

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18718

研究課題名（和文）IL-12による好酸球性副鼻腔炎の病態制御機構の解明

研究課題名（英文）Effect of interleukin-12 on the regulatory mechanism of eosinophilic chronic rhinosinusitis by IL-12

研究代表者

中園 彬（Nakazono, Akira）

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：90581041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：好酸球性副鼻腔炎では鼻副鼻腔粘膜におけるタイトジャンクション（TJ）の形成低下およびバリア機能低下が発症メカニズムにおいて重要である。インターロイキン12(IL-12)のバリア機能への影響を確認するため、IL-12投与によるバリア機能への影響を評価した。好酸球性副鼻腔炎および非好酸球副鼻腔炎いずれの群においても、IL-12投与によるバリア機能の有意な差を認めなかった。またTJを構成するタンパク質であるZO-1について免疫蛍光染色法で評価したが、発現に有意差を認めなかった。これらの結果からは、IL-12は鼻腔粘膜上皮細胞ではなく粘膜下組織において作用している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎は両側鼻腔の鼻茸および粘稠な鼻汁により、高度な鼻閉と嗅覚障害を示す難治性の疾患であり、厚生労働省が定める指定難病の一つである。発症機序は未解明であり、そのメカニズムを明らかにすることは新規治療法を開発する上で非常に重要である。今回の研究によりIL-12粘膜内ではなく粘膜下で作用している可能性が考えられ、今後これらの研究をすすめ発展させていくことでその病態生理を明らかにできる可能性がある。最終的にはIL-12による好酸球性副鼻腔炎の新規治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In eosinophilic sinusitis, decreased formation of tight junctions (TJs) and impaired barrier function in the nasal sinus mucosa is important in the pathogenesis. To confirm the effect of interleukin-12 (IL-12) on barrier function, we evaluated the effect of IL-12 administration on barrier function. No significant difference in barrier function was observed with IL-12 administration in either the eosinophilic or non-eosinophilic sinusitis groups. Immunofluorescence staining for ZO-1, a protein that is a component of TJ, showed no significant difference in expression. These results suggest IL-12 may act on submucosal tissue rather than nasal mucosal epithelial cells.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 IL-12 鼻茸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎は増加傾向にあり、全国で推定約2万人の罹患者がいる。2015年には厚生労働省の指定難病に認定された。内服治療、外科治療を行っても再燃再発を繰り返す症例が多く、根治を期待できる方法は未だ開発されていない。

好酸球性副鼻腔炎を代表とする鼻茸を伴う副鼻腔炎 (CRSwNP) の病態には、黄色ブドウ球菌やそのバイオフィルム、真菌、プロテアーゼなどによる上皮への刺激をトリガーとし、上皮由来の胸腺間質性リンパ球新生因子 (Thymic stromal lymphoprotein: TSLP)、Interleukin (IL)-25、IL-33 等のサイトカインが、自然リンパ球 2 型 (ILC2)、2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) や好酸球などを誘導、活性化し、Th2 サイトカインが産生され、鼻茸を生じると考えられている。なかでも、近年発見された ILC2 は、IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカインを産生する新しいリンパ球クラスターである。ILC2 は、好酸球性炎症や粘液産生に関わるため、CRSwNP においても、臨床病型、鼻茸中の好酸球浸潤、血中好酸球数、そして、予後と相関していることが報告されている [1]。そのため、鼻粘膜における ILC2 の制御は CRSwNP の治療に直結する。

ILC の分化に関わるサイトカインとして IL-12 が同定されている。IL-12 は、NK 細胞に対して細胞増殖を促進し、IFN- γ 産生を促進するなどの性質をもつサイトカインである。近年、ILC2 は可塑性を持ち、IL-12 の存在のもとに ILC1 様の性質を持つよう“再分化”することが判明した [2]。そのため、IL-12 の局所におけるホメオスタシスの破綻は、ILC の再分化を介し異常な免疫応答を誘発する可能性がある。

2. 研究の目的

今回の研究では、世界に先駆けて IL-12 と好酸球性副鼻腔炎の関連を調べる。前述のように IL-12 は ILC の分化を介して、Th2 サイトカイン産生に影響を与えるが、好酸球性副鼻腔炎の病態に及ぼす影響は不明であった。本研究で、好酸球性副鼻腔炎の病態に IL-12 発現低下が関与していることが証明でき、IL-12 の局所投与により ILC の分化を制御できれば、好酸球性副鼻腔炎の発症予防、新規治療法の開発につながる。増加の一途をたどる好酸球性副鼻腔炎の根本的治療に繋がる画期的な研究となる。

3. 研究の方法

IL-12 のバリア機能への影響を確認するため、鼻腔粘膜上皮細胞の気相-液相培養 (air-liquid interface: ALI 培養) を行い、リコンビナント IL-12 投与の有無による経上皮電気抵抗 (Trans epithelial electrical resistance: TEER) を測定しバリア機能を評価した。気相-液相培養においてタイトジャンクションを構成するタンパク質である ZO-1 について免疫蛍光染色法で評価した。

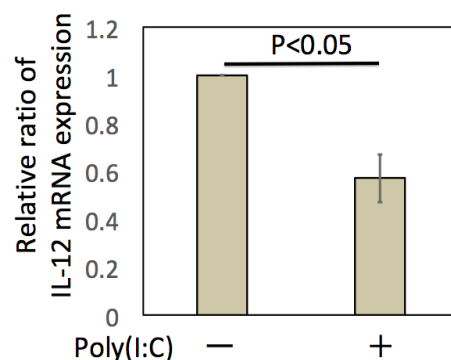
また鼻腔上皮粘膜において自然免疫刺激により IL-12 の mRNA 発現量の評価をおこなった。Total RNA は Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC) 法により抽出し $\Delta\Delta CT$ 法により GAPDH に対する相対値で評価した。鼻腔上皮細胞でのタンパク質発現はイムノブロットング法および免疫蛍光染色法で評価した。イムノブロットング法では GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) に対する、免疫蛍光染色法では DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) に対する相対値でそれぞれ評価した。

4. 研究成果

鼻腔粘膜上皮細胞の ALI 培養を行い、リコンビナントインターロイキン 12 投与の有無によるバリア機能の評価では、好酸球性副鼻腔炎および非好酸球副鼻腔炎いずれの群においても、IL-12 投与群と非投与群で経上皮電気抵抗の有意な差を認めなかった。また ALI 培養において ZO-1 について免疫蛍光染色法で評価したが、それぞれの群において発現に有意差を認めなかった。これらの結果からは、IL-12 は鼻腔粘膜上皮細胞ではなく粘膜下組織において作用している可能性が考えられた。

また鼻腔粘膜において poly (I:C) 刺激により IL-12 の mRNA の発現量が低下することを明らかにした (図 1)。poly (I:C) は自然免疫シグナルを活性化すること、慢性副鼻腔炎においては IL-12 が低下していることから、自然免疫の活性化が好酸球性副鼻腔炎発症のメカニズムに関与している可能性が示唆された。同実験系では、Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) の mRNA およびタンパク質の有意な発現亢進を認めた。またこの発現の亢進は副腎皮質ステロイドであるフルチカゾンプロピオン酸エステルにより有意に抑制された。一方、新型コロナウイルス感染において重要な役割をはたす Transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) のタンパク質発現は有意な変化を認めなかった (図 2.3)。

図 1 Poly(I:C) 刺激による IL-12 発現抑制



ACE2 は新型コロナウイルスの結合受容体であるため、これらの結果からは、in vivo での検討が必要なものの、副腎皮質ステロイドがウイルス感染後の ACE2 発現亢進を抑制することで重症化や感染予防に効果をもつ可能性が示唆された。

図 2. イムノブロッティング法による Poly(I:C) 刺激と FP 処理による ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質発現量の変化の評価

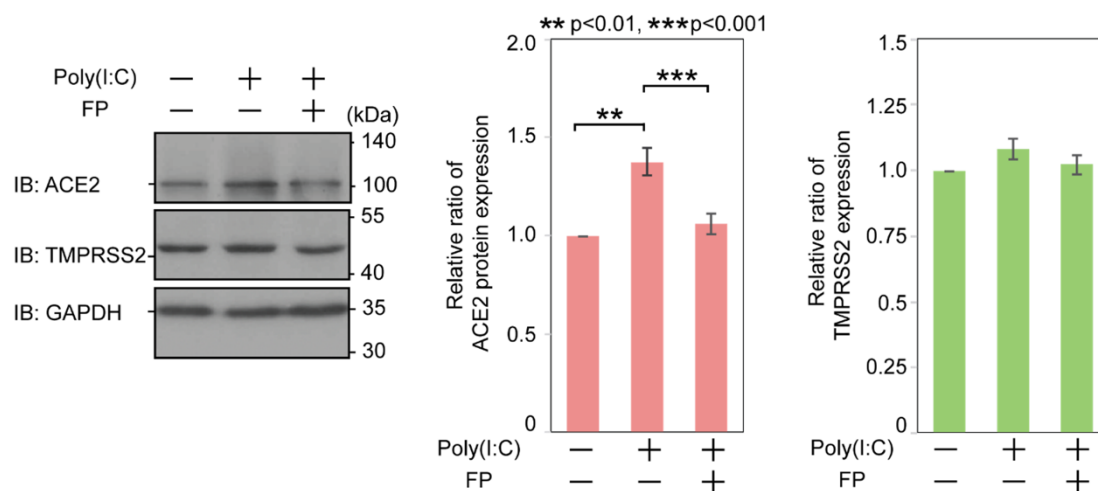
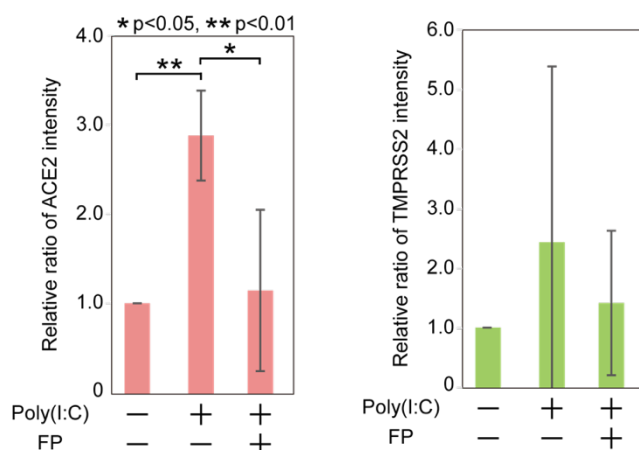


図 3. 免疫蛍光染色法による Poly(I:C) 刺激と FP 処理による ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質発現量の変化の評価



【参考文献】

1. Ho J, Bailey M, Zaunders J, et al (2015) Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. Clin Exp Allergy 45:394-403
2. Ohne Y, Silver JS, Thompson-Snipes L, et al (2016) IL-1 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function and plasticity. Nat Immunol 17:646-655

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakazono Akira, Nakamaru Yuji, Mahnaz Ramezanzpour, Kondo Takeshi, Watanabe Masashi, Hatakeyama Shigetsugu, Kimura Shogo, Honma Aya, P J Wormald, Sarah Vreugde, Suzuki Masanobu, Homma Akihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Fluticasone Propionate Suppresses Poly(I:C)-Induced ACE2 in Primary Human Nasal Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 655666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2021.655666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中園 彬
2. 発表標題 鼻腔粘膜上皮細胞における新型コロナウイルス細胞診入因子の発現制御機構
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 総会・学術講演会
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
---------	---------