

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 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：26861417

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎における抗酸化作用に基づく新たな治療戦略の試み

研究課題名(英文) New strategy based on anti-oxidant action in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps

研究代表者

小野 倫嗣(Ono, Noritsugu)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10433773

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)：26症例の鼻茸組織中の抗酸化酵素のSOD活性が正常鼻粘膜のそれに比較して、減少していた。免疫染色にてSODの減少を認めた。鼻茸組織中の炎症細胞浸潤の程度を解析するため、SODが上皮系に局在するため、鼻茸組織中の上皮障害との関連・リモデリングに相関を認めた。さらに、組織中の好酸球との関連が検証された。鼻茸組織をLaser microdissectionにより鼻茸上皮を採取して、RT-PCRにより鼻茸上皮のSODのmRNA発現が低下していた。

研究成果の概要(英文)：Twenty-six patients with CRS with nasal polyps were divided into eosinophilic and non-eosinophilic groups. The expression of three isoforms of SOD, intracellular copper-zinc SOD (CuZnSOD), mitochondrial manganese SOD (MnSOD) and extracellular SOD (ECSOD), were examined by enzyme activity assay, immunohistochemistry, and quantitative real-time RT-PCR sampled by laser capture microdissection.

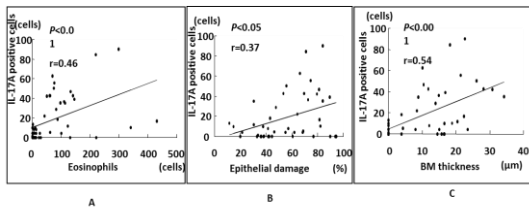
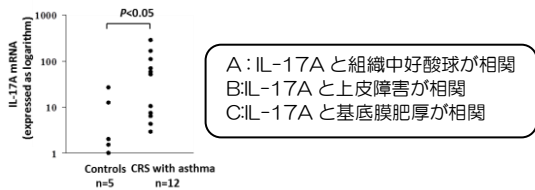
研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球副鼻腔炎 鼻茸 抗活性酸素因子 Superoxide dismutase 好酸球 マクロファージ リモデリング

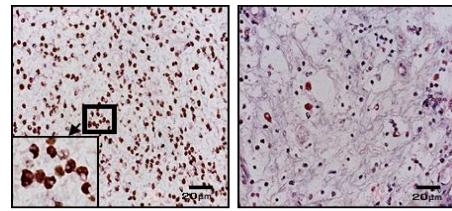
1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎・鼻茸は耳鼻咽喉科の日常診療において頻繁に遭遇する疾患で、鼻閉、鼻漏、嗅覚障害などの原因となり患者の生活の質(QOL)を低下させる。従来の慢性副鼻腔炎の大部分は、細菌感染による急性炎症の反復と持続を契機として発症する化膿性副鼻腔炎であったが、近年これとは異なる機序、すなわち何らかの形でアレルギーや好酸球性炎症が発症に関与する新たな副鼻腔炎の病型が増加してきている。One airway, one disease の観点より、気管支喘息と慢性副鼻腔炎は病態が類似しており、上気道と下気道は密接な関係があると考えられている。気管支喘息において、気道粘膜の上皮障害やリモデリングは、気道粘膜に集簇した好酸球、マクロファージなどの炎症細胞から放出される、活性酸素の増減の関与が示唆されている。そこで、生体内のフリーラジカルを抑制する抗酸化酵素の Superoxide dismutase(SOD),Heme Oxygenase-1(HO-1)、Glutathione peroxidase、Catalase などが病態に関与している。

近年喘息合併の難治性副鼻腔炎の1つである好酸球性副鼻腔炎が注目されている。我々の研究グループは、①IL-17A 陽性浸潤細胞が多量に喘息合併慢性副鼻腔炎に存在すること、②IL-17A 陽性細胞は鼻茸上皮剥離、基底膜肥厚のリモデリングや重症度と相関することを報告している(Saito T et al: Int Arch Allergy Immunol 151:8-16, 2010)。

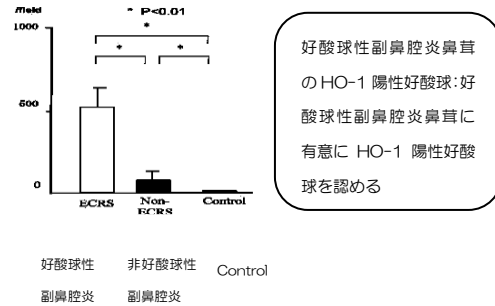


好酸球性副鼻腔炎鼻茸を用いて、組織内好酸球浸潤と抗酸化物の1つである Heme Oxygenase-1(HO-1)、マクロファージとの関連性を報告した(Kawano K et al:Auris Nasus Larynx 39,387-392, 2012)。



好酸球性副鼻腔炎

非好酸球性副鼻腔炎



難治性かつ再発性の好酸球性副鼻腔炎の防御因子の作用機序は解明されていない。

2. 研究の目的

近年、難治性の好酸球性副鼻腔炎の病態形成において、サイトカイン・活性酸素などの上皮障害への増悪因子の関与が提唱されているが、防御因子に関しての研究は少ない。今回、好酸球性副鼻腔炎に伴う鼻茸形成を抑制的に作用すると考えられる抗活性酸素因子である Superoxide dismutase (SOD) を検証する。計画している研究項目は①SOD の蛋白活性、②SOD の発現の局在部位、③Laser microdissection による局在部位をターゲット mRNA の定量、④SOD 発現量と好酸球・マクロファージ浸潤・リモデリングとの関連により、抗酸化療法の治療応用の根拠を確立する。

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より、これらの分子細胞生物学的評価を行い副鼻腔炎各症例に対する炎症細胞マーカー(好酸球、好中球、マクロファージなど)の浸潤細胞数、活性酸素の抗酸化物質である SOD の関連性を検証する。

1. 鼻茸組織中の SOD 活性の測定
2. 炎症細胞 (Eosinophil、Neutrophil elastase、CD68)のカウント
3. SOD の鼻粘膜上皮陽性率、鼻粘膜の上皮障害率測定

4. Laser microdissection で鼻茸上皮採取、RT-PCR による SOD の mRNA の発現量測定
5. 上記との臨床症状の相関につき解析

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

各々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。なお、検体摘出の際に組織損傷がないように注意する。

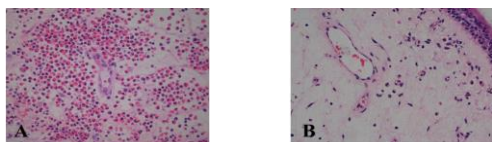
検体の保存に関して、固定の時間の調節や抗体の濃度希釈に注意する必要がある。

2. 鼻茸組織中の SOD 活性測定

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、蛋白定量も行う。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、SOD 活性を測定する。活性はすぐに酵素分解が進行するので、なるべく新鮮な組織を使用する。

3. 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 タイプで比較検証を行う。またリモデリングの程度として、鼻茸上皮の上皮障害率も測定する。



- 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

免疫染色: 脱パラを行い洗浄。Autoclave が必要な抗体は 121°C 10min の条件で行う。1

次抗体として Neutrophil elastase x100、CD68(マクロファージ) x3, autoclave 121°C 10min 、対象として negative control も作成する。酵素抗体法により DAB(LSAB 法)で発色させる。必要に応じて、適宜抗体の希釈率などを変更する。

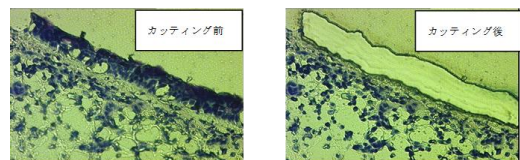
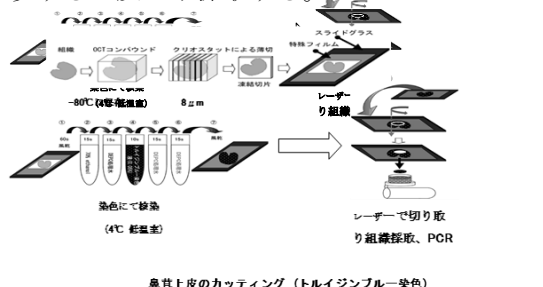
平成 27 年度

1. 細胞数のカウント

染色されたマクロファージ、好中球数を顕微鏡を用いて 400 倍視野で平均 3 視野カウントする。また、SOD に関しては特異的に上皮に染色されるので、CuZnSOD、MnSOD、ECSOD それぞれ上皮の陽性率を計測する。

2. Laser microdissection による上皮組織の採取

採取された検体は直ちに、O.C.T compound にて -80°C に保存。クリオスタットにて $8\mu\text{m}$ の厚さに切片を切り出し、低温室にてトルイジンブルー染色を行い、組織染色する。切片を用いて SOD が発現する部位の採取を行う。



3. RT-PCR による mRNA 量の検証

Laser microdissection により採取した上皮より RNA を抽出する。RNA は時間単位で分解がすすむので、効率よく実験を行う。抽出した RNA より cDNA を合成する。その cDNA より RT-PCR 法にて SOD の mRNA を定量する。

4. 各データの総合的分類・データベース化および臨床所見との比較

(研究計画を遂行するための研究体制: 申請者が所属する研究室に在籍する分子生物学のエキスパートの桜庭から技術的指導を受ける)

4. 研究成果

近年、喘息における気道粘膜の上皮障害、気道壁のリモデリングは、気道粘膜に集簇した好酸球、マクロファージなどの活性化した炎症細胞から放出される、活性酸素の増減の関与が報告されている。抗酸化酵素の1つである superoxide dismutase (SOD) は生体内のフリーラジカルを抑制する作用があり、喘息などの下気道疾患で注目されている。SOD は CuZnSOD、MnSOD、ECSOD の3つの subtype があり、肺では特徴的な局在がある。今回、one air way one disease の観点より、難治性の好酸球性副鼻腔炎において、SOD について検討したので報告する。

方法

好酸球性副鼻腔炎鼻茸 31 例、非好酸球性副鼻腔炎鼻茸 28 例、control として下垂体手術時に採取した正常の蝶形骨洞粘膜 20 例を対象として SOD 活性の測定、免疫学的に SOD の局在を観察し、鼻茸上皮における SOD 陽性細胞率を算出した。また Laser Microdissection を用いて、鼻茸上皮のみ採取して RT-PCR により SOD の mRNA を定量した。また重症度との相関として CT スコア、鼻茸の上皮障害率との相関も検討した。

結果

鼻茸の総 SOD 活性は好酸球性副鼻腔炎、非好酸球性副鼻腔炎ともに有意に control より低下していた。鼻茸上皮の CuZnSOD、MnSOD 陽性率は control、非好酸球性副鼻腔炎と比較して有意に好酸球性副鼻腔炎で低値であった。鼻茸上皮の CuZnSOD の mRNA 発現は非好酸球性副鼻腔炎とは差がなかったが、control と比較して有意に好酸球性副鼻腔炎で低下していた。MnSOD の mRNA 発現は非好酸球性副鼻腔炎 control と比較して有意に好酸球性副鼻腔炎に低値であった。また、重症度との相関では CuZnSOD 陽性率、MnSOD 陽性率は CT スコア、鼻茸の上皮障害率と負の相関関係があった。ECSOD は免疫染色、RT-PCR では有意差は認めなかった。

まとめ

好酸球性副鼻腔炎では、活性酸素の増加に加えて、消去系の活性低下が上皮障害の増悪因子になっていることが示唆された。

SOD の低下が好酸球性副鼻腔炎病態悪化の増悪因子となる可能性が示唆された。

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 5 件)

① Takeshi Kusunoki Noritsugu Ono and Katsuhisa Ikeda

Correlations between Cu, Zn- Superoxide dismutase and Macrophages or MUC5AC in Human Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis

Otology & Rhinology **S1**, 10-14, 2015

査読有

DOI: 10.4172/2324-8785.S1-003

② Masato Miwa Noritsugu Ono Daisuke Sasaki Akihito Shiozawa Mayumi Miwa and Katsuhisa Ikeda

Peroxide Tone in Human Inferior Nasal Turbinate with Allergy.

Otology & Rhinology **S1**, 15-19, 2015

査読有

DOI: 10.4172/2324-8785.S1-004

③ Masato Miwa Daisuke Sasaki Mikio Hirotsu Noritsugu Ono Akihito Shiozawa Mayumi Miwa and Katsuhisa Ikeda

Changes in Contents of Arachidonic Acid Metabolites in Nasal Lavage and Mucosal Tissues in response to Allergen Challenge in Patients with Allergic Rhinitis

Otology & Rhinology **S1**, 20-25, 2015

査読有

DOI: 10.4172/2324-8785.S1-005

④ Shiozawa Akihito, Miwa Masato, Ono Noritsugu, Homma Hiroto

Comparative analysis of cytokine release from epithelial cell cultures of the upper airway

Rhinology **53**, 135-141, 2015

査読有

DOI: 10.4193/Rhino14.078

⑤ Hirotsu M., Shiozawa A., Ono N.

Miwa M., Kikuchi K., Ikeda K.

Fungal extracts detected in eosinophilic
chronic rhinosinusitis induced cytokines
from the nasal polyp cells
The Laryngoscope **124**, E347-353 , 2014
査読有
DOI: 10.1002/lary.24655

(2)研究分担者
(3)連携研究者
()

研究者番号 :

〔学会発表〕 (計 1 件)

①塩沢 晃人, 三輪 正人, 小野 倫嗣
本間 博友, 廣津 幹夫, 池田 勝久
上気道培養上皮細胞より放出されるサイト
カインの比較解析
日本耳鼻咽喉科学会総会
2014年5月16日
ヒルトン福岡シーホーク (福岡市)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

小野 倫嗣 (ONO Noritsugu)
順天堂大学・医学部・助手
研究者番号 : 10433773