

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591900

研究課題名（和文）自然免疫応答からみた好酸球性副鼻腔炎の病態と一酸化窒素産生機構の解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of pathology of eosinophilic chronic rhinosinusitis and regulatory mechanism of nitric oxide production.

研究代表者 竹野 幸夫（TAKENO SACHIO）

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：50243556

研究成果の概要（和文）：

好酸球性副鼻腔炎における自然免疫応答（innate immunity）を介した難治化過程の解析と、一酸化窒素（NO）濃度を指標とした新たな診断法の確立を目的とした。その成果として、1）副鼻腔構成細胞における toll like receptor（TLR）を介した細胞内シグナル伝達機構と細胞内転写因子の活性化についての解析。2）副鼻腔炎粘膜におけるステロイド受容体の発現。3）NO濃度測定モニタによる on-line 法による NO 測定の臨床応用。4）口呼吸 NO（oral FeNO）と鼻呼吸 NO（nasal FeNO）といった新たな指標の確立。5）副鼻腔粘膜における NOS 合成酵素発現の分子生物学的解析。などの知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

The study aimed to analyze pathology of eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) in relation to innate immunity, and to establish a new approach to evaluate the regulatory mechanism of nitric oxide (NO) production in human nose and paranasal sinuses.

We investigated signal transduction mechanisms induced by toll like receptors (TLRs) in the cultured paranasal sinus epithelial cells. Mucosal distribution and cellular localization of glucocorticoid receptor (GR) isoform expression were analyzed. We have established oral and nasal FeNO measurement using an electrochemical analyzer suitable for monitoring the patients in various treatment modalities. It also comprises potential usefulness as a tool to improve daily clinical care. We confirmed that higher FeNO levels in ECRS patients may reflect the persistence of eosinophilic inflammation in sinus mucosa with concomitant iNOS upregulation and accompanying deposition of oxidized NO metabolites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：耳鼻咽喉科

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：一酸化窒素（NO）、サイトカイン、NO 合成酵素（NOS）、ステロイド受容体、呼吸中 NO 濃度（FeNO）、副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎、好酸球

## 1. 研究開始当初の背景

近年、臨床的に問題となっている好酸球性副鼻腔炎の病態に関しては、副鼻腔の解剖学的構造異常を重視する理論に一致せず、むしろ全身的な好酸球増多を介した局所粘膜の易刺激性の亢進に強く依存しているものと考えられている。この“好酸球性副鼻腔炎”という名称は、わが国ではほぼ確立しており、その診断基準の確立が望まれている。一方、欧米諸国の慢性副鼻腔炎の分類は、CRSsNP (Chronic rhinosinusitis without nasal polyps) と CRSwNP (Chronic rhinosinusitis with nasal polyps) が一般的であり、この内の後者 (CRSwNP) が好酸球性副鼻腔炎に該当すると考えられる。しかしながら、我が国では非好酸球性 (化膿性) 副鼻腔炎と診断される症例でも、多発性鼻茸を有する症例は多く存在しており両者の分類基準にはいまだ疫学的要因などによる乖離が存在していると思われる。副鼻腔粘膜局所にこのように著明な好酸球浸潤が生じる機序については不明な点が多いものの、I 型アレルギーの関与以外に副鼻腔局所における構成細胞や浸潤炎症細胞などにおける細胞内転写因子の活性化を伴う炎症の悪循環サイクルが重要な役割を果たしていると思われる。一方で、多機能分子である一酸化窒素(NO) は、ヒトにおいて種々の重要な生理機能、並びに炎症の修飾と制御に深く関与している内因性調節因子である。呼気中 NO 濃度 (fraction of exhaled nitric oxide, FeNO) の測定は、国際的な測定方法の標準化も進められている。ATS/ERS の「臨床家向けの臨床実施ガイドライン 2011」などにより気管支喘息領域における EBM の構築がなされている。これに対して鼻副鼻腔における NO 濃度測定に関しては、骨壁に囲まれた副鼻腔の複雑な解剖学的構造、副鼻腔自然口を通じた生理的換気の影響因子、鼻漏や組織中に NO 自体が早期に吸収されてしまう、などの問題により、測定方法及び基準値の標準化にはいたっていない。一方でヒト副鼻腔では生理的に重要な NO 産生場であることより、種々の鼻副鼻腔疾患においても NO は、その濃度を継続的にモニタリングすることにより、病態診断や治療効果判定に役立つ新たな鼻腔機能検査法となる可能性を秘めている。

## 2. 研究の目的

そこで今回の一連の研究は、好酸球性副鼻腔炎における自然免疫応答 (innate immunity) を介した難治化過程の解析と、一酸化窒素 (NO) 濃度を指標とした新たな診断法の確立を目的とした。そして、現在大きくその病態が変貌しつつある副鼻腔炎に対する低侵襲で効果的な手術療法と、同時に臨床的に有

用な術後の薬物治療法の開発に有用と考えられる基礎的なデータの集積を目指したものである。

## 3. 研究の方法

- 1) 副鼻腔構成細胞における toll like receptor (TLR) 発現に対する刺激を介した細胞内シグナル伝達機構と細胞内転写因子の活性化について分子生物学的な解析。ヒト培養副鼻腔上皮細胞を用い、TLR 発現と細胞内転写因子の制御と活性化の観点から好酸球関連物質の産生機構を解析した。
- 2) 好酸球性副鼻腔炎におけるステロイド受容体の発現解析。ステロイド製剤の臨床的有用性の検証と、鼻腔 NO 濃度測定による治療効果の評価。
- 3) 副鼻腔炎組織の病理組織学的評価と分子生物学的解析。副鼻腔炎粘膜の病理組織所見と臨床背景に基づく好酸球性副鼻腔炎の疫学調査報告。副鼻腔炎粘膜の病理組織所見を検討し、臨床背景とあわせて好酸球性副鼻腔炎の疫学調査を行った。この調査は厚生労働省の難治性疾患克服研究事業 (藤枝班) の「好酸球性副鼻腔炎の疫学、診断基準作成等に関する研究」に参加して、広島県における副鼻腔炎手術症例の組織学的解析やデータベースの作成事業などの一環として行った。
- 4) 簡易型 NO 濃度測定モニタによる on-line 法による NO 測定の臨床応用。実地臨床における口呼気 NO (oral FeNO) と鼻呼気 NO (nasal FeNO) といった新しい炎症状態を評価可能な指標の確立。携帯型 NO 濃度測定モニタ (NObreath®) に我々が発案した鼻呼気用アダプタを組み合わせることにより nasal FeNO の測定が可能となった。そしてこの方法を用いて日本人における正常分布、鼻アレルギーや副鼻腔炎における cut off 値の設定が可能かどうかなどの検討を行った。
- 5) 副鼻腔粘膜における NO 産生機構と NOS 合成酵素発現の分子生物学的解析。好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 症例における治療効果に関する検討では、保存療法群 (局所ステロイドと LT 受容体拮抗剤による薬物療法) と手術療法群にわけ、継続的に FeNO 測定を行った。同時に副鼻腔粘膜における NOS 合成酵素発現の分子生物学的解析も行った。

## 4. 研究成果

- 1) 細菌毒素成分である LPS、PGN などの刺激に対する培養上皮細胞の応答が、細胞表面に

における toll like receptors (TLRs) の中でも TLR4 と TLR2 発現を介した転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を伴っていることを確認し、ステロイドによる抑制効果を Trans AM assay と免疫組織学的解析にて評価した。また培養細胞を炎症性サイトカインで刺激することにより、早期に転写因子活性の有意な上昇が確認され、また本作用はステロイドの前投与により濃度依存的に抑制可能であった。免疫組織学的な観察でも glucocorticoid receptor (GR) の発現と核内移行の所見が観察された。これらの TLR を介した innate immunity の存在が、感染に伴う持続的な副鼻腔粘膜上皮への刺激と相まって慢性副鼻腔炎の遷延化の一因となっていると考えられた。

2) 本研究において好酸球性 (E CRS) と感染型 (non-E CRS) 副鼻腔炎症例の比較では、Trans-AM assay による GR 全体の結合能には変化がないものの、GR beta/alpha 陽性細胞の比率は篩骨洞粘膜を中心として E CRS 症例で有意に高いことを解明した。この結果並びに E CRS では局所の ECP 濃度が高値などの事実と併せて考えると、ステロイド受容体の結合能が相対的に不良であることを示している。また呼気中 NO (FeNO) 並びに局所 NO (nasal and sinus NO) 濃度の測定では、両測定値とも術前・術後並びに術後の治癒過程に応じて変動することが明らかとなった。

3) 広島県を含む 3000 例以上の手術症例を対象とした全国疫学調査でも、各施設で臨床的に好酸球性副鼻腔炎と診断した症例は 27.6% の割合で存在していた。そして本疾患における有意に異なる臨床因子として、副鼻腔罹患洞が両側性である点、鼻茸の存在、嗅覚障害の合併、血液中好酸球率、画像陰影の重症度、などが判明した。当科において 2000 年~2003 年までと 2007 年~2010 年までの期間に手術を施行し、組織学的検討が可能であった症例について、好酸球浸潤の程度と臨床背景について検討した。その結果、1) この 10 年間で手術症例に占める割合は約 10% 増加しており、2) 診断基準には組織学的評価が重要であり、3) 好酸球性副鼻腔炎の臨床像には変化は認められず、4) 術後経過不良例 (全体の約 1/4) に対する治療法の検討が今後も必要、であることが判明した。

4) 正常例と通年性 AR 症例 (喘息非合併例) における呼気 FeNO 値の分布を検討してみると、正常例 (n=33) の口呼気 FeNO 値の中央値は 9 ppb で、AR 例 (n=86) の中央値は 17 ppb であった。両群間の口呼気 FeNO 値には有意差が存在しているものの、感度 (sensitivity) の面からは診断に用いるの

は難しいと考えられた。一方で鼻呼気 FeNO の分布については、両群ともに正規分布パターンを示しており、正常例の中央値は 34、AR 例では 51 と群間の有意差が存在した。また cut off 値として、この自験例における 80 パーセントタイル値である 70 ppb を採用してみたところ、AR 症例における感度は 59.3% (51/86 例) となった。このように鼻アレルギーにおいて、鼻腔 NO 測定が病態把握に有用な指標となる可能性が示唆された。さらに鼻アレルギー症例における有意な上昇、自覚鼻症状スコアと正の相関関係、スギ花粉症症例やレーザー手術施行例における経時 follow にも有用であるなどの点を報告した。

5) 治療開始前の E CRS 例の口呼気 FeNO 値は正常例に比較して高値であった (47.7 vs. 14.8 ppb)。一方、鼻呼気 FeNO 値は両群とも平均はほぼ同様であった (53.5 vs. 45.4 ppb)。E CRS 症例においては疾患加療に伴い、口呼気 FeNO 値は低下、一方の鼻呼気 FeNO 値は上昇する傾向が認められた。特に手術療法群ではこの変化が著明であり、術後 6 ヶ月後には oral FeNO 値で約 20% 弱の低下 (50.9 ppb vs. 36.8 ppb)、鼻呼気 FeNO 値で約 80% 強の増加 (50.6 ppb vs. 93.6 ppb) と、いずれも有意な変化を示した。さらに、篩骨洞粘膜と鼻茸組織における NOS isoform とサイトカイン発現を real-time PCR 法と免疫組織学的に検討したところ、下鼻甲介粘膜に比較して iNOS と IL-5 の有意な上昇を E CRS 症例で確認した。上記の FeNO 値の変動には、E CRS 自体が有する気道粘膜の過敏性と粘液線毛輸送機能の回復のプロセスが密接に関連している可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- 1) Noda N, Take no S, Fukuiri T, Hirakawa K: Monitoring of oral and nasal exhaled nitric oxide in eosinophilic chronic rhinosinusitis: A prospective study. Am J Rhinol Allergy 26: 255-259, 2012. 査読有
- 2) 石野岳志、竹野幸夫、平川勝洋: 難治性副鼻腔炎におけるアレルギー性ムチンより検出された真菌菌種の検討。日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 30, 41-46, 2012. 査読有
- 3) 竹野幸夫、野田礼彰、樽谷智之、石野岳志、平川勝洋: 慢性鼻副鼻腔炎の治療における一酸化窒素 (NO) 濃度のモニタリングの有用性。耳鼻免疫アレルギー (JJIAO) 30: 112-113, 2012. 査読なし
- 4) 竹野幸夫、久保田和法: 器官別機能と

老化による病態 鼻腔機能。特集 高齢化社会と耳鼻咽喉科。JOHNS 28: 1300-1305, 2012. 査読なし

5) 竹野幸夫: 特集「花粉症アップデート」VII 花粉症の病態と一酸化窒素 アレルギー・免疫 19: 60-66, 2012. 査読なし

6) 竹野幸夫、樽谷貴之: 喘息に伴う慢性副鼻腔炎の病態と治療。特集: 副鼻腔気管支症候群と喘息の違いは。Monthly Book ENTONI 143: 45-53, 2012. 査読なし

7) Takeo S, Noda N, Hirakawa K: Measurements of Nasal Fractional Exhaled Nitric Oxide with a Hand-held Device in Patients with Allergic Rhinitis: Relation to Cedar Pollen Dispersion and Laser Surgery. Allergol Int 61: 93-100, 2011. 査読有

8) 竹野幸夫、久保田和法: 好酸球性副鼻腔炎 鼻科学領域、特集 私の処方箋。JOHNS 27: 1380-1382, 2011. 査読なし

9) 竹野幸夫、野田礼彰: 一酸化窒素と活性酸素、特集 慢性炎症の病態を理解する。JOHNS 27: 1723-1728, 2011. 査読なし

10) 竹野幸夫、野田礼彰、石野岳志、平川勝洋: 鼻アレルギー患者における呼気中並びに鼻呼気中における on-line 法による一酸化窒素 (NO) 濃度のモニタリングの有用性について。耳鼻免疫アレルギー (JJIAO) 29: 72-73, 2011. 査読なし

11) 竹野幸夫: 慢性鼻閉に対するデイスージェリー—下鼻甲介粘膜焼灼術を中心に—。日本耳鼻咽喉科学会会報 114: 72-77, 2011. 査読有

12) 竹野幸夫、中下陽介、石野岳志、宮原伸之、呉奎真、野田礼彰、平川勝洋: 炭酸ガスレーザーによる下鼻甲介粘膜焼灼術の長期治療成績。日本鼻科学会誌 50: 7-12, 2011. 査読有

13) 宮里麻鈴、竹野幸夫、平川勝洋、福島典之: ヒト中耳真珠腫上皮における RANKL 発現と増殖能についての検討。Otol Jpn 21: 784-790, 2011. 査読有

14) 竹野幸夫、平川勝洋、石野岳志、野田礼彰、福入隆史、羽嶋正明、木村隆広、小川知幸: 当科における好酸球性副鼻腔炎手術症例の臨床背景と治療成績の変遷について。広島医学 64: 399-402, 2011. 査読有

15) Takeda K, Takeo S, Hirakawa K, Ishino T: Expression and distribution of glucocorticoid receptor isoforms in eosinophilic chronic rhinosinusitis. Auris Nasus Larynx 37:700-707, 2010. 査読有

16) Takeo S, Hirakawa K, Ishino T: Pathological Mechanisms and Clinical Features of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis in the Japanese Population.

Allergol Int 25: 247-256, 2010. 査読有

17) Go K, Ishino T, Nakashimo Y, Miyahara N, Ookubo T, Takeo S, Hirakawa K: Analysis of syndecan-1 and TGF-beta expression in the nasal mucosa and nasal polyps. Auris Nasus Larynx 37: 427-435, 2010. 査読有

18) 竹野幸夫: 慢性副鼻腔炎のマネージメント—通常症例から難治性症例まで—。日鼻誌 49: 59-60, 2010. 査読なし

[学会発表] (計 11 件)

1) 竹野幸夫: 第 31 回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 ミニシンポジウム 「一酸化窒素 (NO) のモニタリングと産生代謝からみた副鼻腔炎病態の比較」 (平成 25 年 2 月 9 日、倉敷)

2) 竹野幸夫: 第 36 回日本医用エアロゾル研究会: ランチョンセミナー 「鼻副鼻腔における局所炎症の制御とエアロゾル療法」 (平成 24 年 9 月 6・7 日、下関)

3) 竹野幸夫: 第 51 回日本鼻科学会 ランチョンセミナー 「鼻副鼻腔のアレルギー・炎症の病態と治療 ②副鼻腔炎編」 (平成 24 年 9 月 27 日、千葉)

4) Takeo S. Symposium “Recent Advances in Monitoring of Exhaled Nitric Oxide in Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis” the 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery (Kyoto, Japan, April 12-14, 2012)

5) 竹野幸夫、野田礼彰、樽谷智之、石野岳志、平川勝洋: 慢性鼻副鼻腔炎の治療における一酸化窒素 (NO) 濃度のモニタリングの有用性。第 30 回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (平成 24 年 2 月 16-18 日、大津)

6) Noda N, Hirakawa K, Takeo S, Isino T, Fukuiri T, Hajima M. Analysis of exhaled and nasal nitric oxide by a simple and efficient on-line technique in diagnosis of patients with allergic rhinitis. the 14th IRS and the 30th ISIAN (Tokyo, Japan, Sep. 20-23, 2011)

7) 竹野幸夫、野田礼彰、石野岳志、平川勝洋: 鼻アレルギー患者における呼気中並びに鼻呼気中における on-line 法による一酸化窒素 (NO) 濃度のモニタリングの有用性について。第 29 回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (平成 23 年 2 月 10-12 日、大分)

8) 竹野幸夫、野田礼彰、福入隆史、宮里麻鈴、羽嶋正明、石野岳志、平川勝洋: 当科における副鼻腔炎手術症例の組織学的並びに臨床背景の変遷について。第 36 回日本耳鼻咽喉科学会中国地方部会連合学会 (平成 22 年 12 月 5 日、松江)

- 9) Takeo S. Symposium “Surgical treatment for patients with allergic rhinitis: therapeutic mechanisms of the different techniques and clinical experience in Japan.” The 13th Korea Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery (Seoul, Korea, Sep. 9-11, 2010)
- 10) 竹野幸夫： 第 34 回日本医用エアロゾル研究会： シンポジウム、エアロゾル療法有効性の検証 「局所炎症の制御からみた鼻副鼻腔疾患に対するエアロゾル療法の有効性」 (平成 22 年 9 月 4 日、名古屋)
- 11) 竹野幸夫： 第 111 回 日本耳鼻咽喉科学会 臨床セミナー9 「鼻閉に対するデイスার্ジェリー」 一下鼻甲介粘膜焼灼術を中心に― (平成 22 年 5 月 22 日、仙台)

[図書] (計 2 件)

- 1) 竹野幸夫： 5. Vidian 神経・後鼻神経切断術の EBM とは? A. アレルギー領域・花粉症 I. 鼻副鼻腔領域 EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療。 pp.16-19, 中外医学社、東京、2010 年。
- 2) 竹野幸夫、立川隆治、夜陣紘治： III 耳鼻科領域 2) 後鼻漏と咳。 三嶋理晃編 咳と痰の臨床。 Pp.110-118、医薬ジャーナル社、大阪、2010 年。

[その他]

ホームページ等

上気道における一酸化窒素 (NO) の機能的役割に関する研究

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/jibika/research/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

研究代表者

竹野 幸夫 (TAKENO SACHIO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：50243556

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

