

令和元年6月13日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10792

研究課題名(和文)慢性副鼻腔炎のEndotypeに基づく難治化因子のエピジェネティクス機構の解明

研究課題名(英文) Identification of epigenetic mechanisms of intractable factors based on endotypes of chronic rhinosinusitis

研究代表者

吉川 衛 (YOSHIKAWA, Mamoru)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：50277092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性副鼻腔炎の術後の予後について、統計学的にリスク因子を同定したところ、これまで指摘されてきた好酸球関連因子はリスク因子とならなかった。また、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を基盤とした手法を用いて、好酸球性副鼻腔炎および非好酸球性副鼻腔炎患者から採取した組織中の遺伝子発現解析を実施し、慢性副鼻腔炎における8つの特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定した。さらに、好酸球性副鼻腔炎における遺伝子発現を制御する上流因子を特定するため、パスウェイ解析を行ったところ、transforming growth factor (TGF- β)などが好酸球性副鼻腔炎の上流因子の一つとして同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎や非好酸球性副鼻腔炎などのフェノタイプとは関係のない、治療抵抗性に関するエンドタイプを同定することにより、これまで報告されてきた好酸球に関連する因子以外の難治化因子が明らかとなった。その結果、既存の治療に抵抗性の慢性副鼻腔炎に対する、新規治療の開発や創薬に繋がることが期待される。また、慢性副鼻腔炎患者の術後の予後とDNAマイクロアレイによる鼻組織の網羅的遺伝子発現解析をもとにした病態のエンドタイプ分類は、慢性副鼻腔炎全体の治癒率の向上に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Hierarchical clustering and principal component analysis (PCA) collectively showed that eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps (ECRSwNP) and non-ECRSwNP (NECRSwNP) had distinct gene expression patterns. Of note, these genes could be divided into 8 distinctive clusters having different expression patterns and functions. Upstream Regulator Analysis revealed that not only T-helper 2 (Th2) and the eosinophilia-related molecules (IL4, IL5, and CSF2) reported so far, but also cell cycle regulators (CDKN1 and CCND1) and a tissue fibrosis-related molecule (TGF- β) were identified in ECRSwNP. On the other hand, mainly interferons (IFNs) and acute inflammatory cytokines (IL1 and IL6) were predicted as upstream regulators in NECRSwNP. These results are useful for understanding the molecular basis of the mechanisms of CRSwNP and point to new targets for developing specific biomarkers and personalized therapeutic strategies for CRSwNP.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：慢性副鼻腔炎 マイクロアレイ フェノタイプ エンドタイプ エピジェネティクス

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

1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎は、粘膿性鼻漏、鼻閉、嗅覚障害、頭重感などの生活に支障をきたす症状が長期にわたって持続し、かつ比較的罹患率の高い疾患である。近年、その中に手術を行っても再発をくり返す難治性の病態が存在することが問題となっており、その特徴として成人発症で嗅覚障害を主訴とし、気管支喘息を伴い、鼻茸のための鼻閉と粘調な鼻汁を示し、鼻粘膜に多数の好酸球を認めることがわかってきた。現在、このような病態は本邦では好酸球性副鼻腔炎と呼ばれている。好酸球性副鼻腔炎の患者数は約 35,000 ~ 50,000 人と推定されているが、原因は不明で未だ治療法も確立されていない。

副腎皮質ステロイドに対する反応はあり、その中止により再燃することから、経験的治療としてその投与が行われているのが現状である。しかし、好酸球性副鼻腔炎患者の治療において、副腎皮質ステロイドによる一定の治療効果はあるものの、局所投与でコントロール可能な軽症例から全身投与を行っても再発を繰り返す重症例までさまざまな病態が存在する。また研究代表者らの予備検討より、術後再発を起こした予後不良症例の中には、末梢血中や組織中に好酸球をそれほど認めない症例が少なからず存在し、さらにこれらの症例の鼻組織中の mRNA 発現を DNA マイクロアレイで解析した結果、インターフェロン誘導性遺伝子の発現が増強している傾向がみられた。すなわち、難治性の慢性副鼻腔炎においては好酸球以外に予後を左右する因子が存在することが推測された。

2. 研究の目的

慢性副鼻腔炎患者の予後と DNA マイクロアレイによる鼻組織の網羅的遺伝子発現解析をもとに病態におけるエンドタイプを明らかにし、既成概念にとられない予後不良因子の解明と新規治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

好酸球性副鼻腔炎の概念にはとられない、予後に基づいた難治性の慢性副鼻腔炎の病態を解明することを目的として、慢性副鼻腔炎のフェノタイプに注目した病態分類と予後調査を行う。そこから得られたサブグループごとに鼻組織から total RNA を抽出して、DNA マイクロアレイで網羅的遺伝子発現解析を行い慢性副鼻腔炎のエンドタイプを明らかにする。特に、これまで難治化因子として解析を行ってきたインターフェロン誘導性遺伝子群など、予後に関連すると思われるエンドタイプの遺伝子については、qPCR および ELISA による再現性の確認を行う。さらに、IFN 誘導性遺伝子群の発現が増強しているエンドタイプの鼻組織より線維芽細胞を培養し、インターフェロン誘導性遺伝子群の発現を確認するとともに、培養細胞におけるエピジェネティックな変化についても検討を行う。これらにより、慢性副鼻腔炎のエンドタイプとそれに基づく難治化因子の解明を行う。

4. 研究成果

研究代表者は、好酸球性副鼻腔炎の治療として、内視鏡下鼻内副鼻腔手術による病変の除去と副鼻腔（篩骨蜂巣）の単洞化を行った後に、局所ステロイドの継続による術後治療を必ず行っている。その結果、予後不良といわれる好酸球性副鼻腔炎においても、ほとんどの症例で病態の制御が可能である。そこで、術後の予後について、統計学的にリスク因子を同定したところ、これまで指摘されてきた好酸球関連因子は、リスク因子とならなかった。すなわち、好酸球に関連する因子は既存の治療で制御できることが示唆された。それでも再燃を繰り返す難治例が存在するが、組織中好酸球数が 70 個/HPF 以下である症例が多く、既存の治療に抵抗性の症例を含むエンドタイプには、好酸球に関連する因子以外の難治化因子が関与していることが予想された。

次に、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を基盤とした手法を用いて、好酸球性副鼻腔炎お

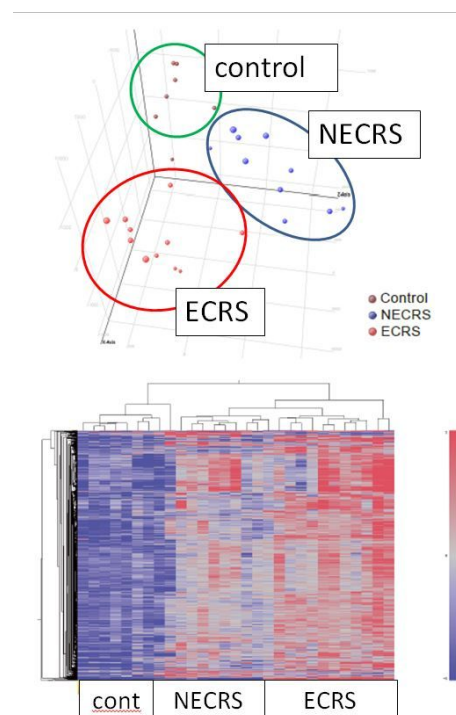


図1 PCA 解析(上)およびクラスター解析(下) ECRS は NECRS とは異なる遺伝子発現プロファイルをもつ

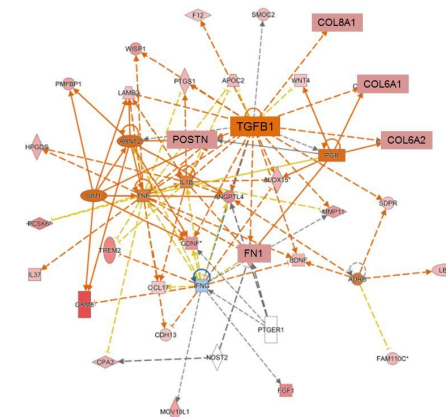


図2 パスウェイ解析(IPA) TGF- は ECRS 組織中における遺伝子発現を制御する上流因子のひとつである

よび好酸球性副鼻腔炎患者から採取した組織中の遺伝子発現解析を実施した。その結果、好酸球性副鼻腔炎（ECRS）においては好酸球性副鼻腔炎（NECRS）や正常粘膜組織（control）とは異なる、特徴的な遺伝子発現プロファイルが存在することを同定した（図 1）。さらに、好酸球性副鼻腔炎における遺伝子発現を制御する上流因子を特定するため、パスウェイ解析を行った。その結果、transforming growth factor (TGF)- β が好酸球性副鼻腔炎の上流因子の一つとして同定された（図 2）。この結果をもとに、2018 年度基盤研究(C)「慢性副鼻腔炎における TGF- β が誘導する治療抵抗性メカニズムの解明」（課題番号 18K09329）を遂行している。

最後に、慢性副鼻腔炎におけるエピジェネティクスの関与を調べるため、鼻茸組織由来の培養線維芽細胞について、網羅的な DNA メチル化解析を行った。その結果、鼻茸組織由来の線維芽細胞では、正常粘膜組織由来細胞に比べて、広範な DNA メチル化の変動が確認された。すなわち、鼻茸組織中の組織構成細胞は、エピジェネティクスな経路を介して表現型が変化しているという重要な知見を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) Nakayama T, Sugimoto N, Okada N, Tsurumoto T, Mitsuyoshi R, Takaishi S, Asaka D, Kojima H, Yoshikawa M, Tanaka Y, Haruna SI. JESREC score and mucosal eosinophilia can predict endotypes of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Auris Nasus Larynx*. 2019; 46: 374-383. doi: 10.1016/j.anl.2018.09.004. 査読あり
- 2) 吉川衛. 【バイオマーカー】好酸球性副鼻腔炎のバイオマーカー. *臨床免疫・アレルギー科* 2018; 70: 249-254. 査読なし
- 3) Okada N, Nakayama T, Asaka D, Inoue N, Tsurumoto T, Takaishi S, Otori N, Kojima H, Matsuda A, Oboki K, Saito H, Matsumoto K, Yoshikawa M. Distinct gene expression profiles and regulation networks of nasal polyps in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018; 8: 592-604. doi: 10.1002/alr.22083. 査読あり
- 4) Nakayama T, Okada N, Yoshikawa M, Asaka D, Kuboki A, Kojima H, Tanaka Y, Haruna SI. Assessment of suitable reference genes for RT-qPCR studies in chronic rhinosinusitis. *Sci Rep*. 2018; 8: 1568. doi: 10.1038/s41598-018-19834-9. 査読あり
- 5) 吉川衛. 【好酸球性副鼻腔炎の効果的な治療法-私の治療戦略-】好酸球性副鼻腔炎とは. *ENTONI* 2017; 209: 1-7. 査読なし
- 6) 吉川衛. 慢性副鼻腔炎における病態分類とエンドタイプについて. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* 2016; 34:203-209. doi: 10.5648/jjiao.34.203. 査読あり
- 7) Fujishima H, Okada N, Matsumoto K, Fukagawa K, Igarashi A, Matsuda A, Ono J, Ohta S, Mukai H, Yoshikawa M, Izuhara K. The usefulness of measuring tear periostin for the diagnosis and management of ocular allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 138: 459-467.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2015.11.039. 査読あり

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1) 井上なつき, 横井佑一郎, 青木由香, 両角尚子, 高畑喜臣, 久保田俊輝, 穠山直太郎, 大原関利章, 吉川衛: スエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)の特異的 IgE 抗体のみが検出されたアレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎についての検討. 第 37 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 大阪府大阪市, 2019/02
- 2) 井上なつき, 横井佑一郎, 葉山奈々, 両角尚子, 高畑喜臣, 久保田俊輝, 吉川衛: 慢性副鼻腔炎に対する内視鏡下鼻内副鼻腔手術の予後についての検討. 第 57 回日本鼻科学会総会・学術講演会, 北海道旭川市, 2018/09
- 3) 井上なつき, 横井佑一郎, 両角尚子, 高畑喜臣, 宮下文織, 久保田俊輝, 穠山直太郎, 吉川衛: 鼻噴霧用ステロイドによるアレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎の病態の制御についての検討. 第 6 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, 石川県金沢市, 2018/09
- 4) 岡田直子, 中山次久, 浅香大也, 井上なつき, 吉川衛: 好酸球性副鼻腔炎における遺伝子発現プロファイル解析. 第 36 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 山口県下関市, 2018/02
- 5) 井上なつき, 葉山奈々, 両角祥子, 中野光花, 高畑喜臣, 竹ノ谷亜希子, 久保田俊輝, 吉川衛: 内視鏡下鼻内副鼻腔手術を施行したアレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎についての臨床的検討. 第 56 回日本鼻科学会総会・学術講演会, 山梨県甲府市, 2017/09
- 6) Nakano M, Inoue N, Hayama N, Morozumi S, Takahata Y, Takenoya A, Kubota T, Akiyama N, Yoshikawa M: Effects of postoperative topical intranasal corticosteroids in eosinophilic rhinosinusitis. *Rhinology World Congress - Hong Kong 2017, Hong Kong, China*, 2017/09
- 7) 吉川衛, 井上なつき, 葉山奈々, 両角尚子, 中野光花, 高畑喜臣, 久保田俊輝, 竹ノ谷亜希子, 穠山直太郎, 森脇宏人: アレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎についての臨床的検討. 第

- 48 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会，福井県福井市，2017/07
- 8) 吉川衛：シンポジウム 15 好酸球性副鼻腔炎、慢性副鼻腔炎のフェノタイプ-診断と治療、その違い- 遺伝子発現プロファイリングによる好酸球性副鼻腔炎の病態解析。第 66 回日本アレルギー学会学術大会，東京都千代田区，2017/06
 - 9) 中野光花，井上なつき，葉山奈々，両角尚子，高畑喜臣，竹ノ谷亜希子，山口宗太，穂山直太郎，森脇宏人，吉川衛：好酸球性副鼻腔炎における術後治療のアドヒアランスと予後についての検討。第 118 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会，広島県広島市，2017/05
 - 10) 井上なつき，葉山奈々，両角尚子，中野光花，中山朱里，高畑喜臣，竹ノ谷亜希子，山口宗太，大久保はるか，森脇宏人，吉川衛：内視鏡下鼻内副鼻腔手術を施行した副鼻腔真菌症症例の検討。第 55 回日本鼻科学会総会・学術講演会，栃木県宇都宮市，2016/10
 - 11) 中野光花，葉山奈々，中山朱里，坂口雄介，高畑喜臣，井上なつき，竹ノ谷亜希子，山口宗太，大久保はるか，森脇宏人，吉川衛：好酸球性副鼻腔炎における術後治療のアドヒアランスと予後についての検討。第 55 回日本鼻科学会総会・学術講演会，栃木県宇都宮市，2016/10
 - 12) 吉川衛：副鼻腔真菌症の臨床 overview。第 60 回日本医真菌学会総会・学術集会，東京，2016/10
 - 13) 井上なつき，中野光花，中山朱里，坂口雄介，高畑喜臣，竹ノ谷亜希子，山口宗太，大久保はるか，森脇宏人，吉川衛：難治性の慢性副鼻腔炎に対する内視鏡下鼻内副鼻腔手術の予後についての検討。第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会，愛知県名古屋，2016/05
 - 14) Okada N, Nakayama T, Asaka D, Matsuda A, Saito H, Yoshikawa M, Matsumoto K : Distinct and common gene expression profiles of nasal polyp tissues in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 2016, Los Angeles, USA, 2016/03
 - 15) 井上なつき，中山朱里，中野光花，坂口雄介，高畑喜臣，山口宗太，大久保はるか，森脇宏人，吉川衛：難治性の慢性副鼻腔炎に対する内視鏡下鼻内副鼻腔手術の予後についての検討。第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会，広島県広島市，2015/10
 - 16) 吉川衛，浅香大也，中山次久，井上なつき[†]，鴻信義：日米の鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎における組織中遺伝子発現についての検討。第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会，広島県広島市，2015/10
 - 17) Yoshikawa M, Sakaguchi Y, Takahata Y, Inoue N, Sawai R, Okubo H, Yamaguchi S, Moriwaki H : Increased Th1 cells infiltration in nasal polyps from patients with refractory chronic rhinosinusitis and asthma. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2015, Barcelona, Spain, 2015/06

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松本 健治

ローマ字氏名：(MATSUMOTO, Kenji)

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。