

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09690

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎におけるNADPHオキシダーゼの役割

研究課題名(英文)Role of NADPH oxidase in eosinophilic sinusitis

研究代表者

神前 英明 (Kouzaki, Hideaki)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：10402710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：上皮由来サイトカイン産生にかかわるDUOX1のメカニズムについて検討した。上皮細胞へのダニ抗原やATPの刺激では、DUOX1は速やかに誘導された。濃度依存性にDUOX1の発現は増加した。また、抗原刺激によるTSLP、IL-25産生もDUOX1の誘導と相関していた。好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮細胞におけるDUOX1の発現は低下していたが、ダニ抗原刺激では、DUOX1の誘導は、タンパク、mRNAのレベルで増加がみられた。抗原が上皮細胞に及ぼす刺激(障害)によりDUOX1を介した上皮由来サイトカインの誘導が認められた。好酸球性副鼻腔炎の病態にも影響を及ぼしている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DUOX1が好酸球性副鼻腔炎の悪化に関与していることが分かった。これにより、環境ストレスが病態の悪化に寄与していることが想定され、新たな治療開発につながる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of DUOX1 involved in epithelium-derived cytokine production was investigated. Stimulation of epithelial cells with mite antigen or ATP induced DUOX1 rapidly. DUOX1 expression increased in a concentration-dependent manner. TSLP and IL-25 production by antigen stimulation also correlated with the induction of DUOX1. Expression of DUOX1 in nasal epithelial cells in eosinophilic sinusitis was decreased, whereas tick antigen stimulation induced an increase in DUOX1 at the protein and mRNA levels. Stimulation (damage) of epithelial cells by antigen resulted in induction of epithelium-derived cytokines via DUOX1. This may have an effect on the pathogenesis of eosinophilic sinusitis.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 NADPHオキシダーゼ DUOX1

## 1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎は、鼻粘膜への著明な好酸球浸潤と多発性の鼻茸形成を特徴とし、気管支喘息やアスピリン喘息を合併することが多い、原因不明の難治性疾患である。ステロイド以外に有効な薬物療法がなく、手術を行っても再発しやすく、治療に難渋することが多い。

近年、上気道炎症における自然免疫の役割が注目され、外来環境因子の刺激によって、抗原抗体反応を介さずに上皮由来サイトカイン (TSLP, IL-25, IL-33) が産生され、2型自然リンパ球 (ILC2) などを介して、Th2型サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) 産生が誘導され、自然型アレルギーが発症することが明らかになった (図1)。

申請者らは、これまでに外来抗原に含まれる蛋白分解酵素 (プロテアーゼ) が気道上皮細胞のプロテアーゼ受容体 (PARs) などを介して、IL-25, IL-33, TSLP 産生を誘導することを明らかにした (Kouzaki H, J Immunol 2009, Kouzaki H, J Immunol 2011, Kouzaki H, Am J Respir Cell Mol Biol 2013)。また、ウイルスが TLR3 を介して TSLP や IL-33, IL-25 を産生させる経路も知られている (Kato A, J Immunol 2007, Pasparakis M, Nat Immunol 2015)。さらに申請者らは、好酸球性副鼻腔炎の鼻粘膜では上皮由来サイトカイン (TSLP や IL-33, IL-25) の発現が亢進し、好酸球性副鼻腔炎由来の培養鼻粘膜上皮細胞が多量の上皮由来サイトカインを産生すること、(Kouzaki H, J Interferon Cytokine Res 2016)、好酸球性副鼻腔炎鼻粘膜では上皮由来サイトカインに反応して多量の Th2 型サイトカインを産生する 2 型自然リンパ球 (ILC2) が増加していることも明らかにし (Tojima I, Kouzaki H, Clin Immunol 2016) 好酸球性副鼻腔炎の病態には上皮由来サイトカインが極めて重要であることを明らかにした。

抗原やウイルスなどの外来環境因子が上皮由来サイトカイン産生を誘導する分子機序はよくわかっていないが、上皮細胞では様々な酸化ストレスにより NADPH オキシダーゼ経路が活性化されることが知られている。NADPH オキシダーゼファミリーには NOX1-4 と DUOX1, 2 が存在するが、申請者らは予備実験において、複数抗原の長期点鼻刺激で作成した好酸球性慢性炎症のマウスモデル (Kouzaki H, Am J Respir Crit Care Med 2017) で、NADPH オキシダーゼ阻害薬を点鼻投与すると、鼻粘膜での上皮由来サイトカイン産生や Th2 型サイトカイン産生と組織への好酸球数浸潤が抑制されることを確認した。上皮細胞における酸化ストレスの抑制が新たな治療手段になる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、上皮由来サイトカイン産生の分子機序を、酸化ストレス反応の面から明らかにすることで、その制御機構を利用した新たな治療手段の開発を目指している。

本研究では、まだ十分に解明されていない上皮由来サイトカイン産生の分子機序について、酸化ストレスに関わる NADPH オキシダーゼファミリーに注目した点に独自性があり、NADPH オキシダーゼの制御は、ステロイド以外に有効な薬物療法がない難治性疾患における新たな治療手段の開発につながる創造性が期待できる。

### 3. 研究の方法

手術時に採取した鼻茸や鼻副鼻腔粘膜を用いて、好酸球性副鼻腔炎の病態における NADPH オキシダーゼファミリーの役割を検討する。

- (1) 手術時に採取した鼻茸、鼻副鼻腔粘膜中のNADPHオキシダーゼファミリー（NOX1-5, DUOX1, 2）の発現を免疫組織化学、Real-time PCR、ELISA 法にて測定する。非好酸球性副鼻腔炎・好酸球性副鼻腔炎などにおける疾患特異的な変化を調査する。
- (2) 手術時に採取した鼻粘膜上皮細胞を培養し、抗原刺激（ダニ抗原、真菌、ブドウ球菌）、Poly(I:C)刺激を行いNADPH オキシダーゼファミリーの発現を Real-time PCR、ELISA 法にて測定する。さらに、疾患特異的な変化も検討する。

培養鼻粘膜上皮細胞や正常機関上皮細胞を用いて、上皮由来サイトカイン産生における NADPH オキシダーゼの役割を検討する。

- (1) 培養鼻粘膜上皮細胞や正常気管支上皮細胞を用いて、抗原（ダニ抗原、真菌、ブドウ球菌）やPoly (I:C)刺激による上皮由来サイトカイン（TSLP, IL-25, IL-33）産生における、NADPHオキシダーゼファミリー阻害薬（DPI、VAS-2870）の作用を検討する
- (2) siRNAによりNADPHオキシダーゼファミリー発現をノックダウンした培養上皮細胞を用いて、抗原、Poly(I:C)刺激による上皮由来サイトカイン産生の変化を検討する

### 4. 研究成果

上皮由来サイトカイン産生にかかわる DUOX 1 のメカニズムと副鼻腔疾患と DUOX1 の発現について検討した。正常ヒト気管支上皮細胞へのダニ抗原や ATP の刺激では、DUOX 1 は刺激後 15 分で速やかに誘導された。抗原刺激に対する上皮細胞の生存率について検討した。濃度依存性に DUOX1 の発現は増加したが、高濃度では細胞死が誘導され、DUOX 1 発現も低下した。また、抗原刺激による TSLP, IL-25 産生も DUOX1 の誘導と相関していた。好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮細胞における DUOX 1 の発現は低下していたが、ダニ抗原刺激では、DUOX 1 の誘導は、タンパク、mRNA のレベルで増加がみられた。抗原が上皮細胞に及ぼす刺激（障害）により DUOX 1 を介した上皮由来サイトカインの誘導が認められた。好酸球性副鼻腔炎の病態にも影響を及ぼしている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideaki Kouzaki
2. 発表標題 Role of IL-33 on the pathogenesis of chronic rhinosinusitis and therapeutic strategy in relation with IL-33
3. 学会等名 61th Annual congress of KRS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Kouzaki
2. 発表標題 Innate immunity on the pathogenesis of chronic sinusitis and therapeutic strategy in relation with IL-33
3. 学会等名 AAO-HNSF 2020 (招待講演) (国際学会)
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
---------	---------