

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11367

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎の発症因子と増悪因子の解明

研究課題名(英文)Factors in the pathogenesis and exacerbation of eosinophilic sinusiti

研究代表者

和田 弘太(WADA, Kota)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20307482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：副鼻腔由来上皮細胞と鼻ポリープから得られた線維芽細胞を用いて検討を行った。TLR3のリガンドであるPoly I;Cを用いて刺激を行った。上皮細胞をTh2サイトカイン刺激を行うとTSLPは検出されなかった。しかし、上皮細胞においてPoly I;C刺激を行うとTSLPの検出が可能であった。Poly I;Cだけ加えるよりも、Th2サイトカインとPoly I;Cを加えるとTSLP産生量が増加し、特にECRS重症例でその傾向が顕著であった。また、局所リンパ球についても検討した。ポリープを伴う副鼻腔炎の中で、ECRSと非ECRSで比較した結果、ECRSでは優位にCD4+T細胞/B細胞比が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治である好酸球性副鼻腔炎は今までは手術とステロイドのみが効果的な治療であった。昨今は分子標的薬(抗IL-4, IL-13受容体抗体療法)が保険適応となった。今回の治療で、TSLPもターゲットサイトカインとなりうることを示された。しかし、TSLPのみをブロックするのではなく、Th2サイトカインも同時にブロックするカクテル療法のような治療の開発が重要である可能性が示唆された。また、ペリオスチンも同様にターゲットとなりうると予想される。今後、これらの基礎研究が臨床の現場へ貢献できると信じている。

研究成果の概要(英文)：The study was performed using sinus-derived epithelial cells and fibroblasts obtained from nasal polyps, and stimulation was performed using Poly I;C, a ligand for TLR3. TSLP was not detected when epithelial cells were stimulated with Th2 cytokines. However, when Poly I;C stimulation was performed on epithelial cells, TSLP could be detected, and the addition of Th2 cytokines and Poly I;C increased TSLP production more than the addition of Poly I;C alone, especially in severe cases of ECRS. Local lymphocytes were also studied. In sinusitis with polyps, the CD4+ T cell/B cell ratio was predominantly higher in ECRS compared to non-ECRS.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 上皮細胞 線維芽細胞 TSLP Th2サイトカイン ペリオスチン 難治性

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎は 2015 年に厚生労働省より難病に指定された。好酸球性副鼻腔炎の臨床的な所見が明らかにされたが、その発生的な要因・病因、そして難治化の因子は解明できていない。副鼻腔炎の原因としては、鼻中隔彎曲症や副鼻腔自然口 (Osteomeatal complex) の閉塞など、解剖学的な内因的要因と、バイオフィルムや骨炎といった難治性感染、黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原、好酸球性炎症を誘発・維持する真菌のコロニー形成などの外因的要因が挙げられる。気管支喘息合併副鼻腔炎患者やアスピリン喘息合併副鼻腔炎患者は明らかな解剖学的な異常や外的な要因は認めないにも関わらず、内服治療や手術療法に抵抗を示す。このような症例は、日本では好酸球性副鼻腔炎という概念として一般化され、日本耳鼻咽喉科学会、日本アレルギー学会でも認められている。しかし、欧米での副鼻腔炎の概念は、European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps (EPOS) で示されるように、Chronic rhinosinusitis (CRS) with nasal polyp (NP) と CRS without NP とポリープの有無で区別され、患者がもつアトピー素因などのバックグラウンドは無視されてしまう。好酸球性副鼻腔炎は、日本で初めて概念として報告され、臨床的には確固とした概念として成立しているが、欧米において認識されない理由は、副鼻腔炎は成因が複雑で、様々な病態に分けて検討することが困難であるからと思われる。

上気道、下気道ともに気道の炎症には様々な細胞が関係しており病因の解明を複雑にしている。気道上皮細胞、線維芽細胞などの上皮と間質の細胞、そして上皮 - 上皮下に浸潤している好酸球、好中球、リンパ球、NKT 細胞、マクロファージ、肥満細胞など様々な細胞が複雑に関与しており、最近では Innate lymphoid cell など重要な役割を演じているとされる。気道上皮細胞は、呼吸によって外界と初めて接し、特に鼻副鼻腔粘膜上皮はファーストバリアとして重要である。また、バリアとしての機能だけでなく、外界からの刺激に反応し、多様な細胞応答を引き起こす。外的因子によって傷害を受けた気道上皮細胞は、粘膜下に存在する線維芽細胞や炎症細胞を活性化する。私が Research fellow として在籍した、Mayo Clinic の Allergic disease research laboratory からの研究でも、Allergen からの Protease やウイルス感染は上皮細胞を刺激し、IL-6, IL-8, GM-CSF さらには TSLP や IL-33 を分泌することが明らかにされている。最近では上皮細胞や線維芽細胞から分泌される IL-25, IL-33, TSLP が重要である。IL-33 は上皮細胞や血管内皮細胞より産生され、肥満細胞、好酸球、マクロファージ、樹状細胞を標的として ST2/IL-1RAcP 受容体と結合して、自然型アレルギー炎症を引き起こす。Mayo Clinic からも、IL-33 はヒト好酸球が ST2 分子を発現し、IL-33 が好酸球の生存率を上昇させ、superoxide 誘導能、好酸球の脱顆粒を引き起こすことを報告している。IL-33 は PAMPs (pathogen associated molecular patterns) としてだけでなく、DAMPs (damage associated molecular patterns)、"Alarmin" として働き、アレルギー疾患の発症と増悪に関与している。また、IL-33 は正常粘膜内でも恒常的に産生されている。TSLP も主として上皮細胞から産生され、TSLPR を持つ樹状細胞に作用すると炎症性 Th-2 型 T 細胞分化を誘導し、アレルギー性疾患で発現が増強する。IL-25 も近年、Th2 細胞が産生する IL-17 ファミリーとして同定された。上皮細胞や好酸球、肥満細胞も IL-25 を産生することが分かっている。このように上皮は免疫機構において、重要なバリアの役割を担い、上皮-上皮下の細胞-炎症細胞の関係を調べることは病因を調べる上で、重要と考える。これらの IL-33, TSLP, IL-25 は Th2 細胞を介することなく、直接に好酸球、好塩基球、肥満細胞を刺激してアレルギー炎症を惹起できることも明らかになっている。

我々は、これまで真菌、特に *Alternaria* の炎症やアレルギーに対する役割を研究してきた。*Alternaria* は気管支喘息の増悪因子として重要である。*Alternaria* は好酸球を脱顆粒させ、上皮細胞から IL-8, GM-CSF を、線維芽細胞から IL-6 を産生させる。樹状細胞には Th2 タイプの反応を誘発し、TLR3 を

介してウイルス感染防御機能を減弱させるなど、免疫機能に対する影響が明らかにされている。また、積極的に、樹状細胞、線維芽細胞のウイルス感染に対する反応を、IP-10 をアウトプットに検討してきた。

次にこれらの反応を誘発する因子は何なのであろうか？細菌、ウイルス、真菌などの感染、Allergen が持つ protease、ATP などを含めた PAMPs/DAMPs などが挙げられる。私どもはウイルス感染がトリガーになると仮説を立てている。特に、好酸球性副鼻腔炎も気管支喘息もいわゆる感冒を契機に症状の悪化を認める。ウイルス感染にひき続く細菌感染がさらなる増悪を来すものと想像している。

2．研究の目的

好酸球性副鼻腔炎は、気管支喘息やアスピリン喘息など好酸球性の炎症疾患を有する患者が多い。気管支喘息やアスピリン喘息も同様に、治療は確立されつつあるが、根本的な病因の解明や発症の要因は明らかになっていない。そこで、我々は副鼻腔粘膜、鼻ポリープを用いて、これら難治性副鼻腔炎の原因を追究し、最終的には気管支喘息、アスピリン喘息の病因に迫りたいと考えている。また、難治化の因子の初期スイッチとしてウイルス感染を予測している。好酸球性副鼻腔炎の悪化時の鼻汁中、ウイルスを同定することで、難治化の因子まで迫りたいと考えている。すなわち、好酸球性副鼻腔炎の発症因子と増悪因子の解明を目指したい。

3．研究の方法

我々の施設では年間 300 件ほどの副鼻腔手術症例(ESS)がある。これらの副鼻腔炎患者を 健康常人(眼窩壁骨折患者など) 喘息非合併患者 アトピー型気管支喘息合併患者 非アトピー型気管支喘息合併患者 アスピリン喘息合併患者の 5 群に分け検討を行うが、全て好酸球性副鼻腔炎の診断ガイドライン(JESREC Study)の 4 つの重症度分類にも同時に分ける。手術より鉤状突起、鼻ポリープを採取し、それより上皮細胞、線維芽細胞を培養し検討を行う。この細胞をウイルス疑似である TLR3 ligand である Poly I:C にての刺激に加え、ATCC から RS ウィルスにて刺激を行う。RS ウィルスは乳幼児では重篤化しやすい。通常成人であれば感冒症状を来します。しかし、好酸球性副鼻腔炎患者や気管支喘息患者では悪化や重症化する。これらの群間で TSLP、の産生を観察する。

東邦大学倫理委員会、病原体等安全管理委員会の承認のもと、発症因子の解明のために、手術から得られた組織から上皮細胞、線維芽細胞を培養し、dsRNA と RS ウィルスで刺激を行い、TSLP 産生をみる。組織サンプルの免疫染色を行い IL-33 の局在、群間差を観察する。

気道上皮細胞は前部篩骨洞粘膜(鉤状突起、篩骨胞)より培養する。得られた組織を骨組織より剥離し、小片にする。これを 型コラーゲンでコートされた培養皿で、Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM) を用いて培養する。この方法で得られた、継代 3 代目までの細胞を用いて dsRNA、RS ウィルスで刺激を加える。刺激後、8 時間で mRNA を抽出し、刺激を 24 時間、48 時間後の培養上清を ELISA で TSLP、IL-25 の産生量を検討する。今までの予備実験では dsRNA 単独では TSLP の産生は低いため、Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 を加え刺激を行うことも併用する。鼻ポリープを、副鼻腔粘膜同様に小片にし、DMEM/F12 に 10% の Fetal calf serum を加えた培養液で培養を行うと線維芽細胞が得られる。継代 5 代目までの細胞を用いて同様の刺激を行い、上皮 - 上皮下の相互関係を検討する。増悪因子の検討のために、副鼻腔炎増悪時の鼻腔洗浄液を用いて検討を行う。東邦大学微生物・感染症学講座の協力のもと、鼻腔洗浄液を multiplex PCR 法を用いて遺伝子検査を行い原因ウイルス・細菌の検討を行う。細菌感染は培養でも同定はできるが、ウイルスはなかなか難しくこのような方法を用いることで JESREC Study で重症例の入る症例の増悪因子となりうる感染症の同定ができるものと期待している。

4．研究成果

東邦大学倫理委員会承認のもと、通常の臨床手術から得られる検体を用いて行っている。副鼻腔炎

の診断で内視鏡下鼻副鼻腔手術を施行した症例と、コントロールとして下垂体手術症例、眼窩壁骨折症例を用いて採取した。鉤状突起から副鼻腔由来上皮細胞(気道細胞)を鼻ポリープから線維芽細胞を培養し検討を行った。副鼻腔炎はウイルス感染を契機に増悪し細菌感染を引き起こす。そのため、ウイルス感染の疑似となる TLR3 のリガンドである Poly I;C を用いて刺激を行っている。また、好酸球性副鼻腔炎 (E CRS) は、免疫・アレルギー疾患のひとつと考えられている。副鼻腔由来上皮細胞において Poly I;C 刺激を行うと上清中の TSLP の検出が可能であった。Th2 サイトカインだけの刺激では検出されなかった。それにも関わらず、Poly I;C だけ加えるよりも、Th2 サイトカインと Poly I;C を加えると TSLP 産生量が増加し、特に E CRS 重症例でその傾向が顕著であった。また、局所(鉤状突起粘膜)のリンパ球についても検討した。ポリープを伴う副鼻腔炎の中で、E CRS と非 E CRS で比較した結果、E CRS では優位に CD4+T 細胞/B 細胞比が高かった。この結果は E CRS の病態に Th2 型反応が関与する可能性が示唆された。免疫・アレルギー疾患において線維芽細胞から産生されるペリオスチンも重要であることから、線維芽細胞に Poly I;C または RS ウィルス液で刺激を加えてペリオスチンの mRNA 発現の検討を行ったが、発現量がそれぞれ微弱であったため、比較検討することが難しかった。今後は、倫理申請変更のうえ、通常廃棄する術中洗浄廃液から副鼻腔粘膜における様々な免疫応答を中心とした発現プロファイルを網羅的に解析することを検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Akiko Inoue, Yuriko Tanaka, Shinya Ohira, Kentaro Matsuura, Motonari Kondo, Kota Wada	4. 巻 25(3)
2. 論文標題 High CD4+ T-Cell/B-Cell Ratio in the Paranasal Sinus Mucosa of Patients with Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Archives of Otorhinolaryngology	6. 最初と最後の頁 e416-e420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0040-1715587	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 -

1. 著者名 Yoshiyuki Watanabe *, Seto Yukiko, Ritsuko Oikawa, Takara Nakazawa, Hanae Furuya, Hidehito Matsui, Sachiko Hosono, Mika Noike, Akiko Inoue, Hiroyuki Yamamoto, Fumio Itoh, Kota Wada	4. 巻 21 (10)
2. 論文標題 Mouthwash-Based Highly Sensitive Pyro-Genotyping for Nine Sexually Transmitted Human Papilloma Virus Genotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21103697	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 -

1. 著者名 Shinya Ohira, Kentaro Matsuura, Hidehito Matsui, Mitsuto Nakamura, Kazuhisa Kamiyama, Riko Kajiwara, Akiko Inoue, Kota Wada	4. 巻 131 (1)
2. 論文標題 Anatomical Factors that Can Predict the Structure of Lamina Papyracea for Endoscopic Sinus Surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E19 -E25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.28644	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 Akiko Inoue, Yuriko Tanaka, Motonari Kondo, Hidehito Matsui, Takara Nakazawa, Shinya Ohira, Hiroshi Osafune, Kota Wada
2. 発表標題 More severe ECRS patients produce more TSLP in the paranasal sinus mucosa
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田弘太、井上彰子、田中ゆり子
2. 発表標題 酸球性副鼻腔炎における難治化因子の解明により下気道疾患の病因を探る
3. 学会等名 第157回東邦医学会例会
4. 発表年 2021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