

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462660

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎の病態形成における肥満細胞の役割に関する研究

研究課題名(英文)Role of mast cell in the development of eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

高林 哲司 (Takabayashi, Tetsuji)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70397272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎の病態形成における肥満細胞の役割に関する検討を行った。本疾患において鼻粘膜上皮に肥満細胞の浸潤が増加し、それらのプロテアーゼの発現パターンがこれまでの分類に当てはまらないユニークな型である事を明らかにした。さらにこれらの変化は気道上皮が産生するサイトカイン刺激によって同様の変化が生じることを培養肥満細胞を用いて証明することができた。特にIL-33の刺激が肥満細胞におけるChymaseの発現量を著明に減少させることは本疾患における粘膜の線維化の誘導障害に大きく関与している可能性が高く、本疾患の病態形成に深く関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the role of mast cell in the development of eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS). We reported that the number of mast cell infiltrated in epithelium of ECRS were significantly increased compared to control tissue. Furthermore, expression pattern of mast cell intrinsic proteases were different from previously reported type. This changes were confirmed by using primary cultured mast cell stimulated by cytokines from airway epithelial cell. We concluded that this type of mast cells were involved in the development of the ECRS pathogenesis.

研究分野：上気道免疫

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 肥満細胞 好酸球 Tryptase Chymase 線維化 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

急激な環境の変化に伴うアレルギー性疾患の増加はわが国のみならず世界中で社会問題となり今や国や分野を超えたグローバルな研究が必要とされている。本来寄生虫感染に対する防御機構であるはずのTh2炎症が何らかの理由で蜂起されることがアレルギー疾患の本体であるが、最近ではTh17, Tregなどの関与も報告されている。耳鼻咽喉科領域においては花粉症に代表されるアレルギー性鼻炎、著しい好酸球の組織の浸潤が認められる好酸球性副鼻腔炎が代表的なTh2炎症性疾患である。慢性副鼻腔炎や本疾患にしばしば合併が見られる鼻茸はかなり以前から知られた疾患であり、保存的、または外科的な治療によってコントロールが比較的良好な疾患であると認識されていた。しかし近年鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎の中に著しい好酸球の浸潤を認め、ステロイドを含めた保存的な治療に抵抗性を示し、外科的な治療を行っても再発率が高い症例があることが知られるようになった。また本疾患は鼻閉、嗅覚障害も一般の慢性副鼻腔炎に比べて高度な事が多いといわれている。10数年前までは慢性副鼻腔炎の数%とそれ程頻繁に見かける疾患ではなかったが、最近の報告ではわが国の慢性副鼻腔炎患者における好酸球性副鼻腔炎の割合は30%を超えており、日常の診療でもよく見られる疾患になった。欧米では80%以上が本疾患であり、日本でもその割合がますます増えていく事が予想される。

肥満細胞は古くからアレルギー疾患に関与する事が知られている。肥満細胞表面に結合したIgEに特異的な抗原が結合し架橋する事によって、あらかじめ細胞内で蓄積されたヒスタミンをはじめとした、ケミカルメディエーターが放出され、アレルギーの即時型反応を起こす。しかし近年、肥満細胞は脱顆粒、または脱顆粒しなくても各種刺激によってde novo経路で作られたサイトカイン、ケモカインがアレルギーの遅発相反応、自然免疫反応に関与する事が分かってきている。実際肥満細胞のノックアウトマウスを用いた喘息モデルでは、抗原感作、抗原刺激によるTh2炎症が起きない事が報告されており、肥満細胞がTh2炎症において重要な役割を果たしている事に疑いは無い。肥満細胞の研究を行うにあたりcell lineやマウスの骨髓幹細胞由来の細胞が用いられる。しかしcell lineの多くは肥満細胞の働きを有していなかったり、マウスの肥満細胞とヒトの肥満細胞で含有するプロテアーゼの違いがあることや、刺激に対する反応性も異なる事からこれらを用いて行った検討の結果が純粋にヒトの病態を説明できるものではない。更に肥満細胞には発現するプロテアーゼの違いによって粘膜型と組織型に分けられ、プロテアーゼの発現だけでなく、反応性も異なっている。

我々は、米国における好酸球性副鼻腔炎の鼻茸においてその上皮と腺組織で肥満細胞

数が著明に増加し、さらに上皮における肥満細胞は tryptase(+), CPA3(+), Chymase (-) のこれまでの分類に当てはまらない型であり、腺組織の肥満細胞は3つのプロテアーゼ陽性である組織型を示す事を報告した (Takabayashi et al, 2012. J Allergy Clin Immunol)。近年同じTh2炎症性疾患である好酸球性食道炎、アレルギー性喘息患者の上皮においても同様の表現系を示す肥満細胞の集積が報告され、このタイプの肥満細胞はTh2炎症の上皮に特異的なものであり可能性がある。

近年気道上皮はバリア機能だけでなく様々な刺激に反応して積極的に炎症に関与していることが報告されているが気道上皮に集積した肥満細胞は上皮細胞と互いに刺激し合いアレルギー性炎症の病態に関与しているものと考えられる。ヒト肥満細胞を用いた実験で好酸球性副鼻腔炎の粘膜上皮に特異的に発現する表現系の肥満細胞を再現する事ができれば、これまで漠然と行われてきた cell line、マウス肥満細胞を用いた実験系よりも格段に詳細で正確な検討が可能である。

2. 研究の目的

難治性である好酸球性副鼻腔炎の病態形成における肥満細胞の役割について、ヒト末梢血幹細胞から肥満細胞を分化させ、Th2炎症性疾患上皮内に集積し特異的なプロテアーゼ発現 (tryptase(+), CPA3(+), Chymase (-)) を示す肥満細胞を作成し検討を行う事によってTh2炎症性疾患の新しい制御機構を探索する。

3. 研究の方法

本邦の好酸球性副鼻腔炎における肥満細胞の分布およびプロテアーゼ発現によるタイプを検討する

正常ヒト末梢血から分離した血液幹細胞をヒト肥満細胞に分化させる。肥満細胞におけるプロテアーゼの発現に変化をきたすサイトカインを用い、蛋白レベルでのプロテアーゼ発現の変化を確認するとともに他のサイトカインや培養条件を検討し効率よくこのタイプの肥満細胞を樹立させる系を確立する。この肥満細胞と気道上皮細胞とのクロストークが好酸球性副鼻腔炎の病態に与える影響について検討を行う。

(1) 本邦における好酸球性副鼻腔炎の鼻茸における肥満細胞の分布、およびプロテアーゼ発現のパターンを手術で採取した検体を用いて免疫組織学的に検討する。

(2) 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮において見られる特異的な肥満細胞の培養系を確立する。

ボランティア正常ヒト末梢血を採取し血液幹細胞 CD34+ cell を分離する。IL-6, stem

cell factor (SCF) を含む培養液で 12 週間以上培養しヒト肥満細胞に分化させる。この細胞をあるサイトカインで刺激し、蛋白レベルでもっとも効率よく Tryptase(++), CPA3(+), Chymase (-)タイプの肥満細胞に分化させる条件、または他のサイトカインとの共刺激による影響を検討し、好酸球性副鼻腔炎や他の Th2 炎症疾患の上皮に集積する特異的な肥満細胞を作成する。線組織に集積が認められた肥満細胞は Tryptase(+), CPA3(+), Chymase (+)でいわゆる組織型肥満細胞の表現系でありこれは通常のヒト培養肥満細胞の条件下で培養したものを実験に使用する。

(3) 気道上皮細胞と肥満細胞とのクロストークが好酸球性副鼻腔炎の病態に及ぼす影響の検討。近年気道上皮はバリア機能だけではなく様々な刺激に反応して積極的に炎症に関与していることが分かってきた。肥満細胞を欠損させたマウスは Th2 炎症が誘導されないことから、気道上皮に集積した肥満細胞は上皮細胞と互いに刺激し合い Th2 炎症の病態形成に関与しているものと考えられる。

1) で作成したヒト培養肥満細胞を用いて検討を行う。気道上皮から産生され Th2 炎症を誘導する IL-33, IL-25, TSLP+IL-1beta で培養肥満細胞を刺激して Th2 炎症上皮に特異的な肥満細胞と通常の組織型肥満細胞の間で反応に差があるかどうかを real time PCR, ELISA、immunocytochemistry, flow cytometer の手法を用いて検討する。肥満細胞が気道上皮に与える影響を検討するために脱顆粒を起こさせた肥満細胞、toll like receptor のリガンド、S. aureus のエンテロトキシンの刺激を加えた肥満細胞の上清で好酸球性副鼻腔炎患者から採取した初代ヒト鼻粘膜上皮培養細胞または正常ヒト鼻粘膜上皮培養細胞を刺激しその反応を同様の手法を用いて検討を行う。気道上皮と肥満細胞が直接接することで起こる反応を観察するために両細胞の共培養実験も行う。また鼻粘膜上皮に発現が認められ、Th2 炎症との関連が報告されている Proteinase-activated receptor (PAR)2 は tryptase によって刺激されることが知られているが、サイトカイン刺激でヒト培養肥満細胞において tryptase の mRNA level が増加していることからこのシグナルも好酸球性副鼻腔炎の病態に関与していると思われる。手術採取サンプルを用いて本疾患の上皮における PAR2 の発現を real time PCR, ELISA, immunocytochemistry を用いて検討し、ヒト鼻粘膜上皮培養細胞においてその発現の制御機構を検討する。

4. 研究成果

(1) 当施設における好酸球性副鼻腔炎患者の摘出標本作製し免疫組織化学を行った。その結果本邦における好酸球性副鼻腔炎鼻茸上皮において肥満細胞の浸潤が多数認められそのフェノタイプは Tryptase(+),

Chymase(-), CPA3(+)の通常みられるいわゆる粘膜型、または組織型の肥満細胞とは異なるユニークなタイプであることが分かった。Real time PCR の結果からも同様の現象を確認し、特に Tryptase はその発現量が増加していた。これらの結果から好酸球性副鼻腔炎の病態形成に肥満細胞が果たす役割を以下のように推察した。

Tryptase は Th2 炎症を誘導する事が知られておりこのプロテアーゼが増加することが鼻粘膜における Th2 環境の形成に深く関与している可能性がある。また Chymase はアルブミンやサイトカインを分解し組織の炎症を収束に向かわせる働きがあり創傷治癒過程の後半に非常に重要な分子である事が知られている。好酸球性副鼻腔炎の粘膜下には炎症によって末梢血管から漏出したアルブミンの蓄積が多いことを我々は証明しており Chymase 発現の欠如はアルブミン分解低下による鼻粘膜における組織の浮腫の遷延化および炎症性サイトカインの分解抑制による炎症の増悪に関与していると考えられた。

(2) ヒト末梢血幹細胞を CD34 ビーズを用い MACS で分離しサイトカインで刺激を行い肥満細胞に分化させ実験を行った。好酸球性副鼻腔炎の鼻粘膜上皮の発現する TSLP, IL-33, IL-25 は本疾患の病態の形成に深く関与することが報告されている。今回の検討で我々は肥満細胞が IL-33 の刺激によって Tryptase(+), Chymase(-), CPA3(+)のフェノタイプに変化することを real time PCR, 免疫染色、フローサイトメトリーを用いて明らかにした。さらに IL-33 で刺激を加えた肥満細胞は接着のが亢進することを示唆する結果も得た。TSLP と肥満細胞のクロストークが Th2 炎症形成に重要であることが報告されているが今回は TSLP 刺激によって肥満細胞のフェノタイプの変化は観察されなかった。これらの結果から、鼻粘膜上皮に浸潤した肥満細胞は IL-33 の刺激によって活性化を受け、そのフェノタイプを変化させることで好酸球性副鼻腔炎の病態の形成に関与していることが予想された。

また腺組織にも肥満細胞の浸潤が増加しておりそれらのプロテアーゼの発現パターンは Tryptase(+), Chymase(+), CPA3(+)の粘膜型肥満細胞の表現型である事が分かった。粘稠な粘液の産生も好酸球性副鼻腔炎の主な特徴の一つであり病理組織学的には腺組織の拡大がみられる。線細胞に浸潤した肥満細胞が粘液の粘稠性に影響を与える可能性が示唆されるが今回の検討ではそのメカニズムを解明することはできなかった。今後は培養線細胞を用いた実験と新たに立ち上げて研究を継続する予定である。

(3) IL-33 の刺激を受けた肥満細胞がプロテアーゼの発現パターン以外にどのように好酸球性副鼻腔炎の病態形成に関与するの

かを検討した。

我々はこれまでの検討において好酸球性副鼻腔炎の鼻粘膜において線溶系に重要な働きをしている tissue plasminogen activator (t-PA) の発現が有意に減少しておりこれによってフィブリン網の分解が抑制され浮腫が遷延化することが本疾患の鼻茸の難治化に関与していることを報告した。つまり線溶系の抑制は本疾患において非常に重要なキーとなることから肥満細胞における plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の発現について (2) と同様にヒト末梢血幹細胞から分化させた肥満細胞を用いて検討を行った。その結果 IL-33 の刺激によって PAI-1 の発現量は著明に増加することを real time PCR によって明らかにした。この結果は上皮に浸潤した肥満細胞が IL-33 の刺激を受けることによって PAI-1 の発現を亢進させ線溶系の抑制による鼻粘膜の浮腫の形成に関与することが示唆された。Th2 サイトカインが鼻粘膜上皮からの t-PA 産生を抑制することとあわせて上皮の肥満細胞が好酸球性副鼻腔炎の鼻粘膜における線溶系の抑制に関与すると思われる。

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 13 件)

Imoto Y, Takabayashi T, Sakashita M, Tokunaga T, Ninomiya T, Ito Y, Narita N, Yamada T, Fujieda S: Peripheral basophil reactivity, CD203c expression by Cryj1 stimulation, is useful for diagnosing seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen. *Immun Inflamm Dis.* 2015;3(3):300-8. 2015. 査読有

Ito Y, Narita N, Nomi N, Sugimoto C, Takabayashi T, Yamada T, Karaya K, Matsumoto H, Fujieda S: Suppression of Poly(rC)-Binding Protein 4 (PCBP4) reduced cisplatin resistance in human maxillary cancer cells. *Sci Rep.* 2015 21;5:12360. 2015. 査読有

Stevens WW, Ocampo CJ, Berdnikovs S, Sakashita M, Mahdavinia M, Suh L, Takabayashi T, Norton JE, Hulse KE, Conley DB, Chandra RK, Tan BK, Peters AT, Grammer LC 3rd, Kato A, Harris KE, Carter RG, Fujieda S, Kern RC, Schleimer RP: Cytokines in Chronic Rhinosinusitis. Role in Eosinophilia and Aspirin-exacerbated Respiratory Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 15;192(6):682-94. 2015. 査読有

Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, Asaka D, Takeno S, Ikeda H, Nakayama T,

Seki N, Ito S, Murata J, Sakuma Y, Yoshida N, Terada T, Morikura I, Sakaida H, Kondo K, Teraguchi K, Okano M, Otori N, Yoshikawa M, Hirakawa K, Haruna S, Himi T, Ikeda K, Ishitoya J, Iino Y, Kawata R, Kawachi H, Kobayashi M, Yamasoba T, Miwa T, Urashima M, Tamari M, Noguchi E, Ninomiya T, Imoto Y, Morikawa T, Tomita K, Takabayashi T, Fujieda S: Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy.* 2015;70(8):995-1003. 2015. 査読有

Tokunaga T, Ninomiya T, Osawa Y, Imoto Y, Ito Y, Takabayashi T, Narita N, Kijima A, Murota H, Katayama I, Fujieda S: Factors associated with the development and remission of allergic diseases in an epidemiological survey of high school students in Japan. *Am J Rhinol Allergy.* 2015;29(2):94-9. 2015. 査読有

Fujieda S, Sakashita M, Tokunaga T, Okano M, Haruna T, Yoshikawa M, Otori N, Asaka D, Haruna S, Nakayama T, Ishitoya J, Sakuma Y, Hirakawa K, Takeno S, Himi T, Seki N, Iino Y, Yoshida N, Kobayashi M, Sakaida H, Kondo K, Yamasoba T, Miwa T, Yamada K, Kawata R, Terada T, Kawachi H, Morikura I, Ikeda K, Murata J, Ikeda H, Noguchi E, Tamari M, Hirota T, Imoto Y, Takabayashi T, Tomita K, Ninomiya T, Morikawa T, Urashima M: Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Alererugy.* 2015;64(1)38-45. 2015. 査読有

Ishii-Mizuno Y, Umeki Y, Takahashi Y, Kato Y, Takabayashi T, Fujieda S, Takakura Y, Nishikawa M.: Nasal delivery of Japanese cedar pollen Cryj1 by using self-gelling immunostimulatory DNA for effective induction of immune responses in mice. *J Control Release.* 2015;28;200:52-9. 2015. 査読有

Kim DY, Cho SH, Takabayashi T, Schleimer RP.: Chronic Rhinosinusitis and the Coagulation System. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015;7(5):421-30. 2015. 査読有

Cho SH, Lee SH, Kato A, Takabayashi T, Kulka M, Shin SC, Schleimer RP: Cross-talk between human mast cells and bronchial epithelial cells in plasminogen activator inhibitor-1 production via transforming growth factor-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;52(1):88-95. 2015. 査読有

Ogi K, Takabayashi T, Sakashita M,

Susuki D, Yamada T, Manabe Y, Fujieda S. : Effect of Asian sand dust on Japanese cedar pollinosis. *Auris Nasus Larynx*. 2014;41(6):518-22. 2014. 査読有

Tokunaga T, Ninomiya T, Kato Y, Ito Y, Takabayashi T, Tokuriki M, Sunaga H, Fujieda S. : Long-term compliance with nasal continuous positive airway pressure therapy for sleep apnea syndrome in an otorhinolaryngological office. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(8):2267-73. 2013. 査読有

Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP. : Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):584-592.e4. 2013. 査読有

Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Cho SH, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP. : Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(1):49-57. 2013. 査読有

[学会発表](計 11 件)

発表題名: 凝固系制御異常による好酸球性副鼻腔炎の病態形成メカニズムに関する検討、発表者: 高林哲司、鈴木 弟、成田憲彦、藤枝重治
学会名: 第 54 回 日本鼻科学会総会・学術講演会、発表年月: 2015.10.2

発表題名: 好酸球性副鼻腔炎の病態形成における好酸球と肥満細胞の相互作用に関する検討、発表者: 高林哲司
学会名: 第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、発表年月: 2015.2.26

発表題名: The binding of plasminogen activator-1 and tissue plasminogen activator promotes less fibrosis and excessive fibrin deposition in nasal polyp tissue. 発表者; Tetsuji Takabayashi,
学会名: 7th International symposium on recent advances in rhinosinusitis and nasal polyposis、発表年月: 2014.10

発表題名: 好酸球性副鼻腔炎の病態形成における分子生物学的検討、発表者: 高林哲司
学会名: 第 53 回日本鼻科学会総会・学術講

演会、発表年月: 2014.9.25

発表題名: Excessive fibrin deposition in patents with CRSwNP
発表者: Tetsuji Takabayashi
学会名: 25th congress of the European Rhinology Society, 発表年月: 2014.6.26

発表題名: 好酸球性副鼻腔炎の病態における肥満細胞と気道上皮の相互作用について、発表者: 高林哲司、学会名: 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、発表年月: 2014.5.16

発表題名: 肥満細胞の多様性と好酸球性副鼻腔炎に関する検討、発表者: 高林哲司、
学会名: 第 63 回日本アレルギー学会秋季臨床大会、発表年月: 2013.11

発表題名: 好酸球性副鼻腔炎の病態形成メカニズムにおける線溶系制御の検討、発表者: 高林哲司、学会名: 第 63 回日本アレルギー学会秋季臨床大会、発表年月: 2013.11

発表題名: 線溶系制御異常による慢性副鼻腔炎の病態形成メカニズムに関する検討、
発表者: 高林哲司、学会名: 第 52 回日本鼻科学会学術講演会、発表年月: 2013.9

発表題名: Excessive fibrin deposition caused by a fibrinolytic disorder associated with reduction of tissue plasminogen activator expression in nasal polyps、発表者: Tetsuji Takabayashi
学会名: The 16th Asian Research Symposium in Rhinology、発表年月 2013.5

発表題名: 好酸球性副鼻腔炎の病態形成における肥満細胞の役割、発表者: 高林哲司、
学会名: 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会、発表年月: 2013.5

[図書](計 2 件)

著者名: 高林哲司
著書名: Monthly Book ENTONI
出版社: 全日本病院出版会
種別: 専門著書
版次、発行年月: 0170, 2014 年 8 月
国内外区分、記述言語: 日本語
著書形態: 単著
キーワード: 好酸球性副鼻腔炎、鼻茸、線溶系

著者名: 藤枝重治、高林哲司
著書名: 医学のあゆみ
出版社: 医歯薬出版株式会社
種別: 専門著書
版次、発行年月: Vol.207、2013 年 12 月

国内外区分：記述言語：日本語
著書形態：共著
キーワード：花粉症、気道上皮、IL-33

〔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：
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

高林 哲司 (TAKABAYASHI TETSUJI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70397272

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし