

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791811

研究課題名(和文)慢性副鼻腔炎の新規治療法開発に向けた環境要因と局所免疫応答の相互作用の解明

研究課題名(英文)Cluster analysis in phenotyping eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

浅香 大也 (ASAKA, DAIYA)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20317928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円、(間接経費) 480,000円

研究成果の概要(和文)：慢性副鼻腔炎症候群としての臨床的側面を持つ。本研究では鼻ポリープを伴った慢性副鼻腔炎手術症例を対象にprospective studyを施行し、臨床的特徴の検討と、副鼻腔局所の免疫応答の評価としてIL-5、IL-8、IL-13、IL-33、IFN- γ の蛋白濃度測定を行い、クラスター解析を行った。測定し得た症例は22例で、血中好酸球数は0.8～25.3%、組織好酸球数は400倍の視野で12～320個、血清総IgE値は25～1432IU/mlであった。細菌培養検査は22例中4例陽性であった。サイトカイン測定結果を加えたクラスター解析では有意差を認めず、今後症例数の蓄積が重要と考えた。

研究成果の概要(英文)：Chronic rhinosinusitis (CRS) is a heterogeneous disease whose pathophysiology is not fully understood. Recently, cluster analysis has been used to classify the phenotypes and subtypes of asthma and food allergy. The aim of this study was to investigate CRS phenotype using cluster analysis. A total of 22 patients were enrolled in this study. The range of peripheral blood eosinophil counts were 0.8-25.3%. Serum total IgE were 25-1432IU/ml. Mucosal tissues eosinophilia were 12-320 eosinophils/HPF. Cluster analysis that added measurement of cytokine did not indicate significant difference. So it is important to accumulation of the number of cases of patients in future.

研究分野：耳鼻咽喉科

科研費の分科・細目：鼻科学

キーワード：サイトカイン バイオフィルム クラスター解析 IL-33

1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎は症状、重症度、治療効果などが多様であり、いわゆる「症候群」としての臨床的側面を持つ。かつては感染を契機として発症する慢性化膿性副鼻腔炎が主体であった。しかし近年罹患副鼻腔粘膜の好酸球浸潤を特徴とする好酸球性副鼻腔炎が増加傾向にある。その病態については不明な点が多く、治療法に関しても統一したものが無いのが現状である。

欧米では慢性副鼻腔炎の病態をポリープの有無で識別し、ポリープを伴ったものは日本でいう好酸球性副鼻腔炎を意味する。しかし、日本では好酸球性副鼻腔炎以外にもポリープを伴った副鼻腔炎は多数存在するので欧米の副鼻腔炎と病態が必ずしも一致しない。Bachertらは鼻ポリープ中のIL-5濃度とsuperantigen特異的IgE濃度に注目して、ベルギーと中国における副鼻腔炎の病態の違いを報告している。本邦においても好酸球性副鼻腔炎診断基準の作成を目的として血中または組織好酸球数から副鼻腔炎の病態を識別する報告が見られる。しかし難治性副鼻腔炎の定義という観点から見ると決して満足のいく的中精度とはいえず、好酸球数のみでは明確に病態を区別できない。従って従来とは異なった方法での病態解明、診断基準作成が必要となる。

慢性副鼻腔炎の発症、増悪に関わる要因は環境要因と宿主の免疫応答に分類される。環境要因としては主に黄色ブドウ球菌が産生するsuperantigenとBiofilmが挙げられるが、特にBiofilmは近年注目を集めている。Biofilmは喘息と並んで慢性副鼻腔炎再発の最も強い要因であり4)、慢性副鼻腔炎患者の獲得免疫応答をsuperantigen非依存性にTh2型にシフトさせる事5)が昨年報告され、今後Biofilmが副鼻腔炎難治化に及ぼすメカニズムの解明が研究の焦点になってくる。

一方患者の局所での免疫応答においては、好酸球性副鼻腔炎患者は健常者と比較して、優位にTreg活性が抑制されTh2活性が増強し、慢性化膿性副鼻腔炎患者ではTh17活性が亢進していることが報告されている。しかしTh2型免疫応答の代表的疾患であるアレルギー性鼻炎と好酸球性副鼻腔炎は異なった病態であり、この獲得免疫応答のみでは説明がつかない。そこで注目するサイトカインとして自然型アレルギー関連サイトカインであるIL-33が挙げられる。マウスTh2細胞にIL-33存在下で抗原刺激をするとIL-5、IL-13産生が増強される一方でIL-4産生は増強しない。また、IL-33はTh2細胞の遊走因子として作用する。また、IL-33は上皮細胞などが細胞壊死して核内から放出されるdamage associated molecular

patterns (DAMP)としても知られている。よって好酸球性副鼻腔炎患者では副鼻腔粘膜上皮が壊死してIL-33が多量に放出され、そのIL-33存在下にTh2細胞が活性化してIL-5やIL-13の産生が亢進し、その結果として好酸球炎症と副鼻腔粘液貯留が起こっている可能性があるが、それを実証した報告はない。またIL-33とBiofilm、Superantigenなど環境要因との関連性についての報告はいまだない。

喘息や食物アレルギーは、慢性副鼻腔炎と同様に症状、重症度、治療薬の効果などが臨床的に多様である。近年その多様性を病因、病態生理に基づいて「phenotype」として分析するクラスター解析の報告が散見される。慢性副鼻腔炎においても臨床所見はもちろん、局所における免疫応答や細菌環境要因を考慮して多様性を評価する検討が必要と考える。

2. 研究の目的

本研究において手術に至った鼻ポリープを伴う慢性副鼻腔炎(CRSwNPs)を対象に自覚症状、臨床検査所見、ポリープ再発の有無、副鼻腔局所の獲得型、自然型アレルギー関連サイトカイン(含IL-18, IL-33)測定、Biofilm産生細菌、Biofilm, Superantigen特異的IgEの同定を行う。そしてクラスター解析を用いてCRSwNPsの多様性をphenotypeとして分類し、慢性副鼻腔炎難治化の病因を明らかにし、さらに治療効果や予後に影響を及ぼす要因を検討する。Heterogeneous inflammatory diseaseといわれる慢性副鼻腔炎を臨床的特徴のみならず免疫学的、細菌学的アプローチを加えてphenotypeに分類することは疾患の理解につながり、今後薬物、手術治療の効果や予後を考慮した新しいテーラーメイド医療の構築につながると考える。

3. 研究の方法

東京慈恵会医科大学附属病院耳鼻咽喉科で手術に至ったCRSwNPs症例を前向きに登録形で検討を行う。検討項目は臨床検査所見として自覚症状スコア、副鼻腔CTスコア(Lund and Mackay score)、鼻ポリープスコア、血中好酸球数、血清総IgE値、特異的IgE値、組織好酸球浸潤の程度、術後1年の経過観察期間におけるポリープ再発の有無を記録する。また術中篩骨洞粘膜を採取してバイオフィルムの同定、黄色ブドウ球菌や緑膿菌の有無、総IgE値とS. aureus enterotoxin特異的IgE値測定、また自然型、獲得型アレルギー関連サイトカイン測定を行う。Calinski Harabasz's pseudo-F indexにてクラスター数を決定し、非階層的クラスター解析にてCRSwNPsのphenotypeを分類する。さらに判別分析により、どの要因が

phenotype に影響するかを検討する。

自覚症状に関しては米国アレルギー学会誌の recommendation を参考に 16 項目からなる自記式アンケート表を作成してスコア化する。副鼻腔 CT 所見は国際的に広く用いられている Lund-Mackay scoring system を用いて 0 ~ 24 にスコアする。鼻ポリープの評価は米国アレルギー学会誌の recommendation に従って 0 : ポリープなし、1 : 中鼻道内に限局するポリープ、2 : 中鼻道を充満するポリープ、3 : 中鼻道を越えて伸展するポリープ、4 : 鼻腔に充満するポリープ、の 0 ~ 4 にスコア化する。また、採取した副鼻腔粘膜組織中の好酸球浸潤の評価に関してはホルマリン固定し、HE 染色した標本を 400 倍の視野で、上皮組織の最も好酸球が浸潤している部位を選んでカウントする。ポリープ再発の有無に関しては、術後 1 年間の経過観察期間で、副鼻腔粘膜にポリープ再発の有無を内視鏡下に評価する。

副鼻腔粘膜のサイトカイン発現解析に関しては、粘膜組織を homogenizer にて on ice で homogenize して凍結保存し、Th1 サイトカイン (IFN-g), Th2 サイトカイン (IL-5, IL-13) 自然型アレルギー関連サイトカイン (IL-1b, IL-18, IL-33)、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) の蛋白濃度を ELISA 法にて検出し、比較検討する。

バイオフィームに関しては副鼻腔粘膜を走査型電子顕微鏡 (SEM) と透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察し Biofilm の同定を行う。さらに Live/Dead BacLight Kit (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR) にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて Biofilm の同定を行う。

4. 研究成果

手術に至ったポリープを伴う慢性副鼻腔炎患者のなかで、術後 1 年の経過観察でき、かつ副鼻腔粘膜のサイトカイン測定とバイオフィーム測定まで施行できた症例は 22 例であった。その臨床的特徴は、血中好酸球数は 0.8 ~ 25.3%、組織好酸球数は 400 倍の視野で 12 ~ 320 個、血清総 IgE 値は 25 ~ 1432 IU/ml であった。細菌培養検査は 22 例中 4 例陽性であった。術後 1 年の経過観察期間で内視鏡下にポリープの再発を認めた症例は 6 例であった。

血中、組織中好酸球数の高い慢性副鼻腔炎症例においては IL-6、IL-8、IL-33 が高発現しており、感染性の副鼻腔炎では IL-6、IL-8、IL-18 が高発現していた。Th1 サイトカインの IFN- と Th2 サイトカインの IL-5、IL-13 に関してはサンプルにより検出率にばらつきが見られた。免疫抑制性サイトカインである IL-10 は検出できなかった。

共焦点レーザー顕微鏡を用いたバイオフィ

ィームの同定は好酸球性副鼻腔炎症例においては検出できなかった。

また、サイトカイン測定結果を加えたクラスタ解析では有意差を認めず、今後症例数の蓄積が重要と考えた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] なし

[学会発表] 2 件

内視鏡下鼻内手術における中鼻甲介基板および前篩骨動脈同定の手法について
日本耳鼻咽喉科学会 2013 年 4 月

Frontal recess における前篩骨神経管の走行と Suprabullar cell の新規分類の試み
日本鼻科学会 2012 年 9 月

[図書] なし

[産業財産権]

出願状況 なし

所得状況 なし

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅香 大也 (ASAKA, daiya)
東京慈恵会医科大学医学部 講師
研究者番号 20317928

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし