

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592579

研究課題名(和文) 気道リモデリングの嗅粘膜障害への関与 好酸球性副鼻腔炎の嗅粘膜分泌異常の解明

研究課題名(英文) Participation in olfactory mucosa disorder of the airway remodeling-Elucidation of hypersecretions in the olfactory mucosa of eosinophilic sinusitis

研究代表者

春名 真一 (haruna, shinichi)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：60198934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎の嗅粘膜の組織学的所見では、好酸球浸潤、ボーマン腺の増大とともに糖蛋白分泌異常が認められ、二オイ分子の嗅粘膜接着が妨害されていることが示唆された。ステロイド薬の投与後に、好酸球浸潤とボーマン腺増勢と分泌異常が抑制され、嗅覚の改善も認められた。しかし、一部の嗅覚障害例では肥満細胞内にステロイド抵抗性のAmphiregulinの存在が認められた。呼吸粘膜に著明な好酸球性浸潤の認められた症例ではFeNOが高値を示した。FeNO高値は線毛機能障害に起こすので、嗅粘膜においても嗅線毛機能異常に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histopathological findings of olfactory mucosa in eosinophilic sinusitis showed eosinophil infiltration, growth of Bowman gland and excessive and abnormal secretions of Bowman gland. These reasons suggested that the olfactory mucosa adhesion of smell molecules were disturbed. After steroid administration, eosinophil infiltration and growth of Bowman gland were suppressed and most cases with olfactory dysfunction were improved. However, presence of steroid-resistant Amphiregulin was found in some dysosmia case in mast cells. Respiratory Nitric acid (FeNO) was found high concentrations in respiratory mucosa with remarkable infiltrative eosinophils. Therefore, olfactory cilia dysfunction and highly secretion of Bowman gland also was suggested to be relationship with FeNO.

研究分野：鼻科学

キーワード：嗅覚障害 嗅粘膜 分泌過多 好酸球

## 1. 研究開始当初の背景

現在の慢性副鼻腔炎は、従来の好中球主体の慢性化膿性副鼻腔炎は著減し、ほとんどの副鼻腔炎が好酸球浸潤の主体した好酸球性副鼻腔炎であるとされる(春名眞一.耳展.2001)。好酸球性副鼻腔炎の臨床症状で病態の早期から嗅覚障害が必発し、その病態の把握と治療は重要なポイントになっている(Haruna S. ANL,2006)。

鼻副鼻腔は呼吸粘膜上皮と嗅粘膜上皮で覆われ、呼吸上皮表面の粘液層は粘液線毛機能を円滑に作用させるために必須であり、一方、嗅粘膜上皮では、上皮を構成する支持細胞、基底細胞、嗅細胞や外界の化学物質の受容体としての細胞表面および粘膜下のボーマン腺に複合糖質が分布し、嗅覚の化学情報伝達に大いに関与していると考えられる。

我々のこれまでの研究で、好酸球性副鼻腔炎では副鼻腔粘膜同様に嗅粘膜にも多数の好酸球浸潤がみられ、活性好酸球の組織障害蛋白による呼吸粘膜の上皮細胞障害は著明だが、隣接する嗅粘膜上皮の剥奪は少ないことが観察されている。しかし、上皮下に存在するボーマン腺は著明な増殖・拡大が認められることが確認され、嗅粘膜上に過度の分泌異常が生じていることが考えられた。さらに嗅粘膜および嗅覚障害時の複合糖質の分布に注目し、これまで人嗅粘膜と呼吸粘膜上皮の細胞表面において糖蛋白分布の異なることをレクチン組織化学で証明し、さらに兔実験的副鼻腔炎モデルにて、正常嗅粘膜に比べて、炎症時に嗅覚のreceptorである嗅粘膜細胞表面でのシアル酸複合糖質の分布の変化やConcanavalin Aの発現を観察した。この結果はStephen. G. ShirleyがConcanavalin A処理後のラット嗅粘膜にelectro-olfactogramでのamp

litudeが有意に減少したという報告(Biochem. J. (1987) 245,175-184)と関連する興味深い知見であり、嗅粘膜における複合糖質分布の変化は嗅粘膜機能障害に強く関与すると考えられる。

鼻副鼻腔ではNitric Oxide(NO)が多量に産生され、内因性NOは鼻粘膜において上皮細胞、血管内皮細胞、腺組織などに分布して粘液分泌の調節作用をはたし、防御機構の中心的存在を占める粘液線毛輸送に深く関わっていると考えられている。一方、炎症時においては逆に、NOは種々の炎症性サイトカインによってもたらされるinducible NOSやconstitutive NOSを介して発現し、粘膜線毛周波数の減少や粘液の異常分泌を躍起させている。副鼻腔粘膜と類似する喘息においては、呼気中のNO濃度の測定は病態の信頼できる指標と考えられている。したがって、喘息同様にリモデリングを呈する好酸球性副鼻腔炎においても多くのNOが排泄されており(Yoshimura T, Haruna S. Allergol Int.2008)副鼻腔粘膜および嗅粘膜においての炎症病態を反映できる。

さらに、最近では好酸球性副鼻腔炎の発症にStaphylococcus aureus感染でenterotoxinがスーパー抗原となりTh2リンパ球を刺激して局所でのIgE抗体産生を増産し、多数の好酸球浸潤をおこし、気道リモデリングを助長し、同時に嗅粘膜障害にも関与していると推測されている。

また、治療面においてもステロイド薬は気道リモデリングの重要な薬剤であるが、ステロイド薬で好酸球浸潤が抑制されても、必ずしも嗅覚障害の改善は認められない。難治性喘息においても吸入ステロイドにて好酸球炎症の抑制にもかかわらず、過剰分泌が認められ、ステロイ

ド抵抗因子で分泌亢進作用を有する Amphiregulin の存在が注目されている (Okumura S, et al. J Allergy Clin Immunol 2005)。したがって副鼻腔粘膜とともに嗅粘膜においても同様のことが予想される。

## 2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎では呼吸粘膜とともに嗅粘膜においても気道リモデリングが形成され、粘稠性分泌物による繊毛機能障害をおこし、同時に呼吸粘膜と連続する嗅粘膜においても嗅粘膜上皮障害と過剰分泌病態を引き起こして臭い分子の接着・認知異常を引き起こしていると考えられる。本研究では人および動物の気道リモデリング状態で呼吸粘膜と嗅粘膜障害を対比する。そのために嗅粘膜障害時および改善時の嗅粘膜の複合糖質と分泌機能を調節する NO と Amphiregulin を *in vivo* と *in vitro* で組織生化学的に検討する。また嗅粘膜上皮を細胞培養し、単離末梢好酸球を添付し糖蛋白分布と NO 合成能を把握し、嗅粘膜の修復能力を観察する。

## 3. 研究の方法

1) 患者に本研究について十分に説明し、登録を行う。好酸球性副鼻腔炎にて嗅覚障害を呈する患者の改善時の血中および嗅粘膜と副鼻腔粘膜局所での好酸球の存在と複合糖質の変化を観察する。そのために、顕微鏡にて AB・PAS 染色、レクチン (WGA, ConA, UEA-1, DBA, SNA, MAA, PNA とニューラミダーゼ処理後の PNA) とムチンに対する抗体 (Muc1, Muc2, Muc4, Muc5ac, Muc5, Muc8) やレクチン電顕を用いて、嗅粘膜上皮の支持細胞、基底細胞、嗅細胞、細胞表面および Bowman 腺の染色像を正常嗅粘膜と対比する。またシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて蛋白分泌の増減を判定する。

2) マウスリモデリングのモデルを作製

する。

BALB/c マウスの腹腔内に ovalalbumin(OVA)4  $\mu$ g を 2 回注入する。慢性モデルを作製するために 17 日～37 日まで OVA を毎日吸入させて 40 日目に屠殺し、リモデリングモデルを確立させる (Tanaka H, Matsuda T, et al: The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res* 50:616-24, 2001)。屠殺後、呼吸粘膜と嗅粘膜上皮を採取し、顕微鏡的、電顕的にリモデリングの状態、好酸球浸潤を観察する。In Site Hybridization 法にて好酸球浸潤の程度と嗅粘膜形態と糖蛋白の染色性の変化を観察する。

3) 慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を呈する患者の嗅粘膜と改善時の嗅粘膜を採取し好酸球の存在と複合糖質の変化を観察する。そのために、顕微鏡にて AB・PAS 染色、レクチン (WGA, ConA, UEA-1, DBA, SNA, MAA, PNA とニューラミダーゼ処理後の PNA) とムチンに対する抗体 (Muc1, Muc2, Muc4, Muc5ac, Muc5, Muc8) やレクチン電顕を用いて、嗅粘膜上皮の支持細胞、基底細胞、嗅細胞、細胞表面および Bowman 腺の染色像を正常嗅粘膜と対比する。またシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて糖蛋白分泌の増減を判定する。

4) 慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を呈する患者の嗅粘膜と改善時の細菌培養検査および血中および副鼻腔粘膜局所での好酸球顆粒蛋白 (ECP, MBP) を計測する。副鼻腔粘膜局所での ECP, MBP をファルマシアの計測キットを用いて、血中同様に測定する。

5) 化学発光式 NO 測定装置 (Stevens NO analyzer Model-280i NOA) を用い、呼気 NO 濃度の測定を安静座位で同時間帯に測定する。外鼻孔をペーパーノズルで密閉し、約 10～20 秒間持続的に呼気を出させ、2 l/min で吸引する。検査は 2～3 回施行し、それらの NO 濃度曲線のピーク値の平均値を呼気 NO 濃度とする。

6) 人における嗅覚障害時、およびマウス実験的鼻副鼻腔炎モデル時の嗅粘膜

を細胞培養し、正常嗅粘膜細胞の増殖および分化能と比較する。そのために、なるべく生体内に近づける目的で、嗅粘膜上皮と繊維芽細胞や脳アストログリアの再構成による嗅粘膜の三次元培養を試みる。その特徴は嗅細胞の新生、増殖を支持する脳アストログリアと上皮細胞の分化を支持する繊維芽細胞を埋め込んだ収縮コラーゲンゲル上に嗅粘膜上皮を移植したままで培地の中に入れ、空気に触れさせながら培養する点にある。コラーゲンゲルが粘膜下のモデルとなり、繊維芽細胞や脳アストログリアと嗅粘膜上皮が上皮・間質間相互作用を作り出し、表面を空気に触れさせることで細胞の分化を促す。また、上皮細胞の分化を支持すると言われる Vitamin A 加無血清培地と血清培地を用い、両者の培地での増殖および分化能を比較観察する。培養細胞に対して種々の cytokeratin 抗体や抗 Neurofilament 抗体を用い嗅上皮であることを同定する。さらに培地に種々の濃度の単離末梢好酸球を添付し、培養細胞の増殖時に分布する糖蛋白の変化を 2) のレクチンや抗体を用いて顕微鏡、電顕やシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて観察し、2、3) の結果と比較検討する。

#### 4. 研究成果

1) 人好酸球性副鼻腔炎の嗅粘膜と呼吸粘膜との複合糖質を検討した。

呼吸粘膜上では著明な好酸球性浸潤とともに上皮細胞障害、胚細胞増勢が見られた。好酸球顆粒蛋白 (ECP, MBP) を免疫染色すると、ともにほとんどすべての好酸球に発現を認め、活性化状態であることが示された。

嗅粘膜では好酸球浸潤は少なく、基底細胞肥厚も軽度であった。嗅粘膜上での ECP, MBP の発現は少なく、強い活性化状態でないこと予想された。またボーマン腺の増勢が認められ、ConA の発現が観察された。

副鼻腔炎手術で採取した前部副鼻腔と後部

副鼻腔粘膜での IgE, NOS, レクチン, EG2 抗体を用い顕微鏡で対比すると後者の方が、IgE, 活性好酸球, NOS の発現が強かった。同時に好酸球性副鼻腔炎での嗅粘膜では EG 2, NOS, IgE の発現が同様に認められ、後部副鼻腔での好酸球性炎症の存在が示唆された。

喘息合併好酸球性副鼻腔炎患者の手術前後に FeNO の計測と呼吸粘膜と嗅粘膜組織障害を対比すると術前 FeNO の高い症例の呼吸粘膜では好酸球性炎症が強くなりリモデリングが観察された。同時に採取した嗅粘膜でも好酸球を中心とした炎症細胞浸潤が観察された。

2) マウスリモデリングのモデルを作製した。BALB/c マウスの腹腔内に ovalalbumin(OVA)4 μg を 2 回注入する。

慢性モデルを作製するために 17 日～37 日まで OVA を毎日吸入させて 40 日目に屠殺し、リモデリングモデルを作製した。鼻腔粘膜の好酸球浸潤が観察され、上皮細胞障害、杯細胞と基底膜肥厚が認められた。嗅粘膜でも呼吸粘膜ほどではないが軽度の好酸球浸潤、上皮細胞障害、基底膜肥厚が観察された。また粘液線のボーマン腺の増勢も観察され、分泌亢進が予想された。レクチン免疫染色にて ConA, SNA の発現があり、粘液の変化が示唆された。

3) マウス実験的鼻副鼻腔炎モデル時の嗅粘膜を細胞培養し、正常嗅粘膜細胞の増殖および分化能と比較した。脳アストログリアと上皮細胞の分化を支持する繊維芽細胞を埋め込んだ収縮コラーゲンゲル上に嗅粘膜上皮を移植したままで培地の中に入れ、空気に触れさせながら培養すると位相差顕微鏡で上皮の outgrowth が確認できた。次に cytokeratin 抗体染色し上皮細胞であることを確認した。また抗 Neurofilament

抗体を用いて免疫染色すると散発的に発現がみられ、嗅細胞であることが考えられた。さらに PAS、WGA ,Muc5ac にて発現があり、ボーマン腺の存在が支持された。

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 6 件)

Kuboki A, Nakayama T, Haruna S. Simple suturing of the nasal septum using the Maniceps septum stitch device. J Laryngol Otol, 査読有、28 巻、2015、1-4.

<http://dx.doi.org/10.1016>

Nakayama T, Otori N, Haruna S. Endoscopic modified medial maxillectomy for odontogenic cysts and tumours. Rhinology, 査読有、52 巻、2014、376-80.

DOI:10.4193

Nakayama T, Okushi T, Haruna S. Endoscopic single-handed septoplasty with batten graft for casudal septum deviation. ANL, 査読有、41 巻、2014、441-5.

<http://dx.doi.org/10.1016>

春名真一. 慢性副鼻腔炎における内視鏡下鼻内手術. 日耳鼻、査読無、116 巻、2013、1140-3.

春名真一. 好酸球性副鼻腔炎. 医学のあゆみ. 査読有. 249 巻、p481. 2014.

春名真一. 副鼻腔乳頭腫に対する内視鏡手術. 日耳鼻、査読無、116 巻、2013、1007-15.

〔学会発表〕(計 5 件)

春名真一、吉田拓人. 好酸球性副鼻腔炎はなぜ両側性病変を呈するのか - 呼気流の関与について -. 第 5 3 回日本鼻科学会、福井、2014、9

Haruna S. Management of (Invasive) Fungal Diseases. 32th ISIAN congress. Amsterdam. 2014、6

Haruna S. Image guided surgery. 15<sup>th</sup> 日韓耳鼻咽喉科学会、Seoul、2014、4.

Haruna S. Endoscopic Revision Sinus Surgery in Japan. 2<sup>nd</sup> Meeting of European Academy of ORL-HNS and CE ORL-HNS. Nice. 2013.6

Haruna S. Endoscopic frontal surgery. 15<sup>th</sup> ARSR. 東京、2013、8.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

春名 真一 (HARUNA shinichi)

獨協医科大学・耳鼻咽喉・頭頸部外科・教授

研究者番号：60198934

(2) 研究分担者

深美 悟 (FUKAMI satoru)

獨協医科大学・耳鼻咽喉・頭頸部外科・准教授

研究者番号：00311944

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：