸入前後の%FEV<sub>1</sub> ( $r = -0.324$ ,  $P = 0.019$ ,  $r = -0.370$ ,  $P = 0.007$ ) および%V<sub>50</sub> ( $r = -0.381$ ,  $P = 0.005$ ,  $r = -0.472$ ,  $P < 0.001$ ) と負の相関を示した (Figure 9A-D)。血漿中の sCD40L は気管支拡張薬吸入前後の%V<sub>50</sub> とのみ負の相関を示した ( $r = -0.336$ ,  $P = 0.015$ ,  $r = -0.367$ ,  $P = 0.007$ ) (Figure 9G, H)。血小板上の CD63 発現率は気管支拡張薬

吸入後の%V<sub>50</sub>と ( $r = -0.285$ ,  $P = 0.040$ )、血小板上の CD69 発現率は気管支拡張薬吸入前後の%V<sub>50</sub>と負の相関を示した ( $r = -0.325$ ,  $P = 0.019$ ,  $r = -0.309$ ,  $P = 0.026$ )。

### 3.2 アスピリン負荷試験時における血小板活性化指標の検討

AERD 24 例および ATA 7 例にてアスピリン誘発時の血漿 sP-selectin, sCD40L 値および uLTE<sub>4</sub> 値の変化を検討した。AERD 患者と ATA 患者を比較すると年齢、性別、BMI、喫煙歴、喘息重症度などを含む患者背景は両群で有意差を認めなかった (Table 10)。血漿 sP-selectin 値および sCD40L 値は、AERD 患者、ATA 患者共にアスピリン誘発後もベースラインからの変化を認めなかった (Table 11, Figure 10)。既報の報告通り、AERD ではアスピリン誘発後 uLTE<sub>4</sub> 値は著明に増加した。

AERD 8 例ではアスピリン誘発時における血小板表面マーカーの解析を FACS にて行った (Table 12)。血漿中マーカーと同様に、4 種類全ての表面マーカーの発現率および血小板付着白血球の割合はアスピリン誘発後も変化しなかった (Table 13, Figure 11)。

### 3.3 アスピリン喘息安定期における CD203c 発現率の検討

AERD 21 例、ATA 22 例、HC 11 例を対象とした。臨床情報のまとめを Table 14 に示す。3 群間で比較しても、年齢、性別、BMI、喫煙歴、喘息重症度、アトピー素因の有無、長期管理薬の使用状況は有意差を認めなかった。さらに、末梢血好酸球数、uLTE<sub>4</sub> 値、肺機能も AERD 患者と ATA 患者で同等であった。

喘息安定期においては、AERD 患者の好塩基球上の CD203c 発現率は ATA 患者と比較しても亢進していない事が示された。ATA 患者では、Anti-IgE 刺激後の CD203c 発現が AERD 患者および HC と比較して有意に高値であった ( $P = 0.002$ , Figure 12B)。ATA 患者と AERD 患者を比較すると、ATA 患者では AERD 患者と比較して Anti-IgE 刺激後の CD203c 発現が有意差はないものの高い傾向があった ( $P = 0.052$ )。さらに、AERD 患者と HC を比較すると、AERD 患者では Anti-IgE 刺激後の CD203c 発現率が HC と比較して有意に高値であった ( $P = 0.017$ )。一方、無刺激および IL-3 刺激後の CD203c 発現率は 3 群間で有意差を認めなかった (Figure 12A, C)。

### 3.4 アスピリン負荷試験時における好塩基球数および CD203c 発現率の推移の検討

次に、AERD 12 例および ATA 7 例にて L-ASA 静脈負荷試験後の好塩基球数および CD203c 発現率の変化を検討した (Figure 13, Table 16)。AERD 患者と

ATA 患者では患者背景に差はなかった。AERD 患者ではアスピリン誘発後の好塩基球数は有意に低下した (Figure 13A, Table 17)。また無刺激の CD203c 発現率はアスピリン誘発 1 時間後、IL-3 刺激後の CD203c 発現率はアスピリン誘発 6、24 時間後に有意に低下した (Figure 13B, D)。一方、ATA 患者ではアスピリン投与後の好塩基球数および CD203c 発現率は変化を認めなかった (Figure 13E-H)。



#### 4. 考察

今回私は AERD の病態解明に寄与すべく、喘息安定期およびアスピリン誘発時における AERD 患者の血小板および好塩基球の活性化指標を検討した。喘息安定期の AERD 患者では 2 種類の血漿中血小板活性化マーカー、4 種類の血小板表面マーカー、血小板付着好酸球の割合が ATA 患者、HC と比較して有意に高値であった。一方、ATA 患者と HC 間では、いずれの血小板活性化指標も有意差を認めなかった (Figure 4A-F)。今回検討した血小板活性化指標のうち、いくつかの血小板活性化指標が uLTE<sub>4</sub> 値と正の相関を (Figure 8A, E)、気管支拡張薬吸入前後の肺機能と負の相関を示し (Figure 9A-D, G, H)、血小板が喘息安定期の AERD における CysLTs 過剰産生と PAFL に関連している可能性が示唆された。一方、アスピリン誘発時には血小板上の表面マーカーの発現率および血漿中の血小板活性化指標の変化は認めなかった (Figure 7, 8)。私たちのグループの過去のデータから L-ASA 静脈負荷試験とアスピリン経口負荷試験では感度や誘発症状に差は認めなかった (未報告データ)。したがって、今回の研究では L-ASA 静脈負荷試験とアスピリン経口負荷試験の患者が混在しているが、誘発方法の違いによって区別する必要はないと考えた。

活性化血小板では P-selectin の発現が誘導され速やかに血小板表面より遊離され失われるため (81)、AERD では持続的な血小板の活性化が生じていると考

えられる。しかしながら、AERDにおける血小板活性化の機序は明らかになっていない。血小板は5-LOを持たないため単独ではCysLTsを産生できないが、白血球と接着する事で白血球より遊離したLTA<sub>4</sub>が血小板のLTC<sub>4</sub>SにてCysLTsに代謝される(30, 31)。さらに、血小板が白血球に付着すると、白血球上の接着因子の発現が亢進し、炎症細胞の気道へのリクルートが生じる(48)。AERD患者では喘息安定期でも血小板付着好酸球が増加しており、上下気道への好酸球のリクルートおよびCysLTs過剰産生が生じていると考えられる(Figure 14A)。

血小板は複数のメカニズムにより活性化し、表面にP-selectinを発現する。CummingsらはLTC<sub>4</sub>がcysLT<sub>2</sub>Rに結合した後、ADPのオートクリンによりP<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>からの刺激が入り、マウス血小板表面にP-selectinが誘導される事を示した(82)。しかしながら、ヒトの血小板ではCysLTsの刺激により血小板の白血球への付着は生じず、血小板付着白血球の気道へのリクルートは見られなかった(83)。CD40LはGPIIb/IIIaのリガンドであるが、sCD40Lの3量体はGPIIb/IIIaを介するシグナルにより、血小板上のP-selectinの発現を亢進させ、血小板の好中球への付着を促進する(84)。

今回の研究では、血小板上のP-selectinおよびCD63の発現率、血漿中のsP-selectinおよびsCD40L値が血小板付着好酸球の割合と正の相関を示した。

(Figure 7, A, B, E, F, Table 8) さらに、血小板上の P-selectin 発現率と血漿中の sP-selectin 値は uLTE<sub>4</sub> 値と正の相関を示した。(Figure 8, A, E, Table 8) 私の結果は Laidlaw らの血小板付着白血球の割合が uLTE<sub>4</sub> 値と相関するという報告と合致する (59)。私の結果から、血小板は P-selectin や CD40L を介して好酸球と付着し、CysLTs 過剰産生に寄与していると推測される。また喘息患者では、血小板は肺組織に遊走し気道リモデリングを引き起こす (48)。私の研究では、血漿中の sP-selectin 値が低肺機能と負の相関を示し、血漿の sP-selectin が血小板活性による気道リモデリングの指標として有用である可能性を示唆する事ができた (Figure 9A-D)。

CEP は気道への好酸球浸潤および CysLTs 過剰産生を呈する点で AERD の病態と類似するが (85)、AERD 患者と CEP 患者では血小板表面マーカーの発現に差があり、AERD 患者では血小板上の CD63 発現率が CEP 患者と比較して有意に高値であった。CD63 はテトラスパニンファミリーであり、P-selectin と結合してコンプレックスを形成し作用を増強し、血小板付着白血球の遊走を促進する (86)。私の研究では、血小板上の P-selectin および CD63 の発現率はお互いに有意に相関し、血小板付着好酸球の割合や uLTE<sub>4</sub> 値とも正の相関を示した。これらの表面マーカーは協調して、AERD における好酸球の気道集簇や CysLTs 過剰産生に関与していると考えられる。

今回の結果は、AERD 患者におけるアスピリン誘発時の血小板活性化指標の推移を初めて検討した研究である。アトピー型喘息患者にてアレルゲンチャレンジを行うと、血小板活性化指標が上昇したという報告はあるが (45, 53)、私たちのグループの検討では AERD 患者のアスピリン誘発後には血小板活性化指標の変動は認められなかった (Table 11, 13, Figure 10, 11)。しかしながら、今回の結果のみでアスピリン誘発反応に血小板が関与していないと言い切る事はできない。アスピリン投与により TXA<sub>2</sub> の産生が低下し、LTC<sub>4</sub>S に対する抑制が外れる。さらに、余剰となったアラキドン酸が血小板から遊離し、付着した白血球の 5-LO を活性化させることで AERD におけるアスピリン誘発時の CysLTs 過剰産生に関与している可能性はある (Figure 14B) (31)。過去の報告によると、TXA<sub>2</sub> の作用と拮抗するプロスタサイクリンはアスピリン誘発反応を抑制しない (87)。さらに、アスピリン不耐症皮疹型でのアスピリン誘発時も、末梢血血小板上の P-selectin 発現は変化しない (88)。これらの報告と私の結果はつじつまが合う。血漿中の血小板活性化指標が気道の血小板活性化を反映していない可能性はあり、追加検討は必要である。

次に、好塩基球活性化指標である末梢血好塩基球上の CD203c 発現率を検討した。喘息安定期の AERD 患者と ATA 患者では HC と比較して、Anti-IgE 刺激後に末梢血好塩基球上の CD203c 発現が亢進していたが、両群間で差は認

めなかった (Figure 12B)。一方、アスピリン誘発時は AERD 患者でアスピリン誘発後の末梢血好塩基球数が低下し、気道にリクルートされている可能性が示唆された (Figure 13A)。好塩基球も CysLTs 産生能を有するが、喘息安定期の AERD 患者と ATA 患者では末梢血好塩基球上の CD203c 発現は同程度であった事より、AERD の病態において好塩基球はあまり重要ではないと予測される。この考察は、Mahdavia により報告された ATA 患者の鼻茸では好塩基球の集簇が認められるが、AERD 患者の鼻茸では ATA 患者の鼻茸と比較して好塩基球が少ないという論文の内容と合致する (89)。ただし、この論文で使用された 2D7 という抗体は、脱顆粒後の好塩基球は検出できず、AERD 患者の鼻茸では好塩基球の集積が全く生じていないのか、それとも脱顆粒後のため検出できなかったかの判断が難しい。

今回の結果では、ATA 患者および AERD 患者由来の好塩基球では、HC 由来の好塩基球と比較すると、Anti-IgE 刺激後の CD203c 発現が亢進していた。AERD 患者と ATA 患者間で、好塩基球の高親和性 IgE 受容体(FcεRI)発現率を比較した報告はこれまでない。好塩基球上の FcεRI の発現は血清 Total IgE 値と正の相関を示すが(90)、AERD 患者と ATA 患者では Total IgE 値に差はなかった。このことは Johns らによっても報告されている (91)。AERD 患者では FcεRI の遺伝子多型の報告があり、今回の結果と関係がある可能性がある (92)。

また、AERD 患者ではアスピリン誘発反応後に末梢血の好塩基球数は低下した (Figure 13A)。以前にも、アスピリン誘発反応後に AERD の鼻汁中の好酸球数および好塩基球数は増加したと報告されており (93)、今回の私の結果もアスピリン誘発後に好塩基球が気道へ遊走している事を示していると予測された。好酸球や好塩基球は様々なメディエーター刺激により気道に遊走する (94, 95)。AERD 患者においてアスピリン誘発後の CysLTs や PGD<sub>2</sub> の著名な上昇は、アスピリン誘発反応後の好酸球および好塩基球の気道への遊走に関与している可能性がある。

今回の結果より、抗血小板薬、特に P-selectin antagonist が AERD 病態に有用である可能性が考えられる。P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> antagonist や P-selectin antagonist は血小板付着白血球の割合を低下させるが、GPIIb/IIIa antagonist は低下させない (96, 97)。P-selectin antagonist は喘息モデルマウスにおいて気道過敏性および好酸球性炎症を抑制する事が報告されている (98)。しかしながら、喘息モデルマウスにおいて、P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> antagonist は P-selectin を介する血小板の白血球への付着を抑制するが、P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> antagonist や P<sub>2</sub>X<sub>1</sub> antagonist は抑制しない (99)。P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> antagonist である Prasugrel が、喘息患者における気道過敏性を抑制し、Platelet reactivity index を低下させることが報告されている (100)。Harvard 大学の Boyce 教授らのグループが、AERD における Prasugrel (NCT01597375)

や TP receptor antagonist である ifetroban (NCT02216357) の有用性を検討する臨床試験を行っているが、好ましい結果は得られていないようだ。AERD 患者における P-selectin antagonist やその他の抗血小板薬の有効性については、更なる検討が必要である。

私たちのグループの研究の対象は日本人に限定されており、検討した活性化指標の人種差が存在する可能性はある。さらに、サンプルサイズが小さいために、Bonferroni 補正後に有意差が残存しない場合もあった。また、血小板研究では、血小板が採血手技により活性化しないように十分な注意を払ったが、多少なりとも採血手技の影響があるかもしれない。さらに、今回は末梢血の血小板および好塩基球を用いており、気道に集簇している血球の状態を正確に反映できていない可能性はある。

今回私は、AERD 患者では喘息安定期に有意な血小板活性化を認め、AERD の特徴的病態である CysLTs 過剰産生および持続的気流制限と関係がある可能性を示唆した。一方、喘息安定期の AERD 患者では好塩基球活性化の指標である CD203c 発現はさほど亢進しておらず、ATA 患者と比較すると、好塩基球の病態への寄与は少ないと考えられた。これらの結果により、AERD の病態解明および新規治療薬の開発につながると考える。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始暖かいご指導とご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ内科学 山本一彦教授並びに藤尾圭志教授に心より感謝を申し上げます。また、本研究の機会を与えてくださり、研究の方向性に関して終治親身なご指導、ご鞭撻を賜りました国立病院機構相模原病院臨床研究センターセンター長谷口正実先生に厚く御礼申し上げます。

データ解析、論文執筆に関してご指導いただいた福富友馬先生、東憲孝先生、小野恵美子先生、実験方法のご指導を頂きました三田晴久先生、実験手技を日々丁寧にご指導いただいた梶原景一実験助手、データ収集およびサンプル採取にご尽力いただきました林浩昭先生、上出庸介先生に厚く御礼申し上げます。さらに、粒来崇博先生、関谷潔史先生、伊藤潤先生、渡井健太郎先生には臨床の側面でご指導、ご協力いただきましてありがとうございました。最後に、仕事と育児を両立し、学位取得という目標を成し遂げるために惜しまず協力してくれた家族に心から感謝しています。なお、本論文に記載されている内容は『Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunology* **137**: 400-11, (2016)』および『Analysis of basophil activation in patients with



aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunology* (2017 in press)』として publish されました。

## 略語リスト

AERD: aspirin-exacerbated respiratory disease  
CysLTs: cysteinyl leukotrienes  
ATA: aspirin-tolerant asthma  
LT: leukotriene  
uLTE<sub>4</sub>: urinary leukotriene E<sub>4</sub>  
COX: cyclooxygenase  
AIA: Aspirin-intolerant asthma  
NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs  
NERD: non-steroidal anti-inflammatory drugs-exacerbated respiratory disease  
PAFL: persistent airflow limitation  
LTC<sub>4</sub>S : LTC<sub>4</sub> synthase  
mRNA: messenger RNA  
PG: prostaglandin  
PGD<sub>2</sub>M: PGD<sub>2</sub> metabolite  
hPGDS: hematopoietic PGD synthase  
LX: lipoxin  
BALF: bronchoalveolar Lavage Fluid  
mPGES: microsomal PGE synthase  
EP: E prostanoid  
TP: T prostanoid  
PKA: protein kinase A  
5-LO: 5-lipoxygenase  
PLA<sub>2</sub>: phospholipase A<sub>2</sub>  
FLAP: 5-lipoxygenase-activating protein  
CysLTR<sub>1</sub>: cysLT receptor 1  
CysLTR<sub>2</sub>: cysLT receptor 2  
ADP: adenosine diphosphate  
PF4: platelet factor 4  
FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in 1 second  
β-TG: beta-thromboglobulin  
Dp: dermatophagoides pteronyssinus  
sP-selectin: soluble P-selectin  
sCD40L: soluble CD40 ligand  
PEF: peak expiratory flow

VLA4: very late antigen 4  
12-LO: 12-lipoxygenase  
TX: thromboxane  
IG: immunoglobulin  
IgE: immunoglobulin E  
IL: interleukin  
E-NPP3: ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3  
L-ASA: lysine-aspirin  
HC: healthy control  
CEP: chronic eosinophilic pneumonia  
BMI: body mass index  
FeNO: fractional exhaled nitric oxide  
PBS: phosphate buffered saline  
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid  
FVC: forced vital capacity  
ANOVA: analysis of variance

## 引用文献

1. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* **118**:773-86, (2006)
2. Cahill KN, Bensko JC, Boyce JA, Laidlaw TM. Prostaglandin D<sub>2</sub>: A dominant mediator of aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* **135**: 245-52, (2015).
3. Shah NH, Schneider TR, DeFaria Yeh D, Cahill KN, Laidlaw TM. Eosinophilia-Associated Coronary Artery Vasospasm in patients with Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *J Allergy Clin Immunol Pract* **4**: 1215-19, (2016).
4. Lee JH, Haselkorn T, Borish L, Rasouliyan L, Chipps BE, Wenzel SE. Risk factors associated with persistent airflow limitation in severe or difficult-to-treat asthma: insights from the TENOR study. *Chest* **132**:1882-9, (2007).
5. Gaber F, Daham K, Higashi A, Higashi N, Gulich A, Delin I, James A, Skedinger M, Gyllfors P, Nord M, Dahlen SE, Kumlin M, Dahlen B. Increased levels of cysteinyl-leukotrienes in saliva, induced sputum, urine and blood from patients with aspirin-intolerant asthma. *Thorax* **63**:1076-82

(2008).

6. Christie PE, Tagari P, Ford-Hutchinson AW, Charlesson S, Chee P, Arm JP, Lee TH. Urinary leukotriene E4 concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* **143**:1025-9, (1991).
7. Smith CM, Hawksworth RJ, Thien FC, Christie PE, Lee TH. Urinary leukotriene E4 in bronchial asthma. *Eur Respir J* **5**:693-9, (1992).
8. Yamaguchi H, Higashi N, Mita H, Ono E, Komase Y, Nakagawa T, Miyazawa T, Akiyama K, Taniguchi M. Urinary concentrations of 15-epimer of lipoxin A(4) are lower in patients with aspirin-intolerant compared with aspirin-tolerant asthma. *Clin Exp Allergy* **41**:1711-8 (2011).
9. Cowburn AS, Sladek K, Soja J, Adamek L, Nizankowska E, Szczeklik A, Lam BK, Penrose JF, Austen FK, Holgate ST, Sampson AP. Overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. *J Clin Invest* **101**:834-46, (1998).
10. Kawagishi Y, Mita H, Taniguchi M, Maruyama M, Oosaki R, Higashi N, Kashii T, Kobayashi M, Akiyama K. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy*

*Clin Immunol* **109**:936-42, (2002).

11. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C(4) synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**:290-6, (2000).

12. Higashi N, Taniguchi M, Mita H, Osame M, Akiyama K. A comparative study of eicosanoid concentrations in sputum and urine in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* **32**:1484-90, (2002).

13. Bochenek G, Nagraba K, Nizankowska E, Szczeklik A. A controlled study of 9alpha,11beta-PGF<sub>2</sub> (a prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite) in plasma and urine of patients with bronchial asthma and healthy controls after aspirin challenge. *J Allergy Clin Immunol* **111**:743-9, (2003).

14. Higashi N, Mita H, Ono E, Fukutomi Y, Yamaguchi H, Kajiwara K, Tanimoto H, Sekiya K, Akiyama K, Taniguchi M. Profile of eicosanoid generation in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis assessed by new biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* **125**:1084-91, (2010).

15. Fischer AR, Rosenberg MA, Lilly CM, Callery JC, Rubin P, Cohn J,

White MV, Igarashi Y, Kaliner MA, Drazen JM. Direct evidence for a role of the mast cell in the nasal response to aspirin in aspirin-sensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* **94**:1046-56, (1994).

16. Feng X, Ramsden MK, Negri J, Baker MG, Payne SC, Borish L, Steinke JW. Eosinophil production of prostaglandin D2 in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* **138**:1089-97, (2016).

17. Sanak M, Levy BD, Clish CB, Chiang N, Gronert K, Mastalerz L, Serhan CN, Szczeklik A. Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin-intolerant asthmatics. *Eur Respir J* **16**:44-9 (2000).

18. Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, Alobid I, Mullol J, Picado C. Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E(2) in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *J Allergy Clin Immunol* **128**:66-72 (2011)

19. Ying S, Meng Q, Scadding G, Parikh A, Corrigan CJ, Lee TH. Aspirin-sensitive rhinosinusitis is associated with reduced E-prostanoid 2 receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* **117**:312-8 (2006).

20. Mastalerz L, Sanak M, Gawlewicz-Mroccka A, Gielicz A, Cmiel A, Szczeklik A. Prostaglandin E2 systemic production in patients with asthma with and without aspirin hypersensitivity. *Thorax* **63**:27-34 (2008).
21. Levy BD, Bonnans C, Silverman ES, Palmer LJ, Marigowda G, Israel E. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **172**:824-30 (2005).
22. Celik GE, Erkeköl FO, Misirligil Z, Melli M. Lipoxin A4 levels in asthma: relation with disease severity and aspirin sensitivity. *Clin Exp Allergy* **37**:1494-501 (2007).
23. Vachier I, Bonnans C, Chavis C, Farce M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. *J Allergy Clin Immunol* **115**:55-60 (2005).
24. Planaguma A, Kazani S, Marigowda G, Haworth O, Mariani TJ, Israel E, Bleecker ER, Curran-Everett D, Erzurum SC, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Gaston B, Jarjour NN, Busse WW, Wenzel SE, Levy BD. Airway lipoxin A4 generation and lipoxin A4 receptor expression are decreased in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **178**:574-82 (2008).
25. Serhan CN. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins



(ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity?

*Prostaglandins* **53**:107-37 (1997).

26. Liu T, Laidlaw TM, Katz HR, Boyce JA. Prostaglandin E2 deficiency causes a phenotype of aspirin sensitivity that depends on platelets and cysteinyl leukotrienes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**: 16987-92, (2013).

27. Laidlaw TM, Culter AJ, Kidder MS, Liu T, Cardet JC, Chhay H, Feng C, Boyce JA. Prostaglandin E2 resistance in granulocytes from patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* **133**: 1692-701, (2014).

28. Reid GK, Karman S, Vickers PJ, Mancini JA, Leveille C, Ethier D, Miller DK, Gillard JW, Dixon RA, Evans JF. Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J biol chem* **265**: 19818-23, (1990).

29. Lam BK, Penrose JF, Freeman GJ, Austen KF. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 7663-7, (1994).

30. Maclouf JA, Murphy RC. Transcellular metabolism of

neutrophil-derived leukotriene A4 by human platelets. A potential cellular source of leukotriene C4. *J Biol Chem* **263**: 174-81, (1988).

31. Patrignani P, Dovizio M. Inside platelet-leukocyte cross-talk. *Blood* **119**: 3649-50, (2012).

32. Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**:123-50, (2009).

33. Bruijnzeel PL, Warringa RA, Kok PT, Kreukniet J. Inhibition of neutrophil and eosinophil induced chemotaxis by nedocromil sodium and sodium cromoglycate. *Br J Pharmacol* **99**:798-802, (1990).

34. Sumimoto H, Takeshige K, Minakami S. Superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by leukotriene B4. *Biochim Biophys Acta* **803**:271-7, (1984).

35. Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: emerging concepts. *Allergy Asthma Immunol Res* **6**:288-95, (2014).

36. Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateauneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB,

Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF.

Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor.

*Nature* **399**:789-93, (1999).

37. Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* **275**:30531-6, (2000).

38. Austen KF, Maekawa A, Kanaoka Y, Boyce JA. The leukotriene E4 puzzle: finding the missing pieces and revealing the pathobiologic implications. *J Allergy Clin Immunol* **124**:406-14, (2009).

39. Kanaoka Y, Maekawa A, Austen KF. Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand. *J Biol Chem* **288**:10967-72, (2013).

40. Corrigan C, Mallett K, Ying S, Roberts D, Parikh A, Scadding G, Lee T. Expression of the cysteinyl leukotriene receptors cysLT(1) and cysLT(2) in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* **115**:316-22 (2005).

41. Adamusiak AM, Stasikowska-Kanicka O, Lewandowska-Polak A, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M, Jankowski A, Kowalski ML, Pawliczak R. Expression of arachidonate metabolism enzyme and receptors in nasal polyps of aspirin-hypersensitive asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* **157**: 354-62, (2012).
42. Idzko M, Pitchford S, Page C. Role of platelets in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **135**:1416-23, (2015).
43. Knauer KA, Lichtenstein LM, Adkinson NF, Jr., Fish JE. Platelet activation during antigen-induced airway reactions in asthmatic subjects. *N Engl J Med* **304**:1404-7, (1981).
44. Averill FJ, Hubbard WC, Proud D, Gleich GJ, Liu MC. Platelet activation in the lung after antigen challenge in a model of allergic asthma. *Am Rev Respir Dis* **145**:571-6, (1992).
45. Kowal K, Pampuch A, Kowal-Bielecka O, DuBuske LM, Bodzenta-Lukaszyk A. Platelet activation in allergic asthma patients during allergen challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* **36**:426-32, (2006).
46. Kowal K, Pampuch A, Kowal-Bielecka O, Iacoviello L,

- Bodzenta-Lukaszyk A. Soluble CD40 ligand in asthma patients during allergen challenge. *J Thromb Haemost* **4**:2718-20, (2006).
47. Slater D, Martin J, Trowbridge A. The platelet in asthma. *Lancet* **1**:110, (1985).
48. Page C, Pitchford S. Platelets and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* **44**:901-13, (2014).
49. Zietkowski Z, Skiepmo R, Tomasiak MM, Bodzenta-Lukaszyk A. Soluble CD40 ligand and soluble P-selectin in allergic asthma patients during exercise-induced bronchoconstriction. *J Invest Allergol Clin Immunol* **18**:272-8, (2008).
50. Morrison JF, Pearson SB, Dean HG, Craig IR, Bramley PN. Platelet activation in nocturnal asthma. *Thorax* **46**:197-200, (1991).
51. Jawien J, Lomnicka M, Korbut R, Chlopicki S. The involvement of adhesion molecules and lipid mediators in the adhesion of human platelets to eosinophils. *J Physiol Pharmacol* **56**:637-48, (2005).
52. Li N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J Leukoc Biol* **83**:1069-78, (2008).
53. Pitchford SC, Yano H, Lever R, Riffo-Vasquez Y, Ciferri S, Rose MJ,

Giannini S, Momi S, Spina D, O'connor B, Gresele P, Page CP. Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **112**:109-18, (2003).

54. Ulfman LH, Joosten DP, van Aalst CW, Lammers JW, van de Graaf EA, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelets promote eosinophil adhesion of patients with asthma to endothelium under flow conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**:512-9, (2003).

55. Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy* **44**:482-98, (2014).

56. Moriyama T, Wada K, Oki M, Matsuura T, Kito M. The mechanism of arachidonic acid release in collagen-activated human platelets. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**:93-8, (1994).

57. Song WL, Stubbe J, Ricciotti E, Alamuddin N, Ibrahim S, Crichton I, PremPeh M, Lawson JA, Wilensky RL, Rasmussen LM, Pure E, FitzGerald GA. Niacin and biosynthesis of PGD<sub>2</sub> by platelet COX-1 in mice and humans. *J Clin Invest* **122**:1459-68, (2012).

58. Maclouf J, Antonine C, Henson PM, Murphy RC. Leukotriene C<sub>4</sub> formation by transcellular biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* **714**:143-50,

(1994).

59. Laidlaw TM, Kidder MS, Bhattacharyya N, Xing W, Shen S, Milne GL, Castells MC, Chhay H, Boyce JA. Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood* **119**:3790-8 (2012).

60. Kowalski ML, Grzelewska-Rzymowska I, Rozniecki J, Szmidt M. Aspirin tolerance induced in aspirin-sensitive asthmatics. *Allergy* **39**:171-8, (1984).

61. Hope AP, Woessner KA, Simon RA, Stevenson DD. Rational approach to aspirin dosing during oral challenges and desensitization of patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* **123**:406-10, (2009).

62. Pleskow WW, Stevenson DD, Mathison DA, Simon RA, Schatz M, Zeiger RS. Aspirin desensitization in aspirin-sensitive asthmatic patients: clinical manifestations and characterization of the refractory period. *J Allergy Clin Immunol* **69**:11-9, (1982).

63. Bertele V, Falanga A, Tomasiak M, Dejana E, Cerletti C, de Gaetano G. Platelet thromboxane synthetase inhibitors with low doses of aspirin:

possible resolution of the "aspirin dilemma". *Science* **220**:517-9, (1983).

64. Capone ML, Tacconelli S, Sciulli MG, Grana M, Ricciotti E, Minuz P, Di Gregorio P, Merciaro G, Patrono C, Patrignani P. Clinical pharmacology of platelet, monocyte, and vascular cyclooxygenase inhibition by naproxen and low-dose aspirin in healthy subjects. *Circulation* **109**:1468-71, (2004).

65. Taytard A, Guenard H, Vuillemin L, Bouvot JL, Vergeret J, Ducassou D, Piguet Y, Freour P. Platelet kinetics in stable atopic asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* **134**:983-5, (1986).

66. Kimura I, Tanizaki Y, Saito K, Takahashi K, Ueda N, Sato S. Appearance of basophils in the sputum of patients with bronchial asthma. *Clin Allergy* **5**:95-8 (1975).

67. Maruyama N, Tamura G, Aizawa T, Ohnui T, Shimura S, Shirato K, Takishima T. Accumulation of basophils and their chemotactic activity in the airways during natural airway narrowing in asthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* **150**:1086-93 (1994).

68. Schroeder JT. Basophils: emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. *Immunol Rev* **242**:144-60, (2011).

69. Yoshimura C, Yamaguchi M, Iikura M, Izumi S, Kudo K, Nagase H,



Ishii A, Walls AF, Ra C, Iwata T, Igarashi T, Yamamoto K, Hirai K. Activation markers of human basophils: CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3. *J Allergy Clin Immunol* **109**:817-23 (2002).

70. McGowan EC, Saini S. Update on the performance and application of basophil activation tests. *Curr Allergy Asthma Rep* **13**:101-9, (2013).

71. Buhring HJ, Streble A, Valent P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* **133**:317-29, (2004).

72. Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, Majlesi Y, Schernthaner GH, Sperr WR, Buhring HJ, Valenta R, Valent P. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol* **110**:102-9, (2002).

73. Hauswirth AW, Sonneck K, Florian S, Krauth MT, Bohm A, Sperr WR, Valenta R, Schernthaner GH, Printz D, Fritsch G, Buhring HJ, Valent P. Interleukin-3 promotes the expression of E-NPP3/CD203C on human blood basophils in healthy subjects and in patients with birch pollen allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**:267-78, (2007).

74. Tsai SH, Kinoshita M, Kusu T, Kayama H, Okumura R, Ikeda K,

Shimada Y, Takeda A, Yoshikawa S, Obata-Ninomiya K, Kurashima Y, Sato S, Umemoto E, Kiyono H, Karasuyama H, Takeda K. The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Immunity* **42**:279-93 (2015).

75. Ono E, Taniguchi M, Higashi N, Mita H, Kajiwarra K, Yamaguchi H, Tatsuno S, Fukutomi Y, Tanimoto H, Sekiya K, Oshikata C, Tsuburai T, Tsurikisawa N, Otomo M, Maeda Y, Hasegawa M, Miyazaki E, Kumamoto T, Akiyama K. CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* **125**:483-9 (2010).

76. Mita H, Endoh S, Kudoh M, Kawagishi Y, Kobayashi M, Taniguchi M, Akiyama K. Possible involvement of mast-cell activation in aspirin provocation of aspirin-induced asthma. *Allergy* **56**:1061-7, (2001).

77. Stevenson DD. Diagnosis, prevention, and treatment of adverse reactions to aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Allergy Clin Immunol* **74**:617-22, (1984).

78. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, Cohen N, Cervin A, Douglas R, Gevaert P, Georgalas C, Goossens H, Harvey R, Hellings P, Hopkins C, Jones N, Joos G, Kalogjera L, Kern B, Kowalski M,

Price D, Riechelmann H, Schlosser R, Senior B, Thomas M, Toskala E, Voegels R, Wang de Y, Wormald PJ. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* **50**:1-12, (2012).

79. Standardization of Spirometry, 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* **152**:1107-36, (1995).

80. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* **162**:2341-51, (2000).

81. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:11877-82, (1996).

82. Cummings HE, Liu T, Feng C, Laidlaw TM, Conley PB, Kanaoka Y, Boyce JA. Cutting edge: Leukotriene C4 activates mouse platelets in plasma exclusively through the type 2 cysteinyl leukotriene receptor. *J Immunol* **191**:5807-10, (2013).

83. Paruchuri S, Tashimo H, Feng C, Maekawa A, Xing W, Jiang Y,

Kanaoka Y, Conley P, Boyce JA. Leukotriene E4-induced pulmonary inflammation is mediated by the P2Y<sub>12</sub> receptor. *J Exp Med* **206**:2543-55, (2009).

84. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* **92**:1041-8, (2003).

85. Ono E, Taniguchi M, Mita H, Higashi N, Fukutomi Y, Tanimoto H, Sekiya K, Oshikata C, Tsuburai T, Tsurikisawa N, Otomo M, Maeda Y, Matsuno O, Miyazaki E, Kumamoto T, Akiyama K. Increased urinary leukotriene E4 concentration in patients with eosinophilic pneumonia. *Eur Respir J* **32**:437-42, 2008.

86. Doyle EL, Ridger V, Ferraro F, Turmaine M, Saftig P, Cutler DF. CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood* **118**:4265-73, (2011).

87. Nizankowska E, Czerniawska-Mysik G, Szczeklik A. Lack of effect of i.v. prostacyclin on aspirin-induced asthma. *Eur J Respir Dis* **69**:363-8, (1986).

88. Palikhe S, Palikhe NS, Kim SH, Yoo HS, Shin YS, Park HS. Elevated

platelet activation in patients with chronic urticaria: a comparison between aspirin-intolerant and aspirin-tolerant groups. *Ann Allergy Asthma Immunol* **113**:276-81, (2014).

89. Mahdavinia M, Carter RG, Ocampo CJ, Stevens W, Kato A, Tan BK, Kern RC, Conley DB, Chandra R, Hulse KE, Suh LA, Norton JE, Peters AT, Grammer LC 3<sup>rd</sup>, Schwartz LB, Schleimer RP. Basophils are elevated in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis without aspirin sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* **133**:1759-63, (2014).

90. Mora J, Riggs EK, Fu J, MacGlashan DW, Jr., Fox SA, Yu B, Tobin MC, Thomas LL. Expression of the high affinity IgE receptor by neutrophils of individuals with allergic asthma is both minimal and insensitive to regulation by serum IgE. *Clin Immunol* **132**:132-40, (2009).

91. Johns CB, Laidlaw TM. Elevated total serum IgE in nonatopic patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Am J Rhinol Allergy* **28**:287-9, (2014).

92. Potaczek DP, Sanak M, Mastalerz L, Setkiewicz M, Kaczor M, Nizankowska E, Szczeklik A. The alpha-chain of high-affinity receptor for IgE (FcεRIα) gene polymorphisms and serum IgE levels. *Allergy*

61:1230-3, (2006).

93. Kupczyk M, Kurmanowska Z, Kuprys-Lipinska I, Bochenska-Marciniak M, Kuna P. Mediators of inflammation in nasal lavage from aspirin intolerant patients after aspirin challenge. *Respir Med* 104:1404-9, (2010).

94. Bochner BS, Schleimer RP. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol rev* 179:5-15, (2001).

95. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193:255-61, (2001).

96. Graff J, Klinkhardt U, Schini-Kerth VB, Harder S, Franz N, Bassus S, Kirchmaier CM. Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther* 300:952-7, (2002).

97. Caron A, Theoret JF, Mousa SA, Merhi Y. Anti-platelet effects of

GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *J Cardiovasc Pharmacol* **40**:296-306, (2002).

98. John AE, Lukacs NW, Berlin AA, Palecanda A, Bargatze RF, Stoolman LM, Nagy JO. Discovery of a potent nanoparticle P-selectin antagonist with anti-inflammatory effects in allergic airway disease. *FASEB J* **17**, 2296-8, (2003).

99. Amison RT, Momi S, Morris A, Manni G, Keir S, Gresele P, Page CP, Pitchford SC. RhoA signaling through platelet P2Y(1) receptor controls leukocyte recruitment in allergic mice. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 528-38, (2015).

100. Lussana F, Di Marco F, Terraneo S, Parati M, Razzari C, Scavone M, Femia EA, Moro A, Centanni S, Cattaneo M. Effect of prasugrel in patients with asthma: results of PRINA, a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *JTH* **13**, 136-41, (2015).

Table 1. 抗体表

血小板上の表面マーカー解析用

	血小板標識マーカー		血小板表面マーカー	
血小板上 P-selectin 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	P-selectin (CD62P)-PE	5 $\mu$ l
血小板上 CD63 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CD63-PE	5 $\mu$ l
血小板上 CD69 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CD69-PE	5 $\mu$ l
血小板上 PAC-1 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	PAC-1-FITC	5 $\mu$ l



Table 2. 血小板付着白血球の割合解析用

	血小板標識マーカー		白血球標識マーカー	
血小板付着好酸球	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRTH-2-FITC	5 $\mu$ l
血小板付着好中球	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CD16-FITC	5 $\mu$ l
血小板付着好塩基球	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRA-1-FITC	5 $\mu$ l
血小板付着 T リンパ球	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CD3-FITC	5 $\mu$ l

Table 3. 白血球に付着した血小板上の表面マーカー解析用

	血小板標識マーカー		白血球標識マーカー		血小板表面マーカー	
好酸球に付着した血小板上の P-selectin 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRTH-2-FITC	5 $\mu$ l	P-selectin (CD62P)-PE	5 $\mu$ l
好酸球に付着した血小板上の CD63 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRTH-2-FITC	5 $\mu$ l	CD63-PE	5 $\mu$ l
好酸球に付着した血小板上の CD69 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRTH-2-FITC	5 $\mu$ l	CD69-PE	5 $\mu$ l
好塩基球に付着した血小板上の P-selectin 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRA-1-FITC	5 $\mu$ l	P-selectin (CD62P)-PE	5 $\mu$ l
好塩基球に付着した血小板上の CD63 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRA-1-FITC	5 $\mu$ l	CD63-PE	5 $\mu$ l
好塩基球に付着した血小板上の CD69 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRA-1-FITC	5 $\mu$ l	CD69-PE	5 $\mu$ l
好塩基球に付着した血小板上の PAC-1 発現率	CD61-PC7	5 $\mu$ l	CRA-1-PE	5 $\mu$ l	PAC-1-FITC	5 $\mu$ l

Table 4. 好塩基球上の表面マーカー解析用

	好塩基球標識マーカー				好塩基球表面マーカー	
好塩基球上 CD203c 発現率	CRTH2-FITC	5 $\mu$ l	CD3-PC7	5 $\mu$ l	CD203c-PE	5 $\mu$ l

Table 5. 喘息安定期における血小板上の細胞表面マーカー解析対象者の臨床情報

	AERD N=30	ATA N=21	CEP N=10	HC N=14
Age, y	52 ± 13	53 ± 17	52 ± 14	41 ± 14*
Age at onset, y	33 ± 15	40 ± 15	40 ± 13	N.A.
Duration of asthma, y	19 ± 11	12 ± 11	10 ± 8*	N.A.
Male, %	23	14	0	7
BMI, kg/m <sup>2</sup>	22 ± 4	23 ± 3	20 ± 2*	21 ± 2
Smoking History, %				
Never	57	71	70	100*
Past	33	29	30	0
Current	10	0	0	0
Atopy, %	60	81	78	100
Comorbidity, %				
atopic dermatitis	10	15	10	14
allergic rhinitis	50	65	20	79*
rhinosinusitis	90	<b>38***</b>	<b>10***</b>	<b>18***</b>
Family history of asthma, %	39	50	20	0**
Pediatric asthma, %	10	19	10	0
Refractory asthma, %	43	24	44	N.A.
Pre-bronchodilator, %				
FEV <sub>1</sub>	89 ± 20	92 ± 19	110 ± 13**	ND
FEF <sub>25-75%</sub>	47 ± 24	57 ± 25	68 ± 12*	ND
Post-bronchodilator, %				
FEV <sub>1</sub>	106 ± 39	106 ± 39	113 ± 20*	ND
FEF <sub>25-75%</sub>	57 ± 29	85 ± 77	78 ± 19*	ND
Exhaled NO, bpm	48 ± 29	49 ± 34	61 ± 36	ND
Serum total IgE, kU/L	369 ± 770	385 ± 506	321 ± 333	ND
Baseline uLTE <sub>4</sub> level, pg /mg creatinine	198 (58-4288)	98 (48-1129) **	147 (54-2361)	<b>74 (37-101)</b> ***
ICS dose, µg/day†	720 (0-3600)	640 (0-1600)	321 (0-1600)	<b>0 (0-0) ***</b>
Continuous OCS treatment, mg/day	0 (0-10)	0 (0-6)	4 (0-20)	0 (0-0)
Patients conducted with L-ASA intravenous challenge test, number (%)	24/30 (80)	7/21 (33)	N.A.	N.A.
Cumulative dose of aspirin, mg	120 (25-400)	N.A.	N.A.	N.A.

P values surviving Bonferroni correction are shown in boldface ( $P < .05/24$ ).

Definition of abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; CEP, idiopathic chronic eosinophilic pneumonia; HC, healthy control; BMI, body mass index; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 second; FEF<sub>25-75%</sub>, mean forced expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity; FeNO, exhaled nitric oxide; IgE, Immunoglobulin E; uLTE<sub>4</sub>, urinary leukotriene E<sub>4</sub>; ICS, inhaled corticosteroid; OCS, oral corticosteroid; L-ASA, lysine-aspirin; N.A., not applicable; ND, no data;

†Dose in budesonide equivalents.

Data are presented as mean±SD (baseline uLTE<sub>4</sub> level, daily ICS dose, continuous OCS treatment, and cumulative dose of aspirin are presented as median with range).

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with AERD patients.

Table 6. 患者における末梢血血球分画

	AERD N=30	ATA N=21	CEP N=10
Total WBC, / $\mu$ l	7715 $\pm$ 2753	5629 $\pm$ 1531**	6896 $\pm$ 1556
Peripheral platelet count, $\times 10^4$ / $\mu$ l	25 $\pm$ 6	22 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
Peripheral eosinophil count, / $\mu$ l	465 $\pm$ 402	303 $\pm$ 374*	557 $\pm$ 618
Peripheral neutrophil count, / $\mu$ l	4885 $\pm$ 2476	3497 $\pm$ 1208*	4663 $\pm$ 1556
Peripheral basophil count, / $\mu$ l	40 $\pm$ 24	37 $\pm$ 26	39 $\pm$ 20
Peripheral lymphocyte count, / $\mu$ l	1936 $\pm$ 586	1510 $\pm$ 464*	1340 $\pm$ 369**
Peripheral monocyte count, / $\mu$ l	389 $\pm$ 142	282 $\pm$ 120**	267 $\pm$ 173*

P values surviving Bonferroni correction are shown in boldface ( $P < .05/7$ ).

Definition of abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; CEP, chronic eosinophilic pneumonia; WBC, white blood count;

Data are presented as mean $\pm$ SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with AERD patients.

Table 7. 患者および健常人における血小板活性化指標

	AERD N=30	ATA N=21	CEP N=10	HC N=14
Plasma sP-selectin level, ng/ml	63 (34-266)	48 (23-89) *	57 (31-86)	41 (35-83) *
Plasma sCD40L level, pg/ml	1529 (285-6782)	824 * (167-2655)	829 * (278-1695)	867 * (245-1204)
P-selectin expression on platelets, %	13±9	7±8*	9±7	<b>5±2**</b>
CD63 expression on platelets, %	32±16	<b>16±13**</b>	<b>11±6***</b>	<b>15±16**</b>
CD69 expression on platelets, %	82±17	62±34*	53±36**	48±38**
PAC-1 expression on platelets, %	19±15	10±13*	15±15	11±10
Platelet adhesion on eosinophils, %	51±23	36±15*	41±16	34±11*
Platelet adhesion on basophils, %	70±21	60±18	67±20	62±19
Platelet adhesion on neutrophils, %	58±25	51±22	52±23	48±18
Platelet adhesion on T lymphocytes, %	32±10	29±8	33±5	32±6
P-selectin expression on platelet-adherent eosinophils, %	12±15	11±14	6±6	9±8
CD63 expression on platelet-adherent eosinophils, %	39±29	35±29	32±21	45±23
CD69 expression on platelet-adherent eosinophils, %	17±13	17±20	23±10	15±12
P-selectin expression on platelet-adherent basophils, %	20±18	12±9	9±5	8±6*
CD63 expression on platelet-adherent basophils, %	60±27	58±26	67±27	42±26*
CD69 expression on platelet-adherent basophils, %	18±10	15±9	17±13	6±2**
PAC-1 expression on platelet-adherent basophils, %	7±7	6±9*	7±8	4±2

Pvalues surviving Bonferroni correction are shown in boldface ( $P < .05/17$ ).

Definition of abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; CEP, chronic eosinophilic pneumonia; HC, healthy control; sP-selectin, soluble P-selectin; sCD40L, soluble CD40L

Data are presented as mean ± SD (plasma levels of sP-selectin and sCD40L are presented as median with range).

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with AERD patients.

Table 8. 血小板活性化指標と血小板付着好酸球および uLTE<sub>4</sub> 値の相関係数

	Platelet-adherent eosinophils				uLTE <sub>4</sub>			
	AERD patients		All patients		AERD patients		All patients	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
P-selectin expression levels, %	0.461	0.014	0.308	0.019	0.085	0.656	0.310	0.015
CD63 expression levels, %	0.395	0.037	0.361	<b>0.005</b>	0.199	0.291	0.240	0.063
CD69 expression levels, %	0.063	0.749	0.137	0.307	0.020	0.917	0.075	0.565
PAC-1 expression levels, %	0.033	0.866	0.106	0.428	-0.066	0.730	0.110	0.397
sP-selectin levels, ng/ml	0.187	0.340	0.276	0.036	0.181	0.338	0.300	0.019
sCD40L levels, pg/ml	0.322	0.095	0.263	0.046	0.172	0.362	0.226	0.080

P values surviving Bonferroni correction are shown in boldface ( $P < .05/6$ ).

Definition of abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; uLTE<sub>4</sub>, urinary leukotriene E<sub>4</sub>; sP-selectin, soluble P-selectin; sCD40L, soluble CD40 ligand



Table 9. AERD 患者および全患者における血小板活性化指標と気管支拡張薬吸入前後の肺機能の相関係数

	Pre-bronchodilator				Post-bronchodilator			
	AERD patients		All patients		AERD patients		All patients	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
<b>FEV<sub>1</sub>, %</b>								
P-selectin expression levels, %	-0.052	0.807	-0.017	0.905	-0.073	0.727	-0.048	0.737
CD63 expression levels, %	-0.208	0.319	-0.158	0.264	-0.228	0.274	-0.147	0.297
CD69 expression levels, %	-0.140	0.504	-0.214	0.127	-0.190	0.363	-0.145	0.306
PAC-1 expression levels, %	0.345	0.091	0.068	0.632	0.303	0.141	0.042	0.769
sP-selectin levels, ng/ml	-0.349	0.087	-0.324	0.019	-0.447	0.025	-0.370	<b>0.007</b>
sCD40L levels, pg/ml	-0.297	0.149	-0.171	0.226	-0.378	0.063	-0.143	0.311
<b>FEF<sub>25-75%</sub>, %</b>								
P-selectin expression levels, %	-0.140	0.504	-0.130	0.357	-0.182	0.385	-0.190	0.178
CD63 expression levels, %	-0.286	0.166	-0.248	0.076	-0.318	0.121	-0.285	0.040
CD69 expression levels, %	-0.330	0.107	-0.325	0.019	-0.301	0.143	-0.309	0.026
PAC-1 expression levels, %	0.315	0.125	0.023	0.870	-0.244	0.241	-0.032	0.822
sP-selectin levels, ng/ml	-0.302	0.142	-0.381	<b>0.005</b>	-0.426	0.034	-0.472	<b>&lt; 0.001</b>
sCD40L levels, pg/ml	-0.251	0.226	-0.336	0.015	-0.363	0.074	-0.367	<b>0.007</b>

P values surviving Bonferroni correction are shown in boldface ( $P < .05/6$ ).

Definition of abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 second; FEF<sub>25-75%</sub>, mean forced expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity; sP-selectin, soluble P-selectin; sCD40L, soluble CD40 ligand

Table 10. アスピリン負荷試験時の血小板活性化指標を検討した患者の臨床情報

	AERD N=24	ATA N=7
Age, year	52 ± 12	55 ± 19
Male, %	21	14
BMI, kg/m <sup>2</sup>	23 ± 4	25 ± 3
Smoking History,%		
Never	67	71
Past	21	29
Current	13	0
Refractory asthma, %	38	43
Atopy, %	63	86
Continuous OCS treatment, %	25	14
Cumulative dose of aspirin, mg	125 (25-420)	N.A.
Peripheral eosinophil count, /μl	350 (193-2070)	390 (160-1000)
FEV <sub>1</sub> , %	85 ± 14	79 ± 25
FEF <sub>25-75%</sub> , %	45 ± 24	49 ± 26

P values surviving Bonferroni correction are shown in boldface (P < .05/9).

Abbreviations: L-ASA, lysine-aspirin; AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; BMI, body mass index; OCS, oral corticosteroid; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 second; FEF<sub>25-75%</sub>, mean forced expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity; N.A., not applicable;

Data are presented mean ± SD. (Cumulative dose of aspirin and peripheral eosinophil count are presented as median with range.)

Table 11. アスピリン負荷試験時における血漿 sP-selectin および sCD40L, uLTE4 値の変化

Plasma marker		Before	0-1 h Onset of reaction	1-3 h	3-6 h	12-24 h
AERD / ATA, number		24 / 7	19 / 7	24 / 7	13 / 4	10 / 4
sP-selectin, ng/ml						
	AERD	65 (25-219)	90 (32-153)	88 (33-159)	88 (36-260)	64 (41-241)
	ATA	88 (56-140)	93 (44-274)	97 (45-228)	107 (56-175)	116 (56-191)
sCD40L, ng/ml						
	AERD	1.6 (0-4.1)	1.8 (0.1-6.1)	1.8 (0.5-5.8)	1.6 (0.4-8.7)	1.2 (0.3-3.2)
	ATA	1.1 (0.2-3.0)	0.7 (0.2-5.5)	1.0 (0.7-4.8)	2.0 (0.8-4.2)	1.5 (0.5-5.7)
uLTE <sub>4</sub>		Before	0-3h	3-6h	6-9h	9-24h
AERD / ATA, number		24 / 7	24 / 7	24 / 7	24 / 7	24 / 7
uLTE <sub>4</sub> , pg/mg creatinine						
	AERD	315 (71-13257)	<b>3393***</b> <b>(346-111202)</b>	<b>5063***</b> <b>(254-163334)</b>	<b>2017***</b> <b>(246-90943)</b>	<b>823***</b> <b>(107-18925)</b>
	ATA	89 (7-2171)	97 (0-1149)	55 (0-952)	51 (23-703)	70 (12-744)

P values surviving Bonferroni correction are shown in boldface ( $P < .05/10$ ).

Abbreviations: uLTE<sub>4</sub>, urinary leukotriene E<sub>4</sub>, L-ASA; lysine-aspirin; AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; sP-selectin, soluble P-selectin; sCD40L, soluble CD40 ligand

Data are presented as median with range.

\*\*\*P < 0.001 compared to baseline.

Table 12. アスピリン負荷試験時にの血小板活性化指標を検討した患者の臨床情報

	AERD N=8
Age, year	38 ± 11
Male, n (%)	1 (12)
BMI, kg/m <sup>2</sup>	23 ± 4
Smoking History, %	
Never	63
Past	25
Current	12
Refractory asthma, %	12
Atopy, %	75
Continuous OCS treatment, %	0
L-ASA challenge test, n (%)	4 (50)
Cumulative dose of aspirin, mg	120 (45-350)
Peripheral eosinophil count, /μl	410 (193-1040)
Basal uLTE <sub>4</sub> level, pg /mg creatinine	267 (75-3239)
FEV <sub>1</sub> , %	95 ± 9
FEF <sub>25-75%</sub> , %	66 ± 19

Abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; BMI, body mass index; OCS, oral corticosteroid; L-ASA, lysine-aspirin; uLTE<sub>4</sub>, urinary leukotriene E<sub>4</sub>; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 second; FEF<sub>25-75%</sub>, mean forced expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity

Data are presented mean ± SD. (Cumulative dose of aspirin, peripheral eosinophil count, and basal uLTE<sub>4</sub> level are presented as median with range.)

Table 13. アスピリン負荷試験時における AERD 患者における血小板活性化指標の変化

	Before	0-1 h	1-3 h	9-24 h
P-selectin expression on platelets, %	11.4 ± 10.9 n = 8	14.5 ± 23.0 n = 8	10.5 ± 8.7 n = 8	10.9 ± 9.8 n = 7
CD63 expression on platelets, %	28.2 ± 26.2 n = 8	23.7 ± 19.5 n = 8	31.6 ± 21.7 n = 8	29.3 ± 31.7 n = 7
CD69 expression on platelets, %	57.1 ± 30.6 n = 8	64.6 ± 19.9 n = 8	64.5 ± 29.9 n = 8	64.1 ± 35.5 n = 7
PAC-1 expression on platelets, %	16.0 ± 12.5 n = 8	8.2 ± 12.5 n = 8	10.1 ± 12.7 n = 8	13.8 ± 23.5 n = 7
Platelet adhesion on eosinophils, %	37.7 ± 8.4 n = 4	37.2 ± 24.8 n = 4	38.1 ± 9.9 n = 4	48.3 ± 23.3 n = 4
Platelet adhesion on neutrophils, %	37.7 ± 5.3 n = 3	36.9 ± 15.4 n = 3	40.3 ± 14.5 n = 3	39.3 ± 6.8 n = 3
Platelet adhesion on lymphocytes, %	33.4 ± 10.1 n = 3	33.9 ± 11.8 n = 3	34.5 ± 2.3 n = 3	32.7 ± 7.6 n = 3
Platelet adhesion on basophils, %	47.3 ± 1.6 n = 2	75.3 ± 28.3 n = 2	54.1 ± 5.8 n = 2	57.7 ± 15.4 n = 2

Abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease

Data are presented as mean±SD.

Table14. 喘息安定期における CD203c 発現率を検討した患者および健康人の臨床情報

	AERD N=21	ATA N=22	HC N=11
Age, year	54 ± 13	53 ± 17	47 ± 10
Male, %	19	32	46
BMI, kg/m <sup>2</sup>	23 ± 4	24 ± 4	20 ± 2
Smoking History			
Never, %	57	73	N.D.
Past, %	38	23	
Current, %	5	4	
Refractory asthma, %	43	23	N.A.
Atopy, %	62	64	64
Comorbidity			
allergic rhinitis, %	57	68	0** ‡
atopic dermatitis, %	14	11	0
rhinosinusitis, %	95	39**	0*** †
Serum total IgE, kU/L	207±290	489±880	N.D.
Peripheral eosinophil count, /μl	390 (140-1070)	250 (50-1140)	N.D.
uLTE <sub>4</sub> , pg /mg creatinine§	259 (39-4288)	111 (19-629) *	N.D.
ICS dose, μg /day ¶	640 (0-1600)	800 (0-1600)	N.A.
Continuous OCS treatment, %	14	0	N.A.
Adaptive treatment, %			
Long acting β-agonist	67	73	
LTRA	52	46	N.A.
Theophylline	19	36	
Omalizumab	5	0	
FEV <sub>1</sub> % predicted, %	83 ± 19	90 ± 21	N.D.
FEF <sub>25-75</sub> % predicted, %	42 ± 22	53 ± 35	N.D.

Abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; HC, healthy control; BMI, body mass index; uLTE<sub>4</sub>, urinary leukotriene E<sub>4</sub>; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 second; FEF<sub>25-75</sub> %, mean forced expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity; N.D., no data; N.A., not appreciable

Data are presented mean ± SD (peripheral eosinophil count and baseline uLTE<sub>4</sub> level are presented as median with range).

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 as compared to AERD patients.

† P < .05 and ‡P < .001 as compared to ATA patients.

§ uLTE<sub>4</sub> levels were measured in 21 AERD patients and 11 ATA patients.

Table 15. 喘息安定期における末梢血好塩基球上の CD203c 発現率

	AERD	ATA	HC
	N=21	N=22	N=11
CD203c expression, net MFI	100±62	136±85	159±137
Anti-IgE stimulated CD203c expression, net MFI	423±244	605±355*	220±104**
IL-3 stimulated CD203c expression, net MFI	344±203	335±218	229±113

Abbreviations: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; HC, healthy control; MFI, mean fluorescence intensity; IgE, immunoglobulin E; IL-3, interleukin-3

Data are presented mean ± SD.

\*P < 0.05, \*\*P < 0.001 compared with ATA patients.



Table 16. アスピリン誘発時の CD203c 発現率の変化を検討した患者の臨床情報

	AERD N=12	ATA N=7
Age, year	51 ± 11	63 ± 11*
Male, %	25	29
BMI, kg/m <sup>2</sup>	23 ± 5	24 ± 2
Smoking history		
Never, %	67	57
Past, %	33	43
Current, %	0	0
Refractory asthma, %	50	14
Atopy, %	67	86
Comorbidity		
allergic rhinitis, %	50	83
atopic dermatitis, %	17	0
rhinosinusitis, %	92	57
Serum total IgE, kU/L	162±194	211±247
Peripheral eosinophil count, /μl	360 (193-861)	335 (210-1050)
uLTE <sub>4</sub> , pg /mg creatinine	301 (122-4288)	100 (19-629) *
ICS dose, μg /day ¶	1120 (0-1600)	720 (0-1600)
Continuous OCS treatment, %	17	0
Adaptive treatment, %		
Long acting β-agonist	75	86
LTRA	50	29
Theophylline	8	14
Omalizumab	0	0
Percent predicted FEV <sub>1</sub> , %	89 ± 18	85 ± 19
Percent predicted FEF <sub>25-75</sub> %, %	47 ± 24	40 ± 26

Abbreviations: L-ASA, lysine-aspirin; AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; BMI, body mass index; uLTE<sub>4</sub>, urinary leukotriene E<sub>4</sub>; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 second; FEF<sub>25-75</sub> %, mean forced expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity

Data are presented as mean ± SD (peripheral eosinophil count and baseline uLTE<sub>4</sub> level are presented as median with range).

\*P < 0.05 compared with AERD patients.

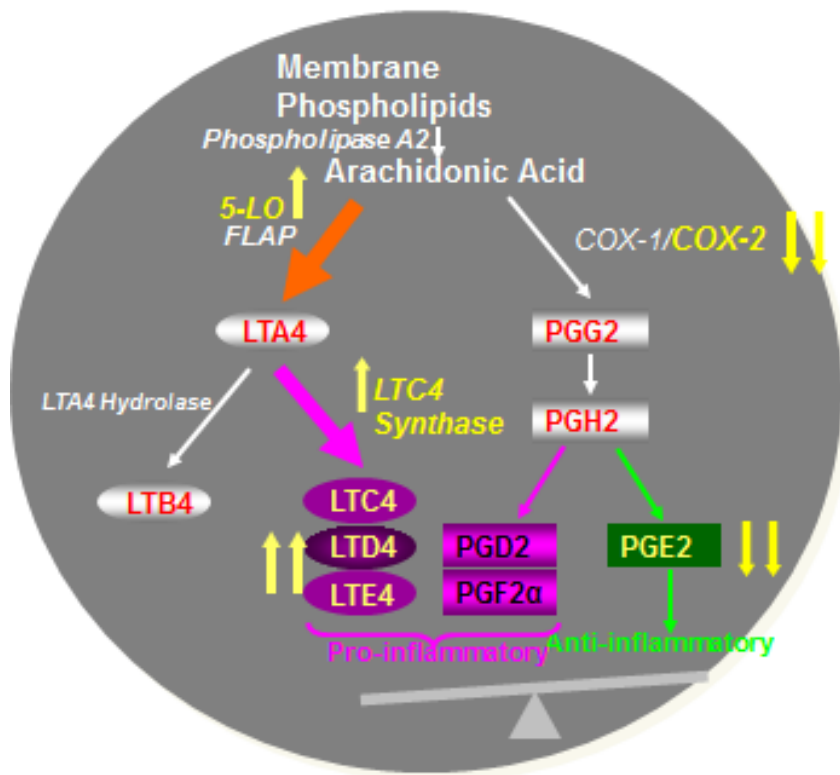
Table 17. アスピリン誘発時の末梢血中の好塩基球の割合と CD203c 発現率、uLTE<sub>4</sub> 値の変化

	Before	0-1 h Onset of reaction	1-3 h	3-6 h	9-24 h
AERD / ATA	12 / 7	12 / 7	12 / 7	12 / 7	12 / 6
Basophil count, %					
AERD	0.6 (0.02-5.2)	0.3 (0.0-0.8)**	0.2 (0.02-0.6)*	0.2	0.3
ATA	0.3 (0.1-1.6)	0.1 (0.01-1.0)	0.2 (0.0-1.2)	(0.02-1.4)*	(0.01-1.3)**
				0.2 (0.0-1.1)	0.4 (0.0-1.5)
CD203c expression, net MFI					
AERD	118±74	98±58*	101±47	96±48	88±46
ATA	87±57	95±63	83±48	93±32	93±48
Anti-IgE stimulated CD203c, net MFI					
AERD	393±235	339±199	362±265	359±207	275±230
ATA	502±357	455±333	459±345	477±248	392±208
IL-3 stimulated CD203c, net MFI					
AERD	354±221	240±179	234±174	204±171*	194±122*
ATA	233±94	191±90	188±101	212±66	167±61
uLTE <sub>4</sub>	Before	0-3h	3-6h	6-9h	9-24h
AERD / ATA	12 / 7	12 / 7	12 / 7	12 / 7	12 / 7
uLTE <sub>4</sub> , pg / mg creatinine					
AERD	300 (98-2062)	3400*** (436-111202)	3962** (254-163334)	2074* (246-49876)	817** (92-14415)
ATA	65 (19-2171)	102 (26-1149)	69 (21-952)	57 (35-703)	123 (34-675)

Abbreviations: uLTE<sub>4</sub>, urinary leukotriene E<sub>4</sub>, L-ASA; lysine-aspirin; AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ATA, aspirin-tolerant asthma; MFI, mean fluorescence intensity; IgE, immunoglobulin E; IL-3, interleukin-3

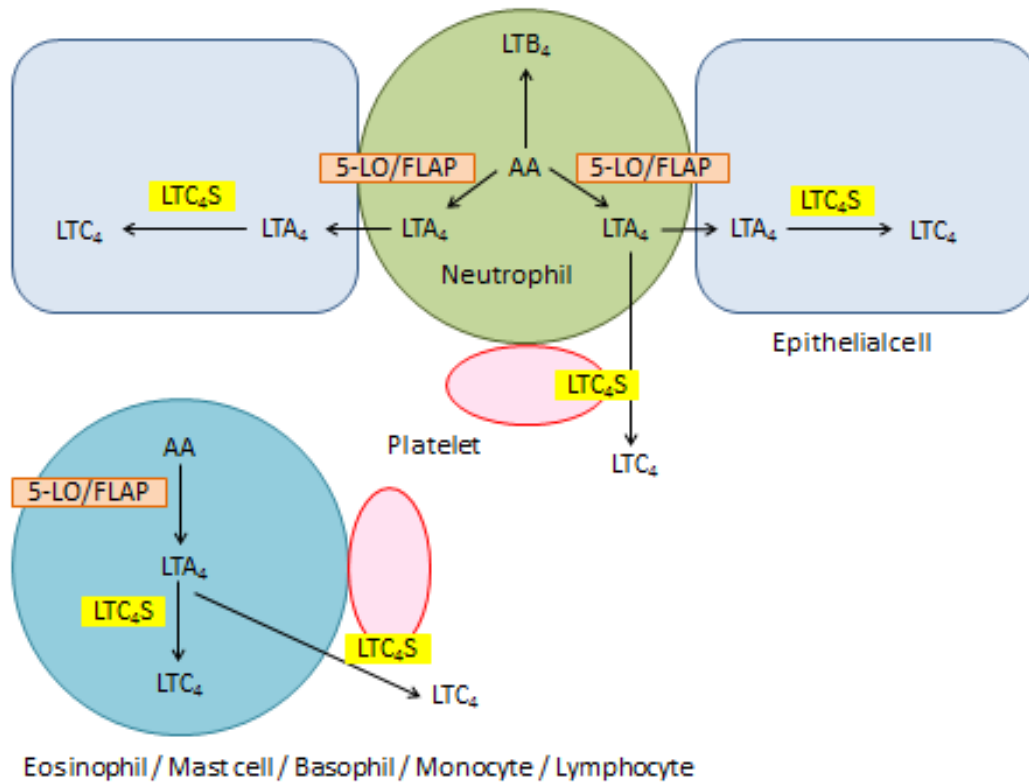
Data are presented as mean ± SD (uLTE<sub>4</sub> concentrations are presented as median with range).

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, compared to baseline.



**Figure 1. AERD におけるアラキドン酸代謝産物不均衡の概略図**

AERD の上気道組織では COX-2 の慢性的な発現低下がみられ、5-LO 経路の代謝産物である CysLTs の過剰産生と、COX 経路の代謝産物である PGE<sub>2</sub> の産生低下が認められる。COX 経路の代謝産物である PGD<sub>2</sub> は AERD の喘息安定期およびアスピリン誘発時にも増加するが、機序は分かっていない。

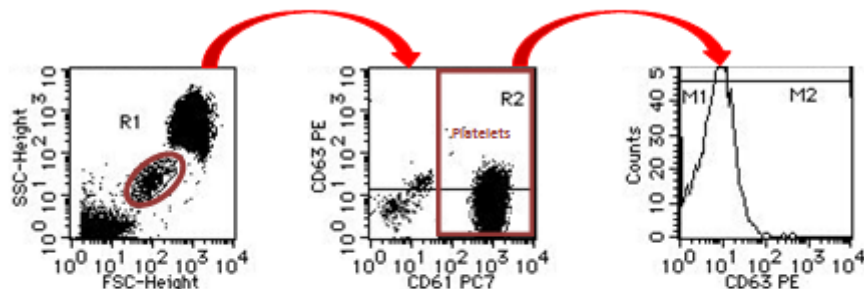


**Figure 2.** 白血球と血小板・上皮細胞とのクロストーク

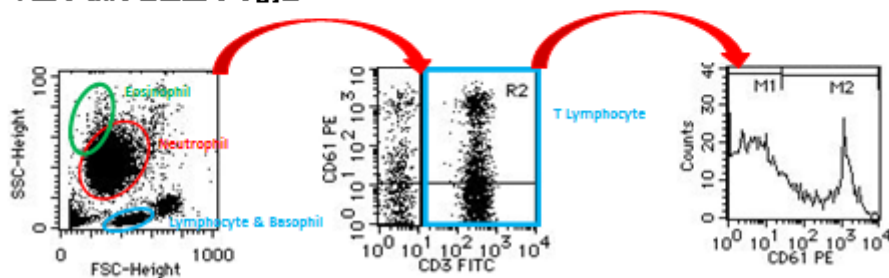
血小板や上皮細胞は 5-LO / FLAP を持たないので、単独では CysLTs を産生できないが、白血球より遊離した  $LTA_4$  を自身の  $LTC_4S$  によって代謝することで CysLTs を産生することができる。AERD における CysLTs 主要産生細胞は好酸球やマスト細胞と考えられてきたが、それ以外の細胞が関与している可能性がある。

A)

1) 末梢血血小板上の表面マーカーの発現率



2) 血小板付着白血球の割合



B)

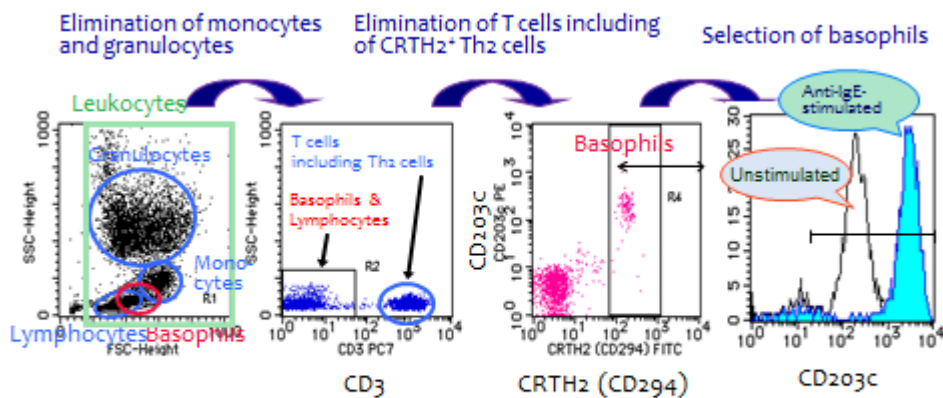
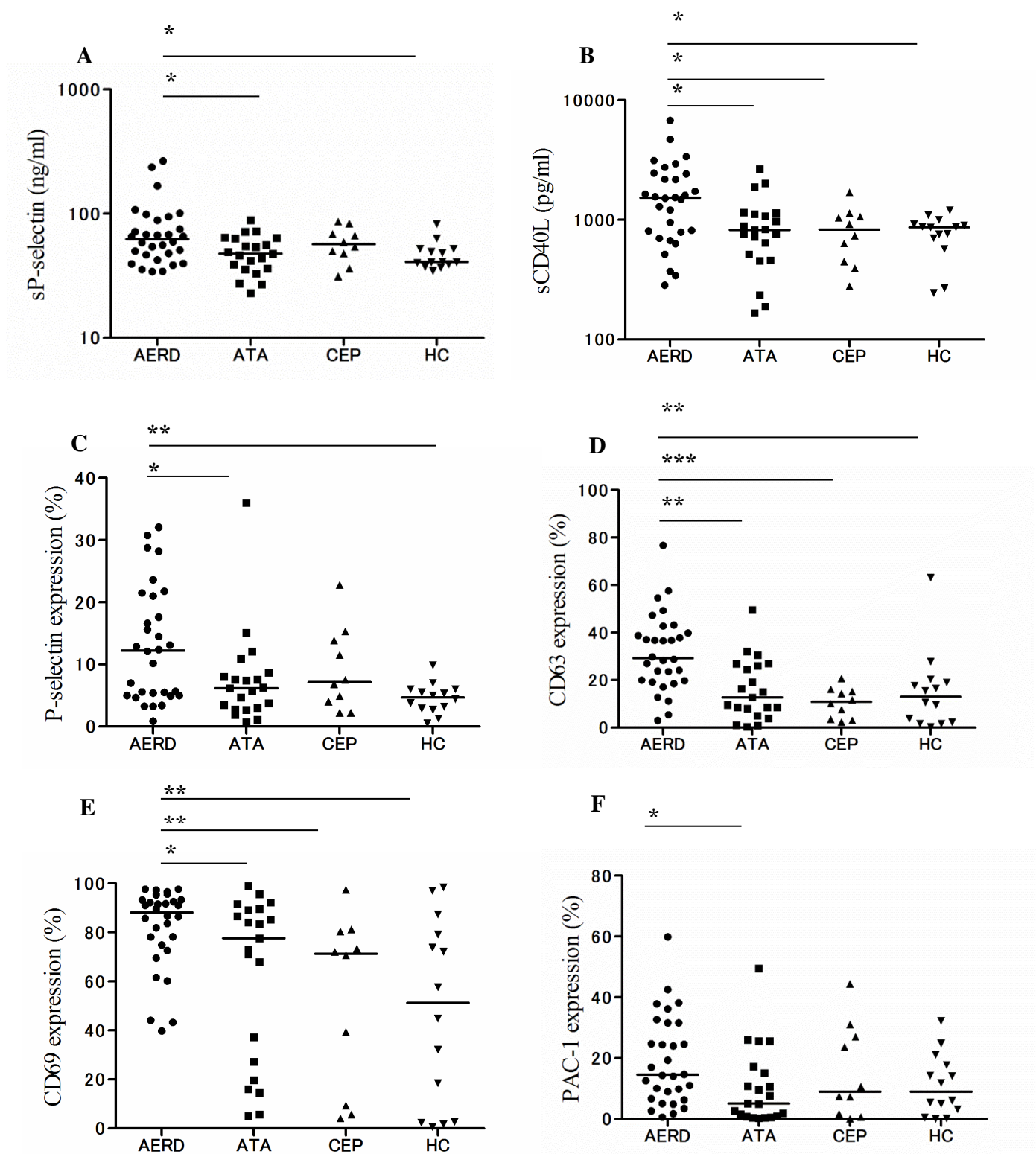


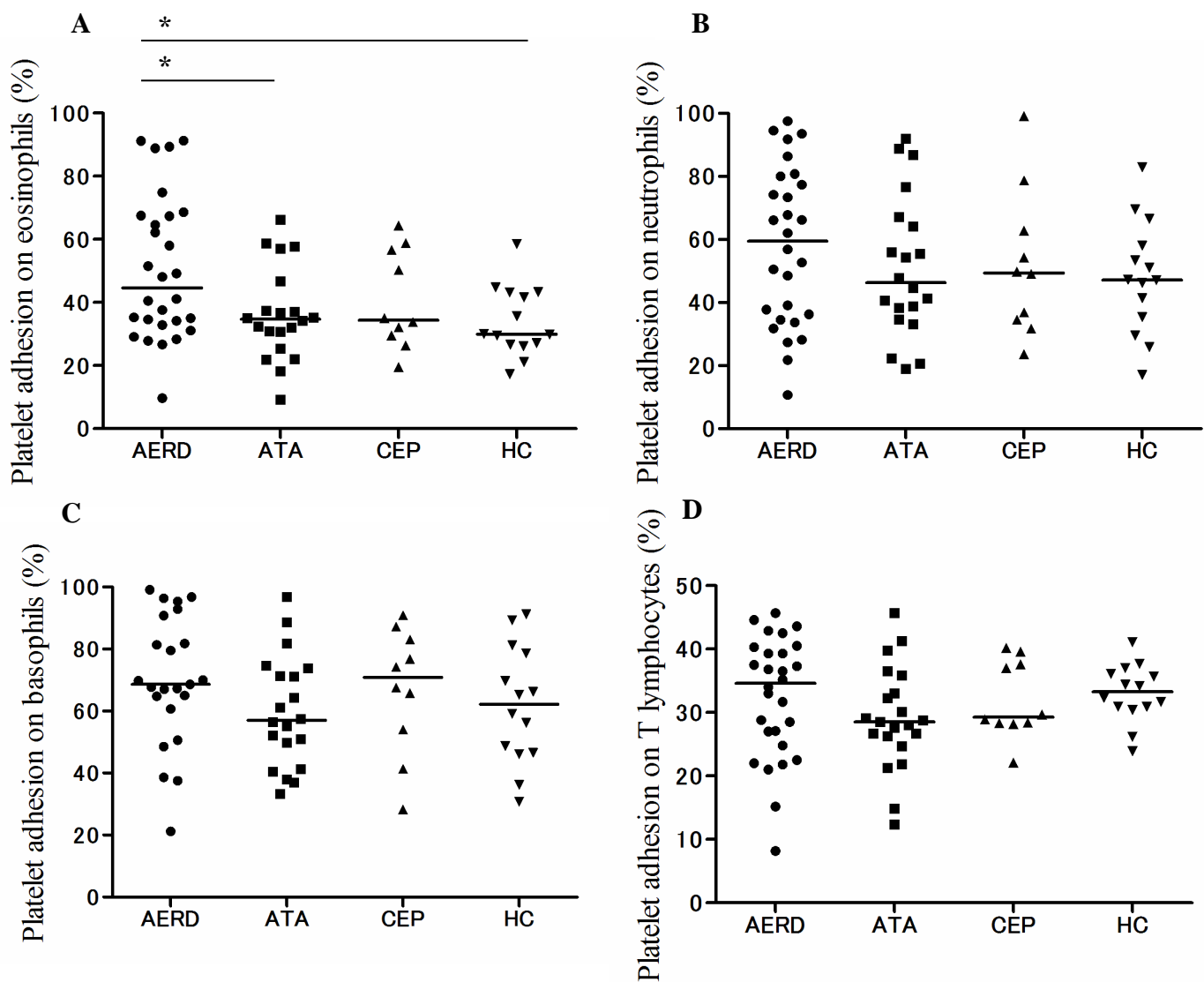
Figure 3. フローサイトメトリーによる解析

A-1) 末梢血血小板上の表面マーカーの発現率、A-2) 血小板付着白血球の割合、  
B) 末梢血好塩基球上の CD203c 発現率をそれぞれ検討した。



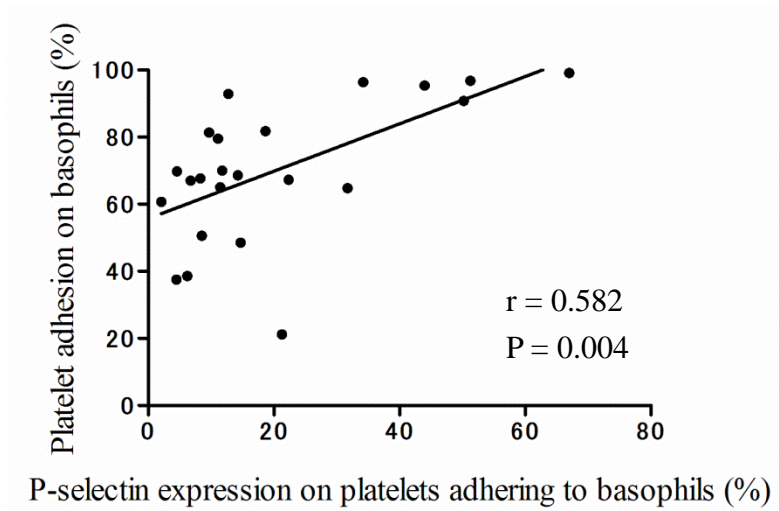
**Figure 4.** 血小板活性化指標の検討

AERD 患者 (n = 30)、ATA 患者 (n = 21)、CEP 患者 (n = 10)、健常人 (HC; n = 14) で A-B 血漿 sP-selectin, sCD40L 値および C-F 末梢血血小板上 P-selectin, CD63, CD69, PAC-1 発現率をそれぞれ比較した。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.



**Figure 5.** 血小板付着白血球の割合の検討

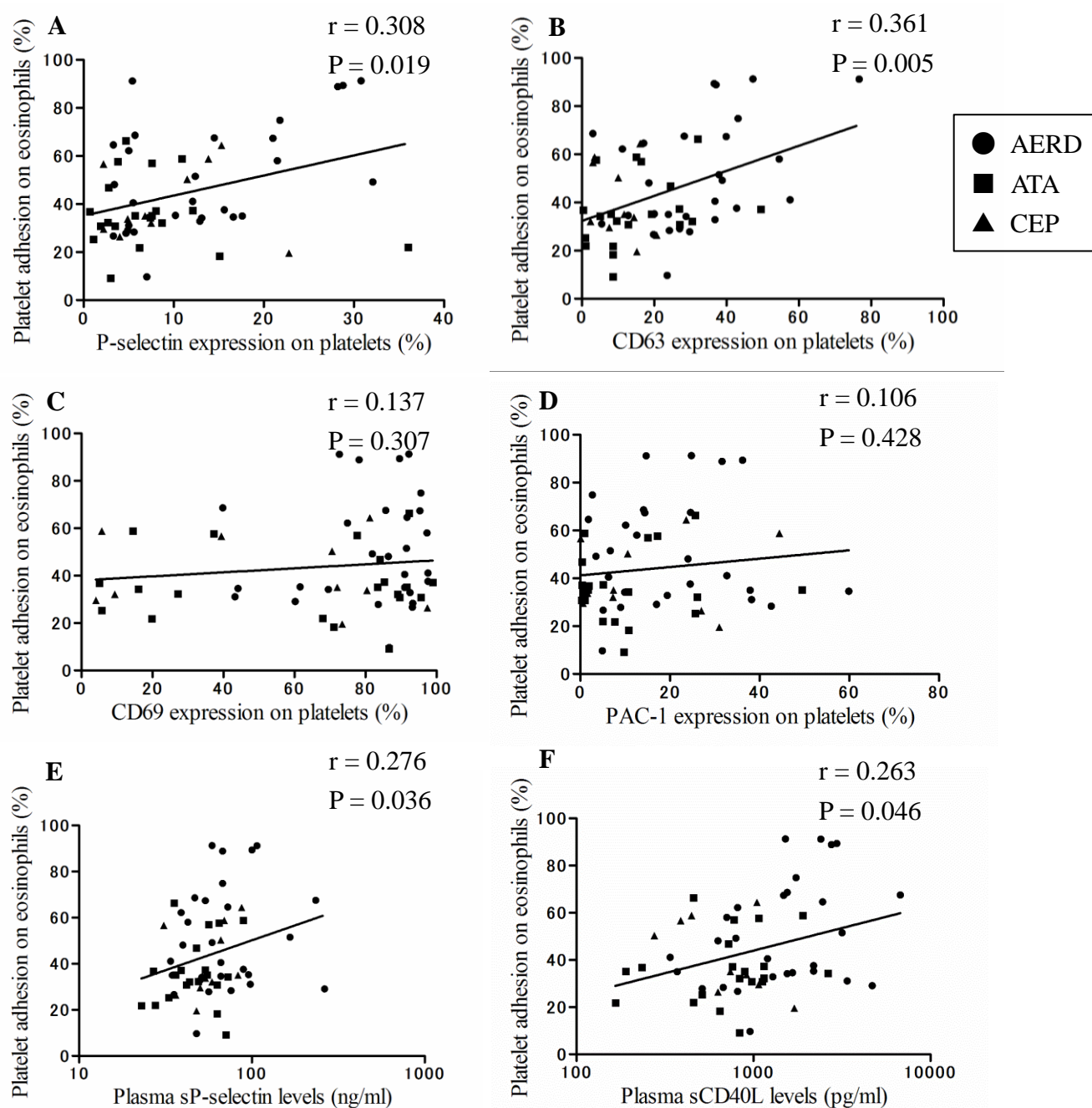
AERD 患者 (n = 30)、ATA 患者 (n = 21)、CEP 患者 (n = 10)、健常人 (HC; n = 14) で **A** 血小板付着好酸球、**B** 血小板付着好中球、**C** 血小板付着好塩基球、**D** 血小板付着 T リンパ球の割合をそれぞれ比較した。\*P<0.05.



**Figure 6.**

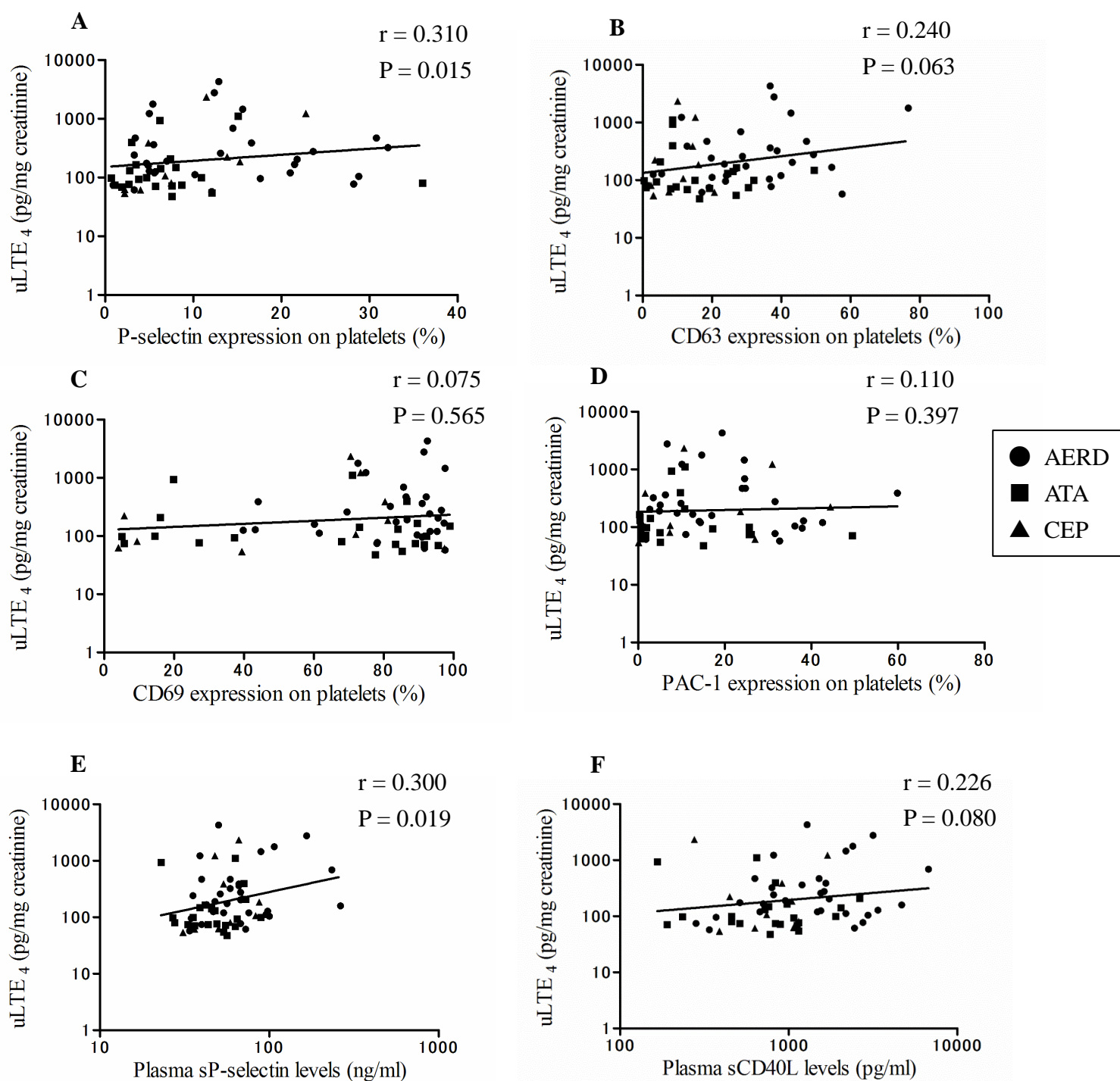
末梢血好塩基球に付着した血小板上の P-selectin 発現率は、血小板付着好塩基球の割合と正の相関を示した。





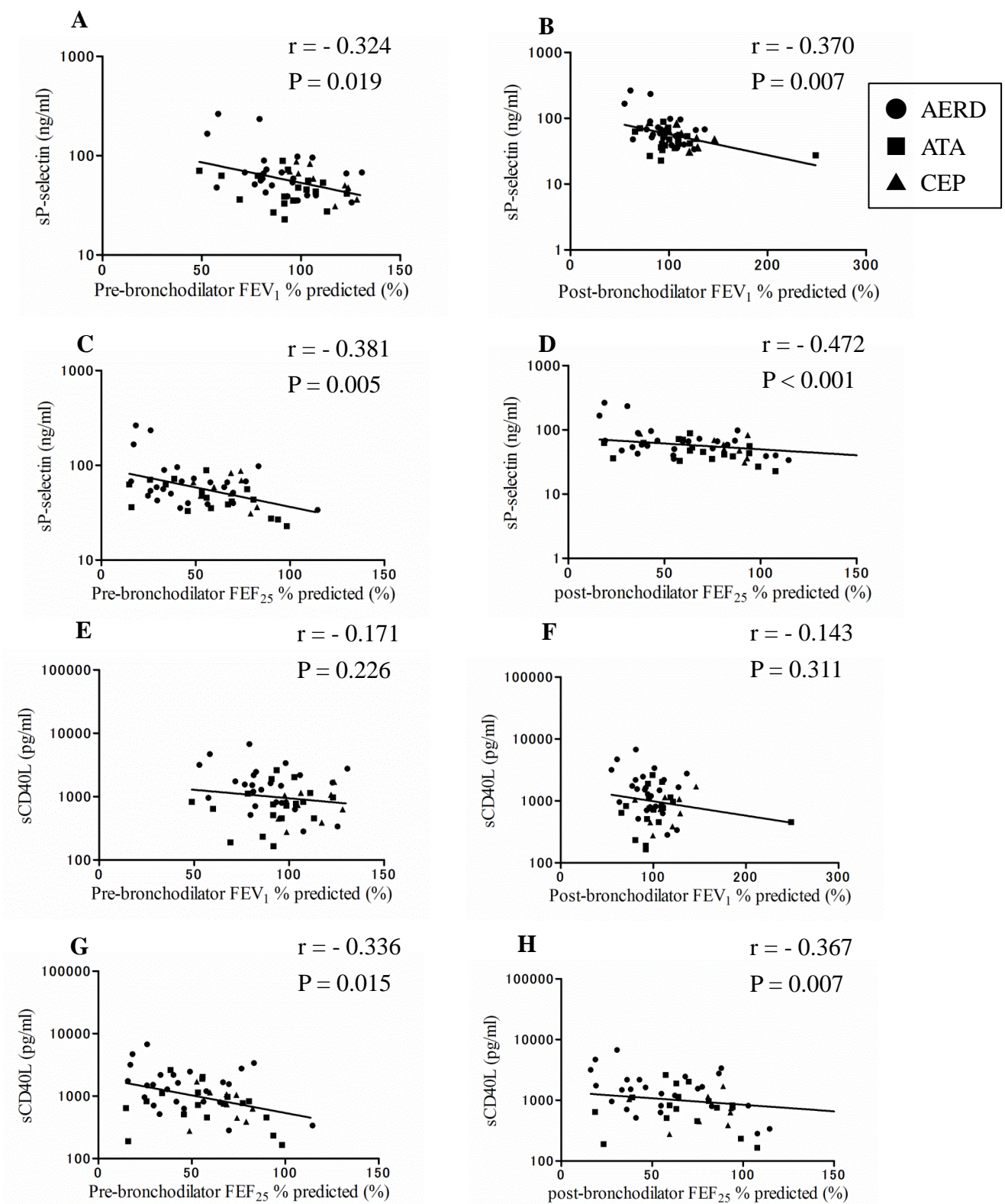
**Figure 7. 血小板活性化指標と血小板付着好酸球の割合との相関関係**

A-D 末梢血血小板上 P-selectin, CD63, CD69, PAC-1 発現率および E, F 血漿 sP-selectin, sCD40L 値と血小板付着好酸球の割合との相関関係をそれぞれ解析したところ、A, B 末梢血血小板上の P-selectin、CD63 発現率および E, F 血漿 sP-selectin, sCD40L 値はそれぞれ血小板付着好酸球の割合と正の相関を示した。



**Figure 8. 血小板活性化指標と尿中 LTE<sub>4</sub> 値の相関図**

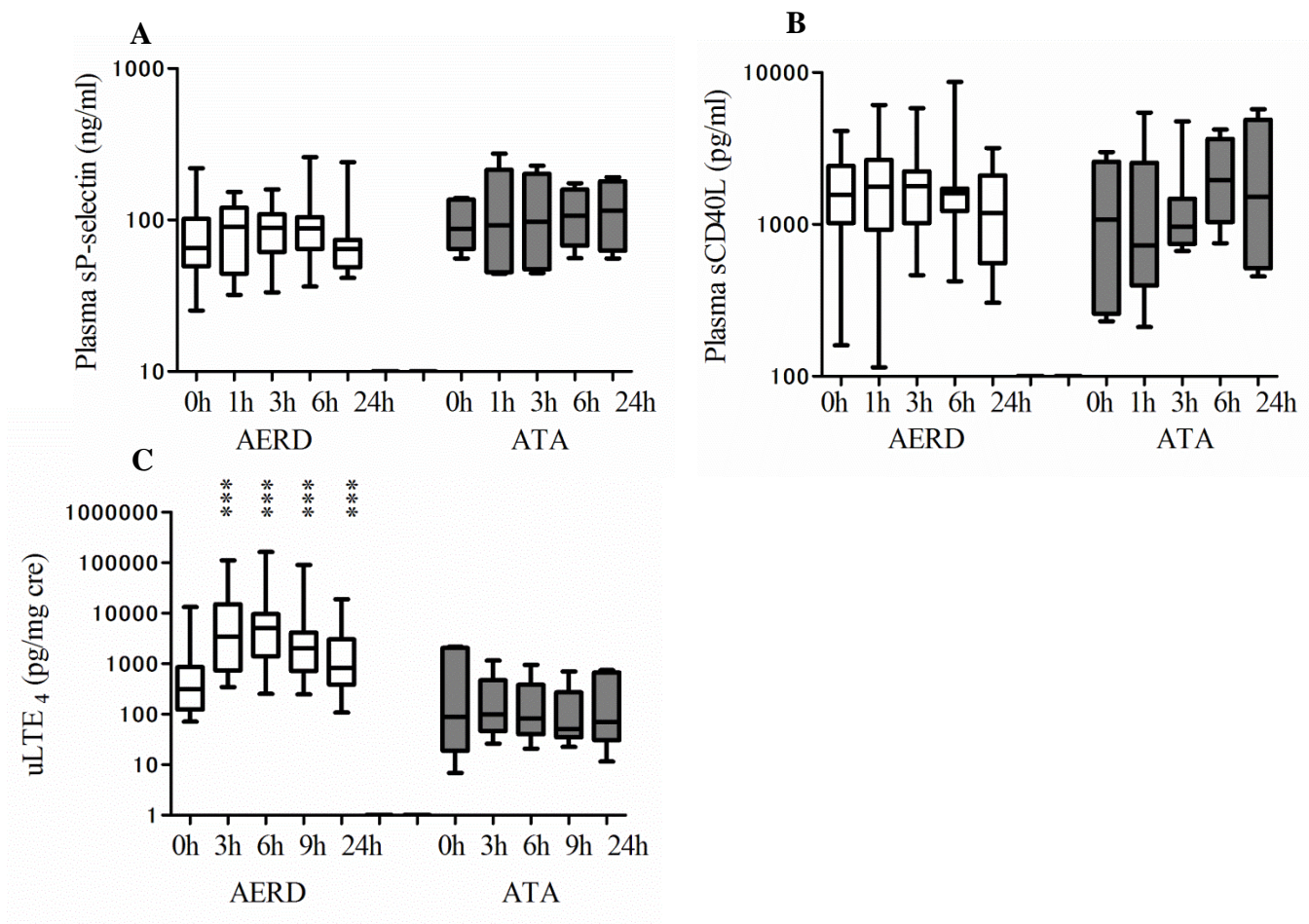
A-D 末梢血血小板上 P-selectin, CD63, CD69, PAC-1 発現率および E, F 血漿 sP-selectin, sCD40L 値と uLTE<sub>4</sub> 値の相関関係をそれぞれ解析したところ、A 末梢血血小板上の P-selectin 発現率および E 血漿中の sP-selectin 値が有意に uLTE<sub>4</sub> 値と正の相関を示した。



**Figure 9. 血漿中の血小板活性化指標と気管支拡張薬吸入前後の肺機能との相関図**

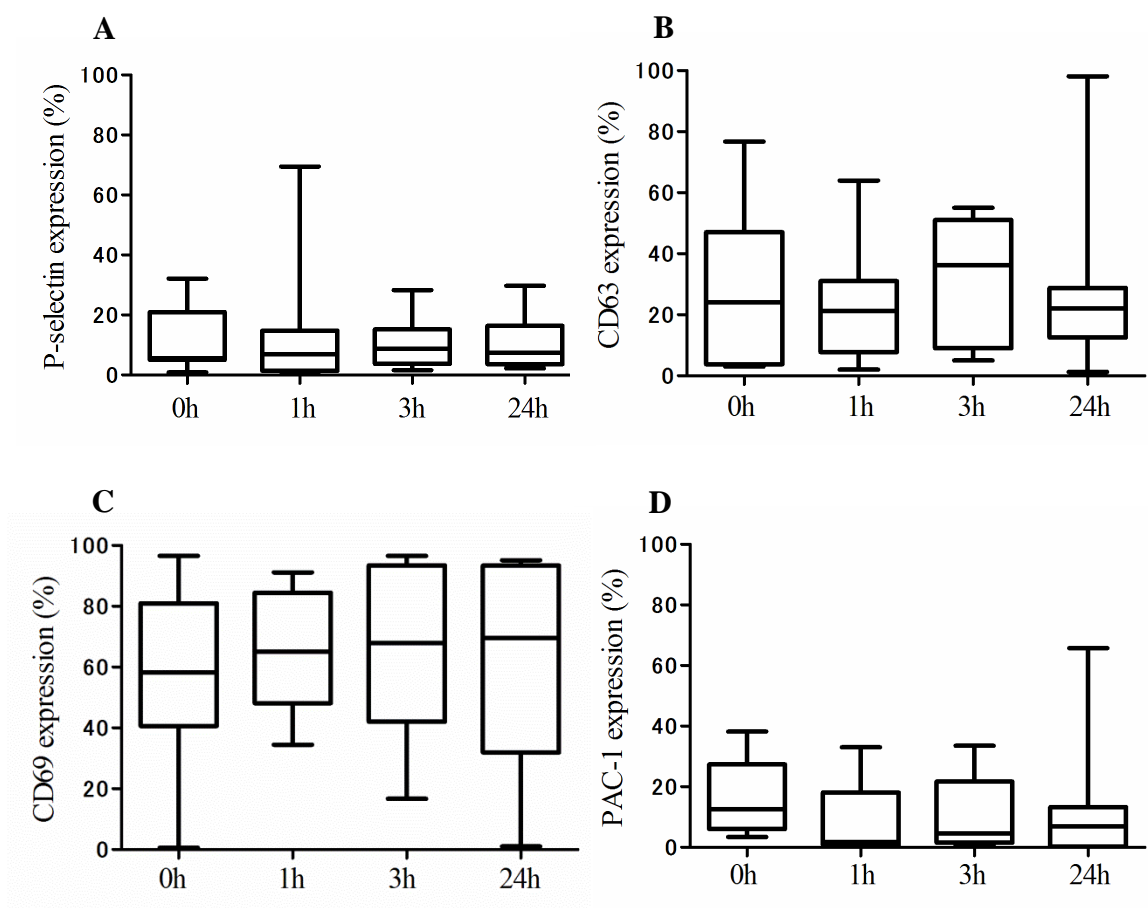
**A-D** 血漿 sP-selectin 値および **E-F** 血漿 sCD40L 値は気管支拡張薬吸入前後での肺機能と負の相関を示した。





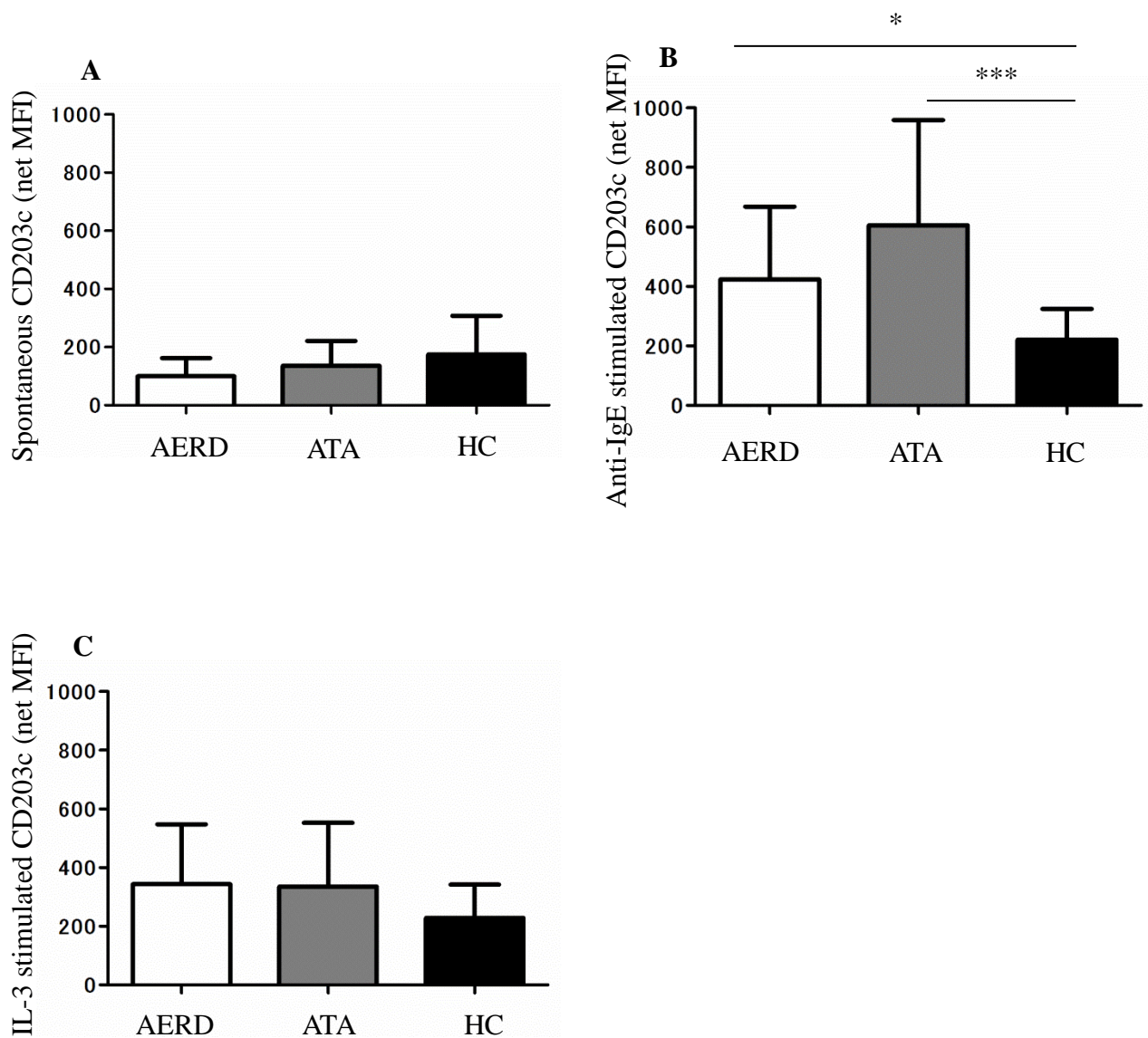
**Figure 10. アスピリン誘発時の血小板活性化指標および尿中  $\text{LTE}_4$  の推移**

AERD 患者 (n = 24), ATA 患者 (n = 7) 共にアスピリン誘発時に A, B 血漿 sP-selectin, sCD40L 値は変化しなかったが、AERD 患者ではアスピリン誘発後に C u $\text{LTE}_4$  値が著明に上昇した。\*\*\* P < 0.001



**Figure 11. アスピリン誘発時の末梢血血小板上の表面マーカーの推移**

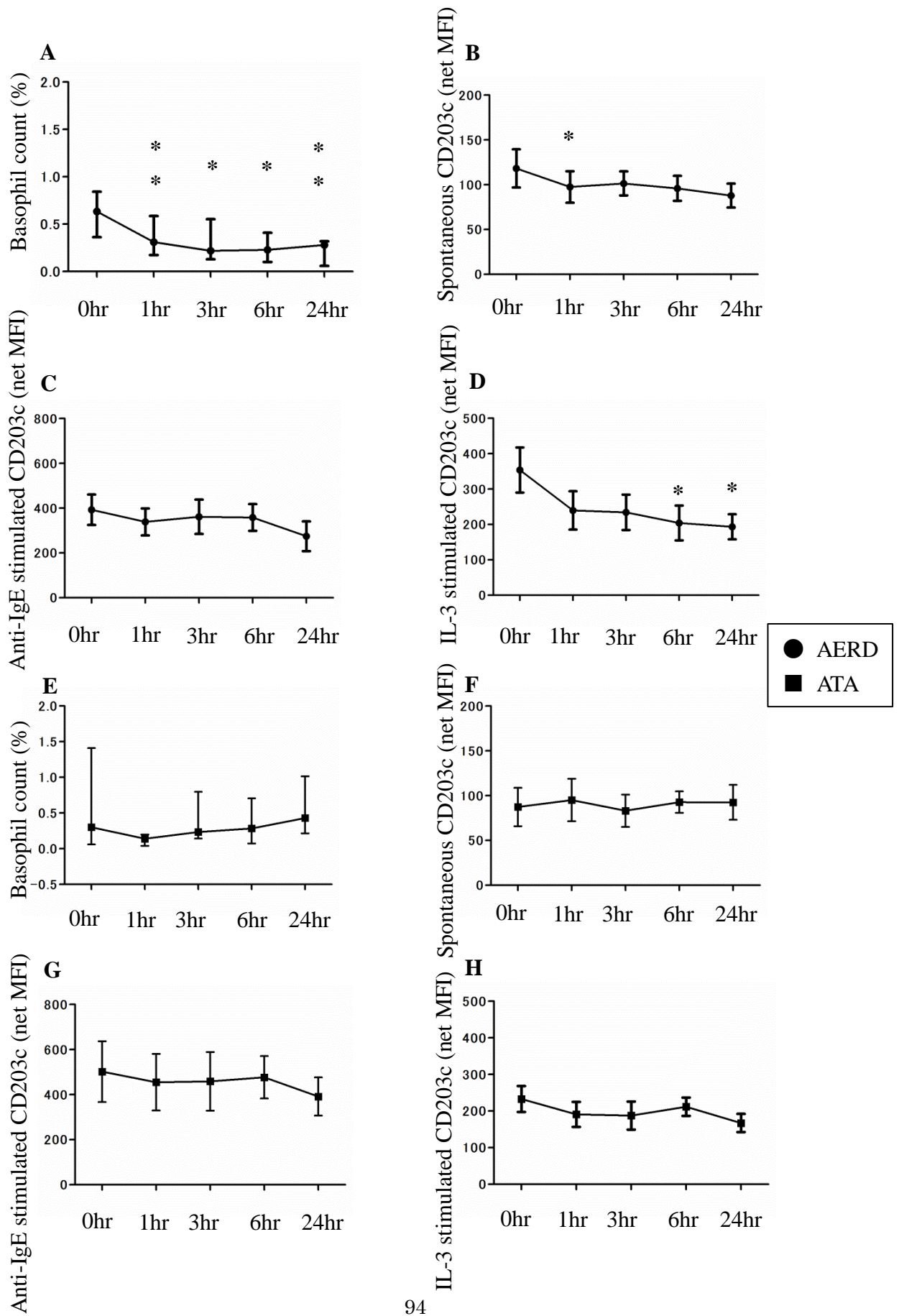
AERD 患者 (n = 8)ではアスピリン誘発時に末梢血血小板上の P-selectin, CD63, CD69, PAC-1 発現率は変化しなかった。



**Figure 12. 喘息安定期における末梢血好塩基球の CD203c 発現率**

A 無刺激および C IL-3 刺激後の CD203c 発現率は 3 群で差を認めなかったが、B Anti-IgE 抗体刺激後の CD203c 発現率は AERD 患者、ATA 患者共に HC と比較して亢進していた。

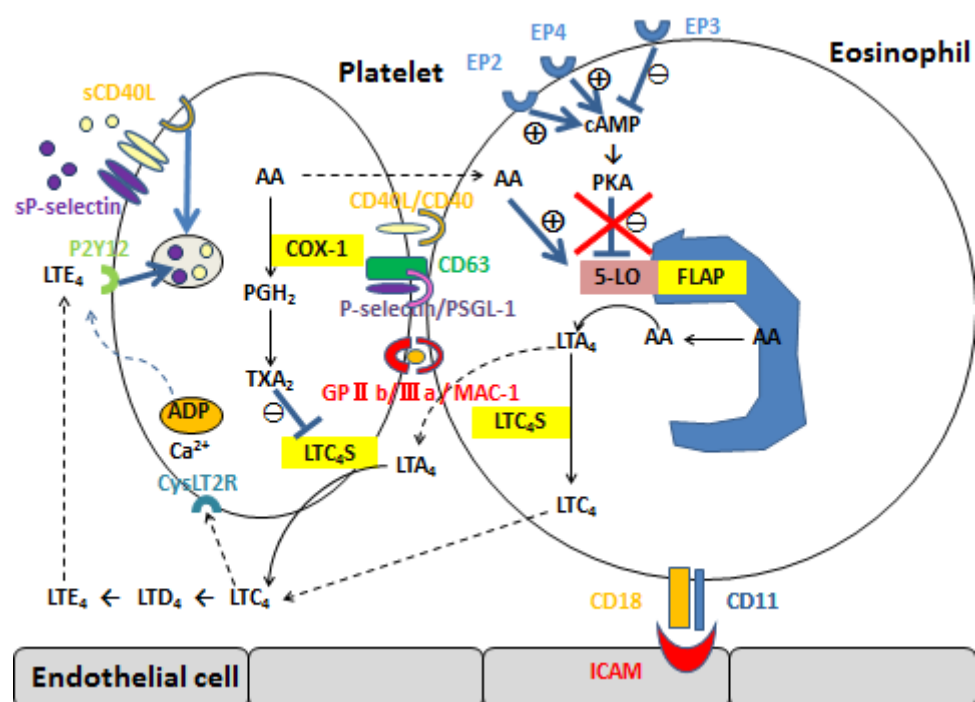
\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001



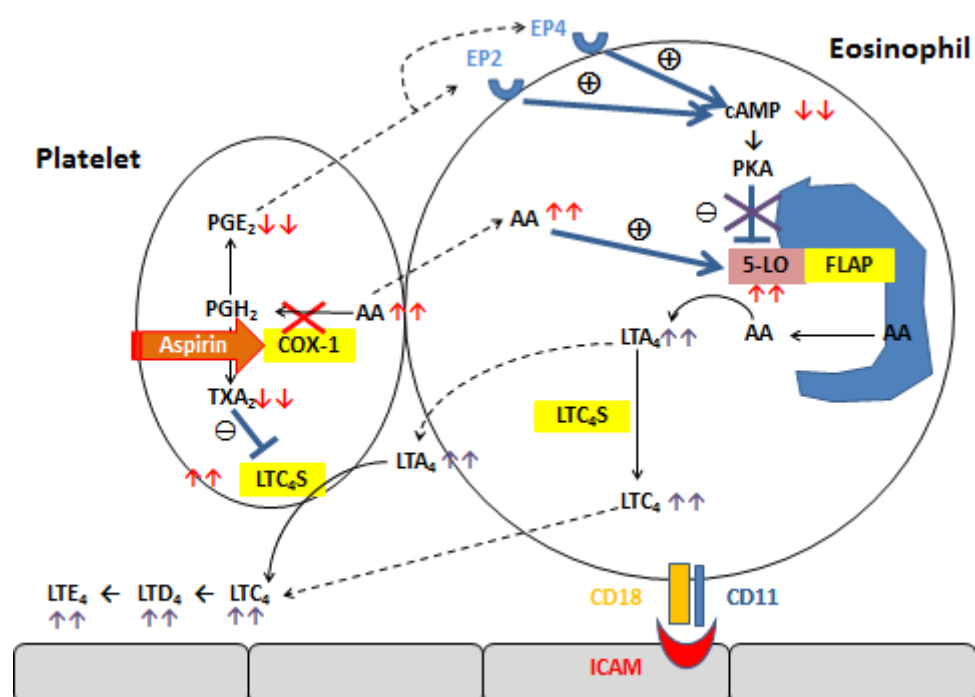
**Figure 13.** アスピリン誘発時の好塩基球数および末梢血好塩基球の CD203c 発現率  
A-D AERD 患者および E-H ATA 患者でアスピリン誘発時における A, E 末梢血好塩基球数および B, F 無刺激、C, G Anti-IgE 抗体刺激、D, H IL-3 刺激後の CD203c 発現率の推移をフローサイトメトリーにて評価した。A AERD 患者ではアスピリン誘発後に末梢血好塩基球数が有意に低下したが、E ATA 患者では変化しなかった。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$



## A 喘息安定期



## B アスピリン誘発時



#### Figure 14. AERD の病態における血小板の役割

A. 喘息安定期の AERD では末梢血血小板の活性化および血小板付着好酸球の増加がみられる。血小板は 5-LO を持たないので単独では CysLTs 産生能を有しないが、白血球より遊離した  $LTA_4$  を自身の  $LTC_4S$  によって CysLTs に代謝する事ができる。さらに、血小板の付着した白血球は、P-selectin / PSGL-1 を介するシグナルにより細胞表面に接着分子を発現し、気道にリクルートされやすくなる。また、血小板上には CysLT 受容体である  $CysLT_1R$ ,  $CysLT_2R$ ,  $P_2Y_{12}$  receptor が発現しており、過剰産生された CysLTs の刺激によって更に血小板の活性化が生じる。

B. アスピリン誘発時には、血小板の COX-1 阻害により  $PGE_2$  および  $TXA_2$  の産生が低下し、血小板の  $LTC_4S$  や、白血球の 5-LO に抑制がかかりにくくなる。さらに、血小板で余剰になったアラキドン酸が白血球へ遊離し、5-LO の活性を促すと共に CysLTs に代謝される。