

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462665

研究課題名(和文) 鼻副鼻腔における一酸化窒素のバイオモニタリングによる好酸球性炎症の解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of retractable eosinophilic inflammation in human nose and paranasal sinuses by using nitric oxide monitoring systems.

研究代表者

竹野 幸夫 (TAKENO, SACHIO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：50243556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：上気道における一酸化窒素(NO)を新たな診断パラメータとするという観点から、1)NO測定方法の確立と妥当性の検証、2)鼻副鼻腔におけるNO合成・代謝機構の解析、3)副鼻腔炎・鼻アレルギーを対象とした臨床重症度との関連性、について研究した。その成果として、1)局所NO(nasal NO)を測定する手法の確立。2)好酸球性副鼻腔炎を鑑別可能なNO産生・代謝機構の特徴。3)鼻副鼻腔におけるNO産生の基質であるarginine代謝に関与する酵素・タンパク質の発現と機能的の解析。4)鼻アレルギー患者におけるNOを指標とした前向き探索的臨床研究の基本となるプロトコル作成、などの成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Nitric oxide (NO) has a variety of roles in human airways. The aims of the study are to establish objective and reliable methods for nasal NO measurement, to investigate mechanisms of NO production and metabolisms, and to study possible relation between NO levels and clinical features in patients with chronic rhinosinusitis (CRS) and allergic rhinitis (AR). We have developed a newly designed method to accurately measure local NO in the nasal cavity. The gradient of nasal NO levels in different areas in human nose indicate multiple roles of NO acting as both a physiological messenger and sensitive markers for allergic inflammation. Eosinophilic CRS (E CRS) patients show different NO metabolisms compared to non-E CRS patients. Molecular analysis revealed that higher nasal NO levels in E CRS patients were closely related with augmented inducible NO synthase expression and decreased L-arginase2 expression accompanied by the local excretion of NO metabolites.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：一酸化窒素(NO)、呼気中NO濃度(FeNO)、サイトカイン、NO合成酵素、副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎、好酸球、アルギナーゼ

1. 研究開始当初の背景

多機能分子である一酸化窒素(NO)は、ヒトにおいて種々の重要な生理機能、並びに炎症の修飾と制御に深く関与している内因性調節因子である。また呼気中 NO 濃度(fraction of exhaled nitric oxide, FeNO)の測定は、国際的な測定方法の標準化により、ATS/ERS の「臨床家向けの臨床実施ガイドライン 2011」などにより気管支喘息領域においては EBM の構築が進行中である。これに対して鼻副鼻腔に関しては、骨壁に囲まれた副鼻腔の複雑な解剖学的構造、副鼻腔自然口を通じた生理的換気の影響因子、鼻漏や組織中に NO 自体が早期に吸収されてしまう、などの問題により、測定方法の標準化にはいたっていない。一方でヒト副鼻腔は生理的に重要な NO 産生場であることも、現象論的に明らかとなっている。従って種々の鼻副鼻腔疾患においても NO は、その濃度を継続的にモニタリングすることにより、病態診断や治療効果判定に役立つ新たな鼻腔機能検査法となる可能性を有している。

また好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) は、副鼻腔粘膜と鼻ポリープに著明な好酸球浸潤を伴う易再発性の慢性副鼻腔炎の総称であり、疫学的にわが国で増加傾向が報告されている。平成 22 年度より厚生労働省の難治性疾患克服研究事業(藤枝班)の「好酸球性副鼻腔炎の疫学、診断基準作成等に関する研究」が開始され、副鼻腔炎手術症例の組織学的解析やデータベースの作成事業などが進行中である。本疾患は疫学的に増加していることと、臨床的に通常の薬物治療に抵抗性(難治性)で再発しやすいことともあいまって、大きな問題となっている。

2. 研究の目的

一酸化窒素(NO)は、内因性調節因子としてヒトの生理機能と炎症の修飾・制御に深く関与している。鼻副鼻腔における NO 濃度測定は、下気道病変に対比しいまだ測定方法と基準値の標準化にはいたっていない。また疫学的に増加している好酸球性副鼻腔炎の病態と治療方法の確立に関するエビデンスの構築は未だ不十分である。本研究では、上気道における NO 測定を新たな診断パラメータとするという切り口から、1) 鼻呼気 FeNO と局所 NO 測定方法の確立とその妥当性の検証、2) 鼻副鼻腔粘膜における NO 合成酵素並びに関連代謝酵素の発現の検討、3) 培養系を用いた NO 産生機構の分子生物学的解析などの研究を行い、これらの疑問を解明するものである。

3. 研究の方法

(1) 携帯型 NO 濃度測定装置による口呼気 NO (oral FeNO) と鼻呼気 NO (nasal FeNO) の測定方法の確立とカットオフ値の標準化の試み。

アレルギー性鼻炎 (AR)、慢性副鼻腔炎

(CRS) など鼻疾患症例において、呼気中 FeNO と nasal FeNO 測定を行った。またさらに、固有鼻腔から直接定量的にサンプルを吸引し、局所 NO (nasal NO) を測定する手技の確立を試みた。

FeNO 測定値と臨床データとの関連性を検討する。そして日本人における正常分布、各疾患における cut off 値の設定が可能かどうかなどの検討を行った。

(2)

鼻副鼻腔における NO 合成酵素 (NOS) 並びに関連代謝酵素の分子生物学的解析、ヒト副鼻腔各洞における NO 産生能の相違の検討、鼻腔内 NO 濃度に影響を及ぼす因子として、NO の基質である arginine 代謝に関与する酵素・タンパク質に着目した。具体的には、内因性の NOS 阻害物質であり、L-arginine から NO 遊離を阻害する作用を有する asymmetric dimethylarginine (ADMA)、NOS と競合的に arginine を基質とする酵素である arginase などの発現と分布を検討した。

4. 研究成果

(1) 固有鼻腔から直接定量的に吸引し、局所 NO (nasal NO) を測定する手法により下気道などの他の要因を受けにくく、かつアレルギー性炎症の主座である下鼻甲介表面と、副鼻腔自然口が開く鼻腔側壁の個々人における解剖学的解析が可能となった。AR 症例ではアレルギー性炎症の主座である下鼻甲介表面(IT)と、鼻腔側壁・中鼻道(MM)における比較を行った。AR 群では IT 領域で NO 値が有意に高く、それに対し MM 領域では差異を認めなかった。このため nasal NO 比 (MM/IT) を比較すると AR 群で顕著な低値を示した。臨床重症度も併せて検証すると、本指標は AR 群と正常群を鑑別するうえで、従来の FeNO 測定よりも鋭敏なマーカーとなることが明らかとなった。引き続き ECRS 症例においても、患者背景、臨床所見(性別、年齢、AR・気管支喘息の有無、鼻腔ポリープサイズ、血中好酸球比率、JESREC スコア、CT スコアの各々についてデータを収集し解析を行った。

(2)

NO の産生・代謝の観点から ECRS と化膿性副鼻腔炎 (non-ECRS) の相違が存在するかどうかの検討では、ECRS 症例では oral FeNO の有意な上昇、non-ECRS 症例では nasal FeNO の有意な低下が確認された。組織学的検討でも ECRS 症例では iNOS 局在と発現亢進を認め、さらに NO 代謝産物で酸化ストレス障害のマーカーである nitrotyrosine の沈着も顕著であった。従って ECRS 症例における NO 産生と代謝機構は non-ECRS のそれとは異なっており、これらを背景とした FeNO モニタリングは本疾患の診断と治療効果を行う上で有用な指標となる可能性が示された。

難治性副鼻腔炎における前頭洞から前頭

陥凹粘膜における病態を解析した。その結果、副鼻腔 CT 画像を用いた前頭陥凹蜂巣の解析で、frontal bullar cells (FBC)を有する症例は有意に前頭洞炎発症率が高くなる点が判明した。また ECRS 症例では好酸球関連サイトカインと NO 関連酵素の発現に特徴を認めた。このことは、手術的な前頭洞の換気排泄路の拡大と同時に、NO 濃度の変動を指標とした術後の薬物療法の有用性も高いことを示唆している。

NOSと競合的に arginine を基質とする酵素である arginase に関して研究した。その結果、誘導的に発現される isoform である arginase II の存在が、NOS による NO 産生と競合的に作用している現象を確認した。そして non-ECRS の特徴的な鼻腔 NO 産生減少の一因として、arginase の活性亢進の影響が示唆され、新たな炎症制御メディエーターの存在を提唱した。

これらの成果を踏まえて、一酸化窒素のバイオモニタリングによる好酸球性炎症の解析と鼻副鼻腔における NO 産生代謝からみた疾患との関連性に関して、図譜のように統括を行った。

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 28 件)

1. Taruya T, Takeo S, Kubota K, Sasaki A, Ishino T, Hirakawa K. Comparison of arginase isoform expression in patients with different subtypes of chronic rhinosinusitis. *J Laryngol Otol.* 2015 Dec;129(12):1194-200. doi: 10.1017/S0022215115002728. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26487482 査読有
2. Ishino T, Takeo S, Hirakawa K. Novel NOG mutation in Japanese patients with stapes ankylosis with broad thumbs and toes. *Eur J Med Genet.* 2015 Sep;58(9): 427-32. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.06.005. Epub 2015 Jul 26. PMID: 26211601 査読有
3. Kubota K, Takeo S, Hirakawa K. Frontal recess anatomy in Japanese subjects and its effect on the development of frontal sinusitis: computed tomography analysis. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015 May 29;44:21. doi: 10.1186/s40463-015-0074-6. PMID: 26021826 査読有
4. Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, Asaka D, Takeo 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 Aug;70(8):995-1003. doi: 10.1111/all.12644. Epub 2015 May 26 査読有

5. Sugino H, Tsumura S, Kunimoto M, Noda M, Chikuie D, Noda C, Yamashita M, Watanabe H, Ishii H, Tashiro T, Iwata K, Kono T, Tsumura K, Sumiya T, Takeo S, Hirakawa K. Influence of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Acute Otitis Media with Severe Middle Ear Inflammation: A Retrospective Multicenter Study. *PLoS One.* 2015 Sep 8;10(9):e0137546. doi: 10.1371/journal.pone.0137546. eCollection 2015. 査読有

6. 竹野幸夫: ストレス・心理要因と鼻閉・後鼻漏 特集 ストレスと耳鼻咽喉科・頭頸部外科 *JOHNS* 31: 317-321, 2015. 査読無

7. 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、森川太洋、浦島充佳: 好酸球性副鼻腔炎 (JESREC Study)。アレルギー 64: 38-45, 2015. 査読有

8. 竹野幸夫: 上・下気道アレルギー炎症の制御 (気道炎症のバイオマーカー)。特集: One airway, one disease 複眼的治療戦略。Monthly Book ENTONI 182: 16-22, 2015. 査読無

9. 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、森川太洋、浦島充佳: 「第 115 回日本耳鼻咽喉科学会臨床セミナー」好酸球性副鼻腔炎: 診断ガイドライン (JESREC Study)。日耳鼻 118: 728-735, 2015. 査読有

10. 竹野幸夫: 難治性鼻出血への対応。日本耳鼻咽喉科学会会報 118: 1164-1165, 2015. 査読無

11. 竹野幸夫、樽谷貴之: 鼻腔一酸化窒素 (nasal NO) の有用性と課題。特集「気道炎症の評価」アレルギー・免疫 22: 1398-1406, 2015. 査読無

12. 竹野幸夫、久保田和法：好酸球性副鼻腔炎と前頭洞病変。耳鼻免疫アレルギー（JJIAO）33（4）：221-224, 2015. 査読有

13. 藤さやか、竹野幸夫：山間地域医療圏における小児急性鼻副鼻腔炎よりの鼻汁検出菌の検討。耳鼻臨床 108: 509-516, 2015. 査読有

14. Takeno S, Yoshimura H, Kubota K, Taruya T, Ishino T, Hirakawa K. Comparison of Nasal Nitric Oxide Levels between the Inferior Turbinate Surface and the Middle Meatus in Patients with Symptomatic Allergic Rhinitis. Allergol Int. 2014 Sep; 63(3): 475-83. doi: 10.2332/allergolint.14-0A-0689 査読有

15. Takeno S. Nitric oxide is a possible reliable marker for evaluation of nasal allergy and chronic sinusitis. Proceeding of Airway Secretion Research 14: 25-26, 2014. 査読無

16. 久保田和法、竹野幸夫：鼻汁が生じるメカニズムは？特集 鼻の疑問に答える JOHNS 30: 847-851, 2014. 査読無

17. 竹野幸夫：鼻内の観察はどこまでわかるか？特集 内視鏡でどこまでわかるかー最新のトピックス。JOHNS 30: 181-185, 2014. 査読無

18. 竹野幸夫：鼻副鼻腔炎に対する局所薬物療法。特集：みみ・はな・のどに対する局所薬物療法。Monthly Book ENTONI 168: 19-25, 2014. 査読無

19. 竹野幸夫：鼻アレルギーの下鼻甲介手術へのレーザーの応用。特集：耳鼻咽喉科ここまでできるレーザー治療。Monthly Book ENTONI 174: 17-23, 2014. 査読無

20. 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、富田かおり、二之宮貴裕、森川太洋、浦島充佳：好酸球性副鼻腔炎の診断基準：JESREC Study。日鼻誌 53：75-76, 2014. 査読有

21. Takeno S, Taruya T, Ueda T, Noda N, Hirakawa K. Increased exhaled nitric oxide and its oxidation metabolism in eosinophilic chronic rhinosinusitis. Auris Nasus Larynx 40: 458-464, 2013. DOI: 10.1016/j.anl.2013.02.001 査読有

22. Miyasato M, Takeno S, Hirakawa K. Expression of RANKL and proliferation abilities of cultured human middle ear cholesteatoma epithelial cells. Hiroshima J Med Sci 62: 1-6, 2013. PMID: 23600327 査読有

23. 久保田和法、竹野幸夫：細菌・真菌感染に対する防御機構。特集 感染と免疫。JOHNS 29: 436-441, 2013. 査読無

24. 竹野幸夫、平川勝洋：一酸化窒素（NO）と副鼻腔炎病態。耳鼻免疫アレルギー（JJIAO）31（3）：225-229, 2013. 査読有

25. 國本優、竹野幸夫、平川勝洋：小児副鼻腔炎治療に対する検討 2010 年度版ガイドラインを用いて 日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 31, 95-100, 2013. 査読有

26. 加島愛、石野岳志、竹野幸夫、平川勝洋、呉奎真、服部稔：当院におけるスギ・ヒノキ花粉飛散状況と気象データによる飛散数予測。広島医学 66: 523-527, 2013. 査読有

27. 竹野幸夫、久保田和法、樽谷貴之、石野岳志、平川勝洋：蝶口蓋孔と後鼻神経手術。耳鼻臨床 106: 1074-1075, 2013. 査読有 他 1 件

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 竹野幸夫、岡林大、河野崇志、久保田和法、樽谷貴之、石野岳志、平川勝洋：鼻腔一酸化窒素（nasal NO）のモニタリングについての検討。第 34 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 平成 28 年 2 月 4-6 日（鳥羽）

2. 竹野幸夫：第 54 回日本鼻科学会 イブニングセミナー 「上下気道の接点と好酸球性炎症 ステロイド療法の新展開 1. 上気道の観点より」平成 27 年 10 月 1 日（広島市）

3. 竹野幸夫：シンポジウム IV：気道疾患と一酸化窒素 「慢性副鼻腔炎の病態分類とアルギニン代謝からみた鼻腔一酸化窒素（nasal NO）の測定意義について。」第 34 回気道分泌研究会 平成 27 年 7 月 11 日（札幌市）

4. 竹野幸夫：「One airway からみた上気道アレルギー性炎症について」第 6 回鼻副鼻腔臨床懇話会 平成 27 年 6 月 19 日（東京）

5. Takeno S. Symposium I (Korea-Japan International Session) Phenotypes of chronic rhinosinusitis in Japanese population and potential biomarkers for clinical evaluation. The 49th Korean Rhinologic Society Annual Congress Mar. 7-8, 2015 (Busan, Korea)

6. 竹野幸夫：第 25 回日本頭頸部外科学会 教育セミナー2 「難治性鼻出血に対する治療」平成 27 年 1 月 29 日（大阪）

7. 竹野幸夫：「One airway からみた慢性副鼻腔炎の病態」第 3 回 One Airway One Disease Seminar 平成 27 年 1 月 20 日（三鷹市）

8. 竹野幸夫：「アレルギー性鼻炎の手術療法 下鼻甲介粘膜焼灼術を中心に」Allergic Rhinitis Forum 2014 平成 26 年 11 月 30 日（東京）

- 9.竹野幸夫、久保田和法、樽谷貴之、佐々木淳、平川勝洋： On line 法によるアレルギー性鼻炎患者における鼻腔一酸化窒素 (nasal NO) の測定。第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 平成 26 年 2 月 6-8 日 (徳島市)
10. Takeo S. Introduction of posterior nasal neurectomy for severe allergic rhinitis: clinical, pathophysiological, and therapeutic aspects. The 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery Dec. 5-7, 2013 (Taipei, Taiwan)
11. Yoshimura H, Takeo S., Kubota K, Taruya T, Sasaki A, Hirakawa K. Analysis of nasal nitric oxide (NO) production and its oxidized metabolites in allergic rhinitis patients based on the anatomical feature. The 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery Dec. 5-7, 2013 (Taipei, Taiwan)
12. 竹野幸夫：第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム 21 「One Airway, One Disease」 鼻アレルギー、慢性副鼻腔炎と One Airway One Disease -一酸化窒素 (NO) の産生代謝からみた上下気道の比較- 平成 25 年 11 月 28-30 日 (東京)
13. 竹野幸夫： 「鼻副鼻腔のアレルギー性炎症に関する最近のトピックス」 第 36 回阪神勤務医耳鼻咽喉科研究会 平成 25 年 10 月 8 日 (神戸)
14. 竹野幸夫、久保田和法、佐々木淳、樽谷貴之、野田礼彰、石野岳志、平川勝洋： 一酸化窒素 (NO) のモニタリングからみた後鼻神経手術の臨床成績。第 52 回日本鼻科学会 平成 25 年 9 月 26-28 日 (福井市)
15. Takeo S. Clinical effectiveness and therapeutic aspects of posterior nasal neurectomy for the treatment of intractable allergic rhinitis. 16th Asian Research Symposium in Rhinology Aug. 29-31, 2013 (Tokyo)
- 他 12 件

〔図書〕(計 4 件)

1. 竹野幸夫、久保田和法： 5. 鼻洗浄のエビデンスは？ - 洗浄液の成分、機序を踏まえて - II. 鼻副鼻腔領域 池田勝久、武田憲昭、香取幸夫、原淵保明、丹生健一編集 EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 2015-2016 pp 212-217、中外医学社、東京、2015 年
2. 竹野幸夫、久保田和法： 軟膏、クリーム の適応と使い方 鼻。 28 軟膏、クリーム 市村恵一 編集 耳鼻咽喉科 最新薬物療法マニュアル-選び方・使い方 pp 286-289、中山書店、東京、2014 年
3. 石野岳志、竹野幸夫： 難治性の後鼻漏感を有する慢性副鼻腔炎症例における咽喉頭逆流症と睡眠時無呼吸治療の効果。本庄巖

編集 耳鼻咽喉科 てこずった症例のブレイクスルー pp 116-117、中山書店、東京、2013 年。

4. 竹野幸夫： 後鼻神経切断術における蝶口蓋孔の位置と神経線維束の走行に關しての normal anatomical variants。本庄巖 編集 耳鼻咽喉科 てこずった症例のブレイクスルー pp 126-127、中山書店、東京、2013 年。

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

広島大学大学院耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学 <http://home.hiroshima-u.ac.jp/jibika/research/index.html>

1. 好酸球性副鼻腔炎の難治化因子に関する研究

2. 鼻アレルギーの病態に関する研究

3. 上気道における一酸化窒素 (NO) の機能的役割に関する研究

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹野 幸夫 (TAKENO SACHIO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：50243556