

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18281

研究課題名（和文）BMP8Bを介した骨芽細胞による好酸球性副鼻腔炎難治メカニズムの解明

研究課題名（英文）Research for the Mechanism of Refractory Eosinophilic Sinusitis through Osteoblasts Mediated by BMP8B

研究代表者

小幡 翔 (Obata, Sho)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：50846409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：BMP8Bを介した骨芽細胞による好酸球性副鼻腔炎難治メカニズムの解明について検討した。好酸球性副鼻腔炎の組織において、蛍光免疫染色を用いることでBMP8Bがどの細胞に発現しているかについて評価を行った。その際、EEtosisと呼ばれる細胞死をきたしている好酸球がBMP8Bをprominence様に放出していることが確認され、その他、BMP8Bは上皮細胞や腺組織にも分布が確認され、そのターゲット細胞として上皮細胞を同定した。BMP8Bに対する上皮細胞の反応について検討し、今後論文化して報告予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、BMP8Bが好酸球性副鼻腔炎の病態形成において果たす役割を解明しました。EEtosisにより好酸球がBMP8Bを放出し、上皮細胞がそのターゲットであることを明らかにしました。学術的には、BMP8BとEEtosisの関連性、特定の細胞相互作用の理解が新たな治療戦略の開発に寄与します。社会的には、効果的な治療法の開発により患者の生活の質向上や医療資源の効率的利用が期待されます。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism of refractory eosinophilic sinusitis mediated by osteoblasts through BMP8B. In the tissue of eosinophilic sinusitis, we evaluated the expression of BMP8B in various cells using fluorescence immunostaining. It was confirmed that eosinophils undergoing cell death, known as EEtosis, prominently release BMP8B. Additionally, BMP8B was found to be distributed in epithelial cells and glandular tissues, with epithelial cells identified as target cells. We examined the response of epithelial cells to BMP8B and plan to report our findings in a future publication.

研究分野：アレルギー

キーワード：BMP8B 好酸球 EEtosis

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ECRSはもともと術後再発が多いというところから定義づけられた疾患である(T Tokunaga, Allergy, 2015)。ECRSの増悪因子としてOsteitisが確立されている。(Kornkiat Snidvongs, Current Allergy and Asthma Reports, 2019) Osteitisについては手術を行うケースでは、その外科的除去が重要であるが、保存加療では対処不能である上に、Osteitisが眼窩壁や頭蓋底などに生じた場合除去自体が困難となる。このためOsteitisが病態の難治化を誘導するメカニズムを検討し、それに基づいた新たな治療戦略が必要とされている。

Osteitisと好酸球性炎症の相互作用を検討するにあたり、まず我々は中鼻甲介に着目した。ECRSでは術後再発例において中鼻甲介から鼻茸が再形成されることが多い。また通常、著しい炎症が認められる場合には骨破壊所見を認めることが多いがECRS再発症例では逆に骨肥厚所見を認めている。加えてOsteitisを伴うECRS再発症例において中鼻甲介に著しい好酸球浸潤を認めることを我々は確認した。このことからECRSの再発には骨代謝と好酸球性炎症の何らかの特殊な相互作用があることが推測される。

### 2. 研究の目的

Osteitisを引き起こすと考えられる骨芽細胞と免疫細胞を対象に病態および新規治療法を研究した。

### 3. 研究の方法

中鼻甲介の好酸球浸潤の評価:

中鼻甲介の好酸球浸潤をHE染色で評価した。

RNAシーケンシングによる遺伝子発現の分析:

ECRS患者の中鼻甲介の遺伝子発現をRNAシーケンシングを用いて分析し、他の部位と比較してリモデリングに関与する因子が高く発現しているかどうかを確認した。

qRT-PCRによるBMP8B遺伝子の発現調査:

本検討で注目したBMP8Bの遺伝子発現をqRT-PCRで調査する。RNAシーケンシングの結果と同じ傾向が見られるかを確認した(図2C)。

免疫染色によるBMP8Bタンパク質の発現評価:

ECRS の中鼻甲介における BMP8B タンパク質の発現を免疫染色で評価する。BMP8B が腺細胞および好酸球に集中しているかどうかを確認し(図 2D、2E)、NECRS の中鼻甲介との比較を行った(図 2F)。

BMP8B による上皮のサイトカイン産生：

ヒト鼻腔上皮細胞に対して BMP8B リコンビナントタンパクで刺激を行い、IL-8 産生を評価した。

#### 4 . 研究成果

研究対象者の特性は表 1 に示す。再手術後、再発は検出されず、術後の嗅覚障害も観察されなかった。次に、中鼻甲介の好酸球浸潤を評価したところ、ECRS 患者から得られた中鼻甲介は強い好酸球浸潤を示した(図 2A)。これにより、中鼻甲介が好酸球性炎症を悪化させると仮説を立てた。

ECRS における中鼻甲介の病理学的役割を明らかにするために、RNA シーケンシングを用いて ECRS 患者の中鼻甲介の遺伝子発現を分析した。その結果、他の部位と比較して、中鼻甲介ではリモデリングに関与する因子が高く発現していることが示された(図 2B)。

遺伝子リストの中で特に骨形成タンパク質(BMP)遺伝子に注目した。BMP は成長因子の一群であり、炎症を誘導することが報告されているが、ECRS における局所的な存在については十分に研究されていない。qRT-PCR を用いて BMP8B の遺伝子発現をさらに調べた結果、RNA シーケンシングの結果と同じ傾向が見られた(図 2C)。これらの結果に基づき、ECRS の中鼻甲介における BMP8B タンパク質の発現を免疫染色で評価した。その結果、BMP8B が腺細胞および好酸球に集中している傾向が見られた(図 2D、2E)。一方、NECRS の中鼻甲介ではそのような傾向は観察されず、この結果は ECRS の中鼻甲介に特有のものであることが示された(図 2F)。

あわせて、我々は BMP8B がヒト鼻腔上皮細胞に対してどのような働きを有するかについて評価を行った結果、無刺激群に対して、用量依存性に IL-8 の産生が亢進することを確認した。

BMP8B は TGF $\beta$  スーパーファミリーに属するタンパク質であり、14 種類のサブタイプが報告されている。いくつかの先行研究は TGF $\beta$  ファミリーのタンパク質がリモデリングの悪化に寄与することを示唆しているが、ECRS における BMP の発現を調べた報告はない。本研究は、ECRS 患者の中鼻甲介において BMP8B の発現が特異的に増加していることを示した。これらの所見は、BMP8B が ECRS の病態に何らかの影響を与える可能性を示唆している。特に、BMP8B が肝細胞に作用して NF-KB の活性化を通じて CCL-5 の生成を促進することが報告されているため、BMP8B は好酸球性炎症と密接に関連している可能性がある。BMP8B と ECRS の病因との関連を探るためにはさらなる研究が必要である。

本研究にはいくつかの制限がある。サンプル数が少なく、術後の観察期間が短い点である。しかし、本研究は中鼻甲介の役割を分析するために包括的な RNA シーケンシングを行った点で新規性がある。

総括すると、ECRS 再発例に対して中鼻甲介切除を行った。中鼻甲介切除後は再発がなく、嗅覚の著しい改善が見られた。術後の明らかな後遺症は検出されなかった。RNA シーケンシングにより、ECRS の中鼻甲介で BMP8B が増強され、免疫染色でも中鼻甲介での BMP8B の発現が顕著に増加していることが示された。中鼻甲介は BMP8B の発現を増加させることによって好酸球性炎症を誘発し、ECRS の再発に寄与している可能性がある。今後、上記について論文化を行う予定である。

表 1. Characterization of the study population.

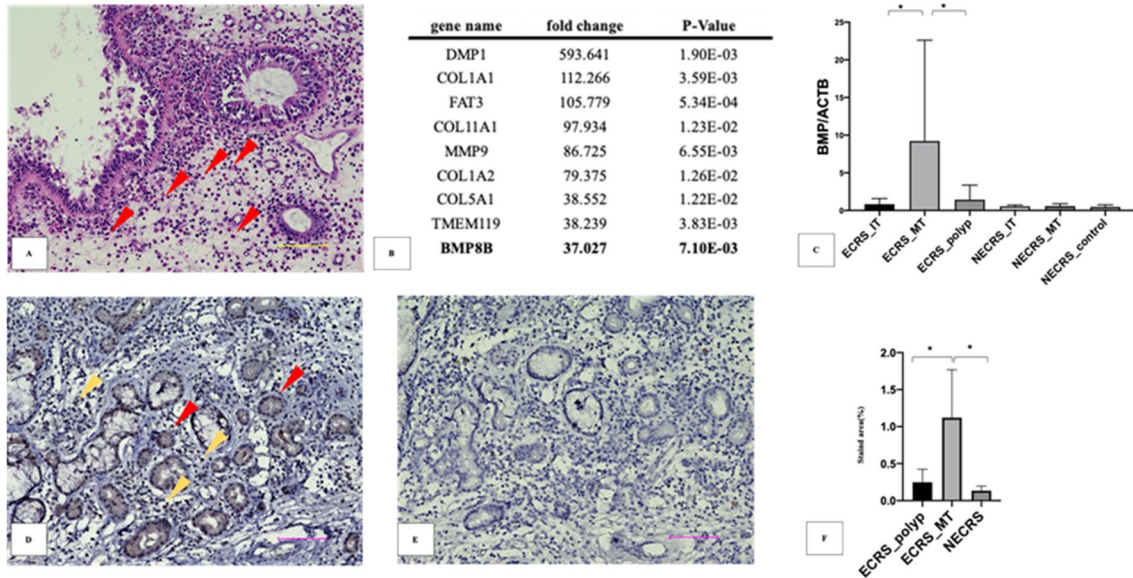
	NECRS	ECRS(MT)	ECRS(NP)
Mean age, years	56.6(±17.3)	52.8(±7.4)	54(±16.7)
SEX, M/F	3/2	4/1	3/2
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25(±1.8)	23.4(±2.9)	25.1(±2.5)
JESREC	3.2(±2.7)	14(±1)	15.8(±1.6)
LM score	7.4(±0.5)	17.5(±4.2)	16.8(±3.5)
IgE, IU/L	99(±93.1)	147.2(±88.8)	1908.3(±2855.9)
Eosinophils in peripheral blood, %	3.5(±3.1)	6.6(±1.1)	10.9(±3.6)
Allergy, -/+	3/2	3/2	2/3
Asthma, -/+	5/0	2/3	3/2
Aspirin (NSAIDs) intolerance, n	0	1	0

All continuous data are presented as mean ± standard deviation. The sum of JESREC score.

Abbreviations:

ECRS, eosinophilic chronic rhinosinusitis; NP, nasal polyp; MT, middle turbinate; BMI, body mass index; JESREC, Japanese Epidemiological Survey of Refractory Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis; LM, Lund–Mackay; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

2.



(A) Hematoxylin-Eosin Stain of MT from ECRS patient. Scale bar = 100  $\mu$  m.

(B) Result of RNA sequencing with MT between ECRS and NECRS patients.

(C) Result of RT-qPCR with each site between ECRS and NECRS patient (each group N=3). Student's t-test was performed to compare each group with significance reported for  $p < 0.05$ .

(D) Immunostaining of BMP8B with MT from ECRS patient. Scale bar = 100  $\mu$  m. BMP8B stained with nasal glands.

(E) Control of Immunostaining of BMP8B with MT from ECRS patient.

(F) Result of counting BMP8B positive area of tissue sections between polyp and MT of ECRS and mucosa of NECRS patients (each N=5). Student's t-test was performed to compare each group with significance reported for  $p < 0.05$ .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------