

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18726

研究課題名（和文）慢性副鼻腔炎の白血球浸潤の解明と炎症との関連性の解析

研究課題名（英文）Elucidation of leukocyte infiltration in chronic sinusitis and analysis of its relationship with inflammation

研究代表者

堤内 俊喜（Tsutsumiuchi, Toshiki）

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：60720084

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）：好酸球性副鼻腔炎で好酸球が組織に浸潤する際に発現する、血管内皮上物質の発現が鼻ポリープ組織中に有意に多いことを確認した。また、それらの発現が好酸球性副鼻腔炎の重症度が上がるほど多くなっていくことも解析した。一方で、好酸球性副鼻腔炎に多い合併症の有無によってはそれらの発現は差がないことも確認した。

非好酸球性副鼻腔炎に主に関与している好中球が組織に浸潤する際に関与する血管内皮物質を認識できる抗体が存在しなかったため、それらを作成した。またアレルギー性炎症をモデルとしたマウスを用いて好酸球が関与する血管内皮上物質の発現も調べた。

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難治性、易再発性を特徴とする副鼻腔炎で、機序の解明も不十分な病態である。それら動態の解明の一助となりうる今回の研究結果が、治療法の確立に役立つ可能性がある。また重症度に合わせたオーダーメイド的な治療プランの確立も行える可能性がある。

また新たな抗体作成で、非好酸球性副鼻腔炎の炎症機序の部分的な解明に役立つ可能性や新たなマウスモデル作成でヒト検体とは異なるアプローチでの病態解明の一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It was confirmed that the expression of substances on the vascular endotheliums, which is expressed when eosinophils infiltrate the tissue in eosinophilic chronic rhinosinusitis, is significantly higher in the nasal polyps. We also analyzed that their expression increases depending on severity of eosinophilic chronic rhinosinusitis. On the other hand, it was also confirmed that there is no difference in their expression depending on the presence or absence of complications that are common in eosinophilic chronic rhinosinusitis.

We created the antibodies that could recognize the vascular endothelial materials involved in the infiltration of tissues by neutrophils, because there were no antibodies, which are primarily involved in non-eosinophil sinusitis. We also investigated the expression of eosinophil-related substances on the vascular endothelium using mice modeled on allergic inflammation.

研究分野：アレルギー性炎症

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 好酸球浸潤 セレクチン 末梢リンパ節アドレシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)近年、内服・手術加療に抵抗性を示し、易再発性かつ難治性の副鼻腔炎である好酸球性副鼻腔炎が注目されている。従来の慢性副鼻腔炎は、鼻茸組織中に好中球が有意に浸潤しており、その主な原因は感染性病変とされるが、好酸球性副鼻腔炎は、鼻茸中に好酸球が有意に浸潤しているのが特徴で病態が異なるものと考えられている。一般的に好酸球が関与した炎症性疾患では、血中の好酸球が血管内皮を通過し間質組織へ遊走する必要がある。それらの過程において、血中を移動する好酸球表面上に発現したレクチンが炎症個所に発現する HEV 様血管内皮上の末梢リンパ節アドレシン(peripheral lymph node addressin ; PNA_d)との間にローリング、接着を起こすことが知られている。

(2)好酸球性副鼻腔炎においても、同様の機序で間質への好酸球浸潤が起きている可能性が考えられる。また好酸球性副鼻腔炎は、様々な条件でその重症度が変わることわかっている。一方で、従来型の非好酸球性副鼻腔炎の好中球浸潤の炎症においても、好中球上の糖鎖リガンドが血管内皮細胞上のレクチンとの間でローリング、接着を起こしていることがわかっている。

(3)潰瘍性大腸炎や前立腺肥大症といった慢性炎症疾患の組織中で、炎症細胞浸潤に特異的な血管の発現が炎症の重症度に相関し、治療により炎症が改善すると、血管発現が減少することが分かっている。

2. 研究の目的

(1)血中好酸球が、好酸球性副鼻腔炎鼻茸組織に浸潤する機序、それらを誘導するサイトカイン・ケモカインや糖鎖分子を解析し、慢性副鼻腔炎における炎症の動態を明らかにする。また血中や組織中の好酸球・好中球数や、臨床的なパラメーター、合併症などと炎症血管発現との間に相関があるかを解析する。

(2)好中球が浸潤する際にローリング、接着を起こす血管内皮細胞上に発現する E セレクチンを認識できる有効な抗体が存在しないため、それらを作成し血管発現が起きているのかを非好酸球性副鼻腔炎の鼻茸組織を用いて確認する。

(3)耳鼻咽喉科領域における慢性炎症疾患である慢性副鼻腔炎やアレルギー性鼻炎において、その炎症の重症度や、治療の前後において炎症細胞浸潤に特異的な血管の発現が相関しているかを調べる。ヒト標本での検討を行う前に、モデルマウスの作成を試み検討する。

3. 研究の方法

(1)好酸球性副鼻腔炎および非好酸球性副鼻腔炎と診断された手術標本を用いて、好酸球のローリング、接着に関わる糖鎖に対する抗体 (MECA-79 など) や、好酸球表面に対する抗体を用いて免疫組織化学を行い、好酸球を病変粘膜に誘導する機序を探索する。

具体的には、好酸球表面上に発現している抗原の同定や血管内皮細胞上に発現する L セレクチンの特異糖鎖リガンドである 6-sulfo sialyl Lewis X の発現を免疫染色の手技を用いて解析する。また、好酸球上に発現するといわれる Siglec 8 とその特異リガンドと考えられている 6'-sulfo sialyl Lewis X の発現を特異抗体を用いて解析する。それらから得られた知見を用いて、疾患の重症度にグループを分けて、その中で血中好酸球数・血中 IgE 抗体・血中炎症反応指数・組織中好酸球数・鼻茸中炎症血管発現などで相関関係の解析を行う。

(2)非好酸球性副鼻腔炎では、好中球浸潤の際に血管内皮に発現する E-セレクチンとの関与について E-セレクチンを特異的に認識する抗体を作成し好酸球性と同様の手法で解析する。

(3)アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて、鼻粘膜の PNA_d 発現を免疫組織化学で調べる。発現を認めた場合には、アレルギー性鼻炎の炎症の度合いに応じて相関があるかを解析する。また副鼻腔炎モデルマウスの作成を試みる。

4. 研究成果

(1)好酸球性副鼻腔炎における好酸球浸潤機序の解明に際し、好酸球性副鼻腔炎および非好酸球性副鼻腔炎において、好酸球浸潤の最初のステップで炎症血管に発現する PNA_d の発現率が有意に好酸球性副鼻腔炎において高いことを確認した。(図 1,2)

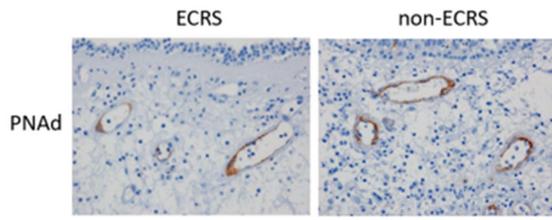


図1 PNA_d発現血管

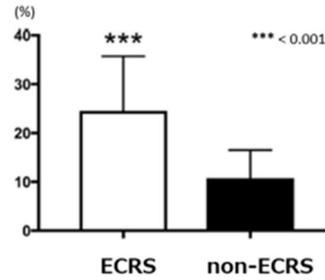


図2 PNA_d 陽性率

その情報をもとに、好酸球性副鼻腔炎の重症度や喘息・アスピリン喘息 (AERD) の合併症や臨床パラメータが、血管数の発現などと相関し、炎症の指標となるかについての解析を行った。その結果鼻ポリープ中の PNA_d 陽性血管の発現数は重症度が上がるにつれて増加しており、重症度との相関を認めた。一方で、NSAID 増悪呼吸器疾患 (NERD) の合併が発現数に関連すると思われたが、それらに有意差は認めなかった。(図 3)

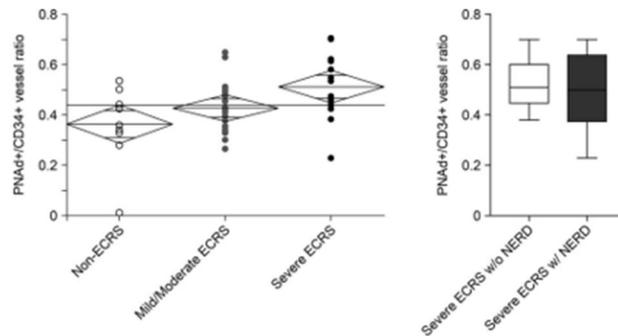


図3 ECRS 重症度 PNA_d発現率

(2)炎症個所に好中球が浸潤する際の誘導性内皮細胞接着分子である E-セレクトリンを認識できる E-セレクトリン特異的モノクローナル抗体が存在しないため、ホルマリン固定及び包埋組織に反応し、P-セレクトリン・L-セレクトリンや IgM には交差しない抗体をネガティブセレクションを行うことで作成した。U12-12 と呼ばれる作成された抗体で、急性虫垂炎や潰瘍性大腸炎の包埋組織で E-セレクトリンを有する血管の発現が確認された。(図 4)

これらを今後鼻粘膜組織を用いて免疫染色し、解析していく予定である。

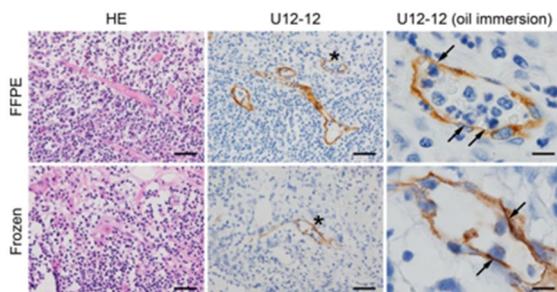


図4 血管上皮 E-selectin発現

(3) 好酸球性副鼻腔炎とは別の病態であるアレルギー性鼻炎に着目し、それらモデルマウスの鼻粘膜中の好酸球浸潤および PNA_d 陽性血管の発現を調べた。シラカバ花粉モデルマウスで、実際に鼻粘膜を染色したところ PNA_d 陽性血管の発現は認められたが、通常モデルのマウスとの有意差は認めなかった。(図 5,6) これらの知見より、好酸球浸潤をより起こさせた好酸球性副鼻腔炎モデルマウスの作成を検討中である。

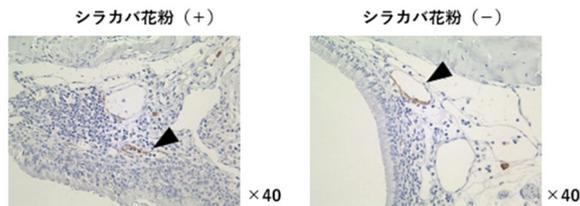


図5 シラカバ花粉モデルマウス PNA_d発現血管

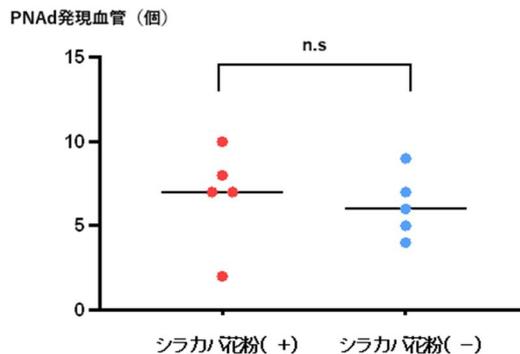


図6 シラカバ花粉モデルマウス PNA_d発現血管数

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 堤内 俊喜、小林 基弘、藤枝 重治	4. 巻 40
2. 論文標題 好酸球性副鼻腔炎における鼻ポリープ中への 好酸球浸潤の機序について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーと臨床	6. 最初と最後の頁 57-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堤内 俊喜
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎における高内皮細静脈様血管の発現と好酸球接着に関する検討
3. 学会等名 第58回 日本鼻科学会
4. 発表年 2019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
---------	---------