

# 序文

「今度、指定難病制度ができるけれども、耳鼻咽喉科疾患で該当する疾患があるかな？」と突然、大阪医科大学学長・竹中洋先生（現京都府立医科大学学長）から尋ねられました。即座に、「好酸球性副鼻腔炎が該当すると思います」とお答えすると、「厚生労働省が指定難病になりそうな疾患の疫学調査を公募しているから、応募してみないか」と言われました。「ただし、あんたの得意な基礎研究ではなくて、疫学研究だよ」と強く念を押されました。すぐに申請書を前に、疫学研究のプランを練りに練ってオールジャパンの体制で申請しました。好評価で採択されたのが、平成22年5月。今から丁度10年前の出来事です。

平成19年～21年に施行された内視鏡下鼻副鼻腔手術の結果を解析することで、好酸球性副鼻腔炎の診断基準を決定する内容にしました。この研究を成功させるためには、多くの手術を行っている施設が必須だと考え、当時、東京慈恵会医科大学の病院長をされていた森山寛先生へ果敢にメールをお送りし、ご協力をお願いいたしました。さらに多くの先生方をお願いしたところ、皆様ご快諾くださり、JESREC Studyが始まったのです。可能なら新しい治療法を構築し、悩んでおられる好酸球性副鼻腔炎患者さんを治したいということを経験目標に、まずは診断基準を決める。次に重症度を作成する。そして適正な治療法を決定するという構想としました。JESREC Studyにご参加くださった先生方のお陰で、予定通りの症例数を確保することができ、結果、世界に誇れる診断基準と重症度分類が完成したと自負しております。また、治療法では、抗体治療が保険承認を受けることができました。しかしながら、今日においても、治療ガイドラインを作成するためのエビデンスはまだ少なく、根治が得られる治療法の確立が切望されている状況です。

一方で、私は、32歳の時に米国UCLAに留学し、IgEクラススイッチに関する分子生物学を勉強しました。留学前から暇があればワトソンの分子生物学を読み、分子生物学を自分のものにしようとして心に誓って日本を離れた私は、意気揚々とロサンゼルスに到着し、UCLAのラボへ挨拶に行きました。ボスのAndrew Saxon教授に会うと、「What do you want to do? What is going on?」と尋ねられ、「Nature, Science, Cellに論文を載せたい」と答えると、「まあそんなに焦らないでいいよ。取り敢えず Journal Immunology (JI) を目指そう。JIでもかなり難しいよ」。そして「When you are happy, I am Happy. Take it easy.」と付け加えてくださったので、肩の力が抜ける思いがしたことを覚えています。その後も、ミーティングの最後にはいつもその言葉があり、私を安心させてくれました。結果的に、6編の論文が掲載に至り、日本耳鼻咽喉科学会に分子生物学を持ち込むことができました。恩師齋藤等名誉教授の宿題報告にも幾許か貢献できたのではないかと思います。

教室を継承した私は、主としてアレルギー性鼻炎の網羅的研究、舌下免疫療法、疫学調査を行ってきました。様々な研究に取り組みたいとも考えましたが、人手も十分でない地方の新設医大、あまり無理をせず「選択と集中」と決めて、アレルギー性鼻炎の研究を中心としました。耳鼻咽喉科に入局してくれた先生は、私が何も言わないのに、順番に大学院に入ってくれただけでなく、信じられないことですが、教授就任後の入局者全員が大学院で研究生活を送ってくれています。本当に感謝です。「大学院の卒業が、研究の始まりである」これが、恩師齋藤先生の口癖でした。私も同様のことをいつも大学院生に言うてきました。「どのような論文でもいいから、とにかく実験して1本論文を書き、卒業しなさい。本当の研究はそこから始まります」と。

さらに私がラッキーだったことは、いつもいいタイミングで最新の網羅的な研究を行っている先生との共

同研究の機会に恵まれたことです。遺伝子多型、全ゲノム解析 (GWAS) では、理研・玉利真由美先生 (現東京慈恵会医科大学・分子遺伝学教授), RNAseqやマイクロバイーム, nCounterでは野口恵美子先生 (筑波大学・医学医療系遺伝医学教授), 三浦謙治先生 (筑波大学・生命環境系生物科学専攻教授), マウスの実験では善本知広先生 (兵庫医科大学・免疫学教授), ナノ構造化核酸では京都大学・西川元也先生 (現東京理科大学・薬学部教授) のお力を借りられたばかりか, 玉利先生, 野口先生, 善本先生の研究室には, 大学院生の国内留学を受け入れていただき, 素晴らしい研究をさせていただきました。JESRECスコアは, 浦島充佳先生 (東京慈恵会医科大学・疫学教授) の発案です。特筆すべきことは, これらの先生方の全員が, その後教授に就任されたことです。すなわち先生方の勢いが最もある中で, 共同研究を行うことができ, その恩恵に与り我々も成果を出せたということです。ペリオスチンの出原賢治先生 (佐賀大学・生化学教授) とは, お互いが教授に就任した直後, 仙台での講演会でご一緒してお近づきになりました。このように, 研究の発展と継続には, ご縁も非常に大切だと感じます。

また, ご縁と研究で思い出すエピソードがあります。私が教室を主宰してしばらく経った頃, 岐阜で行われた日本アレルギー学会に教室員とともに参加したときのことで。懇親会場で, 特別講演をご担当されたシカゴ・ノースウエスタン大学Schlimer教授を見つけた当科の高林哲司医師が, 「あなたの研究室に行って, 是非とも研究させてほしい」と直談判をしました。個人的な面識のない, しかもその道の権威であるSchlimer教授に, 留学したいと話をしに行ったのです。直談判の前にビールを3杯, 一気にあおっていった姿をはっきりと覚えています。それにしてもすごい度胸です。「頑張れー」と言って遠くから眺めていたことは, 指導者として反省しておりますが, 高林先生は, 見事留学OKをもらい, その場でアメリカでの医療保険の支払いまで勝ち取りました。彼は, その後留学中に好酸球浸潤優位の鼻茸にはフィブリン沈着が認められることを発見し, 鼻茸中における凝固系亢進・線溶系抑制メカニズムを提唱しました。特にtissue plasminogen activator (tPA) が線溶系では重要で, 凝固系では最初のtissue factorと最後のXIII因子が鍵であると報告しました。この頃から, 私の研究室の網羅的な研究テーマは, アレルギー性鼻炎から副鼻腔炎へ緩やかにシフトしました。幸いアレルギー性鼻炎の研究で相応の結果を出せていたので, 実験サンプルを換えるだけで済み, シフトは比較的容易であったと思います。高林先生のあとは, 坂下先生, 意元先生とノースウエスタン大学への留学が続きました。懇親会会場での高林先生の勇氣ある一歩が, こうして未来に繋がったのです。

耳鼻咽喉科では鼻科学会, 免疫アレルギー学会で活躍の先生方にJESREC研究, 厚生労働省政策研究にご協力いただき, 結果を得ることができました。その中で, 岡山大学・岡野光博先生 (現国際福祉大学教授) とは, 私の教授選考中に, 松江・一畑ホテルの大浴場で温泉に浸かりながら, 「もし教授選ダメだったら, 他大学に移るか開業すると思う。もし教授になれたら頑張るだけだ」としみじみと話をしました。研究がうまくいかない時, いつもこの時の会話を思い出します。そうすると何故か物事が好転していくように感じるので。そしてもう一つ, 米国のボスの言葉「When you are happy, I am Happy. Take it easy.」も。

今回の宿題報告の研究内容は, 最初に行った鼻茸と下鼻甲介のRNAseqのデータから発展させています。得られたデータを好酸球性副鼻腔炎鼻茸と非好酸球性鼻茸で比較し, 有意差のあったものを詳細に検討していきました。主にペリオスチン, CST-1, ALOX-15, エオタキシン, TRPV3, L-plastinです。これらの機能を調べていくと, 見事に繋がっていくことが解りました。遺伝子ではTSLPとtPAのメチル化が重要で, NOに関連する遺伝子NOS2の反復配列が予後と相関していました。臨床マーカーとしてペリオスチン, IgG4, 鼻腔NO

が役立つことが判明しました。鼻腔内の細菌叢（マイクロバイーム）を16sRNAメタ解析し、非好酸球性副鼻腔炎と好酸球性副鼻腔炎に特徴的な細菌を見出し、機能解析すると病態と関連してきました。さらに凝固系と線溶系アンバランスにもリンクしていました。抗体治療ではその抗体薬選択に役立つ遺伝子パネル・FKNパネル（Fukui-nasal polyyps panel）の結果を紹介し、できればこの結果から新たな新規治療法も開発したいと思います。最後に「鼻茸に浸潤している好酸球と末梢血の好酸球とは違うのか」という疑問に答えるべく、シングルセル解析をし、結果を報告できたらと考えています。今回、宿題報告のモノグラフでは、文献中の当教室論文を太文字にし、分かり易くしました。

好酸球性副鼻腔炎の研究を始めてから、10年で宿題報告をさせていただけるまでになりました。教室員全員の成果ですが、我々の研究アプローチ、研究結果が現在研究をされている先生方、そして今から研究をしようとしている若い先生方の参考になりましたら、望外の喜びです。

2020年8月吉日

福井大学 学術研究院医学系部門  
医学領域 感覚運動医学講座  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野

藤枝 重治

# 目次

## 第1章 好酸球性副鼻腔炎

1-1	好酸球性副鼻腔炎の歴史と定義	3
1-2	好酸球性副鼻腔炎の診断と鑑別	14
1-3	好酸球性副鼻腔炎の病態概要	18

## 第2章 臨床マーカー

2-1	好酸球性副鼻腔炎のバイオマーカーとしてのペリオスチンについて	27
2-2	好酸球性副鼻腔炎患者における鼻腔 NO (nasal NO) の測定意義と可能性	34
2-3	好酸球性副鼻腔炎とケモカイン	42
2-4	バイオマーカーとしての血清 IgG4 値の意義	49

## 第3章 網羅的解析

3-1	好酸球性副鼻腔炎の鼻茸における TRPV3 の発現	57
3-2	好酸球性副鼻腔炎における CST1 の発現と機能的解析	65
3-3	好酸球性副鼻腔炎鼻茸におけるメタボローム解析	74

## 第4章 遺伝子多型とメチル化

4-1	鼻茸におけるエピジェネティクス—DNA メチル化—	85
4-2	慢性副鼻腔炎の遺伝的要因—遺伝子多型と NOS2 反復配列多型—	91

## 第5章 線溶系と凝固系のアンバランスと好酸球性副鼻腔炎

5-1	線溶系抑制による過剰なフィブリン網の形成が鼻茸形成に関与している	103
5-2	血液凝固第 XIII 因子発現増加による好酸球性副鼻腔炎鼻茸形成への関与	114
5-3	短鎖脂肪酸を用いた鼻上皮細胞からの tissue plasminogen activator (t-PA) の産生誘導	121



5-4	トロンビンと thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) による 鼻茸形成の機序	128
5-5	気道上皮におけるレチノイン酸の tissue plasminogen activator 調節と治療, バイオマーカーへの応用の可能性	135

## 第 6 章 好酸球

6-1	好酸球性副鼻腔炎における好酸球の細胞死	145
6-2	好酸球性副鼻腔炎における末梢リンパ節アドレシン (PNAd) の発現について	152
6-3	アスピリン喘息の鼻茸における L-plastin 発現増加に関する検討	158

## 第 7 章 肥満細胞

7-1	好酸球性副鼻腔炎における肥満細胞の役割	169
-----	---------------------	-----

## 第 8 章 マウスモデル

8-1	2 型自然リンパ球活性化による鼻副鼻腔 2 型炎症増悪とステロイド抵抗性の 獲得について	183
-----	---	-----

## 第 9 章 治療

9-1	好酸球性副鼻腔炎に対するナットウキナーゼの治療効果の検討	199
9-2	黄芩の主成分 Baicalin による抗 Type 2 炎症効果と好酸球性副鼻腔炎治療に おける漢方薬の可能性	208
9-3	好酸球性副鼻腔炎の新規治療	217

## 第 10 章 マイクロバイオーム

10-1	慢性副鼻腔炎のマイクロバイオーム	231
------	------------------	-----

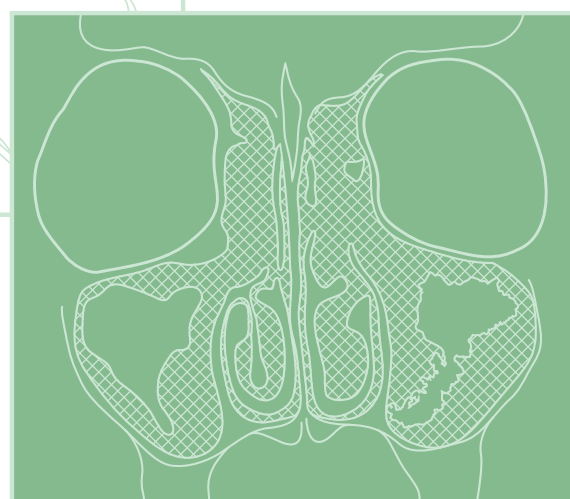
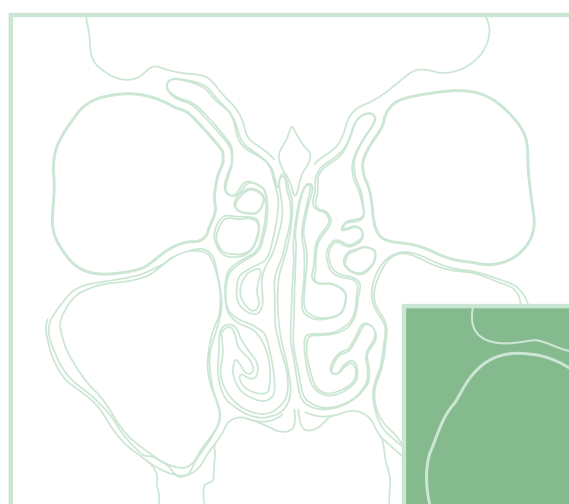
## 第 11 章 遺伝子チップ：nCounter

11-1	エンドタイプに基づいた慢性副鼻腔炎の診断パネル開発	241
------	---------------------------	-----



## 第 1 章

# 好酸球性副鼻腔炎





## 1-1

## 第1章

## 第2章

## 第3章

## 第4章

## 第5章

## 第6章

## 第7章

## 第8章

## 第9章

## 第10章

## 第11章

# 好酸球性副鼻腔炎の歴史と定義

## サマリー

好酸球性副鼻腔炎は、嗅覚障害を主訴とし両側鼻茸を有する疾患である。組織中に好酸球浸潤が著しく、内視鏡下鼻副鼻腔手術を行っても易再発性でかつ難治性副鼻腔炎をこれまで好酸球性副鼻腔炎としていた。2010年に開始した全国疫学大規模疫学研究（JESREC Study）にて診断基準と重症度分類を作成することができた。JESRECスコアは現在広く使用されており、術前に好酸球性副鼻腔炎の可能性が高いことが判明すれば、治療後の予後改善につながる可能性が期待できると考えている。

## 昭和時代の慢性副鼻腔炎

日本人は顔面が欧米人に比較して平面なため、以前から副鼻腔炎の有病率が高いといわれていた。それは成人のみならず未成年においても同様であった。日本においては、副鼻腔炎よりも、蓄膿症の呼び名のほうが、確実に認識度が高い。この疾患は、ウイルス感染およびそれに引き続く細菌感染によって副鼻腔で産生された粘液が、排出障害などのため副鼻腔に貯留することで炎症が遷延化する病気と考えられていた。蓄膿症の名のごとく、副鼻腔に膿が溜まり、膿性鼻汁、鼻閉、頭痛、頬部痛、歯痛などの症状を訴える。患者の中には、鼻腔の中に鼻茸 (nasal polyp) ができる患者もいた。

第二次世界大戦後、日本では開業医をはじめとする耳鼻咽喉科で、非常に多くの局所麻酔下による上顎洞根本手術 (Caldwell-Luc operation) が行われてきた。この手術は、上顎洞に貯留していた膿性粘液を吸引するとともに、病的粘膜を完全摘出し、鼻腔に対孔を増設するものであった。この方法では、60%の治癒率にとどまり、さらなる向上が望まれていた。

光学系の進歩も伴って、1985年 Kennedy<sup>1)</sup>、1986年 Stammberger<sup>2)</sup> が内視鏡下鼻副鼻腔手術 (endoscopic sinus surgery; ESS) を報告した。その方法は、副鼻腔炎粘膜を摘出せずに温存し、上顎洞自然口を開大するとともに、前後の篩骨洞を開放することであった。

日本では当初、病的粘膜の除去を行わないことになりの疑問視もあったが、内視鏡手術という日本人が好む器用さを発揮できることから ESS は急激に普及していった。

以前から、日本の慢性副鼻腔炎と欧米の慢性副鼻腔炎は異なっているといわれていた。欧米の慢性副鼻腔炎に伴う鼻茸は好酸球浸潤が優位であるが、日本の慢性副鼻腔炎は好中球浸潤が優位であるとされてきた。これは Okuda (故 日本医大耳鼻咽喉科 奥田稔名誉教授) が1962年にオーストリアに留学中、欧州と日本の鼻茸を比較して見出した病態で<sup>3)</sup>、以後日本の慢性副鼻腔炎は好中球浸潤優位であるとの報告が相次いだ。以前からびまん性細気管支炎には、慢性副鼻腔炎が合併することが多く、sinobroncheal syndrome として有名であった。

1980年代、びまん性汎細気管支炎に対するマクロライド系抗菌薬エリスロマイシンの少量長期投与の効果が報告された<sup>4)</sup>。合併する慢性副鼻腔炎に使用すると同様に効果が認められるとともに、そのころ上市されたクラリスロマイシンの高い有用性から、日本の慢性副鼻腔炎の治療は一変した<sup>5)6)</sup>。鼻茸のない慢性副鼻腔炎ではマクロライド少量長期投与が著効を示し、鼻茸のある慢性副鼻腔炎では、ESSと術後のマクロライド使用で、術後成績は急激に向上した。多くの耳鼻咽喉科がこれで慢性副鼻腔炎は根治できると思うようになった。



表1. 春名・森山らによる好酸球性副鼻腔炎の診断基準<sup>7)</sup>

## 絶対条件

- 1) 成人発症
- 2) 両側性副鼻腔病変
- 3) CT所見で上顎洞よりも篩骨洞の陰影が優位
- 4) 主訴のなかに嗅覚障害がある
- 5) 内視鏡所見で鼻ポリープを認める
- 6) 血中好酸球6% (300個/ml) 以上もしくは副鼻腔組織中好酸球100個以上で好酸球優位

## 付帯条件

- 1) ステロイド薬、特に経口ステロイド薬が臨床所見の改善に有効
- 2) 気管支喘息、アスピリン喘息を合併する
- 3) 内視鏡下鼻副鼻腔手術後も経過不良を呈する
- 4) マクロライド療法の効果は不明
- 5) 粘稠性分泌物が認められる

表2. 石戸谷らによる好酸球性副鼻腔炎の診断基準<sup>8)</sup>

- 1) 血中好酸球6%以上
- 2) CT所見 (嗅裂陰影スコア1以上, 後部篩骨洞陰影スコア1以上)
- 3) 気管支喘息合併の有無

## 好酸球性副鼻腔炎の出現

1990年代後半から、ESS術後に少量マクロライド長期治療を行っても、手術で摘出したはずの鼻茸がすぐに再発し、治癒しない症例が増加してきた。そのような患者を調査すると、嗅覚障害を主訴とし粘稠な鼻漏と鼻閉を有していた。さらに鼻茸組織中にはこれまでの好中球浸潤ではなく好酸球浸潤が強いことが判明した。それ以外にも気管支喘息の合併症が多い特徴が認められた。このような特徴をもつ鼻茸のある難治性慢性副鼻腔炎を春名・森山らは、好酸球性副鼻腔炎と命名し、表1に示す診断基準を発表した<sup>7)8)</sup>。その後、石戸谷らは、血中好酸球、CTでの後部篩骨洞・嗅裂所見が有意に好酸球浸潤程度と相関し、これら3項目を用いると高い特異度で好酸球性副鼻腔炎が診断できると報告した<sup>9)</sup>(表2)。各施設では、これらの基準を利用して好酸球性副鼻腔炎を診断していたが、実際には病理組織結果において「高い好酸球浸潤を認める」の1行で臨床症状を鑑みて、診断されることが多かった。

表3. 平成22年度「好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究」参加施設と分担研究者。

札幌医科大学	氷見 徹夫	関 伸彦
獨協医科大学	春名 眞一	中山 次久
自治医科大学附属さいたま医療センター	飯野ゆき子	吉田 尚弘
東京慈恵会医科大学	鴻 信義	浅香 大也
東京大学	山唄 達也	近藤 健二
東邦大学	吉川 衛	
順天堂大学	池田 勝久	村田 潤子
横浜市立大学 附属市民総合医療センター	石戸谷淳一	佐久間康徳
金沢医科大学	三輪 高喜	山田 奏子
三重大学	小林 正佳	坂井田 寛
大阪医科大学	河田 了	寺田 哲也
日本赤十字社和歌山医療センター	池田 浩己	
岡山大学大学院医歯学総合研究科	岡野 光博	春名 威範
島根大学	川内 秀之	森倉 一朗
広島大学大学院医歯薬学総合研究科	平川 勝洋	竹野 幸夫
筑波大学人間総合科学研究科	野口恵美子	
理化学研究所ゲノム医科学研究センター	玉利真由美	広田 朝光
東京慈恵会医科大学・疫学	浦島 充佳	
福井大学	富田かおり	森川 太洋
	意元 義政	二之宮貴裕
	徳永 貴広	坂下 雅文

好酸球性副鼻腔炎疫学研究<sup>10)</sup>

平成21年秋、厚生労働省から今後の難治疾患承認に向けた疫学研究に対する研究助成公募の発表がなされた。これまで好酸球性副鼻腔炎の全国規模での疫学調査は行われていなかったこと、明確な診断基準で、誰もが診断できるようなものはなかったこと、重症度分類がなかったことから、平成22年度厚生労働省難治疾患克服事業「好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究 (JESREC Study)」(研究代表者: 藤枝重治) を立ち上げ、表3に示す19施設と関連病院が参加した。

(施設番号)-(整理番号)	(福井大学への郵送用)
<b>前向きは整理番号の頭に「E」をつけて下さい</b>	この症例の診断は、(各施設での基準で診断)
性別( M F ) 年齢 ___ 才	<input type="checkbox"/> 慢性副鼻腔炎 <input type="checkbox"/> 好酸球性副鼻腔炎
この症例は、	<input type="checkbox"/> 慢性中耳炎 <input type="checkbox"/> 好酸球性中耳炎
<input type="checkbox"/> 疫学調査 <input type="checkbox"/> 前向き研究	前向き研究参加 (可 不可)
発症年齢 <input type="checkbox"/> <20 <input type="checkbox"/> 20~40 <input type="checkbox"/> 40 ≤	WBC _____ 個/ul
病変 <input type="checkbox"/> 片側 <input type="checkbox"/> 両側	好酸球 _____ %
術前状況	好塩基球 _____ % (0.1 の桁まで)
術前、2週以内の内服ステロイド使用	好中球 _____ %
(あり なし 不明)	RAST (スコア 2 ≤ 陽性)
抗菌薬への反応 (あり なし 不明)	<input type="checkbox"/> 未測定 <input type="checkbox"/> すべて陰性
ステロイドへの反応	<input type="checkbox"/> コナダニ(1) <input type="checkbox"/> ヤケダニ(2)
点鼻 (あり なし 不明)	<input type="checkbox"/> スギ <input type="checkbox"/> ブタクサ <input type="checkbox"/> カモガヤ
内服 (あり なし 不明)	<input type="checkbox"/> カンジダ <input type="checkbox"/> アスペルギルス
身体所見について	<input type="checkbox"/> アルテルナリア <input type="checkbox"/> その他
鼻茸 (あり なし 不明)	<input type="checkbox"/> その他 <input type="checkbox"/> その他
粘稠な鼻汁 (あり なし 不明)	上顎洞と篩骨洞の陰影濃度
後鼻漏 (あり なし 不明)	<input type="checkbox"/> 上顎 > 篩骨 <input type="checkbox"/> 上顎 = 篩骨
顔面痛 (あり なし 不明)	<input type="checkbox"/> 上顎 < 篩骨 <input type="checkbox"/> 不明
嗅覚障害 (脱失、あり なし 不明)	標本所見について <input type="checkbox"/> 不明
嗅裂閉塞 (あり なし 不明)	好酸球数(x400、一視野あたり)
耳症状 (あり なし 不明)	① _____ 個、② _____ 個、③ _____ 個
骨導閾値上昇(1周波数でも 30dB 以上)	3回の平均数 _____ 個
(あり なし 不明)	合併症について
喫煙について	好酸球性中耳炎 (あり なし 不明)
<input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> 今まで吸ったことがない	慢性中耳炎 (あり なし 不明)
<input type="checkbox"/> 以前ある (本/日、年間)	アスピリン喘息 (あり なし 不明)
<input type="checkbox"/> 現在ある (本/日、年間)	アレルギー性鼻炎 (あり なし 不明)
室内ペット(受診時) (あり なし 不明)	気管支喘息 (あり なし 不明)
検査データについて	アトピー性皮膚炎 (あり なし 不明)
末梢血 <input type="checkbox"/> 不明	食物アレルギー (あり なし 不明)
採血時、2週以内の内服ステロイド使用	蕁麻疹、薬剤アレルギー (あり なし 不明)
(あり なし )	Churg-Strauss syndrome (あり なし 不明)

図1. JESREC Studyで使用した臨床データシート.

平成19年1月1日～平成21年12月31日の3年間に行った病理組織が確実にある慢性副鼻腔炎に対するESS症例を抽出し、各種臨床データと再発の有無を解析した。計3,241例の解析データシートが集

まった。解析データシートを示す(図1)。平均年齢51.9±16.0歳、5歳から93歳まで幅広い分布であった。各施設の判定によって好酸球性副鼻腔炎と通常の慢性副鼻腔炎を分類すると好酸球性副鼻腔炎は

表4. 好酸球性副鼻腔炎と一般的慢性副鼻腔炎の違い.

	好酸球性 副鼻腔炎	慢性副鼻腔炎 (一般)
症例数	822	2,192
年齢	51.0±13.8	51.6±16.8
両側病変	96.8%	59.6%
症状		
鼻茸	92.6%	72.2%
粘調鼻汁	70.4%	52.2%
後鼻漏	51.8%	39.9%
顔面痛	23.2%	22.3%
嗅覚障害	42.3%	23.6%
嗅裂閉鎖	69.0%	23.6%
耳症状	16.4%	10.9%
骨導閾値上昇	3.8%	3.3%
血中好酸球率	8.56±5.68	3.85±3.94
レントゲン陰影濃度		
上顎<篩骨	61.4%	27.1%
上顎=篩骨	30.9%	29.3%
上顎>篩骨	6.6%	40.9%
病理組織中好酸球数	244.1±235.7	66.7±13.0
合併症		
好酸球性中耳炎	2.9%	0.2%
慢性中耳炎	1.0%	0.9%
アスピリン喘息	10.3%	0.9%
アレルギー性鼻炎	53.8%	27.4%
気管支喘息	41.6%	8.9%
アトピー性皮膚炎	1.8%	0.9%
食物アレルギー	2.1%	1.6%
薬物アレルギー	9.1%	3.4%
Churg-Strauss syndrome	0%	0%

822例(27.6%)となり,好酸球性中耳炎38例を含んでいた.表4に好酸球性副鼻腔炎と一般的慢性副鼻腔炎の症例のまとめを示す.多くの項目で2群間に有意差が認められた.しかしこの区分では一貫性はなく,好酸球性副鼻腔炎の診断基準は作成できないと考えた.

## 組織中好酸球数のカットオフ値の決定

これまで好酸球性副鼻腔炎の定義において明確なのは,鼻粘膜に強い好酸球浸潤を認めることである.そこでヘマトキシリン-エオジン染色された組織中の好酸球数を3,241症例全てカウントした.400倍視野,接眼レンズ22において,3か所を選択し,1視野での好酸球の存在をカウントした.カウントは全て3人の福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科大学院生が行い平均化し,浸潤好酸球数とした.全症例における400倍顕微鏡下1視野あたり好酸球浸潤は,平均116.3±184.1個(平均±標準偏差)であった.1視野あたり120個以上の症例数は903例(全症例の30%),150個以上は797例(26%),200個以上は606例(20%),300個以上は368例(12%)であった.

表5に好酸球浸潤数による層別解析を示す.組織内好酸球数が1視野あたり,80個以上,120個以上,200個以上で解析をしたが,症状,レントゲン,合併症など80個以上の3群間で有意差を認める項目はなかった.もちろん80個未満の群とはそれぞれ多くの項目で有意差を認めていた.

これらの症例のうち,術前ステロイドに内服があったり,処方の詳細が不明だったりした症例,再発調査ができなかった症例,観察期間が28日未満の症例は除外した.最終的に1,716例を解析対象とした.この症例数が診断基準作成のための重み付けを決定するうえで,十分な症例数であることを確認した.

まず組織中の好酸球浸潤数と再発の有無を検討した.組織中の好酸球数に関して,1,716の症例を5等分して再発率を計算した.症例数を均等に5等分すると400倍1視野あたり好酸球が0~3.3個,3.4~19個,20~66個,67個~211個,212個以上の5群,各群の症例数は342から345例となった.5群におけるESS術後の鼻茸無再発率を求めると,67個以上の2つの群は66個以下の3つの群に比べて有意に再発率が高いことがわかった(図2).そこで浸潤好酸球数のカットオフ値を66個近辺で検討しなおすと,70個にした際に最も有意差がつくことが判明した(図3).よって好酸球性副鼻腔炎の確定診断は,鼻茸組織中浸潤好酸球数:70個と決定した<sup>10)</sup>.

表5. 組織中に浸潤している好酸球数による層別解析.

	慢性副鼻腔炎	好酸球性	>80個	>120個	>200個
症例数	2,192	822	1,096	903	606
年齢	51	51	52	53	53
両側病変	60%	97%	88%	90%	92%
症状					
鼻茸	72%	93%	91%	91%	93%
粘調鼻汁	52%	70%	60%	61%	60%
後鼻漏	40%	52%	42%	42%	39%
顔面痛	22%	23%	20%	21%	18%
嗅覚障害	24%	42%	35%	36%	35%
嗅裂閉鎖	24%	69%	55%	57%	59%
耳症状	11%	16%	14%	14%	13%
骨導閾値上昇	3%	4%	4%	4%	4%
血中好酸球率	3.9	8.7	7.2	7.4	7.7
レントゲン陰影濃度					
上顎<篩骨	27%	61%	56%	59%	58%
上顎=篩骨	29%	31%	28%	27%	30%
上顎>篩骨	4%	7%	14%	13%	11%
病理組織中好酸球数	67	244	288	329	412
合併症					
好酸球性中耳炎	0%	3%	2%	2%	2%
慢性中耳炎	1%	1%	1%	2%	2%
アスピリン喘息	1%	10%	7%	8%	9%
アレルギー性鼻炎	27%	54%	43%	43%	42%
気管支喘息	9%	42%	30%	30%	33%
アトピー性皮膚炎	1%	2%	2%	2%	2%
食物アレルギー	2%	2%	2%	2%	2%
薬物アレルギー	3%	9%	8%	9%	10%

## JESREC スコアの決定

組織浸潤好酸球が70個以上の群と70個未満の2群に分け、70個以上を好酸球性副鼻腔炎、70個未満を非好酸球性副鼻腔炎として、2群間で有意に差のある臨床項目を検討した(表6)。多くの項目で有意差を認めたが、多変量解析をすると、疾患の両側性、鼻茸の有無、CT所見、末梢血好酸球率に有意なオッズ比が得られた。そこでどのように診断基準を作成するか検討したところ、当時、臨床スコアとして診断基準を作成するほうが利用する医師にとって理解

しやすいとの観点からJESRECスコア(図4)として点数化することとした。合計して17点満点中11点以上の場合に好酸球性副鼻腔炎の可能性が高いとした。このカットオフ値で、感度83%、特異度66%、陽性的中率62%、陰性的中率85%であった。本診断基準は、陰性的中率を高くし、好酸球性副鼻腔炎のスクリーニングにしたいと考えていたので、11点以上でよいと判断した<sup>11) 12)</sup>。そして最終的に浸潤好酸球数が70個以上認めたならば、好酸球性副鼻腔炎と確定診断がつけられるようにした<sup>13)</sup>。

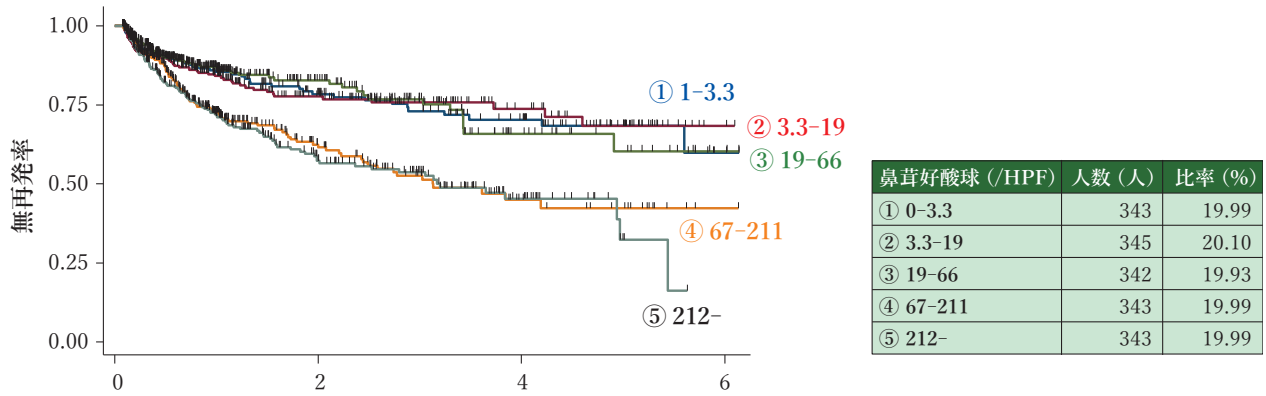


図2. 鼻茸組織中好酸球数別による鼻茸無再発率.

Kaplan-Meier法で鼻茸無再発率を計算した.

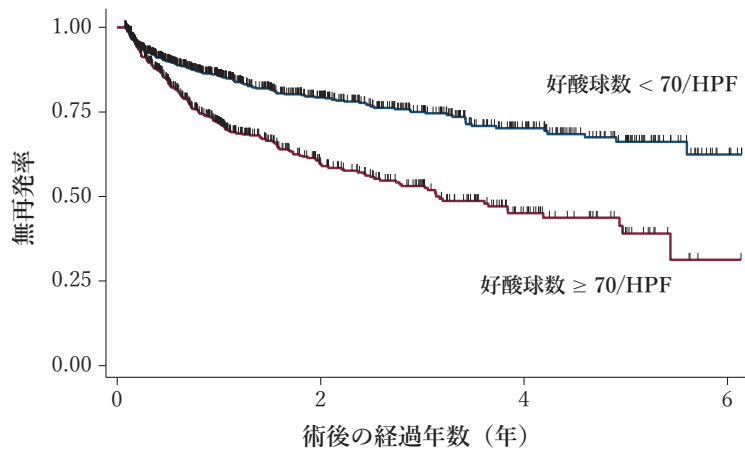


図3. 鼻茸組織中好酸球数が70個/HPFをカットオフとして鼻茸無再発率を求めた.

Kaplan-Meier法で計算し, 2群間に有意な差を認めた ( $P < 0.0001$ ).

項目	スコア	項目	スコア
病側: 両側	3	血中好酸球 (%)	
鼻茸	2	2 < ≤ 5	4
篩骨洞陰影優位	2	5 < ≤ 10	8
		10 <	10

合計スコア ≥ 11点

鼻茸組織中好酸球数 ≥ 70個/HPF

図4. 好酸球性副鼻腔炎診断基準 (JESREC Study).

### 重症度分類

組織中好酸球数が多くとも, 一般的慢性副鼻腔炎のようにESSにて再発なく治癒する症例もあり, 好酸球性副鼻腔炎の中にも重症度が存在すると考えて

いた. そこで対象症例の鼻茸再発率を Kaplan-Meier法によって検討した. 鼻茸再発率は, 72か月で50%と高率であった. 最初の1年で20%が再発し, 次の1年で10%, その後1年ごとに各5%の再発率であった. 再発に関する因子に関して, 単変量Cox比例ハザードモデルで検討すると, 有意であった項目は, 40歳以上, 両側性, 鼻茸あり, 粘調な鼻汁あり, 嗅覚障害, 嗅覚閉鎖, 血中好酸球率, 吸入抗原特異的IgE陽性, CTにおける篩骨洞優位な陰影, アスピリン喘息, アレルギー性鼻炎, 気管支喘息, 薬物アレルギー (NSAIDs), 蕁麻疹の合併であった. さらに多変量Cox比例ハザードモデルで解析すると表7に示すように, 有意な項目は3つの合併症, 末梢血好酸球率とCT所見に絞られた.



表6. 非好酸球性副鼻腔炎（組織好酸球数70個未満）と好酸球性副鼻腔炎（組織好酸球数70個以上）の臨床データ比較<sup>13)</sup>.

	全サンプル (n=1,716)	非好酸球性 (n=1,044)	好酸球性 (n=672)	P value
<b>性別</b>				
男性	1,155 (67.3%)	675 (64.7%)	488 (72.6%)	0.001**
女性	525 (30.6%)	352 (33.7%)	177 (26.3%)	
<b>年齢 (年; mean ± SD)</b>	52.4±16.1	52.5±16.9	52.3±14.6	n.s.
<b>発症年齢 (年)</b>				
≤20	135 (7.9%)	91 (8.7%)	44 (6.5%)	n.s.
20-40	387 (22.6%)	222 (21.3%)	165 (24.6%)	
≥40	927 (54.0%)	566 (54.2%)	361 (53.7%)	
<b>病側</b>				
両側	1,152 (67.1%)	571 (54.7%)	581 (86.5%)	<0.001***
片側	522 (30.4%)	450 (43.1%)	72 (10.7%)	
<b>薬の反応</b>				
抗菌薬	125 (7.3%)	73 (7.0%)	52 (7.7%)	n.s.
経口ステロイド	117 (6.8%)	51 (4.9%)	66 (9.8%)	<0.001***
鼻噴霧用ステロイド	51 (3.0%)	15 (1.4%)	36 (5.4%)	<0.001***
<b>症状</b>				
鼻茸	1,335 (77.8%)	720 (69.0%)	615 (91.5%)	<0.001***
粘稠な鼻漏	940 (54.8%)	547 (52.4%)	393 (58.5%)	n.s.
後鼻漏	690 (40.2%)	437 (41.9%)	253 (37.6%)	n.s.
顔面痛	317 (18.5%)	220 (21.1%)	97 (14.4%)	0.002**
嗅覚減退	469 (27.3%)	235 (22.5%)	234 (34.8%)	<0.001***
嗅覚脱失	256 (14.9%)	87 (8.3%)	169 (25.1%)	<0.001***
嗅裂閉鎖	609 (35.5%)	246 (23.6%)	363 (54.0%)	<0.001***
<b>喫煙歴</b>				
過去にあり	283 (16.5%)	189 (18.1%)	94 (14.0%)	0.004**
現在	244 (14.2%)	133 (12.7%)	111 (16.5%)	
<b>血液所見</b>				
白血球 (10 <sup>3</sup> /μl) (mean ± SD)	6.12±1.55	6.04±1.61	6.24±1.47	0.012*
好酸球 (%) (mean ± SD)	5.16±4.82	3.82±3.74	7.13±5.54	<0.001***
抗原特異的IgE				
ハウスダスト	314 (18.3%)	172 (16.5%)	142 (21.1%)	0.028*
スギ	461 (26.9%)	226 (21.6%)	235 (35.0%)	<0.001***
ブタクサ	71 (4.1%)	34 (3.3%)	37 (5.5%)	0.025*
カモガヤ	108 (6.3%)	60 (5.7%)	48 (7.1%)	n.s.
カンジダ	46 (2.7%)	24 (2.3%)	22 (3.3%)	n.s.
アスペルギルス	30 (1.7%)	20 (1.9%)	10 (1.5%)	n.s.
<b>CT所見</b>				
篩骨洞>上顎洞	611 (35.6%)	238 (22.8%)	373 (55.5%)	<0.001***
篩骨洞=上顎洞	499 (29.1%)	305 (29.2%)	194 (28.9%)	
篩骨洞<上顎洞	535 (31.2%)	448 (42.9%)	87 (12.9%)	
<b>合併症</b>				
気管支喘息	306 (17.8%)	125 (12.0%)	181 (26.9%)	<0.001***
アスピリン不耐症	64 (3.7%)	14 (1.3%)	50 (7.4%)	<0.001***
アレルギー性鼻炎	604 (35.2%)	306 (29.3%)	298 (44.3%)	<0.001***
アトピー性皮膚炎	27 (1.6%)	16 (1.5%)	11 (1.6%)	n.s.
食物アレルギー	34 (2.0%)	18 (1.7%)	16 (2.4%)	n.s.
<b>薬物アレルギー</b>				
NSAIDs	101 (5.9%)	44 (4.2%)	57 (8.5%)	<0.001***
抗菌薬	21 (1.2%)	4 (0.4%)	17 (2.5%)	<0.001***
その他	24 (1.4%)	16 (1.5%)	8 (1.2%)	n.s.
その他	62 (3.6%)	27 (2.6%)	35 (5.2%)	0.005**

\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 (χ<sup>2</sup>検定)

E CRS, eosinophilic chronic rhinosinusitis; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; n.s, non-significant; SD, standard deviation.

表7. 再発性に関する多変量Cox比例ハザードモデル<sup>13)</sup>

項目	ハザード比	p値
アスピリン不耐症	3.25	0.001
NSAIDsアレルギー	2.20	0.039
気管支喘息合併	1.43	0.004
血中好酸球率10%を超える	1.52	0.032
篩骨洞優位な陰影	2.06	<0.001

表8. 難治性に関する多変量Cox比例ハザードモデル<sup>13)</sup>

項目	ハザード比	p値
末梢血中の好酸球率		
2%以下	1	
2-5%以下	1.72	0.072
5-10%以下	1.86	0.036
10%を超える	2.12	0.024
篩骨洞優位な陰影	2.15	0.008

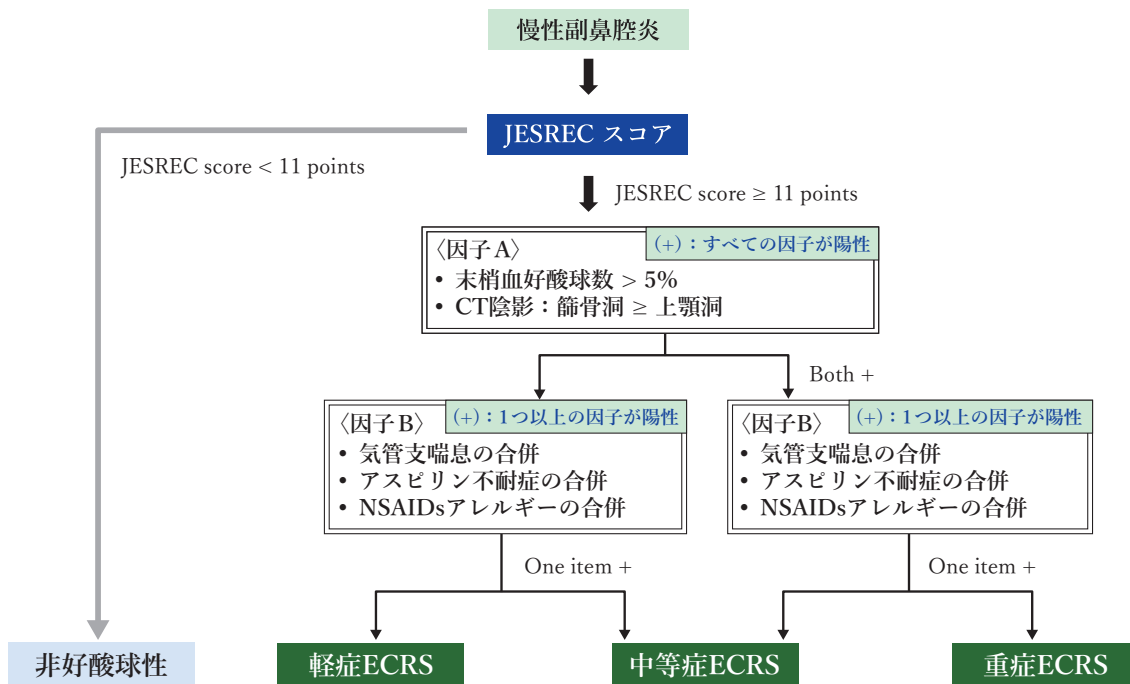


図5. 好酸球性副鼻腔炎の重症度分類アルゴリズム.

次に難治性についても検討した。難治性は、経過観察最終時に治癒していない症例を難治症例として検討した。単変量Cox比例ハザードモデルで有意だった項目は、男性、鼻茸あり、嗅覚障害、嗅裂閉鎖、末梢血好酸球率、CTにおける篩骨洞優位な陰影であった。これらの項目は再発因子とは異なっていた。さらに多変量Cox比例ハザードモデルで解析すると表8に示すように、末梢血好酸球率とCTにおける篩骨洞優位な陰影が有意な項目であった。その再発性因子と難治性因子を使用して、図5のようなアルゴリズムを作成した。すなわち「末梢好酸球5%を超える」と「CTにて篩骨洞優位な陰影を認める」を因子Aとして、両方を認めれば1点とした。1項目

のみは0点とした。因子Bとして気管支喘息の合併・既往、アスピリン不耐症の合併、NSAIDアレルギーの合併のいずれかがあれば1点とした。臨床スコア11点以上で、因子Aと因子Bの合計が、0点を軽症、1点を中等症、2点を重症とした。その結果、非好酸球性副鼻腔炎、好酸球性副鼻腔炎軽症、好酸球性副鼻腔炎中等症、好酸球性副鼻腔炎重症の4つのグループに分けられた(図5)。この4群で鼻茸の再発率を Kaplan-Meier 法で計算すると、非好酸球性副鼻腔炎:12.7%、軽症:23.4%、中等症:31.1%、重症:51.8%の再発率を認め、4群間いずれも有意な差を認めた( $p < 0.01$ , 図6)。さらに難治率を計算すると、非好酸球性副鼻腔炎:3.3%、軽症:11.7%、

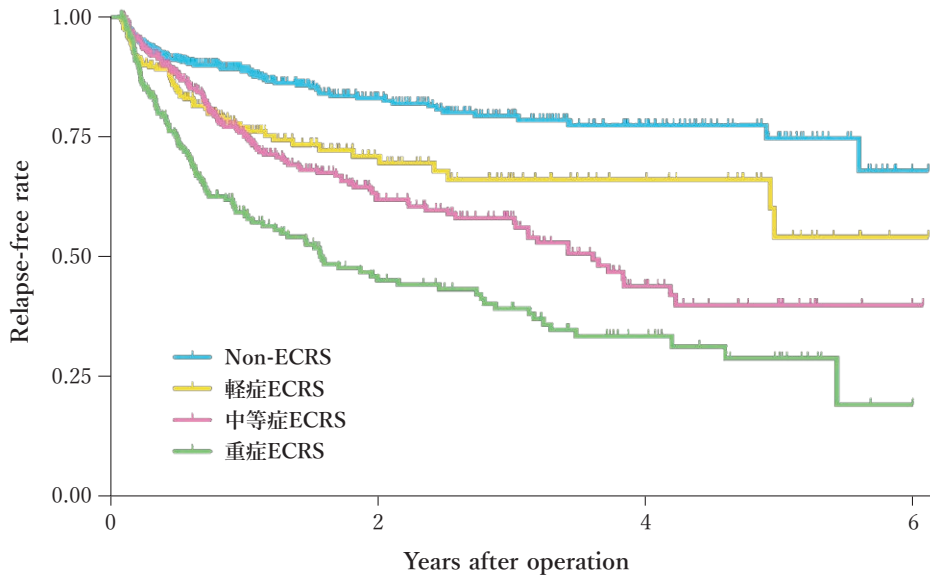


図6. 慢性副鼻腔炎と4群に分け、各群のESS後再発率を Kaplan-Meier 法で検討した。4群間いずれも有意差を認めた。

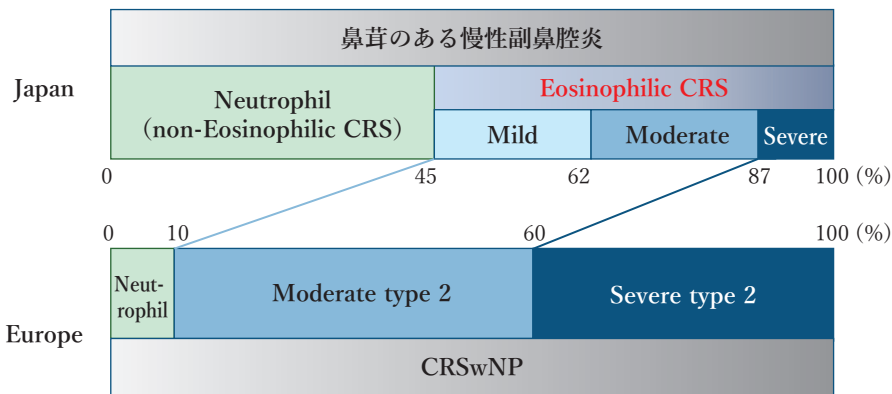


図7. 日本の鼻茸のある慢性副鼻腔炎分類と欧米のCRSwNP分類の対比。

重症好酸球性副鼻腔炎と severe type 2 が同等、軽症・中等症好酸球性副鼻腔炎と moderate type 2 が同等であると考えられる。数字はそれぞれの%を示している。

中等症：16.6%，重症：29.4%とこれも4群間とも有意な差を認めた ( $p < 0.01$ )<sup>13)</sup>。

### JESREC Study の有用性

JESRECスコアを発表した当初、好酸球性副鼻腔炎の主症状は嗅覚障害が多いので、必ず診断基準に入れるべきであるとか、経口ステロイドが有効なことを記載すべきであるとか、鼻茸があるのは当たり前だから不要だなど、さまざまなお意見をいただいた。しかし多くの施設で追試をした結果、JESRECス

コア11点をカットオフ値として、ESS後の再発に関して、いずれの施設でも鼻茸再発率に有意差が認められ同じ結果であった。これは日本のみならず韓国においても同様で、現在韓国でもJESRECスコアは使用されている。韓国の鼻茸サンプルのサイトカイン産生パターンを調べると、重症と中等症好酸球性副鼻腔炎はType 2炎症を示しており、非好酸球性副鼻腔炎はTh1型を示しており、日本のデータをほぼ同じであった<sup>14)</sup>。

またNakayamaらは、JESRECスコアと鼻茸中好酸球数の組み合わせによる4つのサブタイプは、

CRSwNPのCLC, IL5, IL13, CCL11, CCL24, CCL26, POSTN, CSF3, IL8のmRNA発現パターンの分類に一致し, エンドタイプを示していることを報告し, 好酸球性副鼻腔炎の診断以外にもJESRECスコアの有用性を証明した<sup>15)</sup>.

現在, 日本において耳鼻咽喉科はもちろん呼吸器内科においてもJESRECスコアの認知度は向上し, 広く臨床に用いられるようになった. 2020年6月末の段階でAllergyに掲載されたオリジナル論文(文献番号13)の引用回数は182回に達し, 広く引用されていることがわかる.

### 慢性副鼻腔炎の分類と欧米との比較

我々はJESREC Study 報告後, 慢性副鼻腔炎は表9に示すように, 鼻茸ありと鼻茸なしに分類後, 鼻茸ありを好酸球性副鼻腔炎(軽症, 中等症, 重症)および非好酸球性副鼻腔炎に分類した. 他の副鼻腔炎, 破壊型真菌症, 真菌性副鼻腔炎, allergic fungal sinusitisがあるが, この表には含めていない.

欧米では, 慢性副鼻腔炎をchronic rhinosinusitis with nasal polyp(CRSwNP)とchronic rhinosinusitis

表9. 慢性副鼻腔炎の分類<sup>10)</sup>.

慢性副鼻腔炎-----	鼻茸なし	
	鼻茸あり-----	非好酸球性副鼻腔炎 好酸球性副鼻腔炎 軽症 中等症 重症

without nasal polyp(CRSsNP)に分類している<sup>16)</sup>. このpositioning paperでは, CRSwNPは両側と記載されており, 片側性の慢性副鼻腔炎は, CRSwNPにもCRSsNPにも含まれない. そのため片側性鼻茸を有する慢性副鼻腔炎はどのように分類するのか疑問が残る. 最近では欧米のCRSwNPにもsevere type 2およびmoderate type 2が存在するとされ<sup>17)</sup>, JESREC分類に匹敵する分類もなされるようになった. 図7にJESREC分類と欧米の分類の対比を示す<sup>18)</sup>. 最近では欧米でもCRSsNP以外にも好中球浸潤が多いCRSwNPが存在するとの考えがあり, eosinophilic CRSwNPとneutrophilic CRSwNPとの呼び方もつけられている<sup>19)</sup>.

(藤枝 重治)

### 文献

- 1) Kennedy DW, Zinreich SJ, Rosenbaum AE, et al. Functional endoscopic sinus surgery: Theory and diagnostic evaluation. Arch Otolaryngol. 1985;111:643-649.
- 2) Stammberger H. Endoscopic endonasal surgery: Concepts in treatment of recurring rhinosinusitis. Part I and II. Otolaryngology Head Neck Surg. 1986;94:143-156.
- 3) Okuda M. Differences in chronic rhinitis with reference to its incidence and type in Chiba and Vienna. Monatsschr Ohrenheilkd Laryngorhinol. 1969;103:56-71. (in German)
- 4) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, et al. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. Am J Respir Crit Care Med. 1998;157:1829-1832.
- 5) Hashiba M, Baba S. Efficacy of long-term administration of clarithromycin in the treatment of intrac-table chronic sinusitis. Acta Otolaryngol Suppl. 1996;525:73-78.
- 6) Yamada T, Fujieda S, Mori S, Yamamoto H, Saito H. Macrolide treatment decreased the size of nasal polyps and IL-8 levels in nasal lavage. Am J Rhinol. 2000;14:143-148.
- 7) 春名眞一, 鴻信義, 柳清, 森山寛. 好酸球性副鼻腔炎. 耳展. 2001;44:195-201.
- 8) Haruna S, Nakanishi M, Otori N, et al. Histopathological features of nasal polyps with asthma association: an immunohistochemical study. Am J Rhinol. 2004;18:165-172.
- 9) Sakuma Y, Ishitoya J, Komatsu M, et al. New clinical diagnostic criteria for eosinophilic chronic rhinosinusitis. Auris Nasus Larynx. 2011;38:583-588.
- 10) 藤枝重治, 坂下雅文, 意元義政, 他. 好酸球性副鼻腔炎の診断と治療. 日耳鼻会報. 2014;117:96-102.

- 11) 藤枝重治, 坂下雅文, 徳永貴広, 他. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準: JESREC Study. 日鼻誌. 2014;53:75-76.
- 12) 藤枝重治. 重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と治療法確立に関する研究. 平成 25 年度厚生労働省科学研究費補助金 難治疾患克服事業 総括・分担報告書. 2014.5.
- 13) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: JESREC Study. *Allergy*. 2015;70:995-1003.
- 14) Kim DK, Kang SI, Kong IG, et al. Two-track medical treatment strategy according to the clinical scoring system for chronic rhinosinusitis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2018;10:490-502.
- 15) Nakayama T, Sugimoto N, Okada N, et al. JESREC score and mucosal eosinophilia can predict endo-  
types of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Auris Nasus Larynx*. 2019;46:374-383.
- 16) Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol Suppl*. 2012; 23: 3. p preceding table of contents, 1-298.
- 17) Bachert C, Zhang N, Hellings PW, et al. Endotype-driven care pathways in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:1543-1551.
- 18) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019;68:403-412.
- 19) Ho J, Bailey M, Zaunders J, et al. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. *Clin Exp Allergy*. 2015;45:394-403.



## 1-2

## 好酸球性副鼻腔炎の診断と鑑別

## ● サマリー

好酸球性副鼻腔炎と診断するには、まず鼻の詳細な症状を聴取する。特に嗅覚障害がないか注意を払うとともに合併症の有無を入念に聴く。内視鏡にて鼻腔内鼻茸の有無、状態、鼻汁の性状を観察する。できればCTにて上顎洞と篩骨洞の状態を調べるとともに末梢血分画を調べる。JESRECスコアを計算し、アルゴリズムに則って重症度を決定する。鼻茸組織が得られれば浸潤している好酸球数をカウントし、確定診断をつける。経口ステロイドの反応性でほぼ好酸球性副鼻腔炎であるか判断が可能である。

## 慢性副鼻腔炎の分類

膿性・粘性・粘稠な鼻汁、鼻閉、後鼻漏の症状が3か月以上持続している場合に、慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis; CRS) の診断をつけることができる<sup>1)</sup>。慢性副鼻腔炎患者では、鼻茸の有無によって、鼻茸を伴わない慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis without nasal polyp; CRSsNP) と鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis with nasal polyp; CRSwNP) に分けられる。CRSwNPの中に好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis; ECRS) と非好酸球性副鼻腔炎 (non-ECRS) が存在する<sup>2)</sup>。一般に感冒後の副鼻腔炎は、3か月以内の症状なので急性であり、慢性副鼻腔炎とは異なる。

## 好酸球性副鼻腔炎の症状

嗅覚障害、粘稠な鼻汁、鼻閉、後鼻漏、咳嗽の症状を訴える<sup>3)</sup>。特に嗅覚障害を主訴にすることが多い。気管支喘息の合併を来すことが多いので、労作時呼吸困難、咳嗽、喘鳴、夜間呼吸困難などの症状を伴う。すでに呼吸器内科に気管支喘息として通院していることも多い。ECRSの気管支喘息合併率は70%を超え、non-ECRSの気管支喘息合併率は30%にとどまる<sup>4)5)</sup>。また薬物アレルギーやアスピリン不耐症を合併していることも多い。ECRSの場合でも感染を

契機に受診することもあるので、感冒後に膿性鼻汁や鼻閉が急に強まったもしくは起こったと訴えることも多い。しかしよく話を聞くと3か月前から上記の症状を呈していたことが判明する。

## 好酸球性副鼻腔炎の診断手順

問診後、鼻腔内を観察する。内視鏡を用いて鼻汁と鼻茸の有無を確認する。一般に鼻汁は粘稠であるが、細菌感染が存在すると膿性を呈する。鼻茸は両側に認め、中鼻道もしくは嗅裂に存在し多発性も多い(図1)。どちらかと言えば、みずみずしい鼻茸の

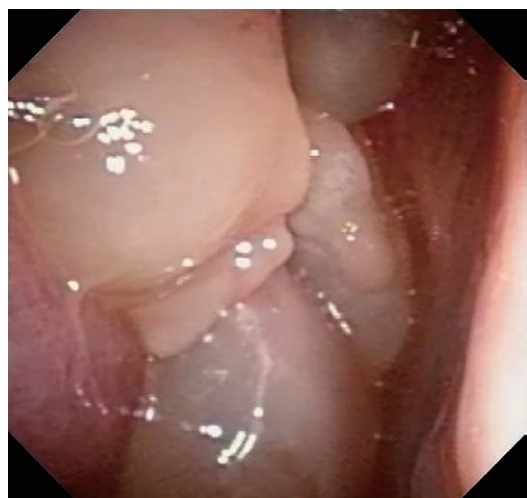


図1. 好酸球性副鼻腔炎の鼻腔所見。  
多発性の鼻茸を認める

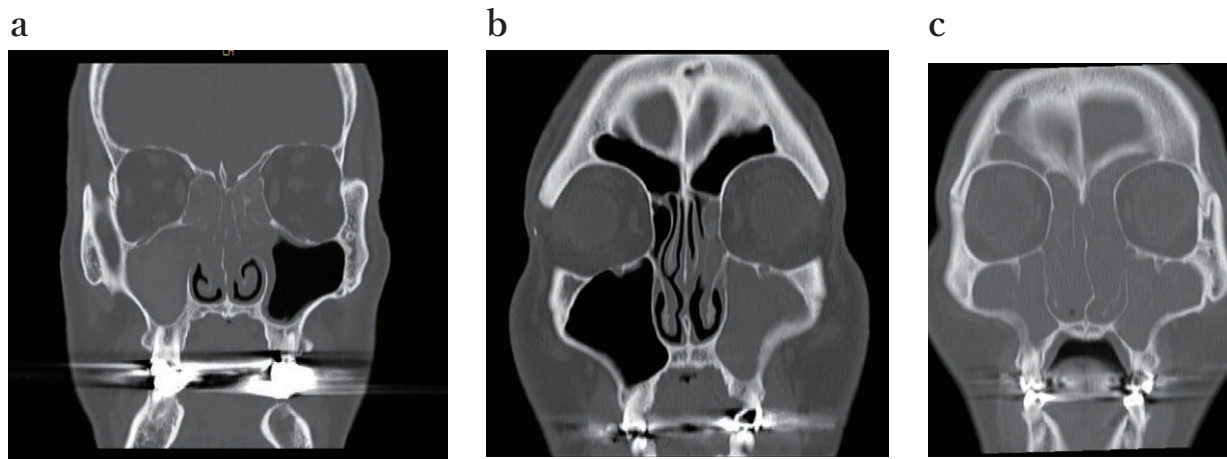


図2. 鼻副鼻腔CT所見.

a) 好酸球性副鼻腔炎 (ECRS). b) 非好酸球性副鼻腔炎 (non-ECRS). c) アスピリン不耐症に伴う ECRS

様相を示す. 次に副鼻腔単純レントゲンを撮影する. 鼻茸の程度のわりに上顎洞の陰影が軽度のことが多い. 篩骨洞には陰影を認める. 嗅裂は軟部陰影で充填し閉塞していることが多い. 単純レントゲンでは, 多くの場合, 篩骨洞の状態を正確に把握することはできないので, できるかぎり速やかに副鼻腔単純CTを撮影する. CTにおいて篩骨洞および嗅裂が均一な陰影で充填していたら, ECRSの可能性が高い (図2a). 一方で左右1側性の病変はnon-ECRSである (図2b). アスピリン不耐症に伴う ECRSでは, 上顎洞, 篩骨洞ともに, 洞内に全く空気が入っておらず, 均一な陰影で充填していることが多い (図2c). いずれの場合も骨破壊はもちろん存在しない.

ECRSの可能性が高いと思ったならば採血を行い, 末梢好酸球率を調べる (表1). これらの結果から, 前章に記載したJESRECスコアを計算して, 11点以上の場合, ECRSの可能性が高い. 最終的には, 鼻茸の生検もしくは内視鏡下鼻副鼻腔手術の標本にて,

400倍視野 (接眼レンズ22を使用) にて3か所の好酸球数を計測し, 平均70個以上存在した場合, ECRSの確定診断をつけることができる (図3). ECRSの重症度は, 前章に記載したアルゴリズムで決定する<sup>5)</sup>.

### 好酸球性副鼻腔炎の鑑別診断

ECRSであるかnon-ECRSであるかは, 内服薬への反応でも判断できる. 通常, non-ECRSの場合, 膿性鼻汁を認めたらAMPC (アモキシシリン) を処方し, 粘性の鼻汁に変化してきたらマクロライド少量長期

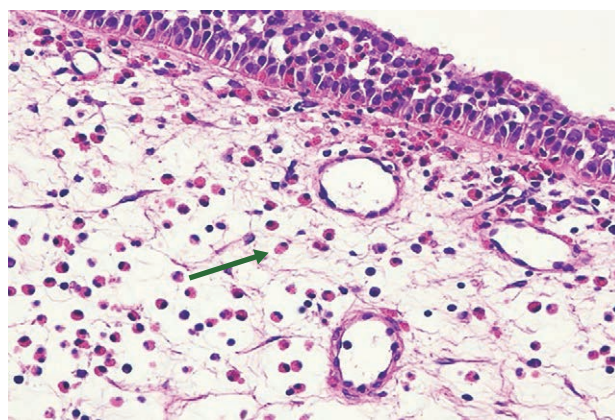


図3. 鼻茸組織 (ヘマトキシリン-エオジン染色).

細胞質が赤く染色されている好酸球 (矢印) であり, 多数 (約100個) 認められる.

表1. 好酸球性副鼻腔炎診断の手順.

1. 詳細な問診 (症状・経過・合併症)
2. 内視鏡検査による鼻腔内の観察
3. 副鼻腔単純レントゲン
4. 必要であれば副鼻腔単純CT
5. 採血: 末梢血好酸球率 (分画)
6. 呼吸器内科への対診 (気管支喘息の有無について)
7. 鼻茸中好酸球数カウント

表2. ECRSとnon-ECRSの臨床的違い<sup>6)</sup>

	ECRS	non-ECRS
好発年齢	成人以降	全年齢で起こりうる
主要症状	嗅覚障害	鼻閉, 鼻漏, 頭痛
鼻汁の性状	粘稠, ニカワ状	膿性, 粘液性
ポリープの状態	中鼻道, 嗅裂 両側, 多発性	中鼻道 片側/両側, 単発性/多発性
優位な病変部位	篩骨洞	上顎洞
優位な細胞浸潤	好酸球	好中球
合併症	気管支喘息 アスピリン不耐性 薬剤アレルギー	びまん性汎細気管支炎 気管支拡張症
マクロライド効果	なし	あり
経口ステロイド効果	あり	なし

投与を行う。すると鼻茸が存在する場合鼻茸の縮小は認めずとも、粘性鼻汁は軽快する。しかしECRSでは膿性鼻汁から膿性が軽快して粘稠な鼻汁になるが、マクロライドを投与しても変化はない。一方でセレスタミン<sup>®</sup>や経口ステロイドを投与するとECRSでは、鼻茸が縮小し、嗅覚障害が改善する。Non-ECRSでは症状の改善は認められない。ECRSとnon-ECRSの比較を表2に示す<sup>6)</sup>。

アレルギー性鼻炎では、鼻茸は伴わず、粘稠な鼻汁も伴わない。ECRS患者のアレルギー性鼻炎合併率は、健常人のアレルギー性鼻炎の発症率とほとんど違いはない。抗原特異的IgE陽性率もECRSと健常人で差は認められない。Non-ECRSでは健常者に比較して、アレルギー性鼻炎の発症率も抗原特異的IgEの陽性率も有意に低くなっている<sup>2)</sup>。

真菌が原因である副鼻腔炎も鑑別の必要がある。真菌による副鼻腔炎である真菌性副鼻腔炎は片側性が多い。CTでは上顎骨の肥厚が認められ、上顎洞内にエンハンスされる塊(真菌塊, Fungus ball)が認められることがある。破壊型真菌症は、鼻副鼻腔症状が少ないわりに視力低下が著しく急速に進行する。CT所見でも上顎洞・篩骨洞・蝶形洞の所見が乏しい。Allergic fungal sinusitisは気管支喘息を伴うことが多く、好酸球率も高値であるが、日本では珍しく片側性がほとんどである。

慢性鼻炎、急性副鼻腔炎などは鼻茸が存在しない。鼻腔内腫瘍であれば、片側性がほとんどである。

## 好酸球性副鼻腔炎の代表的な症例提示

48歳女性。

40歳ごろから鼻閉、粘稠な鼻汁を認め、徐々に嗅覚障害が出現してきた。45歳のときに近医耳鼻咽喉科を受診。両側鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎の診断を受け、内視鏡下鼻副鼻腔手術を勧められ、総合病院耳鼻咽喉科で手術を受けた。鼻閉は一旦改善したが、風邪を引いた半年後には、ほぼ術前の状態と同じく鼻閉と嗅覚障害を認めた。2週間前に風邪をひき、その後膿性鼻汁が出現し湿性咳嗽もひどいので、来院した。

既往歴として、35歳から気管支喘息にて吸入ステロイドを行っている。38歳のときに鎮痛薬内服時に喘息を起こし、救急病院を受診したことがある。血液所見：白血球数8,900、末梢好酸球11.8%、その他異常所見なし。両側鼻腔内、中鼻道と嗅裂には多発性鼻茸と粘稠な鼻汁認め、副鼻腔単純CTは、**図2a**の状態であった。

以上JESRECスコアは、両側：3点、鼻茸：2点、CTにて篩骨洞優位の陰影：2点、血中好酸球：10点、合計17点であり、ECRSの可能が高かった<sup>5)</sup>。2度目の内視鏡下鼻副鼻腔手術を行い、摘出した鼻茸組織をヘマトキシリン・エオジン染色すると、400倍視野(接眼レンズ22にて)好酸球は1視野あたり、100個、123個、134個存在し、平均119個となり、



気管支喘息とアスピリン不耐症を合併する重症 ECRS と診断された。

## まとめ

以前はさまざまな治療を試みて、再発を繰り返すので最終的に ECRS と判断することが多かった。JESREC スコアと重症度分類アルゴリズムの完成で、ECRS の診断が容易になった。鼻症状から ECRS を疑っても合併症の有無を本人が自覚していないことも多い。スパイロメトリー，呼気一酸化窒素 (NO) を測定して気管支喘息の診断をつける，もしくは検査・診断を呼吸器内科に依頼することが肝要である。

**表3. 好酸球性副鼻腔炎の可能性があるので、紹介して欲しい症例<sup>7)</sup>.**

- 気管支喘息・アスピリン不耐症患者が嗅覚障害を訴えた場合
- 気管支喘息・アスピリン不耐症患者において膿性・粘稠な鼻汁が出現した場合
- 好酸球分画が10%以上を示し，嗅覚障害もしくは鼻閉がある場合
- 重症喘息でステロイドを内服すると鼻が通るという場合

また逆に内科側にも **表3** に示す場合には，耳鼻咽喉科に鼻腔内を診察するように紹介して欲しい旨を啓蒙すべきである<sup>7)</sup>.

(藤枝 重治)

## 文献

- 1) Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. Rhinol Suppl. 2012; 23: 3 p preceding table of contents, p. 1-298.
- 2) 藤枝重治, 坂下雅文, 徳永貴広ら. 好酸球性副鼻腔炎診断ガイドライン (JESREC Study). 日耳鼻. 2015; 118:728-735.
- 3) 春名眞一, 鴻 信義, 柳 清ら. 好酸球性副鼻腔炎 (Eosinophilic Sinusitis). 耳展. 2001;44:195-201.
- 4) 藤枝重治, 坂下雅文, 徳永貴広ら. 好酸球性副鼻腔炎 (JESREC Study). アレルギー. 2015;64:38-45.
- 5) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. Allergy. 2015;70: 995-1003.
- 6) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. Allergol Int. 2019;68:403-412.
- 7) 藤枝重治, 坪川亜優美. 好酸球性副鼻腔炎. 内科. 2019;124:1841-1844.

## 1-3

## 好酸球性副鼻腔炎の病態概要

## ● サマリー

好酸球性副鼻腔炎の病態は、Type 2 炎症が関与し、獲得免疫である IgE 依存性炎症と自然免疫である IgE 非依存性炎症の両方が存在する。原因としては、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが重要であるとベルギー・ゲント大学の Bachert グループは主張し、我々は凝固系の亢進と線溶系の抑制を提唱している。好酸球性副鼻腔炎の病態には、B 細胞の IgE へのクラススイッチ、好酸球の分化・増殖・組織浸潤、バリア機能の破綻、杯細胞の過形成と粘液の過剰産生、過剰なフィブリン形成が関与していると考えられている。

好酸球性副鼻腔炎の病態：  
IgE 依存性炎症<sup>1)</sup>

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) はアレルギー性鼻炎と同じ Th2 環境下で発症すると考えられている<sup>1) 2)</sup>。アレルゲンが鼻粘膜に侵入すると樹状細胞が補足をしてナイーブ CD4 陽性 T 細胞に情報を伝え、IL-4 存在下で Th2 細胞へ分化させ、IL-4, IL-5, IL-13 を産生させる。B 細胞は、IL-4 存在下でアレルゲン特異的 IgE 産生形質細胞に分化し、IgE を産生するとされる。アレルギー性鼻炎ではアレルゲンは明白であるが、ECRS の場合、アレルゲンはよくわかっていない (図 1)。細菌はアレルゲンの有力因子であるとともに、細菌・ウイルスなどの微生物に含まれるプロテアーゼも有力候補である。

鼻腔内におけるブドウ球菌のコロニー形成を調べると、CRSwNP では健常人や CRSsNP よりも高いコロニー形成を認める。ベルギー・ゲント大学の Bachert グループは、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が産生するブドウ球菌エンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins; SEs) に対する SE 特異的 IgE を鼻茸中に証明し、SE が CRSwNP 形成のアレルゲン、起因物質であると提唱した<sup>3)</sup>。さらに SE 自身はスーパー抗原としても働き、抗原非特異的に T 細胞を活性化させ、IL-4, IL-5, IL-13 などの Th2 サイトカインを放出させる。それらによりさまざまな

抗原特異的 B 細胞が活性化し、ポリクローナルな IgE を産生する (図 2)。さまざまな IgE は肥満細胞に結合し、さまざまな抗原と反応することで、肥満細胞からはケミカルメディエーターとりわけ好酸球遊走因子が放出され、好酸球炎症を惹起する。現在は、この説が欧米と中国で有力とされている。

SE のなかでエンテロトキシン B (SEB) は鼻茸細胞を刺激して IL-5, IL-13, RANTES を産生する。プロスタグランジン E2 (PGE2) は SEB による Th2 サイトカインやケモカインの産生を抑制する<sup>4)</sup>。グラム陰性菌の構成成分である LPS は、SEB にて刺激された鼻茸細胞から産生される IL-5, IL-13 産生を PGE2 の産生を介して抑制する<sup>5)</sup>。一方で、SEB 自身は鼻上皮細胞からの PGE2 やシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の産生を抑制するので、その機序によって好酸球炎症の鎮静を回避し、炎症を継続しているといえよう。SEB, PGE2 を介した ECRS における炎症メカニズムに関しては、国際医療福祉大学 (元岡山大学) 岡野光博グループが世界的にも有名である。

マウスにおいて黄色ブドウ球菌の感染は IFN- $\lambda$ 1 によって防御される<sup>6)</sup>。健常人の鼻粘膜細胞に黄色ブドウ球菌を *in vitro* で感染させる実験系に IFN- $\lambda$ 1 を加えると感染数は有意に減少する。それには IFN- $\lambda$ 1-IL-28-Reactive oxidase substrate (ROS) -Janus kinase-STAT signal が関与する。しかし鼻茸細胞を用いて同様の実験を行っても IFN- $\lambda$ 1 は黄色ブドウ



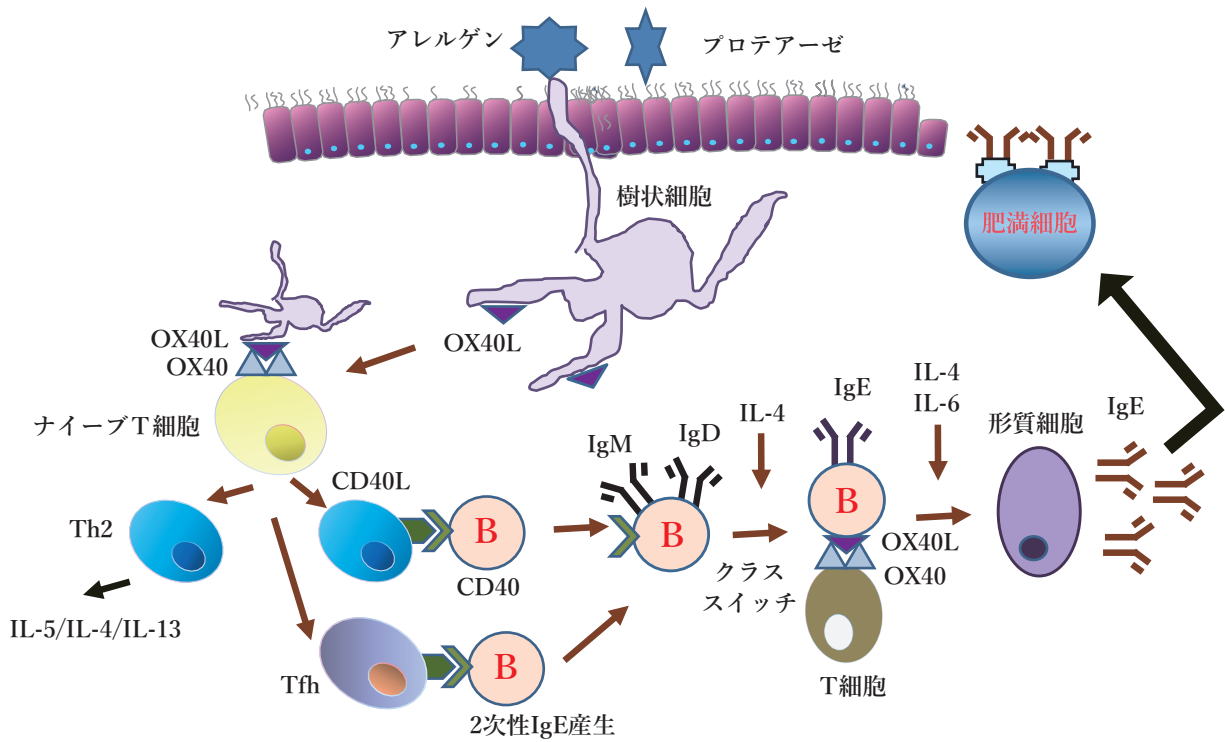


図1. 好酸球性副鼻腔炎に獲得免疫系の関与.

獲得免疫系の活性化によるIgEの産生. 何らかの物質が肥満細胞表面のIgEと結合してケミカルメディエーターを放出し, 好酸球炎症を惹起する.

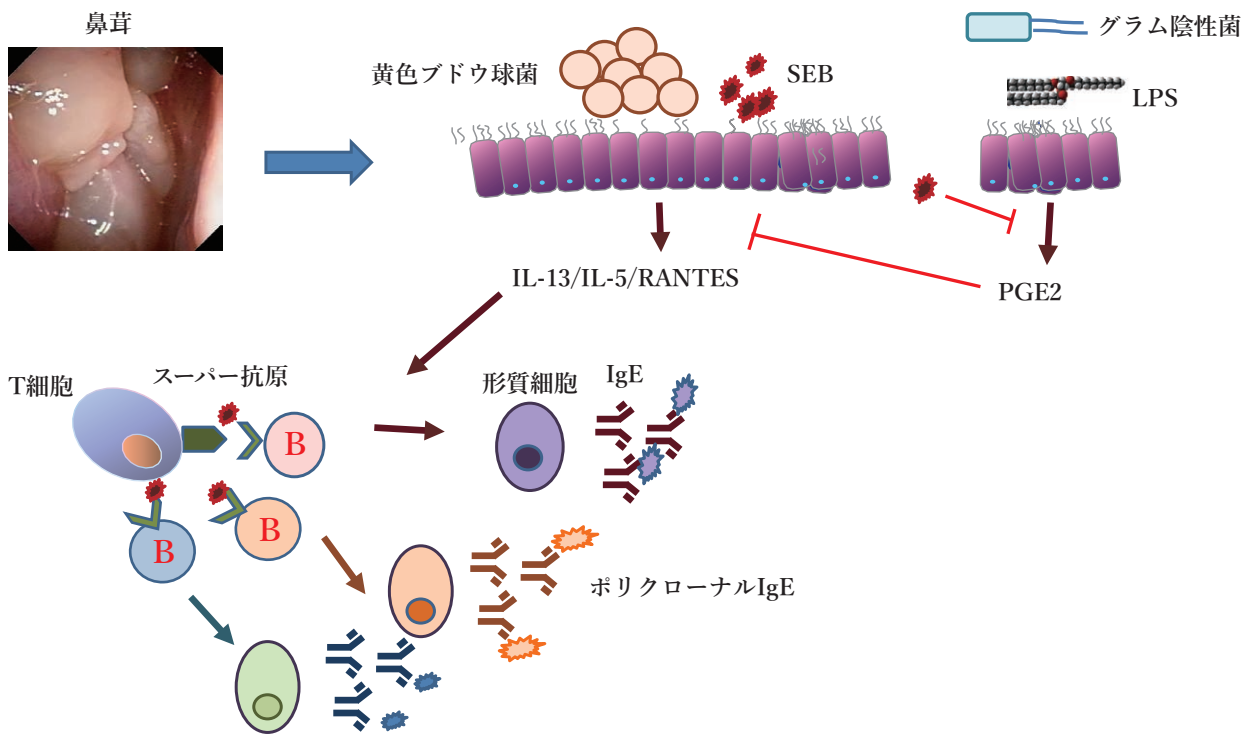


図2. 好酸球性副鼻腔炎における黄色ブドウ球菌の関与.

黄色ブドウ球菌およびエンテロトキシンB (SEB) がポリクローナルIgEを産生し, 好酸球炎症を惹起する.

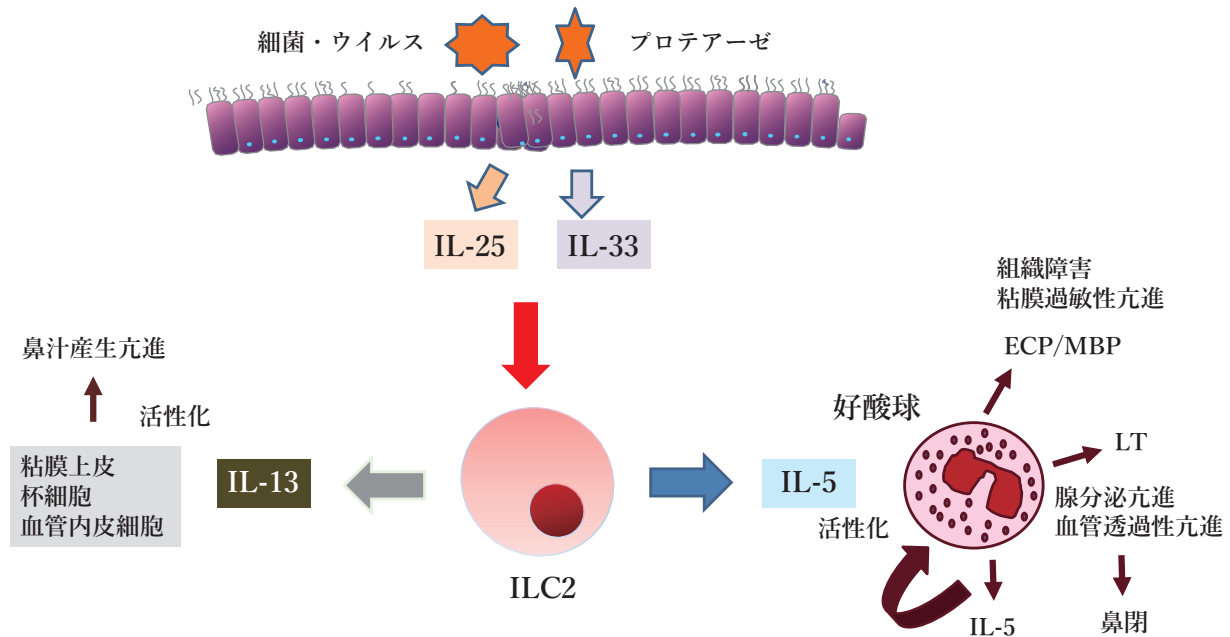


図3. 好酸球性副鼻腔炎による自然免疫系の関与.

上皮系サイトカインがILC2を刺激し、2型サイトカインを放出することにより、好酸球の浸潤と杯細胞の過形成と粘液の過剰産生を惹起する。

球菌の感染を減少できず、このシグナルが何らかの原因で働いていないことが判明した<sup>7)</sup>。

最近、ヒトIgG4が結合する黄色ブドウ球菌の細胞外蛋白の解析から、A～Fまで6種類のstaphylococcal serine protease-like proteins (Spl)が同定された。それぞれのSpl特異的T細胞からはIL-4, IL-5, IL-13が有意に産生されていた。しかしその濃度はSEBに比べかなりの高濃度を必要とした。一方で気管支喘息患者ではSplA, SplB, SplD, SplE特異的IgEが健常人よりも有意に高く検出された。In vivo実験としてマウスの気管にSplDを反復投与すると肺に好酸球浸潤を認めるとともに、血清中にSplD特異的IgEが誘導された<sup>8)</sup>。このようなSplDによる好酸球炎症は、可溶性ST2受容体によるIL-33活性ブロッキング試験によって抑制されるので、IL-33/ST-2を介して起こることが証明された<sup>9)</sup>。

### IgE 非依存性炎症

一方でアレルゲンではなく、化学物質やプロテアーゼ(蛋白分解酵素)を含む蛋白が鼻腔内に侵入し、鼻粘膜を刺激することがある。これには細菌や

ウイルス自身およびそれらのプロテアーゼも該当する。これらの刺激によって鼻粘膜上皮からthymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-25, IL-33の上皮系サイトカインを産生される。①TSLPは樹状細胞の活性化を介してTh2細胞を活性化させる。②IL-25は、Th2細胞, Th9細胞に加え、ILC2細胞に作用し、IL-5とIL-13の産生を誘導する。③IL-33はTh2細胞, ILC2細胞, 肥満細胞に作用してIL-5とIL-13の産生を誘導する。いずれもTh2細胞の活性化が起これば、IgE依存性炎症と同じように炎症反応が起こる。IL-5によって、好酸球浸潤と生存の延長、活性化が起こる。IL-13によって鼻粘膜上皮、杯細胞(粘液産生細胞)、血管内皮細胞の活性化が誘導され炎症が形成される(図3)。これらとは別にCD69とそのリガンドであるミオシン軽鎖による構造が、IL-33の刺激とともにTh2細胞からpathogenic Th2 (Tpath2)細胞への誘導と動員を促し、Tpath2細胞からIL-5が放出され、好酸球が遊走してくることも証明されている<sup>10)</sup>。

実際に鼻茸組織にエンテロトキシン非産生性の黄色ブドウ球菌を感染させるとIL-33, TSLP, IL-5, IL-13の産生が亢進した。健康人下鼻甲介組織に同様

の黄色ブドウ球菌を感染させるとTSLPのみの産生が亢進した。一方で表皮ブドウ球菌 (*S. epidermis*) を鼻茸組織と健常人下鼻甲介組織に感染させても何も産生亢進しなかった。以上から黄色ブドウ球菌が上皮系サイトカイン亢進に関与していると報告されている<sup>11)</sup>。

以前は、特定の黄色ブドウ球菌は、細胞間接着因子を破壊して上皮の繊毛輸送系およびバリア機能を退化させるとされていた。しかし最近の研究では、健康人鼻粘膜では黄色ブドウ球菌の存在によって、細胞間接着因子の発現が亢進してよりバリア機能が保たれるが、CRSwNPではそのような作用はなく、逆に細胞間接着因子発現が抑制されることが報告された<sup>12)</sup>。CRSwNP患者鼻茸由来初代培養上皮細胞株に黄色ブドウ球菌の成分を曝露すると、修復の遅延、ラメリポディア形成縮小、細胞の移動活性減少によって、コントロールの初代培養上皮細胞株に比べ創傷治癒が遅れた<sup>13)</sup>。さらに黄色ブドウ球菌培養上清中の物質は、CRSwNP患者鼻茸由来初代培養上皮細胞株の修復機構をさらに遅延させた。一方で、Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK)

inhibitorはその遅延を正常の修復に戻すことができた。すなわち黄色ブドウ球菌およびその上清中物質は、鼻粘膜上皮にROCKを活性化させることで修復機構を遅らせることが判明した。

また高性能質量分析器によって黄色ブドウ球菌が検出された鼻茸組織では、IL-5の放出が認められた。さらに抗菌薬で黄色ブドウ球菌を殺すとIL-5の放出量が低下した<sup>14)</sup>。

鼻粘膜においてIgEクラススイッチは起こりうる<sup>15)</sup>。鼻茸中にSE特異的IgEが証明されたことから黄色ブドウ球菌が原因菌とされているが、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenza*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に対するIgG, IgA, IgEが鼻茸組織から証明されるとともに、それらのクラススイッチにはTfh細胞の存在が重要性であることが示された<sup>16)</sup>。またクラススイッチは直接目的のクラスにスイッチしないで、他のクラスを経由してスイッチするシーケンシャルスイッチやトランススプライシングの機序も存在する<sup>17)~20)</sup>。実際、細菌特異的IgGもしくはIgA1からのシーケンシャルスイッチによっ

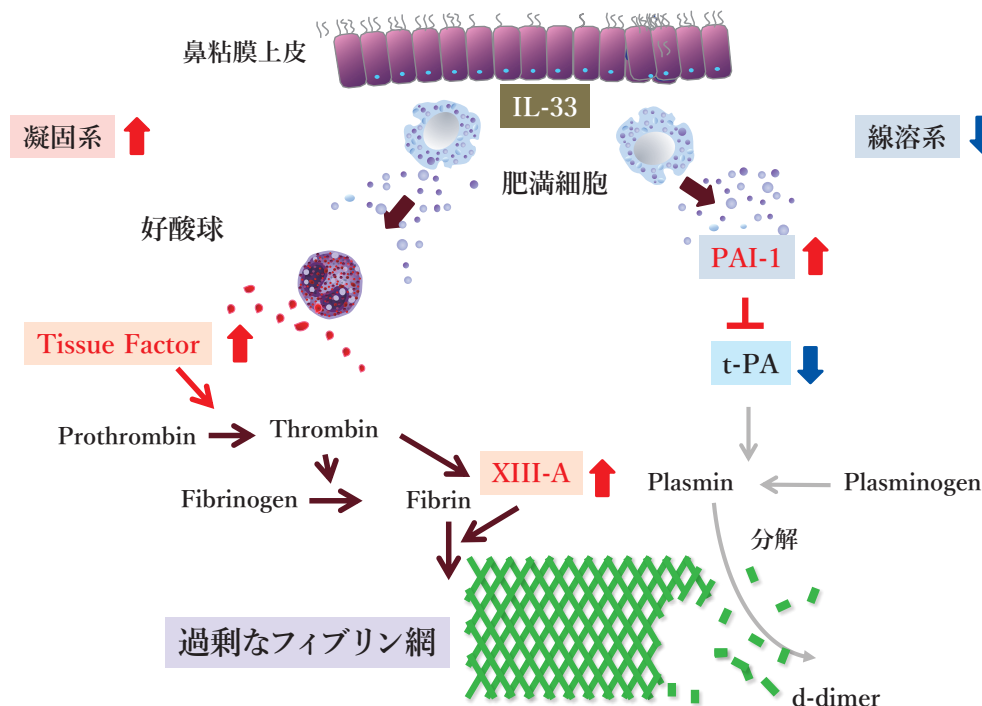


図4. 凝固系亢進と線溶系抑制。

好酸球が関与して凝固系の亢進が起こり、それとともに線溶系抑制が起こり、過剰なフィブリン網が形成される。

て鼻腔内に存在する細菌特異的IgEができることも証明された<sup>16)</sup>。このことから、鼻茸はおそらく一定の条件下では複数の細菌によって形成されると推測される。

IgEは獲得免疫系の中で、Th2環境下で起こる。一方で、自然免疫系では、上皮系サイトカインとILC-2によるTh2サイトカインにて起こる。現在はこの2つのTh2サイトカインで起こる炎症のことをType 2炎症と呼ぶようになった。

## フィブリンと好酸球性副鼻腔炎

好酸球性副鼻腔炎鼻茸においては過剰なフィブリン網が形成されていることを当科の高林が見い出した<sup>21) 22)</sup>。フィブリン網は組織の創傷治癒過程で起こり炎症細胞の浸潤を誘導するが、通常は数日でフィブリン網が分解され浮腫が改善する。しかし好酸球性副鼻腔炎の鼻茸においては、フィブリン網の

代謝をコントロールする凝固系・線溶系の異常が病態形成に関与していると思われる(図4)。前述した黄色ブドウ球菌は、血漿を凝固させるコアグラゼを産生するので、その影響があるのかもしれない。

## まとめ

現在CRSwNPの病態はType 2炎症が主体であるとされる。①好酸球の分化・増殖・遊走。組織浸潤、②B細胞のクラススイッチ、③バリア機能の破綻、④杯細胞の過形成と粘液の過剰産生、⑤凝固系の亢進と線溶系の抑制による過剰なフィブリン網の形成が主たる病態であると考えられている。今回の宿題報告では、これらの内容に、いくつかのアプローチで病態の解明を行い、新規治療法の開発結果を報告する。

(藤枝 重治)

## 文献

- 1) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2019;68:403-412.
- 2) Stevens WW, Ocampo CJ, Berdnikovs S, et al. Cytokines in chronic rhinosinusitis. Role in eosinophilia and aspirin-exacerbated respiratory disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192:682-694.
- 3) Bachert C, Gevaert E. Advances in rhinitis and rhinosinusitis in 2015. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:1277-1283.
- 4) Okano M, Fujiwara T, Haruna T, et al. Prostaglandin E(2) suppresses staphylococcal enterotoxin-induced eosinophilia-associated cellular responses dominantly through an E-prostanoid 2-mediated pathway in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:868-874.
- 5) Higaki T, Okano M, Fujiwara T, et al. COX/PGE(2) axis critically regulates effects of LPS on eosinophilia-associated cytokine production in nasal polyps. *Clin Exp Allergy.* 2012;42:1217-1226.
- 6) Satorres SE, Alcaráz LE, Cargnelutti E, et al. IFN-gamma plays a detrimental role in murine defense against nasal colonization of *Staphylococcus aureus*. *Immunol Lett.* 2009;123:185-188.
- 7) Lan F, Zhong H, Zhang N, et al. IFN- $\lambda$ 1 enhances *Staphylococcus aureus* clearance in healthy nasal mucosa but not in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:1416-1425.
- 8) Stentzel S, Teufelberger A, Nordengrün M, et al. Staphylococcal serine protease-like proteins are pacemakers of allergic airway reactions to *Staphylococcus aureus*. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:492-500.
- 9) Teufelberger AR, Nordengrün M, Braun H, et al. The IL-33/ST2 axis is crucial in type 2 airway responses induced by *Staphylococcus aureus*-derived serine protease-like protein D. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:549-559.
- 10) Kimura MY, Hayashizaki K, Tokoyoda K, et al. Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-Myl9 system in the pathogenesis of airway inflammation. *Immunol Rev.* 2017;278:87-100.
- 11) Lan F, Zhang N, Holtappels G, et al. *Staphylococcus aureus* induces a mucosal type 2 immune response via epithelial cell-derived cytokines. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198:452-463.

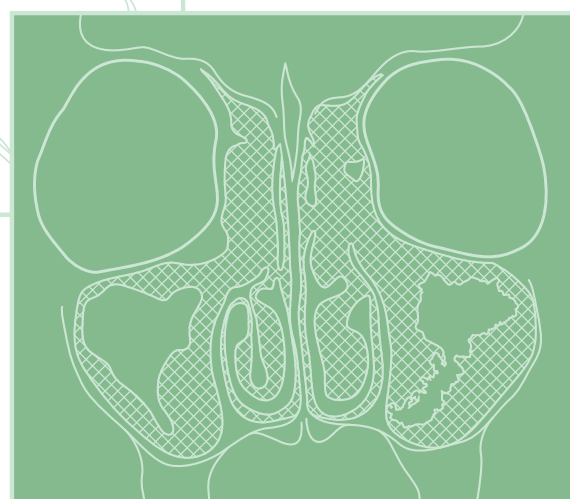
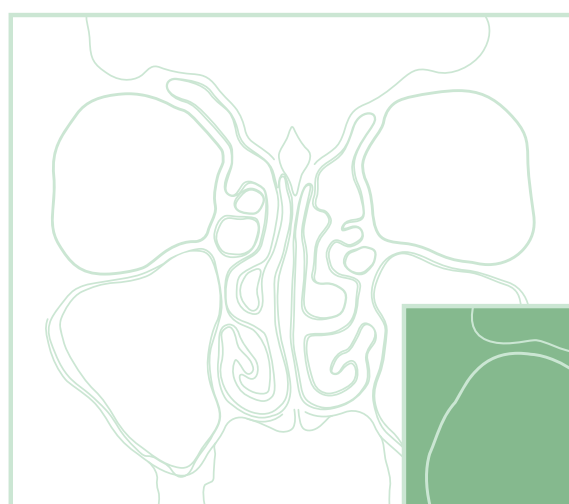
- 12) Altunbulakli C, Costa R, Lan F, et al. Staphylococcus aureus enhances the tight junction barrier integrity in healthy nasal tissue, but not in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142:665-688.
- 13) Valera FCP, Ruffin M, Adam D, et al. Staphylococcus aureus impairs sinonasal epithelial repair: Effects in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:591-603.
- 14) Bachert C, Holtappels G, Merabishvili M, et al. Staphylococcus aureus controls interleukin-5 release in upper airway inflammation. *J Proteomics.* 2018; 180:53-60.
- 15) **Fujieda S, Diaz-Sanchez D, Saxon A. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces In vivo IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19:507-512.**
- 16) Takeda K, Sakakibara S, Yamashita K, et al. Allergic conversion of protective mucosal immunity against nasal bacteria in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 143:1163-1175.
- 17) **Fujieda S, Saxon A, Zhang K. Direct evidence that gamma 1 and gamma 3 switching in human B cells is interleukin-10 dependent. *Mol Immunol.* 1996; 33:1335-1343.**
- 18) **Fujieda S, Lin YQ, Saxon A, et al. Multiple types of chimeric germ-line Ig heavy chain transcripts in human B cells: evidence for trans-splicing of human Ig RNA. *J Immunol.* 1996;157:3450-3459.**
- 19) **Fujieda S, Waschek JA, Zhang K, et al. Vasoactive intestinal peptide induces S(alpha)/S(mu) switch circular DNA in human B cells. *J Clin Invest.* 1996; 98:1527-1532.**
- 20) **Fujieda S, Zhang K, Saxon A. IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells gamma subclass-specific isotype switch: switching to gamma 1, gamma 3, and gamma 4, but not gamma 2. *J Immunol.* 1995;155:2318-2328.**
- 21) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.
- 22) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:584-592.





## 第2章

# 臨床マーカー





## 2-1

# 好酸球性副鼻腔炎のバイオマーカーとしてのペリオスチンについて

## サマリー

好酸球性副鼻腔炎の診断基準には、CT所見、鼻茸の有無、合併症の有無といったかなり曖昧で主観的な項目も含まれている。そのため、客観的なバイオマーカー確立のため次世代シーケンサーによる検討を行い、鼻茸ではペリオスチンが最も発現していることが判明した。鼻茸組織中では粘膜下に発現し、血清中では好酸球性副鼻腔炎が重症化するほど高値を示し、術後の予後因子になりえた。今後診断基準に加えることが可能であるか検討している。

## はじめに

好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis; ECRS) は、嗅覚障害と多発性鼻茸を特徴とし、鼻茸組織中には強い好酸球浸潤が認められる、難治性、再発性の高い副鼻腔炎である。その診断基準は、2015年に Japanese Epidemiological Survey of Refractory Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis Study (JESREC study)<sup>1)</sup>により作成され、現在では全国に広く浸透して診断されるようになった。しかし、この診断基準内にはCT所見や鼻茸の有無といった主観的な項目も一部に含まれており、診断に迷う症例も存在することから、客観的なバイオマーカーが必要とされるようになってきた。

次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンスは、目的とするサンプルのRNAの配列データを網羅的に解析する手法であり、大量のRNA発現の定量化を実現することが可能である。マイクロアレイと比較した利点として、幅広いダイナミックレンジがあること、バックグラウンドが少ないこと、あらかじめ解析するターゲットを決める必要がないことなどがあげられ、新規のバイオマーカー探索に適している。本研究では、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンスを行い、鼻茸中に発現する遺伝子を解析した。その結果、ペリオスチン遺伝子が鼻茸中に最も強く発現していたので着目した。ペリオス

チンはType 2炎症を強く反映するバイオマーカーとして報告されており、気管支喘息やアトピー性皮膚炎で有用であるといわれている<sup>2) 3)</sup>。好酸球性副鼻腔炎もType 2炎症優位の疾患と考えられており、これらの疾患同様にバイオマーカーとして使用できるかもしれない。

また、ペリオスチンはC末端側に選択的splicing領域を持ち、現在8種類のisoformが報告されている<sup>4)</sup>。しかしながら、鼻副鼻腔領域でヒトサンプルを用いてのペリオスチンisoformの解析報告はなく、isoformの機能や、臓器特異性・疾患特異性などについては全くわかっていない。本研究では3種類の抗体を使用し、慢性副鼻腔炎鼻茸におけるペリオスチンのisoformの発現量を比較検討する。

## 実験方法

### 診断

JESRECの診断基準を用いて、好酸球性副鼻腔炎の診断を行った<sup>1)</sup>。内視鏡下鼻副鼻腔手術の術後に、28日以上中鼻道ポリープや膿性鼻汁が継続する状態を術後再発と定義した。

### RNA シーケンス

6例の慢性副鼻腔炎患者 (non-ECRS 2例, moderate ECRS 3例, severe ECRS 1例) から採取し

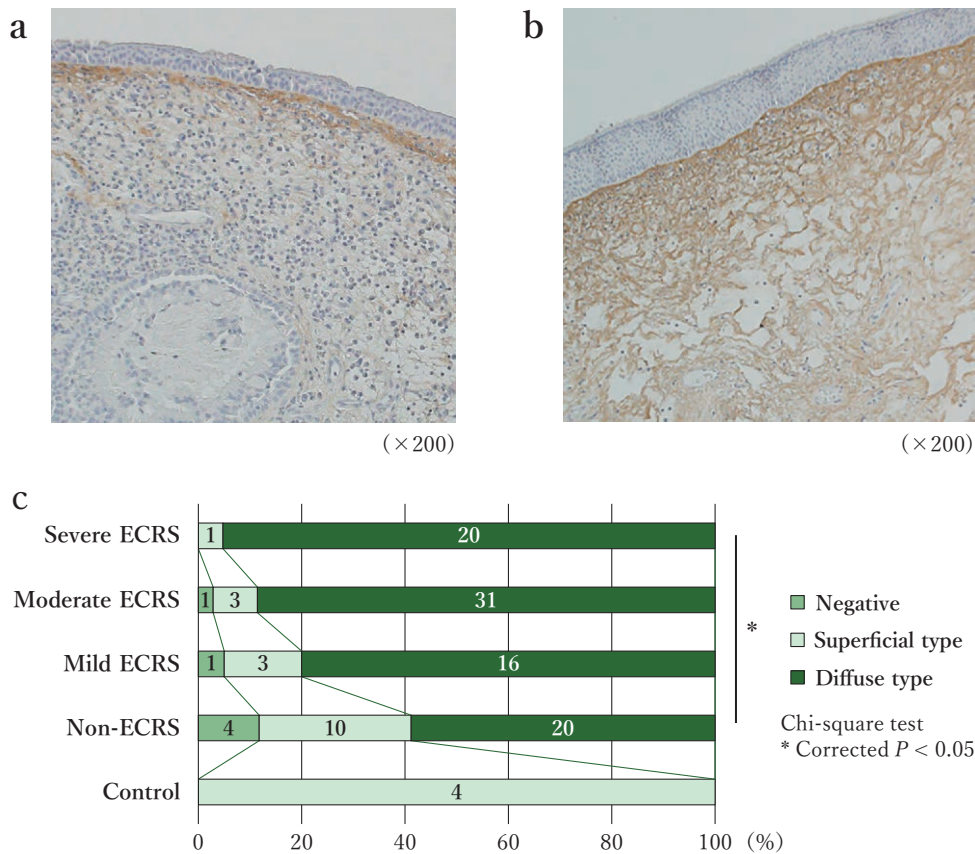


図1. a) 上皮直下のみにペリオスチンの発現を認める (superficial type). b) 粘膜下にびまん性にペリオスチンの発現を認める (diffuse type). c) 鼻茸組織のペリオスチン免疫組織化学. 重症度が高いほど diffuse type が多く認められ, non-ECRS と severe ECRS 間で統計学的有意差を認めた.

た鼻茸, および同一患者から採取した下鼻甲介粘膜を使用して RNA シークエンスを行った. Total RNA を抽出し, TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を使用してサンプルの調製を行った<sup>5)</sup>. Illumina HiSeq 2000 でシークエンスを行い, TopHat 2.0.14 を用いて human reference genome (hg19) にマッピングを行った. 発現量は edgeR を用いて Fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments (FPKM) として算出した.

### 免疫組織化学

110 例の慢性副鼻腔炎鼻茸 (non-ECRS 34 例, mild ECR 20 例, moderate ECRS 35 例, severe ECRS 21 例) を使用して免疫組織化学を行った. コントロールとして 4 人の慢性副鼻腔炎およびアレルギー性鼻炎を既往に持たない患者から, 頭蓋底手術の際に摘出した鉤状突起粘膜を用いた<sup>5)</sup>. 一次抗体とし

て 0.2  $\mu\text{g/ml}$  の mouse anti-POSTN monoclonal antibody (clone SS19C) を使用し, 二次抗体として HRP+anti-rabbit/mouse IgG secondary antibody (EnVision Dako, Glostrup, Denmark) を使用した. ペリオスチンの染色強度による判定は Shiono らの報告を基準とし, 上皮直下のみに発現が認められる群 (superficial type) と, 粘膜下組織にびまん性に発現が認められる群 (diffuse type) に分類して判定した (図1)<sup>5) 6)</sup>. Isoform の検討は 92 症例の慢性副鼻腔炎鼻茸 (non-ECRS 43 例, mild ECR 13 例, moderate ECRS 25 例, severe ECRS 11 例) を使用した. 選択的 splicing により deletion となる exon の前後を標識する抗体を 3 種類設計し (配列非公開), その染色強度から 4 種類の isoform (isoform 1; NP\_006466.2, isoform 2; NP\_001129406.1, isoform 4; NP\_001273594.1, isoform 8; NP\_001317446.1) の判定を行った.

## ELISA

369例の慢性副鼻腔炎患者 (non-ECRS 122例, mild ECR 64例, moderate ECRS 116例, severe ECRS 67例) の術前に採取した血清を使用し, POSTN ELISA Kit (Human) (Shino-test, Tokyo, Japan) を用いてペリオスチン蛋白の定量を行った<sup>5)</sup>。

## 統計解析<sup>5)</sup>

免疫組織化学の群間比較はカイ二乗検定の後に Bonferroni補正を行った。Isoformの統計学的解析は, severe ECRSと moderate ECRS以下をまとめた群を比較対象として, Fisherの正確確率検定を行った。血清ペリオスチンの群間比較には Steel-Dwass法による多重比較を行った。相関関係の検討は Spearmanの順位相関係数を使用した。ROC曲線によるカットオフの最適値の算出は closest point to top-left法を使用した。P<0.05を統計学的有意とした。

## 結果

### RNA シークエンスによる発現解析<sup>5)</sup>

慢性副鼻腔炎鼻茸における発現量を, 同一患者の下鼻甲介粘膜をコントロールとして比較解析した。

全体で16,048遺伝子が検出され, 3,574遺伝子が統計学的有意差を認めた。鼻茸で優位に発現が高かった遺伝子 (fold change >2) は1,264遺伝子であり, 優位に発現が低かった遺伝子 (fold change <0.5) は899遺伝子であった。それぞれ代表的な遺伝子を表1に示す。

## 免疫組織化学

ペリオスチンの染色強度は Shionoらの報告を基準として, 図1のように判定した。コントロール粘膜は全て上皮下にペリオスチンの発現を認める superficial typeであった。重症の副鼻腔炎症例で多く認められると報告されている diffuse typeは, non-ECRSでは34例中20例 (58.8%) に認められ, severe ECRSでは21例中20例 (95.2%) に認められた。Non ECRSと severe ECRS間に統計学的有意差を認めた (図1c, P=0.037)。

さらに, 3種類の抗体を使用することにより, 4種類の isoform (isoform 1; NP\_006466.2, isoform 2; NP\_001129406.1, isoform 4; NP\_001273594.1, isoform 8; NP\_001317446.1) の判定を行った。Severe ECRSでは11例中8例 (72.7%) が isoform 2に判定され, moderate ECRS以下の群 (81例中31

表1. RNA シークエンスで鼻茸中の発現が有意に亢進もしくは低下した遺伝子。

遺伝子名	調整P値 (FDR)	発現比 (対数)	鼻茸中発現量 (FPKM)	下鼻甲介中発現量 (FPKM)
<b>発現亢進</b>				
POSTN	3.58×10 <sup>-3</sup>	3.11	7.98×10 <sup>2</sup>	4.96×10
ALOX15	2.21×10 <sup>-2</sup>	3.07	6.34×10 <sup>2</sup>	8.02×10
CST1	2.26×10 <sup>-2</sup>	4.77	6.29×10 <sup>2</sup>	8.53
SERPINB3	6.41×10 <sup>-3</sup>	2.90	5.45×10 <sup>2</sup>	1.31×10 <sup>2</sup>
CCL18	1.07×10 <sup>-9</sup>	6.83	3.94×10 <sup>2</sup>	9.27×10 <sup>-1</sup>
<b>発現低下</b>				
BPIFA1	9.77×10 <sup>-3</sup>	-3.01	4.13×10 <sup>3</sup>	2.66×10 <sup>4</sup>
SLPI	2.63×10 <sup>-5</sup>	-2.16	3.00×10 <sup>3</sup>	1.11×10 <sup>4</sup>
BPIFB1	1.12×10 <sup>-3</sup>	-2.74	2.02×10 <sup>3</sup>	1.18×10 <sup>4</sup>
STATH	7.96×10 <sup>-11</sup>	-10.8	9.14×10 <sup>2</sup>	6.71×10 <sup>4</sup>
LTF	7.28×10 <sup>-8</sup>	-4.47	8.27×10 <sup>2</sup>	6.92×10 <sup>3</sup>

それぞれ鼻茸中発現量が高値または低値であった上位5番目までの遺伝子を示す。FDR; false discovery rate, FPKM; fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments.



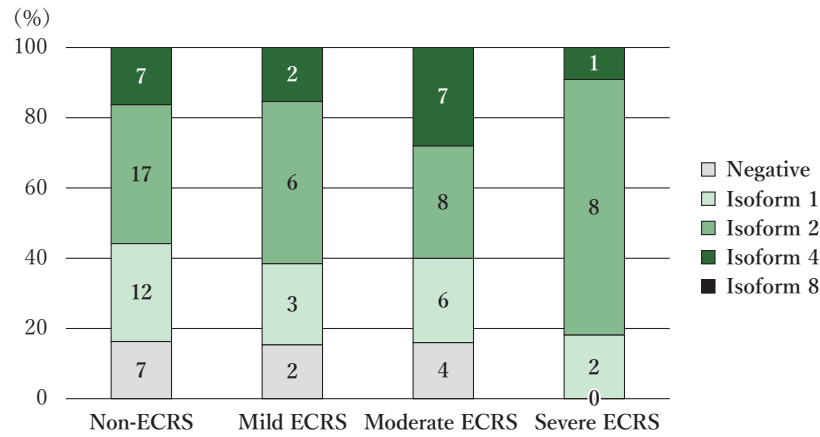


図2. 鼻茸組織におけるペリオスチン isoform の発現.

Severe ECRSでは, moderate ECRS 以下の群と比較して isoform 2 の発現が優位に多かった( $P=0.048$ ). 全ての群において, isoform 8 に判定される症例は認めなかった.

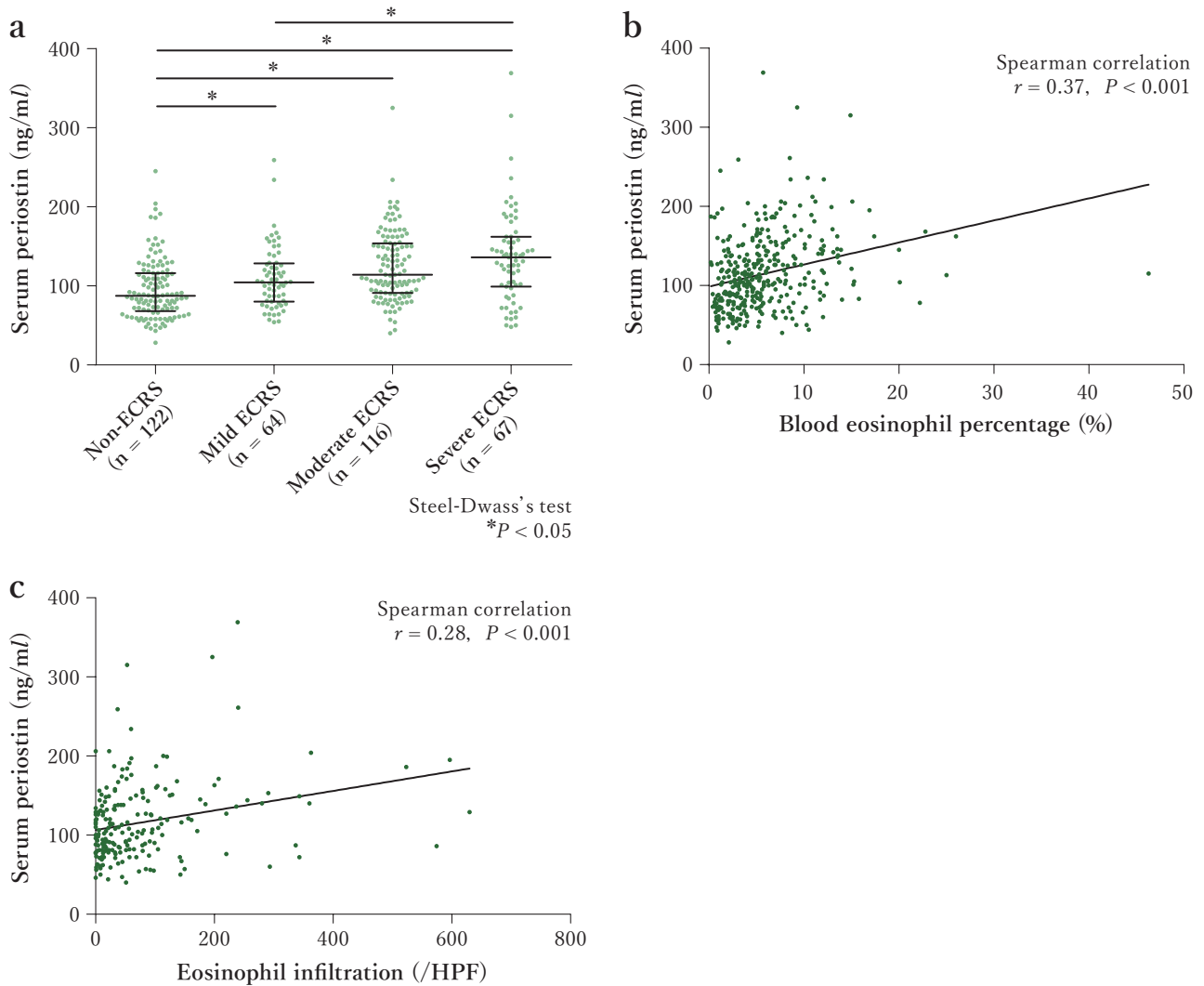


図3. a) 好酸球性副鼻腔炎の重症度別の血清ペリオスチン値. b) 血清ペリオスチン値と末梢血好酸球値との相関. c) 血清ペリオスチン値と組織中好酸球数との相関.

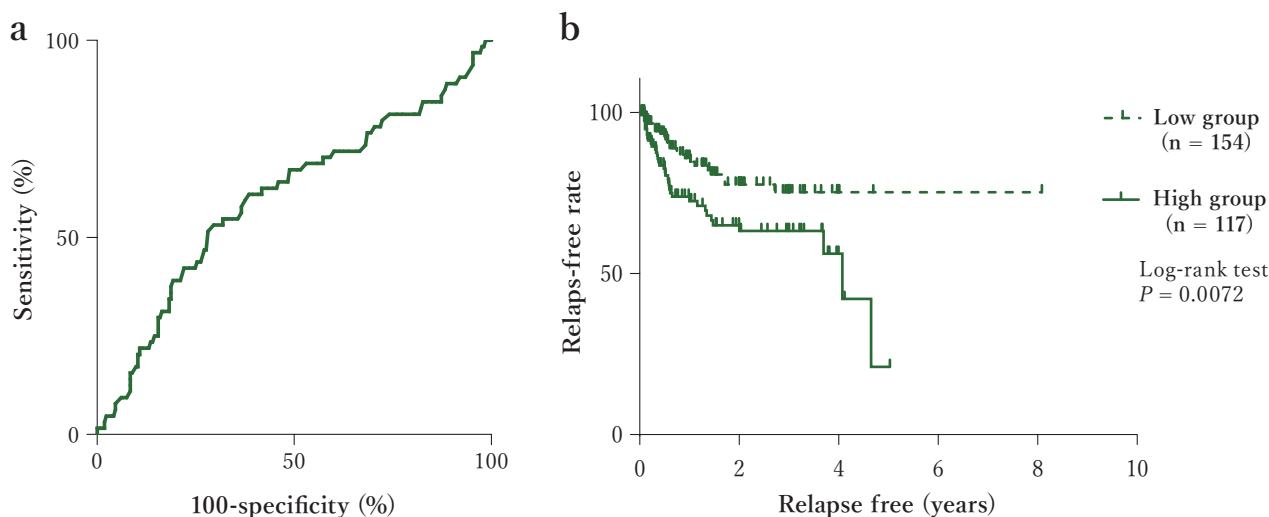


図4. a) 術後再発に対するROC曲線. 血清ペリオスチン値を独立変数, 術後再発を従属変数と設定した (a, AUC 0.595, 標準誤差0.044, 95%CI 0.509~0.681). Closest to topleftの方法でカットオフ値の最適値を算出したところ, 115.5 ng/mlであった (感度60.7%, 特異度61.9%). b) 血清ペリオスチン値115.5 ng/mlをカットオフとした二群の術後再発率についてのKaplan-Meier曲線. Log-rank testで二曲線間に有意差が認められた ( $P=0.0072$ ).

例, 38.3%) と比較して優位に多かった (図2,  $P=0.048$ ). 全ての群で isoform 8 に判定される症例は認めなかった。

### ELISA による血清ペリオスチンの測定

血清ペリオスチンの中央値 (括弧内は範囲) は, non-ECRS 87.5 (28~245) ng/ml, mild ECRS 104.5 (54~259) ng/ml, moderate ECRS 114 (40~325) ng/ml, severe ECRS 136 (48~369) ng/mlであった (図3a). 副鼻腔炎の重症度が上がるにつれて, 血清ペリオスチンは有意に上昇した ( $P<0.05$ ). また, 血清ペリオスチンは, 末梢血好酸球率 (図3b,  $P<0.001$ ) および組織中好酸球数 (図3c,  $P<0.001$ ) と有意な正の相関を示した. 次に血清ペリオスチン値を独立変数, 術後再発を従属変数と設定し, ROC曲線を作成した (図4a, AUC 0.595, 標準誤差0.044, 95%CI 0.509~0.681). このとき, closest to topleftの方法でカットオフ値の最適値を算出したところ, 115.5 ng/mlであった (感度60.7%, 特異度61.9%). さらに, このカットオフ値を用いて二群に分類し, 術後再発率についてのKaplan-Meier曲線を作成した. このとき, log-rank testで二曲線を比較すると有意差が認められた (図4b).

### 考察 5)

慢性副鼻腔炎鼻茸を使用しRNA sequenceを行ったところ, 鼻茸中で有意に発現が亢進している遺伝子の中で, 最も発現量が高値であった遺伝子はペリオスチン遺伝子 (POSTN) であった. ペリオスチンは分子量90 kDaのファシクリンファミリーに属する細胞外マトリックスタンパクであり, 鋭敏なType 2型炎症のバイオマーカーとされている<sup>2)3)</sup>. 慢性副鼻腔炎鼻茸組織中においてもペリオスチンの存在が報告されているが, 本邦における好酸球性副鼻腔炎の診断基準が作成される以前の報告であり, 臨床的な重症度との検討は行われていない<sup>6)</sup>. 本研究では, JESRECの診断基準を用いて分類を行い, ペリオスチンの発現強度と重症度の比較を行った. その結果, 好酸球性副鼻腔炎の重症度が上昇するほどペリオスチンは粘膜下組織にびまん性に発現 (diffuse type) しており, ペリオスチンの発現が好酸球性副鼻腔炎の難治性と関連していることが示唆された.

ペリオスチンはC末端側に選択的splicing領域を持ち, 現在8種類の isoformが報告されている<sup>4)</sup>. しかしながら, ヒトサンプルを使用した報告はごく少数であり<sup>7)~12)</sup>, isoformの機能や, 臓器特異性・疾

患特異性などについては不明な点が多い。今回、重症の好酸球性副鼻腔炎鼻茸中には、isoform 2が最も多く認められた。一方、比較的軽症の副鼻腔炎でも isoform 2が発現している症例が多く、鼻茸の形成そのものに isoform 2が強く関わっている可能性が考えられる。

好酸球性副鼻腔炎のバイオマーカーとして使用するためには、血清を用いた測定系が実用化されやすい。そこで、369症例の慢性副鼻腔炎患者の手術前に採取した血清を用いて、ペリオスチンの定量をELISAで行った。好酸球性副鼻腔炎の重症度が上がるにつれて、血清ペリオスチンも優位に上昇していた。血清ペリオスチンが慢性副鼻腔炎患者で上昇している報告が認められるが、それらはいずれも、鼻茸を伴う副鼻腔炎と伴わない副鼻腔炎の鑑別<sup>13) 14)</sup>や、喘息患者内で副鼻腔炎を合併するかどうかで検討されている<sup>15)</sup>。鼻茸や慢性副鼻腔炎の合併の有無であれば、鼻副鼻腔内視鏡で観察することで診断可能であるため、より臨床的価値が高い項目をアウトカムと設定する必要がある。そこで着目したのが術後再発である。好酸球性副鼻腔炎の最も重要な問題の一つとして、高い術後再発率があげられ、JESREC studyでは、中等症以上の好酸球性副鼻腔炎はKaplan-Meier法により術後6年で50%以上の症例で再発が認められた<sup>1)</sup>。本研究でも同様に、術後再発を術後1か月以上経過している状態で、その後1か月以上中鼻道の鼻茸または膿性鼻汁が継続する状態と定義し、血清ペリオスチン値との検討を行った。血清ペリオスチン値を独立変数、術後再発を従属変数と設定したROC曲線を作成し、closest to topleftの方法でカットオフ値の最適値を算出したところ115.5 ng/mlであり、このときの、感度と特異度はそれぞれ60.7%、61.9%であった。さらに、このカットオフ値を用いて二群に分類し、術後再発率についてのKaplan-Meier曲線を作成した。このとき、log-rank testで二曲線を比較すると有意差が認められており、血清ペリオスチンが術後再発に対するバイオマーカーとして有用であることが示された。

最近では、慢性副鼻腔炎の治療前にendotypingを行い、治療の方針を決定することが必要であろうと提唱されている<sup>16) 17)</sup>。すなわち、Th2型の鼻茸と非Th2型の鼻茸では、鼻副鼻腔内視鏡手術後、異なった治療を行うというものである。JESRECの診断基準に加えて、血清ペリオスチンでType 2炎症の程度を術前に評価することにより、このような治療アルゴリズムに沿った個別化医療が提供できると考えられる。

好酸球性副鼻腔炎を含めた慢性副鼻腔炎の治療によって、血清ペリオスチンがどのように変動するかについては、現在まだ報告が少ない。Schryverらは、doxycycline, methylprednisolone, mepolizumab (抗IL-5抗体), omalizumab (抗IgE抗体)による治療後の、血清ペリオスチンと鼻汁中ペリオスチンの変動について報告している<sup>18)</sup>。Methylprednisoloneの投与後4週後に、ポリープスコアや症状スコアなどとともに、有意な血清ペリオスチンの低下を認められたが、投与後8週の時点では、それらの再上昇が認められた。またmepolizumabおよびomalizumabの投与後8週後に、有意に血清ペリオスチンおよび鼻汁中ペリオスチンの低下を認め、このときのポリープスコア、症状スコアともに有意な減少を認めていた。しかし、doxycyclineの投与後、血清ペリオスチンは軽度の低下のみにとどまっておき、このときのポリープスコアや症状スコアも軽度の低下であった。このことから、血清ペリオスチンは少なくとも数週間以内の病勢を反映するバイオマーカーとして使用可能であると推定される。これまで治療後の病勢を評価する項目としては、鼻副鼻腔内視鏡検査によるポリープスコア、およびアンケート調査による症状スコアなど、客観的でない項目で評価せざるを得ない状態であったが、血清ペリオスチンの測定により客観的に評価ができるようになると考えられる。将来的には、治療後のポリープスコアや症状スコアなどとともに、血清ペリオスチンの上昇が認められる症例に対しては、分子標的薬の治療の適応を考慮する、などの使用方法が有用であると考えられる。  
(二之宮貴裕)

## 文献

- 1) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. **Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. Allergy. 2015; 70(8):995-1003.**
- 2) Kou K, Okawa T, Yamaguchi Y, et al. Periostin levels correlate with disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2014; 171(2):283-291.
- 3) Izuhara K, Ohta S, Ono J. Using Periostin as a Biomarker in the Treatment of Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2016;8(6):491-498.
- 4) Gadermaier E, Tesarz M, Suci A-M, et al. Characterization of a sandwich ELISA for the quantification of all human periostin isoforms. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(2):e22252.
- 5) **Ninomiya T, Noguchi E, Takenori H, et al. Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Sci Rep. 2018;8(1):11450.**
- 6) Shiono O, Sakuma Y, Komatsu M, et al. Differential expression of periostin in the nasal polyp may represent distinct histological features of chronic rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx.* 2015;42(2):123-127.
- 7) Cai L, Brophy RH, Tycksen ED, et al. Distinct expression pattern of periostin splice variants in chondrocytes and ligament progenitor cells. *FASEB J.* 2019; 33(7):8386-8405.
- 8) Yamada S, Tauchi T, Awata T, et al. Characterization of a Novel Periodontal Ligament-specific Periostin Isoform. *J Dent Res.* 2014;93(9):891-897.
- 9) Morra L, Rechsteiner M, Casagrande S, et al. Characterization of periostin isoform pattern in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2012;76(2):183-190.
- 10) Bai Y, Nakamura M, Zhou G, et al. Novel isoforms of periostin expressed in the human thyroid. *Japanese Clin Med.* 2010;1:JCM.S5899.
- 11) Morra L, Rechsteiner M, Casagrande S, et al. Relevance of Periostin Splice Variants in Renal Cell Carcinoma. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1513-1521.
- 12) Litvin J, Selim A-H, Montgomery MO, et al. Expression and function of periostin-isoforms in bone. *J Cell Biochem.* 2004;92(5):1044-1061.
- 13) Maxfield AZ, Landegger LD, Brook CD, et al. Periostin as a biomarker for nasal polyps in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Neck Surg.* 2018;158(1): 181-186.
- 14) Jonstam K, Westman M, Holtappels G, et al. Serum periostin, IgE, and SE-IgE can be used as biomarkers to identify moderate to severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 140(6):1705-1708.e3.
- 15) Asano T, Kanemitsu Y, Takemura M, et al. Serum periostin as a biomarker for comorbid chronic rhinosinusitis in patients with asthma. *Ann Am Thorac Soc.* 2017;14(5):667-675.
- 16) Kim D-K, Kang S Il, Kong IG, et al. Two-track medical treatment strategy according to the clinical scoring system for chronic rhinosinusitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018;10(5):490.
- 17) Bachert C, Zhang N, Hellings PW, et al. Endotype-driven care pathways in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(5):1543-1551.
- 18) de Schryver E, Derycke L, Calus L, et al. The effect of systemic treatments on periostin expression reflects their interference with the eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinol J.* 2017;55(2):152-160.



## 2-2

## 好酸球性副鼻腔炎患者における鼻腔 NO (nasal NO) の測定意義と可能性

### サマリー

好酸球性副鼻腔炎 (E CRS) は診断基準が確立し、疾患概念が浸透してきているが、いまだバイオマーカーが確立されていない。同じ Type 2 気道炎症である気管支喘息では、FeNO 値が重要な臨床マーカーとされている。そこで、非侵襲的かつ簡便に測定可能な nasal NO 値に着目したところ、E CRS では nasal NO 値が有意に低く、末梢血中、組織中の好酸球数と逆相関関係であった。また、NO 低値は鼻茸形成に関与すると考えられるため、E CRS のバイオマーカーとして nasal NO 値が有用であると考える。

### はじめに

好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis; E CRS) と気管支喘息は、炎症の首座が上気道か下気道かで異なるが、いずれも Type 2 炎症を主体とした好酸球性アレルギー性気道炎症である<sup>1)2)</sup>。E CRS において、気管支喘息の合併は、難治再発に関わるリスクファクターの一つである<sup>1)3)</sup>。気管支喘息患者では、呼気中一酸化窒素 (fractional exhaled nitric oxide; FeNO) 値が上昇することが知られているが、吸入ステロイドで治療を行うと、FeNO 値は速やかに低下する<sup>4)</sup>。そのことから FeNO 値は、気管支喘息の病態を反映する重要なバイオマーカーとされている<sup>5)~7)</sup>。

気道において、最も主要な NO 産生源は副鼻腔である<sup>8)</sup>。副鼻腔で産生された NO (nasal NO) は、気道局所における生体防御や副鼻腔の恒常性維持に重要な役割を果たしている。実際、嚢胞性線維症 (cystic fibrosis) や原発性線毛運動不全症患者では、nasal NO 値が低いほど気道感染への感受性が高いことが報告されている<sup>9) 10)</sup>。これは、nasal NO が線毛運動の調節に関与するため、nasal NO 値が低いと上気道における粘膜の線毛運動機能が抑制されるからと考えられる<sup>11)</sup>。さらに、nasal NO は下気道に作用し、動脈酸素分圧を上げ、肺血管抵抗を下げる

ことで、心肺機能の調節にも関与していることが報告されている。このように、nasal NO は上気道だけでなく、下気道に対しても重要な保護的機能を果たしていると考えられている<sup>12)</sup>。

Nasal NO の測定は非侵襲的かつ簡便に行うことが可能である。我々は、気管支喘息と同様に、E CRS において nasal NO 値が病勢を反映する臨床マーカーとなる可能性を考え、本研究を行った。

### 方法

#### 研究対象とサンプル

福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で、慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis; CRS) に対して初めて内視鏡下鼻副鼻腔手術 (endoscopic sinus surgery; ESS) を行った、E CRS 患者 25 人、non-E CRS 患者 45 人、鼻副鼻腔に疾患を持たないボランティア 33 人を control として比較検討を行った。ESS を行った患者は、少なくとも術前 4 週間はステロイドの局所あるいは全身投与を行わなかった。同施設の倫理委員会の承認を得た後、全ての研究対象者に対してインフォームドコンセントをとった。

ESS を行った患者から採取した血液サンプルを用いて、全血球数に対する好酸球数の割合を算出した。また、ESS で採取した篩骨洞粘膜や鼻茸組織サンプル



ルからはパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った後、異なる3か所において好酸球数のカウントを行い、その平均が顕微鏡400倍視野において70個/1視野以上となるものを、組織学的に ECRS と定義した<sup>13)</sup>。

撮影された副鼻腔CTは、Lund-Mackay score (CTスコア) に基づいて評価を行った<sup>14)</sup>。また、鼻茸は大きさに従い0~4の5段階(0:鼻茸なし, 1:中鼻甲介の下端に達しない鼻茸, 2:中鼻甲介の下端を越える鼻茸, 3:下鼻甲介の下端に達する鼻茸, あるいは嗅裂の鼻茸, 4:鼻腔を閉塞する鼻茸) に分類し、スコア化した(鼻茸スコア)<sup>15) 16)</sup>。

## Nasal NO の測定

American Thoracic Society/European Respiratory Societyのガイドラインに基づいて、Sievers Nitric Oxide Analyzer (NOA 280i; GE Analytical Instrument) を用いて、口呼気中のNO (oral FeNO) と鼻呼気中のNO (nasal FeNO) を測定した。Nasal FeNO値からoral FeNO値を引いた値をnasal NO値とし、下気道由来のNOの影響を受けていない上気道由来のNOと考えて検討を行った<sup>17)</sup>。ESS前後でnasal NOを測定し、術前の病勢とnasal NO値との関係を調べるとともに、nasal NO値の術後変化の検討を行った。

## 鼻腔通気度の測定

鼻腔通気度は、鼻腔通気度計 (RHINORHEOGRAPH

MPR-3100, NIHON KOHDEN) を用いて、アンテリオール法で片側ずつ測定した。日本鼻科学会が提唱する鼻腔通気度測定法 (Rhinomanometry) ガイドラインに従い、 $\Delta P$  100Pa点での抵抗値を評価に用い、使用単位はPa/cm<sup>3</sup>/secとした。両側鼻腔抵抗値はオームの法則により計算した。

## 統計解析

全てのデータはmean±SEMで表されている。各群間の比較はKruskal-Wallis ANOVA with Dunnett post hoc testing and Mann-Whitney U testを用いて検討した。繰り返し測定されたデータの分析には、Friedman test with post-hoc testingを用いた。相関はSpearman rank correlationを用いて解析を行った。P valueが0.05以下の場合有意差ありとした。

## 結果

### 研究対象の特徴

本研究では、ECRS患者25人、non-ECRS患者45人、正常control 33人の3群間で比較検討を行った。それぞれの臨床的な特徴を表1に示す。気管支喘息の合併 ( $P<0.001$ )、末梢血中好酸球の割合 ( $P<0.001$ )、鼻茸組織中好酸球数 ( $P<0.001$ )、CTスコア ( $P<0.01$ )、鼻茸スコア ( $P<0.001$ ) はいずれもECRS患者群で有意に高かった。一方、喫煙歴とアレルギー性鼻炎の合併はECRS患者群、non-ECRS患者群間で有意差を認めなかった。

表1. 研究対象者の特徴.

	正常 control	Non-ECRS	ECRS	
数	33	45	25	
年齢	37.7 ± 1.7 (25-53)	50.2 ± 2.6 (18-76)	54.8 ± 2.9 (32-77)	***
喫煙歴	—	14	3	ns
気管支喘息	—	3	11	***
アレルギー性鼻炎	—	22	11	ns
末梢血中好酸球 (%)	—	3.3 ± 0.3 (0.5-12.3)	7.7 ± 0.8 (2.1-17.8)	***
組織中好酸球数 (個/HPF)	—	8.1 ± 2.1 (0-66)	137.5 ± 16.8 (70-299)	***
CTスコア	—	8.6 ± 0.8 (1-24)	13.0 ± 1.3 (2-23)	**
鼻茸スコア	—	2.3 ± 0.4 (0-7)	4.2 ± 0.3 (2-8)	***

\*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$

## Nasal NO 値の検討

副鼻腔から産生されたNOを測定するために、nasal FeNO値からoral FeNO値を引いた値をnasal NO値とした。その結果、ECRS患者群では、他の2群と比較しnasal NO値が有意に低いことがわかった ( $P<0.001$ , 図1a)。一方、nasal FeNO値は3群間で統計学的な有意差を認めなかった。Oral FeNO値はECRS患者群で、他の2群と比較し有意に高かった ( $P<0.01$ )。ここで、下気道で産生されたNO (oral FeNO) 値がnasal NO値に影響を与えている可能性を除外するために、両者間の相関を調べたが、統計学的に有意な相関は認めなかった。このことから、nasal NO値とoral FeNO値とは独立した値であると考えられた (図1b)。また、ECRS患者群、non-ECRS患者群いずれにおいても、気管支喘息やアレルギー性鼻炎の合併の有無、喫煙の有無でnasal NO値に統計学的有意差を認めることはなかった (図1c)。

## Nasal NO 値と臨床所見との相関

我々はこれまでの研究で、末梢血中好酸球の割合と鼻茸組織中の好酸球数が、CRSにおける鼻茸の再発に深く関与していることを報告してきた<sup>1)13)</sup>。そこで、nasal NO値と末梢血中好酸球の割合との相関、nasal NO値と鼻茸組織中の好酸球数との相関を調べた。その結果、nasal NO値と末梢血中好酸球の割合との間には有意な負の相関を認めた ( $r=-0.2434$ ,  $P<0.05$ ) (図2a)。また、nasal NO値と鼻茸組織中の好酸球数との間にも有意な負の相関を認めた ( $r=-0.3652$ ,  $P<0.001$ ) (図2b)。

次に、nasal NO値とCTスコアとの相関を調べたところ、両者間には有意な負の相関が認められた ( $r=-0.4303$ ,  $P<0.001$ ) (図3a)。特にECRS患者群において、non-ECRS患者群と比較し、より強い負の相関を認めた (図3b, c)。

さらに、ECRSの特徴である巨大な鼻茸によって中鼻道の副鼻腔自然口が閉塞するためnasal NO値が低下するという可能性を除外するため、nasal NO

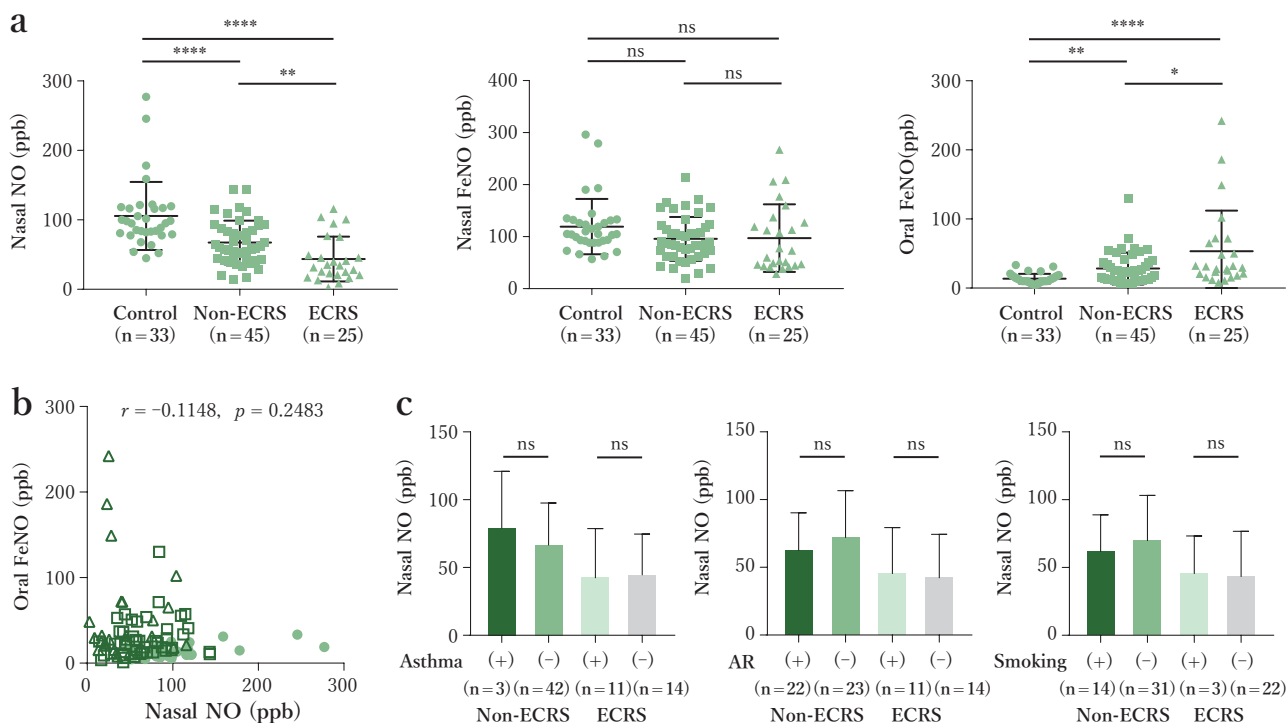


図1. CRS患者におけるnasal NO値。

(a) 正常control群 (n=33), non-ECRS患者群 (n=45), ECRS患者群 (n=25) におけるnasal NO値, nasal FeNO値, oral FeNO値。(b) nasal NO値とoral FeNO値との相関。▲ECRS ■non-ECRS ●正常control (c) 気管支喘息, アレルギー性鼻炎の合併の有無, 喫煙の有無によるnasal NO値の比較。\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

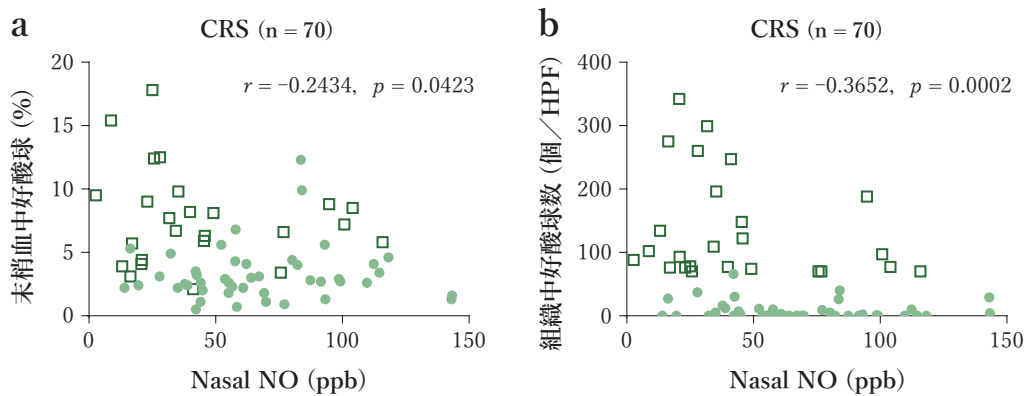


図2. (a) CRS患者 (n=70) における末梢血中好酸球の割合との相関. (b) CRS患者 (n=70) におけるnasal NO値と鼻茸組織中好酸球数との相関.

● non-ECRS, □ ECRS.

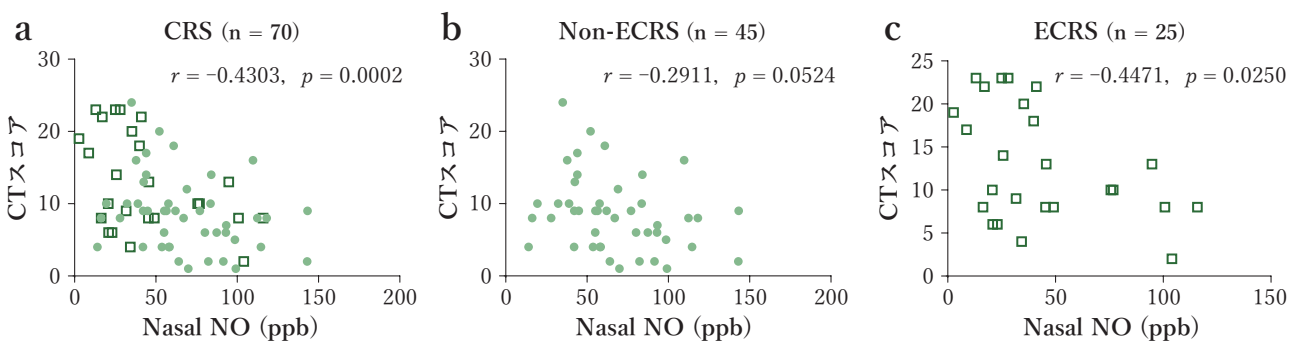


図3. (a) 全CRS患者 (n=70), (b) non-ECRS患者 (n=45), (c) ECRS患者 (n=25) におけるnasal NO値とCTスコアとの相関.

● non-ECRS, □ ECRS.

値と鼻腔通気度との相関, nasal NO値と鼻茸スコアとの相関を調べた. その結果, ECRS患者群, non-ECRS患者群ともに, nasal NO値と鼻腔通気度との間に有意な相関は認めなかった (図4a, b). また, nasal NO値と鼻茸スコアとの間も同様の結果であった (図4c~e).

### Nasal NO 値の術後変化

図5に術前と術後3か月, 術後6か月のnasal NO値の経時的変化を示す. ECRS患者群, non-ECRS患者群ともに, 術後全身あるいは局所ステロイド投与を行った症例が含まれていたが, ステロイド投与症例と非投与症例で, 術後nasal NO値に有意差は認めなかった. また, 術側の違いや術式の違いによる術後nasal NO値の違いはなかった. 術後6か月で

は, ECRS患者群, non-ECRS患者群ともに, 術前と比較しnasal NO値が徐々に上昇する傾向はあるものの, 統計学的な有意差のある上昇は認めなかった. 術後12か月になると, non-ECRS患者群では術前と比較しnasal NO値の有意な上昇を認めた. 一方で, ECRS患者群では術前と比較し統計学的な有意差のあるnasal NO値の上昇を認めなかった (data not shown).

### Nasal NO 値と JESREC score との相関

我々はJESREC scoreに基づき, ECRSの術前診断と重症度分類を行い, 難治性や術後再発の予測を行っている<sup>13)</sup>. そこで, nasal NO値とJESREC scoreとの相関を調べたところ, 両者は有意な負の相関を示した (図6).

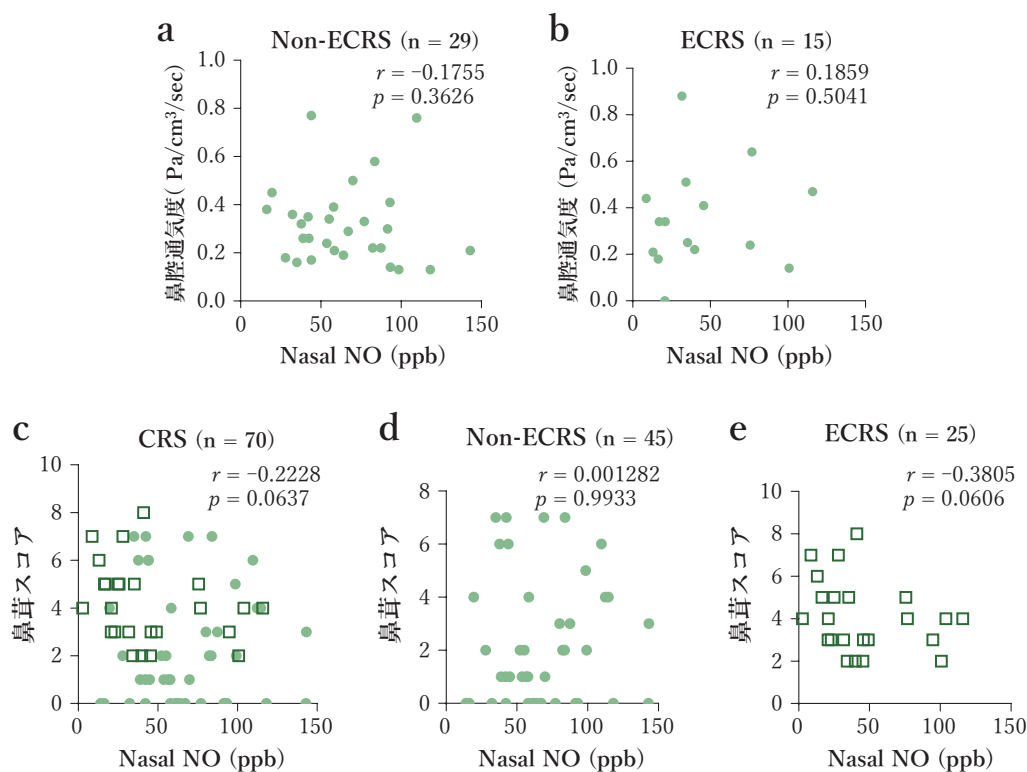


図4. (a) non-ECRS患者 (n=29), (b) ECRS患者 (n=15) における nasal NO 値と鼻腔通気度との相関. (c) 全 CRS 患者 (n=70), (d) non-ECRS 患者 (n=45), (e) ECRS 患者 (n=25) における nasal NO 値と鼻茸スコアとの相関.

● non-ECRS, □ ECRS.

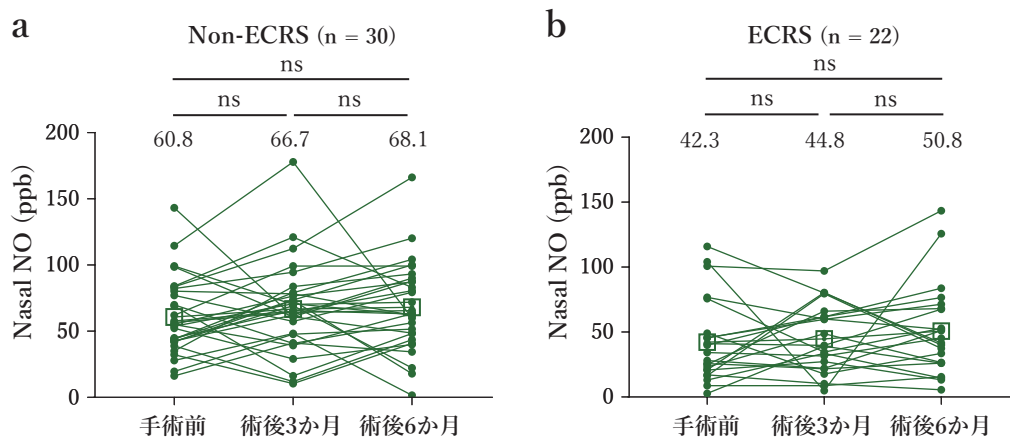


図5. (a) non-ECRS 患者 (n=30), (b) ECRS 患者 (n=22) における, 手術前, 術後3か月 (3 M), 術後6か月 (6 M) の nasal NO 値の変化. 個々の値を線で結び経時的変化を示している. 平均値を上記に記載し, □でグラフ上に表示している.

## 考察

本研究により, ECRS 患者群では, 気管支喘息やアレルギー性鼻炎の合併の有無や喫煙の有無にかかわ

らず, non-ECRS 患者群, 正常 control 群と比較し nasal NO 値が有意に低値であることがわかった. また, nasal NO 値と oral FeNO 値の間には有意な相関がないことから, ECRS 患者群で nasal NO 値が



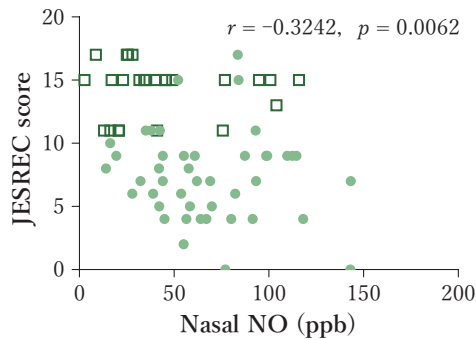


図6. CRS患者 (n=70) におけるnasal NO値とJESREC scoreとの相関。

● non-ECRS, □ ECRS.

低くなるのは、oral FeNO値が高いことだけが原因ではないと考えられた (図1)。

気道におけるNOの主要な産生源は副鼻腔粘膜であり、副鼻腔で産生されたnasal NOは、肺も含めた気道全体に対して保護的に働き、気道全体のホメオスタシスの維持という重要な役割を果たすことが報告されている<sup>9) 10) 12)</sup>。さらにnasal NOは肺機能を調節し、換気血流適合を改善させる働きがあり、成人と小児の両方において、nasal NO値が低いほど、肺機能が悪いという報告もある<sup>18)</sup>。しかしながら、副鼻腔においてnasal NO産生が障害される分子メカニズムはまだほとんどわかっていない。

そこで我々は、ECRS患者においてnasal NO値が低下するのは、好酸球性炎症による副鼻腔粘膜の障害によってnasal NOの産生が抑制されるためであるという仮説と、好酸球性炎症の結果生じた鼻茸によってnasal NOの拡散が阻害されるためという仮説を立てて検討を行った。nasal NO値とCTスコアの間には有意な負の相関を認めることから (図3)、副鼻腔炎における炎症の強さがnasal NO値の抑制に関係することが推察された。一方、nasal NO値と鼻茸スコア、鼻腔通気度との間には統計学的に有意な相関を認めず (図4)、さらにESSにより副鼻腔自然口を開放してもすぐにはnasal NO値が上昇しない (図5) ことから、単純に鼻茸によって中鼻道が閉塞することでnasal NOの拡散障害が生じているわけではないことが推察された。通常ESS後6か月までには、粘膜が完全に再上皮化し、少なくとも

見た目は正常粘膜に見えるようになる。しかし、NO産生の過程まで完全回復するには、さらに時間を要することが考えられる。これらの結果から、副鼻腔におけるnasal NOの産生は、粘膜の障害、特に好酸球性炎症によるダメージによって抑制され、副鼻腔粘膜が完全性を回復することによって増加する可能性が示唆された。

我々はこれまでの研究で、線溶系においてフィブリン網を分解する役割を持つt-PA (tissue plasminogen activator) が鼻粘膜で減少するため、鼻茸中にフィブリンの過剰沈着が生じていることを見つけた。さらに、t-PAは鼻粘膜上皮に恒常的に発現しており、Th2サイトカインであるIL-4/IL-13の刺激で発現が抑制されることも報告してきた<sup>19)</sup>。中枢神経系では、t-PAが細胞膜受容体であるLRP-1 (low-density-lipoprotein receptor-related protein-1) に結合すると、NF-κBシグナル伝達経路を介して誘導型NO合成酵素 (iNOS) が発現し、NO産生が誘導されることが知られている<sup>20)</sup>。我々は鼻粘膜においてもLRP-1が恒常的に発現し、ECRS患者群ではnon-ECRS患者群と比較すると、LRP-1の発現が抑制されていることを確認している (data not shown)。これらの結果から、ECRS患者の鼻粘膜では、Type 2炎症が惹起されることによりt-PAの発現が抑制され、結果としてNO産生が抑制されるという可能性が考えられた。しかしながら、ECRS患者の鼻粘膜ではiNOSの発現が増加しているという報告も存在する<sup>21) 22)</sup>ことから、NO産生が抑制されるメカニズムを明らかにするにはさらなる研究が必要である。

生体において、創傷部ではフィブリン網が蓄積し、線維芽細胞によって産生されるコラーゲンに置き換わることで創傷治癒が完了する<sup>23)</sup>。NOは鼻茸由来の線維芽細胞でのコラーゲン産生を誘導することから、創傷治癒において重要な働きをされると考えられている<sup>24)</sup>。そのため、nasal NO値が低下するとコラーゲン産生が抑制されるため、フィブリンの置換と創傷治癒が阻害され、鼻粘膜における炎症と浮腫が遷延する。その結果、ECRSの特徴である鼻茸が発達すると考えられる。鼻茸組織は病理学的に過剰な浮腫とコラーゲンの減少が特徴であることもこの考えを支持するものである<sup>25)</sup>。それゆえ、ECRS患者に



において nasal NO 値が低いことは、難治性鼻茸の形成にも関与している可能性が考えられる。

気管支喘息や非喘息性好酸球性気管支炎などの下気道疾患において、FeNO 値が重要なバイオマーカーであることは多数報告されてきた<sup>26)</sup>。また、気管支喘息においては、FeNO 値と気管支肺胞洗浄液中の好酸球数との間に有意な正の相関を認めるといふ報告もある<sup>27)</sup>。そこで本研究では、ECRS 患者における nasal NO 値と血液中、鼻粘膜組織中の好酸球との関係を調べてみたが、下気道における報告とは逆の結果となった(図2)。これに対して我々は、副鼻腔粘膜と下気道粘膜とでは、NO 産生などの好酸球性炎症に対する反応が有意に異なるのではないかと推測している。実際、副鼻腔粘膜では好酸球性炎症に対する反応として、粘膜に浮腫が生じ、鼻茸が形成されるが、気管支喘息において下気道に粘膜浮腫や polyp 病変が形成されることは決してない。さらに、TGF-β1 に対する線維芽細胞の分布は気道内において不均一な反応を示し、この不均一性により

上気道と下気道での炎症に対する病理学的な違いが生じるとの報告もある<sup>28)</sup>。それゆえ、下気道においては Type 2 炎症により NO 産生が亢進するが、副鼻腔においては Type 2 炎症により NO 産生が抑制される可能性があると考えられる。

## まとめ

本研究において、nasal NO 値が ECRS の重症度を反映する有用なマーカーとなる可能性、そして ECRS 患者における低い nasal NO 値が ECRS の病態形成に関与する可能性が示唆された。Nasal NO 値と JESREC score との間には有意な負の相関を認めること(図6)からも、ECRS の非侵襲的で簡便な臨床マーカーとして nasal NO の測定は有用であると考えられた。さらには、副鼻腔局所で nasal NO を誘導することが、ECRS の病態改善につながり、新しい治療アプローチとなる可能性も示唆された<sup>29)</sup>。

(吉田 加奈子)

## 文献

- 1) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2019;68:403-412.
- 2) Robnson D, Humbert M, Buhl R, et al. Revisiting type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implication. *Clin Exp Allergy.* 2017;47:161-175.
- 3) Kobayashi Y, Asako M, Ooka H, et al. Residual exhaled nitric oxide elevation in asthmatics is associated with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *J Asthma.* 2015;52:1060-1064.
- 4) Saito J, Inoue K, Sugawara A, et al. Exhaled nitric oxide as a marker of airway inflammation for an epidemiologic study in schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:512-516.
- 5) Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, et al. Increased fraction of exhaled nitric oxide predicts new-onset wheeze in a general population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:324-327.
- 6) Godinho Netto AC, Dos Reis TG, Matheus CF, et al. Fraction of exhaled nitric oxide measurements in the diagnoses of asthma in elderly patients. *Clin Interv Aging.* 2016;11:623-629.
- 7) Chen FJ, Liao H, Huang XY, et al. Importance of fractional exhaled nitric oxide in diagnosis of bronchiectasis accompanied with bronchial asthma. *J Thorac Dis.* 2016;8:992-999.
- 8) Maniscalco M, Sofia M, Pelaia G. Review Nitric oxide in upper airways inflammatory diseases. *Inflamm Res.* 2007;56:58-69.
- 9) Grasemann H, Shehnaz D, Enomoto M, et al. L-ornithine derived polyamines in cystic fibrosis airways. *PLoS One.* 2012;7:1-6.
- 10) Michl RK, Hentschel J, Fischer C, et al. Reduced nasal nitric oxide production in cystic fibrosis patients with elevated systemic inflammation markers. *PLoS One.* 2013;8:e79141.
- 11) Lindberg S, Cervin A, Runer T. Low levels of nasal nitric oxide (NO) correlate impaired mucociliary function in the upper airways. *Acta Otolaryngol.* 1997;117:728-734.

- 12) Lundberg JO, Weitzberg E. Nasal nitric oxide in man. *Thorax*. 1999;54:947-952.
- 13) **Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy*. 2015;70:995-1003.**
- 14) Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology*. 1993;31:183-184.
- 15) Bachert C, Mannent L, Naclerio RM, et al. Effect of subcutaneous dupilumab on nasal polyp burden in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2016;315:469-479.
- 16) Gevaert P, Calus L, Van Zele T, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:110-116.
- 17) **Yamada T, Yamamoto H, Kubo S, et al. Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with perennial allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 2012;33:e9-16.**
- 18) Krantz C, Janson C, Hollsing A, et al. Exhaled and nasal nitric oxide in relation to lung function, blood cell counts and disease characteristics in cystic fibrosis. *J Breath Res*. 2017;11:026001.
- 19) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive Fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:49-57.**
- 20) Lemarchant S, Docagne F, Emery E, et al. tPA in the injured central nervous system: different scenarios starring the same actor? *Neuropharmacology*. 2012;62:749-756.
- 21) Takeno S, Taruya T, Ueda T, et al. Increased exhaled nitric oxide and its oxidation metabolism in eosinophilic chronic rhinosinusitis: *Auris Nasus Larynx*. 2013;40:458-464.
- 22) Cannady SB, Batra PS, Leahy R, et al. Signal transduction and oxidative processes in sinonasal polyposis: *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:1346-1353.
- 23) Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:355-367.
- 24) Tewfik MA, Bernardes JF, Shan J, et al. Nitric oxide and collagen expression in allergic upper-airway disease. *Am J Rhinol*. 2003;17:269-274.
- 25) Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, et al. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:253-259.
- 26) Oh MJ, Lee JY, Lee BJ, et al. Exhaled nitric oxide measurement is useful for the exclusion of nonasthmatic eosinophilic bronchitis in patients with chronic cough. *Chest*. 2008;134:990-995.
- 27) Payne DNR, Adcock IM, Wilson NM, et al. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1376-1381.
- 28) Nonaka M, Pawankar R, Fukumoto A, et al. Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:812-821.
- 29) **Yoshida K, Takabayashi T, Imoto Y, et al. Reduced nasal nitric oxide levels in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019;68:225-232.**

## 2-3

## 好酸球性副鼻腔炎とケモカイン

## ● サマリー

鼻茸を含む鼻副鼻腔炎にはさまざまな細胞が存在する。生体における細胞の組織内移動や局在を制御するケモカイン (chemokine) は重要な役割を担っている。鼻副鼻腔は、外部からの侵入者である抗原、細菌、ウイルス、真菌などに対する気道生体防御機構の第一関門であり「獲得免疫」と「自然免疫」が混在する。ケモカイン産生機序とその作用、獲得免疫と自然免疫の関与、臨床マーカーとして重要なケモカインの存在について述べる。

**略語** CRS: chronic rhinosinusitis, CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyp, endoscopic sinus surgery: ESS, innate lymphoid cell 2: ILC2, extracellular trap cell death: ETosis, CLCs: Charcot-Leyden crystals, 15-Lipoxygenase 1: 15LO1

## ケモカイン

ケモカインは、白血球やリンパ球遊走活性の制御と炎症形成に関与し、走化性の (chemotactic) サイトカイン (cytokine) を意味する低分子量 (8~14 kDa程度) のタンパク質である。Gタンパク質共役受容体を介してその作用を発現する塩基性タンパク質で、1987年にIL-8が同定されて以来50種類以上のケモカインが同定され、その構造からCCケモカイン, CXCケモカイン, CケモカインおよびCX3Cケモカインに分類される。上気道粘膜において、他のサイトカインとともに自然免疫と獲得免疫に関与する。

## 血漿中CCケモカインEotaxin-3 (CCL26) レベルと鼻副鼻腔粘膜好酸球浸潤

鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis with nasal polyp; CRSwNP) における分子病態に基づいた疾患サブグループごとの治療の確立、エンドタイプの長期的な効果判定と検証のために、ケモカイン含むEotaxin-1, Eotaxin-2, Eotaxin-3, Galectin-10, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-21, IL-33, TSLP, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IP-10,

MCP-1の血漿分子を測定した<sup>1)</sup>。まず内視鏡下鼻副鼻腔手術 (endoscopic sinus surgery; ESS) 後3年以上経過した患者における鼻茸再発を基準に、粘膜浸潤好酸球数を調べると、秋田大学およびその関連施設では好酸球数55/HPFがカットオフ値となった。このカットオフ値にて好酸球浸潤低値群と高値群に分け、測定した項目を比較するとEotaxin-3 (CCL26) とGalectin-10が好酸球浸潤高値群で有意な差を認めた ( $p < 0.005$ , 表1)。またJESREC Studyの基準 (カットオフ値: 70個)<sup>2)</sup>で好酸球性副鼻腔炎と診断された群ではEotaxin-3が有意に高値であった。

次に血漿Eotaxin-3のカットオフ値を78.8 pg/mlと定め、Eotaxin-3高値群と低値群を比較すると、血中好酸球数と%では有意差を認めないが、組織中好酸球浸潤数 ( $p < 0.001$ ) に有意差を認めた (図1)。Eotaxin-3高値群は低値群に比べ、再発率が有意に高かった。

3種類のEotaxinとTh2サイトカインの関連性を調べるために、手術で摘出した鼻茸から線維芽細胞株を樹立した。得られた線維芽細胞株を48時間、IL-13で刺激するとEotaxin-3産生が有意に増強した ( $p < 0.05$ )。しかしEotaxin-1またはEotaxin-2の増加は検出できなかった (図2)。Eotaxin-3は、IL-13により上皮細胞からも誘導される<sup>3)</sup>。すなわちIL-13は

表1. 鼻茸組織好酸球数による分類と血漿分子.

	低浸潤群 (n=54) (Mean±SE)	高浸潤群 (n=43) (Mean±SE)	p value
Eotaxin-1 (ng/ml)	1.3±0.1	1.1±0.1	0.369
Eotaxin-2 (ng/ml)	7.0±0.4	6.0±0.4	0.091
Eotaxin-3 (pg/ml)	84.3±5.3	122.6±15.8	0.002**
Galectin-10 (pg/ml)	24.4±2.4	35.5±3.6	0.004**
IL-4 (pg/ml)	164.8±20.6	194.0±33.4	0.974
IL-5 (pg/ml)	132.9±108.7	30.6±10.9	0.918
IL-10 (pg/ml)	156.8±118.5	139.1±107.3	0.318
IL-12 (pg/ml)	56.4±30.3	22.6±5.0	0.305
IL-13 (pg/ml)	138.5±109.2	52.0±34.1	0.139
IL-21 (pg/ml)	26.8±2.4	28.0±2.8	0.476
IL-33 (pg/ml)	57.6±18.4	165.2±55.4	0.768
TSLP (pg/ml)	57.5±8.5	82.6±17.3	0.51
TNFα (pg/ml)	59.4±6.5	51.2±4.1	0.633
INFγ (pg/ml)	26.2±7.2	26.5±3.2	0.933
IP-10 (pg/ml)	843.6±118.3	716.8±89.3	0.645
MCP-1 (ng/ml)	5.3±0.4	5.2±0.4	0.965

p values for comparison between low- and high-eosinophil mucosal infiltration groups. (\*\*:  $p < 0.005$ ).

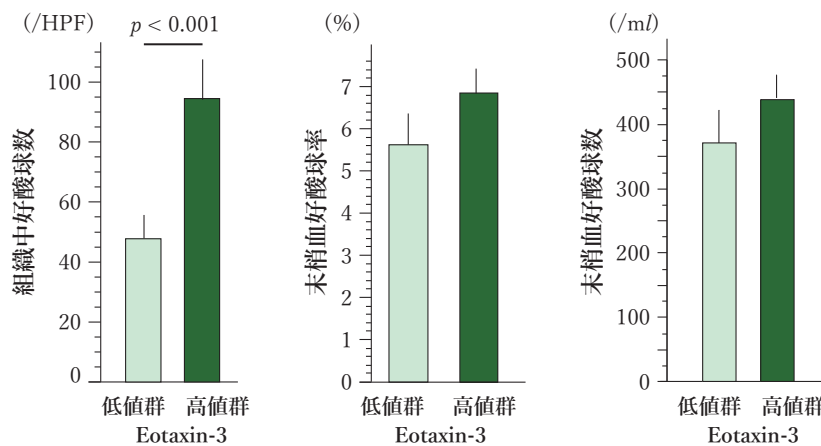


図1. 鼻茸患者血漿 Eotaxin-3 レベルと各種好酸球との関係.

Eotaxin-3 レベルを 78.8 pg/ml 以上の高値群と未満の低値群に分類した. 血漿中 Eotaxin-3 のレベルによって組織中好酸球数が有意に異なっていた.

鼻茸を構成する上皮および線維芽細胞を刺激すると図3に示すように IL-4Rα 鎖と IL-13Rα 鎖を刺激し, STAT6 のリン酸化と 15-Lipoxygenase の誘導による ERK の活性化による 2 つの経路で Eotaxin3 遺伝子を刺激して, Eotaxin3 が産生されることが報告された

(図3)<sup>4)</sup> 第2章のペリオチンで述べられている次世代シークエンサーのデータで鼻茸では ALOX-15 の発現が有意に高くなっている<sup>5)</sup>. ALOX-15 は 15-Lipoxygenase の遺伝子であり, まさしく Th2 環境下の好酸球性副鼻腔炎では IL-13 が高く, その刺

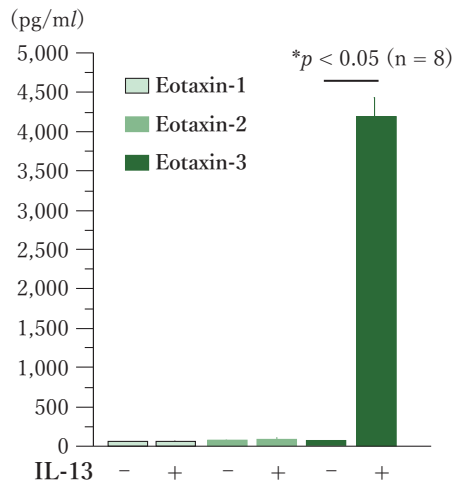


図2. IL-13による鼻由来線維芽細胞からのEotaxin-3産生.

IL-13は鼻茸由来線維芽細胞からEotaxin-3のみを産生させる。

刺激で15-Lipoxygenaseが誘導され、Eotaxin 3が産生・分泌されるのであろう。

抗IL-4R $\alpha$ 鎖抗体であるdupulimabは、第3相国際治験において鼻茸スコア5以上の多数の症例において鼻茸を消失させる効果を認めた<sup>6)</sup>。この抗体はIL-4とIL-13両方の刺激をブロックする。第3相国際治験では、全症例の平均鼻茸減少スコアが2を

超え、これまでのCRSwNPに対する臨床研究では最も効果が認められた。この治験では、実薬群で血清中Eotaxin-3が40%という有意な減少を認め、治療効果と相関を認めた。このことから、Eotaxin-3レベルがESS後の再発や抗体療法の効果を反映するバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

### 鼻腔洗浄液中CXCケモカインIL-8 (CXCL8) とマクロライド療法

長期マクロライドがびまん性汎細気管支炎、慢性副鼻腔炎、嚢胞性線維症<sup>7)</sup>などの慢性気道炎症性疾患の治療に効果的であることが報告されている。CRSwNP患者に対するマクロライド療法のエンドタイピングを目的に、14員環マクロライドを3か月間投与し、患者鼻腔洗浄液を採取、IL-8レベルを測定した<sup>8)</sup>。患者の鼻腔洗浄液中IL-8レベルはマクロライド治療中に有意に減少し、鼻茸スコアが改善した群ではIL-8レベルが231.2 pg/m<sup>3</sup>から44.0 pg/m<sup>3</sup>に著明に低下したが、スコアが改善しなかった群では変化を認めなかった。マクロライド療法前を観察すると有効群では無効群よりもIL-8レベルが有意に高く ( $p < 0.005$ )、治療前の鼻腔洗浄液中のIL-8レベ

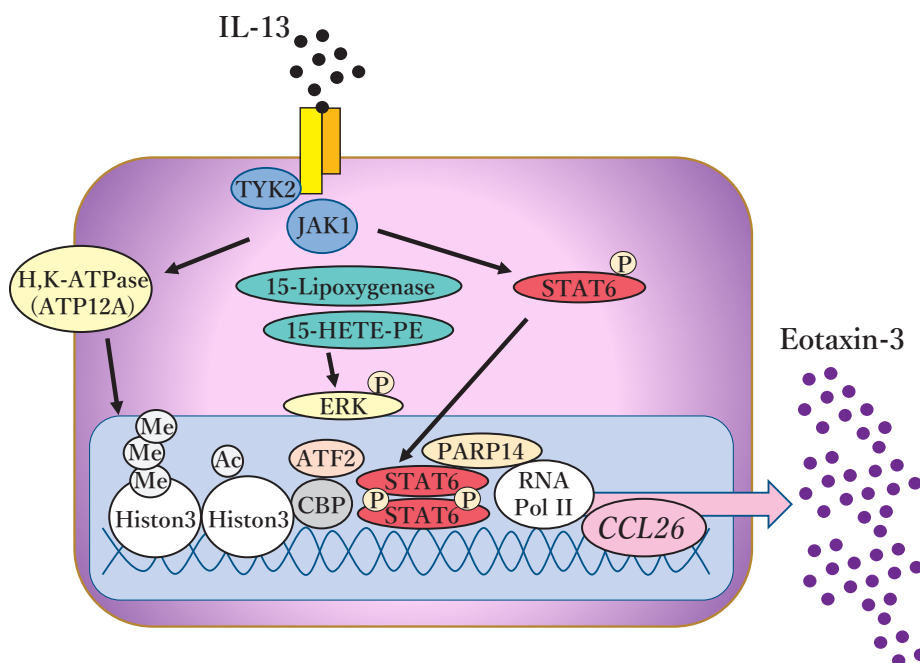


図3. IL-13刺激による細胞内シグナルとEotaxin-3発現機序.



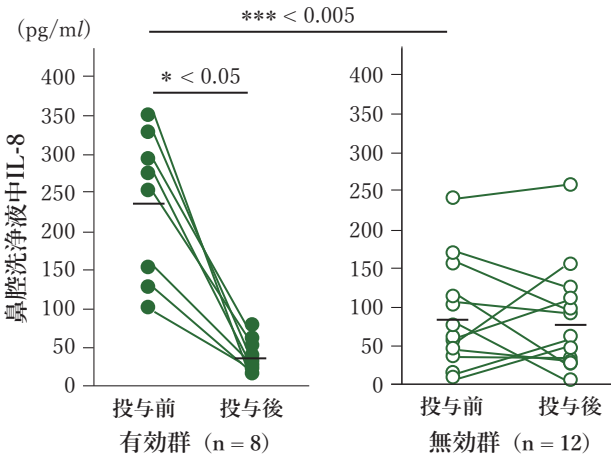


図4. 鼻茸患者に対するマクロライド療法の有効群では治療前鼻腔洗浄液中のIL-8レベルが高い。

ルはCRSwNPにおけるマクロライド治療の鼻茸スコアに対するの臨床マーカーとなる可能性がある(図4)。鼻腔洗浄液中のCCケモカインRANTES(CCL5)とVCAM-1もマクロライド治療中に有意に減少し、マクロライド療法有効群では無効群よりも治療前鼻腔洗浄液中のRANTESとICAM-1が有意に高値であった。

## 気道粘膜の自然免疫と好酸球浸潤・活性化

好酸球浸潤, IgE, Th2環境はアレルギー性鼻炎の発症機序であったが<sup>9)</sup>, 好酸球性副鼻腔炎でも同様の作用機序が存在するとされる。その概念は, 2型自然リンパ球 (innate lymphoid cell 2; ILC2) の発見により抗原が明確でなくてもアレルギー炎症の発症が証明され自然免疫の重要性が明らかとなった<sup>10)</sup>。ウイルスや微生物に共通した構造 (pathogen-associated molecular patterns) を認識して誘導されたり, 細胞障害によって放出されたりする免疫応答を発動する物質 (アラミン) によるシステムが存在する。さらに抗原のプロテアーゼなどの分子は, 細胞を傷害したり刺激したりしてIL-33, TSLP, IL-25などを放出させる。IL-33は気道上皮細胞や血管内皮細胞の核内に局在し細胞外に放出される分泌型サイトカインであり, 放出されたIL-33はILC2を

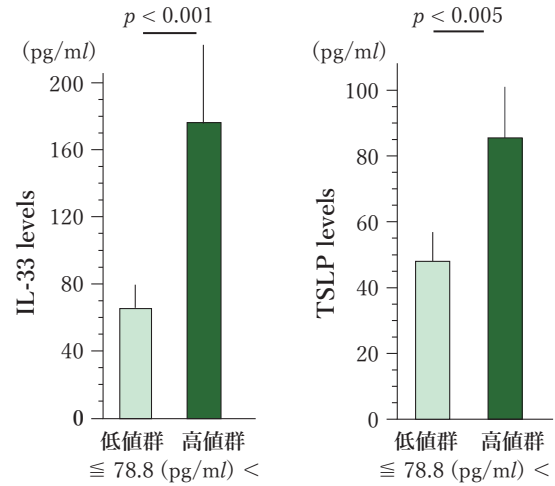


図5. 鼻茸患者血漿Eotaxin-3レベルと血漿IL-33/TSLP濃度との関係。

Eotaxin-3レベルを78.8 pg/ml以上の高値群と未満の低値群に分類した。血漿中Eotaxin-3のレベルによってIL-33, TSLPともに有意に異なっていた。

刺激することによって抗原の関与なしにIL-13やIL-5産生を誘導する。更にIL-33はTh2細胞を刺激してIL-5/IL-13産生を増強し獲得免疫にも関与している。鼻茸組織内には全てのILCサブセットが存在するがILC2が優勢に存在し, 末梢血リンパ球, 扁桃組織, 鼻茸のない副鼻腔粘膜, 正常洞と比較して, 鼻茸組織内ILC2の存在割合は有意に高い<sup>11)</sup>。上述したCRSwNP患者血漿Eotaxin-3レベル高値群ではIL-33 ( $p < 0.001$ ) およびTSLP ( $p < 0.005$ ) の血漿レベルも有意に高値であった(図5)。

好酸球のextracellular trap cell death (ETosis)過程で, 細胞内でのGalectin-10の局在化と放出によってシャルコー・ライデン結晶 (Charcot-Leyden crystals; CLCs) が形成され, CLCsは好酸球性副鼻腔炎の中等症以上で存在していた<sup>12)</sup>。結晶やGalectin-10がTh2反応を誘導することも判明している。CRSwNP患者好酸球数高浸潤群では血漿Galectin-10レベルが有意に高く, 血漿Galectin-10レベル高値群ではEotaxin-3の血漿レベルも有意に高値であった。

## ケモカイン産生と細胞内シグナル

Toll様受容体 (Toll-like receptor; TLR) は動物の

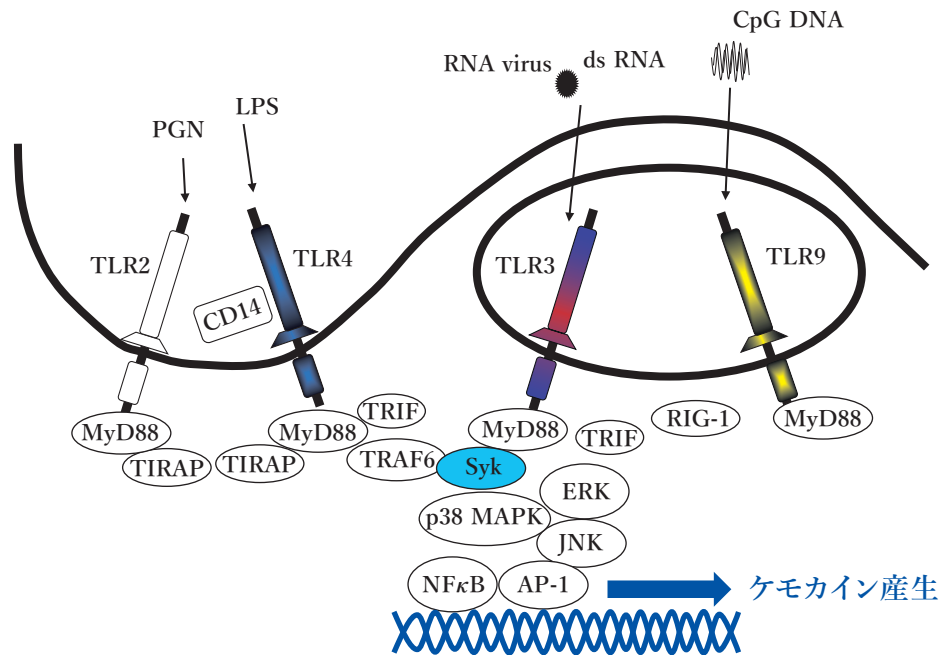


図6. ヒト気道由来線維芽細胞でのTLRシグナルとケモカイン産生。

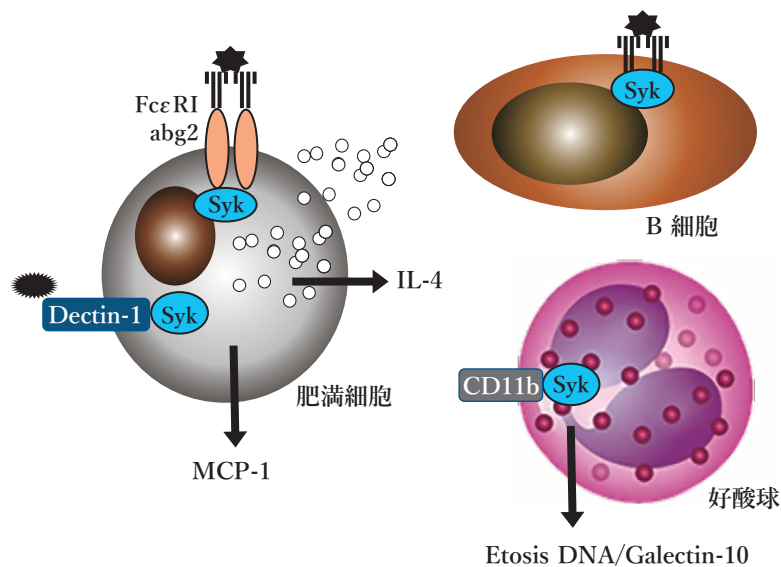


図7. Sykシグナルと肥満細胞・B細胞・好酸球の機能。

細胞表面にある受容体タンパク質で、種々の病原体を感知して自然免疫（獲得免疫と異なり、一般の病原体を排除する非特異的な免疫作用）を作動させる機能があるTLRやその他の自然免疫に関わる受容体は、病原体に常に存在し宿主にはない病原体に特異的なパターンを認識する。TLRリガンドは、細菌表面のリポ多糖（LPS）、鞭毛のフラジェリン、ウイルスの二本鎖RNA、細菌やウイルスのDNAに含まれ

る非メチル化CpG DNAなどである。好塩基球をTLR-2リガンドである黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸とβ-1, 3-glucan, aspergillus fumigatusで刺激するとB-cell-activating factor (BAFF), B lymphocyte stimulatorが産生された<sup>13)</sup>。BAFFは免疫グロブリン産生に重要な分子である<sup>14)</sup>。気道粘膜由来の線維芽細胞を用いた研究では二本鎖RNAによりBAFF<sup>15)</sup>、TSLP<sup>16)</sup>の産生が強く誘導され、CRSwNP患者の鼻

粘膜組織にはBAFF<sup>17)</sup>, TSLP<sup>18)</sup>が強く発現している(図6).

カードランでDectin-1発現マスト細胞株を刺激すると血漿中CCケモカインMCP-1 (CCL2), IL-4, IL-13, TNF $\alpha$ の発現が増強し, spleen tyrosine kinase (Syk) 阻害剤で抑制された(図7)<sup>19)</sup>. Sykは細胞内に存在するチロシンキナーゼ<sup>20)</sup>で抗原受容体に結合し<sup>21)</sup>, IgE受容体の中心的なシグナル分子である<sup>22)</sup>. Sykは鼻茸患者由来の線維芽細胞にも発現がみられ, LPS<sup>23)</sup>やサイトカイン<sup>24)</sup>によるCCケモカインRANTESの産生を制御している. レクチンでもSykは活性化される<sup>25)</sup>. 鼻茸組織をみると好酸球にSykの発現が強くみられた<sup>26)</sup>. これらの作用はSyk阻害剤で抑制された.

## 最後に

血漿Eotaxin-3は, 術後経過や抗体治療の効果と相関を認め, 好酸球性副鼻腔炎のバイオマーカーになりえる可能性がある. 一方, IL-8は非好酸球性副鼻腔炎のバイオマーカーになりえる可能性がある. Th2サイトカイン, pathogen-associated molecular patterns, TLRの刺激はSykを活性化させ, さまざまな反応を生み出す. Janus kinase/ Syk 阻害薬が開発され, アトピー性皮膚炎において有効性が認められるなど<sup>27)</sup>, Th2環境を抑制できるようになった. 今後, このSyk阻害薬が, 好酸球性副鼻腔炎でも有効が求められ, 臨床に導入される可能性も高いと思う.

(山田 武千代: 秋田大学大学院・医学部・耳鼻咽喉科・頭頸部外科, 藤枝 重治)

## 文献

- 1) Yamada T, Miyabe Y, Ueki S, et al. Eotaxin-3 as a Plasma Biomarker for Mucosal Eosinophil Infiltration in Chronic Rhinosinusitis. *Front Immunol.* 2019;10:74.
- 2) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy.* 2015;70:995-1003.
- 3) Min JY, Ocampo CJ, Stevens WW, et al. Proton pump inhibitors decrease eotaxin-3/CCL26 expression in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: Possible role of the nongastric H,K-AT-Pase. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:130-141.
- 4) Li Z, Zeng M, Deng Y, et al. 15-Lipoxygenase 1 in nasal polyps promotes CCL26/eotaxin 3. expression through extracellular signal-regulated kinase activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144:1228-1241.
- 5) Ninomiya T, Noguchi E, Takenori H, et al. Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Sci Rep.* 2018;8:11450.
- 6) Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet.* 2019;394:1638-1650.
- 7) Jaffe A, Francis J, Rosenthal M, et al. Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet.* 1998;351:420.
- 8) Yamada T, Fujieda S, Mori S, et al. Macrolide treatment decreased the size of nasal polyps and IL-8 levels in nasal lavage. *Am J Rhinol Allergy.* 2000;14:143-148.
- 9) Yamada T, Saito H, Fujieda S. Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:632-639.
- 10) Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature.* 2010;463:540-544.
- 11) Ho J, Bailey M, Zaunders J, et al. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. *Clin Exp Allergy.* 2015;45:394-403.
- 12) Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, et al. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap celldeath. *Blood.* 2018;132:2183-2187.
- 13) Boita M, Heffler E, Pizzimenti S, et al. Regulation of B-cell-activating factor expression on the basophil

- membrane of allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;166:208-212.
- 14) Yamada T, Zhang K, Yamada A, et al. B lymphocyte stimulator activates p38 mitogen-activated protein kinase in human Ig class switch recombination. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:388-394.
  - 15) Yamada T, Lihong S, Takahashi N, et al. Poly(I:C) induces B<sub>2</sub>20-1 expression of airway fibroblasts through phosphatidylinositol 3-kinase. *Cytokine.* 2010;50:163-169.
  - 16) Yamada T, Saito H, Kimura Y, et al. CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. *Cytokine.* 2012;57:245-250.
  - 17) Kato A, Peters A, Suh L, et al. Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1385-1392.
  - 18) Nagarkar DR, Poposki JA, Tan BK, et al. Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:593-600.
  - 19) Kimura Y, Chihara K, Honjoh C, et al. Dectin-1-mediated signaling leads to characteristic gene expressions and cytokine secretion via spleen tyrosine kinase (Syk) in rat mast cells. *J Biol Chem.* 2014;289:31565-31575.
  - 20) Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, et al. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem.* 25;266:15790-15796.
  - 21) Yamada T, Taniguchi T, Yang C, et al. Association with B-cell-antigen receptor with protein-tyrosine kinase p72syk and activation by engagement of membrane IgM. *Eur J Biochem.* 1993;213:455-459.
  - 22) Zhu D, Kepley CL, Zhang K, et al. A chimeric human-cat fusion protein blocks cat-induced allergy. *Nat Med.* 2005;11:446-449.
  - 23) Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, et al. Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *J Immunol.* 2001;166:538-543.
  - 24) Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, et al. IL-1 induced chemokine production through the association of Syk with TNF receptor-associated factor-6 in nasal fibroblast lines. *J Immunol.* 2001;167:283-288.
  - 25) Yamada T, Taniguchi T, Nagai K, et al. The lectin wheat germ agglutinin stimulates a protein-tyrosine kinase activity of p72syk in porcine splenocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;180:1325-1329.
  - 26) Hamajima Y, Fujieda S, Sunaga H, et al. Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx.* 2007;34:49-56.
  - 27) Pavel AB, Song T, Kim HJ, et al. Oral Janus kinase/SYK inhibition (ASN002) suppresses inflammation and improves epidermal barrier markers in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144:1011-1024.

## 2-4

第1章

第2章

第3章

第4章

第5章

第6章

第7章

第8章

第9章

第10章

第11章

# バイオマーカーとしての血清 IgG4 値の意義

## サマリー

指定難病の対象となる中等症および重症好酸球性副鼻腔炎患者の血清 IgG4 値は、非好酸球性および軽症好酸球性副鼻腔炎患者と比較し高値であった。血清 IgG4 のカットオフ値を 95 mg/dl とすると、感度 39.7%、特異度 80.5% で術後再発を予測できた。さらに血清ペリオスチン値（カットオフ値 115.5 ng/ml）と組み合わせることで、どちらかが陽性であった例は両者が陰性であった例に比べ、オッズ比 3.95 で術後再発を来した。

## はじめに

IgG4 は、IgE とともに IL-4 や IL-13 などの Type 2 サイトカインの作用によって産生が誘導される抗体である (図1)<sup>1)</sup>。最近、鼻茸には IgG4 陽性細胞の浸潤がみられ、特に重症好酸球性副鼻腔炎患者 (eosinophilic chronic rhinosinusitis; ECRS) の鼻茸では顕著であることが報告された<sup>2)</sup>。本報告では、組織浸潤 IgG4 陽性細胞数は気管支喘息患者、特にアスピリン不耐症 (aspirin-exacerbated respiratory disease; AERD) 患者で多く、また術後経過に関連することが示された。すなわち、組織浸潤 IgG4 陽性

細胞数は ECRS の病態に関与することが明らかとなった。

一方、バイオマーカーの材料としては、採取の侵襲性から組織検体よりは血液や尿あるいは唾液などの検体が望ましい。我々は予備実験で ECRS の組織浸潤 IgG4 陽性細胞数と血清 IgG4 値が有意な正の相関を示すことをみいだした。そこで今回は、血清 IgG4 値が ECRS の病態や予後を反映するバイオマーカーとなりうるのか、さらには我々が最近報告した ECRS のバイオマーカーである血清ペリオスチン値<sup>3)</sup>と組み合わせることによる予後予測の可能性について検討した。

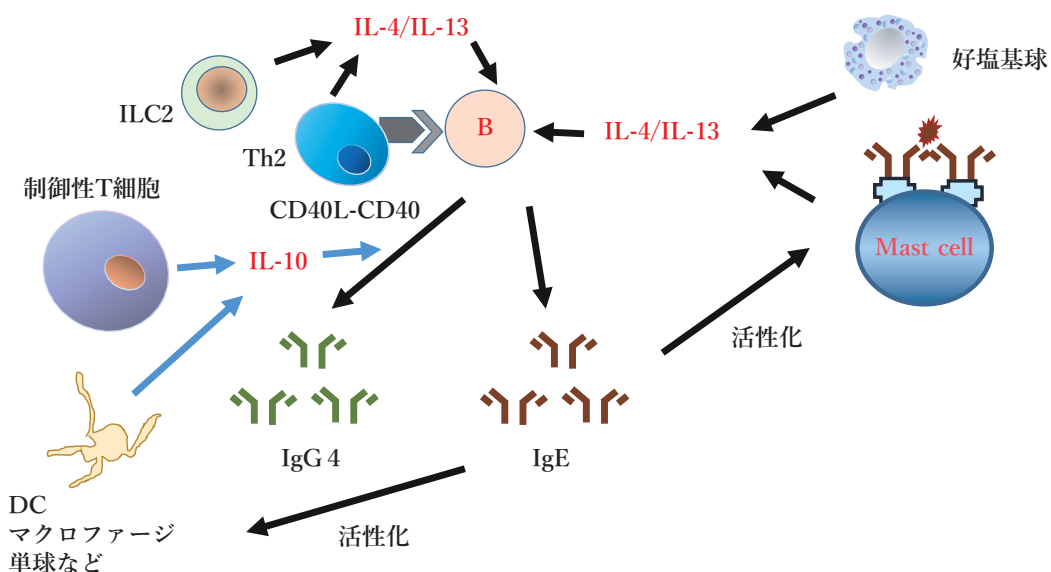


図1. B細胞の活性化とIgE/IgG4の産生.



## 方法

JESREC研究に参加した5つの施設(福井大学, 岡山大学, 獨協医科大学, 自治医科大学さいたま医療センター, 横浜市立大学附属市民総合医療センター)で内視鏡下鼻副鼻腔手術(ESS)を受けた慢性副鼻腔炎患者(CRS)の血清(n=336)を対象とした。そのうち, 鼻茸を伴わない副鼻腔炎は58例であった。JESREC基準による分類では, non-ECRSが119例, 軽症ECRSが57例, 中等度ECRSが94例, 重症ECRSが66例であった<sup>4)</sup>。IgG4関連疾患を合併した例は認めなかった。術後に鼻茸形成または膿性鼻汁を28日以上認めた場合を再発とした。血清IgG4値の測定はThermo Fisher社(Waltham, MA)のELISAキットを用いた。統計的解析はGraphPad Prism 6(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA), JMP Pro 14.0(SAS Institute Inc., Cary, NC), STATA 12.1(StataCorp, College Station, TX)を用い,  $p < 0.05$ を有意とした。

## 結果

### 慢性副鼻腔炎のフェノタイプ/エンドタイプによる血清IgG4値の比較

鼻茸を合併した副鼻腔炎患者(CRS with nasal polyp; CRSwNP)の血清IgG4値(中央値45.0 mg/dl)

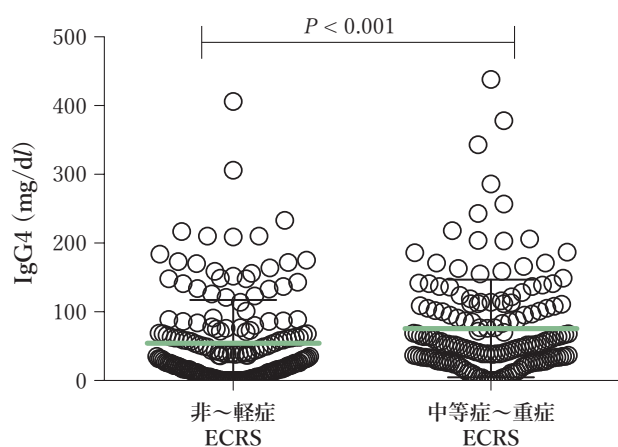


図2. non-ECRS～軽症ECRSと中等症ECRS～重症ECRSにおける血清IgG4値の比較。

2群間に有意な差を認めた( $p < 0.001$ )。

dl, n=278)は, 鼻茸を合併しない副鼻腔炎患者(CRS without nasal polyp; CRSsNP)(中央値8.5 mg/dl, n=58)に比較して有意に高値であった( $p = 0.001$ )。JESREC基準に従いCRSをnon-CRSとECRSに分けると, ECRS(中央値52.0 mg/dl, n=217)ではnon-ECRS(中央値31.0 mg/dl, n=119)に比較して, 血清IgG4値が有意に高値であった( $p < 0.001$ )。ECRSを重症度別に分類し比較すると, non-ECRSの血清IgG4値(中央値31.0 mg/dl)に比較して, 中等症(中央値52.5 mg/dl,  $p = 0.016$ )および重症(中央値52.5 mg/dl,  $p < 0.001$ ) ECRSでは高値を示した。軽症ECRS(中央値42.0 mg/dl)とnon-ECRSとの間には有意な差を認めなかった( $p = 0.887$ )。さらに指定難病となる中等症～重症ECRSでは, non-ECRS～軽症ECRSと比較して, 血清IgG4値が有意に高値となった( $p < 0.001$ )(図2)。

### 慢性副鼻腔炎の病態における血清IgG4値の意義

血清IgG4値と組織浸潤好酸球数との間には, 弱いながらも有意な正の相関を認めた(n=193,  $r = 0.258$ ,  $p < 0.001$ )。末梢血好酸球比率との相関も同様であった(n=336,  $r = 0.202$ ,  $p < 0.001$ )。血清総IgE量(n=96,  $r = 0.177$ ,  $p = 0.084$ )や1秒率(n=101,  $r = -0.056$ ,  $p = 0.580$ )との相関は認めなかった。気管支喘息合併の有無で比較をすると, 喘息を合併するCRS(中央値57.0 mg/dl, n=125)では, 喘息を合併しないCRS(中央値37.0 mg/dl, n=211)に比較して, 血清IgG4値が有意に高値であった( $p < 0.001$ )。AERDは34例で合併していた。AERD合併例の血清IgG4値(中央値68.5 mg/dl)は非合併例(中央値39.5 mg/dl)と比較し, 有意に高値であった( $p = 0.002$ )。

### 術後経過のバイオマーカーとしての血清IgG4値の意義

253例は術後経過を観察しえた。うち58例(22.9%)では再発がみられた。血清IgG4値は非再発例(中央値37.0 mg/dl)に比較して, 術後再発例(中央値52.5 mg/dl)で有意に高値であった。

次いで, 血清IgG4値が術後再発の予測因子と

なりうるのか, receiver operating characteristics (ROC) 解析を行った. ROC曲線による area under curve (AUC) は0.610 (95% CI: 0.528~0.693) であった. 血清IgG4値のカットオフ値を95 mg/dlとすると, 感度39.7% (95% CI: 27.1~53.4), 特異度80.5% (95% CI: 74.3~85.8) で術後再発が予測できる結果となった. このカットオフ値を基に術後再発に関する Kaplan-Meier 解析を行うと, 高血清IgG4値群 (血清IgG4値95 mg/dl以上, n=61) では低血清IgG4値群 (血清IgG4値95 mg/dl未満, n=192) に比較して, 術後再発を有意に認めた ( $p=0.004$ ) (図3).

### 血清IgG4値と血清ペリオスチン値を組み合わせた術後予後バイオマーカーの開発

我々は最近, 血清ペリオスチン値がCRSに対する術後経過の予測因子となることを報告した<sup>3)</sup>. そこで, 血清IgG4値と血清ペリオスチン値を組み合わせることで術後経過のより正確な予測が可能かどうか検討した. 血清IgG4値と血清ペリオスチン値の間には, ほとんど相関を認めなかった ( $r=0.149$ , 95% CI: 0.039~0.255). 血清ペリオスチン値のカットオフ値 (カットオフ値115.5 ng/ml) と血清IgG4値のカットオフ値 (95 mg/dl) から, 症例を4群 (低IgG4/低ペリオスチン, 高IgG4/低ペリオスチ

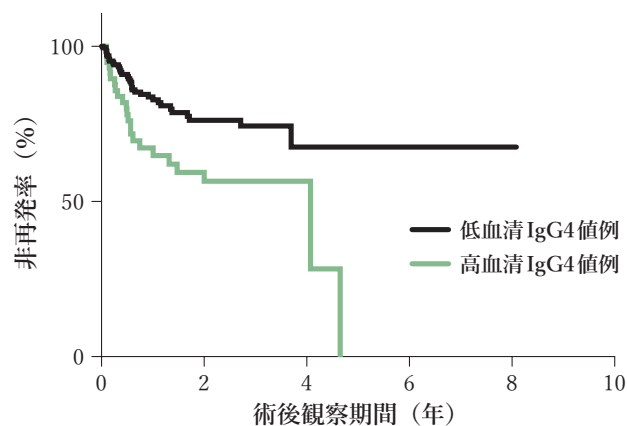


図3. 血清IgG4値別による非再発率の違い.

カットオフ値95 mg/mlによって低IgG4値群と高IgG4値群に分けた. ESS後の非再発率は, Kaplan-Meier法で計算した. 2群間に有意な差を認めた ( $p=0.004$ ).

ン, 低IgG4/高ペリオスチン, 高IgG4/高ペリオスチン) に分類した. ロジスティック解析にて, 低IgG4/低ペリオスチン群はその他の群に比較して, オッズ比3.95 (95% CI: 1.97~7.92) で術後再発が有意に抑制されることが明らかとなった ( $p<0.001$ ) (図4). この有意性は年齢や性 (オッズ比3.85: 95% CI: 1.92~7.69,  $p<0.001$ ), 鼻茸の有無 (オッズ比3.57: 95% CI: 1.69~7.14,  $P<0.001$ ) あるいは施設間 (オッズ比3.33: 95% CI: 1.56~7.14,  $p=0.002$ ) で補正を行っても同様であった.

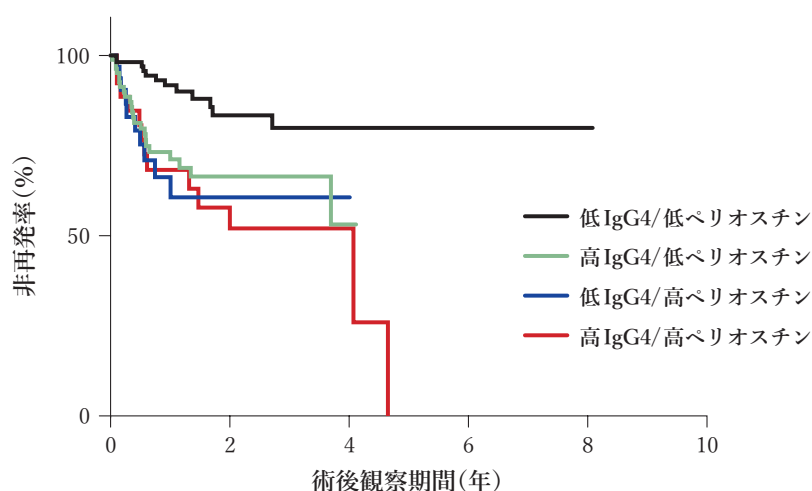


図4. 血清IgG4値と血清ペリオスチン値の組み合わせによる術後非再発率.

血清IgG4のカットオフ値95 mg/ml, 血清ペリオスチン値115.5 mg/mlにて4群に分けた. Kaplan-Meier法で非再発率を計算したところ, 低IgG4/低ペリオスチン群が有意に術後の予後がよかった.

## 考察

血清IgG4値はECRSで有意に高値を示した。IgEと同様にIgG4の産生は、ECRSの病態に密接に関与するIL-4やIL-13などのタイプ2サイトカインに加え制御性サイトカインであるIL-10の作用によって誘導される<sup>5)</sup>。ECRSの病態に関わる可能性がある微生物因子の一つとして黄色ブドウ球菌がある。鼻茸細胞は本菌が産生するエンテロトキシンやプロテインAなどの刺激に対してIL-10を産生する<sup>6)7)</sup>。したがって、ECRSにおけるIgG4産生については微生物抗原への曝露が重要であると考えられた。

中等症～重症のECRSではnon-ECRS～軽症ECRSと比較して、血清IgG4値が有意に高値であった。これは以前に報告された、組織浸潤IgG4陽性細胞数が重症ECRSで高値を示す結果とほぼ同様であり、血清検体もECRSの病態を反映すると考えられた<sup>2)</sup>。現時点では中等症～重症のECRSが指定難病の対象であり、治療抵抗性の難治性CRSといえる<sup>4)</sup>。今回の結果からは、難治性CRSのバイオマーカーとしての血清IgG4値の有用性が示唆された。特に我が国では、IgG4関連疾患の診断や鑑別のために多くの医療機関で血清IgG4値の測定は可能であり、実現可能性は高いと考える。

血清IgG4値のカットオフ値を95 mg/dlとした場合、39.7%の感度と80.5%の特異度で術後再発を予測できた。組織浸潤IgG4陽性細胞数のカットオフ値を17細胞/400倍視野とした場合、術後CTでの陰影残存率50%以上を再発とすると73.3%の感度と82.5%の特異度で術後再発を予測できた<sup>2)</sup>。今回の結果は既報と比較すると感度に劣る。やはり局所での評価がより病態を反映するものと思われる。しか

しながら、バイオマーカーとしての普及を考えるのであれば、採取の侵襲性が低い血清検体を用いる有用性は高いといえる。

血清IgG4値と血清ペリオスチン値がともに低値を示す症例では、術後の経過が良好であった。すなわち、2つのバイオマーカーを用いることでより正確な予後予測が可能となることが示唆された。IgG4もペリオスチンも、ともにIL-13などのTh2サイトカインによって正の制御を受けている。血清IgG4値と血清ペリオスチン値がともに低値を示す症例はnon-Type 2、すなわち難治化につながるType 2炎症の関与が低いエンドタイプのために術後再発を起こしにくいと思われた。

## おわりに

今回の検討では、血清IgG4値がECRSの重症度や術後経過と関連することを示した<sup>8)</sup>。特に血清ペリオスチン値と組み合わせることで、術後再発をより正確に予測できる可能性、すなわちバイオマーカーとしての有用性が示唆された。一方で、ECRSの病態に対するIgG4の機能的関与に関する解析は十分に進んでおらず、研究の進展が期待される。またECRSに代表される治療抵抗性のCRSに対しては、抗IL-4受容体抗体などType 2炎症を標的とした生物学的製剤を用いた新しい治療法が展開されている<sup>9-11)</sup>。生物学的製剤は総じて高価であり、適応患者の選択基準や治療効果の予測の確立が喫緊の課題である。今後、血清IgG4値を含めType 2炎症のバイオマーカーがこれらの新規治療法の選択基準や効果予測に有用であるか、解析が望まれる。

(岡野 光博, 岡 愛子: 国際医療福祉大学)

## 文献

- 1) Fujieda S, Zhang K, Saxon A. IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells gamma subclass-specific isotype switch: switching to gamma 1, gamma 3, and gamma 4, but not gamma 2. *J Immunol.* 1995;155:2318-2328.
- 2) Koyama T, Kariya S, Sato Y, et al. Significance of IgG4-positive cells in severe eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2019;68:216-224.
- 3) Ninomiya T, Noguchi E, Haruna T, et al. Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Sci Rep.* 2018;8:11450.

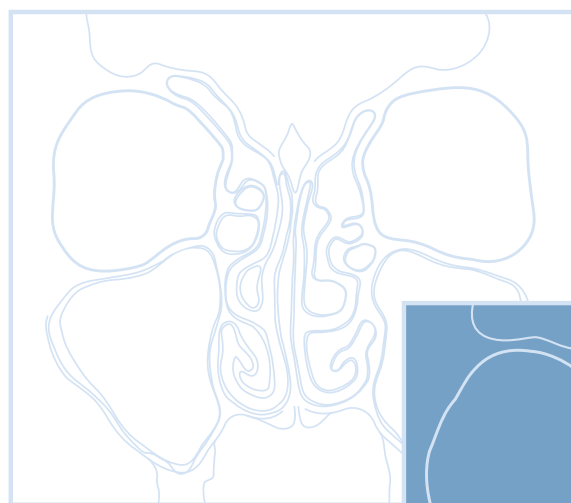
- 4) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: The JESREC Study. *Allergy*. 2015;70:995-1003.
- 5) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019;68:408-412.
- 6) Okano M, Fujiwara T, Kariya S, et al. Staphylococcal protein A-formulated immune complex suppress enterotoxin-induced cellular responses in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:343-350.
- 7) Haruna T, Kariya S, Fujiwara T, et al. Association between impaired IL-10 production following exposure to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B and disease severity in eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2018;67:392-398.
- 8) Oka A, Ninomiya T, Fujiwara T, et al. Serum IgG4 as a biomarker reflecting pathophysiology and post-operative recurrence in chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2020 (Epub ahead of print).
- 9) Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet*. 2019;394:1638-1650.
- 10) Matsunaga K, Katoh N, Fujieda S, et al. Dupilumab: Basic aspects and applications to allergic diseases. *Allergol Int*. 2020;69:187-196.
- 11) Nagase H, Ueki S, Fujieda S. The Roles of IL-5 and anti-IL-5 treatment in eosinophilic diseases: asthma, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int* 2020;69:178-186.





## 第 3 章

# 網羅的解析





## 3-1

第1章

第2章

第3章

第4章

第5章

第6章

第7章

第8章

第9章

第10章

第11章

## 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸における TRPV3 の発現

## サマリー

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 鼻茸組織を用いて次世代シーケンサーによる全トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行ったところ、3つの遺伝子が有意に高く発現していることがわかった。その中で、末梢血好酸球での発現が報告されていない遺伝子として TRPV3 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3) を同定した。TRPV3 は ECRS の鼻茸粘膜上皮および浸潤する好酸球に強く発現していることがわかり、重症度が高いほど、発現が高いこともわかった。TRPV3 は ECRS の難治性に関与している可能性があると思われた。

**略語** ECRS, 次世代シーケンサー, RNA-seq, TRPV3, 全トランスクリプトーム解析

## はじめに

分子生物学において遺伝子発現はフェノタイプの基礎となる要素であり、網羅的に遺伝子発現の種類や発現量を知ることによって、遺伝子発現がどのようにフェノタイプを決定するかを知ることができる。マイクロアレイは何千~何万種類の遺伝子発現を一度に知ることができ、遺伝子発現解析によく用いられている<sup>1)</sup>。通常マイクロアレイは高スループットの方法ではあるが、既知の遺伝子配列から作成したプローブにクロスハイブリダイゼーションを行うことによって遺伝子配列を検出するため、未知の配列や変異のある配列が検出されないなど、検出結果にバイアスが生じる可能性がある。一方、次世代シーケンサーを用いた全トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) は比較的新しい遺伝子発現解析法であり、トランスクリプトームのマッピングと定量をデジタル情報として得ることができる。

RNA-seq の手順の概略は次に示す通りである。  
①組織から抽出した RNA を cDNA に変換し、短い配列 (一般的には 30~400 塩基長) に切断する。  
②切断された cDNA にアダプターを付加させ、cDNA ライブラリーを作成する。  
③cDNA ライブラリーをリファレンスゲノムにマッピングし、また cDNA

ライブラリーから新規の遺伝子配列を同定する。  
④cDNA ライブラリーを定量し、遺伝子の発現レベルを測定する。

RNA-seq は未知のトランスクリプトを検出でき、エクソン領域だけでなく、転写開始配列や 5' 非翻訳領域、uORF (upstream open reading frame)、選択的スプライシングも検出できる<sup>2)~4)</sup>。

ECRS の病態生理は、いまだ解明されておらず、また ECRS に対する RNA-seq 解析の報告も少ない。我々は、副鼻腔炎鼻茸組織の RNA-seq 解析を行い、ECRS に強く発現するトランスクリプトを同定した<sup>5)</sup>。

## 実験材料と方法

## 対象患者

福井大学で内視鏡下鼻副鼻腔手術 (ESS) を施行された患者から鼻茸組織を採取した。JESREC の診断基準・重症度分類<sup>6)</sup>に従って診断し、好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 5例と非好酸球性副鼻腔炎 (non-ECRS) 5例の鼻茸組織を用いた。表1に患者背景を記載した。

## RNA の抽出および rRNA の除去

RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を鼻茸から抽出した。Ribo-Zero<sup>™</sup> Gold kit (Epicentre

表1. 患者背景.

	ECRS	Non-ECRS	p値
患者数	5	5	
性別 (男/女)	2/3	4/1	n.s. <sup>†</sup>
年齢	36 [29–52]	58 [57–59]	0.047*
鼻茸中の好酸球数 (/HPF)	214.0 [155.0–249.0]	5.0 [5.0–6.0]	0.012*
末梢血好酸球 (%)	13.5 [10.6–13.6]	2.3 [1.8–3.2]	0.008**
JESREC スコア	15 [15–17]	9 [5–9]	0.010*

中央値と四分位範囲 (括弧内) であらわす. <sup>†</sup> $\chi^2$  test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Wilcoxon rank-sum test.

Biotechnologies) を用いて, 1 症例あたり 4~8  $\mu\text{g}$  の全 RNA から rRNA を除去した. RNA の定量は NanoDrop1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を用い, RNA の品質は Agilent 2100 Bio-analyzer, RNA 6000 Pico chips (Agilent Technologies) を用いたキャピラリー電気泳動で評価し, RNA Integrity Number (RIN)<sup>7)</sup> が 7 以上のものを次世代シーケンサー解析に用いた.

### cDNA ライブラリーの作成と次世代シーケンサー解析

SOLiD<sup>TM</sup> Total RNA-Seq Kit (Life Technologies) を用いて 300~450 ng の rRNA を除去した mRNA から cDNA ライブラリーを作成した. ライブラリーは SOLiD<sup>TM</sup> EZ Bead<sup>TM</sup> Emulsifier kit (Life Technologies) を用いてビーズに付着させてクローニング (emulsion PCR), SOLiD<sup>TM</sup> EZ Bead<sup>TM</sup> Enrichment kit (Life Technologies) を用いてビーズを増幅させた. 増幅されたビーズを SOLiD<sup>TM</sup> 5500xl system (Life Technologies) でシーケンスした. シーケンス設定は single-end, 75-bp reads とした.

### マッピングおよびシーケンスデータの加工

得られたシーケンスデータは Lifescape<sup>TM</sup> Genomic Analysis Solutions version 2.5.1 (Life Technologies) を用いて UCSC human genome 19 (hg19) にゲノムマッピングを行った. Lifescape の設定はデフォルト設定を用いた.

マッピングされたデータは Avadis<sup>®</sup> NGS v1.4.1 (Strand Scientific Intelligence) を用いて解析し, リファレンスゲノム (UCSC transcripts) に存在する

既知の配列だけでなく未知の配列も検出した. Read depth を RPKM (Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads) 単位で算出し, 発現差の比較を行った<sup>2)</sup>. Non-ECRS と ECRS との発現差解析には t 検定を用い, Benjamini-Hochberg 法を用いて多重検定の補正を行った<sup>8)</sup>.

### リアルタイム PCR

福井大学で ESS を施行された副鼻腔炎患者で, RNA-seq を行った患者とは異なる 40 例の鼻茸組織から RNA を抽出した. JESREC の診断基準・重症度分類を用いて診断した. TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix and Gene Expression Kit (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った. プライマーとプローブは TRPV3 (Hs00376854\_m1: Applied Biosystems) を用いた.

### 免疫組織化学 (酵素抗体法)

福井大学で ESS を施行された副鼻腔炎患者で, RNA-seq を行った患者とは異なる 80 例の鼻茸組織を用いた. JESREC の診断基準・重症度分類を用いて診断した. 鼻茸組織をホルマリンで固定した後, パラフィ包埋を行った. 4 mm スライス切片を作成し, TRPV3 特異的抗体 (Sigma-Aldrich) を用いて, 免疫組織化学を行った. 上皮細胞における TRPV3 陽性細胞の数を高倍率視野 (HPF: 400 倍) で最も細胞の多い場所 3 か所を数え平均を求めた. その際, 臨床データがわからない状態で測定した. 染色スライドは Olympus BX53 倒立型顕微鏡と cellSens<sup>®</sup> Standard software (Olympus) を用いて撮影した.

## 免疫組織化学（蛍光抗体法）

酵素抗体法と同じ鼻茸組織をホルマリンで固定した後、パラフィン包埋を行った。またECRS患者および健常人の末梢血を採取し、MACS<sup>®</sup> Cell Separation system (Miltenyi Biotech) を用いて好酸球を分離し、サイトスピンでスライドグラスに置いた。一次抗体としてTRPV3はTRPV3-specific antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich) を用いて、好酸球塩基性蛋白 (ECP) はECP-specific antibody produced in rabbit (Bioss Antibodies) を用いた。二次抗体はAlexa Fluor<sup>®</sup> 594-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen) およびAlexa Fluor<sup>®</sup> 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) を用いた。最後にSlowFade<sup>®</sup> Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific) で処理した後、スライドグラスでカバーした。染色スライドはOlympus BX53 倒立型顕微鏡とcellSens<sup>®</sup> Standard software (Olympus) を用いて撮影した。

## マイクロアレイ

マイクロアレイはRNA-seqで用いたサンプルと同じものを用いた。Illumina BeadArray single-color platform (Illumina) を用いて行った。Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion) を用いて500 ngの全RNAからビオチンラベルcRNAを作成した。cRNAをHumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit (Illumina) でハイブリダイゼーションした後、streptavidin-Cy3 (GE Healthcare) でラベルした後、Illumina BeadStation 500 System (Illumina) でスキャンした。複製した同じサンプルで解析を行い、その相関係数 ( $r^2$ ) が0.995~0.998であることを確認した。データは $\log_2$ で標準化し、RNA-seqのデータと比較した。

## 統計学的解析

全てのデータは特記ない場合には、「平均±標準偏差」を記載している。群間の平均値の差については、2群の場合はStudentのt検定を、3群以上の場合是一元配置分散分析を用い事後比較はTukey法を行った。相関検定はPearsonの検定を用いた。 $p$ 値や補正 $p$ 値 ( $q$ 値) は0.05を有意水準とした。解析に

はAvadis NGSに装備された統計ツールを用い、追加の検定はR version 2.13.1 for MacOSX GUI 1.40-devel Leopard build 64-bit (R-project, <http://www.r-project.org/>)とPrism 5.0b for MacOS(MDF)を用いた。

## 倫理的問題

研究に参加した全患者にはインフォームドコンセントを行い、同意を得た。本研究は福井大学医学系研究倫理審査委員会の承認を得た（承認番号：20120076）。

## 結果

### アラインメントの結果

1サンプルあたり $110.0 \pm 7.1 \times 10^6$ リードのデータセットが得られ、そのうち $58.0 \pm 8.1\%$ がUCSC hg19にアラインできた。ヒトゲノムにおいては全配列の3%未満がエクソンであるが、本研究でマッピングされたリードの $62.0 \pm 2.8\%$ がエクソンに該当した。この結果から、本研究のRNAサンプルは、エクソン配列を効率的に増幅できていることが確認された。

## 発現解析

鼻茸の遺伝子発現レベルを評価するために、得られたシーケンスリードを全て用いた。遺伝子発現レベルは同一アイソフォームにおけるRPKMの総和で表した。RPKMの分布は正規分布ではなく歪んでおり、中央値はNon-ECRSで33.8、ECRSで32.5であった。UCSC hg19にマッピングされたトランスクリプトは36,579個であり、極めて低発現のものを除外すると解析可能なトランスクリプトは19,932個となった。この19,932個のトランスクリプトにおいて発現差解析を行ったところ12個のトランスクリプトが、Non-ECRSとECRSとの群間において5倍以上の有意な発現差を認めた。12個のトランスクリプトのうち10個は既知のものであり、2個は未知のものであった。詳細は表2に記載した。

12個のうち、ECRSにおいて高発現のものは3個であった。そのうち、過去のマイクロアレイの報告で<sup>9)</sup>、末梢血好酸球に発現を認めなかったものとし



表2. 発現に差があったトランスクリプト.

遺伝子	遺伝子座	タイプ	発現差 (倍)	q値 (補正p値)	末梢血好酸球の マイクロアレイ <sup>†</sup>
ECRSで高発現 (発現差>5.0倍)					
<i>SIGLEC8</i>	chr 19	protein-coding	7.76	0.047	P
<i>TRPV3</i>	chr 17	protein-coding	5.81	0.045	A
<i>GPR97</i>	chr 16	protein-coding	5.56	0.047	P
ECRSで低発現 (発現差<-5.0倍)					
<i>LOC285141</i>	chr 2	protein-coding	-5.41	0.045	N/A
<i>HABP2</i>	chr 10	protein-coding	-6.22	0.045	A
<i>CCDC153</i>	chr 11	protein-coding	-6.59	0.046	N/A
<i>LOC100652764</i>	chr 1	miscRNA	-6.79	0.030	N/A
<i>SCG3</i>	chr 15	protein-coding	-7.57	0.030	A
<i>LRRC18</i>	chr 10	protein-coding	-9.98	0.046	A
<i>C1orf129</i>	chr 1	protein-coding	-11.47	0.030	N/A

<sup>†</sup>過去の末梢血好酸球におけるマイクロアレイ解析の結果 (Saito et al.<sup>9)</sup>).

P: 発現あり; A: 発現なし; N/A: データなし.

て TRPV3 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3) が同定された.

### TRPV3 の発現

RNA-seqの結果を確認するために、リアルタイムPCRと免疫組織化学を行った。リアルタイムPCRで20例の non-ECRSと20例の ECRSを比較すると、TRPV3は ECRS群において有意に高い発現を認め、発現レベルは non-ECRS群で  $45.2 \pm 61.9$  (コピー/ng-全RNA), ECRS群で  $640.1 \pm 819.4$ であった (図1A).

さらに、80例 (non-ECRS:20例, 軽症 ECRS:20例, 中等症 ECRS:20例, 重症 ECRS:20例) に対して、免疫組織化学を行った。TRPV3は、鼻茸組織の粘膜上皮と浸潤した血球細胞に発現していた (図1B)。TRPV3を発現している浸潤した血球細胞が好酸球であるかどうかを調べるために、蛍光抗体法にて免疫組織化学を行ったところ、TRPV3陽性細胞に ECPも強く発現していた (図1C)。これらの結果から、鼻茸に浸潤している TRPV3陽性細胞は好酸球であることが示唆された。

次に末梢血好酸球において蛍光抗体法を行ったところ、健常者においても ECRS患者においても好酸球に TRPV3が強く発現していた (図1D)。この結果

は過去のマイクロアレイの結果とは一致しない結果であった<sup>9)</sup>。

### ECRSの重症度と TRPV3 発現との関連

JESREC診断基準の重症度によって TRPV3陽性細胞数を調べると、重症度が上がるにつれて有意に増加していた。TRPV3陽性細胞の数は、それぞれ non-ECRS:  $16.2 \pm 10.9$ /HPF, 軽症 ECRS:  $33.7 \pm 20.6$ /HPF, 中等症 ECRS:  $68.4 \pm 29.9$ /HPF, 重症 ECRS:  $52.9 \pm 25.2$ /HPFであった (図2A)。鼻茸組織中の TRPV3陽性細胞数と好酸球数との相関はわずかであり ( $R=0.27$ ;  $p=0.017$ )、鼻茸上皮における TRPV3の発現数と浸潤する好酸球数とは一致しなかった (図2B)。

### TRPV3 の発現

RNA-seqと同じサンプルを用いてマイクロアレイも行い、そのデータを比較した。同定できたトランスクリプトは RNA-seqで19,932個、マイクロアレイで34,692個であり、両者で共通するものは16,862個であった。RNA-seqとマイクロアレイの結果は強い相関を認め、log変換した発現比による相関は  $R=0.75$  ( $p<0.001$ )であった (図3)。

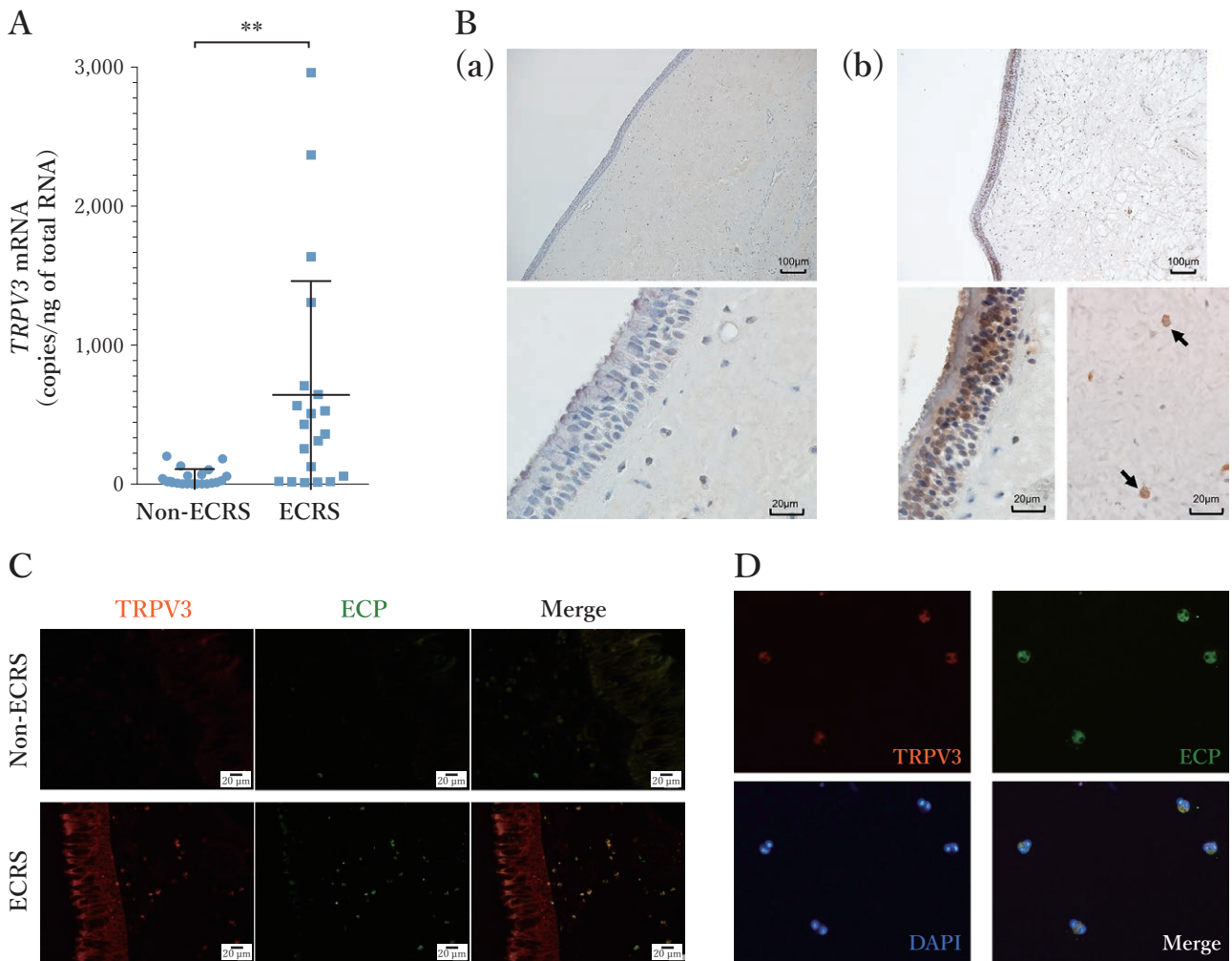


図1. 鼻茸におけるTRPV3の発現.

(A) 鼻茸から全RNAを抽出し、PCRでTRPV3の発現をリアルタイムPCRで測定した。横線とエラーバーは平均と標準偏差をあらわす。\*\* $p < 0.01$ 。

(B) 鼻茸組織におけるTRPV3の免疫組織化学。(a)はnon-ECRS、(b)はECRS。上段は低倍率視野(100倍)、下段は高倍率視野(400倍)。ECRSの鼻茸において上皮組織と浸潤した好酸球(矢印)にTRPV3が発現していたが、non-ECRSには認められなかった。

(C) 鼻茸組織におけるTRPV3とECPの蛍光抗体法。上段はnon-ECRS、下段はECRS。TRPV3とECPの両方がECRSに浸潤する細胞で陽性であった。

(D) 末梢血好酸球におけるTRPV3とECPの蛍光抗体法。ECRS患者においても健常人においてもTRPV3とECPの両方が陽性であった。

## 考察

本研究において、我々はECRS鼻茸のRNA-seqを行った。鼻茸におけるRNA-seqの報告は世界で本研究が初めてである。我々はECRSの鼻茸に多く発現しているTRPV3に注目した。JESREC studyでも示されたように、ECRSは気管支喘息と強い関連がある。TRPV3の属するTRP (transient receptor potential) チャンネルファミリーのサブタイプであるTRPA1

やTRPM8は気管支喘息の発症に重要な役割を果たしている<sup>10) 11)</sup>。しかし、TRPV3が喘息患者の気管支組織に発現しているという報告はない。

TRPチャンネルファミリーは、形質膜上に存在する温度感受性イオンチャンネルであり、6回膜貫通型の構造をしており細胞質側にN末端とC末端が存在する。近年、カプサイシン受容体であるTRPV1をはじめTRPチャンネルファミリーが、創薬のターゲット分子として注目されている。活性化した

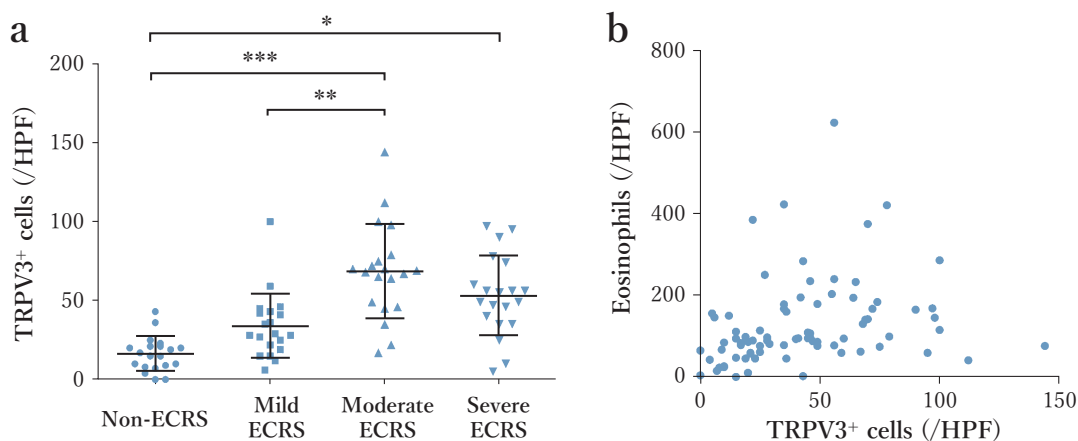


図2. (a) JESREC重症度分類別のTRPV3陽性細胞数。横線とエラーバーは平均と標準偏差をあらわす。発現レベルは重症度と相関していた。\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ 。HPF: 高倍率視野(400倍)。(b) 鼻茸中のTRPV3陽性細胞数と好酸球数との相関。ピアソンの相関係数は $R=0.27$  ( $p=0.017$ )であった。

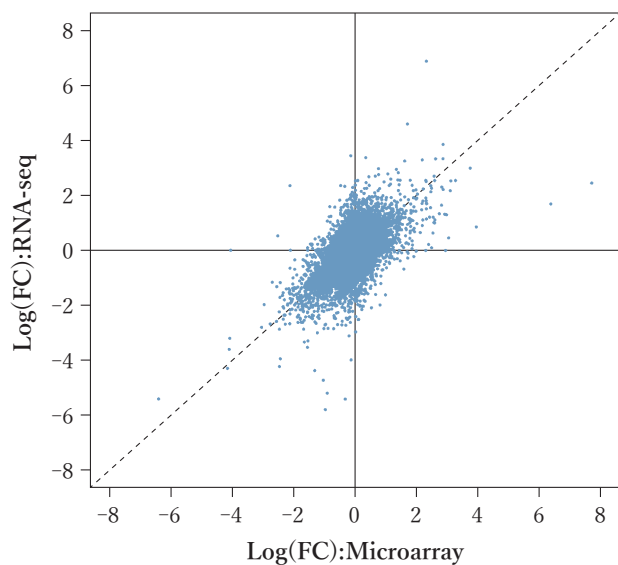


図3. マイクロアレイとRNA-seqとのmRNA発現結果の相関。

10名の患者の同じサンプルを用いてmRNAの発現をマイクロアレイとRNA-seqで行った。16,862遺伝子の発現量を表している。横軸がマイクロアレイ、縦軸がRNA-seq。ピアソンの相関係数は $R=0.75$  ( $p < 0.001$ )であった。いずれのデータも標準化している。

TRPV3が発現した上皮細胞は、プロスタグランジンE2やその他のサイトカインを放出するといわれている<sup>12)</sup>。さらに、TRPV3は一酸化窒素(NO)合成酵素とは独立に亜硝酸塩を減少させ、皮膚内でのNO合成を制御している<sup>13)</sup>。一方、慢性副鼻腔炎患者に対するランダム化比較試験において、カプサイシン

を鼻腔内投与された患者は鼻茸が有意に縮小したという報告がある<sup>14)</sup>。これらの結果からTRPVファミリーは上皮組織の炎症に関与しており、それは気道上皮においても関与している可能性がある<sup>15)</sup>。

TRPV3は皮膚ケラチノサイトにおいて皮膚の温度感覚、皮膚バリア、創傷治癒、発毛、痛みや痒みの知覚など、多様な機能を制御している<sup>16)</sup>。ChengらはケラチノサイトのTRPV3がトランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )や上皮成長因子受容体(EGFR)に関連したシグナル伝達に関与していることを示し、EGFRが活性化すると、TRPV3チャンネルの活性化が高まり、その結果TGF- $\alpha$ が放出されると報告した<sup>17)</sup>。ECRS患者の鼻茸では、non-ECRS患者の鼻茸と比べてTGF- $\alpha$ の発現が極めて高く、さらにTGF- $\alpha$ は腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )と相乗的に働き、それによって分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(TRK)シグナル経路を介して、ヒト粘膜上皮細胞からのムチン(MAC5AC)の発現を高めると報告されている<sup>18)</sup>。もし、TRPV3がECRSの鼻茸においてTGF- $\alpha$ /EGFRのシグナル経路を構成しているとすれば、TRPV3は粘膜における過分泌、粘膜の血管新生、腺細胞や線維芽細胞の増殖などに寄与している可能性があり、ECRSの再発性・難治性に関与しているかもしれない。

TRPV3を刺激する化学活性物質はいくつか同定されている。例えば、植物由来の活性物質として、

樟脳(カンファー)、カルバクロール、オイゲノール、チモール、メンソールなどの香料が挙げられている<sup>19)</sup>。これらの物質の鼻症状への効果については、種々の研究がなされている。Schrieverらはメンソールを口腔内に投与することによって、嗅覚障害患者の主観的な鼻閉感が改善すると報告した<sup>20)</sup>。また、内因性のTRPV3活性物質としてはステロイドホルモンの生体内合成経路の中間体であるファルネシル二リン酸(FPP)が知られている。FPPはTRPV3を活性化するイソプレノイドを生成し、TRPV3を特異的に強く刺激するといわれている<sup>21)</sup>。

一方、TRPV3活性化に対する内因性のアンタゴニストであるレゾルビンなどの $\omega$ -3脂肪酸から合成された化合物は、抗炎症作用および創傷治癒に関連しており、特に17(R)-レゾルビンD1は、TRPV3に特異的な阻害剤であり、TRPV3の電気的感受性に影響を与え、活性を低下させる<sup>22)</sup>。TRPV3のアゴニストおよびアンタゴニストに対する研究が進んでいけば、ECRSに対する新たな治療法が見いだされるかもしれない。

我々の行った同じサンプルにおけるRNA-seqとマイクロアレイの結果は強い相関を認め、他の報告と同程度であった<sup>23)24)</sup>。TRPV3においては、マイクロアレイでは有意な発現差を認めなかったが、RNA-seqでは発現差を認め、リアルタイムPCRと免疫蛍光染色によってRNA-seqの結果が確認された。また、SaitoらがGeneChip® Human Genome U133A probe array (Affymetrix)を用いて行った末梢血好酸球のマイクロアレイ<sup>9)</sup>でも、我々がHumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit (Illumina)を用いて

行ったマイクロアレイでもTRPV3は高発現ではなかった。このようなマイクロアレイとRNA-seqとの間の矛盾は、マイクロアレイキットのTRPV3プローブの感度に起因すると考えられた。プローブの感度は、ターゲットとなる配列への結合強度によって規定され、マイクロアレイによって読まれるシグナル強度に影響を与える<sup>25)</sup>。

マイクロアレイデータとRNA-seqデータとの一致率は種々研究がなされている。例えば、Sultanらは2つの細胞株における遺伝子発現の違いをマイクロアレイとRNA-seqを用いて比較したがその結果は有意な相関を認めた( $R=0.88$ )<sup>26)</sup>。またWangらは酵母菌のトランスクリプトームについてマイクロアレイ<sup>27)</sup>とRNA-seq<sup>28)</sup>の結果を比較し、発現量の低いトランスクリプトにおいては、2者の相関は低く( $R=0.099-0.177$ )、発現量がある程度高いトランスクリプトにおいては、相関が比較的高いことを示した( $R=0.509$ )<sup>29)</sup>。このことは、RNA-seqと比べてマイクロアレイはダイナミックレンジが狭いことを反映している。その他の報告でも両者の一致率が高いものと低いものと混在している<sup>24)30)</sup>。このような研究間における一致率の差は両者の方法を適応させる基準や評価法に整合性がとれていないからだと思われる。本研究では、RNA-seqデータとマイクロアレイデータとの一致率は高く、log変換した発現差の相関も高い結果であったことから、本実験は高いクオリティを示している。

本研究の成果は、第12回(2015年度)日本アレルギー学会学術大会賞を受賞した。

(徳永 貴広)

## 文献

- 1) DeRisi J, Penland L, Brown PO, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet.* 1996;14(4):457-460.
- 2) Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods.* 2008;5(7):621-628.
- 3) Cloonan N, Forrest ARR, Kolle G, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat Methods.* 2008;5(7):613-619.
- 4) Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 2008;40(12):1413-1415.
- 5) **Tokunaga T, Ninomiya T, Kato Y, et al. The significant expression of TRPV3 in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2017;66(4):610-616.**



- 6) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy*. 2015; 70(8):995-1003.
- 7) Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.
- 8) Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B*. 2012;57(1):289-300.
- 9) Saito H, Matsumoto K, Okumura S, et al. Gene expression profiling of human mast cell subtypes: an in silico study. *Allergol Int*. 2006;55(2):173-179.
- 10) Nassini R, Pedretti P, Moretto N, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42454.
- 11) Xing H, Ling JX, Chen M, et al. TRPM8 mechanism of autonomic nerve response to cold in respiratory airway. *Mol Pain*. 2008;4:22.
- 12) Huang SM, Lee H, Chung M-K, et al. Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2. *J Neurosci*. 2008;28(51):13727-13737.
- 13) Miyamoto T, Petrus MJ, Dubin AE, et al. TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. *Nat Commun*. 2011;2:369.
- 14) Zheng C, Wang Z, Lacroix JS. Effect of intranasal treatment with capsaicin on the recurrence of polyps after polypectomy and ethmoidectomy. *Acta Otolaryngol*. 2000;120(1):62-66.
- 15) Grace MS, Baxter M, Dubuis E, et al. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. *Br J Pharmacol*. 2014;171(10):2593-2607.
- 16) Nilius B, Bíró T. TRPV3: a “more than skinny” channel. *Exp Dermatol*. 2013;22(7):447-452.
- 17) Cheng X, Jin J, Hu L, et al. TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell*. 2010;141(2):331-343.
- 18) Ishinaga H, Shah SA, Sakaida H, et al. The role of transforming growth factor- $\alpha$  on mucin overproduction in eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Pharmacology*. 2011;88(5-6):302-308.
- 19) Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol*. 2007;151(4):530-540.
- 20) Schriever VA, Hummel T. Subjective changes in nasal patency after chewing a menthol-containing gum in patients with olfactory loss. *Acta Otolaryngol*. 2015;135(3):254-257.
- 21) Bang S, Yoo S, Yang T-J, et al. Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing molecule via specific activation of TRPV3. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19362-19371.
- 22) Bang S, Yoo S, Yang TJ, et al. 17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception. *Br J Pharmacol*. 2012;165(3):683-692.
- 23) Fu X, Fu N, Guo S, et al. Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC Genomics*. 2009;10:161.
- 24) Zhao S, Fung-Leung W-P, Bittner A, et al. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e78644.
- 25) Lemoine S, Combes F, Le Crom S. An evaluation of custom microarray applications: the oligonucleotide design challenge. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6):1726-1739.
- 26) Sultan M, Schulz MH, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*. 2008;321(5891):956-960.
- 27) David L, Huber W, Granovskaia M, et al. A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(14):5320-5325.
- 28) Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 2008;320(5881):1344-1349.
- 29) Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57-63.
- 30) Malone JH, Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol*. 2011;9(1):34.



## 3-2

## 好酸球性副鼻腔炎における CST1 の発現と機能的解析

## サマリー

CST1 は重症好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮で強い発現を示す。精製した鼻茸上皮細胞を IL-4+dsRNA+CST1 で刺激すると、TSLP の発現が有意に上昇する。鼻茸上皮細胞への TSLP あるいは IL-33 の刺激は、CST1 の発現を誘導する。また、鼻茸線維芽細胞に対する CST1 の刺激は、CCL11 と periostin の発現を誘導する。CST1 は、鼻茸形成・増悪に関わるさまざまな因子と相互作用することで Th2/好酸球性炎症として作用し、鼻茸の重症化、難治性、再発に関わる。

## はじめに

RNA-sequencing (RNA-seq) を用いた遺伝子発現の解析は、新規疾患関連遺伝子を同定し、疾患の病態メカニズムを解明するためのスクリーニングとして大変有用である。我々は好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) の病態を解明するために、次世代シーケンサーを用いて、鼻茸の RNA-seq における transcriptome 解析を行った。CRSwNP 患者において、同一患者の鼻茸と下鼻甲介を比較した解析では、実に 3,000 以上の遺伝子で有意差を認めた<sup>1)</sup>。鼻茸で特に高い発現を示した 10 遺伝子は、periostin, CST1, SERPINB3, CCL18, IGFBP3, TUBB4B, ALOX15, CSTB, SERPINF1, TPPP3 であった。我々は、これらの遺伝子の中で、CST1 という分子に着目した。

Cystatin family は、アミノ酸配列の違いから type 1, type 2, type 3 の 3 つの family に分類され、CST1 (cystatin SN) は type 2 cystatin family に属する分子である。Type 2 cystatin family は、唾液腺や涙腺の外分泌上皮から産生され、唾液や涙液中に含まれることが知られている<sup>2)</sup>。現在では、膀胱や尿管、精巢上皮、また皮膚疾患や炎症性肺疾患など、さまざまな部位、疾患での発現が報告されている。Cystatin family は protease inhibitor という重要な役割を有するが、その作用の強さはさまざまである。Type 1 cystatin family や cystatin C, cystatin F は protease inhibitor として強い作用を示すが、一方で cystatin S,

cystatin SA, CST1 ではその作用が弱いといわれている<sup>3)</sup>。また、cystatin family は protease inhibitor 以外にもさまざまな働きが報告されており、炎症や腫瘍形成過程においても重要な役割を果たしている<sup>4)</sup>。

CRSwNP 患者の鼻茸に対する遺伝子発現解析の結果を踏まえて、我々は CST1 が ECRS の病態に関与していると考えた。そこで、鼻茸中、特に ECRS の鼻茸における CST1 の発現や、鼻茸内での CST1 の機能について検討を行った。

## 方法

## Real-time polymerase-chain reaction

鼻茸の RNA は TRIzol (Ambion) と DNase I を用いて抽出した。鼻茸上皮細胞と鼻茸線維芽細胞の RNA は NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) と rDNase を用いて抽出した。cDNA は High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて合成した。遺伝子発現は TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) を用いて測定した。Primer は、CST1 (Hs0060696), thymic stromal lymphopoietin (TSLP, Hs00263639), cytokine receptor-like factor 2 (CRLE2, Hs00845692), interleukin (IL) -1 receptor-like 1 (IL1RL1, Hs00249384), CC chemokine ligand 11 (CCL11, Hs00237013), periostin (POSTN, Hs01566750), glyceraldehyde-

3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, 4352934E) を使用した (Applied Biosystems). mRNA 発現の標準化には *GAPDH* を用いた.

### Immunohistochemistry

鼻茸をパラフィン包埋し, 4  $\mu\text{m}$  で薄切した. 脱パラ, 賦活化, ブロッキング後, rabbit anti-CST1 antibody (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (aa 31–80; LS-B5996, LSBio, Seattle, WA) (4°C overnight), Envision dual-link system-HRP (Dako) (1時間室温), DAB/Tris solution (Muto Pure Chemicals, Tokyo) (12分室温) で染色した. CST1 の発現は, 1視野あたりの上皮細胞における CST1 発現の割合を数値化することで半定量化した (% CST1 expression rate in epithelial cells per HPF 0%, 0 (no expression) ; 0%~49%, 1 (low expression) ; 50%~79%, 2 (moderate expression) ; and >80%, 3 (high expression)). 1サンプルにつき3か所測定し, 平均値を semiquantitative score とした.

### 細胞培養

ECRS由来の鼻茸から上皮細胞と線維芽細胞を精製した. 細胞数は  $5 \times 10^4$  cells/well とし, 刺激濃度は, IL-4 (100 ng/ml), double-stranded RNA (dsRNA, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), CST1 (100 ng/ml), TSLP (1, 10, or 100 ng/ml), and IL-33 (1, 10, or 100 ng/ml) とした. 6時間刺激後, 細胞を回収し, real-time PCR を用いて mRNA 発現を解析した. また, 24時間刺激後の上清を回収し, ELISA を用いて蛋白発現を解析した. siRNA を用いた実験に関しては, GenomONE-Si (Ishihara Sangyo Kaisha, Osaka, Japan) を用いて *CRLF2* (s195343), *IL1RL1* (s225093), negative control No.1 siRNA (4390843) に対する siRNA を鼻茸上皮細胞に移入した. 移入24時間後に, TSLP (100 ng/ml) もしくは IL-33 (100 ng/ml) で6時間刺激し, 細胞を回収し, CST1 の mRNA 発現を解析した.

### 統計解析

GraphPad Prism software (San Diego, CA) を用いて統計解析を行った.  $p < 0.05$  を統計学的に有意と判定した.

## 結果

### 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸における CST1 の発現

まず, CRSwNP患者を ECRS と non-ECRS に分類し, CST1 の発現を比較検討した. CRSwNP患者から採取した鼻茸における, CST1 mRNA の発現を real-time PCR を用いて解析すると, non-ECRS患者群の鼻茸に比べて, ECRS患者群の鼻茸で, CST1 mRNA の発現が有意に高値であった (図1a). 次に免疫組織化学を用いて鼻茸における CST1 の発現を調べると, やはり non-ECRS患者の鼻茸に比べて, ECRS患者の鼻茸で CST1 の強い発現を認めた (図1b, c, d). 免疫組織化学では, CST1 は特に鼻茸上皮細胞に発現していた. JESREC の重症度分類<sup>5)</sup> に応じて鼻茸を分類し, 上皮に発現する CST1 の半定量分析を行うと, severe ECRS患者群で最も CST1 の発現が高いことが明らかとなった (図1e). CRSwNP患者の鼻茸内での好酸球数と CST1 発現との相関を調べると, これらに正の相関関係を認めた (図2a, b).

### 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸における CST1 の機能的解析

CST1 が severe ECRS の鼻茸上皮で高発現していることが明らかとなった. そこで鼻茸中の CST1 の機能について検討した. CST1 が鼻茸組織内で関わる分子について, ECRS との関連が報告されている分子との相関を調べた. すると, CST1 mRNA と TSLP, IL-33, CCL11 (eotaxin-1), periostin mRNA との間で, 正の相関関係が認められた (図3a~d). そこで, ECRS患者の鼻茸組織から精製した鼻茸上皮細胞と鼻茸線維芽細胞を用いて, これらの関係を検討した.

精製した鼻茸上皮細胞に, IL-4, dsRNA, CST1 で刺激をし, TSLP の発現を調べた. まず, IL-4 と dsRNA による共培養により, 鼻茸上皮細胞からの TSLP の発現が上昇した. 興味深いことに, IL-4+dsRNA による刺激に比べて, IL-4+dsRNA+CST1 による共刺激では, 更に TSLP の発現が増強した (図4a, b).

CST1 の発現における TSLP と IL-33 の効果を調べるために, 鼻茸上皮細胞を, TSLP あるいは IL-33 で

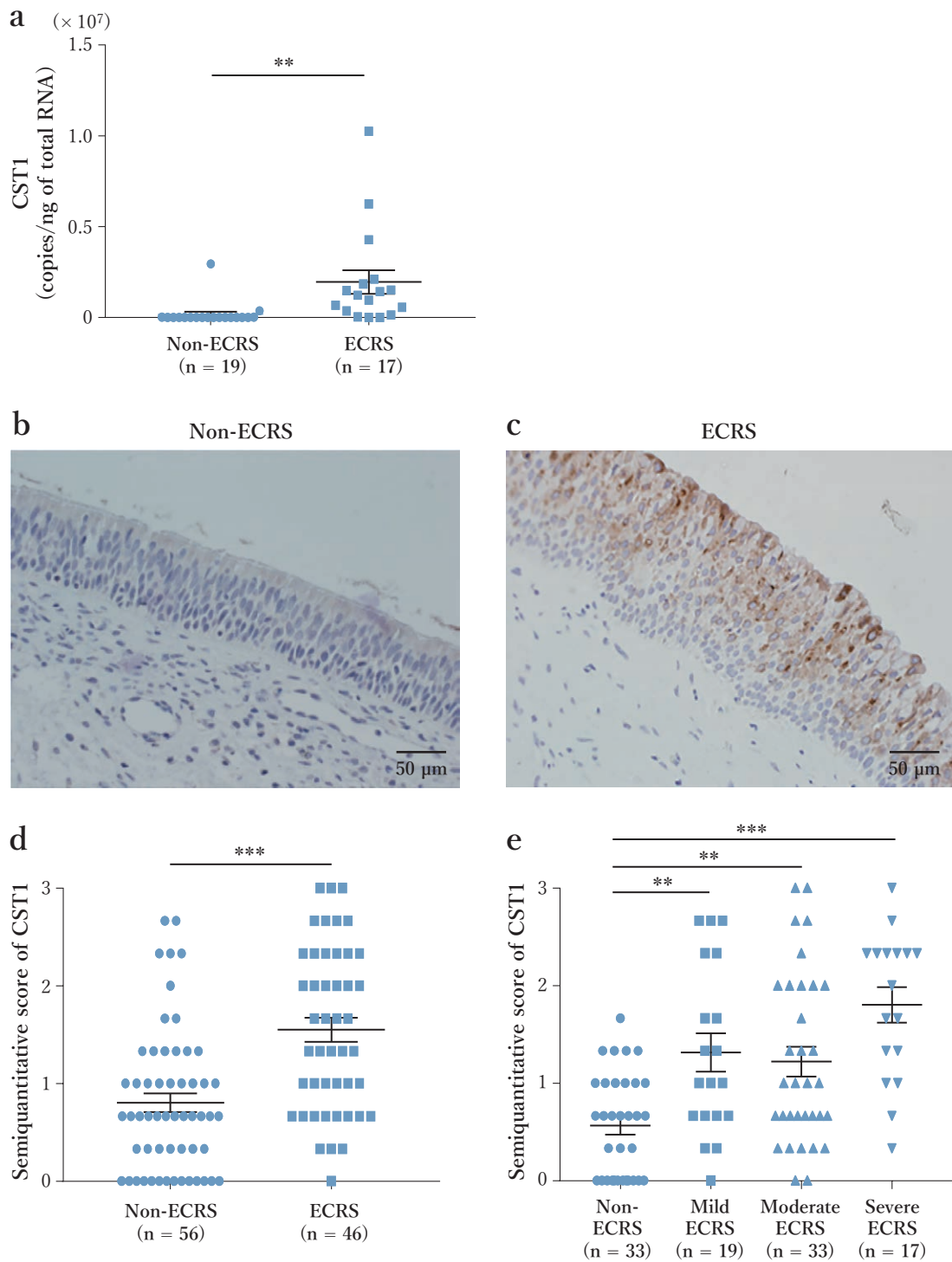


図1. CRSwNP患者の鼻茸におけるCST1の発現。

(a) ECRS患者とnon-ECRS患者の鼻茸におけるCST1 mRNAの発現。(b, c) non-ECRS患者(b)とECRS患者(c)の鼻茸におけるCST1の免疫組織化学。(d) 鼻茸上皮細胞におけるCST1発現のsemiquantitative score。(e) JESREC scoreを用いてECRSの重症度を分類しCST1発現のsemiquantitative scoreを解析した。SEM, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

刺激し、CST1の発現を解析した。TSLPもしくはIL-33の単独刺激によって、鼻茸上皮細胞からのCST1の発現が誘導された(図4c, d)。更に、TSLP・IL-33シグナリングとCST1発現誘導との関係を検

証するために、TSLPに対するレセプターであるCRLF2とIL-33のレセプターであるIL1RL1(ST2)のsiRNAを用いてノックダウンさせる実験を行った。CRLF2あるいはST2に対するsiRNAを鼻茸上皮細胞

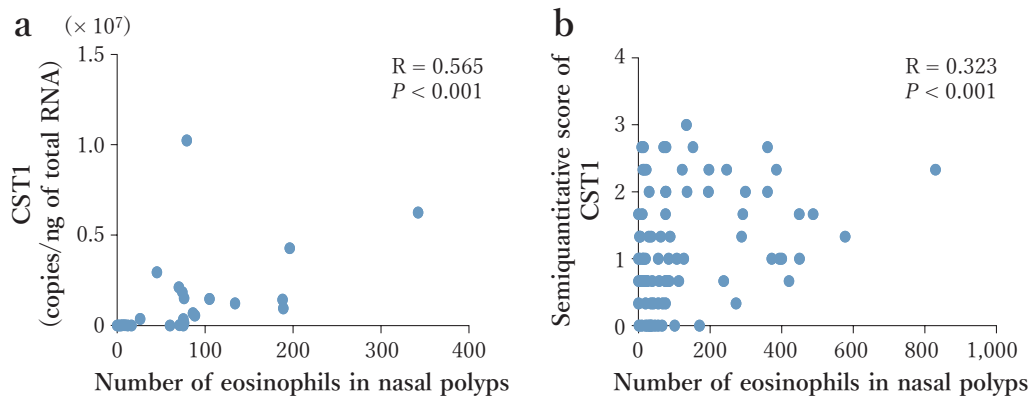


図2. CRSwNP患者における鼻茸中のCST1発現と好酸球数の相関。

(A) CST1 mRNAの発現と好酸球数の相関. n=36. (B) CST1の免疫組織化学と好酸球数の相関. n=102.

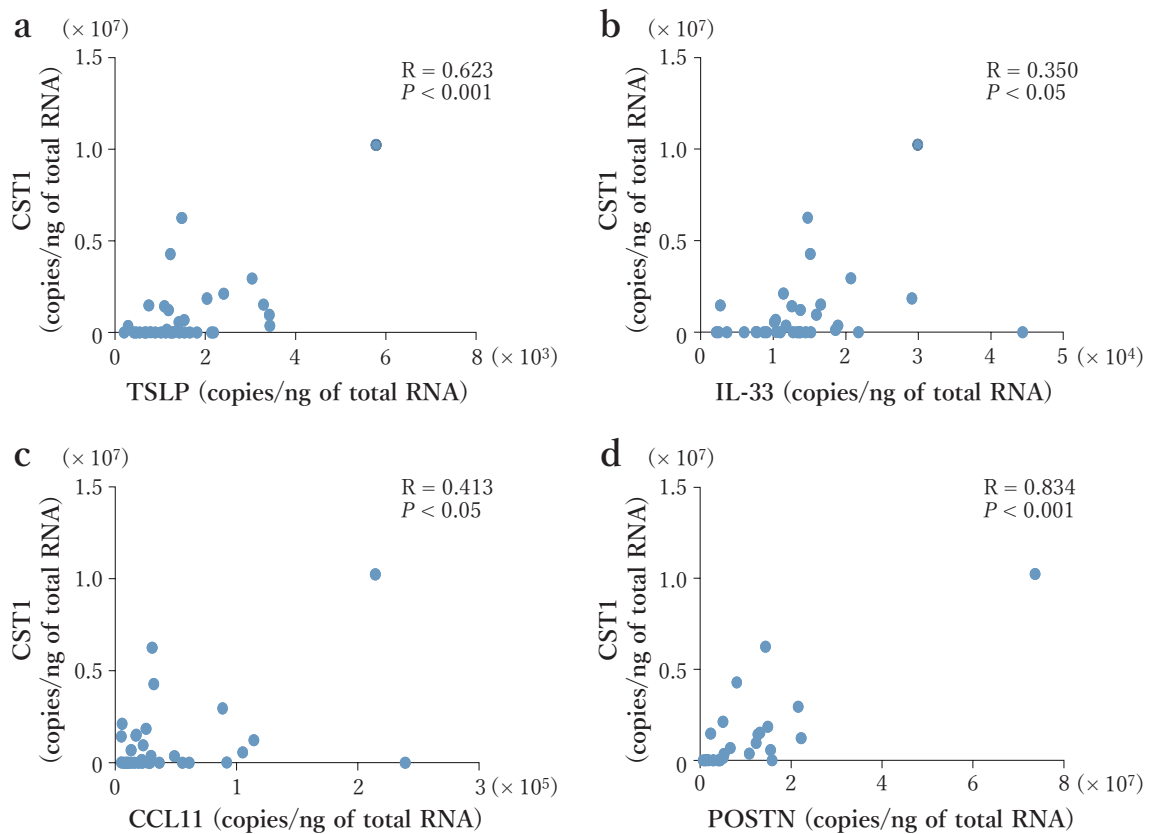


図3. CRSwNP患者における鼻茸中のCST1 mRNA発現とTSLP, IL-33, CCL11, POSTN (periostin) mRNAの相関。

CRSwNP患者の鼻茸からmRNAを抽出し、それぞれの発現と相関関係を解析した. n=36.

に transfection した後、それぞれ TSLP もしくは IL-33 で刺激し、CST1 の発現を解析した。すると、siRNA を transfection した細胞では、negative control siRNA を transfection した細胞に比べて、TSLP もしくは

IL-33 の刺激による CST1 の発現誘導が抑制された (図5a~d)。つまり、鼻茸上皮細胞への TSLP, IL-33 による刺激は、それぞれのレセプターのシグナル経路を介して、CST1 の発現を誘導することが示された。

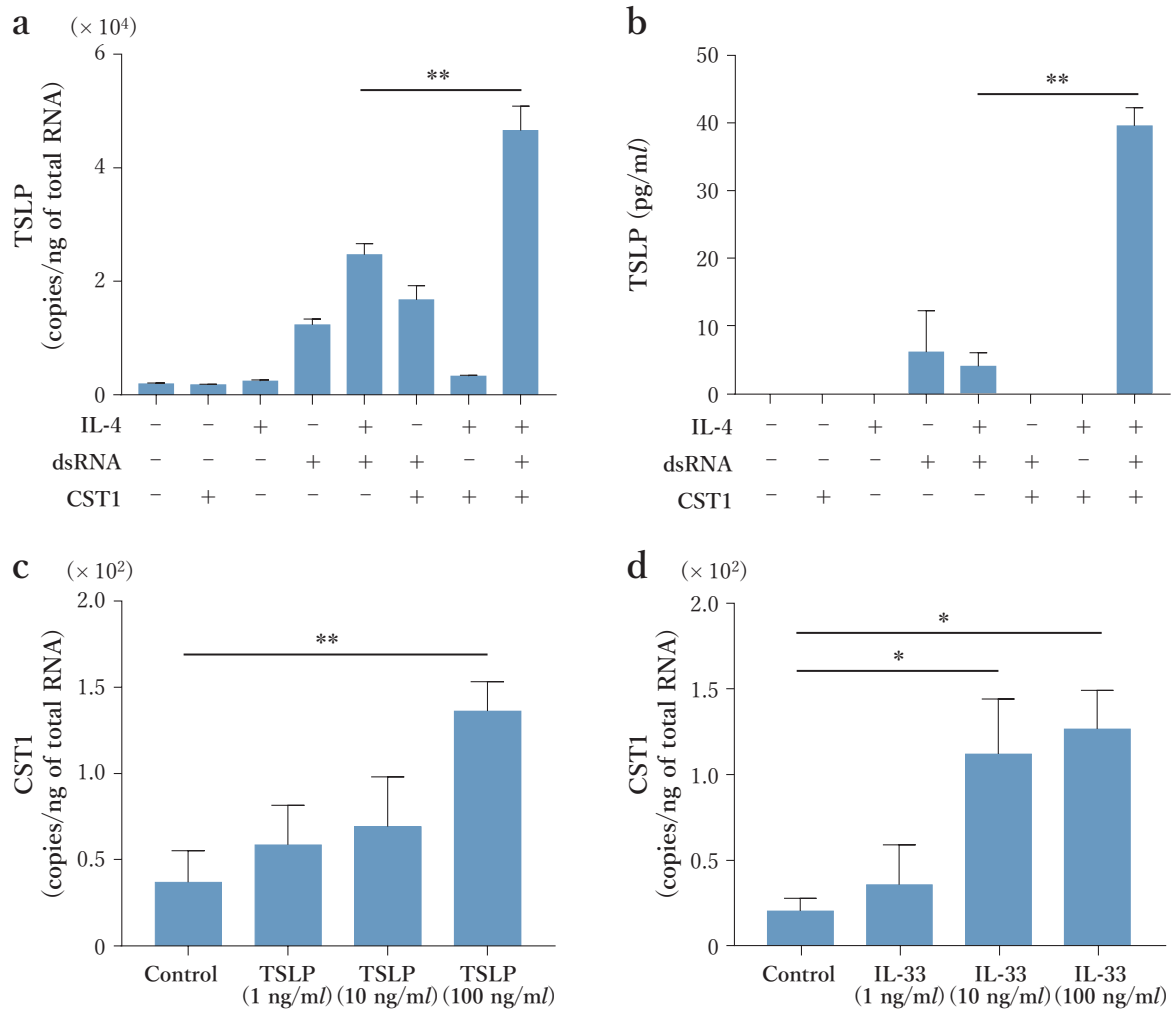


図4. 鼻茸上皮細胞におけるCST1と上皮由来サイトカインの関係。

(a, b) 鼻茸上皮細胞をIL-4 (100 ng/ml), dsRNA (50 µg/ml), CST1 (100 ng/ml) で刺激した。(a) 6時間刺激後, 細胞を回収し, TSLPのmRNA発現を解析した。(b) 24時間刺激後, 上清を回収し, TSLP蛋白濃度を解析した。(c, d) 鼻茸上皮細胞をTSLP (1~100 ng/ml) (c) もしくはIL-33 (1~100 ng/ml) (d) で6時間刺激し, CST1のmRNA発現を解析した。n=6, SEM, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ 。

鼻茸中のCCL11 (Eotaxin 1) におけるCST1の役割を調べるため, 鼻茸上皮細胞, 鼻茸線維芽細胞をCST1で刺激した後に, CCL11の発現を解析した。すると, CST1は鼻茸上皮細胞からのCCL11発現には影響を及ぼさなかったが, 鼻茸線維芽細胞からのCCL11の発現を誘導した(図6a, b)。また, 鼻茸線維芽細胞をCST1で刺激すると, periostinの発現が誘導された(図6c, d)。

## 考察

RNA-seqにおけるtranscriptome解析では, 鼻茸

中のCST1の発現は, 下鼻甲介と比較して27.2倍高発現していた。また, non-ECRSとECRSの鼻茸を比較したRNA-seqによる解析では, ECRSの鼻茸でCST1の発現が高い傾向にあった<sup>6)</sup>。Real-time PCRや免疫組織化学を用いた解析においても, CST1はsevere ECRSの鼻茸で強く発現していた。これらの結果は, CST1がECRSの重症度・難治性と関連しており, 鼻茸内でTh2/好酸球性炎症に関与すると考えられた。一方で, Kouzakiらは, cystatin familyの一つであるcystatin AがECRS患者の鼻茸で有意に低値であり, 気道上皮において防御的な役割を担っていると報告している<sup>7)</sup>。Cystatin familyは, 少なくと



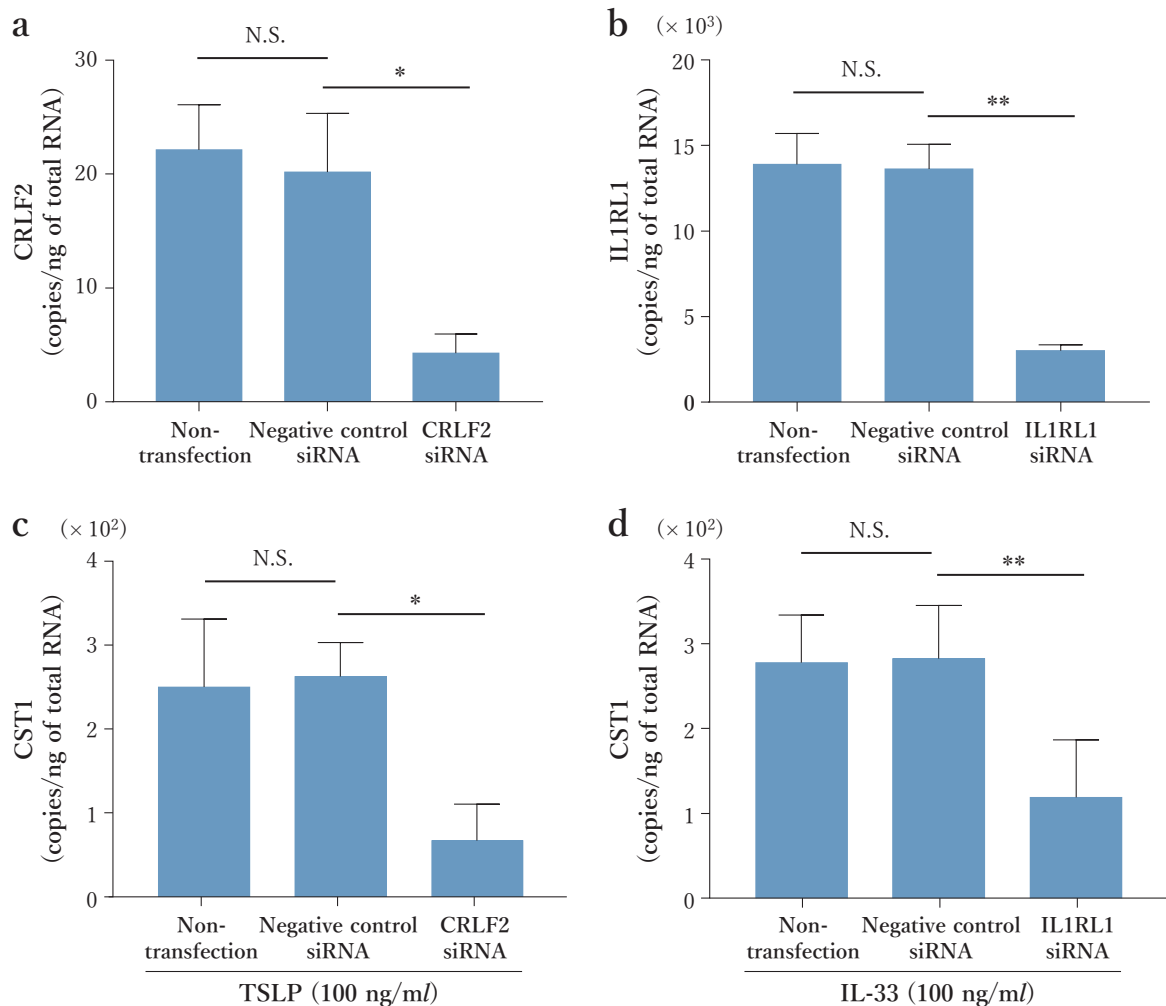


図5. 鼻茸上皮細胞のCRLF2とIL1RL1を介した反応。

(a, b) CRLF2 (a) あるいはIL1RL1 (ST2) (b) に対するsiRNAを鼻茸上皮細胞にtransfectionした。CRLF2 (a) あるいはIL1RL1 (b) のmRNAを測定し、発現が抑制されていることを確認した。(c, d) 移入した細胞をそれぞれTSLP (100 ng/ml) (c), IL-33 (100 ng/ml) (d) で6時間刺激し、CST1の発現を解析した。n=6, SEM, N.S. not significant. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

も17種類の遺伝子から構成され、3つのsubfamilyに分類されている。それぞれの遺伝子が持つ作用はさまざま、cystatin Aはtype 1 cystatin subfamilyに属しており、protease inhibitorとして強い作用を有する。CST1はtype 2 cystatin subfamilyに属しており、protease inhibitor以外にも、炎症・Th2環境のupregulationなどの作用を有している<sup>8)</sup>。アレルギー性鼻炎に関しては、抗原曝露中のアレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介粘膜ではCST1が高発現している<sup>9)</sup>。一方で、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおいて、CST1はprotease inhibitorとして作用し防御的役割を持つ<sup>10)</sup>。つまり、好酸球性副鼻腔炎では鼻

茸増悪因子として作用し、アレルギー性鼻炎においては抑制因子として作用する。CST1が、鼻副鼻腔のTh2炎症性疾患に対して相反する2つの機能を有することは、両者を区別する観点からも大変興味深い。

TSLPとIL-33は、2型炎症において中心的な役割を担う上皮由来サイトカインである<sup>11)</sup>。近年、上皮由来サイトカインと難治性好酸球性副鼻腔炎との関連が注目されている。NagarkarらはTSLP mRNAが好酸球浸潤を伴う鼻茸で有意に高値であり、難治性鼻茸の2型炎症に重要な役割を担うと報告している<sup>12)</sup>。また、IL-33に関しては、難治性慢性副鼻腔炎では、治療反応性慢性副鼻腔炎に比べて、IL-33の発

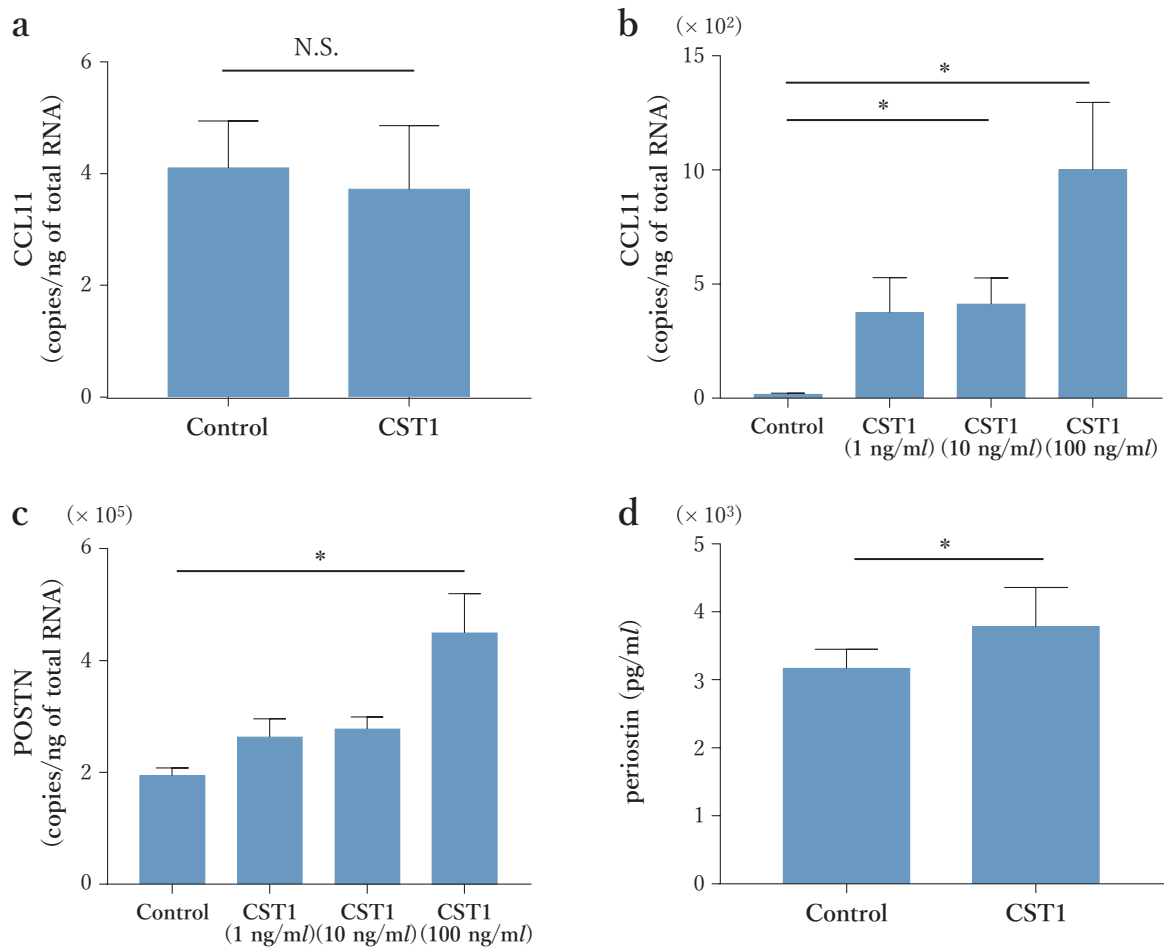


図6. 鼻茸線維芽細胞から産生されるCCL11とPOSTONに対するCST1の効果.

(a) 鼻茸上皮細胞をCST1 (100 ng/ml) で6時間刺激し、CCL11のmRNA発現を解析した。(b, c) 鼻茸線維芽細胞をCST1 (1~100 ng/ml) で6時間刺激し、CCL11とPOSTONのmRNA発現を解析した。(d) 鼻茸線維芽細胞をCST1 (100 ng/ml) で24時間刺激し、上清中のperiostinの蛋白濃度を解析した。n=6, SEM, N.S. not significant. \* $p<0.05$ .

現が高値であるとの報告がある<sup>13)</sup>。RNA-seqにおけるtranscriptome解析においても、これらのサイトカインの発現は、下鼻甲介より鼻茸で高い傾向にあった。鼻茸上皮細胞を用いた実験では、IL-4+dsRNAによる刺激に比べて、IL-4+dsRNA+CST1による共刺激ではTSLPの発現が増強した。つまり、CST1はIL-4やdsRNAと相乗効果を示す。2型サイトカインやウイルス感染はECRSの病態において、重要な増悪因子である。ECRSは、Th2優位の好酸球浸潤によって特徴付けられるとともに、Th2環境下で感染が起こると上皮由来サイトカインの放出を介して、Th2炎症を増幅させる<sup>14)15)</sup>。ECRSの鼻茸では、CST1、IL-4、dsRNAの相乗作用によって発現が上昇したTSLPが、Th2細胞やILC2sの活性化を促し、こ

れらの細胞によって放出される2型サイトカインを介して、好酸球浸潤やTh2炎症が増幅される。また、鼻茸上皮細胞へのTSLP、IL-33による刺激は、それぞれのレセプターのシグナル経路を介して、CST1の発現を誘導する。このようにECRSの鼻茸内では、CST1とTSLP、IL-33とのpositive feedbackを通して難治性鼻茸が形成される。

難治性鼻茸の形成に重要な線維芽細胞は、炎症細胞の誘導や炎症反応に関わるextracellular matrix proteinsの産生細胞である<sup>16)</sup>。本研究では、CST1は鼻茸線維芽細胞からのCCL11の発現を誘導した。CCL11やRANTESのようなケモカインの放出は、好酸球に発現しているCCR3を介して好酸球を遊走させる。CCL11は鼻茸内における好酸球浸潤に密接に

関連している<sup>17)</sup>。RNA-seqにおけるtranscriptome解析では、CCL11は好酸球浸潤を伴う鼻茸で高発現している。CST1は線維芽細胞からCCL11を産生させることで、鼻茸内での好酸球遊走を誘導する。RNA-seqを用いた解析において、periostinは鼻茸で極めて高い発現を示している。periostinは、主に線維芽細胞で産生されるextracellular matrix proteinである<sup>18)</sup>。Type 2炎症に関わる重要因子であり、好酸球のエフェクター機能を増強させる。好酸球性副鼻腔炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎など、type 2炎症を主体とする疾患では血清periostin濃度が上昇しており、新規バイオマーカーとして注目されている<sup>19)</sup>。鼻茸線維芽細胞をCST1で刺激すると、periostinの発現が誘導された。つまり、CST1は鼻茸線維芽細胞からのperiostin産生を誘導することで、ECRSの病態に関与する。CST1は上皮細胞のTSLPやIL-33、また線維芽細胞のCCL11やperiostinとの相互作用を介して、鼻茸内の好酸球浸潤やTh2炎症に関わっている。

## まとめ

CST1はsevere ECRSの鼻茸上皮細胞に強く発現しており、鼻茸の重症度、難治性と相関している。TSLPやIL-33は上皮細胞内でのCST1の発現を誘導する。誘導されたCST1はdsRNAやIL-4と協同し、TSLPの発現を増強させる。増強されたTSLPは、Th2細胞の活性化やILC2sの働きにより、IL-5やIL-13といった2型サイトカインを放出させる。これにより、好酸球遊走、ムチンの産生が亢進する。更に、CST1は、細胞外において線維芽細胞に作用し、CCL11やperiostinの放出を誘導する。これらもまた、type 2/好酸球性炎症に関わる重要な因子である。CST1は鼻茸内において、このようなメカニズムでTh2/好酸

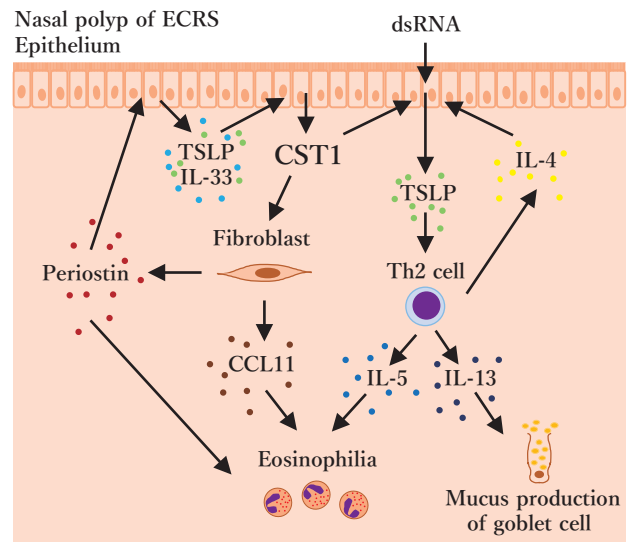


図7. ECRSの鼻茸におけるCST1の役割。

ECRSの鼻茸上皮細胞では、CST1が高発現している。TSLPやIL-33は上皮細胞内でのCST1の発現を誘導する。誘導されたCST1はdsRNAやIL-4とともにTSLPの発現を増強させる。増強されたTSLPは、Th2細胞の活性化やILC2sの働きにより、2型サイトカインを放出させ、好酸球遊走、ムチンの産生が亢進する。更に、CST1は線維芽細胞に作用し、CCL11やperiostinの放出を誘導する。CCL11は好酸球の遊走に寄与し、periostinはtype 2炎症や好酸球のエフェクター機能増強に関わる。

球性炎症に関わる因子として作用し、鼻茸の重症化、難治性、再発に関わる(図7)<sup>20)</sup>。ECRSに関わる多様な因子とCST1との関係を更に解析することは、ECRSの病態を解明するために、非常に有用である。ECRSは術後の再発率が高く、鼻茸の制御に難渋する症例が多い。難治性鼻茸の術後再発を防ぐために、CST1をtargetとした治療戦略が有用かもしれない。

(加藤 幸宣)

本研究の成果は、第5回(2018年度)日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会奨励賞を受賞した。

## 文献

- 1) Ninomiya T, Noguchi E, Haruna T, et al. Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinitis with nasal polyps. *Sci Rep.* 2018;30;8:11450.
- 2) Isemura S, Saitoh E, Sanada K. Characterization of a new cysteine proteinase inhibitor of human saliva, cystatin SN, which is immunologically related to cystatin S. *FEBS Lett.* 1986;198:145-149.

- 3) Ochieng J, Chaudhuri G. Cystatin superfamily. *J Health Care Poor Underserved*. 2010;21:51-70.
- 4) Cao X, Li Y, Luo RZ, et al. Expression of Cystatin SN significantly correlates with recurrence, metastasis, and survival duration in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep*. 2015;5:8230.
- 5) **Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: The JESREC Study. *Allergy*. 2015;70:995-1003.**
- 6) **Tokunaga T, Ninomiya T, Kato Y, et al. The significant expression of TRPV3 in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int* 2017;66:610-616.**
- 7) Kouzaki H, Matsumoto K, Kikuoka H, et al. Endogenous protease inhibitors in airway epithelial cells contribute to eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195:737-747.
- 8) Kim JT, Lee SJ, Kang MA, et al. Cystatin SN neutralizes the inhibitory effect of cystatin C on cathepsin B activity. *Cell Death Dis*. 2013;4:e974.
- 9) **Imoto Y, Tokunaga T, Matsumoto Y, et al. Cystatin SN upregulation in patients with seasonal allergic rhinitis. *PLoS One* 2013;8:e67057.**
- 10) **Fukuoka A, Matsushita K, Morikawa T, et al. Human cystatin SN is an endogenous protease inhibitor that prevents allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143:1153-1162.**
- 11) Divekar R, Kita H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015;15:98-103.
- 12) Nagarkar DR, Poposki JA, Tan BK, et al. Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:593-600.
- 13) Reh DD, Wang Y, Ramanathan M, et al. Treatment-recalcitrant chronic rhinosinusitis with polyps is associated with altered epithelial cell expression of interleukin-33. *Am J Rhinol Allergy*. 2010;24:105-109.
- 14) Lam K, Schleimer R, Kern RC. The etiology and pathogenesis of chronic rhinosinusitis: a review of current hypotheses. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15.
- 15) Krysko O, Teufelberger A, Van Nevel S, et al. Protease/antiprotease network in allergy: the role of *Staphylococcus aureus* protease-like proteins. *Allergy*. 2019;74:2077-2086.
- 16) Carroll WW, O'Connell BP, Schlosser RJ, et al. Fibroblast levels are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps and are associated with worse subjective disease severity. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6:162-168.
- 17) Hulse KE, Stevens WW, Tan BK, et al. Pathogenesis of nasal polyposis. *Clin Exp Allergy* 2015;45:328-346.
- 18) Jia G, Erickson RW, Choy DF, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:647-654.
- 19) Izuhara K, Matsumoto H, Ohta S, et al. Recent developments regarding periostin in bronchial asthma. *Allergol. Int*. 2015;64 Suppl, S3-S10.
- 20) **Kato Y, Takabayashi T, Sakashita M, et al. Expression and Functional Analysis of CST1 in Intractable Nasal Polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;59(4):448-457.**

## 3-3

## 好酸球性副鼻腔炎鼻茸におけるメタボローム解析

## ● サマリー

アレルギー炎症を惹起するエイコサノイドは、脂肪酸由来の生理活性脂質であり、これまでも好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis; ECRS) との深い関連性が指摘されていた。ECRS と非好酸球性副鼻腔炎 (non-ECRS) の鼻茸組織中  $\omega$ -6 系と  $\omega$ -3 系脂肪酸代謝産物濃度を液体クロマトグラフィーと質量分析、およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化法にて解析した。

ECRS と non-ECRS の鼻茸中に存在する 158 種の脂質メディエーターを一斉解析した結果、 $\omega$ -6 系脂肪酸が 15-Lipoxygenase (15-LOX) によって代謝された炎症性脂質メディエーターが ECRS 鼻茸中に有意に多かった。一方で、ECRS の鼻茸中には、同じく 15-LOX で  $\omega$ -6 系の脂肪酸から代謝された Lipoxin A4,  $\omega$ -3 系の Resolvin D2 といった炎症収束脂質メディエーターも有意に増加していた。このことは、ECRS では炎症状態から恒常状態に回帰させようとするメカニズムも働いているが、実際には機能していないことが判明した。さらに、ECRS 鼻茸中のアラキドン酸含有ホスファチジルコリンの有意な低下も認められた。

## はじめに

脂肪酸由来の生理活性脂質による炎症は重要であり、副鼻腔炎との関連が報告されている<sup>1)</sup>。不飽和脂肪酸は $\omega$ -6系と $\omega$ -3系からなる。有名なアラキドン酸 (Arachidonic acid; AA) は、 $\omega$ -6系のリノール酸 (Linolenic acid; LA) から代謝され、エイコサノイドと称される炎症性脂質メディエーターであるプロスタグランジン (Prostaglandin; PG), トロンボキサン (Thromboxan; TX), ロイコトリエン (Leukotrien; LT) に代謝されていく。とりわけこれらの代謝物は、アラキドン酸代謝カスケードとして知られており、代謝酵素であるシクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase; COX), リポキシゲナーゼ (Lipoxygenase; LOX), チトクローム P450 (Cytochrome P450; CYP450) によって分解されていく。PG と TX は COX で、LT は 5-LOX で代謝される。これらのことは、アレルギーに関与する医師ならばほとんど知っているが、実は、COX, LOX, CYP450 は **図1**, **図2** に示すように、リノール酸, DGLA, AA,  $\omega$ -3系のリノレン酸, エイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid; EPA), ドコ

サヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid; DHA) を次々とさまざまな物質に代謝、分解させていく。

代謝された物質の中には、リポキシン (Lipoxin; LX), レゾルビン (Resolvin; Rv), マレシン (Maresin; MaR), プロテクチン (Protectin) のような、エイコサノイドとは違い炎症を抑制する specialized pro-resolving mediators (SPA) と称される炎症収束脂質メディエーターも存在する<sup>2)</sup>。これらの脂質メディエーターは代謝経路の中で連携した制御を受け、炎症を正や負に制御するため、組織中で働いている。脂肪酸代謝物は、遺伝から作られるものではなく、代謝されて作られるものなので、RT-PCR で検出することは無理であり、lipid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) による質量分析にてその存在量が判明する。そのため一つから数種類の代謝産物を LC/MS で測定するか、ELISA でその量を測定するしか方法がなかった。しかし最近、100種類以上の脂肪酸代謝物を測定できる方法が確立され、病態解明に寄与できるのではないかと期待されている<sup>3)</sup>。

一方、脂質の基本構成成分は脂肪酸であり、脂肪酸のみで構成されるトリアシルグリセロールのよう



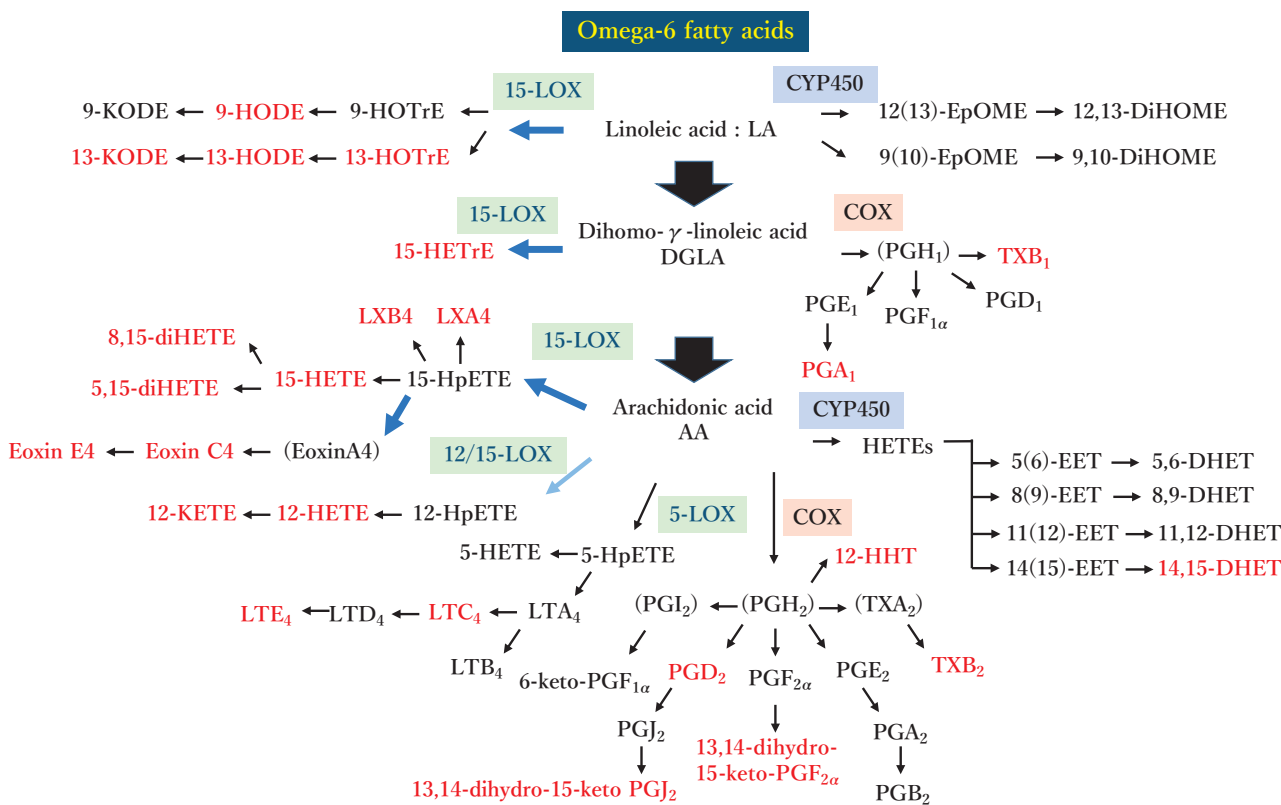


図1. ω-6系の脂質代謝経路を示す。ECRS鼻茸中で有意に増加していた代謝産物は赤字で示す。(P<0.05)

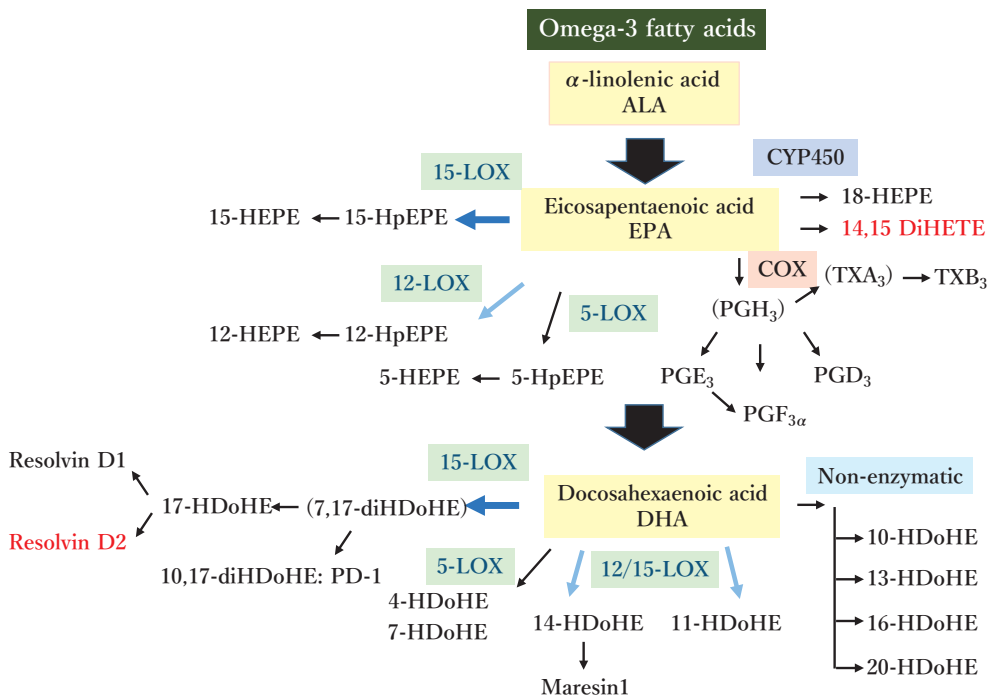


図2. ω-3系の脂質代謝経路を示す。ECRS鼻茸中で有意に増加していた代謝産物は赤字で示す。(P<0.05)

第1章  
 第2章  
 第3章  
 第4章  
 第5章  
 第6章  
 第7章  
 第8章  
 第9章  
 第10章  
 第11章

な単純脂質と、脂質以外のリン酸基や糖鎖と結合したリン脂質や糖脂質のような複合脂質に分けられる。構成する脂肪酸の種類と組み合わせに多くの分子種があるため、分子種の分離とそれぞれの同定作業が脂質分析となる。

今回、マトリックスで被覆した分子にレーザーを当てることでソフトな（分子の破壊を抑えた）イオン化方法（マトリックス支援レーザー脱離イオン化法：MALDI）によって脂質測定を行った。分離した分子の質量を測定する部分を担う質量分析（MS）では、イオンの質量（ $m$ ）をその電化数（ $z$ ）で割った質量電荷比（ $m/z$ ）で表される。ここで生成したイオンをさらに分離して、その $m/z$ を測定するイオン同定を多段階質量分析といい、2回繰り返すとMS/MSと表記する。こうして決定したイオンの $m/z$ 値を横軸、イオンの相対量を縦軸に表したものが質量スペクトルである。また、MALDIにイメージング技術を加えたMALDI-imaging mass spectrometry（IMS）がある<sup>4)</sup>。IMSでは、生体組織切片を分離精製することなく、直接質量分析することができる。通常の質量分析では、組織のホモジェネートを作成して生成するため組織中の部位別解析はできない。一方でIMSでは組織を切片にして、顕微鏡上において測定範囲を指定し質量分析できるのが利点である。今回、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸組織中の脂質を解析するためにLC-MS/MSとMALDI-IMSを用いた。

## 方法

### 対象

LC-MS/MSによるアラキドン酸カスケード代謝物の測定には、JESREC Study<sup>5)</sup>による診断基準11点以上のECRS患者5名の鼻茸と11点未満のnon-ECRS患者4名の鼻茸を用いた。MALDI-IMSによる鼻組織中の脂肪酸代謝物測定には、上記とは別のECRS患者5名の鼻茸、およびnon-ECRS患者5名の鼻茸を用いた。

### LC-MS/MS<sup>3)</sup>

LC-MS/MSは鼻茸組織を下記のように前処理を行い、株式会社島津製作所のLC部（LC-30Aシステム）

MS部（LCMS-8050）を使用した。各試料全量に水200  $\mu$ lを添加してホモジナイズし、内部標準10  $\mu$ lを添加、メタノール1 mlを加え攪拌した。遠心分離（10,000 rpm, 5分）後の上清を別の容器に移し、この溶液に0.1% ぎ酸溶液4 mlを添加し攪拌した。メタノール1 mlおよび0.1% ぎ酸溶液1 mlでコンディショニングした固相を全量ロードした。0.1% ぎ酸溶液1 mlで固相を洗浄し、15% エタノール溶液1 mlで固相を洗浄した。最後にメタノール200  $\mu$ lで溶出した溶液を測定した。LC部のカラムにはKinetex C8 100A 2.1 $\times$ 150 mm, 2.6  $\mu$ m（Phenomenex）を用い、移動相A：0.1% ぎ酸溶液、移動相B：アセトニトリルとして移動相Bのグラジエント条件を設定して流速0.4 ml/min, 試料注入量5  $\mu$ l, カラム温度40 $^{\circ}$ Cにて測定した。各検体を測定し、各化合物の面積値を内標準物質のピーク面積値と試料量（g）で除した値（重量補正值）を算出した。計測は島津テクノリサーチ社との共同研究にて行った。158種類の分子を測定した。

### MALDI-IMS<sup>4)</sup>

鼻組織は摘出後-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。凍結保存組織はLicaCM1950 cryostat（Leica Microsystems GmbH）にて-25 $^{\circ}$ Cの設定で10  $\mu$ mの厚さに切片を作成した。切片は融解してindium-tin-oxide（ITO）コーティングされたガラススライド（Bruker Daltonics）上に載せた。マトリックスとして2',5'-dihydroxyacetophenone（DHAP）（Tokyo Chemical Industry Co., LTD）を用いて、マトリックス昇華装置によって切片上に均一に塗布した。MALDI-IMS解析は高解像度イメージングマススペクトロメーター（iMScope prototype; Shimadzu）に355-nm Nd:YAG laserを装填し行った。測定領域は同装置内に装填された光学顕微鏡にて行った。切片は20倍の倍率において観察し、レーザーを当てて操作する間隔は5  $\mu$ mとした。各箇所でも100回のレーザー照射（1,000 Hz）を反復して700から1,000  $m/z$ （質量電荷比）をポジティブイオンモード、ネガティブイオンモードで行った。

表1. LC-MS/MS解析の対象鼻茸.

Group	Sex	Age (Year)	Blood eosinophil (%)	JESREC score	Experiment
ECRS-1	M	60	19.9	17	LC-MS/MS
ECRS-2	M	43	5.7	15	LC-MS/MS
ECRS-3	M	56	8.5	15	LC-MS/MS
ECRS-4	M	63	7.4	15	LC-MS/MS
ECRS-5	F	23	9.3	15	LC-MS/MS
NECRS-1	M	57	2.0	5	LC-MS/MS
NECRS-2	M	59	2.9	6	LC-MS/MS
NECRS-3	F	62	1.8	4	LC-MS/MS
NECRS-4	F	36	0.1	5	LC-MS/MS

NECRS: non-ECRS.

表2. IMC解析の対象鼻茸.

Group	Sex	Age (Year)	Blood eosinophil (%)	JESREC score	Experiment
ECRS-6	F	28	10.6	17	MALDI-IMS
ECRS-7	F	29	8.1	15	MALDI-IMS
ECRS-8	M	52	13.6	17	MALDI-IMS
ECRS-9	F	50	11.9	17	MALDI-IMS
ECRS-10	M	58	17.5	17	MALDI-IMS
NECRS-5	M	55	3.4	5	MALDI-IMS
NECRS-6	M	66	3.2	9	MALDI-IMS
NECRS-7	F	59	2.3	9	MALDI-IMS
NECRS-8	F	78	1.0	5	MALDI-IMS
NECRS-9	M	57	0.9	7	MALDI-IMS

NECRS: non-ECRS.

## 統計

LC-MS/MSでは、q-valueに基づいたfalse discovery rateを求めてBenjamini-Hochberg法により多重検定を調整した。MALDI-IMSでは、ECRS群とnon-ECRS群の重量補正值をMann-Whitney検定にて解析した。p<0.05を有意と定義した。

## 結果

### LC-MS/MSによるω6系脂質解析

158種類の脂質のうち、ECRSの鼻茸では75種、non-ECRSの鼻茸では64種の代謝産物を測定することができた。75種の産物はECRSにおいて、LA由

来の9-HODE, 13-HOTrE, 13-HODE, 13-KODEの発現量がnon-ECRSよりも高く(いずれもp<0.05)、DGLA (dihomo-γ-linoleic acid) 由来の15-HETrE量も有意に高かった(p<0.05)。AA由来の15-HETE, 8,15-diHETE, 5,15-diHETE, Lipoxin A4 (LXA4), LXB4, Eoxin E4, 12-HETE, 12-KETEもECRSにおいて高かった(p<0.05) (図1)。これらのうち、9-HODE, 13-HODE, 15-HETE, Eoxin C4/E4, 12-HETEは炎症性脂質であり、多形核白血球浸潤を誘導し、8,15-diHETEは好酸球を遊走させる。EoxinはLTC4, PGD2, IL-5刺激により好酸球から放出され、炎症を顕著に増悪させる<sup>6)</sup>。これらの14の代謝産物は、全て15-lipoxygenase (15-LOX) によりω-6系脂

脂肪酸から代謝されたものである(図1)。AA由来の代謝産物においてECSRsで有意に多かったのは、5-LOXによってAAから代謝されるLTC4とLTE4、COXによりAAから代謝される三つのPGとTXB2であった。その他の5-LOXによる代謝産物はECSRsとnon-ECSRsで違いはなかった。non-ECSRs中には、AAがECSRsより高かったが、有意差はなかった。これらの結果から、ECSRsでは15-LOXにより $\omega$ -6脂肪酸代謝がnon-ECSRsと比べて亢進していることが判明した。さらに、ECSRsの鼻茸では、AAから15-LOXにて代謝されるLXA4 ( $p < 0.05$ )、AAからCOXで代謝される12-HHT ( $p < 0.05$ )、AAからCYP450により代謝される14,15-DHET ( $p < 0.05$ )が有意に高かった。LXA4は炎症収束因子、12-HHTも創傷治癒に関与し、14,15-DHETも血管系疾患において抗炎症効果と相関を持つ因子であった。

### LC-MS/MSによる $\omega$ 3系脂質解析

$\omega$ -3系のDHAから15-LOXにより代謝されるResolvin D2 (RvD2) ( $p < 0.05$ )がECSRs鼻茸に有意に多く含まれていた(図2)。RvD2は、 $\omega$ -6系のLXA4と同様にSPMsと呼ばれ炎症を抑制し恒常状態に戻すために重要な役割を担っている。その他のSPMsであるPD-1, maresin-1もECSRsにおいて増加しているが、有意ではなかった。これらの結果から、ECSRsの鼻茸において炎症を抑制する因子もnon-ECSRsよりも多く存在していることが判明した。

### IMSによる鼻茸中のAA含有脂肪酸

LC-MS/MSでは、AAの炎症性代謝産物がECSRsで高く、有意差はなかったものの前駆体であるAAがECSRsで減少していた。そこで、ECSRsでは、よりAA代謝が亢進していると仮定し、AA産生の前駆体となる脂肪酸の解析をMALDI-IMSを用いて行った。ECSRs鼻茸5例とnon-ECSRs鼻茸5例を比較した(表2)。IMSの特性を活かして、鼻茸の粘膜下組織部分を指定してその部分に含まれる脂肪酸の代謝産物を解析した。図3aは、各サンプルの鼻茸組織切片を光学顕微鏡で観察した写真で、その中に小さな白い線で囲まれた四角部分、大きさは500  $\mu$ m四方であり、各辺を100スポット、合計10,000スポットにイオ

ン化レーザーを当てて質量顕微鏡で測定した。照射されたレーザーによりイオン化した種々の質量電荷比を持った脂質が分離されて(横軸)、イオンの相対量(intensity, 縦軸)を表す質量スペクトルが作成される(図3b)。測定により得られた700 m/zから1,000 m/zの範囲のスペクトラムを示す(図4a)。スペクトラムの一つ一つのピークは異なる分子を示しているが、この中の分子Aに着目した。測定データは(図4a)の右上に示すが、10例において指定した解析部分にレーザーを照射して、分子Aがどれだけ検出されたかをヒートマップで示している。得られたスペクトラム内の各分子についてECSRsとnon-ECSRs間に有意差のある分子を上位から列挙した(図4b)。ECSRsにおいて有意な低下を示したのは上から5つ目の分子Aであった。分子Aの構成成分から、ホスファチジルコリン分子に含まれる脂肪酸の共通構造である59 Daと183 Daを差し引き、さらにナトリウムから水素への変換時の重量変化22 Daを差し引いて、最終的に分子Aは脂肪酸Xと脂肪酸Yを含みナトリウムを伴ったホスファチジルコリンPC (FA X;FA Y) Na<sup>+</sup>であると同定できた(図4c)。このうち脂肪酸YはAAであることがわかり、分子Aの定量値をECSRsとnon-ECSRsで比較したところECSRs鼻茸中AAは有意に低下していた(図4d) ( $p < 0.05$ )。

### 考察

鼻茸中の脂質代謝解析を目的に、ECSRsとnon-ECSRsの鼻茸をLC-MS/MSを用いて脂質メディエーターを一斉解析した。 $\omega$ -6系脂肪酸のLA, DGLA, AAの15-LOXによる代謝産物であるHODE, HETE, Eoxinといった強い炎症性脂質メディエーターが多く含まれていた一方で、SPMsと呼ばれる炎症収束脂質メディエーターや12-HHT, 4,15-DHETといった抗炎症効果を持つ代謝産物も多く含まれていた。これらの代謝物質の多くがAAからのものであるためか、ECSRs鼻茸中ではAAの減少が認められたがLC-MS/MSでは有意ではなかった。しかしMALDI-IMSにおいては、ECSRs鼻茸中のAA含有ホスファチジルコリンの有意な低下が認められた。以上のこと



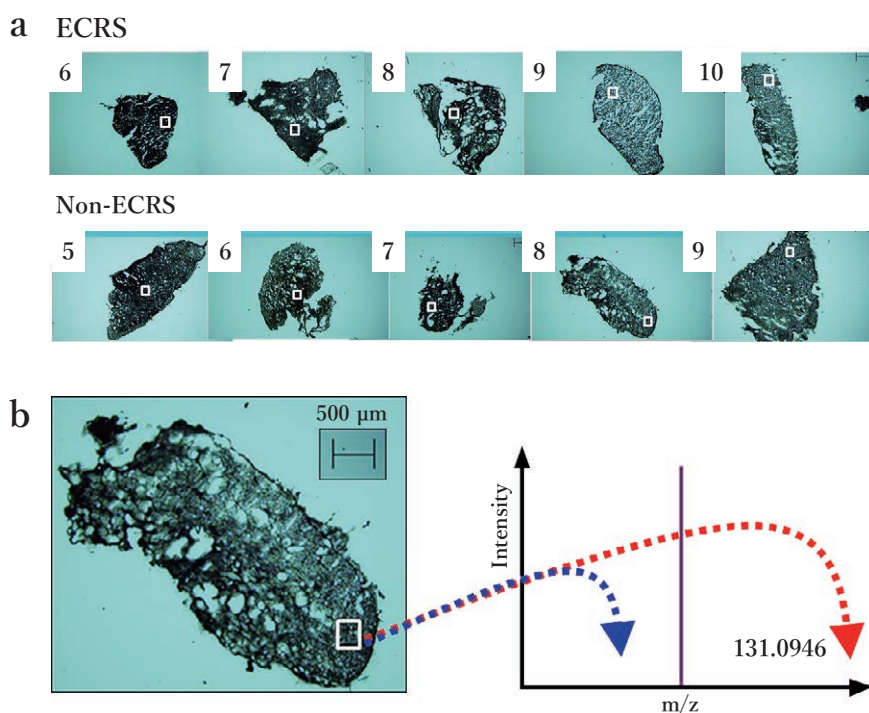


図3. (a) MALDI-IMSにおいて使用したECRS鼻茸とnon-ECRS鼻茸を使用機器内の顕微鏡によりイメージ化したもの。白い四角は一辺が500  $\mu\text{m}$ のレーザー照射範囲を示す。

(b) MALDI-IMSによる測定方法のシエマ。白い四角内に照射されたレーザーによりイオン化した種々の質量電荷比を持った脂質が分離されて(横軸), イオンの相対量(intensity, 縦軸)を表す質量スペクトルが作成される。

からECRS鼻茸中では、AAの代謝が亢進し、その代謝産物が増加していることには間違いがないと言える。

今回、LC-MS/MSを用いた脂質代謝解析は、158種類の代謝産物を同時に測定できることから疾患の全体像を把握できる利点がある。AA由来の炎症性産物がECRSで高い中で特に15-HETEは他の産物と比べて桁違いに大量に測定されるとともに、ECRSにて有意に多く含まれていたものは、そのほとんどが15-LOXの作用によって作られたものであった。

15-LOXは気道上皮や好酸球、マスト細胞、樹状細胞が大量に含有している。これらの細胞をIL-4, IL-13で刺激すると15-LOXが産生される。我々は、RNAseqを用いた網羅的遺伝子発現解析にて、ECRS鼻茸には15-LOXをコードする*ALOX15*遺伝子発現が有意に上昇していることを報告した<sup>7) 8)</sup>。最近Stevensらは、CRSwNPを構成している鼻上皮細胞中に15-LOXが有意に発現しており、他の細胞に作用することでその分解産物である15-HETEの下流にある15-oxo-EETEの上昇を証明した<sup>9)</sup>。我々の系で

は、15-oxo-EETEの測定はできないが、ほぼ同様の結果であった。Rostkowska-Nadolskaらも、鼻茸群ではコントロール群に比べて*ALOX15*の発現が高いことを示している<sup>10)</sup>。

AAから15-LOXによって15-HETEとEoxinが作られる。Eoxinは血管透過性を亢進し、ヒスタミンに比較して血管透過作用は100倍強力でLTC4やLTD4と同等とされている<sup>6)</sup>。15-HETEは気管支喘息患者の肺組織では非喘息の肺組織よりも多く作られ、喘息患者のBALFや鼻汁中には健常者と比べて有意に15-HETE値が高く含まれていた<sup>6)</sup>。

アイスランド人とイギリス人の慢性副鼻腔炎患者、鼻茸患者、健常人を対象にした全ゲノム解析では、*ALOX15*遺伝子の変異では15-LOXの産生および活性が低下し、慢性副鼻腔炎および鼻茸を有しにくくなることが報告された<sup>11)</sup>。以上のことは15-LOX阻害薬が、ECRSを含むCRSwNPの治療薬になる可能性を示している。現在数種類の15-LOX阻害薬が開発段階にあり、今後その効果が期待される<sup>12)</sup>。

LTは5-LOXによりAAから生合成される生理活性



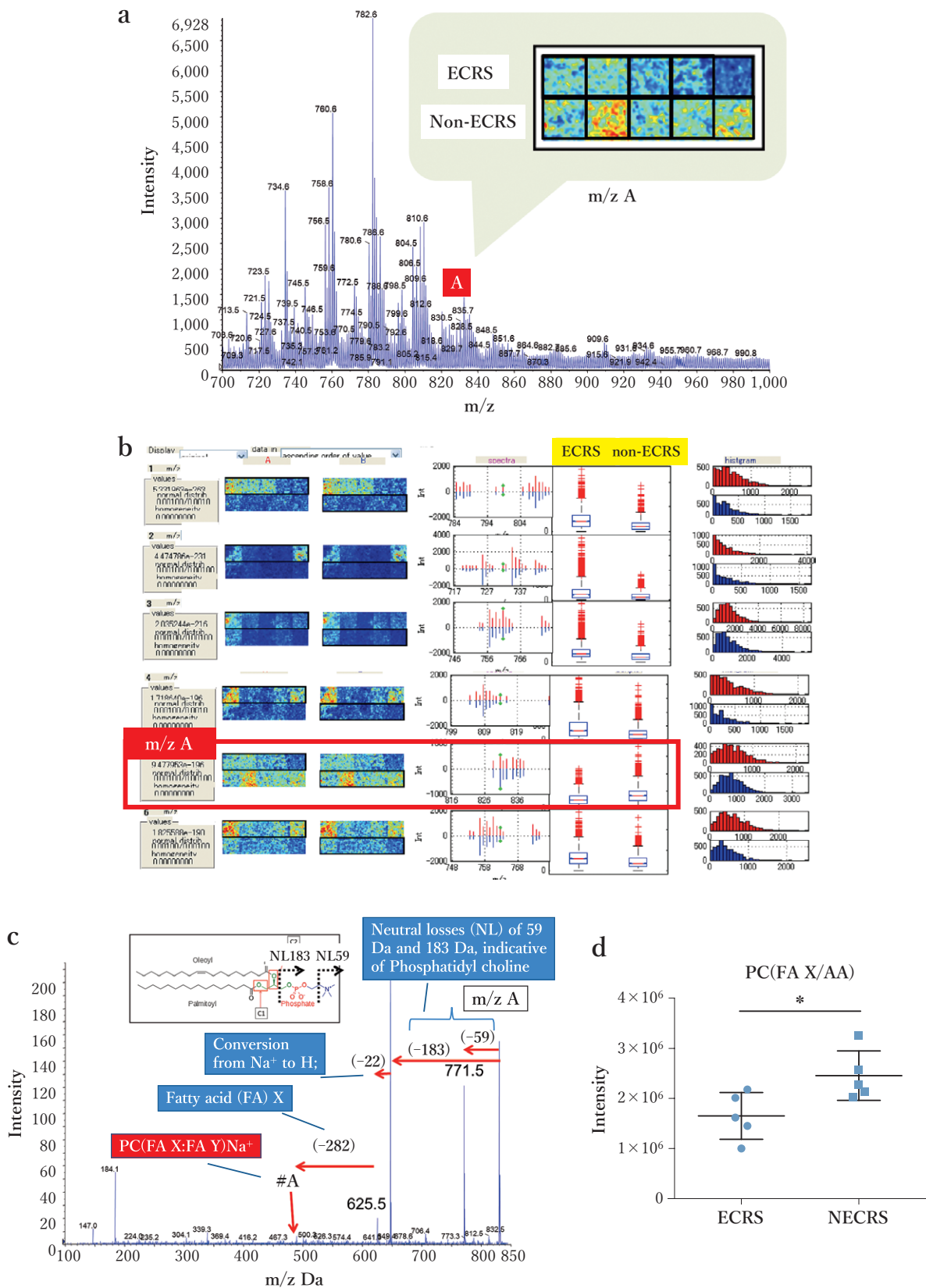


図4. (a) 今回の測定により注目した  $m/z$  A の物質. (b)  $m/z$  A は ECRS において有意に少なかった脂質であった. (c)  $m/z$  A の構成成分から、ホスファチジルコリン分子に含まれる脂肪酸の共通構造である 59 Da と 183 Da を差し引き、さらにナトリウムから水素への変換時の重量変化 22 Da を差し引いて、最終的に分子 A は脂肪酸 X と脂肪酸 Y を含みナトリウムを伴ったホスファチジルコリン PC (FA X;FA Y) Na<sup>+</sup> であると同定できた. (d)  $m/z$  A の定量値を ECRS と NECRS で比較した. \*,  $p < 0.05$ .

脂質の総称であり、受容体の一つのCysLT1に対する拮抗薬は、現在気管支喘息やアレルギー性鼻炎の治療に使われる。Pérez-NovoらはCRSsNP組織、CRSwNPの鼻茸、正常人の下鼻甲介粘膜中CysLT1 mRNAを測定し、鼻茸中で有意に増加していることを報告した<sup>13)</sup>。また、ELISAにて測定したLTC4/D4/E4は鼻茸中で高く、これらの高発現は好酸球炎症と有意な相関を示した<sup>12)</sup>。一方で、Miyataらは、鼻茸から好酸球を分離し、カルシウムイオノフォアによる刺激を加え上清のLC-MS/MSを行ったところ、LTD4が選択的に増加しており、LTC4とLTE4が減少していた<sup>14)</sup>。これは我々の結果と全く逆の結果であるが、鼻茸をホモジェネートした我々の方法に対して、Miyataらは好酸球の刺激上清を用いていることに起因していると思われる。また、LTの産生細胞は好酸球以外にマスト細胞があり、E CRS中に存在するマスト細胞の影響も重要なかもしれない<sup>15)</sup>。

$\omega$ -6系の炎症修復性脂質メディエーターがE CRSで高いと同時に、炎症収束脂質メディエーターも増加していた。これは炎症性脂質メディエーターが産生されるとその制御機構も時間差で働き出すという仕組みが始動するためと考えられる。SPMsは好中球関連のサイトカインやケモカイン産生を抑制し、好中球遊走に対して内在性の“停止信号(stop signal)”として働く<sup>2)</sup>。好中球優位の浸潤がみられるnon-E CRS鼻茸では好中球に対するSPMsの停止信号がより少ないために好中球浸潤が抑制できないのではないかと考えている。E CRSの鼻茸では、代謝

されたSPMsが好中球浸潤を直接的に阻害するが、同時にマクロファージを誘導してアポトーシスした好中球を貪食するように働く。これまでに、TakabayashiらはE CRSの鼻茸の2型炎症において、M2マクロファージの重要性について報告している<sup>16)</sup>。M2マクロファージは、SPMsとともに好中球炎症を抑制し組織や器官の線維化による不可逆的な機能低下を防ぐ働きがあるとともに、好酸球浸潤を誘導して炎症を終息させようとする<sup>17)</sup>。しかしE CRSではこの最終段階に何らかの問題があり、好酸球炎症が持続し、最終的に経口ステロイドしか反応しなくなるのではないかと推測される。最終段階が機能しない原因としては、抑制因子の存在、もしくは機能しない因子が出現することなどが推測できるが、まだ何もわからない。今後の検討課題であると考えられる。

## まとめ

E CRSの鼻茸中には、炎症性脂質メディエーターだけでなく、炎症収束脂質メディエーターも同時に産生されていた<sup>18)</sup>。炎症性脂質メディエーターを主に産生する15-LOXの阻害剤は今後のE CRS治療戦略において重要になる可能性があると考えられる。また、E CRSにおいては、炎症収束脂質メディエーターの機能回復が、炎症状態から恒常性回帰への鍵となることと思われる。

(坂下 雅文, 二之宮貴裕, 藤枝 重治)

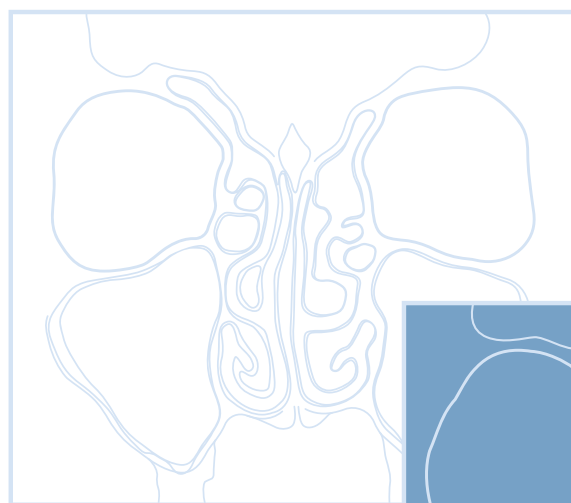
## 文献

- 1) Pérez-Novo CA, Claeys C, Van Cauwenberge P, et al. Expression of eicosanoid receptors subtypes and eosinophilic inflammation: implication on chronic rhinosinusitis. *Respir Res.* 2006;7:75.
- 2) Spite M, Clària J, Serhan CN. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. *Cell Metab.* 2014;19:21-36.
- 3) Yamada M, Kita Y, Kohira T, et al. A comprehensive quantification method for eicosanoids and related compounds by using liquid chromatography/mass spectrometry with high speed continuous ionization polarity switching. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;995-996:74-84.
- 4) Ishikawa S, Tateya I, Hayasaka T, et al. Increased expression of phosphatidylcholine (16:0/18:1) and (16:0/18:2) in thyroid papillary cancer. *PLoS One.* 2012;7:e48873.
- 5) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy.* 2015;70:995-1003.

- 6) Feltenmark S, Gautam N, Brunnström A, et al. Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:680-685.
- 7) **Ninomiya T, Noguchi E, Haruna T, et al. Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinitis with nasal polyps. *Sci Rep*. 2018;8:11450.**
- 8) **Imoto Y, Takabayashi T, Kato Y, et al. Enhanced 15-LO is related to the pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinitis. (投稿中)**
- 9) Stevens WW, Staudacher AG, Hulse KE, et al. Activation of the 15-lipoxygenase pathway in aspirin exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;S0091-6749(20)30627-8. doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.031. Online ahead of print.
- 10) Rostkowska-Nadolska B, Kapral M, Fraczek M, et al. A microarray study of gene expression profiles in nasal polyps. *Auris Nasus Larynx*. 2011;38:58-64.
- 11) Kristjansson RP, Benonisdottir S, Davidsson OB, et al. A loss-of-function variant in ALOX15 protects against nasal polyps and chronic rhinosinitis. *Nat Genet*. 2019;51:267-276.
- 12) Sadeghian H, Jabbari A. 15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26:65-88.
- 13) Pérez-Novo CA, Watelet JB, Claeys C, et al. Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinitis with and without nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:1189-1196.
- 14) Miyata J, Fukunaga K, Kawashima Y, et al. Cysteinyl leukotriene metabolism of human eosinophils in allergic disease. *Allergol Int*. 2020;69:28-34.
- 15) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:410-420.**
- 16) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:584-592.**
- 17) Werz O, Gerstmeier J, Libreros S, et al. Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat Commun*. 2018;9:59.
- 18) **Sakashita M, Imoto Y, Koyama K, et al. Series of lipid mediators metabolized by 15-lipoxygenase in omega 3 and 6 pathways were increased in eosinophilic chronic rhinosinitis with nasal polyps. (投稿中)**

## 第4章

# 遺伝子多型とメチル化







## 4-1

## 鼻茸におけるエピジェネティクス—DNAメチル化—

## ● サマリー

遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化は、その遺伝子の発現制御に影響を与えている。鼻茸組織における tissue-type plasminogen activator (t-PA : 遺伝子名 *PLAT*) の発現低下がフィブリン分解低下を引き起こし、鼻茸中に過剰なフィブリン沈着を引き起こす。鼻茸における *PLAT* の DNA メチル化と遺伝子発現との関連について検討したところ、鼻茸における高メチル化と遺伝子発現の低下を認め、メチル化変化率と遺伝子発現量変化率との間に負の相関傾向を認めた。さらに、鼻茸における網羅的な DNA メチル化解析および遺伝子発現解析を行ったところ、*PLAT* のほかに新たな 3 つの遺伝子の関連を見出した。DNA メチル化は鼻茸形成の病態に重要な役割を果たしていると考えられる。

## エピジェネティクスとは

エピジェネティクス (epigenetics) とは、1942 年に Waddington により「遺伝子型の変化を伴わない表現型の変化」として定義された<sup>1)</sup>。その後、DNA メチル化やヒストンアセチル化・メチル化などのヒストン修飾などがその担い手として明らかとなり、現在では「DNA メチル化およびヒストン修飾に関連する学問領域」として理解され、さらに non-coding RNA (ncRNA)、クロマチン構造変化などが明らかになるにつれ、「DNA 塩基配列を超えた遺伝子発現変動継承のしくみ」の定義となった<sup>2)3)</sup>。

エピジェネティクスは、発生・分化の過程で働く遺伝子と働かない遺伝子を決定しており、受精卵から体内の各細胞への分化を誘導し、個体を形成する。悪性腫瘍でさかんに研究されてきた分野であるが、近年では、慢性炎症性疾患など病態との関連も報告されており、DNA メチル化と気管支喘息、アスピリン過敏症、アレルギー性鼻炎をはじめとする気道アレルギー炎症との関連が注目されている<sup>4)~7)</sup>。

遺伝子発現は、DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな変化の影響を強く受けている。一般的に、プロモーター領域における CpG 部位の DNA メチル化は転写調節における重要な役割を果たすとされる<sup>8)</sup>([図 1](#))。通常、プロモーター領域に

存在する CpG 領域が高メチル化状態である場合はクロマチン構造が折り畳まれ、転写が抑制され遺伝子発現量が低下する。一方で、プロモーター領域に存在する CpG 領域が低メチル化状態である場合にはクロマチン構造が開くことで遺伝子発現量が増加する<sup>8)</sup>。

DNA メチル化を測定する方法として、単一の遺伝子など個別領域の解析を行う方法と網羅的解析を行う方法に大別される。個別領域の解析方法としては、バイサルファイトシーケンス法、メチル化特異的 PCR 法、パイロシーケンス法などが存在する。網羅的解析を行う方法としては、マイクロアレイ法、PBAT (post-bisulfite adaptor tagging) 法などが存在する。いずれの方法も、後述するバイサルファイトの原理を応用して測定されている。本編では省略するが、そのほか DNA メチル化を測定する方法として制限酵素を用いた方法なども存在する。

## PLAT の DNA メチル化について

我々は、鼻茸組織における tissue-type plasminogen activator (t-PA : 遺伝子名 *PLAT*) の発現低下がフィブリン分解低下を引き起こし、鼻茸中に過剰なフィブリン沈着を引き起こすことを報告した (第 5 章参照)<sup>9)</sup>。しかし、鼻茸における t-PA 発現

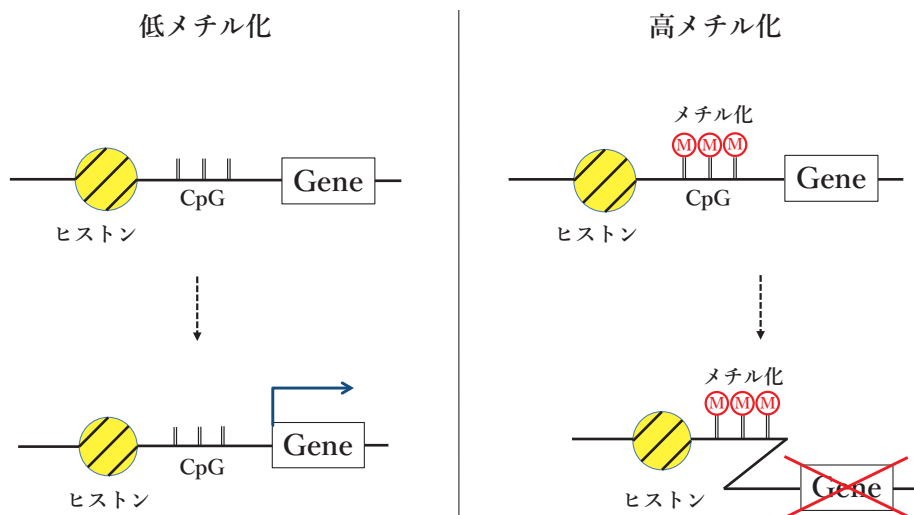


図1. プロモーター領域のDNAメチル化と遺伝子発現.

低下のメカニズムはいまだ不明な点が多い。PLATのプロモーター領域にはDNAメチル化の影響を受けるCpG領域が多数存在しており、血管内皮細胞や脳神経細胞ではPLATプロモーター領域のメチル化がPLATの発現に関与していることが報告されている<sup>10)11)</sup>。そこで、鼻茸においてもPLATプロモーター周囲領域のDNAメチル化が遺伝子発現に関与しているのではないかと考え、鼻茸におけるPLATプロモーター領域のメチル化と遺伝子発現との関連について検討した<sup>12)</sup>。

### 鼻茸のPLATプロモーターは高メチル化状態である

鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSwNP) 患者の内視鏡下鼻副鼻腔手術時に採取した鼻茸および下鼻甲介粘膜からDNAを抽出した。DNA塩基配列の修飾はPCRによるDNA増幅では維持されないことから、PCRで増幅したDNA上のメチル化修飾を直接検出することはできないため、DNAのバイサルファイト処理を行ったのちにDNAメチル化率を測定した。バイサルファイト処理とは、DNAを亜硫酸水素塩で処理し、構成する塩基を化学的に修飾する方法で、この処理によってシトシン (C) は脱アミノ化されてウラシル (U) に変換され、メチル化されたシトシン (5-mC) は処理の影響を受けず、そのままシトシン

として残る。その後、バイサルファイト処理をしたDNAから、PCR増幅したのちに、パイロシーケンス法によってPLATのプロモーター領域のうち3か所のCpG部位のメチル化率を測定した。測定した全てのCpG部位において、鼻茸が下鼻甲介よりメチル化率が高かった (図2)。

### 鼻茸はPLAT発現量が低くメチル化率と負の相関

組織内の遺伝子発現量を測定するために、メチル化率を測定した同一検体 (鼻茸・下鼻甲介粘膜) の一部からRNAをそれぞれ抽出した。抽出したRNAを相補的DNA (cDNA) へ変換したのちに定量リアルタイムPCR法にてPLAT発現量を測定した。鼻茸では下鼻甲介よりPLAT発現量が低値であった (図3)。さらに、鼻茸と下鼻甲介におけるメチル化変化率と遺伝子発現量変化率との相関をそれぞれ3か所のCpG部位において計測したところ、全てのCpG部位においてメチル化変化率と遺伝子発現量変化率との間に負の相関傾向を認め、CpG部位1において最も強い負の相関を認めた (図4)。

### 鼻茸のPLATメチル化は遺伝子発現に関与する

我々は、CRSwNPの鼻茸組織内におけるPLAT発現低下と過剰なフィブリン沈着を過去に報告した。t-PAはプラスミノゲンを活性化プラスミンへ変換

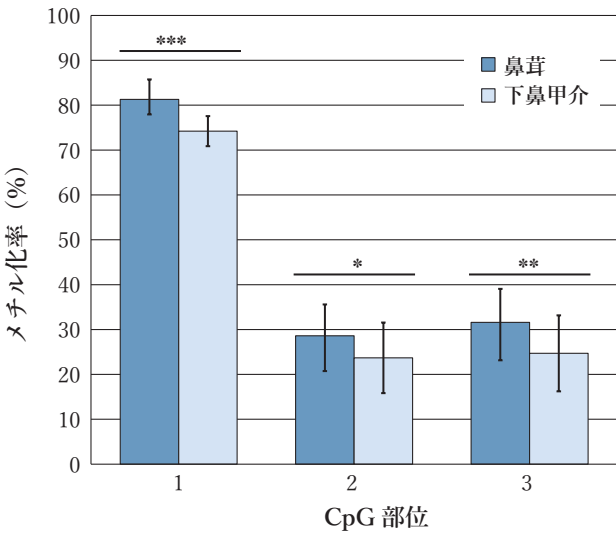


図2. PLATのDNAメチル化率 (Kidoguchi M, et al. Am J Rhinol Allergy 2018 改変).

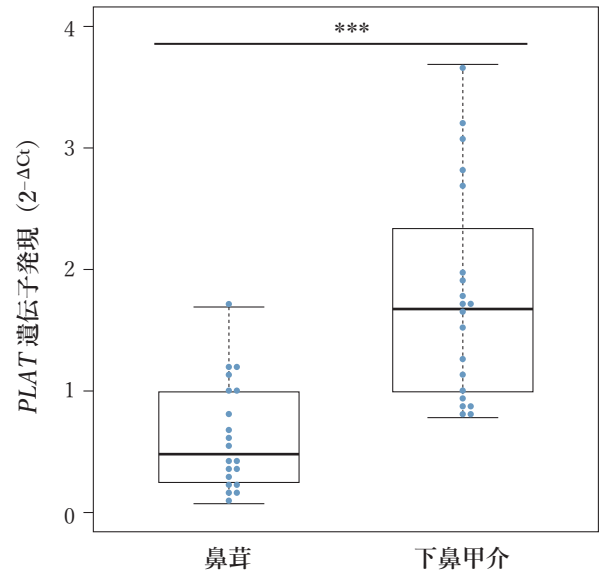


図3. PLATの遺伝子発現量 (Kidoguchi M, et al. Am J Rhinol Allergy 2018 改変).

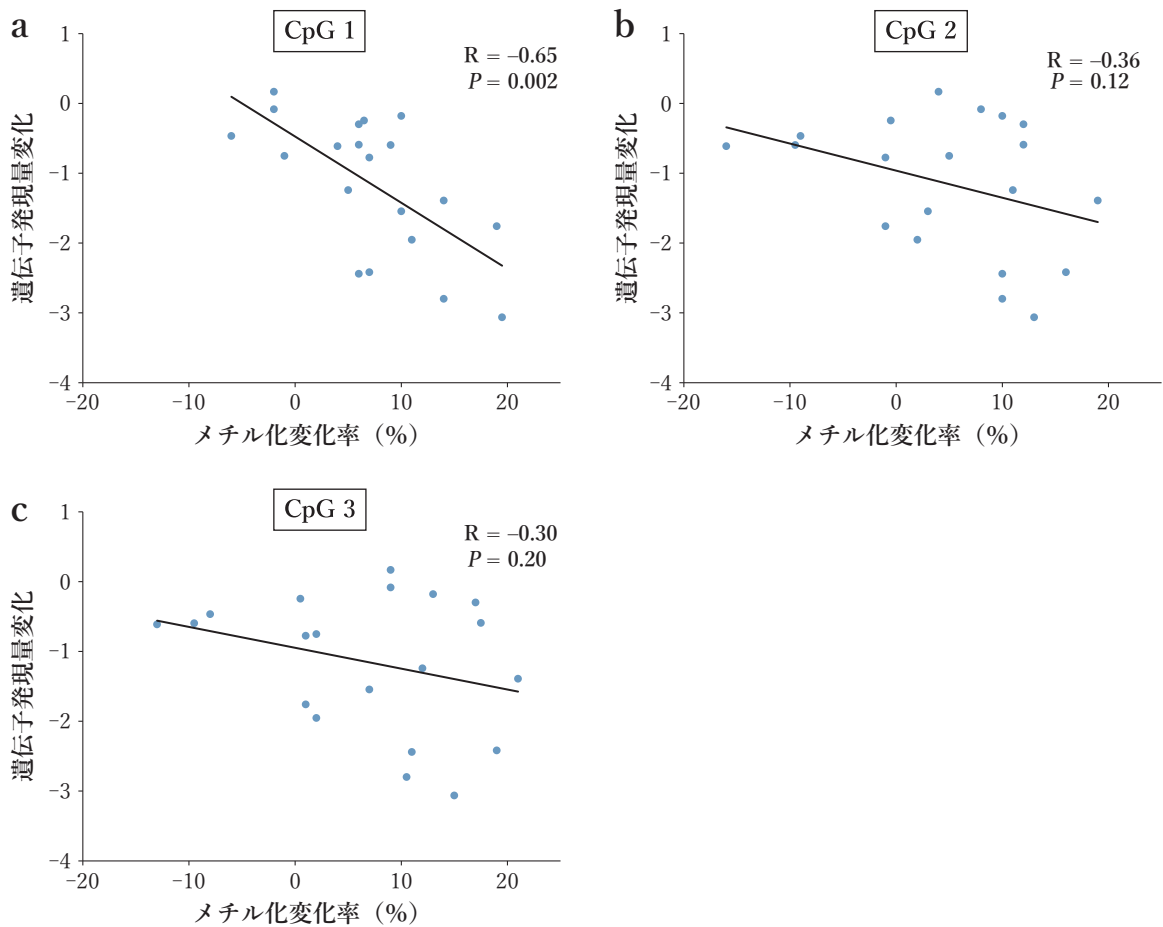


図4. PLATのDNAメチル化率と遺伝子発現量の相関 (Kidoguchi M, et al. Am J Rhinol Allergy 2018 改変).

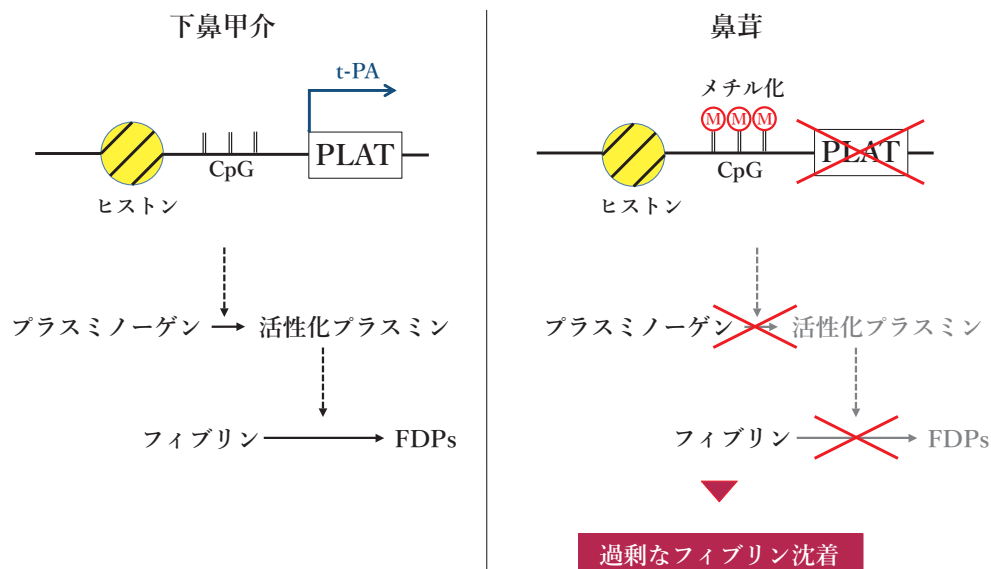


図5. DNAメチル化による鼻茸形成メカニズム.

する補酵素であり、活性化プラスミンはフィブリン分解を促す。鼻茸ではPLAT発現量が低く、不十分な活性化プラスミンのために過剰なフィブリン沈着が引き起こすとされる。本研究では、CRSwNP患者の鼻茸におけるPLATプロモーター領域の高メチル化と遺伝子発現の低下を見出した<sup>12)</sup>。PLATプロモーター領域の高メチル化が遺伝子発現の低下を引き起こし、鼻茸における凝固線溶系の異常を引き起こしている可能性が示唆された(図5)。

### 網羅的なDNAメチル化解析について

ヒトには23対46本の染色体が存在しており、その染色体には約23,000種類の遺伝子が存在している。鼻茸においてPLATではDNAメチル化が遺伝子発現に関与していることを見出したが、その他の遺伝子についてもDNAメチル化が遺伝子発現に関与している可能性がある。そこで、PLAT以外の遺伝子においてもメチル化が遺伝子発現に関与しているのではないかと考え、網羅的な解析手法の一つであるPBAT法を用いて鼻茸および下鼻甲介粘膜におけるDNAメチル化状態を測定した。さらに、DNAメチル化の遺伝子発現への影響を検討するために、同時に採取した鼻茸および下鼻甲介粘膜からRNAを抽出し、RNA-seq法によって遺伝子発現量を測定し、

DNAメチル化との関連解析を行った。

### 網羅的なDNAメチル化解析 (PBAT法)

CRSwNP患者の内視鏡下鼻副鼻腔手術時に採取した鼻茸および下鼻甲介粘膜からDNAを抽出した。抽出したDNAを断片化し、バイサルファイト処理およびPCR増幅を行ったのちにアダプターを付加した。バイサルファイト処理にてDNA損傷を来す可能性があるため、アダプターの付加はバイサルファイト処理ののちに行った。アダプターが付加されたライブラリを次世代シーケンサーHiSeq 4000 (イルミナ)にて測定を行った。次世代シーケンサーより得られたゲノム配列データは、ヒトゲノム(hg19)をリファレンスゲノム配列としてマッピングを行い、さらにBismarkを用いてメチル化部分の検出を行い<sup>13)</sup>、解析ソフトRのmethylKitを用いて比較した<sup>14)</sup>。DNAメチル化が変化している遺伝子は、プロモーター周囲のメチル化率が25%以上変化し、さらに、調整したP値が0.05未満のものを有意とした。PBAT法で網羅的なDNAメチル化解析の結果、鼻茸と鼻甲介粘膜において41遺伝子のメチル化率が有意に変化を来していた(図6)。

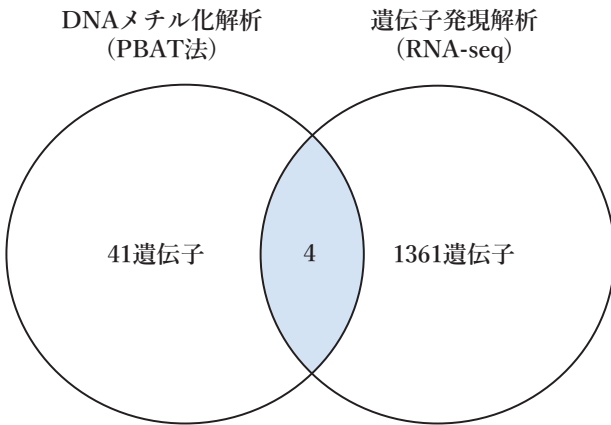


図6. DNAメチル化と遺伝子発現との関連解析.

### 網羅的なDNAメチル化と遺伝子発現との関連解析

DNAメチル化の遺伝子発現への影響を検討するために、同時に採取した鼻茸および下鼻甲介粘膜からRNAを抽出し、前述したRNA-seq法を用いて遺伝子発現量を測定した(第2章参照). RNA-seqにおいて鼻茸と下鼻甲介粘膜の遺伝子発現量を比較したところ、1361遺伝子の発現量が変化していた(図6). さらに、DNAメチル化が変化していた41遺伝子と、遺伝子発現量が変化していた1361遺伝子を比較したところ、4つの遺伝子(*PLAT*, *GeneA*, *GeneB*, *GeneC*)においてDNAメチル化と遺伝子発現量が同時に変化していた(図7). 鼻茸は下鼻甲介粘膜と比べて、2つの遺伝子(*PLAT*, *GeneA*)ではDNAが高メチル化状態で遺伝子発現量が低下していた. 一方で、残りの2つの遺伝子(*GeneB*, *GeneC*)ではDNAが低メチル化状態で遺伝子発現量が増加していた. 4つの遺伝子には、個別領域の解析を行った*PLAT*も含まれており、網羅的な解析でも再現性が確認された.

遺伝子名	DNAメチル化 (PBAT法)	遺伝子発現 (RNA-seq)
<i>PLAT</i>	高メチル化	低発現
<i>GeneA</i>	高メチル化	低発現
<i>GeneB</i>	低メチル化	高発現
<i>GeneC</i>	低メチル化	高発現

図7. DNAメチル化と遺伝子発現との関連解析によって得られた遺伝子.

### まとめ

鼻茸では、DNAメチル化が遺伝子発現と関連しており、鼻茸形成の病態と密接に関わっている可能性が示唆された.*PLAT*プロモーター領域の高メチル化が遺伝子発現量の低下を引き起こすことにより、不十分な活性化プラスミンによる過剰なフィブリン沈着を引き起こしているかもしれない. 脳細胞においては、アルコールが*PLAT*のDNAメチル化に影響を与えることが報告されている<sup>15)</sup>. また、短鎖脂肪酸の一つである酪酸(*Butyrate*)が*t-PA*の発現を増加させることを報告したが(第5章参照)<sup>16)</sup>, *Butyrate*はエピジェネティックなメカニズムであるヒストン脱アセチル化酵素のはたらきをもっており、エピジェネティックな*t-PA*への影響もあるのかもしれない<sup>17)</sup>. DNAメチル化を含む*PLAT*のエピジェネティクスは鼻茸の形成に関与している可能性があり、鼻茸の新たな治療ターゲットとなる可能性がある.

さらに、ゲノムワイドでDNAメチル化解析および遺伝子発現解析を行ったところ、個別領域の解析を行った*PLAT*の再現性が確認され、ほかに新たな3つの遺伝子(*GeneA*, *GeneB*, *GeneC*)においてメチル化と遺伝子発現が関連していることを見出した.*PLAT*に限らず、さまざまな遺伝子のDNAメチル化をはじめとするエピジェネティクスは、鼻茸形成の病態に極めて重要な役割を果たしていると考えられる.

(木戸口 正典・藤枝 重治)



## 文献

- 1) Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol.* 2012;41:10-13.
- 2) Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. *Science.* 2010;330:612-616.
- 3) Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet.* 2016;17:487-500.
- 4) Harb H, Renz H. Update on epigenetics in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135:15-24.
- 5) Nicodemus-Johnson J, Naughton KA, Sudi J, et al. Genome-wide methylation study identifies an IL-13-induced epigenetic signature in asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193:376-385.
- 6) Cheong HS, Park SM, Kim MO, et al. Genome-wide methylation profile of nasal polyps: relation to aspirin hypersensitivity in asthmatics. *Allergy.* 2011;66:637-644.
- 7) Sarnowski C, Laprise C, Malerba G, et al. DNA methylation within melatonin receptor 1A (MTNR1A) mediates paternally transmitted genetic variant effect on asthma plus rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:748-753.
- 8) Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13:484-492.
- 9) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.**
- 10) Dunoyer-Geindre S, Kruithof EK. Epigenetic control of tissue-type plasminogen activator synthesis in human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2011;90:457-463.
- 11) Olsson M, Hultman K, Dunoyer-Geindre S, et al. Epigenetic regulation of tissue-type plasminogen activator in human brain tissue and brain-derived cells. *Gene Regul Syst Bio.* 2016;10:9-13.
- 12) **Kidoguchi M, Noguchi E, Nakamura T, et al. DNA methylation of proximal PLAT promoter in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Rhinol Allergy.* 2018;32:374-379.**
- 13) Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics.* 2011;27:1571-1572.
- 14) Akalin A, Kormaksson M, Li S, et al. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol.* 2012;13:R87.
- 15) Zhang X, Kusumo H, Sakharkar AJ, et al. Regulation of DNA methylation by ethanol induces tissue plasminogen activator expression in astrocytes. *J Neurochem.* 2014;128:344-349.
- 16) **Imoto Y, Kato A, Takabayashi T, et al. Short-chain fatty acids induce tissue plasminogen activator in airway epithelial cells via GPR41&43. *Clin Exp Allergy.* 2018;48:544-554.**
- 17) Kruithof EK, Dunoyer-Geindre S. Human tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost.* 2014;112:243-254.

## 4-2

## 慢性副鼻腔炎の遺伝的要因 —遺伝子多型とNOS2反復配列多型—

### サマリー

鼻腔における一酸化窒素 (nitric oxide; NO) は主に一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase 2; NOS2) によって合成され, NOS2 遺伝子には遺伝子多型の1つである反復配列多型が存在する. 慢性副鼻腔炎患者および好酸球性副鼻腔炎患者において, NOS2 反復配列の回数が少ないほど鼻茸における NOS2 遺伝子発現量が増加していた. 反復配列の回数を, 11回以下をS型, 12回以上をL型と分類したところ, 多施設前向きコホートをを用いた慢性副鼻腔炎患者および好酸球性副鼻腔炎患者では, S/S型はS/L型やL/L型と比較して高い術後再発率を示した. NOS2 反復配列多型は鼻茸における NOS2 発現量と関連しており, 術後再発に影響を与える遺伝的要因となる可能性が示唆された.

### 多因子疾患と遺伝的要因

多因子疾患は, 生活習慣などのさまざまな環境的要因と遺伝的要因が複合的に関与して発症する疾患である. 糖尿病, 高血圧, 関節リウマチ, 気管支喘息をはじめとし, 耳鼻咽喉科領域ではアレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎など common disease の多くが多因子疾患に属する.

多因子疾患と関連する環境要因としては喫煙, 飲酒, 食事などから, 近年では, マイクロバイオームとよばれるヒトと共存する微生物叢が疾患と関連していることが報告され, 我々も慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎に関するマイクロバイオームについての研究を進めている (第10章参照)<sup>1)</sup>.

遺伝的要因としては, 遺伝子を構成しているDNA配列の変化が疾患の発症や病態に関連すると考えられている. 遺伝子を構成しているDNA配列はヒト個人間で0.1%の違いがあるとされ, 集団におけるアレル頻度が1%未満の配列変化を変異, 1%以上のアレル頻度を有するものを多型として区別している. DNA配列変化のうち, 1つの塩基が別の塩基に置き換わったものを一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP), いくつかの塩基からなる配列を繰り返しDNAの長さがヒト個人間

で異なるものを反復配列多型, 数千塩基以上の大きなサイズのDNAが通常は2コピーであるところを1コピー以下 (欠失) や3コピー以上 (重複) となっているのがコピー数多型 (copy number variation; CNV) である. 今まで, 網羅的に遺伝子多型を分析する方法として, マイクロアレイを使用してゲノム全領域にまたがるSNPsを決定して解析する全ゲノム関連解析 (genome-wide association study; GWAS) がさかんに行われてきた<sup>2)</sup>. 我々は日本人を対象としたアレルギー疾患のGWASを数多く行ってきており, アレルギー性鼻炎<sup>3)</sup>, アトピー性皮膚炎<sup>4)</sup>, 小児喘息<sup>5)</sup>, IgE産生<sup>6)7)</sup>, 好酸球性食道炎<sup>8)</sup> について報告した. それらの結果から, thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の遺伝子多型が好酸球関連疾患では関連があるのではないかと考えてきた. そこで鼻茸合併慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) と慢性副鼻腔炎を伴うアスピリン不耐症 (AERD) 患者の TSLP 遺伝子多型を調べた. 表1に示す TSLP 遺伝子多型 (rs1837253) が CRSwNP および AERD ともに別集団による2度の解析でも有意な相関を認めた (表1)<sup>9)</sup>. この部位にて CC genotype はヒト鼻上皮細胞に dsRNA の刺激をした際の TSLP 分泌が有意に高いとされ, CC genotype が病態に関与している<sup>10)</sup>. 同じように鼻茸中好酸球数との関係を調べるとリス

表1. rs1837253 遺伝子多型と CRSwNP および AERD 発症率との関係<sup>9)</sup>.

Stage	Subject	Genotype			Total	RAF	P value <sup>†</sup>	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P het <sup>‡</sup>
		TT	TC	CC					
<b>CRSwNP</b>									
Primary	Case	93	146	64	303	0.45	1.27×10 <sup>-6</sup>	1.60 (1.32–1.94)	
	Control	396	395	109	900	0.34			
Validation	Case	61	92	43	196	0.45	1.78×10 <sup>-5</sup>	1.63 (1.30–2.04)	
	Control	449	431	122	1002	0.34			
Combined							1.01×10 <sup>-10</sup>	1.61 (1.40–1.86)	0.900
<b>AERD</b>									
Primary	Case <sup>§</sup>	25	20	23	68	0.49	1.16×10 <sup>-3</sup>	1.78 (1.26–2.52)	
	Control	396	395	109	900	0.34			
Validation	Case	35	67	23	125	0.45	1.08×10 <sup>-3</sup>	1.57 (1.20–2.05)	
	Control	449	431	122	1002	0.34			
Combined							4.86×10 <sup>-6</sup>	1.64 (1.33–2.04)	0.575

†: P values and ORs of the logistic regression test with adjustment for sex and age as covariates. Results of combined analyses were calculated using fixed-effects meta-analysis. ‡: P values of Cochran's heterogeneity statistics. §: Among a total of 499 patients with CRSwNP (303 cases in primary set and 196 cases in validation set), a total of 68 subjects had AERD. RAF, risk allele frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

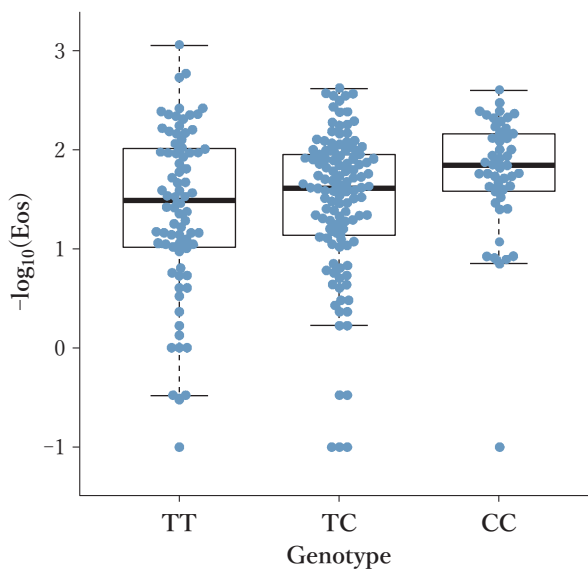


図1. 鼻茸における浸潤好酸球数と TSLP 遺伝子多型 (rs1837253) との関係 (n=240).

Linear regression 解析を行ったところ, CC genotype と他の genotype の間には,  $p=0.017$  と有意な差を認めた.

クアレルである CC genotype では, 有意に好酸球浸潤数が高いことが判明した (図1)<sup>9)</sup>.

海外では Kristjansson らが興味深い論文を報告した<sup>11)</sup>. 鼻茸, CRS, コントロールの GWAS を行った結果, *ALOX15*, *HLA*, *IL-18R1-IL1RL1*, *IL-33*, *FOXP1*, *CYP2S1*, *SLC22A4*, *MYRF*, *TSLP*, *10p14* の変異と鼻茸に関連があることがわかった. *TSLP* の変異は, 我々と同じ rs1837253 の遺伝子多型であった. さらに *ALOX15* の missense variant で, 15-LO 酵素活性がないと鼻茸ができにくいことが証明された. 一方 Miyata らは, 鼻茸由来の好酸球を分離し刺激をすると, 末梢血好酸球を刺激した場合よりも *ALOX15* で代謝された脂質メディエーターが減少していることを報告した<sup>12)</sup>. 第3章のペリオチンの項目で述べる鼻茸と下鼻甲介粘膜の RNA 発現を RNA-Seq で比較した我々のデータでは, *ALOX15* 発現は鼻茸全体では, 有意に亢進していた<sup>13)</sup>. 以上のことから, 好酸球性副鼻腔炎は *TSLP* と *ALOX15* 遺伝子が少なからず関連していることは間違いのないと思われる.

多因子疾患に関連する遺伝子多型は数十~数百個以上存在するとされ, 一つ一つの遺伝子多型が疾患に及ぼす影響力は小さい. GWAS によって見出され

た多くの疾患感受性遺伝子は、それぞれが発症や予後に与える影響力は小さく、現状では病態機序の全貌を理解できるまでには至っていない。そのため、近年では、世界各国のゲノムデータを統合したGWASの大規模化、遺伝子発現量を調整するゲノム領域 (expression quantitative trait locus; eQTL) との統合解析、全ゲノムメチル化解析 (epigenome-wide association studies; EWAS) などへ発展してきている。

遺伝子多型には、SNPsのほかに反復配列多型が存在する。数塩基の小さな塩基配列が繰り返すものから1,000塩基以上の単位で塩基配列が繰り返すものを含めると、反復配列はヒトゲノムの約50%を占めるとされる<sup>14)</sup>。反復配列のうち、100塩基未満からなる配列が繰り返されているものをミニサテライトと呼び、数塩基が繰り返されているものをマイクロサテライトと呼ぶ。マイクロサテライトはヒトゲノムの約3%を占めるとされ、ヒトゲノムに100万以上存在すると考えられているが、その全貌はいまだ明らかとなっていない<sup>15)~17)</sup>。反復配列の中には、トリプレットリピート病との関連が明らかなものも存在するが、多くの反復配列多型はいまだ機能が不明であり「ジャンクDNA」の1つと考えられてきた。しかし近年、反復配列多型がさまざまな遺伝子発現と関連していることが報告され、反復配列多型と疾患やその疾患と関わる形質との関連が注目されている<sup>18)</sup>。

## 慢性副鼻腔炎とNOS2遺伝子反復配列について

一酸化窒素 (nitric oxide; NO) は生体内でさまざまな組織によって産生されており、一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS) によって合成される。NOSは細胞内に常時産生される神経型NOS (neuronal NOS; nNOS: 遺伝子名NOS1) や内皮型NOS (endothelial NOS; eNOS: 遺伝子名NOS3) と、炎症などの外的ストレスによって産生される誘導型NOS (inducible NOS; iNOS: 遺伝子名NOS2) が存在する。気道炎症組織におけるNOは主にNOS2によって合成される<sup>19)</sup>。気管支喘息では、代謝産物

である呼気NOが病勢を反映するバイオマーカーとしてすでに臨床応用されており<sup>20)</sup>、私たちは鼻腔NOや呼気NOと慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎との関連について報告してきた (第2章参照)<sup>21)</sup>。また、鼻腔NOの主な合成酵素であるNOS2に関しては、鼻茸中のNOS2の過剰発現や好酸球との関連が報告されており慢性副鼻腔炎の病態と密接に関連している<sup>22)~24)</sup>。

NOS2のプロモーター領域には反復配列多型の1つであるマイクロサテライト多型が存在する。このNOS2の反復配列多型は、心房細動や肺動脈高血圧症などの循環器疾患のほかに、鼻茸、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患との関連も報告されている<sup>25)~28)</sup>。その中で、日本人の気管支喘息患者を対象とした研究では、NOS2の反復配列多型が末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) 中のNOS2発現量や呼気NOと関連し、さらに症状増悪とも関連していたことが報告されている<sup>26)</sup>。そこで、私たちは好酸球性副鼻腔炎を含む慢性副鼻腔炎においてもNOS2遺伝子反復配列多型が鼻茸や鼻腔粘膜におけるNOS2発現量や術後予後に影響を与えているのではないかと考え、慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎におけるNOS2遺伝子反復配列多型と鼻茸中のNOS2発現量との関連について検討した<sup>29)</sup>。さらに、多施設前向きコホートを使用して、NOS2遺伝子反復配列多型が慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎の術後再発に与える影響についても併せて検討した。

## 鼻茸ではNOS2反復配列の回数が少ないほどNOS2発現量が高い<sup>29)</sup>

福井大学医学部附属病院において内視鏡下鼻副鼻腔手術を行った慢性副鼻腔炎患者114名を対象に、手術時に病理診断目的のために作成した鼻茸および鼻腔粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋 (firmalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 切片からDNAを抽出した。抽出したDNAはQubit3.0を用いて濃度測定を行った。NOS2の反復配列を含むプロモーター領域を含む配列を増幅するプライマーセットを用いてPCRを行い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (サーモフィッシャーサイエン



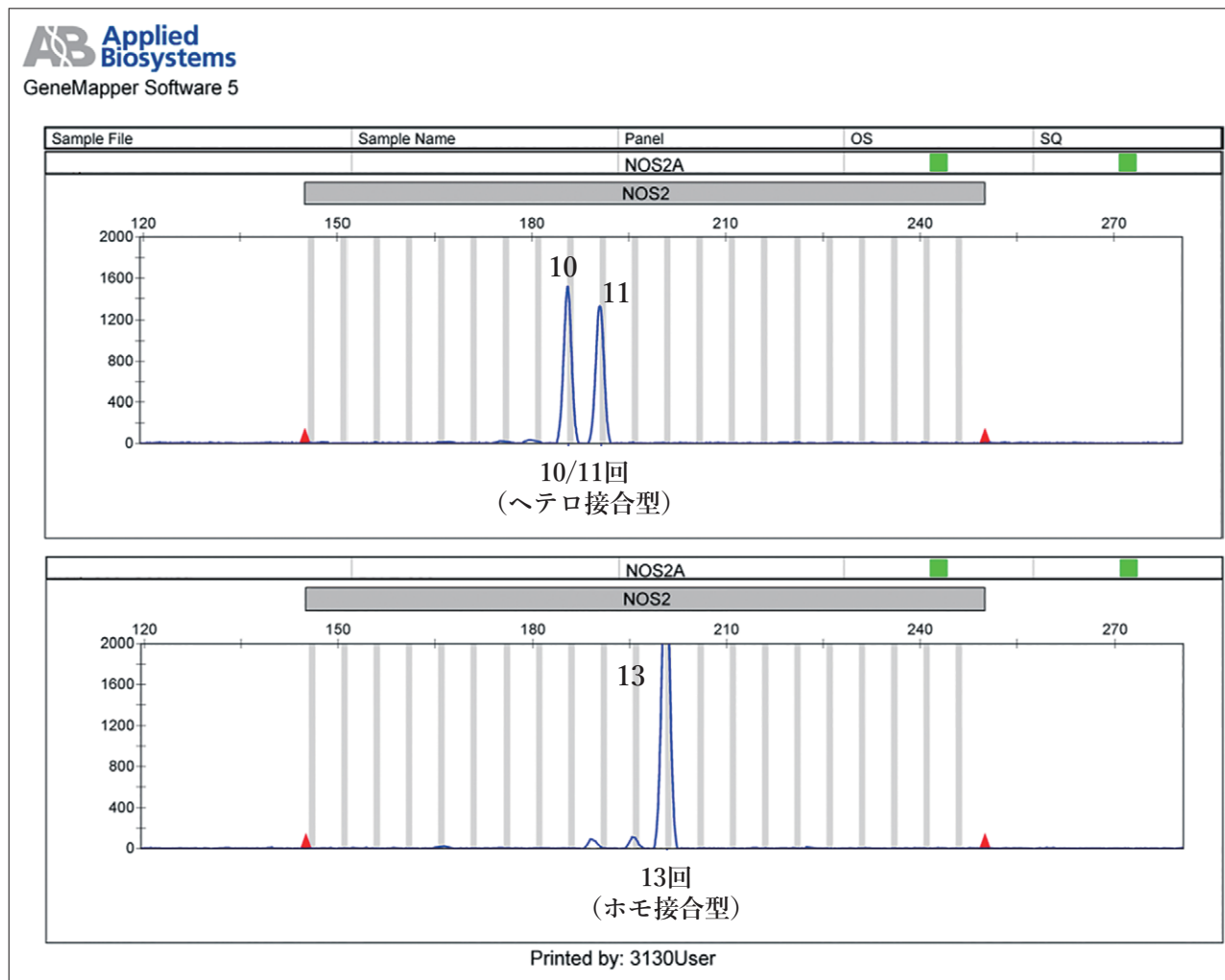


図2. NOS2反復配列のGeneMapper softwareでの測定例。

ティフィック)を用いてNOS2プロモーター領域のゲノム配列長を取得した。解析にはGene Mapper v5.0 software (サーモフィッシャーサイエンティフィック)を用いて反復配列の回数を計測した(図2)。各症例のNOS2の反復配列は5~21回であり、反復回数の割合は10~12回がそれぞれ全体の15%以上であった(図3)。

次に、同一症例の鼻茸、鉤状突起、下鼻甲介粘膜からRNAを抽出し、反復配列の回数とNOS2発現量との関連を検討した。抽出したRNAはAgilent 2100 Bioanalyzer (アジレントテクノロジー)を用いてRNAの品質(RNA integrity number; RIN)を測定した。114例のうち79例からの検体が以後の解析に使用可能であった。抽出したRNAはNOS2をターゲットとした定量リアルタイムPCR法によりNOS2発現量を測定した。Glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内在性コントロールとして発現量の補正を行った。NOS2発現量は繰返し配列の増加にともない段階的に減少した(図4)。慢性副鼻腔炎患者をJESRECスコアによって好酸球性副鼻腔炎(スコア11点以上, n=44)と非好酸球性副鼻腔炎(スコア10点以下, n=35)に分類したところ、好酸球性副鼻腔炎は非好酸球性副鼻腔炎に比べてNOS2発現量が有意に増加しており、また好酸球性副鼻腔炎におけるNOS2発現量は反復配列の増加にともない段階的に減少した(図5)。さらに、反復配列の回数をHiraiらの報告に従って<sup>26)</sup>、11回以下をS型、12回以上をL型と分類して解析を行ったところ、慢性副鼻腔炎ではL/L型、S/L型、S/S型の順にNOS2発現量が多かった(図6)。



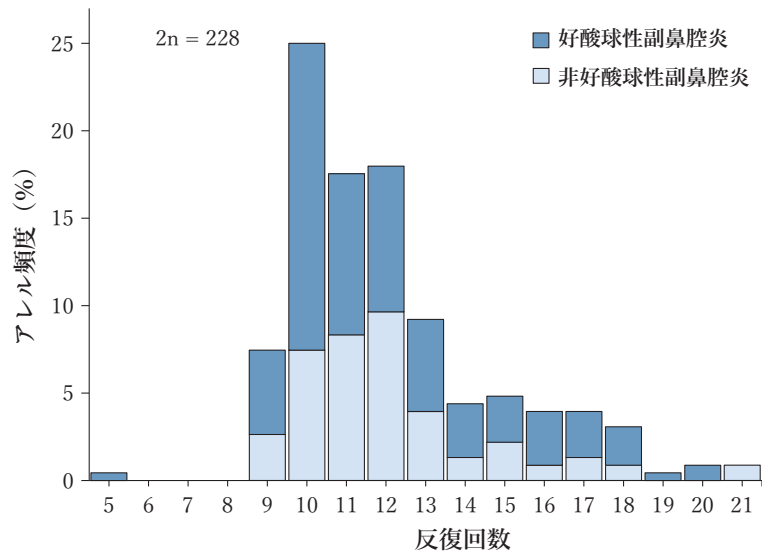


図3. 反復配列の繰り返し回数と頻度 (遺伝子発現解析群).

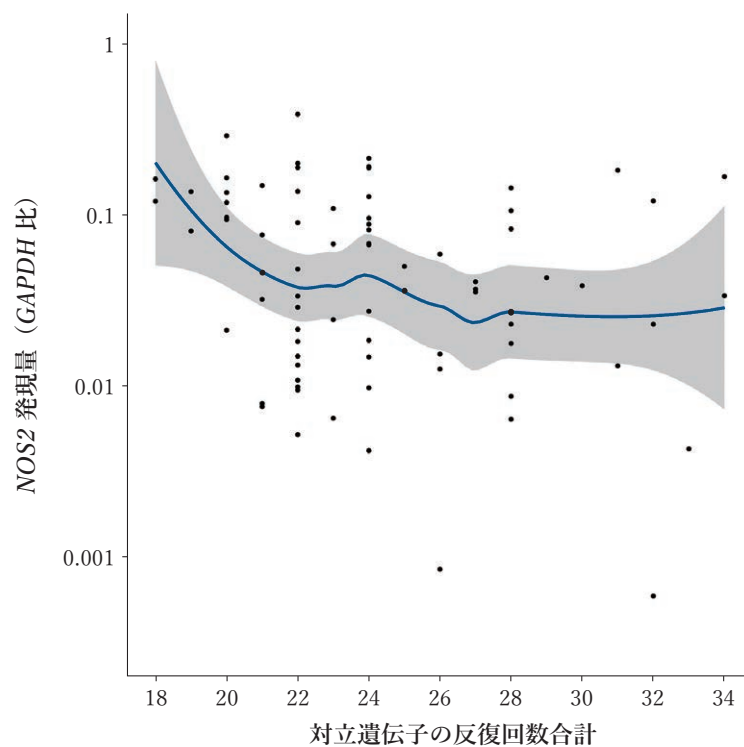


図4. 反復配列の繰り返し回数とNOS2発現量.

### NOS2 遺伝子反復配列の回数が少ない患者は高い術後再発率を示した<sup>29)</sup>

さらに、NOS2 遺伝子多型と術後再発との関連について検討を行うために、前述の遺伝子発現量の解析群とは独立した多施設前向きコホートを用いた研究を行った。福井大学医学部附属病院，岡山大学病

院，横浜市立大学附属市民総合医療センター，獨協医科大学病院，自治医科大学附属さいたま医療センターにおける慢性副鼻腔炎の多施設前向きコホート205名についてのNOS2 遺伝子多型と術後経過を検討した。各症例のNOS2の反復配列は5～20回であり，反復回数の割合は10～12回がそれぞれ全体の

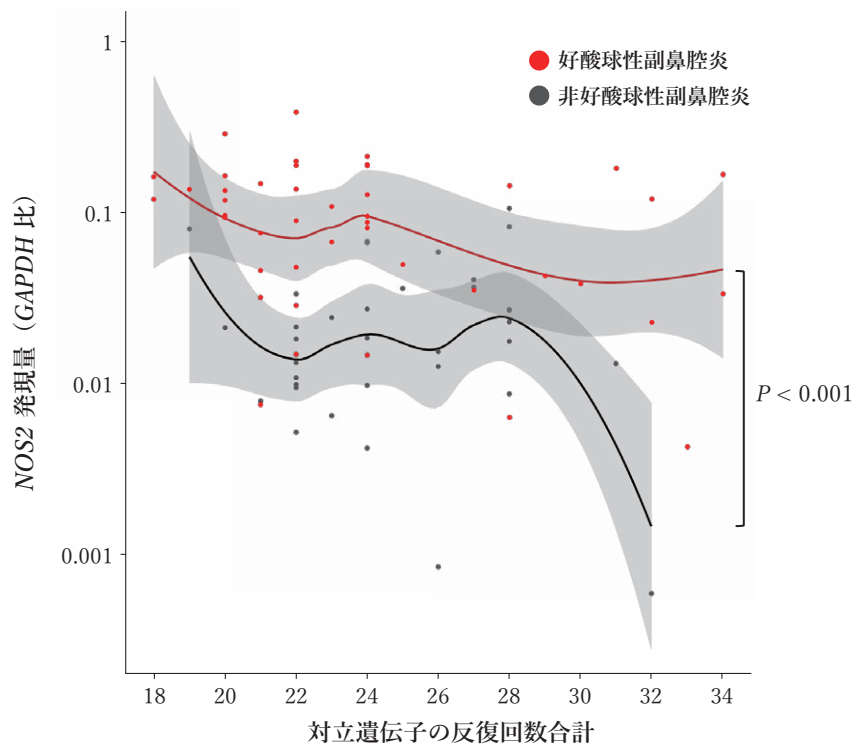


図5. 反復配列の繰り返し回数とNOS2発現量(好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎に分類).

15%以上であり、遺伝子発現量を検討した群と類似していた(図7). 反復配列の回数を、遺伝子発現量を解析した群と同様に11回以下をS型、12回以上をL型と分類したところ、慢性副鼻腔炎患者では、S/S型はS/L型+L/L型と比較して高い術後再発率を示した(図8). また、慢性副鼻腔炎患者をJESRECスコアによって好酸球性副鼻腔炎(スコア11点以上, n=160)と非好酸球性副鼻腔炎(スコア10点以下, n=45)に分類したところ、好酸球性副鼻腔炎患者において同様にS/S型はS/L型+L/L型と比較して高い術後再発率を示した(図9).

## まとめ

慢性副鼻腔炎患者および好酸球性副鼻腔炎患者において、NOS2反復配列の回数が少ないほど鼻茸におけるNOS2遺伝子発現量は増加していた。日本人の気管支喘息患者を対象とした研究では、NOS2反復配列の回数が少なくなるにつれPBMC中のNOS2発現量が増加していると報告されており、私たちの慢性副鼻腔炎患者の鼻茸中のNOS2発現量において

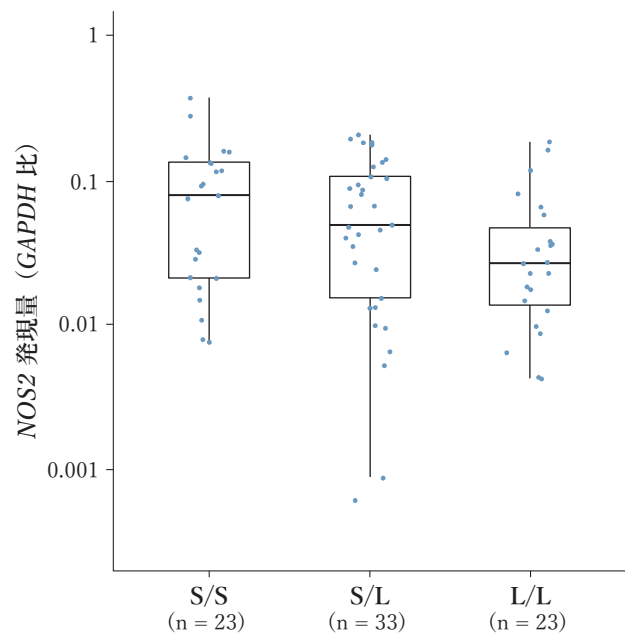


図6. S/S型, S/L型, L/L型におけるNOS2発現量.

も同様の結果が得られた。また、NOS2反復配列の回数が少ない症例をS(11回以下)、多い症例をL(12回以上)と分類したところ、Sのホモ接合型のS/S型は、S/L型やL/L型と比較して術後に再発しやすく、

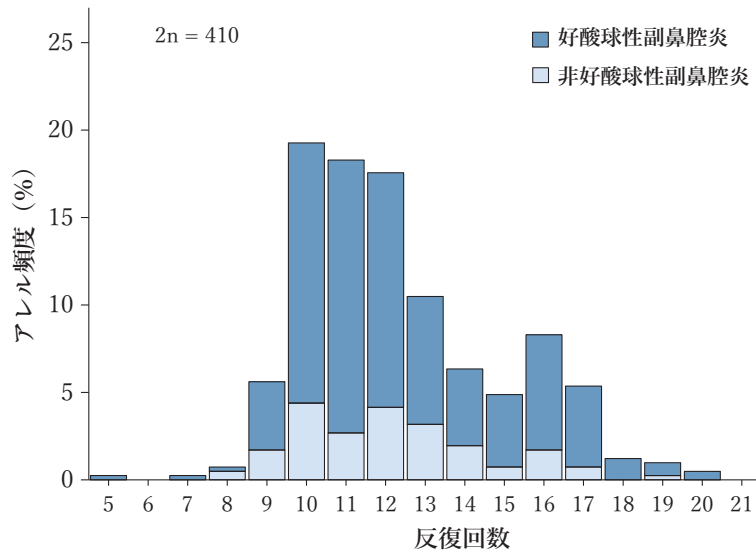


図7. 反復配列の繰り返し回数と頻度 (多施設前向きコホート).

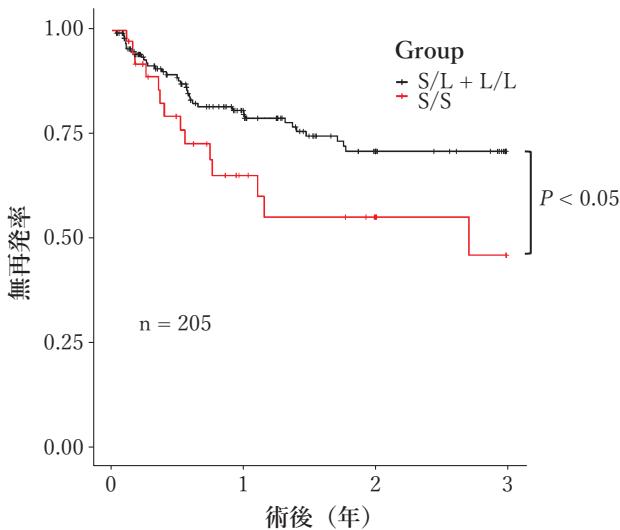


図8. 慢性副鼻腔炎における反復配列 (S/S型, S/L型, L/L型) と術後再発率.

術後再発のリスクになることが示唆された。今までに、慢性副鼻腔炎や鼻茸と関連した遺伝子多型の報告はあるが、慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎の“術後再発”と関連する遺伝子多型の報告はほとんどない。本研究において、NOS2反復配列多型が術後再発に関わる遺伝的要因として慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎における新たなリスク因子として見出した。私たちは今までにJESREC Studyを介して、慢性副鼻腔炎の術後再発や難治性のリスクを明らかにし、それらの要因を基に好酸球性副鼻腔炎の診断

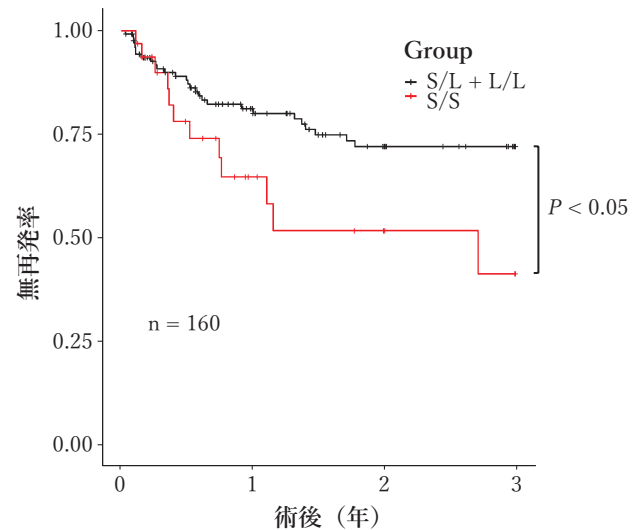


図9. 好酸球性副鼻腔炎における反復配列 (S/S型, S/L型, L/L型) と術後再発率.

基準を作成してきた<sup>30)</sup>。また、術後再発リスクと関連する因子として血清ペリオスチン値を報告した(第2章参照)。NOS2反復配列多型は、慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎の術後再発に関わる遺伝的要因の1つとして、臨床的にJESREC診断基準や血清ペリオスチンとともに評価すべきリスク因子となるかもしれない。

(木戸口 正典・藤枝 重治)

## 文献

- 1) Jatzlauk G, Bartel S, Heine H, et al. Influences of environmental bacteria and their metabolites on allergies, asthma, and host microbiota. *Allergy*. 2017;72:1859-1867.
- 2) Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide association studies of allergic diseases. *Allergol Int*. 2013;62:21-28.
- 3) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, et al. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68:92-100.
- 4) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012;44:1222-1226.
- 5) Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, et al. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet*. 2011;7:e1002170.
- 6) Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, et al. Genome-wide association study for levels of total serum IgE identifies HLA-C in a Japanese population. *PLoS One*. 2013;8:e80941.
- 7) Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, et al. S2254X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:498-500.
- 8) Hirota T, Nakayama T, Sato S, et al. Association study of childhood food allergy with genome-wide association studies-discovered loci of atopic dermatitis and eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:1713-1716.
- 9) Nakayama T, Hirota T, Asaka D, et al. A genetic variant near TSLP is associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and aspirin-exacerbated respiratory disease in Japanese populations. *Allergol Int*. 2020;69:138-140.
- 10) Hui CC, Yu A, Heroux D, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) secretion from human nasal epithelium is a function of TSLP genotype. *Mucosal Immunol*. 2015;8:993-999.
- 11) Kristjansson RP, Benonisdottir S, Davidsson OB, et al. A loss-of-function variant in ALOX15 protects against nasal polyps and chronic rhinosinusitis. *Nat Genet*. 2019;51:267-276.
- 12) Miyata J, Fukunaga K, Kawashima Y, et al. Dysregulated fatty acid metabolism in nasal polyp-derived eosinophils from patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2019;74:1113-1124.
- 13) **Ninomiya T, Noguchi E, Takenori H, et al. Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Sci Rep*. 2018;8:11450.**
- 14) Gemayel R, Vences MD, Legendre M, et al. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu Rev Genet*. 2010;44:445-477.
- 15) Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004;5:435-445.
- 16) Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2007;5:7-14.
- 17) Hannan AJ. Tandem repeat polymorphisms: modulators of disease susceptibility and candidates for 'missing heritability'. *Trends Genet*. 2010;26:59-65.
- 18) Suzuki H, Forrest ARR, van Nimwegen E, et al. The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line. *Nat Genet*. 2009;41:553-562.
- 19) Abba AA. Exhaled nitric oxide in diagnosis and management of respiratory diseases. *Ann Thorac Med*. 2009;4:173-181.
- 20) Shaw DE, Berry MA, Thomas M, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:231-237.
- 21) **Yoshida K, Takabayashi T, Imoto Y, et al. Reduced nasal nitric oxide levels in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019;68:225-232.**
- 22) Jorissen M, Lefevre L, Willems T. Nasal nitric oxide. *Allergy*. 2008;56:1026-1033.
- 23) Taruya T, Takeno S, Kubota K, et al. Comparison of arginase isoform expression in patients with different subtypes of chronic rhinosinusitis. *J Laryngol Otol*. 2015;129:1194-1200.
- 24) Noda N, Takeno S, Fukui T, et al. Monitoring of oral and nasal exhaled nitric oxide in eosinophilic chronic rhinosinusitis: a prospective study. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26:255-259.

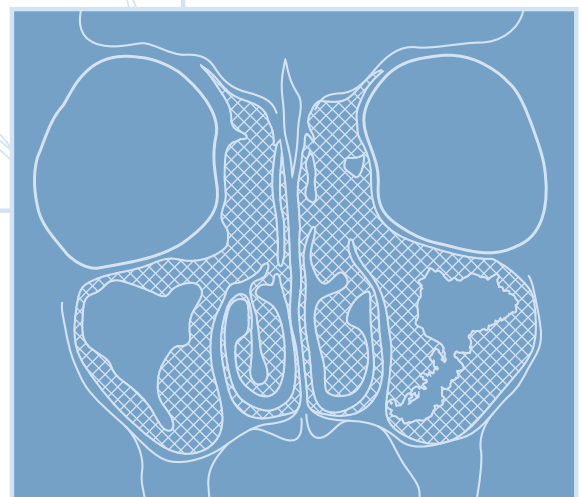
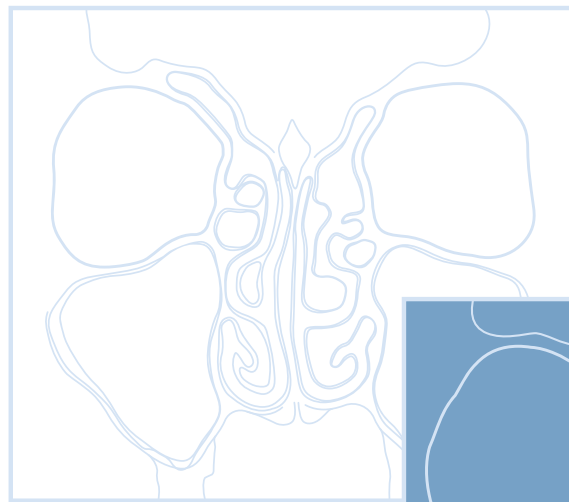
- 25) Pascual M, Sanz C, Isidoro-Garcia M, et al. (CCTTT)n polymorphism of NOS2A in nasal polyposis and asthma: a case-control study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008;18:239-244.
- 26) Hirai K, Shirai T, Suzuki M, et al. Association between (CCTTT)n repeat polymorphism in NOS2 promoter and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142:663-665 e663.
- 27) Konno S, Hizawa N, Yamaguchi E, et al. (CCTTT)n repeat polymorphism in the NOS2 gene promoter is associated with atopy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:810-814.
- 28) Hsu LA, Yeh YH, Chen WJ, et al. Association evidence of CCTTT repeat polymorphism in the iNOS promoter and the risk of atrial fibrillation in Taiwanese. *Sci Rep*. 2017;7:42388.
- 29) **Kidoguchi M, Yoshida K, Noguchi E, et al. Association between the NOS2 pentanucleotide repeat polymorphism and risk of postoperative recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps in a Japanese population. *Allergol Int* (in press).**
- 30) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy*. 2015;70:995-1003.





## 第5章

# 線溶系と凝固系のアンバランスと 好酸球性副鼻腔炎





## 5-1

# 線溶系抑制による過剰なフィブリン網の形成が鼻茸形成に関与している

## サマリー

鼻粘膜の過度な浮腫によって生じる鼻茸の形成メカニズムは良くわかっていなかった。本研究では鼻粘膜に過剰に沈着したフィブリン網が浮腫を遷延化させることを発見した。また、鼻粘膜上皮から産生される組織型プラスミノゲンアクチベーターが type 2 炎症によって著しく抑制されこれによる組織の線溶系抑制によるフィブリン網の分解力低下がフィブリン網の過剰な沈着の原因であることを明らかにした。本研究によって好酸球性炎症を呈する慢性副鼻腔炎の難治化メカニズムの一部を明らかにした。

## はじめに

CRSwNP, および ECRS は難治性で再発率も高い。本疾患の治療で最も重要なことは易再発性の鼻茸の制御である<sup>1)~4)</sup>。鼻茸は中鼻道周囲や副鼻腔粘膜から生じる浮腫性の病変であるが、肉眼的には半透明のみずみずしい外観を呈し、組織学的には好酸球の著明な浸潤と粘膜浮腫が特徴である。高度の炎症が鼻茸の発生に関与していることが予想されるがその領域特異性も含めて詳しい病態メカニズムはわかっていない。これまでの研究で浮腫は血漿蛋白であるアルブミンが主な成分であることがわかっている<sup>5)</sup>。しかし末梢血管から漏出したアルブミンは容易に鼻粘膜上皮を通過して鼻腔に放出される。実際アレルギー性鼻炎患者の鼻汁中には多量のアルブミンが含まれてる<sup>6)</sup>。どのようなメカニズムで鼻粘膜の間質に末梢血管から漏出した血漿タンパクが長期に保持されて鼻茸の形成が起こるのかはわかっていない。

フィブリン網は凝固系によって合成され、血管内の止血機構として赤血球や血小板と共同して血栓を形成する。血管外においても特に外傷や組織の炎症の際に凝固系によってフィブリン網が形成され創傷治癒の初期に浮腫を形成し、組織損傷の炎症を最小限にとどめる役割がある<sup>7)</sup>。しかし過剰なフィブリン網の形成はさまざまな疾患の原因になることも知られており、関節リウマチ、多発性硬化症、重症気管支喘息、木質結膜炎などがあげられる<sup>7)~11)</sup>。

フィブリン網の分解には線溶系が関与しており、セリンプロテアーゼのプラスミンがフィブリン網を直接分解する。プラスミンはプラスミノゲンから合成されその触媒は urokinase plasminogen activator (u-PA) と tissue plasminogen activator (t-PA) の2種類の酵素が担っている<sup>12)</sup>。

我々は鼻粘膜における血漿タンパクの保持による過度な粘膜浮腫がフィブリン網の過剰な形成によって起こっているとの仮説のもとに本研究を行った。その結果鼻茸の形成にはフィブリン網代謝異常が深く関与しており、鼻茸形成の領域特異性についても一定の見解が得られた。

## 方法

### サンプル

ノースウエスタン大学免疫アレルギー・耳鼻咽喉科教室において副鼻腔炎に対して行った手術の際に採取した鼻粘膜組織を本研究に使用した。全ての患者に対してインフォームドコンセントをとり同施設の倫理委員会の承認を得ている。採取したサンプルはコントロール患者から採取した鉤状突起 (uncinate process tissue; UT) (Control UT), CRSsNP 患者の鉤状突起 (CRSsNP UT), CRSwNP 患者の鉤状突起 (CRSwNP UT), CRSwNP 患者の鼻茸組織の4群に分類して検討を行った。各群の患者情報を表1に示す。

表1. サンプルデータ.

	Control (n=73)	CRSsNP UT (n=126)	CRSwNP UT (n=156)	CRSwNP Polyp
Male/Female	36/37	50/76	92/64	—
Age, yr, median (range)	43 (16–78)	36 (18–73)	45 (22–74)	—
Atopy				
Yes	4	51	73	—
No	49	55	52	—
Unknown	20	20	31	—
Asthma				
Yes	0	16	66	—
No	67	101	84	—
Unknown	6	9	6	—
Methodology used				
Tissue RNA, n (M/F)	16 (7/9)	27 (8/19)	33 (21/12)	33 (22/12)
Age, yr, median (range)	45 (16–62)	35 (20–59)	38 (23–67)	39 (23–67)
Tissue extract, n (M/F)	31 (16/15)	64 (21/43)	61 (39/22)	55 (34/21)
Age, yr, median (range)	45 (19–72)	36 (18–73)	44 (26–73)	45 (26–73)
Immunohistochemistry, n (M/F)	14 (5/9)	18 (8/10)	16 (9/7)	17 (11/6)
Age, yr, median (range)	43 (19–64)	43 (24–70)	52 (33–64)	50 (27–74)
Nasal lavage, n (M/F)	36 (20/16)	49 (22/27)	48 (35/13)	—
Age, yr, median (range)	42 (18–78)	36 (18–73)	45 (29–72)	—

Definition of abbreviations: CRSsNP=chronic rhinosinusitis without nasal polyps; CRSwNP=chronic rhinosinusitis with nasal polyps; F=female, M=male.

## 免疫組織化学

フィブリンの染色は蛍光免疫染色法を用いて行った。凍結切片をアセトンで固定し、非特異的な5%ヤギ血清にてブロッキングを行い50倍希釈のAnti-human fibrin antibody (Sekisui Diagnostics, Stamford, CT) で4°C, 一晚反応させた。二次抗体には500倍希釈のAlexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (invitrogen) を暗所室温で1時間反応させた。撮影にはOlympus IX71倒立顕微鏡を使用した。フィブリン網の半定量には10視野をランダムに選択し染色強度を0~3の4段階(0:発現なし, 1:軽度, 2:中等度, 3:高度)に分類し、本研究に無関係な研究者2人が測定を行った。t-PAの免疫組織化学にはパラフィン切片を用いた。一次抗体にrabbit anti-human t-PA pAb (HPA003412, rabbit antibody; Sigma-Aldrich) を100倍希釈で、4°C, 一晚反応させた。ネガティブコントロールとして同濃度のrabbit control IgG (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて反応させた。二次抗体にはbiotinylated secondary goat anti-rabbit antibody

(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) を500倍希釈で使用した。発色にABC reagent (avidin-biotin-horseradish peroxidase complex; Vector Laboratories, Burlingame, CA) を使用した。

## Real-Time PCR

鼻粘膜からtotal RNAをNucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA), DNase Iを用いて抽出した。Single-strand cDNAの作成にはSuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。Real-time RT-PCRはTaqMan methodを用いて行った<sup>13)</sup>。

## ELISA

u-PA, tPA (Assaypro St. Charles, MO), eosinophilic cationic protein (ECP) (MBL, Woburn, MA), d-dimer (Diagnostica Stago, Asnieres-Sur-Seine, France) はそれぞれのELISAキットで測定した。



## 細胞培養

気道上皮細胞の実験には2種類の細胞を使用した。Primary normal human bronchial epithelial cells (NHBE) はLonza (Walkersville, MD) から購入し、Human primary nasal epithelial cells (PNEC) は手術の際に患者の鉤状突起粘膜からRhinoprobe (Arlington Scientific, Inc., Springville, UT) を用いて採取した。NHBEとPNECはコラーゲンコートされた24 wellプレートに播種して、serum-free bronchial epithelial cell growth medium (BGEM, Lonza) で培養した。サイトカインでの刺激前にはBEGMからhydrocortisone抜いて少なくとも36時間培養した。

## 統計解析

全てのデータをmean±SEMで示す。各群間の比較はKruskal-Wallis ANOVA with Dunnett post hoc testing and Mann-Whitney U testを用い、相関は

Spearman rank correlationを用いて解析を行った。P valueが0.05以下の場合有意差ありとした。

## 結果

### 慢性副鼻腔炎患者における鼻粘膜のフィブリン網

鼻粘膜におけるフィブリン網を測定するために蛍光免疫染色法を用いて検討を行った。採取したサンプルはコントロール患者から採取した鉤状突起 (Control UT), CRSsNP患者の鉤状突起 (CRSsNP UT), CRSwNP患者の鉤状突起 (CRSwNP UT), CRSwNP患者の鼻茸組織の4群に分けて比較した (表1)。CRSsNP UTにおいてはごく少量の、CRSwNP UTでは中等度のフィブリン網の存在を認めた。一方、鼻茸 (nasal polyp; NP) では非常の強いフィブリン網の染色が認められた (図1a~d)。染色の程度を半定量化したところ鼻茸組織におけるフィブリン網の量はControl UTおよびCRSsNP UT

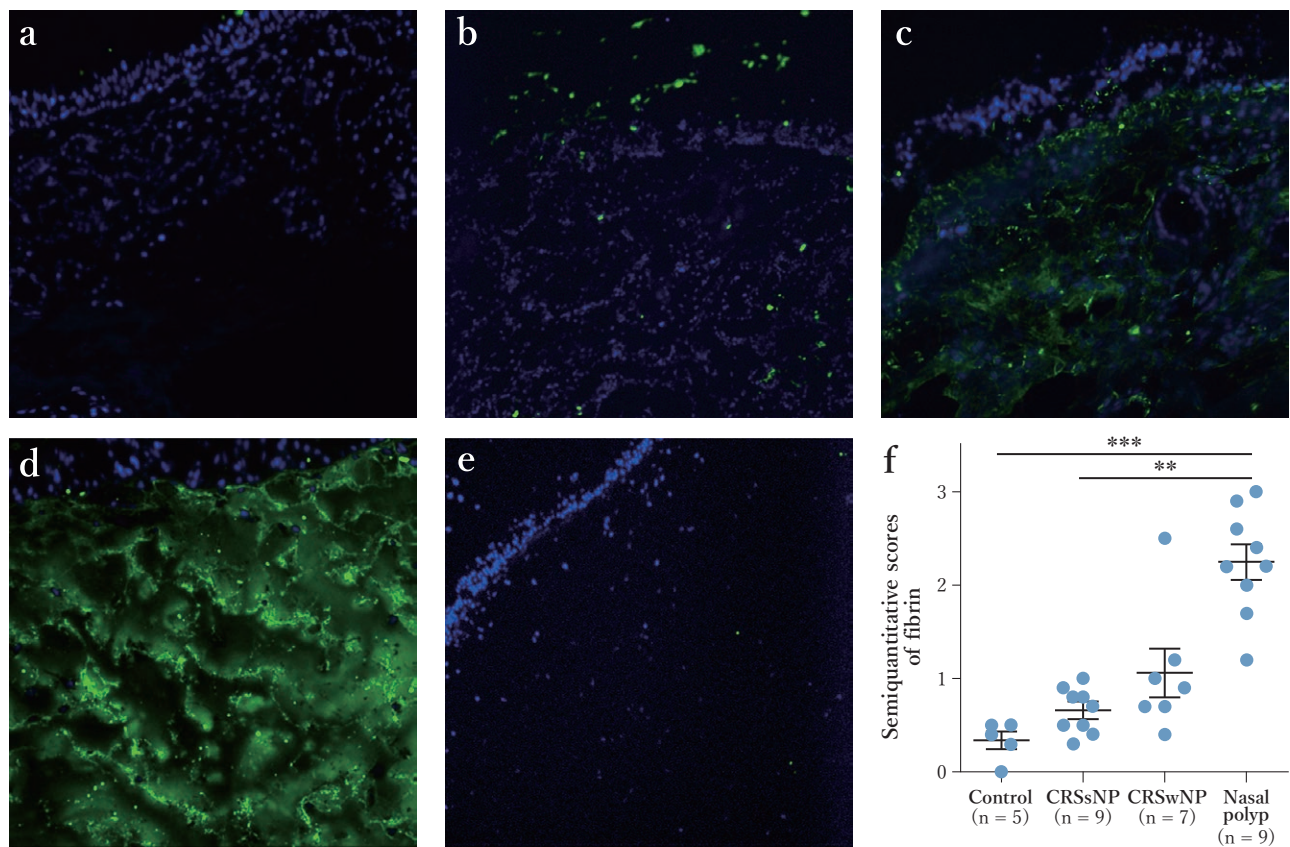


図1. 鼻粘膜におけるフィブリン網の蛍光免疫染色。

抗ヒトフィブリン抗体使用 (緑色)。コントロール鉤状突起 (UT) (a), CRSsNP UT (b), CRSwNP UT (c), CRSwNP 鼻茸 (NP) (d)。ネガティブコントロール (e)。フィブリン網染色強度の判定量グラフ (f)。×400。\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

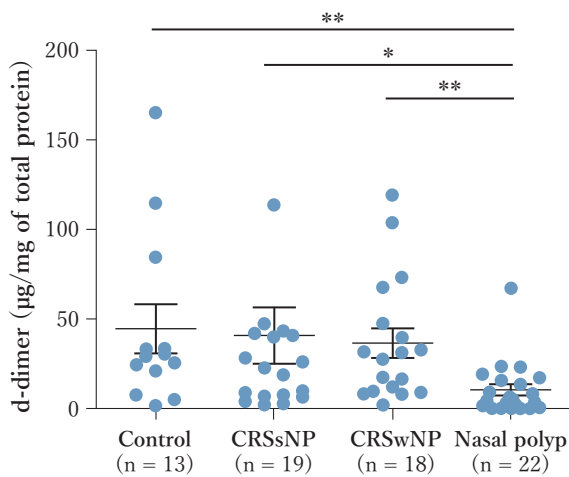


図2. 鼻粘膜組織におけるフィブリン網分解産物 d-dimer 量.

コントロール鉤状突起 (UT), CRSsNP UT, CRSwNP UT, CRSwNP 鼻茸 (NP) における d-dimer 量を比較した. d-dimer 濃度は組織抽出液における総蛋白量で標準化を行った.

と比較して有意差をもって多いことがわかった ( $P < 0.01$ , 図1f).

凝固系によって形成されたフィブリン網は通常線溶系によって分解され, フィブリン分解産物 (fibrin degradation products; FDPs) になる. 線溶系のプラスミンがフィブリン網を直接分解しフィブリン網の過剰な沈着を防止している<sup>14)</sup>. そこで鼻粘膜における線溶系の強度を図るためにFDPの1つである d-dimer の量を ELISA によって定量した. 鼻茸組織において d-dimer のタンパク量は Control UT および CRSsNP UT と比較して有意差をもって低かった (図2). これらの結果から鼻茸組織における過剰なフィブリン網の形成はフィブリン網の分解が抑制されているためであると考えられる.

## CRS 患者における plasminogen activators の発現

フィブリン網は線溶系の最終生成物である plasmin によって直接分解を受けるが, Plasmin は plasminogen 産生され, この反応には2つの plasminogen activator (urokinase plasminogen activator (u-PA), tissue plasminogen activator (t-PA)) の作用が必須である.

我々は4群の鼻粘膜組織における u-PA と t-PA の発現量を測定した. Real time PCR の検討では u-PA の発現量に関しては4群間に差が認められなかったが (図3a), t-PA の発現量は鼻茸組織において Control UT および CRSsNP UT と比較して有意差をもって少なかった ( $P < 0.01$ ) (図3b). このデータをタンパクレベルでも確認するために, 鼻粘膜組織からタンパクを抽出し ELISA 法によって u-PA と t-PA の発現量を測定した. その結果, mRNA のデータと同様に u-PA では4群間に差が認められなかったが (図3c), t-PA の発現量は鼻茸組織において Control UT および CRSsNP UT と比較して有意差をもって少なかった ( $P < 0.01$ ) (図3d). t-PA の活性を測定したところやはり鼻茸組織において優位に低下していた ( $P < 0.01$ ) (図2e). 以上の結果から鼻茸組織における t-PA の発現量および活性の低下が線溶系を抑制し, これが鼻粘膜における過剰なフィブリン網の形成に関与している可能性が示唆された.

## 鼻粘膜における t-PA の免疫組織学的検討

t-PA の鼻粘膜における発現をさらに検討するために, 免疫組織化学を行った. その結果 t-PA の染色は鼻粘膜の腺組織, および粘膜上皮に認められた (図4). また ELISA のデータと同様に t-PA 染色は鼻茸組織において (図4i, j), Control UT および CRSsNP UT (図4c, d) と比較して少ないことがわかった.

## 下甲介粘膜と鉤状突起における plasminogen Activator 発現の比較

鼻茸は基本的に中鼻道周囲や副鼻腔の粘膜から発生し下甲介粘膜からの発生はないという領域特異性がある<sup>5)</sup>. しかしなぜこのような領域特異性を示すのかはわかっていない. 我々は下甲介粘膜 (inferior turbinate; IT) と鉤状突起 (uncinate process tissue; UT) における plasminogen activator のタンパク発現量の比較を ELISA 法にて行った. u-PA のタンパク量は Control, CRSsNP, CRSwNP において, UT のほうが IT に比べて優位に少なかった (図5a). さらに t-PA のタンパク量も CRSsNP, CRSwNP において, UT のほうが IT に比べて優位に少なかった (図5b). Control における t-PA の発現量に有意差は見られな

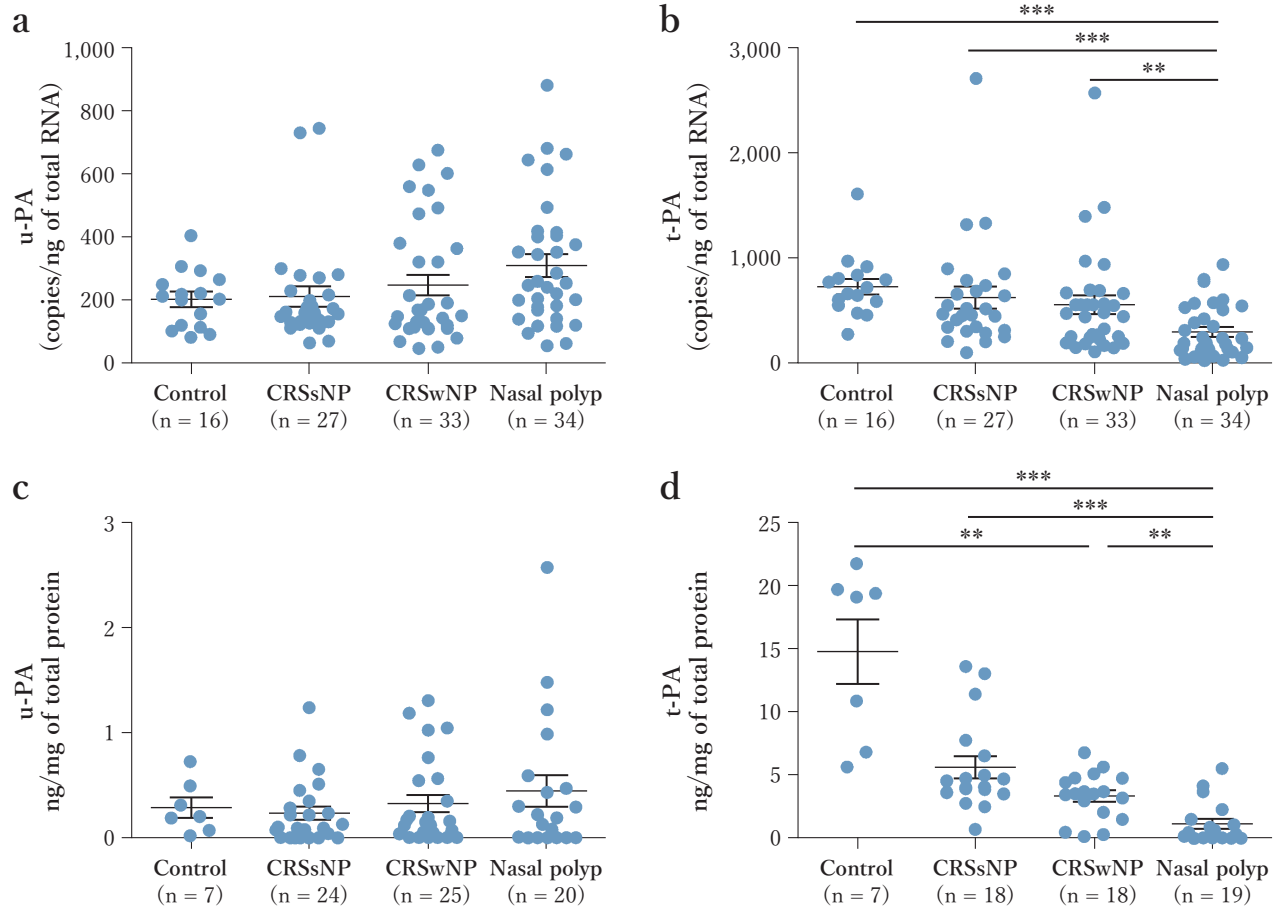


図3. 鼻粘膜組織におけるplasminogen activatorの発現。

鈎状突起 (UT) と鼻茸 (NP) からtotal RNAを抽出してu-PA (a) とt-PA (b) のmRNA発現量をreal time PCRで測定した。UTとNPの組織抽出液におけるu-PA (c) とt-PA (d) のタンパク量をELISA法によって測定した。Plasminogen activator濃度は組織抽出液における総蛋白量で標準化を行った。\*\* $P < .001$ , \*\*\* $P < .0001$ 。

いものの、やはりUTで少ない傾向にあった ( $P=0.068$ ) (図5b)。これらの結果から鼻茸が発生しうる部位である鈎状突起粘膜は下甲介粘膜に比較してu-PA, t-PAの発現量が少ないため線溶系活性が弱く、もともとフィブリン網が分解されにくい性質を持っているために鼻茸が形成されやすいと考えられる。

### Th2 サイトカインが気道上皮のt-PA発現に与える影響

CRSwNPやECRSはその病態にTh2優位の好酸球性炎症が強く関与していることが知られている<sup>15)</sup>。我々は鼻粘膜におけるplasminogen activatorが好酸球炎症に関与するのかを検討してみた。好酸球のマーカーとしてECPをELISAにて測定した。その結

果鈎状突起 (UT) および鼻茸組織におけるt-PAのタンパクの発現量はECPとの間に有意な負の相関を示した ( $r=-0.5395$ ,  $P < 0.0001$ ) (図6a)。しかしながらu-PAとECPの間には有意な相関関係は認められなかった (data not shown)。免疫組織化学のデータではt-PAの発現は主に鼻粘膜の腺組織と粘膜上皮に認められた (図4) ので、鼻粘膜組織の擦過細胞におけるt-PAの発現量をreal time PCR測定し4群間で比較を行った。統計学的な有意差は認められなかったが、鼻茸におけるt-PAの発現レベルはControl UTに比較して少ない傾向にあった ( $P=0.063$ ) (図6b)。t-PAは鼻粘膜の上皮に発現しており、好酸球性炎症とは負の相関関係を示し、鼻茸組織においては発現量が低下していることから、我々は鼻粘膜上皮におけるt-PAの発現にTh2サイ



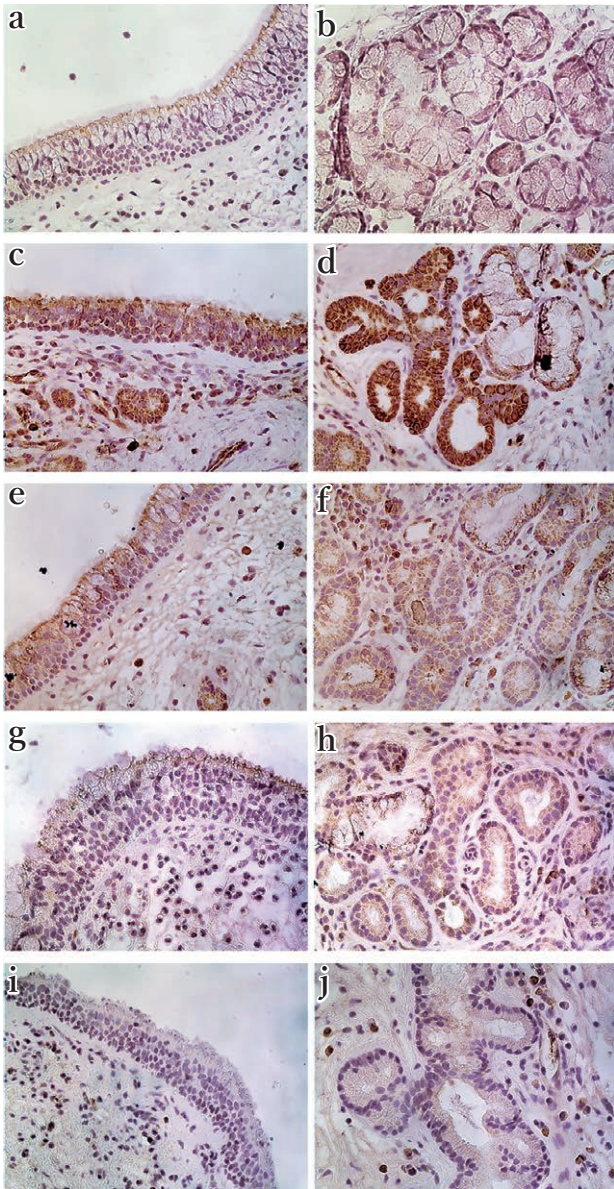


図4. 免疫組織化学による鉤状突起 (UT) と鼻茸 (NP) におけるt-PA発現の検討.

(a, b) コントロールUTをIso type controlで染色した場合, ほとんど染まっていない。(c, d) コントロールUTにおいて, 鼻粘膜上皮と腺組織においてt-PAの発現を認める。CRSsNP UT (e, f) では, t-PAは中等症の発現を認めるが, CRSwNP UT (g, h) やNP (i, j) ではt-PAの発現はほとんど認められない。×400.

トカインが何らかの影響を与えているのではないかと予想した。気道上皮におけるt-PAの発現調整機構について検討するためにNHBE細胞を用いて実験を行った。NHBE細胞をTh2サイトカインであるIL-4, IL-13で24時間刺激し細胞内のplasminogen activatorのmRNAレベルをreal time PCRで測定し

た。その結果u-PAのmRNAレベルはTh2サイトカイン刺激によって影響は受けなかったが(図6c), t-PAのmRNAレベルはTh2サイトカイン刺激によって優位に, 量依存的に抑制された(図6d)。タンパクレベルでも確認するためにNHBE細胞からタンパクを抽出してELISAによって検討した。mRNAレベルと同様にu-PAタンパクはTh2サイトカイン刺激による影響は受けなかったがt-PAタンパクはTh2サイトカイン刺激によって有意に抑制された(図6f)。これらの結果は鼻粘膜上皮(NEC)を用いても同様であった(data not shown)。これらのことからTh2炎症は鼻粘膜上皮におけるt-PA発現を抑制するがu-PAの発現には影響しないことがわかった。

## 考察

鼻茸は鼻粘膜の過度の浮腫で形成されその内容は血漿タンパクのアルブミンである<sup>5)</sup>。しかしながら炎症によって末梢血管から漏出した血漿タンパクが鼻粘膜に保持され過度の浮腫が遷延化し, 鼻茸が形成されるメカニズムについては良くわかっていなかった。本研究では鼻茸の間質には過剰なフィブリン網が形成されていることを明らかにした。鼻粘膜内に形成されたフィブリン網が血漿タンパクを間質に保持することによって浮腫が遷延し鼻茸が形成されると考えられる。また過剰なフィブリン網の形成はt-PAレベルの低下によって線溶系が著しく抑制され, その結果フィブリン網分解障害おきることが原因であった。さらにt-PAは鼻粘膜上皮細胞に発現しており, 気道上皮におけるt-PAの発現はTh2サイトカイン刺激によって著しく抑制されることもわかった。これはTh2優位の好酸球性炎症が特徴であるECRSの鼻茸が難治性で易再発性であることを説明しうる研究結果である。

血管外におけるフィブリン網の形成は外傷や障害における創傷治癒の初期段階に認められ, これは生体にとって有害な物質や細菌, ウィルスなどの拡散を防止し, 速やかな解毒に重要な役割をはたしている<sup>16)~18)</sup>。またフィブリンは血漿タンパクの保持作用による組織の浮腫以外に単核細胞に作用して

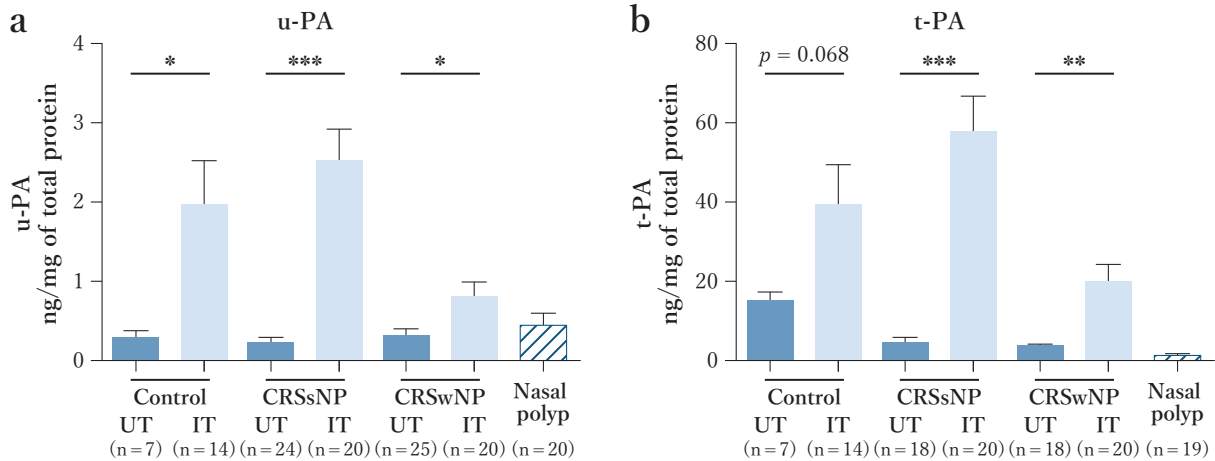


図5. 鈎状突起 (UT) と下甲介粘膜 (IT) における plasminogen activator 発現量の比較。

UTとITの組織抽出液におけるu-PA(a)とt-PA(b)の発現量をELISA法にて測定した。Plasminogen activator濃度は組織抽出液における総蛋白量で標準化を行った。 $*P<0.05$ ,  $**P<.001$ ,  $***P<.0001$ 。

IL-1bやTNF- $\alpha$ の産生を誘導する作用がある。これらのサイトカインは血管内皮細胞や線維芽細胞に作用してCXCL8やCCL2などのケモカインの放出を誘導する。これらのケモカインの作用によって炎症細胞が局所に遊走することで炎症の遷延化にも関与していると予想される。実際、組織におけるフィブリン網の過剰な蓄積はさまざまな疾患の病態に関与しフィブリン網の除去による症状の改善効果も報告されている<sup>7)19)~24)</sup>。

t-PAはplasminogenをフィブリン網を直接分解するplasminへの変換を触媒する働き以外に、そのタンパク分解作用によっていくつかの成長因子に対してposttranslational activation作用を発揮することが知られている。中でもt-PAによって活性化されたtumor growth factor-beta (TGF- $\beta$ )はt-PAの発現を増加させることがわかっている<sup>25)26)</sup>。鼻粘膜においてt-PAとTGF- $\beta$ はpositive feedback loopを形成している可能性がある(図7)。これまでの研究で鼻茸中にはコラーゲン産生が抑制され組織の線維化が少ないことがわかっている<sup>27)</sup>。TGF- $\beta$ は組織におけるコラーゲン産生を誘導する作用があるため、鼻茸組織における低t-PA発現は組織の低線維化にも関与している予想される(図7)。t-PAはサイトカインとしての作用も報告されており、細胞膜に発現しているlow-density-lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1)に結合してそのシグナル伝達に

よってコラーゲン産生を誘導することもわかっている<sup>28)~32)</sup>。我々は鼻粘膜におけるLRP-1発現も確認しており(data not shown)、低t-PAからLRP-1を介したシグナルもまた鼻粘膜の線維化低形成に関与している可能性がある(図7)。さらにt-PA/LRP-1シグナルは一酸化窒素(nitric oxide; NO)産生を誘導する<sup>32)33)</sup>。我々はECRS患者において鼻腔で産生されるNOがnon-ECRSに比べて優位に低いことを報告しており<sup>34)</sup>、低t-PAのNO産生低下への関与が示唆される。

慢性副鼻腔炎における鼻茸形成を考える上で最も興味深い謎はその領域特異性である。つまり鼻茸は中鼻道周囲や副鼻腔粘膜から発生し下甲介粘膜から発生することはまずない。また鼻茸様の病変は生体のほかの部分で見られることはなく鼻副鼻腔に特有の病変であるといえる。今回の検討では我々は2つのplasminogen activator; u-PA, t-PAの発現が下甲介粘膜に比べて鈎状突起粘膜で少ないことを明らかにした。このことは鈎状突起粘膜が下甲介粘膜に比べてもともと線溶活性が低い性質を持つことを示唆している。つまり炎症が起きて、鼻粘膜内に形成されたフィブリン網は鈎状突起粘膜では分解されにくいために鼻茸が形成されやすいものと推察される。さらに下甲介粘膜と鈎状突起には自然免疫に関する分子の発現に差があることも報告されており<sup>35)36)</sup>、これらが鼻茸発生の領域特異性に関与していると思



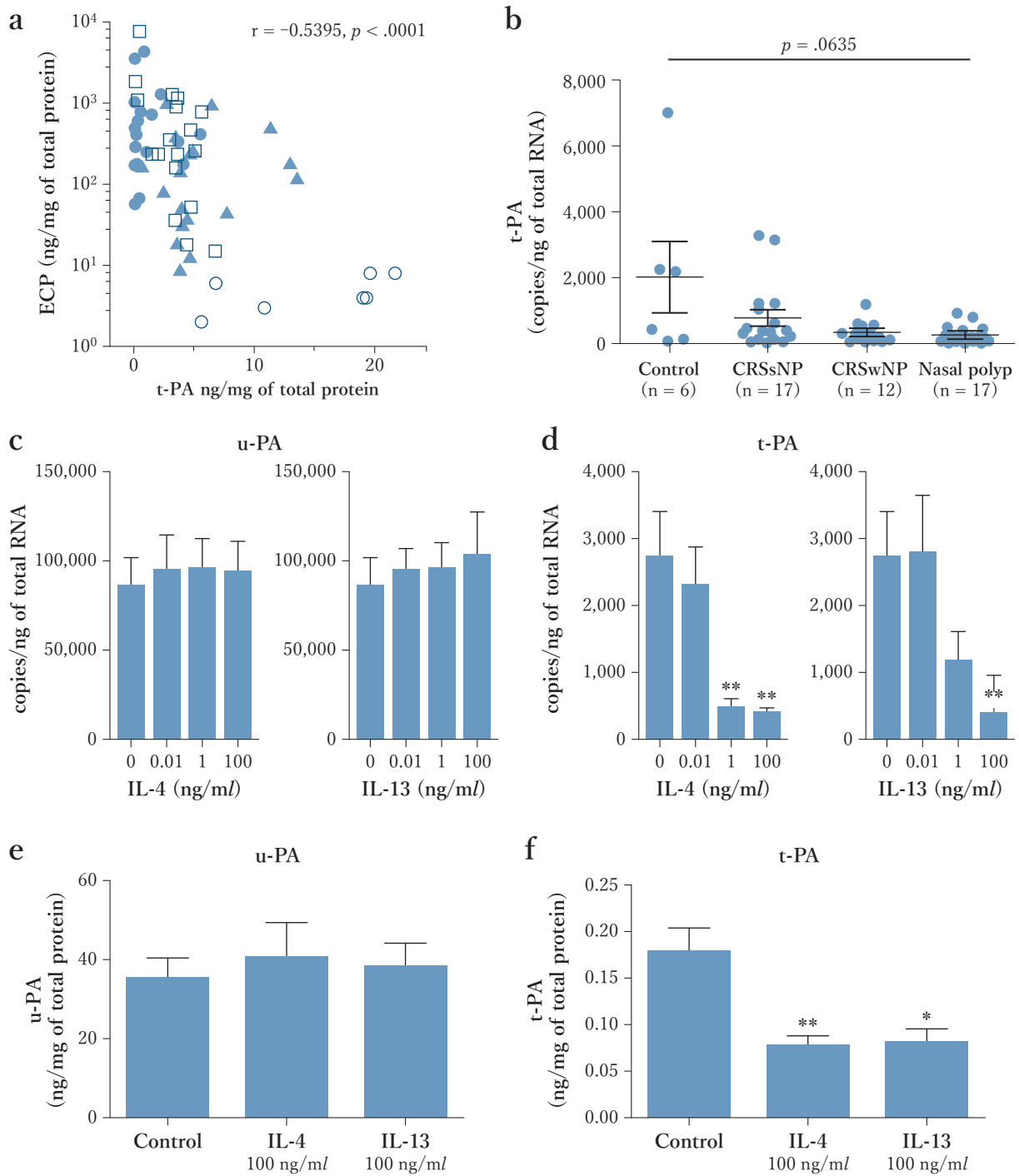


図6. Th2 サイトカインの気道上皮細胞におけるt-PA発現に与える影響。

鼻粘膜におけるt-PAとECPのタンパク量をELISAで測定して相関を検討した。(○ Control UT, ▲ CRSsNP UT, □ CRSwNP UT, ● NP)。t-PAとECPの相関関係はSpearman rank correlation testを用いて検討した(a)。鈎状突起(UT)と鼻茸(NP)の擦過細胞からtotal RNAを抽出してt-PAのmRNA量をreal time PCRで測定した。NPのt-PA量はコントロールUTと比較して少なかった( $P=0.063$ ) (b)。NHBE細胞を0.01~100 ng/mlのIL-4またはIL-13で24時間刺激してu-PA (c)とt-PA (d)のmRNA量をreal time PCRで測定した。またu-PA (e)とt-PA (f)のタンパク量はELISA法を用いて測定した。結果は6回の独立した検討の平均±標準誤差で表している。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

われる。

我が国を含めた東アジアにおける慢性副鼻腔炎は鼻茸を伴っていても好中球性炎症であるといわれて

いた。しかし十数年ほど前から難治性で易再発性の鼻茸を伴う好酸球性炎症を呈する副鼻腔炎が我が国で報告されはじめ現在ではECRSと呼ばれている<sup>4)35)</sup>。

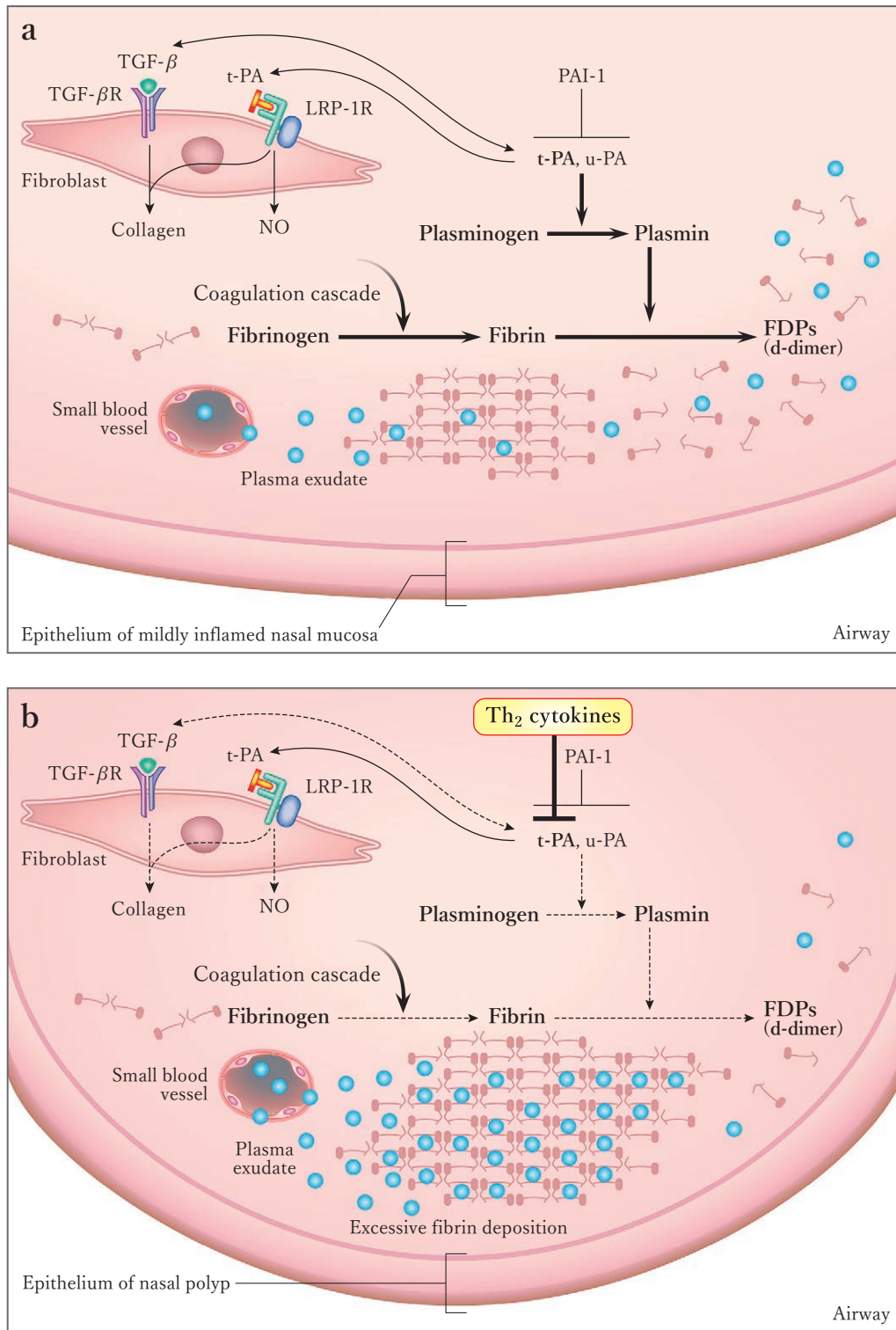


図7. 鼻茸組織 (NP) における過剰なフィブリン網の形成にはt-PAが関与している。

t-PAはプロテアーゼとしての働きによってplasminogenをplasminに変換し、フィブリン網を分解する。またt-PAのサイトカインとしての働きによって線維芽細胞の細胞表面のLRP-1に結合しコラーゲン産生や一酸化窒素(NO)の産生を誘導する(a)。Th<sub>2</sub>サイトカインの存在下ではt-PAの発現量が減少し、フィブリン網の過剰形成が起こり鼻茸が形成される。

Non-ECRSの鼻茸は内視鏡手術で比較的治療しやすく、再発もそれほど問題にはならなかった。同じ鼻茸でも炎症のタイプによってその性質が異なるが、

なぜTh<sub>2</sub>優位の好酸球性炎症における鼻茸が難治性で易再発性なのかはわかっていなかった。今回の検討でt-PAは鼻粘膜の腺組織と粘膜上皮に強く発現

しており、鼻粘膜を含めた気道上皮におけるt-PAの発現はTh2サイトカインの刺激によって著明に抑制されることを明らかにした(図6)。この結果はTh2優位の好酸球性炎症によって形成された鼻茸が難治性で易再発性であることを説明できるものである。

現在ECRSやCRSwNPに対する新規治療法として好酸球をターゲットとした分子標的治療薬に大きな

期待が寄せられている。しかしこれらの治療法はかなり高額であり、さらに治療効果に乏しい症例も存在することから他の治療法の開発も切望される。今回の研究の結果から、好酸球性炎症を呈する鼻茸の治療戦略にフィブリン網の分解やt-PA産生の賦活化がターゲットになりうる と期待される。

(高林 哲司)

## 文献

- 1) Kern RC, Conley DB, Walsh W, et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol.* 2008;22:549-559.
- 2) Schleimer RP, Kato A, Peters A, et al. Epithelium, inflammation, and immunity in the upper airways of humans: studies in chronic rhinosinusitis. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6:288-294.
- 3) Bachert C, Gevaert P, van Cauwenberge P. Staphylococcus aureus superantigens and airway disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2002;2:252-258.
- 4) **Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2019;68:403-412.**
- 5) Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, et al. Nasal polyposis: from cytokines to growth. *Am J Rhinol.* 2000;14:279-290.
- 6) Persson CG. Plasma exudation in the airways: mechanisms and function. *Eur Respir J.* 1991;4:1268-1274.
- 7) Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, et al. The plasminogen activation system in inflammation. *Front Biosci.* 2008;13:4667-4686.
- 8) Gveric D, Hanemaaijer R, Newcombe J, et al. Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain.* 2001;124:1978-1988.
- 9) Wagers SS, Norton RJ, Rinaldi LM, et al. Extravascular fibrin, plasminogen activator, plasminogen activator inhibitors, and airway hyperresponsiveness. *J Clin Invest.* 2004;114:104-111.
- 10) Idell S. Adult respiratory distress syndrome: do selective anticoagulants help? *Am J Respir Med.* 2002;1:383-391.
- 11) Schuster V, Seregard S. Ligneous conjunctivitis. *Surv Ophthalmol.* 2003;48:369-388.
- 12) Busso N, Hamilton JA. Extravascular coagulation and the plasminogen activator/plasmin system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2268-2279.
- 13) Kato A, Truong-Tran AQ, Scott AL, et al. Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism. *J Immunol.* 2006;177:7164-7172.
- 14) Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003;31: S213- S220.
- 15) Pawliczak R, Lewandowska-Polak A, Kowalski ML. Pathogenesis of nasal polyps: an update. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5:463-471.
- 16) Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* 1988;53:505-518.
- 17) Jennewein C, Tran N, Paulus P, et al. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Molecular medicine (Cambridge, Mass).* 2011;17: 568-573.
- 18) Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:355-367.
- 19) Perrio MJ, Ewen D, Trevethick MA, et al. Fibrin formation by wounded bronchial epithelial cell layers in vitro is essential for normal epithelial repair and independent of plasma proteins. *Clin Exp Allergy.* 2007;37:1688-1700.
- 20) Szaba FM, Smiley ST. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood.* 2002;99:1053-1059.
- 21) Inoue A, Koh CS, Shimada K, et al. Suppression of cell-transferred experimental autoimmune encephalomyelitis in defibrinated Lewis rats. *J Neuroimmunol.* 1996;71:131-137.
- 22) Hamblin SE, Furmanek DL. Intrapleural tissue plasminogen activator for the treatment of parap-

- neumonic effusion. *Pharmacotherapy*. 2010;30:855-862.
- 23) Akassoglou K, Adams RA, Bauer J, et al. Fibrin depletion decreases inflammation and delays the onset of demyelination in a tumor necrosis factor transgenic mouse model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:6698-6703.
- 24) Haraguchi M, Border WA, Huang Y, et al. t-PA promotes glomerular plasmin generation and matrix degradation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2001;59:2146-2155.
- 25) Schacke W, Beck K-F, Pfeilschifter J, et al. Modulation of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 by transforming growth factor-beta in human retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:2799-2805.
- 26) Hu K, Wu C, Mars WM, et al. Tissue-type plasminogen activator promotes murine myofibroblast activation through LDL receptor-related protein 1-mediated integrin signaling. *J Clin Invest*. 2007;117:3821-3832.
- 27) Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, et al. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:253-259.
- 28) Hu K, Wu C, Mars WM, et al. Tissue-type plasminogen activator promotes murine myofibroblast activation through LDL receptor-related protein 1-mediated integrin signaling. *J Clin Invest*. 2007;117:3821-3832.
- 29) Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, et al. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem*. 2006;281:2120-2127.
- 30) Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, et al. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest*. 2003;112:1533-1540.
- 31) Nagai N, Yamamoto S, Tsuboi T, et al. Tissue-type plasminogen activator is involved in the process of neuronal death induced by oxygen-glucose deprivation in culture. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:631-634.
- 32) Lemarchant S, Docagne F, Emery E, et al. tPA in the injured central nervous system: different scenarios starring the same actor? *Neuropharmacology*. 2012;62:749-756.
- 33) **Takabayashi T, Schleimer R. Formation of nasal polyps: the roles of innate Type 2 inflammation and deposition of fibrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;45:740-750.**
- 34) **Yoshida K, Takabayashi T, Imoto Y, et al. Reduced nasal nitric oxide levels in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019;68:225-232.**
- 35) Seshadri S, Lin DC, Rosati M, et al. Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2012;67:920-928.
- 36) Tieu DD, Peters AT, Carter RG, et al. Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:667-675.

## 5-2

## 血液凝固第 XIII 因子発現増加による好酸球性副鼻腔炎 鼻茸形成への関与

### ● サマリー

鼻粘膜における過剰なフィブリン網の形成が鼻茸を形成させ、Type 2 炎症の環境下では難治化する。組織においては、凝固系によってフィブリン網が形成される。好酸球性炎症下の鼻粘膜において凝固系亢進のメカニズムについて検討を行った。鼻茸組織において M2 マクロファージが増加し、この細胞は凝固因子 FXIII A を発現していた。FXIII A は凝固系の最終段階でフィブリンの架橋を強固にしてフィブリン網形成に重要な役割を果たしており、鼻茸における過剰なフィブリン網の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

### はじめに

好酸球性副鼻腔炎の治療を行ううえで最も重要なことは難治性で易再発性の鼻茸制御である。Th2 環境下における鼻茸形成メカニズムについてはこれまで良くわかっていなかったが、我々は鼻粘膜における過剰なフィブリン網の沈着が粘膜における浮腫を遷延化させ鼻茸の形成に深く関与することを発見し、さらに Th2 環境下では、フィブリン網を分解する線溶系分子である t-PA の発現量が抑制されることによって線溶系にブレーキがかかり、分解障害によるフィブリン網の過剰沈着を引き起こすことを明らかにした<sup>1)</sup>。

凝固系によるフィブリン網の形成は止血機構としての役割が良く知られているが、炎症の局所で凝固系が亢進して形成されたフィブリン網が細菌やウイルス、生体にとって有害な物質を局所に封じ込めることによって生体防御機構として働くことも知られている。しかし一方で凝固系の制御異常による組織におけるフィブリン網の過剰な形成は関節リウマチ、重症喘息、糸球体腎炎、遅発性過敏症、クローン病などさまざまな疾患の原因になることも報告されている<sup>2)</sup>。本研究では好酸球性炎症を呈する慢性副鼻腔炎の鼻粘膜における凝固系に注目した。鼻茸組織における血液凝固第 XIII 因子の発現が増加していることを発見し、その制御機構について検討した。

### 方法

#### サンプル

ノースウエスタン大学免疫アレルギー・耳鼻咽喉科教室において副鼻腔炎に対して行った手術で採取した鼻粘膜組織を本研究に使用した。全ての患者に対してインフォームドコンセントをとり同施設の倫理委員会の承認を得ている。採取したサンプルはコントロール患者から採取した鉤状突起 (uncinate process tissue; UT) (Control UT), chronic rhinosinusitis without nasal polyp (CRSsNP) 患者の鉤状突起 (CRSsNP UT), chronic rhinosinusitis with nasal polyp (CRSwNP) 患者の鉤状突起 (CRSwNP UT), CRSwNP 患者の鼻茸組織 (NP) の4群に分類して検討を行った。本研究で使用したサンプルは Control 35 例, CRSsNP 56 例, CRSwNP 96 例を用いた。

#### Real-Time PCR

鼻粘膜から total RNA を NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA), DNase I を用いて抽出した。Single-strand cDNA の作成には SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。Real-time RT-PCR は TaqMan method を用いて行った。



## ELISA

FXIII-AはELISAキット (HYPHEN BioMed, Neuville-Sur-Oise, France) を用いて測定した。発色の定量には Bio-Rad Spectrophotometer Model 680 Microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いた。FXIII-A濃度は鼻粘膜の総タンパク量を用いて標準化した。

## 免疫組織化学

免疫組織化学にはパラフィン切片を用いた。一次抗体に Anti-human FXIII-A Ab (CELL MARQUE, Rocklin, CA) を使用し、4°C over nightで反応させた。ネガティブコントロールとして同濃度の宿主動物の control IgG (R&D Systems, Mineapolis. MN) を用いた。二次抗体には biotinylated secondary goat anti-rabbit antibody (Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, PA) を室温 500倍希釈で1時間反応させた。発色に ABC reagent (avidin-biotin-horseradish peroxidase complex; Vector Laboratories, Burlingame, CA) を使用した。各スライドは情報をブラインド下に10視野ずつ選択し、鼻粘膜におけるFXIII-A陽性細胞数を本研究に無関係な研究者2人が測定した。

## 統計解析

全てのデータは中間値±標準誤差で示した。各群間の比較はKruskal-Wallis ANOVA with Dunnett post hoc testing and Mann-Whitney U testを用い、相関はSpearman rank correlationを用いて解析を行った。P値が0.05以下の場合有意差ありとした。

## 結果

### 鼻粘膜組織における凝固因子発現のスクリーニング

我々がこれまでに Control 群鉤状突起 (UT), CRSsNP UT, CRSwNP UT, CRSwNP NP の4群間で行ったマイクロアレイのデータを用いて鼻粘膜組織における凝固因子の発現量を解析した。その結果 CRSwNP NPにおけるFXIII-Aの発現量が他の3群に比べて優位に増加していることがわかった (data not shown)。

### 慢性副鼻腔炎におけるFXIII-Aの発現

鼻粘膜におけるFXIII-Aの発現量を real time PCR で測定した。FXIII-Aの発現量はマイクロアレイのデータと同様にNP組織において他の3群に比べて有意差をもって増加していた (図1a)。またELISA kitを用いたFXIII-Aのタンパク濃度もNP組織にお

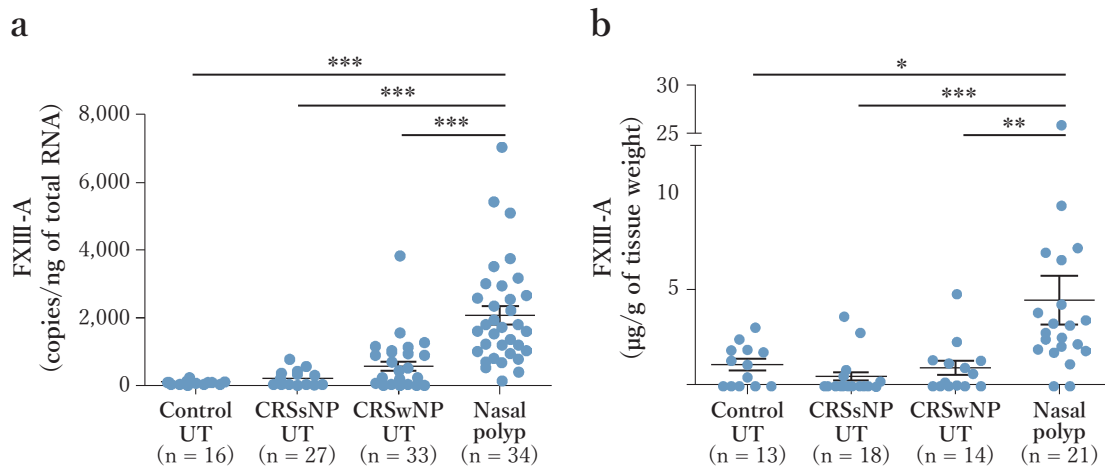


図1. 鼻粘膜組織におけるFXIII-Aの発現。

a : UTとNPからtotal RNAを抽出してFXIII-Aの発現量をreal time PCRで測定した。b : UTとNPの組織抽出液におけるFXIII-Aのタンパク量をELISA法によって測定した。FXIII-A濃度は組織抽出液における総蛋白量で標準化を行った。  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

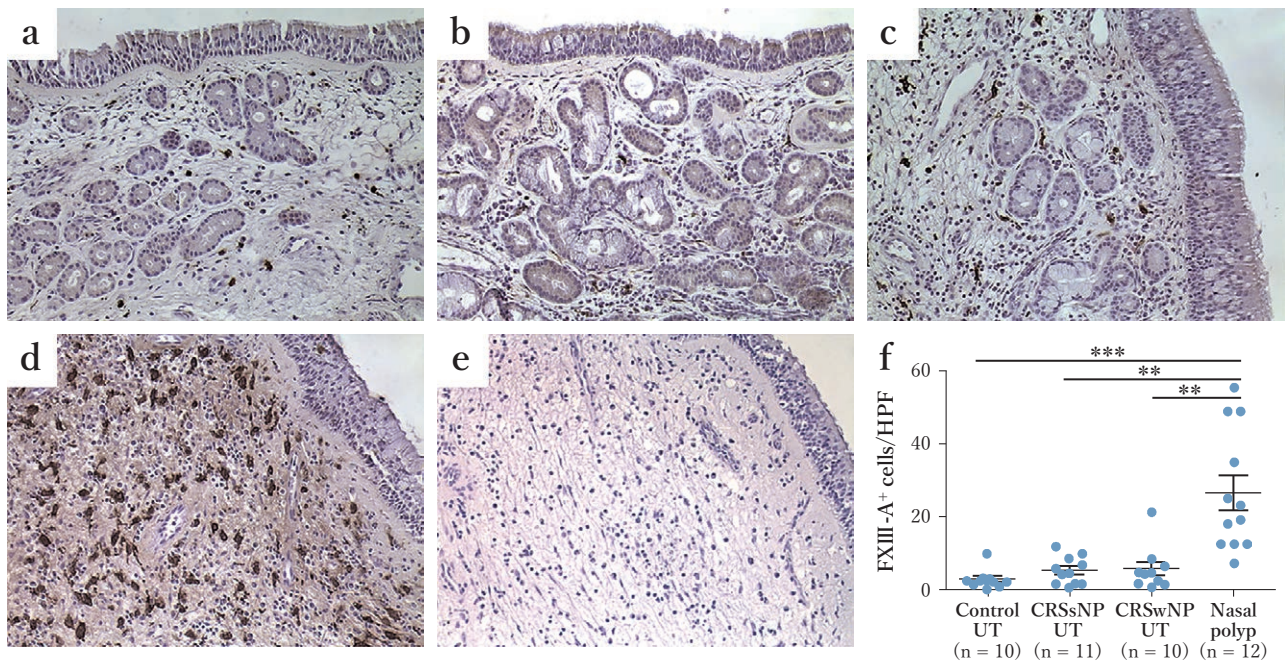


図2. 免疫組織化学による鼻粘膜におけるFXIII-A発現の検討.

a : コントロールUT, b : CRSsNP UT, c : CRSwNP UT, d : CRSwNP NPをFXIII-Aに対する抗体で染色した. e : NPをIso type controlで染色した. f : FXIII-A陽性細胞数: コントロールUT (n=10), CRSsNP UT (n=11), CRSwNP UT (n=10), CRSwNP NP (n=12),  $\times 400$ .  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ .

いて他の3群に比較して有意に増加していた(図1b).

### 鼻粘膜組織におけるFXIII-Aの発現の免疫組織化学的検討

鼻粘膜組織におけるFXIII-A発現の分布について検討を行うためにanti-human FXIII-A Abを用いて免疫組織化学を行った. Real time PCRとELISAの結果と同様にNPにおいてFXIII-A positiveの細胞が多く認められ(図2), その発現細胞は鼻粘膜の間質に多いことがわかった(図2d). FXIII-A陽性細胞数をカウントし判定量化を行ったところ, 有意差をもってNPにFXIII-A陽性細胞の浸潤が増加していることがわかった(図2f). FXIII-Aは血小板, 巨赤芽球, マクロファージなど骨髄系の細胞に発現していることが知られている<sup>3)~6)</sup>. 我々はこの中でマクロファージに注目してanti-human FXIII-A Abとマクロファージのマーカーであるanti-human CD68 antibodyを用いた蛍光二重染色を行った. その結果FXIII-Aの発現はCD68<sup>+</sup>のマクロファージに認められることがわかった(図3a).

### M2 マクロファージにおけるFXIII-Aの発現

マクロファージはサイトカインや病原など周囲の環境によって極性を変化させることが知られている<sup>7)~11)</sup>. マクロファージはTh1サイトカインであるIFN- $\gamma$ や細菌の菌体成分(LPS)の刺激によって誘導されるM1マクロファージとTh2サイトカインであるIL-4やIL-13の刺激によって誘導されるM2マクロファージの2種類に大きく分類される. 最近M2マクロファージにFXIII-Aの発現量が増加しているとの報告があるため<sup>6) 12)</sup>, 我々はNP組織におけるFXIII-Aの発現がM2マクロファージに認められるかどうかを検討した. まずmacrophage mannose receptor (MMR), CD163, stabilin 1 (STAB1)の3つの分子をM2マクロファージのマーカーとして, 鼻粘膜組織における発現量をreal time PCRによって測定した. 鼻茸組織では, MMR, CD163, STAB1のいずれの発現も他の3群に比較して有意に増加していた(図4a). またMMR, CD163, STAB1のいずれのmRNA量もFXIII-AのmRNA量との間に有意に正の相関を認めた(図4b). FXIII-AがM2マクロファージに発現していることを確認するためにマクロ

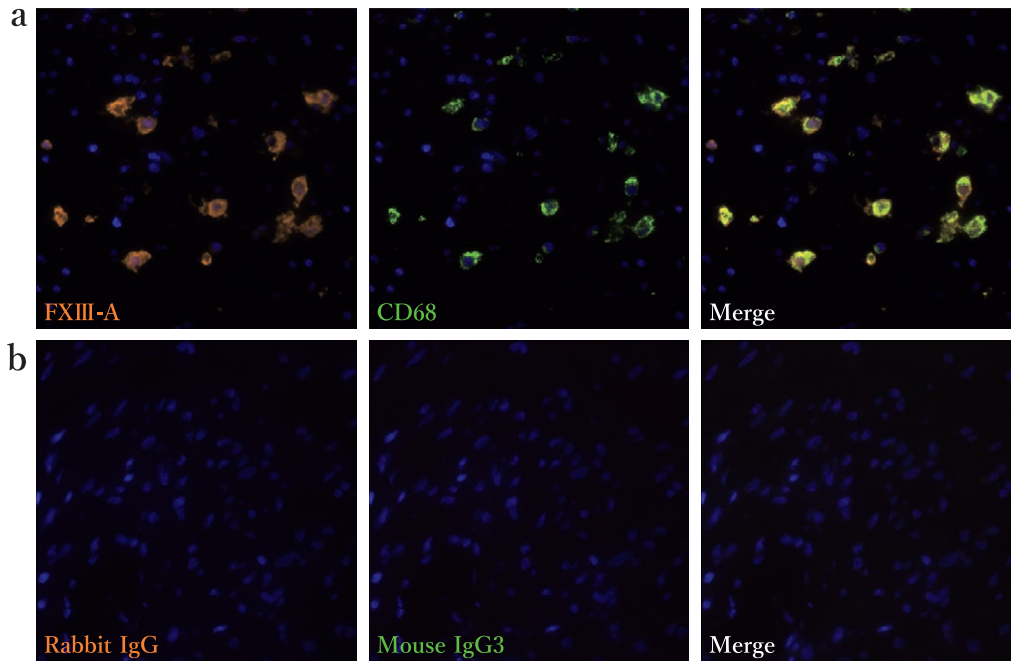


図3. 鼻粘膜組織のFXIII-AとCD68の蛍光免疫染色.

a: Anti-FXIII-A Ab (オレンジ色)とanti-CD68 mAb (マクロファージのマーカー: 緑色)を用いた. b: Control IgG. 核はDAPI (青色).

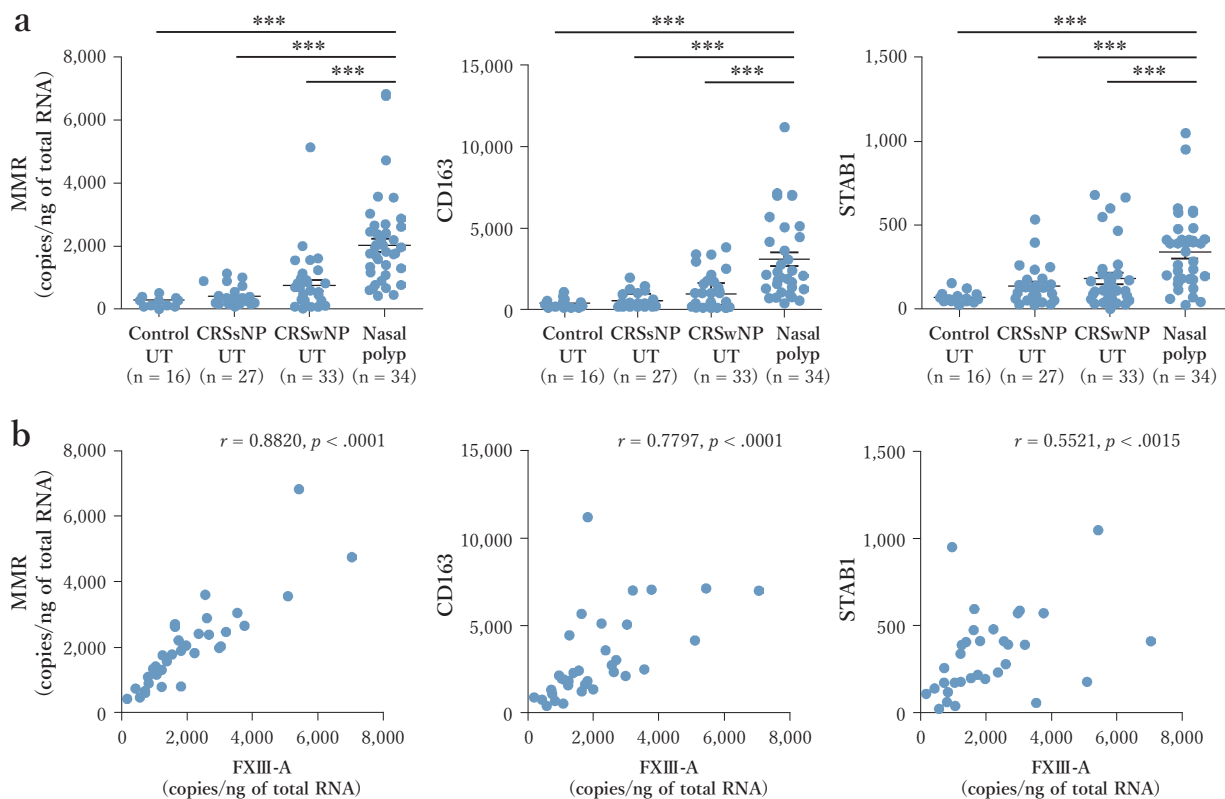


図4. 鼻粘膜組織におけるFXIII-AとM2マクロファージのマーカーとの相関.

a: total RNAを抽出してM2マクロファージのマーカーの発現量をreal time PCRで測定した(コントロールUT (n=16), CRSsNP UT (n=27), CRSwNP UT (n=33), CRSwNP NP (n=34)). b: real time PCRで測定したFXIII-AとM2マクロファージのマーカー(MMR, CD163, STAB1)との間の相関関係はSpearman rank correlation testを用いて検討した. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



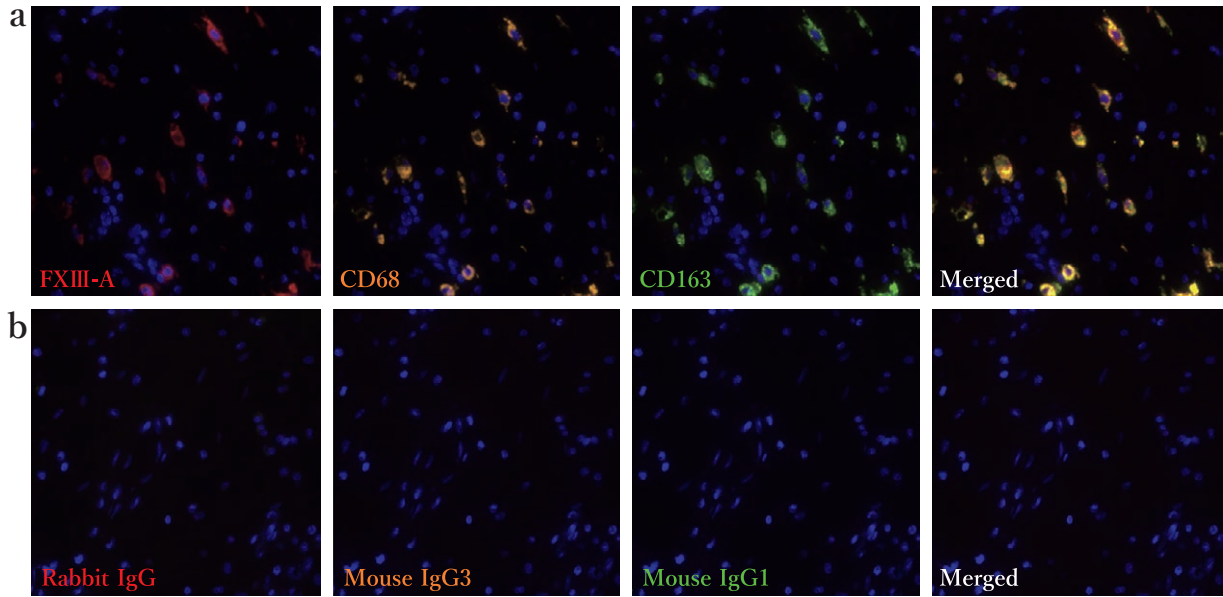


図5. NP組織中のM2 マクロファージにおけるFXIII-Aの発現.

a : 蛍光免疫染色を anti-FXIII-A Ab (赤色) と anti-CD68 mAb (オレンジ色) と anti-CD163 mAb (M2 マクロファージのマーカー : 緑色) を用いて検討した. b : Iso type control. 核は DAPI (青色).

ファージのマーカーである CD68, M2 マクロファージのマーカーである CD163, anti-human FXIII-A ab による 3重蛍光免疫染色を行った. その結果これらの3つの分子は同一細胞に局在することが示された (図5a). これらの結果から鼻茸組織において主に M2 マクロファージに FXIII-A が発現していることが示された.

## 考察

好酸球性炎症を呈する副鼻腔炎の鼻茸は Type 2 炎症, 好酸球, 肥満細胞の著明な浸潤を特徴とする<sup>13)~16)</sup>. 鼻茸の組織学的な特徴である過度の粘膜浮腫や pseudocyst の形成は, 好酸球や肥満細胞の活性化によって末梢血管から漏出した血漿蛋白によって形成されると考えられる. しかし漏出した血漿蛋白が長期に鼻粘膜に保持され浮腫が遷延するメカニズムに関してはあまり良くわかっていなかった. 我々は最近の研究でフィブリン網の過剰な形成が鼻粘膜における血漿蛋白を保持することによって浮腫が遷延化し, 鼻茸形成の原因になることを報告した. また Th2 環境下では, 線溶系分子である t-PA の発現量が抑制され, これによる線溶系の低下が過剰な

フィブリン網の沈着に繋がっていると結論した<sup>1)</sup>. フィブリン網の形成は凝固系によって制御され, 炎症局所では凝固系が亢進することが知られている. 今回の検討では鼻茸組織における凝固系について検討し, FXIII-A の発現量が増加していることを明らかにした (図1). FXIII には2つのタイプがある. 血漿中の FXIII は2つの活性サブユニットである FXIII-A と2つの阻害型サブユニット FXIII-B から形成されている. 一方血小板, 巨赤芽球, およびマクロファージなど細胞内に FXIII は FXIII-A が dimer を形成して存在する<sup>17) 18)</sup>. 血漿中の FXIII の活性化にはまず thrombin の作用によって FXIII-A から活性ペプチドが遊離し, カルシウムイオンの存在下に FXIII-B が外れることによって活性化トランスグルタミナーゼの FXIII-A に変換される. これに対して細胞内の FXIII は阻害型サブユニットである FXIII-B が存在せず, FXIII-A に活性型への変化に活性ペプチドの遊離は必要ない. 組織内の通常のカルシウム濃度で FXIII-A は容易に活性化される. 活性化された FXIII はフィブリンの  $\gamma$ -glutamyl と  $\epsilon$ -lysyl 残基を共有結合させることでフィブリンモノマーを重合させ強固なフィブリン網を形成しこれが血漿蛋白を粘膜内に保持することで浮腫, および鼻茸の形成につながる<sup>6) 17)</sup>. 実

際鼻粘膜中の FXIII-A の発現量と血漿蛋白の主成分であるアルブミン量が有意に正に相関する (data not shown) ことから FXIII-A は鼻茸の形成に深く関与する可能性が高い。

最近の研究において M2 マクロファージ数は鼻茸組織において増加するが、M1 マクロファージは変化しないことが報告された<sup>19) 20)</sup>。実際本研究においても M2 マクロファージのマーカーである MMR, CD163, STAB1 の発現量が鼻茸組織において有意に増加していた (図 4a)。鼻茸組織における M2 マクロファージ数の増加は 2 型自然リンパ球や肥満細胞によって誘導される Th2 環境によるものであると考えられる<sup>9) 21) 22)</sup>。しかし M2 マクロファージがどのように鼻茸の形成に関与しているのかは明らかにされていなかった。重要なことは本研究で明らかにしたように鼻茸組織において M2 マクロファージが FXIII-A の主な産生細胞で M1 マクロファージでは FXIII-A の発現がほとんど認められず (図 5)、また FXIII-A と M2 マクロファージのマーカーのそれぞれの mRNA が正に相関する (図 4b) ことから M2 マクロファージが FXIII-A を産生する主たる細胞である

と言える。組織におけるフィブリン網の形成が tumor matrix, または豊富な FXIII-A を発現する腫瘍関連マクロファージの周囲に認められることが報告されていることから<sup>23) 24)</sup>、鼻茸組織において増加した M2 マクロファージが FXIII-A の働きによって凝固系を亢進させ、フィブリン網の過剰な形成による血漿蛋白の保持、それによる粘膜の浮腫の遷延、鼻茸形成に関与すると推察される。

前述のような Th2 環境によって、鼻粘膜での t-PA 発現が抑制され、線溶系にブレーキがかかり、フィブリン網の代謝障害が生じて組織におけるフィブリン網過剰形成が誘導される。また Th2 環境が、M2 マクロファージを誘導し、M2 マクロファージからの FXIII-A によって凝固系を亢進させ組織におけるフィブリン網を過剰に形成する。これらのことから好酸球性炎症を呈する副鼻腔炎における鼻茸の難治化には Th2 環境による凝固系の亢進と、線溶系の抑制による鼻粘膜におけるフィブリン網の過剰沈着が大きな原因になっていると考えられる。

(高林 哲司)

## 文献

- 1) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of t-PA expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;187:49-57.
- 2) Jennewein C, Tran N, Paulus P, et al. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol Med.* 2011;17:568-573.
- 3) Katona E, Ajzner E, Toth K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods.* 2001;258:127-135.
- 4) Malara A, Gruppi C, Rebuzzini P, et al. Megakaryocyte-matrix interaction within bone marrow: new roles for fibronectin and factor XIII-A. *Blood.* 2011;117:2476-2483.
- 5) Adany R, Bardos H. Factor XIII subunit A as an intracellular transglutaminase. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1049-1060.
- 6) Muszbek L, Berczky Z, Bagoly Z, et al. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011;91:931-972.
- 7) Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:958-699.
- 8) Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32:593-604.
- 9) Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:723-737.
- 10) Fairweather D, Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2009;33:222-230.
- 11) Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-461.



- 12) Torocsik D, Szeles L, Paragh G, et al. Factor XIII-A is involved in the regulation of gene expression in alternatively activated human macrophages. *Thromb Haemost.* 2010;104:709-717.
- 13) Pawliczak R, Lewandowska-Polak A, Kowalski ML. Pathogenesis of nasal polyps: an update. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5:463-471.
- 14) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:410-420.**
- 15) Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy.* 2006;61:1280-1289.
- 16) **Takabayashi T, Schleimer R. Formation of nasal polyps: the roles of innate Type 2 inflammation and deposition of fibrin. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145:740-750.**
- 17) Bagoly Z, Katona E, Muszbek L. Factor XIII and inflammatory cells. *Thromb Res.* 2012;129 Suppl 2: S77-S81.
- 18) Derrick EK, Barker JN, Khan A, et al. The tissue distribution of factor XIIIa positive cells. *Histopathology.* 1993;22:157-162.
- 19) Krysko O, Holtappels G, Zhang N, et al. Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. *Allergy.* 2011; 66:396-403.
- 20) Peterson S, Poposki JA, Nagarkar DR, et al. Increased expression of CC chemokine ligand 18 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:119-127.
- 21) Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol.* 2011;12:1055-1062.
- 22) Mjosberg J, Bernink J, Golebski K, et al. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity.* 2012;37:649-659.
- 23) Hao N-B, Lu M-H, Fan Y-H, et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:948098.
- 24) Quatresooz P, Paquet P, Hermanns-Le T, et al. Molecular mapping of Factor XIIIa-enriched dendrocytes in the skin (Review). *Int J Mol Med.* 2008;22: 403-409.

## 5 - 3

# 短鎖脂肪酸を用いた鼻上皮細胞からの tissue plasminogen activator (t-PA) の産生誘導

## サマリー

鼻茸には凝固系の最終産物であるフィブリンが蓄積している。この原因は、線溶系因子である tissue plasminogen activator (t-PA) が鼻茸上皮細胞で低下しているためである。我々は酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸が、気道上皮細胞から t-PA を誘導することを見出した。そしてそれらの反応は G-protein-coupled receptor (GPR) 41 と GPR43 依存性に生じていることを確認した。

## はじめに

現在行われている好酸球性副鼻腔炎の治療は、手術療法と長期にわたる局所および全身ステロイド投与が中心である。そこに新規抗体治療薬の効果が報告され、保険適応が承認された。しかしそれらは治療費が高額であるという医療経済上の問題がある。そのためより詳細な好酸球性副鼻腔炎の病態解明と新規治療法の確立が渴望されている。

鼻茸の病理学的特徴は炎症細胞の浸潤と過剰なフィブリンの沈着である<sup>1)2)</sup>。フィブリンは凝固系の最終産物であり、組織障害や炎症により組織内で産生され組織修復に貢献する<sup>3)</sup>。生成されたフィブリンは生体内では線溶系の plasmin で分解される。plasmin は tissue plasminogen activator (t-PA) と urokinase plasminogen activator (u-PA) で合成されるが、鼻茸上皮細胞では t-PA 産生が低下している<sup>1)</sup>。一方で鼻茸中では、凝固系第 XIIIa 因子とトロンビンが高発現することで、鼻茸組織内で凝固系と線溶系のアンバランス (= 凝固系の亢進と線溶系の低下) が生じている<sup>4)5)</sup>。その主たる原因は Th2 サイトカインであり、interleukin-4 (IL-4) と IL-13 が上皮細胞の t-PA 産生を抑制できる<sup>1)</sup>。

以上のことから気道上皮細胞の t-PA 誘導に着目し、鼻茸中のフィブリン制御による新規治療法を開発することにした。血管内皮細胞における t-PA の agonist としては、さまざまな薬剤やホルモン、サイ

トカインや酪酸などが報告されている<sup>6)~9)</sup>。酪酸などの短鎖脂肪酸は、我々の腸管内で食物繊維から腸内細菌叢により産生される安全な生理活性物質で<sup>10)</sup>、代謝機能の調節や、炎症反応の制御、抗腫瘍効果など多彩な機能を有している<sup>11)~16)</sup>。そこで我々は、短鎖脂肪酸が気道上皮細胞からの t-PA 産生を誘導できるかどうか検討した<sup>17)</sup>。

## 方法

### G-protein-coupled receptor (GPR) 41 と GPR43 の免疫組織化学

短鎖脂肪酸受容体は7回膜貫通型受容体である G タンパク質共役型受容体 : G-protein-coupled receptor (GPR) 41 と GPR43 からなる<sup>14) 18) 19)</sup>。内視鏡下鼻副鼻腔手術で採取し、ホルマリン固定された鉤状突起と鼻茸組織のパラフィンブロックから 3 μm の切片を作製し、脱パラフィン後に GPR41 と GPR43 の免疫組織化学を行った。GPR41 に対する抗体は rabbit anti human GPR41/FFAR3 pAb (Life Span Bioscience, Seattle, US) を、GPR43 は rabbit anti human GPR43/FFAR2 pAb (LifeSpan Bioscience) を用いた。

### 短鎖脂肪酸の種類

短鎖脂肪酸には酢酸 ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )、プロピオン酸 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ )、酪酸 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ )、

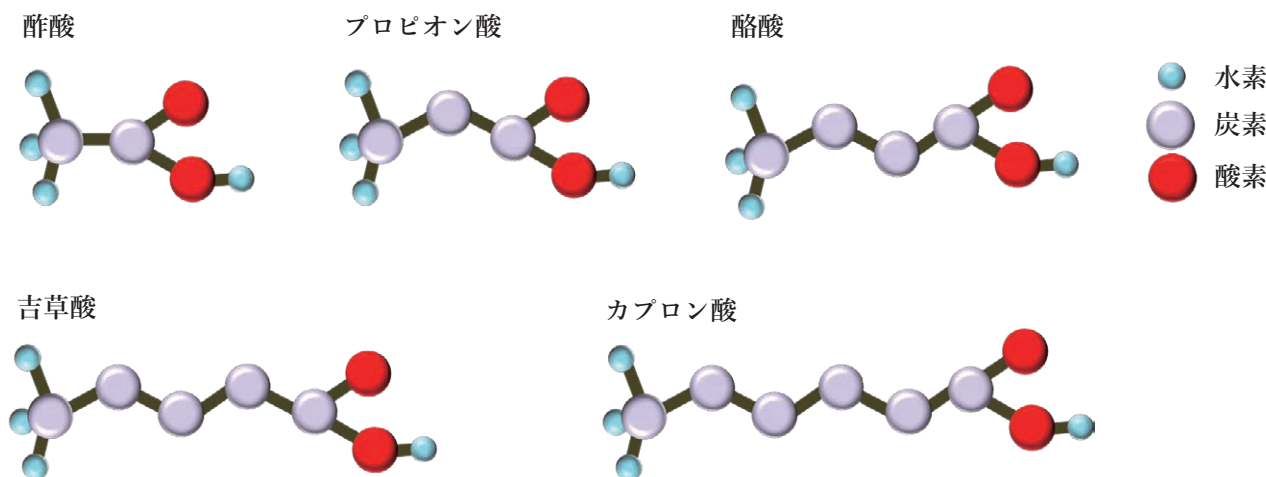


図1. 短鎖脂肪酸の構造式.

吉草酸 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ), そしてカプロン酸 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ ) がある. 模式図を図1に示す.

### t-PA 産生誘導の検討

正常ヒト気道上皮細胞 (normal human bronchial epithelial cells; NHBE cells) を用い, 短鎖脂肪酸によってt-PA産生が誘導されるかを検討した. 酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 吉草酸, カプロン酸をNHBE細胞に作用させ, 刺激後24時間後のt-PAのmRNAの発現を定量real time-PCR法で測定した. 同時に刺激後48時間後の培地中のt-PAタンパク濃度をELISA (Assaypro, St. Charles, US) で測定した. またNHBE細胞から産生され培地中に放出されたt-PAの活性についても検討した. NHBE細胞に短鎖脂肪酸添加後のpHの変化はAccumet Basic (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) で測定し, 細胞障害についてはMTS Reagent (Promega, Madison, US) を用いて評価した.

## 結果

### 鼻粘膜上皮細胞におけるGPR41とGPR43の発現

手術で摘出した鼻茸および正常鉤状突起組織を抗GPR41抗体と抗GPR43抗体で免疫組織化学を行った. 鼻茸および鉤状突起粘膜の上皮細胞にGPR41とGPR43が存在していることを見出した (図2).

GPR41とGPR43の鼻腔粘膜上皮細胞における発現はこれまで報告がなかった.

### NHBE細胞における短鎖脂肪酸刺激によるt-PAの誘導

NHBE細胞に短鎖脂肪酸を作用させると, t-PAの誘導ができるかを検討した. t-PAのmRNAは, プロピオン酸, 酪酸, そして吉草酸で著明に誘導され, 酢酸, プロピオン酸, 吉草酸は10 mM, 酪酸は1 mMの濃度で最も強く誘導された (図3a). t-PAタンパクはプロピオン酸10 mMで最も多く培養液中に放出された (図3b). さらに培養液中に放出されるt-PAの活性について検討したところ, プロピオン酸10 mM刺激により放出されるt-PAは十分な活性を有することがわかった (図3c). これら短鎖脂肪酸 (0.1~20 mM) によるt-PA誘導において, NHBE細胞培地中のpHに影響しないこと, そして上皮細胞に対する細胞障害を生じないことを確認した (data not shown).

### GPR41とGPR43を介した短鎖脂肪酸によるt-PA誘導

Gタンパク質共役結合受容体は,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ のサブユニットから構成され,  $\alpha$ サブユニットの違いにより異なったシグナル伝達を持つことが知られている. GPR41は $\alpha$ サブユニットにai/oを, GPR43はai/oと $\alpha$ q/11を有している<sup>18)</sup> (図4). ai/oを阻害するの



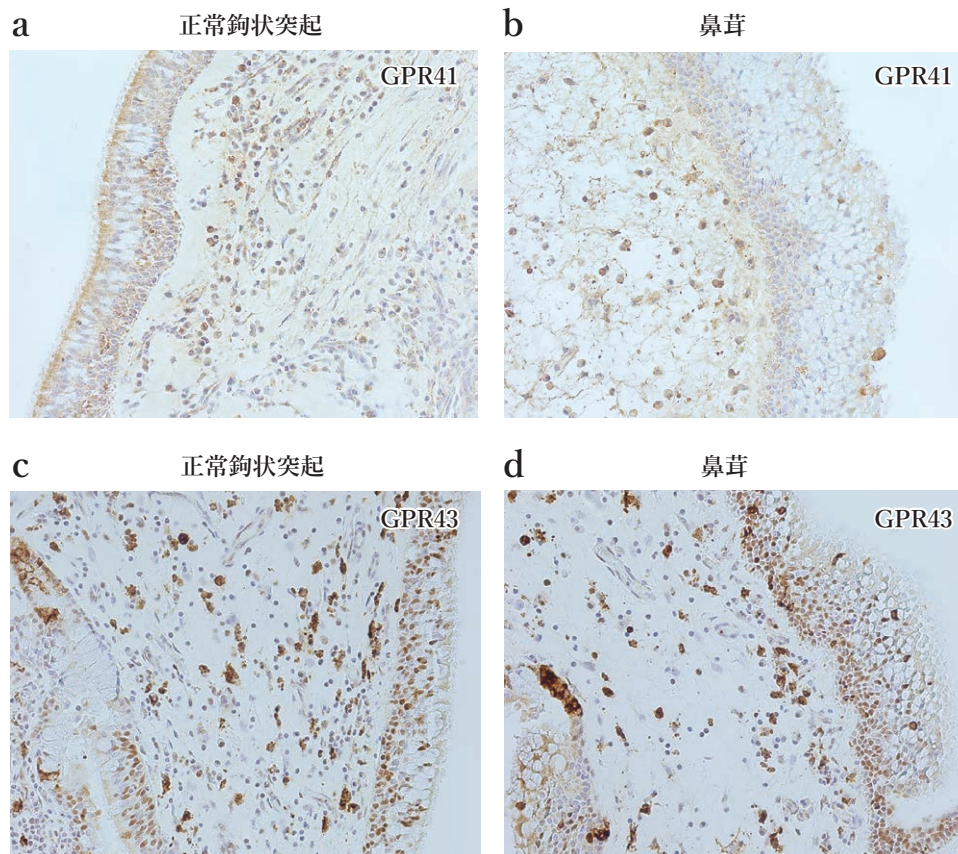


図2. 鉤状突起粘膜および鼻茸組織におけるGPR41とGPR43の免疫組織化学。

GPR41 (a, b) とGPR43 (c, d) は鉤状突起と鼻茸の上皮細胞に発現している (×200)。

が百日咳毒素 (Sigma-Aldrich, St. Louis) であり,  $\alpha q/11$  を選択的に阻害するのがYM-254890 (Wako, Osaka) である. NHBE細胞をプロピオン酸刺激前に百日咳毒素ならびにYM-254890で前処理し, その後プロピオン酸による刺激後24時間後のt-PAの発現量について定量real time-PCR法で検討した. さらにGPR41とGPR43に対するshort interfering RNA (siRNA) をNHBE細胞に作用させ (GPR41; OriGene, Rockville, MD, GPR43; OriGene), siRNA導入後48時間後にプロピオン酸で刺激し, 刺激後24時間後のt-PAのmRNAについて定量real time-PCR法で確認した. GPR41とGPR43に対するsiRNA作用後に, Western blot法を用いてGPR41とGPR43のタンパクについて確認した.

百日咳毒素およびYM-254890単独刺激ではNHBE細胞からのt-PA産生には影響がないことを確認した (data not shown). 次に百日咳毒素およびYM-254890をNHBE細胞に前処理後にプロピオン

酸10 mMによるt-PA産生について検討した. その結果百日咳毒素およびYM-254890はプロピオン酸によるt-PA産生誘導を抑制することがわかった (図5). 即ちGPR41とGPR43受容体を介してプロピオン酸によるt-PA誘導が行われていた.

さらにそれを確認するためにGPR41とGPR43に対するsiRNAをNHBE細胞に遺伝子導入した. GPR41とGPR43のタンパク発現が抑制されていることをWestern blot法にて確認した (図6a, b). siRNA作用後にプロピオン酸でNHBE細胞を刺激したところ, t-PA産生誘導は有意に抑制された (図6c, d). さらにGPR41とGPR43の2つの遺伝子をsiRNAで抑制したところ, プロピオン酸によるt-PA産生はさらに抑制された (図6e). これらの結果より, NHBE細胞からの短鎖脂肪酸によるt-PA産生はGPR41とGPR43依存性であることが証明された.

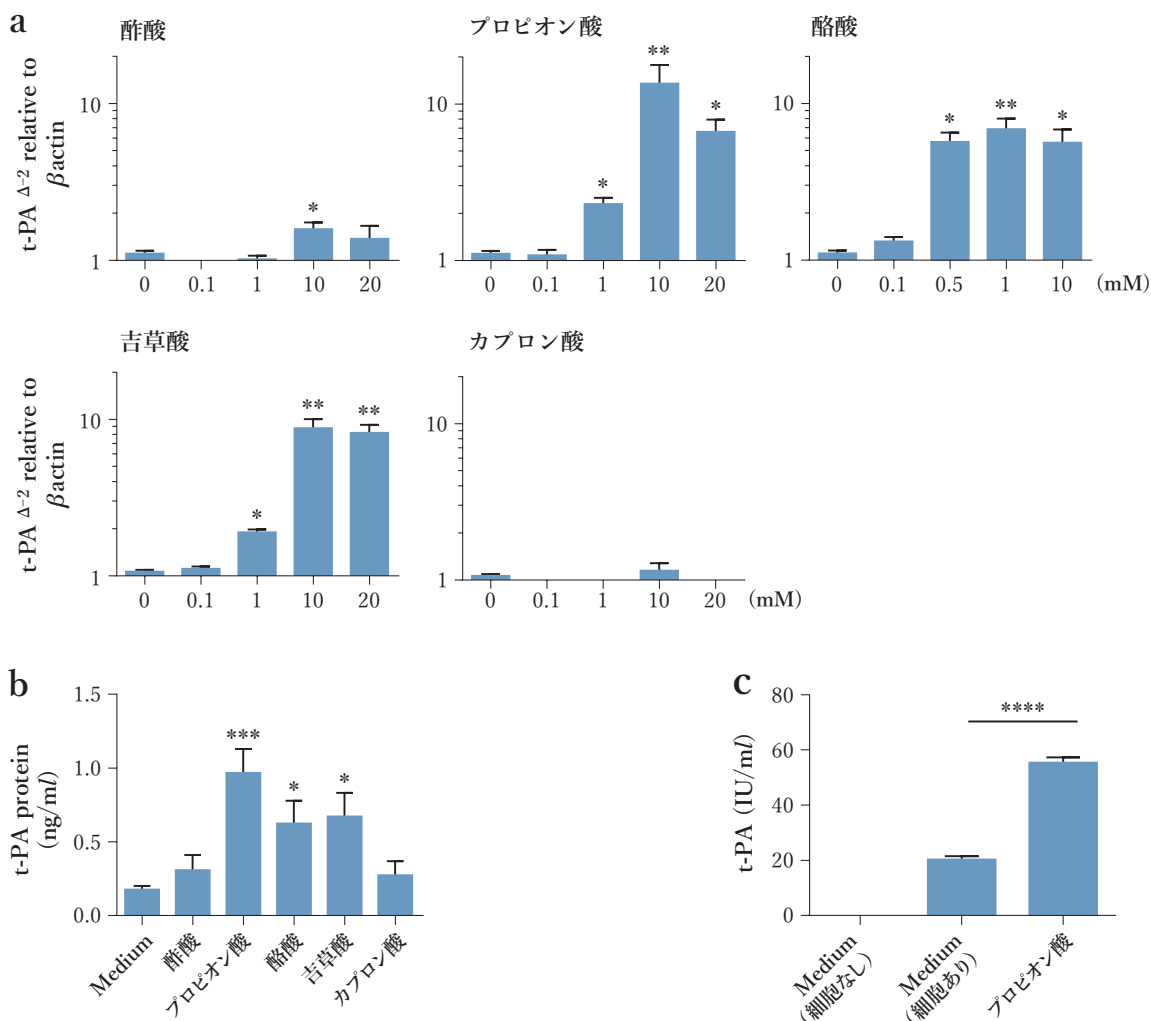


図3. NHBE細胞による短鎖脂肪酸刺激後のt-PA産生誘導 (文献17より)。

(a) t-PAのmRNA, (b) 培養液中に含まれるt-PAタンパク. 酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 吉草酸を作用させるとNHBE細胞からt-PA産生を誘導した. (c) プロピオン酸刺激により培養液中に産生, 放出されたt-PAの活性. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , mean  $\pm$  SEM (n=4-8).

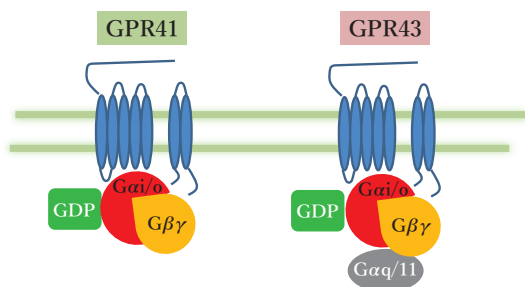


図4. GPR41 (a) と GPR43 (b) の構造図 (文献17より)。

### 考察

本研究では, 短鎖脂肪酸が気道上皮細胞から安全に活性を有するt-PAの産生をGPR41とGPR43を

介して誘導できることを見出した (図7)<sup>17)</sup>. GPR41とGPR43はさまざまな免疫細胞, 脂肪細胞, 腸管上皮細胞に発現しており<sup>18)19)</sup>, GPR41はプロピオン酸, 酪酸, 吉草酸, 酢酸の順に, GPR43は酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 吉草酸の順に活性化される<sup>18)19)</sup>. 本研究でt-PAを最も強く誘導したのはプロピオン酸であった. これまで短鎖脂肪酸がGPR41とGPR43に対してアゴニスト活性を示すにはmMレベルの濃度が必要であることが知られていたが<sup>18)</sup>, 本研究でもNHBE細胞からt-PA産生を誘導する短鎖脂肪酸は1 mM~20 mMであった. このように比較的高濃度の短鎖脂肪酸が必要である理由は, 多種多様なGタンパク質共役型受容体は我々の生体



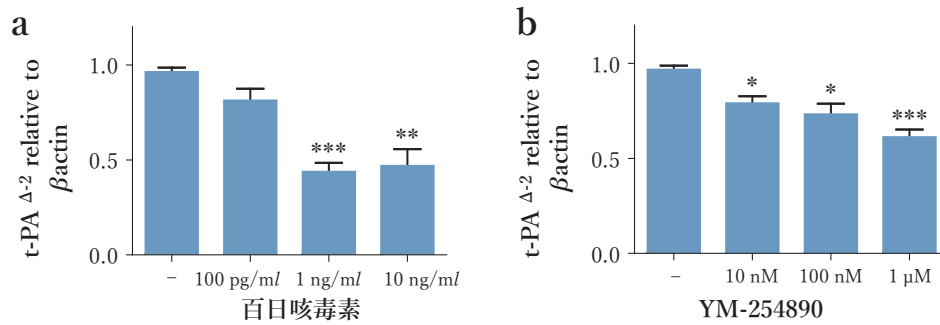


図5. プロピオン酸刺激によるt-PA産生に対する(a)百日咳毒素および(b)YM-254890の抑制効果. 百日咳毒素およびYM-254890前処理により, プロピオン酸刺激によるt-PA産生が抑制される. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , mean mean $\pm$ SEM (n=5).

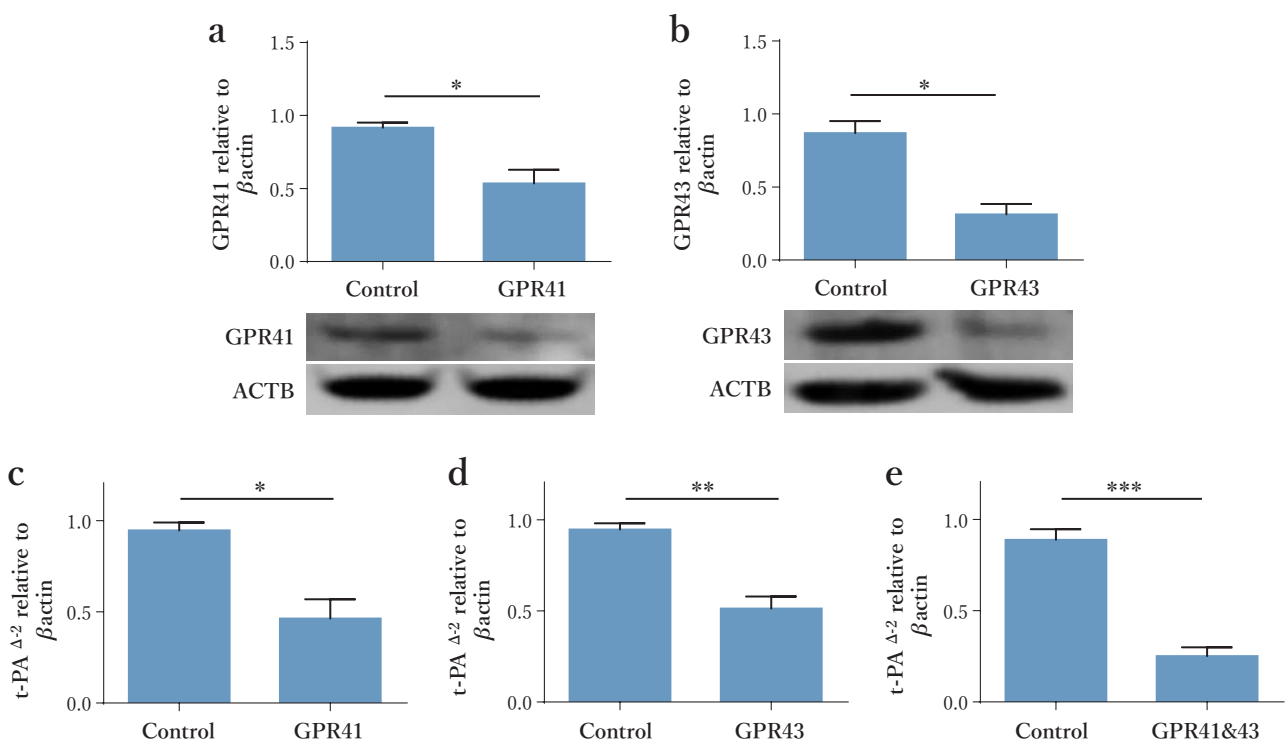


図6. NHBE細胞におけるGPR41とGPR43のsiRNAを用いたt-PA産生誘導の検討(文献17より).

(a) siRNAによるGPR41タンパク抑制, (b) siRNAによるGPR43のタンパク抑制効果, (c) GPR41抑制下におけるプロピオン酸投与後のt-PA発現量の変化, (d) GPR43抑制下におけるプロピオン酸投与後のt-PA発現量の変化, (e) GPR41とGPR43抑制下におけるプロピオン酸投与後のt-PA発現量の変化. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , mean mean $\pm$ SEM (n=4-6).

のあらゆる組織に存在しており, Gタンパク質共役型受容体が容易に活性化しないように各組織で制御されているためと考えられている. しかし細胞間の距離や産生する細菌との距離から, *in vivo*において高濃度の状態にはなりうると思われる.

短鎖脂肪酸はアレルギー炎症を抑制することから

一躍注目を浴びるようになった. 腸管内では短鎖脂肪酸が腸上皮細胞からのサイトカイン産生を調節したり, 腸上皮下に到達した短鎖脂肪酸が樹状細胞に作用することでアレルギー反応を制御する<sup>10)16)</sup>. 酪酸は好酸球の走化や生存を制御する<sup>20)</sup>. またアレルギー性喘息モデルマウスでは, 食物繊維の多い餌を

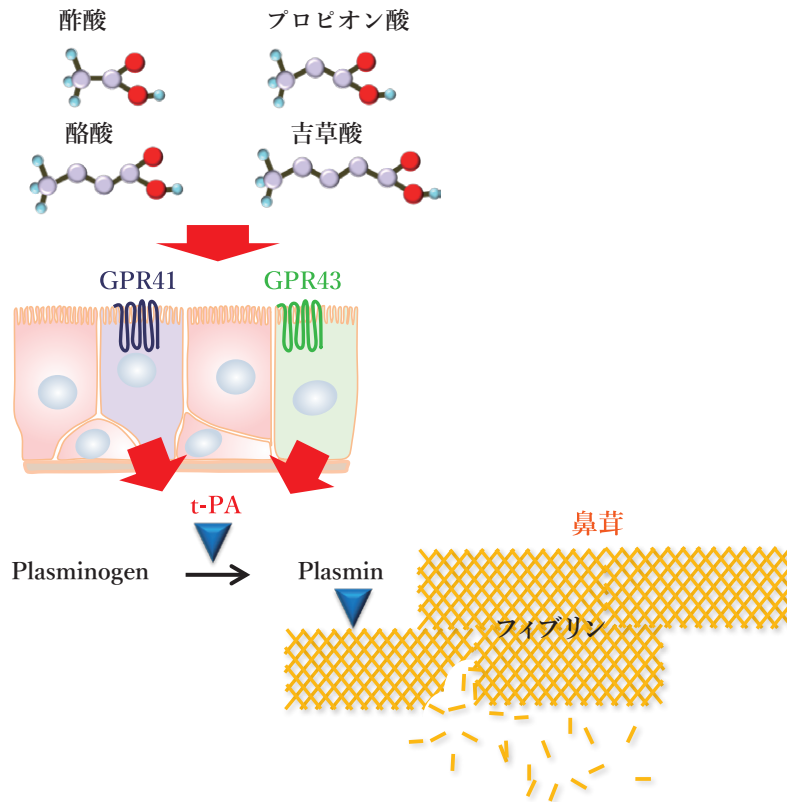


図7. 本研究の概要図.

酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 吉草酸はt-PAを気道上皮細胞からGPR41とGPR43依存性に誘導することで, 鼻茸のフィブリンを減少することができる可能性がある.

摂取させたマウスの気道好酸球性炎症が抑制されること, そしてそれらが糞便中の短鎖脂肪酸濃度と関連があることが知られている<sup>12)</sup>. さらにヒトでは妊婦の血清中の短鎖脂肪酸の濃度が高いと子供の喘息の発症率が低く<sup>15)</sup>, 短鎖脂肪酸の抗アレルギー効果はGPR41とGPR43依存性であると考えられている<sup>12)15)</sup>. それでは腸管内で短鎖脂肪酸が多く産生されれば鼻腔組織でのt-PA産生が誘導され, 鼻茸は縮小するのであろうか. 腸管内では短鎖脂肪酸は高濃度で存在するが( $\sim 100$  mM)<sup>18)</sup>, 体内循環により速やかに分解されるため血清中の濃度は低くなり(0.5

$\sim 140$   $\mu$ M)<sup>21)</sup>, 腸管以外の組織における濃度はさらに低いと考えられている. 一方鼻腔洗浄液中の短鎖脂肪酸濃度を測定したところ検出感度以下であった<sup>17)</sup>. これらの結果からt-PAを誘導できる濃度の短鎖脂肪酸あるいはGPR41とGPR43の特異的アゴニストを鼻腔内に投与できれば, 上皮細胞からのt-PA産生を誘導でき鼻茸縮小効果が得られる可能性があるかもしれない. 今後GPR41とGPR43の特異的アゴニストを開発し, 点鼻投与可能であるかを検討する予定である.

(意元 義政)

## 文献

- 1) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.
- 2) Schleimer RP. Immunopathogenesis of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Annu Rev Pathol.* 2017;12:331-357.

- 3) Jennewein C, Tran N, Paulus P, et al. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol Med*. 2011;17:568-573.
- 4) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:584-592.e4.**
- 5) **Imoto Y, Kato A, Takabayashi T, et al. Increased thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144:1566-1574.e6.**
- 6) Medcalf RL, Kruithof EK, Schleuning WD. Plasminogen activator inhibitor 1 and 2 are tumor necrosis factor/cachectin-responsive genes. *J Exp Med*. 1988;168:751-759.
- 7) Chang Y-C, Yang S-F, Huang F-M, et al. Induction of tissue plasminogen activator gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod*. 2003;29:114-117.
- 8) Lansink M, Kooistra T. Stimulation of tissue-type plasminogen activator expression by retinoic acid in human endothelial cells requires retinoic acid receptor beta 2 induction. *Blood*. 1996;88:531-541.
- 9) Dunoyer-Geindre S, Fish RJ, Kruithof EKO. Regulation of the endothelial plasminogen activator system by fluvastatin. Role of Rho family proteins, actin polymerisation and p38 MAP kinase. *Thromb Haemost*. 2011;105:461-472.
- 10) Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011;474:327-336.
- 11) Tang Y, Chen Y, Jiang H, et al. G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer. *Int J Cancer*. 2011;128:847-856.
- 12) Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med*. 2014;20:159-166.
- 13) Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341:569-573.
- 14) Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461:1282-1286.
- 15) Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun*. 2015;6:7320.
- 16) Sivaprakasam S, Prasad PD, Singh N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacol Ther*. 2016;164:144-151.
- 17) **Imoto Y, Kato A, Takabayashi T, et al. Short-chain fatty acids induce tissue plasminogen activator in airway epithelial cells via GPR41&43. *Clin Exp Allergy*. 2018;48:544-554.**
- 18) Le Poul E, Loison C, Struyf S, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003;278:25481-25489.
- 19) Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 2003;278:11312-11319.
- 20) Theiler A, Bärnthaler T, Platzer W, et al. Butyrate ameliorates allergic airway inflammation by limiting eosinophil trafficking and survival. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144:764-776.
- 21) Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev*. 1990;70:567-590.

## 5 - 4

# トロンビンと thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) による鼻茸形成の機序

## ◆ サマリー

過剰なフィブリン沈着を特徴とする好酸球性副鼻腔炎の鼻茸では、凝固系の亢進と線溶系の低下が生じている。我々は好酸球性副鼻腔炎患者における鼻茸組織と鼻腔洗浄液中のトロンビンと thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) が健常者と比較して有意に高いこと、特に気管支喘息を合併する患者で高いことを見出した。これらの結果は好酸球性副鼻腔炎の難治化に関与している可能性を示唆している。

## はじめに

気管支喘息患者の末梢気道中では、好酸球を主体とする多数の炎症性細胞の浸潤と、凝固系のトロンビンの上昇、そして過剰なフィブリンの沈着が認められる<sup>1)</sup>。このような炎症組織像は好酸球性副鼻腔炎鼻茸組織においても認められ、局所の凝固系の亢進と線溶系の低下が病態に関与している<sup>2)~4)</sup>。フィブリンは組織修復や炎症反応の過程で生成され、通常であれば線溶系で分解される。しかし慢性炎症では過剰なフィブリンが炎症性サイトカインの産生を誘導し、炎症反応を遷延化させる<sup>5)</sup>。好酸球炎症と凝固系は密接な関連があり、好酸球は凝固系の initiator である tissue factor を発現している<sup>6)</sup>。

凝固系カスケードで生成されたトロンビンがフィブリン塊を形成すると線溶系が働き出す。線溶系カスケードにおいて、plasminogen が tissue plasminogen activator (t-PA) もしくは urokinase plasminogen activator (u-PA) によって plasmin に変換され、plasmin がフィブリンを分解する。鼻茸組織では t-PA の産生が低下しており、鼻茸の形成の重要な病因となっている<sup>3)</sup>。Plasmin によりフィブリンが分解されると、フィブリンの C 末端が リジン に変換され、plasminogen と t-PA のフィブリンへの結合が促進されることにより線溶系の positive feedback が形成される。Thrombin activatable fibrinolysis

inhibitor (TAFI) は肝臓で合成される酵素であり<sup>7)</sup>、フィブリンの C 末端のリジン残基を除去することで線溶系の働きを制御する<sup>8)</sup>。TAFI はその名のごとくトロンビンで活性化されるが、肝臓以外では血小板に貯蔵されて、活性化した血小板は TAFI を放出することで線溶系を抑制する<sup>7)9)10)</sup>。アスピリン喘息患者では、血小板の活性化が病態形成に重要な役割を担っているという興味深い論文も報告された<sup>11)</sup>。本研究では、鼻腔組織および鼻腔洗浄液中のトロンビンと TAFI 濃度について調べ、トロンビンと TAFI が鼻茸形成にどのように関与しているかを検討する。

## 方法

### サンプル採取

内視鏡下鼻副鼻腔手術時に採取した鉤状突起粘膜、および鼻茸組織と鼻腔洗浄液を使用した。対象とした患者は、鼻茸を有する慢性副鼻腔炎患者 (chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSwNP) と、鼻茸を有さない慢性副鼻腔炎患者 (chronic rhinosinusitis without nasal polyps; CRSsNP)、そして慢性副鼻腔炎を有さない健常者 (コントロール群: control) である。

鼻腔組織は 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, US) を含む PBS-TWEEN で凍結保存し、Next Advance bullet blender (Next Advance

Inc, Averill Park, US) で粉碎後, 遠心後の上澄を測定に用いた. 採取後鼻腔洗浄液は $-80^{\circ}\text{C}$ で, 鼻腔組織については $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した<sup>12)</sup>. 血清は鼻腔洗浄液サンプルと同一患者から採取し, 遠心後 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した.

### 鼻腔洗浄液および鼻腔組織の総タンパク濃度測定

鼻腔洗浄液および鼻腔組織の総タンパク濃度については, Bicinchoninic acid Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, US) を用いて測定した.

### ELISA

トロンビンの濃度については thrombin anti-thrombin complex (TATc) を測定することでトロンビン濃度とした. TATc, TAFI, Eosinophil cationic protein (ECP), そしてアルブミンについては以下の ELISA キットを用いて測定した (TATc; Assaypro, St. Charles, US, TAFI; Life Span Bioscience, Seattle, US, ECP; MBL International, Woburn, US, アルブミン; Bethyl Laboratories, Montgomery, US). 測定した値については, 鼻腔洗浄液および組織の総タンパク濃度にて補正した. ELISA キットを用いた吸光度測定には, Bio-Rad Spectrophotometer Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, US) を用いて行った.

表1.

	鼻腔洗浄液			鼻腔組織			
	Control (n=15)	CRSsNP (n=15)	CRSwNP (n=21)	Control UT (n=8)	CRSsNP UT (n=7)	CRSwNP	
						UT (n=7)	NP (n=15)
男性/女性	6/9	4/11	14/7*	1/7	5/2	5/2	13/2*
年齢	36.1±10.4	45.2±15.4	47.8±13.0**	58.1±9.4	36.3±12.9*	43.4±13.0*	49.1±11.2 <sup>#</sup>
合併症, あり/なし/不明							
気管支喘息	0/15/0	6/9/0	9/12/0	1/7/0	3/4/0	4/3/0	6/9/0
アトピー	4/6/5	6/8/1	11/9/1	3/0/5	4/3/0	4/1/2	12/1/2
ステロイド使用							
経口	0/15	0/15	3/18	1/7	1/6	2/5	2/13
吸入	0/15	2/13	3/18	0/8	1/6	2/5	1/14
点鼻	2/13	2/13	2/19	0/8	2/5	2/5	4/11

\*;  $p < 0.05$ , vs. Control. \*\*;  $p < 0.01$ , vs. Control. <sup>#</sup>;  $p < 0.05$ , vs. CRSsNP.

## 結果

### 患者背景因子

対象とした患者の詳細を表1に示す. 鼻腔洗浄液を解析した患者群の中で, CRSwNP群はコントロール群と比較して男性が多く, 年齢もやや高かった. 鼻腔組織を解析した患者群では CRSsNP群はコントロール群と CRSwNP鼻茸採取群と比較して若く, CRSwNP鉤状突起採取群はコントロール群より若かった. しかしながらアトピーや気管支喘息合併とステロイド使用については有意な差は認めなかった.

### 鼻腔洗浄液および組織中の TATc と TAFI 濃度

鼻腔洗浄液および組織中の TATc 濃度の結果を図1に示す (図1a; 鼻腔洗浄液, b; 鼻腔組織). コントロール群と比較して CRS群 (CRSsNP および CRSwNP群) の鼻腔洗浄液中の TATc は有意に上昇していた. また鼻腔組織ではコントロール群と比べ CRS群の鉤状突起の TATc が高く, さらに鼻茸組織中の TATc は高値を示すことを見出した. CRSwNP群の鼻腔洗浄液中の TAFI の濃度は, コントロール群および CRSsNP群と比較して有意に上昇していた (図1c). さらに鼻茸組織中の TAFI 濃度は鉤状突起組織内と比べ有意に高いことが判明した (図1d).



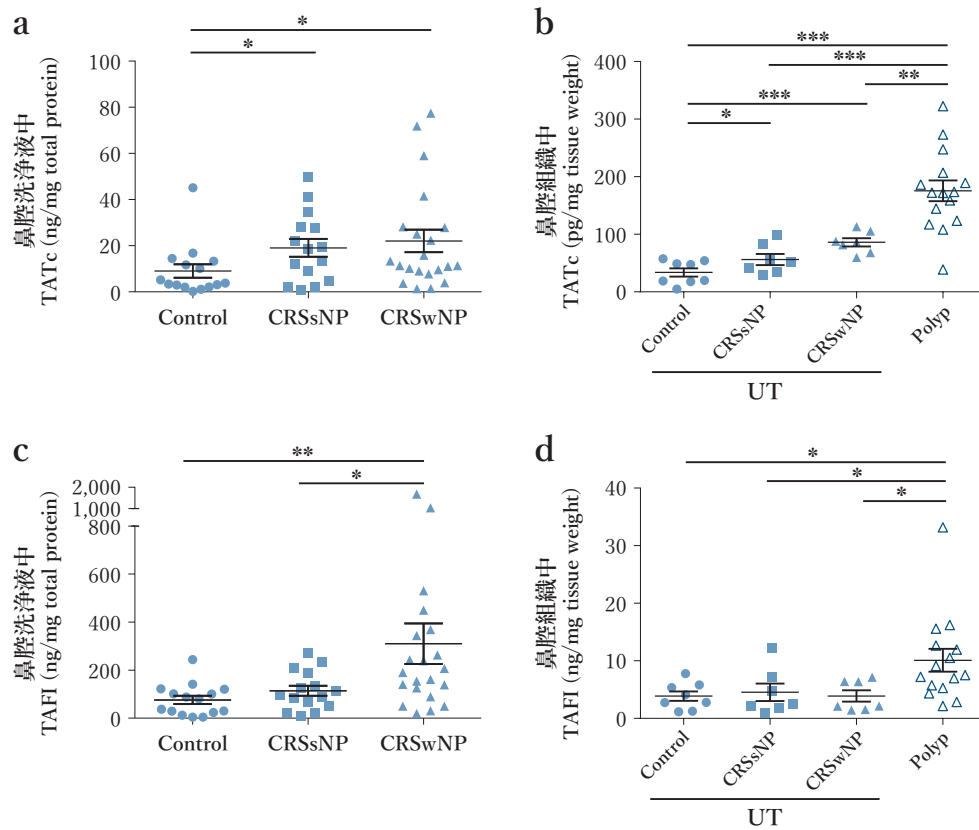


図1. 鼻腔洗浄液と鼻腔組織中のTATcとTAFI濃度 (文献12より).

(a) 鼻腔洗浄液中のTATc (●; control, ■; CRSsNP, ▲; CRSwNP, n=15-21). (b) 鼻腔組織中のTATc濃度 (●; control UT, ■; CRSsNP UT, ▲; CRSwNP UT, △; CRSwNP NP tissue, n=7-15). (c) 鼻腔洗浄液中のTAFI濃度 (n=15-21). (d) 鼻腔組織中のTAFI濃度 (n=7-15). TATcとTAFI濃度は総タンパク量で補正している. \* $P<.05$ , \*\* $P<.01$ , and \*\*\* $P<.001$ . CRSsNP (鼻茸を伴わない慢性副鼻腔炎); CRS without nasal polyps, CRSwNP (鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎); CRS with nasal polyps, UT (鉤状突起); uncinat tissue.

### 鼻腔組織中のTATcとTAFIの好酸球炎症との関連

ECPは鼻茸組織などの好酸球炎症が生じている組織内で上昇し、好酸球炎症の1つのマーカーであると考えられている<sup>13)</sup>. CRSwNPにおいてTATcとTAFIが上昇していることが好酸球炎症と関連があるかを検証するために、鼻腔組織のECPとの相関を調べた。その結果TATcとECP ( $r=0.49$ ,  $p<0.01$ , 図2a), TAFIとECP ( $r=0.4566$ ,  $p<0.01$ , 図2b)には有意な正の相関を認め、TATcとTAFIが局所の好酸球炎症と関連がある可能性が示唆された。

### 血清中のTAFIの濃度

TAFIは主に肝臓で生成され体内循環される物質である。CRSwNP群の鼻腔洗浄液と鼻茸組織内でのTAFIが血清TAFIの濃度の違いによるかを検証する

ため、鼻腔洗浄液を測定した患者の血清TAFI濃度を測定した。その結果コントロール群とCRS群では血清TAFIには有意な差は認めなかった(図3)。これらのことより鼻腔内で上昇しているTAFIは血清濃度による違いではないことが示唆された。

### 鼻腔洗浄液中のアルブミン濃度

血清に含まれ体内を循環するタンパクは、炎症が生じている局所において血管外へ漏出する。アルブミンは血漿タンパクの1つであり、炎症局所において血管内から組織へと漏出するため、局所のアルブミンは血管外漏出のパラメーターと考えられている<sup>3)14)</sup>. CRSwNP群における鼻腔内TAFI濃度の上昇が、炎症反応に伴う血管外漏出に規定されるかを検討するために、鼻腔洗浄液中のアルブミン濃度を測定した。その結果コントロール群と比較してCRS群

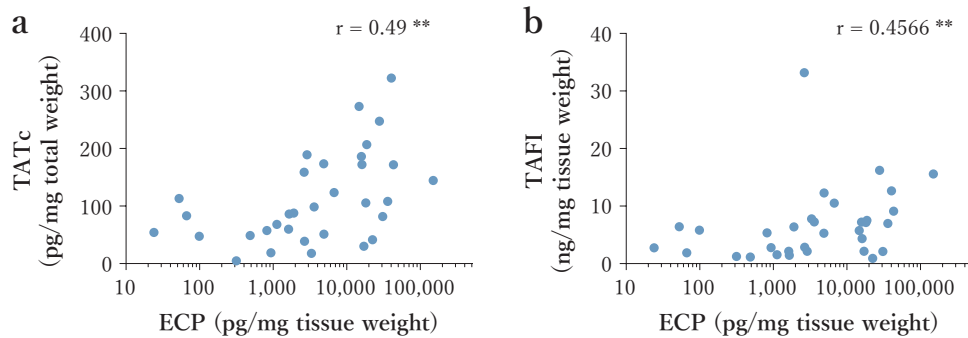


図2. 鼻腔組織中のECPとTATc, ECPとTAFI濃度の相関関係 (文献12より).

(a) 鼻腔組織中のECPとTATc, (b) ECPとTAFI濃度には有意な相関関係がある.  $^{**}P < .01$ .

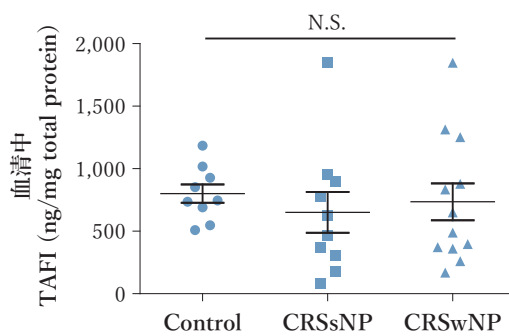


図3. 血清中のTAFI濃度 (文献12より).

血清中のTAFI濃度には3群間において有意な差は認めない (●; control, ■; CRSsNP, ▲; CRSwNP,  $n=9-12$ ).

のアルブミン濃度が高いことを見出した (図4a). その傾向は特にCRSwNP群で著明に認められたこと, 鼻腔洗浄液中のTAFI濃度をアルブミンで補正してもCRSwNP群で高いこと (図4b), そして総タンパクで補正した濃度とアルブミンで補正した濃度には高い相関があることから (図4c), 鼻腔内のTAFI濃度は血管外漏出の影響が大きいことが示唆された.

### 気管支喘息合併による鼻腔洗浄液中のTATcとTAFIの濃度の検討

慢性副鼻腔炎患者は気管支喘息を合併する割合が比較的高く<sup>15)16)</sup>, 特にCRSwNPでは気管支喘息を合併すると副鼻腔炎が重症であることが多い<sup>17)18)</sup>. 気管支喘息の合併により鼻腔洗浄液中のTATcとTAFIが異なるかを検討した. その結果気管支喘息を合併しているとTATcとTAFIが気管支喘息非合併例より有意に高いことを見出した (図5a, b). 特に

CRSwNP群において, TATcとTAFIの鼻腔洗浄液中濃度が気管支喘息合併例で高いことを確認した (図5c, d).

### 考察

本研究ではCRSwNPの鼻腔洗浄液および鼻茸組織内のTATc (トロンビン) とTAFIが上昇しており, これらが好酸球炎症 (ECP) と関連していること, 局所の炎症反応に伴う血管外漏出により生じていること, そして気管支喘息の合併がこれらの局所の濃度に影響していることを見出した<sup>12)</sup>. トロンビンは凝固系内で生成されるセリンプロテアーゼであり<sup>19)</sup>, フィブリノーゲンをフィブリンに変換するのみならず, 凝固系第V因子, 第VIII因子, そしてXIII因子を活性化させる. よってトロンビンは凝固系において重要な機能を担っていると考えられる. さらにトロンビンはTAFIの活性化にも関与しているため, トロンビンは線溶系と凝固系の両方に影響を与える因子であるといえる. 本研究結果より鼻茸組織内でTATcとTAFIが上昇していたことは, 鼻茸成因に凝固系の亢進と線溶系の低下が生じていることが改めて確認できた.

上気道炎症と下気道炎症は密接に関連しているが<sup>15)16)</sup>, 気管支喘息を合併するCRSwNP患者群は気管支喘息非合併群よりもTATcとTAFIが上昇していた. 重症気管支喘息患者におけるステロイド使用は, 末梢血の凝固系に影響を与える可能性がある. しかし, ステロイド使用の有無による鼻腔洗浄液中

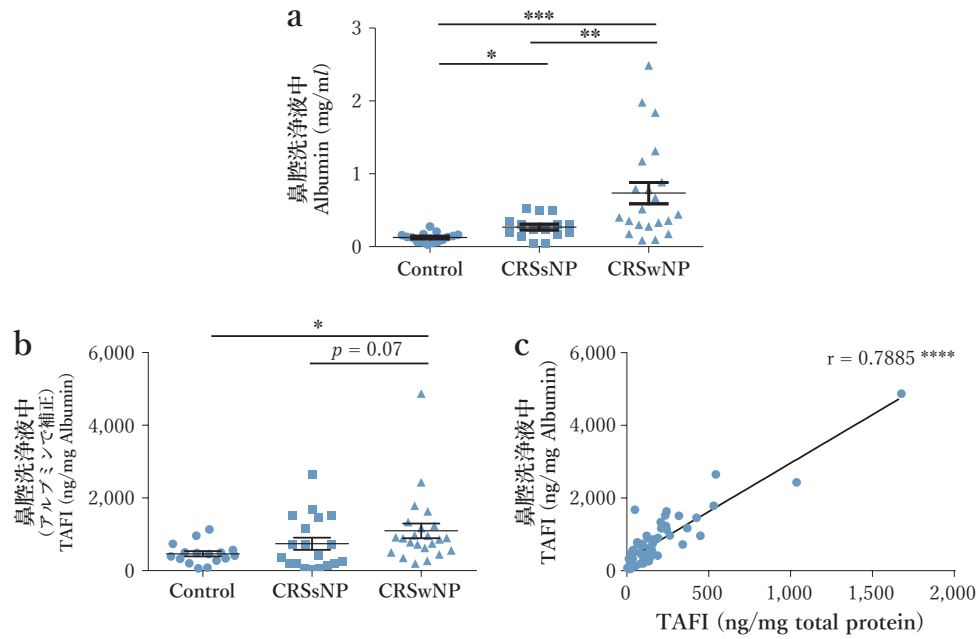


図4. 鼻腔洗浄液中のアルブミン濃度とアルブミン濃度補正によるTAFI濃度 (n=15-21) (●; control, ■; CRSsNP, ▲; CRSwNP) (文献12より).

(a) 鼻腔洗浄液中のアルブミン濃度. 慢性副鼻腔炎患者における鼻腔洗浄液中のアルブミン濃度は上昇している (n=15-21). (b) 鼻腔洗浄液中のTAFI濃度 (鼻腔洗浄液中のアルブミン値による補正). コントロール群と比較してCRSwNP群のTAFI濃度は有意に高い. (c) 鼻腔洗浄液中の総タンパクとアルブミン値により補正したTAFI濃度の相関. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , and \*\*\* $P < .001$  and \*\*\*\* $P < .0001$ .

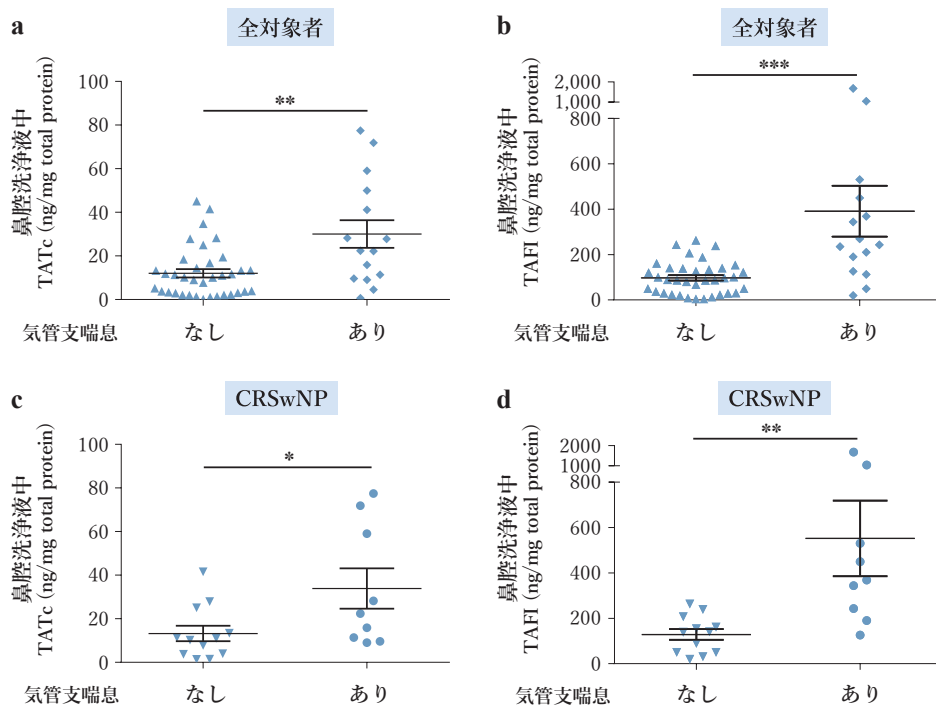


図5. 気管支喘息の合併による鼻腔洗浄液中のTATcとTAFI濃度の比較 (文献12より).

(a) 全対象者でのTATc濃度. (b) 全対象者でのTAFI濃度. (▲; 気管支喘息非合併症例, ◆; 気管支喘息合併症例 n=15-36). (c) CRSwNP群におけるTATc濃度. (d) CRSwNP群におけるTAFI濃度 (▼; 気管支喘息非合併症例, ●; 気管支喘息合併症例, n=9-12). \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , and \*\*\* $P < .001$ .

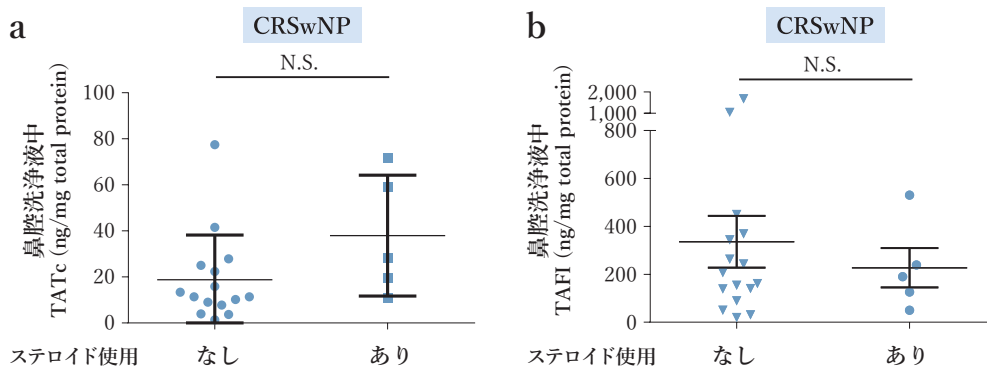


図6. CRSwNP群におけるステロイド使用状況による鼻腔洗浄液中のTATc (a) とTAFI濃度 (b) (n=5-11) (文献12より).

ステロイド使用では鼻腔洗浄液中のTATcとTAFI濃度には影響しない。

TATcとTAFIの差を検討したが、ステロイド投与群と非投与群では両因子とも差を認めなかった(図6)。気管支喘息を合併するCRS患者においてTATcとTAFIが上昇していたことは気管支喘息が鼻腔の炎症にも影響を与えていることを示唆している。

術前のCTで病変の程度(広がり)を示すLund-MackayスコアとTATcとTAFIの関連を調べたところ、TATcとLMスコア( $r=0.7062, p<0.0001$ ), そしてTAFIとLMスコア( $r=0.3856, p<0.05$ )には有意な相関を認めた。すなわち病変の広がりとはTATcとTAFIは相関することを示している。

鼻腔内のTAFI濃度上昇は、局所での炎症反応による血管外漏出が亢進しているためである。それでは気管支喘息合併のCRSwNPでTAFIが上昇していた理由は、血管外漏出がより亢進しているため(=アルブミン漏出が多いため)であろうか。CRSwNPの気管支喘息合併例と非合併例の鼻腔洗浄液中のアルブミン濃度を比較したところ、有意な差は認めなかった(図7)。この結果はCRSwNPにおいて鼻腔内でTAFIを上昇させる原因が血管漏出以外にもある可能性を示唆している。

生体内におけるTAFIは血清以外にも血小板の $\alpha$ 顆粒に含まれている<sup>9)10)</sup>。血小板は核を持たない細胞であるが、血小板はさまざまなサイトカインやケモカインを貯蔵しているため、炎症細胞としての機能を有する。トロンビンは気管支喘息の病態に関連しているが、トロンビンは血小板を活性化させ、活性化した血小板は気管支(炎症局所)へ遊走し、さ

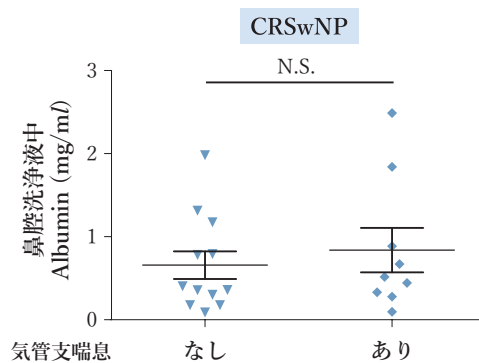


図7. CRSwNP群における気管支喘息合併の有無による鼻腔洗浄液中のアルブミン濃度の比較 (n=9-12) (文献12より).

気管支喘息合併症例と非合併症例では鼻腔洗浄液中のアルブミン濃度には有意な差はない。

らにトロンビンで活性化され、炎症反応を増強させる<sup>20)~22)</sup>。これらの反応は下気道のみならずアスピリン喘息の鼻茸にも生じていることが近年報告されている<sup>11)23)24)</sup>。本研究で鼻茸中のTATc(トロンビン)が上昇していたことは、トロンビンが血小板を活性化させることにより、血小板からのTAFI放出(=鼻茸中のTAFI濃度上昇)が生じている可能性を示唆している。以上の結果よりCRSwNPにおいて鼻腔内でのTAFI濃度を規定する因子として、炎症による血管外漏出のみならずトロンビンにより活性化された血小板からの放出が関連していると考えられた。気管支喘息を合併するCRSwNP患者においてこの傾向が顕著であることから、鼻茸形成には下気道炎症が重要であることが示唆された。

(意元 義政)



## 文献

- 1) Wagers SS, Norton RJ, Rinaldi LM, et al. Extravascular fibrin, plasminogen activator, plasminogen activator inhibitors, and airway hyperresponsiveness. *J Clin Invest.* 2004;114:104-111.
- 2) Shimizu S, Gabazza EC, Ogawa T, et al. Role of thrombin in chronic rhinosinusitis-associated tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy.* 2011;25:7-11.
- 3) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.**
- 4) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:584-592.e4.**
- 5) Jennewein C, Tran N, Paulus P, et al. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol Med.* 2011;17:568-573.
- 6) **Takabayashi T, Tanaka Y, Susuki D, et al. Increased expression of L-plastin in nasal polyp of patients with nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease. *Allergy.* 2019;74:1307-1316**
- 7) Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, et al. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem.* 1991;266:21833-21838.
- 8) Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995;270:14477-14484.
- 9) Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, et al. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood.* 2003;101:4844-4846.
- 10) Schadinger SL, Lin JHH, Garand M, et al. Secretion and antifibrinolytic function of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor from human platelets. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2523-2529.
- 11) Takahashi T, Kato A, Berdnikovs S, et al. Microparticles in nasal lavage fluids in chronic rhinosinusitis: Potential biomarkers for diagnosis of aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:720-729.
- 12) **Imoto Y, Kato A, Takabayashi T, et al. Increased thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144:1566-1574.e6.**
- 13) **Stevens WW, Ocampo CJ, Berdnikovs S, et al. Cytokines in chronic rhinosinusitis. Role in eosinophilia and aspirin-exacerbated respiratory disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192:682-694.**
- 14) Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, et al. Nasal polyposis: from cytokines to growth. *Am J Rhinol.* 2000;14:279-290.
- 15) Jarvis D, Newson R, Lotvall J, et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. *Allergy.* 2012;67:91-98.
- 16) Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinol Suppl.* 2012;3 p preceding table of contents, 1-298.
- 17) **Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy.* 2015;70:995-1003.**
- 18) Stevens WW, Peters AT, Suh L, et al. A retrospective, cross-sectional study reveals that women with CRSwNP have more severe disease than men. *Immunity, Inflamm Dis.* 2015;3:14-22.
- 19) Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000;407:258-264.
- 20) Idzko M, Pitchford S, Page C. Role of platelets in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135:1416-1423.
- 21) Metzger WJ, Sjoerdsma K, Richerson HB, et al. Platelets in bronchoalveolar lavage from asthmatic patients and allergic rabbits with allergen-induced late phase responses. *Agents Actions Suppl.* 1987;21:151-159.
- 22) Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, et al. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:1745-1753.
- 23) Laidlaw TM, Boyce JA. Platelets in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135:1407-14; quiz 1415.
- 24) Mitsui C, Kajiwara K, Hayashi H, et al. Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:400-411.



## 5 - 5

# 気道上皮におけるレチノイン酸のtissue plasminogen activator調節と治療, バイオマーカーへの応用の可能性

## サマリー

アスピリン不耐症 (aspirin exacerbated respiratory disease; AERD) 患者は、易再発性の鼻茸が特徴であり、治療に難渋する。慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSwNP) の鼻茸ではIL-13濃度が高く、tissue plasminogen activator (tPA) の発現が低い。AERDの鼻茸では、IL-13濃度はCRSwNPの鼻茸と同じく高いが、tPAはさらに低い。これは、AERD鼻茸中のレチノイン酸 (retinoic acid; RA) 濃度が低いことによる。RAはビタミンAの活性化代謝産物であり、正常ヒト気管支上皮細胞 (normal human bronchial epithelial cells; NHBE) を刺激することでtPA産生を誘導した。IL-13との共刺激では、IL-13によるtPA産生抑制を回復させた。これらのことからRA濃度の低下がAERD鼻茸中のtPA発現減少に関与し、RAの補充による治療応用の可能性が示唆された。

## はじめに

我々は、慢性副鼻腔炎に伴う鼻茸は過剰なフィブリン沈着によって形成されていることを明らかにした。フィブリンの沈着は上皮細胞からのtPAが減少し、凝固系と線溶系のバランスが凝固系に傾いていることによると考えられ、tPA産生の抑制にはIL-13が原因だとしている<sup>1)</sup>。AERDに伴う副鼻腔炎は、手術を行っても高率に鼻茸を再発する重篤かつ難治性の慢性副鼻腔炎と認識されており<sup>2)</sup>、本邦での好酸球性副鼻腔炎に含まれる。このAERD鼻茸中tPAはCRSwNPよりも有意に低いことが報告されていたが、鼻茸中IL-13濃度には差がなかったため<sup>3)</sup>、Th2サイトカイン以外にもtPAを抑制する原因があるのではないかと考えていた。

レチノイン酸 (retinoic acid; RA) は、ビタミンAの活性化代謝産物で、視力、胎児の成長、細胞分化、上皮細胞の統合性維持および免疫機能などヒトの生物学的活動には欠かせない微量栄養素である<sup>4)~5)</sup>。たとえばRAの作用として、粘膜の繊毛機能を改善したり<sup>6)</sup>、ヒト2型innate lymphoid cells (ILC2s) からの調節性サイトカインIL-10分泌を増加させ、炎症性CD4+T細胞や、ILC2s機能を抑制したりする<sup>7)</sup>。

RAは細胞膜に可溶性で、ホルモン結合タンパクとともに血中を循環しており、核内受容体と結合する。核内受容体はRARとRXRに大別され、それぞれ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ のサブタイプからなる。RAは血管内皮細胞や線維芽細胞、星状細胞、Hela細胞においてtPAを誘導することが報告されている<sup>8)</sup>。本研究は、AERDの鼻茸中でよりtPAが減少する機序としてRAが関与しているかどうかを検討した。

## 方法

### 検体

CRSwNPおよびAERD患者から鼻茸組織を採取し、凍結破碎後T-PER (Thermo, Waltham, MA) を用いて懸濁液を作成した。鼻腔内から行う下垂体腫瘍手術時に採取した鈎状突起組織を正常コントロールとして用いた。

### ELISA

ELISAを用いて組織懸濁液のRA濃度 (Cusabio, Wuhan, China), tPA濃度 (Assaypro, St. Charles, MO), d-dimer濃度 (Diagnostica Stago, Asnieres-Sur-Seine, France) を測定した。

## 免疫組織化学

鼻茸組織をパラフィン包埋し、4  $\mu\text{m}$ の切片を作成した。免疫組織化学は、ウサギ抗RA受容体 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (retinoic acid receptor; RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) を1次抗体 (ab188000, ab53161, ab217004, Abcam, Cambridge, UK), ウサギポリクローナルIgGを2次抗体 (ab171870, Abcam, Cambridge, UK) として行った。全組織中の0~25%に染色がとどまっている状態をスコア0 (low expression), 26~50%の場合をスコア1 (mild expression), 51~75%が陽性の場合スコア2 (moderate expression), 76~100%が染色される場合をスコア3 (high expression) とした。

## リアルタイムPCR

正常ヒト気管支上皮細胞 (normal human bronchial epithelial cells; NHBE) (Lonza, Walkersville, MD) を all trans RA (ATRA, SIGMA, St. Louis, MO) と IL-13 (Peprtech, Rocky Hill, NJ) にて24時間刺激した。細胞を回収しRNAを抽出後、cDNAを合成してリアルタイムPCRによってtPA発現を解析した。また、上清中のtPA濃度をELISAにて測定した。

## 統計学的検討

コントロールとCRSwNP, AERD鼻茸の比較はMann-Whitney testで、2群間の相関解析はSpearman rank correlationを用いて検討した。

## 結果

### 鼻茸中のRA, tPA, d-dimer 濃度

鼻茸中のRAを測定すると、AERD鼻茸ではコントロールおよびCRSwNPに比べ有意に低かった ( $p < 0.05$ , 図1)。同じ検体を用いてtPAのmRNAを測定すると、AERD鼻茸ではコントロールとCRSwNPより有意に低かった ( $p < 0.01$ , 図2a)。tPAタンパクは、AERD鼻茸中でコントロールよりも有意に低いが、CRSwNP鼻茸もコントロールよりも有意に低かった ( $p < 0.01$ , 図2b)。これらの組織中のtPAタンパクとRAを比較すると高い正の相関を示していた ( $r = 0.6426$ ,  $p < 0.001$ , 図2c)。線溶系のも

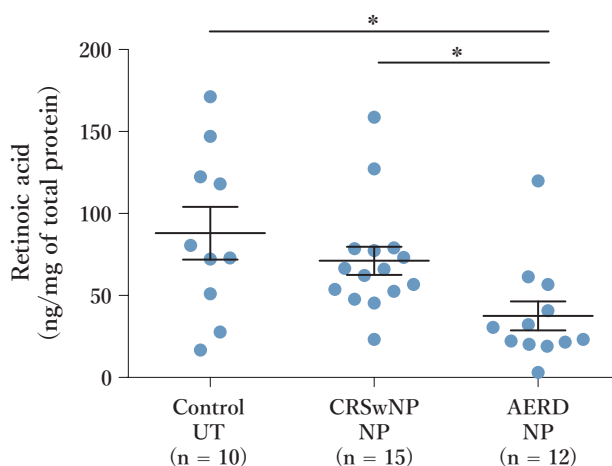


図1. 鼻茸中のRA濃度。

コントロール鉤状突起 (control UT), CRSwNP鼻茸 (CRSwNP NP), AERD鼻茸 (AERD NP) の組織中RA (retinoic acid) 濃度をELISAにて測定した。\* $p < 0.05$ 。

う一つのマーカーとして、組織中のフィブリン分解生成物のd-dimer濃度を測定したところ、AERD鼻茸では、コントロール、CRSwNP鼻茸と比べて有意に低かった ( $p < 0.01$ , 図3a)。組織中のd-dimerとRAも正の相関が認められた ( $r = 0.5278$ ,  $p < 0.05$ , 図3b)。これらのことから、RA濃度が低いためtPA産生が抑制され、線溶系の働きが低下してフィブリン分解産物のd-dimerが少なくなっていることが考えられた。

### RAによるNHBE細胞からのtPA産生

CRSwNP, AERDの鼻茸ではTh2環境下にあり、IL-13発現が高い。そこで、tPA誘導におけるIL-13とRAの関係を調べた。RAの活性化型である all trans RA (ATRA)<sup>9)</sup>で、NHBE細胞を刺激すると無刺激のコントロールに対して、0.1  $\mu\text{M}$ で7倍、1  $\mu\text{M}$ で15倍強くtPAのメッセンジャーRNA発現を誘導した ( $p < 0.01$ , 図4a)。一方、IL-13でNHBE細胞を刺激すると、濃度依存的にtPA mRNA誘導は抑制され、10 ng/mlと100 ng/mlではおよそ60%の抑制が認められた ( $p < 0.01$ , 図4b)。ATRA刺激後の上清中tPAタンパクを測定したが、mRNAの誘導と同様に有意に強く誘導されていた (data not shown)。IL-13刺激後の上清中tPAタンパクは有意に抑制されていた (data not shown)。次に、ATRA (1  $\mu\text{M}$ ) と

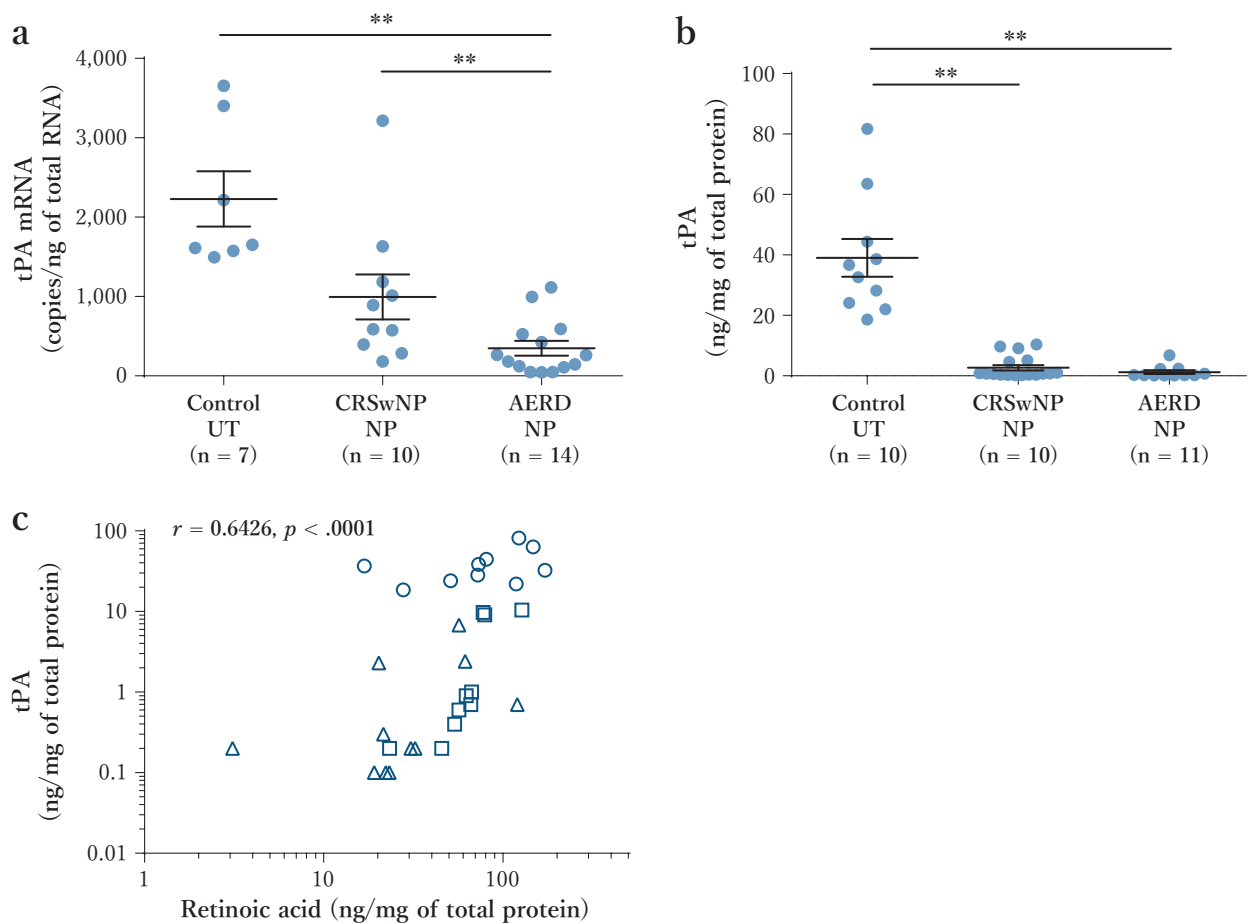


図2. 鼻茸中のtPA発現.

Control UT, CRSwNP NP, AERD NP組織中のtPAメッセンジャーRNA発現をreal time PCRにより測定した(a). それぞれの組織中のtPAタンパクをELISAにより測定した.  $**p < 0.01$ . (b). それぞれの組織中のtPAとRAをELISAにより測定し, 相関関係を示した(c). Control UT (○), CRSwNP NP (□), AERD NP (△).

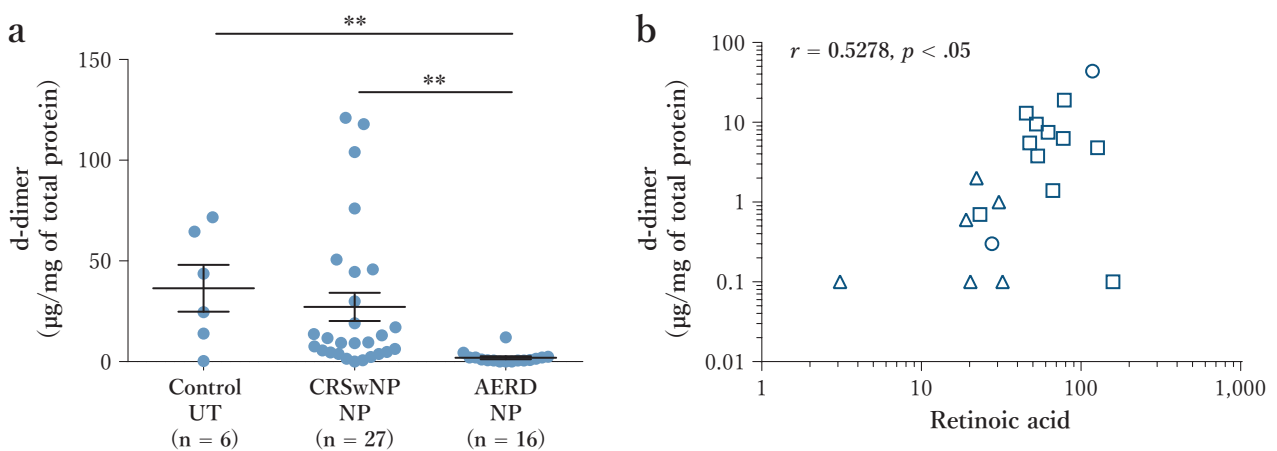


図3. 鼻茸中のd-dimer濃度.

Control UT, CRSwNP NP, AERD NPのそれぞれの組織中のd-dimerタンパクをELISAにより測定した.  $**p < 0.01$ . (a) それぞれの組織中のd-dimerとRAをELISAにより測定し, 相関関係を示した(b). Control UT (○), CRSwNP NP (□), AERD NP (△).

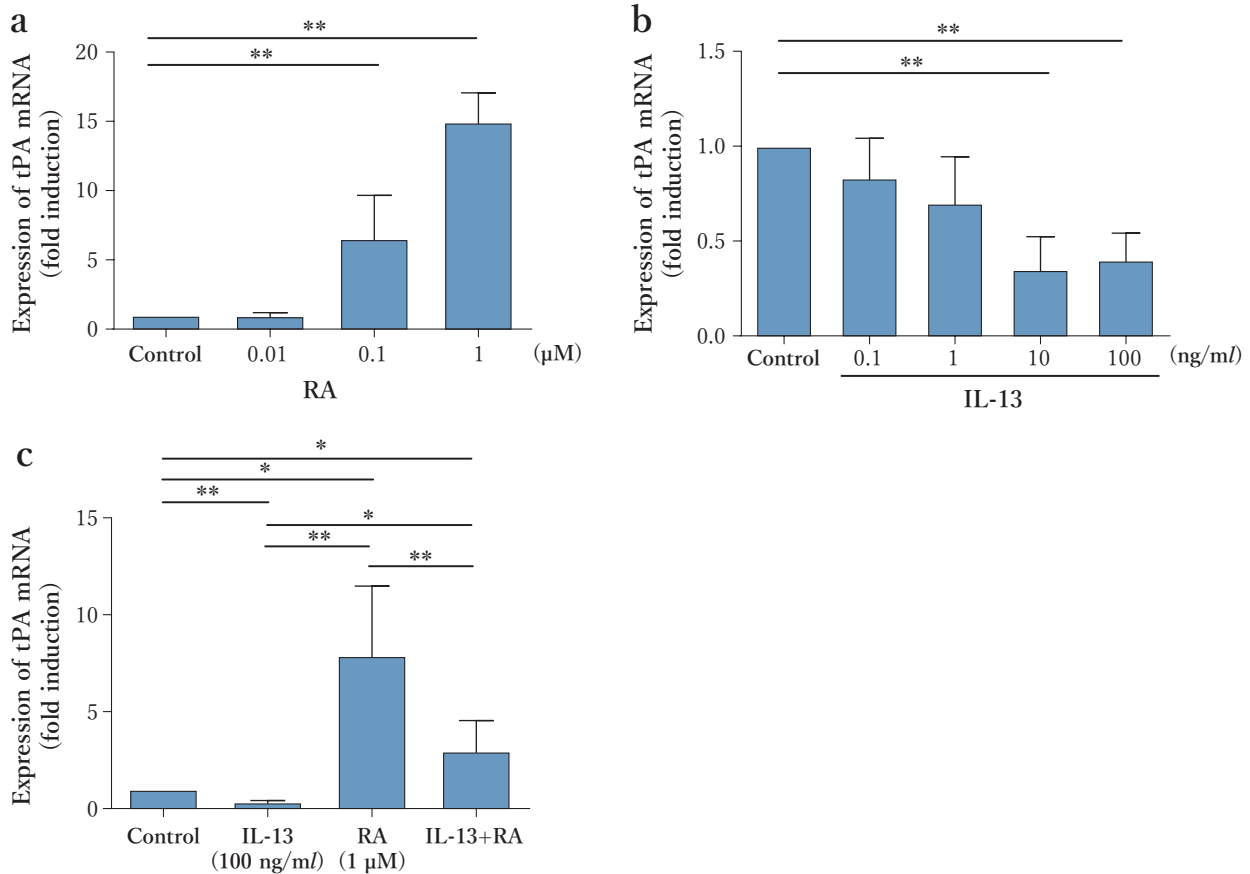


図4. NHBE細胞におけるtPAの誘導.

NHBE細胞をRA, IL-13, 共刺激により24時間刺激し, 回収した細胞からtPAのメッセンジャーRNAをリアルタイムPCRにて測定した(a~c). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

IL-13 (100 ng/ml) とを共刺激したところ, IL-13によって抑制されたtPA発現が2倍以上に増加した( $p < 0.01$ , 図4c). ATRAの受容体であるRA受容体にある3つのサブタイプ全てに対するアンタゴニストであるBMS493で処理すると, RAによるtPAのmRNA発現はBMS493濃度依存的に抑制された(data not shown). そこで, RA刺激がどのRARサブタイプと関連しているのか調べた.

### 鼻茸中 RAR $\gamma$ の免疫組織化学

RARは $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ のサブタイプからなり. ラットでは, RAR発現はRAR濃度によって影響を受けることが報告されている<sup>9)</sup>. そこで, 鼻茸組織中の3種類のRARをそれぞれ免疫組織学的に染色し, 比較検討した. すると, RAR $\gamma$ は, コントロールとCRSwNPで発現が高いが, AERDではほとんど発現していなかった(図5a~d). 一方で, RAR $\alpha$ とRAR $\beta$ については,

コントロール, CRSwNP, AERDいずれも発現を認めず, 3群間で有意差を認めなかった(data not shown).

### 考察

本研究は, AERD鼻茸中tPAとRAの関係を調べるために行った. その結果, AERD鼻茸では, IL-13濃度はCRSwNPの鼻茸と同レベルに高いにもかかわらずtPAがより低いのは, AERD鼻茸ではCRSwNP鼻茸に比べてRAが有意に低いことによることがわかった. RAは正常NHBE細胞を刺激することでtPA産生を誘導し, IL-13との共刺激ではIL-13による抑制を回復してtPA産生を誘導した. RA濃度の低下がAERD鼻茸中のtPA発現減少の本態であった. このことがAERDの難治性にも関わることはないかと考えている(図6).



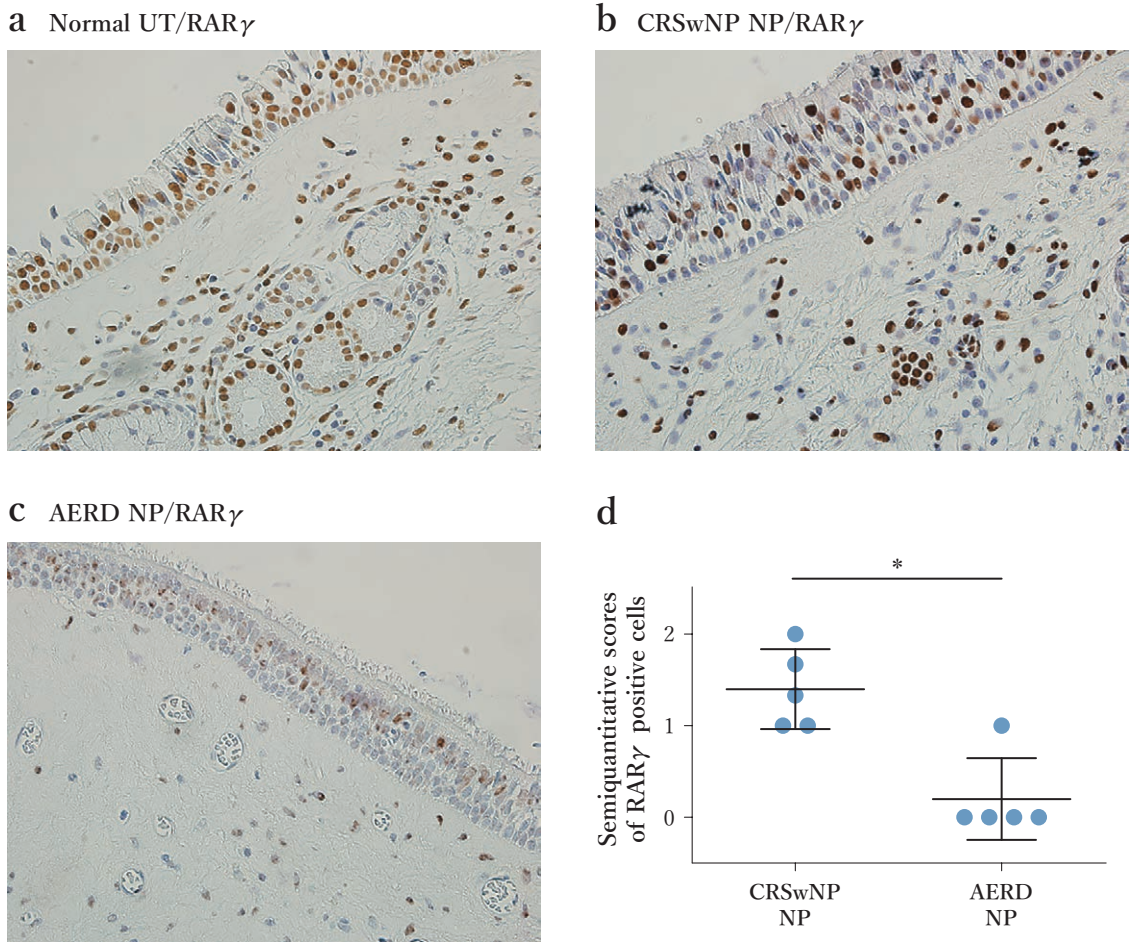


図5. 鼻茸中 RAR $\gamma$ の免疫組織化学.

Control UT, CRSwNP NP, AERD NPの組織中のRAR $\gamma$ に対する免疫組織染色を行った(a~c). 染色状態をスコアによって半定量した(d). \* $p < 0.05$ .

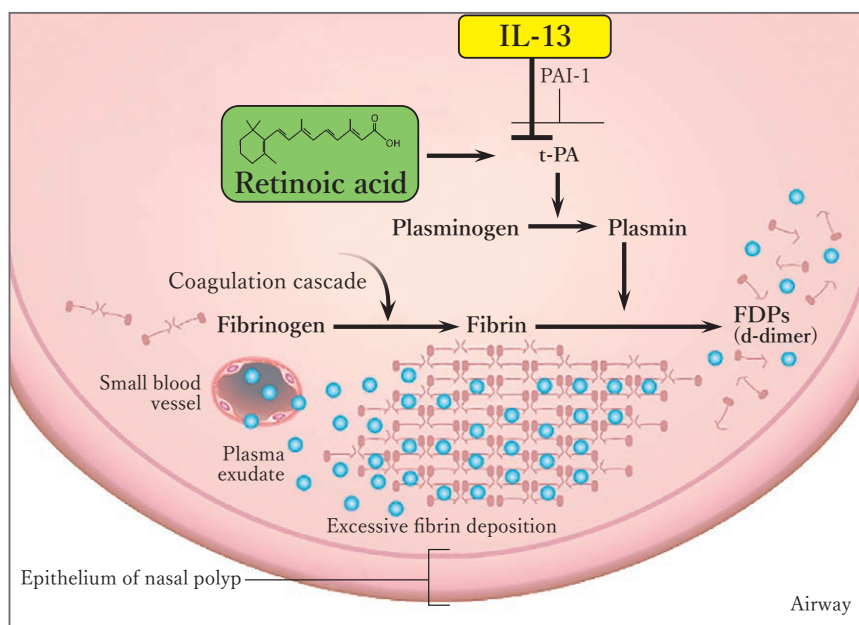


図6. RAと鼻茸中のtPA産生.



今回RAを選定したのは、tPA産生誘導物質を探索した結果である。RA、デキサメタゾン、エストロゲン、ビタミンD3などのホルモン、酪酸、トリコスタチンAなどのヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-13、IFN $\gamma$ の炎症性サイトカイン、LPS、polyI:CのToll様受容体のリガンドなど23種類をNHBE細胞を用いて検討した。その結果、最もtPA産生誘導の強かったのは、今回用いたRAであった (data not shown)。

血管内皮細胞は、産生したtPAをWeidel beiden粒子の中に一旦蓄積し、特定の刺激を受けるとtPAを放出するメカニズムを持っている<sup>10)</sup>。血管塞栓発生の際には、thrombin, factor Xa, bradykinin, desmopressin, substance P, histamineやepinephrineなどの刺激によって血管内皮細胞から一気にtPAが放出される。同様のことが気道上皮細胞においても起こるのか調べてみた。気道上皮細胞をRA (1  $\mu$ M)で刺激して気道上皮細胞内と培養上清中の両方のtPAを測定した。両者を合わせた濃度を全tPA産生濃度、上清中のものを分泌濃度としたところ、分泌濃度は全産生量のおよそ80%であった (data not shown)。この80%は、無刺激とIL-13 (100 ng/ml) 刺激においても同じ値であった。すなわち、刺激の有無、刺激がtPAの誘導性か抑制性かにかかわらず、気道上皮中では、蓄積の仕組みはなく、産生されたtPAのうち80%が自動的に上清中に分泌されることがわかった。以上のことは、鼻粘膜上皮からのtPA誘導が回復できれば、分泌のための刺激なしに直接tPAが分泌されるため、治療応用には有利なことを示している。

過去の報告では、コントロール鉤状突起組織中と比べてCRSwNP鉤状突起ではtPA産生は少なかった<sup>1)</sup>。しかし、今回コントロールとCRSwNPの鼻茸からの擦過細胞を培養液中で増殖させてtPA産生を測定すると両者からtPAの産生が確認され違いはなかった (data not shown)。このことから、鼻茸の上

皮細胞そのものが元来tPA産生能を欠いているのではなく、Th2サイトカインなどの微小環境の変化により影響を受けていることが主であると考えられ、その微小環境が正常化するとtPA産生が回復するものと考えられる。

恒常的に上皮の維持に必要とされるRAが少ないという微小環境が鼻茸中で生じている理由はいまだ不明である。しかしtPA抑制性のIL-13が多いという微小環境は、RA投与によりキャンセルされ得ることが示唆された。これまで、CRSwNPやAERD鼻茸の治療は経口ステロイド薬や、手術療法が主であった。本研究のRAはビタミンAの活性化代謝物であり、RA自体は毛嚢炎の治療に用いられている。ビタミンAおよびその代謝物であるレチノイドは上皮の維持に必須ものであることから長期使用も問題は少ないと考えられ、治療応用が期待できる。

好酸球性副鼻腔炎の診断基準や重症度分類は、JESREC studyと臨床データによるが、より客観的なバイオマーカーの探索もなされている。血清中ペリオスチンなどが候補となっているが<sup>11)</sup>、組織中RAも臨床マーカーになり得るかもしれない。現在簡易な組織中RA測定法の確立を目指している。

## 結論

RAは、*in vitro*でNHBE細胞からのtPAの誘導薬であり、CRSwNPより重症型と考えられるAERD鼻茸組織において減少していた。AERD鼻茸では、線溶系のtPAがより低く抑えられてフィブリン沈着が強く生じている。RAにてNHBE細胞を刺激することでIL-13によるtPAの抑制を回復できたことから、RAを用いた鼻茸の縮小や術後の再発予防を検討する臨床応用を考えている。本研究の成果は現在投稿中である<sup>12)</sup>。

(坂下 雅文)

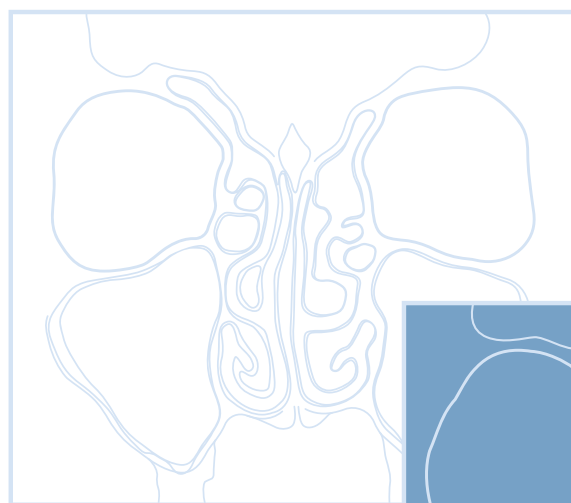
## 文献

- 1) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. **Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.
- 2) Stevens W, Buchheit K, Cahill KN. Aspirin-exacerbated diseases: Advances in Asthma with nasal polyposis, urticaria, angioedema, and anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15:69.
- 3) Stevens WW, Ocampo CJ, Berdnikovs S, et al. **Cytokines in chronic rhinosinusitis role in eosinophilia and aspirin-exacerbated respiratory disease.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192:682-694.
- 4) Reichrath J, Lehmann B, Carlberg C, et al. Vitamins as hormones. *Horm Metab Res.* 2007;39:71-84.
- 5) Unal M, Tamer L, Pata YS, et al. Serum levels of antioxidant vitamins, copper, zinc and magnesium in children with chronic rhinosinusitis. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;18:189-192.
- 6) Hwang PH, Chan JM. Retinoic acid improves ciliogenesis after surgery of the maxillary sinus in rabbits. *Laryngoscope.* 2006;116:1080-1085.
- 7) Morita H, Kubo T, Ruckert Bm, et al. Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:2190-2201.
- 8) Kooistra T, Schrauwen Y, Arts J, et al. Regulation of endothelial-cell t-PA synthesis and release. *Int J Hematol.* 1994;59:233-255.
- 9) Belloni PN, Garvin L, Mao CP, et al. Effects of all-trans-retinoic acid in promoting alveolar repair. *Chest.* 2000;117:235S-241S.
- 10) Rosnoble C, Vischer UM, Gerard RD, et al. Storage of tissue-type plasminogen activator in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1796-1803.
- 11) Ninomiya T, Noguchi E, Haruna T, et al. **Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinitis with nasal polyps.** *Sci Rep.* 2018;8:11450.
- 12) Sakashita M, Takabayashi T, Imoto Y, et al. **Potential regulatory and therapeutic role of retinoic acid in fibrin deposition within nasal polyps: Particular relevance in aspirin-exacerbated respiratory disease (投稿中)**



## 第 6 章

# 好酸球







## 6-1

第1章

第2章

第3章

第4章

第5章

第6章

第7章

第8章

第9章

第10章

第11章

# 好酸球性副鼻腔炎における好酸球の細胞死

## サマリー

好酸球性副鼻腔炎は生体にとって望まれない免疫の過剰反応であり、副鼻腔粘膜のみならず篩骨洞などの副鼻腔内にも好酸球の選択的な集積を伴う。このような局所では、好酸球の活性化による顆粒蛋白の放出によって組織障害が起こるが、好酸球は細胞外トラップや顆粒を放出する能動的な細胞死（EETosis）を来していることがわかってきた。EETosisは粘液の粘性を増強し、クリアランス障害、シャルコー・ライデン結晶の形成などに寄与しており、炎症増幅に関与している。好酸球性副鼻腔炎の病態を理解するうえで、好酸球の運命決定機構を理解することが重要であり、将来的な新規治療にもつながると考えられる。

**略語** NETs : Neutrophil extracellular traps, ETs : Extracellular traps, CLC : Charcot-Leyden Crystal, EETosis : Eosinophil extracellular trap cell death, ETosis : Extracellular trap cell death

## はじめに一好酸球の役割とは

好酸球（eosinophil : エオシン好性細胞）の名前は、酸性エオシンで顆粒が赤く染色されることに由来している。1879年に簡便で再現性の良い染色法を確立したエールリッヒによって初めて記載され、これが学問的な好酸球研究の出発点になっている<sup>1)</sup>。

多くのアレルギー疾患の炎症部位で、他の細胞に比べて好酸球は著しく局所に集積する。1980年頃から、好酸球を特徴づける顆粒蛋白の細胞障害性や大量の活性酸素産生能が明らかとなり、寄生虫感染やアレルギー疾患といった2型免疫反応における「エフェクター細胞」として認知されるようになっていく。

実際、好酸球は慢性炎症やリモデリング形成において主要な役割を担っているが、単なる炎症細胞というわけではない。定常状態でも好酸球は血中の100倍ほどが皮膚、肺、腸管などの組織に存在するとされ、その生理的な役割は十分わかっていない。近年の研究成果は、サイトカイン・増殖因子、脂質メディエーターの産生細胞として、他の細胞をコントロールし、多面的な役割を發揮する免疫細胞として理解がなされるようになった<sup>2)</sup>。好酸球側から換

言すれば、「生体の恒常性を保とうとしている」ということで、好酸球の役割とは、どのようなコンテキスト（文脈）で語られたかということに過ぎない。

## 好酸球の組織集積

骨髄における好酸球の分化は、IL-5、IL-3、GM-CSFといったサイトカインによって誘導され、骨髄前駆細胞から成熟すると血管内へ移行する<sup>3)</sup>。流血中の好酸球の半減期は、定常状態で1日ほどだが、活動性の炎症があると1時間ほどで組織に集積することができる。IL-5は、好酸球にかなり選択的な作用を有するサイトカインで、IL-5トランスジェニックマウスは著明な好酸球増多を呈し、ヒトでもIL-5産生過剰状態によって好酸球増多症候群を呈する。分化だけでなく生存延長作用を有するほか、低濃度でもプライミング（刺激に対する反応性や細胞機能を亢進させる）作用により、好酸球の接着や脱顆粒などさまざまな機能を正に調節している。IL-5の主要な産生細胞として、抗原提示を必要とする獲得免疫系ではTh2リンパ球、上皮障害などで発動する自然免疫機構においてはtype 2 innate lymphoid cell（ILC2）と呼ばれるリンパ球様細胞が重要である。

現在、IL-5/IL-5受容体をターゲットとした分子標的治療が開発され、難治性喘息や好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA), Churg-Strauss syndrome) の治療に利用されており、著明に末梢血好酸球を減少させ、発作頻度の抑制や経口ステロイド減量効果を有している。

好酸球の組織遊走過程では、血管内皮へのインテグリンを介した接着、細胞間隙の通過、組織への遊走反応が連動して起こる。好酸球の遊走には、細胞表面受容体のケモカイン受容体CCR3が重要であり、選択的な好酸球集積に寄与している。実際、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸抽出液に対する好酸球の遊走は、CCR3をブロックすることによって著明に抑制される<sup>4)</sup>。CCR3の発現は、粘膜免疫を調節する因子として重要なレチノイン酸によって増加し、その機能も増強する<sup>5) 6)</sup>。レチノイン酸は好酸球のICAM-1発現を増加させるほか<sup>7)</sup>、強力なアポトーシス抑制因子でもある<sup>8)</sup>。好酸球の接着や遊走は細胞内シグナルによって制御され<sup>9)</sup>、アディポサイトカイン<sup>10) 11)</sup>、脂肪酸<sup>12) 13)</sup>、核内受容体リガンド<sup>14)</sup>などの細胞外因子によって調節されている。

CCR3のリガンドとして、eotaxin-1 (CCL11) や RANTES (CCL5) が知られている。しかし近年では、IL-13に誘導されるeotaxin-3 (CCL26) の重要性が明らかになってきている<sup>15)</sup> (図1)。好酸球性副鼻腔炎患者において、組織中の好酸球は、血清中のIL-5やeotaxin-1ではなく、むしろeotaxin-3によって精度良く予測できる<sup>15)</sup>。また、気道内腔の好酸球はCCL4と良く相関しているが、活性化した好酸球がCCL4を産生することでさらに好酸球を遊走させている可能性がある<sup>16)</sup>。

そのほか、種々の脂質メディエーターにも遊走活性を有するが、中でもプロスタグランジンD2は好酸球に強い遊走活性を示す。その受容体であるCRTH2は、好酸球やTh2リンパ球、好塩基球、ILC2などアレルギーに関連する細胞に選択的に発現することから、治療ターゲットとしても注目されている<sup>17)</sup>。基本的に組織の好酸球は流血中から供給されるが、近年、組織に常在するフェノタイプの好酸球の存在を示す報告や<sup>18)</sup>、一部は組織で分化しているという研究結果もある。

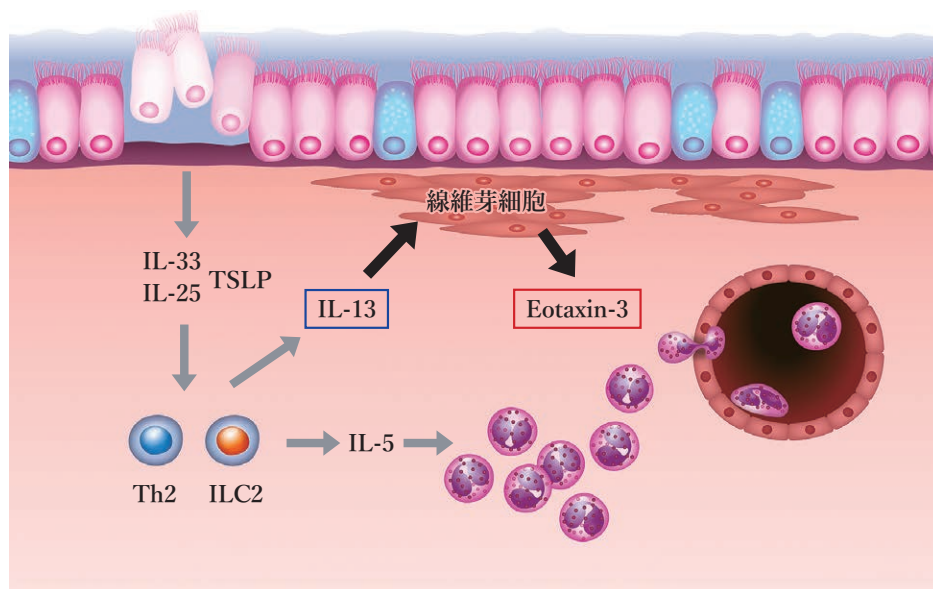


図1. 好酸球の組織集積におけるIL-13とeotaxin-3.

好酸球は骨髄で産生され、血中から組織に移行する。血管外へ遊走する場合、上皮由来のサイトカインやケモカインにより活性化されたTh2細胞やILC2は、IL-13を産生することで気道上皮や線維芽細胞から好酸球選択的な遊走因子であるeotaxin-3を産生させる。遊走した好酸球はIL-5によってさらに活性化される。

## 好酸球の活性化と脱顆粒

好酸球は好中球と比較すると貪食能が弱く、エフェクター細胞としての機能の中で最も重要なのが顆粒内容の放出(脱顆粒)である。成熟した好酸球は200個ほど、脂質二重膜で覆われた直径約0.7~1 μmの顆粒を有している<sup>19)</sup>。顆粒は強い細胞障害性を持つ4種類の特異的な蛋白を有しており、カチオン性・塩基性を持ち好酸球の染色性を決定している。

Major basic protein (MBP) は顆粒の中心部に局在し、多くのアルギニン残基によって強い塩基性を有する。細胞膜の透過性を亢進させることで細胞を障害するほか、血小板やマスト細胞の活性化にも作用する。Eosinophil peroxidase (EPO/EPX) はhaloperoxidaseであり、ハロゲン化物(塩化物や臭化物など)をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と共働して酸化し、次亜塩素酸などを産生することで細菌や寄生虫の殺傷に寄与する。Eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil-derived neurotoxin (EDN) はRNase活性と細胞障害性を有しウイルスなどに対する生体防御に寄与するほか、EDNはalarminとしても働く。この他にも顆粒には、数十種類ともいわれるサイトカインや酵素が貯蔵されている。

よく知られた脱顆粒誘導因子として、高濃度のIL-5、血小板活性化因子(PAF)や補体成分(C5aなど)、固相化された免疫グロブリン(IgA, IgG)などがある。脱顆粒反応は接着分子(特にβ2インテグリン)に大きく依存している。流血中では脱顆粒がほとんどおこらないが、これはトリガーとなる因子の濃度が組織より低いことだけでなく、足場となるインテグリンとの結合がないことも重要と考えられる。

他の有核細胞と同様に、好酸球は新たな蛋白合成と小胞体-ゴルジ体を介した分泌経路も有している。しかし、組織好酸球の寿命は短く(長くて1週間程度)、迅速に組織に移動できることから、あらかじめ準備されている蛋白を放出するほうが効率的である。好酸球が顆粒蛋白を放出する仕組みは詳細に検討されており、削り取り脱顆粒(piecemeal degranulation)、エクソサイトーシス(exocytosis)、細胞崩壊(cytolysis)に分類される<sup>20)</sup>。削り取り脱

顆粒では、顆粒に融合する小胞に選択的に蛋白を取り込んで、細胞膜まで輸送している。これは免疫調節細胞としての好酸球を説明するうえで重要な機構と考えられる。エクソサイトーシスは開口分泌とも呼ばれ、個々の顆粒が細胞膜と融合することで顆粒内容物が非選択的に放出される。エクソサイトーシスは、より活性化された状態と考えられているが、生体内で観察されることはまれである。細胞崩壊は、崩壊型脱顆粒(lytic degranulation)などとも呼ばれ、文字通り細胞死の結果として起こる脱顆粒である。

## 炎症部位における好酸球の崩壊型脱顆粒

成熟した好酸球はそれ以上分裂・増殖することなく、ターンオーバーからみても消費される性格の細胞といえる。組織に移行しない好酸球は網内系で処理されるが、組織の好酸球は粘膜から気道や消化管内腔などに遊出するか、組織で一生涯を終える。しかし、病理学的にアレルギーや寄生虫感染の炎症組織でアポトーシスを来す好酸球はまれで、マクロファージに貪食された形跡もあまり認められない。一方で、崩壊を来して細胞外に顆粒そのものが遊離した好酸球像は、古くは1800年代から繰り返し観察されてきた<sup>21)</sup>。電子顕微鏡での観察では疾患によって10~90%の好酸球が崩壊型脱顆粒の形態を取る<sup>22) 23)</sup>。好酸球の崩壊型脱顆粒の本態は長年の謎だったが、近年の研究から単なるネクローシスではなく、過剰な活性化によっておこるプログラム細胞死であることが明らかになってきた。

## Extracellular traps と ETosis

好中球は菌体成分などによって活性化されると、核膜・細胞膜が崩壊して網目状のクロマチン繊維を放出する。これはneutrophil extracellular traps (NETs, 好中球細胞外トラップ)と呼ばれ、その粘性によって周囲の病原体を捕捉するだけでなく、NETsの構成成分である顆粒蛋白やヒストンなどによって殺菌にも働く自然免疫機構である<sup>24)</sup>。この細胞死は、アポトーシスやネクローシスと異なるプログラム細胞死としてneutrophil extracellular trap



cell death (NETosis) と呼ばれている<sup>25)</sup>。同様の細胞外トラップを形成する細胞死は他の免疫細胞にも認められることから、総称して extracellular trap cell death (ETosis) と呼ぶ<sup>26)</sup>。

好酸球の崩壊型脱顆粒は、好中球の NETosis とほぼ同様の事象であり、迅速に核膜・細胞膜が崩壊して繊維状のクロマチン (細胞外トラップ) が放出されることから、好酸球では EETosis と呼んでいる<sup>27)</sup>。ただし、NETosis と異なり、EETosis の過程では、顆粒の崩壊がほとんど起こらないため、顆粒はそのままの形態と内容を保って細胞外に放出される<sup>28)</sup>。興味深いことに、少なくとも一部の顆粒は、細胞外での二次刺激でも顆粒内容が放出され、クラスター爆弾のように働きうる<sup>29)</sup>。

## 細胞外トラップとアレルギーの病態

EETosis における最大の特徴はその最終的な形態にあり、アポトーシスと異なり全長2メートルといわれる DNA が断片化されずネット状に放出される。EETosis を起こした細胞は find-me シグナルをほとんど出さずに迅速に崩壊するため、顆粒や細胞外トラップは貪食から逃れて組織に残存する<sup>21)</sup>。細胞外に放出されたヒストンや DNA は免疫を賦活化し、組織障害、凝固反応の促進など多彩な活性を有する。細胞外トラップは抗微生物活性を有し、本来の役割は病原体に付着して、その拡散や移動を防ぐための自然免疫機構である<sup>21)</sup>。

しかし、好酸球が望まれない部位で過剰な EETosis を来すことが種々のアレルギー疾患の病態に関与している<sup>30)</sup>。好酸球性副鼻腔炎や好酸球性中耳炎は再発率が高く、難治性であることが多いが、これらの疾患では、ニカワ状と表現される粘稠度の高い粘液 (好酸球性ムチン) が副鼻腔や中耳に貯留する<sup>31)</sup>。この好酸球性ムチンは、好酸球の細胞外トラップを大量に含有することによって高い粘性が形成され、分泌物のクリアランスを阻害している<sup>32)33)</sup>。好酸球の細胞外トラップは、好中球のそれと比較して安定で太い構造を取っており、高い粘性の原因になっている<sup>28)</sup>。同様に、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症の気道内に粘液栓が形成されるが、粘液栓に

は大量の好酸球由来の細胞外トラップが存在している<sup>34)</sup>。管腔内の好酸球増多、脱顆粒と EETosis は重症喘息でも問題になり<sup>35)</sup>、これらのコントロールは今後の治療ターゲットになると考えられる。なお、ミトコンドリア DNA からなる好酸球細胞外トラップを主張する研究グループもあるが、その意義は疑問が呈されている<sup>30)36)37)</sup>。

## シャルコー・ライデン結晶の形成と EETosis

シャルコー・ライデン結晶 (Charcot-Leyden crystal; CLC) は、両錐型六角形の特徴的な結晶である。顕微鏡の発達により、1853年、シャルコーらによって白血病死患者の脾臓や心臓にはじめて発見され、のちにライデンが喘息患者の痰にも見出したことからこの名がある<sup>38)</sup>。CLC は好酸球性炎症を示唆する古典的な病理所見として知られており、多くの疾患の組織や分泌液中で認められる (表1)。

当初、CLC を形成する蛋白は、リゾホスホリパーゼ活性と糖結合性蛋白の性質を持つとされ、CLC 蛋白 (Charcot-Leyden crystal protein) や好酸球リゾホスホリパーゼと呼ばれていた。しかしその後、アミノ酸配列、3D 構造、遺伝子解析などによって既知のホスホリパーゼとの関連は認められず、S 型レクチンであるガレクチンスーパーファミリーとの相同性が見いだされ、CLC 蛋白は galectin-10 であることが判明した。galectin-10 はマウス好酸球では認められず、霊長類の好酸球が有している。ヒトでは好塩基球や制御性 T 細胞も発現がみられるが、好酸球に大量に含まれており、好酸球の蛋白のうち実に 7~10% を占める<sup>39)</sup>。

CLC は好酸球性炎症と関連して出現するが、CLC が形成されるメカニズムはよくわかっていなかった。そこで我々は、EETosis が CLC 形成に関与していることを想定し、好酸球性炎症疾患の組織を電子顕微鏡などで詳細に検討した。すると、病理形態学的に CLC は EETosis に伴って出現することがほとんどで、好酸球性副鼻腔炎のポリープでは、疾患の重症度が高いほど多く観察され、重症患者では通常の H&E 染色でも半数以上に認められた<sup>40)</sup>。

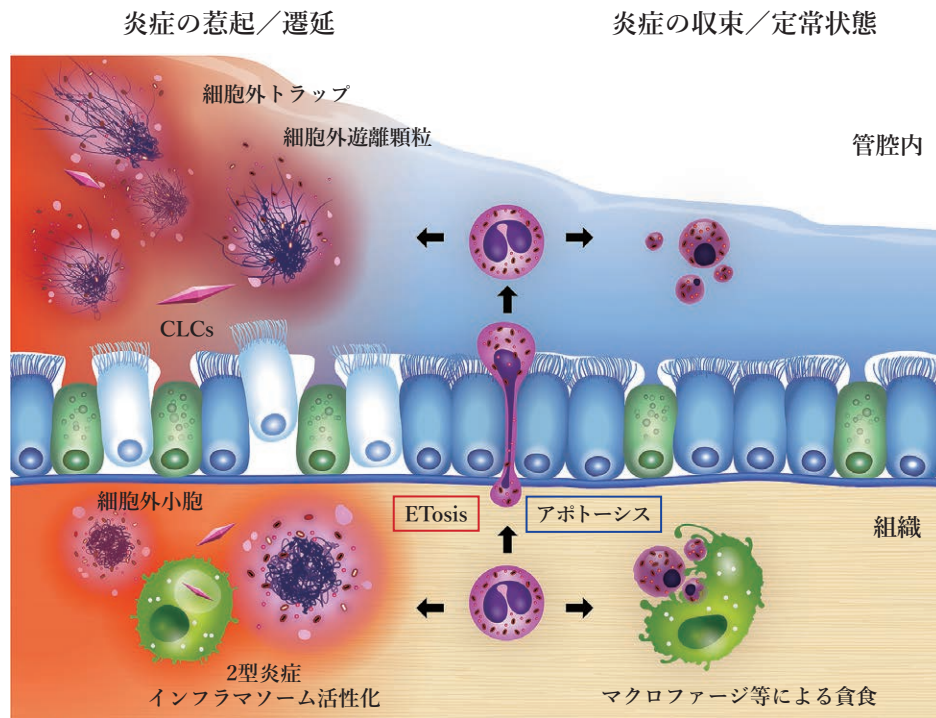


図2. 好酸球の運命と炎症病態.

定常状態や炎症の収束時において、好酸球はアポトーシスを選択する。これにより好酸球はマクロファージによる貪食作用や、管腔内での繊毛運動などで効率的に除去される。一方、活性化した好酸球は迅速にEETosisを選択し、細胞外小胞、細胞外トラップ、遊離顆粒、その他種々のalarminを放出する。これによって組織障害や粘液クリアランスの悪化が引き起こされる。好酸球の細胞質にあるgalectin-10は、EETosisによって細胞内外で結晶化し、2型炎症やインフラマソームを活性化することで炎症がさらに遷延する。

*in vitro*で末梢血から分離した好酸球にEETosisを誘導したところ、細胞質に偏在したgalectin-10の分布が大きく変化し、刺激後30分程度で一部の細胞に結晶が認められる。顕微鏡でタイムラプスをとって詳細に検討すると、細胞膜の崩壊する前に細胞質内で結晶化しており、結晶は出現後1~2分で長軸方向に伸びながら完成していく様子がとらえられた。また、細胞どうしが近接した状態でEETosisを誘導すると、周囲のgalectin-10濃度の上昇により細胞外でもCLCが形成された<sup>40)</sup>。なお、生理的な意義は証明されていないが、好酸球はケモカインで活性化、EETosisの過程では、大量の細胞外小胞(extracellular vesicles)を放出する<sup>27) 40) 41)</sup>。

組織で形成されたCLCについては、しばしばマクロファージに取り込まれている様子が確認できる。CLCはマクロファージのNLRP3インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカインの産生につながる<sup>42)</sup>。これらのことから、CLCはEETosisによって形成され、さらに局所の炎症を増幅することが示唆される

(図3)。一方で、病理学的に認めるCLCは、EETosisの存在を示唆する所見といえるかもしれない<sup>43)</sup>。

## おわりに

ヒト好酸球のプロテオーム解析では、7,000以上同定された蛋白のうち、トップ10のうち7つを顆粒蛋白、galectin-10、ヒストンが占める<sup>44)</sup>。つまり、好酸球が組織で崩壊する場合には、これらの蛋白に加え核酸が大量に放出されることになる。とりわけ「強い」好酸球性炎症が特徴的な疾患群(例えば好酸球性喘息、アレルギー性気管支肺真菌症、好酸球性副鼻腔炎、好酸球性中耳炎、好酸球性消化管疾患、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症など)ではEETosisの関連が深いと考えている<sup>45)</sup>。好酸球性中耳炎や好酸球性副鼻腔炎ではムチンの貯留によって上皮障害が起こり、増悪のサイクルを作っているのではないだろうか。疾患コントロール改善のためにも、今後EETosisのさらなる理解が必要だと考えている。

(植木 重治：秋田大学検査診断学)



## 文献

- 1) Kay AB. The early history of the eosinophil. *Clin Exp Allergy*. 2015;45:575-582.
- 2) Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:746-760.
- 3) Dougan M, Dranoff G, Dougan SK. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. *Immunity*. 2019;50:796-811.
- 4) Saito H, Honda K, Asaka C, et al. Eosinophil chemotaxis assay in nasal polyps by using a novel optical device EZ-TAXIScan: Role of CC-chemokine receptor 3. *Allergol Int*. 2016;65:280-285.
- 5) Ueki S, Nishikawa J, Yamauchi Y, et al. Retinoic acids up-regulate functional eosinophil-driving receptor CCR3. *Allergy*. 2013;68:953-956.
- 6) Ueki S, Nishikawa J, Konno Y, et al. Eliciting eosinophil CCR3 expression by synthetic retinoids. *Allergol Int*. 2014;63 Suppl 1:67-68.
- 7) Ueki S, Nishikawa J, Fukuchi M, et al. ICAM-1 up-regulation is not required for retinoic acid-induced human eosinophil survival. *Immunol Lett*. 2018;196:68-73.
- 8) Ueki S, Mahemuti G, Oyamada H, et al. Retinoic acids are potent inhibitors of spontaneous human eosinophil apoptosis. *J Immunol*. 2008;181:7689-7698.
- 9) Saito Y, Takeda M, Nishikawa J, et al. The effect of pharmacological PI3Kgamma inhibitor on eotaxin-induced human eosinophil functions. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014;27:164-169.
- 10) Yamamoto R, Ueki S, Moritoki Y, et al. Adiponectin attenuates human eosinophil adhesion and chemotaxis: implications in allergic inflammation. *J Asthma*. 2013;50:828-835.
- 11) Kato H, Ueki S, Kamada R, et al. Leptin has a priming effect on eotaxin-induced human eosinophil chemotaxis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155:335-344.
- 12) Tanigai T, Ueki S, Kihara J, et al. Docosahexaenoic acid exerts anti-inflammatory action on human eosinophils through peroxisome proliferator-activated receptor-independent mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;158:375-386.
- 13) Konno Y, Ueki S, Takeda M, et al. Functional analysis of free fatty acid receptor GPR120 in human eosinophils: Implications in metabolic homeostasis. *PLoS One*. 2015;10:e0120386.
- 14) Ueki S, Matsuwaki Y, Kayaba H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates eosinophil functions: a new therapeutic target for allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;134 Suppl 1:30-36.
- 15) **Yamada T, Miyabe Y, Ueki S, et al. Eotaxin-3 as a plasma biomarker for mucosal eosinophil infiltration in chronic rhinosinusitis. *Front Immunol*. 2019;10.**
- 16) Kobayashi Y, Konno Y, Kanda A, et al. Critical role of CCL4 in eosinophil recruitment into the airway. *Clin Exp Allergy*. 2019;49:853-860.
- 17) Chiba T, Ueki S, Ito W, et al. The opposing role of two prostaglandin D2 receptors, DP and CRTH2, in human eosinophil migration. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106:511-517.
- 18) Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest* 2016;126:3279-3295.
- 19) Melo RCN, Weller PF. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J Leukoc Biol*. 2018;104:85-93.
- 20) Spencer LA, Bonjour K, Melo RC, Weller PF. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front Immunol*. 2014;5:496.
- 21) **Ueki S, Tokunaga T, Fujieda S, et al. Eosinophil ETosis and DNA traps: a new look at eosinophilic inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016;16:54.**
- 22) Erjefalt JS, Greiff L, Andersson M, et al. Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax*. 2001;56:341-344.
- 23) Saffari H, Hoffman LH, Peterson KA, et al. Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:1728-1734 e1.
- 24) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532-1535.
- 25) Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176:231-241.
- 26) Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway. *Sci Signal*. 2008;1:pe25.

- 27) Ueki S, Melo RC, Ghiran I, et al. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood*. 2013;121:2074-2083.
- 28) Ueki S, Konno Y, Takeda M, et al. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:258-267.
- 29) Neves JS, Perez SA, Spencer LA, et al. Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci the U S A*. 2008;105:18478-18483.
- 30) Mukherjee M, Lacy P, Ueki S. Eosinophil extracellular traps and inflammatory pathologies-untangling the Web! *Front Immunol*. 2018;9:2763.
- 31) **Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019;68:403-412.**
- 32) Ueki S, Ohta N, Takeda M, et al. Eosinophilic otitis media: the aftermath of eosinophil extracellular trap cell death. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17:33.
- 33) **Ohta N, Ueki S, Konno Y, et al. ETosis-derived DNA trap production in middle ear effusion is a common feature of eosinophilic otitis media. *Allergol Int*. 2018;67:414-416.**
- 34) Omokawa A, Ueki S, Kikuchi Y, et al. Mucus plugging in allergic bronchopulmonary aspergillosis: Implication of the eosinophil DNA traps. *Allergol Int*. 2018;67:280-282.
- 35) Mukherjee M, Bulir DC, Radford K, et al. Sputum autoantibodies in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:1269-1279.
- 36) Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J Innate Immun*. 2018;10:414-421.
- 37) Persson C, Ueki S. Lytic eosinophils produce extracellular DNA traps as well as free eosinophil granules. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:1164.
- 38) Su J. A brief history of Charcot-Leyden crystal protein/galectin-10 research. *Molecules*. 2018;23.
- 39) Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem*. 2014;289:17406-17415.
- 40) **Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, et al. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. *Blood*. 2018;132:2183-2187.**
- 41) Akuthota P, Carmo LAS, Bonjour K, et al. Extracellular microvesicle production by human eosinophils activated by "Inflammatory" stimuli. *Front Cell and Dev Biol*. 2016;4.
- 42) Rodriguez-Alcazar JF, Ataide MA, Engels G, et al. Charcot-Leyden crystals activate the NLRP3 inflammasome and cause IL-1beta inflammation in human macrophages. *J Immunol*. 2019;202:550-558.
- 43) Ueki S, Miyabe Y, Yamamoto Y, et al. Charcot-Leyden crystals in eosinophilic inflammation: active cytolysis leads to crystal formation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019;19.
- 44) Wilkerson EM, Johansson MW, Hebert AS, et al. The peripheral blood eosinophil proteome. *J Proteome Res*. 2016;15:1524-1533.
- 45) **Melo RCM, Wang H, Silva TP, et al. Galectin-10, the protein that forms Charcot-Leyden crystals, is not stored in granules but resides in the peripheral cytoplasm of human eosinophils. *J Leukoc Biol*. 2020. [Epub ahead of print]**

## 6-2

## 好酸球性副鼻腔炎における末梢リンパ節アドレシン (PNAd) の発現について

### サマリー

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) は鼻粘膜への著明な好酸球浸潤が特徴である。本研究では好酸球上の L-selectin と炎症個所に発現する HEV 様血管内皮上の末梢リンパ節アドレシン (PNAd) との関与に着目した。組織中の PNAd の発現、血管内腔に接着する白血球の傾向、好酸球上の L-selectin 発現、PNAd を発現させた CHO 細胞への好酸球接着の相違を解析した。ECRS の鼻ポリープには HEV 様血管が誘導されており、その内腔面に発現する PNAd と好酸球上の L-selectin が相互作用し好酸球浸潤が起きている可能性が示唆された。

### はじめに

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) は、鼻ポリープへの強い好酸球浸潤が特徴であるが、好酸球の炎症箇所への浸潤メカニズムについてはいまだ不明点が多い。好酸球の粘膜への浸潤は、血管内を循環している好酸球上と血管内皮上の接着分子の相互作用で起きている可能性が高い。一般的に慢性炎症や悪性腫瘍では、2次リンパ組織に誘導される高内皮細静脈血管 (high endothelial venules; HEV) に類似する HEV 様血管が誘導される<sup>1) 2)</sup>。HEV を介したリンパ球循環では、最初の過程でリンパ球表面に発現する L-selectin と HEV 内腔に発現する末梢リンパ節アドレシン (peripheral lymph node addressin; PNAd)

の微弱な接着がおこり、血管内腔をリンパ球が“ローリング”する。このローリングに、ケモカインやインテグリンを介した強固な接着が加わりリンパ球が血管内皮を介して血管外へと遊走していく<sup>2) 3)</sup>。こうした背景から、ECRS の好酸球浸潤は好酸球表面の L-selectin とポリープ内の PNAd 発現を有する HEV 様血管との分子相互作用によるものと推測される (図1)。本研究は慢性炎症に発現する血管内部で血球表面分子と血管内皮分子間の接着、病巣への浸潤機序、炎症との関連性について着目し、血中好酸球がポリープ組織に浸潤する機序、それらに参与する細胞接着分子を解析し、ECRS における炎症の動態を解明することを目的とする。

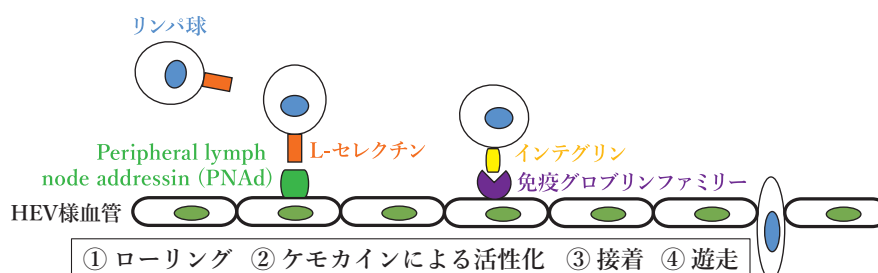


図1. 好酸球のローリング接着の様子。

好酸球上の L-selectin と血管内皮上の PNAd との接着。ローリングの初期段階で接着が起こり好酸球が血管外へ浸潤する。

## 方法

福井大学附属病院および関連病院で内視鏡下鼻副鼻腔手術を施行された ECRS 鼻茸 30 例, non ECRS 30 例の検体を用いた。ECRS の診断は JESREC study<sup>4)</sup> に準じて行った。

## 免疫組織化学

標本中の全ての血管内皮を QBEND10 (mouse IgG; Immunotech, Marseille, France) で染色し CD34 の発現を調べた。PNAd 発現は sialyl 6-sulfo Lewis X 構造を認識する MECA-79 (rat IgM; BD Pharmingen, San Diego, CA) で調べた<sup>5) 6)</sup>。CD34, MECA79 いずれも同様の手技で染色した。キシレンで脱パラフィン後にエタノールで再水和し 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノール液に 30 分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制, 1 nM EDTA を含む 10 nM Tris/HCl バッファーで 105°C で 15 分間オートクレーブ処理し, TBS で 30 分間非特異的タンパク結合を抑制させる。1 次抗体 QBEND, MECA-79 を 60 分間反応, TBS で洗浄, 2 次抗体は HRP 結合ヒストファイン (Nichirei), HRP 結合ヤギ抗ラット IgM (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) をそれぞれ 60 分間反応させ, TBS 洗浄後, 3,3'-ジアミノベンジジンで 5 分間呈色反応し, ヘマトキシリンで対比染色とした。

## PNAd 発現血管の定量

200 倍視野で CD34 発現血管と PNAd 発現血管をカウントし, PNAd 発現血管の割合を PNAd<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> で算出した。

## PNAd 発現血管に付着した白血球の定量化

MECA-79 発現血管の内腔に接着している好酸球, 好中球, リンパ球数をカウントし, PNAd 発現血管 100 個あたりの割合で算出した。

## 好酸球分離および L-selectin 発現

健常者より採血し Polymorphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) を用い密度遠心分離し, 白血球分画を回収後, Eosinophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec

GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) を用いた磁気活性化細胞分離 (Magnetic cell separation system; MACS) で好酸球を回収した。好酸球の純度が 98% 以上であることをエオジン染色で確認した。好酸球における L-selectin 発現は抗ヒト L-selectin モノクローナル抗体 DREG-56 (mouse IgG; BD Pharmingen) を用いた蛍光活性化セルソーティング (FACS) 分析によって確認した<sup>7)</sup>。

## 好酸球の rolling assay

PNAd を発現させた CHO 細胞株を用いて, 以下の rolling assay を行った。

Assay の 24 時間前に  $5 \times 10^4$  個の CHO 細胞を Lab tech 4well chamber slide のウェルにまいた。そこに単離した  $1 \times 10^6$  個のヒト好酸球を 20 mM HEPES を添加した RPMI に懸濁し, 各ウェルに添加した。rotating shaker で 4°C, 30 分間インキュベート後, 非接着細胞を RPMI で 3 回リンスして除去した。1% グルタルアルデヒドを含む PBS で固定し, Nomarski 微分干渉光学顕微鏡を用い 200 倍, 5 視野で CHO 細胞と接着好酸球の数を計測し, CHO 細胞 100 個あたりの接着好酸球の割合を算出した。Negative control は抗 L-selectin 抗体を 4°C, 10 分間前処理したものと接着を仲介するカルシウムイオンを阻害するキレート因子として EDTA を前処理したものを用いて同様に計測した<sup>7)</sup>。

## 結果

### ECRS における PNAd 発現

ECRS, nonECRS いずれも全症例で CD34, PNAd の発現を認めた (図 2)。また PNAd 発現血管内腔への白血球接着も確認された。それぞれの PNAd 発現血管の陽性率は, ECRS は  $24.56 \pm 11.14\%$  であったのに対し, nonECRS は  $10.76 \pm 5.75\%$  であり, ECRS で PNAd 発現血管が有意に多い結果 ( $p < 0.001$ ) となった (図 3)。

### PNAd 発現血管における白血球接着

ECRS, nonECRS における PNAd 発現血管内腔に接着する白血球は, 好酸球は有意に血管内腔に接着



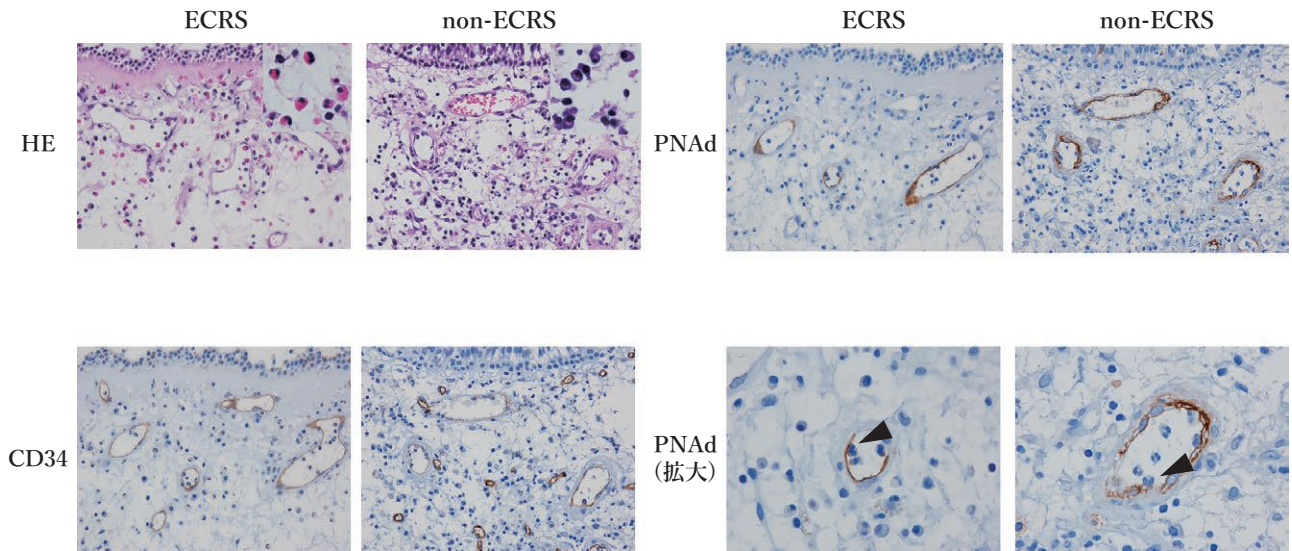


図2. 鼻茸におけるPNAAd, CD34の発現.

HE染色はECRSで多数の好酸球を認める. CD34はECRS, non ECRSいずれも血管内皮が染色されている. PNAAd弱拡大では, HEV様血管の内皮上に発現を認める. PNAAd強拡大では, 血管内皮に接着する白血球を認める (▼).

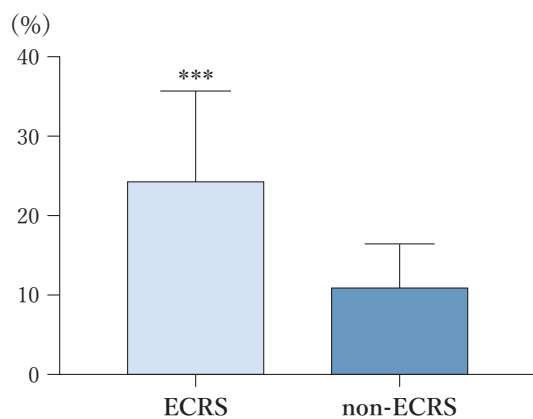


図3. ECRS, non ECRS鼻茸におけるPNAAd発現血管の陽性率.

PNAAd発現血管の陽性率はECRSで有意に高く, より多くの血管が発現していた. \*\*\* $P < 0.001$ .

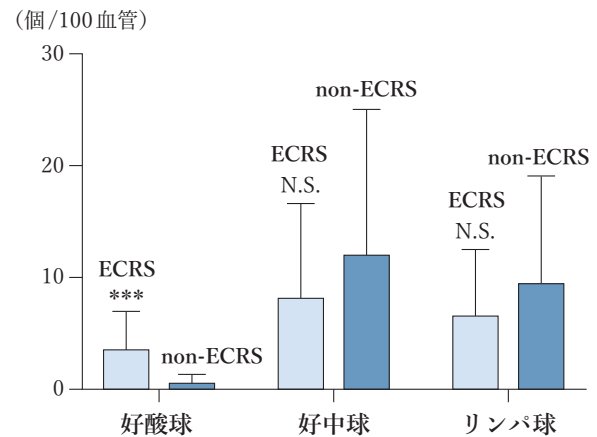


図4. PNAAd発現血管に接着する白血球の比較.

ECRSで好酸球が有意に多く接着していた. 好中球, リンパ球は有意差はないがnonECRSに多く接着している傾向であった. \*\*\* $P < 0.001$ .

している結果となった ( $3.58 \pm 3.38$  個 vs.  $0.52 \pm 0.80$  個/100血管  $P < 0.001$ ) (図4). 一方, nonECRSで好中球とリンパ球が多い傾向であったが有意差は認めなかった (好中球  $8.35 \pm 8.20$  個 vs.  $11.97 \pm 13.05$  個/100血管; リンパ球  $6.70 \pm 5.82$  個 vs.  $9.39 \pm 9.71$  個/100血管) (図4).

### 好酸球とPNAAd発現CHO細胞との接着

好酸球の浸潤にはL-selectinとPNAAdを介した分

子相互作用が起きているものと推測される (図1). L-selectinとPNAAdの接着を確認するため, 好酸球上のL-selectin発現をFACSで解析した (図5). 好酸球上にはL-selectinが発現していた. L-selectinのリガンド糖鎖であるsialyl 6-sulfo Lewis Xを含むPNAAd構造を定常発現させたCHO細胞に対して, 好酸球のrolling assayを施行した (図6). 好酸球のPNAAd発現したCHO細胞への接着が肉眼的に確認された ( $80.12 \pm 10.05$  個/100 CHO cells). また, こ



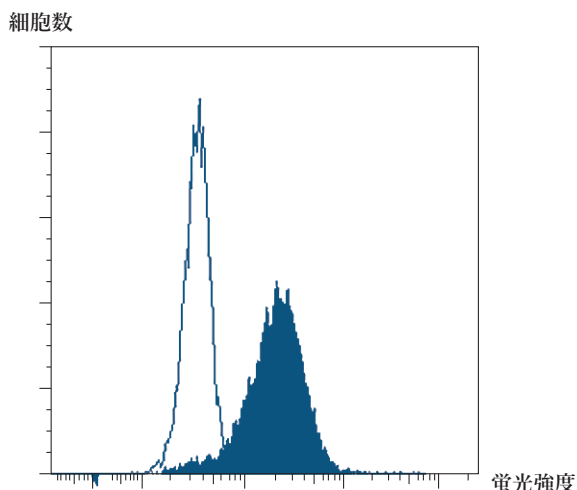


図5. 好酸球上のL-selectinの発現.

FACS解析で、好酸球上のL-selectin発現が確認された。

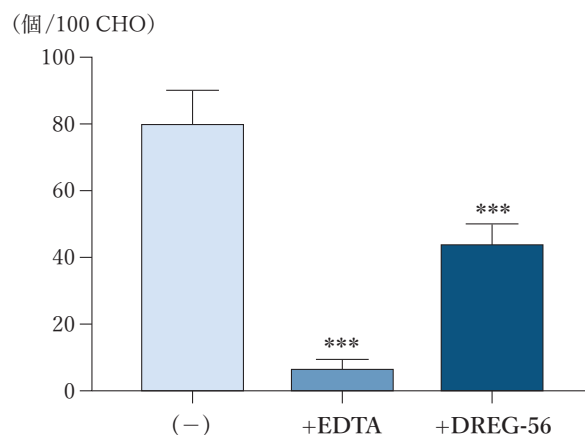


図7. Rolling assayの接着好酸球数の結果.

PNAdを発現させたCHO細胞への好酸球接着数を比較した。EDTAを添加した群では、著しく好酸球接着が抑制されていた。抗L-selectin (DREG-56) では、接着抑制されていたがEDTAほどの抑制効果は認めなかった。\*\*\* $P < 0.001$ .

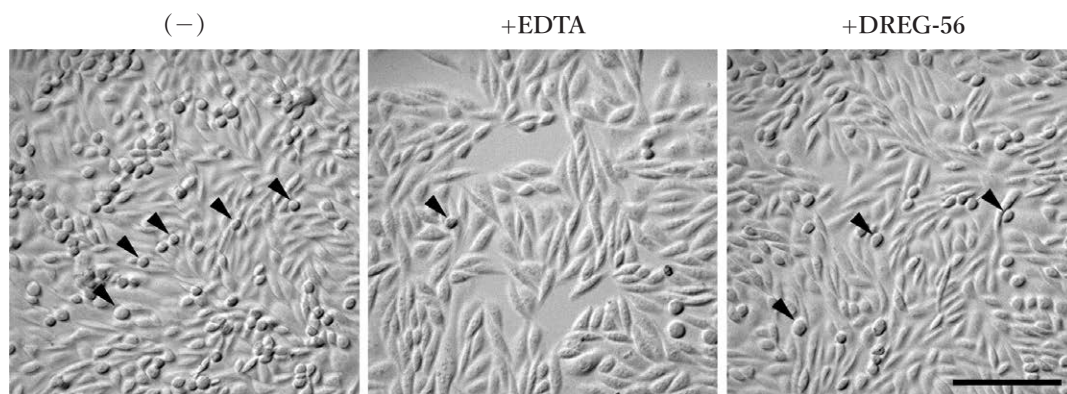


図6. 好酸球のRolling assay.

好酸球がPNAdを発現させたCHO細胞に接着している (▼左). EDTAを添加すると接着が著しく抑制された (正中). 抗L-selectin抗体で処理させると接着は抑制された (右).

EDTA: Caキレートとして使用. DREG-56: 抗L-selection抗体. Bar 100  $\mu\text{m}$ .

これらの接着はEDTA処理により著明に抑制された ( $6.17 \pm 3.35$  個). 同様に、好酸球を抗L-selectin (DREG-56) で処理すると、好酸球のCHO細胞への接着が抑制された ( $43.35 \pm 6.62$  個). 以上から、PNAd発現CHO細胞への好酸球接着が、部分的にL-selectinを介して行われている可能性が示唆された。

## 考察

今回の検討で、ECRSの鼻粘膜およびポリープ中にPNAd発現を認める血管が誘導され、好酸球が血管内腔に接着していることがわかった。また、好酸球がPNAd発現CHO細胞にカルシウム依存的に接着し、抗L-selectin抗体によって阻害されることも示唆された<sup>8)</sup>。以上から、ECRSにおける好酸球の集積にはPNAd発現血管が部分的に役割を果たすことが予測された。

PNAdには種々の糖転移酵素や硫酸転移酵素の作用で6-sulfo Lewis Xという糖鎖構造が存在する。6-sulfo Lewis X中のN-acetylglucosamine (GlcNAc)の硫酸化にはN-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase 1 (GlcNAc6ST-1), GlcNAc6ST-2といった硫酸化酵素が関与している<sup>9)~11)</sup>。T細胞から産生されるリンホトキシン $\alpha\beta$ で、硫酸化酵素のmRNAおよびタンパク質が増加しHEV様血管にPNAdが生じることもわかっている。ECSRにおいても同様なメカニズムでPNAd誘導が行われている可能性がある。

また、ECSRでPNAd発現血管の内腔に接着した好酸球の数がnonECSRよりも有意に多い結果となったが、これらは好酸球接着を促進するメカニズムの存在を示唆している。好酸球に発現する $\alpha4\beta1$ および $\alpha4\beta7$ インテグリンと、サイトカイン誘導性内皮受容体血管細胞接着分子 (VCAM-1), 粘膜アドレスリン細胞接着分子 (MAdCAM-1)との相互作用<sup>12)</sup>や、鼻茸中の好酸球遊走因子エオタキシン (Eotaxin, CCL)とその受容体 (CCR)とエオタキシンの存在<sup>13) 14)</sup>が、好酸球接着を強固なものとした可能性もある。

一方、次世代シーケンスを用いたトランスクリプトーム解析で、ECSRではTRPV3, CST1, POSTNなどの発現が増加していることがわかっている<sup>15)~17)</sup>。これらの因子は、ECSRの好酸球性炎症の再発・難治性への濃厚な関与が疑われており、一連の好酸球遊走において関与している可能性もある。

Rolling assayでは、抗L-selectin抗体で処理した条件よりも、EDTAで処理した条件のほうが著しく接着が阻害された。今回用いた抗体が好酸球接着をブロックするのに十分でなかった可能性や、好酸球に発現するガレクチンやシアル酸結合免疫グロブリン様レクチン (Siglec)を含む他のカルシウム依存性炭水化物結合タンパク質がPNAdやその中間体と相互作用し、接着に寄与していた可能性もある<sup>18)~20)</sup>。慢性胃炎、潰瘍性大腸炎、慢性前立腺炎といった慢性炎症疾患で誘導されるPNAd陽性HEV様血管の発現が、その重症度と相関することもわかっており<sup>21)~24)</sup>、PNAd発現血管の差やその糖鎖構造がECSRにおける臨床マーカーや治療ツールとなりうるかどうか、今後の更なる研究が必要である。

(堤内 俊喜)

## 文献

- 1) Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:205-217.
- 2) Sakai Y, Kobayashi M. Lymphocyte 'homing' and chronic inflammation. *Pathol Int*. 2015;65:344-354.
- 3) Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996;5:60-66.
- 4) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy*. 2015;70:995-1003.
- 5) Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC. Immunohistologic and functional characterization of avascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol*. 1988;107:1853-1862.
- 6) Yeh JC, Hiraoka N, Petryniak B, et al. Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a core 1 extension  $\beta1,3$ -N-acetylglucosaminyltransferase. *Cell*. 2001;105:957-969.
- 7) Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:2244-2248.
- 8) Tsutsumiuchi T, Hoshino H, Fujieda S, et al. Induction of peripheral lymph node addressin in human nasal mucosa with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Pathology*. 2019;51:268-273.
- 9) Fujiwara M, Kobayashi M, Hoshino H, et al. Expression of long-form N-acetylglucosamine-6-O sulfotransferase 1 in human high endothelial venules. *J Histochem Cytochem*. 2012;60:397-407.
- 10) Bistrup A, Bhakta S, Lee JK, et al. Sulfotransferases of two specificities function in the reconstitution of high endothelial cell ligands for L-selectin. *J Cell Biol*. 1999;145:899-910.

- 11) Hiraoka N, Petryniak B, Nakayama J, et al. A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis X, an L-selectin ligand displayed by CD34. *Immunity*. 1999;11:79-89.
- 12) Bochner BS. Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:817-828.
- 13) Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer RP. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J Immunol*. 2000;164:3847-3854.
- 14) Saito H, Honda K, Asaka C, et al. Eosinophil chemotaxis assay in nasal polyps by using a novel optical device EZ-TAXIScan: role of CC-chemokine receptor 3. *Allergol Int*. 2016;65:280-285.
- 15) **Tokunaga T, Ninomiya T, Kato Y, et al. The significant expression of TRPV3 in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2017;66:610-616.**
- 16) **Kato Y, Takabayashi T, Sakashita M, et al. The expression and functional analysis of CST1 in intractable nasal polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;59:448-457.**
- 17) **Ninomiya T, Noguchi E, Haruna T, et al. Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Sci Rep*. 2018;8:11450.**
- 18) Schnaar RL. Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2016;99:825-838.
- 19) Rao SP, Ge XN, Sriramarao P. Regulation of eosinophil recruitment and activation by galectins in allergic asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:68.
- 20) O'Sullivan JA, Carroll DJ, Bochner BS. Glycobiology of eosinophilic inflammation: contributions of siglecs, glycans, and other glycan-binding proteins. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:116.
- 21) Kobayashi M, Mitoma J, Nakamura N, et al. Induction of peripheral lymph node addressin in human gastric mucosa infected by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17807-17812.
- 22) Suzawa K, Kobayashi M, Sakai Y, et al. Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:1499-1509.
- 23) Kobayashi M, Hoshino H, Masumoto J, et al. GlcNAc6ST-1-mediated decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates directs disease activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:697-706.
- 24) Inamura S, Shinagawa T, Hoshino H, et al. Appearance of high endothelial venule-like vessels in benign prostatic hyperplasia is associated with lower urinary tract symptoms. *Prostate*. 2017;77:794-802.

## 6-3

# アスピリン喘息の鼻茸における L-plastin 発現増加に関する検討

## サマリー

アスピリン喘息は極めて難治性、易再発性の鼻茸を特徴とした疾患で、好酸球性副鼻腔炎の最重症例に分類される。アラキドン酸代謝異常が病態に関与することが知られているがまだ不明なことも多い。本研究では二次元電気泳動と MALDI-TOF-MS によるプロテオーム解析によって、アクチン結合タンパクである L-plastin の発現がアスピリン喘息患者の鼻茸で増加していることを発見した。さらに L-plastin は好酸球に発現し、凝固因子の tissue factor を介して凝固系を誘導することによって病態に関与することを明らかにした。

## はじめに

好酸球性副鼻腔炎は難治性の疾患であり JESREC スコアによって重要度分類がなされる。アスピリン喘息は好酸球性副鼻腔炎における最重症タイプであり、手術後も鼻茸の再発を繰り返し、ステロイドの投与でも疾患のコントロールが極めて困難である<sup>1)~3)</sup>。アスピリン喘息の病態としてアラキドン酸代謝異常によるシステニルロイコトリエン (CysLTs) である LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> の過剰な産生が NSAIDs を含めたアスピリンの摂取によってさらに増加し、これによる更なるアレルギー炎症の増悪が知られている<sup>4)</sup>。アスピリン喘息の鼻粘膜には著しい好酸球の浸潤が認められており、極めて再発性の高い鼻茸は治療を困難にし、複数回の手術や長期に渡るステロイド投与によって患者は多大な苦痛を強いられる<sup>4)</sup>。脱感作療法などの治療オプションがあるが、アスピリン喘息における治療のターゲットとしては再発性の鼻茸の制御が最も重要であると考えられる。アスピリン喘息患者の鼻茸における特異的な組織学的な特徴は今のところわかっていないが、手術によって病的鼻粘膜を除去することによって患者の血清中や尿中の CysLTs の濃度が低下することが報告されており<sup>5)</sup>、鼻茸の制御が気管支喘息の病状の緩和にも繋がると予想される。

我々はこれまでに好酸球性炎症によって生じる鼻茸の鼻粘膜間質にはフィブリン網が過剰に形成されていることを明らかにした。また過剰なフィブリン網の形成は炎症によって末梢血管から漏出した血漿蛋白を鼻粘膜間質内に保持することによって浮腫を遷延化させ鼻茸の形成に繋がると結論した<sup>6)</sup>。またその後の研究によってアスピリン喘息患者の鼻茸にはより多くのフィブリン網の形成が認められ、さらにフィブリン網の代謝を担っている線溶系関連分子である組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) の発現量もより少ないことがわかった<sup>7)</sup>。これらの結果からアスピリン喘息の鼻茸形成メカニズムの解明は疾患のコントロールを行ううえで重要であると考えている。

本研究では二次元電気泳動と MALDI-TOF-MS によるプロテオーム解析によって、非アスピリン喘息とアスピリン喘息の鼻茸における発現タンパクの違いを検討した。この中から発現量に違いの認められた L-plastin に注目して病態への関与について検討した。

## 方法

### 対象とサンプル

福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科および獨協医科



大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科において採取されたアスピリン喘息または非アスピリン喘息患者の鼻茸を研究に使用した。全ての患者に対してインフォームドコンセントをとり、またそれぞれの施設の倫理委員会の承認を得ている。

## 二次元電気泳動と MALDI-TOF-MS

アスピリン喘息または非アスピリン喘息患者それぞれ8症例の鼻茸を使用した。二次元電気泳動のサンプルに対するラベリングはメーカーのプロトコールに従って行った (GE Healthcare, Fairfield, CT)。タンパク質の同定に MALDI-TOF-MS を使用した。

## ウエスタンブロッティング

鼻茸組織をホモジナイズし、抽出液を用いてタンパク量の測定に使用した。蛋白抽出液を denature 後、12.5% Gels (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて SDS-PAGE で分離し、Hybond-P (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Sweden) に転写した。ブロッキング後、anti-human-L-plastin Ab (ab83496; Abcam, Cambridge, UK) で反応させた。二次抗体として horse radish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用した。

## 免疫組織化学

パラフィン包埋した鼻粘膜組織を 3 μm 厚でスライスした。ブロッキング後、mouse anti-human L-plastin antibody (clone: LPL4A.1 IgG1, ab3290; Abcam), mouse anti-human fibrin mAb (Sekisui Diagnostics, Stamford, CT), rabbit anti-human tissue factor antibody (bs-4690R; Bioss Antibodies, Woburn, MA) を 4°C で over night 反応させた。

## 細胞培養

The human eosinophilic leukemic cell line Eol-1 を 10% ウシ胎児血清を含んだ RPMI1640 medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) で 37°C, 5% CO<sup>2</sup> インキュベーターで培養し実験に使用した。

## L-plastin の siRNA

L-plastin とコントロールの siRNA を Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) から購入して研究に使用した。Eol-1 cells に siRNA を GenomeONE-Si (Ishihara Sangyo, Osaka, Japan) を用いてトランスフェクションした。24時間後、免疫染色や Transmigration Assay で評価した。Eol-1 における L-plastin の抑制効果は real time PCR および ELISA にて確認した。

## Real-Time PCR

Eol-1 cell から total RNA を NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA), DNase I を用いて抽出した。Single-strand cDNA の作成には SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。Real-time RT-PCR は TaqMan method を用いて行った。

## 統計解析

全てのデータは中間値 ± 標準誤差で表している。各群間の比較は Kruskal-Wallis ANOVA with Dunnett post hoc testing and Mann-Whitney U test を用い、相関は Spearman rank correlation を用いて解析を行った。P 値が 0.05 以下の場合有意差ありとした。

## 結果

### アスピリン喘息患者の鼻茸において L-plastin のタンパク量が増加していた

アスピリン喘息 (aspirin-exacerbated respiratory disease; AERD) の鼻茸の形成に関与する分子を同定するためにプロテオーム解析を行った。アスピリン喘息と非アスピリン喘息患者から採取した鼻茸の組織抽出液を蛍光標識し、二次元電気泳動を行った (図 1a)。2 群間でタンパクの発現に 2 倍以上差があった 61 個のタンパクを MALDI-TOF-MS で解析した。Mascot software (Matrix Science, Boston, MA) での検索の結果、そのうち 9 つのタンパクが NCBI のデータベース中に確認できた。

9 つのタンパクの中で今回の研究では L-plastin に



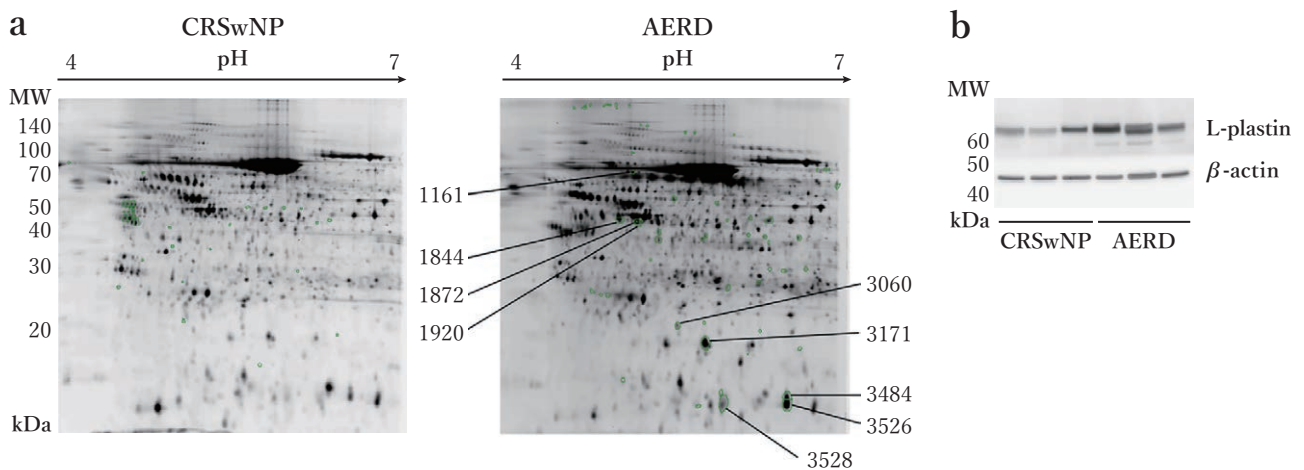


図1. (a) アスピリン喘息の鼻茸(右 AERD)と非アスピリン喘息鼻茸(左 CRSwNP)の二次元電気泳動写真。右パネルで番号がつけられているスポットはアスピリン喘息の鼻茸において2倍以上の発現増加を認めたもの。(b) 鼻茸組織からの抽出サンプルを用いたウェスタンブロッティング (anti-human L-plastin Ab)。

注目して検討を進めた。L-plastinの発現量はWestern blotting法をでもアスピリン喘息患者の鼻茸で増加を認めた(図1b)。

### 鼻茸組織におけるL-plastinの発現の免疫組織化学的検討

アスピリン喘息の鼻茸におけるL-plastinの発現の分布を検討するためにanti human-L-plastin Abを用い免疫組織化学によってアスピリン喘息と非アスピリン喘息を比較した(図2a~c)。L-plastinの発現は鼻茸組織の粘膜下の主に炎症性細胞に発現しており、L-plastin陽性の細胞数はアスピリン喘息の鼻茸において有意に多かった(図2d)。L-plastinは主に白血球に発現しており細胞骨格を制御することで、好酸球など炎症細胞の遊走に関与することが知られている<sup>8)~10)</sup>。このため我々はアスピリン喘息の鼻茸組織に認められたL-plastin陽性の細胞が好酸球であるかどうかを調べるためにL-plastin陽性細胞数と好酸球との相関関係を調べてみた。その結果両者は有意に正の相関関係にあることがわかった( $r=0.765, P<0.0001$ )(図2e)。またanti-L-plastin Abと好酸球のマーカーであるECPに対する抗体を用いて鼻粘膜における蛍光二重染色を行った。その結果アスピリン喘息の鼻茸組織では多くの細胞で、L-plastinとECPの両方が共局在することがわかった(図3)。

これらの結果からアスピリン喘息の鼻茸において好酸球がL-plastinを発現しているということが示唆される。

### アスピリン喘息の鼻茸におけるフィブリン網の形成

アスピリン喘息の鼻茸では、極めて多数の好酸球が浸潤していることが組織学的な特徴の1つであるが<sup>11) 12)</sup>、鼻粘膜における好酸球がどのように病態の形成に関与しているのかは良くわかっていない。我々はこれまでの検討でアスピリン喘息の鼻茸におけるt-PAの発現量が非アスピリン喘息と比較して有意に少ないことを報告した<sup>6)7)</sup>。線溶系において重要な分子であるt-PAの発現減少は線溶系によるフィブリン網分解を抑制させ、フィブリン網の過剰沈着を誘導し、これがアスピリン喘息の鼻茸の難治化に関与していると思われる。次に鼻粘膜におけるフィブリン網の沈着度を検討するためにanti-human fibrin Abを用いて検討した。その結果アスピリン喘息の鼻茸におけるフィブリン網沈着量は非アスピリン喘息と比較して有意に多いことが確認できた(図4a~c)。また鼻粘膜における好酸球数とフィブリン網の沈着度の間には有意な正の相関関係を認めた( $r=0.4637, P<0.005$ )(図4d)。

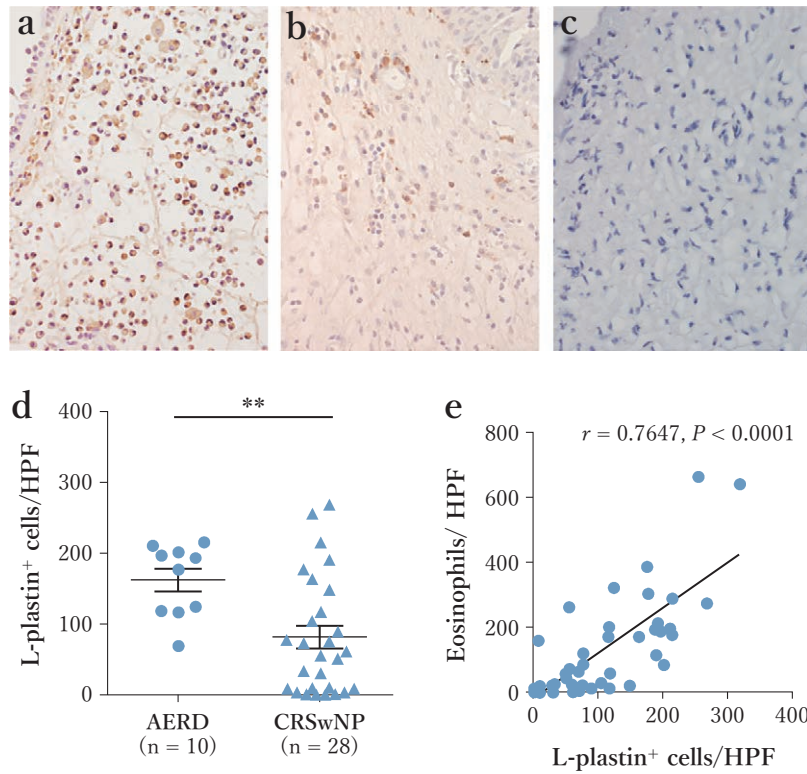


図2. Anti-human L-plastin Abを用いた鼻粘膜の免疫組織化学。

(a) アスピリン喘息の鼻茸 (AERD), (b) 非アスピリン喘息の鼻茸 (CRSwNP), (c) Iso type control. (d) L-plastin 陽性細胞数の比較, (e) 鼻粘膜における好酸球数と L-plastin 陽性細胞数の相関.  $\times 400$ ,  $**P < 0.01$ . HPF; high-power field.

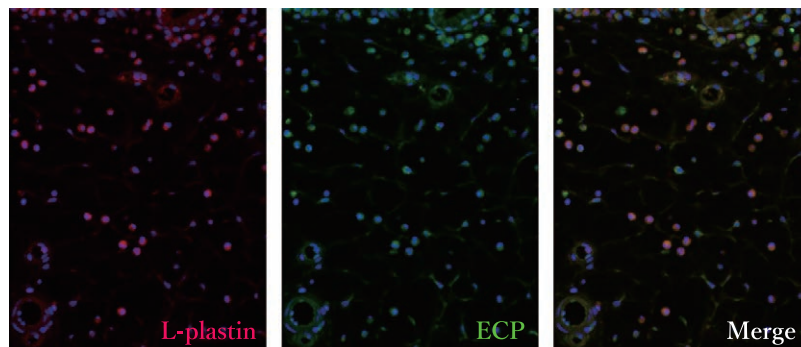


図3. アスピリン喘息の鼻茸における L-plastin の発現。

Anti-human L-plastin Ab (赤色), anti human ECP Ab (緑色). 細胞核は DAPI 染色 (青色).

### L-plastin 陽性好酸球における組織因子の発現

組織に分布する好酸球は凝固系の起点として働く組織因子 (TF) を発現し凝固系を亢進させ、フィブリン網の形成を誘導することが知られている<sup>13) 14)</sup>. 凝固因子 VIIa が細胞表面の TF に直接結合することで凝固因子 IX と X が活性化されトロンビン産生され、最終的にフィブリン網の形成がおこる<sup>15)</sup>. TF が

凝固系を進めるためには VIIa との直接の結合が必要であるがどのようなメカニズムで TF が細胞表面に表出させられるのかはわかっていない. 活性化された好酸球では TF が細胞の表面に表出することが報告されており、最近の報告では GM-CSF で刺激を受けた好酸球は L-plastin がリン酸化されることによって活性化され、L-plastin は細胞表面の leading

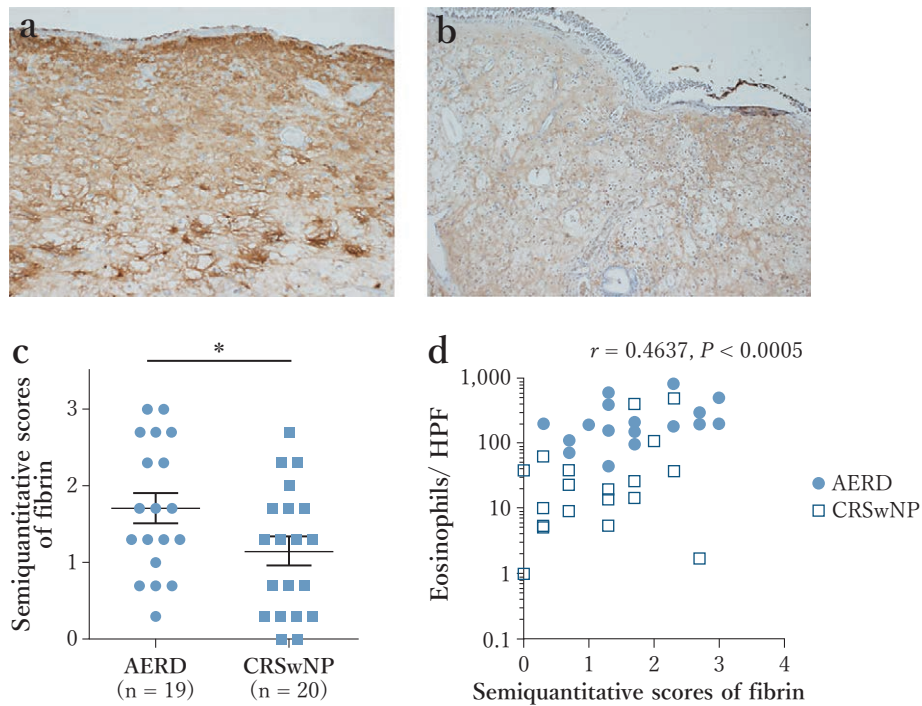


図4. 鼻茸におけるフィブリン網の免疫組織化学.

(a) アスピリン喘息の鼻茸 (AERD), (b) 非アスピリン喘息の鼻茸 (CRSwNP), (c) フィブリン網沈着の判定量による比較, (d) 鼻粘膜におけるフィブリン網沈着量と好酸球数との相関.  $\times 400$ ,  $**P < 0.01$ .

edgeの先端に集まることが明らかにされた<sup>9) 10) 13)</sup>. これらの結果を受け、我々は細胞骨格に結合するL-plastinがTFの好酸球表面への表出に関与するのではないかと考えた. アスピリン喘息の鼻茸におけるTFの発現をanti-human TF antibodyを用いて検討した結果、TFは主に鼻茸上皮と浸潤細胞に多く認められた(図5a). これに対して非アスピリン喘息の鼻茸においてはTFの発現量は少なかった(図5b). さらにTF陽性細胞は形態的に好酸球であることが疑われたため(図5a)、TFと好酸球のマーカーであるECPに対する抗体を用いた蛍光二重染色を行った. その結果、好酸球にTFの発現が認められた. またTF陽性好酸球にL-plastinの発現があるのかを検討したところ、TFとL-plastinが共局在しており(図5d)、アスピリン喘息の鼻茸組織において好酸球にTFとL-plastinが同時に発現していることがわかった.

### L-plastin が好酸球においてTFの細胞表面への表出に関与する

L-plastinが好酸球においてTFの細胞表面への表出への関与を検討するために、L-plastinの発現をsiRNAによって抑制し実験を行った. L-plastinのsiRNAによる発現抑制効果はreal time PCRおよびELISAによって確認した(data not shown). Eol-1細胞にL-plastinに対するsiRNAをトランスフェクションしGM-CSFで刺激し1時間後にTFの分布を蛍光免疫染色で検討した. siRNAをトランスフェクションしていない、または抑制効果のないコントロールsiRNAをトランスフェクションしたEol-1細胞ではGM-CSFの刺激を加えることによってTFが細胞の表面に移動するのに対し、L-plastinに対するsiRNAをトランスフェクションしたEol-1ではGM-CSF刺激を加えてもTFは細胞表面へ表出せず細胞質にとどまったままであった(図6). この結果からL-plastinは好酸球においてTFの細胞表面への表出に深く関与することが示された.



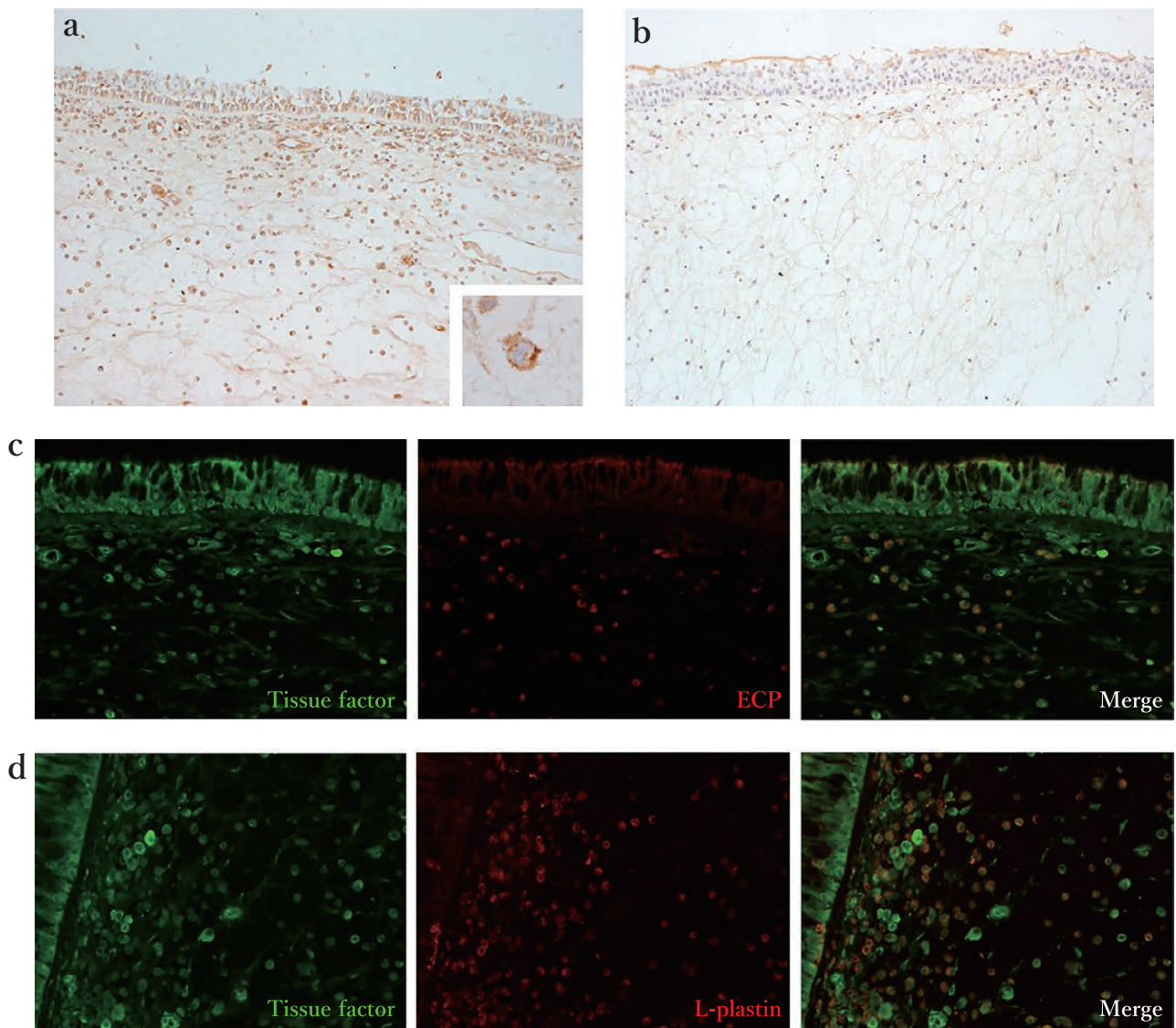


図5. 鼻粘膜におけるTFの免疫組織化学.

(a) アスピリン喘息の鼻茸 (右下は細胞の強拡大像), (b) 非アスピリン喘息の鼻茸, (c) アスピリン喘息の鼻茸の蛍光二重染色. TF (緑色), ECP (赤色), (d) アスピリン喘息の鼻茸の蛍光二重染色. TF (緑色), L-plastin (赤色).

## 考察

本研究では二次元電気泳動とMALDI-TOF-MSによるプロテオーム解析によって、非アスピリン喘息とアスピリン喘息の鼻茸における発現タンパクの違いを検討した。その結果アスピリン喘息の鼻茸において9つのタンパクの発現増加を確認することができた。またこの中から細胞骨格に関与するL-plastinに注目して検討した結果、L-plastinはアスピリン喘息の鼻茸の主に好酸球に発現を認め、凝固系の起点であるTFの細胞表面への表出に関与することを明

らかにした<sup>16)</sup>。TFの細胞表面への表出によって凝固系が亢進し鼻粘膜におけるフィブリン網の過剰な形成はアスピリン喘息の鼻茸の難治性に関与していると考えられる。

JESREC studyによって好酸球性副鼻腔炎の診断基準が確立し重症度分類に応じた治療法が今後開発され好酸球性副鼻腔炎の治療成績は向上すると思われる<sup>1)~4)</sup>。しかしアスピリン喘息は本疾患の最重症タイプに分類され今のところ有効な治療法もない状態である<sup>5)</sup>。抗体製剤の治療効果にも期待されるが新たな病態の解明は、適切な治療方法の選択による治

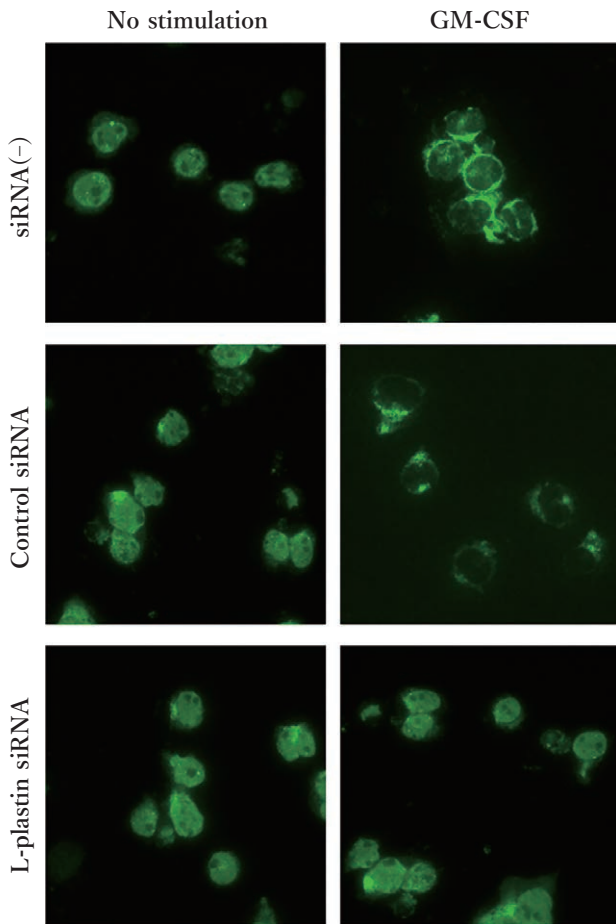


図6. Eo1細胞を用いたL-plastinのsiRNAによる抑制効果の検討。

TFは緑で表れされている。Eo1細胞にsiRNAのトランスフェクションなし(上)、コントロールsiRNAトランスフェクション(中)、L-plastin siRNAトランスフェクション(下)。GM-CSF刺激前(左)、GM-CSF刺激後1時間(右)。

療効果の向上のため不可欠である。好酸球性炎症を呈する慢性副鼻腔炎の鼻茸に比較してアスピリン喘息の鼻茸組織にはさらに多くの好酸球の浸潤が認められることが知られている<sup>7)</sup>。しかしながら実際に浸潤した好酸球がどのように鼻茸の形成に関与しているのかは良くわかっていない。好酸球の活性化は遊走やサイトカイン、ケモカインの放出に繋がるため、炎症局所における活性化メカニズムの解明は重要である。GM-CSFは好酸球を活性化させることがわかっており<sup>10)</sup>、我々の最近の研究ではGM-CSFがアスピリン喘息の鼻茸で増加していることを明らかにしている<sup>7)</sup>、GM-CSFはL-plastinをリン酸化することによって好酸球を活性化することから<sup>10)</sup>、アス

ピリン喘息の鼻茸において増加したGM-CSFは好酸球におけるL-plastinをリン酸化することによって好酸球を活性化し、これが細胞の遊走や脱顆粒に対する感受性を向上させ、さらにサイトカイン産生を誘導し、アスピリン喘息の病態の悪化に関与しているものと思われる。今回の研究でも実際にL-plastinの抑制によってEo1から産生されるケモカイン量の減少が認められた(data not shown)。

CysLTsの過剰産生はアスピリン喘息の最も重要な特徴であるが、そのメカニズムは十分解明されていない。近年、好酸球が血小板と結合することでCysLTsのtranscellular metabolismが急激に増加することが示されている<sup>17) 18)</sup>。またアスピリン喘息の末梢血における白血球と血小板の結合率が有意に高く、これらの結合はCysLTs量と相関することから血小板と好酸球の相互作用がアレルギー炎症の増悪に関与していると考えられる<sup>19)</sup>。活性化された血小板はGM-CSFを産生し、好酸球を活性化し、さらに血小板におけるCysLTsの産生が亢進することが知られている<sup>18)</sup>。これらのことからアスピリン喘息の鼻茸におけるL-plastinの発現の増加はCysLTs産生の増加に関与していると考えられる。

鼻粘膜におけるフィブリン網の過剰な形成は炎症によって末梢血管から漏出した血漿蛋白を保持することによって組織の浮腫を遷延化させ鼻茸を形成する<sup>6)</sup>。今回の検討でもアスピリン喘息の鼻茸では非アスピリン喘息に比べてフィブリン網の形成が有意に多いことがわかった(図4a, b)。我々のこれまでの研究では鼻茸の形成にはフィブリン網を形成する凝固系と、フィブリン網を分解する線溶系の制御異常がフィブリン網を過剰に沈着させ、これが鼻茸の難治化、易再発性に深く関与していることを報告してきた<sup>6)</sup>。好酸球には凝固系の起点であるTFが発現していることが知られており<sup>20)</sup>、今回の検討でも鼻粘膜における好酸球数とフィブリン網の形成度は有意に正の相関を示した(図4d)。このことから好酸球がフィブリン網の形成に関与することが示唆される。TFとVIIaとの直接結合が凝固系の進行に必要ながTFは産生後は細胞質に存在し、細胞表面への表出メカニズムは不明であった<sup>21)</sup>。今回の検討でアスピリン喘息の鼻茸におけるTFは好酸球の表面



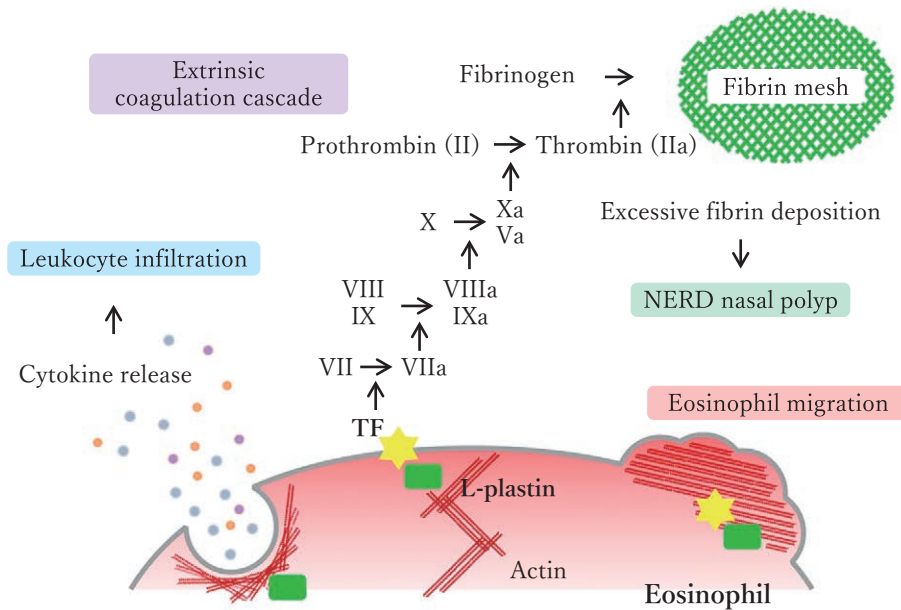


図7. アスピリン喘息の鼻茸において L-plastin の発現増加が鼻茸形成に関与する。

L-plastin によって TF が好酸球の細胞表面に表出し凝固因子 VII と直接結合することで凝固系が進行し鼻粘膜にフィブリン網が形成される。L-plastin はアクチン細胞骨格と結合し好酸球の遊走にも関与する。

に分布しており、L-plastin との共局在が細胞内でも観察された (図5)。さらに Eol-1 細胞を用いた実験では L-plastin の抑制によって GM-CSF 刺激による TF の細胞表面への表出はほぼ見られなくなった (図6)。T 細胞において CD69 と CD25 の細胞表面への表出に L-plastin が重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>22)</sup>。活性化された好酸球の TF は細胞表面に表出し<sup>11)</sup>、GM-CSF 刺激は L-plastin をリン酸化することによって好酸球を活性化し、さらに

L-plastin の細胞表面へ移動し細胞骨格との共局在は観察される<sup>8)9)</sup>。これらのことからアスピリン喘息の鼻茸の好酸球において L-plastin が GM-CSF の刺激によってリン酸化されることによって TF を細胞表面へ表出させ、凝固系を亢進させることによって鼻粘膜におけるフィブリン網も過剰産生を起こし、これが難治性の鼻茸形成に繋がると考えることは理にかなっていると思われる (図7)。

(高林 哲司)

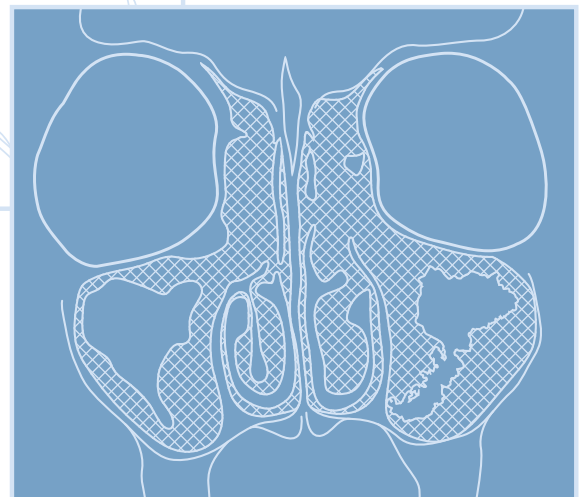
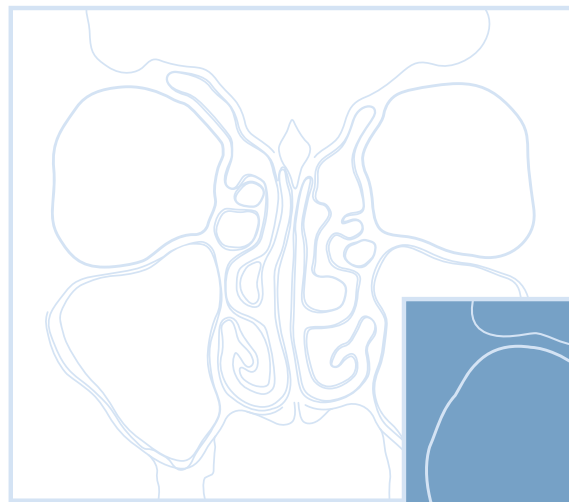
## 文献

- 1) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy*. 2015;70:995-1003.
- 2) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019;68:403-412.
- 3) Takabayashi T, Schleimer R. Formation of nasal polyps: the roles of innate type 2 inflammation and deposition of fibrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145:740-750.
- 4) Laidlaw TM, Boyce JA. Aspirin-exacerbated respiratory disease—New prime suspects. *N Engl J Med*. 2016;374:484-488.
- 5) Choi JH, Kim MA, Park HS. An update on the pathogenesis of the upper airways in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14:1-6.
- 6) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plas-

- minogen activator expression. Am J Respir Crit Care Med. 2013;187:49-57.**
- 7) **Stevens WW, Ocampo CJ, Berdnikovs S, et al. Cytokines in chronic rhinosinusitis. Role in eosinophilia and aspirin-exacerbated respiratory disease. Am J Respir Crit Care Med. 2015;192:682-694.**
  - 8) Morley SC. The actin-bundling protein L-plastin: a critical regulator of immune cell function. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:935173.
  - 9) Noh JY, Shin JU, Park CO, et al. Thymic stromal lymphopoietin regulates eosinophil migration via phosphorylation of L-plastin in atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2016;25:880-886.
  - 10) Pazdrak K, Young TW, Straub C, et al. Priming of eosinophils by GM-CSF is mediated by protein kinase C $\beta$ 1-phosphorylated L-plastin. *J Immunol.* 2011;186:6485-6496.
  - 11) Steinke JW, Liu L, Huyett P, et al. Prominent role of IFN- $\gamma$  in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:856-865. e1-3.
  - 12) Mullol J, Picado C. Rhinosinusitis and nasal polyps in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2013;33:163-176.
  - 13) Moosbauer C, Morgenstern E, Cuvelier SL, et al. Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood.* 2007;109:995-1002.
  - 14) Shimizu S, Ogawa T, Takezawa K, et al. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in nasal mucosa and nasal secretions of chronic rhinosinusitis with nasal polyp. *Am J Rhinol Allergy.* 2015;29:235-242.
  - 15) Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV. Tissue factor trafficking in fibroblasts: involvement of protease-activated receptor-mediated cell signaling. *Blood.* 2007;110:161-170.
  - 16) **Takabayashi T, Tanaka Y, Susuki D, et al. Increased expression of L-plastin in nasal polyp of patients with nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease. Allergy. 2019;74:1307-1316.**
  - 17) Mitsui C, Kajiwara K, Hayashi H, et al. Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:400-411.
  - 18) Laidlaw TM, Boyce JA. Platelets in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135:1407-1414.
  - 19) Laidlaw TM, Kidder MS, Bhattacharyya N, et al. Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood.* 2012;119:3790-3808.
  - 20) Tedeschi A, Kolkhir P, Asero R, et al. Chronic urticaria and coagulation: pathophysiological and clinical aspects. *Allergy.* 2014;69:683-691.
  - 21) de Boer JD, Majoor CJ, van 't Veer C, et al. Asthma and coagulation. *Blood.* 2012;119:3236-3244.
  - 22) Wabnitz GH, Köcher T, Lohneis P, et al. Costimulation induced phosphorylation of L-plastin facilitates surface transport of the T cell activation molecules CD69 and CD25. *Eur J Immunol.* 2007;37:649-662.

## 第7章

# 肥満細胞







## 好酸球性副鼻腔炎における肥満細胞の役割

### サマリー

好酸球性炎症を呈する慢性副鼻腔炎の鼻粘膜における肥満細胞の分布とフェノタイプについて検討を行った。鼻茸の上皮と腺上皮に肥満細胞の浸潤の増加を認め、それぞれの部位の肥満細胞は MC-T (tryptase+, chymase-), MC-TC (tryptase+, chymase+) のフェノタイプを呈していた。特に鼻粘膜上皮の肥満細胞に発現の増加を認める tryptase は鼻粘膜上皮から産生される上皮系サイトカインである IL-33, TSLP との間に positive feedback loop を形成し、鼻粘膜における type 2 炎症の形成と維持に深く関与していると考えられる。

### はじめに

慢性副鼻腔炎は慢性疾患の中で最も頻度の高い疾患の1つであるが、炎症の形態は単一ではなく複雑な病態が絡み合って疾患を形成することが知られており病態に応じた治療法が求められる<sup>1)2)</sup>。これまで我が国を含めた東アジア諸国と欧米諸国では副鼻腔炎における炎症のタイプは異なっているといわれていたため、基礎研究を含めた疾患の解明が滞っていた面もあった。しかし、JESREC studyによって副鼻腔炎の重症度分類ができるようになり難治性の好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) が定義されたことによって好酸球性炎症を呈する欧米の CRSwNP と ECRS がほぼ同じフェノタイプであることが示された<sup>3)~5)</sup>。

ECRS は Th2 優位の好酸球性炎症を呈し、鼻粘膜における IL-5, IL-13, eotaxin, eosinophil cationic protein (ECP) が著明に増加している。これらのサイトカインやケモカインが、鼻粘膜における好酸球性炎症を誘導し鼻茸形成を含めた疾患の形成に大きく関与していると考えられる<sup>6)~8)</sup>。

肥満細胞は細胞内にさまざまなケミカルメディエーターを含み、Th2 サイトカインを産生することから組織の浮腫やリモデリングおよび好酸球性炎症に関与しているといわれている<sup>9)</sup>。本来肥満細胞は生体防御に極めて重要な役割を果たしているが、肥満細胞の過剰な反応はアナフィラキシーショックや

各種アレルギー疾患の原因にもなる<sup>10)</sup>。肥満細胞は tryptase, chymase, carboxypeptidase A3 (CPA3) の3つの特異的なプロテアーゼを発現しておりその発現パターンによって粘膜型肥満細胞 (MC-T; tryptase), 組織型肥満細胞 (MC-TC; tryptase/chymase) の2種類に分類されている。MC-T は tryptase を多く含んでいるものの chymase や CPA3 はほとんど含まれておらず、MC-TC は3つのプロテアーゼ全てが発現している<sup>11)</sup>。これらの肥満細胞は生体における分布が異なっており MC-TC は主に皮膚の分布しており、MC-T は肺胞壁や気道上皮に分布している<sup>12)</sup>。また気管平滑筋内の MC-TC 数と気道過敏性が相関し、花粉飛散期には鼻粘膜上皮における MC-T 数が増加するなどフェノタイプと疾患への関与も報告されている<sup>13)14)</sup>。近年下気道や食道の好酸球性疾患において肥満細胞の浸潤が著明に増加し、それらのプロテアーゼの発現パターンがこれまでの分類と違ったものであることがわかってきた<sup>15)~18)</sup>。これまで慢性副鼻腔炎における肥満細胞の浸潤パターンやそのフェノタイプについてはこれまであまり検討されておらず、これらを明らかにすることで鼻粘膜における特に好酸球性炎症に肥満細胞がどのように関与しているのを明らかにすることは規治療法開発の糸口になる。

本研究ではコントロール、鼻茸のない慢性副鼻腔炎 (CRSsNP)、鼻茸のある慢性副鼻腔炎 (CRSwNP)

の鈎状突起 (UT), および鼻茸 (NP) における肥満細胞の発現, そして肥満細胞のプロテアーゼ発現パターンの解析を行った。

## 方法

### サンプル

ノースウエスタン大学免疫アレルギー・耳鼻咽喉科教室において副鼻腔炎に対して行った手術で採取した鼻粘膜組織を本研究に使用した。全ての患者に対してインフォームドコンセントをとり同施設の倫理委員会の承認を得ている。採取したサンプルはコントロール患者から採取した鈎状突起 (Control UT), CRSsNP患者の鈎状突起 (CRSsNP UT), CRSwNP患者の鈎状突起 (CRSwNP UT), CRSwNP患者の鼻茸組織の4群に分類して検討を行った。

### Real-Time PCR

鼻粘膜から total RNA を NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA), DNase I を用いて抽出した。Single-strand cDNA の作成には SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。Real-time RT-PCR は TaqMan method を用いて行った。

### ELISA

タンパク量の測定には次の ELISA キットを用いて測定した。Human Tryptase (Uscn Life Science, Inc, Wuhan, China)。発色の定量には Bio-Rad Spectrophotometer Model 680 Microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いた。Tryptase 濃度は鼻粘膜の総タンパク量を用いて標準化した。

### 免疫組織化学

免疫組織化学にはパラフィン切片を用いた。一次抗体には以下のものを使用し、4°C で一晩反応させた。Mouse anti-human tryptase mAb (Thermo Scientific, Fremont, CA), mouse anti-human chymase mAb (Thermo Scientific), rabbit anti-human CPA3 polyclonal antibody (HPA008689,

Sigma, St Louis, MO)。ネガティブコントロールとして同濃度の宿主動物の control IgG (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いた。二次抗体には biotinylated secondary goat anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) を室温 500 倍希釈で 1 時間反応させた。発色に ABC reagent (avidin-biotin-horseradish peroxidase complex; Vector Laboratories, Burlingame, CA) を使用した。各スライドは情報をブラインド下に 10 視野ずつ選択し、鼻粘膜の上皮、腺組織、間質における陽性細胞数を本研究に無関係な研究者 2 人が測定した。

### 統計解析

全てのデータは中間値 ± 標準誤差で表される。各群間の比較は Kruskal-Wallis ANOVA with Dunnett post hoc testing and Mann-Whitney U test を用い、相関は Spearman rank correlation を用いて解析を行った。P 値が 0.05 以下の場合有意差ありとした。

## 結果

### 慢性副鼻腔炎における肥満細胞の発現

本研究で使用したサンプルは Control 群鈎状突起 (UT) 42 例, CRSsNP UT 70 例, CRSwNP 91 例であった。

鼻粘膜における肥満細胞の発現を検討するためにまず肥満細胞に特異的なプロテアーゼである tryptase の発現量を real time PCR で測定した。内在性 Control には今回検討に用いた Control UT, CRSsNP UT, CRSwNP UT, NP の 4 群間に差がなかった housekeeping gene  $\beta$ -glucuronidase (GUSB) を用いた。Tryptase の発現量は NP において他の 3 群に比べて有意に多かった ( $P < 0.001$ ; 図 1a)。また同一 CRSwNP 患者における NP の tryptase 発現量は UT に比較して有意に多かった ( $P < 0.05$ ; data not shown)。上皮における tryptase の発現量を検討するために鼻粘膜擦過細胞から抽出した mRNA を用いて tryptase の発現量を real time PCR で検討した。その結果 NP 上皮における tryptase の発現量は Control UT および CRSsNP UT に比較して有意に多いこと

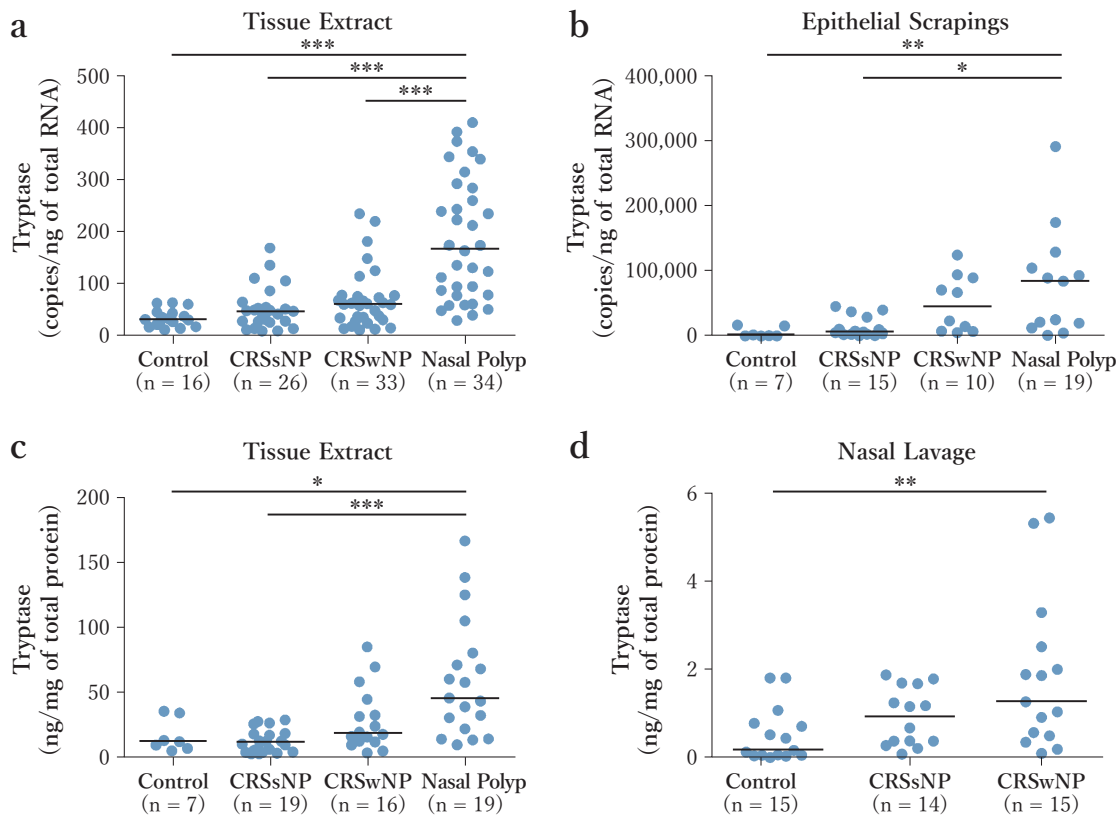


図1. 鼻粘膜組織における tryptase の発現量。

鉤状突起 (UT) と鼻茸 (NP) における (a) と鼻粘膜擦過細胞における (b) tryptase mRNA の発現量。鉤状突起 (UT) と鼻茸 (NP) における (c) と鼻腔洗浄液中における (d) tryptase タンパク濃度を ELISA 法によって測定した。Tryptase 濃度は組織抽出液における総蛋白量で標準化を行った。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

がわかった (図1b)。これらの結果を ELISA 法を用いてタンパクレベルでも確認した (図1c)。また鼻腔洗浄液中の tryptase の濃度も同様に CRSwNP 群において増加を認めた (図1d)。

鼻粘膜組織における肥満細胞の分布について検討を行うために anti-human tryptase mAb を用いて免疫組織化学を行った。Real time PCR と ELISA の結果と同様に NP において tryptase positive の細胞が多く認められ、その分布は鼻粘膜上皮および腺に多いことがわかった (図2)。Tryptase 陽性細胞数をカウントし半定量化を行うと、有意差をもって NP の粘膜上皮と腺上皮に tryptase 陽性細胞の浸潤が増加していることがわかった (図3a 左, 右)。また鼻粘膜の間質における tryptase 陽性細胞数は4群間に差を認めなかった (図3a 中央)。これらの結果から NP 組織において肥満細胞の浸潤が増加し、その分布は主に粘膜上皮と腺上皮で増加しており間質の肥満細胞数は変わらないことがわかった。

### 慢性副鼻腔炎肥満細胞の chymase の発現と分布

鼻粘膜に分布する肥満細胞のフェノタイプを検討するために chymase の発現を検討した。Real time PCR による検討では Control UT に比べて NP で chymase の発現量が増加していたが CRS サンプル3 群間には有意差を認めなかった (図4a)。また同一 CRSwNP 患者における NP の chymase 発現量は UT に比較して有意差はなかった (data not shown)。鼻粘膜擦過細胞を用いた検討でも chymase の mRNA レベルは4群間に有意な差は認められなかった (図4b)。次に慢性副鼻腔炎の鼻粘膜における chymase の分布を検討するために anti-human chymase mAb を用いて免疫組織化学を行った (図4c~f と図3b)。NP 粘膜上皮における chymase 陽性細胞数は Control UT 上皮に比べてわずかに多かったものの CRS 群間に有意差は認められなかった (図3b 左)。一方で NP の腺上皮における chymase 陽性肥満細胞数は他の3群に比べて有意に著明な増加を認めた



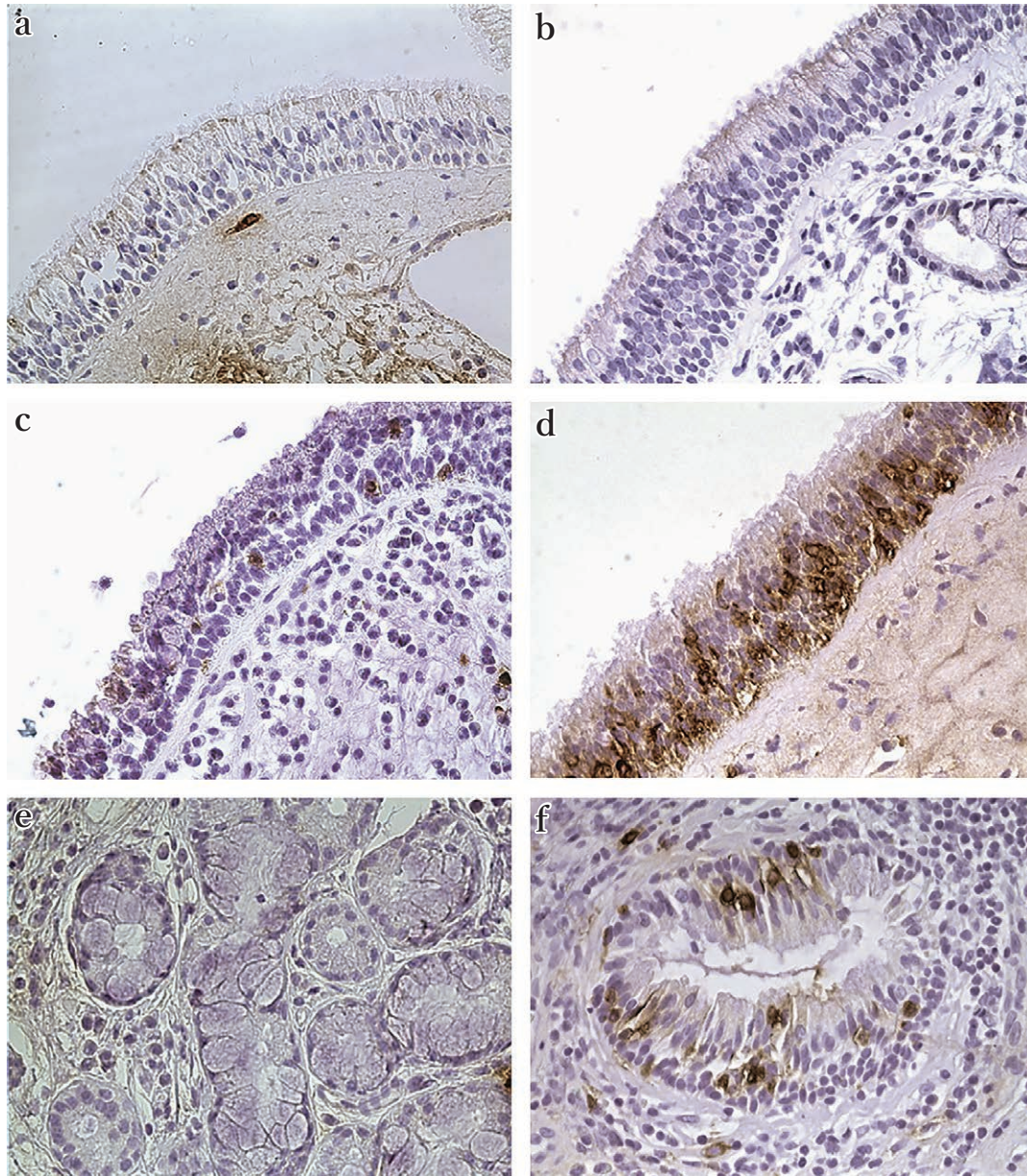


図2. 免疫組織化学による鉤状突起 (UT) と鼻茸 (NP) におけるtryptase発現.

鼻粘膜上皮; (a) コントロールUT, (b) CRSsNP UT, (c) CRSwNP UT, (d) NP. 腺上皮; (e) コントロールUT, (f) NP.  $\times 400$ .

(図3b右). また間質における chymase陽性肥満細胞数は4群間に差を認めなかった(図3b中央).

#### 慢性副鼻腔炎肥満細胞のCPA3の発現と分布

次にCPA3の発現を検討した. Real time PCRによる検討ではNPにおけるCPA3の発現量は他の3群に比べて有意に著明に増加が認められた( $P < 0.001$ ; 図5a). また同一CRSwNP患者におけるNPのCPA3発現量はUTと比較して有意に多かった( $P < 0.05$ ; data not shown). 鼻粘膜擦過細胞から抽

出したmRNAを用いてCPA3の発現量をreal time PCRで検討した結果, NP上皮におけるCPA3の発現量はControl UTおよびCRSsNP UTと比較して有意に多いことがわかった( $P < 0.01$ ; 図5b). 次に慢性副鼻腔炎の鼻粘膜におけるCPA3の分布を検討するためにanti-human CPA3 polyclonal Abを用いて免疫組織化学を行った. CPA3陽性細胞はNPの粘膜上皮と腺上皮, および間質に認められた(図5c~f). またCPA3陽性細胞数はNPで他の3群と比較して, 粘膜上皮( $P < 0.001$ )と腺上皮( $P < 0.01$ )で有意に



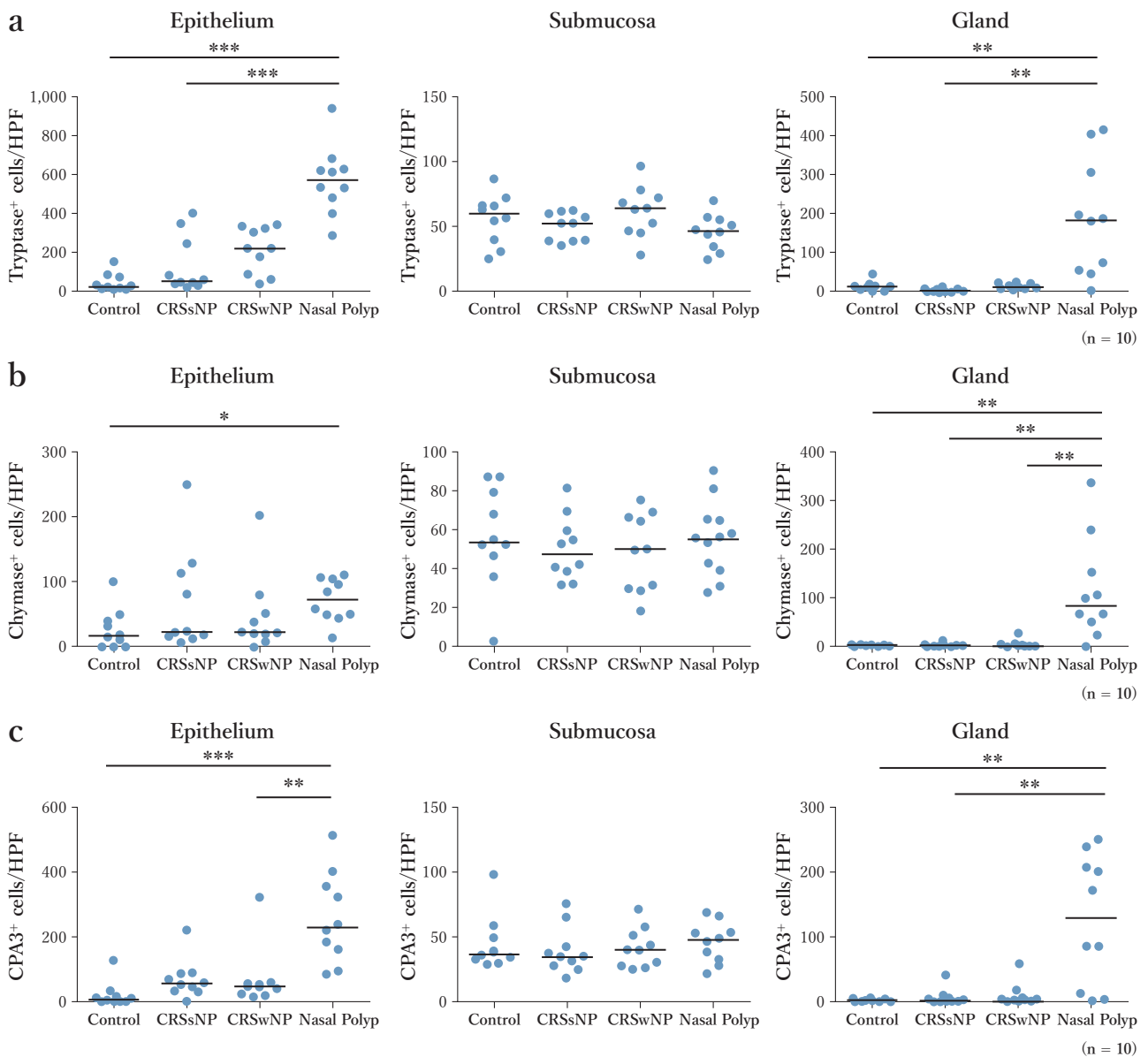


図3. 鼻粘膜における肥満細胞プロテアーゼの領域別陽性細胞数。

(a) tryptase, (b) chymase, (c) CPA3. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

著明に増加していた。一方間質におけるCPA3陽性細胞数は4群間に有意な差は認められなかった(図3c)。

### 慢性副鼻腔炎肥満細胞のフェノタイプ

慢性副鼻腔炎の肥満細胞のフェノタイプを明らかにするために本研究で検討した3つの肥満細胞特異的プロテアーゼに対する蛍光二重染色を行った。NPにおいて肥満細胞数の増加を認めた粘膜上皮と腺上皮において検討した。その結果NP粘膜上皮においてtryptase陽性細胞のほとんどがchymaseを発現し

ていなかった(mean and SEM tryptase single positive:  $74.8\% \pm 3.7\%$ ;  $n=10$ , 図6a)。一方でNP粘膜上皮においてtryptase陽性細胞のほとんどがCPA3陽性であった(mean and SEM double positive:  $84.2\% \pm 2.9\%$ ;  $n=10$ , 図6b)。NP腺上皮に浸潤した肥満細胞においてはtryptase陽性細胞のほとんどがchymase陽性であった(mean and SEM double positive:  $79.5\% \pm 4.0\%$ ;  $n=10$ , 図6c)。さらにtryptaseとCPA3もほとんどの肥満細胞とともに発現していることがわかった(mean and SEM double positive:  $87.7\% \pm 2.7\%$ ;  $n=10$ , 図6d)。この結果からNP腺上

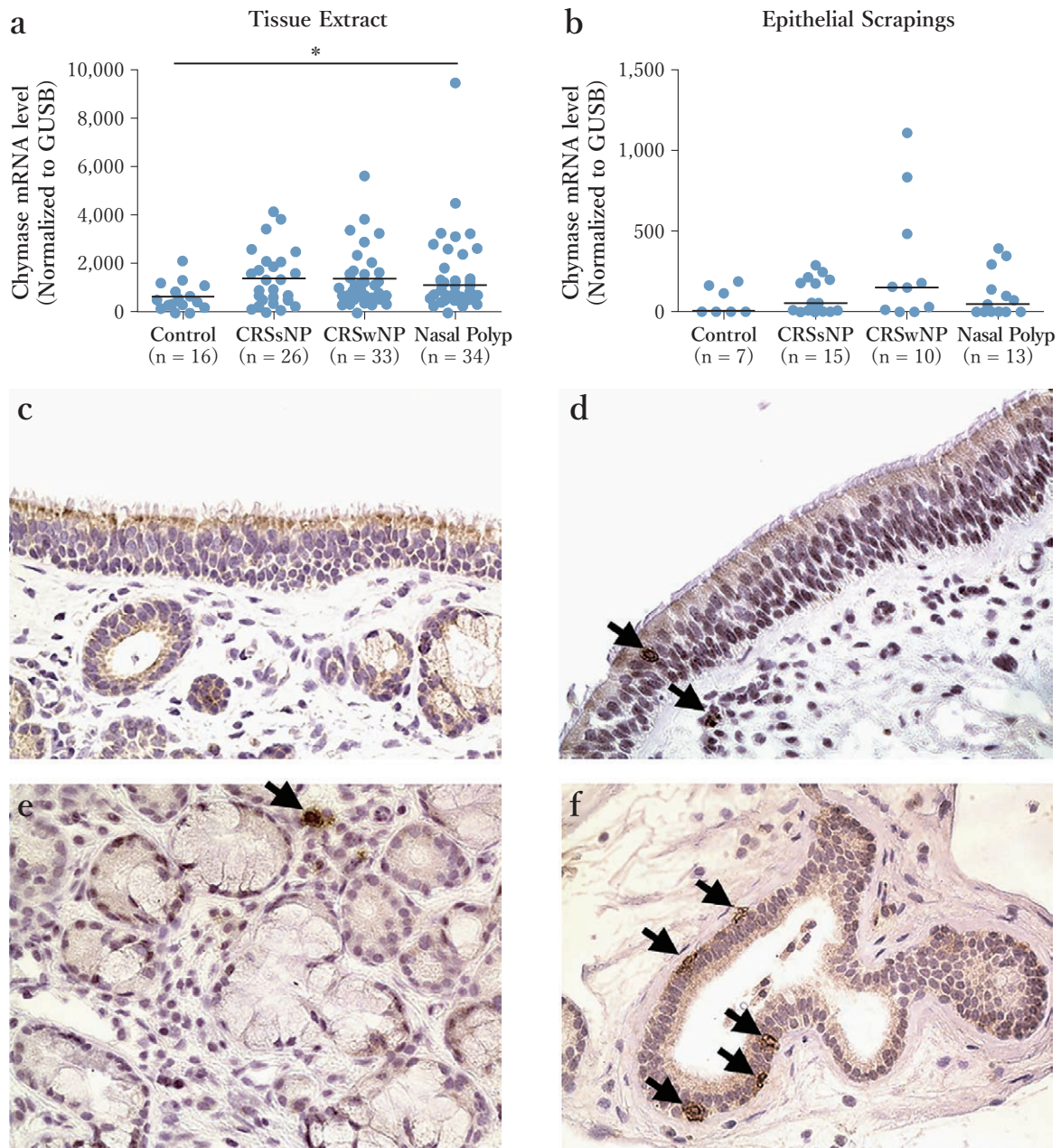


図4. 鼻粘膜におけるchymaseの発現.

(a) 鼻粘膜組織におけるchymaseのmRNA発現量, (b) 鼻粘膜擦過細胞におけるchymaseのmRNAの発現量. Chymaseの免疫組織化学. 鼻粘膜上皮; (c) コントロールUT, (d) NP. 腺上皮; (e) コントロールUT, (f) NP.  $\times 400$ . \* $P < 0.05$ .

皮に浸潤した肥満細胞は3つの特異的プロテアーゼ全てを発現するMC-TCであることがわかった. 一方NP上皮の肥満細胞はtryptaseとCPA3を発現するもののchymaseの発現はほとんど認められず, このプロテアーゼの発現パターンはMC-TまたはMC-TCいずれのタイプにも該当しないタイプある.

## 考察

本研究で鼻粘膜における高度の好酸球性の炎症を呈するCRSwNP患者における鼻茸組織において肥満細胞の数がコントロールサンプル, および非好酸球性炎症を呈するCRSsNP患者の鉤状突起粘膜に比べて有意に増加していることを明らかにした. また鼻茸における肥満細胞数の増加は粘膜上皮と腺上皮



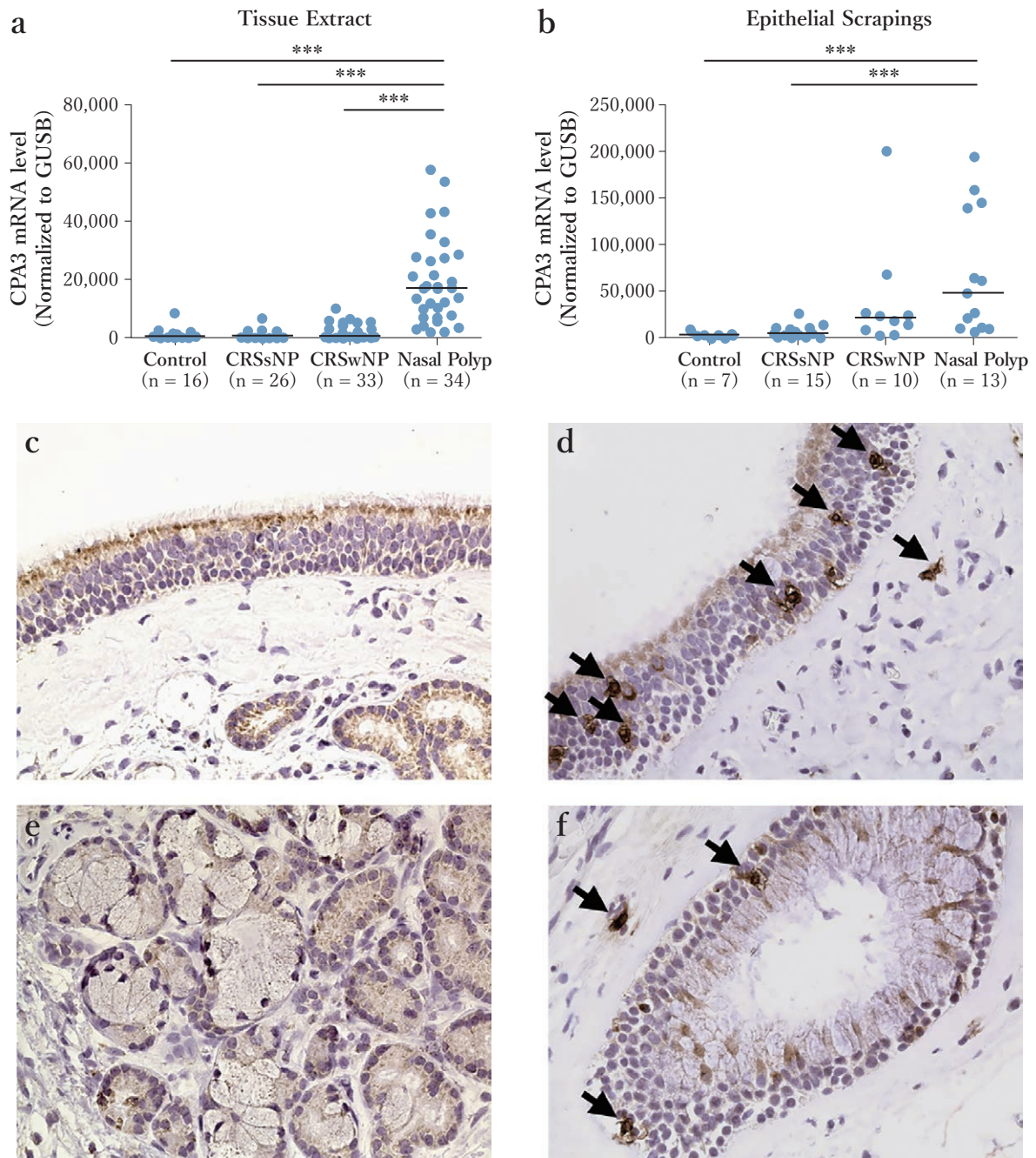


図5. 鼻粘膜におけるCPA3の発現.

(a) 鼻粘膜組織におけるCPA3のmRNA発現量, (b) 鼻粘膜擦過細胞におけるCPA3のmRNAの発現量. CPA3の免疫組織化学. 鼻粘膜上皮; (c) コントロールUT, (d) NP. 腺上皮; (e) コントロールUT, (f) NP.  $\times 400$ .  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ .

に認められ間質における肥満細胞数には差がなかった. また鼻茸粘膜上皮の肥満細胞にはtryptase, CPA3が発現しchymaseはほとんど発現していなかった. 一方鼻茸腺上皮の肥満細胞にはtryptase, chymase, CPA3の全てが高発現しており, 鼻茸組織の部位によって肥満細胞のフェノタイプが異なることがわかった<sup>19)</sup>.

肥満細胞の機能としてIgEのクロスリンクを介した脱顆粒反応によるI型アレルギーが良く知られており, アナフィラキシーショックや気管支喘息, アレルギー性鼻炎などの疾患の主な原因である<sup>10)</sup>. また最近では創傷治癒過程の制御に肥満細胞が積極的に関与するなど生体の恒常性にも重要な役割を果たしていることがわかってきた<sup>9)</sup>. CRSwNPはTh2優

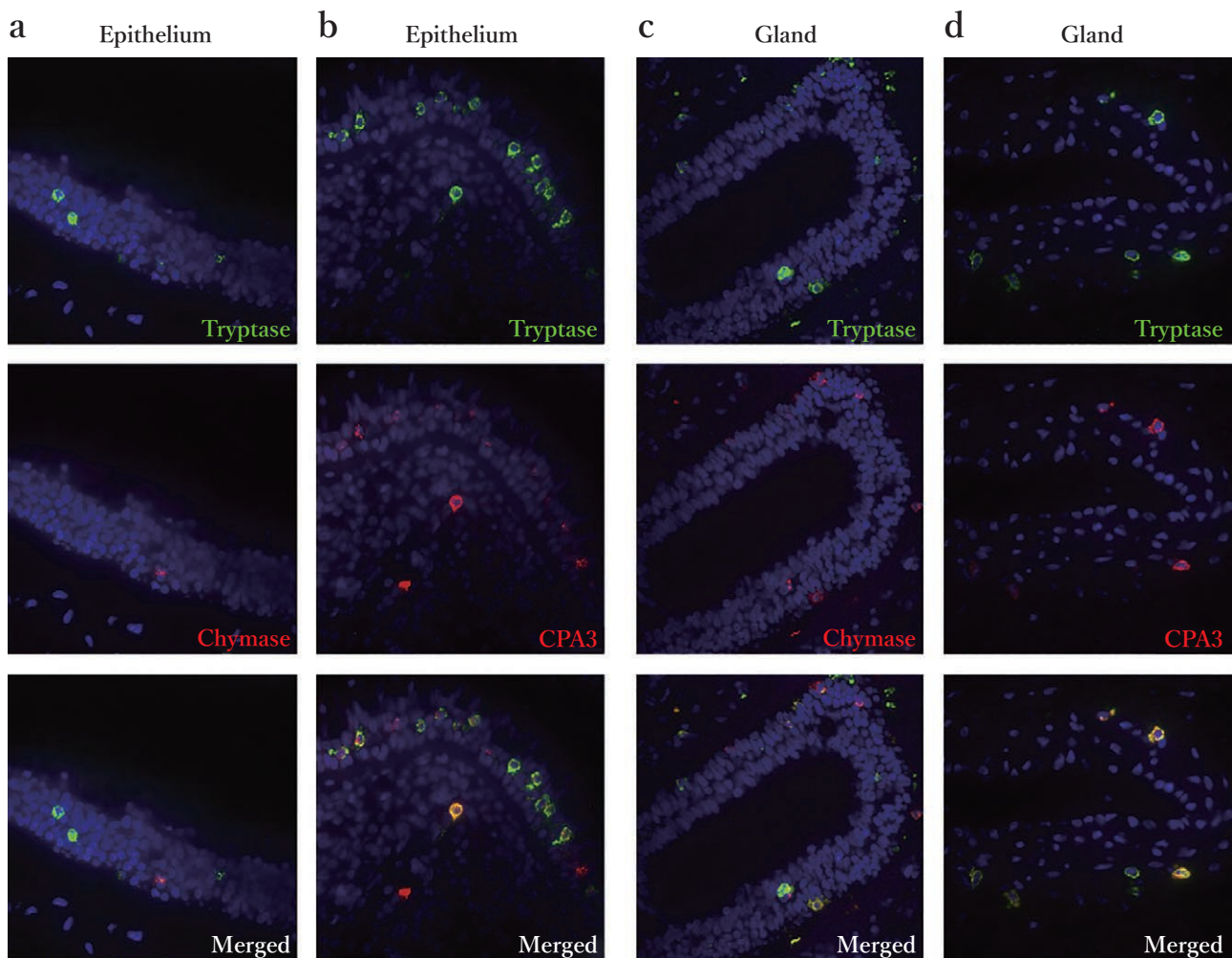


図6. NPにおける肥満細胞プロテアーゼの蛍光免疫染色.

粘膜上皮：(a) tryptase (緑色), chymase (赤色), (b) tryptase (緑色), CPA3 (赤色). 腺上皮：(c) tryptase (緑色), chymase (赤色), (d) tryptase (緑色), CPA3 (赤色). 核はDAPI染色を行った(青色).

位の炎症を呈し鼻粘膜における著明な好酸球浸潤をきたし、好酸球による組織障害が病態形成に深く関与しているといわれている<sup>20)</sup>. 肥満細胞はIL-5, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, eotaxin, RANTESなど好酸球を活性化するサイトカインを多量に産生する<sup>21)</sup>. 好酸球内のECPは肥満細胞を活性化を促し、脱顆粒反応を誘導することから、CRSwNPの鼻粘膜において肥満細胞と好酸球の相互作用が炎症の増悪と遷延化に関与しているものと思われる. 実際に本研究でも鼻粘膜におけるECPとtryptaseの濃度には有意に正の相関を認めたと<sup>19)</sup>.

これまでアレルギー疾患における肥満細胞は、抗原の刺激を受けると粘膜表面に移動してくるが組織全体の数は変わらないといわれていた<sup>22)</sup>. 本研究で

はCRSwNP患者の鼻茸組織においては分布の変化だけでなく肥満細胞の数が増加することも明らかにした. この現象は鼻粘膜の肥満細胞において何らかの遊走および増殖メカニズムの存在を示唆している. 気道上皮から産生されるstem cell factor (SCF)は肥満細胞に対して遊走と増殖を促進し、実際に鼻茸組織におけるSCF発現の増加も報告されている<sup>23)</sup><sup>24)</sup>. またTh2サイトカインによって発現が亢進する上皮のeotaxinもCCR3を介して肥満細胞の遊走に関与する<sup>25)</sup>. 鼻茸組織においてSCF, eotaxin-1, eotaxin-2, eotaxin-3の発現量は増加し、それらはtryptaseのmRNAの発現量と有意に正の相関をすることも明らかにしており<sup>19)</sup>, 鼻粘膜上皮由来のSCFが鼻茸組織における肥満細胞の遊走と生存に関与すると予想



できる。ほかに神経ペプチドである substance P (SP), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), leukotriene B4などが肥満細胞の活性に関与する分子としてあげられるが<sup>26)~28)</sup>, 肥満細胞の遊走と増殖に関するメカニズムに関しては更なる検討が必要である。

CRSwNP患者における鼻腔洗浄液中の tryptase 濃度が増加していること (図1d) から肥満細胞は活性化された状態であると考えられる。肥満細胞の活性化に関していくつかのメカニズムが考えられる。ブドウ球菌のコロニー形成は好酸球性副鼻腔炎で認められ、ブドウ球菌エンテロトキシンは肥満細胞を活性化する<sup>29) 30)</sup>。また神経ペプチドはFcεRIのクロスリンクとは無関係に肥満細胞の活性化に関与し、SPとVIPが肥満細胞の脱顆粒とケモカイン産生を増加させることが報告されている<sup>31)</sup>。SPは肥満細胞における toll like 受容体2 (TLR2) の発現量を増加させ、TLR2を介した leukotriene C4とIL-8の産生を増加させる<sup>26)</sup>。ラットを用いた検討では鼻粘膜上皮に注射された神経の80%にSPの発現を認めている<sup>32)</sup>。これらのことから神経ペプチドが粘膜上皮や腺上皮の肥満細胞に働いて病態の形成に関与することは十分考えられる。

上皮系サイトカインIL-33, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-25が組織のTh2炎症を強力に誘導することが知られている<sup>33)</sup>。TSLPは肥満細胞からIL-5産生を誘導し<sup>34)</sup>, IL-33はIL-13の産生を誘導する<sup>35)</sup>。さらに tryptase は鼻粘膜上皮に発現している proteinase-activated receptor 2 (PAR-2) を介して TSLP 産生を亢進させ<sup>36) 37)</sup>, IL-33を切断修飾することで活性化する<sup>38)</sup>。これらの結果から鼻粘膜上皮に浸潤した肥満細胞と上皮の間にTh2炎症を増幅する positive feedback loop が形成され、鼻粘膜のアレルギー炎症の形成に大きな影響を与えている可能性が高い。

本研究で鼻茸上皮に浸潤した肥満細胞は tryptase+, CPA3+, chymase- のプロテアーゼ発現パターンを示しておりこれまでの報告にあるような MC-T または MC-TC の分類には当てはまらないフェノタイプであった。このフェノタイプに類似した肥満細胞の増加がTh2炎症優位の気管支喘息およ

び好酸球性食道炎でも報告された<sup>17) 18)</sup>。重症喘息における肥満細胞はMC-TCで tryptase+, CPA3+, chymase+ であり、プロスタグランジンD2の濃度が上昇していることからMC-TCはアラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼ系が優位であると考えられている<sup>39) 40)</sup>。鼻茸上皮に認められる tryptase+, CPA3+, chymase- の肥満細胞はリポキシゲナーゼ系が優位になっており、これがアレルギー性炎症の増悪を誘導している可能性も考えられる。

鼻粘膜上皮の肥満細胞が tryptase+, CPA3+, chymase- の発現パターンに変化するメカニズムに関しては良くわかっていないが、IL-13刺激を加えた気道上皮と肥満細胞を共培養することによって tryptase, CPA3 の発現は変化しないが chymase の発現が低下することが報告されている<sup>18) 41)</sup>。鼻茸組織においてはTh2細胞やinnate type 2細胞など強力にIL-13を産生する細胞が存在しており、Th2優位のIL-13存在下では肥満細胞は tryptase+, CPA3+, chymase- のフェノタイプに変化するのではないかと考えている。

鼻茸の腺上皮の浸潤が増加した肥満細胞は tryptase+, CPA3+, chymase+ のMC-TC型であった。鼻粘膜における腺の分泌過剰は慢性副鼻腔炎の特徴の1つで、好酸球性副鼻腔炎において膨張した鼻腺を頻繁に認める<sup>42)</sup>。これまでの研究で鼻茸組織の腺上皮におけるムチン遺伝子 *MUC5B* の発現が亢進し<sup>43)</sup>, プロスタグランジンD2は *MUC5B* の発現を亢進させることが報告されている<sup>44)</sup>。MC-TC型の肥満細胞はアラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼ系が有意となりプロスタグランジンD2産生が増加することから腺上皮に浸潤した肥満細胞が腺の分泌過多を誘導し病態の形成に関与していると考えている。

好酸球性炎症を呈する鼻茸組織において粘膜上皮と腺上皮のそれぞれ異なったフェノタイプの肥満細胞の増加が認められた。これらの肥満細胞がそれぞれ異なる作用を発揮することによって病態の形成に関与し、好酸球性炎症における鼻茸の難治性、易再発性に関与していると思われる。

(高林 哲司)

## 文献

- 1) Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, et al. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:155-212.
- 2) Hamilos DL. Chronic rhinosinusitis patterns of illness. *Clin Allergy Immunol.* 2007;20:1-13.
- 3) **Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy.* 2015;70:995-1003.**
- 4) **Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2019;68:403-412.**
- 5) **Takabayashi T, Schleimer R. Formation of nasal polyps: the roles of innate type 2 inflammation and deposition of fibrin. *J Allergy Clin Immunol* 2020;145:740-750.**
- 6) Van Bruaene N, Perez-Novo CA, Basinski TM, et al. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1435-1441.
- 7) Polzehl D, Moeller P, Riechelmann H, et al. Distinct features of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Allergy.* 2006; 61:1275-1279.
- 8) Perez-Novo CA, Claeys C, Van Cauwenberge P, et al. Expression of eicosanoid receptors subtypes and eosinophilic inflammation: implication on chronic rhinosinusitis. *Respir Res.* 2006;7:75
- 9) Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2010;10:440-452.
- 10) Beaven MA. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol.* 2009;39:11-25.
- 11) Schwartz LB. Analysis of MC(T) and MC(TC) mast cells in tissue. *Methods Mol Biol.* 2006;315:53-62.
- 12) Brightling CE, Bradding P, Symon FA, et al. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* 2002;346:1699-1705.
- 13) Gibson PG, Allen CJ, Yang JP, et al. Intraepithelial mast cells in allergic and nonallergic asthma—Assessment using bronchial brushings. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:80-86.
- 14) Juliusson S, Pipkorn U, Karlsson G, et al. Mast-cells and Eosinophils in the allergic mucosal response to allergen challenge—Changes in distribution and signs of activation in relation to symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;90:898-909.
- 15) Balzar S, Fajt ML, Comhair SA, et al. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma: data from the severe asthma research program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:299-309.
- 16) Karen S. Hsu Blatman M, Nirmala G, et al. Expression of mast cell-associated genes is upregulated in adult eosinophilic esophagitis and responds to steroid or dietary therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 125:1307-1308.
- 17) Abonia JP, Blanchard C, Buckmeier BK, et al. Involvement of mast cells in Eosinophilic Esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:Ab132-Ab.
- 18) Dougherty RH, Sidhu SS, Raman K, et al. Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique protease phenotype in T(H)2-high asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:1046.
- 19) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:410-420**
- 20) Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy* 2006;61:1280-1289.
- 21) Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6:135-142.
- 22) Enerback L, Karisson G, Pipkorn U. Nasal mast cell response to natural allergen exposure. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1989;88:209-211.
- 23) Kowalski ML, Lewandowska-Polak A, Wozniak J, et al. Association of stem cell factor expression in nasal polyp epithelial cells with aspirin sensitivity and asthma. *Allergy* 2005;60:631-637.
- 24) Otsuka H, Kusumi T, Kanai S, et al. Stem cell factor mRNA expression and production in human nasal epithelial cells: Contribution to the accumulation of mast cells in the nasal epithelium of allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102:757-764.
- 25) Price KS, Friend DS, Mellor EA, et al. CC chemokine receptor 3 mobilizes to the surface of human mast cells and potentiates immunoglobulin E-dependent generation of interleukin 13. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:420-427.
- 26) Tancowny BP, Karpov V, Schleimer RP, et al. Substance P primes lipoteichoic acid- and Pam3CysSerLys4-

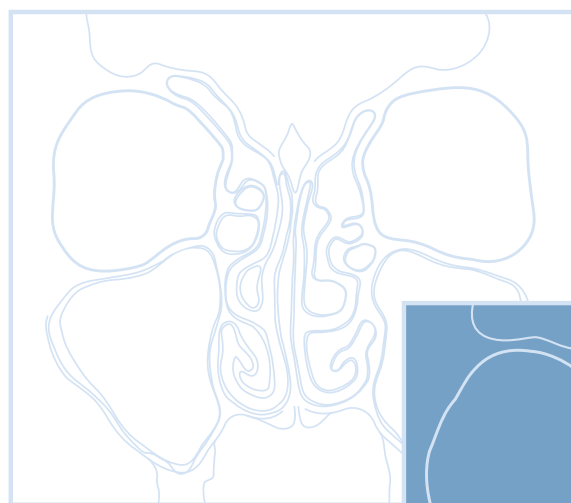
- mediated activation of human mast cells by up-regulating Toll-like receptor 2. *Immunology* 2010;131:220-230.
- 27) Maintz L, Wardelmann E, Walgenbach K, et al. Neuropeptide blood levels correlate with mast cell load in patients with mastocytosis. *Allergy* 2011;66:862-869.
- 28) Weller CL, Collington SJ, Brown JK, et al. Leukotriene B<sub>4</sub>, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. *J Exp Med*. 2005;201:1961-1971.
- 29) Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, et al. Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:1840-1847.
- 30) Verbruggen K, Van Cauwenberge P, Bachert C. Anti-IgE for the treatment of allergic rhinitis and eventually nasal polyps? *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;148:87-98.
- 31) Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, et al. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* 2008;123:398-410.
- 32) Hunter DD, Dey RD. Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium. *Neuroscience*. 1998;83:591-599.
- 33) Allakhverdi Z, Comeau M, Ziegler SF, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is released by human epithelial cells in response to microbes and potently activates mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:523-528.
- 34) Nagarkar DR, Poposki JA, et al. Comeau MR, Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:225-232.
- 35) Iikura M, Suto H, Kajiwara N, et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest*. 2007;87:971-978.
- 36) Kouzaki H, O'Grady SM, Lawrence CB, et al. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol*. 2009;183:1427-1434.
- 37) Levi-Schaffer F, Piliponsky AM. Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. *Trends Immunol*. 2003;24:158-161.
- 38) Lefrançois E, Duval A, Mirey E, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(43):15502-15507.
- 39) Balzar S, Fajt ML, Comhair SAA, et al. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma data from the severe asthma research program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:299-309.
- 40) Boyce JA. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev*. 2007;217:168-185.
- 41) Hsieh FH, Sharma P, Gibbons A, et al. Human airway epithelial cell determinants of survival and functional phenotype for primary human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14380-14385.
- 42) Tos M, Mogensen C. Mucous glands in nasal polyps. *Arch Otolaryngol* 1977;103:407-413.
- 43) Ali MS, Wilson JA, Bennett M, et al. Mucin gene expression in nasal polyps. *Acta Otolaryngol*. 2005;125:618-624.
- 44) Choi YH, Lee SN, Aoyagi H, et al. The Extracellular Signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 protein kinase 1 cascade phosphorylates cAMP response element-binding protein to induce MUC5B gene expression via D-prostanoid receptor signaling. *J Biol Chem*. 2011;286:34199-34214.





## 第 8 章

# マウスモデル





## 8-1

## 2型自然リンパ球活性化による鼻副鼻腔2型炎症増悪とステロイド抵抗性の獲得について

### サマリー

鼻粘膜に Th2 細胞と ILC2 を同時に誘導させた好酸球性副鼻腔炎想定マウスモデルを作成し、ILC2 が鼻 type 2 炎症に関わるメカニズムについて検討した。さまざまな遺伝子改変マウスを用いて、ILC2 が IL-33/ST2 伝達経路を介して鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤を増悪させること、鼻粘膜肥厚増悪因子として ILC2 由来の IL-13 が重要であることを確認した。さらに、ILC2 活性化により増悪した鼻粘膜肥厚はステロイド抵抗性を獲得することも確認した。今回の検討結果により、難治性疾患である好酸球性副鼻腔炎の治療ターゲットとして、ILC2 および ILC2 活性化因子である IL-33 を制御することが重要であると考えられる。

### はじめに

鼻副鼻腔領域において、アレルギー性鼻炎と chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) は重要な2型炎症関連疾患である。アレルギー性鼻炎の症状はIgEを介した肥満細胞脱顆粒による早期反応(くしゃみ, 鼻水)と, 炎症細胞浸潤と血管透過性の亢進による遅発反応(鼻閉)が特徴的である<sup>1)2)</sup>。CRSwNPは慢性副鼻腔炎(CRS)のTh2優位のサブタイプであり, 鼻茸(NP)の存在と好酸球浸潤により特徴づけられる<sup>3)~5)</sup>。Th2細胞は, IL-4, IL-5, IL-13のようなtype 2サイトカインを産生し, その病態形成の中心的な役割を担っている<sup>1)~5)</sup>。IL-5は好酸球の遊走, 癒着, 生存に関わり, 組織好酸球浸潤を促進し, IL-13も好酸球過多をきたすとともに杯細胞と上皮細胞の過形成を促進する<sup>5)</sup>。さらにtype 2サイトカインは鼻粘膜上皮のtissue plasminogen activator (t-PA)を抑制, 線維化を促進し, その結果CRSwNPの鼻茸を形成する<sup>4)</sup>。

2型自然リンパ球(group 2 innate lymphoid cells; ILC2s)は, 2010年に同定された新しい細胞集団で, 上皮由来のIL-25, IL-33, TSLP (thymic stromal lymphopoietin)に反応して多量のtype 2サイトカインを産生する<sup>6)~9)</sup>。パパイン(papain), アルテル

ナリア, ダニを吸入することで, IL-33を介したILC2活性化が誘導され, 獲得免疫に依存しないアレルギー性肺炎が起こる<sup>10)~13)</sup>。さらに, ILC2は細胞間接触やMHC-class IIを介して直接的に, またIL-13を介して樹状細胞に作用し間接的にTh2細胞分化を促進する<sup>14)~18)</sup>。よって, ILC2はtype 2サイトカイン産生とTh2細胞活性化によりアレルギー性肺炎を増悪させる(図1)。

実際にILC2は鼻副鼻腔疾患の病態に関与している。季節性アレルギー性鼻炎, 猫アレルギーの患者では末梢血中ILC2が増加し<sup>19)~21)</sup>、CRSwNP患者では鼻茸中にILC2の増加が認められる<sup>22)~26)</sup>。つまり, ILC2は鼻副鼻腔2型炎症を促進している可能性が考えられる。しかし, 鼻粘膜のILC2に注目したマウス実験は少なく, 鼻アレルギー疾患におけるILC2の役割, Th2細胞との関係性もよくわかっていない。

今回我々は, Th2細胞を誘導する抗原として卵白アルブミン(ovalbumin; OVA), ILC2を活性化する物質としてパパイン(papain)を用いて, Th2細胞とILC2の関係性を検討した。その結果, Th2細胞とILC2を同時に活性化することで, 鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤が相乗的に増悪されることを明らかにした。また, IL-33/ST2伝達経路を介したILC2活性化によ

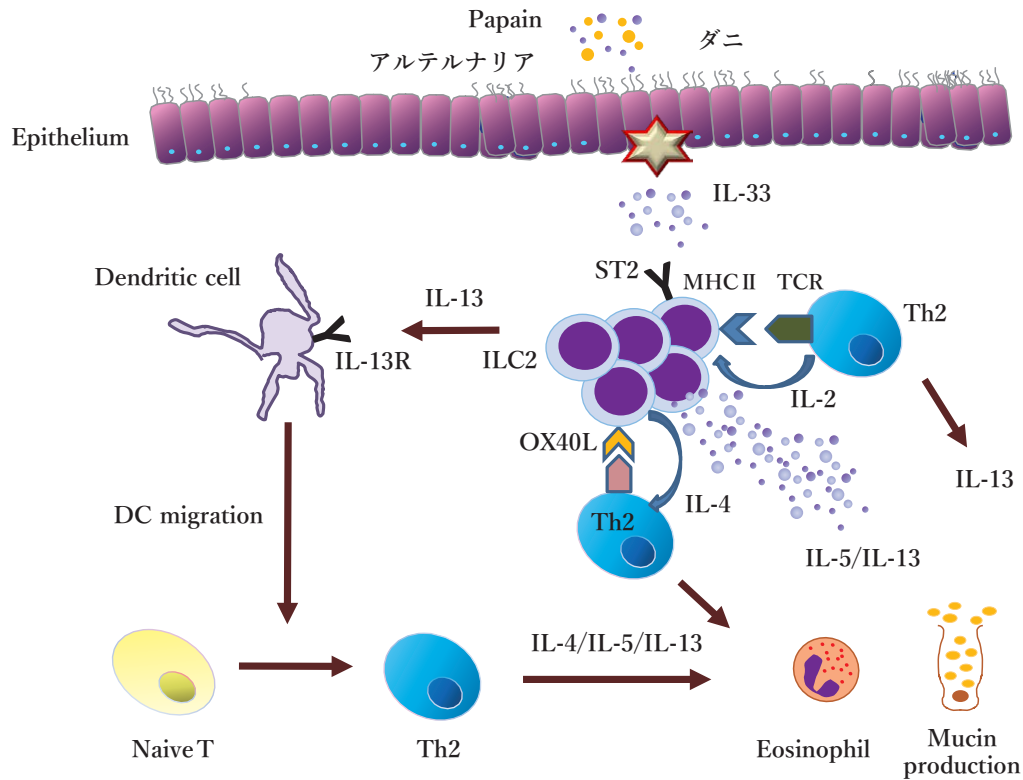


図1. ILC2 活性化による2型炎症誘導メカニズム.

IL-33で活性化されたILC2は多量のtype 2サイトカインを産生し、2型炎症を誘導する。一方、ILC2はOX40L、MHC-class IIを介してTh2細胞分化を直接的に促進し、またILC2由来のIL-13は樹状細胞にも作用しTh2細胞分化を間接的に促進し、2型炎症を誘導する。

り、鼻粘膜肥厚のステロイド抵抗性が獲得されることが示唆された。

## 実験方法

### マウスモデル

マウスに、①PBS、②OVA、③papain、④OVA + papainをそれぞれ2週間点鼻投与する実験系を作成した(図2a)。1, 3, 6, 8, 10, 13日目に点鼻を行い、最終点鼻24時間後に鼻組織を採取した。脱灰後、ホルマリン固定・パラフィン切片(HE染色)を作成し、鼻粘膜肥厚および鼻粘膜下好酸球浸潤について検討した。抗IL-5抗体(100 µg)を腹腔内投与(1, 5, 8, 12日目)し、好酸球を欠損させる実験系、各点鼻の24時間前・2時間前に、デキサメタゾン(2.5もしくは5 mg/kg)を腹腔内投与する実験系も作成した。

### 使用マウス

マウスは、野生型(WT)マウス(BALB/c, C57BL/6)、IL33 KOマウス(IL-33<sup>-/-</sup>)、ST2 KOマウス(*Il1rl1*<sup>-/-</sup>)、Rag2 KOマウス(Rag2<sup>-/-</sup>, T/B細胞欠損マウス)、*Rora*<sup>sg/sg</sup> BMT (bone marrow transplanted) マウス(ILC2欠損マウス)、 $\Delta$ dblGATAマウス(好酸球欠損マウス)、IL13 KOマウス(IL-33<sup>-/-</sup>)を使用した。

### フローサイトメトリーによる解析

鼻粘膜中の細胞を、表面マーカー: CD45, lineage (CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD19, DX-5, Gr-1, Siglec F, IgE), Thy1.2, ST2で染色し、ILC2をLineage<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>Thy1.2<sup>+</sup>細胞として同定した(図2c)。

### Quantitative RT-PCR

鼻粘膜中のCD4<sup>+</sup>T細胞をAuto MACS (anti-mouse-CD4 MicroBeads: L3T4)を用いて抽出し、



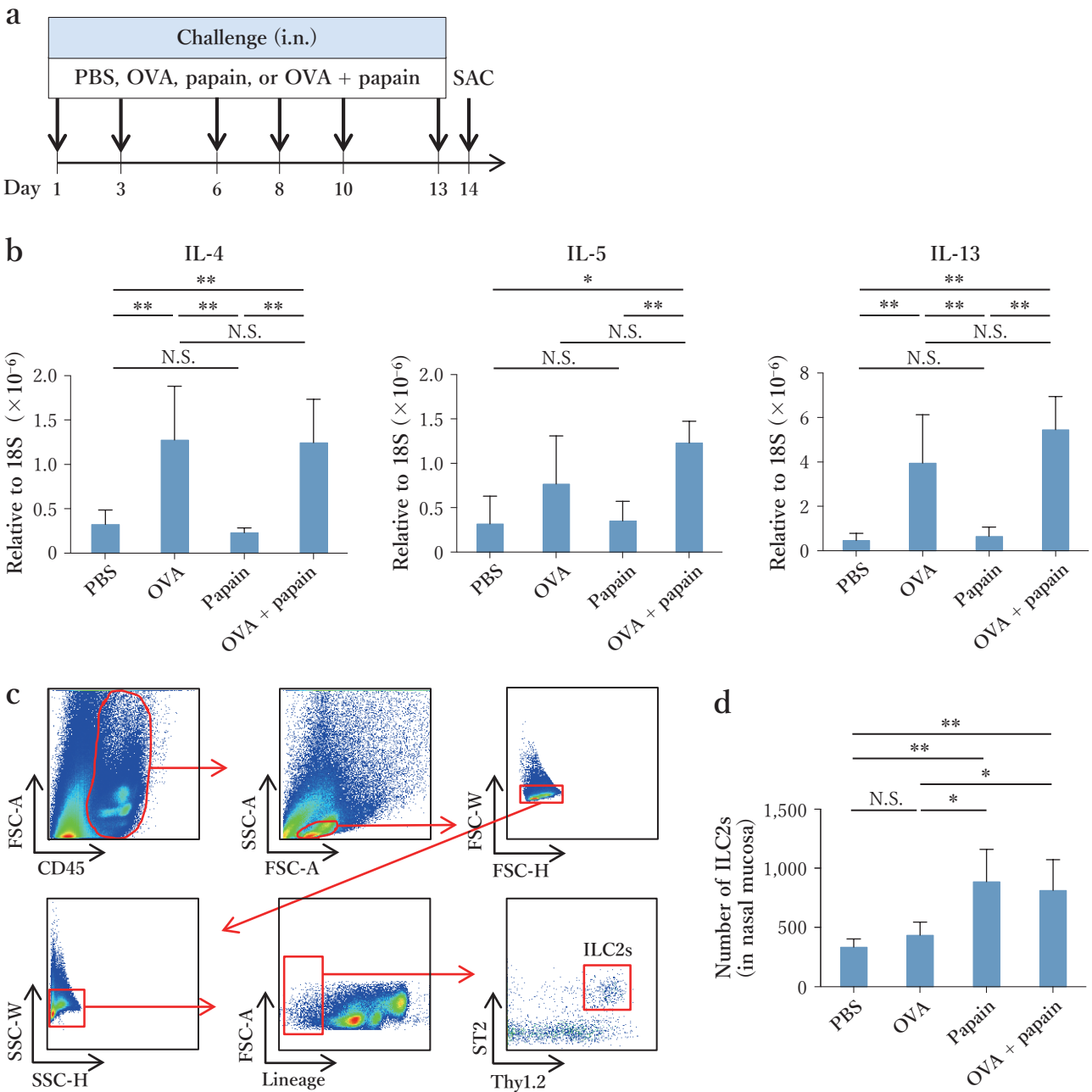


図2. OVAによるTh2細胞の活性化とpapainによるILC2活性化について。

(a) 実験のプロトコル。(b) OVA, papainによる刺激で誘導される鼻粘膜中CD4<sup>+</sup>T細胞のmRNA (IL-4, IL-5, IL-13)を示す。RT-PCRにて定量した。(c) Lineage<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>Thy1.2<sup>+</sup>のゲーティングによって区別される鼻粘膜ILC2。(d) 各刺激における鼻粘膜ILC2の誘導をフローサイトメトリーで検討した。PapainでILC2が誘導される。

そのCD4<sup>+</sup>T細胞からTotal RNAを抽出した。TaqMan probe (IL-4, IL-5, IL-13, 18S rRNA) を使用してRT-PCRを行い、18S rRNAを基準としたrelative expressionとして測定した。

## 結果

### OVA → Th2細胞, papain → ILC2活性化による鼻副鼻腔2型炎症の誘導<sup>11)</sup>

鼻副鼻腔粘膜におけるTh2細胞とILC2の役割および相乗効果を検討するため、Th2細胞を誘導する抗原としてOVA, IL-33/ST2伝達経路を介してILC2

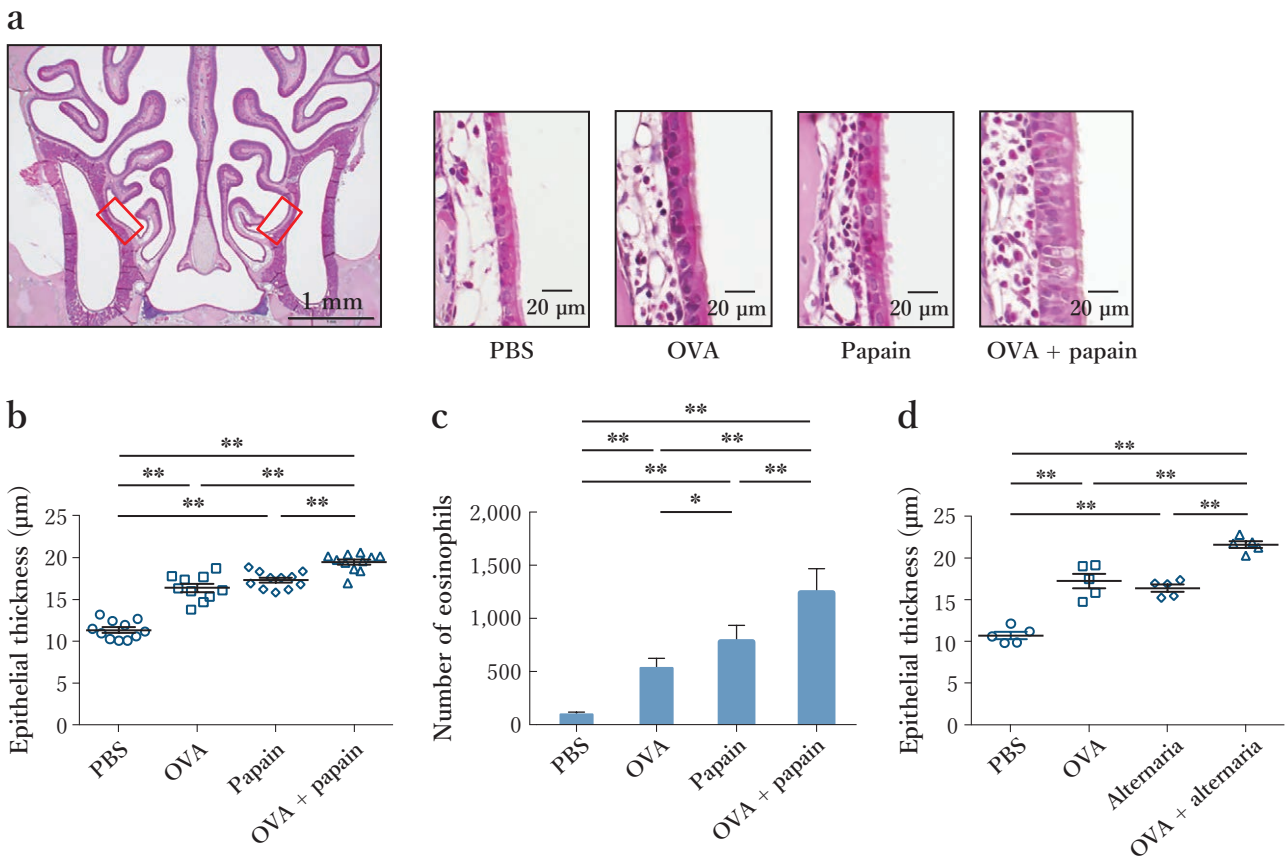


図3. OVA, papainによる鼻副鼻腔2型炎症の誘導.

(a) OVAとpapainで誘導されるマウス鼻粘膜の肥厚状態. (b) 各刺激による鼻粘膜肥厚状態を計測. OVA, papainは鼻粘膜肥厚を誘導し, OVA + papainではさらに強く誘導した. (c) 各刺激による鼻粘膜好酸球浸潤の状態. OVA, papainにより好酸球浸潤も誘導された. (d) Papainの代わりにアルテルナリア (*Alternaria alternate*) を使用した実験においても鼻粘膜肥厚が誘導された.

を活性化する物質としてpapainを使用した<sup>13) 27)</sup>.

図2aのように, WTマウスにPBS (20 μl), OVA (5%), papain (10 μg/body), OVA + papainを2週間点鼻し, 解析した. 連日の抗原鼻腔内投与がTh2免疫応答を活性化することは以前報告されているが<sup>28)29)</sup>, 今回の検討でOVA点鼻群では, 鼻粘膜CD4<sup>+</sup>T細胞のtype 2サイトカインmRNA (IL-4, IL-5, IL-13) 発現は上昇した (図2b). しかし, OVA点鼻群ではLineage<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>Thy1.2<sup>+</sup>細胞として同定するILC2の細胞集団は誘導されなかった (図2c, d). 一方, papain点鼻はILC2の細胞集団を有意に誘導した (図2d). OVA + papain点鼻群では, Th2細胞とILC2両方が誘導された (図2b, d). つまり, OVA点鼻はTh2細胞を, papain点鼻はILC2をそれぞれ活性化していることを証明した.

通常, 鼻副鼻腔2型免疫応答の活性化により鼻粘

膜肥厚と好酸球浸潤が誘導され, その結果, アレルギー性鼻炎の鼻閉症状や慢性副鼻腔炎の鼻茸形成が促される<sup>2)3)</sup>. そこで我々は, Th2細胞とILC2活性化がどのように鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤に影響を及ぼすか検討した. OVA点鼻群とpapain点鼻群ともに鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤が誘導され, OVA + papain点鼻群ではさらに強く鼻副鼻腔2型炎症を誘導した (図3a, b, c). 加えて, 他のILC2誘導因子として知られるアルテルナリア (*Alternaria alternate*) 抽出液を点鼻した場合にも, OVA誘導の鼻粘膜肥厚は増悪した (図3d). これらの結果から, 鼻粘膜のTh2細胞とILC2を同時に活性化すると, 鼻副鼻腔2型炎症を相乗的に増悪させることが示唆された.

次に, ILC2が鼻副鼻腔2型炎症にどのように関与しているかを直接検討するため, Rag2 KOマウス (T/B細胞欠損マウス), *Rora*<sup>sg/sg</sup> BMTマウス (ILC2

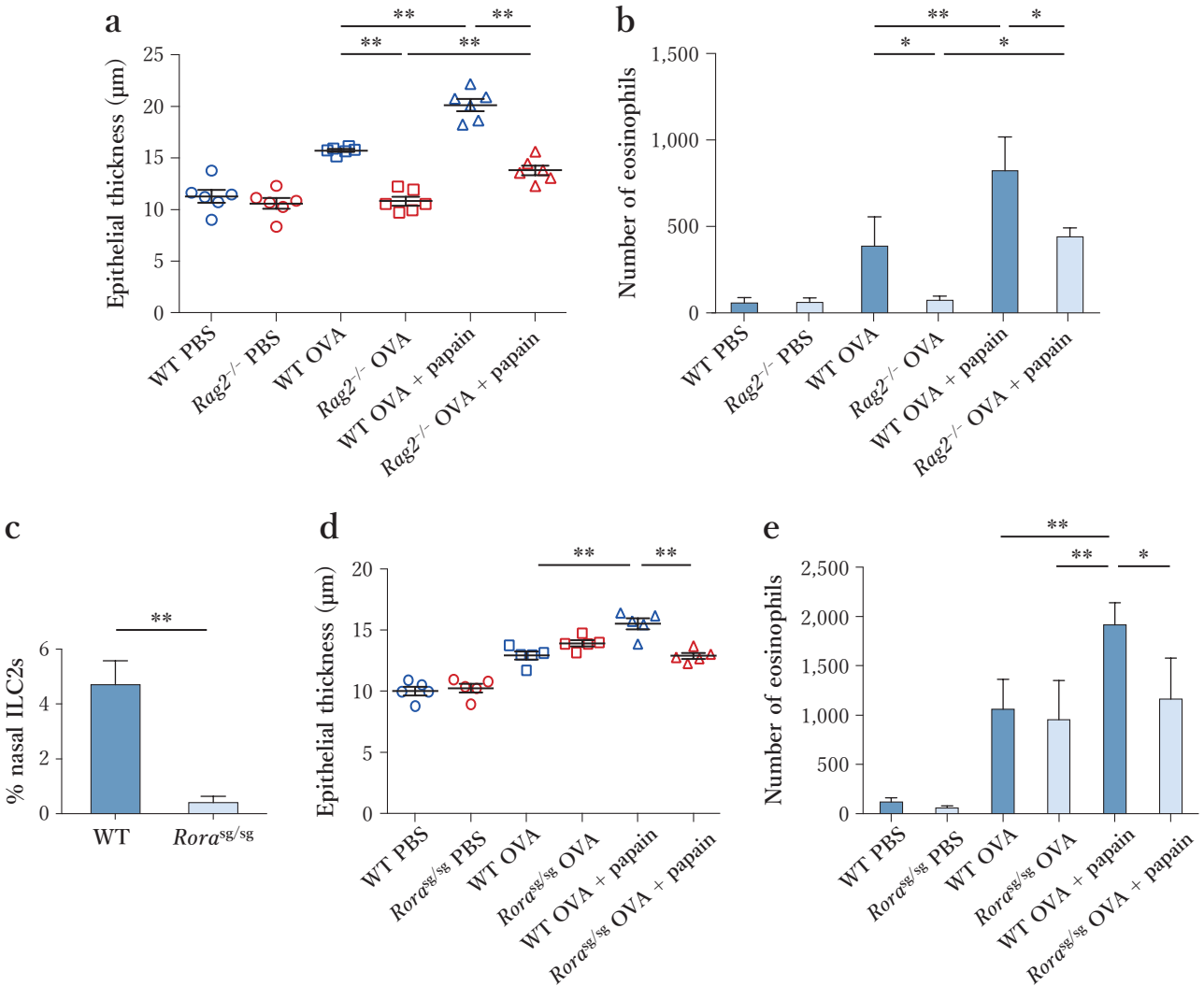


図4. Th2細胞とILC2による鼻副鼻腔2型炎症の相乗的増悪について。

(a, b) WTマウスとRag2 KOマウス ( $Rag2^{-/-}$ ) における鼻粘膜肥厚と鼻粘膜好酸球浸潤の誘導。Rag2 KOマウスで、OVAによる鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤は完全に抑制されたが、papainによる炎症は残存した。(c) 連続4日間papain点鼻したWTマウスと  $Rora^{sg/sg}$  BMTマウスにおける鼻粘膜ILC2の誘導。WTマウスのみILC2が誘導された。(d, e) WTマウスと  $Rora^{sg/sg}$  BMTマウスにおける鼻粘膜肥厚と鼻粘膜好酸球浸潤の誘導。 $Rora^{sg/sg}$  BMTマウスで、papainによる鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤が抑制された。

欠損マウス) を使用し検討した。Rag2 KOマウスにおいては、OVAを点鼻しても完全に鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤は消失したが、OVA + papain点鼻群では一部鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤が誘導された(図4a, b)。 $Rora^{sg/sg}$  BMTマウスは、Th2細胞が正常に保たれ、ILC2が欠損するので、papainでのILC2誘導は  $Rora^{sg/sg}$  BMTマウスで完全に起こらなかった(図4c)。OVAで誘導された鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤は、WTマウスと  $Rora^{sg/sg}$  BMTマウスで同じであったが、papainで誘導された鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤は  $Rora^{sg/sg}$  BMTマウスで有意に抑制された(図4d, e)。

よって、papainで誘導されたILC2とOVAで誘導されたTh2細胞は並行して、鼻粘膜炎症を誘導した。

### ILC2を介した鼻副鼻腔2型炎症におけるIL-33/ST2シグナルの関与

IL-33/ST2シグナル伝達経路は、papain由来のILC2活性化に重要である<sup>13) 27)</sup>。Papainが鼻粘膜上皮細胞からのIL-33分泌を促進するかを検討するため、鼻粘膜中IL-33の免疫組織染色を行った。図2aのプロトコールで点鼻を行い、最終点鼻前後で鼻粘膜中IL-33を評価した。最終点鼻前では、PBS点鼻群と

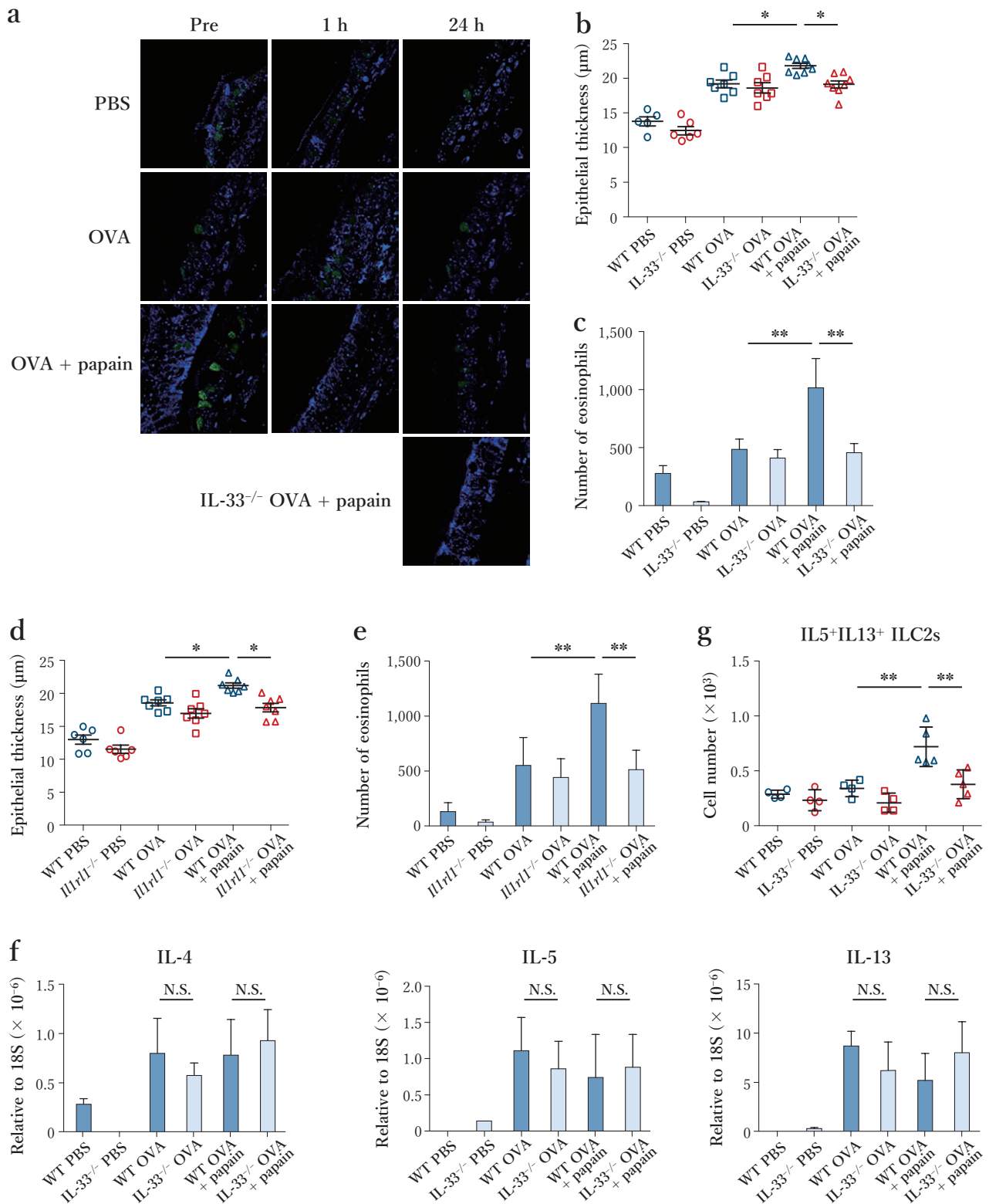


図5. 鼻副鼻腔2型炎症におけるIL-33/ST2シグナルの関与。

(a) 図2aプロトコールで点鼻された最終点鼻前、1時間後、24時間後の鼻粘膜組織のIL-33発現を免疫組織化学で検討した。Papain刺激によりIL-33産生、分泌が促進された。(b, c) IL-33の影響をWTマウスとIL33 KOマウス (IL-33<sup>-/-</sup>) における鼻粘膜肥厚、鼻粘膜好酸球浸潤で検討した。IL33 KOマウスで、papainによる鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤は抑制された。(d, e) IL-33受容体の影響をWTマウスとST2 KOマウス (*Il1rl1*<sup>-/-</sup>) における鼻粘膜肥厚、鼻粘膜好酸球浸潤で解析した。ST2 KOマウスで、papainによる鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤は抑制された。(f) WTマウスとIL33 KOマウス (IL-33<sup>-/-</sup>) の鼻粘膜中CD4<sup>+</sup> T細胞のIL-4, IL-5, IL-13の発現状況。RT-PCRで検討した。(g) 各刺激におけるIL-5/IL-13産生ILC2の誘導をフローサイトメトリー解析で比較した。IL33 KOマウスでILC2誘導は抑制された。



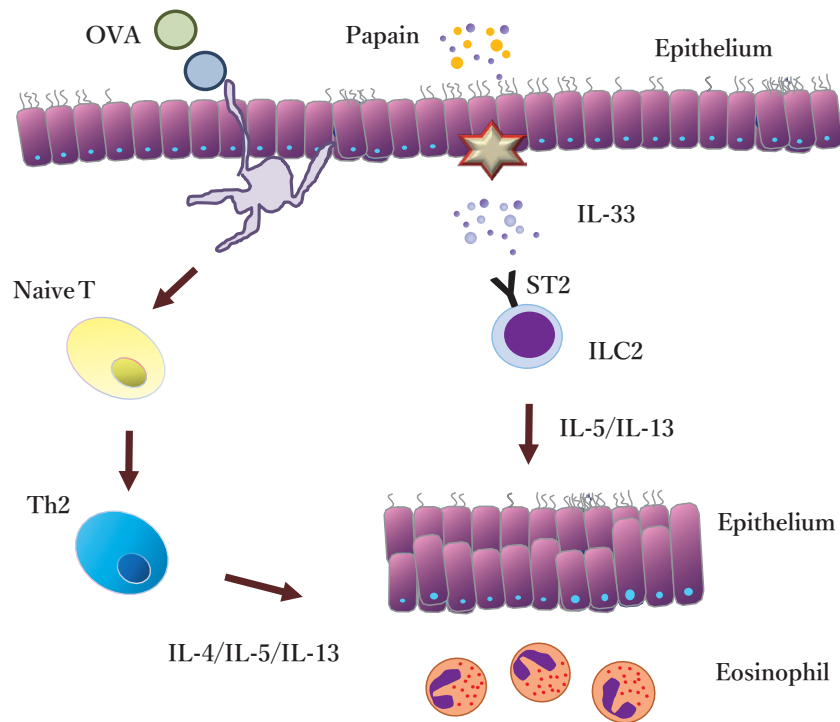


図6. OVA, papainによる鼻副鼻腔2型炎症の誘導メカニズム.

OVAにより誘導されたTh2細胞と、papainにより誘導されたILC2活性化は、それぞれ独立して鼻副鼻腔2型炎症を引き起こす。

OVA点鼻群と比較し、OVA + papain点鼻群でIL-33は強く発現するが、点鼻1時間後で減少し、点鼻24時間後ではIL-33発現が回復していた(図5a)。一方、PBS点鼻群とOVA点鼻群では、IL-33発現に変化は認められなかった。これらの結果から、papainは鼻粘膜上皮細胞から一時的なIL-33分泌を誘導するとともに、papainの慢性的な曝露は組織中IL-33発現を増強することがわかった。次に、OVA + papain誘導の鼻副鼻腔2型炎症にIL-33/ST2シグナルが影響するかを、IL33 KOマウス、ST2 KOマウスを用いて検討した。OVA単独点鼻で誘導された鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤は、WTマウスとIL33 KOマウスで同等に誘導されたが、OVA + papain点鼻で誘導された鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤は、IL33 KOマウスで有意に抑制され、OVA点鼻群と同等レベルまで抑制された(図5b, c)。同様に、ST2 KOマウスでも、papainで誘導された鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤は有意に抑制された(図5d, e)。IL-33/ST2シグナルが、Th2細胞活性化およびILC2活性化に重要な役割を担っているため、鼻粘膜中CD4<sup>+</sup>T細胞のIL-4、IL-5、IL-13 mRNA発

現と、IL-5/IL-13産生ILC2発現を調べた。鼻粘膜中CD4<sup>+</sup>T細胞のIL-4、IL-5、IL-13 mRNA発現は、OVA点鼻群とOVA + papain点鼻群ともに、WTマウスとIL33 KOマウスで同等であった(図5f)。一方、OVA + papain点鼻群におけるIL-5/IL-13産生ILC2発現は、WTマウスと比較し、IL33 KOマウスで有意に少なかった(図5g)。これらの結果から、IL-33/ST2シグナルはTh2細胞活性化にはほとんど関与せず、ILC2を介した鼻副鼻腔2型炎症増悪に関与することがわかった(図6)。

### 鼻粘膜好酸球浸潤による鼻粘膜肥厚への影響

好酸球はアレルギー性肺炎での上皮肥厚や組織リモデリングに関与しているといわれている<sup>30)~33)</sup>。我々は、鼻粘膜において好酸球が鼻副鼻腔2型炎症にどのように影響するか検討するため、抗IL-5抗体の腹腔内投与により好酸球を欠損させたマウスを使用した。これまで同様のOVA点鼻群とOVA + papain点鼻群では、誘導される好酸球浸潤が、抗IL-5抗体で完全に抑制された。しかし一方で、鼻粘膜肥厚

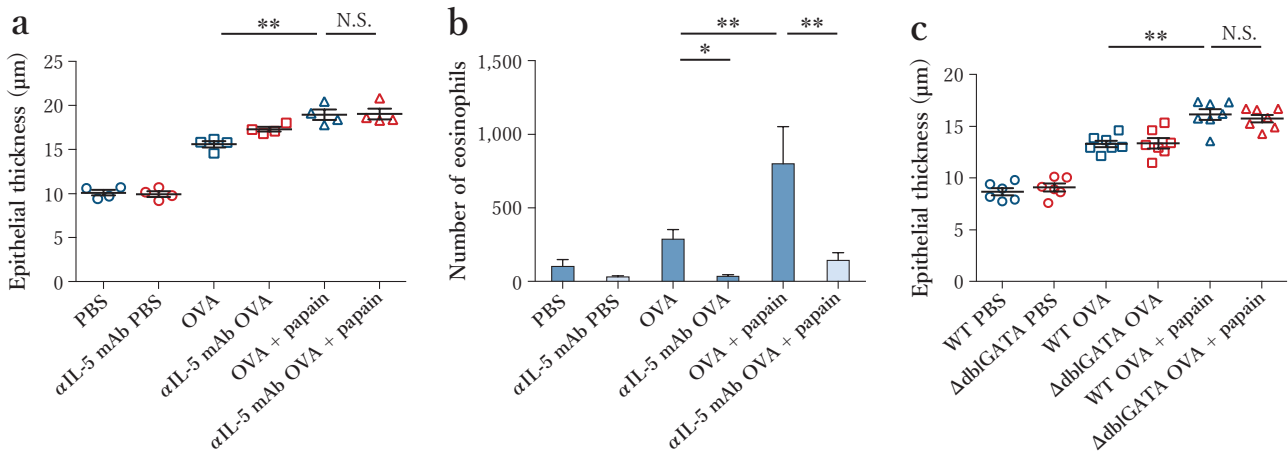


図7. 鼻粘膜好酸球浸潤による鼻粘膜肥厚への影響.

(a, b) PBSもしくは抗IL-5抗体を腹腔内投与したマウスモデルでの鼻粘膜肥厚, 鼻粘膜好酸球浸潤を比較検討した. 抗IL-5抗体投与で好酸球浸潤は完全に抑制されたが, 鼻粘膜肥厚は変わらなかった. (c) WTマウスと $\Delta$ dblGATAマウスにおける鼻粘膜肥厚の誘導を比較した. 両者の鼻粘膜肥厚は, 各刺激間で変わらなかった.

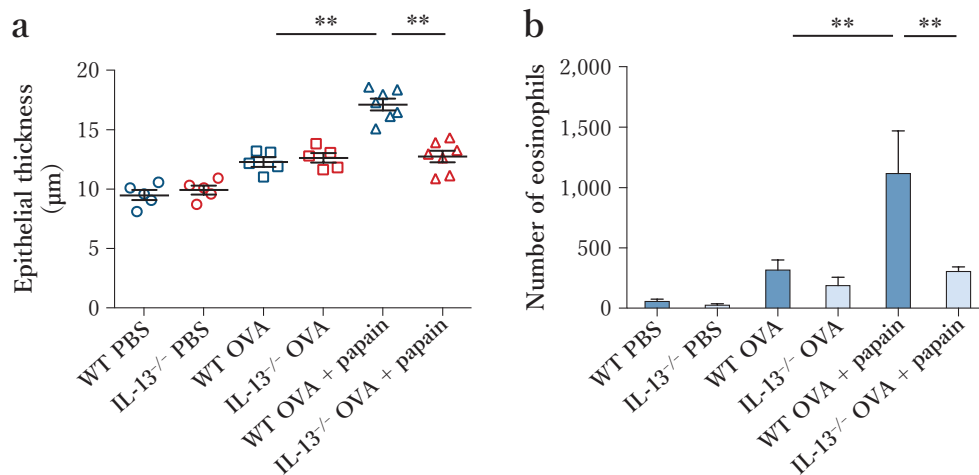


図8. 鼻副鼻腔2型炎症におけるILC2由来のIL-13の重要性.

(a, b) WTマウスとIL13 KOマウス (IL-13<sup>-/-</sup>) において鼻粘膜肥厚と鼻粘膜好酸球浸潤の状態を比較検討した. IL13 KOマウスで, papainによる鼻粘膜肥厚, 好酸球浸潤は抑制された.

は抗IL-5抗体で抑制されなかった (図7a, b). さらに $\Delta$ dblGATAマウス (好酸球欠損マウス) でも同様の実験を行ったが, 鼻粘膜肥厚は抑制されなかった (図7c). ゆえに, Th2細胞とILC2はIL-5産生により鼻粘膜好酸球浸潤を誘導するが, 好酸球自身はOVAとpapainで誘導された鼻粘膜肥厚増悪に重要な因子ではないことが判明した.

### 鼻副鼻腔2型炎症におけるILC2由来IL-13の重要性

IL-13は, 肺での好酸球集積, 上皮肥厚, 粘液細胞過形成を誘導する<sup>34)</sup>. OVAとpapainで誘導された鼻副鼻腔2型炎症におけるIL-13の影響を, IL13 KOマウスを用いて検討した. Papain誘導の鼻粘膜2型炎症はIL13 KOマウスにて抑制され, OVA点鼻群とOVA + papain点鼻群の鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤は同等レベルとなり, 相乗効果は認められなかった (図8a, b). しかし, OVA単独点鼻で誘導された鼻

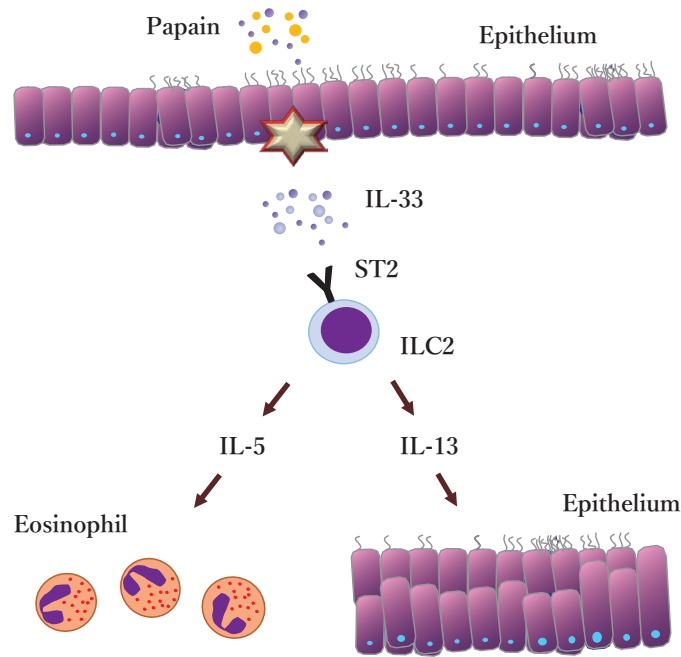


図9. 鼻副鼻腔2型炎症におけるILC2の役割。

IL-33/ST2シグナルで活性化したILC2はIL-5、IL-13を産生、分泌する。ILC2由来のIL-5は好酸球浸潤の増悪、ILC2由来のIL-13は鼻粘膜肥厚の増悪に関与している。

粘膜肥厚と好酸球浸潤は、IL13 KOマウスで抑制されなかった(図8a, b)。つまり、Th2細胞由来ではなく、ILC2由来のIL-13がpapainで誘導された鼻粘膜肥厚および好酸球浸潤に重要であることがわかった。(図9)

### ILC2 活性化による鼻粘膜肥厚ステロイド抵抗性の獲得

ILC2とIL-33は、鼻副鼻腔、肺におけるアレルギー反応のステロイド治療抵抗性に関与していることが報告されている<sup>35)36)</sup>。アレルギー性鼻炎において、papain誘導のILC2活性化によりステロイド抵抗性を獲得するかを、デキサメタゾン(2.5もしくは5 mg/kg)を腹腔内投与したマウスを用いて検討した。OVA点鼻誘導の鼻粘膜肥厚はステロイド用量依存性に抑制され、ステロイド高用量群(5 mg/kg)で完全に抑制された。しかし、OVA + papain誘導の鼻粘膜肥厚はステロイド高用量群(5 mg/kg)で一部抑制されるのみであった(図10a)。Papain誘導のILC2活性化はIL-33/ST2伝達経路を介するため(図5)、ST2 KOマウスを用いてステロイド抵抗性を検

討した。ST2 KOマウスのステロイド高用量群(5 mg/kg)で、papain誘導の鼻粘膜肥厚は完全に抑制された(図10b)。鼻粘膜好酸球浸潤は、OVA点鼻群とOVA + papain点鼻群ともにステロイド用量依存性に抑制された(図10c)。よって、鼻粘膜好酸球浸潤はステロイドでコントロールできるが、papainによる鼻粘膜肥厚増悪はステロイド抵抗性を獲得することがわかった。ステロイド高用量群(5 mg/kg)のOVA + papain点鼻群で、鼻粘膜中CD4<sup>+</sup>T細胞のIL-4、IL-5、IL-13 mRNA発現は完全に抑制されていたが(図10d)、IL-5/IL-13産生ILC2発現は抑制されていなかった(図10e)。これらの結果から、鼻粘膜ILC2活性化はIL-33/ST2伝達経路を介して、鼻副鼻腔2型炎症のステロイド抵抗性を誘導することが示唆された。

### 考察

今回の検討で、鼻粘膜ILC2からのIL-13によってTh2細胞由来の鼻副鼻腔2型炎症を相乗的に増悪させることが判明した。さらにIL-33/ST2伝達経路を

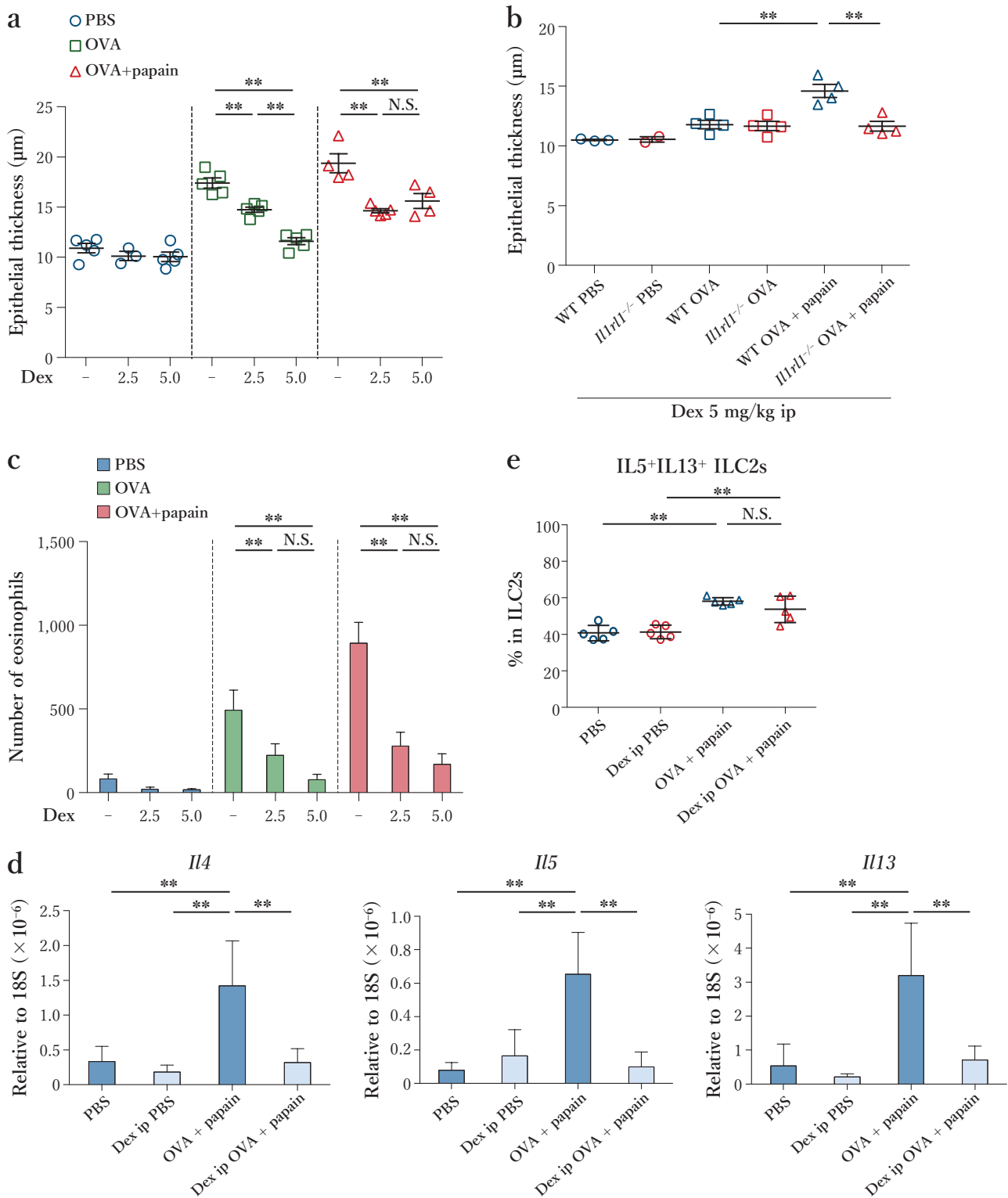


図10. Papain誘導のILC2活性化による鼻粘膜肥厚ステロイド抵抗性の獲得。

PBSもしくはデキサメタゾン(2.5もしくは5 mg/kg)を腹腔内投与した。(a)各刺激におけるWTマウスの鼻粘膜肥厚の状態。OVAによる鼻粘膜肥厚はステロイド用量依存性に抑制された。一方papainによる鼻粘膜肥厚は残存した。(b)ST2 KOマウス(*Il1rl1*<sup>-/-</sup>)における鼻粘膜肥厚の状態。WTマウスで残存したpapainによる鼻粘膜肥厚は、ST2 KOマウスで抑制された。(c)各刺激におけるWTマウスの鼻粘膜好酸球浸潤の状態。ステロイド用量依存性に抑制された。(d)WTマウスの鼻粘膜中CD4<sup>+</sup>T細胞のIL-4、IL-5、IL-13の発現をRT-PCRで検討した。デキサメタゾン(5 mg/kg)投与下で、これらのサイトカインは完全に抑制された。(e)IL-5/IL-13産生ILC2の誘導状態をフローサイトメトリーで解析した。デキサメタゾン(5 mg/kg)投与下で、papainによるILC2活性化が確認された。



介したILC2活性化がステロイド抵抗性を獲得させることもわかった。

CRSwNP患者の鼻茸中には、ILC2の存在が報告されており、CRSwNPの鼻茸形成にILC2が関連していると考えられている<sup>22)~26)</sup>。好酸球性副鼻腔炎患者でも、鼻茸中のILC2発現が増加していることが確認されている<sup>37)</sup>。しかしアレルギー性鼻炎の場合は意見が分かれる。健常コントロールとアレルギー性患者の末梢血単核球中のILC2数は同等である報告がある一方<sup>38)</sup>、季節性アレルギー性鼻炎患者、猫アレルギー患者の抗原暴露時の末梢血中ILC2が増加している報告がある<sup>19)~21)</sup>。今回の我々の検討では、papainやアルテルナリアといったIL-33誘導因子の点鼻で鼻粘膜ILC2が増加したが、T細胞活性化抗原のOVA点鼻投与ではILC2は誘導されなかった。つまり、抗原や微生物の違いが、アレルギー性鼻炎のILC2活性化を左右していると推測され、鼻粘膜IL-33産生を誘導する抗原を吸入した際に鼻粘膜ILC2が活性化され、症状を増悪させるとともに副鼻腔炎の鼻茸形成を誘導する可能性が考えられる。

最近、アレルギー疾患の治療として抗type 2サイトカイン抗体治療が研究されている<sup>39) 40)</sup>。抗IL-5抗体(mepolizumab)は、CRSwNPの鼻茸を縮小させ、CTスコアを改善させたが、鼻閉や鼻汁は改善しなかった<sup>41)</sup>。今回の我々の検討で、OVA, papain点鼻による好酸球浸潤は抗IL-5抗体治療で有意に抑制したが、鼻粘膜肥厚は抑制されなかった。一方、OVA + papain点鼻群の鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤とともに、IL13 KOマウスで有意に抑制された。よって、IL-13はアレルギー性鼻炎、CRSwNPの良い治療ターゲットとなるかもしれない。そして、OVA単独

点鼻群の鼻粘膜肥厚はIL13 KOマウスで抑制されず、Th2細胞が産生する別の因子の関与が示唆される。IL-4シグナルはIL-4/IL-13レセプター両者を介して上皮肥厚に参与するため、IL-4がその因子かもしれない<sup>42)</sup>。IL-4レセプター $\alpha$ サブユニットに対するヒトモノクローナル抗体(dupilumab)は、IL-4とIL-13両方を阻害し、鼻茸患者の鼻茸スコアと鼻症状(鼻閉, 鼻汁)を有意に改善させた<sup>43)</sup>。ゆえに、我々の検討結果と合わせて、Th2細胞由来のIL-4と、ILC2由来のIL-13を同時に阻害することが鼻粘膜肥厚、鼻茸形成をより強く抑制すると推察される。

CRSwNPと気管支喘息において、ステロイド治療抵抗性は臨床的に問題となり注目されている。OVA誘導アレルギー性肺炎マウスモデルで、IL-33投与によりILC2依存性にステロイド抵抗性を獲得すること、ステロイド抵抗性CRSwNPで鼻粘膜IL33 mRNA発現が増加していることが報告されている<sup>35) 36)</sup>。今回の我々の検討でも、IL-33/ST2伝達経路を介したILC2活性化により増悪した鼻粘膜肥厚が、ステロイド抵抗性を獲得することが示された。ILC2活性化やIL-33産生を制御することが、難治性CRSwNPのコントロールに重要であると考えられる。

以上まとめると、鼻副鼻腔2型炎症のTh2細胞とILC2の関係性として、ILC2はTh2細胞の鼻粘膜炎症を相乗的に増悪することがわかった。さらにILC2由来のIL-13が鼻粘膜炎症に特に重要であること、ILC2が鼻副鼻腔2型炎症のステロイド抵抗性に参与することがわかった。今後、ILC2とILC2活性化因子であるIL-33が、CRSwNPを含む難治性鼻アレルギー疾患の治療ターゲットとなることが期待される。  
(森川 太洋)

## 文献

- 1) Bousquet J, Khaltaev N, Cruz, AA, et al. World Health Organization; GA(2)LEN; AllerGen. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl 86:8-160.
- 2) Okubo K, Kurono Y, Ichimura K, et al. Japanese guidelines for allergic rhinitis 2017. *Allergol Int*. 2017;66:205-219.
- 3) Hulse KE, Stevens WW, Tan BK, et al. Pathogenesis of nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*. 2015;45:328-346.
- 4) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plas-

- minogen activator expression. Am J Respir Crit Care Med. 2013;187:49-57.**
- 5) **Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. Allergol Int. 2019;68:403-412.**
  - 6) Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015;517:293-301.
  - 7) Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010;463:540-544.
  - 8) Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 2010;464:1367-1370.
  - 9) Price AE, Liang HE, Sullivan BM, et al. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:11489-11494.
  - 10) Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, et al. IL-33-responsive lineage- CD25+CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol*. 2012;188:1503-1513.
  - 11) **Morikawa T, Fukuoka A, Matsushita K, et al. Activation of group 2 innate lymphoid cells exacerbates and confers corticosteroid resistance to mouse nasal type 2 inflammation. Int Immunol. 2017;29:221-233.**
  - 12) Gold MJ, Antignano F, Halim TY, et al. Group 2 innate lymphoid cells facilitate sensitization to local, but not systemic, TH2-inducing allergen exposures. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:1142-1148.
  - 13) Halim TY, Krauss RH, Sun AC, et al. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*. 2012;36:451-463.
  - 14) Drake LY, Iijima K, Kita H. Group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice. *Allergy*. 2014;69:1300-1307.
  - 15) Liu B, Lee JB, Chen CY, et al. Collaborative interactions between type 2 innate lymphoid cells and antigen-specific CD4+ Th2 cells exacerbate murine allergic airway diseases with prominent eosinophilia. *J Immunol*. 2015;194:3583-3593.
  - 16) Mirchandani AS, Besnard AG, Yip E, et al. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4+ Th2 cell responses. *J Immunol*. 2014;192:2442-2448.
  - 17) Oliphant CJ, Hwang YY, Walker JA, et al. MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity*. 2014;41:283-295.
  - 18) Halim TY, Steer CA, Mathä L, et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*. 2014;40:425-435.
  - 19) Lao-Araya M, Steveling E, Scadding GW, et al. Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:1193-1195.e4.
  - 20) Lombardi V, Beuraud C, Neukirch C, et al. Circulating innate lymphoid cells are differentially regulated in allergic and nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:305-308.
  - 21) Doherty TA, Scott D, Walford HH, et al. Allergen challenge in allergic rhinitis rapidly induces increased peripheral blood type 2 innate lymphoid cells that express CD84. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:1203-1205.
  - 22) Ho J, Bailey M, Zaunders J, et al. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. *Clin Exp Allergy*. 2015;45:394-403.
  - 23) Miljkovic D, Bassiouni A, Cooksley C, et al. Association between group 2 innate lymphoid cells enrichment, nasal polyps and allergy in chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2014;69:1154-1161.
  - 24) Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol*. 2011;12:1055-1062.
  - 25) Shaw JL, Fakhri S, Citardi MJ, et al. IL-33-responsive innate lymphoid cells are an important source of IL-13 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:432-439.
  - 26) Walford HH, Lund SJ, Baum RE, et al. Increased ILC2s in the eosinophilic nasal polyp endotype are associated with corticosteroid responsiveness. *Clin Immunol*. 2014;155:126-135.
  - 27) Kamijo S, Takeda H, Tokura T, et al. IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-induced allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2013;190:4489-4499.

- 28) Akasaki S, Matsushita K, Kato Y, et al. **Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33 signaling pathways.** *Int Immunol.* 2016;28:65-76.
- 29) Cho SH, Oh SY, Zhu Z, et al. Spontaneous eosinophilic nasal inflammation in a genetically-mutant mouse: comparative study with an allergic inflammation model. *PLoS One.* 2012;7:e35114.
- 30) Cho JY, Miller M, Baek KJ, et al. Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004;113:551-560.
- 31) Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest.* 2003;112:1029-1036.
- 32) Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, et al. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science.* 2004;305:1776-1779.
- 33) Tanaka H, Komai M, Nagao K, et al. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:62-68.
- 34) Kumar RK, Herbert C, Yang M, et al. Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1104-1111.
- 35) Reh DD, Wang Y, Ramanathan M Jr, et al. Treatment-recalcitrant chronic rhinosinusitis with polyps is associated with altered epithelial cell expression of interleukin-33. *Am J Rhinol Allergy.* 2010;24:105-109.
- 36) Kabata H, Moro K, Fukunaga K et al. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun.* 2013;4:2675.
- 37) Tojima I, Kouzaki H, Shimizu S. et al. Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Clin Immunol.* 2016;170:1-8.
- 38) Bartemes KR, Kephart GM, Fox SJ, et al. Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:671-678.e4.
- 39) Ingram JL, Kraft M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:829-842.
- 40) Mukherjee M, Sehmi R, Nair P. Anti-IL5 therapy for asthma and beyond. *World Allergy Organ J.* 2014; 7:32.
- 41) Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, et al. Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:989-995.e1-8.
- 42) Munitz A, Brandt EB, Mingler M, et al. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha 1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:7240-7245.
- 43) **Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials.** *Lancet.* 2019;394:1638-1650.





# 第 9 章

## 治 療





## 9-1

# 好酸球性副鼻腔炎に対するナットウキナーゼの治療効果の検討

## サマリー

鼻茸の制御は好酸球性副鼻腔炎の治療において非常に重要である。我々はこれまでの研究によって鼻粘膜における過剰なフィブリン網の沈着が鼻茸形成に関与していることを明らかにした。鼻粘膜におけるフィブリン網を分解することで鼻茸を縮小できると考え、強力な線溶活性を持つナットウキナーゼの鼻茸の対する効果を検討した。その結果ナットウキナーゼはフィブリン網を分解することによって鼻茸を著明に縮小させることを明らかにした。

## はじめに

現在好酸球性副鼻腔炎に対する治療の中心は手術とステロイドの全身または局所投与である。手術は内視鏡下鼻副鼻腔手術による副鼻腔の単洞化が推奨されているが副鼻腔の高度の炎症による術中の出血は手術操作を困難にし、不測の合併症や術後再発のリスクは少なからずある。ステロイドの投与は病状を改善させることが多いものの、中止または減量による炎症の再燃を来すことが多く、長期投与による副作用は大きな問題である。頑固な嗅覚障害や気管支喘息の合併は好酸球性副鼻腔炎の重要な特徴であるが、治療の主なターゲットは中鼻道周囲や嗅裂、副鼻腔、特に篩骨洞粘膜の浮腫性病変から形成される鼻茸である<sup>1)</sup>。鼻茸は組織学的に好酸球をはじめとした炎症性細胞の著しい浸潤と過度の浮腫である。間質における浮腫の増悪によってはしばしばpseudocystが形成され、浮腫の中身は血漿蛋白のアルブミンであることがわかっている<sup>2)</sup>。我々は以前の研究で鼻粘膜組織における凝固系の亢進と線溶系の抑制がフィブリン網の過剰な沈着を形成しこれが末梢血管から漏出した血漿蛋白を保持することによって浮腫、またはpseudocystの形成に関与することを報告した<sup>3)4)</sup>。これらの研究結果から好酸球性副鼻腔炎の治療において鼻粘膜において過剰に形成されたフィブリン網をターゲットにすることでより高

い鼻茸の縮小効果を期待できる。粘稠度の高い鼻汁もまた好酸球性副鼻腔炎における特徴の1つで、好酸球性ムチンとして知られている。また本疾患に高率に合併する気管支喘息においても粘稠度の高い喀痰はガス交換効率を低下させ呼吸機能を著しく低下させる。これら粘稠性の高い分泌物中にはいずれもフィブリン網の形成を認め分泌物の高粘稠度に影響している<sup>5)6)</sup>。

微生物の産生するフィブリン溶解酵素がこれまでにいくつか報告されている<sup>7)8)</sup>。その中でナットウキナーゼは*Bacillus subtilis*によって産生され、275のアミノ酸残基で構成され分子量27.724 kDaのセリンプロテアーゼである。またナットウキナーゼは大豆を発酵させた我が国の伝統食品納豆に含まれる酵素である<sup>9)10)</sup>。ナットウキナーゼのフィブリン溶解作用に関する検討はかなりなされておられ、生体内で直接フィブリン網の分解を行うプラスミンの約4~6倍のフィブリン溶解作用を持つことが報告されている<sup>11)12)</sup>。ナットウキナーゼはフィブリン溶解作用に加えて、プロウロキナーゼや組織型プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)など線溶系に関連する酵素を活性化作用や、線溶系を抑制するPAI-1に対してインヒビターとして働くため結果として線溶系を亢進させフィブリン網の分解を促進する<sup>11)13)14)</sup>。これらのことから鼻粘膜における過剰なフィブリン網の沈着が認められる好酸球性副鼻腔

炎に対してナットウキナーゼが治療薬として使える可能性がある。

本研究では慢性副鼻腔炎患者に対する内視鏡下鼻副鼻腔手術で摘出した鼻茸組織を用いてナットウキナーゼの鼻粘膜組織への影響を検討した。また好酸球性副鼻腔炎患者から採取した鼻汁、および気管支喘息患者から採取した喀痰の粘稠度に対するナットウキナーゼの影響も検討した。

## 方法

### 対象とサンプル

福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科において慢性副鼻腔炎に対して行った内視鏡下鼻副鼻腔手術で採取した鼻粘膜組織を本研究に使用した。福井大学呼吸器内科で外来患者を対象に喘息患者の喀痰を採取した。全ての患者に対してインフォームドコンセントをとり福井大学倫理委員会の承認を得ている。コントロールサンプルとして肥厚性鼻炎、鼻中隔湾曲症患者に対して行った際に採取した下甲介粘膜を使用した。

### ナットウキナーゼ

ナットウキナーゼは日本生物化学研究所から提供を受けた。ナットウキナーゼ粉末は生理食塩水で目的の濃度に希釈し、コントロールとして生理食塩水を使用した。

### ナットウキナーゼの鼻茸への影響の評価

手術で採取した鼻粘膜組織を約5 mm角に切り分けて水分を拭いて質量を測定した。切り分けた鼻粘膜組織を生理食塩水またはナットウキナーゼ溶液(10~1,000 FU/ml)に浸して37°Cで24時間振盪した。振盪後鼻粘膜組織を取り出し水分を拭いて質量を測定し鼻粘膜の縮小効果を評価した。

### ウェスタンブロッティング

鼻粘膜組織振盪後の上清を用いた。上清をdenature後、12.5% Gels (Bio-Rad, Hercules, CA)を用いてSDS-PAGEで分離し、Hybond-P (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Sweden)に転写

した。ブロッキング後、anti-d-dimer Ab (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)で反応させた。二次抗体としてhorse radish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を使用した。

### 動物実験

本研究における動物実験は福井大学動物実験倫理委員会の承認を受け、その規則に則って行った。Wild type BALB/cマウスはCharles River Laboratories Japan (Yokohama, Japan)から購入した。マウスの鼻内に50 µlのナットウキナーゼ溶液または生理食塩水を7日間連続で注入した後、鼻内の組織学的な検討を行った。

### 粘稠度測定

鼻汁、喀痰の粘稠度はスポイト (Nippon Genetics, Tokyo, Japan)を用いて一滴の容量で測定した。

### 免疫組織化学

パラフィン包埋した鼻粘膜組織を3 µm厚でスライスした。ブロッキング後、anti-human fibrin antibody (Sekisui Diagnostics, Stamford, CT)を4°Cで一晩反応させた後、ABC reagentを反応させ、DAB (Invitrogen, Carlsbad, CA)で発色させた。

### 統計学的解析

全てのデータは平均±標準偏差で表した。各群間の比較はpaired Student's t testを用いて検討した。P値が0.05以下の場合有意差ありとした。

## 結果

### ナットウキナーゼの鼻茸縮小効果

鼻茸には過剰なフィブリン網の形成が認められ<sup>9)</sup>、ナットウキナーゼはフィブリン網に対する分解作用がある<sup>15)</sup>ことからナットウキナーゼが鼻茸を縮小させると考え、検討した。14症例の鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎患者から鼻茸を採取して検討に用いた。5 mm角にした鼻茸組織をナットウキナーゼ溶液



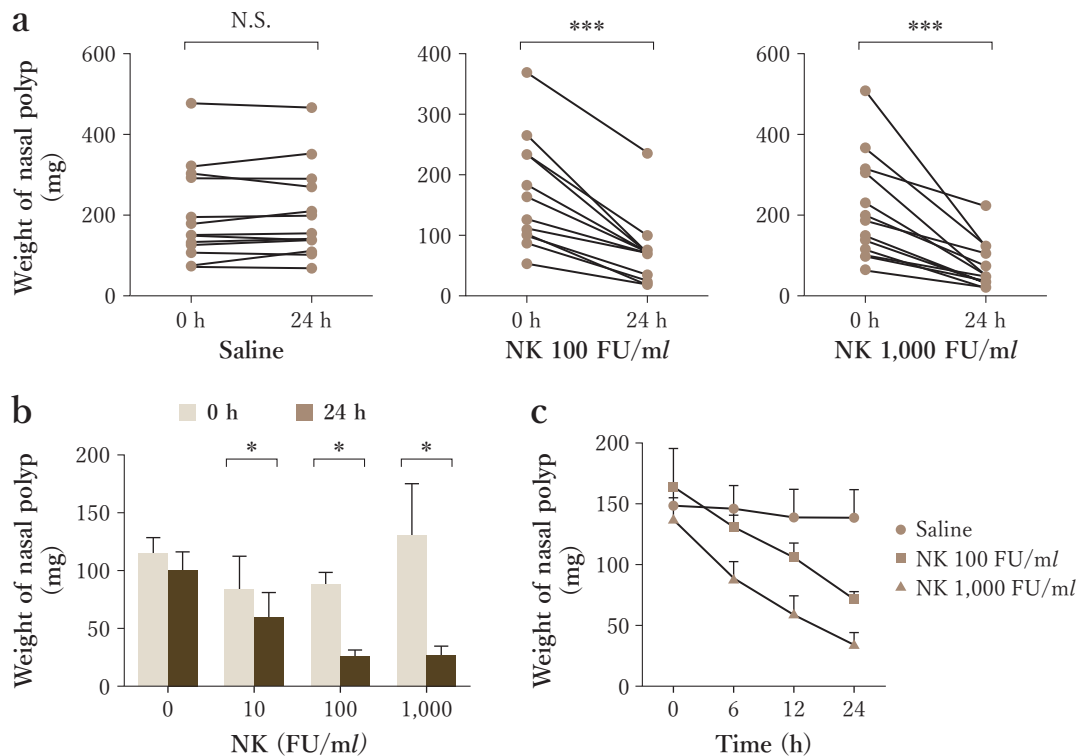


図1. ナットウキナーゼによる鼻茸の縮小効果。

(a) 5 mm角の鼻茸組織の質量を測定し、生理食塩水、ナットウキナーゼ溶液 (100 or 1,000 FU/ml) にて24時間振盪した。その後質量を測定した。(b) 鼻茸組織をナットウキナーゼ溶液 (0~1,000 FU/ml) で24時間振盪し、質量を測定した。(c) 鼻茸組織を生理食塩水、ナットウキナーゼ溶液 (100 or 1,000 FU/ml) にて振盪し時間系列での変化を観察した。 $*P<0.05$ ,  $***P<0.001$ 。

(10~1,000 FU/ml) またはコントロールとして生理食塩水に加え37°Cで24時間振盪し、処理前後の鼻茸組織の重さを測定した。生理食塩水で処理した鼻茸組織の質量に変化はなかったが ( $188.0\pm 29.2$  to  $192.6\pm 28.1$  mg; mean $\pm$ SD), ナットウキナーゼで処理した鼻茸の質量は著明に減少した (100 FU/ml;  $162.7\pm 25.1$  to  $67.8\pm 15.8$  mg;  $P<0.001$ , 1,000 FU/ml:  $199.3\pm 32.3$  to  $67.3\pm 14.29$  mg;  $P<0.001$ ) (図1a)。このナットウキナーゼによる鼻茸の縮小効果は時間、および濃度依存的な変化であった (図1b, c)。

ナットウキナーゼによって鼻茸は非常に薄く肉眼的には間質が抜けたように変化した (図2a)。この鼻茸縮小効果が鼻粘膜におけるフィブリンの分解によるものであるかどうかを確認するために、ナットウキナーゼ処理後の鼻茸におけるフィブリン網を免疫組織化学で検討した。その結果ナットウキナーゼで処理した鼻茸中のフィブリン網は処理前に比べて

著しく減少していた (図2b)。さらに処理後、溶液中のd-dimer量の上昇も認められた (図2c)。これらの結果からナットウキナーゼは鼻粘膜におけるフィブリン網を分解することで鼻茸を縮小させることが示された。

### 線溶活性は鼻茸を縮小させる

生体内ではフィブリン網は線溶系の働きによって分解され、線溶系の最終産物であるプラスミンが直接フィブリン網を分解する。線溶活性が鼻茸を縮小させるかどうかを検討するためにプラスミン (10 and 100 mU/ml) で鼻茸を振盪処理した。その結果ナットウキナーゼ処理と同様にプラスミン処理においても鼻茸の質量の著明な現象が認められた (10 mU/ml:  $121.0\pm 10.2$  to  $101.8\pm 8.9$  mg;  $P<0.05$ , 100 mU/ml:  $131.7\pm 9.4$  to  $88.8\pm 6.6$  mg;  $P<0.001$ ) (図3a)。

ヘパリンは抗炎症作用を有し慢性副鼻腔炎を含む

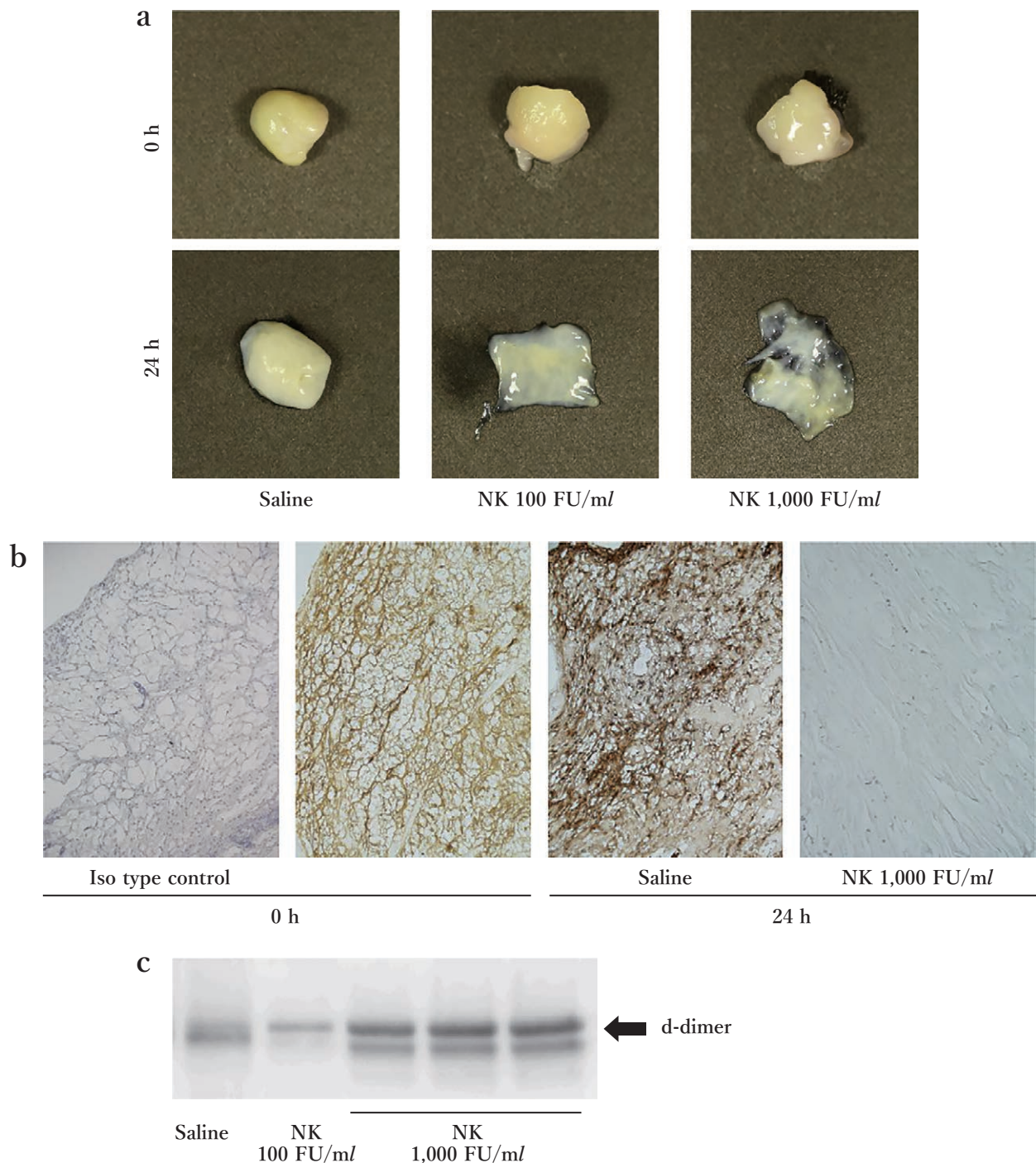


図2. ナットウキナーゼによる鼻茸の縮小効果.

(a) 5 mm角の鼻茸組織の質量を測定し、生理食塩水、ナットウキナーゼ溶液 (100 or 1,000 FU/ml) にて24時間振盪した。(b) anti-human fibrin Abを用いた免疫組織化学的検討。(c) 鼻茸組織をナットウキナーゼ溶液で振盪後の上清におけるフィブリン分解産物 (d-dimer) 量をWestern blotting法にて測定した。

アレルギー疾患に対しても効果を発揮すると報告されている<sup>6)</sup>。鼻茸におけるヘパリンの効果を検討するために本研究では未分画ヘパリン (UFH) と低分子量ヘパリン (LMWH) の2種類を実験に使用した。その結果これら2種類ヘパリンは鼻茸組織における

縮小効果は認められなかった (10 IU/ml UFH:  $181.9 \pm 31.7$  to  $186.5 \pm 33.2$  mg, 10 IU/ml LMWH:  $228 \pm 14.7$  to  $228.8 \pm 8.8$  mg) (図3b)。システインプロテアーゼのパパインの鼻茸への効果も検討したが、パパインの鼻茸に対する縮小効果は認められな

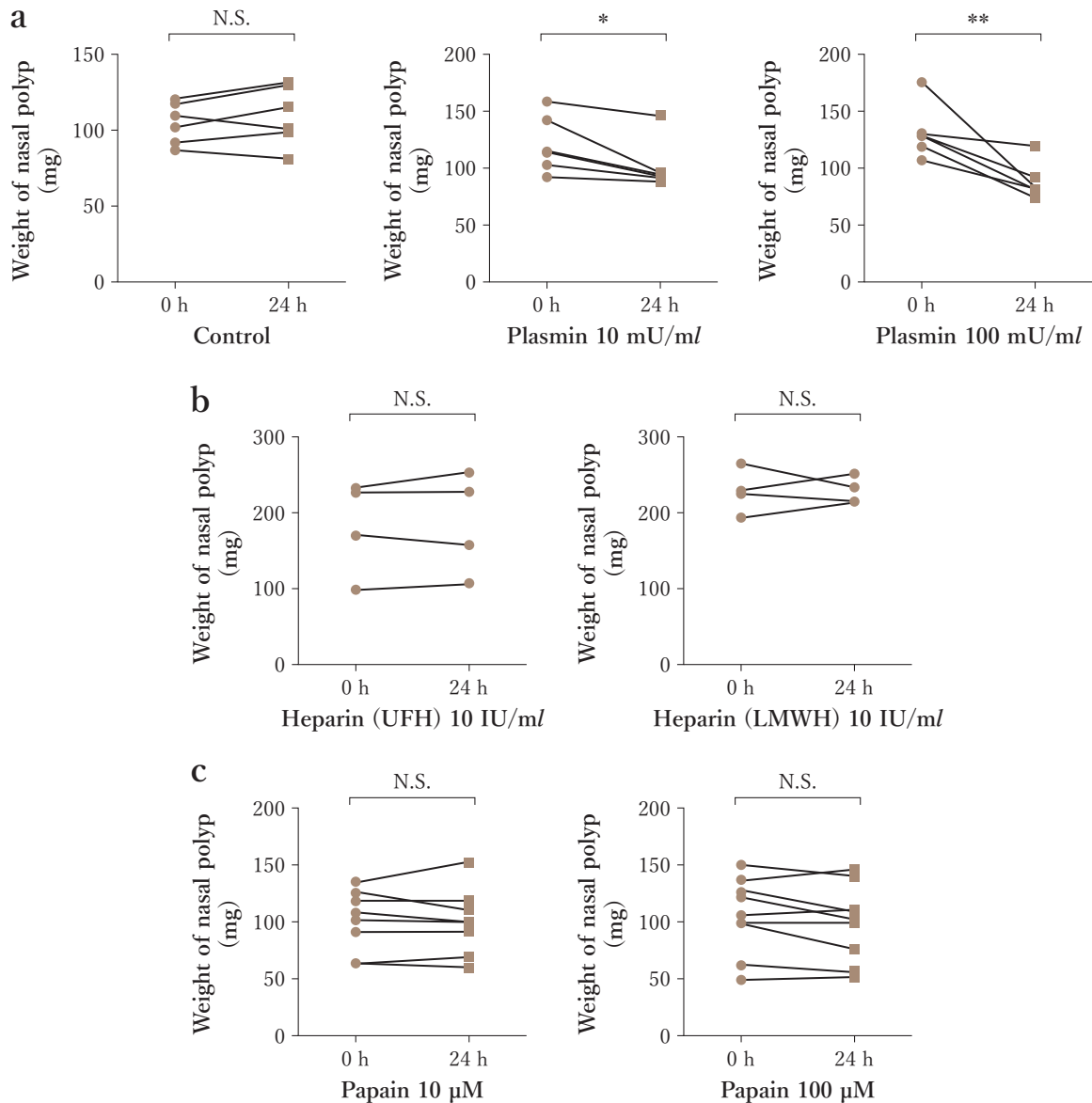


図3. 線溶活性による鼻茸の縮小効果。

(a) 5 mm角の鼻茸組織の質量を測定し、生理食塩水、プラスミン溶液 (10 or 100 mU/ml) にて24時間振盪した。(b) 鼻茸組織を未分画ヘパリン (UFH), または低分子量ヘパリン (LMWH) で24時間振盪した。(c) 鼻茸組織をパパイン溶液 (10 or 100 μM) で24時間振盪した。24時間振盪した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

かった (10 μM:  $103.9 \pm 8.8$  to  $101.7 \pm 9.0$  mg, 100 μM:  $105.6 \pm 11.0$  to  $99.3 \pm 10.9$ ) (図3c)。この結果鼻茸は線溶活性によって縮小されるのであって抗凝固作用や蛋白分解酵素の働きによって縮小されるのではないことが明らかとなった。

### ナットウキナーゼの正常鼻粘膜に対する作用

ナットウキナーゼの正常鼻粘膜への作用を検討するために、下甲介粘膜を用いて検討した。下甲介粘膜を生理食塩水、またはナットウキナーゼ溶液で処

理を行うと、24時間後に少しふやけたような外観にはなるものの質量の変化はほとんど認められなかった (Saline:  $71.1 \pm 8.5$  to  $74.3 \pm 8.9$  mg, 100 FU/ml:  $73.1 \pm 8.3$  to  $72.4 \pm 8.3$  mg, 1,000 FU/ml:  $75.3 \pm 7.9$  to  $71.9 \pm 8.3$  mg) (図4a)。次に生体へのナットウキナーゼの影響を検討するためにマウスの鼻腔内に生理食塩水、またはナットウキナーゼ溶液の点鼻を行い、組織学的な変化について検討したところナットウキナーゼ溶液 (100 FU/ml) を7日間連続投与を行っても鼻粘膜において組織学的な変化は認めら



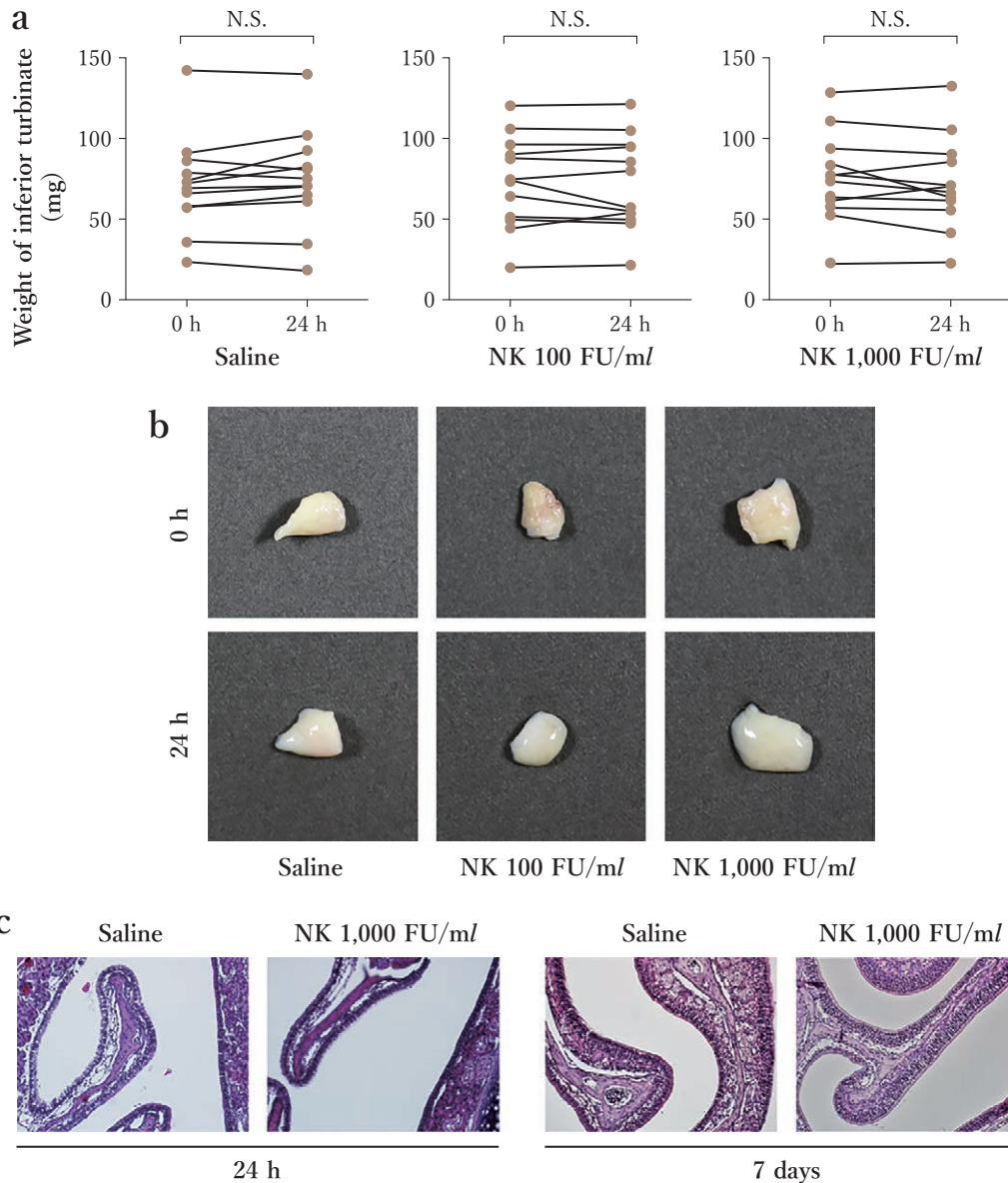


図4. ナットウキナーゼの正常鼻粘膜に対する影響.

(a, b) 5 mm角の下甲介粘膜組織の質量を測定し、生理食塩水、ナットウキナーゼ溶液 (100 or 1,000 FU/ml) にて24時間振盪した。(c) マウスにナットウキナーゼ溶液 (1,000 FU/ml) を7日間連日経鼻投与し、鼻粘膜の組織学的な変化をHE染色で評価した。

れなかった (図4c)。

### ナットウキナーゼの鼻汁および喀痰への作用

好酸球性副鼻腔炎の鼻汁や気管支喘息の喀痰は極めて粘稠性で特に気管支喘息においてはガス交換の障害によって呼吸機能を著しく障害する。これらの分泌物の粘稠性にフィブリン網の形成が関与していることもわかっており、ナットウキナーゼが粘液の粘稠性を低下させることができるのではないかと考

えた。鼻茸を伴う副鼻腔炎患者6人、および喘息患者20人からそれぞれ鼻汁、喀痰を採取して検討を行った。ナットウキナーゼの粘液に対する効果を検討するために採取した鼻汁、または喀痰にナットウキナーゼ溶液を加え、37°Cで1時間振盪し、粘稠度の変化を測定した。生理食塩水での処理では鼻汁の粘稠度に変化は認められなかったが (345.2±65.3 to 354.2±74.7 ml), ナットウキナーゼによる処理では粘稠度の著しい低下が認められた (371.7±69.1



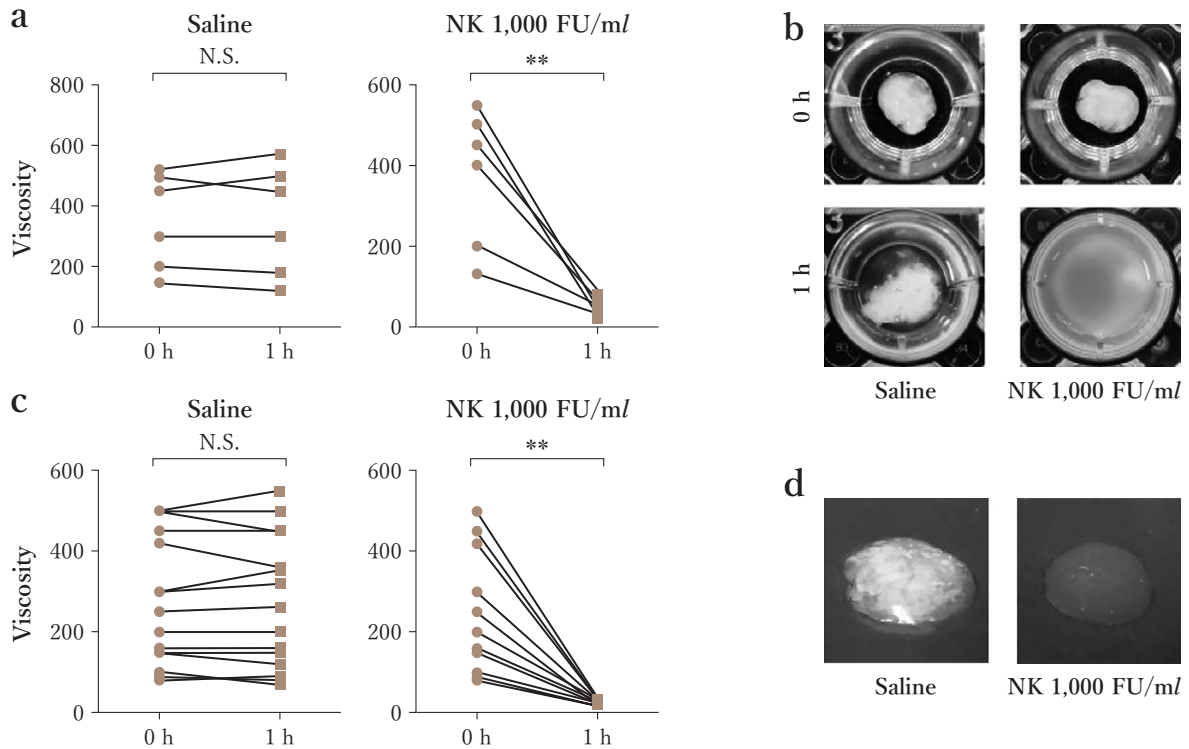


図5. 粘稠性粘液に対するナットウキナーゼの効果。

(a, b) 慢性副鼻腔炎患者の鼻汁に生理食塩水またはナットウキナーゼ溶液 (1,000 FU/ml) を加え1時間振盪し、粘稠度を測定した。(c, d) 気管支喘息患者の喀痰に生理食塩水またはナットウキナーゼ溶液 (1,000 FU/ml) を加え1時間振盪し、粘稠度を測定した。

to  $45.0 \pm 9.2$  m,  $P < 0.01$ ) (図5a)。また肉眼的にも塊の鼻汁が溶けている様子が認められた (図5b)。同様の検討を喘息患者の喀痰を用いて検討したところ、鼻汁と同様ナットウキナーゼ処理によって粘稠度が著明に減少した ( $234.5 \pm 35.1$  to  $26.5 \pm 1.2$  m;  $P < 0.01$ ) (図5c)。また肉眼でも粘稠度の低下が観察された (図5d)。

## 考察

本研究では強力なフィブリン溶解作用を持つナットウキナーゼが慢性副鼻腔炎患者の鼻茸を著明に縮小させ、鼻汁または気管支喘息の喀痰の粘稠度を低下させることを明らかにした<sup>15)</sup>。

鼻茸は鼻腔特有の病変であり他の領域でこのような病変はあまりない。鼻茸は中鼻道、嗅裂および副鼻腔の粘膜の浮腫性変化によって形成され、重症例では鼻腔、副鼻腔を充満し、鼻閉、嗅覚障害、頭痛の原因となる。特に近年増加傾向にある好酸球性副鼻

腔炎においては手術後も再発を繰り返し、ステロイドの長期投与を余儀なくされる症例が少なくない。これらのことから鼻茸のコントロールは副鼻腔炎の治療において最も重要であるが、鼻茸の形成メカニズムはあまり良くわかっていなかった。鼻茸の組織学的な特徴に高度の粘膜浮腫、pseudocystの形成があり、浮腫の内容は末梢血管から漏出した血漿蛋白である<sup>1)2)</sup>。我々はこれまでの研究で鼻粘膜における過剰なフィブリン網の形成が血漿蛋白を鼻粘膜間質に保持することによって粘膜浮腫が遷延した結果、鼻茸が形成されることを報告してきた<sup>2)3)</sup>。この研究結果をふまえると、鼻粘膜に形成された過剰なフィブリン網を鼻茸治療のターゲットにすることは極めて理にかなっている。

ナットウキナーゼはプラスミンと同様にフィブリン網に直接作用して分解する以外に、線溶系に関わるt-PA, pro-urokinase, プラスミンなどの分子の発現を亢進させ、線溶系を促進する作用があることも知られている<sup>1)</sup>。さらにナットウキナーゼは線溶系

の抑制因子であるPAI-1を不活化する作用があるため<sup>14)</sup>、結果的に線溶活性が増強しフィブリン網の分解が促進される。これらのナットウキナーゼの線溶系関連分子に対する作用の中で最も興味深いのはt-PAによる作用である。我々はこれまでの検討でTh2環境下では鼻粘膜上皮におけるt-PAの発現が著明に抑制されることが線溶系抑制の主なメカニズムであることを報告した<sup>3)</sup>。またt-PA遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化が好酸球性副鼻腔炎患者に高頻度に認められることから<sup>16) 17)</sup>、鼻粘膜におけるt-PA発現のコントロールは治療に直結する可能性があり、凝固系の異常亢進も鼻茸の形成に深く関与する。好酸球性炎症を呈する慢性副鼻腔炎の鼻茸においてM2マクロファージの浸潤が増加し、凝固因子FXIII-Aが発現しているが、FXIII-Aは凝固系の最終局面でフィブリンの $\gamma$ -glutamylと $\epsilon$ -lysyl残基を共有結合させることによってフィブリンモノマーを重合させフィブリン網の形成させる<sup>4)</sup>。架橋されたフィブリン網は安定化し炎症によって末梢血管から漏出した血漿蛋白を高効率に保持し鼻粘膜に浮腫を起こし鼻茸が形成される。また好酸球性副鼻腔炎の最重症タイプであるアスピリン喘息において、好酸球に凝固因子の起点である組織因子が発現し、凝固系の亢進によるフィブリン網が過剰形成に関与することも明らかになった<sup>18)</sup>。ナットウキナーゼは抗凝固作用も報告されており、ヒトへの投与によって血清中のフィブリノーゲン、凝固因子VII、VIIIの量が低下することから、心血管系の疾患へ治療応用が検討されている<sup>19)</sup>。これらのことからナットウキナーゼの抗凝固は鼻茸の再発予防への応用も期待できる。

慢性副鼻腔炎、特に好酸球性副鼻腔炎には高率に気管支喘息を合併することが知られている<sup>1)</sup>。両疾

患において粘稠度の高い鼻汁や喀痰は病状を悪化させる。特に気管支喘息において粘稠性の喀痰は致死性になることもあり、粘液の粘稠度を少なくすることは治療にとって極めて重要である。本研究でナットウキナーゼは鼻汁と喀痰の粘稠度を短時間に下げることか明らかになった(図5)。

ナットウキナーゼを慢性副鼻腔炎の治療に応用する場合の投与方法としては、鼻粘膜や下気道に対する直接投与と経口投与の2種類が考えられる。本研究はナットウキナーゼの鼻茸や粘液に対する直接の作用を検討した。動物実験において鼻粘膜への直接投与で組織障害は認められなかったが効果や安全性については更なる検討が必要である。

経口摂取されたタンパク質は通常、消化酵素によってペプチドやアミノ酸にまで分解される。しかしナットウキナーゼは温度やpHに対して非常に安定性を示すことから酵素活性を保ったまま腸管から吸収されるという報告もある<sup>10)</sup>。実際ナットウキナーゼのヒトや動物に対する経口投与によって血中の線溶活性や抗凝固能が亢進されるという研究結果も報告されている<sup>20)</sup>。ナットウキナーゼを含んでいる納豆は日本の伝統食品で1000年以上の歴史があり経口摂取に対する安全は確立されていると考えられ、経口投与による副鼻腔炎治療も期待できる。

近年増加傾向にある好酸球性副鼻腔炎は高率に気管支喘息を合併し、高度の嗅覚障害の他、しばしば合併が認められる好酸球性中耳炎は極めて難治性である。好酸球性副鼻腔炎に対しては現状の内視鏡下鼻副鼻腔手術、ステロイドの投与では十分な効果が得られておらず、ナットウキナーゼも今後治療の選択肢の1つとして検討を行う価値がある。

(高林 哲司)

## 文献

- 1) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2019;68:403-412.
- 2) Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, et al. Nasal polyposis: from cytokines to growth. *Am J Rhinol.* 2000;14:279-290.
- 3) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.

- 4) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. **Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps.** *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:584-592.
- 5) Brims FJ, Chauhan AJ, Higgins B, et al. Coagulation factors in the airways in moderate and severe asthma and the effect of inhaled steroids. *Thorax.* 2009;64:1037-1043.
- 6) Ogawa T, Shimizu S, Shimizu T. The effect of heparin on antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Allergol Int.* 2013;62:77-83.
- 7) Zhang RH, Xiao L, Peng Y, et al. Gene expression and characteristics of a novel fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41:190-195.
- 8) Liu XL, Zheng XQ, Qian PZ, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from culture supernatant of *Pleurotus ostreatus*. *J Microbiol Biotechnol.* 2014;24:245-253.
- 9) Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia.* 1987;43:1110-1111.
- 10) Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197:1340-1347.
- 11) Dabbagh F, Negahdaripour M, Berenjian A, et al. Nattokinase: production and application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98:9199-9206.
- 12) Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biol Pharm Bull.* 1995;18:1387-1391.
- 13) Yatagai C, Maruyama M, Kawahara T, et al. Nattokinase-promoted tissue plasminogen activator release from human cells. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008;36:227-232.
- 14) Urano T, Ihara H, Umemura K, et al. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* Cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem.* 2001;276:24690-24696.
- 15) Takabayashi T, Imoto Y, Sakashita M, et al. **Nattokinase, profibrinolytic enzyme, effectively shrinks the nasal polyp tissue and decreases viscosity of mucus.** *Allergol Int* 2017;66:594-602.
- 16) Kidoguchi M, Noguchi E, Nakamura T, et al. **DNA methylation of proximal PLAT promoter in chronic rhinosinusitis with nasal polyps.** *Am J Rhinol Allergy.* 2018;32:374-379.
- 17) Takabayashi T, Schleimer R. **Formation of nasal polyps: the roles of innate type 2 inflammation and deposition of fibrin.** *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145:740-750.
- 18) Takabayashi T, Tanaka Y, Susuki D, et al. **Increased expression of L-plastin in nasal polyp of patients with nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease.** *Allergy.* 2019;74:1307-1316.
- 19) Hsia CH, Shen MC, Lin JS, et al. Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects. *Nutr Res.* 2009;29:190-196.
- 20) Kurosawa Y, Nirengi S, Homma T, et al. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles. *Sci Rep* 2015;5:11601.

## 9-2

## 黄芩の主成分 Baicalin による抗 Type 2 炎症効果と好酸球性副鼻腔炎治療における漢方薬の可能性

### ● サマリー

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) に対して治療効果が報告されているステロイドと分子標的治療薬は、Th2 サイトカインやその受容体、好酸球、IgE をターゲットとしている。辛夷清肺湯も Type 2 気道炎症に有効と報告されているが、詳細な薬理作用はわかっていない。本研究では、辛夷清肺湯の主成分 Baicalin が IL-33 の産生を抑制し、肥満細胞からのメディエーター放出を抑制することで抗 Type 2 炎症作用を示すことが判明した。Baicalin を主成分とする黄芩を含むような漢方薬は、ある一定数の ECRS 患者に対して治療効果が期待できる。

### はじめに

好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis; ECRS) や気管支喘息に対する薬物治療は、現在のところ、Type 2 優位の炎症と過剰に浸潤した好酸球を主な治療ターゲットとしている。ステロイドの全身あるいは局所投与がその一つであるが、長期投与による副作用の問題が懸念される。一方、抗 IgE 抗体、抗 IL-5 抗体、抗 IL-4/IL-13 受容体抗体といった生物学的製剤が、気道の Type 2 炎症に対する新しい治療薬として開発され、ECRS や気管支喘息の臨床所見や症状の改善に有効であると報告されている<sup>1)~4)</sup>。しかしながら、生物学的製剤は従来の薬と比較し非常に高価であり、医療経済的な負担となることが考えられる。それゆえ、代替治療が大いに役立つ可能性がある。

伝統的な漢方薬は病気の予防と治療に応用されてきた長い歴史があるが、新規治療薬としても最近注目を集めている。日本では、Type 2 気道炎症性疾患に対する治療薬として、いくつかの漢方薬が処方されている。例えば柴朴湯は、気管支喘息の患者に処方され、その有効性が報告されている<sup>5)</sup>。また、辛夷清肺湯は、鼻副鼻腔に炎症を持つ喘息患者への有効性が報告されている<sup>6)</sup>。さらに両漢方薬は、気管支喘息と副鼻腔炎の実験モデルにおいて、アレルギー

の繰り返される感作で引き起こされる Type 2 炎症を抑制することが報告されている<sup>7) 8)</sup>。柴朴湯、辛夷清肺湯はそれぞれ10種類、9種類の生薬によって構成されているが、これらの中で唯一共通する生薬が、Baicalin を主成分とする黄芩である<sup>9)</sup>。

Baicalin は、経口投与されると複雑な代謝経路を介して全身循環によく吸収されることがわかっている<sup>9) 10)</sup>。また、Baicalin は気管支喘息や鼻炎、皮膚炎などの動物研究において抗アレルギー効果や抗 Th2/Th17 炎症効果を認めたと報告されている<sup>11) 12)</sup>。しかしながら、ECRS や気管支喘息などの Type 2 気道炎症に関わるさまざまな免疫担当細胞に対して、Baicalin が実際どのように働くかはまだほとんどわかっていない。本研究では、正常なヒト気道上皮細胞 (normal human bronchial cells; NHBE) とヒト肥満細胞のアレルギー反応に対して Baicalin が与える直接的な効果の検討を行った。

### 方法

#### 辛夷清肺湯の血漿薬物動態

辛夷清肺湯エキス粉末を蒸留水に溶解し、2.0 g/10 ml/kg の容量で、16時間断食したラットに経口投与を行った。経口投与後、0 (経口投与前)、0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10, 24時間後に腹部大静脈よ



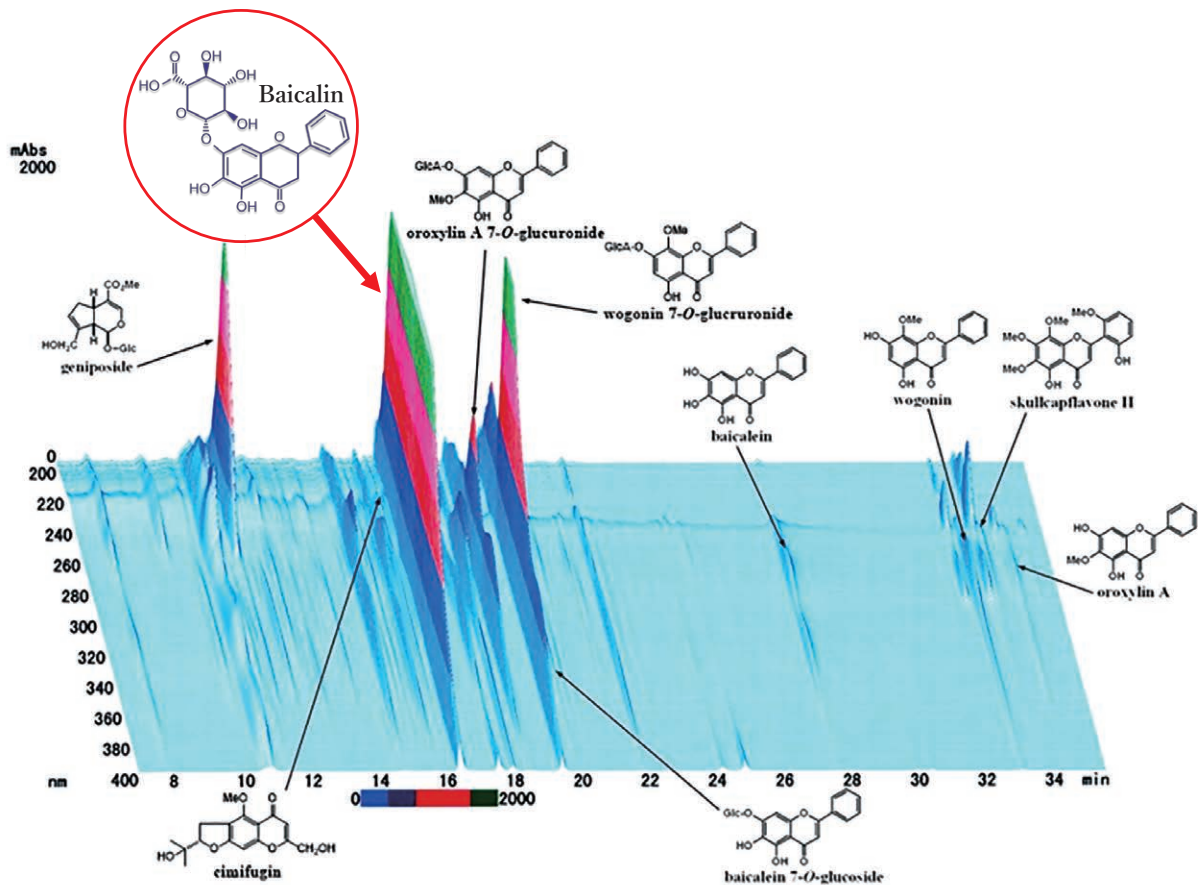


図1. 辛夷清肺湯の3次元高速液体クロマトグラフィー (3D-HPLC) プロファイル。

り採血した。ここで使用した辛夷清肺湯エキス粉末 (Lot No. 2140104010) は、9種類の生薬、石膏 (18.5%)、麦門冬 (18.5%)、黄芩 (11.1%)、山梔子 (11.1%)、知母 (11.1%)、百合 (11.1%)、辛夷 (7.4%)、枇杷葉 (7.4%)、そして升麻 (3.7%) の水溶性抽出混合物として (株) ツムラ (東京) により製造されたものである。辛夷清肺湯を3次元高速液体クロマトグラフィー (3D-HPLC) で成分解析すると、Baicalin, Baicalein, wogonoside, wogonin といったフラボノイドを中心とする混合多成分で構成されていた (図1)。

### 細胞培養

NHBEを専用の培養液 (bronchial epithelial cell growth medium; BEGM) で培養した。細胞刺激を行う前は、少なくとも24時間はhydrocortisoneを除去したBEGMで培養した。NHBEを3  $\mu$ M, 30  $\mu$ MのBaicalinで前処理した後、IL-4 (100 ng/ml)

+dsRNA (25  $\mu$ g/ml), IFN- $\gamma$  (10 ng/ml), Pam3CSK4 (2  $\mu$ g/ml) で刺激した。

ヒトCD34(+)造血前駆細胞をSCF, IL-6, IL-3, 2-mercaptethanol (2-ME), penicillin, streptomycinを含む培養液 (iscover methylcellulose medium) で培養し、4週目にSCF, IL-6, insulin-transferrin-selenium, 2-ME, penicillin, streptomycinを含む培養液 (iscover modified dulbecco medium; IMDM) を追加した。培養6週目には、0.1%BSAを含むIMDMで培養した。それ以降は5%FBSを含むIMDMに切り替え、さらに5~7週間培養することでヒト肥満細胞へと分化誘導させた。培養ヒト肥満細胞を0.3  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ MのBaicalinで前処理した後、IL-33 (100 ng/ml), thymic stromal lymphopoietin (TSLP) (10 ng/ml), TSLP (10 ng/ml) +IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) で刺激した。

刺激した細胞からRNAや蛋白を回収した。

### $\beta$ -hexosaminidase assay

12 wellプレートに $0.2 \times 10^6$  cells/wellとなるよう培養ヒト肥満細胞を調整し、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のIgEと $0.3 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$ のBaicalinを加え24時間培養した。各wellの細胞を回収し、tyrode-hepes buffer ( $10 \text{ mM}$  Hepes,  $\text{pH}$  7.4,  $127 \text{ mM}$  NaCl,  $4 \text{ mM}$  KCl,  $0.5 \text{ mM}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.6 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{LiCl}_2$ ,  $5.6 \text{ mM}$  glucose, and  $0.1\%$  BSA)を加えた。その後、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  IgEと $0.3 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$ のBaicalinで前処理したwellを $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  anti IgE Abで、前処理していないwellを $1 \mu\text{M}$  A23187で刺激、さらに前処理していない別のwellを $20\%$ NP-40で刺激し各wellの上清のみ回収した。20%NP-40で刺激したサンプルを用いてstandardを作成した。96 wellプレートにstandardと回収した上清を入れ、同量のsubstrate solution ( $0.1 \text{ M}$  sodium citrate  $\text{pH}$  4.5にp-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosideを溶解)を加えた。その後 $0.2 \text{ M}$  Glycine  $\text{pH}$  1.1を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで $405 \text{ nm}$ における吸光度を測定した。

### Real time PCR

上述した培養NHBE, 培養ヒト肥満細胞からtotal RNAを抽出し、一本鎖cDNAを作成した。TaqManプローブ法でreal time RT-PCRを行った。標的遺伝子の正確なコピー数を決定するために、定量された一定量のPCR精製断片を連続希釈しstandardとした。10 ngのtotal RNAに相当する一定量のcDNAをreal time PCRに使用した。mRNAの発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子GAPDHの平均値を基準に計算した。

### ELISA

培養細胞は、protease inhibitor cocktailを含むcell lysis bufferを用いて回収した。IL-33, IL-5蛋白濃度はELISA kit (R&D Systems, Minneapolis)で測定した。

### 統計解析

各群間の比較はKruskal-Wallis ANOVA with

Dunnett post hoc testing と Mann-Whitney U testを用いて検討した。P valueが0.05以下の場合、有意差ありとした。

## 結果

### 辛夷清肺湯由来フラボノイドの血漿薬物動態

辛夷清肺湯エキスを経口投与されたラットの血漿中フラボノイド定量結果を図2に示す。Baicalin, wogonin, wogonosideは血漿中で検出されたが、Baicaleinは検出下限濃度 ( $200 \text{ ng}/\text{ml}$ ) を下回った。血漿中最高濃度を示したのはBaicalinで $1,610 \text{ ng}/\text{ml}$ であった。いずれの化合物も経時的な血漿中濃度変化は二峰性を示し、投与後6時間の2つ目のピークがより高い濃度であった。本研究では、辛夷清肺湯、柴朴湯に共通する生薬、黄芩の主要成分であり、血漿中に最も高濃度に移行するBaicalinに注目しさまざまな検討を行った。

### 上皮系サイトカイン産生に対する Baicalin の効果

気道上皮細胞由来のサイトカイン (上皮系サイトカイン) は ECRS や気管支喘息のような気道の Type 2 炎症の病態に深く関与する。上皮系サイトカインは、さまざまなサイトカインや toll like receptor (TLR) のリガンドで産生亢進が起これ、アレルギー炎症に重要な役割を果たす<sup>13)~15)</sup>。そこで、サイトカインや toll like receptor (TLR) を介する上皮系サイトカインの産生系に対する Baicalin の効果を調べた。NHBE を IL-4 と dsRNA で刺激すると TSLP を、IFN- $\gamma$  で刺激すると IL-33 を、Pam3CSK4 (TLR2 ligand) で刺激すると IL-25 を産生する (図3)。そこで、Baicalin で前処理した NHBE で上皮系サイトカインの発現を調べた。その結果、IFN- $\gamma$  の刺激で亢進した IL-33 mRNA の発現は、Baicalin の濃度依存的に有意に抑制された。一方で、IL-4 と dsRNA の刺激で亢進した TSLP mRNA の発現、Pam3CSK4 の刺激で亢進した IL-25 mRNA の発現は Baicalin に影響されることはなかった。Baicalin 刺激により唯一変化を認めた IL-33 の発現についてさらに詳しく検討するために、Baicalin 刺激による IL-33 遺伝子発現抑制効果

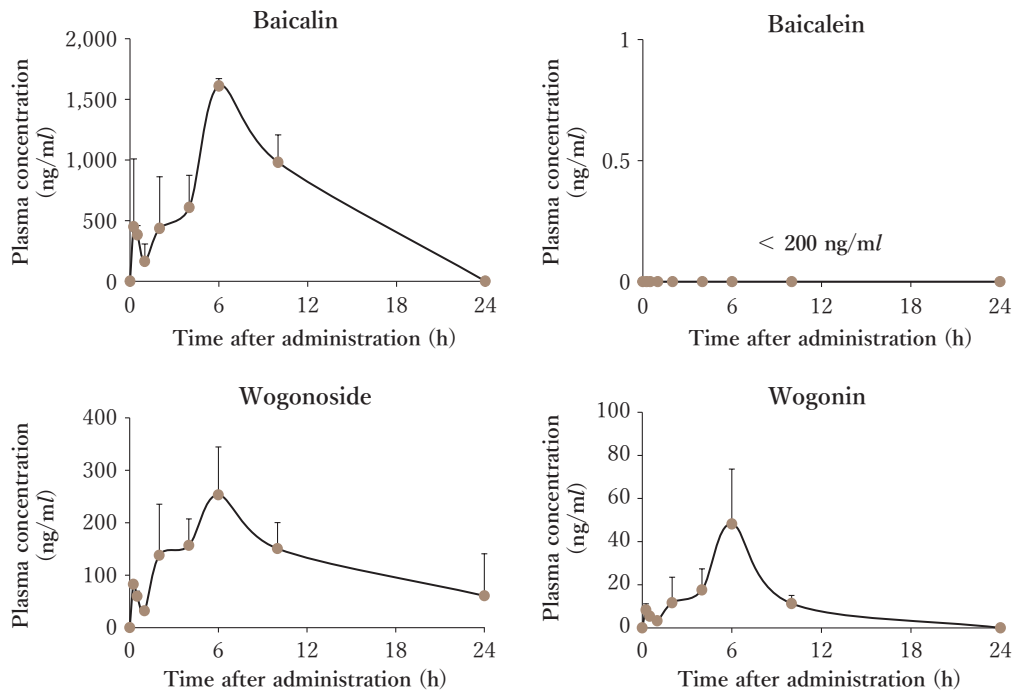


図2. 辛夷清肺湯由来フラボノイドのラット血漿薬物動態.

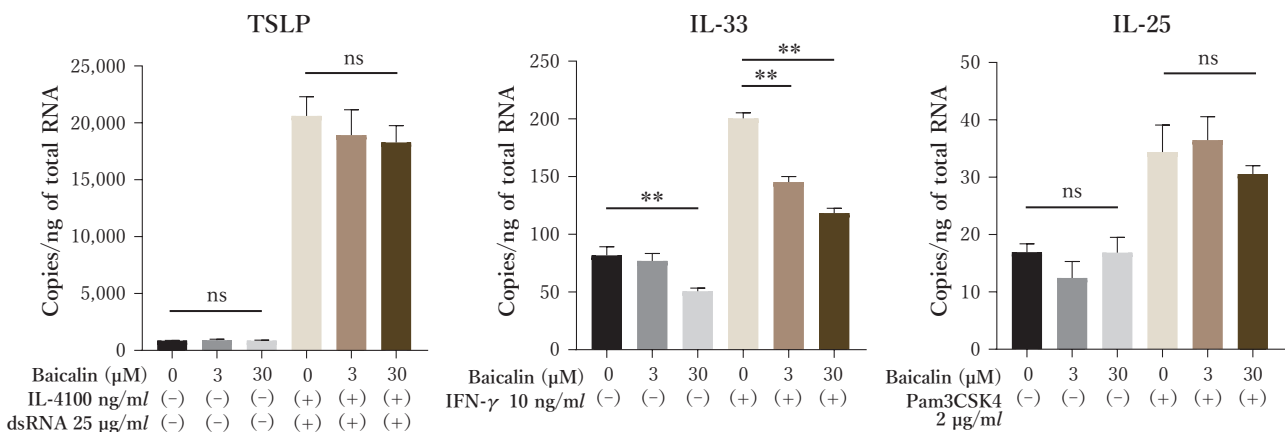


図3. BaicalinがNHBEにおける上皮系サイトカイン (TSLP, IL-33, IL-25) の遺伝子発現に与える影響をreal time PCRで検討.

の経時的変化を検討した。その結果、IL-33の抑制効果は少なくとも36時間持続することがわかった(図4a, b)。また、ELISAでIL-33の蛋白レベルでの検討を行った結果、Baicalin刺激によりIL-33の蛋白発現も有意に抑制された(図4c)。

### IL-33によるヒト肥満細胞の tryptase 発現亢進

ECRSや気管支喘息では、気道粘膜上皮において肥満細胞の数が増加し、肥満細胞に特異的な内因性

プロテアーゼである tryptase の発現も亢進することが報告されている<sup>16)17)</sup>。Tryptaseは気道のアレルギー炎症増悪に関与するが、気道粘膜上皮に浸潤した肥満細胞において、どのように tryptase の発現が制御されているかよくわかっていない。マウスの骨髄由来の肥満細胞においては、滑膜線維芽細胞が産生するIL-33が tryptase の発現を亢進させることが報告されている<sup>18)</sup>。そこで、ヒト肥満細胞の tryptase 発現に対し上皮系サイトカインが与える影

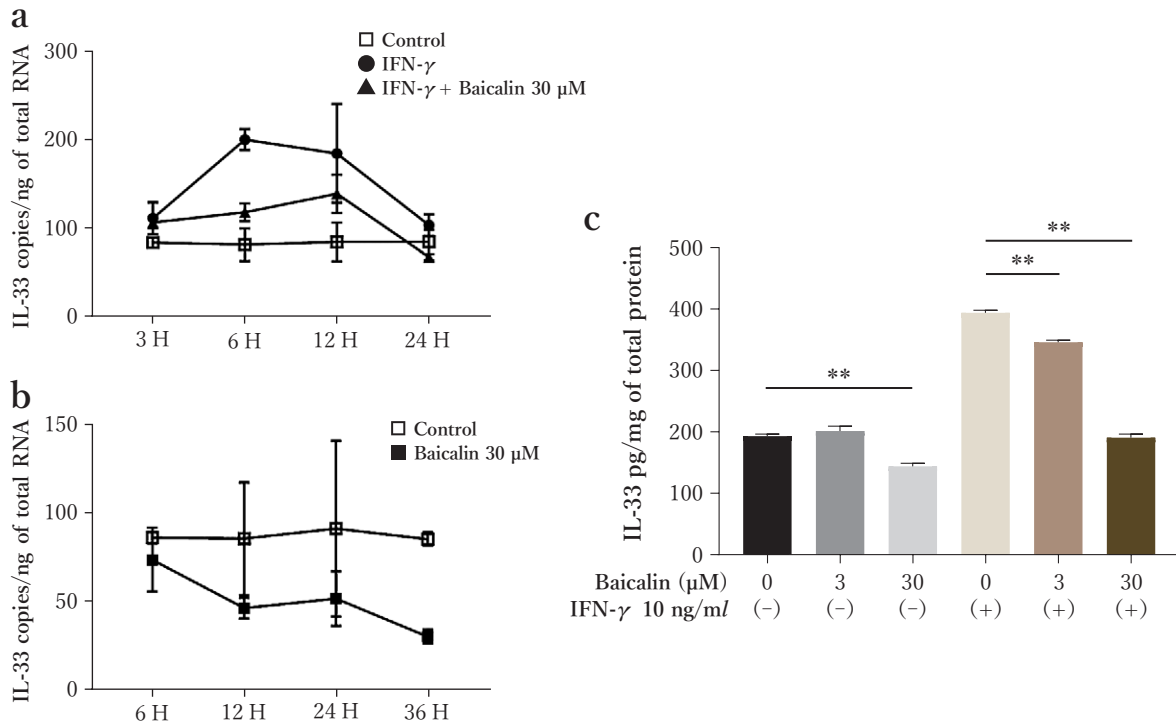


図4. (a) IFN- $\gamma$ 刺激下 (b) サイトカイン無刺激によるBaicalinのIL-33遺伝子発現抑制効果の経時変化を検討。(c) BaicalinがNHBEにおけるIL-33の蛋白産生に与える影響をELISAで検討。

響を検討した。培養ヒト肥満細胞をTSLP, IL-33, IL-25で48時間刺激してtryptaseの発現を調べたところ、IL-33で刺激を行った場合のみtryptaseの発現が有意に上昇することがわかった(図5a)。さらに、フローサイトメトリーにより、蛋白レベルでもtryptaseの産生が有意に上昇していることがわかった(図5b)。

### ヒト肥満細胞に対するBaicalinの影響

培養ヒト肥満細胞におけるIL-33を介したtryptase産生に対してBaicalinが与える影響を検討した。その結果、IL-33で刺激した場合、しなかった場合とともに、Baicalinによりtryptaseの発現が有意に抑制された(図5c)。次に、上皮系サイトカインを介したヒト肥満細胞によるTh2サイトカイン産生に対してBaicalinが与える影響について検討した。IL-33でヒト肥満細胞を刺激すると、Th2サイトカインであるIL-13の発現が亢進することが報告されている<sup>19)</sup>。ところがBaicalinで培養ヒト肥満細胞を前処理すると、亢進したIL-13の発現がBaicalinの濃度依存的に抑制されることがわかった(図6a)。さ

らに、TSLP, IL-1 $\beta$ はヒト肥満細胞において、Th2サイトカインであるIL-5の産生を亢進させることが報告されている<sup>20)</sup>。ところがBaicalinで培養ヒト肥満細胞を前処理すると、上昇したIL-5のmRNAはBaicalinの濃度依存的に有意に抑制されることがわかった(図6b)。また、肥満細胞におけるIL-5蛋白産生もTSLPとIL-1 $\beta$ の刺激により上昇するが、Baicalinによる前処理を加えることで有意に抑制された(図6c)。

次に、IgEを介したヒト肥満細胞のメディエーター放出に対してBaicalinが与える影響を検討した。BaicalinのアグリコンであるBaicaleinは、ヒト肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制することが報告されている<sup>21)</sup>。そこで、培養ヒト肥満細胞における脱顆粒を $\beta$ -hexosaminidase assayで検討したところ、Baicalinで前処理した培養ヒト肥満細胞では、Baicalinの濃度依存的に脱顆粒が抑制されることがわかった(図6d)。



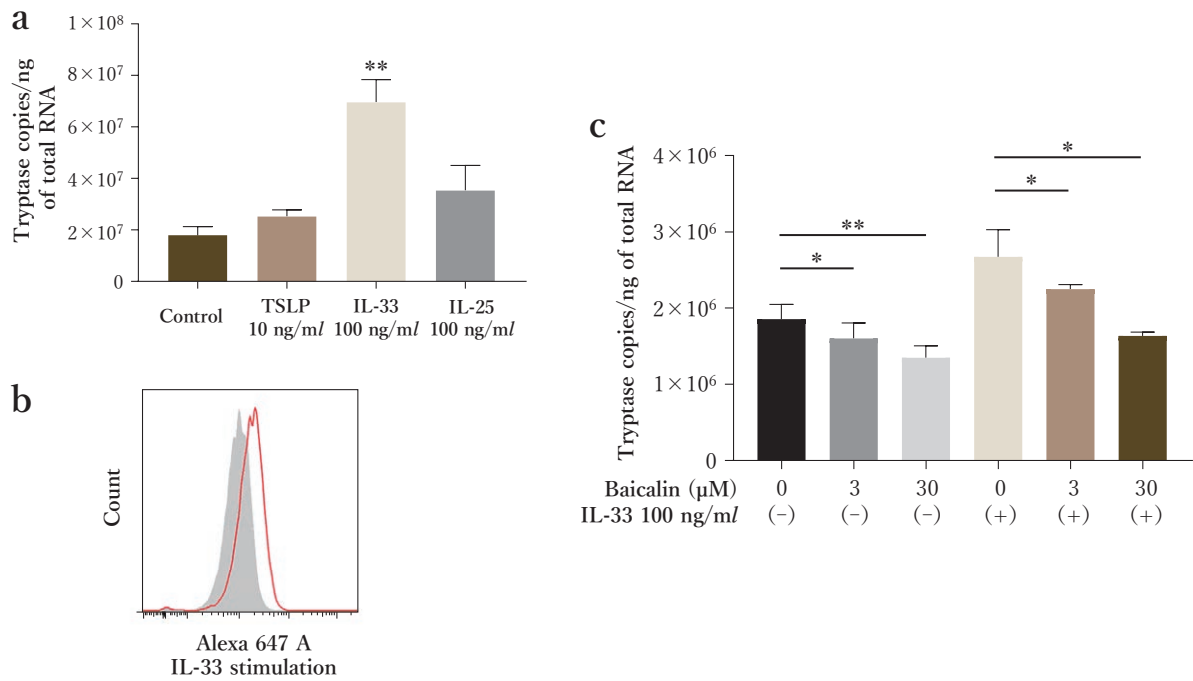


図5. (a) 上皮系サイトカイン (TSLP, IL-33, IL-25) の刺激による培養ヒト肥満細胞における tryptase 遺伝子発現を real time PCR で検討. (b) IL-33 の刺激による培養ヒト肥満細胞における tryptase 蛋白産生をフローサイトメトリーで検討. (c) Baicalin がヒト肥満細胞における tryptase 遺伝子発現に与える影響を real time PCR で検討.

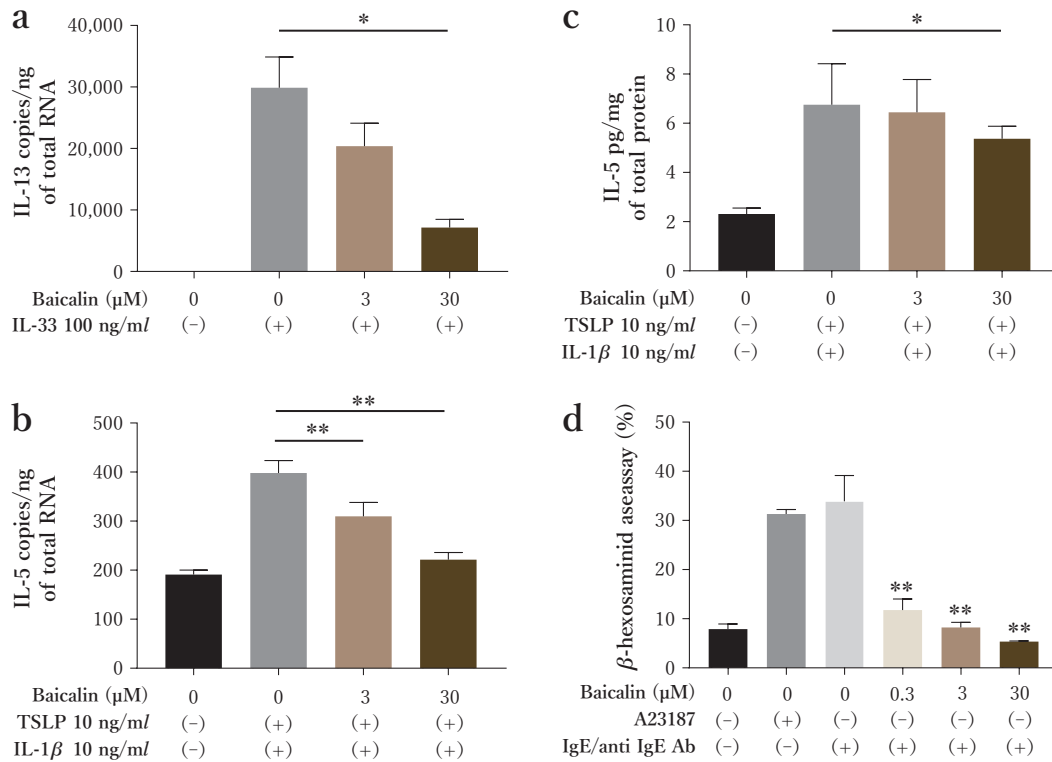


図6. (a) 培養ヒト肥満細胞を IL-33 で刺激した際の IL-13 遺伝子発現に対する Baicalin の影響を real time PCR で検討. (b) 培養ヒト肥満細胞を TSLP, IL-1β で刺激した際の IL-5 遺伝子発現に対する Baicalin の影響を real time PCR で検討. (c) 培養ヒト肥満細胞を TSLP, IL-1β で刺激した際の IL-5 蛋白産生に対する Baicalin の影響を ELISA で検討. (d) Baicalin が IgE を介するヒト肥満細胞の脱顆粒に与える影響を β-hexosaminidase assay で検討.

## 考察

現在、ECRSや気管支喘息に対して治療効果が報告されている薬物は、ステロイドと分子標的治療薬である<sup>1)~4)</sup>。これらの薬物はいずれも、Th2サイトカインやその受容体、好酸球、IgEなどを治療ターゲットとしており、ECRSの病態形成に関わるさまざまな分子の中の、より下流の分子に着目した治療である。一方、辛夷清肺湯や柴朴湯もECRSや気管支喘息のようなType 2気道炎症に対して治療効果があると報告されている漢方薬であるが<sup>5)~8)</sup>、どのような分子生物学的なメカニズムで抗Type 2炎症効果を発揮しているかはまだよくわかっていなかった。そこで本研究では、辛夷清肺湯の主成分であるBaicalin (図1)がECRSや気管支喘息におけるType 2炎症の病態に与える影響を検討し、上皮系サイトカインIL-33の産生を抑制すること、肥満細胞からのメディエーター放出を抑制することを見出した。

外因性プロテアーゼや黄色ブドウ球菌、ウイルス、さまざまなアレルゲンにより刺激を受けた気道上皮ではTSLP、IL-33、IL-25といった上皮細胞由来のサイトカインが産生され、これらがアレルギー性気道炎症において重要な役割を果たす<sup>22)</sup>。IL-33は、気道上皮のアレルゲン暴露に素早く反応して放出され、IL-33の受容体であるST2を発現したさまざまな免疫担当細胞に作用する。2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cells; ILC2) はIL-33により活性化されると大量のTh2サイトカインを放出する。また、IL-33は肥満細胞からのIL-13の放出も促進することにより気道粘膜局所にType 2炎症を誘導することが報告されている<sup>19)</sup>。産生されたTh2サイトカインであるIL-5は好酸球の集積と生存に重要な役割を果たし、IL-13やIL-4は気道粘膜での粘稠分泌物の産生や鼻粘膜での鼻茸の形成<sup>23)</sup>、B細胞でのIgE産生に重要な役割を果たす<sup>24)</sup>。またIL-33は、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞をTh2細胞に分化誘導することも知られており、自然免疫だけでなく獲得免疫においても重要な役割を果たしている<sup>25)</sup>。このように、IL-33は気道粘膜におけるType 2炎症の起点としてECRSや気管支喘息の病態において非常に重要である。さ

らに、IL-33はより治療抵抗性の強い症例において発現量が多いという報告もあることから、難治再発の病態にも深くかかわることが考えられる<sup>26) 27)</sup>。したがって、IL-33の産生や上皮からの放出を制御することは、ECRSや気管支喘息などの気道におけるType 2炎症の制御につながるため、Baicalinを主成分に含む漢方薬のECRSや気管支喘息に対する治療有効性が期待できると考える。しかし、詳細な制御メカニズムはまだわかっていないため、今後さらなる検討が必要である。また、今回の検討でTSLPやIL-25の発現はBaicalinにより抑制されなかったことから、IL-33優位のエンドタイプの治療オプションとして有効性が発揮される可能性が考えられた。

ECRSや気管支喘息の気道粘膜上皮では、tryptaseの発現が亢進した肥満細胞が多数浸潤しており、上皮系サイトカインやIgEを介してTh2サイトカイン、PGD<sub>2</sub>、LTC<sub>4</sub>といったさまざまなメディエーターを放出することでType 2炎症の増幅に関わる。Tryptaseは鼻粘膜上皮に存在するproteinase-activated receptor 2 (PAR-2)に作用することでTSLPの産生を促す<sup>28) 29)</sup>。また、tryptaseにより切断修飾を受けることで、IL-33は活性化を持ちType 2炎症の増幅に関与する<sup>30)</sup>。したがってECRSの病態において肥満細胞が果たす役割は非常に大きい。本研究で、IL-33によりtryptaseの発現が亢進し、その効果はBaicalinにより有意に抑制されることがわかった (図5c)。さらに、上皮系サイトカインを介して肥満細胞からTh2サイトカインが産生されるが<sup>19) 20)</sup>、この働きも肥満細胞をBaicalinで前処理することにより有意に抑制された (図6a~c)。これらの結果から、Baicalinは肥満細胞でのtryptase発現を抑制することでIL-33-tryptaseポジティブフィードバックを断ち切り、さらに上皮系サイトカインを介する上皮細胞と肥満細胞とのクロストークに影響を与えることにより、抗Type 2炎症効果を示す可能性が考えられた。さらに、BaicalinはIgEを介する肥満細胞の脱顆粒にも影響を与える (図6d) ことから、自然免疫ばかりでなく獲得免疫における肥満細胞の制御も期待できるかもしれない (図7)。しかしながら詳細なメカニズムはまだわかっていないため、さらなる検討が必要と考える。

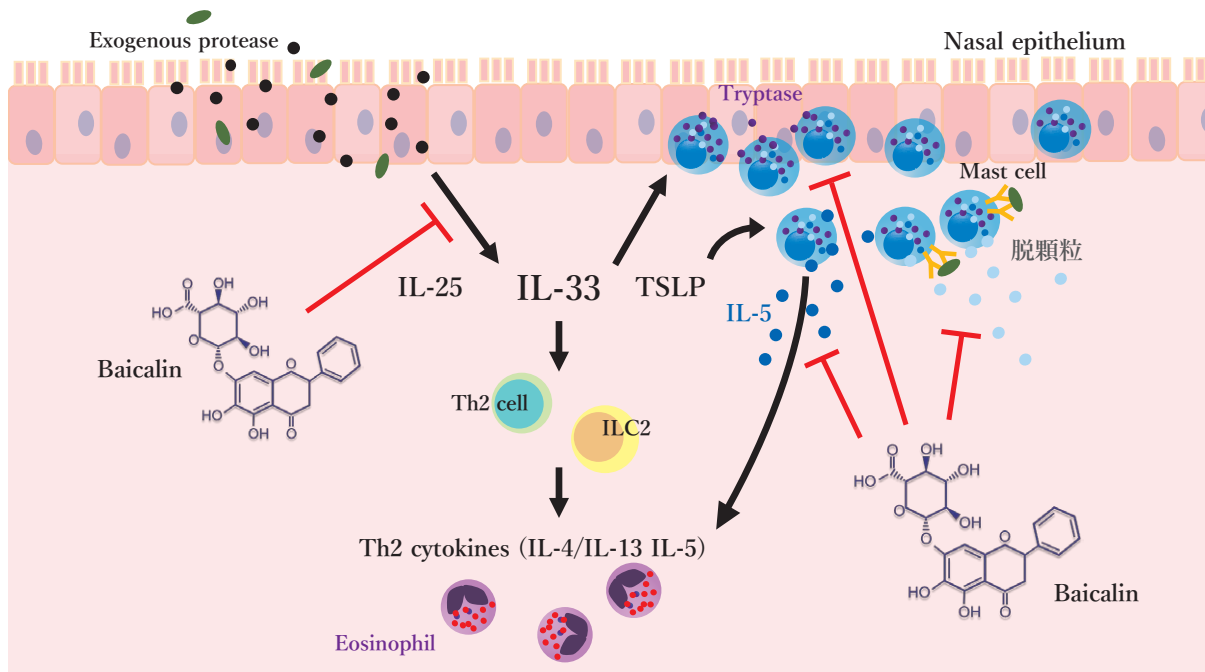


図7. Baicalinの抗 Type 2 炎症効果.

Baicalinは鼻粘膜上皮細胞におけるIL-33の産生を抑制する。また、Baicalinは肥満細胞に特異的な内因性プロテアーゼであるtryptaseの発現を抑制する。さらに、肥満細胞からのIL-5の放出を抑制する。

## まとめ

本研究において、Baicalinが上皮細胞からの上皮系サイトカインの産生や、肥満細胞における上皮系サイトカインを介したtryptase、Th2サイトカインの産生、IgEを介した脱顆粒を抑制することで、ECSR

の病態形成に関わるさまざまな分子の中の、より上流のキープレイヤーをターゲットとし、抗Type 2炎症作用を示すことがわかった<sup>31)</sup>。したがって、Baicalinを主成分とする黄芩を含むような漢方薬はECSRに対する治療効果が期待できると考える。

(吉田 加奈子)

## 文献

- 1) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2019;68:403-412.
- 2) Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet.* 2019; 394:1638-1650.
- 3) Rivero A, Liang J. Anti-IgE and anti IL5 biologic therapy in the treatment of nasal polyposis: A systematic review and meta-analysis. *Ann Oto Rhino Laryngol.* 2017;126:739-747.
- 4) Generoso A, Muglia-Chopra C, Oppenheimer J. Prospects for monoclonal antibody therapy in pediatric asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2018;18:45.
- 5) Urata Y, Yoshida S, Irie Y, et al. Treatment of asthma patients with herbal medicine TJ-96: a randomized controlled trial. *Respir Med.* 2002;96:469-474.
- 6) Katayama Y, Marumo S, Shima H, et al. Effectiveness of Shin'iseihaito in asthmatic patients with upper airway disease: A retrospective cohort study. *J Altern Complement Med.* 2017;23:121-125.
- 7) Tohda Y, Haraguchi R, Kubo H, et al. Effect of saiboku-to on dual-phase bronchoconstriction in asthmatic guinea pigs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1999;21:469-474.

- 8) Minami M, Konishi T, Jiang Z, et al. Effect of shin'iseihaito on murine allergic reaction induced by nasal sensitization. *J Tradit Complement Med.* 2016;6:252-256.
- 9) Cai Y, Li S, Li T, et al. Oral pharmacokinetics of baicalin, wogonoside, oroxylin A 7-O- $\beta$ -d-glucuronide and their aglycones from an aqueous extract of *Scutellariae Radix* in the rat. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;1026:124-133.
- 10) Akao T, Kawabata K, Yanagisawa E, et al. Baicalin, the predominant flavone glucuronide of *scutellariae radix*, is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form. *J Pharm Pharmacol.* 2000;52:1563-1568.
- 11) Xu L, Li J, Zhang Y, et al. Regulatory effect of baicalin on the imbalance of Th17/Treg responses in mice with allergic asthma. *J Ethnopharmacol.* 2017; 208:199-206.
- 12) Zhou YJ, Wang H, Sui HH, et al. Inhibitory effect of baicalin on allergic response in ovalbumin-induced allergic rhinitis guinea pigs and lipopolysaccharide-stimulated human mast cells. *Inflamm Res.* 2016; 65:603-612.
- 13) Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: Airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007;19: 711-720.
- 14) Kouzaki H, Tojima I, Kita H, et al. Transcription of interleukin-25 and extracellular release of the protein is regulated by allergen proteases in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;49:741-750.
- 15) Soyka MB, Holzmann D, Basinski TM, et al. The induction of IL-33 in the sinus epithelium and its influence on T-Helper cell responses. *PLoS One.* 2015;10:e0123163.
- 16) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyp. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:410-420. e5.**
- 17) Balzar S, Fajt ML, Comhair SA, et al. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. Data from the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:299-309.
- 18) Kaieda S, Shin K, Nigrovic PA, et al. Synovial fibroblasts promote the expression and granule accumulation of tryptase via interleukin-33 and its receptor ST-2(IL1RL1). *J Biol Chem.* 2010;285:21478-21486.
- 19) Iikura M, Suto H, Kajiwara N, et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cell. *Lab Invest.* 2007;87:971-978.
- 20) Nagarkar DR, Poposki JA, Comeau MR, et al. Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:225-232. e4.
- 21) Kimata M, Shichijo M, Miura T, et al. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy.* 2000;30:501-508.
- 22) Kato A. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2015;64:121-130.
- 23) **Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.**
- 24) **Fujieda S, Diaz-Sanchez D, Saxon A. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces in vivo IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19:507-512.**
- 25) Drake LY, Kita H. IL-33: Biological properties, functions and roles in airway disease. *Immunol Rev.* 2017;278819:173-184.
- 26) Baba S, Kondo K, Kanaya K, et al. Expression of IL-33 and its receptor ST2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope.* 2014;124:E115-E122.
- 27) Reh DD, Wang Y, Ramanathan M, et al. Treatment-recalcitrant chronic rhinosinusitis with polyps is associated with altered epithelial cell expression of interleukin-33. *Am J Rhinol Allergy.* 2010;24:105-109.
- 28) Kouzaki H, O'Grady SM, Lawrence CB, et al. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol.* 2009;183:1427-1434.
- 29) Levi-Schaffer F, Piliponsky AM. Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. *Trends Immunol.* 2003;24:158-161.
- 30) Lefrançois E, Duval A, Mirey E, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:15502-15507.
- 31) **Takabayashi T, Yoshida K, Fujieda S. Baicalin suppresses type 2 immunity through breaking off the interplay between mast cell and airway epithelial cell. (投稿中)**



## 9-3

## 好酸球性副鼻腔炎の新規治療

## ● サマリー

Type 2 炎症に関連する抗体薬が上市され、通常治療抵抗性の鼻茸を有する慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) を対象に大規模国際共同プラセボ対照二重盲検試験が行われ、その有効性が示された。その結果によって、実際的には中等症および重症好酸球性副鼻腔炎の治療薬として、使用されていくと思われる。我々は、上皮系サイトカインである TSLP 産生を制御する短鎖脂肪酸、IL-33 産生を制御する Bicalin、線溶系の中心的因子 Tissue plasminogen activator とフィブリンを標的にした新規治療法を 2 件の特許出願を含め開発しようとしている。

## これまでの好酸球性副鼻腔炎の治療

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 患者は一般的に膿性鼻汁を認め、医療機関を受診することが多い。まずアモキシリン (AMPC) を処方し、7日～10日で膿性鼻汁が消失したら、クラリスロマイシン (CAM) に変更する。しかし粘稠な鼻汁、嗅覚障害、鼻茸に変化がないので、経口ステロイド (セレスタミン、プレドニン) を処方する。すると粘稠な鼻汁は著減、鼻閉と嗅覚障害も改善する。さらに鼻茸の縮小も認められる。これが典型的な好酸球性副鼻腔炎の治療経過となる。その後、経口ステロイドを漸減し最終的に隔日ないしは、1週間に2日程度の内服とし、約2～3か月間継続する。適宜血中コルチゾールを測定し、異常がないかを確認する。症状がほぼ消失すれば経口ステロイド投与を中止する。軽快した症状は風邪などのウイルス感染、細菌感染によって、再度同じ状態に戻る。このような状態を何度か繰り返すと鼻茸は増大し鼻閉を強く感じるので、内視鏡下鼻副鼻腔手術 (ESS) を行うこととなる。

経口ステロイドを中止した後などに漢方薬を処方することもある。漢方薬は、辛夷清肺湯を処方している。辛夷清肺湯に含まれる Baicalin が効果を有する (第9章を参照)。効果に関しては個人差が大きいが、著効することもある。抗ロイコトリエン薬の処方をすることもあるが、あまり効果がない。鼻噴霧

用ステロイド薬は、ESS後に使用するが、術前での使用ではあまり効果がない。最近、気管支喘息治療薬である吸入ステロイドを吸入し鼻から吐き出すこと (経鼻呼出法) で、後部篩骨洞にステロイドが到達し鼻茸の縮小とCT所見が改善すると報告されている<sup>1)</sup>。

## IL-4 受容体抗体による治療

ヒト化抗体は、直接サイトカインやサイトカイン受容体の作用を阻害できる効果的な薬物である。IL-4受容体抗体 (Dupilumab, Dupixent<sup>®</sup>) はIL-4受容体 (IL-4R) a鎖に結合する。IL-4Ra鎖はIL-4RのみならずIL-13の受容体の1つでもあるので、DupilumabはIL-4とIL-13の両方の効果を抑制することができる。図1に気道上皮でのIL-4およびIL-13の一般的機能を示す。さらに鼻茸におけるIL-4およびIL-13の作用を図2に示す<sup>2)</sup>。獲得免疫系では、刺激 (細菌・ウイルスなど) の認識から樹状細胞がNaive T細胞を刺激してTh2 (T helper type 2) 細胞に分化させる。Th2細胞からはIL-4とIL-13が分泌される。一方、自然免疫系では、刺激 (プロテアーゼやその他) によって上皮細胞からTSLP、IL-33が産生され、ILC2 (Innate lymphoid cell type 2) を刺激してIL-4とIL-13を分泌させる。両方の系から放出されたIL-4とIL-13は、IgEへのクラススイッチ、粘液産

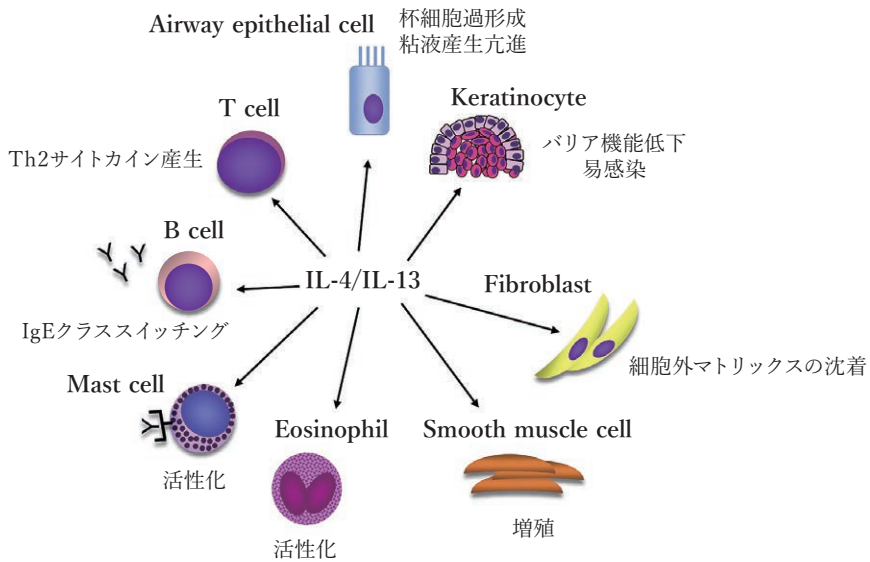


図1. 気道上皮でのIL-4およびIL-13の一般的機能.

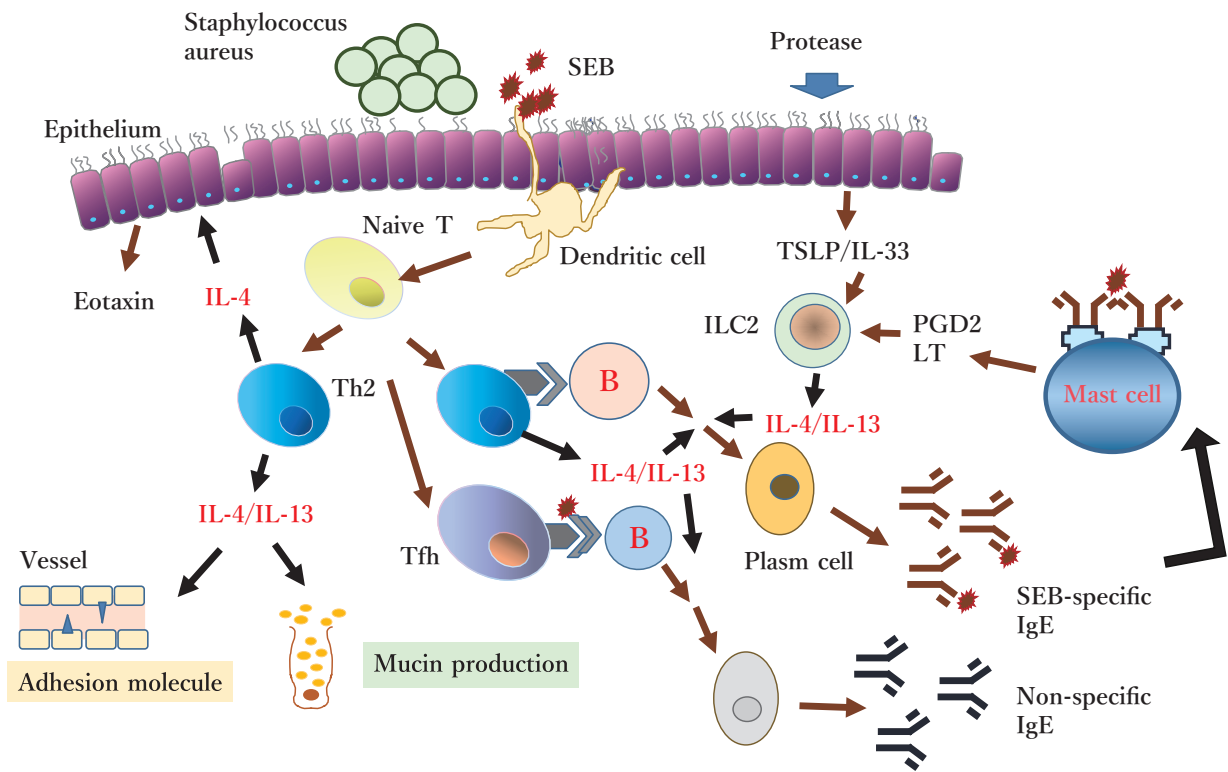


図2. 鼻茸におけるIL-4およびIL-13の作用.

細菌や抗原を樹状細胞が認識する獲得免疫系と上皮が直接刺激を受ける自然免疫系が存在する。

生亢進, 粘膜バリア機能の低下, Tissue plasminogen activator (tPA) の産生抑制, CST-1 の産生亢進, 好酸球浸潤促進, 血管内皮細胞の接着分子発現亢進など多彩な機能を有している<sup>2)3)</sup>.

Dupilumabのプラセボ対照二重盲検試験(後期第II相試験)は, 鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎(CRSwNP)60名に対して16週間の皮下注射で行われた<sup>4)</sup>. プラセボに対して, 鼻茸スコア(nasal polyp score),

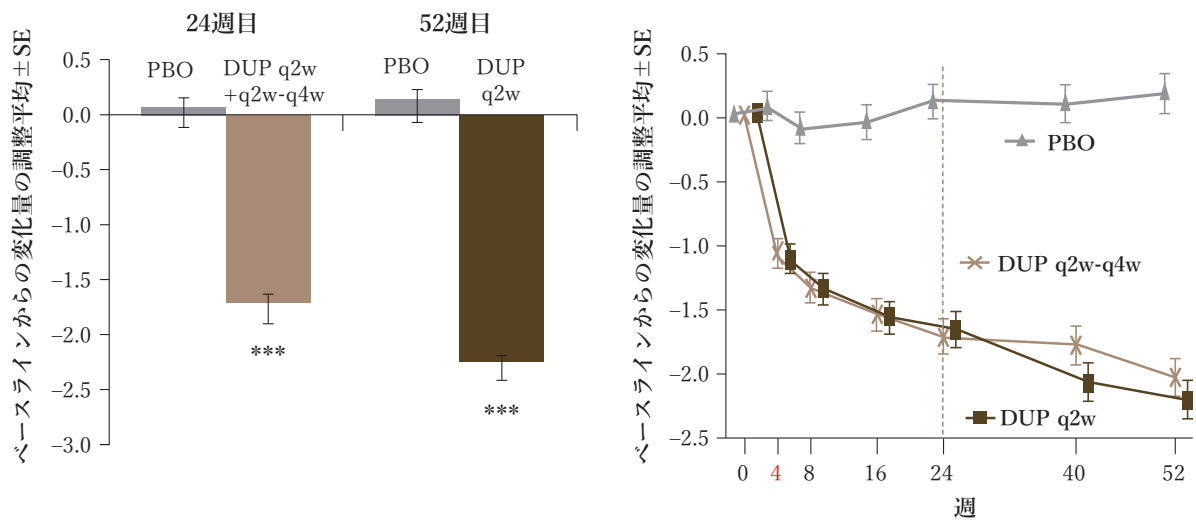


図3. Dupilumabによる鼻茸スコアの減少効果。

投与前の状態（ベースライン）からの変化量を示す。\*\*\* $P < 0.0001$  vs PBO,  $P < 0.0001$  (全評価時点, 両DUP vs PBO). DUP, デュピルマブ300 mg; PBO, プラセボ; SE, 標準誤差。

Lund-Mackay CTスコア, SNOT-22, 嗅覚検査において有意な改善を認めた。特に半数以上の鼻茸症例で, 鼻茸スコアが2以上改善を認めるとともに, 鼻閉, 鼻漏, 嗅覚障害の自覚症状および鼻腔通気度の有意な改善も認めた。

2016年からはCRSwNPに対する第III相大規模国際共同臨床研究が開始された。最初の研究では, Dupilumab (300 mg, 143名) とプラセボ (133名) を24週間2週間ごとに皮下注射を行い, 治療効果を検討した。さらに別の研究では, Dupilumab (300 mg, 2週ごとと52週間, 150名, A群), Dupilumab (300 mg, 2週ごとと24週間その後4週ごとと28週間, 145名, B群), プラセボ (52週間, 153名, C群) の3群での試験を行った<sup>5)</sup>。対象者は鼻茸スコア5以上の患者 (片側最低2以上) とした。その結果, 24週の段階で実薬群では, 鼻茸スコアが-2.06と有意な縮小を示し, ほとんど変化のなかったコントロール群との間に有意な差を認めた (図3)。52週の段階でもこの差は持続した。Visual analogue scale (VAS) で示した鼻閉スコアは, 24週の実薬群で-0.89とこれも有意な減少であり, 52週まで持続した。Lund-MackayによるCTスコアも, 24週で-7.44, 52週で-5.13を実薬群で示し, DupilumabがCRSwNPに対して非常に有効であることが証明された。その他,

SNOT-22, 嗅覚スコア, 嗅覚検査であるUPSITも実薬群では有意な改善を認めた。一方有害事象は, 上咽頭炎 (20%), 頭痛 (10%), 鼻炎症状 (7%) を呈したが, プラセボ群と有意差はなく, 問題になるような事象は認められなかった。

一般に鼻茸スコアが平均で2.0減少することは, 効果が少ないように思えるが, 平均で2.0の減少ということは, かなりの症例で, 両側2から3の鼻茸スコアを示すポリープが消失することを示す。図4にDupilumab投与前と投与後の鼻腔所見を示すが, 2および3であった鼻茸が両側とも24週で消失し, 52週まで継続した。図5には基準となる鼻茸スコアを示す。

この国際臨床研究では, 52週3アームの448名の参加者のうち49名が日本人であった。2000年以降, 日本でも好酸球性副鼻腔炎が増加してきたが, 欧米人とは効果が異なる可能もある。そこで同様に3アーム行った日本人データを解析した。全体の検討と同じように, Dupilumab (A群, 2週ごとと52週間, 16名), Dupilumab (B群, 2週ごとと24週間その後4週ごとと28週間, 17名), プラセボ (C群, 16名) で比較検討すると, 鼻茸スコアは52週でA群が-3.53, B群が-2.39を示し, 研究全体の鼻茸スコア改善率よりも日本人解析のほうが良好な結果であった<sup>6)</sup>。

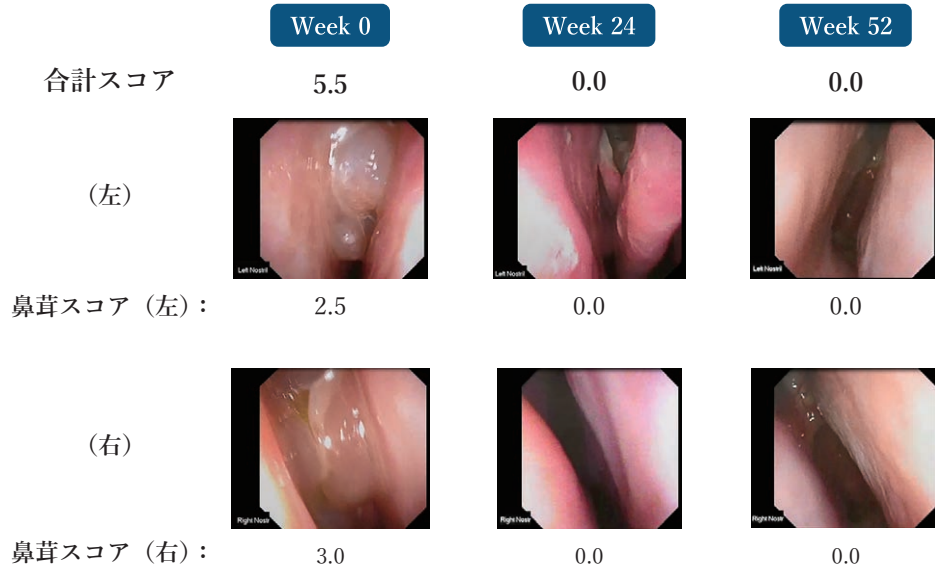
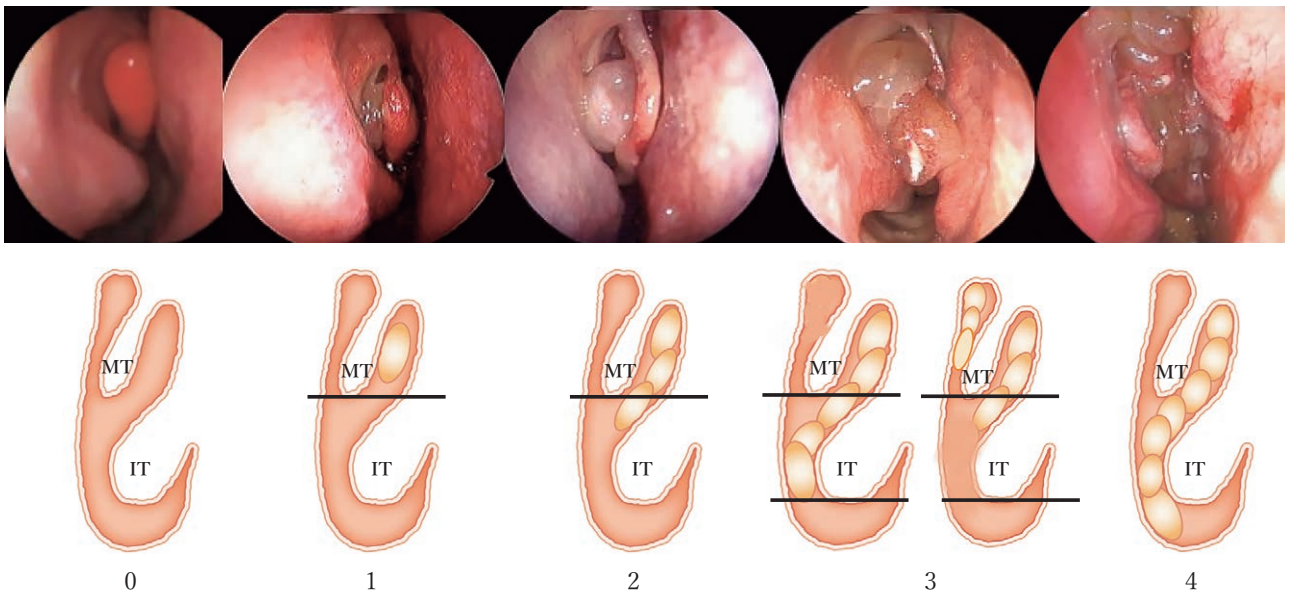


図4. Dupilumabが奏効した1例.

両側の鼻茸 (鼻茸スコア : 左2.5, 右 : 3.0) が24週で消失し, 52週まで消失が継続した.

鼻茸スコア (nasal polyp score)



- 0 : ポリプなし
  - 1 : 中鼻道内小ポリプ
  - 2 : 中鼻道限局ポリプ
  - 3 : 下鼻甲介下端に到達するポリプ もしくは 中鼻道のポリプスコア2と中鼻甲介内側にあるポリプの合併
  - 4 : 総鼻道を充満するポリプ
- MT : 中鼻甲介, IT : 下鼻甲介  
 ★両側で最大8点。

図5. 臨床研究で用いられている鼻茸スコアの概要.

嗅裂ポリプはスコア3に該当する.

鼻閉スコアも全体よりも高い改善率であった.  
 Lund-MackayによるCTスコアも有意に減少してい

た. 以上のことからDupilumabは日本人でも全く  
 問題なく治療効果が得られることが判明した.



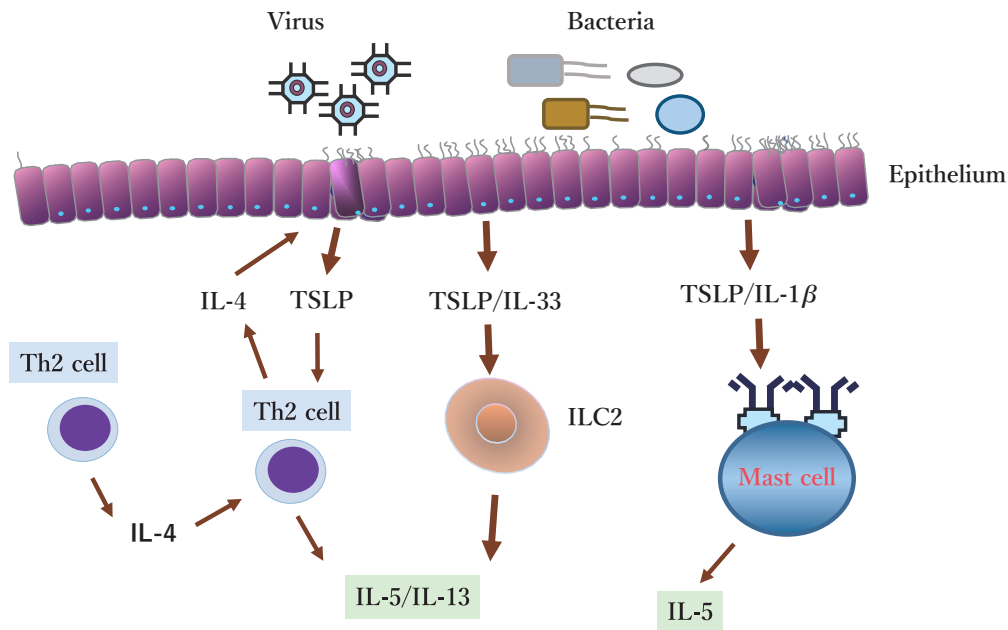


図6. 鼻粘膜におけるIL-5産生機序.

この国際臨床試験の対象者は、過去2年以内に経口ステロイドの使用か鼻茸に関する手術を受けた患者であり、鼻茸スコアが計5点以上であった。正確には、本報告で述べるECRS患者ではないが、末梢好酸球数が多く、気管支喘息かアスピリン不耐症を合併している患者が約82%を占めるので、かなりはECRS患者であると思われる。そこでJESREC Studyで決定したECRSの重症度別に国際臨床研究全体症例の治療効果を検討すると、中等症・重症ECRSでは、Dupilumabの治療効果は鼻茸スコア $-2.10 \sim -2.75$ と優れていた。一方でnon-ECRSでも $-1.57 \sim -1.53$ と有意な鼻茸スコアの改善を認めた<sup>7)</sup>。このことは、DupilumabがECRSにはもちろん有効であるが、鼻茸が大きく、過去2年以内に経口ステロイドの使用か鼻茸に関する手術を受けた患者であれば、JESRECスコアにかかわらず効果を認めることを示している。Dupilumabは2020年から日本においても制御不可能な難治性副鼻腔炎に対して保険適応になった。

## 抗IL-5抗体による治療

鼻茸において、ウイルスや細菌感染などが起こると鼻粘膜上皮からTSLP、IL-33が産生される。図6

に示すようにTSLPはTh2細胞に働くとIL-5を産生する。TSLPがILC2に働いてもIL-5を産生させる。IL-33もILC2を刺激してIL-5を産生させる。肥満細胞にはTSLPとIL-1 $\beta$ の共同作用でIL-5を産生させる<sup>8)</sup>。これらのIL-5が好酸球上のIL-5受容体(IL-5R)を介して、好酸球の増殖・分化促進、生存の延長、活性化、気道組織への浸潤を起こし、炎症関連物質遊離を促進させる。

鼻茸に対する抗IL-5抗体の効果は、2011年に報告されている。鼻副鼻腔手術後で経口ステロイドにも抵抗性の重症かつ難治性CRSwNPに対して、Mepolizumabを4週間の間隔で2回静脈注射を行うプラセボ対照二重盲検試験を行った。実薬群20名、プラセボ10名であった。その結果、実薬群の鼻茸スコアは $-1.3$ で有意な縮小効果を認めプラセボ群に対して有意な減少であった。60%の実薬群症例で鼻茸縮小を認めた<sup>9)</sup>。しかし対象症例が少なかったこともあり、Lund-Mackay CTスコア、SNOT-22、嗅覚障害スコア、鼻汁スコアには有意差を認めなかった。Mepolizumab群では、末梢血中好酸球数、血清中ECPとIL-5Rレベルの有意な低下を認めた。

次なるMepolizumabのプラセボ対照二重盲検試験(後期II相試験)は、実薬(54名)、プラセボ(53名)で、ベルギー、オランダ、英国の3か国で行われた<sup>10)</sup>。

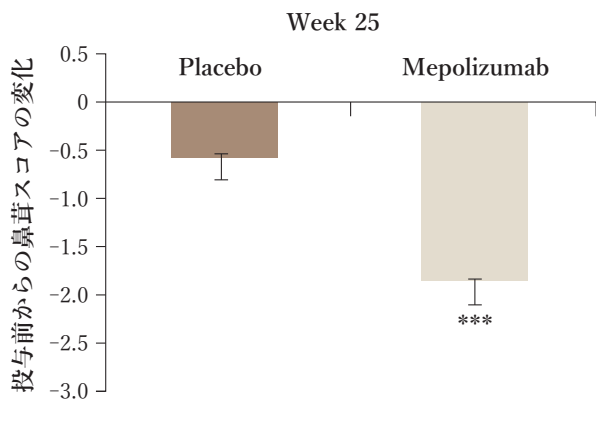


図7. Mepolizumabの鼻茸スコアに対する効果。

両側鼻茸スコアが5もしくはそれ以上で(片側最低鼻茸スコア2), 経口ステロイドにも抵抗性で鼻副鼻腔手術が必要な患者であった。著者の印象では, Dupilumabの対象とほぼ同じであろうと思われる。4週間6クルのMepolizumab静脈投与を行った結果, Mepolizumab群30%, プラセボ群10%の症例が手術を必要としなくなった。鼻茸スコアもMepolizumab群で-1.8と有意に減少した(図7)。鼻汁, 鼻閉, 嗅覚障害に関するVAS, SNOT-22も有意にMepolizumab群で減少した。末梢血好酸球数もMepolizumab群で有意に減少した。有害事象としては, 上咽頭炎, 咽頭痛, 頭痛などが認められたが, プラセボとの間に有意差は認められず, 問題ないと判定できた。

重症好酸球性喘息患者に対するMepolizumabの有効性を検討したプラセボ対照二重盲検試験のメタ解析では, CRSwNPを伴う重症好酸球性喘息患者のほうが, CRSwNPを伴わない重症好酸球性喘息患者よりも, Mepolizumabの上気道への有効性を示すSNOT-22の改善率が高いことが最近報告された<sup>11)</sup>。かつ末梢好酸球レベルの高い重症好酸球性喘息患者のほうが, Mepolizumabの効果が高く, 末梢好酸球レベルは, CRSwNPを伴う重症好酸球性喘息患者の治療効果予測マーカーになると推測された。以上のことから, Mepolizumabの有効性が高いフェノタイプは, 末梢好酸球レベルが高くCRSwNPを伴う重症好酸球性喘息患者であることが示された。現在は, 第III相大規模国際共同臨床研究が行われている。

IL-5自体に結合するMepolizumabに対してIL-5

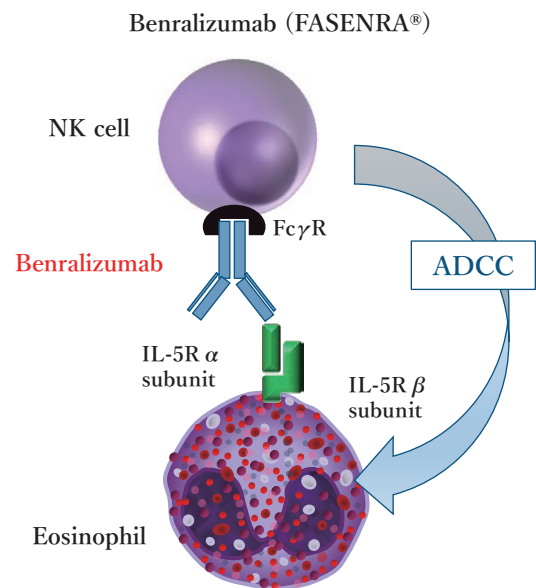


図8. Benralizumabの作用機序。

受容体に結合するBenralizumabが開発され,すでに気管支喘息の保険適応となっている。ヒト化IL-5受容体抗体(Benralizumab, FASENRA®)のFab部は好酸球上のIL-5受容体α鎖に結合し, Fc部がNK細胞のFcγRに結合して, 好酸球はNK細胞によって抗体依存性細胞障害(ADCC)を受け, アポトーシスに陥る(図8)。日本において好酸球性副鼻腔炎に対する第II相試験が行われた。Benralizumab(30 mg)3回皮下投与(23名), Benralizumab(30 mg)1回皮下投与(22名), placebo(11名)で行った<sup>8) 12)</sup>。Benralizumabは1回の投与で, 末梢好酸球数をゼロに減少させた。数例において, 鼻茸スコアを2以上減少させたが, 最終的にBenralizumab3回投与も1回投与もプラセボとの間に有意差は認められなかった(data no shown)<sup>12)</sup>。しかしながらこの臨床研究は, 投与回数が最大3回と少ない回数であり, 判定も12週間と短かった。そのため約1年間と期間を延長し, Benralizumabの投与回数を増やした大規模な国際共同プラセボ対照二重盲検試験が行われているとともに, それとは異なった臨床研究も計画されている。それによってBenralizumabのCRSwNPに対する治療効果が判明すると思われる。しかしながらこの第II相試験で明確になったことは, 末梢好酸球数がゼロになっても, 鼻茸スコアに変化がないものがかかり存在することである。末梢好酸

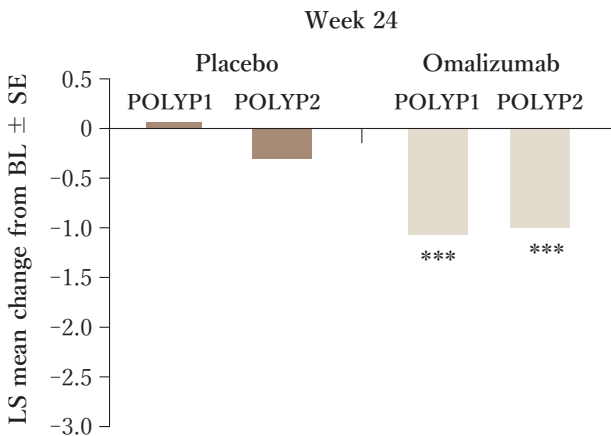


図9. Omalizumabの鼻茸スコアに対する効果.

球数と鼻茸組織中好酸球数は、正の相関が認められているが、Benralizumabで末梢好酸球数がゼロになると鼻茸組織中好酸球数もゼロになるのかは、現段階では不明であるが、好酸球をゼロにしても全ての鼻茸が縮小するわけではなく、鼻茸の病態が多面的である根拠を示している。

## 抗IgE抗体による治療

図1で示したように、IL-4とCD40によってB細胞はIgE産生形質細胞にクラススイッチを行い、IgEが産生される<sup>13)</sup>。抗IgE抗体(Omalizumab)は、血清中および組織中のIgEに結合し、肥満細胞および好塩基球の細胞表面のIgE受容体への結合を阻害する。重症気管支喘息、難治性の特発性慢性蕁麻疹に対して保険適応がある。現在、難治性花粉症も保険適応疾患となった。

CRSwNPに対してはOmalizumab群(15名)、プラセボ群(8名)の二重盲検試験が行われた。Omalizumabは患者の至適用量を2週ごともしくは4週ごとに皮下注射を行った結果、投与18週後の鼻茸スコアはOmalizumab群-2.67、プラセボ群-0.12と、Omalizumab群で有意に減少した<sup>14)</sup>。鼻閉スコア、鼻汁スコア、嗅覚障害スコアも有意な改善を認めた。日本においてアスピリン不耐症患者に1年間Omalizumabを投与するとLTE4、PGD2、末梢好酸球数とともにVASによる鼻閉スコア、鼻汁スコア、嗅覚障害スコアの有意な改善を認めた<sup>15)</sup>。アスピリ

ン不耐症患者では約90%に、CRSwNPを合併しており、ほとんどはECRSであるので、OmalizumabはECRSに効果があると思われる。実際ECRSに対してOmalizumabの有効性がCT上でも示されている<sup>16)</sup>。

最近報告された2つのプラセボ対照二重盲検試験を組み合わせた報告：POLYP1(Omalizumab 72名、プラセボ66名)とPOLYP2(Omalizumab 62名、プラセボ65名)では、2週ないしは4週ごとに24週間Omalizumabを投与した群において、鼻茸スコアがPOLYP1:-1.08、POLYP2:-0.90とプラセボ群の+0.06、-0.31に比較して有意に縮小を認めた(図9)<sup>17)</sup>。鼻閉、SNOT-22、嗅覚障害、鼻汁、後鼻漏の各スコアの改善も認められた。特に重篤な有害事象は認められなかった。

## その他の抗体薬による治療

図2、図6で示すように鼻粘膜上皮が細菌・ウイルス・抗原などに刺激をされるとTSLP、IL-33、そしてIL-25が分泌される。これら上皮系サイトカインがTh2細胞、ILC2、肥満細胞を刺激する。鼻茸では鉤状突起部などよりもTSLPのmRNAレベルは高値であるが、蛋白レベルは逆に減少している<sup>18)</sup>。それは組織中蛋白分解酵素(プロテアーゼ)にTSLPが感受性をもつためであり、鼻茸中には十分な活性を持ったTSLPが存在すると報告されている。

抗TSLP抗体(AMG 157, Tezepelumab)は、584名のコントロール不良の重症気管支喘息患者を対象者として第II相国際共同プラセボ対照二重盲検試験(PATHWAY試験)が行われ、年間喘息増悪率の低下、1秒率、ACQ-6スコアの有意な改善を認めた<sup>19)</sup>。喀痰中好酸球率、呼気一酸化窒素濃度、血清中IgEも有意な低下を認めた。TSLPは上流のサイトカインであり、いわゆる上流ドライバーとも言える。CRSwNPの遺伝子多型においてもTSLPリスクアレルでTSLP産生が多いこと<sup>20)</sup>、TSLPの下流であるIL-4、IL-5の抗体でかなりの効果が認められることから<sup>5)</sup>、抗TSLP抗体も難治性CRSwNPの治療薬として期待がもてる。

抗IL-33抗体(Etokimab)は、ピーナッツアレルギーに対して第II相プラセボ対照二重盲検試験が行



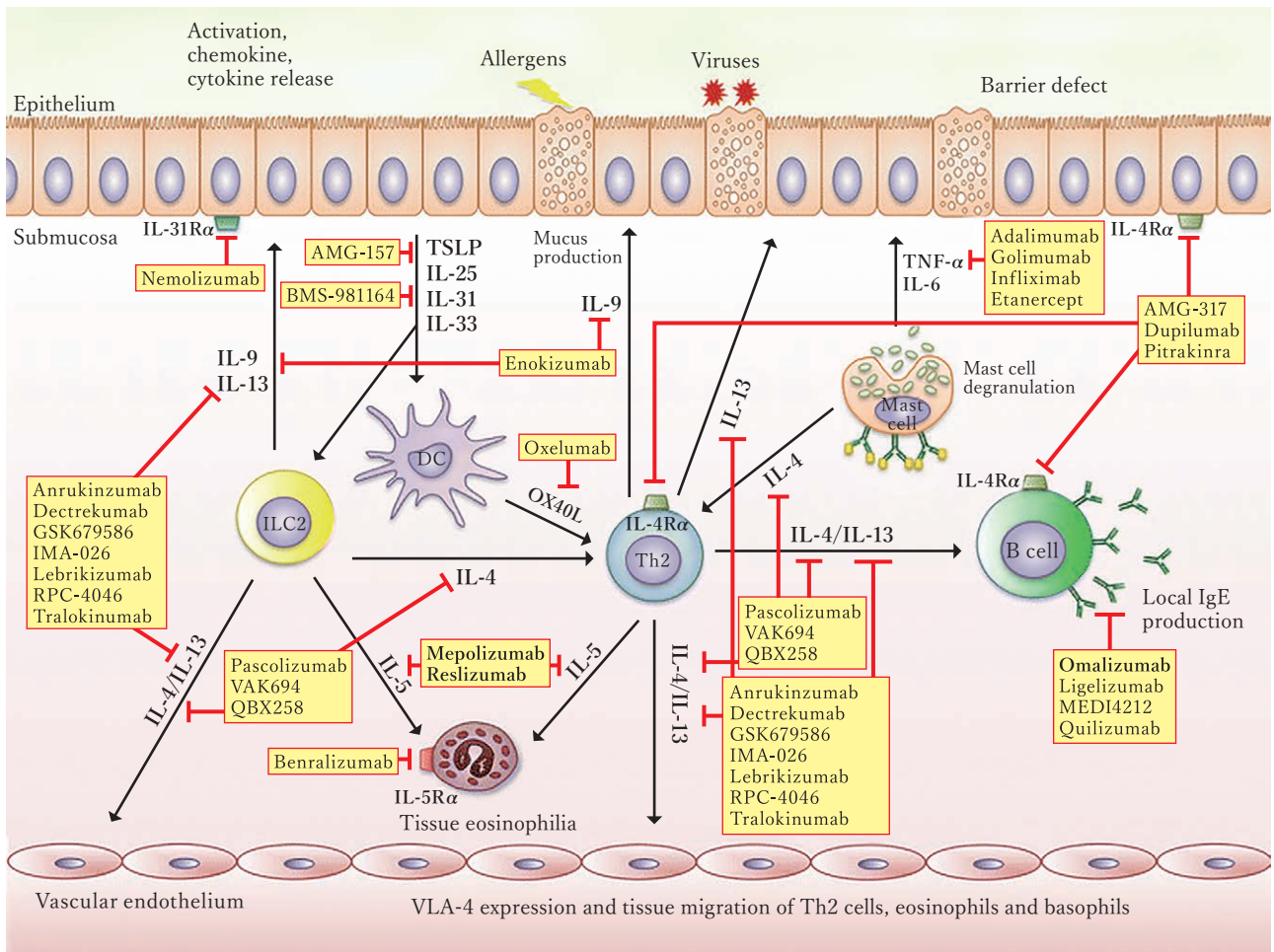


図10. 上皮系サイトカインに対する治療薬の可能性.

われた<sup>21)</sup>. Etokimabは安全で、食物誘発検査でも完全な抑制を認めるとともに、CD4+ T細胞からのIL-4, IL-5, IL-9, IL-13, ST2の産生を抑制した。今後気管支喘息, CRSwNPが研究対象になると思われる。図10には、鼻茸の病態に関して該当する抗体薬について記載した。これら抗体薬の治療はどのように選択すべきであるかは、今後の臨床効果との比較によると思われるが、我々は第10章で述べるFKN panel (Fukui nasal polyp panel) で検討し、その症例のエンドタイプを決定して、どの抗体薬を選択するか決める方法を提案している。

### 我々が見出した新規治療法

鼻粘膜上皮に細菌, ウイルス, 真菌などの微生物が感染もしくはプロテアーゼなどで刺激をすると上

皮からはTSLP, IL-33, IL-25が産生される。第5章で示した短鎖脂肪酸は、腸内細菌が産生するが、鼻腔内に存在する細菌からも産生される。短鎖脂肪酸は、鼻粘膜上皮から産生されるTSLPを抑制するデータを我々はすでに得ている(図11)。第10章のマイクロバイームで述べるnon-ECRSで検出され、ECRSで検出されない嫌気性菌は、かなりの短鎖脂肪酸を産生する。すなわちnon-ECRSでは、好酸球炎症を中心としたType 2炎症を惹起しないような機序が存在することになる。鼻汁中から測定可能な短鎖脂肪酸は測定できなかったが、細胞と細菌の距離によって、一定量の短鎖脂肪酸が産生されれば、至近距離であれば上皮細胞に抑制刺激を与えられると我々は考えている<sup>22)</sup>。さらにこの嫌気性菌のlipopolysaccharide (LPS) によって、鼻茸で発現の高かったALOX-15の産生を抑制することも判明した。



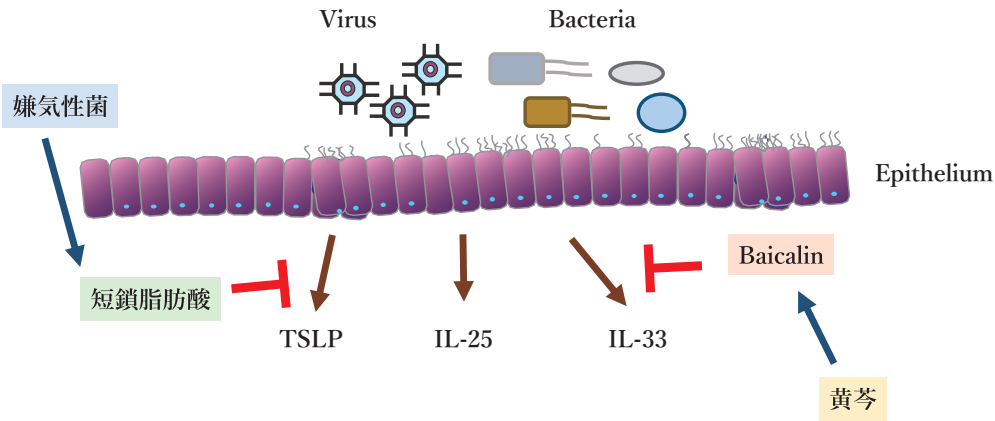


図11. 線溶系およびフィブリンに作用する治療薬の可能性.

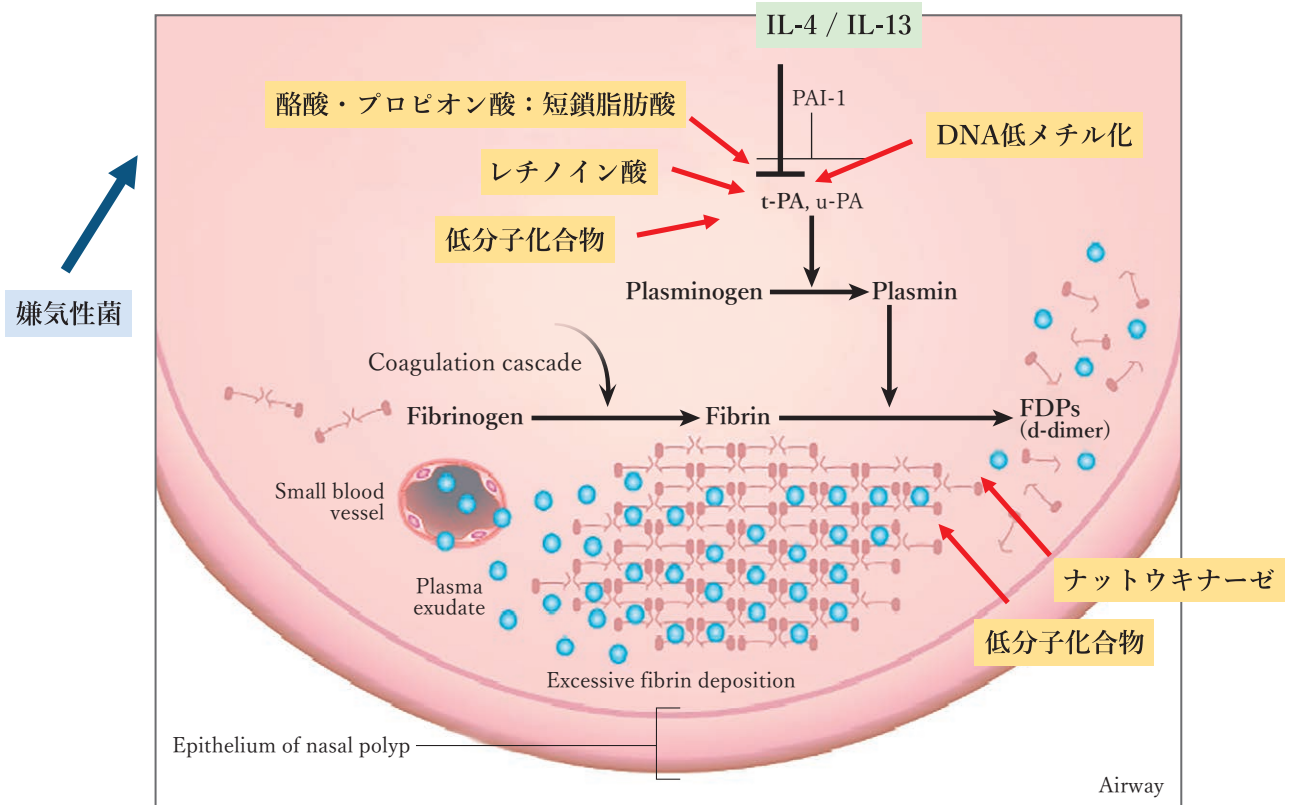


図12. 我々が見出し、発展させようと考えている好酸球性副鼻腔炎に対する新規治療物質.

第9章で述べている黄芩に含まれるBaicalinは、IFN $\gamma$ の刺激による鼻粘膜上皮からのIL-33の産生を抑制する<sup>23)</sup>。IFN $\gamma$ 自身は、ウイルス感染や細菌感染によってTh1細胞から産生されるので、病原微生物の感染による自然免疫系の活性化にBaicalinは効果があることになる。短鎖脂肪酸、BaicalinともにIL-25産生には影響を及ぼさなかった。TSLPとIL-33

の産生が抑制できれば、第3章で述べた鼻粘膜上皮からのCST-1産生が抑制され、好酸球浸潤のポジティブループを切断することが可能となる<sup>24)</sup>。

第5章で述べた凝固系の亢進と線溶系の抑制によるフィブリン網の沈着では、我々は線溶系カスケードの要であるtissue plasminogen activator (tPA)を治療標的としている<sup>25) 26)</sup>。細菌産生の短鎖脂肪酸、

その中の酪酸とプロピオン酸はtPAを誘導する<sup>22)</sup>(図12)。tPAのプロモータ領域を低メチル化にするとtPAの発現は増加する<sup>27)</sup>。同様にレチノイン酸もtPAを誘導する<sup>28)</sup>。我々はtPAの性質を持つ低分子化合物にも注目し、特許を申請した(特願2019-101552, 慢性副鼻腔炎の予防剤または治療剤, およびこれらを製造するためのスタチンの使用: 坂下雅文, 藤枝重治, 高林哲司)。

tPAはプラスミノーゲンをプラスミンにし、フィブリン網を分解する。第9章で述べたナットウキ

ナーゼは直接フィブリン網を分解する。これは日常の食生活によるECRS治療として有効性が得られる可能性がある。臨床研究自体としては、長期にわたる研究期間が必要なため今回成功しなかったが、生活習慣としては試みるべきものと思う(図12)。我々は、ナットウキナーゼと同様の作用を持つ低分子化合物分子に関して特許を申請した(特願 2019 医薬組成物)。最終的にこの化合物の利用を考えている。

(藤枝 重治)

## 文献

- 1) Kobayashi Y, Asako M, Yamamoto T, et al. Replacement of SFC-DPI with SFC-MDI exhaled through the nose improves eosinophilic chronic rhinosinusitis in patients with bronchial asthma. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2017;55:89-94.
- 2) Matsunaga K, Katoh N, Fujieda S, et al. Dupilumab: Basic aspects and applications to allergic diseases. *Allergol Int.* 2020;69:187-196.
- 3) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2019;68:403-412.
- 4) Bachert C, Mannent L, Naclerio RM, et al. Effect of subcutaneous dupilumab on nasal polyp burden in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis: A randomized clinical trial. *JAMA.* 2016;315:469-479.
- 5) Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet.* 2019;394:1638-1650.
- 6) Fujieda S, Matsune S, Takeno S, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients in Japan with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a sub-group analysis of the placebo-controlled, randomized, phase 3 SINUS-52 trial. 投稿中
- 7) Fujieda S, Matsune S, Takeno S, et al. Impact of eosinophilic status on efficacy of dupilumab in the JESREC subpopulations of Phase 3 SINUS-52 study for severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps. 投稿予定
- 8) Nagase H, Ueki S, Fujieda S. The roles of IL-5 and anti-IL-5 treatment in eosinophilic diseases: asthma, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2020;69:178-186.
- 9) Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, et al. Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:989-995.
- 10) Bachert C, Sousa AR, Lund VJ, et al. Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:1024-1031.
- 11) Howarth P, Chupp G, Nelsen LM, et al. Severe eosinophilic asthma with nasal polyposis: A phenotype for improved sino-nasal and asthma outcomes with mepolizumab therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2020; 145:1713-1715
- 12) Takabayashi T, Asaka D, Okamoto Y, et al. A phase II, multicenter, randomized, placebo-controlled study of benralizumab, a humanized anti-IL-5R alpha monoclonal antibody, in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. 投稿中
- 13) Fujieda S, Zhang K, Saxon A. IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells gamma subclass-specific isotype switch: switching to gamma 1, gamma 3, and gamma 4, but not gamma 2. *J Immunol.* 1995;155:2318-2328.
- 14) Gevaert P, Calus L, Van Zele T, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:110-116.

- 15) Hayashi H, Mitsui C, Nakatani E, et al. Omalizumab reduces cysteinyl leukotriene and  $9\alpha,11\beta$ -prostaglandin F<sub>2</sub> overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:1585-1587.
- 16) **Okano M, Kariya S, Ohta N, et al. Association and management of eosinophilic inflammation in upper and lower airways. *Allergol Int.* 2015;64:131-138.**
- 17) Gevaert P, Omachi TA, Corren J, et al. Efficacy and safety of omalizumab in nasal polyposis: Two randomized phase III trials. *J Allergy Clin Immunol.* 2020; in press
- 18) Nagarkar DR, Poposki JA, Tan BK, et al. Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:593-600.
- 19) Corren J, Parnes JR, Wang L, et al. Tezepelumab in adults with uncontrolled asthma. *N Engl J Med.* 2017;377:936-946.
- 20) **Nakayama T, Hirota T, Asaka D, et al. A genetic variant near TSLP is associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and aspirin-exacerbated respiratory disease in Japanese populations. *Allergol Int.* 2020;69:138-140.**
- 21) Chinthrajah S, Cao S, Liu C, et al. Phase 2a randomized, placebo-controlled study of anti-IL-33 in peanut allergy. *JCI Insight.* 2019;4:e131347.
- 22) **Imoto Y, Kato A, Takabayashi T, et al. Short-chain fatty acids induce tissue plasminogen activator in airway epithelial cells via GPR41&43. *Clin Exp Allergy.* 2018;48:544-554.**
- 23) Takabayashi T, Yoshida K, Fujieda S. Baicalin suppresses type 2 immunity through breaking off the interplay between mast cell and airway epithelia cell. 投稿中
- 24) Kato Y, Takabayashi T, Sakashita M, et al. Expression and Functional Analysis of CST1 in Intractable Nasal Polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;59:448-457.
- 25) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.
- 26) Takabayashi T, Schleimer RP. Formation of nasal polyps: The roles of innate type 2 inflammation and deposition of fibrin. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145:740-750.
- 27) Kidoguchi M, Noguchi E, Nakamura T, et al. DNA methylation of proximal PLAT promoter in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Rhinol Allergy.* 2018;32:374-379.
- 28) Sakashita M, Takabayashi T, Imoto Y, et al. Potential regulatory and therapeutic role of retinoic acid in fibrin deposition within nasal polyps: Particular relevance in aspirin-exacerbated respiratory disease. 投稿中

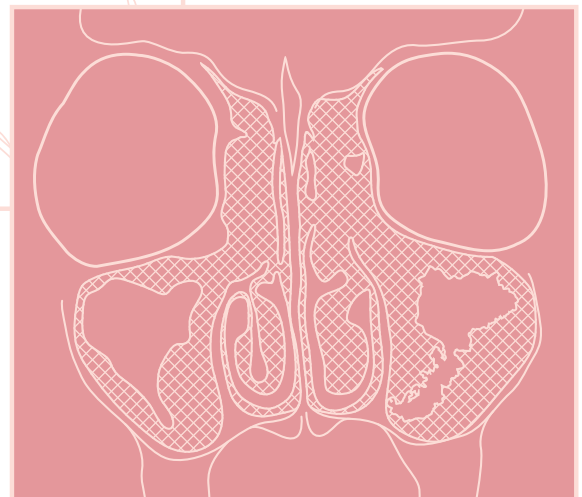
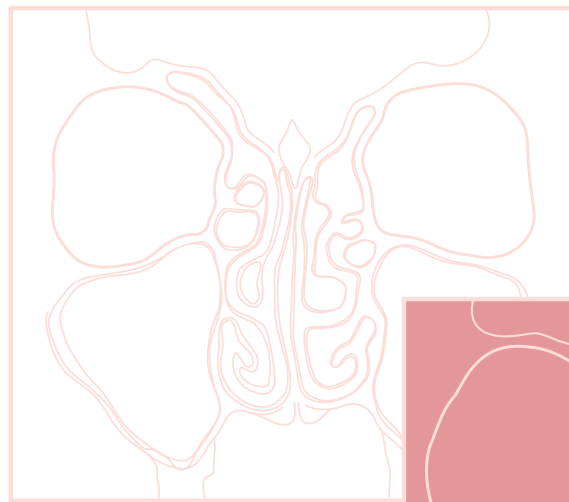




将来展望

## 第10章

# マイクロバイオーム





# 慢性副鼻腔炎のマイクロバイオーーム

## サマリー

慢性副鼻腔炎の鼻腔および口腔の微生物叢（マイクロバイオーーム）について、鼻茸を合併している慢性副鼻腔炎を好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎に分類し16S rRNA メタゲノム解析を行った。好酸球性副鼻腔炎は非好酸球性副鼻腔炎と比較して $\alpha$ 多様性（個体内での均等性）が低下し、 $\beta$ 多様性（個体間での種類性）が異なっていた。好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎においてそれぞれ特徴的なバイオマーカーとなる菌種や細菌機能が検出されており、好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎とは異なる鼻腔マイクロバイオーームを有する可能性が示唆された。

## はじめに

ヒトを含む生物は自然環境に生息する微生物叢（マイクロバイオーーム）と一体となってそれぞれの生体系を形成している。地球上の細菌数は約 $5 \times 10^{30}$ と考えられており<sup>1)</sup>、ヒトに生息するものに限っても1,000種類以上、一人あたり1~3 kgの細菌と共存している。微生物学は、従来はグラム染色法にはじまり、培養法やPCR法を利用した菌種の同定法が主流であった。培養法には、特定できる菌種は培地で増殖可能な菌種に限られるため全ての微生物が培養できないという限界があった。また、PCR法は特定の菌種の遺伝子配列に基いてプライマーを設計し検出する検査法のため、想定外の微生物を測定することは困難であった。2004年にVenterらによって、海洋の細菌群などを網羅的にショットガンシーケンシング解析が初めて報告され、微生物由来のDNAを網羅的にシーケンシングするメタゲノム解析が可能となった<sup>2)</sup>。その後、2000年代半ばより次世代シーケンサーが開発され、一度により大量のゲノム配列を得ることが可能となり、現在では、16S rRNA、18S rRNA、ITS (internal transcribed spacer) など微生物のDNAのうち特定の領域をターゲットとしてPCR増幅を行い解析する手法が発展している。

鼻副鼻腔に関する細菌研究として、1999年にNadalらは、副鼻腔炎を伴わない健常人の中鼻道

検体を採取し、Gram染色ではほとんどの症例で菌種の同定ができず、培養法でも3割以上に細菌が検出されないことを報告した<sup>3)</sup>。2009年にAbou-Hamadらは、健常人から採取した上顎洞の洗浄液のうち、培養法では8割以上に細菌が検出されなかったことを報告した。今では信じがたいことであるが、少なくとも10年程前までは健常人の副鼻腔内は無菌であると考えられていた<sup>4)</sup>。その後、2014年にChoiらが韓国における慢性副鼻腔炎や健常人の鼻腔洗浄液を初めて次世代シーケンサーを用いて解析し、鼻腔内は無菌ではなく常在細菌叢が存在し、慢性副鼻腔炎患者では細菌叢の多様性が変容 (dysbiosis) していることを報告した<sup>5)</sup>。その後、アメリカ、ヨーロッパ、オセアニア、アジア諸国から続々と慢性副鼻腔炎におけるマイクロバイオーーム研究の成果が報告され、今では鼻腔内のマイクロバイオーームが環境的要因の一つとして慢性副鼻腔炎の発症や病勢に強く関わっていると考えられるようになってきた<sup>6)7)</sup>。

しかしながら、日本における慢性副鼻腔炎患者をはじめとした鼻腔内のマイクロバイオーームの報告は、私たちが調べたかぎり存在しない。さらに、海外においても慢性副鼻腔炎のマイクロバイオーームは鼻茸やその他の全身性の合併症の有無などで分類解析した報告に限られており、好酸球性副鼻腔炎や非好酸球性副鼻腔炎に着目して解析した報告はほとんど

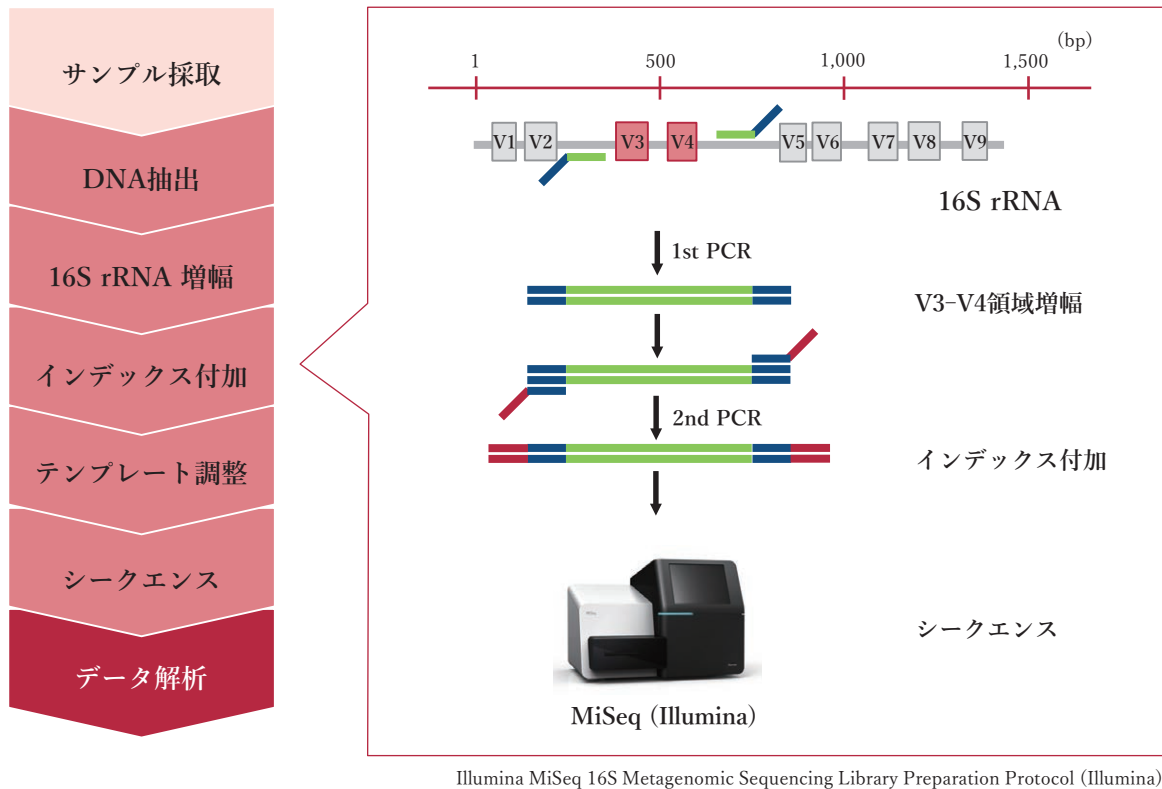


図1. 16Sメタゲノム解析の概要.

ない。そこで私たちは今回、好酸球性副鼻腔炎、非好酸球性副鼻腔炎、健常者からそれぞれ採取した検体を用いて、好酸球性副鼻腔炎に関連する鼻腔内マイクロバイオームを明らかにすることを目指した。本研究の結果から、好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎では細菌叢が異なる可能性が示唆され、さらに本研究で新たに同定した菌種から産生される代謝産物を用いた機能実験を行っている。

## 患者情報と検体採取

福井大学医学部附属病院および獨協医科大学埼玉医療センターにおいて、慢性副鼻腔炎に対する内視鏡下鼻副鼻腔手術を行った患者を対象とした。コントロールは非炎症性鼻疾患（鼻中隔彎曲症など）に対する手術を行った患者とした。合計130症例（慢性副鼻腔炎112例、コントロール18例）より検体を採取した。慢性副鼻腔炎はJESRECスコアに従って、好酸球性副鼻腔炎59例（スコア11点以上）、非好酸球性副鼻腔炎53例（スコア10点以下）に分類した。

内視鏡下鼻副鼻腔手術時もしくは前処置時に、嗅裂 (olfactory cleft; OC)、中鼻道 (middle meatus; MM)、下鼻甲介前縁 (interior turbinate; IT)、口腔から、それぞれ滅菌スワブを用いてぬぐい液を採取した。それぞれの症例から検体を採取し、嗅裂105検体、中鼻道121検体、下鼻甲介117検体、口腔121検体を以後の解析に使用した。必要に応じて内視鏡を使用し慎重に検体を採取した。採取した検体は氷上で保存しDNA抽出まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。

## 次世代シーケンサーによるシーケンス

概要を図1に示す。採取したスワブから微生物DNAを抽出した。抽出した微生物DNAから、16S Metagenome Sequencing Library Preparation (イルミナ) のプロトコルに沿ってライブラリを作成した。具体的には、細菌DNAの16S rRNA遺伝子V3~V4領域をPCR法により増幅し、増幅産物を精製したのちにインデックスを付加した。作成したライブラリはAgilent 2100 BioanalyzerもしくはTapeStation 2200 (アジレントテクノロジー) によ



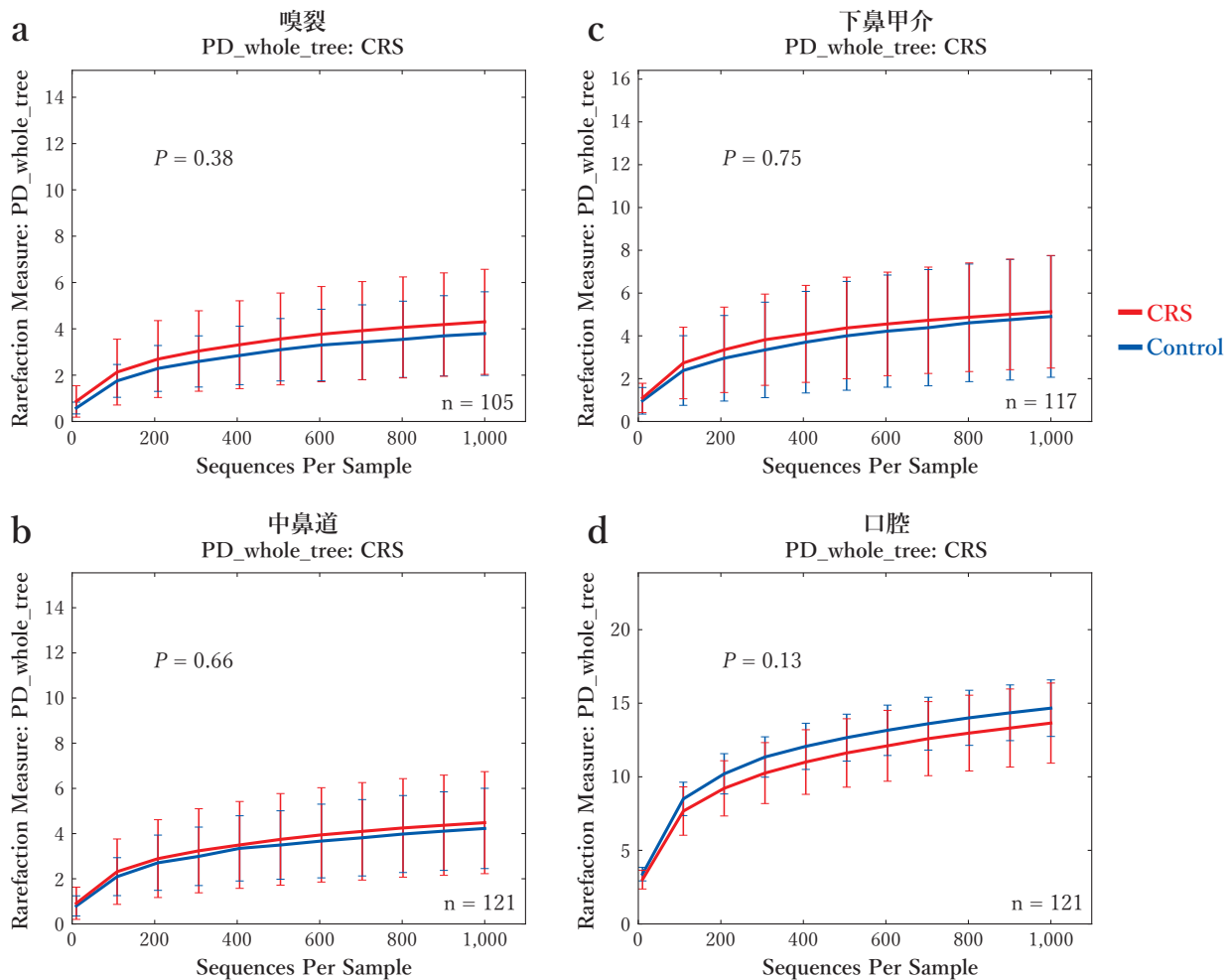


図2. 慢性副鼻腔炎とコントロールの各部位における $\alpha$ 多様性 (a, 嗅裂; b, 中鼻道; c, 下鼻甲介; d, 口腔).

る品質チェックを行い、次世代シーケンサーMiSeq(イルミナ)を使用してシーケンスを行った。

### シーケンスデータの解析

次世代シーケンサーによって得られた微生物細菌叢由来のシーケンスデータを、細菌ゲノム配列データベースはGreengenes database<sup>8)</sup>とQuantative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)<sup>9)</sup>を用いて解析した。慢性副鼻腔炎群と非炎症性疾患群、さらに慢性副鼻腔炎はJESRECスコアに基づいて好酸球性副鼻腔炎群(11点以上)と非好酸球性副鼻腔炎群(10点以下)に細分類し、各群間における細菌叢の $\alpha$ 多様性(個体内での均等性)、 $\beta$ 多様性(個体間での種類似性)を比較した。さらにLinear discriminant analysis Effect Size (LEfSe)<sup>10)</sup>を用いて、各群間のバイオマーカー細菌種の探索を行った。細菌叢から細

菌機能の予測についてはPhylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt)<sup>11)</sup>を使用し、Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP)<sup>12)</sup>を用いて各群間における予測された細菌機能の比較を行った。 $P < 0.05$ を統計的有意水準とした。

### 細菌叢の多様性

慢性副鼻腔炎とコントロールの $\alpha$ 多様性(個体内での均等性)との比較では、嗅裂, 中鼻道, 下鼻甲介, 口腔いずれも有意差は認められなかった(図2)。さらに、慢性副鼻腔炎を好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎に分類して3群で $\alpha$ 多様性を比較したところ、中鼻道のみで統計学的有意差を認め( $P=0.012$ )、好酸球性副鼻腔炎では非好酸球性副鼻

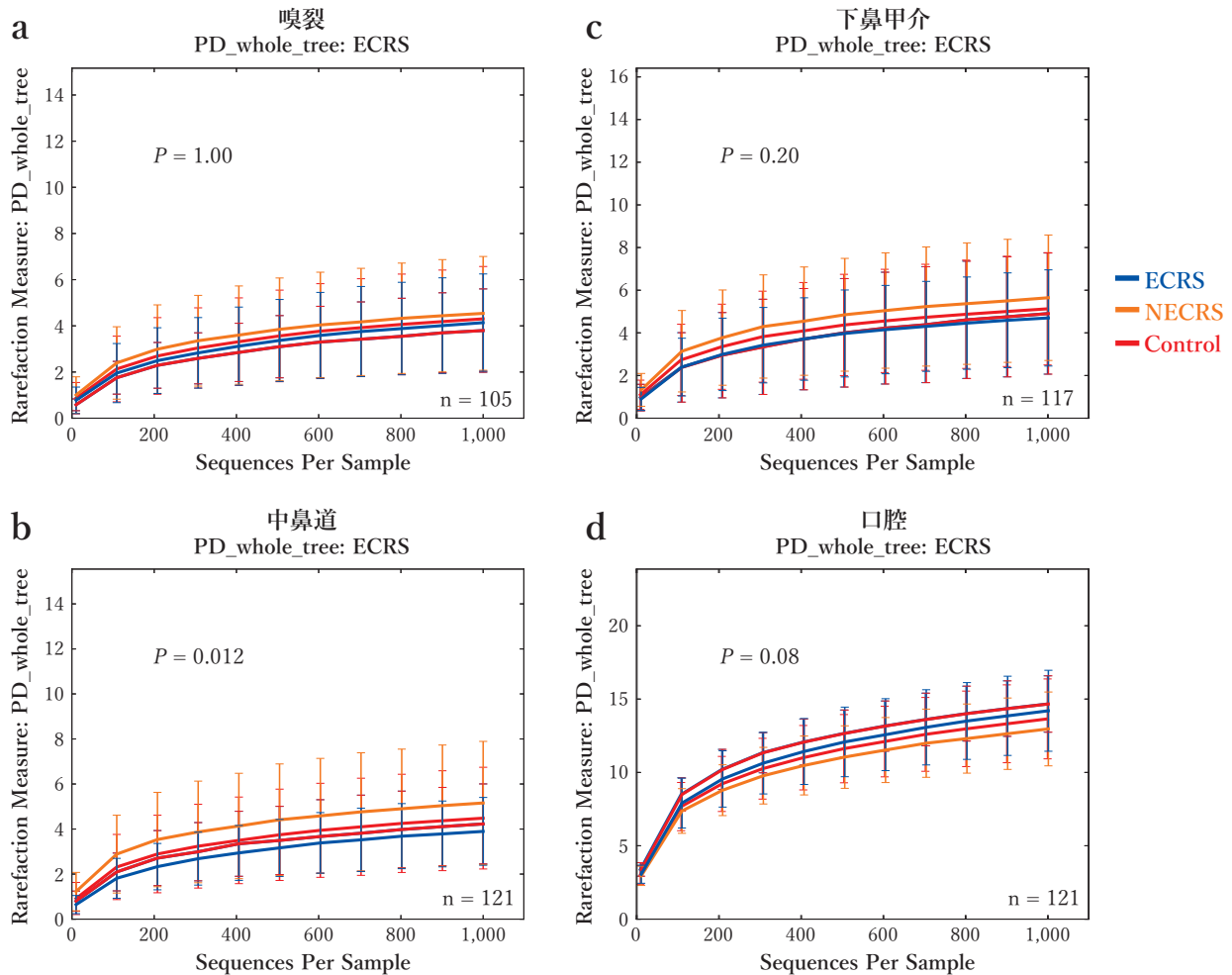


図3. 好酸球性副鼻腔炎, 非好酸球性副鼻腔炎, コントロールの各部位における $\alpha$ 多様性 (a, 嗅裂; b, 中鼻道; c, 下鼻甲介; d, 口腔).

腔炎と比較して $\alpha$ 多様性が低下していた (図3).

次に, 慢性副鼻腔炎とコントロールの $\beta$ 多様性 (個体間での種の類似性) を比較したところ, 嗅裂, 中鼻道, 下鼻甲介, 口腔いずれも有意差は認めなかった (図4). さらに, 慢性副鼻腔炎を好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎に分類して3群で $\beta$ 多様性を比較したところ, 鼻腔3か所 (嗅裂, 中鼻道, 下鼻甲介) 全てにおいて有意差が検出され, 好酸球性副鼻腔炎・コントロールと非好酸球性副鼻腔炎の鼻腔内は異なる細菌叢を有することが示唆された (図5).

### バイオマーカー菌種の同定

鼻腔および口腔の細菌種を決定したところ, 図6に示す細菌種 (phylum/genus level) が主に同定された. さらに, 好酸球性副鼻腔炎・非好酸球性副鼻

腔炎・コントロールそれぞれの細菌叢におけるバイオマーカーとなる細菌種の探索を行ったところ, それぞれの部位で複数の細菌種が同定された (図7). 興味深いことに, 鼻腔3か所 (嗅裂, 中鼻道, 下鼻甲介) において共通の菌種がバイオマーカーとして同定された. 鼻腔内において部位にかかわらず共通の菌種が病態などに関連する可能性がある. 一方, 口腔では鼻腔と共通の菌種は同定されなかった.

### 細菌叢の機能解析

細菌叢解析から得られたデータから細菌機能の予測を行い, 各群間の予測メタゲノム機能を比較したところ, 中鼻道において好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎の細菌機能が異なっていた (図8). 好酸球性副鼻腔炎では複数のアミノ酸代謝のパスウェ

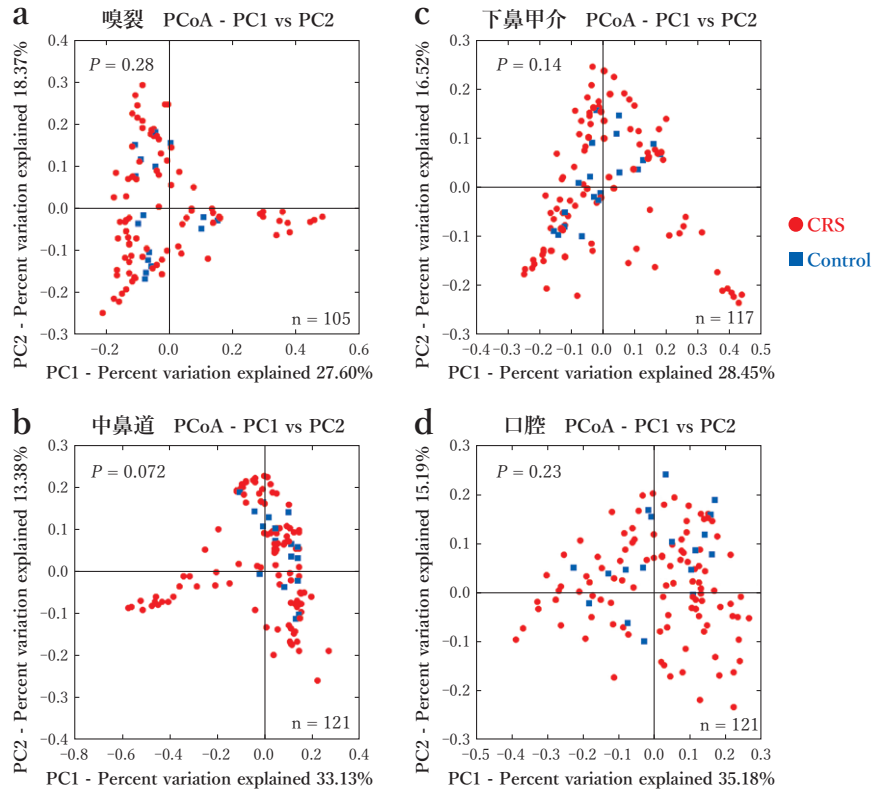


図4. 慢性副鼻腔炎とコントロールの各部位におけるβ多様性 (a, 嗅裂 ; b, 中鼻道 ; c, 下鼻甲介 ; d, 口腔).

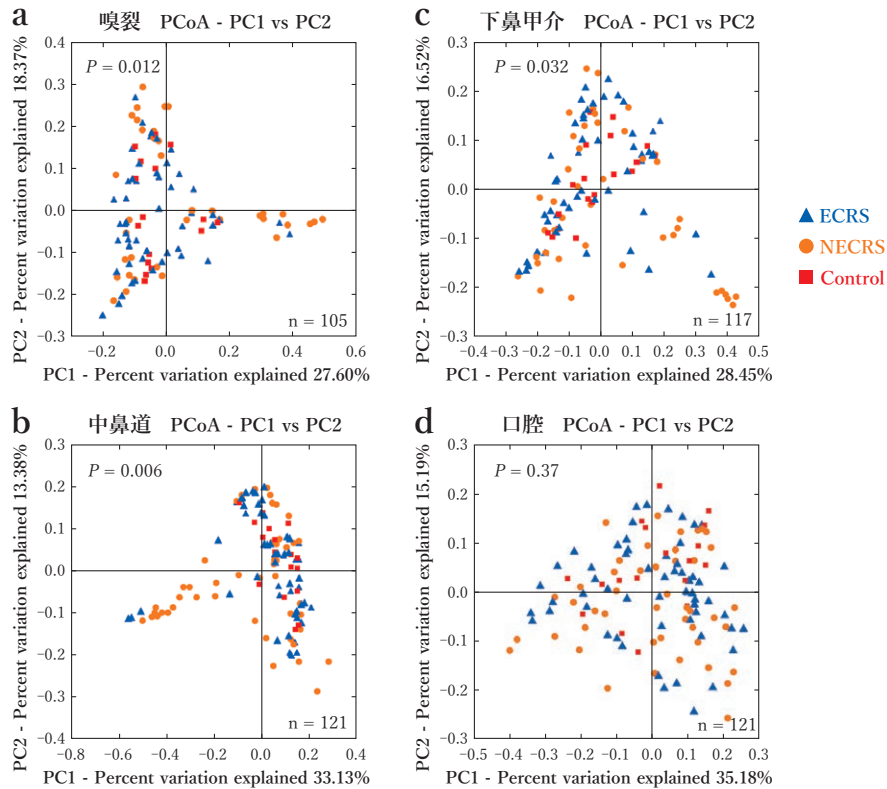


図5. 好酸球性副鼻腔炎, 非好酸球性副鼻腔炎, コントロールの各部位におけるβ多様性 (a, 嗅裂 ; b, 中鼻道 ; c, 下鼻甲介 ; d, 口腔).

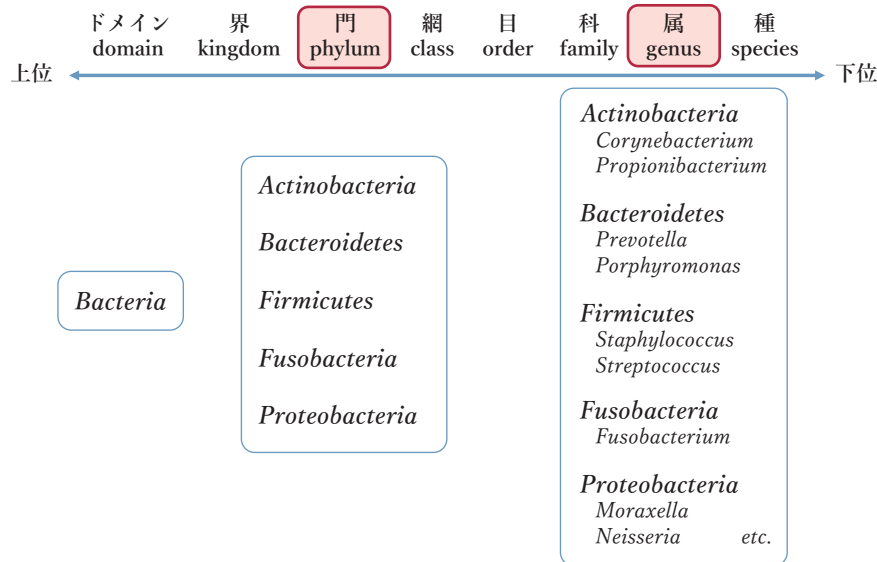


図6. 鼻腔（嗅裂・中鼻道・下鼻甲介）において主に同定された細菌種 (phylum/genus level).

イが亢進しており，一方，非好酸球性副鼻腔炎ではエネルギー代謝やミスマッチ修復など細胞傷害に関わるパスウェイが亢進していた。

## まとめ

慢性副鼻腔炎の鼻腔および口腔のマイクロバイオームについて，慢性副鼻腔炎を好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎に分類し16S rRNAメタゲノム解析を行った。好酸球性副鼻腔炎は非好酸球性副鼻腔炎と比較して $\alpha$ 多様性が低下し， $\beta$ 多様性が異なり，好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎においてそれぞれ特異的なバイオマーカーとなる菌種や細菌機能を示した。慢性副鼻腔炎の中でも，好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎は異なる鼻腔マイクロバイオームであることが示唆された。

好酸球性副鼻腔炎は中鼻道や嗅裂に鼻茸を合併することが多く，ムチン状の鼻汁が遷延し，抗菌薬治

療に対する抵抗性を示す難治性の疾患である。主にTh2サイトカインが関与するType 2炎症疾患であると考えられている。一方，非好酸球性副鼻腔炎は細菌感染を契機として発症する慢性炎症性疾患といわれ，Th1サイトカインが関与するとされる。本研究では，好酸球性副鼻腔炎ではアミノ酸代謝などのパスウェイが亢進していた一方で，非好酸球性副鼻腔炎では細胞傷害に関わるパスウェイが亢進しており，細菌による鼻副鼻腔の細胞傷害が起きている可能性が示唆された。

さらに，本研究により同定した菌種およびその代謝物を用いて，*in vitro*の実験により鼻粘膜細胞や気管上皮細胞へ与える影響について検討した。詳細は次章を参考にされたい。鼻腔マイクロバイオームやその代謝産物は，環境的要因の一つとして好酸球性副鼻腔炎や非好酸球性副鼻腔炎の病態に重要な役割を果たしていると考えられる。

(木戸口 正典)



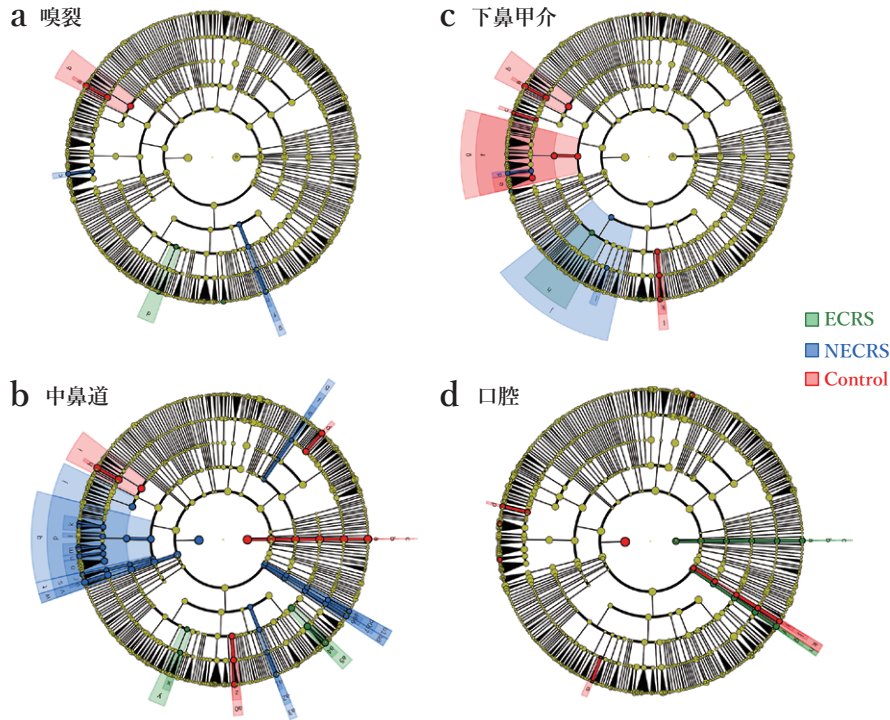


図7. 好酸性副鼻腔炎, 非好酸性副鼻腔炎, コントロールの細菌系統図およびバイオマーカー細菌種の同定.

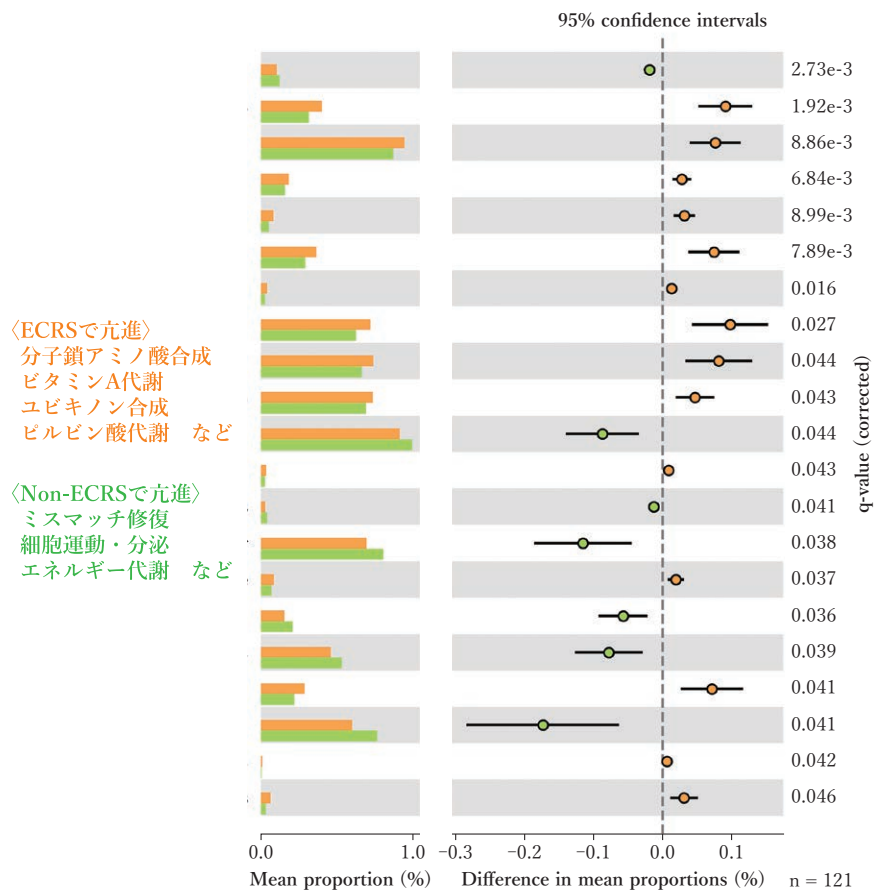


図8. 予測メタゲノム機能解析 (中鼻道における好酸性副鼻腔炎と非好酸性副鼻腔炎の比較).

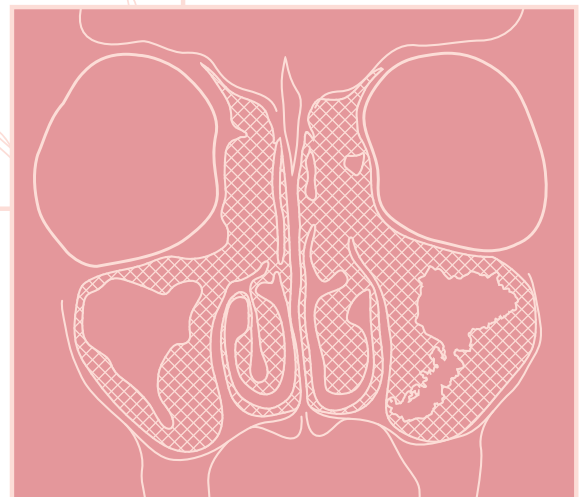
## 文献

- 1) Fuhrman JA. Microbial community structure and its functional implications. *Nature*. 2009;459:193-199.
- 2) Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. 2004;304:66-74.
- 3) Nadel DM, Lanza DC, Kennedy DW. Endoscopically guided sinus cultures in normal subjects. *Am J Rhinol*. 1999;13:87-90.
- 4) Abou-Hamad W, Matar N, Elias M, et al. Bacterial flora in normal adult maxillary sinuses. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23:261-263.
- 5) Choi EB, Hong SW, Kim DK, et al. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy*. 2014;69:517-526.
- 6) Mahdavinia M, Keshavarzian A, Tobin MC, et al. A comprehensive review of the nasal microbiome in chronic rhinosinusitis (CRS). *Clin Exp Allergy*. 2016;46:21-41.
- 7) Psaltis AJ, Wormald PJ. Therapy of Sinonasal Microbiome in CRS: A Critical Approach. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17:59.
- 8) McDonald D, Price MN, Goodrich J, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J*. 2012;6:610-618.
- 9) Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, et al. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Bioinformatics* 2011;Chapter 10:Unit 10 17.
- 10) Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011;12:R60.
- 11) Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. 2013;31:814-821.
- 12) Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014;30:3123-3124.

将来展望

## 第11章

# 遺伝子チップ：nCounter







# エンドタイプに基づいた慢性副鼻腔炎の診断パネル開発

## サマリー

慢性副鼻腔炎のエンドタイプ分類を行うことを目的として、オリジナルの慢性副鼻腔炎診断パネル (Fukui-nasal polyps panel; FKN panel) を作成した。FKN panel は好酸球性副鼻腔炎の診断 (組織中好酸球数カウント) 時作成の鼻茸のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 検体を使用して遺伝子発現解析を行うことが可能である。自験例の網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) 結果との関連性を確認しており、FKN panel はより簡便な検査手法であることから実臨床のエンドタイプ分類を行ううえで有効な診断パネルになりうると考えられる。本研究にて開発した診断パネルを用いて、慢性副鼻腔炎のエンドタイプ分類をはじめ、手術予後、ステロイド薬への反応性、抗モノクローナル抗体の効果予測などの臨床応用へ向けた様々な研究を計画している。

## 慢性副鼻腔炎の分類について

慢性副鼻腔炎は12週間以上持続する鼻汁、鼻閉、後鼻漏症状を3徴とする慢性炎症性疾患とされ<sup>1)</sup>、日本では「蓄膿症」として国民に広く知られている<sup>2)</sup>。慢性副鼻腔炎は、鼻茸合併の有無により鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSwNP) と鼻茸を伴わない慢性副鼻腔炎 (chronic rhinosinusitis without nasal polyps; CRSsNP) に大別され、病態やその要因について長く議論されてきた<sup>1)</sup>。欧米におけるCRSwNPの大部分はT helper type 2 (Th2) サイトカインや好酸球浸潤が特徴的な炎症であり、気管支喘息や嗅覚障害を合併することが多く、経口ステロイド薬や鼻噴霧用ステロイド薬が効果的である<sup>1)</sup>。一方、アジア諸国では欧米に比べてTh1 サイトカインや好中球浸潤が優位の炎症を来すことが多く、マクロライド療法などの抗菌薬治療への反応性が良好である<sup>2)</sup>。私たちは、2010年より日本国内における慢性副鼻腔炎の多施設共同疫学調査 (JESREC Study) を行い、その中で慢性副鼻腔炎における好酸球性副鼻腔炎の罹患率や術後再発・難治化をきたすリスク因子を調査した<sup>3)</sup>。CRSwNPのうち少なくとも半数以上が好酸球性副鼻腔炎であったが、欧米諸国と比較すると好

酸球性副鼻腔炎の罹患率は低く、中国などのアジア諸国よりは高かった。また、鼻茸や篩骨洞粘膜の病理学的検査における400倍拡大視野で70個以上の好酸球浸潤、鼻茸合併、両側性病変、篩骨洞優位のCT陰影、血中好酸球数 (%) 高値、気管支喘息・アスピリン喘息 (NSAIDs 不耐症) の合併がリスク因子であった<sup>3)</sup>。その結果に基づいて私たちは、2015年にこれらの予後因子を基準として好酸球副鼻腔炎の診断基準を作成し、現在では国内で広く活用されている (第1章参照)<sup>4)</sup>。

好酸球性副鼻腔炎の診断基準は、診察、CT検査、病理学的検査など保険診療の範囲内で診断することが可能であり、予後予測にも有用で簡便な診断方法である。しかし、好酸球性副鼻腔炎と診断された症例の中にも手術や保存的治療で完治する症例が一定数存在し、一方で非好酸球性副鼻腔炎と診断された症例の中に術後再発を来す症例が存在しており、これらの分類の中にも多様な病態が存在すると考えられている<sup>5)</sup>。

## 慢性副鼻腔炎のエンドタイプ分類

近年では、さまざまな疾患において分子バイオマーカーに基づいたエンドタイプ分類が着目されている<sup>6)</sup>。さらに、従来の手術療法や薬物治療ほかに

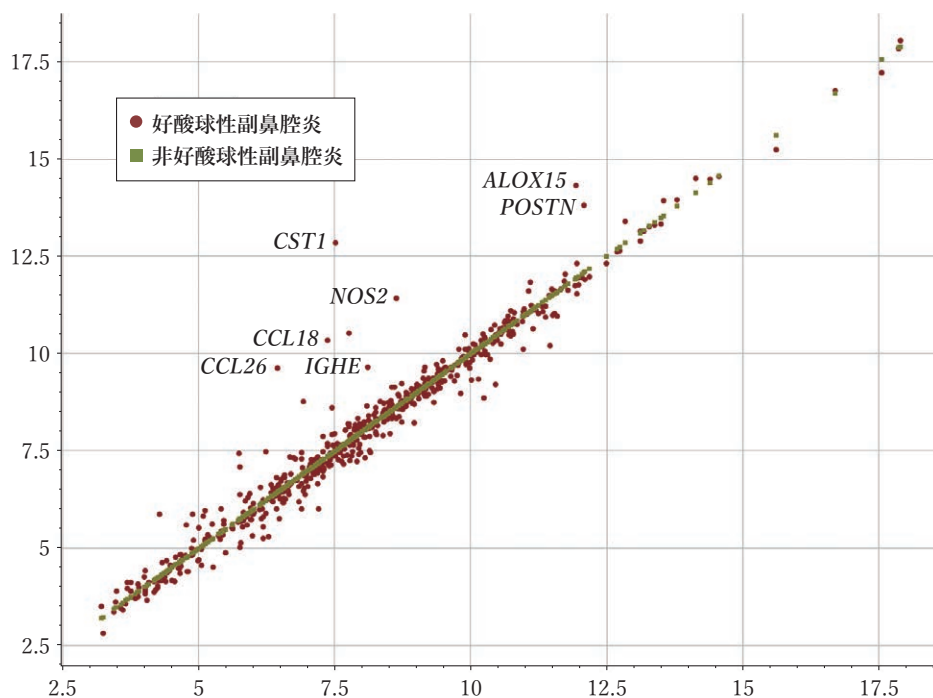


図1. 鼻茸の遺伝子発現量。

抗モノクローナル抗体薬が新たな治療方法として開発され、分子バイオマーカーに基づいた治療戦略の重要性が高まってきている<sup>7)</sup>。慢性副鼻腔炎と合併することの多い気管支喘息においても、Th2サイトカインによる炎症では全ての病態を説明することはできず、エンドタイプを用いた分類やそれに基づいた治療アプローチが議論されている。

慢性副鼻腔炎においても、2016年にTomassenらによって分子病態の違いによってクラスター化したエンドタイプ分類が世界で初めて報告された<sup>5)</sup>。14種の分子バイオマーカー (IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-22, ECP, MPO, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IgE, 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的IgE, アルブミン) をもとに慢性副鼻腔炎を10クラスターにエンドタイプ分類し、特定のエンドタイプと鼻茸や気管支喘息の合併との関連を示した<sup>7)</sup>。また、2018年にLiaoらは慢性副鼻腔炎を28の臨床的な指標と38の分子バイオマーカーに基づきエンドタイプ解析を行い、7クラスターに分類し治療抵抗性との関連を示した<sup>8)</sup>。日本においては、Nakayamaらが好酸球性副鼻腔炎の診断基準であるJESRECスコア (11点) と組織中好酸球数 (70個) にて4つのグループ

を作った。そして好酸球関連の *CLC*, *IL5*, *IL13*, *CCL11*, *CCL24*, *CCL26*, *POSTN*, *CSF3* 遺伝子と *IL-8* 発現を解析すると5つのクラスターに分類できた。そのクラスターに含まれている症例を調べると最終的に4つのグループの症例が同じクラスターに含まれていることが判明し、JESRECスコアと組織中好酸球によってCRSwNPのエンドタイプを予測できる可能性を示した<sup>9)</sup>。しかしながら、まだ世界的にも明確なエンドタイプ分類も存在せず、エンドタイプをもとにした治療戦略を立てることも必要であると考えられおり、今後の検討課題になっている。

### 日本の慢性副鼻腔炎エンドタイプ分類とその臨床応用へ向けて

私たちは、慢性副鼻腔炎におけるさまざまな分子バイオマーカーの探索を行っている。鼻茸と下鼻甲介粘膜における遺伝子発現をRNA-seqにより比較し、鼻茸において *POSTN*, *ALOX15*, *CST1*, *SERPINB3*, *CCL18* などの高発現遺伝子, *BPIFA1*, *SLPI*, *BPIFB1*, *STATH*, *LTF* などの低発現遺伝子を見出し、その中で血清ペリオスチン (遺伝子名: *POSTN*) が術後再発のバイオマーカーとなることを示した (第2章参

照). また, RNA-Seqにより検出されたCST1を詳細に分析したところ, 好酸球性副鼻腔炎の重症例に高発現であり, 病態との関連性を見出した(第3章参照)<sup>10)</sup>. さらに, 好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎の鼻茸における遺伝子発現をRNA-Seqと比較し, transient receptor potential cation channel subfamily V member 3 (TRPV3)が好酸球性副鼻腔炎で高発現であることを示した(第3章参照)<sup>11)</sup>. そのほか, 血清Eotaxin-3 (CCL26)と慢性副鼻腔炎の鼻粘膜好酸球浸潤との関連(第2章参照)<sup>12)</sup>, 鼻茸組織におけるtissue-type plasminogen activator (t-PA)<sup>13)</sup>, L-plastin<sup>14)</sup>, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)<sup>15)</sup>(第5章参照), nitric oxidase synthase 2 (NOS2)の遺伝子発現とその病態との関連についてそれぞれ報告してきた(第4章参照).

上記の研究では, 鼻茸検体はRNA保存液(RNAlater<sup>®</sup>, TRIzol<sup>®</sup>など)に入れて-80°C保存したものを使用しているため, 限られた施設でのみ実施可能である. 実臨床で, 応用可能なエンドタイプ分類を行うためには①検体採取が簡便であること, ②検査工程が煩雑でないこと, ③エンドタイプ分類に必要な分子マーカーなどを過不足なく測定できること, が必要である. そこで, 私たちはこれらの条件を満たすために, 好酸球性副鼻腔炎の診断時(組織中好酸球数カウント)に作成しているホルマリン固定パラフィン包埋(formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE)病理検体を活用して, エンドタイプ分類が可能な診断パネルを開発することを目指した.

## 慢性副鼻腔炎オリジナル診断パネル (FKN panel) の開発

一般的な診療における鼻茸の組織学的診断では, 手術時に採取した鼻茸検体からFFPEブロックを作成し, 診断に使用する. RNAは容易に分解されやすく不安定な分子であるため, ホルマリン固定されたサンプル由来のものは不適であると考えられてきた. しかし, 近年では従来の手法では分解により解析が困難であったFFPE検体からでも, デジタル分子バーコード技術を用いることで, 目的とするRNAを1分

子単位でカウントすることが可能となった.

NanoString Technologies社が開発したnCounter<sup>®</sup>システムは, 上記技術を使用して対象となるRNAを最大800種類程度までデジタルカウントすることが可能なシステムである. 具体的には, FFPE由来の組織検体から抽出したRNA(150~300 ng程度)を標的となるプローブにハイブリダイズさせ, nCounter<sup>®</sup>SPIRINT/MAXなどの測定機器を用いてRNA量をカウントする. カウントされた各遺伝子のRNA量は標準化し, そのデータを使用してクラスター分類やパスウェイ解析を行う. nCounter<sup>®</sup>システムはRNAのほかにもDNAやタンパク質の測定も可能であり, 近年話題となっているマルチオミクス解析にも応用可能である. nCounter<sup>®</sup>は目的に応じて分子バーコードがすでにセットとなったパネルが開発されており, 例えば悪性腫瘍の研究分野では乳癌専用の診断パネル(PAM50)などを用いた乳癌のエンドタイプ分類, 予後予測, 抗癌剤の適応などの参考情報として利用されており, すでに臨床応用されつつある<sup>16)17)</sup>.

私たちは, このnCounter<sup>®</sup>システムを用いて, 慢性副鼻腔炎のエンドタイプ分類が可能となるオリジナル診断パネルを開発した. 慢性副鼻腔炎に関しては専用の診断パネルは存在しないため独自の慢性副鼻腔炎のオリジナルパネル(Fukui-nasal polyps panel; FKN panel)を作成した. FKN panelには, 免疫関連遺伝子を中心とした既存パネル(Human immunology v2 panel)に, 過去に国内外でエンドタイプ分類として使用された遺伝子<sup>5)8)9)</sup>, 現在までに私たちが報告してきた遺伝子<sup>10)~15)</sup>など, 40種を追加した計634個の遺伝子が含まれている.

## FKN panel を用いた遺伝子発現解析

福井大学医学部附属病院, 広島大学附属病院, 筑波大学附属病院, 松脇クリニック品川において慢性副鼻腔炎の手術治療もしくは外来通院治療を行っている患者を研究対象とした. 検体は入院中もしくは外来通院時に, 好酸球性副鼻腔炎の診断目的に作成した鼻茸FFPEブロックを使用した. FFPEブロックを検体の表面積に応じて20 μm~200 μmに薄切し,



RNeasy FFPE Kit (キアゲン) を用いてRNAの抽出を行った。抽出したRNAは、Agilent TapeStation 2200 (アジレント) を用いてRNA品質チェックを行った。慢性副鼻腔炎オリジナル診断パネル (FKN panel) を用いて、抽出したRNAを標的となるプローブにハイブリダイズを行ったのちに、nCounter<sup>®</sup> MAXを用いて遺伝子発現量を測定した。96例の鼻茸FFPE検体からRNA抽出を行い、FKN panelを用いて96例の遺伝子発現解析を行った。測定データの品質チェックを行い、92例の測定結果が以後の解析に利用可能であった。測定した結果を図1に示す。凍結検体由来のRNA-Seq研究で、鼻茸組織における遺伝子発現の上位5つの遺伝子のうち4つの遺伝子 (POSTN, ALOX15, CST1, CCL18) については、nCounterを用いた解析においても好酸球性副鼻腔炎由来鼻茸で遺伝子発現量の上昇が認められた。そのほか、NOS2やCCL26などについても好酸球性副鼻腔炎にて遺伝子発現量が高く、過去の研究結果との関連性が確認された。エンドタイプ分類を行ったところ、今までに報告されてきたTh1サイトカイン/Th2サイトカインのほかにもエンドタイプ分類に関わる新たな分子マーカーの存在も見出しており、現在はさらに情報収集を行っている段階である。

## 今後の展望

鼻茸組織から検査可能な慢性副鼻腔炎オリジナル診断パネル (FKN panel) を開発した。鼻茸のFFPE検体は、手術後の組織中好酸球数をカウントする際に作成されることが多いので、確定診断を行っている医療機関では容易に入手可能である。本研究のnCounterシステムを使用した遺伝子発現解析により、過去に作成されたFFPE検体からも検査を行うことが可能であり、予備実験では少なくとも5年以

上前の検体からも解析が可能であった。FKN panelは過去に報告されたエンドタイプ分類に使用された分子マーカーを可能なかぎり網羅し、RNA-Seqから得られた結果とも関連性が高いことを確認している。先行研究として行った92例の解析ではすでにエンドタイプ分類を実施しており、Th1サイトカイン、Th2サイトカインのほかにもエンドタイプ分類に関わる分子マーカーの存在を見出している。現在は、症例数を増やし、再現性など詳細なデータを収集している段階である。

欧州において、2019年10月に抗IL-4/IL-13モノクローナル抗体の一つであるDupilumab (デュピクセント<sup>®</sup>) が鼻茸を伴う重症慢性副鼻腔炎の治療薬として承認された<sup>18) 19)</sup>。日本国内においても2020年春頃に同薬剤が承認を取得する見込みである。Dupilumabは鼻茸を伴う重症慢性副鼻腔炎に対し非常に有効的な治療薬であるが、一方で、治療効果の乏しい症例や治療後の再発を来す症例も存在している。また、抗モノクローナル抗体薬として抗IgEモノクローナル抗体 (Omalizumab)、抗IL-5モノクローナル抗体 (Mepolizumab) など複数の抗体薬が販売されており、今後も鼻茸に対して適応となる薬剤が増える可能性がある<sup>20)</sup>。抗モノクローナル抗体は有効な治療薬であるが、同時に高額であるため、慢性副鼻腔炎のエンドタイプ分類に基づいた個別化医療の必要性は今後ますます高まると予想される。本研究により開発した日本オリジナルの慢性副鼻腔炎診断パネルがその一助となることを期待しており、慢性副鼻腔炎のエンドタイプ分類をはじめ、手術予後、ステロイド薬への反応性、抗モノクローナル抗体の効果予測など、臨床応用へ向けた研究を進めている。

(木戸口 正典, 藤枝 重治)

## 文献

- 1) Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012;50:1-12.
- 2) Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2019;68:403-412.
- 3) Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic



- rhinosinusitis: the JESREC Study. Allergy. 2015;70:995-1003.**
- 4) 藤枝重治, 坂下雅文, 徳永貴広, 他. 好酸球性副鼻腔炎: 診断ガイドライン (JESREC Study). *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2015;118:728-735.
  - 5) Tomassen P, Vandeplass G, Van Zele T, et al. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:1449-1456 e1444.
  - 6) Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet.* 2008;372:1107-1119.
  - 7) Bachert C, Zhang N, Hellings PW, et al. Endotype-driven care pathways in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:1543-1551.
  - 8) Liao B, Liu JX, Li ZY, et al. Multidimensional endotypes of chronic rhinosinusitis and their association with treatment outcomes. *Allergy.* 2018;73:1459-1469.
  - 9) Nakayama T, Sugimoto N, Okada N, et al. JESREC score and mucosal eosinophilia can predict endotypes of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Auris Nasus Larynx.* 201;46: 374-383.
  - 10) Kato Y, Takabayashi T, Sakashita M, et al. The expression and functional analysis of CST1 in intractable nasal polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;59:448-457.
  - 11) Tokunaga T, Ninomiya T, Kato Y, et al. The significant expression of TRPV3 in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2017;66:610-616.
  - 12) Yamada T, Miyabe Y, Ueki S, et al. Eotaxin-3 as a plasma biomarker for mucosal eosinophil infiltration in chronic rhinosinusitis. *Front Immunol.* 2019;10:74.
  - 13) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:49-57.
  - 14) Takabayashi T, Tanaka Y, Susuki D, et al. Increased expression of L-plastin in nasal polyp of patients with nonsteroidal anti-inflammatory drug exacerbated respiratory disease. *Allergy.* 2018.
  - 15) Imoto Y, Kato A, Takabayashi T, et al. Increased thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2019.
  - 16) Nielsen TO, Parker JS, Leung S, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:5222-5232.
  - 17) Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2013;31:2783-2790.
  - 18) Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet.* 2019;394:1638-1650.
  - 19) Matsunaga K, Katoh N, Fujieda S, et al. Dupilumab: Basic aspects and applications to allergic diseases. *Allergol Int.* 2020;69:187-196.
  - 20) Nagase H, Ueki S, Fujieda S. The roles of IL-5 and anti-IL-5 treatment in eosinophilic diseases: asthma, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2020;69:178-186.



# 研究費リスト

## 文部省科学研究費・学術振興会研究費

研究種目	研究題名	代表者	年 度
基盤研究 (B)	アレルギー性鼻炎における細菌叢の解析と短鎖脂肪酸の影響に関する検討	藤枝 重治	2017～2019
基盤研究 (B)	アレルギー性鼻炎発症における肥満細胞脱顆粒の多面的研究	藤枝 重治	2014～2016
基盤研究 (B)	網羅的解析を組み合わせたスギ花粉症に対する遺伝子多型からの発症予防と治療戦略	藤枝 重治	2011～2013
基盤研究 (B)	スギ花粉症に対する舌下免疫療法施行患者血清中の網羅的蛋白解析から得た新薬開発	藤枝 重治	2008～2010
基盤研究 (B)	アレルギー性鼻炎に対するナノレベルからの機序解明と新治療法開発	藤枝 重治	2005～2007
基盤研究 (B)	アレルギー性鼻炎に対するIgE・ケモカイン産生を抑制する遺伝子治療の確立	藤枝 重治	2001～2003
基盤研究 (C)	合成単鎖DNAによるヒト末梢リンパ球および扁桃リンパ球IgE産生抑制の試み	藤枝 重治	1999～2000
奨励研究 (A)	IgA腎症患者扁桃細胞のパラインフルエンザ菌特異的IgA産生態について	藤枝 重治	1997～1998
挑戦的研究 (萌芽)	機械学習を用いたスギ舌下免疫療法に最適な鼻腔細菌叢モデル作成	藤枝 重治	2018～2019
挑戦的萌芽研究	iPS細胞による嗅覚障害の再生医療への基礎研究	藤枝 重治	2014～2015
挑戦的萌芽研究	エクソゾームによるスギ花粉症治療の可能性	藤枝 重治	2010～2011
萌芽研究	TLR3を介した二本鎖RNAによる感音性難聴誘導の試み	藤枝 重治	2005～2006
特定領域研究 (A)	内分泌攪乱物質におけるIgE産生亢進物質の検索	藤枝 重治	2001
特定領域研究 (C)	G-CSFリセプターにおける癌浸潤能責任部位同定と頭頸部癌の同部位遺伝子解析	藤枝 重治	2000
特定領域研究 (A)	G-CSFリセプター遺伝子導入によるがん細胞浸潤能増強の検討	藤枝 重治	1999
基盤研究 (B)	遺伝子多型関連分子と難治性上気道好酸球性病変局所的好塩基球に対する治療戦略	山田武千代	2013～2015
基盤研究 (C)	好酸球性副鼻腔炎におけるTRPV3の機能解析と治療戦略	加藤 幸宣	2020～2022
基盤研究 (C)	線溶系制御による好酸球性副鼻腔炎に対する新規治療法の開発	高林 哲司	2020～2022
基盤研究 (C)	好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープにおける脂肪酸代謝解析	坂下 雅文	2018～2020
基盤研究 (C)	好酸球性副鼻腔炎における短鎖脂肪酸の機能解析	意元 義政	2017～2019
基盤研究 (C)	好酸球性炎症粘膜におけるTRP受容体ファミリーの発現とその機能解析	徳永 貴広	2016～2018
基盤研究 (C)	凝固、線溶系の制御からみた好酸球性副鼻腔炎の病態解明と新規治療法の開発	高林 哲司	2016～2018
基盤研究 (C)	Mechanism of production and release of tissue plasminogen activator in airway epithelial cells	坂下 雅文	2015～2017

研究種目	研究題名	代表者	年 度
基盤研究 (C)	好酸球性副鼻腔炎の病態形成における肥満細胞の役割に関する研究	高林 哲司	2013～2015
基盤研究 (C)	キメラ分子による好塩基球活性化の制御とスギ花粉症の新規治療	山田武千代	2010～2012
基盤研究 (C)	アレルギー性鼻炎の診断治療における鼻腔一酸化窒素濃度の有用性の検討	山本 英之	2011～2013
基盤研究 (C)	内分泌攪乱物質のアレルギー性鼻炎への影響	山本 英之	2008～2010
基盤研究 (C)	微生物ゲノムを用いた非侵襲的アレルギー治療薬の開発	伊保 澄子	2007～2008
基盤研究 (C)	BLySによるIL-4誘導IgEクラススイッチの解明とアレルギー治療戦略	山田武千代	2005～2006
基盤研究 (C)	キメラ分子IgE Fc-IgG FcによるIgE産生抑制効果	山田武千代	2003～2004
若手研究	鼻粘膜上皮細胞、マスト細胞におけるdectin-1受容体の存在と機能解析	木村 幸弘	2019～2020
若手研究	鼻腔NOに着目した好酸球性副鼻腔炎の病態解明と新規治療への応用	吉田加奈子	2019～2021
若手研究	慢性副鼻腔炎の白血球浸潤の解明と炎症との関連性の解析	堤内 俊喜	2019～2020
若手研究	モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギーの病態解明	加藤 幸宣	2018～2019
若手研究	好酸球性副鼻腔炎におけるペリオスチンの重要性を検討する研究	二之宮貴裕	2018～2019
若手研究	ORMDL3がアレルギー性鼻炎に与える影響についての研究	扇 和弘	2018～2019
若手研究	網羅的解析によるILC2活性化に伴う鼻粘膜炎症増悪因子の同定	森川 太洋	2018～2019
若手研究 (B)	鼻副鼻腔炎症疾患におけるORMDL3の機能について	扇 和弘	2016～2017
若手研究 (B)	アスピリン喘息鼻茸におけるL-plastinの役割	鈴木 弟	2015～2016
若手研究 (B)	アレルギー性鼻炎発症機序の解明	加藤 幸宣	2015～2016
若手研究 (B)	アレルギー性鼻炎の感作から発症に関連する新規遺伝子の研究	意元 義政	2014～2015
若手研究 (B)	好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸におけるTRP受容体の発現とその機能解析	徳永 貴広	2014～2015
若手研究 (B)	アレルギー性鼻炎におけるORMDL3遺伝子発現の影響	富田かおり	2013～2014
若手研究 (B)	アレルギー性鼻炎関連遺伝子ORMDL3遺伝子とウイルス感染の関連	坂下 雅文	2012～2013
若手研究 (B)	アレルギー性鼻炎における感作・発症に関する研究	意元 義政	2012～2013
若手研究 (B)	酸化ストレス代謝酵素CYP1A1のSNPがアレルギー性鼻炎発症に及ぼす影響	坂下 雅文	2010～2011
若手研究 (B)	CpG-DNAによるアレルギー性鼻炎抑制の基礎的研究	窪 誠太	2010～2011
若手研究 (B)	経口投与CpG-DNAによるアレルギー疾患治療薬開発への基礎研究	大澤 陽子	2009～2010
若手研究 (B)	functionalMRIを利用した顔面表情筋運動障害の病態解明に関する研究	呉 明美	2008～2009
若手研究 (B)	TLR9ノックアウトマウスを用いたアレルギー疾患の発症予防及び治療効果の検討	大澤 陽子	2005～2006
若手研究 (B)	鼻茸に対するアポトーシス誘導遺伝子療法の研究	伊藤 聡久	2002～2003



## 難治性疾患等政策研究・難治疾患克服事業

研究題名	代表者	年 度
好酸球性副鼻腔炎における治療指針作成とその普及に関する研究	藤枝 重治	2018～2020
好酸球性副鼻腔炎の診療ガイドライン作成と実態調査	藤枝 重治	2016～2017
重症好酸球性副鼻腔炎に対する新しい治療戦略	藤枝 重治	2014～2016
重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と治療法確立に関する研究	藤枝 重治	2013
好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究	藤枝 重治	2011～2012
好酸球性副鼻腔炎の疫学、診断基準作成等に関する研究	藤枝 重治	2010

## AMED 免疫アレルギー疾患実用化研究事業

研究種目	研究題名	代表者	年 度
研究代表	難治性ダニアレルギー性鼻炎、難治性スギ花粉症の定義付けとガイドラインへの反映	藤枝 重治	2018～2020
研究分担	アスピリン喘息/NSAIDs不耐症の病因・機序の最終的な解明とその治療薬の開発に向けての研究	谷口 正実	2017～2019
	NSAIDs 不耐症におけるブレイクスルーを目指した病因・機序の解明、および、NSAIDs 誤使用ゼロを目指す具体的対策の実行に関する研究	谷口 正実	2014～2016
	NSAIDs 過敏気道疾患の病因、発症機序解明とガイドライン作成に関する研究	谷口 正実	2011～2013
	NSAIDs 不耐症の病態解明と診断治療指針作成に関する研究	谷口 正実	2008～2010
	免疫療法による花粉症治療の新しい展開を目指した研究	岡本 美孝	2014～2016
	免疫療法による花粉症予防と免疫療法のガイドライン作成に向けた研究	岡本 美孝	2011～2013
	代替医療の実態と有効性の科学的評価	岡本 美孝	2008～2009
	生命予後に関わる重篤な食物アレルギーの実態調査・新規治療法・予防法の開発	森田 栄伸	2015～2017
	生命予後に関わる重篤な食物アレルギーの実態調査・新規治療法の開発および治療指針の策定	森田 栄伸	2012～2014
	アレルギー疾患のダイナミックな変化とその背景因子の横断的解析による医療経済の改善効果に関する調査研究	片山 一朗	2011～2013
	リアルタイムモニター花粉数の情報のあり方の研究と舌下ペプチド・アジュバンド療法の臨床研究	大久保 公裕	2008～2010
	リアルタイムモニター飛散数と現状の治療によるQOLの関連性の評価研究と花粉症根治療法の開発	大久保公裕	2005～2007
花粉症のQOLからみた各種治療法評価と新しい治療法開発の基礎的研究	大久保公裕	2002～2004	

## 共同研究者

### 福井大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

---

成田 憲彦, 高林 哲司, 岡本 昌之, 坂下 雅文, 意元 義政, 扇 和弘, 伊藤 有未, 菅野 真史,  
加藤 幸宣, 木村 幸弘, 呉 明美, 二之宮貴裕, 堤内 俊喜, 吉田加奈子, 木戸口正典, 斎藤 杏子,  
小山 佳祐, 加藤 永一, 足立 直人, 後沢理佳子, 宮本 大輔, 前川 文子, 土屋ひろこ, 久保 富隆,  
高橋 昇, 小嶋 章弘, 大澤 陽子, 窪 誠太, 富田かおり, 徳永 貴広, 森川 太洋, 坪川亜優美,  
清水 杏奈, 高波 貴司, 深田 靖人

## 研究協力者

---

玉利真由美 先生 (東京慈恵会医科大学・分子遺伝学)  
野口恵美子 先生 (筑波大学・医学医療系遺伝医学)  
出原 賢治 先生 (佐賀大学・分子生物学)  
浦島 充佳 先生 (東京慈恵会医科大学・分子疫学)  
三浦 謙治 先生 (筑波大学・生命環境系生物科学)  
善本 知広 先生 (元兵庫医科大学・免疫学)  
西川 元也 先生 (東京理科大学・薬学部)  
山田武千代 先生 (秋田大学・耳鼻咽喉科)  
植木 重治 先生 (秋田大学・検査部)  
小林 基弘 先生 (福井大学・腫瘍病理学)  
谷口 正美 先生 (湘南鎌倉総合病院・元国立病院相模原病院・呼吸器内科)  
田中香お里 先生 (岐阜大学研究基盤センター・嫌気性菌研究分野)  
飛田 征男 技師 (福井大学医学部附属病院・検査部)  
Robert P Schleimer 先生 (ノースウエスタン大学 アレルギー・免疫科)  
Atsushi Kato 先生 (ノースウエスタン大学 アレルギー・免疫科)  
Robert C Kern 先生 (ノースウエスタン大学 耳鼻咽喉科)

## JESREC 研究・厚生労働省研究班

---

水見 徹夫先生・関 伸彦先生 (札幌医科大学)・春名 眞一先生・中山 次久先生 (獨協医科大学)・  
飯野ゆき子先生・吉田 尚弘先生 (自治医大学さいたま医療センター)  
鴻 信義先生・浅香 大也先生 (東京慈恵会医科大学)・山嵜 達也先生・近藤 健二先生 (東京大学)・  
吉川 衛先生 (東邦大学)・池田 勝久先生・村田 潤子先生 (順天堂大学)  
石戸谷淳一先生・佐久間康德先生 (横浜市大 市民総合医療センター)  
三輪 高喜先生・山田 奏子先生 (金沢医科大学)・小林 正佳先生・坂井田 寛先生 (三重大学)  
河田 了先生・寺田 哲也先生 (大阪医科大学)・池田 浩己先生 (和歌山医療センター)  
岡野 光博先生 (国際医療福祉大学)・春名 威範先生・檜垣 貴哉先生 (岡山大学)  
川内 秀之先生・森倉 一郎 (島根大学)・平川 勝洋先生・竹野 幸夫先生 (広島大学)  
都築 建三先生 (兵庫医科大学)・神田 晃先生 (関西医科大学)・松根 彰志先生 (日本医科大学)・  
中丸 裕爾先生 (北海道大学)・太田 伸男先生 (東北医科薬科大学)  
田中 康広先生 (獨協医科大学・埼玉医療センター)

## 後援

---

### 日本耳鼻咽喉科学会福井県地方部会

石黒 英世先生, 宇野 敏行先生, 宇野 良二先生, 鎌数 清麿先生, 金泉 秀典先生, 清水 元博先生,  
玉木 優子先生, 土屋 克之先生, 鳥山 恭央先生, 中村 隆先生, 原 誠彦先生, 福辻 範彦先生,  
堀川 利之先生, 米野 邦彦先生

### 福井大学耳鼻咽喉科同門会・喉龍会

斎藤 等先生, 坪川 俊仁先生, 豊田 健司先生, 斉藤 憲治先生, 本多 德行先生, 大坪 俊雄先生,  
真鍋 恭弘先生, 津田 豪太先生, 坂下 勤武先生, 岩城 詠子先生, 塩見 佳子先生, 久保 富隆先生,  
野田 一郎先生, 木村 有一先生, 田中 信之先生, 都築 秀明先生, 池田 拓生先生, 河野 陽子先生,  
五十嵐 充先生, 山本 健人先生, 須長 寛先生, 徳力 雅治先生, 山本 英之先生, 嘉本奈穂子先生,  
堀川久美子先生, 斉藤 寛先生

医療法人厚生会福井厚生病院, 社会医療法人中村病院, 医療法人至捷会木村病院, 加賀ぐっすりクリニック,  
医療法人東山会斎藤病院, 舞鶴共済病院, 千寿会医療福祉グループ・つくし野病院, 坂井市立三国病院,  
長浜市立湖北病院, 福井総合病院, 福井赤十字病院, 公立丹南病院, 杉田玄白公立小浜病院

## 謝 辞

本宿題報告「好酸球性副鼻腔炎の病態解明と新たな治療戦略」を第121回日本耳鼻咽喉科学会において発表する栄誉を与えてくださった西崎和則会長ならびに日本耳鼻咽喉科学会 森山寛前理事長, 村上信五理事長はじめ, 役員, 代議員ならびに会員各位に対し, 心から感謝申し上げます.

今回, これまでの研究成果を宿題報告として発表し, モノグラフを発刊することができましたのは, すべて福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学の全教室員の真摯な研究に対する取り組み, 努力, そしてその成果の賜物です. 彼らが, 私の誇りであり, 財産です. 本当に感謝しています. 「ありがとう」. そして物心両面で多大なご支援をいただいた福井県地方部会, 福井大学耳鼻咽喉科同門会・喉龍会各位に心から感謝いたします.

どこに入局しようかと迷っていた時, 「藤枝君は何を研究したいんだね」とお尋ねくださった齋藤等先生. 「免疫学をやりたいのです」と答えると「おー, それはいいね」と, 以降いつも自由にさせてくださったばかりか, 医局の誰よりも私の研究内容をご理解くださっていました. その恩師のようになりたいという思いが, 今日の私の礎にあります.

学生の時, 入局を勧めてくださったにもかかわらず, 実際に私が入局する頃には, 京都府立医大に戻っておられた竹中洋先生. しかし留学およびその後の研究でも沢山のご指導をいただきました. 故石川哮先生(熊本大学名誉教授), 故奥田稔先生(日本医科大学名誉教授), 千葉大学名誉教授 今野昭義先生には, 色々な場で沢山の質問とご助言をいただきました. 今回の宿題報告は, JESREC Studyにご参加くださった先生方なしには成し得ませんでした. この場をお借りして感謝とともに御礼申し上げます.

また, 米国留学の研究であるウイルス感染のPCR結果を発表されているお姿を学会で拝見して以来, ずっとずっと目標としてきた千葉大学名誉教授 岡本美孝先生に, 本宿題報告のご司会の労をお取りいただき, 幸せを感じるとともに厚く御礼申し上げます.

2020年10月吉日

藤枝 重治



宿題報告2020  
好酸球性副鼻腔炎の病態解明と新たな治療戦略

発行日：2020年10月

発行者：藤 枝 重 治

福井大学 学術研究院医学系部門  
医学領域 感覚運動医学講座  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野  
〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3

印刷所：中西印刷株式会社

〒602-8048 京都府京都市上京区下立売通小川東入ル

