

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：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860377

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎合併喘息の病態解明とAirway Medicine確立への第一歩

研究課題名(英文)The first step for elucidation of mechanism of asthma with eosinophilic chronic rhinosinusitis and establishment of Airway Medicine

研究代表者

小林 良樹(KOBAYASHI, Yoshiki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：10375298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎は、喘息を合併する場合、治療抵抗性で易再発性であると言われているが、特に重症喘息を合併するケースにおいて、好酸球性気道炎症を反映する呼気中一酸化窒素の上昇とステロイド感受性の低下を認めた。ステロイドに対する反応性は、炎症局所近傍の気道上皮細胞と免疫反応に關与する末梢血液中単核球細胞の双方において低下していた。ステロイド受容体の機能を調節するタンパク質(ホスファターゼ)の減少が、その原因の一つとして考えられた。

研究成果の概要(英文)：Eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) with asthma is known as refractory and recurrence-prone disease. In particular, ECRS patients with severe asthma had elevated levels of fractionated exhaled nitric oxide and reduced response to corticosteroids. Corticosteroid sensitivity was reduced in both bronchial epithelial cells located near inflammatory site and peripheral blood mononuclear cells. Impaired proteins (some phosphatases) involved in regulation of glucocorticoid receptor function may be one of mechanisms.

研究分野：気道炎症・アレルギー

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 ステロイド抵抗性 ホスファターゼ 重症喘息

1. 研究開始当初の背景

今や国民病とも言えるアレルギー性疾患の中でも気道アレルギーは、患者の Quality of Life を著しく低下させ大きな問題となっている。その代表格とも言える気管支喘息の半数以上に副鼻腔炎(特に篩骨洞優位型の好酸球性副鼻腔炎)を合併して、喘息の重症度に比例して副鼻腔炎の重症度も悪化する。この難治性の好酸球性副鼻腔炎合併喘息の病態解明・病勢コントロールが、“one airway, one disease”の概念を確立させるために必要不可欠である。

好酸球性副鼻腔炎合併喘息においては、喘息に対して吸入ステロイドを中心とした治療を行っているにもかかわらず、好酸球性気道炎症を反映する呼気中一酸化窒素 (FeNO) が高値を示すのが特徴であり、この好酸球性気道炎症を誘導するメカニズムに参与する分子がキーファクターとなる。誘導型 NO 産生酵素 (iNOS) 産生や重症喘息の気道局所で増加している炎症性サイトカイン産生 (IL-2, IL-4, IL-5 など) を制御する NFκB のような炎症性転写因子の活性が一つのターゲットになる。従来は、ステロイドによるヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) 活性の抑制やヒストン脱アセチル化酵素 2 (HDAC2) の誘導を介して、炎症促進メディエーターの転写活性が適切にコントロールされているが、好酸球性副鼻腔炎合併喘息のようなステロイド抵抗性を示す病態においては、制御不能の状態である。

重症喘息におけるステロイド抵抗性メカニズムの一つとして、我々はステロイド受容体 (GR) のセリン 226 残基 (Ser226) のリン酸化亢進を報告している。GR-Ser226 のリン酸化がステロイド結合後の核内移行能を低下させ、その結果としてステロイド抵抗性が生じることになる。Ser226 のリン酸化亢進の原因として、種々のホスファターゼの発現および活性低下があげられる。これまでに serine/threonine ホスファターゼ PP2A, dual specificity ホスファターゼ DUSP4 そして tyrosine ホスファターゼ PTP-RR が、GR およびその上流シグナルの JNK1 と複合体を形成して GR-Ser226 リン酸化を制御することがわかっている。これらのホスファターゼ活性と GR 機能や NFκB 活性との関与を好酸球性副鼻腔炎合併喘息において確認すること、特に iNOS や各種炎症性サイトカインの産生源である気道上皮細胞を用いて検討することが重要である。

2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎合併喘息において想定される病態を症例サンプルと *in vitro* モデルを用いて解明し、さらに、臨床応用可能な病勢反映マーカーの簡易検査法を確立させることが、本研究の目的である。

(1) ヒト気道上皮細胞のサンプリング方法および至適培養条件の確立

(2) 疾患特異的パターンの認識 (好酸球性炎症に参与するサイトカイン産生パターンやステロイド感受性およびホスファターゼ活性など)

(3) ステロイド抵抗性再現モデルにおける iNOS 発現変化とホスファターゼ活性 (PP2A, DUSP4, PTP-RR など)、好酸球活性化との関連性の検討

(4) 日常臨床で活用できるような症例サンプルを用いた簡易検査法の確立; 疾患特異的な病態を反映する指標を検出できる方法

(5) 新たな治療ターゲットの探究; 症例サンプルから病態と関連の深いホスファターゼの抽出、それらの過剰発現モデルあるいは活性化物質を用いた臨床応用への可能性の探究

3. 研究の方法

(1) 好酸球性副鼻腔炎合併喘息の疾患特異的パターンの認識

これまでの検討から、好酸球性副鼻腔炎合併喘息の特徴として、吸入ステロイドなどの治療介入後も持続する FENO 高値、そして好酸球性炎症があげられる。そこで、気道上皮における iNOS 発現および好酸球活性化を誘導する炎症性メディエーター産生に参与する特異的なパターンを疾患サンプルから得られる情報から検証した。

① ヒト気道上皮細胞として鼻粘膜細胞を用いた。子宮頸管用擦過ブラシを用いて鼻腔からアプローチして下鼻甲介あるいはポリープ周囲から採取した。液体成分 (鼻粘膜上皮被覆液) と細胞成分に分け、細胞成分は気道上皮細胞用の培養液を用いて 3~4 週間培養した。

② 液体成分および培養・剥離した細胞を用いて、サイトカイン産生能 (ELISA、Bio-Plex® や RT-PCR)、iNOS やホスファターゼ (PP2A, PTP-RR) 発現変化 (RT-PCR)、ステロイド感受性などを測定し、臨床情報とあわせて、疾患特異的なパターンを解析した。

③ 末梢血単核球細胞を用いて、PP2A 活性やステロイド感受性を測定し、気道上皮細胞におけるパターンとの相関性について評価した。

(2) 好酸球性気道炎症を想定したステロイド抵抗性再現モデル (*in vitro*) における検討

本研究で得られた結果に基づいてステロイド抵抗性 *in vitro* モデル (末梢血単核球細胞、単核球系培養細胞 U937 および気道上皮細胞 BEA-SB) を再現した。siRNA を用いて病態への関与が疑われるホスファターゼ (PP2A および PTP-RR) のノックダウンモデルを作成し、ステロイド感受性、GR 核内移行、GR-Ser226 リン酸化レベルを確認した。また、ヒト末梢血分離好酸球と BEAS-2B との共培養モデルにおける iNOS およびホスファターゼ (PP2A, PTP-RR) の発現変化 (RT-PCR)、さらに好酸球活性を確認した。

(3) 日常臨床で応用可能なマーカーの発見とその検出法の確立

好酸球性副鼻腔炎合併喘息の病態・病勢を反映する指標となるものを末梢血単核球や鼻粘膜擦過細胞を用いて簡易に測定する方法を検証した。ステロイド抵抗性に関与するホスファターゼ発現レベル (PP2A, PTP-RR, DUSP4) や GR-Ser リン酸化レベル、GR 核内移行能を、ImageStream® X (imaging flow cytometer)を用いて、再現性の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 好酸球性副鼻腔炎合併喘息の疾患特異的パターンの認識

鼻粘膜上皮被覆液を用いた検討においては、種々の Th1/Th2 サイトカンの中で安定して検出可能であったものは、ペリオスチン、IL-33、MIP-1βであった。ただし、サンプリングや治療による影響のため、疾患群による相違は認められなかった。ペリオスチンに関しては好酸球性副鼻腔炎において増加すること、IL-33 についてもアレルギー性鼻炎などの気道炎症で増加することがすでに報告されているため、本研究では MIP-1βに着目した。以前より我々は MIP-1βが好酸球性活性化に関与することを見出しているが、これを反映して鼻粘膜擦過上皮の初代培養細胞における MIP-1βの mRNA レベルと末梢血好酸球数は正の相関関係を示した。なお、mRNA レベルにおいても MIP-1βは、治療の影響もあり、疾患群で有意な差が認められなかった。

また、炎症局所のステロイド感受性の評価として、鼻粘膜擦過上皮の初代培養細胞を用いて感受性 (dexamethasone の TNFα誘導性 IL-8 産生抑制能: Dex-IC50) を測定した。重症喘息を合併する好酸球性副鼻腔炎において他のグループと比較して有意に Dex-IC50 が高値 (感受性が低下) であった(図 1A)。同時に、ステロイド感受性に関与する GR-Ser226 リン酸化を制御するホスファターゼ (PP2A と PTP-RR) の mRNA レベルも Dex-IC50 と相関して低下していた(図 1B,C)。

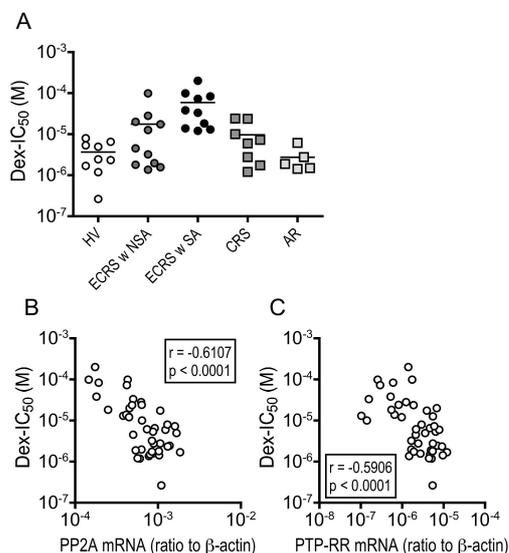


図 1.炎症局所におけるステロイド感受性 (Dex-IC50) (A)および Dex-IC50 とホスファターゼ (PP2A (B), PTP-RR (C)) mRNA レベルとの相関関係. HV: 健常コントロール, ECRS: 好酸球性副鼻腔炎, NSA: 非重症喘息, SA: 重症喘息, CRS: 慢性副鼻腔炎, AR: アレルギー性鼻炎

さらに、全身性のステロイド感受性の評価として、末梢血単核球細胞を用いて Dex-IC50 を測定した。興味深いことに前述の炎症局所における感受性と同様の結果が得られた。重症喘息を合併する好酸球性副鼻腔炎で有意に Dex-IC50 が高値 (感受性が低下) で(図 2A)、PP2A 活性レベルが Dex-IC50 と相関して低下していた (図 2B)。

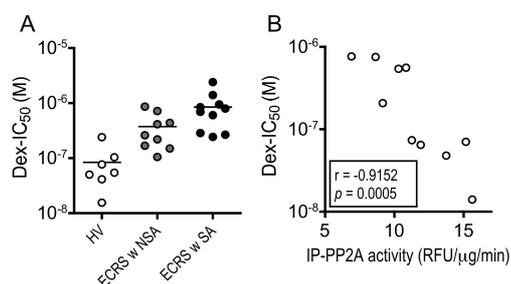


図 2. 全身性のステロイド感受性 (Dex-IC50) (A)および Dex-IC50 と PP2A 活性レベルとの相関関係 (B). HV: 健常コントロール, ECRS: 好酸球性副鼻腔炎, NSA: 非重症喘息, SA: 重症喘息

(2) 好酸球性気道炎症を想定したステロイド抵抗性再現モデル(in vitro)における詳細な検討

末梢血単核球細胞と U937 細胞を用いた検討で、PTP-RR ノックダウンにより GR-Ser226 リン酸化、GR 核内移行能低下が起こり、ステロイド抵抗性が誘導された。PP2A ノックダウンによっても同様に結果が得られたが、PP2A は PTP-RR によって Tyr307 残基を介して制御されていることがわかった。

また、BEAS-2B と末梢血好酸球の共培養の系で、PP2A と PTP-RR の発現レベルの低下が確認された。さらに、好酸球活性化 (生存能延長) と iNOS 発現レベルの上昇を認め、病態の一部を反映している結果となった。

なお、当初予定していた NO の好酸球機能への直接的影響および iNOS 産生に関与するシグナルに関する検討は、気道上皮サンプルでの iNOS 発現において疾患群で有意な結果が得られなかったこともあり、今回は行っていない。

本研究では、formoterol などの長時間作用型β2 刺激剤が PTP-RR および PP2A を活性化させ、ステロイド感受性の改善に繋がるところまでわかった。今後の課題としては、新たな治療ターゲットとしての可能性を探るために、症例サンプルでこれらの過剰発現 in vitro モデル作成を試みたい。ステロイド感受性改

善のみならず、iNOS 産生抑制、好酸球活性抑制が確認できれば、将来的にマウスモデルでも検討していく予定である。

(3) 日常臨床で応用可能なマーカーの発見とその検出法の確立

日常診療で応用可能なマーカーとして、鼻粘膜擦過上皮細胞は容易に採取できるものの、摂取量が少なく、増量させるためには3~4週間の培養期間を要するため、現実的ではなかった。ステロイド感受性の評価として、気道上皮と同様のパターンを示すことから末梢血単核球細胞を用いた。今回の検討では、ImageStreamを用いてPP2AとPTP-RRは安定した描出が困難であったが、ステロイド感受性制御に関与する別のホスファターゼDUSP4は、重症喘息を合併する好酸球性副鼻腔炎でその発現が低下していた。DUSP4発現レベルは、GR-Ser226とその上流シグナルであるJNKのリン酸化レベルと逆相関していた。また、別の指標として、末梢血単核球細胞におけるGR核内移行能を評価した。蛍光標識でラベルされたDexの核内局在をImageStreamで測定し、ステロイド抵抗性を誘導するIL-2/IL-4共刺激下で核内移行が低下することを確認した。

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 2件)

(1) Kobayashi Y, Ito K, Kanda A, Tomoda K, Miller-Larsson A, Barnes PJ, Mercado N. Protein tyrosine phosphatase PTP-RR regulates corticosteroid sensitivity. *Respir Res* 2016; 17: 30. 査読有, DOI: 10.1186/s12931-016-0349-0

(2) Kobayashi Y, Asako M, Ooka H, Kanda A, Tomoda K, Yasuba H. Residual exhaled nitric oxide elevation in asthmatics is associated with eosinophil chronic rhinosinusitis. *J Asthma* 2015; 52:1060-4. 査読有, DOI: 10.3109/02770903.2015.1054404

[学会発表] (計 7件)

① 小林 良樹、喘息合併難治性 ECRS における局所治療効果の検証、アレルギー・好酸球研究会 2015、2015年10月24日、学術総合センター、東京都千代田区

② 小林 良樹、好酸球性副鼻腔炎合併喘息へのpMDI吸入ステロイド経鼻呼出療法、第3回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会総会・学術講演会、2015年9月4日、ライフォート札幌、札幌市

③ 小林 良樹、喘息合併 ECRS におけるステロイド感受性の検討、第64回日本アレルギー学会学術大会、2015年5月26日、プリンスホテル新高輪 国際館パミール、東京都港区

④ 小林 良樹、喘息合併 ECRS に対する経鼻呼出療法における適正な呼吸条件の推算、第64回日本アレルギー学会学術大会、2015年5月26日、プリンスホテル新高輪 国際館パミール、東京都港区

⑤ 小林 良樹、治療抵抗性 ECRS における全身性および局所性ステロイド感受性の検討、第53回日本鼻科学会、2014年9月26日、グランフロント大阪、大阪府大阪市

⑥ 小林 良樹、気管支喘息合併 ECRS への新しいアプローチ、第53回日本鼻科学会、2014年9月25日、グランフロント大阪、大阪府大阪市

⑦ Yoshiki Kobayashi, Protein tyrosine phosphatase PTPRR regulates PP2A in mononuclear cells, The 24th Annual Congress of European Respiratory Society, 2014年9月7日, ICM Internationales Congress Center Munchen, Munich, Germany

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 良樹 (KOBAYASHI, Yoshiki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：10375298