

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20281

研究課題名(和文) 好酸球性副鼻腔炎における自然免疫と獲得免疫の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of innate and acquired immunity in eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

杉本 直基 (Sugimoto, Naoki)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20771405

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)：ADAM-like decysin1(ADAMDEC1)は炎症の早期の役割を担うと報告されているが、本研究において鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎の病因に関与するADAMDEC1の役割を調査した。ADAMDEC1は正常状態では他臓器と同様に鼻には発現はほとんどないが、鼻茸を伴う非好酸球性副鼻腔炎や喘息非合併の鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎で発現が高く、またADAMDEC1はCD68陽性細胞であるマクロファージに発現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎は再発や増悪を繰り返す難治性の慢性副鼻腔炎であり、その特徴としては、成人発症で早期に嗅覚障害を呈し、気管支喘息を合併するとともに、鼻内に多発性の鼻茸と粘調性鼻汁を認める。病態に関しては、未だに解明されていないことが多い。本研究の結果から、非好酸球性副鼻腔炎患者や喘息非合併の慢性副鼻腔炎患者の鼻茸においてADAMDEC1の発現が高いことがわかった。今後、研究を積み重ねることで、好酸球性副鼻腔炎の病態解明を目指したい。

研究成果の概要(英文)：The metalloproteinase ADAM-like decysin 1 (ADAMDEC1) has been reported to play a role in the early stages of the inflammatory response. We investigated the role of ADAMDEC1 in the pathogenesis of CRSwNP. We compared ADAMDEC1 expression in nasal polyp tissue from CRS patients using immunohistochemistry and RT-qPCR. ADAMDEC1 was virtually undetectable in tissues from control patients but was highly expressed in the NECRSwNP group compared with the ECRSwNP group. ADAMDEC1 was expressed by CD68-positive cells, with a positive correlation between ADAMDEC1-positive and CD68-positive cells, and also between ADAMDEC1 and CD68 mRNA levels. This study demonstrates that ADAMDEC1 is involved in the pathogenesis of NECRSwNP, and also bacterial endotoxin signalling in macrophages; however, the underlying mechanism remains to be elucidated.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 鼻茸 好酸球 マクロファージ 好塩基球 ADAMDEC1

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1)好酸球性副鼻腔炎

慢性副鼻腔炎の病態は従来は感染を契機として発症する慢性化膿性副鼻腔炎が主体であり、マクロライド療法や内視鏡下鼻内手術の普及により治療成績は向上した。しかし、これらの治療に抵抗し、再発や増悪を繰り返す難治例が増加し問題となってきた。その特徴としては、成人発症で早期に嗅覚障害を呈し、気管支喘息を合併するとともに、にかわ状の粘調性鼻汁を認める。このような難治性副鼻腔炎を春名らは 2001年に好酸球性副鼻腔炎として提唱し、疾患概念は広く普及した。しかし、診断基準が長らくなく、臨床のみならず基礎研究においても障害となってきたが、2015年にTokunaga らにより診断基準が報告された(Tokunaga T, et al. Allergy 2015;70; 995-1003.)。これにより好酸球性副鼻腔炎の病態解明に向けた研究がさらに進むことが期待されている。

(2)好酸球性副鼻腔炎の病態と好酸球浸潤に関わる自然免疫・獲得免疫応答

好酸球性副鼻腔炎の病態は未だ不明な点が多いが、好酸球性副鼻腔炎の患者の鼻副鼻腔粘膜に、強い好酸球浸潤が引き起こされる原因には、黄色ブドウ球菌の外毒素であるエンテロトキシンがスーパー抗原もしくはアジュバントとして関与すること(Bachert C, et al. J Allergy Clin Immunol 2001;107:607-614.)や真菌抗原の中でも特にAlternariaの関与(Inoue Y, et al. J Immunol 2005;175:5439-5447.)が報告されてきた。好酸球性炎症はこれまでTh2 細胞を介した獲得免疫によりIL-5,IL-13が産生され引き起こされるとされてきた。近年自然免疫として上皮細胞由来サイトカインであるIL-33,TSLPがTh2細胞を介することなく好酸球性炎症を惹起する病態が明らかになってきている。特に2010年にType 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2s)が同定され、上皮細胞サイトカインであるIL-33, IL-25の刺激によりIL-5,IL-13を短時間にしかも大量に産生することが明らかになり、気道上皮における好酸球性炎症の病態の一端が明らかになりつつある。これまでの我々の検討では、好酸球性副鼻腔炎症例における副鼻腔粘膜では、非好酸球性副鼻腔炎症例と比較してILC2sの増加を認めることを明らかにしている。また、2015年にEndoらはTh2細胞の中でも特に長期間生存する病原性メモリーTh2 細胞が、IL-33の受容体であるST2を高発現し、IL-33の刺激によりIL-5を著しく産生することを明らかにした(Endo Y, et al. Immunity 2015;42:294-308.)。この報告では、好酸球性副鼻腔炎症例においても検討を行っており、非好酸球性副鼻腔炎患者と比較して好酸球性副鼻腔炎患者のメモリーCD4 T細胞が IL-33 に反応してIL-5を著しく産生することを明らかにしている。好塩基球は白血球の0.5%以下の自然免疫細胞であり長らく機能が不明であったが、IgE 依存的慢性炎症に関わることが明らかにされて以来注目を集めている免疫細胞である。その機能には不明な点も多いが、慢性副鼻腔炎においても2015年にKagoyaらは、好酸球性副鼻腔炎群と非好酸球性副鼻腔炎群との比較において、好酸球性副鼻腔炎群において好塩基球浸潤が強く認められることを報告した(Kagoya R, et al. Ann Allergy Asthma Immunol.2015;114:30-35)。我々も好酸球性副鼻腔炎における鼻副鼻腔粘膜で好塩基球の浸潤を免疫染色にて確認している。IL33の受容体であるIL1RL1(ST2)は、メモリーTh2細胞、肥満細胞、NKT細胞とともに好塩基球とILC2s にも発現している。近年ILC2s の活性化にはIL-33の刺激により好塩基球から産生されるIL-4が必要であり、システインプロテアーゼにより誘導される好酸球性炎症の病態に関わることが報告されている (Motomura Y, et al. Immunity 2014;40:758-71)。このことから好塩基球は、好酸球性炎症の免疫動態に強く関与しており、そのため鼻茸組織内の好塩基球浸潤度が重症度の指標となると示唆している。

2. 研究の目的

慢性副鼻腔炎における難治例である好酸球性副鼻腔炎は、術後再発をきたしやすい症例に好酸球浸潤が多いことから疾患概念が生まれた。当然、好酸球浸潤が病態の主体と考えられてきたが、そのSourceについて不明な点が多かった。しかし、近年の研究で好酸球性炎症を引き起こす機序として、自然免疫においては自然リンパ球・好塩基球、獲得免疫においては病原性メモリーTh2細胞がそれぞれIL-5を介して好酸球浸潤に関わることが明らかになってきている。本研究では、いまだ病態に不明な点が多い好酸球性副鼻腔炎の鼻副鼻腔粘膜における好酸球浸潤に至る機序を自然免疫と獲得免疫の両面から解析を行うことで、好酸球性副鼻腔炎の病態解明と新規治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1)症例登録

鼻茸・副鼻腔粘膜、副鼻腔貯留液などの検体の採取目的に、手術予定の慢性副鼻腔炎患者を対象に60症例を目標として症例登録を行う。また、対照症例として眼窩底骨折整復術・下垂体手術施行症例を20例を登録する。

(2)臨床検査項目

- ①自覚症状:自記式アンケート調査(7-scale Linkert scale)を行う。
- ②副鼻腔CT所見:Lund-Mackay scoring systemを用いて0-24にスコア化する。
- ③鼻ポリープの評価:内視鏡下に観察を行い、0-4にスコア化する。
- ④血液検査所見:血中好酸球数、好塩基球、血清総IgE値、各種抗原特異的IgE値を測定する。

(3)好酸球性副鼻腔炎の診断

採取した鼻副鼻腔粘膜組織をホルマリン固定して保存し、HE染色を行い粘膜上皮下の好酸球数を計測する。難治性疾患等克服研究事業「重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と治療法確立に関する研究」(JESREC Study)による好酸球性副鼻腔炎の診断基準に従い、臨床スコアを満たすとともに組織中好酸球数70個以上(400倍視野)を好酸球性副鼻腔炎と診断する。

(4)副鼻腔粘膜局所免疫に関わる因子の測定

①検体の採取

術中採取した副鼻腔粘膜組織に重さ0.1gあたり1mlのPBS with Tween20を加えon iceでhomogenizeする。その後4°Cで10分間4,000rpmで遠心し上清を-80°Cで凍結保存する。また、副鼻腔に貯留しているムチンも同時に採取した後同様に上清を採取し凍結保存する。

②ELISA/Real time PCRによるサイトカインの測定

Th1サイトカイン(IFN- γ), Th2サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13) 自然免疫応答関連サイトカイン(IL-1b, TSLP, IL-18, IL-25, IL-33)、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-8)、免疫抑制性サイトカイン(IL-10, IL-35), Th17 サイトカイン(IL-17)の蛋白濃度をELISA法にて検出する。さらにDAMPsの指標としてHigh-mobility group box 1(HMGB1)、LDHの測定も行う。また、採取した組織をRNA later(Life Technologies)に保存後、NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel)を用いてRNAを抽出し、PrimeScript RT reagent kit(Takara)にてcDNAを合成する。その後、上記サイトカインについてSYBR Premix Ex Taq(Takara)を用いたインターカレーター法によりReal time PCRを行い上記サイトカインmRNAの発現を測定する。

③フローサイトメトリー

鼻副鼻腔粘膜・鼻茸組織をRPMI、DNase、CollagenaseIV下にgentle MACS、MACSmix Tube Rotatorを用いてSingle cell suspensionを行う。

各種免疫細胞の同定は、・ILC2s:lineage^{neg}/CD45⁺/CD127⁺/CRTH2⁺・好塩基球:lineage^{neg}/抗HLA-DR⁺/CD123⁺・病原性メモリーTh2 細胞:CD4⁺/CD45RO⁺/CD62L^{low}/CXCR3^{low}で行う。

④細胞培養

鼻副鼻腔粘膜・鼻茸組織のSingle cell suspensionを96 wellプレートに 2.5×10^5 cellsずつ分注した後、IL-2/IL-33 にて刺激を行い8日間培養を行う。その後回収して遠心後上清をELISAにてIL-5,IL-13の測定を行う。

4. 研究成果

鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎は好酸球性副鼻腔炎 (ECRSwNP) と非好酸球性副鼻腔炎 (NECRSwNP) に分類される。好酸球性副鼻腔炎の炎症のメカニズムは解明されてきているが、非好酸球性副鼻腔炎は十分にわかっていない。ADAM-like decysin1 (ADAMDEC1) は ADAM ファミリーに属するメタプロテアーゼであり、炎症の早期の役割を担うと報告されているが、今回鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎の病因に関する ADAMDEC1 の役割を調査した。

対象症例 88 例の鼻茸組織または鉤状突起を採取した。その内訳は好酸球性副鼻腔炎 (ECRSwNP) 40 例、非好酸球性副鼻腔炎 (NECRSwNP) 35 例、コントロール群 13 例であった。平均年齢、性別に有意差を認めず、好酸球性副鼻腔炎患者は血中好酸球数は優位に高かった。非好酸球性副鼻腔炎患者はコントロール群と比較して CD68 陽性細胞、MPO 陽性細胞が優位に多かった。

免疫組織化学染色において ADAMDEC1 陽性細胞はコントロール群ではほとんどなかったが、非好酸球性副鼻腔炎患者や好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸組織には検出された。非好酸球性副鼻腔炎患者はコントロール群と比較して、ADAMDEC1 陽性細胞は優位に多かった。また ADAMDEC1 の mRNA 発現量は非好酸球性副鼻腔炎患者はコントロール群や好酸球性副鼻腔炎患者と比較して高かった。また ADAMDEC1 は CD68 陽性細胞であるマクロファージに発現していることが明らかとなった。ADAMDEC1 陽性細胞数は CD68 陽性細胞に相関するが、MPO 陽性細胞や好酸球数には相関しなかった。リアルタイム PCR 解析においても ADAMDEC1 と CD68 は mRNA レベルで相関が見られた。

本研究において ADAMDEC1 は鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎に発現し、細菌感染に伴う免疫システムに関係している可能性を示した。今後鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎の病因として ADAMDEC1 の役割をさらなる調査研究で解明することが必要である。

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 Sugimoto Naoki, Nakayama Tsuguhisa, Kasai Yoshiyuki, Asaka Daiya, Mitsuyoshi Ryoto, Tsurumoto Tadao, Takaishi Shinya, Omae Sachiko, Kojima Hiromi, Tanaka Yasuhiro, Haruna Shin-Ichi	4. 巻 138
2. 論文標題 The role of ADAM-like decysin 1 in non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 830～836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1080/00016489.2018.1481296	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----