

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18723

研究課題名（和文）好酸球性副鼻腔炎に伴う神経性嗅覚障害の病態生理の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of neurological olfactory disorders associated with eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

籠谷 領二（KAGOYA, RYOJI）

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：90707762

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嗅覚障害を来す代表的疾患であるが、その病態生理の詳細は未解明である。本研究では活性型ビタミンD3誘導体を用いて、好酸球性炎症のマスター制御因子であるTSLPを多量に誘導することにより、鼻副鼻腔に重度の好酸球性炎症を起こすマウスモデルを確立した。そのモデルを用いて、マウスの嗅上皮に組織学的変化が生じていることを示した。本モデルでは、鼻粘膜下の好酸球浸潤だけでなく好塩基球やM2マクロファージの浸潤も認められ、ヒトの好酸球性副鼻腔炎の特徴を反映したモデルである。

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物理的な鼻閉だけでなく嗅神経系に様々な免疫学的影響を与えられ、ヒトの嗅上皮を採取して解析することは技術的・倫理的にやや困難であるため、優れた動物モデルが必要であった。本研究の成果により、鼻副鼻腔の好酸球性炎症が嗅神経系に与える影響の解析が可能になり、今後、嗅覚障害に対する有効な治療法確立に役立てることができると期待される。

研究成果の概要（英文）：Eosinophilic chronic rhinosinusitis is a typical disease that causes olfactory dysfunction, but the details of its pathophysiology have not been clarified. In the present study, we established a murine model that has severe eosinophil inflammation in the nasal mucosa by inducing a large amount of TSLP, which is a master regulator of eosinophil inflammation, using an active vitamin D3 analog. Using the model, we showed that histological changes in the olfactory epithelium of the mice. In the model, not only infiltration of eosinophils under the nasal mucosa but also infiltration of basophils and M2 macrophages was observed, which reflects the characteristics of human eosinophilic chronic rhinosinusitis.

研究分野：鼻科学、アレルギー学

キーワード：好酸球 好塩基球 嗅上皮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎は、鼻茸組織内における多数の好酸球浸潤に加えて IL-4、IL-5、IL-13 といった Th2 系サイトカインの増加を主な特徴としている。また、非好酸球性副鼻腔炎と比較して嗅覚障害を伴う頻度が非常に高いことも好酸球性副鼻腔炎の重要な特徴である。好酸球性副鼻腔炎に伴う嗅覚障害は鼻茸や鼻粘膜腫脹による伝導性障害によって起こるとこれまで考えられてきたが、嗅裂部閉塞の程度と嗅覚障害の重症度が必ずしも相関しないことから、単純閉塞だけではなく炎症による何らかの神経性障害も関与していると捉えられつつある (Rombaux P, et al. Curr Allergy Asthma Rep 2016)。しかし、鼻副鼻腔の好酸球性炎症がどのようなメカニズムで嗅上皮及びそれより中枢側の嗅神経伝導路に影響を及ぼすのかは不明であり、これを明らかにするためには優れた動物モデルを用いた基礎研究が不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、活性型ビタミン D3 アナログである MC903 を用いて多量の TSLP を誘導することにより鼻副鼻腔に TSLP 好塩基球軸による好酸球性炎症を起こすマウスモデルを作成し、同モデルにおける嗅粘膜上皮、嗅球の変化を解析し、鼻副鼻腔の好酸球性炎症が嗅覚神経伝導路に及ぼす影響を明らかにし、好酸球性副鼻腔炎に伴う嗅覚障害の有効な治療法開発に繋げることである。

### 3. 研究の方法

MC903 (2nmol/mouse) と OVA (100µg/mouse) を C57BL/6 マウス (8 週齢♂) の耳介皮膚に 14 日間塗布 (Day0 ~ 13) し、TSLP を誘導する。その後 OVA (2400µg/mouse) 点鼻を 5 日間行う (図 1)。対照群として、OVA のみを投与する群 (対照群 1) と MC903 と OVA のいずれも投与しない群 (対照群 2) を設定する。Day19 に sacrifice し、組織標本を得る回では 4%PFA による還流固定を行った後、鼻腔組織及び嗅球を採取し、4%PFA 固定・脱灰処理後、パラフィン包埋標本を作製する。遺伝子発現解析を行う回では、鼻腔組織及び嗅球組織から TRIzol を用いて RNA 抽出を行う。蛋白質発現解析を行う回では、鼻腔組織及び嗅球組織から蛋白質抽出を行う。鼻副鼻腔の好酸球性炎症が嗅神経系へ及ぼす影響を評価することが本研究の主目的であるため、粘膜下の好酸球浸潤を確認できればまずはモデル成立とする。

好酸球性副鼻腔炎モデルが成立したら嗅上皮、呼吸上皮の解析を行う。まずは嗅粘膜上皮における Olfactory marker protein (OMP) 陽性細胞数 (成熟嗅細胞の指標)、Ki-67 陽性細胞 (細胞増殖能の指標)、Caspase-3 陽性細胞数 (アポトーシスの指標) を免疫組織化学染色により評価し、対照群と比較して嗅粘膜上皮に対する影響の概要を把握する。また嗅粘膜下及び呼吸粘膜下における炎症細胞 (好酸球 (Siglec-F 陽性細胞)、好塩基球 (Mcpt8 陽性細胞)、リンパ球 (CD3 陽性細胞)、マクロファージ (F4/80 陽性細胞)) の浸潤度についても免疫組織化学染色により評価する。また嗅粘膜組織から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により少なくとも Th2 系サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) と、上皮性サイトカイン (TSLP、IL-33、IL-25)、嗅神経の増殖に寄与するサイトカインである IL-15、及びこれらの受容体の遺伝子発現レベルの解析を行う。

### 4. 研究成果

活性型ビタミン D3 誘導体をマウスの耳介に塗布することによって多量の TSLP 産生を誘導し、卵白アルブミン(OVA)の点鼻チャレンジと組み合わせて重度の好酸球性炎症をマウスの鼻副鼻腔に誘導するモデルを確立した。このマウスモデルでは、鼻粘膜下の好酸球浸潤に加えて、好塩基球や M2 マクロファージの浸潤が認められ、本実験系ではアレルギー性鼻炎に相当する群(対照群 1)と比較しても重度の免疫細胞浸潤が認められた。

また、本モデルでは対照群 1、対照群 2 と比べて 2 型炎症のマスタースイッチである TSLP や 2 型サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-13)、好酸球誘導ケモカイン(Eotaxin-1、Eotaxin-2)の増加が遺伝子レベル、蛋白質レベルとともに認められた。

、さらに嗅神経上皮の菲薄化、成熟嗅細胞(OMP 陽性細胞)の減少といった所見も認められ、ヒトの好酸球性副鼻腔炎の病態を反映したモデルと考えられた。特に嗅上皮領域については、ヒトの組織試料を得ることが難しい領域であるため、本モデルを用いた解析が、好酸球性副鼻腔炎の嗅神経系に与える影響を解明する上で有用と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kagoya Ryoji, Kondo Kenji, Kishimoto Urata Megumi, Shimizu Yuya, Kikuta Shu, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 A murine model of eosinophilic chronic rhinosinusitis using the topical application of a vitamin D3 analog	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.14627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 籠谷領二、近藤健二、岸本めぐみ、清水裕也、菊田周、山岨達也
2. 発表標題 活性型ビタミンD3誘導体塗布による好酸球性副鼻腔炎モデルにおける嗅上皮変化の検討
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 籠谷領二、他
2. 発表標題 活性型ビタミンD3誘導体塗布による好酸球性副鼻腔炎モデルマウスの検討
3. 学会等名 第58回 日本鼻科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------