

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592178

研究課題名（和文）

嗅粘膜分泌異常における気道リモデリングの関与-好酸球性副鼻腔炎の嗅覚障害の解明-

研究課題名（英文） Contribution of airway mucosal remodeling for secretion in the olfactory mucosa-The elucidation of the mechanism of smell dysfunction for eosinophilic sinusitis-

研究代表者 春名真一（HARUNA SHINICHI）

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：60198934

研究成果の概要（和文）：

嗅覚障害を伴った副鼻腔炎で、術後 ECP 濃度が減少したのものには、経過良好例が多く、嗅覚障害の改善も認められた。同時に呼気中 NO 濃度も有意に減少した。組織学的には呼吸粘膜では高度の好酸球浸潤が認められるが、嗅粘膜では好酸球浸潤の割合は低かった。しかし、粘膜下のボーマンの拡大が見られ、レクチン免疫染色にて ConA、SNA の発現を認め、粘液の変化が観察された。粘液分泌亢進に関与する肥満細胞から amphiregulin は嗅粘膜では呼吸粘膜ほど分布してなかった。以上から、呼吸粘膜のリモデリングによる嗅粘膜への影響は、好酸球自体による嗅粘膜障害と言うより、嗅粘膜分泌異常の亢進による嗅粘膜機能障害の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The cases of sinusitis with olfactory dysfunction which postoperative ECP concentration decreased were found in not only postoperative good and improvement of dysosmia, but also significant decrease of respiratory NO concentration. Although severe infiltration of eosinophil in the respiratory mucosa were seen, there was little infiltration in olfactory mucosa. As large Boman glands were seen and positive stain of ConA and SNA were found, the increase of mucosa secretion in the olfactory mucosa was suspected. There was little distribution of amphiregulin in the olfactory mucosa compared with that in the respiratory mucosa. Therefore, the effect of the olfactory mucosa due to the respiratory mucosal remodeling was indicated that the possibility of dysfunction of the olfactory mucosa was due to the secretory change.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
22年度	600,000	180,000	780,000
23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻科学

1. 研究開始当初の背景

鼻副鼻腔は呼吸粘膜上皮と嗅粘膜上皮で覆わ

れ、呼吸上皮表面の粘液層は粘液線毛機能を円滑に作用させるために必須であり、一方、嗅粘膜上皮では、上皮を構成する支持細胞、基底細胞、嗅細胞や外界の化学物質の受容体としての細胞表面および粘膜下のボーマン腺に複合糖質が分布し、嗅覚の化学情報伝達に大いに関与していると考えられる。

我々は嗅粘膜および嗅覚障害時の複合糖質の分布に注目し、これまで人嗅粘膜と呼吸粘膜上皮の細胞表面において糖蛋白分布の異なることをレクチン組織化学で証明し、さらに兎実験的副鼻腔炎モデルにて、正常嗅粘膜に比べて、炎症時に嗅覚のreceptorである嗅粘膜細胞表面でのシアル酸複合糖質の分布の変化やConcanavalin Aの発現を観察した。この結果はStephen. G. ShirleyがConcanavalin A処理後のラット嗅粘膜にelectro-olfactogramでのamplitudeが有意に減少したという報告 (Biochem. J. (1987) 245, 175-184) と関連する興味深い知見であり、嗅粘膜における複合糖質分布の変化は嗅粘膜機能障害に強く関連すると考えられる。

鼻副鼻腔ではNitric Oxide (NO) が多量に産生され、神経伝達、平滑筋弛緩作用や粘膜線毛機能など多彩な機能を有している。そのうち、内因性NOは鼻粘膜において上皮細胞、血管内皮細胞、腺組織などに分布して粘液分泌の調節作用をはたし、防御機構の中心的存在を占める粘液線毛輸送に深く関わっていると考えられている。一方、炎症時には逆に、NOは種々の炎症性サイトカインによってもたらされるinducible NOSやconstitutive NOSを介して発現し、粘膜線毛周波数の減少や粘液の異常分泌を躍起させていると推測されている。副鼻腔粘膜と類似する喘息においては、呼気中のNO濃度の測定は病態の信頼できる指標と考えられている。

喘息病態の中心である気道リモデリングは

鼻副鼻腔慢性炎症においても観察され、好酸球が最も重要な炎症細胞と認識されている。実際に慢性副鼻腔炎の副鼻腔粘膜において、活性好酸球浸潤が多数認められるものは、上皮細胞の細胞間隙の離開、剥奪が起こり、多数の分泌細胞に置換され、線毛細胞障害と粘液の分泌異常が起こり粘液線毛機能と嗅粘膜機能不全が生じている。同時にこのような副鼻腔炎では早期から嗅覚障害を呈し、活性好酸球の組織障害蛋白による嗅粘膜障害を引き起こしているとともに、組織障害蛋白のひとつのECPは分泌亢進作用があると報告されており嗅粘膜上での粘液の過剰分泌を惹起させ、臭い分子の嗅粘膜上の接着を抑制している。

我々のこれまでの研究で、副鼻腔粘膜同様に嗅粘膜にも多数の好酸球浸潤が認められるが、呼吸粘膜の上皮細胞障害ほど嗅粘膜の剥奪は少ないが、ボーマン腺の著明な増殖・拡大が認められ、組織学的にも嗅粘膜上での過分泌状態が示唆された。

また副鼻腔炎でのステロイド薬で好酸球浸潤が抑制されても、必ずしも嗅覚障害の改善は認められない。難治性喘息においても吸入ステロイドにて好酸球炎症の抑制にもかかわらず、過剰分泌が認められ、ステロイド抵抗因子で分泌亢進作用を有するAmphiregulinの存在が注目されている (Okumura S, et al. J Allergy Clin Immunol 2005)。したがって副鼻腔粘膜と嗅粘膜においても同様のことが予想される。今回の研究では、嗅覚障害を呈した副鼻腔炎での治療前後における嗅粘膜分泌の変化および改善不良因子について好酸球炎症を中心にその関与を検討したい。

2. 研究の目的

呼吸粘膜における気道リモデリング形成時に呼吸粘膜と隣接する嗅粘膜にも同様な好酸球性炎症が発症し、臨床的には嗅覚障害

が必発することが問題視される。本研究ではその病態解明を目的とし、著明な好酸球の浸潤した嗅粘膜上皮障害と過剰分泌病態による嗅覚障害の改善の解明とステロイド抵抗性因子を検索する。そのために、人および動物の気道リモデリング状態での嗅粘膜障害時および改善時の嗅粘膜の複合糖質と分泌機能を調節する NO と Amphregulin を in vivo と in vitro で組織生化学的に対比する。また正常および嗅粘膜障害時の嗅粘膜上皮を細胞培養し、単離末梢好酸球を添付し糖蛋白分布と NO 合成能を把握し、嗅粘膜の修復能力を検討する。

3. 研究の方法

(1) 慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を訴える人の手術前後に血中および副鼻腔粘膜局所の好酸球顆粒蛋白 (ECP, MBP) と NO を計測する。

(2) 慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を訴える人嗅粘膜とマウス喘息リモデリングモデルを作製し、その呼吸粘膜と嗅粘膜を用いて、NO Sの存在とレクチンおよびEG2抗体を用いた光顕および電顕的観察やシアル酸糖転移酵素等の発現をIn Site Hybridization法で行い分泌糖蛋白の変化を検索する。また、ステロイド抵抗因子であるamphregulinの分布を呼吸粘膜と嗅粘膜で検討する。

(3) 正常および嗅粘膜障害時の嗅粘膜上皮を細胞培養し、単離末梢好酸球を添付し糖蛋白分布とNO合成能を把握し、嗅粘膜の修復能力を検討する。

具体的には

①患者に本研究について十分に説明し、登録を行う。慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を呈する患者の嗅粘膜と改善時の血中および副鼻腔粘膜局所での好酸球顆粒蛋白 (ECP, MBP) を計測する。中鼻道に細胞診用ブラシを挿入し、生食中に落下させ、副鼻腔粘膜局所での ECP, MBP をファルマシアの計測キットを用いて、血中同様に測定する。

②化学発光式 NO 測定装置 (Sievers NO analyzer Model-280i NOA) を用い、呼気 NO 濃度の測定を安静座位で同時間帯に測定する。外鼻孔をペーパーノズルで密閉し、約 10-20 秒間持続的に呼気を出させ、2 l/min で吸引する。検査は 2-3 回施行し、それらの NO 濃度曲線のピーク値の平均値を呼気 NO 濃度とする。

③慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を呈する患者の嗅粘膜と改善時の嗅粘膜を採取し好酸球の存在と複合糖質の変化を観察する。そのために、光顕にて AB・PAS 染色、レクチン (WGA, ConA, UEA-1, DBA, SNA, MAA, PNA とニューラミダーゼ処理後の PNA) とムチンに対する抗体 (Muc1, Muc2, Muc4, Muc5ac, Muc5, Muc8) やレクチン電顕を用いて、嗅粘膜上皮の支持細胞、基底細胞、嗅細胞、細胞表面および Bowman 腺の染色像を正常嗅粘膜と対比する。またシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて糖蛋白分泌の増減を判定する。

④マウスリモデリングのモデルを作製する。BALB/c マウスの腹腔内に ovalalbumin(OVA)4 μg を 2 回注入する。慢性モデルを作製するために 17 日-37 日まで OVA を毎日吸入させて 40 日目に屠殺し、リモデリングモデルを確立させる (Tanaka H, Matsuda T, et al: The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. Inflamm Res 50:616-24, 2001)。屠殺後、呼吸粘膜と嗅粘膜上皮を採取し、光顕的、電顕的にリモデリングの状態、好酸球浸潤を観察する。In Site Hybridization 法にて好酸球浸潤の程度と嗅粘膜形態と糖蛋白の染色性の変化を観察する。

⑤人およびマウス嗅粘膜と NO 合成酵素 (iNOS, eNOS) を用い光顕、電顕的検討を行い、上記の糖蛋白分泌変化と NO との関連性を検討する。さらにステロイド抵抗性因子の Amphregulin 抗体を用いて、呼吸粘膜と嗅粘膜の分布を検討する。

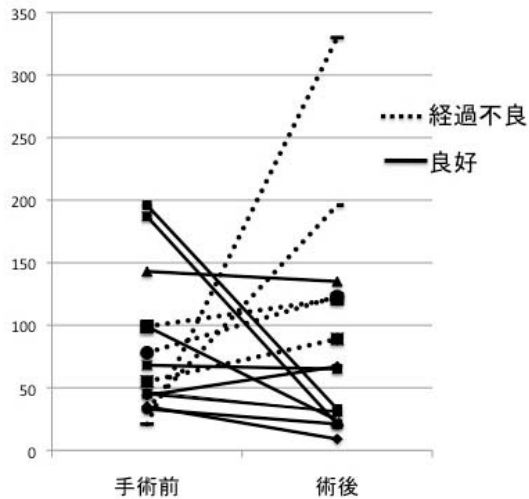
⑥人における嗅覚障害時、およびマウス実験的鼻副鼻腔炎モデル時の嗅粘膜を細胞培養し、正常嗅粘膜細胞の増殖および分化能と比較する。そのために、なるべく生体内に近づける目的で、嗅粘膜上皮と繊維芽細胞や脳アストログリアの再構成による嗅粘膜の三次元培養を試みる。その特徴は嗅細胞の新生、増殖を支持する脳アストログリアと上皮細胞の分化を支持する繊維芽細胞を埋め込んだ収縮コラ

一ゲンゲル上に嗅粘膜上皮を移植したままで培地の中に入れ、空気に触れさせながら培養する点にある。コラーゲンゲルが粘膜下のモデルとなり、繊維芽細胞や脳アストログリアと嗅粘膜上皮が上皮・間質相互作用を作り出し、表面を空気に触れさせることで細胞の分化を促す。また、上皮細胞の分化を支持すると言われる Vitamin A 加無血清培地と血清培地を用い、両者の培地での増殖および分化能を比較観察する。培養細胞に対して種々の cytokeratin 抗体や抗 Neurofilament 抗体を用い嗅上皮であることを同定する。さらに培地に種々の濃度の単離末梢好酸球を添付し、培養細胞の増殖時に分布する糖蛋白の変化をレクチンや抗体を用いて光顕、電顕やシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて観察し、前の結果と比較検討する。

4. 研究成果

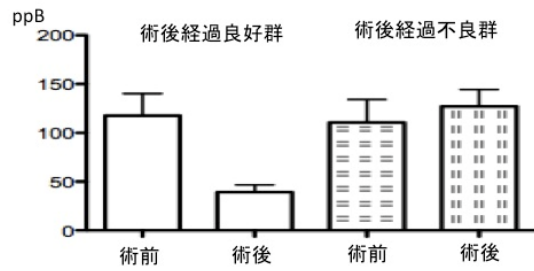
(1) 副鼻腔粘膜局所での好酸球顆粒蛋白 (ECP, MBP) 濃度

嗅覚障害を伴った副鼻腔炎での治療後に副鼻腔粘膜 ECP 濃度が有意に改善を認めたものには、術後経過良好例が多く嗅覚障害の改善も認められた。逆に ECP 濃度の改善のないものでは、術後経過不良の割合が高く、嗅覚障害の改善も少なかった。



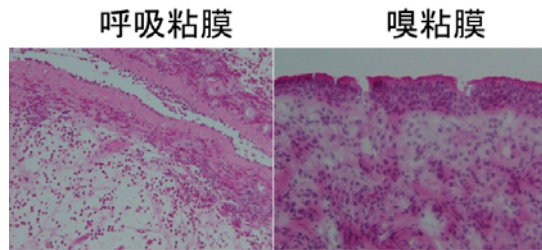
(2) 化学発光式 NO 測定装置による術前後の鼻副鼻腔の呼気中 NO 濃度の測定

術後経過良好群では、NO 濃度は有意な減少を認め、嗅覚機能改善を認める割合が高かった。一方、経過不良群では NO 濃度の改善が少なく、同時に嗅覚改善も見られなかった。



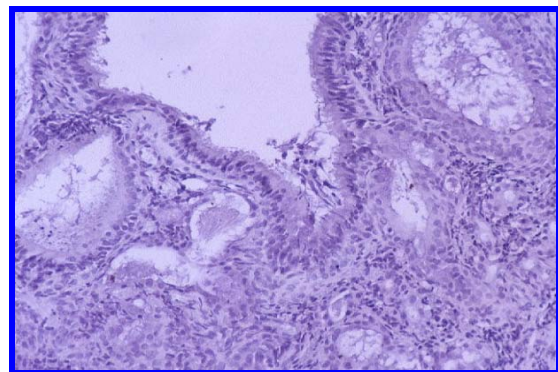
(3) 呼吸粘膜と嗅粘膜での好酸球浸潤と分泌状態の比較

好酸球浸潤は呼吸粘膜には多数認められた。しかし、嗅粘膜での浸潤の割合は少なかった。

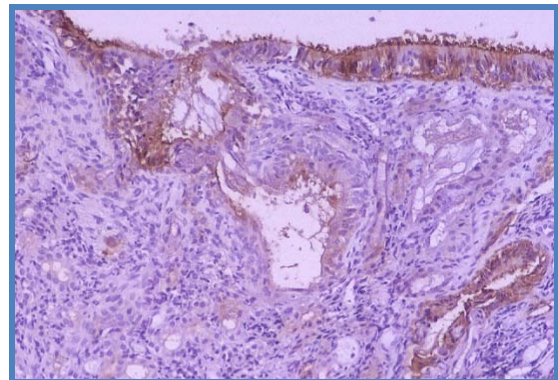


好酸球浸潤:呼吸粘膜>>嗅粘膜 6例/13例

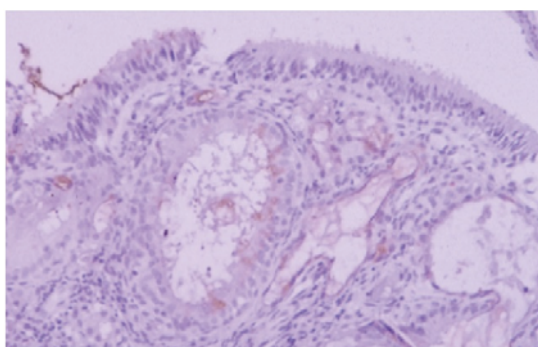
一方、多くの症例で粘膜下の粘液腺のボーマン腺の拡大および増勢が観察された。



さらにレクチン免疫染色にて ConA, SNA の発現を認め、粘液の変化が観察された。



SNA



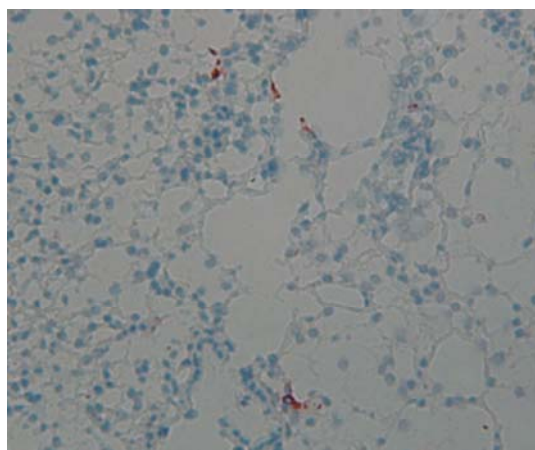
呼吸粘膜と嗅粘膜での組織学的な変化をまとめると以下のごとくになる。

好酸球浸潤	呼吸粘膜>嗅粘膜
上皮細胞障害	呼吸粘膜>嗅粘膜
分泌腺の増大	呼吸粘膜≒嗅粘膜(ボーマン腺)
杯細胞の増勢	呼吸粘膜>>嗅粘膜
基底膜の肥厚	呼吸粘膜>嗅粘膜
繊維化の増生	呼吸粘膜、嗅粘膜ともに少ない
嗅細胞の障害	少ない

呼吸粘膜と嗅粘膜との好酸球炎症状態

(4) 好酸球浸潤性兔実験的副鼻腔炎モデル
呼吸粘膜には多数の好酸球浸潤が認められ、上皮細胞障害や杯細胞化生とともに軽度の基底膜の肥厚も認められた。一方、嗅粘膜において好酸球浸潤は、好酸球浸潤が呼吸粘膜>嗅粘膜の群、呼吸粘膜≒嗅粘膜の群と分けられ、前者の群の方が多かった。嗅粘膜障害や杯細胞化生を示したものは後者の群に多く認められ、嗅細胞の減少も予想された。しかし、両群ともにボーマン腺の拡大が認められ、過剰分泌の可能性が示唆された。ConAの増強、SNAの減弱化が免疫染色で認められた。iNOS, eNOSともに嗅粘膜、ボーマン腺に観察された。

(5) 呼吸粘膜と嗅粘膜での amphiregulin の分布を検討した。好酸球浸潤の強い呼吸粘膜では、amphiregulin の発現する割合も多く認められた。しかし、嗅粘膜上では明らかな amphiregulin の発現は認められなかった。



呼吸粘膜上の amphiregulin の発現を肥満細胞上に認める。また、喘息合併、アスピリン喘息合併と好酸球増多副鼻腔炎での肥満細胞 (AA1)、amphiregulin の発現数を以下のごとく比較したが、各群での有意な差はなかった。

	AIAsinusitis (n=7)	ATAsinusitis (n=8)	Sinusitis (n=8)
血中好酸球数(%)	8.43	8.29	6.45
組織中好酸球数 (x400)	355	121	170
血清総IgE値	354	770	135
AA1(x100)	49	62	88
Amphiregulin(x100)	2.55	1.2	1.5
組織IgE(x100)	32	49	44

各群における組織学的検討

(6) 兔実験的副鼻腔炎モデル時の嗅粘膜を嗅粘膜上皮と繊維芽細胞や脳アストログリアの再構成による嗅粘膜の三次元培養を試みている。しかし、現在まで嗅細胞は培地の中では、抗体を用いた嗅細胞の生存の確認は数日間のみであり、明らかな嗅細胞の cell line の確立には至っていない。

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5件)

① Haruna S. Day surgery for nasal obstruction--excluding that on the lower nasal turbinate. Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 2011 Sep;114(9):755-60. Review.

査読有

② Clinical Epidemiological Study of 553 Patients with Chronic Rhinosinusitis in Japan. Haruna S. et al. Allergol Int. 60:491-6,2011. 査読有

③ Efficacy of combined treatment with S-carboxymethylcysteine (carbocysteine) and clarithromycin in chronic rhinosinusitis patients without nasal polyp or with small nasal polyp. Majima Y, Haruna S. ANL 39: 38-47, 2011. 査読有

④ Majima Y, Kurono Y, Hirakawa K, Suzaki H, Haruna S. et al. Reliability and validity assessments of a Japanese version of QOL 20-Item Sino-Nasal Outcome Test for chronic rhinosinusitis. Auris Nasus Larynx. 2010 Aug;37(4):443-8. 査読有

⑤ Haruna S., Shimada C, Ozawa M, Fukami S, Moriyama H. A study of poor responders for long-term, low-dose macrolide administration for chronic sinusitis. Rhinology. 2009 Mar;47(1):66-71. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 春名眞一. 鼻副鼻腔乳頭腫の手術的治療. 第 113 回日耳鼻教育セミナー. 新潟. 2012. 5.

② Haruna S. Revision surgery and treatment of eosinophilic sinusitis. 5th World Congress for endoscopic surgery of the brain, skull base & spine combined the first global update on FESS, the sinuses & the nose. Vinnea. 2012. 3

③ Haruna S. Clinical evidence for Macrolide Therapy in Chronic Rhinosinusitis and SOM. APAC. Seoul. 2012. 4.

④ Haruna S. Tsukidate T. Transnasal Endoscopic Surgery for Benign Orbital Tumor. JKmeeting. Kyoto. 2012. 4.

⑤ Haruna S. Clinical management for Eosinophilic sinusitis - ESS including Revision Surgery-. JTmeeting. Kobe. 2011. 12.

⑥ Haruna S. Revision surgery for

eosinophilic sinusitis. IRS&ISIAN Congress Tokyo. 2011

⑦ Haruna S. Revision surgery for eosinophilic sinusitis. Rhinology World Congress (Philadelphia). Haruna S, (2009)

[図書] (計 0 件)

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春名眞一 (HARUNA SHINICHI)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：60198934

(2) 研究分担者

深美悟 (FUKAMI SATORU)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00311944

(3) 連携研究者

月舘利治 (TSUKIDATE TOSHIHARU)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：40287256