

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10790

研究課題名(和文)喘息気道炎症の嗅粘膜分泌異常への関与 気道リモデリングの嗅粘膜機能障害の解明

研究課題名(英文) Relationship between asthmatic respiratory inflammation and abnormal secretion of olfactory mucosa-effect of olfactory dysfunction due to airway remodeling

研究代表者

春名 眞一 (Haruna, Shinichi)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：60198934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：組織学的所見では、嗅粘膜に好酸球浸潤、ボーマン腺の増大とともに糖蛋白分泌異常が認められ、ニオイ分子の嗅粘膜接着が妨害されていることが示唆された。ステロイド薬の投与後に、好酸球浸潤とボーマン腺増勢と分泌異常が抑制され、嗅覚の改善も認められた。また前部副鼻腔呼吸粘膜と後部との好酸球浸潤を比較すると、後部呼吸粘膜に有意であった。呼吸粘膜に著明な好酸球性浸潤の認められた症例ではFeNOが高値を示し、後部鼻腔から鼻副鼻腔へ流入し、呼吸粘膜のみならず嗅粘膜においても嗅線毛機能異常に関与することが予想された。

以上から、好酸球性副鼻腔炎の嗅覚炎症は下気道炎症の影響を受けていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Histopathological findings of olfactory mucosa in eosinophilic sinusitis showed eosinophil infiltration, growth of Bowman gland and abnormal secretion of Bowman gland. After using oral steroid, eosinophil infiltration and growth of Boman gland were suppressed and most cases with olfactory dysfunction were improved. On the other hand, histopathological eosinophilic infiltration in anterior portion of sinus respiratory mucosa significantly increased more than those in posterior portion. Oral respiratory Nitric acid (FeNO) was found high concentrations in respiratory mucosa with remarkable infiltrative eosinophils and high FeNO concentration was imaged to flow from choana into nasal cavity. Not only cilia damage of the respiratory sinus mucosa, but also olfactory cilia damage and highly secretion of Bowman gland were suggested to be relationship with FeNO. Therefore, olfactory dysfunction in eosinophilic sinusitis was thought to be affected by lower respiratory tract inflammation.

研究分野：鼻科学

キーワード：嗅粘膜 NO 好酸球 ボーマン腺 好酸球性副鼻腔炎 嗅覚障害 気道リモデリング

1. 研究開始当初の背景

喘息を多く合併する好酸球性副鼻腔炎の臨床症状で病態の早期から嗅覚障害が必発し、その病態の把握と治療は大きな課題となっている(Haruna S. ANL,2006)。

これまでの研究で、好酸球性副鼻腔炎では副鼻腔粘膜同様に嗅粘膜にも多数の好酸球浸潤がみられ、活性好酸球の組織障害蛋白による呼吸粘膜の上皮細胞障害は著明だが、隣接する嗅粘膜上皮の剥奪は少ないことが観察されている。しかし、嗅覚の化学情報伝達に關与する上皮下に存在するボーマン腺は著明な増殖・拡大が認められることが確認され、嗅粘膜上に過度の分泌異常が生じていることが考えられた。さらに嗅粘膜および嗅覚障害時の複合糖質の分布に注目し、これまで人嗅粘膜と呼吸粘膜上皮の細胞表面において糖蛋白分布の異なることをレクチン組織化学で証明し、さらに兔実験的副鼻腔炎モデルにて、正常嗅粘膜に比べて、炎症時に嗅覚のreceptorである嗅粘膜細胞表面でのシアル酸複合糖質の分布の変化やConcanavalin Aの発現を観察した。この結果はStephen. G. ShirleyがConcanavalin A 処理後のラット嗅粘膜にelectro-olfactogramでのamplitudeが有意に減少したという報告(Biochem. J. (1987) 245, 175-184)と関連する興味深い知見であり、嗅粘膜における複合糖質分布の変化は嗅粘膜機能障害に強く關与すると考えられる。

鼻副鼻腔ではNitric Oxide(NO)が多量に産生され、内因性NOは鼻粘膜において上皮細胞、血管内皮細胞、腺組織などに分布して粘液分泌の調節作用をはたし、防御機構の中心的存在を占める粘液線毛輸送に深く關わっていると考えられている。一方、炎症時には逆に、NOは種々の炎症性サイトカインによってもたらされるinducible NOSやconstitutive NOSを介して発現し、粘膜線毛周波数の減少や粘液の異常分泌を惹起させている(Yoshimura T, Haruna S. Allergol Int.2008)。同時に気管支喘息患者においても多量のNOが産生され、鼻腔後部から呼気中の多量のNOが上気道に流入し、好酸球性副鼻腔炎の発症に關与していると察する。実際、軽症～中等症の好酸球性副鼻腔炎のCTおよび内視鏡所見を観察すると、陰影およびポリープは鼻副鼻腔と嗅裂の後部から進展していることがわかる(春名眞一.日鼻誌53,2014)。したがって、好酸球性副鼻

腔炎では、上気道自体のみならず下気道の好酸球性炎症産物によって副鼻腔粘膜および嗅粘膜においての好酸球性炎症が形成され、過剰分泌が発症していると考えられる。また、治療面においてもステロイド薬は好酸球性炎症の改善に重要な薬剤であるが、点鼻ステロイド薬を使用しても好酸球浸潤が抑制されても、必ずしも嗅覚障害の改善は認められず、後部鼻副鼻腔および嗅裂の好酸球性炎症まで抑制していないことを想起させる。喘息治療の吸入ステロイド薬を鼻腔から呼出させることで、好酸球性副鼻腔炎が改善したとの報告もある(Hamada S)。さらに難治性喘息においても吸入ステロイドにて好酸球炎症の抑制にもかかわらず、過剰分泌が認められ、ステロイド抵抗因子で分泌亢進作用を有するAmphiregulinの存在も注目されている(Okumura S,et al. JACI 2005)。したがって副鼻腔粘膜とともに嗅粘膜においても同様のことが予想される。

2. 研究の目的

今回の研究では、嗅覚障害を伴った好酸球性副鼻腔炎に対して、副鼻腔呼吸粘膜障害と嗅粘膜障害の治療前後における粘液分泌の変化と改善不良因子について、上気道のみならず下気道好酸球性炎症とも関連づけて、両粘膜の分泌障害および改善機能の差異を検討する。

(1)好酸球性炎症時の嗅粘膜のボーマン腺からの分泌過多および糖蛋白の変化をきたし、嗅線毛の機能異常を引き起こしていること

(2)気道リモデリング時に呼吸粘膜と嗅粘膜上においてNOを介した糖蛋白の分泌異常が生じ、細胞表面における線毛不全と二オイ分子の嗅粘膜接着が妨害されていること

(3)下気道粘膜からのNOをはじめとする好酸球性炎症産物による嗅粘膜障害の関与を証明する。

(4)好酸球性副鼻腔炎の前部副鼻腔と後部副鼻腔粘膜の好酸球炎症状態を組織的に比較する。

(5)ステロイド薬と嗅覚障害の改善の有無を組織学的に観察する。また呼吸粘膜と嗅粘膜上でのステロイド抵抗因子についてAmphiregulinの存在を観察する。

(6)嗅粘膜細胞培養上で、単離末梢好酸球を添付し糖蛋白分布とNO合成能の変化を把握し、嗅粘膜の修復能力を検討する。

以上の研究から上気道のみならず下気道

の好酸球性炎症により、鼻副鼻腔粘膜とともに嗅粘膜上で糖蛋白の分泌異常が生じ、細胞表面における嗅線毛の機能異常を引き起こし、ニオイ分子の嗅粘膜接着を妨害することが、嗅覚障害の一因であると予期させる。また、呼吸粘膜上皮における粘液分泌異常の改善に有効なステロイド薬の使用による嗅粘膜分泌過多の不耐例の存在も示され、呼吸粘膜と嗅粘膜機能障害の差異も示唆される。

3. 研究の方法

(1)患者に本研究について十分に説明し、登録を行う。喘息合併好酸球性副鼻腔炎にて嗅覚障害を呈する患者の術前に FeNO 測定する。NO 測定装置(携帯型 NO 測定器(Nobreath, Bedford 社))を用い、安静座位で同時間帯に測定する。鼻腔からの NO 濃度も測定する。外鼻孔をペーパーノズルで密閉し、約 10~20 秒間持続的に呼気を出させ、2 l/min で吸引する。検査は 2~3 回施行し、それらの NO 濃度曲線のピーク値の平均値を呼気 NO 濃度とする。

(2)術中に前部と後部副鼻腔粘膜と嗅粘膜を採取し、好酸球の存在と複合糖質の変化を対比する。そのために、顕微鏡にて AB-PAS 染色、レクチン(WGA, ConA, UEA-1, DBA, SNA, MAA, PNA とニユラミダーゼ処理後の PNA) とムチンに対する抗体(Muc1, Muc2, Muc4, Muc5ac, Muc5, Muc8)やレクチン電顕を用いて、嗅粘膜上皮の支持細胞、基底細胞、嗅細胞、細胞表面および Bowman 腺の染色像を正常嗅粘膜と対比する。またシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて糖蛋白分泌の増減を判定する。

(3)マウス喘息リモデリングのモデルを作製する。

BALB/c マウスの腹腔内に ovalalbumin(OVA)4 µg を 2 回注入する。慢性モデルを作製するために 17 日~37 日まで OVA を毎日吸入させて 40 日目に屠殺し、リモデリングモデルを確立させる(Tanaka H, Matsuda T, et al: The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res* 50:616-24, 2001)。屠殺後、気管支および前部および後部鼻呼吸粘膜と嗅粘膜上皮を採取し、顕微鏡的、電顕的にリモデリングの状態、好酸球浸潤と NO を観察する。

(4)喘息合併好酸球性副鼻腔炎にて嗅覚

障害を呈する患者の術後の改善時の細菌培養検査および血中および副鼻腔粘膜局所での好酸球顆粒蛋白(ECP, MBP)を計測する。副鼻腔粘膜局所での ECP, MBP をファルマシアの計測キットを用いて、血中同様に測定する。同時に副鼻腔粘膜および嗅粘膜を採取し好酸球の存在と複合糖質の変化を観察する。(2)と同様の仕方で、好酸球の存在と複合糖質の変化を対比する。

(5)人における嗅覚障害時、およびマウス実験的鼻副鼻腔炎モデル時の嗅粘膜を細胞培養し、正常嗅粘膜細胞の増殖および分化能と比較する。そのために、なるべく生体内に近づける目的で、嗅粘膜上皮と繊維芽細胞や脳アストログリアの再構成による嗅粘膜の三次元培養を試みる。その特徴は嗅細胞の新生、増殖を支持する脳アストログリアと上皮細胞の分化を支持する繊維芽細胞を埋め込んだ収縮コラーゲンゲル上に嗅粘膜上皮を移植したままで培地の中に入れ、空気に触れさせながら培養する点にある。コラーゲンゲルが粘膜下のモデルとなり、繊維芽細胞や脳アストログリアと嗅粘膜上皮が上皮・間質相互作用を作り出し、表面を空気に触れさせることで細胞の分化を促す。また、上皮細胞の分化を支持すると言われる Vitamin A 加無血清培地と血清培地を用い、両者の培地での増殖および分化能を比較観察する。培養細胞に対して種々の cytokeratin 抗体や抗 Neurofilament 抗体を用い嗅上皮であることを同定する。さらに培地に種々の濃度の単離末梢好酸球を添付し、培養細胞の増殖時に分布する糖蛋白の変化を(2)のレクチンや抗体を用いて顕微鏡、電顕やシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて観察し、(2)と(3)の結果と比較検討する。

4. 研究成果

(1)人好酸球性副鼻腔炎の嗅粘膜と呼吸粘膜との組織科学的検討した。呼吸粘膜上では著明な好酸球性浸潤とともに上皮細胞障害、胚細胞増勢が見られた。好酸球顆粒蛋白(ECP, MBP)を免疫染色すると、ともにほとんどすべての好酸球に発現を認め、活性化状態であることが示された。副鼻腔炎手術で採取した前部副鼻腔と後部副鼻腔粘膜での IgE, NOS, レクチン, EG2 抗体を用い顕微鏡で対比すると後者の方が、IgE, 活性好酸球, NOS の発現が強かった。同時に好酸球性副鼻腔炎での嗅粘膜では

EG 2, NOS, IgE の発現が同様に認められ、後部副鼻腔での好酸球性炎症の存在が示唆された。

また、嗅粘膜では好酸球浸潤は少なく、基底細胞肥厚も軽度であった。嗅粘膜上での ECP, MBP の発現は少なく、強い活性状態でないこと予想された。またボーマン腺の増勢が認められ、ConA の発現が観察された。

(2) マウスリモデリングのモデルの作製
BALB/c マウスの腹腔内に ovalalbumin (OVA) 4 µg を 2 回注入する。慢性モデルを作製するために 17 日～37 日まで OVA を毎日吸入させて 40 日目に屠殺し、リモデリングモデルを作製した。鼻腔粘膜には、多数の好酸球浸潤が観察され、上皮細胞剥奪、杯細胞と基底膜肥厚が認められリモデリングの状態が認められた。一方、嗅粘膜でも呼吸粘膜ほどではないが軽度の好酸球浸潤、上皮細胞障害、基底膜肥厚が観察された。また粘液線のボーマン腺の増勢も観察され、分泌亢進が予想された。レクチン免疫染色にて ConA, SNA の発現があり、リモデリング状態の粘液分泌の変化が示唆された。

(3) 嗅粘膜の細胞培養の確立
マウスの嗅粘膜上皮と繊維芽細胞や脳アストログリアの再構成による嗅粘膜の三次元培養に上皮細胞の分化を支持すると言われる Vitamin A 加無血清培地と血清培地にて試みた。培養細胞に対して種々の cytokeratin 抗体や抗 Neurofilament 抗体を用い嗅上皮であることを同定できた。今後、詳細な培養細胞の性格を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

金谷洋明, 春名眞一. 上皮細胞間隙タイトジャクシオン. 日鼻誌、査読有、Vol. 56, No1. 2017, pp32-34.

今野渉, 春名眞一. 局所ステロイド処置による好酸球性副鼻腔炎術後の再燃抑制効果. 日鼻誌、査読有、Vol. 56, No 2. 2017, pp97-102.

Hosokawa Y, Kuboki A, Mori A, Kanaya H, Nakayama T, Haruna S. Yellow Nail Syndrome With Dramatic Improvement of Nail Manifestations After Endoscopic Sinus Surgery. Clin Med Insights Ear Nose Throat. 査読有 2017 Jul

5;10:1179550617718184. doi:

10.1177/1179550617718184.

Tada T, Hitani A, Honda N, Haruna S, Yoshimura T, Haruki K, Tanaka Y. A case of falciparum malaria: Acute hearing loss as the initial symptom. J Infect Chemother 査読有 Vol 23, No 1, 2017, pp56-58.

[学会発表](計3件)

金谷洋明, 春名眞一. 好酸球性副鼻腔炎鼻茸組織中の Matrix-metalloproteinase-8 陽性好中球の検討. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 旭川, 2017.

柏木 隆志, 金谷洋明, 平林秀樹, 春名眞二. 低酸素条件下での副鼻腔組織形態の変化 器官培養モデルを用いた検討. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 旭川, 2017.

金谷洋明, 柏木隆志, 常見泰弘, 阿久津誠, 宇野匡祐, 春名眞一. 上皮細胞間隙のタイトジャクシオン. 日本鼻科学会. 山梨, 2017

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春名 眞一 (Haruna Shinichi)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60198934

(2) 研究分担者

金谷 洋明 (Kanaya Hiroaki)

獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：40265301

深美 悟 (Fukami Satoru)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00311944

吉田 拓人 (Yoshida Takuto)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：80328369

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者
()