

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861415

研究課題名(和文) 抗菌ペプチドの発現抑制は黄色ブドウ球菌による好酸球性副鼻腔炎の誘因である

研究課題名(英文) Inhibition of antibacterial peptide expression induces eosinophilic chronic rhinosinusitis caused by *Staphylococcus aureus*

研究代表者

倉野 香 (Kurano, Kaori)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00514522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎患者より得た鼻ポリプ組織におけるβ-デフェンシンとカテリシジンの発現の程度を実証し、上皮組織から分泌される抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌の上皮細胞接着の抑制作用が実証された。好酸球性副鼻腔炎とβ-デフェンシンとカテリシジン遺伝子と蛋白発現の関連、好酸球炎症を惹起するサイトカイン、ケモカインによる粘膜上皮の抗菌ペプチドの応答性、抗菌ペプチドによる黄色ブドウ球菌への上皮接着への影響が実証された。好酸球性副鼻腔炎における抗菌ペプチドの防御因子としての重要であることが判明された。

研究成果の概要(英文)：Using the nasal polyps derived from eosinophilic chronic rhinosinusitis, the expression of beta-defensin and cathelicidin were demonstrated using immunohistochemistry and chemical assay. Furthermore, antibacterial peptides secreted from nasal epithelial cells inhibited the adhesion of *Staphylococcus aureus* on the epithelial cells. Based on the following studies including expression of beta-defensin and cathelicidin, responses of antibacterial peptides on eosinophil-related cytokines, and the adhesion of *Staphylococcus aureus*, antibacterial peptides may play an important role on defensive factors in the pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis.

研究分野：耳鼻咽喉科学

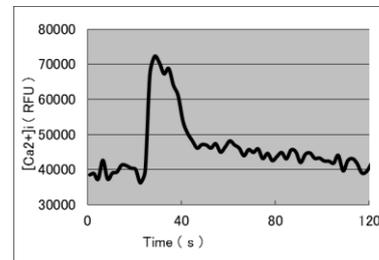
キーワード：好酸球性副鼻腔炎 黄色ブドウ球菌 スーパー抗原 抗菌ペプチド β-デフェンシン カテリシジン

1. 研究開始当初の背景

鼻副鼻腔は気道系の門戸である。つまり外界の吸気性異物(ウイルス、細菌、真菌など)が最初に暴露する臓器であり、異物除去のための種々の防御機構が構築されている。近年、難治性の鼻副鼻腔炎として、I型アレルギーが関与しない好酸球浸潤を伴う鼻ポリープ(好酸球性副鼻腔炎)が注目されている。好酸球性副鼻腔炎の病因として、黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原の関与の証拠が挙げられている(Bachart et al., J Allergy Clin Immunol, 2001)。黄色ブドウ球菌由来の内毒素はスーパー抗原としての構造を有しており、Tリンパ球のクラスII受容体と結合して、Tリンパ球を刺激し、Th2型の各種サイトカインを誘導して好酸球を動員するという機序が推察されている。一方、本来の生体には外的因子に対する防御因子によって細菌の排除機構が備わっており、黄色ブドウ球菌の定着が阻害される。従って、好酸球性副鼻腔炎では黄色ブドウ球菌に対する排除機構が抑制・破綻されている可能性がある。気道系の外的因子への抗菌ペプチドはβ-デフェンシンとカテリシジンが抗菌及び免疫調節作用を果たしている(Ganz, Nat Rev Immunol, 2003; Niyonsaba et al., Crit Rev Immunol, 2006)。上述した好酸球性副鼻腔炎における抗菌ペプチドの役割についての先行研究は、①Th2サイトカインは鼻ポリープ由来の培養上皮細胞からの抗菌ペプチドの分泌を抑制した(AM J Rhinol 2008)。②カテリシジンを誘導する活性型ビタミンDは慢性副鼻腔炎で低下している(J Allergy Clin Immunol, 2008)、③好酸球性副鼻腔炎の好酸球動員にeotaxinとIL-17Aが関与している(当研究グループ、Laryngoscope 2009; Int Arch Allergy Immunol 2010)、④好酸球性副鼻腔炎で認めるマスト細胞の細胞内Caの増加と生物作用の活性化がβ-デフェンシンによって生じた(申請者の論文、Int J Mol Med., 23:337-40, 2009)。

そこで、好酸球性副鼻腔炎における抗菌ペプチドの役割を以下の観点から研究することを企画した。①鼻ポリープにおける好酸球浸潤と抗菌ペプチド発現の関係、②鼻ポリープ

の好酸球動員に関連するeotaxinとIL-17Aによる抗菌ペプチド分泌、③抗菌ペプチドの鼻ポリープ上皮細胞における黄色ブドウ球菌の接着能への影響である。



ヒトβデフェンシン0.3μg/mlの投与によるマスト細胞の細胞内Ca²⁺動員

2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎の病因として、黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原の関与の証拠が挙げられている。本来の生体には外的因子に対する防御因子によって細菌の排除機構が備わっており、黄色ブドウ球菌の定着が阻害されるが、好酸球性副鼻腔炎では黄色ブドウ球菌に対する排除機構が抑制・破綻されている可能性がある。そこで、好酸球性副鼻腔炎の増悪機序として、抗菌ペプチドによる防御因子の抑制に注目して鼻ポリープにおけるβ-デフェンシンとカテリシジンの機能解析を行うことを企画した。

3. 研究の方法

本研究では多種の副鼻腔炎患者より得た鼻ポリープ組織におけるβ-デフェンシンとカテリシジンの発現の程度を実証し、上皮組織における抗菌ペプチドの調節機序を検討する。具体的には以下の実験計画から成る。

1. 鼻茸組織中のβ-デフェンシンとカテリシジン活性の測定
2. Real-time PCRによるmRNAの発現量測定
3. IL-17A、eotaxin刺激による培養上皮からのβ-デフェンシンとカテリシジン産生応答
4. 抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌の接着能への影響
5. 上記の実験結果から好酸球性副鼻腔炎の抗菌ペプチドの役割の解明

平成 26 年度

1. 副鼻腔炎手術患者の鼻ポリープおよびコントロール

慢性副鼻腔炎患者の鼻ポリープおよびコントロール群として下垂体手術時に採取した正常の蝶形骨洞粘膜組織を検体として用いる。

2. 切片の作成

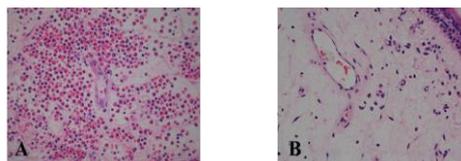
ホルマリン固定-パラフィン包埋処理、パラフィン切片の作成を行う。切片は $3.5\mu\text{m}$ とする。H.E 染色で 400 倍視野で平均 3 視野好酸球数カウント、好酸球数 100 以上のものを好酸球性副鼻腔炎、100 未満のものを非好酸球性副鼻腔炎と診断(臨床症状も考慮)する。コントロールとして正常の蝶形骨洞粘膜を使用して 3 タイプで比較検討を行う。

3. Real-time PCR 法による mRNA の測定

検体(30 mg)より Aurum Total RNA kit (BioRad Laboratories, Hercules, CA)を用いて RNA を抽出する。800 ng の RNA より High capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)を用いて cDNA を合成する。mRNA を定量的リアルタイム PCR 法によって、7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems Inc.)と TaqMan gene Expression Assays (assay identification number Hs00936345_m1)を用いて測定する。データ解析は 7500 Software v2.0.1(Applied Biosystems Inc.)を用いて standard curve 法で行う。

4. 鼻茸組織中の β -デフェンシンとカテリシジン濃度の ELISA 測定

手術時に採取された検体は、直ちに -80°C のフリーザーに保存。手術時に採取された検体は、直ちに -80°C のフリーザーに保存。鼻茸組織は一定量の 5mm 角に刻んで、組織を超遠心機にてホモジナイズした上清を測定試料とする。同時に、蛋白量も計測する。各ウェルにサンプル溶液を入れていき、順序希釈していく。プレートリーダーで 450nm の吸光度を測定して、 β -デフェンシンとカテリシジン濃度を測定する。



A: 好酸球性副鼻腔炎：著明な好酸球浸潤を認める
B: 非好酸球性副鼻腔炎：好酸球浸潤は少ない

平成 27 年度

1. 鼻ポリープおよびコントロール副鼻腔組織からの表面上皮細胞の培養

好酸球性副鼻腔炎患者および他の副鼻腔炎患者の鼻ポリープ、およびコントロール群として下垂体手術時に採取した正常の蝶形骨洞粘膜組織を検体として用いる。ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン含有バッファーによる殺菌処理、同時に組織内末梢血の洗浄を行う。Ca free MEM をバッファーとし、MEM with DNAase and protease を用いた酵素処理を行う。酵素処理後の検体を攪拌し遠心 ($1000\text{rpm} \times 5\text{min}$) し、上清を抽出後再び遠心 ($1000\text{rpm} \times 5\text{min}$) し上清を吸引し MEM を加える。



鼻ポリープより分離した上皮細胞培養系。増殖能の高い細胞群が得られる

2. IL-17A、eotaxin 刺激による培養上皮からの β -デフェンシンとカテリシジン産生応答

IL-17A、eotaxin 刺激による培養上皮細胞の上清中の分泌液から β -デフェンシンとカテリシジンを ELISA キットにて測定する。好酸球性、非好酸球性、コントロールごとで計測する。

3. 抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌の接着能への影響

培養上皮を酵素処理にて単離し、 2.5×10^7 CUF の FITC 標識した黄色ブドウ球菌を 5×10^5

の培養上皮細胞に1時間暴露し、接着能を蛍光顕微鏡下で評価する。種々の濃度のβ-デフェンシンとカテリシジンの前処置による接着能の変化を検討する。

4. 各データの総合的な解析

以上の実験結果から①好酸球性副鼻腔炎とβ-デフェンシンとカテリシジン蛋白や遺伝子発現の関連、②好酸球炎症を惹起するサイトカイン、キモカインによる粘膜上皮の抗菌ペプチドの応答性、③抗菌ペプチドによる黄色ブドウ球菌への上皮接着への影響を検証する。

4. 研究成果

好酸球性副鼻腔炎の病因として、黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原の関与の証拠が挙げられている。本来の生体には外的因子に対する防御因子によって細菌の排除機構が備わっており、黄色ブドウ球菌の定着が阻害されるが、好酸球性副鼻腔炎では黄色ブドウ球菌に対する排除機構が抑制・破綻されている可能性がある。そこで、好酸球性副鼻腔炎の増悪機序として、抗菌ペプチドによる防御因子の抑制に注目して鼻ポリープにおけるβ-デフェンシンとカテリシジンの機能解析を行った。鼻茸内の浸潤好酸球数100以上のものを好酸球性副鼻腔炎、100未満のものを非好酸球性副鼻腔炎と診断(臨床症状も考慮)する。コントロールとして正常の蝶形骨洞粘膜を使用して3タイプで比較検討を行った。また好酸球性副鼻腔炎患者より得た鼻ポリープ組織におけるβ-デフェンシンとカテリシジンの発現の程度を計測した。上皮組織から分泌される抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌の上皮細胞接着の抑制作用を実証し、好酸球性副鼻腔炎における抗菌ペプチドの防御因子としての役割を明らかにする。具体的には、①好酸球性副鼻腔炎とβ-デフェンシンとカテリシジン遺伝子と蛋白発現の関連、②好酸球炎症を惹起するサイトカイン、ケモカインによる粘膜上皮の抗菌ペプチドの応答性、③抗菌ペプチドによる黄色ブドウ球菌への上皮接着への影響を行う。外界からの黄色ブドウ

球菌は鼻副鼻腔粘膜の表面上皮に接着し、内毒素に含まれるスーパー抗原の作用によって血中から好酸球を粘膜組織に動員させる。好酸球ならびに関連の各種サイトカインや活性化蛋白によって、上皮細胞や粘膜へ浸潤した炎症性細胞を刺激・活性化させ、抗菌ペプチドを分泌させる。抗菌ペプチドは表面上皮へ作用して黄色ブドウ球菌の上皮接着を抑制し、病態の悪化を抑えることが判明した。

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 1 件)

IkedaK,KusunokiT,SaitohT,YaoT,KaseK,MinekawaA,InoshitaA,YokoiH,KawanoK.

(2015)

Effectiveness of flucocorticosteroid for postoperative recurrence of nasal polyps in chronic rhinosinusitis associated with asthma.

J Otol Rhinol Laryngol 96:6-9

査読有

DOI:10.4172/2324-8785.S1-002

[学会発表] (計 1 件)

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 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 1 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

倉野 香 (KURANO Kaori)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：00514522

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

()

研究者番号：