

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18264

研究課題名（和文）好酸球性副鼻腔炎の増悪因子におけるライノウイルス感染に関する分子メカニズムの探索

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of rhinovirus infection regarding aggravating factors in eosinophilic rhinosinusitis

研究代表者

大庭 亜由子 (Oba, Ayuko)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：90812975

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：副鼻腔粘膜に多数の好酸球浸潤を伴い、難治性かつ再発性の鼻ポリープを伴う好酸球性副鼻腔炎が注目されている。好酸球性副鼻腔炎の増悪機序の解明の目的で、培養ヒト鼻上皮細胞と鼻腺細胞におけるライノウイルス感染の影響を分泌応答機構から検討した。ライノウイルス感染による鼻上皮表面上皮からの炎症性サイトインやライノウイルス受容体のICAM-1の発現亢進、好酸球性副鼻腔炎の培養鼻腺細胞からのMac5AC分子発現応答、ウイルス感染に基づく粘液産生亢進の分子メカニズムを解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎再燃時の鼻汁分泌を呈する疾患の病態解明が確信できる。好酸球性副鼻腔炎の増悪・再燃の分子メカニズムを世界に先駆けて発信することができる。本研究から、IL-13, IL-17A, TSLPなどの炎症性サイトカイン、鼻上皮細胞のICAM-1や鼻腺細胞のMuc5AC遺伝子の転写因子が新しい創薬のターゲット候補として注目される。鼻汁、鼻閉、後鼻漏、嗅覚障害などの鼻症状、頭痛、頬部痛などに悩み、苦しむ国内の数百万人の患者への大きな福音となり、国民生活の質的向上をもたらす極めて有意義な研究である。

研究成果の概要（英文）：Eosinophilic sinusitis, which is accompanied by numerous eosinophils infiltrating the sinus mucosa and is accompanied by refractory and recurrent nasal polyps, has been attracting attention. To clarify the mechanism of exacerbation of eosinophilic sinusitis, we investigated the effects of rhinovirus infection in cultured human nasal epithelial cells and nasal gland cells from the perspective of secretory response mechanisms. We were able to elucidate the molecular mechanisms of (1) increased expression of inflammatory cytokines and the rhinovirus receptor ICAM-1 from the nasal epithelial surface epithelium due to rhinovirus infection, (2) Mac5AC molecule expression response from cultured nasal gland cells with eosinophilic sinusitis, and (3) increased mucus production due to viral infection.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 鼻ポリープ ライノウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、副鼻腔粘膜に多数の好酸球浸潤を伴い、難治性かつ再発性の鼻ポリープを伴う副鼻腔炎が注目されている。この好酸球性副鼻腔炎は喘息に類似する病態を示すことが指摘されている。一方、喘息を像悪させる因子としてライノウイルス感染が知られている。ライノウイルス感染により気管支の表面上皮からの炎症性サイトインであるIL-6やライノウイルス自体のリセプターであるICAM-1の発現が亢進し、炎症反応の悪循環が生じる。好酸球性副鼻腔炎においても特徴的な膿性～ムチン様の鼻漏を繰り返すことを契機として再発することが多く、ウイルス感染に基づく粘液産生が病態に深く関わりあうことが推察される。そこで、粘液産生の現場である鼻腺細胞に注目した。申請者らの研究グループは世界で最初にヒト鼻腺細胞の純化培養に成功しており (Am J Physiol 271:L593-L600, 1996)、神経伝達、炎症性起因物質による分泌応答の機序の解明を行ってきた。今回は、好酸球性副鼻腔炎の増悪機序の解明の目的で培養ヒト鼻腺細胞におけるライノウイルス感染の影響を分泌応答機構から検討する企画を立案するに至った。

2. 研究の目的

研究の独創的特色は、難治性・再発性の好酸球性副鼻腔炎の病態の特徴である好酸球性ムチンの発症の機構を全く斬新な発想で解明することである。研究の独創的特色は、ヒト培養鼻腺細胞において、呼吸器ウイルス感染に伴い副鼻腔粘膜の炎症を引き起こすことにより、好酸球性副鼻腔炎の再燃の分子メカニズムを世界に先駆けて解明する事である。下記の図のような分子メカニズムによって鼻腺細胞のムチンの過剰分泌が引き起こされることを証明する。

3. 研究の方法

(1) 鼻腺細胞・表面上皮細胞の培養

内視鏡下副鼻腔手術にて摘出したポリープをプロテアーゼにて一晩処理し、上皮細胞を剥がす。上皮細胞のみ単離し、フィルター上に培養する。ヒト培養鼻上皮細胞をライノウイルス14型 10^5 TCID₅₀/mlに60分間感染させて、純化培養する。

(2) ライノウイルス感染の確認

感染の確認はRT-PCR法によりヒト培養鼻上皮細胞中のウイルスRNAの増加で確認する。更に培養液中のウイルスの増加で確認する。

(3) サイトカインの測定

ライノウイルス感染によるヒト培養鼻上皮細胞の培養液の炎症性サイトカイン (IL-13, IL-17A, TSLP) をELISA法で測定する。

(4) エンドトキシンによる鼻上皮細胞のICAM-1の発現測定

ノーザンブロット法により培養鼻上皮細胞内 ICAM-1 合成の発現を確認する。エンドトキシン添加による ICAM-1 合成の発現変化を検討する。

(5) 炎症性サイトカインによる鼻腺細胞のムチン遺伝子発現の検討

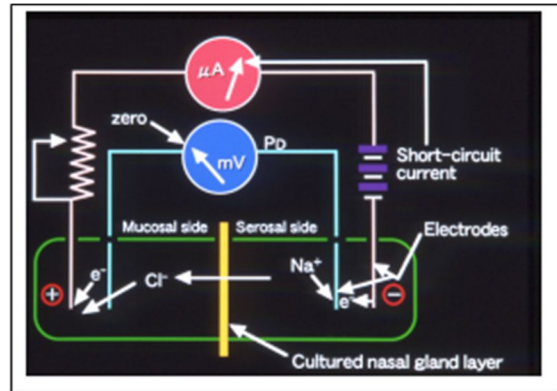
IL-13, IL-17A, TSLP刺激による鼻腺細胞のMac5AC遺伝子/蛋白の発現を定量的PCR法とウエスタンブロット法で測定する。

(6) 炎症性サイトカインによる鼻腺細胞の核内因子N- BやERK/AP-1活性の測定

IL-13, IL-17A, TSLPによるヒト培養鼻腺細胞に発現するMuc5AC遺伝子の核内転写因子NF- BやERK/AP-1活性を測定する。

(7) 鼻腺細胞のムチン分泌応答の測定

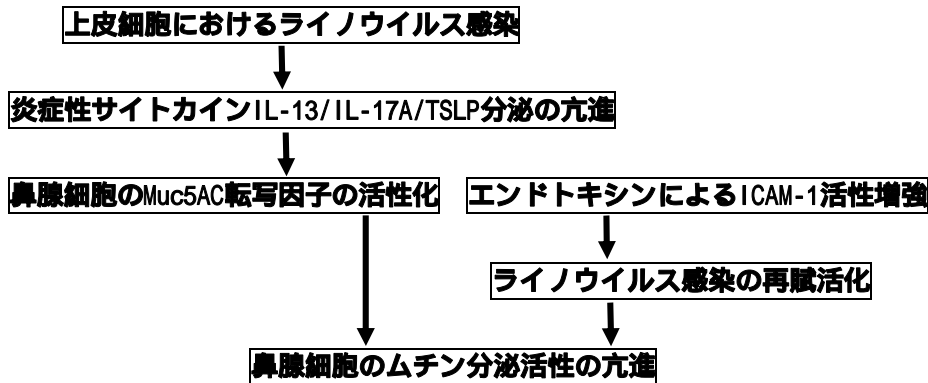
フィルターに培養した細胞がconfluentになった後、Ussing chamberを用い短絡電流測定装置にてvoltage-clamp法でイオン電流の解析を行う。腺細胞上皮細胞の分泌能を調べる。ERK/AP-1阻害剤U0126の投与による短絡電流の変化を測定する。



短絡電流の測定回路図

4. 研究成果

副鼻腔粘膜に多数の好酸球浸潤を伴い、難治性かつ再発性の鼻ポリープを伴う好酸球性副鼻腔炎が注目されている。好酸球性副鼻腔炎の増悪機序の解明の目的で、培養ヒト鼻上皮細胞と鼻腺細胞におけるライノウイルス感染の影響を分泌応答機構から検討した。(1)ライノウイルス感染による鼻上皮表面上皮からの炎症性サイトインやライノウイルス受容体の ICAM-1 の発現亢進、(2)好酸球性副鼻腔炎の培養鼻腺細胞からの Mac5AC 分子発現応答、(3)ウイルス感染に基づく粘液産生亢進の分子メカニズムを解明できた。



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 1件）

1. 著者名 Ayuko Oba, Shin Ito, Hiroko Okada, Takashi Anzai, Ken Kikuchi, Katsuhisa Ikeda	4. 巻 Vol 3
2. 論文標題 Early and noninvasive diagnosis using serological antigen biomarkers in chronic invasive fungal rhinosinusitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rhinology Online	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4193/RHINOL/20.041	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 -

〔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 池田勝久、大庭亜由子、伊藤伸、岡田弘子、安齋崇
2. 発表標題 慢性浸潤性真菌性鼻副鼻腔炎の血清学的抗原マーカーを用いた非侵襲的な早期診断
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会
4. 発表年 2020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
---------	---------