

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09329

研究課題名（和文）慢性副鼻腔炎におけるTGF- β が誘導する治療抵抗性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of TGF-beta induced treatment resistance in chronic rhinosinusitis.

研究代表者

吉川 衛（Yoshikawa, Mamoru）

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：50277092

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）：慢性副鼻腔炎において、多くの症例では病態を制御することが可能となったが、手術やステロイドの局所投与等による治療を行っても再燃をくりかえす難治例が少なからず存在する。このような症例では、これまで報告されているような末梢血や組織中の好酸球増多を認めないことも多く、好酸球以外の難治化因子の存在が示唆される。

そのため、慢性副鼻腔炎の難治化に関わる新たな機序を解明することを目的として本研究課題を遂行したところ、TGF- β 依存性エンドタイプに難治例が多く含まれていることを明らかにした。しかし、鼻組織由来の線維芽細胞において、当初予想していたTGF- β によって誘導されるエピジェネティクスは認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性副鼻腔炎におけるTGF- β 依存性エンドタイプの同定により、新たな治療抵抗性の病態の存在を明らかにしたものの、TGF- β によって誘導される線維芽細胞のエピジェネティックな変化が慢性副鼻腔炎の難治化に関わる新たな機序であることは証明できなかった。

しかし、慢性副鼻腔炎患者の鼻組織由来の線維芽細胞において広範なDNAメチル化の変動を確認し、特にペリオスチン遺伝子のプロモーター領域に低メチル化を認めたことから、このメカニズムの解明により、既存の治療に抵抗性の病態に対する新規治療の開発や創薬に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although it is recently possible to control the disease in many cases of chronic rhinosinusitis, there are still a small number of refractory cases who repeatedly relapse despite surgery and topical steroid administration. In such cases, eosinophilia in the peripheral blood and nasal tissues is often absent, suggesting the presence of refractory factors other than eosinophils.

Therefore, we conducted this study to elucidate a novel mechanisms of refractoriness of chronic rhinosinusitis, and found that TGF- β -dependent endotypes are often involved in refractory cases. However, no epigenetics induced by TGF- β was observed in fibroblasts derived from nasal tissue, as initially expected.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：慢性副鼻腔炎 エンドタイプ TGF- β エピジェネティクス 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦の慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis: CRS) においては、これまで欧米に多いとされてきた、好酸球優位な炎症性細胞浸潤を特徴とする難治性のフェノタイプが増加しており、好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic CRS: eCRS) と呼ばれている (厚生労働省 指定難病 306)。術後再発率が高く予後不良な病態とされているが、その詳細な機序は解明されていない。

そこで申請者らは、eCRS の病態解明を目的としてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を基盤とした手法を用いて、eCRS および非好酸球性副鼻腔炎 (non-eCRS: neCRS) 患者から採取した組織中の遺伝子発現解析を行った。その結果、eCRS においては neCRS や正常粘膜組織とは異なる、特徴的な遺伝子発現プロファイルが存在することを同定した。次に、eCRS における遺伝子発現を制御する上流因子を特定するため、パスウェイ解析を行った。その結果、transforming growth factor (TGF)- β が eCRS の上流因子の一つとして同定された (Okada N, et al. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2018)。

上皮細胞や線維芽細胞などの組織構成細胞において、TGF- β 刺激によるペリオスチン等の細胞外マトリックス発現の増強効果や、骨化誘導について報告されている (Takayama G, et al. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. / Wang M, et al. *Am J Rhinol Allergy*. 2015.)。一方、興味深いことに、TGF- β 刺激によって誘導された血管内皮細胞からのペリオスチン産生は、副腎皮質ステロイドでは抑制されないという報告がある (Shoda T, et al. *Allergy*. 2013.)。これらの報告より、eCRS においては TGF- β シグナルを介して治療抵抗性が誘導される可能性を予想した。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、eCRS や neCRS などのフェノタイプとは異なる TGF- β 依存性のエンドタイプを同定し、そのエンドタイプと治療抵抗性の病態との関連性を検討するだけでなく、TGF- β により誘導される線維芽細胞のエピジェネティックな変化が、CRS の難治化に関わる新たな機序であることについて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 慢性副鼻腔炎における TGF- β シグナル依存性エンドタイプの同定

①網羅的な遺伝子発現解析による慢性副鼻腔炎のエンドタイプ解析

申請者はすでに、CRS 患者由来鼻組織 (鼻ポリープ、鉤状突起粘膜) の DNA マイクロアレイ解析 (Agilent 社) を実施している。このデータを一部活用し、クラスター解析、主成分分析などを駆使し、エンドタイプを同定した。

②TGF- β シグナル依存性エンドタイプの探索

次に、①で分類されたエンドタイプについて、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて各エンドタイプの上流シグナル因子を予測し、TGF- β 依存性エンドタイプを同定する。ここで、このエンドタイプの予後も含めた臨床的な背景についても調査し、治療抵抗性との関連も検討した。

③TGF- β 依存性エンドタイプで発現変動する上流分子群、下流分子群の同定

②で同定されたエンドタイプについて、鼻組織における特異的な発現変動遺伝子を確認する。この変動遺伝子を、TGF- β シグナルを制御する上流分子群 (TGF- β レセプター、Smad などの転写因子) と、TGF- β によって誘導される下流分子群 (*POSTN*, *FNI* など) に分類し、定量的 PCR や Western blotting で再現性確認を行った。

(2) TGF- β 刺激に対する副腎皮質ステロイド感受性についての検討

本項目ではステロイド抵抗性に関与する因子を確認することを目的とした。健常者の鼻組織から線維芽細胞を培養し、TGF- β によって発現誘導される遺伝子群について、*in vitro* でのステロイド感受性を、マイクロアレイをもちいた網羅的遺伝子発現解析で検討した。

(3) TGF- β シグナルを介した鼻粘膜線維芽細胞におけるエピジェネティクス誘導能解析

① TGF- β により誘導されるエピジェネティクスの解析

健常者の鼻組織由来の線維芽細胞において、TGF- β が遺伝子発現誘導する際に、DNA メチル化やヒストン修飾状態に変化を認めるかどうか確認した。具体的には、項目 (1) の③で同定された TGF- β の上流・下流遺伝子を対象とし、TGF- β 刺激前後でのプロモーター領域での DNA メチル化やヒストンの化学的修飾 (メチル化、アセチル化) を、メチル化 DNA 特異的 PCR 法およびクロマチン免疫沈降法で確認した。

②TGF- β 関連エンドタイプ由来の線維芽細胞におけるエピジェネティクスの解析

CRS 患者の鼻組織で、実際に TGF- β によってエピジェネティクスが誘導されていることを検

証するため、項目（１）の②で明らかにした TGF-β 依存性エンドタイプを対象とし、CRS 患者の鼻組織から線維芽細胞を培養し、健常者由来の線維芽細胞と比較検証した。方法は①に準じ、TGF-β の刺激前後でエピジェネティック変化が見られた遺伝子を対象とした。

（４）線維芽細胞の表現型変化におけるエピジェネティクスの関与の検討

CRS 患者の鼻組織由来の線維芽細胞と健常者の鼻組織由来の線維芽細胞について、Human Methylation450K BeadChip (Illumina 社)を用いて網羅的な DNA メチル化解析を行った。

4. 研究成果

本研究課題では TGF-β シグナルに着目し鼻組織や線維芽細胞について解析を行った。その結果 TGF-β 依存性エンドタイプを発見し、このエンドタイプにおいてはペリオスチンなどの炎症関連遺伝子が高発現していた。さらに術後の予後を調査したところ、TGF-β 依存性エンドタイプには、術後の局所ステロイド治療に抵抗性を示す難治例が多く含まれていることを明らかにした。

次に、TGF-β が作用を及ぼす細胞の候補として線維芽細胞に着目し、CRS 患者の鼻組織由来の培養線維芽細胞における遺伝子発現解析を行った。その結果の一つとして、CRS 患者の鼻組織由来の線維芽細胞ではペリオスチンをはじめ多数の炎症関連因子が無刺激状態でも有意に発現増強されており、細胞の表現型変化が生じていることが示唆された (図 1)。しかし、健常者の鼻組織由来の線維芽細胞をもちいて、TGF-β によって誘導されるエピジェネティクスについて確認したが、TGF-β 刺激前後で有意な変化のある DNA メチル化やヒストン修飾状態は認められなかった。

そこで当初予定していた TGF-β シグナル阻害による遺伝子発現およびエピジェネティック変化制御の検討を断念し、あらためて CRS 患者の鼻組織由来の線維芽細胞の表現型変化におけるエピジェネティクスの関与を調べるため、線維芽細胞について、Human Methylation450K BeadChip (Illumina 社)を用いて網羅的な DNA メチル化解析を行った。その結果、CRS 患者の鼻組織由来の線維芽細胞では、健常者の鼻組織由来の線維芽細胞に比べて広範な DNA メチル化の変動が確認され、特に、ペリオスチン遺伝子のプロモーター領域では低メチル化が観察された。すなわち、CRS 患者の鼻組織中の線維芽細胞は、エピゲノム変化を介して表現型が変化しているという重要な知見を明らかにした (未発表データ)。この結果をもとに現在の研究課題 (21K09662) において検討を継続している。

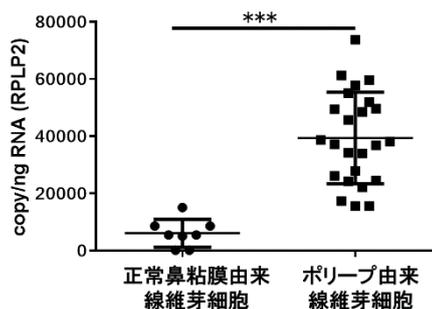


図 1 線維芽細胞におけるペリオスチン発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Okada N, Nakayama T, Asaka D, Inoue N, Tsurumoto T, Takaishi S, Otori N, Kojima H, Matsuda A, Oboki K, Saito H, Matsumoto K, Yoshikawa M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Distinct gene expression profiles and regulation networks of nasal polyps in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Forum of Allergy & Rhinology	6. 最初と最後の頁 592 ~ 604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/alr.22083	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 -

1. 著者名 Nakayama T, Okada N, Yoshikawa M, Asaka D, Kuboki A, Kojima H, Tanaka Y, Haruna SI.	4. 巻 8
2. 論文標題 Assessment of suitable reference genes for RT-qPCR studies in chronic rhinosinusitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19834-9	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 -

1. 著者名 Nakayama T, Sugimoto N, Okada N, Tsurumoto T, Mitsuyoshi R, Takaishi S, Asaka D, Kojima H, Yoshikawa M, Tanaka Y, Haruna SI.	4. 巻 46
2. 論文標題 JESREC score and mucosal eosinophilia can predict endotypes of chronic rhinosinusitis with nasal polyps	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 374 ~ 383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2018.09.004	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 -

1. 著者名 Nakayama T, Hirota T, Asaka D, Sakashita M, Ninomiya T, Morikawa T, Okano M, Haruna S, Yoshida N, Takeno S, Tanaka Y, Yoshikawa M, Ishitoya J, Hizawa N, Isogai S, Mitsui C, Taniguchi M, Kojima H, Fujieda S, Tamari M.	4. 巻 69
2. 論文標題 A genetic variant near TSLP is associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and aspirin-exacerbated respiratory disease in Japanese populations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 138 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.06.007	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田直子, 井上なつき, 浅香大也, 吉川衛
2. 発表標題 Type2炎症性の慢性副鼻腔炎における病態についての検討
3. 学会等名 第1回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021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
連携研究者	岡田 直子 (Okada Naoko) (50636165)	日本薬科大学・薬学部・講師 (32425)	
連携研究者	井上 なつき (Inoue Natsuki) (60816148)	東邦大学・医学部・大学院生 (32661)	

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
---------	---------