

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462588

研究課題名(和文) 好酸球性副鼻腔炎における難治化因子の解明により下気道疾患の病因を探る

研究課題名(英文) We investigate an etiology of the lower respiratory tract disease by intractable factor in eosinophilic chronic rhinosinusitis.

研究代表者

和田 弘太 (WADA, Kota)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20307482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鉤状突起から副鼻腔粘膜由来上皮細胞を、鼻ポリープから線維芽細胞を培養し検討を行う。副鼻腔炎の診断で内視鏡下鼻副鼻腔手術を施行し、非好酸球性副鼻腔炎、好酸球性副鼻腔炎(喘息無し)、好酸球性副鼻腔炎(喘息あり)を用いて採取し検討を行った。ウイルス感染の疑似となるTLR3のリガンドであるPoly I;Cを用いて刺激を行った。IL-33は検知されず、TSLPにおいて好酸球性副鼻腔炎に高い傾向があるものの有意差は得られなかった。今後は免疫染色、mRNAの検討も行う予定である。特に、IL-33は細胞内に貯留しているものと考えられるため、免疫染色は重要と考えている。更なる結果が得られるように努力したい。

研究成果の概要(英文)：We stimulated it using Poly I; C which was a ligand of TLR3 which became false of the viral infection. IL-33 was not detected, and there is no significant difference in TSLP. However, TSLP is tended to high in ECRS group. Immunostaining, the examination of mRNA are going to be carried out in future, too. Particularly, we want to make an effort because it is thought that IL-33 accumulates in cells so that we think that the immunostaining is important, and further results are obtained.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 上皮細胞 線維芽細胞 IL-33 TSLP ウイルス感染

## 1. 研究開始当初の背景

副鼻腔炎の原因としては、鼻中隔彎曲症や副鼻腔自然口 (Osteomeatal complex) の閉塞など、解剖学的な内因的要因と、バイオフィームや骨炎といった難治性感染、黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原、好酸球性炎症を誘発・維持する真菌のコロニー形成などの外因的要因が挙げられる。気管支喘息合併副鼻腔炎患者やアスピリン喘息合併副鼻腔炎患者は明らかな解剖学的な異常や外的な要因は認めないにも関わらず、内服治療や手術療法に抵抗を示す。このような症例は、日本では好酸球性副鼻腔炎という概念として一般化され、日本耳鼻咽喉科学会、日本アレルギー学会でも認められている。しかし、欧米での副鼻腔炎の概念は、European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps (EPOS) で示されるように、Chronic rhinosinusitis (CRS) with nasal polyp (NP) と CRS without NP とポリープの有無で区別され、患者がもつアトピー素因などのバックグラウンドは無視されてしまう。好酸球性副鼻腔炎は、日本で初めて概念として報告され、臨床的には確固とした概念として成立しているが、欧米において認識されない理由は、副鼻腔炎は成因が複雑で、様々な病態に分けて検討することが困難であるからと思われる。

上気道、下気道ともに気道の炎症には様々な細胞が関係しており病因の解明を複雑にしている。気道上皮細胞、線維芽細胞などの上皮と間質の細胞、そして上皮-上皮下に浸潤している好酸球、好中球、リンパ球、NKT細胞、マクロファージ、肥満細胞など様々な細胞が複雑に関与しており、最近では Innate lymphoid cell なども重要な役割を演じているとされる。気道上皮細胞は、呼吸によって外界と初めて接し、特に鼻副鼻腔粘膜上皮はファーストバリアとして重要である。また、バリアとしての機能だけでなく、外界からの刺激に反応し、多様な細胞応答を引き起こす。外的因子によって傷害を受けた気道上皮細胞は、粘膜下に存在する線維芽細胞や炎症細胞を活性化させる。私が Research fellow として在籍した、Mayo Clinic の Allergic disease research laboratory からの研究でも、Allergen からの Protease やウイルス感染は上皮細胞を刺激し、IL-6, IL-8, GM-CSF さらには TSLP や IL-33 を分泌することが明らかにされている<sup>1,2)</sup>。最近では上皮細胞や線維芽細胞から分泌される IL-25, IL-33, TSLP が重要である。IL-33 は上皮細胞や血管内皮細胞より産生され、肥満細胞、好酸球、マクロファージ、樹状細胞を標的として ST2/IL-1RAcP 受容体と結合して、自然型アレルギー炎症を引き起こす。Mayo Clinic からも、IL-33 はヒト好酸球が ST2 分子を発現し、IL-33 が好酸球の生存率を上昇させ、superoxide 誘導能、好酸球の脱顆粒を引き起こすことを報告している。IL-33 は PAMPs

(pathogen associated molecular patterns) としてだけでなく、DAMPs (damage associated molecular patterns)、“Alarmin” として働き、アレルギー疾患の発症と増悪に関与している。また、IL-33 は正常粘膜内でも恒常的に産生されている。TSLP も主として上皮細胞から産生され、TSLPR を持つ樹状細胞に作用すると炎症性 Th-2 型 T 細胞分化を誘導し、アレルギー性疾患で発現が増強する。IL-25 も近年、Th2 細胞が産生する IL-17 ファミリーとして同定された。上皮細胞や好酸球、肥満細胞も IL-25 を産生することが分かっている。IL-25 は IL17RB を受容体とし、アレルギー炎症の維持と増強に関与しているとされる。このように上皮は免疫機構において、重要なバリアの役割を担い、上皮-上皮下の細胞-炎症細胞の関係を調べることは病因を調べる上で、重要と考える。これらの IL-33, TSLP, IL-25 は Th2 細胞を介することなく、直接に好酸球、好塩基球、肥満細胞を刺激してアレルギー炎症を惹起することも明らかになっている。

我々は、これまで真菌、特に *Alternaria* の炎症やアレルギーに対する役割を研究してきた。*Alternaria* は気管支喘息の増悪因子として重要である。*Alternaria* は好酸球を脱顆粒させ、上皮細胞から IL-8, GM-CSF を、線維芽細胞から IL-6 を産生させる<sup>3)</sup>。樹状細胞には Th2 タイプの反応を誘発し、TLR3 を介してウイルス感染防御機能を減弱させるなど、免疫機能に対する影響が明らかにされている。また、積極的に、樹状細胞、線維芽細胞のウイルス感染に対する反応を、IP-10 をアウトプットに検討してきた<sup>4)</sup>。

次にこれらの反応を誘発する因子は何なのであろうか？細菌、ウイルス、真菌などの感染、Allergen が持つ protease, ATP などを含めた PAMPs/DAMPs などが挙げられる。私もウイルス感染がトリガーになると仮説を立てている。特に、好酸球性副鼻腔炎も気管支喘息もいわゆる感冒を契機に症状の悪化を認める。ウイルス感染にひき続く細菌感染がさらなる増悪を来すものと想像している。

## 2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎は 2015 年に厚生労働省より難病に指定された。好酸球性副鼻腔炎の臨床的な所見が明らかにされたが、その発生学的な要因・病因、そして難治化の因子は解明できていない。好酸球性副鼻腔炎は、気管支喘息やアスピリン喘息など好酸球性の炎症疾患を有する患者が多い。気管支喘息やアスピリン喘息も同様に、治療は確立されつつあるが、根本的な病因の解明や発症の要因は明らかになっていない。そこで、我々は副鼻腔粘膜、鼻ポリープを用いて、これら難治性副鼻腔炎の原因を追究し、最終的には気管支喘息、アスピリン喘息の病因に迫りたいと考えている。また、難治化の因子の初期スイッチとしてウイルス感染を予測している。好酸球

性副鼻腔炎の悪化時の鼻汁中、ウイルスを同定することで、難治化の因子まで迫りたいと考えている。

### 3. 研究の方法

好酸球性副鼻腔炎の発症因子と増悪因子の解明を目指したい。

我々の施設では年間 300 件ほどの副鼻腔手術症例 (ESS) がある。これらの副鼻腔炎患者を 健康人 (眼窩壁骨折患者など) 喘息非合併患者 アトピー型気管支喘息合併患者 非アトピー型気管支喘息合併患者 アスピリン喘息合併患者 の 5 群に分け検討を行うが、全て好酸球性副鼻腔炎の診断ガイドライン (JESREC Study) の 4 つの重症度分類にも同時に分ける。手術より鉤状突起、鼻ポリープを採取し、それより上皮細胞、線維芽細胞を培養し検討を行う。この細胞をウイルス疑似である TLR3 ligand である Poly I:C にての刺激に加え、ATCC から RS ウイルスにて刺激を行う。RS ウイルスは乳幼児では重篤かしやすい。通常成人であれば感冒症状を来します。しかし、好酸球性副鼻腔炎患者や気管支喘息患者では悪化や重症化する。これらの群間で TSLP、IL-25 の産生を観察する。

また、増悪因子の検討として東邦大学微生物・感染症学講座の協力のもとで、副鼻腔炎悪化時、ないしは ESS 後の増悪時の鼻腔洗浄液 (悪化から 2 日以内) を用いて、呼吸器感染症の原因病原体に対する multiplex PCR 法を用いた遺伝子検査を行い、増悪因子なりうる感染症を検討する。またこの洗浄液中の IL-33 を測定する。これらから、発症因子と増悪因子が同定できる可能性がある。

好酸球性副鼻腔炎は日本から発信された概念であるが、まだその病因は明らかにされていない。本研究により、難治性の副鼻腔炎である好酸球性副鼻腔炎の成因が追求できると考えられる。喘息患者からは容易に組織を採取できないが、副鼻腔からは手術において容易に組織を得られるため、この研究は、好酸球性副鼻腔炎の検討だけではなく、副鼻腔サンプルを利用した喘息の検討になる。そのため、そのまま難治性の喘息の病因にも迫れると考えている。特に、気管支喘息はウイルス感染を起こすと致死的は発作を来すことがある。これらの研究の成功により好酸球性炎症性疾患研究に大きな進歩をもたらすものと期待している。特に、上皮細胞と上皮下線維芽細胞との相互作用の検討はその間に存在するしないしは浸潤している好酸球、好中球、リンパ球、NKT 細胞、マクロファージ、肥満細胞との関係も理解できるようになると考えている。

- 1) Kouzaki H, Kita H. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol.* 2011;186:4375-87.

- 2) Kouzaki H, Kita H. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol.* 2009;183:1427-34.
- 3) Matsuwaki Y, Wada K, Kita H. *Alternaria* fungus induces the production of GM-CSF, IL-6 and IL-8 and Ca signaling in human airway epithelium through PAR-2. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158:19-29.
- 4) Wada K, Matsuwaki Y, Moriyama H, Kita H. *Alternaria* inhibits double-stranded RNA-induced cytokine production through TLR-3. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161:75-83.

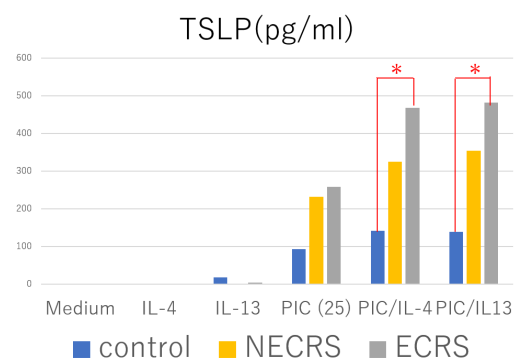
東邦大学倫理委員会、病原体等安全管理委員会の承認のもと、発症因子の解明のために、手術から得られた組織から上皮細胞、線維芽細胞を培養し、dsRNA と RS ウイルスで刺激を行い IL-25、TSLP 産生をみる。組織サンプルの免疫染色を行い IL-33 の局在、群間差を観察する。増悪因子の解明のため、東邦大学微生物・感染症学講座の協力のもと、副鼻腔炎の悪化時の鼻腔洗浄液を multiplex PCR 法を用いた遺伝子検査を行い原因ウイルス・細菌の検討を行う。鼻腔洗浄液中の IL-33 濃度を ELISA にて検討を行う。術後経過を retrospective に検討し、in vitro データとの関連を検討する。今回の実験では、遺伝子導入や SNPs の検出などは行う予定はない。東邦大学倫理委員会の承認のもと、患者に十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得たのちに研究を行う。我々の大学付属病院では年間 200 件の副鼻腔手術が行われている。その手術の中から、健康人 (眼窩壁骨折患者) 喘息非合併患者 アトピー型気管支喘息合併患者 非アトピー型気管支喘息合併患者 アスピリン喘息合併患者 の 5 群に分類し検討を行う。また、同時に好酸球性副鼻腔炎の診断ガイドライン (JESREC Study) の 4 つの重症度分類にも同時に分ける。これは我々の研究の目的が好酸球性副鼻腔炎の病態解明であるが、気管支喘息やアスピリン喘息の病態解明にも迫りたいからである。発症因子の解明のため、副鼻腔手術から得られる鉤状突起、鼻ポリープから上皮細胞、線維芽細胞を培養する。気道上皮細胞は前部篩骨洞粘膜 (鉤状突起、篩骨胞) より培養する。得られた組織を骨組織より剥離し、小片にする。これを 型コラーゲンでコートされた培養皿で、Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM) を用いて培養する。この方法で得られた、継代 3 代目までの細胞を用いて dsRNA, RS ウイルスで刺激を加える。刺激後、8 時間で mRNA を抽出し、

刺激を 24 時間、48 時間後の培養上清を ELISA で TSLP、IL-25 の産生量を検討する。今までの予備実験では dsRNA 単独では TSLP の産生は低いため、Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 を加え刺激を行うことも併用する。また、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  はウイルス感染時に重要であり、これとの共刺激も重要かもしれない。また、線維芽細胞を鼻ポリープより培養する。鼻ポリープを、副鼻腔粘膜同様に小片にし、DMEM/F12 に 10% の Fetal calf serum を加えた培養液で培養を行うと線維芽細胞が得られる。継代 5 代目までの細胞を用いて同様の刺激を行い、上皮 - 上皮下の相互関係を検討する。増悪因子の検討のために、副鼻腔炎増悪時の鼻腔洗浄液を用いて検討を行う。東邦大学微生物・感染症学講座の協力のもと、鼻腔洗浄液を multiplex PCR 法を用いて遺伝子検査を行い原因ウイルス・細菌の検討を行う。細菌感染は培養でも同定はできるが、ウイルスはなかなか難しくこのような方法を用いることで JESREC Study で重症例の入る症例の増悪因子となりうる感染症の同定ができるものと期待している。また、この鼻腔洗浄液中の IL-33 を検討する。IL-33 は上皮内で貯留しており刺激により mRNA が増幅されタンパク質が産生されるものではないとされる。IL-33 の Autocrine の反応をみるため、IL-33 にて鼻組織由来上皮細胞を刺激し IL-33 の産生を観察する。IL-33 (+ $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ ) で刺激後、cytokine protein microarray を施行し、発現増強タンパク質を同定する。cytokine protein microarray の結果を検討し、ケモカイン、特に好酸球の遊走、生存延長に関係するたんぱく質を探求する。特に RANTES、Eotaxin を中心に群間での差を検討し、難治化因子を特定する。上記の結果より組織の免疫染色を行う。IL-33、そのレセプターである ST2、TSLP、IL-25 について染色を行い、上皮、上皮組織、さらには浸潤細胞に対して 2 重染色を行いその局在を検討する。ウイルス感染に対する自然免疫として重要な TLR3 についても検討を行う。さらに、鼻ポリープ組織中の Periostin、Pendrin の局在、dsRNA、RS ウイルス刺激後の Periostin、Pendrin の産生の観察、鼻腔洗浄液中の Periostin、Pendrin の濃度の測定を行う予定である。経過良好群と経過不良群に分け、検討を行う。群間比較だけでなく、この術後経過の検討で新たな発見があると考え。また、平成 30 年度以降は術後良好群と不良群の鼻内洗浄液の cytokine protein microarray を行い、術後経過不良群に析出されるたんぱく質の検討を行う。また、経過良好群と経過不良群の凍結保存した上皮細胞と線維芽細胞を再度、IL-33 で刺激を行い、細胞を Proteome 解析にかけ、未知の難治化因子の同定を図りたいと考えている。上記結果を総合的に検討し、海外での学会発表を行い、論文にまとめた

と考えている。IL-33 は、アレルゲン刺激や感染による刺激などが鼻副鼻腔粘膜や気道上皮に加わった場合に、上皮細胞内にプールされていた IL-33 が放出される。そのため、単一刺激では、有意差が検出されない可能性がある。その場合は、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  などの炎症誘発性サイトカインと、共刺激し反応を観察する。

#### 4. 研究成果

dsRNA 刺激には合成の二本鎖 RNA である Poly(I:C) 25 ug/ml を使用した。単独では TSLP の産生量は低かったため、Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 (それぞれ 100 ng/ml) も併用した。刺激後 24 時間の培養上清において、コントロール 4 例、ECRS 9 例、Non-ECRS (非好酸球性副鼻腔炎) 17 例で検討した。いずれの群も Poly(I:C) 刺激においては TSLP 量が無刺激に比して上昇し、Poly(I:C) と Th2 タイプのサイトカインの共刺激でさらに上昇した。Th2 サイトカイン単独では TSLP の産生はほとんど認められなかった。ECRS 群においてはコントロールとの二群間で Poly(I:C) と Th2 タイプのサイトカインの共刺激により有意差が認められた。一方、NECRS については有意差を認めなかった。ECRS の重症度別でも検討を行ったが、有意な結果は得られなかったがこれについては症例が少なかったことが一因として考えられた。



上記 Figure が示すように Poly I:C 単独で有意差はなく、IL-4、IL-13 と共刺激を行った際には有意差をみとめた。

実際の臨床でも、好酸球性、非好酸球性のどちらの副鼻腔炎も上気道感染で増悪する。ECRS の難治性の原因は、Th2 サイトカインが存在するような特殊な環境下において TSLP が多く産生され、アレルギー反応、免疫反応がさらに活性化していることが示唆された。Th2 サイトカインのみではこの反応は乏しく、感染が加わることが重要であり大変興味深い。今後は症例数を増やすこと、IL-25、IL-33 についても検討することが必要

であると思われる。また、Poly(I:C)は疑似刺激である。実際の気道感染を再現するため、気道感染を起こしやすいライノウイルスやRSウイルスでの刺激でも検討を行う予定である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Akiko Inoue, Yuriko Tanaka, Kota Wada, Motonari Kondo : Study of relationship of allergy and chronic rhinosinusitis. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017.

〔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：  
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

和田 弘太 (WADA, Kota)

東邦大学・医学部・教授  
研究者番号： 20307480

(2)研究分担者

(3)連携研究者

吉川 衛 (YOSHIKAWA, Mamoru)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号： 50277092

近藤 元就 (KONDO, Motonari)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号： 20594344

(4)研究協力者

井上 彰子 (INOUE, Akiko)