

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16929

研究課題名（和文）難治性骨炎を伴う好酸球性副鼻腔炎に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for eosinophilic chronic rhinosinusitis with osteitis

研究代表者

津田 武 (Tsuda, Takeshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00778631

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）：好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 患者由来の中鼻甲介では IL-4 signaling pathway の発現が亢進するとともに、線維化に関連する pathway が亢進していた。線維化に関する pathway に共通して含まれていた遺伝子として MMP9 があげられ、ECRS の中鼻甲介では蛋白レベルでも MMP-9 増加を認めた。鼻腔上皮細胞に対して MMP-9 の刺激を行い変動遺伝子について網羅的に解析したところ、刺激によって IL-6 および IL-17 signal pathway の亢進を認めた。これらを総合して ECRS の病態において中鼻甲介が MMP9 の産生を介して複合炎症を誘導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

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) について病態は解明が進みつつあるが、増悪メカニズムについてはまだ不明な点が非常に多い。今回の研究からこれまでに中鼻甲介が浮腫性変化をきたした症例ではより重症度が高く治療後の再発が多いという事象を説明するメカニズムとして中鼻甲介の silent Type2 炎症および MMP-9 産生による線維化の亢進と複合炎症の誘導というものが新たに示唆された。このような症例において例えば今後、中鼻甲介に対しても積極的な手術アプローチなどを行うことが重要になると考えられこれによりコントロールが良好になれば患者 QOL の改善につながる。

研究成果の概要（英文）：In the middle turbinate of patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS), the IL-4 pathway was upregulated, as were fibrosis-related pathways. MMP-9 was a common gene in fibrosis-related pathways, and MMP-9 was also increased at the protein level in the middle turbinate of ECRS. Comprehensive analysis of MMP-9 stimulation of nasal epithelial cells showed that the IL-6 and IL-17 pathways were enhanced by stimulation. Taken together, these findings suggest that the middle nasal turbinate induces complex inflammation via MMP-9 production in the pathogenesis of ECRS.

研究分野：免疫、アレルギー

キーワード：MMP-9 中鼻甲介 好酸球性副鼻腔炎 RNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎(ECRS)は好酸球浸潤の強い鼻茸を特徴とする疾患であり、厚生労働省の難病指定を受けている。治療法として手術やステロイド内服、抗体薬があげられるが早期再発や副作用を引き起こすなど問題点も多く、根本的な治療が未だにない。特に著しい骨炎を伴う症例では、予後が不良となるが好酸球性副鼻腔炎で骨炎を引き起こすメカニズムについて不明な点が多く病態解明および新たな治療法の確立が重要となる。我々がこれまでに研究を続けてきた中では特に中鼻甲介で骨肥厚を認めることが多く鼻茸の再発も同部位周辺からが多いが、中鼻甲介が ECRS の病態においてどのように病態に影響を与えているかは十分検討なされていなかった。申請者らは好酸球性副鼻腔炎患者で骨肥厚を認めた症例から採取した中鼻甲介において Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)遺伝子の発現が亢進していること、さらに好酸球性副鼻腔炎患者では他の鼻副鼻腔疾患患者より血清 MMP-9 が高値であることを発見した。Matrix metalloproteinase(MMP)ファミリーは金属要求性蛋白分解酵素群であり細胞外マトリックスの分解や、様々なサイトカインの活性化能を持つ物質であり複数のサブクラスが存在する。MMP の 1 種である MMP-9 は様々な細胞から産生され、Ⅲ型コラーゲンを分解する物質である。好酸球性副鼻腔炎や気管支喘息の患者において局所で発現が亢進しているということが報告されているが、直接的な病態への影響を検討した報告は少ない。申請者は以前に MMP-9 が鼻腔上皮細胞のリモデリングマーカーの発現を誘導し好酸球性副鼻腔炎の難治化に寄与することを発見した (Tsuda, *Int. Immunology*. 2019)。

2. 研究の目的

ECRS の重症化に寄与する因子は複数考えられるが、我々はその中で骨炎に注目した。骨炎を伴う難治性の ECRS 症例において骨炎が起こるメカニズムを解明するとともに、骨炎が起こりやすい中鼻甲介が ECRS の病態にどのように寄与しているかを評価する。また ECRS 患者において上昇している血清 MMP-9 値が ECRS のバイオマーカーとして有用であるかどうか臨床的病勢を示す様々な所見との相関を確認して可能性を検討する。MMP-9 がリモデリングを誘導していることは上述のとおり過去の我々の研究で解明されていたが、その他に炎症を増悪させるメカニズムがないかを評価する。

3. 研究の方法

骨炎を起こしている難治性 ECRS の中鼻甲介・下鼻甲介を採取するとともに比較対象として非好酸球性副鼻腔炎(NECRS)の症例から対応する部位を採取してこれらについて網羅的解析を行った。その結果、ECRS 由来の中鼻甲介では MMP9 の遺伝子発現が亢進していた。我々はこのことから MMP-9 と骨炎および炎症の難治化メカニズムに注目し、中鼻甲介や polyp における MMP-9 の蛋白レベルの発現局在を免疫染色で評価するとともに ImageJ ソフトウェアを用いて定量化し疾患間で発現に差が認められるかを評価した。また血清の MMP-9 濃度については患者血清を ELISA 法で測定し、カルテベースの患者情報から血中好酸球(数およびパーセント)・JESREC score・Polyp score、臨床的重症度など臨床的な病勢をあらゆる項目との相関についても評価した。これらに加えて MMP-9 自体の機能を評価することを目的として、手術の際に採取した副鼻腔組織より Air-liquid interface culture の手法を用いて確立した鼻腔上皮細胞をターゲットとして recombinant MMP-9 による刺激実験を行った。刺激により変動した遺伝子については RNA-sequencing による網羅的な解析を行い、変動した遺伝子の関係性については Ingenuity pathway analysis(IPA)を用いた Pathway 解析を行うことで MMP-9 の病的意義についても広く評価を行なった。同時に採取していた培養上清については、Cytometric Bead Array による複数サイトカイン濃度の測定を行い MMP-9 が上皮細胞から炎症性サイトカインの産生を誘導するかどうかについて評価を行った。

4. 研究成果

ECRS および NECRS 患者より採取した中鼻甲介・下鼻甲介を用いて RNA-sequencing による解析を行った。まず ECRS 患者の中鼻甲介と下鼻甲介の発現遺伝子について評価したところ、ECRS 患者の中鼻甲介では 70 の遺伝子が発現亢進しており逆に 330 の遺伝子の発現低下を認めた。これらの発現亢進していた遺伝子の中には MMP9 が含まれていた。同様に NECRS 患者においても中鼻甲介と下鼻甲介における遺伝子発現を網羅的に比較したところ、NECRS 患者の中鼻甲介では下鼻甲介と比較して 21 の遺伝子が発現亢進しており、逆に 43 遺伝子の発現が低下していた。続けて我々は ECRS 患者の中鼻甲介と NECRS 患者の中鼻甲介について遺伝子発現を比較したところ、211 の遺伝子が有意に発現変動を認めていた。これらの発現変動をみとめた遺伝子の中には上述の MMP9 も含まれており、ECRS 患者の中鼻甲介において有意に発現が多く認められた。またこれらの変動遺伝子リストを用いて Pathway 解析を行ったところ、ECRS 患者由来の中鼻甲介では IL-4 signaling pathway の発現が亢進しており、この pathway に関連するいくつかのコラーゲン遺伝子の発現亢進を認めた。(具体的には、COL10A1、COL11A1、COL11A2、COL12A1、COL16A1、COL1A1、

COL1A2、COL24A1、COL27A1、COL3A1、COL5A1、COL8A1などの遺伝子が有意に上昇していた。)同時に ECRS 患者の中鼻甲介では Pulmonary Fibrosis Idiopathic Signaling Pathway、Extracellular matrix organization や Wound Healing Signaling Pathway など線維化に関連する pathway も亢進していた。線維化に関する pathway に共通して含まれていた遺伝子として MMP9 があげられた。これらを踏まえて、我々は実際に ECRS 患者の中鼻甲介において蛋白レベルでも MMP-9 の発現が亢進しているかを評価する目的で免疫染色を行った。その結果、ECRS 患者の中鼻甲介において MMP-9 蛋白の発現が亢進していることを確認することができた。NECRS 患者の中鼻甲介についても同様に MMP-9 の蛋白発現を評価し ImageJ で定量化して疾患間の発現差を評価したところ ECRS 患者の中鼻甲介において有意に MMP-9 蛋白の発現が亢進していた。また並行して ECRS の特徴である Polyp についても同様に MMP-9 の免疫染色を行ったところ、こちらでも MMP-9 の発現を認めており、NECRS 患者の副鼻腔組織と比較しても有意に発現が亢進していた。これらのことから ECRS 患者では Polyp のみならず中鼻甲介においても MMP-9 の発現が亢進していることが示された。

また ECRS 患者および NECRS 患者の血清 MMP-9 濃度を測定したところ ECRS 患者において NECRS 患者と比較して血清 MMP-9 濃度が有意に上昇しており、Polyp score と正の相関を認めた。(血中好酸球数や好酸球パーセント、JESREC score、臨床的重症度とは相関を認めなかった。)MMP-9 の機能解析を行う目的で行った鼻腔上皮細胞の recombinant MMP-9 刺激実験および RNA-sequencing 解析からは、MMP-9 刺激によって鼻腔上皮細胞では 180 の遺伝子に発現変動を認めた。同様に IPA による解析を行ったところ、IL-6 および IL-17 signaling Pathway、S100 Family Signaling Pathway、HIF1 Pathway の亢進を認めた。培養上清中のサイトカイン濃度については IL-1、IL-6、IL-8、RANTES について評価を行った。その結果 IL-6、RANTES については MMP-9 の刺激により産生が誘導される傾向を認めたものの統計学的な有意差は認められなかった。

ECRS は、2 型炎症と 3 型炎症が共存する複雑な病態である。ECRS では、主に 2 型炎症に関与する IL-4、IL-5、IL-13 などのサイトカインが好酸球の増殖と活性化を促進し、慢性的な炎症と組織損傷を引き起こす。好酸球が副鼻腔内に集積することで、持続的な炎症が生じ、鼻ポリープの形成や副鼻腔の閉塞が発生する。しかし、近年の研究により、3 型炎症も ECRS の病態に重要な役割を果たしていることが明らかになった。IL-6、IL-17 などは 3 型炎症を引き起こすことが知られており、3 型炎症自体は好中球の動員と活性化を促進し、これがさらに組織のリモデリングや繊維化を引き起こす。IL-17 は特に好中球性炎症を誘導し、好中球が産生するプロテアーゼや活性酸素種が組織損傷を助長することで慢性的な炎症状態を持続させる要因ともなりうる。ECRS における 2 型炎症と 3 型炎症の共存は、疾患の複雑さと治療の難しさを増大させる要因となっている。2 型炎症は好酸球を主なターゲットとし、ステロイドや抗 IL-5 治療、抗 IL-4/13 治療が効果を示す一方で、3 型炎症を標的とする治療も必要とされる。このような背景から、ECRS の治療には包括的なアプローチが求められる。MMP-9 は 2 型および 3 型炎症の両方に影響を与える因子であることが推測され、この働きを考慮した治療戦略を確立することで、より効果的な疾患管理と患者の生活の質の向上が期待される。新たな治療ターゲットの探索と開発は、今後の研究において重要な課題であり、ECRS の病態解明と治療法の進展に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 津田 武 武田和也 藤井宗一郎 小幡 翔 端山昌樹 前田陽平 中谷彩香 猪原秀典
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎・中鼻甲介における Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)の発現と機能解析
3. 学会等名 第3回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2023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
---------	---------