

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16859

研究課題名(和文) ヒト鼻粘膜上皮細胞よりのペリオスチン産生とその影響

研究課題名(英文) Periostin production from human nasal epithelial cells and its influence

研究代表者

洲崎 勲夫 (Suzaki, Isao)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20791370

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)：ペリオスチンは慢性副鼻腔炎や気管支喘息など気道炎症性疾患の病変局所に発現する。ヒト鼻粘膜上皮細胞を分化・培養させた細胞群をもちいて、2型炎症性サイトカインであるIL-13の刺激を加えることで、ヒト鼻粘膜上皮細胞からペリオスチンの発現が誘導されることが明らかになった。さらに、ペリオスチンがヒト鼻粘膜上皮細胞に作用することで、粘液産生が促進される作用が観察された。つまり、鼻粘膜上皮細胞は、鼻副鼻腔局所においてペリオスチンの産生源として重要な働きを有し、産生されたペリオスチンが気道炎症病態に関与する働きを有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内視鏡下鼻副鼻腔手術の技術革新やマクロライド療法の確立により、慢性副鼻腔炎に対する治療成績は向上したが、好酸球性副鼻腔炎をはじめとした難治性慢性副鼻腔炎の治療方針はいまだ確立されていない。本研究により、ペリオスチンの鼻副鼻腔における産生メカニズムと慢性副鼻腔炎の難治化病態への関与を明らかにした。難治性慢性副鼻腔炎に対する新規治療標的探索や、病態解析の発展に貢献する意義をもつ研究と考える。

研究成果の概要(英文)：Periostin is expressed at the lesion site of airway inflammatory diseases such as chronic rhinosinusitis and asthma. Using differentiated and cultured human nasal epithelial cells, we demonstrated that stimulation with IL-13, a type 2 proinflammatory cytokine, induces periostin expression from human nasal mucosal epithelial cells. In addition, periostin was observed to promote mucus production and remodeling by acting on human nasal mucosal epithelial cells. These findings suggest that nasal epithelial cells play an important role as a source of periostin in the nasal and paranasal mucosa and that the periostin produced by these cells plays an important role in the pathogenesis of airway inflammation.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：慢性副鼻腔炎 好酸球性副鼻腔炎 IL-13 ペリオスチン

1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎は宿主の遺伝学的な要因や、アレルゲン暴露や感染などの環境因子に加え、解剖学的要因などが複雑に絡み合って、鼻副鼻腔に慢性炎症が遷延する病態である。つまり、1つの症候群とされてはいるが、個々の患者背景の病態には多様性を伴う疾患群の総称である。手術療法や薬物療法の進歩により、その治療成績は向上したが、一部に難治性の慢性副鼻腔炎が存在し、治療に難渋する。近年増加傾向にある好酸球性副鼻腔炎は、鼻茸や副鼻腔粘膜局所において高度の好酸球浸潤を来す気道炎症性疾患であり、治療抵抗性・易再発性の難治性慢性副鼻腔炎のサブタイプの1つであるとされている。我が国では、他施設共同疫学研究により、好酸球性副鼻腔炎の診断基準が作成され、平成27年7月より指定難病へと位置づけられた。好酸球性副鼻腔炎は喘息と強く関連し、気道リモデリングによる上皮の杯細胞化生、組織の線維化や強い好酸球浸潤といった共通の病態的特徴を有する。慢性副鼻腔炎や喘息においては、気道組織中において特に杯細胞が粘液過分泌や炎症性サイトカインを強く誘導する事で、気道炎症の病態に重要な役割を担う事が知られている。

ペリオスチンはIL-4やIL-13といった2型炎症性サイトカインやTGF- β の刺激により線維芽細胞や上皮細胞から誘導される細胞外マトリックスタンパクの一種である。気道においては、喘息や慢性副鼻腔炎などの気道炎症性疾患の病変局所に強く発現することが知られている。本物質は組織構造の維持のほか、組織の線維化や好酸球誘導などを介して、好酸球性炎症の病態に関与すると示唆されている。また、血清中のペリオスチン値が喘息患者の表現型の分類や、治療反応性の予測因子のバイオマーカーとしての有用性が報告されている。しかしながら、鼻副鼻腔粘膜におけるペリオスチンの産生機構や慢性副鼻腔炎の病態におけるペリオスチンの詳細な役割については不明な点が多い。

2. 研究の目的

鼻副鼻腔組織を構成する細胞において、上皮細胞は上気道で抗原やアレルゲンの暴露刺激を受ける機会が最も多い細胞の一つであり、気道炎症性病体の構築を中心的に担う細胞の一つであると考えられる。本研究では、慢性副鼻腔炎の病態を探索するにあたり、上皮細胞における炎症関連物質としてペリオスチンの産生メカニズムとペリオスチン自体が気道炎症性病態へ及ぼす影響として、喘息や慢性副鼻腔炎の病態の1つとして重要で粘液過分泌や杯細胞化生へ与える影響を検討した。

3. 研究の方法

ヒトの鼻粘膜上皮細胞(Human nasal epithelial cells: HNEc)を用いて、細胞培養実験をおこなった。In vitroで、生体内に近い環境を再現するために培養方法としてはAir liquid interface: ALI法を用いて細胞培養を行った。ALI法では通常の液相培養を行った後に、専用のトランスウェルへと播種し、管腔側の上清を除去した状態で気相培養を14日間行う事で、分化した細胞を実験に使用することが可能となった。

HNEcにおけるペリオスチンの産生について検討するために、細胞に刺激としてIL-13, LPS, Poly IC刺激を行った。細胞より得られた上清をもちいてELISA法で、細胞より抽出したtRNAを用いてRT-PCR法でペリオスチンの産生を検討した。

ペリオスチン自体の上皮細胞に対する影響の検討として、リコンビナントのペリオスチンをもちいて、HNEcを培養液へと添加刺激を行った。細胞より得られた上清をもちいてELISA法で、細胞より抽出したtRNAを用いてRT-PCR法でMUC5ACの産生を検討した。さらに、細胞の形態学的な変化への影響を検討する目的で、培養した細胞群を用いて病理組織学的な検討を行った。トランスウェルごと分割した細胞をホルマリン固定し、パラフィン包埋した。パラフィンを薄切した切片を作成し、H-E染色、PAS染色、免疫組織化学染色を施行して病理学的な検討をおこなった。

4. 研究成果

HNEcをALI法で14日間培養すると、表面に線毛を有した分化した細胞を得ることができた。分化した線毛細胞にLPS, poly ICを加えた細胞群からはペリオスチンの産生は確認できなかった。しかし、IL-13を添加した細胞群からは、ペリオスチンの産生が有意に上昇していることが確認できた。また、ペリオスチンの産生はIL-13刺激の濃度および時間依存性に上昇することが確認された。一方、通常の液相培養で培養した細胞に対してIL-13刺激を行った群からは、ペリオスチンの産生を検出・確認することは困難であった。

リコンビナントペリオスチンの上皮細胞に与える影響の検討では、ペリオスチンの刺激を加えることで、刺激を加えていない群と比較してMUC5AC産生の増強が確認された。また、ALI法でHNEcを分化誘導すると、線毛を有した線毛細胞へと分化することが観察されるが、ペリオスチンの存在下で培養を行うと、ペリオスチンの存在下ではcontrolと比較して杯細胞化生が増強していた。PAS染色、MUC5AC染色を行っても、controlと比較し、発現が増強してい

た。

以上の結果より、鼻粘膜上皮細胞にペリオスチンを産生する能力があることが示された。上皮細胞からのペリオスチン産生の誘導因子には、細菌感染やウイルス感染刺激によるものではなく2型炎症による刺激が必要と考えられた。さらに、*in vitro*環境でペリオスチンの産生を評価するには、分化誘導を行った培養系で検討を行うことが望ましい可能性が示唆された。鼻粘膜上皮細胞におけるペリオスチンの産生量が微量で、ALI法で細胞数を増加し分化させた状況で検討する方が評価には有利である可能性がある。鼻粘膜上皮細胞で産生されたペリオスチン自体が、上皮へと作用してMUC5ACをはじめとした粘液産生の亢進を行い、上皮の杯細胞化生を通じて、上気道のリモデリングへ関与している可能性が考えられた。つまり、ペリオスチンは慢性副鼻腔炎などの気道炎症性疾患において、病変局所で産生されかつ病態への増悪因子として機能している可能性が示唆され、今後の治療ターゲット候補となりうる可能性が考えられた。

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 洲崎勲夫	4. 巻 38
2. 論文標題 鼻・副鼻腔の炎症病態に及ぼすペリオスチンの影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1188-1191
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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 洲崎勲夫
2. 発表標題 重症喘息に併発した副鼻腔炎・中耳炎に対する分子標的治療薬の臨床効果
3. 学会等名 第68回 日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzaki I, Hirano K, Yuki M, Kobayashi H, and Bruce K. Rubin
2. 発表標題 IL-13-induced periostin production from human bronchial epithelial cells and human nasal epithelial cells
3. 学会等名 World Allergy Congress, WAC 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洲崎勲夫, 水吉朋美, 小林一女, Bruce K Rubin
2. 発表標題 ヒト気道上皮細胞とヒト鼻粘膜上皮細胞におけるペリオスチン産生の検討
3. 学会等名 第37回 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzaki I, Awakura H, Hirano K, Kobayashi H, and Bruce K. Rubin
2. 発表標題 IL-13-induced periostin production and mechanism from human nasal epithelial cells
3. 学会等名 The World Allergy Organization International Scientific Conference, WISC/SIAAIC 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎勲夫, 上村佐和, 平野康次郎, 池田賢一郎, 小林一女, 出原賢治
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮組織におけるペリオスチンの発現上昇
3. 学会等名 第2回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 洲崎勲夫, 関野恵里子, 上村佐和, 松浦聖平, 平野康次郎, 小林一女
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸組織におけるIL-4R 発現の検討
3. 学会等名 第59回 日本鼻科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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