

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861371

研究課題名(和文)好酸球性鼻副鼻腔炎の病態形成におけるIL-33、IL-25、ILC2の役割

研究課題名(英文) Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

戸嶋 一郎 (Tojima, Ichiro)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80567347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血および鼻茸から分離したILC2にIL-33とIL-2を加えるとIL-5やIL-13を産生し、ILC2自身が増殖した。ECRS群では鼻茸中のILC2が増加していたが、末梢血中のILC2は増加せず、むしろ末梢血好酸球率が高い症例ほど末梢血中のILC2は低下していた。末梢血中のILC2はアレルギー性鼻炎合併例では増加し、喘息合併例では低下していた。培養鼻粘膜上皮細胞をアルテルナリアで刺激したところ、ECRS鼻茸上皮細胞ではIL-33放出が増加した。ECRSでは、環境抗原刺激による鼻粘膜上皮からの過剰なIL-33放出がきっかけとなり、組織中のILC2を介して好酸球浸潤が生じていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：ILC2s represent a critical innate cellular source of type 2 cytokines and may play important roles in various diseases. We examined the role of ILC2s in the pathogenesis of two subgroups of CRSwNP; ECRS and non-ECRS. We analyzed the prevalence of ILC2s in sinonasal tissues and in blood from patients with ECRS, non-ECRS, CRSsNP and control. The prevalence of ILC2s in nasal tissues was higher in patients with ECRS as compared to those with non-ECRS or CRSsNP. The prevalence of blood ILC2s was not different between patients with ECRS and non-ECRS. The prevalence of blood ILC2s was higher in patients with allergic rhinitis and elevated serum IgE levels. Alternaria-induced IL-33 secretion was increased in nasal epithelial cells derived from patients with ECRS as compared to those from patients with non-ECRS or CRSsNP. ILC2s may be involved in the pathogenesis of CRSwNP, in particular in patients with tissue eosinophilia (i.e. ECRS).

研究分野：耳鼻咽喉科、アレルギー、免疫

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 鼻茸 ILC2 IL-33 アレルギー性鼻炎 喘息 IL-5 IL-13

1. 研究開始当初の背景

好酸球性鼻副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis: ECRS) は、一般的に慢性副鼻腔炎に有効とされるマクロライド療法が無効であり、手術加療を行っても高頻度に再発する難治性の副鼻腔炎である。

近年同定された IL-33、IL-25 などの気道上皮から放出されるサイトカインが、獲得免疫を介さない自然型アレルギーとして、喘息などの好酸球性気道炎症の病態に深く関わっていることが示唆されている。さらに、IL-33 や IL-25 に反応して多量の Th2 サイトカイン (IL-5、IL-13) を放出する自然リンパ球が同定され、group 2 innate lymphoid cells (ILC2) と呼ばれている。この ILC2 は慢性副鼻腔炎の鼻茸中に増加していることが報告されているが、ECRS などの鼻副鼻腔疾患の病態形成における IL-33 や ILC2 の働きについてはほとんど解明されていない。

しかし、近年同定された ILC2 にヒト鼻粘膜上皮から放出された IL-33 が、どのように作用しているか、難治性の ECRS の病態に、IL-33 や ILC2 がどのように関わっているかについては不明のままである。

2. 研究の目的

(1) ILC2 と IL-33 が、ECRS の病態形成にどのように関与しているかを明らかにすること。

(2) 鼻茸中や、末梢血中における ILC2 の割合を算出し、ECRS 患者と non-ECRS 患者の間での違いを明らかにすること。

(3) 喘息やアレルギー性鼻炎を伴う患者では、末梢血中における ILC2 の割合に変化があるのか、また末梢血中における ILC2 の割合に影響する因子があるなら、それを明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 患者はすべて滋賀医科大学耳鼻咽喉科にて、研究の同意が得られた鼻副鼻腔疾患患者を対象とし、コントロール群 (副鼻腔炎を伴わない群)、鼻茸を伴わない慢性副鼻腔炎群 (CRSsNP)、鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) は JESREC study をもとに ECRS 群と non-ECRS 群に分類した。

(2) ILC2 の測定は、血液検体としては PBMC を用い、鼻粘膜組織としては CRSsNP 患者からは鉤状突起を、CRSwNP 患者からは鼻茸を用いた。得られた検体から、表面マーカーである Lineage、CD45、CD127、CRTH2 を用いて、FACS にて ILC2 を同定した。

(3) FACS で分離した ILC2 を、IL-33 や IL-2 を加えて 10% autologous serum 入りの RPMI 中で培養したのち、上清中のサイトカインを ELISA 法で測定した。

(4) 鉤状突起や鼻茸から得られた鼻粘膜上皮細胞を、BEGM 中で培養し、confluent になった状態で真菌であるアルテルナリアを加えて刺激し、上清中の IL-33 を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) Lineage<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> CRTH2<sup>+</sup> cells だけが IL-33 と IL-2 に反応して IL-5 と IL-13 を産生したことから、ILC2 であることを確認した。末梢血および鼻茸から分離した ILC2 に IL-33 と IL-2 を加えた培養実験から、末梢血由来の ILC2 と鼻茸由来の ILC2 では機能的にほとんど差がないこと、そして ILC2 は IL-33 と IL-2 に反応して多量の IL-5 と IL-13 を産生するだけでなく、ILC2 自身の細胞数も増加させることが確認できた。

(2) 鼻粘膜組織中における ILC2 の割合は、CRSsNP 群や non-ECRS 群と比較して、ECRS 群で有意に高値であった。また鼻茸中における ILC2 の割合は、浸潤する好酸球数と有意な正の相関がみられた (図 1)。一方副鼻腔炎の重症度の指標として用いた JESREC score や Lund-Mackay score などとは相関しなかった。

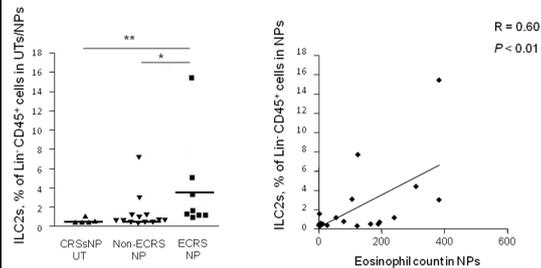


図 1

(3) 末梢血中における好酸球率は、他の群と比較して ECRS 群で有意に高値であったが、末梢血中における ILC2 の割合は ECRS 群と non-ECRS 群で差がなく、むしろ CRSsNP 群と比較すると ECRS 群では有意に低い結果となった (図 2)。また JESREC score や Lund-Mackay score などとは相関しなかった。

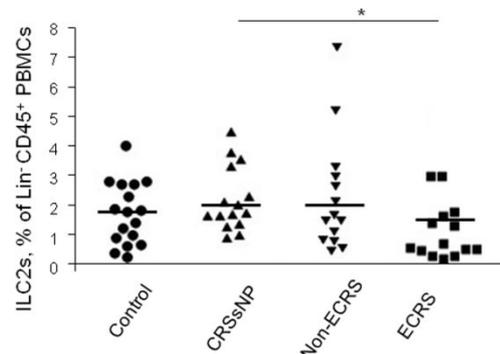


図 2

末梢血中における ILC2 の割合と相関する因子を検討したところ、末梢血中における好酸球率が 10%以上の群では、5%未満の群と比

較して有意に末梢血中における ILC2 の割合が低かった。対象から喘息患者を除外したところ、アレルギー性鼻炎を伴う群では、アレルギー性鼻炎を伴わない群と比較し、有意に末梢血中における ILC2 の割合が増加していた(図 3)。一方喘息を伴う群では、喘息を伴わない群と比較して、有意に末梢血中における ILC2 の割合が低下していた(図 4)。

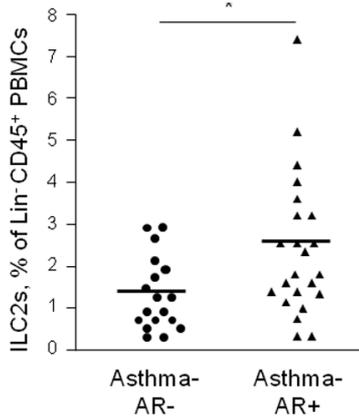


図 3

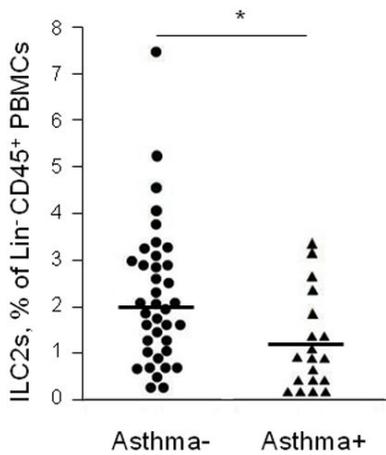


図 4

(4) 培養鼻粘膜上皮細胞を、気道アレルギーであるアルテルナリアで刺激したところ、ECRS 患者の鼻茸上皮からは有意に IL-33 放出が増加したが、non-ECRS 患者の鼻茸上皮や CRSsNP 患者の鉤状突起上皮からはそのような増加がみられなかった(図 5)。

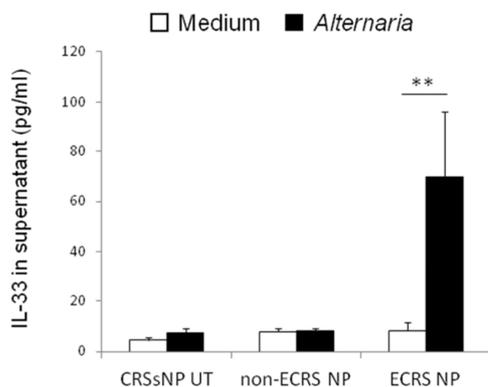


図 5

以上から、ECRS では、環境抗原刺激による鼻粘膜上皮からの過剰な IL-33 放出がきっかけとなり、組織中の ILC2 を介して放出された IL-5 により好酸球浸潤を来し、IL-13 によりムチン産生が生じていると考えられた。

#### 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 12 件)

- 1) Shimizu S, Tojima I, Takezawa K, Matsumoto K, Kouzaki H, Shimizu T. Thrombin and activated coagulation factor X stimulate the release of cytokines and fibronectin from nasal polyp fibroblasts *via* protease-activated receptors. *Am J Rhinol Allergy*. 31:13-18 2017 査読有
- 2) Kouzaki H, Matsumoto K, Kato T, Tojima I, Shimizu S, Kita H, Shimizu T; Endogenous protease inhibitor in airway epithelial cells contribute to eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 195; 737-747, 2017 査読有
- 3) Tojima I, Kouzaki H, Shimizu S, Ogawa T, Arikata M, Kita H, Shimizu T: Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Clin Immunol*. 170; 1-8, 2016 査読有
- 4) Shimizu S, Kouzaki H, Kato T, Tojima I, Shimizu T: HMGB1-TLR4 signaling contributes to the secretion of interleukin 6 and interleukin 8 by nasal epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy*. 30; 167-172, 2016 査読有
- 5) Kouzaki H, Matsumoto K, Kato T, Tojima I, Shimizu S, Shimizu T: Epithelial Cell-Derived Cytokines Contribute to the Pathophysiology of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. *J Interferon Cytokine Res*. 36;169-179, 2016 査読有
- 6) Tojima I, Shimizu S, Ogawa T, Kouzaki H, Omura S, Sunazuka T, Shimizu T: Anti-inflammatory effects of a novel non-antibiotic macrolide, EM900, on mucus secretion of airway epithelium. *Auris Nasus Larynx*. 42; 332-336, 2015 査読有
- 7) Shimizu S, Ogawa T, Takezawa K, Tojima I, Kouzaki H, Shimizu T: Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in nasal mucosa and nasal secretions of chronic rhinosinusitis with nasal polyp. *Am J Rhinol Allergy*. 29; 235-242, 2015 査読有

- 8) Hara K, Iijima K, Elias MK, Seno S, Tojima I, Kobayashi T, Kephart GM, Kurabayashi M, Kita H: Airway uric acid is a sensor of inhaled protease allergens and initiates type 2 immune responses in respiratory mucosa. J Immunol. 192; 4032-4042, 2014 査読有
- 9) Shimizu S, Kouzaki H, Ogawa T, Takezawa K, Tojima I, Shimizu T: Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling. Am J Rhinol Allergy. 28; 103-109, 2014 査読有
- 10) 戸嶋一郎、谷口怜子、清水猛史：保存的に治療した小児急性副鼻腔炎眼窩内合併症の4例 日耳鼻感染症エアロゾル会誌 4; 48-53. 2016 査読有
- 11) 谷口怜子、有方雅彦、戸嶋一郎、清水猛史：Streptococcus pneumoniaeによる細菌性髄膜炎を生じた蝶形骨洞炎例 日耳鼻感染症エアロゾル会誌 3; 81-83. 2015 査読有
- 12) 小河孝夫、戸嶋一郎、清水猛史：嗅上皮傷害マウスモデルにおけるバルプロ酸ナトリウムによる嗅神経再生作用 耳鼻ニューロサイエンス 28; 17-19. 2014 査読無

〔学会発表〕(計 12件)

- 1) 戸嶋一郎:好酸球性副鼻腔炎におけるグループ2自然リンパ球(ILC2)の役割 第36回気道分泌研究会 2017.4.8. 東京グランドホテル(東京都港区)
- 2) Ichiro Tojima: Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Increased in Nasal Polyps in Patients with Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis AAAAI annual meeting 2017.3.4. Atlanta (USA)
- 3) Ichiro Tojima: Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis 第55回日本鼻科学会 International Session 1 2016.10.15. 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
- 4) 戸嶋一郎:異常発達した前頭洞に生じた感染に対し鼻内視鏡手術を行った精神発達遅滞患者の検討 第35回滋賀臨床耳鼻咽喉科セミナー 2016.10.15 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
- 5) 戸嶋一郎:異常発達した前頭洞に感染を生じ手術加療を行った精神発達遅滞患者症例の検討 第4回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会 2016.9.3. 倉敷市芸文会館(岡山県倉敷市)
- 6) Ichiro Tojima: Role of group 2 innate lymphoid cells(ILC2s) and IL-33 in the pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis .The 11<sup>th</sup> Research Symposium

on Human Natural Defense System in conjunction with Rhinology Research Forum in Asia (RReFA) Annual Meeting 2015.10.17. Seoul (Korea)

- 7) 戸嶋一郎: Group 2 innate lymphoid cell: IL-33の産生と好酸球浸潤・増殖の関連. 第54回鼻科学会総会・学術講演会 2015.10.1. 広島国際会議場(広島県広島市)
- 8) 戸嶋一郎:小児急性副鼻腔炎に伴う眼窩内合併症に対し、保存的治療により治癒した4例. 第3回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会 2015.9.4. ホテルライフオート札幌(北海道札幌市)
- 9) 戸嶋一郎:好酸球性副鼻腔炎におけるILC2. 第64回日本アレルギー学会 2015.5.26. グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
- 10) 戸嶋一郎:副鼻腔疾患における好酸球とILC2. 第33回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2015.2.26. 東武ホテルレバント東京(東京都墨田区)
- 11) 戸嶋一郎:鼻入口部に発生した化膿性肉芽腫の2例. 第25回日本頭頸部外科学会 2015.1.30. コングレコンベンションセンター(大阪府大阪市)
- 12) 戸嶋一郎他:浸潤型副鼻腔真菌症3例の検討. 第53回日本鼻科学会 2014.9.27. コングレコンベンションセンター(大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
戸嶋一郎(TOJIMA, Ichiro)  
滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80567347