

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09615

研究課題名（和文）酸化・窒素化ストレスによる嗅粘膜障害-気道リモデリングの嗅粘膜分泌異常の解明-

研究課題名（英文）Olfactory mucosa dysfunction Induced by oxidative nitrosative stress -
Elucidation of olfactory mucosa secretory abnormalities in airway remodeling

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

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）：喘息合併好酸球性副鼻腔炎では、従来型慢性副鼻腔炎とは異なり、早期から後部副鼻腔及び嗅裂部に好酸球性病変が生じて嗅覚障害を訴えやすい。呼吸粘膜と嗅粘膜を組織学的に検討すると、鼻腔後部粘膜で有意に好酸球浸潤と窒素化ストレスのマーカーであるニトロチロシン（3-NT）の発現を認めた。従って、喘息病態による下気道粘膜から鼻腔後部へ多量のNOが流入し、酸化・窒素化ストレスを形成し、鼻副鼻腔と嗅粘膜に好酸球炎症を惹起し、嗅粘膜分泌異常をきたしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息合併好酸球性副鼻腔炎では、上気道のみ治療でなく、喘息治療を十分に改善・維持させて、下気道リモデリングにより生じる過剰なガス状メディエーター、特に鼻副鼻腔へのNOの流入を減少させ、鼻副鼻腔と嗅粘膜の好酸球炎症を抑制させる。その結果、嗅覚障害を改善し好酸球性副鼻腔炎の難治化に対応できる。

研究成果の概要（英文）：In asthma-associated eosinophilic sinusitis, unlike usual chronic sinusitis, eosinophilic lesions in the posterior sinuses and olfactory cleft are likely to develop early on and cause olfactory complaints. Histological examination of the respiratory and olfactory mucosa revealed significant eosinophilic infiltration and expression of nitrotyrosine (3-NT), a marker of nitrosative stress, in the posterior nasal mucosa. Therefore, it is thought that the influx of large amounts of NO from the lower respiratory tract mucosa into the posterior nasal cavity due to asthma pathology forms oxidative and nitrosative stress, induces eosinophilic inflammation in the nasal sinuses and olfactory mucosa, and leads to abnormal olfactory mucosa secretion.

研究分野：上気道好酸球炎症

キーワード：嗅覚障害 好酸球 FeNO 窒素化ストレス ニトロチロシン

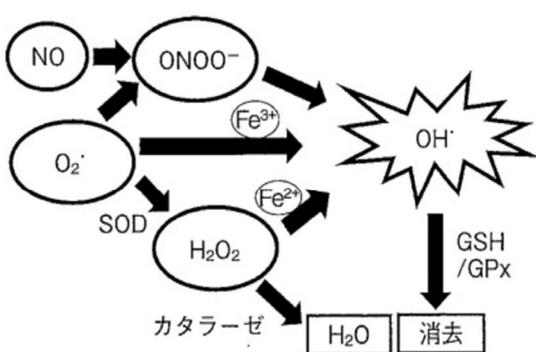
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

喘息を多く合併する好酸球性副鼻腔炎(以下、ECRSと略す)の臨床症状で病態の早期から嗅覚障害が必発し、その病態の把握と治療は大きな課題となっている(Haruna S. ANL,2006)。

これまでの研究で、ECRSでは副鼻腔粘膜同様に嗅粘膜にも多数の好酸球浸潤がみられ、活性好酸球の組織障害蛋白による呼吸粘膜の上皮細胞障害は著明だが、隣接する嗅粘膜上皮の剥奪も観察され、嗅粘膜障害が生じている(Kashiwagi T, Haruna S. Acta Otolaryngol.2019.)。同時に、嗅覚の化学情報伝達に關与する上皮下に存在するボーマン腺は著明な増殖・拡大が認められることが確認され、嗅粘膜上に過度の分泌異常が生じていることが考えられた(Haruna S.投稿中)。さらに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、さらに兔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与すると考えられる。

気道系ではNOなどのガス状メディエーターが多量に産生される。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、多量のガス状メディエーターであるスーパーオキシドとNOが反応し、ONOO⁻を形成し(酸化・窒素化ストレス) 粘膜線毛障害や粘液異常分泌と関与している(Yoshimura T,Haruna S.Allergo Int.2008)。



活性酸素と活性窒素のクロストーク

喘息においては、酸化・窒素化は血管透過性亢進、好酸球浸潤促進や繊維化などで重症化との関連が指摘されている(Furukawa. Respir Res 2011)。

喘息起動で産生された多量のガス状メディエーターは気管支のみならず、後鼻孔から鼻副鼻腔にも流入し、酸化・窒素化ストレスを形成し、鼻腔後部から好酸球炎症を惹起していると予想される。

実際、軽症～中等症のECRSのCTおよび内視鏡所見を観察すると、副鼻腔陰影およびポリープ形成は鼻部副鼻腔と嗅裂の後部から進展している(春名眞一.日鼻誌 53,2014)。またECRSでは、前副鼻腔粘膜に比べ有意に後部篩骨洞粘膜に好酸球数が多い(Samura Y. ANL 38,2011)と報告されている。したがってECRSでは、上気道自体のみならず下気道の好酸球性炎症産物によって副鼻腔粘膜および嗅粘膜において、呼吸粘膜障害や過剰分泌が発症していると予想される。また、治療面においてもステロイドは好酸球性炎症の改善に重要な薬剤であるが、点鼻ステロイドを

使用しても必ずしも嗅覚障害の改善は認められず、後部鼻副鼻腔および嗅裂の好酸球性炎症まで抑制していないことを想起させる。逆に喘息治療の吸入ステロイドを後鼻孔から呼出させることで ECRS が改善したとの報告もある (Kobayashi Y. Int J Clin Pharmacol Ther. 2014)。また、ECRS の術後の再燃時に、嗅裂部と副鼻腔にサージセル綿を挿入し呼気流を遮断しケナコルトを添加すると、粘膜浮腫と分泌過多が著明抑制され、嗅覚障害を改善したと報告した (Konno W, Haruna S. ANL 2019)。さらに、抗 IL-4/IL-13 受容体モノクローナル抗体のデュプリマブは ECRS 再発した呼吸粘膜の消退に有効であるとともに嗅覚障害の改善も認められており (Tsunemi Y, Haruna S. AJRS in press)、嗅粘膜自体の type 2 炎症の消退も関与していることが予想される。

難治性喘息において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 の存在も注目されている (Okumura S. JACI 2005)。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。

2. 研究の目的

なぜ、喘息合併好酸球性副鼻腔炎では病態の早期から後部副鼻腔及び嗅裂部に病変が生じ嗅覚異常が生じるのか、同時に、なぜ、嗅粘膜上皮剥奪より嗅粘膜分泌異常を起こしているのかを、上気道のみならず下気道リモデリングにより生じる過剰なガス状メディエーターに注目して、酸化・窒素化ストレスと嗅粘膜の複合糖質の変化とを関連づけることにある。さらに分泌過多状態の改善を妨げるステロイド抵抗因子との関与も検討し、好酸球性副鼻腔炎の嗅粘膜分泌異常の因子を解明する。

3. 研究の方法

(1) ECRS の前・後副鼻腔粘膜及び嗅粘膜における好酸球浸潤と FeNO との関係を示す。患者に本研究について十分に説明し、登録を行う。喘息合併好酸球性副鼻腔炎にて嗅覚障害を呈する患者の術前に FeNO 測定する。NO 測定装置 (携帯型 NO 測定器 (Nobreath, Bedfont 社)) を用い、安静座位で同時間帯に測定する。鼻腔からの NO 濃度も測定する。

(2) ECRS の前後部副鼻腔粘膜と嗅粘膜で好酸球浸潤と窒素化ストレスのマーカーであるニトロチロシン (3-NT) の発現を免疫組織的に証明し、両者の関係を示す。

(3) 同時に嗅粘膜のボーマン腺からの分泌過多および糖蛋白の変化をきたし、嗅線毛の機能異常を引き起こしていることを関連づける。顕微鏡にて AB・PAS 染色、種々のレクチンとムチン抗体 (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、細胞表面およびボーマン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) ステロイド薬と嗅覚障害の改善の有無を組織学的に観察し、呼吸粘膜と嗅粘膜上でのステロイド抵抗因子について Amphiregulin の存在を組織学的に明確にする。また 3-NT との関係に対比する。

(5) マウス喘息リモデリングモデルを作製し、嗅粘膜糖蛋白の分布と NO の変化を比較する。BALB/c マウスの腹腔内に ovalbumin (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. Inflamm Res 2001)。屠殺後、気管支および前部および後部鼻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、NO, 3-NTを観察する。(6)嗅粘膜細胞培養し、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。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を試みる。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観察する。

4. 研究成果

(1)呼吸粘膜上では著明な好酸球性浸潤とともに上皮細胞障害、胚細胞増勢が見られた。好酸球顆粒蛋白 (ECP, MBP) を免疫染色すると、ほとんどすべての好酸球に発現を認め、活性化状態であることが示された。嗅粘膜では好酸球浸潤は少なく、基底細胞肥厚も軽度であった。嗅粘膜上での ECP, MBP の発現は少なく、強い活性化状態でないこと予想された。またボーマン腺の増勢が認められ、ConA の発現が観察された。

副鼻腔炎手術で採取した前部副鼻腔と後部副鼻腔粘膜での IgE, NOS、レクチン、EG2 抗体を用い光顕で対比すると後者の方が、IgE, 活性好酸球、NOS の発現が強かった。同時に好酸球性副鼻腔炎での嗅粘膜では EG2, NOS, IgE の発現が同様に認められ、後部副鼻腔での好酸球性炎症の存在が示唆された。

喘息合併好酸球性副鼻腔炎患者の手術前後に FeNO の計測と呼吸粘膜と嗅粘膜組織障害を対比すると術前 FeNO の高い症例の呼吸粘膜では好酸球性炎症が強く、気道リモデリングが観察された。同時に採取した嗅粘膜でも好酸球を中心とした炎症細胞浸潤が観察された。

(2)好酸球性副鼻腔炎の気道リモデリングの関与による嗅粘膜分泌異常と鼻副鼻腔での酸化・窒素化ストレスとの関連づけるために、前・後部副鼻腔呼吸粘膜と嗅粘膜で好酸球浸潤と窒素化ストレスのマーカーであるニトロチロシン(3-NT)の発現を免疫組織的に検討した。その結果、嗅粘膜では呼吸粘膜に比較して好酸球浸潤は少なく基底細胞肥厚も軽度であり、嗅粘膜と呼吸粘膜ともにニトロチロシン(3-NT)の発現を認めた。また、前部副鼻腔粘膜の方が後部に比べ好酸球浸潤少なくニトロチロシン(3-NT)の発現も少なかった。マウス喘息リモデリングモデルを作製し、嗅粘膜糖蛋白の分布と NO の変化を比較し、嗅粘膜でも呼吸粘膜ほどでないがニトロチロシン(3-NT)の発現を認めた。同時にリモデリング状態での粘液線のボーマン腺の増勢も観察され、レクチン免疫染色にて ConA, SNA の発現があり、リモデリング状態の粘液分泌の変化が示唆された。ボーマン腺においてはニトロチロシン(3-NT)の発現は認めなかった。

(3)マウス喘息リモデリングモデルを作製し、嗅粘膜糖蛋白の分布と NO の変化を比較する目的でマウスリモデリングモデルの作製を試みた。BALB/c マウスの腹腔内に ovalalbumin(OVA)4 μ g 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作製した。鼻腔粘膜には、多数の好酸球浸潤が観察され、上皮細胞剥奪、杯細胞と基底膜肥厚が認められ、リモデリングの状態が認められた。一方、嗅粘膜でも呼吸粘膜ほどではないが軽度の好酸球浸潤、上皮細胞障害、基底膜肥厚が観察された。また粘液線のボーマン腺の増勢も観察され、分泌亢進が予想された。レクチン免疫染色にて ConA, SNA の発現があり、リモデリング状態の粘液分泌の変化が示唆された。

(4)嗅粘膜の細胞培養はマウスの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に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にて試みた。その結果、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できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakashita M, Haruna S, et al.	4. 巻 150
2. 論文標題 Retinoic acid promotes fibrinolysis and may regulate polyp formation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1114-1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2022.05.021.	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 -

1. 著者名 Nakayama T, Haruna S	4. 巻 7
2. 論文標題 A review of current biomarkers in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Expert Rev Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1744666X.2023.2200164.	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 -

1. 著者名 Nakashima D, Haruna S, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Dupilimab improves eosinophilic otitis media associated with eosinophilic chronic rhinosinusitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergo Int.	6. 最初と最後の頁 S1323-8939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.37796/2211-8039.1237.	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 -

1. 著者名 Nakayama T, Haruna S, et al	4. 巻 149
2. 論文標題 Inflammatory molecular entotypes of nasal polyps derived from White and Japanese populations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 1296-1308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.11.017	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

1. 著者名 Takabayashi T, Haruna S, et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 A phase II, multicenter, randomized, placebo-controlled study of benralizumab, a humanized anti-IL-5R alpha monoclonal antibody, in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Rhinol Allergy	6. 最初と最後の頁 861-870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/19458924211009429	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 -

1. 著者名 Ohki M, Haruna S, et al.	4. 巻 47
2. 論文標題 Consensus guidance of Nebulize therapy for acute rhinosinusitis.r	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 18-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.08.007	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 -

1. 著者名 Nakayama T, Haruna S et al	4. 巻 35
2. 論文標題 Comparison of current staging systems for sinonasal inverted papilloma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Rhinol Allergy	6. 最初と最後の頁 64-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1945892420933178	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
研究分担者	金谷 洋明 (Kanaya Hiroaki) (40265301)	獨協医科大学・医学部・非常勤講師 (32203)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	柏木 隆志 (kashiwagi Takashi) (50622982)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	

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