

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14202  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2018～2020  
 課題番号：18K09317  
 研究課題名(和文) 好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における自然免疫の役割 - アラーミンとIL-18について

研究課題名(英文) Role of innate immunity in the pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis: Alermin and IL-18

## 研究代表者

小河 孝夫 (Takao, Ogawa)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90549908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：上気道炎症における自然免疫の役割に注目し、感染や炎症によって上皮細胞などから放出されるアラーミンである、HMGB1、Calprotectin、TSLP、IL-25、IL-33、ATPなどの好酸球性副鼻腔炎における役割とその産生・制御機構について検討した。  
 好酸球性副鼻腔炎の鼻粘膜ではさまざまな抗原刺激によってこうしたアラーミンの発現が亢進し、酸化ストレス(NADPHオキシダーゼのうちDUOX1)がその放出に関わっていた。NADPHオキシダーゼ阻害薬の点鼻投与は好酸球性副鼻腔炎のモデルマウスで鼻粘膜の炎症を抑制し、新たな治療ターゲットになることが明らかになった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

2015年に難病指定された好酸球性鼻副鼻腔炎は、著明な好酸球浸潤と多発する鼻茸、嗅覚障害を特徴とする難治性疾患で、いまだに病態が不明で、手術を行っても再発しやすく、ステロイド以外に有効な治療法がない。本研究ではその病態にアラーミンとして上皮細胞から放出されるHMGB1、Calprotectin、TSLP、IL-25、IL-33、ATPなどによる自然免疫反応が重要で、酸化ストレスがその放出に関わっていることを明らかにした。さらに酸化ストレスの制御がマウスモデルでの鼻粘膜炎症を抑制することも確認し、新たな治療法の開発につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Alarmins such as HMGB1, Calprotectin, TSLP, IL-25, IL-33, ATP, are released from airway epithelial cells by various inflammatory stimuli, and play important roles in innate immune responses of airway inflammation. We revealed that allergens such as Alternaria, house dust mite, protease from *S aureus*, stimulated the release of these alarmins and that mRNA and protein expression of these alarmins were increased in nasal epithelial cells from patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis.

Oxidative stress (NADPH oxidase-DUOX1) and ATS are important in the release of TSLP, IL-25, IL-33, and intranasal instillation of NADPH oxidase inhibitors attenuated the nasal inflammation in mouse model of eosinophilic chronic rhinosinusitis.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 酸化ストレス HMGB1 Calprotectin IL-25 IL-33 TSLP NADPH oxidase

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2015年に難病指定された好酸球性鼻副鼻腔炎は、著明な好酸球浸潤と多発する鼻茸、嗅覚障害を特徴とする難治性疾患で、いまだに病態が不明で、手術を行っても再発しやすく、ステロイド以外に有効な治療法がない。

近年、獲得免疫に加えて自然免疫の重要性が注目され、自然免疫にはToll-like receptor (TLR) や Protease activated receptors (PARs) などのパターン認識受容体によって異物や病原体を認識する機序と、感染や炎症に伴う細胞傷害によって放出される Danger signal (アラミン) によって惹起される反応がある。アラミンとしては、HMGB1, S100 蛋白 (Calprotectin), TSLP, IL-25, IL-33, ATP などが知られているが、好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における役割は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、好酸球性鼻副鼻腔炎の発症・悪化における自然免疫の関与について、特にアラミン (HMGB1, S100 蛋白-Calprotectin, TSLP, IL-25, IL-33, ATP) とその上皮細胞からの放出機序について、臨床検体と培養細胞、さらに好酸球性鼻副鼻腔炎のマウスモデルを利用して明らかにする。本研究によって、自然免疫をターゲットとした好酸球性鼻副鼻腔炎に対する新たな治療手段の手がかりが得られることが期待される。

### 3. 研究の方法

1) 患者鼻汁や手術時に採取した鼻粘膜組織や鼻茸 (好酸球性・非好酸球性鼻副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎、正常コントロール) を用いた検討

HMGB1, S100 蛋白-Calprotectin, TSLP, IL-25, IL-33 の鼻汁や組織内濃度と局在、mRNA 発現について、ELISA 法、免疫組織化学法、RT-PCR 法で比較検討し、疾患による違いを明らかにする。

それぞれの受容体である、RAGE (HMGB1 と S100A8/A9 の受容体)、ST2 (IL-33 受容体)、P2X7 と P2Y2 (ATP 受容体) の役割を検討する。

2) 培養鼻粘膜上皮細胞や培養気管支上皮細胞を利用した検討

HMGB1, S100A8/A9-Calprotectin, TSLP, IL-25, IL-33 などの産生機序について、さまざまな外来刺激 (TLR リガンド、アルテルナリア、スギ抗原、ダニ抗原、パピイン・トリプシンプロテアーゼ、黄色ブドウ球菌プロテアーゼ、) による作用を検討する。

それぞれのアラミンの放出機序について、siRNA を利用したり、様々な阻害薬を利用して検討する。

患者鼻粘膜から分離して培養した上皮細胞からのアラミン産生について、培養細胞が由来する鼻疾患における、疾患特異的な反応性の変化を検討する。

3) 好酸球性鼻副鼻腔炎のマウスモデル [3 種抗原 (アルテルナリア、ダニ、黄色ブドウ球菌プロテアーゼ) の長期点鼻 (1 ~ 4 か月) によって作成] を利用した検討

自然免疫をターゲットとした新たな治療手段について、鼻粘膜や鼻腔洗浄液中のサイトカイン (IL-25, IL-33, TSLP, IL-5, IL-13) 産生、血清中の IgE 産生、組織中の好酸球浸潤、鼻粘膜のポリープ様変化などを指標に評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) HMGB1 について

HMGB1 はアレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎鼻汁中に高濃度に存在し (図 1)、その刺激は、培養鼻粘膜上皮細胞からの IL-8, IL-6 の産生と mRNA 発現を引き起こした (図 2)。その作用は抗

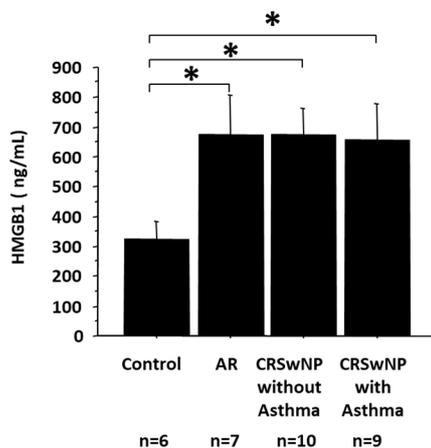


図1 鼻汁中のHMGB1濃度

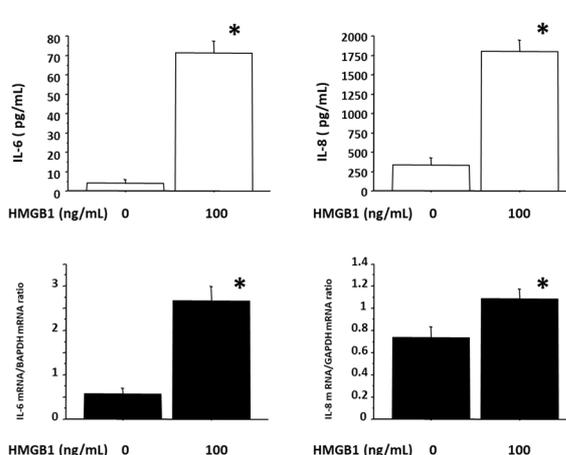


図2 HMGB1刺激による培養鼻粘膜上皮細胞からのIL-6,IL-8分泌とmRNA発現

RAGE 受容体で抑制され (図 3) 上皮細胞の RAGE 受容体を介していた。また、TNF- $\alpha$  刺激によって、培養鼻粘膜上皮細胞からの HMGB1 産生と mRNA 発現が増強された (図 4)。以上の結果から、炎症時には HMGB1 が産生され、自然免疫反応に関わっていることが明らかになった。

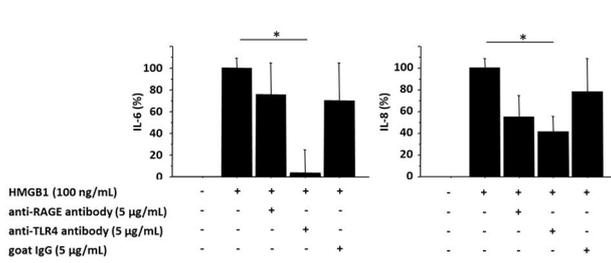


図3 HMGB1による鼻粘膜上皮細胞からのIL-6, IL-8産生は抗RAGE受容体抗体で抑制され、上皮細胞のRAGE受容体を介していると考えられた。

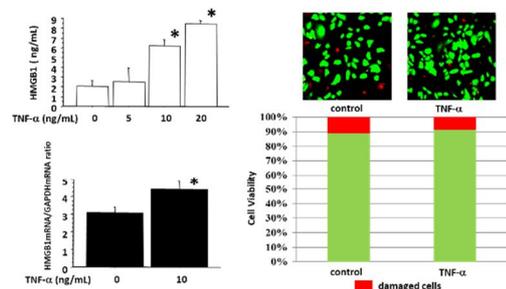


図4 TNF- $\alpha$ は気道上皮細胞 (NCI-H292細胞) からのHMGB1分泌を促進した。

## (2) Calprotectin について

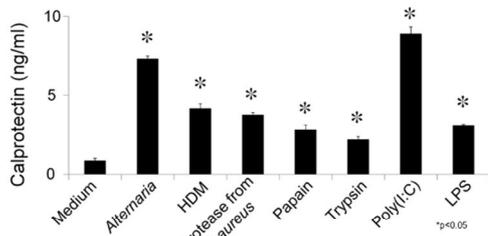


図5 正常気管支上皮細胞からのCalprotectin産生

ダニ抗原やアルテリナリア刺激、黄色ブドウ球菌プロテアーゼなどの刺激により、培養正常ヒト気管支上皮細胞からの Calprotectin 産生が増加し (図 5)、その作用はプロテアーゼ阻害薬で抑制されたことから (図 6)、抗原由来のプロテアーゼ刺激が重要と考えられた。

Calprotectin は ATP との共刺激で、培養正常気管支細胞からの IL-25, TSLP 産生を増強させ (図 7) さらにアルテリナリア刺激による IL-25, TSLP 産生も増強させた (図 8)。アルテリナリア刺激による IL-25, TSLP 産生は、siRNA で Calprotectin をノックダウンすると抑制され (図 9) 上皮細胞の Calprotectin 受容体の RAGE と TLR-4 のノックダウンでも抑制されたことから、Calprotectin とその受容体に関わっていることが明らかになった。

さらに、こうした刺激によって培養鼻粘膜上皮細胞から産生される Calprotectin 量は、好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 由来の培養上皮細胞で、非好酸球性副鼻腔炎やコントロール由来の鼻粘膜上皮細胞に比べて有意に増加していた (図 10)。

このように、抗原刺激によって上皮細胞から産生される Calprotectin はさらに上皮細胞からの IL-25 や TSLP 産生を誘導し、アレルギー炎症を増悪させると考えられた。

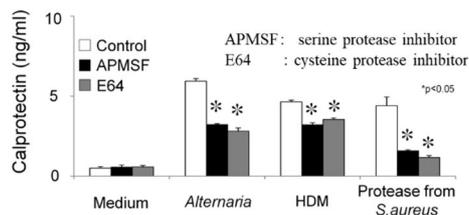


図6 アルテリナリアやダニ抗原刺激による Calprotectin産生はProtease阻害薬で抑制された。

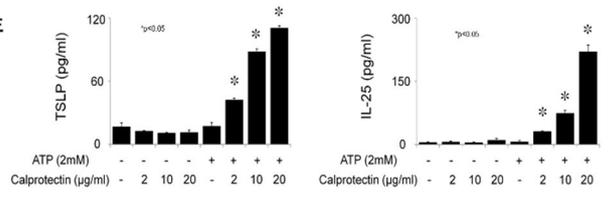


図7 CalprotectinとATPの共刺激は培養上皮細胞からのTSLP, IL-25産生を促進した

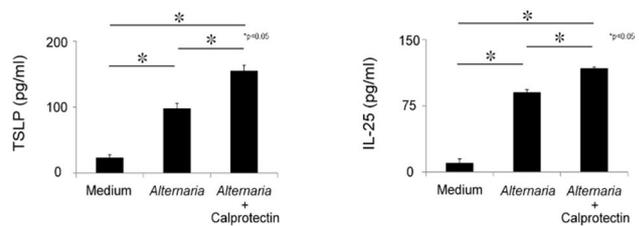


図8 Calprotectinはアルテリナリア刺激によるTSLP, IL-25産生を増強した。

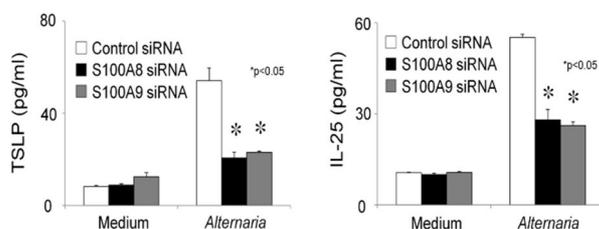


図9 アルテリナリアによるTSLP, IL-25産生は、S100A8とS100A9 (Calprotectin) のノックアウトで抑制された

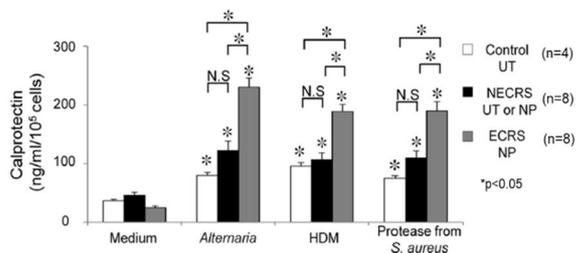


図10 好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 由来の培養鼻粘膜では抗原刺激によるCalprotectin産生が増加した。

( 3 ) IL-33 について

IL-33 遺伝子を導入した培養ヒト気道上皮細胞では、ダニ抗原刺激で 15 分後から 1 時間の早期に、IL-33 が産生された ( 図 11 )。IL-33 は好塩基球株 KU812 細胞からの IL-5 産生を誘導した ( 図 12 )。ダニ抗原刺激による培養上皮細胞の細胞上清で好塩基球株 KU812 細胞を刺激すると IL-5 が産生された ( 図 13 ) が、この反応は抗 IL-33 抗体や IL-33 受容体の抗 ST2 受容体抗体で消失した ( 図 14 )。つまりダニ抗原刺激で上皮細胞から放出された IL-33 が好塩基球に作用して IL-5 を産生させることが明らかになり、自然免疫による上皮細胞と好塩基球を介したアレルギー性炎症の新たな作用機序が解明された。

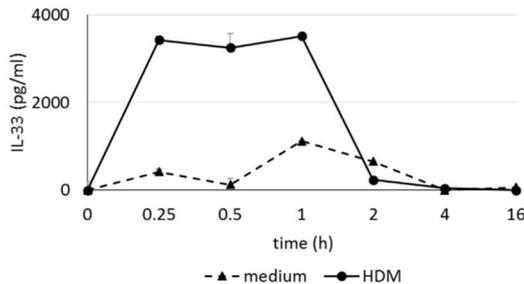


図 11 IL-33 遺伝子を導入したヒト気道上皮細胞では、ダニ抗原刺激で IL-33 産生を誘導した

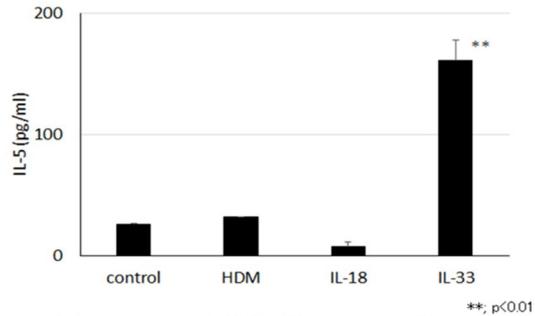


図 12 IL-33 は好塩基球株 KU812 細胞からの IL-5 産生を誘導した

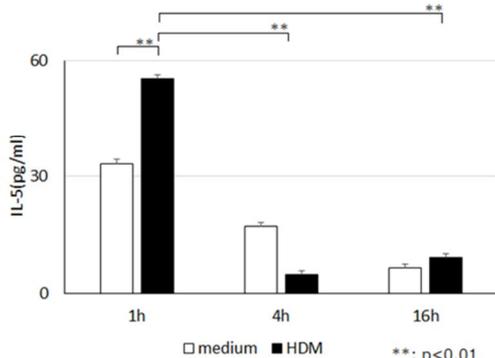


図 13 ダニ抗原刺激による培養上皮細胞の細胞上清の刺激で KU812 細胞からの IL-5 産生が誘導された

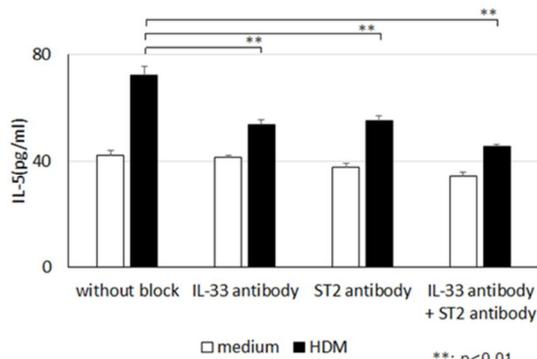


図 14 細胞上清刺激による KU812 細胞からの IL-5 産生は抗 IL-33 抗体や抗 ST2 抗体で抑制された

( 4 ) NADPH oxidase (酸化ストレス) について

抗原刺激における酸化ストレスの影響を検討する目的で、培養正常気管支上皮細胞からの NADPH oxidase の産生を検討したところ、ダニ抗原や ATP は刺激 15 分後から NADPH oxidase 産生を誘導した ( 図 15 )。また、ダニ抗原による NADPH oxidase 産生はプロテアーゼ阻害薬で抑制されたことから、抗原のプロテアーゼ活性が重要であり、その他の NADPH oxidase 産生は、ATP 阻害薬やカルシウムキレート剤で抑制されたことから、その機序に ATP とカルシウム流入が関わっていることが明らかになった ( 図 16 )。

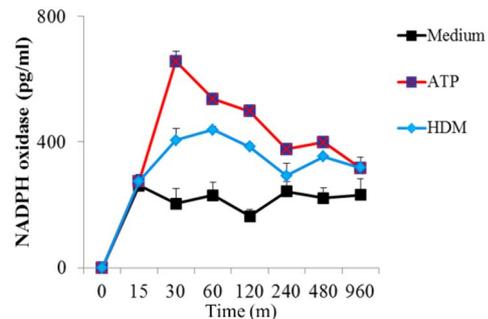


図 15 ダニ抗原や ATP は培養正常気管支上皮細胞からの NADPH oxidase 産生を誘導した

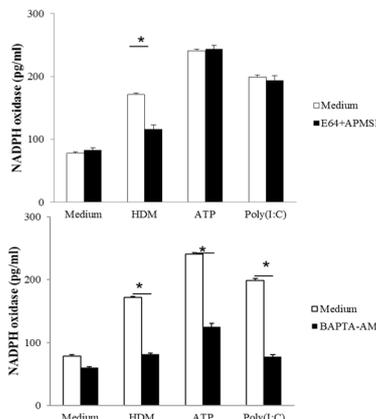


図 16 NADPH oxidase 産生に及ぼすプロテアーゼ阻害薬、ATP 受容体阻害薬、カルシウムキレート剤の抑制作用

我々は、好酸球性副鼻腔炎の鼻粘膜で TSLP, IL-25, IL-33 の mRNA 発現やタンパク量が亢進していることを確認し、さまざまな抗原刺激による培養鼻粘膜上皮からの TSLP, IL-25, IL-33 産生が好酸球性副鼻腔炎由来の培養細胞で亢進していることを確認している。

また、鼻粘膜上皮細胞では、NADPH oxidase のうち NOX1, NOX4, DUOX1, DUOX2 の発現が認められた(図 17)。そこで、TSLP, IL-25, IL-33 産生機序における酸化ストレスと NADPH オキシダーゼの役割を検討したところ、NADPH オキシダーゼのうち、siRNA による DUOX1 のノックアウトでこうした上皮由来サイトカイン産生は抑制された(図 18)。ダニ抗原や ATP が培養正常気管支細胞からの DUOX1 の産生と mRNA 発現を亢進させて、TSLP, IL-25 産生を誘導していた(図 19)。さらに、ダニ抗原による DUOX1 産生と mRNA 発現は、好酸球性鼻副鼻腔炎由来の培養鼻粘膜で有意に増強していた(図 20)

次に、複数抗原(MMA:アルテルナリア、ダニ抗原、黄色ブドウ球菌プロテアーゼ)点鼻によるマウス鼻粘膜の TSLP, IL-25, IL-33 産生は NADPH oxidase 阻害薬(VAS-2870, DPI)の点鼻投与で抑制された(図 21)。さらに、複数抗原の4か月点鼻で作成した好酸球性鼻副鼻腔炎モデルマウスで、NADPH オキシダーゼ阻害薬(VAS-2870, DPI)の点鼻投与は、血清 IgE 値、鼻粘膜の好酸球浸潤と IL-5, IL-13 産生を抑制し(図 22)鼻粘膜のポリープ様変化を抑制した(図 23)。

このように、酸化ストレスの抑制は、好酸球性鼻副鼻腔炎のような難治性上気道炎症に対する新たな治療ターゲットになると考えられた。

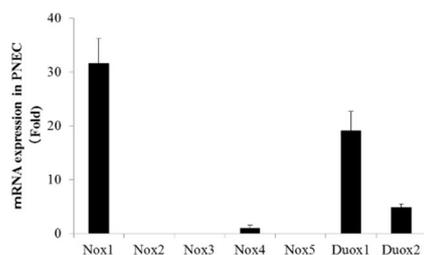


図17 鼻粘膜上皮細胞におけるNADPH familyの発現

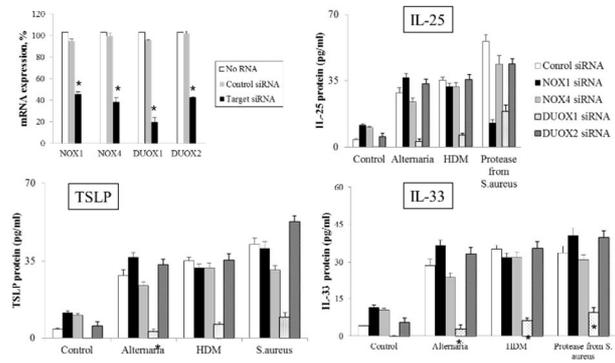


図18 抗原刺激による培養上皮細胞からのTSLP, IL-25, IL-33 産生は DUOX1のノックダウンで抑制された。

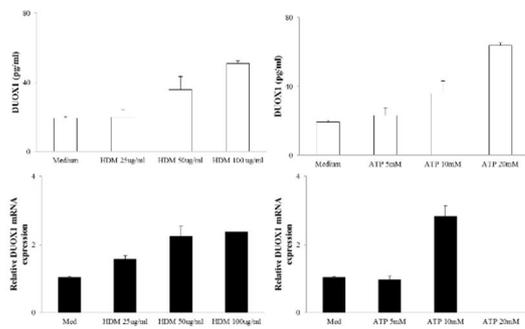


図19 ダニ抗原やATPは培養気管支上皮細胞からの DUOX1産生とmRNA発現を誘導した

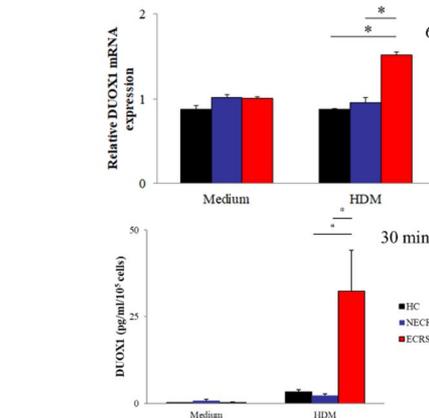
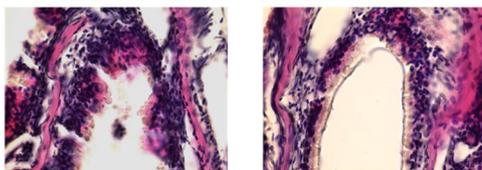


図20 ダニ抗原によるDUOX1の誘導は好酸球性鼻副鼻腔炎由来の培養上皮細胞で増強していた



MAA MAA+DPI

図23 NADPH oxidase阻害薬(DPI)の点鼻投与は好酸球性副鼻腔炎モデルマウス鼻粘膜のポリープ様変化を抑制した

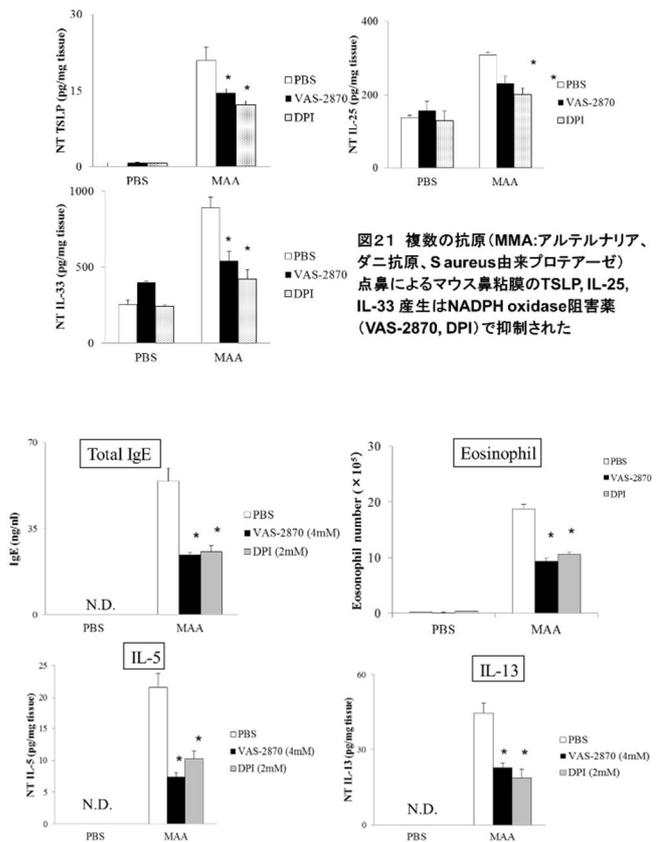


図21 複数の抗原(MMA:アルテルナリア、ダニ抗原、S aureus由来プロテアーゼ)点鼻によるマウス鼻粘膜のTSLP, IL-25, IL-33 産生はNADPH oxidase阻害薬(VAS-2870, DPI)で抑制された

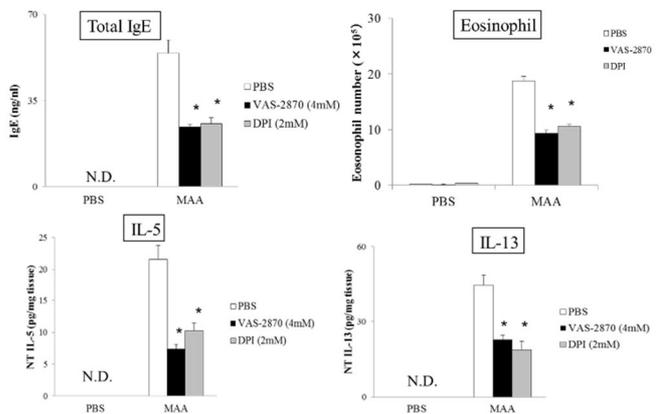


図22 複数抗原の4か月点鼻で作成した好酸球性副鼻腔炎モデルマウスで、NADPH oxidase阻害薬は、血清IgE値、鼻粘膜の好酸球浸潤とIL-5, IL-13産生を抑制した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsumoto Koji, Kouzaki Hideaki, Kikuoka Hiroataka, Kato Tomohisa, Tojima Ichiro, Shimizu Shino, Shimizu Takeshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Soluble ST2 suppresses IL-5 production by human basophilic KU812 cells, induced by epithelial cell-derived IL-33	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 S32 ~ S37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2018.05.009	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kouzaki H, Shimizu S, Shimizu T
2. 発表標題 Role of DUOX1 in the productions of epithelial-derived cytokines (IL-25, IL-33, TSLP) in eosinophilic chronic rhinosinusitis
3. 学会等名 5th Rhinology Research Forum in Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu T, Shimizu S, Kouzaki H
2. 発表標題 Role of innate immunity in the pathophysiology of eosinophilic chronic rhinosinusitis
3. 学会等名 17th Koera-Japan joint meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery (招待講演) (国際学会)
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
研究分担者	清水 志乃  (Shimizu Shino)  (50505592)	滋賀医科大学・医学部・医員    (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	中多 祐介  (Nakata yusuke)  (80794958)	滋賀医科大学・医学部・客員助教     (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関