

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592582

研究課題名(和文) エピゲノム制御機構の解析に基づく難治性慢性副鼻腔炎の病態解明

研究課題名(英文) Pathologic Analysis of Intractable Chronic Rhinosinusitis Based on Epigenetic Mechanisms

研究代表者

吉川 衛 (YOSHIKAWA, Mamoru)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：50277092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性副鼻腔炎の難治症例では気管支喘息の合併が多く、鼻粘膜、鼻腔ポリープに著しい好酸球浸潤を認める。また、気管支喘息患者では、ウイルス感染時に発現するケモカインのCXCL10が病態の増悪に関与していると報告されている。そこで、慢性副鼻腔炎患者から採取した鼻茸由来の線維芽細胞をもちいて検討を行った。その結果、本研究課題の成果の一つとして、気管支喘息を合併した慢性副鼻腔炎患者においては、鼻茸中の線維芽細胞からのCXCL10の発現増強を介したTh1細胞浸潤が、慢性副鼻腔炎の難治化の要因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic rhinosinusitis (CRS) is characterized by local inflammation of the sinonasal tissues. CRS patients with nasal polyps and asthma often develop acute exacerbation of sinonasal symptoms after upper respiratory tract infections. Nasal fibroblasts isolated from the specimens were stimulated with poly I:C. CXCL10 expression was analyzed. Biopsy specimens were subjected to immunohistochemistry for detection of T-bet and GATA-3 expression in CD3+ T cells by double labeling. Nasal fibroblasts from the aspirin-tolerant asthma (ATA) and aspirin-intolerant asthma (AIA) patients showed significantly enhanced expression of CXCL10 mRNA and protein after poly I:C stimulation. In addition to T helper (Th)2 cells, there was more abundant infiltration of Th1 cells into tissues from the AIA and ATA patients. Our findings suggest that CRS associated with asthma may become intractable through the over-production of CXCL10 in response to viral infection.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：慢性副鼻腔炎 気管支喘息 ウイルス感染 線維芽細胞 エピゲノム制御機構

## 1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎は、粘膿性鼻漏、鼻閉、嗅覚障害、頭重感などの生活に支障をきたす症状が長期にわたって持続し、かつ比較的罹患率の高い疾患である。近年、マクロライド系抗菌薬の少量長期投与などの治療法により治癒率の向上を得たものの、従来の治療法では改善しない予後不良例が徐々に増加してきており問題となっている。このような治癒寛解が困難な病態をもつ慢性副鼻腔炎患者の多くには鼻腔ポリープが認められ、手術を行っても再発を繰り返すことが多い。難治症例の臨床的背景を検討したところ、アスピリン喘息(Aspirin Intolerant Asthma; AIA)を含めた非アトピー性気管支喘息を合併している症例が多く、末梢血中の好酸球増多や鼻粘膜、鼻腔ポリープに著しい好酸球浸潤があることがわかってきた。現在、そのような病態は日本では好酸球性副鼻腔炎と呼ばれている。(春名 眞一, 他. 耳展. 2001; 44: 195-201.) また、内視鏡下鼻内手術を行った慢性副鼻腔炎患者 223 例を対象とした研究代表者らの疫学研究において、欧米の診断基準において重要視される鼻腔ポリープの有無よりも、粘膜の好酸球浸潤の方が統計学的に予後との相関があることを報告した。(Nakayama T, Yoshikawa M, et al. *Rhinology*. 2011; 392-6.) そのため新規治療法を考える場合、重要な標的となるのは著明な好酸球浸潤を制御している因子である。すなわち、予後良好な症例とは異なる難治症例特有の微小環境を制御している因子を解明することによって、著明な好酸球浸潤を認める病態の根本的な治療が可能になると考える。

近年、間葉系細胞は骨髄における造血幹細胞のニッチとしての役割や、発生あるいは組織形成において細胞の増殖や分化への役割、ある種の癌の増殖や転移に対する環境因子としての作用をもつことが知られてきている。(Saito RA, et al. *Cancer Res*. 2010; 70: 2644-54. Kleeff J, et al. *Int J Cancer*. 2007; 121: 699-705. Hill R, et al. *Cell*. 2005; 123: 1001-11.) これらの知見は、線維芽細胞が周辺の細胞へ様々な形で影響を与え、発分化やからだの恒常性、病態形成において中心的な役割をもつ可能性を示唆しており、難治性の慢性炎症においても重要な役割をもっていると考えられる。

研究代表者は、これまで中耳腔や鼻・副鼻腔における炎症組織由来の線維芽細胞と正常組織由来の線維芽細胞の包括的遺伝子発現解析による比較検討を行い、各種刺激後に特定の遺伝子群の発現において差があることを解明し、長期的に炎症に暴露された線維芽細胞は表現型の変化を起こしている可能性があることを報告してきた。(Yoshikawa M, et al. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 132: 734-42.) その中でも、慢性副鼻腔炎患者のうち非アトピー性気管支喘息合併

例(AIAを含む)と非合併例から採取した鼻組織由来の線維芽細胞を培養し、ウイルス由来二重鎖RNAを認識するToll-like receptor (TLR) 3を介する応答性の違いについて検討を行ったところ、著明な好酸球浸潤を認める難治例の副鼻腔粘膜に存在する線維芽細胞にはインターフェロン(IFN)誘導性遺伝子の発現を調節しているシグナル伝達経路に変異が存在し、IFN誘導性遺伝子の発現を増強させていることを解明した。この結果から、好酸球性副鼻腔炎のような難治性の病態においては、局所に存在する線維芽細胞の表現型に変化が生じ、これにより局所の炎症が増強していることが病態形成において重要な因子ではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、このような治癒寛解が困難な慢性副鼻腔炎を対象とし、局所に存在する線維芽細胞の表現型がウイルス感染などの何らかの環境因子により変化し、その結果炎症細胞が誘導されて浸潤し難治性の慢性炎症を引き起こすという仮説を証明することを目的としている。具体的には、以下の4つの仮説を証明することによって新規治療薬の開発に貢献することを最終的な目標としている。

- (1) 組織中の間葉系細胞(特に線維芽細胞)が生体内の微小環境に関与している
- (2) 線維芽細胞の表現型がウイルス感染などの何らかの環境因子によって変化(塩基配列の変異を伴わない、DNAやヒストンの生理的な化学修飾による遺伝子発現調節)し、その表現型がその後も維持される
- (3) 表現型が変化した線維芽細胞による作用によって、好酸球などの炎症細胞浸潤を誘導し難治化した慢性炎症病態を形成する
- (4) 変化した線維芽細胞の表現型を正常時の状態へ戻すと、このような難治化した慢性炎症病態が改善される

最近では生体のもつあらゆる分子情報を、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどの様々な階層で網羅的に計測して分析するオミックス(Omics)解析が行われている。これにより新規のメカニズムに基づく医薬品の創生が期待されているが、本研究課題では、このうちDNAやヒストンの化学修飾状態に関するゲノム高次構造の変化などのエピジェネティック変化を測定するエピゲノムの網羅的な解析を行う。これまで研究代表者が行ってきた難治性の慢性副鼻腔炎の病態に関するトランスクリプトーム解析の実績をふまえて、その研究成果をさらにこのエピゲノム情報と比較・統合し創薬標的を探索する。また、DNAメチル化阻害剤やヒストンアセチル化酵素阻害剤を用いたエピジェネティック治療

が既に一部の疾患で効果をあげているが、本研究課題で抽出された創薬標的候補に対するエピジェネティック治療薬によって、難治性の慢性副鼻腔炎患者の線維芽細胞の表現型を正常時の状態に戻せるかどうかについて明らかにすることを目標としている。

### 3. 研究の方法

- (1) 局所の線維芽細胞がどのような表現型の変化を起こしているのかについて検討するため、まず IFN 誘導性遺伝子の IP-10/CXCL10 に着目し、難治症例の副鼻腔粘膜由来の線維芽細胞でこれらの発現を増強させている因子の同定を行った。  
慢性副鼻腔炎患者を、喘息を合併しない群 (CRS 群)、喘息を合併する群 (Aspirin Tolerant Asthma; ATA 群)、アスピリン喘息を合併する群 (AIA 群) に分類し、倫理委員会の承認のもと患者の同意を得たうえで、手術時に採取した鼻組織より線維芽細胞を培養した。ウイルス由来二重鎖 RNA (poly I:C) を認識する TLR3 を介した IP-10/CXCL10 の発現について検討を行った。解析は Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) および Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で行った。さらに poly I:C だけでなく IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  による刺激を行い、Poly I:C が IP-10/CXCL10 を誘導するシグナル伝達経路のうちどこに変化が生じているのかについて検討した。また、IP-10/CXCL10 が遊走する細胞のうち Th1 細胞の組織中への浸潤について検討を行うため、鼻茸組織中の CD3 の発現と、Th1 細胞に特異的な転写因子である T-bet および Th2 細胞に特異的な転写因子である GATA3 の発現について免疫染色を行った。
- (2) この後に、IP-10/CXCL10 のプロモーター領域を中心にヒストンの化学修飾の変化を確認し、難治症例の副鼻腔粘膜由来の線維芽細胞でこれらの発現を増強させているヒストン化学修飾因子の同定を行ったが、有意なデータが得られなかった。そこで、喘息患者の組織において細胞外マトリックスの periostin (POSTN) の発現が上昇していること、さらにステロイド投与により POSTN 発現が減少し、その発現減少が肺機能の改善と相関することに着目し、喘息を合併する慢性副鼻腔炎患者の副鼻腔粘膜および鼻茸組織中における periostin (POSTN) と、その発現に關与する IL-13, TSLP の発現を解析し、慢性副鼻腔炎の病態との関連性について検討を行った。  
慢性副鼻腔炎患者を、鼻茸のない慢性副鼻腔炎群 (control, n=6)、鼻茸を有する喘息 (アスピリン喘息を含む) を合併しない慢性副鼻腔炎群 (CRSnA 群、

n=9)、鼻茸を有する喘息 (アスピリン喘息を含む) を合併する慢性副鼻腔炎群 (CRSwA 群, n=7) に分類し、倫理委員会の承認のもと患者の同意を得たうえで、手術時に各組織を採取した。miRNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。この一部について定量的 PCR を用いて、鈎状突起粘膜および鼻茸組織中における POSTN, IL-13, TSLP 遺伝子の発現変動を解析し、各遺伝子間の相関性についても検討した。遺伝子発現解析後の数値は GAPDH で補正を行った (%GAPDH)。

### 4. 研究成果

- (1) 喘息を合併した慢性副鼻腔炎患者由来の線維芽細胞 (ATA 群, AIA 群) では、qRT-PCR, ELISA による解析において、poly I:C 刺激による IP-10/CXCL10 の発現が有意に増強していた。また、ATA 群では、主に NF- $\kappa$ B を介する TNF- $\alpha$  刺激で、AIA 群では TNF- $\alpha$  刺激だけでなく IRF3 や IRF7 を介する IFN- $\alpha$  刺激でも同様な増強効果が認められた。免疫染色において、喘息を合併した慢性副鼻腔炎患者の鼻茸組織においては、既に報告されている CD3(+)GATA3(+)細胞すなわち Th2 細胞の浸潤が増強しているだけでなく、CD3(+)T-bet(+)細胞すなわち Th1 細胞の浸潤も増強していた。特にこの傾向は AIA 群に顕著であった。  
喘息を合併した慢性副鼻腔炎患者由来の線維芽細胞において poly I:C 刺激による IP-10/CXCL10 の発現が有意に増強していたことから、何等かの線維芽細胞の表現型の変化が生じている可能性があるが、このメカニズムの解明のためにはさらなるエピジェネティクス解析などが必要である。また、この現象は ATA 群と AIA 群の線維芽細胞において異なる部位の変化で生じている可能性が示唆されたことも興味深い。  
これらの結果から、喘息を合併した慢性副鼻腔炎患者においては、副鼻腔粘膜局所の線維芽細胞からの IP-10/CXCL10 の発現増強を介した Th1 細胞浸潤が、慢性副鼻腔炎の難治化の一つの要因となっている可能性が示唆された。
- (2) CRSwA 群患者では、他の群に比べて血中好酸球数が有意に高値であったが、総 IgE 値には差が認められなかった。また、今回採取した鼻茸組織においては、組織中の好酸球数および組織中 RNASE2 (EDN) mRNA レベルは、喘息の有無すなわち CRSwA 群と CRSnA 群では有意な差は認められなかった。組織中 POSTN mRNA は、CRSwA 群が CRSnA 群および control 群に比べて有意に高値であった (p<0.05; CRSnA 群との比較, p<0.05; control 群との比較, 各群の中央値: CRSwA; 94.21,

CRSnA; 16.89, control; 10.28) . 組織中 IL-13 mRNA は各群において有意な差は認められなかったが, TSLP mRNA は CRSwA において他群と比較して最も高い発現が認められた ( $p < 0.05$ ; CRSnA 群との比較,  $< 0.05$ ; control 群との比較, 各群の中央値: CRSwA; 0.038, CRSnA; 0.022, control; 0.011) . 全てのサンプルにおける組織中 POSTN mRNA は IL-13 mRNA と相関性が見られた ( $r = 0.5825$ ,  $p < 0.01$ ) . さらに組織中 TSLP mRNA は POSTN mRNA の発現との相関が確認された ( $r = 0.5469$ ,  $p < 0.01$ ) が, IL-13 mRNA とは有意な相関が確認できなかった ( $r = 0.3549$ ,  $p = 0.09$ ) . 喘息を合併する慢性副鼻腔炎の病態においては, POSTN および TSLP が高発現していた . また, POSTN と IL-13 および TSLP の発現は組織中で相関することから, 既報 (Masuoka M, et al. *Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. J Clin Invest. 2012;122(7):2590-600.*) にあるように, 喘息を合併する患者の組織中においては, IL-13 によって組織構成細胞 (線維芽細胞など) から発現誘導された POSTN が TSLP を誘導し, type-2 炎症の増悪を引き起こすサイトカインサイクルが存在することが示唆された .

#### 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 6 件)

Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, Asaka D, Takeno S, Ikeda H, Nakayama T, Seki N, Ito S, Murata J, Sakuma Y, Yoshida N, Terada T, Morikura I, Sakaida H, Kondo K, Teraguchi K, Okano M, Otori N, Yoshikawa M, Hirakawa K, Haruna S, Himi T, Ikeda K, Ishitoya J, Iino Y, Kawata R, Kawauchi H, Kobayashi M, Yamasoba T, Miwa T, Urashima M, Tamari M, Noguchi E, Ninomiya T, Imoto Y, Morikawa T, Tomita K, Takabayashi T, Fujieda S. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy*. 2015; 70: 995-1003.

doi:10.1111/all.12644. 査読有  
藤枝重治, 坂下雅文, 徳永貴広, 岡野光博, 春名威範, 吉川 衛, 鴻 信義, 浅香大也, 春名眞一, 中山次久, 石戸谷淳一, 佐久間康徳, 平川勝洋, 竹野 幸夫, 氷見徹夫, 関 伸彦, 飯野ゆき子, 吉田尚弘, 小林正佳, 坂井田寛, 近藤健二, 山嵜達也, 三輪高喜, 山田奏子, 河田 了, 寺田哲也, 川内秀之, 森倉一朗, 池田勝久, 村田潤子, 池田浩己, 野口恵美子,

玉利真由美, 広田朝光, 意元義政, 高林哲司, 富田かおり, 二之宮貴裕, 森川大洋, 浦島充佳 . 好酸球性副鼻腔炎 診断ガイドライン(JESREC Study) . 日本耳鼻咽喉科学会会報 2015 ; 118 : 728-735 . 査読無

doi:10.3950/jibiinkoka.118.728

Yoshikawa M, Wada K, Yoshimura T, Asaka D, Okada N, Matsumoto K, Moriyama H. Increased CXCL10 expression in nasal fibroblasts from patients with refractory chronic rhinosinusitis and asthma. *Allergol Int*. 2013; 62: 495-502. 査読有

doi:10.2332/allergolint.13-0A-0572.

Yoshikawa M, Kojima H, Yaguchi Y, Okada N, Saito H, Moriyama H. Cholesteatoma fibroblasts promote epithelial cell proliferation through overexpression of epiregulin. *PLoS One*. 2013;8(6): e66725. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0066725.

Nakayama T, Asaka D, Yoshikawa M, Okushi T, Matsuwaki Y, Moriyama H, Otori N. Identification of chronic rhinosinusitis phenotypes using cluster analysis. *Am J Rhinol Allergy*. 2012; 26: 172-6. 査読有

doi:10.2500/ajra.2012.26.3749.

Asaka D, Yoshikawa M, Nakayama T, Yoshimura T, Moriyama H, Otori N. Elevated levels of interleukin-33 in the nasal secretions of patients with allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012; 158: s47-50. 査読有

doi: 10.1159/000337764.

[学会発表](計 9 件)

Okada N, Nakayama T, Asaka D, Matsuda A, Saito H, Yoshikawa M, Matsumoto K. Distinct and common gene expression profiles of nasal polyp tissues in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis . American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 2016 , Los Angeles , USA , 2016.3.6

吉川 衛, 浅香大也, 中山次久, 鴻 信義 . 日米の鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎における組織中遺伝子発現についての検討 , 第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会 , 広島国際会議場(広島県広島市) , 2015 . 10.3

井上なつき, 中山朱里, 中野光花, 坂口雄介, 高畑喜臣, 山口宗太, 大久保はるか, 森脇宏人, 吉川 衛 . 難治性の慢性副鼻腔炎に対する内視鏡下鼻内副鼻腔手

術の予後についての検討 .第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会，広島国際会議場(広島県広島市)，2015.10.3

Yoshikawa M, Sakaguchi Y, Takahata Y, Inoue N, Sawai R, Okubo H, Yamaguchi S, Moriwaki H . Increased Th1 cells infiltration in nasal polyps from patients with refractory chronic rhinosinusitis and asthma . European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2015 , Barcelona , Spain , 2015.6.9

Yoshikawa M, Wada K, Yoshimura T, Asaka D, Moriyama H. Increased IP-10 expressions in nasal fibroblasts from patients with refractory chronic rhinosinusitis and asthma. 2014 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology annual meeting, San Diego, USA, 2014.3.2

Yoshikawa M, Wada K, Yoshimura T, Asaka D, Moriyama H: Increased CXCL10 expression in nasal fibroblasts from patients with refractory chronic rhinosinusitis and asthma. European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, Milan, Italy, 2013.6.24

Okada N, Yoshikawa M, Asaka D, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K: Possible involvement of thymic stromal lymphopoietin and IL-13/periostin in development of asthma in patients with chronic rhinosinusitis. European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, Milan, Italy, 2013.6.24

吉川 衛, 和田 弘太, 浅香 大也, 吉村 剛, 森山 寛:喘息を合併した慢性副鼻腔炎患者由来の線維芽細胞における IP-10/CXCL10 の発現について . 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会，大阪国際会議場(大阪府大阪市)，2012.11.30

Yoshikawa M, Yoshimura T, Asaka D, Moriyama H: CXCL10 expression in nasal fibroblasts derived from patients with chronic rhinosinusitis. The 31st International Symposium on Infection and Allergy of the Nose & The 24th European Rhinologic Society, Toulouse, France, 2012.6.17

(1)研究代表者

吉川 衛 (YOSHIKAWA, Mamoru)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：50277092

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

松本 健治 (MATSUMOTO, Kenji)

国立成育医療研究センター・免疫アレルギー

ー・感染研究部・部長

研究者番号：60181765