

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592584

研究課題名(和文) 鼻副鼻腔炎を伴う鼻茸の発症機序と再発に關与するT細胞特にTreg細胞の新たな役割

研究課題名(英文) Analysis of novel roles of T cells especially T reg cells in the pathogenesis and recurrence of Rhinosinusitis with Nasal polyps

研究代表者

Ruby Pawankar (Pawankar, Ruby)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：00287674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：鼻粘膜に比べ、アトピー型と非アトピー型鼻茸のCD4+CD45RO+が多く、CD4+CD25+Treg細胞(FoxP3)は僅かでした。IL-13, IL-33, IgE, TSLPとperiostinは鼻茸に多かった。又TSLPと好酸球とIgE, periostinとIL-13には正の相関、IgEとTreg細胞に負の相関があった。ダニ抗原で刺激し鼻茸にIL-4, IL-5, IL-13, TSLP, periostinが増加し、T細胞にIL-4, IL-5, IL-13が増加し、LPSを加えより増加した。上皮細胞からRANTES, Eotaxin, TSLPが増加し、刺激したT細胞がB細胞からのIgE産生量が増加した。

研究成果の概要(英文)：CD4+CD45RO+ cells was significantly more and CD4+CD25+ FoxP3(Treg) cells were significantly less in nasal polyps (NP) of atopics and non-atopics than in nasal mucosa (NM) of allergic rhinitis (AR). Levels of IL-4, IL5, IL-10 and IFN-gamma were not different, but IL-13, TSLP, periostin, IL-33, filaggrin and IgE were greater in NP than NM especially atopics (filaggrin similar in both NPs). There was a good positive correlation between IgE and ECP, TSLP and IgE, TSLP and ECP, periostin and IL-13 and IL-33 in NP and a negative correlation between Treg cells and IgE. Mite stimulated NP expressed more IL-13, IL-33, TSLP and periostin. Co-stimulation with LPS upregulated it; LPS and IL-4 upregulated TSLP, Eotaxin and RANTES. Mite stimulated T cell supernatant upregulated RANTES, Eotaxin and TSLP from epithelial cells and co-culture of mite stimulated T cells with autologous B cells increased IgE. Reduced T reg cells and increased Th2 cells contribute to the progression and recurrence of NPs.

研究分野：気道アレルギー

キーワード：アトピー型鼻茸 T細胞 TSLP IgE periostin ダニ抗原 LPS

1. 研究開始当初の背景

鼻茸副鼻腔炎は一般的な上気道の慢性疾患であり、しばしば喘息や好酸球性中耳炎と合併し、患者の QOL に影響あたえる。鼻副鼻腔炎は鼻茸を伴う (CRSwNP) や鼻茸を伴わない副鼻腔炎 (CRSSNP) に分類されている。鼻茸を伴う鼻副鼻腔炎には好酸球浸潤の増加がしばしば認められる。また、好酸球性鼻茸は、アトピー型鼻茸と非アトピー型鼻茸が見られる。アトピー型鼻茸はしばしば再発率が高い。しかし、鼻副鼻腔炎は鼻茸の発症機序や再発のメカニズムは明らかではない。鼻茸を伴う鼻副鼻腔炎にはしばしば好酸球性炎症共に IgE が非常に多くみられる (Bachert, Okano M et al)。Bachert らはブドウ球菌エンテロトキシン (Staphylococcal enterotoxin :SAEs) の IgE 抗体が鼻茸中に存在し、好酸球性炎症の重症度と相関することを報告している。SAE 特異的 IgE が喘息の増悪因子でもあると報告されている。鼻茸に *Staphylococcus aureus* バイオフィームが認められ、バイオフィームと ECP や IgE、鼻茸の重症度と相関が見られたと報告されている (Foreman et al, Allergy 2011)。鼻茸組織内にも多くの T 細胞が存在することが知られている (Hamilos et al, Pawankar R et al, Peres Novos et al)。鼻茸における T 細胞は SAE の刺激により Th2 サイトカインを産生し SAE 特異的 IgE を産生誘導する事が考えられる。また、Th2 サイトカインは上皮細胞や線維芽細胞からのケモカイン (eotaxin, RANTES, TARC) 産生を増強させ好酸球や Th2 細胞を遊走させうる (Pawankar et al, Nonaka M et al, Schliemer et al)。さらに、鼻粘膜上皮細胞は抗原特異的 T 細胞の局所増殖に関わること、また鼻粘膜および気管支上皮細胞は高親和性 IgE 受容体を発現している (Takizawa R, Pawankar R, Clin Exp

Allergy 2007, Campbell A 2001 Am J Resp Mol Biol, Yamagishi S, Pawankar R)。つまり、IgE 抗体を介した免疫反応に気道上皮細胞が関与している可能性が示唆される。このような事から T 細胞と上皮細胞の相互作用が鼻茸の炎症に重要と考えられる。また、上皮細胞が産生するサイトカインである Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、は Th2 細胞の活性化と局所集積 (Allakhverdi Z, J Exp Med 2007)、そして IgE の産生に関与する (Ebner J. Allergy Clin Immunol 2007)。このような T 細胞の働きを抑制するには FoxP3 を発現する Treg 細胞が極めて重要な役割を果たす。この Treg 細胞の機能に異常を来すと、極めて重篤な自己免疫疾患・アレルギー疾患を発症する。Treg 細胞は IgE 産生の抑制や肥満細胞と好酸球の活性化を抑制する事が示唆されている。

2. 研究の目的

アトピー型鼻茸と非アトピー型鼻茸の発症機序や再発を明らかにする為

i) アトピー型鼻茸と非アトピー型鼻茸における T 細胞のフェブ: CD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+, Treg 細胞, Th17 細胞、T 細胞のフェノタイプと IgE や好酸球の関連性を検討する。Treg 細胞増加させる因子を検討する。

ii) アトピー型鼻茸と非アトピー型鼻茸における T 細胞のサイトカインプロファイル: IL-4, IL-5, IL-13, など を検討する。

iii) ブドウ球菌エンテロトキシン (SAE)、リポポリサッカライド (LPS)、ダニ抗原でそれぞれと SAE+ダニ抗原の刺激で活性化させた T 細胞から産生されたメディエーターが、上皮細胞に及ぼす影響につき検する。

iv) Treg 細胞を増加させ、IgE 産生や上皮細胞の相互作用を検討する。

3. 研究の方法

手術により採取したアトピー型と非アトピー型鼻茸組織中におけるCD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+, Treg 細胞 (FOXP3), Th17細胞、好酸球免疫組織学的に検討, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, IFN-gamma、IgE をELISAにて検討する。アトピー型と非アトピー型鼻茸患者の末梢血におけるCD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+細胞, Treg 細胞 (FOXP3), Th17細胞をフローサイトメトリ(FACS)にて検討する。CD4+, Treg 細胞とIL-4, IL-10, IFN-gammaを二重染色し、フローサイトメトリ(FACS)にて検討する。アトピー型と非アトピー型鼻茸組織中における好酸球やIgEとCD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+, Treg 細胞 (FOXP3), Th17細胞の関連性を検討する。アトピー型と非アトピー鼻茸T細胞をStaphylococcal enterotoxin A、Bで刺激して活性化したT細胞と同患者末梢血から分離したB細胞を培養し、IgE産生を検討する。再発した鼻茸における好酸球やIgEとCD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+細胞, Treg 細胞 (FOXP3), Th17細胞の関連性を検討する。アトピー型と非アトピー型鼻茸をexplant cultureし、ダニ抗原で刺激し鼻茸におけるCD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+, Treg 細胞 (FOXP3), Th17細胞を免疫組織学的に検討する。アトピー型と非アトピー型鼻茸組織をexplant cultureし、ダニ抗原で刺激し鼻茸組織中のIL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, IFN-gamma をELISAにて検討する。アトピー型と非アトピー鼻茸組織をexplant cultureし、Staphylococcal enterotoxin A、Bを加え、アトピー型と非アトピー鼻茸組織中におけるCD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+, Treg 細胞 (FOXP3), Th17細胞 を免疫組織学的に検討する。a)アトピー型と非アトピー鼻茸組織をexplant cultureし、Staphylococcal enterotoxin A、Bと

ダニ抗原で刺激し鼻茸組織中におけるCD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+, Treg 細胞 (FOXP3), Th17細胞 を免疫組織学的に検討する ; b)アトピー型と非アトピー鼻茸組織をexplant cultureしStaphylococcal enterotoxin A、Bを加え刺激し鼻茸組織中のIL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, IFN-gamma をELISAにて検討する ; c)アトピー型と非アトピー鼻茸組織をexplant cultureし、Staphylococcal enterotoxin A、Bとダニ抗原の刺激し鼻茸組織中のIL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, IFN-gamma をELISAにて検討する ; d)アトピー型と非アトピー鼻茸におけるT細胞を分離し、IFN-gamma, IL-10, TGF beta刺激し、Treg細胞をフローサイトメトリ(FACS)にて検討する。アトピー型鼻茸からT細胞をFACSにて分離し a)ダニ抗原 b)Staphylococcal enterotoxin A、B c)リポポリサッカライド(LPS)(TLRを介する) d)Staphylococcal enterotoxin A、B+ダニ抗原を加えて刺激し、CD4+, CD8+, CD45RO, CD4+CD25+, Treg 細胞 (FOXP3), Th17細胞をFACSにて検索する。アトピー鼻茸からT細胞をFACSにて分離し a)ダニ抗原 b)Staphylococcal enterotoxin A、B ; c)リポポリサッカライド(LPS) ; d)Staphylococcal enterotoxin A、B+ダニ抗原を加えて刺激し、IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, IFN-gamma をELISAにて検討する。アトピー型鼻茸からT細胞をFACSにて分離し a)ダニ抗原のみ ; b)Staphylococcal enterotoxin A、B ; c)リポポリサッカライド(LPS) ; d)Staphylococcal enterotoxin A、B+ダニ抗原 ; e) Treg細胞増加因子を加えて刺激し、活性化させたT細胞の培養上清をもちいて気道上皮細胞Cell line Cal-3, NCI-H292を刺激し、上皮細胞から産生されるRANTES、

Eotaxin, TARC, TSLP をELISAにて測定する。アトピー型鼻茸からT細胞をFACSにて分離しa)ダニ抗原のみb)Staphylococcal enterotoxin A, B ; c)Staphylococcal enterotoxin A, B+ダニ抗原 ; d)Treg 細胞増加因子を加えて刺激し、活性化させたT細胞と同患者末梢血から分離したB細胞を培養し、産生されるIgE のレベルを検討する。

4 . 研究成果

アレルギー性副鼻腔炎を伴う鼻茸（アトピー型鼻茸）と非アレルギー性副鼻腔炎を伴う（非アトピー型鼻茸）とアレルギー性鼻炎鼻粘膜の発症機序や再発を明らかにする為、手術によ鼻茸と鼻粘膜中におけるCD4+, CD45RO, Treg 細胞 (FOXP3) 好酸球、IgE, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-33, IFN- γ , TSLP, periostin, fillagrin を検討した。

鼻粘膜に比べ、アトピー型鼻茸と非アトピー型鼻茸における CD4+, CD45RO, 好酸球 が有意に多くみられた。しかし CD4+CD25+, Treg 細胞 (FOXP3) はアトピー型鼻茸と非アトピー型鼻茸には僅かでした。アトピー型と非アトピー鼻茸には IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ に差はみられなかった。一方、IL-13 と IgE はアトピー型鼻茸に多くみられた。鼻茸組織中における好酸球と IgE には正の相関がみられた。IgE と Treg 細胞 (FOXP3) の間には negative の関連性がみられた。TSLP, periostin と fillagrin はアトピー型鼻茸と非アトピー型鼻茸に増加した。しかし、アトピー型鼻茸には TSLP だけは増加した。鼻茸では TSLP と好酸球、TSLP と IgE, periostin と IL-13 の間には、正の相関があった。

アトピー型鼻茸をダニ抗原で刺激し IL-13, TSLP, periostin, IL-33 の発現を増加した。又、鼻茸をポリサッカライド(LPS)と IL-4

で刺激し TSLP, Eotaxin, RANTES, が増加した。さらにアトピー型鼻茸の T 細胞を分離しダニ抗原で刺激し、IL-4, IL-5, IL-13 の産生量が優位に多かった。又、LPS とダニ抗原で刺激し IL-4, IL-5, IL-13 の産生量が多かった。ダニ抗原で活性化した T 細胞の上清で上皮細胞を刺激し、上皮細胞から産生された RANTES, Eotaxin, TARC, TSLP は増加した。アトピー型鼻茸の T 細胞をダニ抗原で刺激し、同患者末梢血から分離した B 細胞と培養し、IgE の産生量が優位に増加した。本研究の結果より、Treg 細胞が僅かであり Th2 型の炎症が増加され鼻茸の慢性炎症と再発に関連する事考えられる。現在、鼻茸における T 細胞を分離し Staph enterotoxin A, B で刺激し、T 細胞のプロファイルと IgE 産生を検討中です。

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)

1 Suzaki H, Watanabe S, Pawankar R Rhinosinusitis and asthma-microbiome and new perspectives Curr Opin Allergy Clin Immunol、査読有、2013; 13 (1) 45-49 DOI: 10.1097/ACI.0b013e32835b34f6

2 Roongrotwattanasiri K, Pawankar R, Kimura S. Decreased Expression of FOXP3 in Nasal Polyposis. Allergy Asthma Immunol Res、査読有 2012; 4 (1): 24-30 DOI: 10.4168/aaair.2012.4.1.24.

3 Mori S, Pawankar R, Ozu C, Nonaka M Expression and Roles of MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, and TIMP-2 in Allergic Nasal Mucosa. Allergy Asthma Immunol Res 4 (4) 、査読有 2012 2314-239 DOI: 10.4168/aaair.2012.4.4.231

4 Pawankar R, Sanchez Borgez M, Bonini S et al. Burden of Disease: Rhinitis,

Conjunctivitis, Rhinosinusitis.
WAO White book on Allergy、 査読有
2012; 2: 27-33
5 Bachert C, Pawankar R, Zhang L et al.
International Consensus on Chronic
Rhinosinusitis. World Allergy Organ J.
査読有、2014;27:7(1):25-55.
DOI: 10.1186/1939-4551-7-25.
6 Pawankar R, Hayashi M, Yamanishi S, et
al. The paradigm of cytokine networks in
allergic airway inflammation. Curr Opin
Allergy Clin Immunol. 査読有
2015;15(1):41-8.
DOI: 10.1097/ACI.000000000000129.
〔学会発表〕(計 9 件)
1 Pawankar R, Roongrotwattanasiri K,
Mori S. Role of IgE, T regs and TSLP in
nasal polyps Congress of the Latin
American Society of Allergy and
Immunology (2012 年 10 月 24 日 ~ 2012 年
10 月 27 日 Cartagena, Columbia
2 Pawankar R. Mast cells and IgE in
allergic airway disease Symposium on
Experimental Rhinology of the Nose
2013年03月21日 ~ 2013年03月23日
Lueven, Belgium
3 Pawankar R. Mechanisms of upper airway
disease 2nd WAO International Scientific
Conference
2012 年 12 月 06 日 ~ 2012 年 12 月 09 日
Hyderabad, India
4 Mori S, Pawankar R, Ozu C.
Differential expression of MMP in Nasal
polyps and nasal mucosa
EAACI-WAO World Allergy Asthma Congress
Milan, Italy
2013年06月22日 ~ 2013年06月26日
5 Zhang L, Pawankar R, Watanabe S, et al
Increased expression of filaggrin and
periostin in nasal polyps

16th Asian Research Symposium in
Rhinology
2013年08月29日 ~ 2013年08月31日
6 Pawankar R
The microbiome is central for upper
airway disease EAACI Congress,
Copenhagen, Denmark
2014年06月07日 ~ 2014年06月11日
7 Pawankar R
Chronic Rhinosinusitis: Phenotypes and
endotypes
Malaysian Society of Allergy and
Immunology
2014年04月06日 ~ 2014年04月08日
8 Zhang L, Pawankar R, Watanabe S, et al
Increased expression of periostin and
IL-33 in chronic rhinosinusitis with
nasal polyps.
Collegium International Allergologicum
Congress Petersberg, Germany
2014年09月13日 ~ 2014年09月08日
9 Pawankar R
IgE and the microbiome I Chronic
rhinosinusitis
3rd WAO International Scientific
Conference
2014 年 12 月 06 日 ~ 2012 年 12 月 09 日
Rio de Janeiro, Brazil
〔図書〕(計 4 件)
1 Pawankar R. Nonaka M, Kimura S
Nasal polyposis, 査読有 2012 pp185-191.
Springer
2 Corren J, Baroody F, Pawankar R.
Allergic and Non-Allergic Rhinitis
査読有 2013; 3: 90-96 Middleton
3 Pawankar R. Hayashi M, Yamanishi S et
al.
Air pollution and Oxidative stress in
Allergic Airway diseases.
Studies on Respiratory diseases

Springer 査読有 2014; (1) 151-161
4 Pawankar R, Hashimoto S, Hayashi M,
Yamanishi S et al
Airway remodeling- Update
査読有 2015; pp 866-875
Text Book of Pulmonary and Critical Care
Medicine 2015 update

〔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
ルビー パワンカール (Ruby Pawankar)
日本医科大学 医学部 教授

研究者番号：00287674

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：