

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791240
 研究課題名（和文） 真菌による好酸球性副鼻腔炎の発症とその病態解明に関する研究
 研究課題名（英文） Clarification for the pathogenesis and its onset of Eosinophilic Rhinosinusitis caused by Fungi.
 研究代表者：松脇 由典（MATSUWAKI YOSHINORI）
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：60287290

研究成果の概要：

- 1) Protease Activated Receptor (PAR)-2 および PAR-3 は慢性副鼻腔炎の病態に関与している可能性が示唆された。特に炎症性細胞種とそれぞれの PAR-2・PAR-3 の発現率の違いが慢性副鼻腔炎の病態に大きく関与していると考えられた。PAR-2 および PAR-3 をターゲットとした慢性副鼻腔炎の治療戦略の可能性が示唆された。
- 2) 鼻副鼻腔炎において真菌や黄色ブドウ球菌由来抗原量に違いを認め、好酸球炎症の誘導に寄与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,200,000	0	2,200,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	90,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎、慢性副鼻腔炎、真菌、好酸球、アレルギー性真菌性副鼻腔炎

1. 研究開始当初の背景

副鼻腔炎の中にはこれらの治療を行っても、ポリープの再発を繰り返す難治性副鼻腔炎が増えてきている。これら難治性副鼻腔炎はアスピリン喘息や非アトピー型喘息を合併していることが多く、副鼻腔粘膜や鼻茸組織中に多数の好酸球有意な炎症性細胞浸潤を認め、洞内にも粘稠・ニカワ状の好酸球性ムチンが貯留しているのが特徴である。我々は、副鼻腔粘膜に著明に活性好酸球が浸潤した副鼻腔炎を好酸球性副鼻腔炎 (Eosinophilic rhinosinusitis) と呼称するこ

とを提案した。

副鼻腔粘膜に著明に好酸球が浸潤する原因として、真菌の関与が指摘され、そのような副鼻腔炎はアレルギー性副鼻腔真菌症 (Allergic fungal sinusitis: AFS) と呼ばれ、欧米では手術を必要とする慢性副鼻腔炎患者の 4～7% 程度、本邦でも我々が行った前向き研究では、手術を必要とする慢性副鼻腔炎患者の約 4% が AFS であった。また二重盲検試験により通常の慢性副鼻腔炎に対し抗真菌剤であるアンホテリシン B による鼻洗浄が有意に有効であり、慢性副鼻腔炎の発症メ

カニズムあるいは少なくとも増悪因子として真菌（とくに *Alternaria*）が関与していることが示唆された（Ponikau JU et al. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:125-31）。

このように真菌が慢性副鼻腔炎の発症に大きく関わっていることは明らかであるが、正常者の鼻副鼻腔中あるいは慢性副鼻腔真菌症（*Mycetoma*）患者の罹患副鼻腔中にも同様に真菌（*Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Cladosporium*）は存在する（*Mayo Clin Proc* 1999;74:877-84）。慢性副鼻腔炎患者だけが真菌に反応しアレルギー炎症を引き起こすメカニズムは未だ不明である。また正常者に比較して、気管支喘息患者の気管支粘膜において PAR-2 の発現が増強され、さらにステロイド抵抗性である難治症例にその割合が高いことが報告された（*J Allergy Clin Immunol* 2001;108:797-803）。しかし上気道とくに慢性副鼻腔炎やアレルギー性鼻炎における PAR-2 の発現に関する知見はない。また慢性副鼻腔炎をアレルギー合併症（アトピー型喘息、非アトピー型喘息、アスピリン喘息、アレルギー性鼻炎）ごとに各病態群に細かく分類し、その免疫状態（サイトカイン、ケモカイン環境）を検討した研究も少ない。また欧米では真菌による好酸球性副鼻腔炎の発現頻度が検討され報告されているが、本邦ではその報告はない。

2. 研究の目的

以上の研究背景と現在までの我々の研究成果から、私は次の仮説を提唱したい。仮説 1) 慢性副鼻腔炎患者は正常者と比較して、真菌由来の外因性 protease に対し過剰な反応を引き起こす準備状態となっている。そのメカニズムとして、仮説 1-1) 慢性副鼻腔炎患者の副鼻腔粘膜では正常者に比較して PAR-2 の発現が増強されている。仮説 1-2) 慢性副鼻腔炎患者の免疫担当細胞表面上に発現する PAR-2 の発現型が正常者とは異なり、活性化されやすい。仮説 1-3) 慢性副鼻腔炎患者の罹患副鼻腔には、真菌が感染増殖し、その貯留液中には真菌より分泌された Aspartate protease 活性あるいは PAR-2 cleavage 活性が高く、局所への好酸球浸潤の程度に比例している。仮説 2) 難治性副鼻腔炎と考えられている非アトピー型喘息・アスピリン喘息を合併した副鼻腔炎はとくに PAR-2 の発現が強く、その免疫状態はいわゆる Th2 like immune response(IL-5, IL-13, IFN-gamma 高値)である。

これらの仮説を明らかにするべく本研究を遂行したい。

3. 研究の方法

1) 慢性副鼻腔炎における Protease Activated Receptors 発現の検討

鼻茸を有する慢性副鼻腔炎患者を①気管支喘息合併群 (ATA)、②アスピリン喘息合併群 (AIA)、③アレルギー性鼻炎合併群 (AR)、④アレルギー疾患合併症なし群 (CRS)、に分類し、さらにコントロール群 (Cont.) として⑤副鼻腔炎を合併せず副鼻腔經由に手術を施行した下垂体腫瘍患者を加え検討した。組織の採取に際し、提供者の人権および利益の保護について配慮し、検体提供と本研究の意義を説明した上で患者本人の同意を得た。方法は ABC 法にて PAR-1, 2, 3, 4 のポリクローナル抗体を用い免疫染色を行った。また陽性細胞の判定のために好酸球 (抗 ECP 抗体)、好中球 (抗エラスターゼ抗体)、リンパ球 (抗 CD3 抗体)、マクロファージ (抗 CD68 抗体) に対する二重染色を行った。

2) 鼻副鼻腔炎における真菌抗原、黄色ブドウ球菌スーパー抗原による好酸球ならびに好中球炎症の検討

アレルギー性鼻炎 (コントロール)、慢性化膿性副鼻腔炎、好酸球性副鼻腔炎 (ステロイドなし)、好酸球性副鼻腔炎 (ステロイドあり)、アレルギー性真菌性副鼻腔炎 (AFRS)、副鼻腔真菌症に群分けし、術中採取した鼻汁中の EDN, Elastase, B-D グルカン, Asp f1, Alt a1, Aspartate protease, SEA, SEB 量を ELISA にて計測し比較検討した。

4. 研究成果

1) 慢性副鼻腔炎における Protease Activated Receptors 発現の検討

上皮細胞および局所に浸潤した炎症性細胞両者とも AIA>ATA>CRS>AR は Cont. と比較して有意に PAR-2、PAR-3 の発現が増強されていた。PAR-1、PAR-4 の発現増強はどの群においても Cont. と差を認めなかった。炎症性細胞の二重染色において、PAR-2 陽性細胞における好酸球の占める割合は、AIA=ATA (80%)>AR (40%)>CRS (25%)>Cont. (0%) であり、一方好中球の占める割合は、CRS (35%)>AR (30%)>ATA (5%)>AIA= Cont. (0%) であった。PAR-3 陽性細胞も PAR-2 陽性細胞とほぼ同様の傾向であった。さらに好酸球における PAR-2 および PAR-3 の発現率は AIA= ATA (95%)>AR =CRS (50%)>Cont. (10%) であり、同様に局所に浸潤した好酸球であっても PAR-2・PAR-3 の発現率に違いを認めた。以上の結果から PAR-2 および PAR-3 は慢性副鼻腔炎の病態に関与している可能性が示唆された。特に炎症性細胞種とそれぞれの PAR-2・PAR-3 の発現率の違いが慢性副鼻腔炎の病態に大きく関与していると考えられた。PAR-2 および PAR-3 をターゲットとした慢性副鼻腔炎の治療戦略の可能性が示唆された。

2) 鼻副鼻腔炎における真菌抗原、黄色ブドウ

ウ球菌スーパー抗原による好酸球ならびに好中球炎症の検討

EDN は AFRS において有意に高値を示した。Elastase は慢性副鼻腔炎群においてほとんど差がなく、アレルギー性鼻炎に比較し高い傾向を示した。慢性副鼻腔炎群はアレルギー性鼻炎に比較し有意に B-D グルカンの上昇を認めた。Aspartate protease は、AFRS において、Asp f1 および SEB は好酸球性副鼻腔炎において他群に比較し有意に高値を示し、EDN との相関を認めた。以上より鼻副鼻腔炎において真菌や黄色ブドウ球菌由来抗原量に違いを認め、好酸球炎症の誘導に寄与している可能性が示唆された。

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 11 件)

1. Yoshinori Matsuwaki, Hirohito Kita, 他6名. RECOGNITION OF FUNGAL PROTEASE ACTIVITIES INDUCES CELLULAR ACTIVATION AND EOSINOPHIL-DERIVED NEUROTOXIN RELEASE IN HUMAN EOSINOPHILS. *J Immunol* (投稿中)
2. Plager DA, Henke SA, Matsuwaki Y, Madaan A, Squillace DL, Dierkhising RA, Kita H: Pimecrolimus Reduces Eosinophil Activation Associated with Calcium Mobilization. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:119-126.
3. Matsuwaki Y, Moriyama H, 他 6 名. Chronic rhinosinusitis: risk factors for the recurrence of chronic rhinosinusitis based on 5-year follow-up after endoscopic sinus surgery. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146 Suppl 1:77-81. 2008.
4. 中山次久, 小森 学, 高柳博久, 米本友明, 松脇由典. アレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎 (AFRS) の検討.耳鼻咽喉科展望 51;2:82-91, 2008.
5. 松脇由典, 他 6 名. ナビゲーションシステム(イメージガイド手術支援機器)を用いた内視鏡下鼻内副鼻腔手術のこれまでの経験と術中画像更新について.耳鼻咽喉科展望 51; 359-362, 2008
6. 松脇由典, 内水浩貴, 森山寛. 好酸球性中耳炎・副鼻腔炎の病態と治療. *アレルギーの臨床* 2007; 27(9): 688-692.
7. 松脇由典. 好酸球性副鼻腔炎における真菌の関与. *JOHNS* 2007; 23(6):847-852.
8. Matsuwaki Y, White T, Hotta K, CB Lawrence, Kita H. Aspartate Protease

from *Alternaria* induced GM-CSF, IL-6, and IL-8 production, and calcium signaling in human airway epithelial cells through a Protease Activated Receptor-2 (PAR-2). *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119(1)

9. 松脇由典, 浅香大也, 大櫛哲史, 吉田拓人, 鴻信義, 森山寛. 好酸球性副鼻腔炎の疫学, 病態, 治療. *日本鼻科学会誌* 2007; 46(1):42-3.
10. 松脇由典. DPCに対応したクリニカルパスの実際—内視鏡下鼻副鼻腔手術—.耳鼻咽喉科・頭頸部外科 2007;79(3):255-65.
11. Matsuwaki Y, White T, Hotta K, Kita H. Exogenous Chitinase Activate and Induce Degranulation of human Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(2), Suppl:189

[学会発表] (計 18 件)

1. Yoshinori Matsuwaki, Christopher B. Lawrence, Hirohito Kita. An Exogenous Glycosidase, Xylanase, Induces Human Eosinophil Degranulation Through Protease-Activated Receptor-2 (PAR-2). American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting. March 17th 2009, Washington, DC
2. 松脇由典. 副鼻腔炎遷延化・難治化の最近の問題, 好酸球性副鼻腔炎—真菌の関与について—. 第 4 7 回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会, 第 3 7 回鼻科学臨床問題懇話会(招待講演). 名古屋市. 2008
3. 松脇由典, 他 7 名. 家庭用空気清浄機による花粉症抑制効果の検討(二重盲検比較試験). 第 5 8 回日本アレルギー学会秋季学術大会 11 月, 東京. 2008
4. 松脇由典, 他 6 名. アレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎 (AFRS) の臨床的検討. 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 5 月、大阪市. 2008
5. D. Asaka, Y. Matsuwaki, T. Ohtori, T. Nakajima, H. Moriyama, H. Saito. Fungal Antigens From *Alternaria* Induce Cytokine Production by Human Nasal Fibroblasts. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting. March 17th 2008, Philadelphia.
6. T. Yoshida, Y. Matsuwaki, D. Asaka, H. Moriyama. The role of Protease-Activated Receptors (PARs) in Chronic Rhinosinusitis (CRS). American

- Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting. March 17th 2008, Philadelphia.
7. 中山次久, 小森学, 高柳博久, 米本友明, 松脇由典, 森山寛. 慢性副鼻腔炎手術症例における Allergic fungal rhinosinusitis(AFRS)の検討. 日本鼻科学会 9月 2007, 宇都宮
 8. 松脇由典, 浅香大也, 吉田拓人, 小島純也, 柳清, 鴻信義, 森山寛. 鼻性髄液漏に対する内視鏡下鼻内法による整復術. 日本鼻科学会 9月 2007, 宇都宮
 9. 小島純也, 松脇由典, 鴻信義, 浅香大也, 吉村剛, 三浦正寛, 中島庸也, 森山寛 Allergic fungal rhinosinusitis(AFRS)に対する内視鏡下鼻内手術と術後の治療について. 日本耳鼻咽喉科学会. 5月 2007, 金沢
 10. 松脇由典, 石戸谷淳一, 竹内万彦, 山本陸三朗. 好酸球性副鼻腔炎の克服に向けて. 好酸球性副鼻腔炎一疫学, 病態 (AFSの病態も含め), 治療法の工夫一第 45 回日本鼻科学会総会, 第 35 回鼻科学臨床問題懇話会. 四日市, 9月. (シンポジウム). 2007
 11. 松脇由典, White TA, Hotta K, 吉田拓人, 森山寛, CB Lawrence, Hirohito Kita. 真菌 *Alternaria* によるヒト気道上皮細胞のサイトカイン・ケモカイン産生および細胞内カルシウムシグナルのメカニズムについて. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 11月. (ミニシンポジウム). 2007
 12. Matsuwaki Y, White T, Hotta K, CB Lawrence, Kita H. Aspartate Protease from *Alternaria* induced GM-CSF, IL-6, and IL-8 production, and calcium signaling in human airway epithelial cells through a Protease Activated Receptor-2 (PAR-2). AAAAI 2007, March, San Diego, USA.
 13. Matsuwaki Y, White TA, Inoue Y, Kita H, Yanagi K, Yoshida T, Ootori N, Moriyama H. Aspartate protease from environmental fungus, stimulate activation and degranulation of human eosinophils through a protease activated receptor-2 (PAR-2). The 11th Asian Research Symposium in Rhinology. 2006; Nov, Seoul, Korea.
 14. 松脇由典, White TA, 吉田拓人, 森山寛, Hirohito Kita. 真菌 *Alternaria* によるヒト気道上皮細胞のサイトカイン・ケモカイン産生および細胞内カル

シウムシグナルのメカニズムについて. 第 107 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 東京, 5月. 2006.

15. 松脇由典, White TA, 吉田拓人, 森山寛, Hirohito Kita. 真菌 *Alternaria* による気道上皮細胞のサイトカイン産生および細胞内カルシウムシグナルについて. 第 45 回日本鼻科学会総会. 四日市, 9月. 2006
16. 松脇由典. いわゆる好酸球性副鼻腔炎における真菌の関与一真菌 (とくに *Alternaria*) による好酸球性炎症のメカニズム一. 第 1 回気道アレルギー研究会. 秋田, 5月. 2006.
17. 松脇由典. いわゆる好酸球性副鼻腔炎における真菌の関与一真菌 (とくに *Alternaria*) による好酸球性炎症のメカニズム一. 第 57 回臨床アレルギー研究会. 東京, 6月. 2006.
18. 松脇由典. カビによるアレルギー性鼻炎と副鼻腔炎. 東京都耳鼻科医会. 東京, 3月. 2006.

〔図書〕 (計 3 件)

1. 松脇由典. Q&A でわかるアレルギー 疾患真菌と副鼻腔炎の関係は? 真菌と副鼻腔炎の関係について教えてください. (株)丹水社 2008
2. 松脇由典, 森山寛. 難治性副鼻腔炎 (多発性鼻茸) の診断. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科診療のコツと落とし穴②鼻・副鼻腔疾患, 神崎仁編集, 中山書店 2006:26-7
3. 松脇由典. カビによるアレルギー性鼻炎・副鼻腔炎, スギ・ヒノキ花粉以外のアレルギーによる鼻結膜炎. 小児アレルギーシリーズ, 花粉症と周辺アレルギー疾患. 診断と治療社 2007:142-6.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松脇 由典 (MATSUWAKI YOSHINORI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60287290

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし