

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09373

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープにおける脂肪酸代謝解析

研究課題名(英文)Fatty acid metabolome in nasal polyps with eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

坂下 雅文(Sakashita, Masafumi)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：40555455

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)：好酸球性副鼻腔炎は成人発症の気管支喘息を高率に合併する難治性疾患である。炎症遷延化機序は明らかになっておらず、アラキドン酸代謝が重要と考えられるが十分に研究されていないため、鼻ポリープ組織中の脂肪酸代謝について検討した。本研究期間には好酸球性副鼻腔炎における炎症性脂質メディエーターについて検討を進め、好酸球性副鼻腔炎ではアラキドン酸カスケードの代謝が亢進しているために原料となるアラキドン酸を含んだリン脂質が減少しており、カスケードの下流では恒常性を保つための炎症収束脂質メディエーターが増加していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープ中には、炎症を促進する脂質メディエーターだけでなく、炎症を収束させる脂質メディエーターも同時に産生されていたことが分かった。炎症を促進させる脂質メディエーターを産生する代謝酵素の15-LOXを阻害する薬剤は今後の好酸球性副鼻腔炎治療戦略において重要になると期待される。また、好酸球性副鼻腔炎においては、炎症収束脂質メディエーターの機能回復が、炎症状態から恒常性回帰への鍵となることと思われる。

研究成果の概要(英文)：Eosinophilic sinusitis is an intractable disease that is often associated with adult-onset bronchial asthma. The mechanism of the prolonged inflammation is not clear, and although arachidonic acid metabolism is thought to be important, it has not been sufficiently studied, so we investigated fatty acid metabolism in nasal polyp tissue. During this study, we examined inflammatory lipid mediators in eosinophilic sinusitis and found that phospholipids, including arachidonic acid, the raw material of the arachidonic acid cascade, were decreased in eosinophilic sinusitis due to increased metabolism of the cascade, and inflammatory convergent lipid mediators for homeostasis were increased downstream of the cascade mediators for homeostasis.

研究分野：鼻科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 脂質メディエーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎は1990年代後半から本邦で提唱された概念である。気管支喘息やアスピリン不耐症を高率に合併する。内視鏡下鼻副鼻腔手術を行っても再発が多い難治性の鼻ポリープを生じるため、長期内服ステロイドを内服する必要がある炎症性疾患である。申請者は全国共同疫学研究 (JESREC スタディ) を行い、診断基準と重症度分類を作成した。しかし、治療においては中等症以上で再発する確率は50%以上、その抑制には経口ステロイドを長期内服する必要があり、疾患制御の確立が急務となっている。病態は、高いIL-5、IL-13と好酸球浸潤であることが報告されている。その原因の中心としては、上皮細胞からのThymic stromal lymphopoietin (TSLP)、IL-33によりInnate lymphoid cell type 2 (ILC2)、Th2型細胞、肥満細胞からIL-5やIL-13が産生されることが考えられている。上皮細胞への刺激としては、Staphylococcus aureusやその他の細菌、ウイルス、真菌感染が考えられている。しかし、遷延する好酸球浸潤の原因については、いまだ解明されていない。好酸球遊走に関わるアラキドン酸カスケードの代謝物は炎症惹起に重要な物質であるが、脂質代謝についての解析は進んでこなかった。鼻ポリープ中のアラキドン酸代謝に関する研究が行われてこなかった理由としては、アラキドン酸代謝物を同定するのが困難であるためである。しかし、近年の質量分析法の新技术の進歩により同定が可能になった。

2. 研究の目的

好酸球の浸潤を繰り返し惹起する炎症病態の解明

類似疾患とされるアスピリン喘息では、尿中ロイコトリエンが高く、喘息の発症と相関するという報告がある。ロイコトリエンはアラキドン酸カスケード中の代謝産物であり、好酸球の遊走を引き起こす。このアラキドン酸は細胞膜を構成するリン脂質から切り出されて細胞質内で代謝を受ける。ロイコトリエンが増加することにより好酸球が炎症の場であるポリープに集積する可能性がある。また、アラキドン酸代謝が好酸球性副鼻腔炎のポリープ中では亢進しており炎症の遷延が生じている可能性がある。手術により鼻ポリープ中の炎症惹起物質を減少させることにより、合併症である気管支喘息が軽快することがある。また、気管支喘息の増悪により鼻ポリープが増大することも知られており、病勢のコントロールのために気管支喘息の管理も必要になる。これらのことから、局所の鼻・副鼻腔疾患という捉え方よりも全身疾患の局所病態ととらえて、好酸球の浸潤を繰り返し惹起する病態解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 鼻ポリープ中の脂質代謝酵素の発現測定

アラキドン酸代謝経路の亢進もしくは減弱について、次世代シーケンサーを用いて代謝酵素発現を測定した。正常鼻粘膜組織(鉤状突起)10例、非好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープ10例、好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープ10例を用いる。鼻ポリープ組織中の、シクロオキシゲナーゼ(COX)経路、リポキシゲナーゼ(LOX)経路、シトクロムP450代謝経路の酵素のメッセンジャーRNA発現をリアルタイムPCRにて測定した。代謝酵素は、phospholipase A2 (PLA2), 5-lipoxygenase (5-LO), prostaglandin D synthase (PGDS), PGES, PGIS, PGFS, thromboxane synthase (TXS), leukotriene A4(LTA4) hydrolase, LTC4 synthase (LTCS), LTBS, cyclooxygenase-1 (COX1), COX2とした。

(2) 鼻ポリープ組織中の脂質およびその代謝酵素の発現を測定する

脂質及びその代謝酵素の増加もしくは減少が全身性であるのか、局所性であるのかとすることを比較するために、被験者の鼻ポリープ組織中の脂質を液体クロマトグラフィー質量分析法(Liquid Chromatography/Mass Spectrometry :LC/MS/MS)を用いて測定した。解析対象は、アラキドン酸カスケード中の代謝産物(tetranor-PGFM/PGEM/PGDM, 20-hydroxyPGF2a/PGE2, 18-carboxy-dinor-LTB4, 13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF1b, TXB2, 14,15-LTC4, LTD4, LTC4, LTE4, LTF4, LTB4, 19-HETE, 20-HETE, 18-HETE, 17-HETE, 8-HETE, arachidonic acid)の他に、脂質メディエーター関連物質において、リノール酸関連物質(12, 13-DiHOME, 13-HODE, 9-HODE)、血小板活性化因子関連物質(Lyso-PAF, PAF, Azelaoyl-PAF)、リノレン酸関連物質(9-HOTrE, 13-HOTrE)、エイコサペンタエン酸(8-iso-PGF3a, TXB3, PGF3a, PGE3, PGD3, LXA5, 17, 18-DiHETE, 18-HEPE, 15-HEPE, 12-HEPE, 5-HEPE, EPA)、ドコサヘキサエン酸(Resolvin, Maresin1, 10, 17-DiHDoHE, 20-HDoHE, 116-HDoHE, DHA)を測定した。

(3) 鼻組織でのリン脂質発現分布を示す

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法質量顕微鏡法(MALDI-IMS)の代表的な解析対象であるリン脂質のうち、ホスファチジルコリンは、グリセロールにリン酸基と脂肪酸が2つ結合するため脂肪酸の組み合わせによって構造式が変わる。脂肪酸の炭素数によって、パルミチン酸(C16)、オレイン酸(C18)、アラキドン酸(C20)と呼ばれ、どのような脂肪酸が多いか解析した。

正常鼻粘膜組織（鉤状突起）5例、非好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープ5例、好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープ5例を用いて薄切片を作成し、リン脂質およびその結合する脂肪酸を特定して組織中の発現分布と発現強度を測定して組織間での発現強度を比較した。同じ標本から得られた連続切片をHE染色し、解析部位の組織学的な特徴を比較した。

鼻組織は摘出後-80℃にて保存した。凍結保存組織はLicaCM1950 cryostat(Leica Microsystems GmbH)にて-25℃の設定で10μmの厚さに切片を作成した。切片は融解してindium-oxide (ITO)コーティングされたガラススライド(Bruker Daltonics)上に載せた。マトリックスとして2',5'-dihydroxyacetophenone (DHAP) (Tokyo Chemical Industry Co., LTD)を用いて、マトリックス昇華装置によって切片上に均一に塗布した。MALDI-IMS解析は高解像度イメージングマスマスペクトロメーター (iMScope prototype; Shimadzu)に355-nm Nd:YAG laserを装填した行った。測定領域は同装置内に装填された光学顕微鏡にて行った。切片は20倍の倍率において観察し、レーザーを当てて操作する間隔は5μmとした。各箇所100回のレーザー照射(1000Hz)を反復して700から1000 m/z (質量電荷比)をポジティブイオンモード、ネガティブイオンモードで行った。

4. 研究成果

(1) 鼻ポリープ中の脂質代謝酵素の発現を測定する

ECRSの鼻組織中の脂質代謝酵素のうち、アラキドン酸経路の代謝酵素である、5リポキシゲナーゼ(5-LO)、5リポキシゲナーゼ活性化タンパク(FAP)の亢進が認められた。(図1)

(2) 鼻ポリープ組織中の脂質およびその代謝酵素の発現を測定する

LC-MS/MSによる 6系脂質解析

158種類の脂質のうち、ECRSの鼻茸では75種、NECRSの鼻茸では64種の代謝産物を測定することができた。75種の産物はECRSにおいて、LA由来の9-HODE、13-HOTrE、13-HODE、13-KODEの発現量がNECRSよりも高く(いずれも $p < 0.05$)、DGLA (dihomo- γ -linoleic acid)由来の15-HETrE量も有意に高かった($p < 0.05$)。AA由来の15-HETE、8,15-diHETE、5,15-diHETE、Lipoxin A4 (LXA4)、LXB4、Eoxin E4、12-HETE、12-KETEもECRSにおいて高かった($p < 0.05$) (図2)。

これらのうち、9-HODE、13-HODE、15-HETE、Eoxin C4/E4と12-HETEは炎症性脂質であり、多形核白血球浸潤を誘導し、8,15-diHETEは好酸球を遊走させる。EoxinはLTC4、PGD2、IL-5刺激により好酸球から放出され、炎症を顕著に増悪させる6)。これらの14の代謝産物は、すべて15-lipoxygenase (15-LOX)により 6系脂肪酸から代謝されたものである。AA由来の産物でECRSで有意に多かったのは、5-LOXによってAAから代謝されるLTC4とLTE4、COXによりAAから代謝される3つのPGとTXB2であった。その他の5-LOXによる代謝産物はECRSとNECRSで違いはなかった。NECRS中には、AAがECRSより高かったが、有意差はなかった。これらの結果から、ECRSでは15-LOXにより 6系脂肪酸代謝がNECRSと比べて亢進していることが判明した。一方で、ECRSの鼻茸では、AAから15-LOXにて代謝されるLXA4 ($p < 0.05$)、AAからCOXで代謝される12-HHT ($p < 0.05$)、AAからCYP450により代謝される14,15-DHET ($p < 0.05$)が有意に高かった。LXA4は炎症収束因子、12-HHTも創傷治癒に関与し、14,15-DHETも血管系疾患において抗炎症効果と相関を持つ因子であった。

LC-MS/MSによる 3系脂質解析

-3系のDHAから15-LOXにより代謝されるResolvin D2 (RvD2) ($p < 0.05$)がECRS鼻茸に有意に多く含まれていた(図3)。RvD2は、6系のLXA4おなじSPMsと呼ばれ炎症を抑制し恒常状態に戻すための重要な役割を担っている。その他のSPMsであるPD-1、maresin-1もECRSにおいて増加しているが、有意ではなかった。これらの結果から、ECRSの鼻茸において炎症を抑制する因子もNECRSよりも多く存在していることが判明した。

(3) 鼻組織でのリン脂質発現分布

質量分析イメージングによる鼻茸中のアラキドン酸(AA)含有脂肪酸

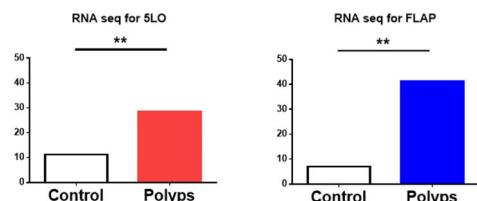
LC-MS/MSでは、AAの炎症性代謝産物がECRSで高く、有意差はなかったものの前駆体であるAAがECRSで減少していた。そこで、ECRSでは、よりAA代謝が亢進していると仮定し、AA産生の前駆体となる脂肪酸の解析をMALDI-IMSを用いて行った。ECRS5例とNECRS5例を比較した(図4)。IMSの特性を活かして、鼻茸の粘膜下組織部分を指定してその部分に含まれる脂肪酸の代謝産物を解析した。各サンプルの鼻茸組織切片を光学顕微鏡で観察した写真で、その中に小さな白い線で囲まれた四角部分、大きさは500μm四方であり、各辺を100スポット、合計10,000スポットにイオン化レーザーを当てて質量顕微鏡で測定した。照射されたレーザーによりイオン化した種々の質量電荷比を持った脂質が分離されて、イオンの相対量(intensity)を表す質量スペクトルが作成される。測定により得られた700m/zから1000m/zの範囲のスペクトラムから、この中の分子Aに着目した。分子Aの構成成分から、ホスファチジルコリン分子に含まれる脂肪

酸の共通構造である 59Da と 183Da を差し引き、さらにナトリウムから水素への変換時の重量変化 22Da を差し引いて、最終的に分子 A は脂肪酸 X と脂肪酸 Y を含みナトリウムを伴ったホスファチジルコリン PC(FA X;FA Y)Na⁺ であると同定できた。このうち脂肪酸 Y は AA であることが分かり、分子 A の定量値を ECRS と NECRS で比較したところ ECRS 鼻茸中では有意に低下していた (図 5) (p<0.05) (分子 A, 脂肪酸 X は知的財産権取得に因るためアルファベットとしてしている)。

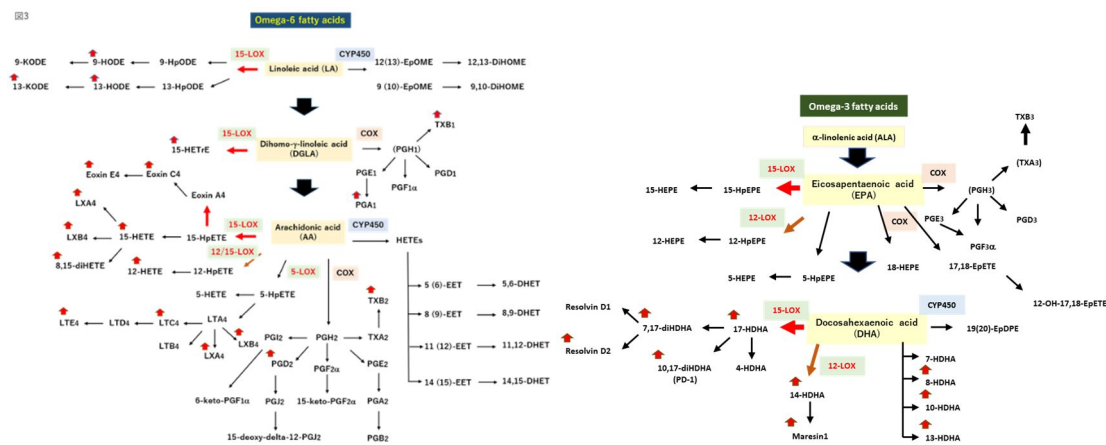
結論

鼻茸中の脂質代謝解析を目的に、ECRS と NECRS の鼻茸を LC-MS/MS を用いて脂質メディエーターを一斉解析した。-6 系脂肪酸の LA, DGLA, AA の 15-LOX による代謝産物である、HODE、HETE、Eoxin といった強い炎症性脂質メディエーターが多く含まれていた一方で、SPMs と呼ばれる炎症収束脂質メディエーターや 12-HHT、4,15-DHET といった抗炎症効果を持つ代謝産物も多く含まれていた。これらの代謝物質の多くが AA からのものであるためか、ECRS 鼻茸中では AA の減少が認められたが、LC-MS/MS では有意ではなかった。しかし MALDI-IMS においては、ECRS 鼻茸中の AA 含有ホスファチジルコリンの有意な低下が認められた。以上のことから ECRS 鼻茸中では、AA の代謝が亢進し、その代謝産物が増加していることが明らかになった。

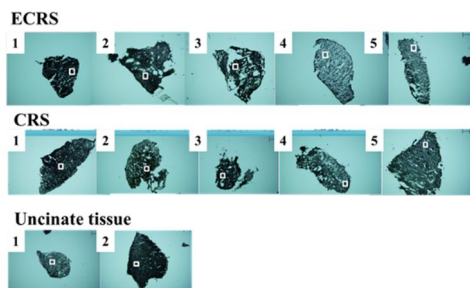
(図 1) アラキドン酸カスケード中の代謝亢進がみられた酵素の遺伝子発現



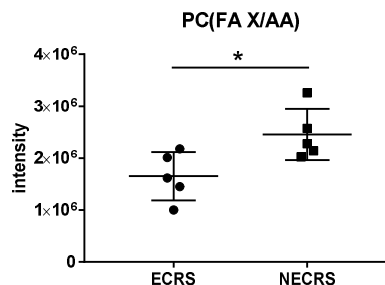
(図 2) 6 系の脂肪酸代謝の LC-MS/MS 解析 (図 3) 3 系の脂肪酸代謝の LC-MS/MS 解析



(図 4) MALDI-IMS のサンプルの顕微鏡像



(図 5) MALDI-IMS により選出した脂肪酸 A



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masafumi Sakashita
2. 発表標題 Epidemiological study of allergic rhinitis for hospital workers in University of Fukui between 2006 and 2016
3. 学会等名 European Academy of Allergy and Clinical Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masafumi Sakashita
2. 発表標題 Analysis of fatty acid distribution and lipid mediators in nasal polyps with ECRS
3. 学会等名 日本アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂下雅文
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎治療と眠気について、よりよい治療法の提案と啓蒙
3. 学会等名 日本鼻科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂下雅文
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎の基礎から臨床
3. 学会等名 日本アレルギー学会北陸地方部会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂下雅文
2. 発表標題 臨床研究から好酸球性副鼻腔炎のコントロールを目指す
3. 学会等名 第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂下雅文
2. 発表標題 Analysis of fatty acid distribution and lipid mediators in nasal polyps with ECRS
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 慢性副鼻腔炎の予防剤または治療剤、およびこれらを製造するためのスタチンの使用	発明者 坂下雅文	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-101552	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 慢性副鼻腔炎の予防剤または治療剤、およびこれらを製造するためのスタチンの使用	発明者 坂下雅文	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-170536	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 画像処理方法、画像合成方法、データの取得方法、学習モデルの生成方法、鼻 および副鼻腔疾患の診断支援システム、並びに鼻および副鼻腔疾患の診断支援方法	発明者 坂下雅文	権利者 足立直人
産業財産権の種類、番号 特許、2020-048500	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	高林 哲司 (Takabayashi Tetsuji) (70397272)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師 (13401)	

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