

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20278

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 treatment strategy in eosinophilic rhinosinusitis based on anti-oxidant reaction

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：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。活性は非常に不安定なため、組織の保存法、従来の活性測定法を改良した。また、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・リモデリングについて検証した。さらに、組織中の好酸球との関連についても検証した。鼻茸組織をLaser microdissectionにより鼻茸上皮を採取して、鼻茸上皮のSODのmRNA発現を検証した。鼻茸上皮から抽出できるRNAは非常に微量で単位時間で分解が進行するため、効率よくRNA抽出する方法を改良した。

研究成果の概要(英文)：The SOD activity was examined in the eosinophilic and non-eosinophilic CRS with nasal polyps as well as control sinus mucosa. The results can be summarized as follows: i) the SOD activity of the CRS groups was significantly decreased compared with that of the controls; ii) immunostaining of both CuZnSOD and MnSOD of the eosinophilic group was significantly decreased compared with that of the non-eosinophilic and control groups; iii) CuZnSOD mRNA of the eosinophilic group was significantly decreased compared with that of the control; iv) MnSOD mRNA of the eosinophilic group was significantly decreased compared with those of the non-eosinophilic and control groups. In conclusion, a disrupted balance between the oxidant generation mediated by recruited eosinophils and the oxidant defense system of SOD is suggested to play an important role in the formation and exacerbations of CRS with nasal polyps.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：Superoxide dismutase 好酸球性副鼻腔炎 鼻茸 Laser microdissection 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(quality of life, 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、IL-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、IL-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)。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

難治性の好酸球性副鼻腔炎の病態が、喘息の病態と類似している事に着目して、好酸球、好中球、マクロファージの浸潤の程度、また活性酸素の防御因子(抗酸化酵素)である Superoxide Dismutase (SOD)について解析する。また、SOD には subtype があり、気道上皮では特有の局在を呈するので、subtype についても同様に検証する。

研究の第一段階として、活性酸素との関連における、鼻茸組織中の抗酸化酵素の SOD 活性について検証する。活性は非常に不安定なため、組織の保存法、従来の活性測定法を改良していく。

研究の第2段階として、鼻茸組織中の炎症細胞浸潤の程度を解析するため、免疫染色法を改良し、適切な染色条件を検証する。また、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・リモデリングについて検証する。さらに、組織中の好酸球との関連についても検証する。

研究の第3段階として、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 発現を検証する。鼻茸上皮から抽出できる RNA は非常に微量で単位時間で分解が進行するため、効率よく RNA 抽出する方法を改良していく。

3. 研究の方法

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。手術時に採取された検体は、直ちに-80℃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℃のフリーザーに

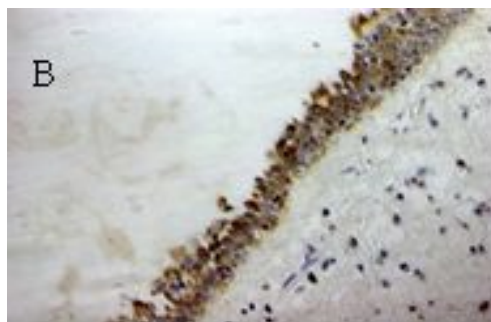
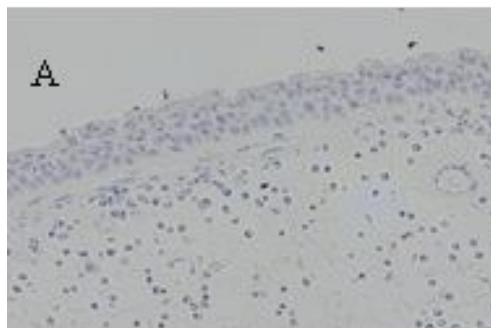
保存。鼻茸組織は一定量の5mm角に刻んで、組織を超遠心機にてホモジナイズした上清を測定試料とする。同時に、蛋白定量も行う。各ウェルにサンプル溶液を入れていき、順序希釈していく。プレートリーダーで450nmの吸光度を測定して、SOD活性を測定する。活性はすぐに酵素分解が進行するので、なるべく新鮮な組織を使用する。ホルマリン固定-パラフィン包埋処理、パラフィン切片の作成を行う。切片は3.5 μ mとする。H.E染色で400倍視野で平均3視野好酸球数カウント、好酸球数100以上のものを好酸球性副鼻腔炎、100未満のものを非好酸球性副鼻腔炎と診断(臨床症状も考慮)する。コントロールとして正常の蝶形骨洞粘膜を使用して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。

免疫染色は脱パラを行い洗浄。Autoclaveが必要な抗体は121 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 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。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。採取された検体は直ちに、O.C.T compoundにて-80 に保存。クリオスタットにて8 μ 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 Laser microdissection 使用にて SOD が発現する上皮のみ採取する。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. 研究成果

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 の関連性について、以下の項目を検証した。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



鼻茸の SOD 局在

A: 好酸球性副鼻腔炎

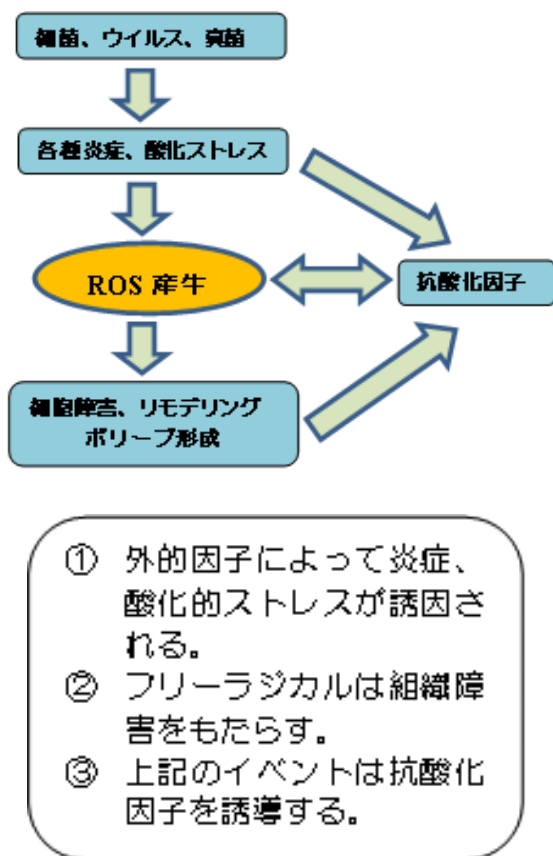
B: 非好酸球性副鼻腔炎

好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮では SOD は有意に低下している。この事より、活性酸素による SOD の消費などが考

microdissection で鼻茸上皮採取、RT-PCR による SOD の mRNA の発現量測定である。

研究の第1段階として、活性酸素との関連における、鼻茸組織中の抗酸化酵素の SOD 活性について検証する。活性は非常に不安定

なため、組織の保存法、従来の活性測定法を改良した。第2段階として、鼻茸組織中の炎症細胞浸潤の程度を解析するため、免疫染色法を改良し、適切な染色条件を検証する。また、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・リモデリングにつ



て検証した。さらに、第3段階として、組織中の好酸球や粘膜の上皮障害との関連についても検証する。第4段階として、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 発現を検証する。鼻茸上皮から抽出できる RNA は非常に微量で単位時間で分解が進行するため、効率よく RNA 抽出する方法を改良した。

好酸球性副鼻腔炎は高度の嗅覚障害、鼻閉、膠状の粘稠な鼻汁を呈し、喘息合併頻度が高く、著しく QOL を低下させる治療抵抗性の難治性副鼻腔炎である。その多くが、薬剤治療抵抗性であり、手術治療となるケースが多い。しかし、術後経過不良で再発するケース

も多く、同時に喘息の悪化も伴う。

本研究は好酸球性副鼻腔炎の分子病態・機序を解明する突破口を開き、根本的治療の実現に正面から取り組むものである。これらの基礎研究は、これまでの報告ではほとんどない極めて独創性の高い研究である。この技術が臨床に適用されると、鼻科学に新しい局面を迎えることができる。鼻汁、鼻閉、後鼻漏、嗅覚障害などの鼻症状、頭痛、頬部痛などに悩み、苦しむ数百万人の患者への大きな福音となり、国民生活の質的向上をもたらす極めて有意義な研究である。将来的には、活性酸素が関連する本疾患に対して、既存の薬物治療、手術治療とは異なる新規の抗酸化酵素剤の治療法の開発が期待できる。

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)

Takeshi Kusunoki, Noritsugu Ono and Katsuhisa Ikeda. Correlations between Cu, Zn-Superoxide dismutase and Macrophages or MUC5AC in Human Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. J Otol Rhinol 2015 S1, 10-14 査読有

Shiozawa, A., Miwa, M., Ono, N., Homma, H., Hirotsu, M., and Ikeda, K. Comparative analysis of cytokine release from epithelial cell cultures of the upper airway. Rhinology 2015 53, 135-141

Ono N., Ito S, Homma H, Okada H, Murata J, Ikeda K. Endoscopic endonasal management of recurrent maxillary mucoceles using biliary T-tube stenting. Ear Nose Throat J. 2017 Dec;96(12):469-476 査読有

Ikeda K, Ito S, Homma H, Ono N., Okada H, Kidokoro Y, Shiozawa A, Kusunoki T. Orbital Injury in Endoscopic Sinus Surgery for Sinonasal Inflammatory Disorders: Juntendo's Ten-Year Experience. International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery 2017,

6, 65-70 査読有

Ikeda K, Ito S, Homma H, Ono N, Okada H,
Kidokoro Y, Shiozawa A, Kusunoki T.
Endonasal Endoscopic Anterior Skull Base
Surgery for Sinonasal Malignancies: Juntendo's
Experience. Juntendo Medical Journal 2017.

63(4)279-284 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小野 倫嗣 (ONO, Noritugu)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10433773