

令和元年6月10日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11213

研究課題名(和文) 上気道好酸球性炎症における客観的バイオマーカーの確立と治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of objective biomarkers for eosinophilic inflammation in human upper airways and its therapeutic implication.

研究代表者

竹野 幸夫 (TAKENO, SACHIO)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：50243556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では上気道のアレルギー性・好酸球性炎症における新たなバイオマーカーの確立と治療への応用を目的に、1) 鼻腔一酸化窒素(NO)濃度と鼻腔抵抗、鼻アレルギー治療効果との関連性、2) NO代謝機構を介在としたレドックス制御に関与するスカベンジャー受容体(SRs)、特にLOX-1の機能的役割の解明、3) 好酸球性副鼻腔炎(ECRS)の前頭洞粘膜の難治化病態の解明と有効な手術法の開発、4) 胃酸逆流(GERD)による組織障害の機序、など一連の課題を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本世紀に入り慢性副鼻腔炎の病状は、急激に変遷してきています。従来は「蓄膿症」としてひとくくりにされていた副鼻腔炎も実際は、癌と同じように単一の疾患(表現型)ではなく、非常に難治・再発性の一群が存在することが判明しています。本研究では鼻茸が再発しやすく“鼻の喘息”と呼ばれる「好酸球性副鼻腔炎」について、アレルギー性炎症との関連性と客観的指標(バイオマーカー)の研究を行いました。その結果、1) 鼻腔の一酸化窒素(NO)濃度と鼻腔抵抗、治療効果との関連性、2) 活性酸素による障害とスカベンジャー受容体の役割、3) 前頭洞病変の難治化病態とそれを解決する手術法、4) 胃酸逆流の影響、などの疑問を解明しました。

研究成果の概要(英文)：The purposes of the study were to elucidate and establish theoretical evidence for therapeutic application of novel biomarkers for allergic and eosinophilic inflammation in human upper airways. They include; 1) Functional relation between nasal nitric oxide (NO) levels and nasal airflow resistance as well as therapeutic effects for nasal allergy. 2) Elucidation of functional roles of scavenger receptors (SRs). Among all, we found that LOX-1 was intimately involved in the inflammatory processes of the NO-mediated redox mechanisms. 3) Pathological features of frontal sinus mucosa in intractable eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS). We have managed to develop surgical methods using free turbinate grafts to avoid post-operative bony stenosis. 4) Tissue damage mechanisms caused by gastric acid reflux diseases (GERD).

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：鼻副鼻腔炎 好酸球 一酸化窒素(NO) 鼻アレルギー スカベンジャー受容体 LOX-1 前頭洞 胃酸逆流

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多機能分子である一酸化窒素(NO)は、種々の生理機能、並びに炎症の修飾・制御に深く関与している。呼気中 NO 濃度 (FeNO) の測定は、ATS/ERS の「臨床家向けの臨床実施ガイドライン」により、気管支喘息などの下気道疾患の重症度評価や治療効果判定に臨床応用されている。鼻副鼻腔疾患においても鼻腔 NO モニタリングは測定方法と基準値の確立により、病態診断や治療効果判定に役立つ新たなバイオマーカーとなりうる有望な因子といえる。しかしながら上気道においては、ヒト鼻副鼻腔の複雑な解剖学的構造、鼻腔換気と副鼻腔自然口の開放状態、鼻副鼻腔における NO 産生と吸収の不均衡、などの基準値の設定に向けて解決すべき問題が残されている。

私はこれまで NO に関する基礎的研究として 1) 粘膜上皮における NO 産生と気道クリアランスの関連性。2) 鼻腔粘膜における NOS isoform 発現の研究。3) NO 供与体と NOS 阻害剤が細胞内転写因子の活性化に及ぼす影響の検討、4) 上気道における NO 関連酸化代謝産物の産生機序と分子生物学的解析などを行ってきた。

今回の研究ではこれらの実績をもとに、鼻腔由来の NO が上気道のアレルギー、好酸球性炎症のバイオマーカーとしての要件を満たすかどうか基礎・臨床の両面よりの検証を目的としたものである。同時に NO 産生の制御機構の解明を目的として、NO 産生基質である L-arginine 代謝とレドックス制御機構に焦点をあて、関連酵素の誘導発現機構について蛋白・遺伝子レベルでの分子生物学的解析も興味ある課題といえる。さらに鼻アレルギー並びに好酸球性副鼻腔炎症例を対象とした臨床研究を実施し、鼻腔 NO 測定値の変動と疾患の臨床症状との相関が理論的妥当性を持って得られるかどうかの検証も重要といえる。

2. 研究の目的

各種炎症性疾患の診断と治療において、その病態を鋭敏に反映するバイオマーカーの確立は、Evidence-Based Medicine (EBM) に基づいた治療方法の確立と医療資源の有効な配分の面からも非常に重要である。一酸化窒素(NO)は、ヒトの生理機能と炎症の修飾に深く関与している内因性調節因子であり、簡便かつ非侵襲的に測定できることより気道領域で標準的なバイオマーカーとして有望視されている。しかしながら鼻副鼻腔における NO の機能的役割の解析は、下気道に対比して充分になされていない。そこで本研究では、疫学的な患者数の増加と重症化が問題となっている上気道のアレルギー性・好酸球性炎症における新たなバイオマーカーの確立と治療への応用を目指すといった切り口から、

1) 鼻副鼻腔における局所 NO 測定方法の標準化と疾患関連性の検討、本指標を用いた鼻アレルギー並びに好酸球性副鼻腔炎症例を対象とした治療効果の検証。

2) NO 産生とレドックス制御に関与する物質の蛋白・遺伝子レベルでの分子生物学的解析。

3) ヒト副鼻腔各洞、特に前頭洞における難治化病態の発症と NO 産生能とサイトカイン・成長因子発現の関連性の検討。さらに好酸球性副鼻腔炎に適した手術療法としての内視鏡下副鼻腔手術 (ESS) の標準術式の確立と、前頭洞病変に対する遊離粘膜弁の狭窄予防効果について検討。

4) 副鼻腔炎の難治化、遷延化に及ぼす上部消化管疾患の影響。すなわち胃酸逆流 (GERD)、咽喉頭逆流症 (LPRD) との関連性の検討。

を目的とした。

3. 研究の方法

1) 鼻副鼻腔における鼻呼気 NO 測定方法の標準化と鼻腔開存性との関連性、並びに本指標を用いた鼻アレルギー (AR) 並びに好酸球性副鼻腔炎症例を対象とした治療効果の検証。

固有鼻腔から直接定量的にサンプルを吸引し、局所鼻腔 NO (nasal NO) を測定する手技の確立を試みた。この手法により下気道などの他の要因を受けにくく、かつアレルギー性炎症の主座である下鼻甲介表面と、副鼻腔自然口が開く鼻腔側壁の濃度を個別に測定した。そして鼻腔抵抗との関連性、鼻アレルギー病態と標準治療による変化について解析を試みた。

2) レドックス制御から見た NO 産生とスカベンジャー受容体 (SRs) に関与する物質のゲノム解析と遺伝子レベルでの分子生物学的解析、

NO と L-arginine 代謝を介在としたレドックス制御に注目し、副鼻腔炎病態を鑑別可能な遺伝子の同定を試みた。次世代シーケンサ - を用いた網羅的遺伝子解析により、SRs 遺伝子群について候補を絞り、RT-PCR、免疫組織学的検討などを用いて、鼻副鼻腔粘膜における発現と局在を検討した。

3) 前頭洞病変におけるサイトカイン発現に関して検討した。手術時に鼻茸、篩骨洞粘膜、前頭陥凹粘膜の各部位の検体を採取し、RT-PCR 法にて TGF- β 、IL-5、IL-6、iNOS の mRNA 発現を測定した。一部の粘膜を HE 染色と IL-5、IL-6 による免疫組織化学染色を行い、サイトカインの局在についても検討した。

臨床的に前頭洞病変に対する処理方法と下鼻甲介遊離粘膜弁の臨床効果について、難治性前頭洞炎に対して前頭洞単洞化手術 (EMLP) を施行した 21 例を対象とし、遊離粘膜弁使用の有無および術後排泄路の開存性について検討した。

4) 慢性副鼻腔炎における鼻腔組織への H pylori 感染と病態との関連性について検討した。免疫染色および迅速ウレアーゼテスト、PCR 法にて研究し、副鼻腔炎病態別の関連性を検討した。

4 . 研究成果

1-1) AR 群を対象に、鼻腔通気度および呼気 NO 濃度を測定したところ、鼻腔抵抗値は有意差を認めなかった。一方で、鼻呼気 NO 値は正常群で 26.5 ppb、軽症 AR 群で 44.1 ppb、中等症以上の AR 群で 54.5 ppb、と有意に上昇していた。さらに鼻アレルギー診断の正診率を算出してみたところ、ROC 曲線下面積 (AUC) が 0.85、カットオフ値の設定が 38.5 ppb (感受度 71.2%、特異度 86.7%) となった。

1-2) AR 症例を対象として鼻噴霧ステロイド剤 (INS) 使用による臨床効果と、鼻呼気 NO 濃度変化の関係について検討した。その結果下鼻甲介表面における nasal NO 値は INS 投与前と比較して 2 カ月後には有意な低下を認めた。

2) 「悪玉」としての NO を介在としたレドックス制御に注目した。次世代シーケンサー - を用いて網羅的遺伝子解析を行ったところ、SRs family に属する遺伝子群に副鼻腔炎病態に対応した遺伝子発現の特徴的差異を認めた。RT-PCR、免疫組織学的検討などを用いて、対象候補遺伝子を絞り込んだ。その結果、副鼻腔粘膜における 3 種類の SRs (MSR1、SCARB1、LOX-1) の中では、LOX-1 遺伝子が対照群と比較して、ECRS と non-ECRS の篩骨洞粘膜で有意に発現亢進が認められた。また免疫組織学的にマクロファージなどの炎症細胞、並びに血管内皮に LOX-1 発現陽性所見を認めた。蛋白 assay の結果でも副鼻腔炎症例で LOX-1 濃度が有意に高値を示しており、術前の CT スコアと有意な正の相関が見られた。LOX-1 は生体内の酸化ストレスによって生じる酸化 LDL (Oxidized Low-Density Lipoprotein; Ox-LDL) の主要な受容体である。Ox-LDL が取り込まれることで、内皮細胞機能不全や NO バイオアベイラビリティの低下を引き起こすことが知られている。今回の結果は慢性副鼻腔炎における炎症の遷延化においても LOX-1 が何らかの機能的役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられる。

3) 好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 症例の前頭陥凹粘膜では、上皮細胞と粘膜下腺細胞の細胞質により強く IL-5 と IL-6 の発現と産生亢進を認めた。これらの結果は、篩骨洞と同様に ECRS 症例における前頭洞病変の難治化の病因となっているものと考えられた。また手術術式の考案に関して、前頭洞単洞化手術 (EMLP) における遊離下鼻甲介粘膜弁の有用性の評価を行った。その結果、粘膜弁使用例は全例排泄路が確保されており、本術式は術後排泄路閉塞の予防に有用であった。

4) 胃酸逆流の影響について検討したところ、ウレアーゼの酵素反応陽性は鼻茸や篩骨蜂巢領域が主体であった。また H pylori に対する免疫組織染色でも同様の結果が得られた。難治性、再発性副鼻腔炎の病態形成の一端においては、胃酸逆流との関連性を示唆する報告が認められる。その関与の機序としては、胃酸による鼻副鼻腔への直接刺激、H pylori 感染による炎症誘導、迷走神経刺激による鼻粘膜応答などが想定されている。本検討では胃酸逆流の部位別相違、胃酸による組織障害性と炎症誘導機序、などの一端が解明された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1) Takahara D, Kono T, Takeo S, Ishino T, Hamamoto T, Kubota K, Ueda T. Nasal nitric oxide in the inferior turbinate surface decreases with intranasal steroids in allergic rhinitis: A prospective study. *Auris Nasus Larynx* 4-DEC-2018, DOI 10.1016/j.anl.2018.11.005 (査読あり)

2) Sasaki A, Kunimoto M, Takeo S, Sumiya T, Ishino T, Sugino H, Hirakawa K. Influence of pneumococcal conjugate vaccines on acute otitis media in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 45, (4): 2018, 718-721. doi: 10.1016/j.anl.2017.10.006. (査読あり)

3) 島村歩美, 上條篤, 竹野幸夫, 石野岳志, 増山敬祐: 慢性副鼻腔炎の周術期管理の現状 全国の大学病院を対象としたアンケート調査より *日鼻誌* 57 (4) : 623-630, 2018 (査読あり)

4) 竹野幸夫, 高原大輔, 石野岳志, 西田 学, 上田 勉: 好酸球性副鼻腔炎・中耳炎の診断と病態分類。 *日耳鼻会報* 121: 1152-1159 , 2018 (査読あり)

5) 石野岳志, 竹野幸夫: 胃酸逆流と副鼻腔炎。 *耳鼻臨床* 111 (11) : 727-737 , 2018. (査読あり)

6) 竹野幸夫、岡林 大、河野 崇志、弓井康平、平川 勝洋： 鼻アレルギー診断において鼻呼気一酸化窒素濃度 (nasal FeNO) は鼻腔通気抵抗とは独立した客観的指標である。 ANL Secondary Publication 日耳鼻 121: 75-76, 2018. (査読なし)

7) Takeno S, Okabayashi Y, Kohno T, Yumii K, Hirakawa K. The role of nasal fractional exhaled nitric oxide as an objective parameter independent of nasal airflow resistance in the diagnosis of allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx*. 2017 Aug;44(4): 435-441 doi: 10.1016/j.anl.2016.09.007. (査読あり)

8) Kubota K, Takeno S, Taruya T, Sasaki A, Ishino T, Hirakawa K. IL-5 and IL-6 are increased in the frontal recess of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017 May 2;46(1):36. doi: 10.1186/s40463-017-0214-2. (査読あり)

9) Takahara D, Takeno S, Hamamoto T, Ishino T, Hirakawa K. Management of Intractable Nasal Hyperreactivity by Selective Resection of Posterior Nasal Nerve Branches. *Int J Otolaryngol*. 2017;2017:1907862. doi: 10.1155/2017/1907862. Epub 2017 Dec 12. (査読あり)

10) 竹野幸夫： 「第118回日本耳鼻咽喉科学会総会 モーニングセミナー」 重症鼻過敏症に対する後鼻神経切断術(経鼻腔翼突神経切断術)。 日耳鼻 120: 1299-1304, 2017. (査読あり)

11) 竹野幸夫、河野崇志、岡林 大、久保田和法、石野岳志、平川勝洋： 鼻呼気一酸化窒素濃度 (nasal FeNO) を指標とした鼻噴霧ステロイド剤の有効性に関するパイロット研究。 耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会会誌 5(1): 38-42, 2017. (査読あり)

12) Takeno S, Kubota K, Ishino T, Taruya T, Sasaki A, Hirakawa K. CRS phenotypes in Japanese population and the role of nasal nitric oxide with L-arginine metabolisms as a surrogate marker for clinical evaluation. *Proceeding of Airway Secretion Research* 17: 23-25, 2016. (査読なし)

13) 竹野幸夫： 後鼻漏の病態生理 特集：せき・くしゃみ・はなみず JOHNS 32: 1027-1031, 2016. (査読なし)

14) 竹野幸夫、岡林大、河野崇志、久保田和法、樽谷貴之、石野岳志、平川勝洋： 鼻腔一酸化窒素 (nasal NO) のモニタリングについての検討。耳鼻免疫アレルギー (JJIAO) 34(2): 92-93, 2016. (査読なし)

15) 岡林 大、樽谷貴之、久保田和法、佐々木淳、竹野幸夫、平川勝洋： 好酸球性副鼻腔炎と鼻腔 NO 濃度の関係性について。耳鼻免疫アレルギー (JJIAO) 34(2): 134-135, 2016 (査読なし)

〔学会発表〕(計 22 件)

1) 西田学、竹野幸夫： レドックス制御からみた慢性副鼻腔炎粘膜における組織・血管障害について。第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(平成31年2月6日~2月8日、大阪)

2) 高原大輔、石野岳志、竹野幸夫： アレルギー性鼻炎患者への点鼻ステロイド治療に対する効果判定としての鼻腔 NO の有用性。第1回日本アレルギー学会 中国四国支部地方会(H31年2月2日、広島市)

3) 石野岳志、竹野幸夫： 鼻腔生理学フォーラム NO 測定の生理的意義と臨床応用。第57回日本鼻科学会(平成30年9月27日(木)~29日(土) 旭川)

4) 高原大輔、西田学、久保田和法、石橋卓弥、石野岳志、竹野幸夫、平川勝洋： 副鼻腔炎粘膜におけるレドックス制御機構とスカベンジャー受容体の発現について。第57回日本鼻科学会(平成30年9月27日(木)~29日(土) 旭川)

5) Takeno S, Takahara D, Ishino T, Wake M: Endoscopic resection of posterior nasal nerves for management of severe allergic rhinitis with intractable nasal hyper-reactivity. *BACO International 2018 (British Academic Conference in Otorhinolaryngology)*, (4-6 July, 2018,

Manchester, UK)

6) 竹野幸夫：第 119 回日本耳鼻咽喉科学会 教育セミナー 「好酸球性中耳炎・副鼻腔炎の診断と治療」 (平成 30 年 6 月 1 日、横浜市、2018)

7) 石川知慧, 石野岳史, 竹野幸夫, 平川勝洋：鼻副鼻腔炎における局所 urease 活性と H pylori の局在について。第 36 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(平成 30 年 2 月 22 日~2 月 24 日、下関)

8) 石野岳志、竹野幸夫、平川勝洋：第 56 回日本鼻科学会 パネルディスカッション 「副鼻腔炎に対する precision medicine。一酸化窒素 (NO) 濃度、胃酸逆流の観点からの病態の相違に応じた治療」 (平成 29 年 9 月 28-30 日、甲府市、2017)

9) 島村歩美 1, 上條篤 1,2, 初鹿恭介 1, 竹野幸夫 3, 石野岳志 3, 渡辺浩介 1, 林亨 1, 増山敬祐 1：慢性副鼻腔炎の手術管理-全国大学病院を対象としたアンケート調査より。第 56 回日本鼻科学会(平成 29 年 9 月 28 日、甲府) 1 山梨大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科, 2 埼玉医科大学耳鼻咽喉科/アレルギーセンター, 3 広島大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

10) 高原大輔, 竹野幸夫, 関沙織, 岡林大, 久保田和法, 石橋卓弥, 石野岳志, 平川勝洋：鼻腔形態整復術と後鼻神経切断術の臨床効果の検討。第 56 回日本鼻科学会(平成 29 年 9 月 29 日、甲府)

11) 河野崇志、竹野幸夫、岡林大、久保田和法、石野岳志、平川勝洋：アレルギー性鼻炎に対する鼻噴霧ステロイド治療における下鼻甲介領域 NO の測定意義。第 56 回日本鼻科学会(平成 29 年 9 月 28-30 日、甲府)

12) 竹野幸夫：第 118 回日本耳鼻咽喉科学会 シンポジスト 「シンポジウム 2. 耳鼻咽喉科領域における新たな診療技術 鼻副鼻腔領域 鼻腔機能の客観的検査法とバイオマーカー」 (平成 29 年 5 月 19 日、広島市、2017)

13) 有木雅彦、竹野幸夫、岡林大、久保田和法、石野岳志、平川勝洋：副鼻腔炎粘膜におけるスカベンジャー受容体の発現と一酸化窒素 (NO) 産生代謝機構についての検討。第 118 回日本耳鼻咽喉科学会(平成 29 年 5 月 18-20 日、広島)

14) 石野岳志、岡林大、久保田和法、竹野幸夫、平川勝洋：Modified Lothrop procedure における当科での手術改善点。第 118 回日本耳鼻咽喉科学会(平成 29 年 5 月 18-20 日、広島)

15) 高原大輔、竹野幸夫、関沙織、岡林大、久保田和法、石橋卓弥、石野岳志、平川勝洋：重症鼻アレルギー患者に対する後鼻神経切断術の臨床効果について。第 118 回日本耳鼻咽喉科学会(平成 29 年 5 月 18-20 日、広島)

16) 有木雅彦、竹野幸夫、岡林大、久保田和法、石野岳志、平川勝洋：副鼻腔炎粘膜におけるスカベンジャー受容体の発現と一酸化窒素 (NO) 産生代謝機構についての検討。第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(平成 29 年 4 月 13-15 日、旭川)

17) 竹野幸夫：第 55 回日本鼻科学会 パネルディスカッション 「気道炎症バイオマーカーとしての一酸化窒素 (NO) と副鼻腔炎病態」 エビデンスに基づいた我が国の副鼻腔炎病態の多様性 (平成 28 年 10 月 13-15 日、宇都宮市、2016)

18) 竹野幸夫、岡林大、河野崇志、久保田和法、石野岳志、平川勝洋：鼻アレルギーにおける鼻腔一酸化窒素を指標とした局所鼻噴霧ステロイド剤の有効性の評価。第 4 回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会(平成 28 年 9 月 2・3 日、倉敷)

19) 竹野幸夫：埼玉喘息・アレルギー研究会 「好酸球性副鼻腔炎の病態とバイオマーカー」 (平成 28 年 8 月 27 日、埼玉、2016)

20) 石野岳志、岡林大、竹野幸夫、平川勝洋：シンポジウム IV：気道上皮細胞と粘液分泌胃酸刺激によるヒト気道上皮細胞における IL-18 および IL-33 産生。第 35 回気道分泌研究会(平成 28 年 4 月 23 日、津)

21) Takeo S. Management of intractable nasal hyper reactivity by selective resection of posterior nasal nerves combined with inferior turbinectomy. Rhinology World Congress - Hong Kong 2017 (Hong Kong, Sep. 1-3, 2017)

22) Takeo S. English Session- Oral: Nasal nitric oxide measurement in the inferior turbinate can be an objective parameter for monitoring the therapeutic effects of intranasal steroids. The 66th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology (Tokyo, June 16-18, 2017)

〔図書〕(計 2件)

竹野幸夫： 鼻アレルギー。慢性副鼻腔炎と一酸化窒素（NO） 小林俊光、高橋晴雄、浦野正美編集 ENT 臨床フロンティア 耳鼻咽喉科イノベーション ―最新の治療・診断・疾患概念 pp 157-159、中山書店、東京、2016年。

竹野幸夫： 急性鼻副鼻腔炎に対するネブライザー療法の手引き 日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会編、金原出版、東京、2016年。

〔その他〕

ホームページ等

広島大学大学院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/jibika/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡林 大

ローマ字氏名：Masaru Okabayashi

研究協力者氏名：河野崇志

ローマ字氏名：, Takashi Kono

研究協力者氏名：久保田和法

ローマ字氏名：Kazunori Kubota

研究協力者氏名：高原大輔

ローマ字氏名：Daisuke Takahara

研究協力者氏名：有木雅彦

ローマ字氏名：Masahiko Arika

研究協力者氏名：西田学

ローマ字氏名：Manabu Nishida

研究協力者氏名：石野岳志

ローマ字氏名：Takashi Ishino

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。