

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20225

研究課題名(和文) D-アミノ酸発現機序と機能的役割の解明および慢性炎症病態との関連

研究課題名(英文) Interpretation about the mechanism and the function of D-amino acid, and its association with chronic inflammations

研究代表者

鈴木 祐輔 (Suzuki, Yusuke)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：50466629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に存在しないと考えられてきたD-アミノ酸、特にD-アスパラギン酸が耳鼻咽喉科領域の様々な疾患組織に発現していることが明らかとなった。難治性疾患である好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープでは、特に再発症例においてポリープ中のD-アミノ酸発現が増強する傾向が認められた。また喉頭疾患においては、慢性炎症が発生母地となる声帯結節の肥厚した上皮内や、分化増殖能異常をきたしている癌腫などの腫瘍性病変にD-アミノ酸発現が増強する傾向が認められた。D-Aspがこれらの疾患の成因のメカニズムに何らかの関連がある可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いままで生体内に存在しないと考えられ、その機能的役割も不明確であったD-アミノ酸が様々な疾患組織中に発現していることが示された。癌腫などの細胞が異常増殖している部位や、難治性炎症が起きていると考えられる鼻ポリープ組織や声帯結節に多く発現することが明らかとなった。この発現機序をさらに研究することにより、疾患の治療や予防に役立てることができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：While it is considered that D-amino acids were eliminated from living organisms, we demonstrated the expression of D-amino acid, especially D-aspartic acid, in various tissues of the otorhinolaryngological field. D-aspartic acid expressed strongly in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients in the recurrence case. It was also revealed that D-aspartic acid expressed strongly in the tissue of vocal cord nodule, squamous papilloma and laryngeal cancer. It was seemed that D-aspartic acid is correlated with the pathogenesis of these diseases.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：D-アミノ酸 D-アスパラギン酸 慢性炎症 好酸球性炎症 鼻ポリープ 声帯ポリープ 喉頭癌 乳頭腫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の生体には L 体のアミノ酸のみが存在すると考えられてきたが、近年その光学異性体である D 体のアミノ酸 (D-アミノ酸) が人の組織内に多量に存在し、様々な生理的機能を担っていることが明らかとなっている。主たる D-アミノ酸としては D-セリン (D-Ser) と D-アスパラギン酸 (D-Asp) が知られている。

D-Ser はグルタミン酸受容体の 1 つである NMDA 受容体の活性調節や統合失調症に関与することが明らかとなっている。

一方 D-Asp は出現のピークが臓器の機能・形態の成熟時期と一致するため分化や成熟に関連すると考えられている。またタンパク質中のアスパラギン酸は加齢とともにラセミ化が進み D 体となることが知られている。そして D-Asp 含有タンパク質が、老化した水晶体、脳、皮膚、骨、動脈壁など組織に多く蓄積しているため老化や自然放射線や活性酸素などの慢性炎症との関連が研究されている。タンパク質の不溶化や凝集を起こして白内障の原因となることや、アルツハイマー病におけるタンパク質中に D-Asp が認められることが報告されているが、D-Asp は D-Ser に比べいまだ不明な点が多い。

患者の QOL に直結する感覚器を扱う耳鼻咽喉科領域において、アンチエイジングは非常に重要であり、特に老化や長期間のストレスに関連すると考えられる D-Asp の発現様式、およびその機能的役割の解明は非常に興味深い。我々はこれまで、手術加療により摘出した口蓋扁桃に対し D-Asp 特異抗体による免疫組織化学的検討を行い、小児の口蓋扁桃にはほとんど発現の認められない D-Asp が成人の口蓋扁桃では多量に発現すること、また D-Asp の発現量は年齢と相関関係があることを明らかにした。さらに手術加療により摘出した鼻ポリープ、声帯ポリープ、中耳真珠腫に対し D-Asp 特異抗体による免疫組織化学的検討を行うことにより、鼻ポリープにおける多列繊毛上皮の直下から浮腫状の固有層にかけて、また声帯ポリープにおける重層扁平上皮内、そして中耳真珠腫における上皮から脱落した角化物 (debris) や角質・間質内にも D-Asp 発現が認められることも明らかにした。

### 2. 研究の目的

これまでの結果より、様々な耳鼻咽喉科疾患の組織においても D-アミノ酸が発現していることが明らかとなった。また、その発現部位は加齢や慢性炎症などの長期間のストレスに関連していると考えられた。よって D-アミノ酸、特に D-Asp は疾病発症や難治化に寄与すると考えられ、その機能的役割の解明は各疾患の発症機序や新たな治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

本研究では、各疾患・組織の背景となる因子 (炎症の程度、罹病期間、治療歴、使用薬剤の差異、病態の差異など) により発現の程度、部位などの変化があるかどうかを検討し、どのような条件下で D-Asp が最も発現するかを比較することにより、その発現機序を探求することを目的とした。

(1) まず、D-Asp の発現量が年齢との相関関係を認めた口蓋扁桃組織について、IgA 腎症の腎予後を規定する臨床的重症度分類や組織学的重症度分類によって D-Asp 発現様式に差異を認めるかどうかを検討することにより、炎症の程度と D-Asp 発現機序との関連を検討した。

(2) 鼻ポリープについては好酸球性副鼻腔炎群と非好酸球性副鼻腔炎群に分類し、各々の D-Asp 発現様式を比較することにより好酸球性炎症およびアレルギー性炎症と D-Asp 発現機序との関連を検討した。

(3) 喉頭疾患組織においては炎症性ポリープと肉芽腫、癌腫など種々の疾患組織における D-Asp 発現様式を比較し、発現機序を検討した。

(4) 小児先天性真珠腫症例の角質、および成人後天性真珠腫症例の間質に強い D-Asp 発現を認め、年齢や疾患機序による D-Asp 発現パターンに差異を認めることを以前我々は報告した。本事象をさらに検討するため、同一症例における先天性真珠腫および後天性真珠腫組織について免疫組織化学染色を行い、D-Asp 発現と疾患発症機序との関連を検討した。

### 3. 研究の方法

対象は口蓋扁桃組織 (IgA 腎症) 22 症例、鼻ポリープ 26 症例 (好酸球性副鼻腔炎 13 症例、非好酸球性副鼻腔炎 13 症例)、喉頭疾患 17 症例 (正常組織 1 症例、白板症 3 症例、扁平上皮癌 3 症例、乳頭腫 1 症例、声帯結節 3 症例、喉頭嚢胞 3 症例、声帯ポリープ 3 症例)、中耳真珠腫 1 症例である。

免疫組織化学染色は抗 D-アスパラギン酸抗体 (Cosmo Bio Co, LTD, Tokyo) を用いて DAB 発色にて行った。染色面積の評価は 40 倍視野で任意の 4 視野を撮像し、染色部位を Photoshop にて抽出後、Image J にて計測し数値化した。

統計学的手法は、Mann-Whitney の U 検定、スピアマンの順位相関係数を用い、統計値は 5% を有意水準とした。

## 4. 研究成果

### (1) IgA 腎症症例の口蓋扁桃組織中 D-Asp 発現と重症度分類

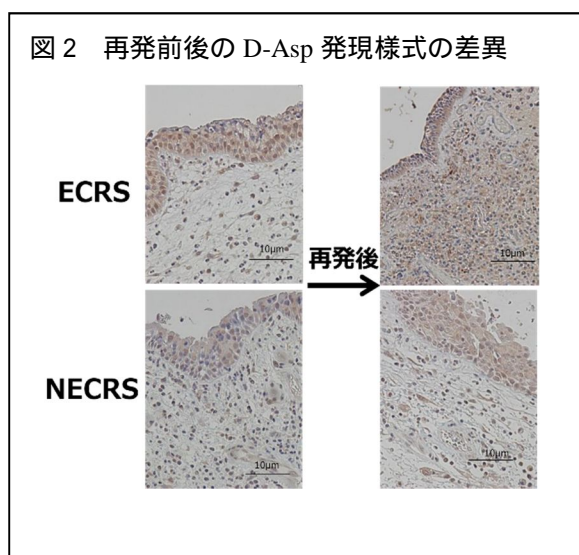
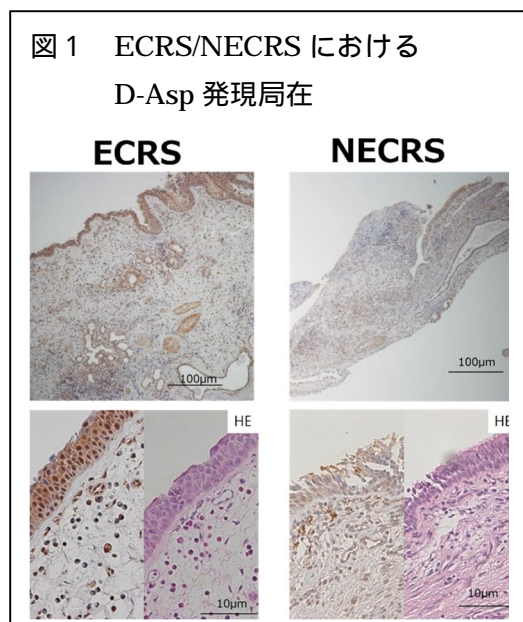
対象とした 22 症例を IgA 腎症診療指針（第 3 版）による臨床的重症度分類により分類したところ、Grade1 は 3 症例、Grade2 は 9 症例、Grade3 は 10 症例であった。また、組織学的重症度分類による分類では、Grade1 は 10 症例、Grade2 は 9 症例、Grade3 は 3 症例であった。各々、スピアマンの順位相関係数にて重症度と D-Asp 発現面積との相関関係を検討したが有意な相関は得られなかった（臨床的： $P=0.24$ 、組織学的： $P=0.74$ ）。よって、口蓋扁桃組織における D-Asp 発現と IgA 腎症の重症度の関連は明らかではなく、D-Asp が IgA 腎症の病勢に関与している可能性は低いと考えられた。

### (2) 鼻ポリープ組織における D-Asp 発現様式

難治性易再発性炎症疾患である好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープに着目し、好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 13 症例、非好酸球性副鼻腔炎 (NECRS) 13 症例における D-Asp 発現の有無、発現様式の違いを検討した。ECRS 群、NECRS 群ともに、症例ごとに程度の差はあるが繊毛上皮、間質内の炎症細胞、腺組織に D-Asp 発現を認めた。ECRS 群と NECRS 群で発現パターンに大きな差異は認められなかったが、間質内への好酸球浸潤が多い症例では、D-Asp が多く発現している傾向が認められた（図 1）。

罹病期間毎による D-Asp 発現様式の差異も検討したが、ECRS 群、NECRS 群ともに、罹病期間によらず染色パターンには変化を認めなかった。

再発症例における D-Asp 発現様式の差異については、特に ECRS 再発症例では D-Asp 発現の程度が強くなっている傾向を認めた（図 2）。

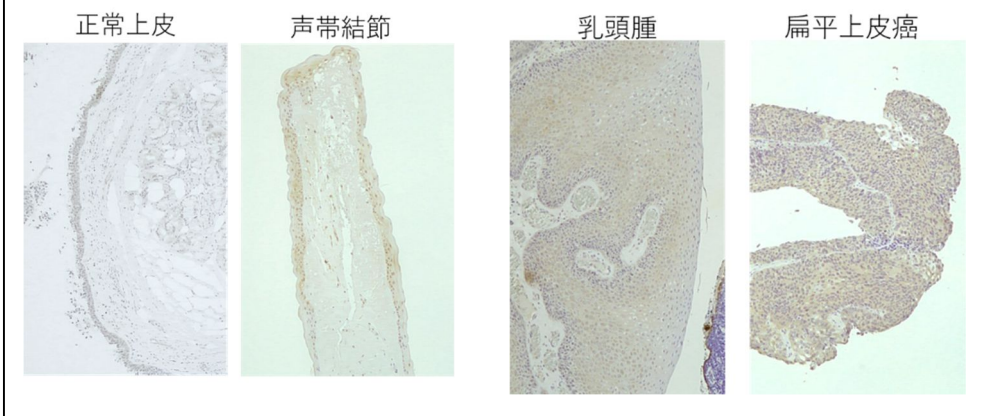


ECRS 群、NECRS 群ともに D-Asp の発現パターンに違いは認められず、アレルギー性炎症/好酸球性炎症における D-Asp の関与は今回の検討では明らかにはならなかった。しかし、再発症例では特に ECRS 症例において鼻ポリープ中の D-Asp 発現が増強する傾向があり、炎症の程度や難治性のメカニズムに D-Asp が関連する可能性が考えられた。

### (3) 喉頭疾患組織における D-Asp 発現様式

正常上皮、声帯結節、腫瘍性病変である乳頭腫および扁平上皮癌組織について、D-Asp 免疫組織化学染色をおこなった。正常上皮では呼吸上皮および腺組織に淡い D-Asp 発現を認めるのみであったが、声帯結節組織では肥厚した上皮内に強い D-Asp 発現を認めた。また、腫瘍性病変においては肥厚した上皮内から上皮下にかけてびまん性に強い D-Asp 発現が認められた（図 3）。

図3 喉頭疾患組織における D-Asp 発現局在

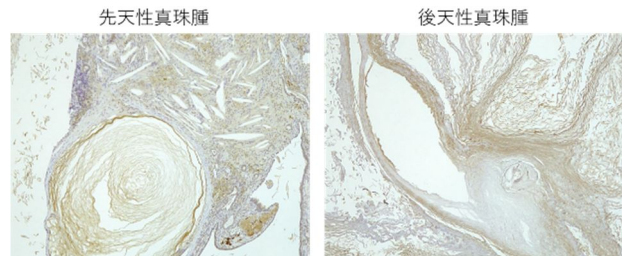


分化増殖能異常をきたしている癌腫などの腫瘍性病変や、炎症のフォーカスである結節の表層において D-Asp 発現が増強していることが明らかとなり、D-Asp 発現が細胞増殖や分化のメカニズムの一端を担う可能性があることが示唆された。

#### (4) 先天性および後天性真珠腫組織での D-Asp 発現局在

同一症例において摘出した先天性真珠腫と後天性真珠腫について D-Asp 発現局在を検討した。乳突洞内に認められた close 型真珠腫では、脱落した層状の角化物 (debris) およびともに摘出したコレステリン肉芽腫に強い発現を認め、上鼓室壁骨融解を伴う後天性弛緩部型真珠腫では層状の角化物の他に発生部位と考えられる上皮にも D-Asp 発現が認められた (図4)。発生部位により強い発現が認められたことから、D-Asp が真珠腫病態形成に関与している可能性が示唆された。

図4 先天性および後天性真珠腫組織での D-Asp 発現様式



以上より、様々な耳鼻咽喉科領域においても D-Asp 発現は認められ、これまで言われていたような年齢や炎症による刺激以外にも発現に関わる何らかの要因があると考えられた。アレルギー性炎症や好酸球性炎症との関連は明らかとはならなかったが、難治性炎症や角化、腫瘍増殖においては D-Asp が疾患の成因のメカニズムに何らかの関連がある可能性が期待された。

#### <引用文献>

Kaji Y, Oshika T ほか: Localization of D-beta-aspartic acid-containing proteins in human eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 2007, 3923-3927.

Fujii N, Satoh K ほか: Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha A-crystallin from human lens. J Biochem 116: 1994, 663-669.

Fujii N, Tajima S ほか: The presence of D-beta-aspartic acid-containing peptides in elastic fibers of sun-damaged skin: a potent marker for ultraviolet-induced skin aging. Biochem Biophys Res Commun 294: 2002, 1047-1051.

Fujii N, Shimo-Oka T ほか: Localization of biologically uncommon D-beta-aspartate-containing alphaA-crystallin in human eye lens. Mol Vis 6:2000, 1-5.

松尾清一, 川村哲也 ほか: IgA 腎症診療指針-第3版-. 日腎会誌 53: 2011; 123-135.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鈴木祐輔, 高橋裕一, 欠畑誠治	4. 巻 39
2. 論文標題 慢性および難治性炎症におけるD-アミノ酸発現機序の解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1159-1162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木祐輔
2. 発表標題 鼻ポリープ組織中におけるD-アミノ酸の発現様式
3. 学会等名 第36回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----