

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03086

研究課題名（和文）好酸球性副鼻腔炎に対するマルチオミックス解析

研究課題名（英文）Multi-Omics Analysis for Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis

研究代表者

藤枝 重治 (Fujieda, Shigeharu)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：30238539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：好酸球性副鼻腔炎鼻茸では、ペリオスチン、レプチン、peripheral lymph node addressin (PNAd)の発現が有意に高く、レチノイド発現が低かった。レチノイン酸刺激により線溶系因子tPA発現を更新させ治療標的薬の可能性を見出した。非好酸球性副鼻腔炎では、好酸球性副鼻腔炎に比較してアルファ多様性が低く、Fusobacterium nucleatum (FN)の検出が有意に多く、LPS合成酵素とLPS合成物質が亢進していた。FN由来のLPSは、気道上皮細胞株NHBE株におけるIL-4、IL-13刺激による好酸球遊走因子：ALOX-15産生を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎は下気道・全身性疾患を伴う難治性副鼻腔炎であり、その原因や病態は未だ不明である。治療は経口ステロイドが有効であるが、最近出現した抗体薬が非常に有効であることが証明された。本研究では、好酸球性副鼻腔炎の病因として、鼻腔内の細菌叢の違いが好酸球浸潤の程度に影響を及ぼすことを証明するとともに、抗体薬がどのような症例に効果があり、どの程度の効果なのかを証明した。またレチノイン酸を含むものが、新規治療薬として使用可能であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Periostin, leptin, and peripheral lymph node addressin (PNAd) expression was significantly higher and retinoid expression was lower in nasal polyps of eosinophilic chronic sinusitis (E CRS). Retinoic acid stimulation renewed fibrinolytic system factor tPA expression and identified a potential therapeutic target agent. Non-E CRS had lower alpha diversity and significantly more Fusobacterium nucleatum (FN) detection than E CRS, and LPS synthase and LPS synthetase were upregulated. FN-derived LPS was found in the airway epithelial cell line NHBE strain, which was associated with IL-4 and IL-13-stimulated eosinophil migration factor: ALOX-15 production in the NHBE airway epithelial cell line.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 鼻茸 マイクロバイオーム 2型炎症 レチノイン酸 レプチン ペリオスチン

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎は、両側の鼻腔に好酸球浸潤のある多発性の鼻茸が生じ、内視鏡下鼻副鼻腔手術で摘出しても再発を繰り返す難治性副鼻腔炎である。申請者は多施設共同大規模疫学研究によって、JESREC スコアからなる好酸球性副鼻腔炎の診断基準ならびに重症度分類を策定した。この分類により、好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎に区別することが可能となり、病態解明のための基礎研究が精力的に行うことができるようになった。

我々は、好酸球性副鼻腔炎鼻茸の組織では凝固系因子である L-plastin、TAFI、XIII 因子 A の亢進や線溶系因子である t-PA の低下など凝固線溶系の異常から鼻茸内に過剰なフィブリン沈着をきたすことを見出した。さらに t-PA の低下に関しては、t-PA 発現遺伝子である *PLAT* のメチル化異常や、細菌代謝物のひとつである短鎖脂肪酸が t-PA 発現に関与していることを見出しており、DNA メチル化や細菌代謝物が病態へ関与していると考えている。鼻茸由来サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析では好酸球遊走因子を誘導する因子としての CST1、術後予後予測因子としてのペリオスチン、IgG4 を同定した。

また、宿主であるヒト(鼻茸患者)と相互作用をする鼻腔内の細菌叢を探索することを目的としてマイクロバイーム解析を行い、好酸球性副鼻腔炎には黄色ブドウ球菌と *Corynebacterium* が有意に検出された。しかし、この結果は、好酸球性副鼻腔炎の断片的な状態を見ているに過ぎず、疾患発症の成り立ちや関与する細胞・遺伝子発現解析の解明には至っていない。

網羅的な遺伝子発現解析には、一般的には凍結生サンプルが適しているが、凍結生サンプルの入手は容易ではなく、そのため臨床症状との関連が詳細に検討できないという課題があった。そこで、通常の手術時に採取されている病理検体でも網羅的遺伝子発現解析が可能な、nCounter (nanoString 社) システムをベースとした独自の FuKui Nasal polyps-panel (FKN-panel)を開発し、後方視的に臨床症状と遺伝子発現との関連を検討できるシステムを構築した。

2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎は下気道・全身性疾患を伴う難治性副鼻腔炎であり、その原因は未だ不明である。治療は経口ステロイドのみが有効であり、それに匹敵する治療法も確立されていない。しかし近年のサイトカイン等に対する抗体薬の出現で個別化医療の可能性が問われるようになってきた。本研究では、オリジナルパネルを使用した nCounter による遺伝子発現解析によるクラスタ分類、病変に存在する微生物叢のマイクロバイーム解析、全ゲノム関連解析 (GWAS)、DNA メチル化解析によるマルチオミックス解析による好酸球性副鼻腔炎のエンドタイプ決定を行い、本疾患の個別化医療へのアルゴリズムを作成する。さらにマイクロバイーム解析で判明した菌種がどのような機能を有し、好酸球性副鼻腔炎の病態に関与しているかを解明する。

3. 研究の方法

好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎患者の中鼻道から滅菌綿棒を使用してブラッシングしサンプルを採取する。採取した検体から微生物由来 DNA を自動抽出機器 QIAcube により抽出した。抽出された DNA を使用してライブラリを作成し、次世代シーケンサーを用いて 16S rRNA (細菌)、ITS (真菌) のシーケンス、ショットガンメタゲノムシーケンスを行う。得られた塩基配列データは QIIME (Caporaso et al, Nat Method 2010) 等を使用して、微生物叢の分類、疾患関連の菌叢、細菌の種 (species) および真菌の同定を行う。好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性

副鼻腔炎で細菌叢によるアミノ酸合成、窒素代謝、硫黄代謝の違いを見出し、免疫担当細胞への影響と鼻茸形成への関与を検討する。

JESREC Study の診断基準に準じて、好酸球性副鼻腔炎（軽症・中等症・重症）と非好酸球性副鼻腔炎の手術時採取した鼻茸病理検体（ホルマリン固定パラフィン包埋検体）から、RNeasy FFPE kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出した。nCounter® SPRINT (NanoStrings)により、Human Immunology Panel をベースとした鼻茸に特化した遺伝子発現パネルである FKN-panel を用いて約 600 遺伝子の発現量を測定した。得られたデータは、nCounter® Analysis System (NanoStrings)を用いて標準化し、遺伝子発現量を算出した。血清中のレプチン量を測定し、末梢血および鼻茸中好酸球数との関連を調べた。

4 . 研究成果

110 名の慢性副鼻腔炎患者と 33 名の健康人において鼻腔内中鼻道の細菌叢を 16S ribosome RNA 遺伝子増幅によって次世代シーケンサーで検討した。その結果非好酸球性副鼻腔炎(25名)では、好酸球性副鼻腔炎(62名)に比較して、アルファ多様性が低く、Fusobacterium nucleatum (FN) の検出が有意に多く、LPS 合成酵素と LPS 合成物質が亢進していることが判明した。さらに FN 由来の LPS は、気道上皮細胞株 NHBE 株における IL-4、IL-13 刺激による ALOX-15 産生を抑制した。対照の大腸菌由来 LPS は、同様の ALOX-15 産生を抑制できなかった。ALOX-15 は強い好酸球遊走因子である。このことは、非好酸球性副鼻腔炎における FN の存在が、自身の LPS 産生によって上皮細胞からの好酸球遊走因子の産生を抑制し、好酸球浸潤を抑制方向に向かわせ、新規治療標的因子になる可能性を示していた。鼻茸を有する慢性副鼻腔炎に対して行われた IL-4 アルファ鎖抗体薬（デュピクセント）の臨床研究（SINUS-24 と SINUS-52）において、アドホック解析として、嗅覚障害と味覚障害に関して、その回復度を検討したところ、嗅覚障害は自覚的にも客観的にも有意に改善を認めていた。その回復は味覚障害の回復とも有意な相関を認め、QOL スコアの改善とも相関するとともに、患者が訴える嗅覚障害は、患者の訴える味覚障害とも相関を認めた。

好酸球性副鼻腔炎鼻茸では、ペリオスチン、レプチン、peripheral lymph node addressin (PNAd)の発現が有意に高く、レチノイド発現が低かった。レチノイン酸刺激により線溶系因子 tPA 発現を更新させ、鼻茸中のフィブリンを分解する働きがあるので、治療標的分子の可能性を見出した。

250 例の鼻茸を FKN パネルで遺伝子発現量を調べると5つのクラスターに分類できることが判明した。そして内視鏡下鼻副鼻腔手術後の再発を調べると、5つのクラスターで有意に違いが認められることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Saito K, Orimo K, Kubo T, Tamari M, Yamada A, Motomura K, Sugiyama H, Matsuoka R, Nagano N, Hayashi Y, Arae K, Hara M, Ikutani M, Fukuie T, Sudo K, Matsuda A, Ohya Y, Fujieda S, Saito H, Nakae S, Matsumoto K, Akdis CA, Morita H.	4. 巻 78
2. 論文標題 Laundry detergents and surfactants-induced eosinophilic airway inflammation by increasing IL-33 expression and activating ILC2s.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 1878-1892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15762.	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 該当する

1. 著者名 Tsuda T, Suzuki M, Kato Y, Kidoguchi M, Kumai T, Fujieda S, Sakashita M.	4. 巻 51
2. 論文標題 The current findings in eosinophilic chronic rhinosinusitis.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 51-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2023.08.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kidoguchi M, Imoto Y, Noguchi E, Nakamura T, Morii W, Adachi N, Ii R, Koyama K, Aoki S, Miyashita K, Hosokawa Y, Omura K, Tanaka Y, Tanaka K, Hida Y, Ninomiya T, Kato Y, Sakashita M, Takabayashi T, Fujieda S.	4. 巻 156
2. 論文標題 Middle meatus microbiome in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis in a Japanese population.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1669-1676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2023.06.029.	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 Izuhara K, Fujieda S, Ohta N.	4. 巻 30
2. 論文標題 The functional role and the clinical application of periostin in chronic rhinosinusitis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Expert Rev Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1744666X.2023.2192928.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kato E, Tsutsumiuchi T, Muramoto A, Tokunaga T, Fujieda S, Kobayashi M.	4. 巻 7(1)
2. 論文標題 The Percentage of PNAd-Expressing Vessels is Correlated with Disease Severity in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Am J Rhinol Allergy.	6. 最初と最後の頁 43-50.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/19458924221129903.	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 Peters AT, Soler ZM, Kern RC, Heffler E, Maspero JF, Crampette L, Fujieda S, Lane AP, Zhang H, Nash S, Khan AH, Siddiqui S, Jacob-Nara JA, Rowe P, Deniz Y.	4. 巻 52(9)
2. 論文標題 Improvement in patient-reported "taste" and association with smell in dupilumab-treated patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps from the SINUS-24 and SINUS-52 trials.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Exp Allergy.	6. 最初と最後の頁 1105-1109.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cea.14194.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakashita M, Takabayashi T, Imoto Y, Homma T, Yoshida K, Ogi K, Kimura Y, Kato A, Stevens WW, Smith SS, Welch KC, Norton JE, Suh LA, Carter RG, Hulse KE, Seshadri S, Min JY, Pothoven KL, Conley DB, Tan BK, Harris KE, Kern RC, Haruna S, Matsuwaki Y, Ochiai R, Fujieda S, Schleimer RP.	4. 巻 150(5)
2. 論文標題 Retinoic acid promotes fibrinolysis and may regulate polyp formation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1114-1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2022.05.021.	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 該当する

1. 著者名 Imoto Y, Ueki S, Kato Y, Yoshida K, Morikawa T, Kimura Y, Kidoguchi M, Tsutsumiuchi T, Koyama K, Adachi N, Ito Y, Ogi K, Sakashita M, Yamada T, Schleimer RP, Takabayashi T, Fujieda S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Elevated Serum Leptin Levels in Patients With Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 793607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.793607.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogi K, Liu S, Ramezanpour M, Cooksley C, Javadiyan S, Fujieda S, Wormald PJ, Vreugde S, Psaltis AJ.	4. 巻 353
2. 論文標題 Trimellitic anhydride facilitates transepithelial permeability disrupting tight junctions in sinonasal epithelial cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicol Lett.	6. 最初と最後の頁 27-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2021.09.016.	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 該当する

1. 著者名 Fujieda S, Matsune S, Takeno S, Ohta N, Asako M, Bachert C, Inoue T, Takahashi Y, Fujita H, Deniz Y, Rowe P, Ortiz B, Li Y, Mannent LP.	4. 巻 77(1)
2. 論文標題 Dupilumab efficacy in chronic rhinosinusitis with nasal polyps from SINUS-52 is unaffected by eosinophilic status.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 186-196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14906.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Desrosiers M, Mannent LP, Amin N, Canonica GW, Hellings PW, Gevaert P, Mulloj J, Lee SE, Fujieda S, Han JK, Hopkins C, Fokkens W, Jankowski R, Cho SH, Mao X, Zhang M, Rice MS, Khan AH, Kamat S, Patel N, Graham NMH, Ruddy M, Bachert C.	4. 巻 59(3)
2. 論文標題 Dupilumab reduces systemic corticosteroid use and sinonasal surgery rate in CRSwNP.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rhinology	6. 最初と最後の頁 301-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4193/Rhin20.415.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takabayashi T, Asaka D, Okamoto Y, Himi T, Haruna S, Yoshida N, Kondo K, Yoshikawa M, Sakuma Y, Shibata K, Suzuki M, Kobayashi M, Kawata R, Tsuzuki K, Okano M, Higaki T, Takeno S, Kodama S, Yonekura S, Saito H, Nozaki A, Otori N, Fujieda S.	4. 巻 35(6)
2. 論文標題 A Phase II, Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Study of Benralizumab, a Humanized Anti-IL-5R Alpha Monoclonal Antibody, in Patients With Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Rhinol Allergy.	6. 最初と最後の頁 861-870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/19458924211009429.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujieda S, Matsune S, Takeno S, et al.	4. 巻 131(6)
2. 論文標題 The Effect of Dupilumab on Intractable Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E1770-E1777.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.29230.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshida K, Takabayashi T, Kaneko A, Takiyama M, Sakashita M, Imoto Y, Kato Y, Narita N, Fujieda S.	4. 巻 267
2. 論文標題 Baicalin suppresses type 2 immunity through breaking off the interplay between mast cell and airway epithelial cell.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Ethnopharmacol.	6. 最初と最後の頁 113492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2020.113492.	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 Fujieda S, Matsune S, Takeno S, Asako M, Takeuchi M, Fujita H, Takahashi Y, Amin N, Deniz Y, Rowe P, Mannent L.	4. 巻 131
2. 論文標題 The Effect of Dupilumab on Intractable Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E1770-E1777.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.29230	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1件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤枝重治
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎における生物学的製剤
3. 学会等名 第123回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会(招待講演)
4. 発表年 2022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
研究分担者	岸川 敏博 (Kishikawa Toshihiro) (20756944)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究分担者	木戸口 正典 (kidoguchi Masanori) (30880132)	福井大学・学術研究院医学系部門・助教 (13401)	
研究分担者	野口 恵美子 (Noguchi Emiko) (40344882)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
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
---------	---------