

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791742

研究課題名(和文)新規標的分子を介した炎症性鼻疾患に対する治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new treatments for nasal diseases through novel target molecules

研究代表者

石田 晃弘(Ishida, Akihiro)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00361246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎を代表とする鼻粘膜における炎症性疾患の病態として過剰な鼻汁産生と粘膜浮腫があり様々な分子が関与しているが、今回はpendrinとperiostinについて解析を行った。ヒト鼻粘膜上皮細胞株でのpendrinとperiostinの発現について解析を行った。細胞株をIL-13で刺激するとpendrin及びperiostinの発現量が増加する傾向を認めた。また、本研究では血清中のperiostin濃度も測定可能であったため臨床検体を用いて解析を行った。血清中のperiostin濃度は鼻粘膜の疾患活動性や重症度を示すバイオマーカーとして利用可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Several factors contribute to pathologies such as excessive mucus production and mucosal edema, leading to nasal discharge and obstruction in inflammatory nasal disorders. These pathological conditions might be precipitated by the actions of molecules such as pendrin and periostin. Production of these molecules is induced by IL-13 in airway epithelial cell cultures. Production of these molecules is upregulated in inflammatory nasal disorders. We also studied the correlation between serum periostin concentration and severity of chronic sinusitis. Periostin may be employed as a biomarker of disease activity and severity of inflammatory nasal disorders.

研究分野：鼻科学

キーワード：慢性副鼻腔炎 アレルギー性鼻炎 ペンドリン ペリオスチン

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎などの鼻疾患は鼻汁、鼻閉が主症状となり QOL を低下させ日常生活の支障となりうる。これら鼻粘膜における慢性炎症の病態として過剰な鼻汁産生と粘膜浮腫があり様々な分子が関与しているが、近年注目されている分子としてペンドリンとペリオスチンが挙げられる。

### (1) ペンドリンについて

ペンドリンは細胞膜貫通型の蛋白質であり、陰イオン輸送体として重炭酸イオン、ヨードイオン、塩素イオンなどを透過させる(図1)<sup>1)</sup>。ペンドリンは内耳、甲状腺、腎臓に主として発現しており、この蛋白質に変異が生じることで感音難聴や、甲状腺腫大と特徴とする Pendred 症候群を発症する<sup>2)</sup>。近年、IL-4 または IL-13 が気道上皮細胞においてペンドリンの発現を上昇させることがわかっている。また、喘息あるいは COPD のモデルマウスの肺組織においてペンドリンの発現が上昇しており、ペンドリンをマウス肺組織に強制発現させると、気道過敏性の亢進、粘液産生、好中球浸潤が増強されることから、喘息や COPD における炎症メディエーターの一つとして注目されている<sup>3-5)</sup>。

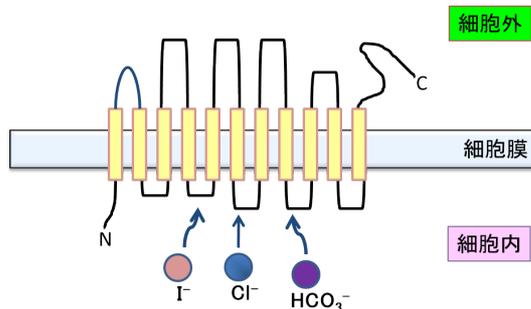


図1: ペンドリンの構造

### (2) ペリオスチンについて

ペリオスチンは骨膜や歯根膜に特異的に発現し、骨芽細胞株より単離された細胞外マトリックス蛋白である<sup>6)</sup>。ペリオスチンは線維化とコラーゲン沈着の調節因子であり、心筋梗塞後の心筋修復に重要な役割を果たしていることでも注目されているが<sup>7)</sup>、ペンドリンと同様 IL-4 や IL-13 によって誘導され、気道上皮の線維化を引き起こすことから気管支喘息の病態形成に関与することが示唆されている<sup>8-10)</sup>。

### (3) One airway one disease (United airway disease)

上気道と下気道のアレルギー性炎症が密接に関連していることが近年多くの報告から知られている。上気道の疾患であるアレルギー性鼻炎は気管支喘息発症の危険因子であり増悪因子でもある。また喘息患者の7割か

ら8割がアレルギー性鼻炎を合併していることはよく知られている<sup>11)</sup>。one airway one disease (united airway disease) という概念が提唱されているが、このことから考慮すると下気道におけるアレルギー性炎症はアレルギー性鼻炎を代表とする上気道の慢性炎症病変においても病態学的に類似する点が多いと推測される<sup>12)</sup>。

## 2. 研究の目的

アレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎などの炎症性鼻疾患は QOL を低下させるだけでなく日常生活の支障となり経済的損失も大きい。これら炎症性鼻疾患治療の新規標的分子として pendrin と periostin は有用であると考えられる。これら2分子の発現の状態を解析するのが本研究の目的である

## 3. 研究の方法

(1) 今回はアレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎、アスピリン喘息症例の鼻粘膜組織におけるペンドリン及びペリオスチンの発現を免疫染色、リアルタイム PCR 法によって検出した。また、ペリオスチンについてはウエスタンブロット法によっても検出し検討した。

(2) 健常者 66 例の血清中のペリオスチン量を ELISA 法にて測定し、慢性副鼻腔炎患者 60 例の血清中ペリオスチン濃度と比較した。各患者の鼻内所見(ポリープの有無)、CT 所見、アレルギー性鼻炎合併の有無、好酸球数、ECP 濃度を測定し、血清 periostin 量との相関を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 鼻粘膜におけるペンドリンの発現  
抗ペンドリン抗体を用いて免疫染色を行うと正常鼻粘膜においてペンドリンは鼻粘膜の管腔側に発現していることがわかる。(図2)これに対してアレルギー性鼻炎では同様の局在を示すがその陽性像は正常鼻粘膜と比較して明らかに強い。慢性副鼻腔炎においてもペンドリンは鼻粘膜上皮に発現を認め、アレルギー性鼻炎と同様に強い陽性像を示した。

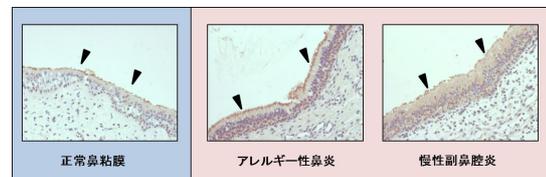


図2: 鼻粘膜におけるペンドリンの発現(免疫染色)

また、ペンドリン mRNA の発現をリアルタイム PCR にて定量するとアレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎ではコントロール群と比較して有意に発現量が増加しているのが明らかとなった。(図3)

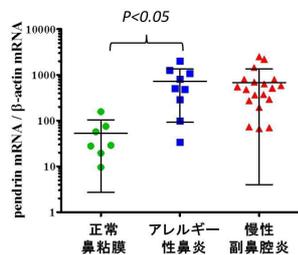


図3: 鼻粘膜におけるペンドリンmRNA発現量の定量化(リアルタイムPCR)

(2)鼻粘膜組織におけるペリオスチンの発現  
抗ペリオスチン抗体を用いて免疫染色を行うと正常鼻粘膜組織においてペリオスチンは鼻粘膜上皮下に弱い陽性像を認めた。アレルギー性鼻炎でも同様の局在を示すがその陽性像は正常鼻粘膜と比較してより深部まで認められた。慢性副鼻腔炎において特にポリープ組織で粘膜上皮下の間質すべての領域に発現を認めた(図4)。

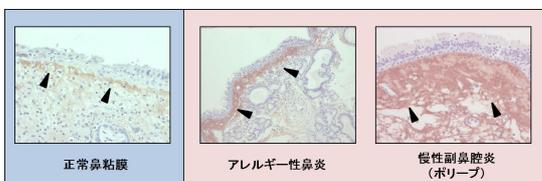


図4: 鼻粘膜におけるペリオスチンの発現(免疫染色)

mRNAの発現をリアルタイムPCRにて定量するとアレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎ではコントロール群と比較して有意に発現量が増加していたが、慢性副鼻腔炎のポリープ組織における発現はアレルギー性鼻炎と比較しても有意に増加していた(図5)。

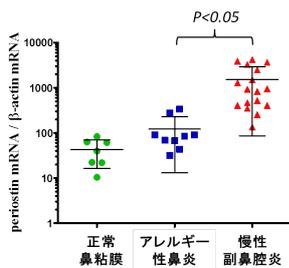


図5: 各疾患におけるペリオスチンmRNA発現量の定量化(リアルタイムPCR)

ペリオスチンについてはウェスタンブロットでも発現量を検討したが、同様の結果となった(図6)。

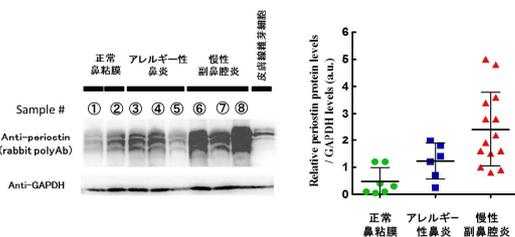


図6: 各疾患におけるペリオスチン発現量の定量化(ウェスタンブロット)

(3)慢性副鼻腔炎患者における血清ペリオスチン濃度について

慢性副鼻腔炎患者60例と健常者66例を比較した。カットオフ値をROC曲線から95ng/mLに設定した。感度68.2%、特異度98.5%となった。この値を基準として血中ペリオスチン濃度を検討した。慢性副鼻腔炎患者ではペリオスチン濃度が有意に上昇していた(図7)。

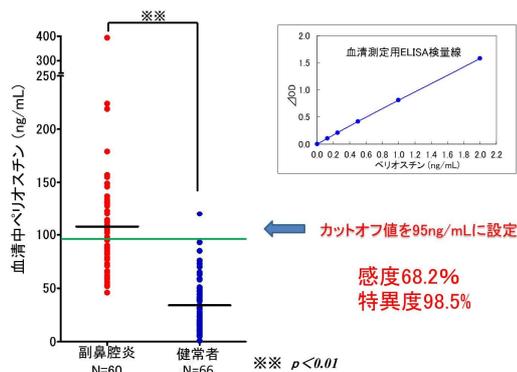


図7 血清中ペリオスチン濃度(健常者との比較)

血清ペリオスチン濃度と嗅覚障害について検討した。嗅覚障害合併症例では臨床症状とペリオスチン濃度との相関関係が認められた(図8)。

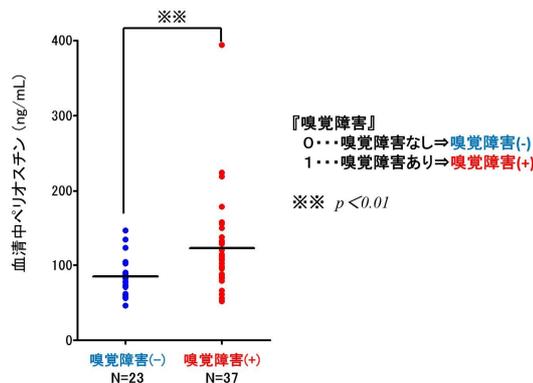


図8 血清中ペリオスチン濃度と嗅覚障害

血清ペリオスチン濃度と鼻内所見(ポリープの有無)について検討した。鼻内ポリープが充満しているような症例では血清ペリオスチン濃度が有意に上昇していた(図9)。

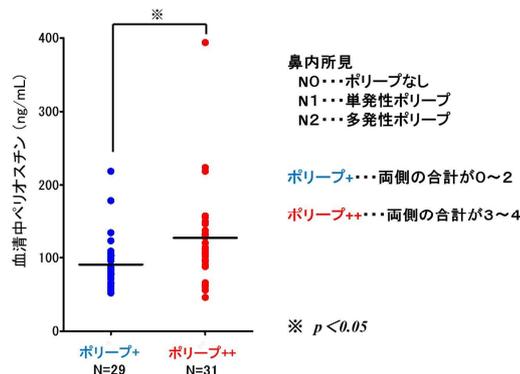


図9 血清中ペリオスチン濃度と鼻内所見(ポリープ)

慢性副鼻腔炎患者における血清ペリオスチン濃度について

チン濃度と他のアレルギー疾患の合併について検討した。気管支喘息の合併例においては合併のない症例と比較して血清ペリオスチン濃度が有意に上昇していた(図10)。

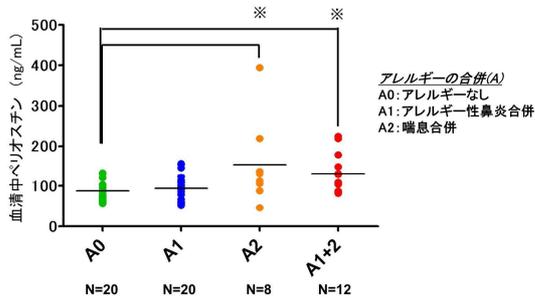


図10 血清中ペリオスチン濃度とアレルギーの合併

血清中ペリオスチン濃度と好酸球数との間に相関があるか検討した。慢性副鼻腔炎患者における血清ペリオスチン濃度と好酸球数の間には強い相関関係があると考えられた(図11)。

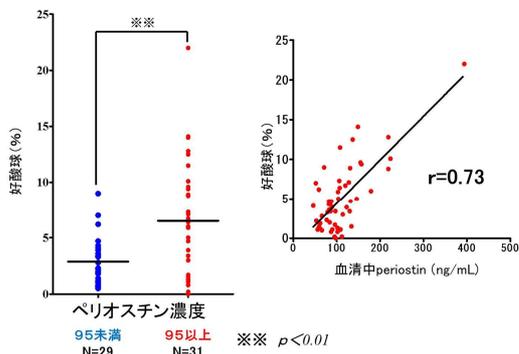


図11 血清中ペリオスチン濃度と末梢血好酸球(%)

血清中ペリオスチン濃度と血清中ECP濃度との間に相関があるか検討した。慢性副鼻腔炎患者における血清ペリオスチン濃度と血清中ECP濃度の間には相関関係があると考えられた(図12)。

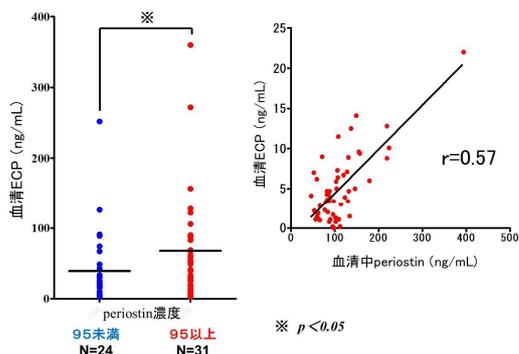


図12 血清中ペリオスチン濃度とECP

#### (4) 考察

ペンドリンとペリオスチンは様々な免疫反応に関与しているとされるがその生理学的意義や病態形成にどのようにかかわってくるかはいまだ不明な点が多い。今回我々はペンドリンとペリオスチンがアレルギー性鼻

炎、慢性副鼻腔炎の鼻粘膜組織において過剰に発現していることを明らかにした。ペンドリンは粘膜上皮と上皮下の腺細胞に発現を認めた。ペリオスチンは基底膜と一部の浸潤細胞に発現を認め、慢性副鼻腔炎のポリープ組織には強い陽性像を認め、ポリープ形成に重要な要素であることが推測された。

ペンドリンは7回膜貫通型の陰イオントランスポーターで気管粘膜上皮における水分のイオン濃度を高める。これによって分泌物の粘調性が増加する。気道上皮細胞に過剰に発現するペンドリンにより粘液産生が増加することが明らかとなり、喘息やCOPDにおける気道炎症や気道閉塞に関わっている可能性が指摘されている。我々の検討においてもアレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎の鼻粘膜上皮細胞、粘膜下の腺細胞に過剰発現を認めた。こういった状況下での粘液過剰産生の機序は解明されていないが、ペンドリンがTGF-アルファ、EGF、TNF-アルファといったMUC5AC遺伝子の転写を調節するメディエーターの産生を引き起こすことが示唆されている。粘液の過剰産生はペンドリンのみで引き起こされるわけではないが、好中球等の炎症性細胞を間接的に介した経路の存在も報告されている。

ペリオスチンは大きさ約90 kDaの細胞外マトリックスタンパクで主として線維芽細胞より分泌される。TGF-やIL-4/IL-13によって誘導されるペリオスチンは気管支喘息において過剰に発現しており、杯細胞化生や粘液の過分泌を制御している。気管支喘息の線維化に関与しており、tenascin C、fibronectin、collagenといった他のマトリックスタンパク質と結合することにより、この線維化が生じる。ペリオスチンは近年、多くの疾患の病態形成に関与することが分かってきており、アトピー性皮膚炎でも皮膚に大量に沈着することで炎症の遷延化に関与していることが示唆されているが、アレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎においても粘膜のリモデリングやポリープ形成に重要な役割を示す可能性が示唆された。本研究では血清中のperiostinは慢性副鼻腔炎の疾患活動性や重症度のバイオマーカーとして利用可能であり、治療の標的分子として利用可能であることが明らかになった。今後はペリオスチンにターゲットを絞った炎症性疾患の新規治療法開発のため研究を進めていく予定である。

#### <引用文献>

- Nofziger C, Dossena S, Suzuki S, et al: Pendrin function in airway epithelium. Cell Physiol Biochem 28: 2011, p571-578
- Everett LA, Glaser B, Idol JR, et al: Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). Nat. Genet 17: 1997, p411-422.

Nakao I, Kanaji S, Ohta S, et al. Identification of pendrin as a common mediator for mucous production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol.* 180: 2008, p6262-6269.

Izuhara K, Ohta S, Shiraishi H, et al. The mechanism of mucous production in bronchial asthma. *Curr Med Chem* 16: 2009, p2867-2875.

Nakagami Y, Favoreto S Jr, Zhen G, et al. The epithelial anion transporter is induced by allergy and rhinovirus infection, regulates airway surface liquid, and increases airway reactivity and inflammation in an asthma model. *J. Immunol.* 181: 2008, p 2203-2210.

Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, et al. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin 1. *Biochem J.* 294: 1993, p271-278.

Norris RA, Kern CB, Wessels A, et al. Identification and detection of the periostin gene in cardiac development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 281: 2004: p1227-1233.

Yuyama N, D.E. Davies, Akaiwa k, et al. Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine.* 19(6): 2002, p287-296.

Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblastic-specific factor 2; cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin 1. *Biochem. J.* 294: 1993, p271-278.

Takayama G, Arima K, Kanaji T, et al. Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol.* 118; 2006, p98-104.

Frieri M. Interaction between rhinitis and asthma: state of alert. *Allergy Asthma proc.* 24(6): 2003, 385-393.

Rimmer J, Ruhno JW. Rhinitis and asthma: united airway disease. *Med J Aust.* 20; *Clin Exp All Rev.* 2005; 5: 68-71.

## 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 3件)

Ohta N, Ishida A et al, Expression and Roles of Periostin in Otolaryngological Diseases. *Allergology Int.* 査読有、63(2): 2014 Jun; 171-80.

doi:10.2332/allergolint.13-RAI-0673. Ohta N, Kurakami K, Ishida A et al. Roles of TGF-beta and periostin in fibrosclerosis in patients with IgG4-related diseases. *Acta Otolaryngol.* 査読有、133(12):2013 Dec; 1322-7.

doi: 10.3109/00016489.2013.831187.

Ishida A et al. Expression of Pendrin and Periostin in Various Nasal Disorders. *Allergology Int.* 査読有、61(4):2012 Dec; 589-95.

doi: 10.2332/allergolint.11-0A-0370.

### [学会発表](計 5件)

石田晃弘 : 鼻疾患におけるペンドリンとペリオスチン. 杜の都 Allergic Rhinitis セミナー2014. 2014年10月19日; ホテルメトロポリタン仙台 仙台市

Ishida A et al. Investigation of Blood Periostin Levels in Patients with Chronic Sinusitis. The 33<sup>rd</sup> International Symposium of Infection and Allergy of the Nose. 2014年6月22日~26日; Amsterdam, Netherland.

Ishida A et al. Overexpression of Pendrin and Periostin in Nasal disorders. 7<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. 2013年10月4日~6日; Kunibiki Messe, Matue, Shimane.

Ishida A et al. Periostin levels in patients with chronic sinusitis. The 16<sup>th</sup> Asian Research Symposium in Rhinology. 2013年8月29日~31日; Keio Plaza Hotel, Tokyo.

石田晃弘 他 : 慢性副鼻腔炎患者における血清中periostin量の検討. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013年2月; 倉敷芸文館 倉敷市

### [図書](計 1件)

石田晃弘 他、医薬ジャーナル社、アレルギー・免疫、2013、20; 58-64

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 晃弘 (ISHIDA Akihiro)

山形大学・医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座 非常勤講師

研究者番号: 00361246