

令和元年6月25日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11207

研究課題名(和文)凝固、線溶系の制御からみた好酸球性副鼻腔炎の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)The parthenogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

高林 哲司 (Takabayashi, Tetsuji)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：70397272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アスピリン喘息患者の鼻茸は極めて難治性で易再発性である。鼻茸中には過剰なフィブリン網形成による粘膜浮腫が認められる。好酸球による凝固系因子tissue factor (TF)発現亢進が凝固系の異常亢進がフィブリン網の過剰形成に関与している。アスピリン喘息患者の鼻茸組織において、アクチン結合蛋白L-plastinの発現量の増加が認められた。L-plastinの発現量の増加は、好酸球のtissue factorを細胞表面へ表出させ、凝固系を亢進することによってフィブリン網を過剰に産生することで難治性の鼻茸形成に関与している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎は非常に難治性の疾患で厚生労働省によって指定難病に登録されている。本疾患において重症タイプのアスピリン喘息における鼻茸形成のメカニズムについてはこれまであまり分かっていなかった。今回の研究結果によって好酸球性副鼻腔炎における鼻茸形成メカニズムが解明され今後新規治療法の開発にも大きく役立つと思われる。

研究成果の概要(英文)：Nasal polyps from patients with aspirin-exacerbated respiratory disease (AERD) are defined by a predominant Th2 inflammation environment. L-plastin protein levels in nasal polyp tissue were increased in patients with AERD relative to those in patients with aspirin tolerant CRSwNP. Immunofluorescence analysis revealed that L-plastin was dominantly expressed in eosinophils and L-plastin and TF were co-expressed in eosinophils in AERD nasal polyp tissue. Silencing of L-plastin in Eo1-1 cells disrupted the cell surface distribution of TF by stimulation with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. The expression of L-plastin by eosinophils may contribute to abnormal fibrin deposition through TF translocation to the eosinophil cell surface in AERD nasal polyp tissue, which in turn may contribute to the pathogenesis of AERD.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 鼻茸 アスピリン喘息

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎：

近年の急激な環境の変化に伴うアレルギー疾患の増加に伴い、耳鼻咽喉科領域の疾患も大きく変化しつつある。慢性副鼻腔炎は蓄膿症として一般的に広く知られた疾患であり、マクロライド療法や、鼻内内視鏡手術によって良好な治療効果をおさめてきた。しかしこの 10 数年で内服治療に抵抗性で手術を行っても容易に再発する副鼻腔炎が増加している。組織学的に鼻粘膜への著明な好酸球の浸潤が見られることから好酸球性副鼻腔炎として従来の慢性副鼻腔炎とは区別されている。臨床的には篩骨洞や鼻腔を充満する易再発性の鼻茸、粘調な鼻汁、高度の嗅覚障害が特徴で気管支喘息やアスピリン喘息を合併する症例が多く、中耳炎を合併する症例では高度の難聴をきたすこともある。重症例では鼻内内視鏡手術の適応となるが副鼻腔粘膜の浮腫性病変が高度であり、術中の出血も多いことから予期せぬ頭蓋、眼窩内の損傷を来すこともあり深刻な医療事故の報告もしばしば聞かれる。ステロイド投与によって症状が軽減される場合もあるが効果が限定的であることが多く副作用の面からも長期の投与は望ましくない。本疾患は耳鼻咽喉科領域で現在最も治療に難渋する疾患の一つであり平成 27 年 7 月 1 日からは厚生労働省の指定難病にも定められ、病態メカニズムの解明と新たな治療方法の開発が急務である。

好酸球性副鼻腔炎の病態メカニズム：

好酸球性副鼻腔炎の治療を行う上で最も重要なことは、難治性、易再発性の鼻茸のコントロールである。申請者は鼻粘膜における過剰なフィブリン網の形成によって組織の浮腫が遷延化することが鼻茸形成に中心的な役割を果たしていることを報告した(研究業績 17)。これまで本疾患における研究の中心は好酸球浸潤を誘導する Th2 炎症メカニズムの解明であったが、この発見は極めてユニークで好酸球性副鼻腔炎研究のブレイクスルーともいえる成果である。通常フィブリン網の形成や分解は血管内で行われるが、最近ではフィブリン網の代謝が組織における創傷治癒や炎症においても見られることが明らかになってきた。フィブリン網はフィブリンを形成する凝固系、そして分解する線溶系によって巧みに制御され、生体のホメオスタシスが保たれている。これらのバランスの破綻は播種性血管内凝固症候群(DIC)を始め重篤な疾患の原因になりうる。申請者は好酸球性副鼻腔炎の鼻茸における過剰なフィブリン網の沈着は凝固因子の異常亢進と線溶系の抑制によるものであることを発見し、さらに好酸球性副鼻腔炎の鼻粘膜上皮における tissue plasminogen activator(t-PA)の発現とその活性が著明に抑制され、鼻粘膜に数多く浸潤したM2 マクロファージが凝固因子 Factor XIIIa を過剰に発現していることが凝固・線溶系の不均衡を誘導することによってフィブリン網の過剰な沈着の原因になっていることを明らかにした(研究業績 16、17)。これら以外にも数多くの分子が凝固・線溶系の制御に関与しており、本疾患におけるフィブリン網代謝の不均衡メカニズムの解明は非常に重要である。特に好酸球自身も凝固系に深く関与する可能性を示唆する研究結果も近年報告されており、鼻粘膜に著明に浸潤した好酸球が直接フィブリンの過剰沈着に関与している可能性が高い。疫学的な調査では Th2 炎症を有する患者は脳、心血管系の梗塞性疾患の罹患率が高いことも報告されており好酸球性副鼻腔炎の背景にある Th2 炎症も凝固・線溶系の制御以上に關与していると考えている。

2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎は極めて難治性の疾患であり厚生労働省の指定難病にも定められている。本疾患の治療において最も重要なのは再発性の高い鼻茸をいかにコントロールするかという事である。我々は副鼻腔粘膜の過剰なフィブリン網の沈着が鼻茸の形成に重要であることを明らかにしており、凝固系と線溶系の不均衡が好酸球性副鼻腔炎の病態に関与している可能性が高い。本疾患における凝固、線溶系の詳細な制御機構を手術で得られたサンプル、および培養細胞を用いて検討する。得られた結果をもとにモデルマウスを作製し、Th2 サイトカイン、スーパー抗原の疾患への影響の観察および新規治療方法の効果の検討を行う

3. 研究の方法

(1) 手術で採取した鼻粘膜サンプルを用いた凝固・線溶系関連分子の検討(高林、加藤) 当施設で行った鼻内内視鏡手術で得られた鼻粘膜を用いて凝固・線溶系に関与する分子(TAFI, 2 anti-plasmin, PAI-1, tissue factor, tanascin-C, L-plastin)の発現を real time PCR, ELISA, 免疫組織化学、フローサイトメトリーによって検討する。これらのサンプルは免疫組織化学によってフィブリン網の沈着度を定量し、それぞれ測定した分子との相関を検討しフィブリン網の形成に関与している可能性が高い分子を同定する。また蛍光免疫組織化学によってどの炎症細胞がフィブリン網の産生に影響しているかを解析する。

(2) 凝固・線溶系に与える肥満細胞と好酸球との相互作用についての検討(高林、加藤) ボランティアを募り、正常ヒト末梢血を採取し血液幹細胞 CD34+ cell を磁気ビーズを用いて分離する。IL-3, IL-6, stem cell factor で刺激を加え、ヒト肥満細胞に分化させ、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮に浸潤した肥満細胞と同じプロテアーゼ発現パターンに変化させる(この条件はこれまでの研究で確立している)。肥満細胞は凝固・線溶系に積極的に関与し、創傷治癒

を時間的空間的に支配している。フェノタイプを変化させた肥満細胞がどのように凝固・線溶系に影響を与えるかを検討する。現時点で t-PA の抑制に作用する PAI-1 の発現が大きく増加することを発見しており、臨床サンプルの結果と合わせて解析を行う。またタイプの肥満細胞の抽出物で培養好酸球 (EoI-1) に刺激を加えると tissue factor の発現量が増加することも明らかにしている (未発表データ) ので実際にどの分子が関与しているのかを検索する。また好酸球における Tissue factor の制御機構についても検討する。好酸球性副鼻腔炎の好酸球には L-plastin が非好酸球性副鼻腔炎に比べて優位に多く発現しており、この分子が細胞内で tissue factor を細胞表面にリクルートする事を発見しているが、これが実際に鼻粘膜におけるフィブリン網の形成に関与するのかが検証する。具体的な手法としては正常血液から血漿を分離し、これに L-plastin を強制発現および RNAi によって発現を抑制させた培養好酸球を加えフィブリン網形成に与える影響を観察する。

(3) 鼻粘膜上皮における t-PA 産生メカニズムの解明 (高林、坂下)

好酸球性副鼻腔炎の鼻茸粘膜における線溶系の抑制には粘膜上皮における t-PA の発現と活性の著明な抑制が関与している。発現量の低下には Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 の刺激によるものであることを培養細胞を用いた検討によって明らかにしているが、t-PA の活性の抑制に関するメカニズムは分かっていない。PAI-1 は直接 t-PA, u-PA を不活性化する働きがあり、本疾患にも関与している可能性がある。臨床サンプルを用いた検討によって PAI-1 の関連を解析し、培養気道上皮 (NHBE), 培養鼻粘膜上皮 (NEC) を用いてリコンビナント PAI-1 を加えることによって t-PA の活性を ELISA にて測定する。また実際の治療方法を考える上で鼻粘膜における t-PA の産生誘導は有効な手段の一つである。鼻粘膜上皮細胞が主な t-PA 産生細胞であり、前述のように Th2 サイトカイン刺激によって t-PA の産生が著明に低下することを明らかにしたが、t-PA の産生を亢進させる条件はまだ分かっていない。血管内皮細胞での報告であるがレチノイン酸が t-PA の発現亢進に関与するというデータもあり、レチノイン酸が気道上皮における t-PA 発現に関与するかどうかを real time PCR, ELISA によって検討する。さらに最適な条件を検索するため IL-17, IFN- γ とのコンビネーションも行う。

(4) 鼻粘膜のフィブリン網を直接分解する (高林、坂下)

難治性の鼻茸粘膜にはフィブリン網が過剰に形成されており、これは凝固系の亢進、線溶系の抑制効果によるものである。凝固・線溶系を修正することが治療方法としては理想だが、様々な因子が複雑に絡み合っているため解析には時間がかかる。そのため鼻茸内のフィブリン網を直接分解する方法の検討を行う。フィブリン網の分解には生体内では plasmin が関与しているためリコンビナントの、ダニ唾液腺の酵素である Longistatin、同じくヒルの Hirudin を手術摘出鼻茸に直接加えることで分解が可能かを検討する。解析には質量の変化、d-dimer の測定 (ELISA)、免疫組織化学の手法を用いて行う。

4. 研究成果

鼻粘膜における過剰なフィブリン網を強力な線溶活性酵素であるナットウキナーゼを用いて溶解する事が出来た。好酸球性副鼻腔の最重症タイプであるアスピリン喘息の鼻茸形成メカニズムにアクチン結合蛋白である L-plastin が鼻粘膜における凝固系亢進に深く関与し鼻茸の難治化に影響を与えることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

- 1) Takabayashi T, Tanaka Y: Increased expression of L-plastin in nasal polyp of patients with nonsteroidal anti-inflammatory drug exacerbated respiratory disease. Allergy. 2018 (In press)
- 2) Yoshida K, Takabayashi T (Corresponding author): Reduced nasal nitric oxide levels in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. Allergol Int. 2018 (In press)
- 3) Imoto Y, Takabayashi T: Combination therapy with montelukast and loratadine alleviates pharyngolaryngeal symptoms related to seasonal allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol Pract. 2018 Aug 10.
- 4) Ninomiya T, Takabayashi T: Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinitis with nasal polyps. Sci Rep. 2018 Jul

30;8(1):11450.

- 5) Kidoguchi M, Takabayashi T: DNA Methylation of Proximal PLAT Promoter in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. Am J Rhinol Allergy. 2018 Sep;32(5):374-379.
- 6) Kato Y, Takabayashi T: Expression and Functional Analysis of CST1 in Intractable Nasal Polyps. Am J Respir Cell Mol Biol. 2018 Oct;59(4):448-457.
- 7) Imoto Y, Takabayashi T: Short-chain fatty acids induce tissue plasminogen activator in airway epithelial cells via GPR41&43. Clin Exp Allergy. 2018 May;48(5):544-554.
- 8) Tokunaga T, Takabayashi T: The significant expression of TRPV3 in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis. Allergol Int. 2017 Oct;66(4):610-616.
- 9) Takabayashi T, Imoto Y(Corresponding author): Nattokinase, profibrinolytic enzyme, effectively shrinks the nasal polyp tissue and decreases viscosity of mucus. Allergol Int. 2017 Oct;66(4):594-602.

〔学会発表〕(計 21 件)

〔図書〕(計 3 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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤幸宜

ローマ字氏名：Kato Yukinori

所属研究機関名：福井大学

部局名：学術研究院医学系部門(附属病院部)

職名：助教

研究者番号(8桁): 00748981

研究分担者氏名：坂下雅文
ローマ字氏名：Sakashita Masafumi
所属研究機関名：福井大学
部局名：学術研究院医学系部門（附属病院部）
職名：講師
研究者番号（8桁）：40555455

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。