

機関番号：32651
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20791230
 研究課題名（和文） 好酸球性副鼻腔炎の病態解明-制御性T細胞とIL-17産生性T細胞の関与について
 研究課題名（英文） Expression of Treg and Th17 Lymphocyte Subsets in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis
 研究代表者
 浅香 大也 (ASAKA DAIYA)
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20317928

研究成果の概要（和文）：罹患副鼻腔粘膜への好酸球浸潤を特徴とする好酸球性副鼻腔炎の病態形成に、ヘルパーT細胞サブセットのアンバランスが存在するのではないかと考えた。本研究課題では慢性副鼻腔炎患者の鼻ポリープと末梢血単核球を採取して、ヘルパーT細胞サブセットを比較検討した。好酸球性副鼻腔炎患者は慢性副鼻腔炎患者と比較して、鼻ポリープ、末梢血単核球ともにIL-4陽性CD4陽性細胞、IFN- γ 陽性CD4陽性細胞が高発現していた。好酸球性副鼻腔炎患者は免疫能が亢進している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The clinical feature of eosinophilic chronic rhinosinusitis is intense eosinophilic inflammation in nasal mucosa. The pathophysiology of eosinophilic chronic rhinosinusitis is poorly understood. We thought that unbalance of Th subsets is underlying in pathophysiology of eosinophilic chronic rhinosinusitis. The expression of IL-4(+)/CD4(+)/T cell and IFN- γ (+)/CD4(+)/T cell in eosinophilic chronic rhinosinusitis were up-regulated in both nasal mucosa and PBMC compare to chronic rhinosinusitis. These result suggest that hyperimmunoreactivity to pathogen may contribute to pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：免疫学、好酸球性副鼻腔炎、Treg、Th17

1. 研究開始当初の背景

1) 慢性副鼻腔炎の病態は近年多様化と増加の傾向を示している。かつては感染を契機として発症する慢性化膿性副鼻腔炎が主体であったが、マクロライド療法と内視鏡下鼻内手術の普及によりその治療成績は飛躍的に向上した。

一方これらの治療を行っても再発を繰り返す難治症例が増加している。これら難治性副鼻腔炎は非アトピー型喘息やアスピリン喘息を合併していることが多く、罹患副鼻腔粘膜に多数の好酸球優位な炎症細胞浸潤を認め、罹患洞内にも多数の好酸球からなる好酸球性ムチンが貯留しているのが特徴である。現在このような難治性副鼻腔炎は好酸球性副鼻腔炎と呼ばれており、I型アレルギーを病態の中心とするアレルギー性鼻炎やアレルギー性副鼻腔炎とは明確に区別される。本疾患の罹患率は近年増加傾向にあるが、その病態については不明な点が多く、治療法に関しても統一したものがないのが現状である。

2) 近年ヘルパーT細胞サブセットは4つ(Th、Th2、Treg、Th17)同定されている。Th1細胞とTh2細胞の分化は相互排他的であり、さらにTh1およびTh2細胞がTh17細胞分化を抑制する。また、Th17細胞がTh1、Th2細胞分化に対し抑制的であることも示唆されている。またTregの分化に必要なIL-2はTh17細胞分化を阻害し、逆にIL-6の存在はTreg細胞分化を抑えTh17細胞分化を促

進する。この様に、各T細胞サブセットは相互に緊密な相互調節によって恒常性を維持していることが分かる。

疾患における各T細胞サブセットのバランスがどう保たれているかを解明する事はその病態を理解する上で非常に重要であるが、好酸球性副鼻腔炎におけるこれらT細胞サブセットの知見は少ない。

2. 研究の目的

(仮説)

好酸球性副鼻腔炎患者におけるヘルパーT細胞のバランスはTh1↑ Th2↑ Treg↓ Th17↑となっている。この免疫学的偏向が好酸球性副鼻腔炎発症の原因となる。

この仮説を実証するために本課題を遂行する。

(目的)

好酸球性副鼻腔炎におけるヘルパーT細胞サブセットのバランスを検討する。

3. 研究の方法

対象) 手術を施行した慢性副鼻腔炎患者を①副鼻腔粘膜正常者、②好酸球性副鼻腔炎、③非好酸球性副鼻腔炎の3群に分類して検討する。

方法)

1) 末梢血単核球を分離し、Flow cytometryにてCD4陽性細胞中の各Th細胞の割合を測定し比較検討する。Th1細胞としてIFN- γ 産生細胞、Th2

細胞として IL-4 産生細胞、Treg 細胞として Foxp3 発現細胞、Th17 細胞として IL-17 産生細胞を細胞内染色にて同定した。

2) 術中採取した鼻ポリープまたは副鼻腔粘膜組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋してスライド上に切片を作成した。作成した連続切片に対し、抗 CD4 抗体と抗 GATA-3 抗体、抗 t-bet 抗体、抗 Foxp3 抗体、抗 ROR γ t 抗体を反応させて、二重染色にて CD4 陽性細胞中の各サブセットの発現細胞数を測定した。

4. 研究成果

1) 免疫染色

鼻ポリープはリンパ球の細胞浸潤が乏しかったため、病変部の篩骨洞粘膜で炎症細胞浸潤の多い部位を対象として免疫染色を行なった。好酸球性副鼻腔炎患者は非好酸球性副鼻腔炎と比較して GATA-3 陽性の CD4 陽性細胞 (Th2 細胞) と t-bet 陽性の CD4 陽性細胞 (Th1 細胞) を多く認めた。また、Foxp3 陽性 CD4 陽性細胞 (Treg) と抗 ROR γ t 陽性 T 細胞 (Th17) の発現は好酸球性副鼻腔炎群、非好酸球性副鼻腔炎群ともに同定することが出来なかった。抗体の反応時間を延長したが、Foxp3、ROR γ t 陽性細胞を検出することができなかった。

2) Flow cytometry

対象から血液 20ml を採取して、比重遠心分離法にて末梢血単核球を分離したそして PMA と Ionomycin にて活性化

させ、モネシンでサイトカインの細胞外放出を阻害して 3 時間反応させた。反応後に細胞を回収し、Flow cytometry にて CD4 陽性細胞中の各 Th 細胞の割合を測定し比較検討した。Th1 細胞として IFN- γ 産生細胞、Th2 細胞として IL-4 産生細胞、Treg 細胞として Foxp3 発現細胞、Th17 細胞として IL-17 産生細胞を細胞内染色にて同定した。好酸球性副鼻腔炎患者は非好酸球性副鼻腔炎と比較して IL-4 陽性 T 細胞 (Th2) の発現が増強している傾向があった。IFN- γ 陽性 T 細胞 (Th1) は非好酸球性副鼻腔炎患者において発現が増強している傾向があったが有意差を認めなかった。Fox p3 陽性 T 細胞 (Treg) の発現は有意差を認めなかった。IL-17 産生 CD4 陽性細胞は検出することが出来なかった。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- 1) D. Asaka, M. Yoshikawa, T. Okushi, N. Otori, H. Saito, H. Moriyama. Increased Levels of IL-33 in Nasal Secretions of Patients with Allergic Rhinitis. ISIAN 2010 June 22; Geneva.
- 2) D. Asaka, T. Nakajima, T. Ohno, Y. Matsuwaki, H. Moriyama, H. Saito. Reciprocal Regulation of Chitinase 3 like-1 Production from Human Macrophages by Th1 and Th2 cytokines. AAAAI 2009 March 16; Washington DC.

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

(1) 研究代表者

浅香 大也 (ASAKA DAIYA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20317928