

表1 Toll like receptor (TLR) とリガンドの関係 (human)

TLR-1・TLR-2	diacyl lipopeptide
TLR-2・TLR-6	triacyl lipopeptides
TLR-3	ds RNA
TLR-4	LPS
TLR-5	flagelin
TLR-7	anti-viral compounds
TLR-8	ssRNA
TLR-9	CpG DNA

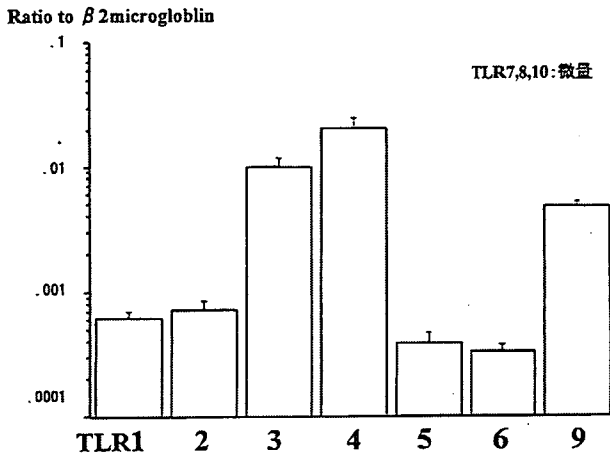


図1 鼻茸由来線維芽細胞における Toll like receptor の発現 Real time PCR にて比較検討した。

気道上皮を使用した実験では、TNFα 存在下では IL-8 が産生され好中球が浸潤する。そこに IL-4 もしくは IL-13 が加わると Eotaxin 産生され、好酸球が遊走される。TNFα と IFNγ の存在下では、RANTES が産生されリンパ球や単球の浸潤に貢献する¹³⁾。

上皮の障害と修復

浸潤した好酸球からは、ECP (Eosinophilic cationic protein) や MBP (major basic protein) が放出される。好中球からは、カテプシン G や エラスターゼ が放出され、上皮に障害を与える。これは、感染した細胞を除去するためであろうと考えられる。上皮が障害を受けると、線維芽細胞や血小板から TGF-β (Transforming growth factor-beta), PDGF (Platelet derived growth factor), EGF (Epithelial growth factor) が産生されるとともに線維芽細胞からは collagen, MMP (Matrix metalloproteinase), TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) が産生され、欠損した上皮および組織の修復が始まる⁹⁾。それによって欠損した部分は上皮化され、鼻茸が形成されることとなる。

組織障害に対する組織反応として組織の再構築が起こる。完全に元と同じように組織が再構築されれば治療と

いうことになるが、構造の変化を伴う場合をリモデリング (remodeling) と呼ぶ。気管支喘息では、気道におけるリモデリングが重要視されている。実は、鼻茸も Epithelial rupture 説からすれば、明らかに鼻粘膜におけるリモデリングであるといえよう。その観点からみると細胞外マトリックスは、鼻茸形成において極めて重要な因子となる^{5,6)}。

サイトカイン・ケモカインの相互作用

サイトカインやケモカインは、単純な一つの作用を持つのみではなく、特定の環境下で多種多様な作用を有している。RANTES は、二本鎖 RNA によって鼻茸由来線維芽細胞や鼻粘膜上皮から大量に産生される。この RANTES 自身が、鼻茸由来線維芽細胞の増殖を亢進させる。また鼻茸由来線維芽細胞における IL-8 産生を亢進させる。もちろん鼻茸由来線維芽細胞には、RANTES の受容体である CCR3 の発現を認める (藤枝, 未発表)。

また GM-CSF や IL-5 は実際に鼻粘膜に浸潤している好酸球のアポトーシスを有意に抑制し、長期間の活性化を可能としている⁷⁾。そして長期間活性化した好酸球から上述の ECP, MBP の放出が継続される⁸⁾。鼻茸由来上皮の培養上清には多くの GM-CSF が存在し、好酸球は活性化されている¹³⁾。さらに IL-5 は、気道のリモデリングに極めて重要な因子であることが判明した。これは、IL-5 ノックアウトマウスにおいて抗原刺激を行っても、気道粘膜における基底膜の肥厚や MBP 陽性好酸球の浸潤が誘導されず、TGF-β の産生も認めなかったことによる¹⁰⁾。おそらく IL-5 も鼻茸形成に重要な因子である。IL-5 とともに代表的 Th2 サイトカインである IL-4 は、IgE 産生に必須であるとともに接着因子の発現を増強させ、Eotaxin の産生を著しく亢進させる^{11,15)}。さらに IL-4 は鼻茸由来線維芽細胞からの IL-6, TGF-β, MCP-4 (CCL13) の産生を亢進させる。

最も重要であるとされるのが、TGF-β である⁹⁾。しかし TGF-β の機能自体が、正と負の両面から制御しているために、断定的な鼻茸発生への関与の報告は少ない。今後、TGF-β の細胞内シグナル制御を行なうことによって、TGF-β の関与が証明されていくと思われる。

IgE と鼻茸

これまでアトピーと鼻茸形成は無関係であるとの報告が多い¹⁶⁾。その根拠は血清中の総 IgE や抗原特異的 IgE (ダニ, スギなど) の陽性、陰性別による鼻茸有病率に差を認めないことによる。しかし最近注目を浴びているのは、鼻茸中の IgE である。鼻茸をホモジネートし、

表2 鼻茸中 SAE 特異的 IgE と吸入抗原陽性からみた鼻茸におけるエンテロトキシン関与

鼻茸中	血清中
1) SAE 特異的 IgE (-)・総 IgE 低値/吸入抗原特異的 IgE (-): エンテロトキシン関与なし (全体の30%以下の症例)	
2) SAE 特異的 IgE (+)・総 IgE 高値/吸入抗原特異的 IgE (+): アレルギー患者でありスーパー抗原の関与高い (全体の50%以下の症例)	
3) SAE 特異的 IgE (+)・総 IgE 中等度~高値/吸入抗原特異的 IgE (-): 非アレルギー患者でありスーパー抗原の関与高い (全体の10%以下の症例)	
4) SAE 特異的 IgE (-)・総 IgE 高値/吸入抗原特異的 IgE (+): エンテロトキシン関与少ない (全体の10%以下の症例)	

組織中の総 IgE, IL-5 を調べたところ, 鼻茸中に存在する IgE は高値を示し, IL-5 と有意な相関を認めた¹⁹⁾。

黄色ブドウ球菌から産生されるエンテロトキシンは, スーパー抗原の一つとされている。T細胞は, MHC 拘束性に抗原提示細胞からの抗原ペプチドを T細胞受容体介して受け取ることで, 抗原特異性を獲得する。スーパー抗原は, そのような MHC を介さずに特定の T細胞 (CD4+CD8+gamma delta + T細胞) を活性化して IL-4 を産生し IgE 産生を亢進する可能性が高い¹⁹⁾。Staphylococcal aureus-derived enterotoxins (SAEs) に対する特異的 IgE が, 全症例の少なくとも50%の鼻茸中に証明され, 鼻茸形成における関与が示唆されるようになった^{19,20)}。この SAE 特異的 IgE 陽性者は, 血清中に検出されアトピー性と診断されるダニや花粉に対する IgE 陽性者とは一致しない。これまでの研究からは, 表2に示す患者群で関係があるとされている。しかしながら, まだ日本では鼻茸中の SAE 特異的 IgE が証明されておらず, 今後の検討課題である。

鼻茸におけるこの SAE 特異的 IgE や非特異的 IgE の存在は, 報告されてきた鼻茸中に認められる脱顆粒した肥満細胞を十分説明しうる²¹⁾。これまでは, 血清中の吸入抗原特異的 IgE や総 IgE の値を持ってアトピー, 非アトピーを分類していたため, 鼻茸中に認められる脱顆粒した肥満細胞とアトピー・非アトピーの関係は認められず, どうして脱顆粒した肥満細胞が鼻茸に存在するのか疑問であった。約60%に関与するであろう SAE 特異的 IgE の存在は, 黄色ブドウ球菌の感染とエンテロトキシンの放出がきっかけとなって局所でのアレルギー炎症の増強という新しい反応を誘導する。

酸化ストレスで鼻茸は出現する?

鼻茸形成の的確な実験モデルはまだ存在しない。最近, 家兎上顎洞を用いた実験的鼻茸の作成が報告されている²²⁾。彼らは, 粘膜の機械的損傷と細菌感染, 化学物質の注入を行なっている。そこでわれわれは, 鼻茸由来

表3 鼻茸由来線維芽細胞を DEP 処理 (酸化ストレス) 後, 発現が上昇した mRNA の項目

KGF (FGF7), EGF, MCP-1, IL-6, CSF1, IL-1 β BMP-1, MMP-2, MMP-14, VEGF, HSP, GST MAPKK2, MAPKK3, PLA2, STAT6

マイクロアレーにて検討した。

線維芽細胞に酸化ストレス処理 (ディーゼル排出粒子処理) を行い, DNA マイクロアレーを行なった。表3に mRNA の発現増強を認めた蛋白名を示す。これまで鼻茸におけるマイクロアレーも報告されているが²³⁾, 表3に掲載した蛋白とかなりの類似性を認めた。このことは, 鼻茸形成において酸化ストレスも重要であり, 鼻茸の in vitro モデルとしては, 代用できると思われる。今後は, このような系にて検討することが可能であろう。

酸化ストレスにおいて忘れてはいけないものが活性酸素, 一酸化窒素 (NO) である。鼻茸患者の呼気中 NO 濃度は正常に比べて有意に高い²⁴⁾。さらに NO 合成酵素 (NOS) の中で誘導型 NOS (iNOS) が鼻茸中にて上昇している一方, 抗酸化酵素 (SOD) の亢進は認められず, 鼻茸形成への関与が示唆されている²⁵⁾。

プロスタノイドとロイコトリエン

アラキドン酸カスケードとアレルギー性鼻炎や気管支喘息とは, 深い関係があるが, 鼻茸もまた関連がある。アラキドン酸は Cyclooxygenase 1 と 2 (COX1, COX2) によってプロスタノイド (プロスタグランジン) が生成される。鼻茸中の COX1 と COX2 は, 正常副鼻腔粘膜とは異なった制御を受けていることが報告されている²⁶⁾。さらに各種プロスタノイド合成酵素に関しても最近広く検討されており, 今後の報告が楽しみである。

鼻茸が高頻度に合併するアスピリン喘息は, COX1 阻害の強い NSAIDs によって誘導され, プロスタノイドの減少程度によって発作が生じると考えられている。アラキドン酸は 5-lipoxygenase で代謝されると各種ロイコ

トリエン (LT) となる。副鼻腔炎患者の副鼻腔粘膜では、LTC₄, LTD₄, LTE₄ の Cys-LT 濃度が高く、特に好酸球優位の鼻茸では有意に Cys-LT が高い²⁷⁾。さらに LT 濃度は LTC₄ 合成酵素の mRNA 発現と相関を認め²⁸⁾。臨床的にも LT 受容体拮抗薬がアスピリン喘息患者における副鼻腔炎治療に効果があることが証明され²⁹⁾、アスピリン喘息患者の鼻茸を摘出すると、尿中 LTE₄ の減少が認められた^{29,30)}。以上のことから LT やプロスタノイドが、鼻茸形成のどのような局面で関与しているのかは不明であるが、深く関与していることだけはまず間違いないと思われる。

その他の因子と鼻茸

慢性副鼻腔炎において中鼻道などの閉塞は、洞内の低酸素状態を誘導し、鼻茸発生に関与する可能性が高い。低酸素状態は、細胞に一種の酸化ストレスを与えた時と同じような状態である。さらに低酸素状態によって浸潤している細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞から血管新生因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が産生される。VEGF 自身にも、血管新生のみならず他の作用もあることが証明されてきている³¹⁾。鼻茸組織からは正常粘膜に比べて多くの VEGF が産生され、TGF- β 刺激は VEGF の産生を亢進させる³²⁾。

Insulin-like growth factor-I (IGF-1) は、線維芽細胞の増殖と生存に貢献し、アポトーシスに陥ることを抑制する³³⁾。鼻茸中には、IGF-1 と IGF-2 が存在し、好塩基球を選択的に遊走させるとともに CD11b の発現を亢進させ、好塩基球のアポトーシス誘導を抑制させる³⁴⁾。抗アポトーシスという作用では、Galectin-3 も報告されている。鼻茸中の表面粘膜、腺細胞、間質組織において、下鼻甲介や中鼻甲介に比べて Galectin-3 の発現が有意に高い³⁵⁾。

骨 と 鼻 茸

鼻茸の発生部位は中鼻道を中心とした部位が最も多い。同じ気道粘膜でありながら肺には存在しない鼻茸であるが、好発部位から考えると、その違いは骨・骨膜の存在ではなかろうかと我々は考えている。我々は、EGF-R (Epidermal growth factor receptor), IGF-R, RANK (Receptor activator of nuclear factor-kB) の発現を骨膜由来線維芽細胞と粘膜由来線維芽細胞で Real time PCR (polymerase chain reaction) を用いて検討した。EGF-R と IGF-R はともに両方の線維芽細胞に発現を認めるが、有意差は認めなかった (図 2)。RANK の発現は骨膜由来線維芽細胞のみに認めた。さらに LPS,

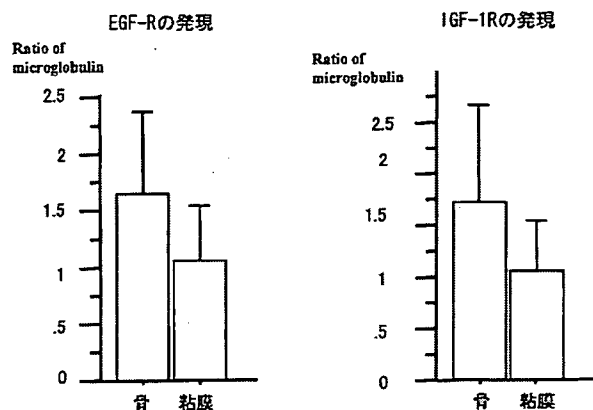


図 2 Epidermal growth factor receptor (EGF-R) と Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-1R) の発現。骨膜由来線維芽細胞と粘膜由来線維芽細胞を Real time PCR にて検討した。

CpG, MALP2, PGN, Pam3, PolyIC 刺激によって発現への影響を調べたところ、リガンドに発現が亢進するものや低下するものなどいろいろ存在した。現在検討中である (藤枝, 未発表)。

次に EGF, RANKL (Receptor activator of nuclear factor-kB ligand), BMP (Bone morphogenetic protein) によって刺激を行い細胞増殖の変化を調べた。その結果、粘膜由来線維芽細胞は EGF によって有意な細胞増殖を認めたが、骨膜細胞由来線維芽細胞は有意な変化がなかった。そこにさらに LPS, CpG, PolyIC 刺激を追加すると、それぞれ特定の濃度によって有意な増殖の亢進が認められた。今後細胞内のシグナル解析, 定量, サイトカイン・ケモカインの産生を検討していく予定である。しかしながら、糖尿病性潰瘍由来の線維芽細胞においては、EGF, IGF-I, bFGF, PDGF の刺激に対して同じような反応を示さず、いろいろな反応を示すことが報告されており³⁶⁾、鼻粘膜や骨膜細胞由来線維芽細胞においても特徴的な反応や個人差などの検討も必要であると思われる。

これまでの研究では、歯根膜と歯肉由来線維芽細胞において TGF- β 刺激では細胞増殖を最も亢進させ、PDGF 刺激は強いマイトジェンの役割を示し、BMP 刺激は逆に細胞分裂を抑制する方向に働くことが示された³⁷⁾。さらに BMP は歯肉由来線維芽細胞を骨芽細胞へ誘導するが、高濃度では逆に抑制作用を認める³⁸⁾。BMP 刺激による Smad7 シグナルは、FGF (Fibroblast growth factor) による分化を抑制するなど、BMP は TGF- β に類似した作用を示す³⁹⁾。BMP は哺乳動物の細胞外マトリックス形成に重要な役割を演じている⁴⁰⁾。IL-1 β と TNF α は線維芽細胞の BMP 発現を亢進するが、IFN γ

は亢進しないなど、BMPはサイトカインと関連し分化・増殖に関与している⁴³⁾。

RANKLは一般的に、単球を成熟破骨細胞に分化させる⁴²⁾。歯肉由来線維芽細胞にLPS刺激を加えると単球の成熟破骨細胞への分化を抑制する⁴³⁾。RANKLは、角膜の上皮障害後の治癒過程において間質細胞から産生され、RANKを発現する単球や線維芽細胞の治癒への作用に影響を及ぼす⁴⁴⁾。さらにRANKはIL-1 β からの刺激で活性化されるTRAF6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) と連動しており⁴⁵⁾、我々が報告した鼻茸由来線維芽細胞のケモカイン産生のシグナルに深く関与している可能性がある¹²⁾。

最後に

これまで報告されてきた鼻茸の成因に関与する可能性の高い因子をまとめた。総論ということから、最新の論文を引用した。ここから古い論文へと遡っていただきたい。最後には、あまりに不確定要素の骨・骨膜と鼻茸の関係について述べたが、ぜひともこれを読んで斬新な研究を始めていただきたい。

文 献

- Bernstein JM: The molecular biology of nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 1: 262-267, 2001.
- Slavin RG: Nasal polyps and sinusitis. *Clin Allergy Immunol.* 16: 295-309, 2002.
- Picado C.: Aspirin intolerance and nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2: 488-493, 2002.
- Pruliere-Escabasse V, Fanen P, Dazy AC, et al: TGF- β 1 downregulates CFTR expression and function in nasal polyps of non-CF patients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288: L77-L83, 2005.
- 間島雄一: 鼻・副鼻腔のリモデリング 耳鼻免疫アレルギー 21: 7-14, 2003.
- Watelet JB, Bachert C, Claeys C, et al: Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis. *Allergy.* 59: 54-60, 2004.
- Fan GK, Itoh T, Imanaka M, et al: Eosinophilic apoptosis in sinus mucosa: relationship to tissue eosinophilia and its resolution in allergic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 106: 551-558, 2000.
- Uller L, Andersson M, Greiff L, et al: Occurrence of apoptosis, secondary necrosis, and cytolysis in eosinophilic nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med.* 170: 742-747, 2004.
- Akira S: Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 15: 5-11, 2003.
- Gern JE, French DA, Grindle KA, et al: Double-stranded RNA induces the synthesis of specific chemokines by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28: 731-737, 2003.
- Fujisawa T, Kato Y, Atsuta J, et al: Chemokine production by the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: differential regulation of eotaxin, IL-8, and RANTES by TH2- and TH1-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 105: 126-133, 2000.
- 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.* 167: 283-288, 2001.
- Shin SH, Lee SH, Jeong HS, et al: The effect of nasal polyp epithelial cells on eosinophil activation. *Laryngoscope.* 113: 1374-1377, 2003.
- Cho JY, Miller M, Baek KJ, et al: Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. *J Clin Invest.* 113: 551-560, 2004.
- Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, et al: Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20: 777-786, 1999.
- Steinke JW, Crouse CD, Bradley D, et al: Characterization of interleukin-4-stimulated nasal polyp fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 30: 212-219, 2004.
- 飯野ゆき子: 鼻茸の病理組織 JOHNS 20: 1759-1763, 2004.
- Hirschberg A, Jokuti A, Darvas Z, et al: The pathogenesis of nasal polyposis by immunoglobulin E and interleukin-5 is completed by transforming growth factor- β 1. *Laryngoscope.* 113: 120-124, 2003.
- Bachert C, van Zele T, Gevaert P, et al: Superantigens and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep.* 3: 523-531, 2003.
- Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, et al: Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyp tissue. *Allergy.* 60: 71-79, 2005.

- 21) Kawabori S, Denburg JA, Schwartz LB, et al: Histochemical and immunohistochemical characteristics of mast cells in nasal polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 6: 37-43, 1992.
- 22) 瀬島尊之, 市村恵一: 鼻茸の実験動物モデル *JOHNS* 20: 1787-1791, 2004.
- 23) Fritz SB, Terrell JE, Conner ER, et al: Nasal mucosal gene expression in patients with allergic rhinitis with and without nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 112: 1057-1063, 2003.
- 24) Prieto L, Seijas T, Gutierrez V, et al: Exhaled nitric oxide levels and airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in subjects with nasal polyposis. *Int Arch Allergy Immunol.* 134: 303-309, 2004.
- 25) Kang BH, Huang NC and Wang HW: Possible involvement of nitric oxide and peroxynitrite in nasal polyposis. *Am J Rhinol.* 18: 191-196, 2004.
- 26) Steinke JW, Bradley D, Arango P, et al: Cysteinyl leukotriene expression in chronic hyperplastic sinusitis-nasal polyposis: importance to eosinophilia and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 342-349, 2003.
- 27) Mullol J, Fernandez-Morata JC, Roca-Ferrer J, et al: Cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 expression is abnormally regulated in human nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 109: 824-830, 2002.
- 28) Sousa AR, Parikh A, Scadding G, et al: Leukotriene-receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells in aspirin-sensitive rhinosinusitis. *N Engl J Med.* 347: 1493-1499, 2002.
- 29) Higashi N, Taniguchi M, Mita H, et al: Clinical features of asthmatic patients with increased urinary leukotriene E4 excretion (hyperleukotrienuria): Involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 113: 277-283, 2004.
- 30) 谷口正実, 東 憲孝, 河岸由紀男, 他: 脂質メディエーターから見た上下気道の関連 *アレルギー科* 19: 5-9, 2004.
- 31) Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, et al: Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 56: 549-580, 2004.
- 32) Coste A, Brugel L, Maitre B, et al: Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur Respir J.* 15: 367-372, 2000.
- 33) Wynes MW, Frankel SK, Riches DW: IL-4-induced macrophage-derived IGF-I protects myofibroblasts from apoptosis following growth factor withdrawal. *J Leukoc Biol.* 76: 1019-1027, 2004.
- 34) Hartnell A, Heinemann A, Conroy DM, et al: Identification of selective basophil chemoattractants in human nasal polyps as insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-2. *J Immunol.* 173: 6448-6457, 2004.
- 35) Delbrouck C, Gabius HJ, Kaltner H, et al: Expression patterns of galectin-1 and galectin-3 in nasal polyps and middle and inferior turbinates in relation to growth regulation and immunosuppression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 129: 665-669, 2003.
- 36) Loot MA, Kenter SB, Au FL, et al: Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol.* 81: 153-160, 2002.
- 37) Marcopoulou CE, Vavouraki HN, Dereka XE, et al: Proliferative effect of growth factors TGF-beta1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Int Acad Periodontol.* 5: 63-70, 2000.
- 38) Murphy MG, Mailhot J, Borke J, et al: The effects of rhBMP-2 on human osteosarcoma cells and human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Implantol.* 27: 16-24, 2001.
- 39) Hayashi H, Ishisaki A, Imamura T: Smad mediates BMP-2-induced upregulation of FGF-evoked PC12 cell differentiation. *FEBS Lett.* 536: 30-34, 2003.
- 40) Steiglitz BM, Ayala M, Narayanan K, et al: Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *J Biol Chem.* 279: 980-986, 2004.
- 41) Lories RJ, Derese I, Ceuppens JL, et al: Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum.* 48: 2807-2818, 2003.
- 42) Roccisana JL, Kawanabe N, Kajiya H, et al: Functional role for heat shock factors in the transcriptional regulation of human RANK ligand gene ex-

- pression in stromal/osteoblast cells. *J Biol Chem.* 279: 10500–10507, 2004.
- 43) Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, et al: LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol.* 130: 338–344, 2002.
- 44) Wilson SE, Mohan RR, Netto M, et al: RANK, RANKL, OPG, and M-CSF expression in stromal cells during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 2201–2211, 2004.
- 45) Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, et al: A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem.* 277: 44347–44356, 2002.

別刷請求先：藤枝 重治

〒910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月23
福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis

Yuki Hamajima^{a,*}, Sigeharu Fujieda^b, Hiroshi Sunaga^b, Takechiyo Yamada^b,
Kazuho Moribe^c, Nobuhiro Watanabe^a, Shingo Murakami^a

^a Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University, 1, Kawasumi, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Aichi, Japan

^b Department of Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery, University of Fukui, Matsuoka, Fukui, Japan

^c Department of Otolaryngology, Ichinomiya Municipal Hospital, Japan

Received 22 August 2005; accepted 15 September 2006

Available online 1 December 2006

Abstract

Objective: Numerous signalings are involved in allergic inflammation. The non-receptor protein tyrosine kinase, Syk, is widely expressed in immune-potentiated cells and plays critical roles in initiating signal transduction in response to the activation of cytokine, chemokine and other types of receptors. It has been hypothesized that Syk expression in allergic nasal mucosa and polyps with allergy is different from non-allergic mucosa, and that changes in Syk expression contribute to the activation of allergic reactions.

Methods: We examined whether the expression of Syk is found in allergic nasal mucosa and polyps. We investigated the expression of Syk in 46 nasal mucosa and polyps (14 samples from patients with allergic rhinitis and 32 samples with non-allergic chronic sinusitis) using an immunohistochemical technique.

Results: Allergic polyps had more Syk positive cells than non-allergic polyps. Syk positive cells were determined to mainly be eosinophils. There was no difference in Syk expression in the lamina propria and nasal gland between allergic mucosa and non-allergic mucosa.

Conclusion: Eosinophils in allergic polyps receive an intracellular signal, although the signal is not able to determine the function in the present state. Syk appears to be a promising target molecule for anti-allergic inflammation in allergic rhinitis.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nasal polyp; Syk; Eosinophil; Mast cell; Nasal allergy

1. Introduction

Nasal polyps are recurrent protrusions of the nasal sinus mucosa that prolapses into the nasal cavity. The origin of nasal polyps can be divided into two categories: allergic rhinitis (AR) and non-allergic chronic sinusitis (NACS). In AR, exposure to the allergen promotes the cross-linking of IgE molecule on mast cells and mast cells release histamine and other proinflammatory mediators within minutes. The released chemical mediators induce many signals in the cells of the nose and the sum of signals causes allergic inflammation. Chemoattractants play a dual role by triggering integrin activation and directing leukocyte

migration. Some chemokines and cytokines (RANTES, Eotaxin, IL-5, etc.) have been shown to attract and activate eosinophils *in vitro* and to recruit eosinophils into the inflammatory region in the nasal mucosa. The addition of several factors (ex. edema, a change in architecture of the epithelium, a large influx of water, an alteration of the structure of gland) to the AR contributes to the development of nasal polyp [1].

NACS may originate from or be perpetuated by local or systemic factors that predispose one to sinus ostial obstruction and infection [2]. Japanese NACS is different from Western NACS, and has a characteristic that neutrophils are the predominant infiltrating cells in nasal mucosa [3]. A high level of IL-8 concentration in the nasal lavage from patients with nasal polyps is typical in Japanese NACS [3–5]. Persistent inflammation due to bacterial

* Corresponding author. Tel.: +81 52 853 8256; fax: +81 52 851 5300.

E-mail address: hamajima@med.nagoya-cu.ac.jp (Y. Hamajima).

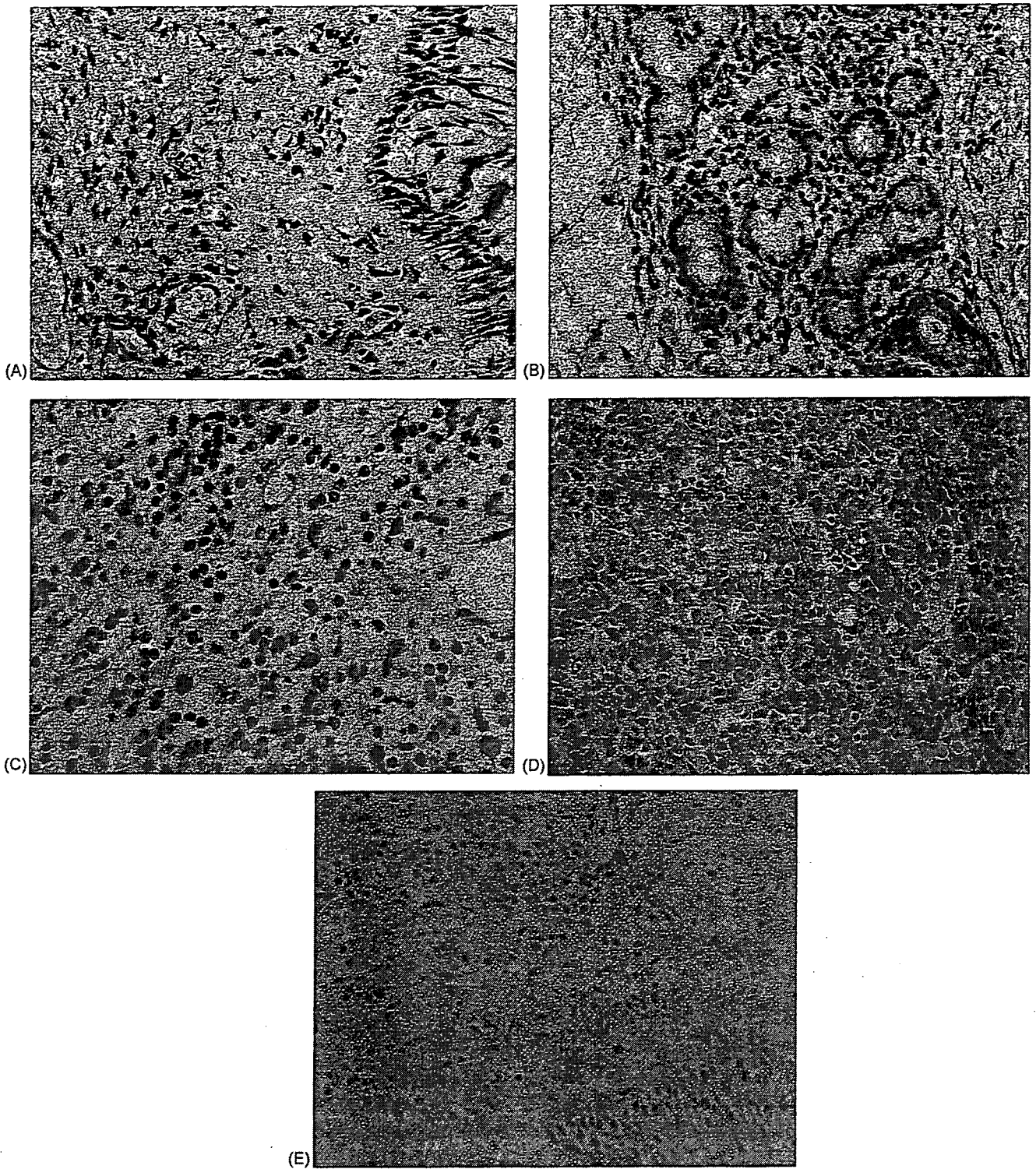


Fig. 1. Immunohistochemical staining of Syk in the nasal mucosae, intestine of lamina propria (a: Syk score = 29.5), the nasal gland (b: Syk score = 46.5), nasal polyp (c: Syk score = 57.5), the tonsil was for the positive staining of Syk (d: Syk score = 48.8) nasal polyp (e: negative control) (magnification 200 \times).

infection and sequential cytokine secretion (IL-1 β , TNF α , IL-8, TGF α and TGF β) induced many signals in inflammatory cells, fibroblasts and epithelial cells [6,7]. The activation of epidermal growth factor receptor kinase and platelet-derived growth factor receptor kinase leads to

hyperplasia of epithelial cells and nasal glands for the pathogenesis of nasal polyps in NACS [8,9].

The complicated activation in cells through cytokine and chemokine receptors is associated with protein tyrosine kinase. Protein tyrosine kinases can be divided into two

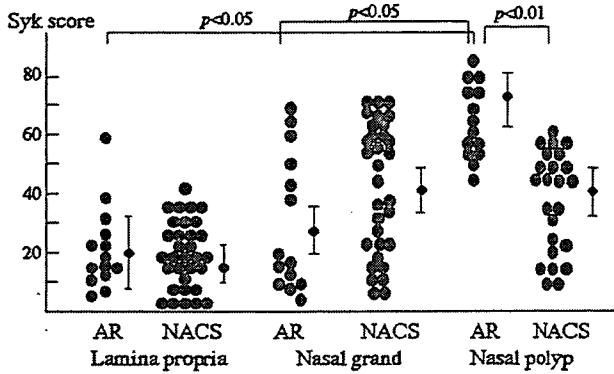


Fig. 2. The number of Syk positive cells. The Syk score determined the number of Syk positive cells in all cells. The Syk score in the nasal polyp with allergic rhinitis (AR) was higher than those with non-allergic chronic sinusitis (NACS).

families: receptor tyrosine kinases and non-receptor tyrosine kinases. Syk has non-receptor protein tyrosine kinases function as critical components in signaling cascades from membrane receptors lacking intrinsic tyrosine kinase activity, and is widely expressed on hematopoietic cells: B cells [10,11], mast cells [12], eosinophils [13], T cells [14], neutrophils [15] and other cells. Recently, it has been shown that Syk is also expressed in non-hematopoietic cells; human nasal fibroblasts [16,17], breast epithelium [18] and human hepatocytes [19]. The level of Syk expression in nasal polyp-derived fibroblasts was correlated with RANTES production by LPS [16].

In this study, we investigated the Syk expression on nasal polyps between AR and NACS using an immunohistochemical technique, since there are few reports about the expression of signal molecules in nasal polyps.

2. Materials and methods

2.1. Patients and sample collections

We studied the inferior turbinate mucosa and nasal polyps of 14 patients (10 males and 4 females) with perennial AR caused by *Dermatophagoides Pteronyssinus* (DP), and 32 control subjects (20 males and 12 females) with NACS. All of the patients underwent endoscopic sinus surgery, because all conservative treatments had no effect on their nasal congestion. We obtained informed consent from all patients. Both the inferior turbinate mucosa and the nasal polyps were excised during surgery. All of the patients with AR had a high titer of anti-DP-specific IgE without Japanese Cider and Ragweed in the serum. All patients with NACS had negative evidence for these allergies. No patients in either group had histories of aspirin-induced asthma. There were no significant differences in the background of the patients in AR and NACS groups except for nasal allergy. The operation was performed under local anesthesia by injection with 0.5% lidocaine with 1:100,000 adrenalin and 10% cocaine.

2.2. Immunohistochemical staining

Specimens were immediately fixed in 4% paraformaldehyde for over 48 h. After fixation, samples were embedded in paraffin and sectioned at 2–4 μm thickness. They were deparaffinated and treated with ethanol, then rinsed with pH7.4 phosphate-buffered saline (PBS). Immunohistochemical staining was performed using the avidin–biotin–complex technique [20].

Specimens were washed in distilled water, and rinsed with pH 7.4 PBS, and incubated in 0.3% H_2O_2 solution dissolved in absolute methanol at room temperature for 15 min to inhibit endogenous peroxidase activity. After washing, specimens that would be stained for Syk were treated by microwave irradiation for 10 min in distilled water. They were rinsed with PBS and incubated with rabbit anti-human Syk polyclonal antibodies diluted at 1:200 at 4 $^\circ\text{C}$ for 24 h. After rinsing with PBS, all specimens were treated with polymerized peroxidase anti rabbit-IgG (DAKO, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. After rinsing with PBS, peroxidase color visualization was carried out with 15 mg of 3–3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (WAKO, Tokyo, Japan) dissolved in 100 ml PBS with 8 μl of 30% H_2O_2 for 10 min. Nuclear counter staining was carried out with Mayer's haematoxylin for 2 min before mounting. For positive controls, we used the tissue of the tonsil, which was already known to be positive for Syk. For the negative control, we used rabbit anti-human IgG for the first antibody.

2.3. Double immunofluorescence techniques

The standard double immunofluorescence technique was employed. Mouse anti-human EG2 monoclonal antibody (mAb) as a marker of eosinophils, anti-CD30 mAb for T cells, anti-CD14 mAb for macrophages, anti-elastase mAb for neutrophils, anti-tryptase for mast cells, and anti-CD20 mAb for B cells were used. After being incubated with anti-human Syk antibody, rinsing with tris buffered saline (TBS), we applied swine FITC conjugated anti rabbit immunoglobulins for 2 h at room temperature. After rinsing with TBS, we applied the second antibody (for example: CD20) at 4 $^\circ\text{C}$ for 24 h. After rinsing with TBS, we treated rabbit RPE conjugated anti-mouse immunoglobulin for 2 h at room temperature. After washing with TBS, nuclear counter staining was carried out with Mayer's haematoxylin for 2 min before mounting. Then, we counted the positive cells with fluorescence microscopy. In this experiment, 7 NACS samples were randomly selected.

2.4. Evaluation of Syk expression

For microscopic analysis, we randomly selected five images of strongly stained sections of Syk in each specimen. The mean number of Syk positive cells per field, that had infiltrated the intestinum of the lamina propria, goblet cell,

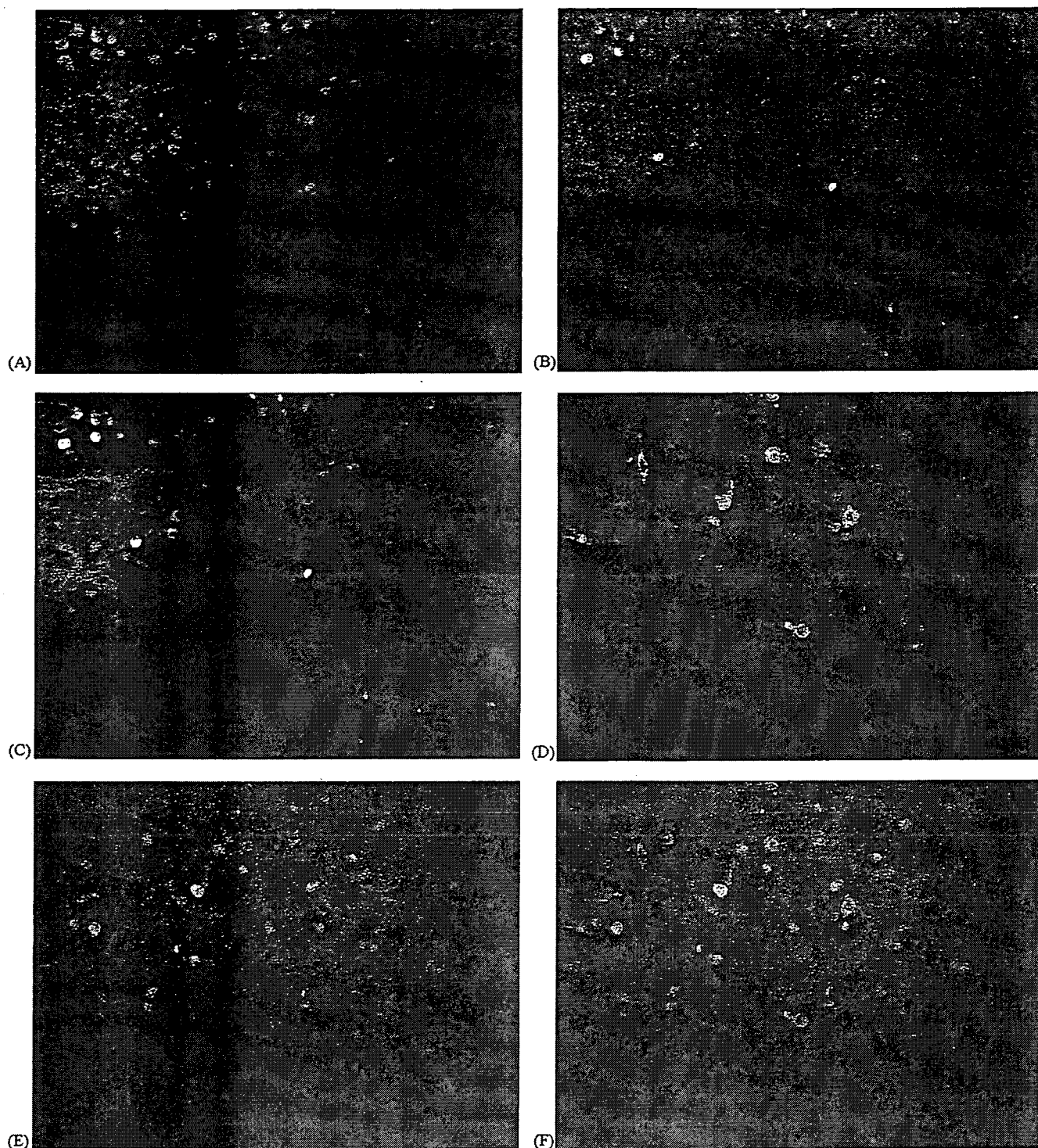


Fig. 3. Double immunohistochemical staining. (A) EG2 positive cells (red); (B) Syk positive cells (green); (C) merged view Syk score is 0.44 in this section (magnification 200 \times); (D) mast cell positive cells (red); (E) Syk positive cells (green); (F) merged view Syk score is 0.16 in this section (magnification 200 \times) (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.).

epithelial layer were counted. We counted at least 1000 cells, including Syk positive cells, and estimated the positive cells as the Syk score [20].

For fluorescence analysis, we used a microscope (BX51-33-FL-3, Olympus, Tokyo, Japan). We randomly selected three images of strongly stained sections of Syk.

The mean number of Syk and other per field that had infiltrated the nasal polyp were counted. These analyses were performed at a magnification of 400 \times (Syk positive cells). Macintosh computers (Stat view software; Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) were used for all statistical analysis.

3. Results

3.1. Syk expression in the nasal mucosa and polyp

Syk positive cells were observed in the lamina propria, nasal gland and nasal polyp. Syk staining was positive in the cells that had infiltrated the lamina propria and the nasal gland (Fig. 1A and B). The usual pattern of positive staining for Syk involved the cytoplasm. The mean Syk positive cells per field (Syk score) in the lamina propria from all 46 patients was 15.9 ± 11.4 (mean \pm S.D.), that in the nasal gland was 32.2 ± 22.4 , and that in nasal polyp was 38.0 ± 19.0 . In the AR group, the mean Syk score in the lamina propria was 18.0 ± 11.7 , that in the nasal gland was 25.8 ± 21.1 , that in the nasal polyp was 50.9 ± 17.9 . Syk score in the nasal polyp was higher than that in the lamina propria and nasal gland ($p < 0.05$, $p < 0.05$). In the NACS group, the mean of the Syk score in the lamina propria was 14.8 ± 11.2 , that in the nasal gland was 35.3 ± 22.6 , that in the nasal polyp was 30.2 ± 15.2 (no difference among the NACS group). In the AR group, the Syk score in the nasal polyp was significantly higher than that in the NACS group (50.9 ± 17.9 versus 30.2 ± 15.2 , $p < 0.01$, Fig. 2). Few Syk positive cells were detected in the epithelial layer (data not shown).

3.2. Double staining

To clarify which cells expressed Syk in the nasal polyp from patients with AR, double immunostaining was performed. EG2 and Syk double positive cells were mainly observed in the allergic polyp (Fig. 3). In the AR group, the mean percentage of double positive staining for Syk and EG2 was higher than the NACS group ($29.4 \pm 21.4\%$ versus $11.5 \pm 8.7\%$, $p < 0.05$, Fig. 4). Since the Syk score of the nasal polyp in AR was higher than that in the NACS group, the absolute number of double positive nasal polyp cells in AR was also higher than that in NACS. Double positive cells

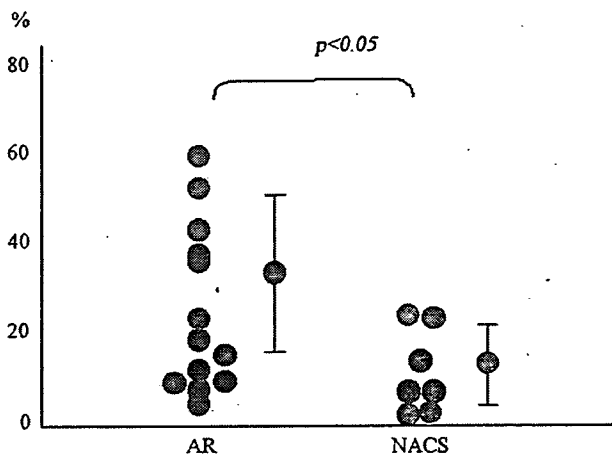


Fig. 4. The mean percentages of EG2 and Syk double positive cells. The double positive cells in AR were higher than those in NACS ($p < 0.05$).

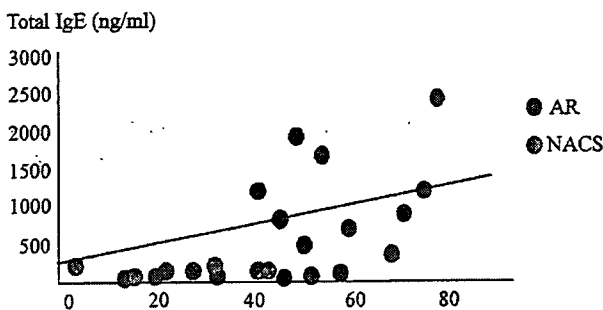


Fig. 5. The correlation with serum IgE titer and Syk score in AR. Total IgE in the serum was correlated with Syk score of nasal polyp from AR patients.

for Syk with each CD30 or elastase or CD14 were only minimally detected in both the AR and NACS group (data not shown). Although CD20 positive cells were stained in AR, the mean percentage of double positive cells in the CD20 cells was $1.1 \pm 0.9\%$. And the mean percentage of double positive cells in the tryptase positive cells was $10.92 \pm 16.85\%$.

3.3. Correlation of Syk score and IgE in the serum

Serum total IgE values in AR range from 16 to 2400, while those values in NACS range from 8 to 130. Total IgE in the sera is significantly associated with the Syk score in the nasal polyp ($r = 0.640$, $p < 0.01$, Fig. 5). There is no difference between the Syk score in the lamina propria and serum IgE (data not shown). Nine NACS samples which has IgE data were included.

4. Discussion

In this study, we demonstrated that Syk expression in nasal polyps from AR patients was significantly higher than that those from NACS patients. There was no difference in the Syk expression between nasal mucosa from AR and that from NACS. The Syk-positive cells are mainly eosinophils in the nasal polyp. Syk was stained in the cytoplasm of eosinophils. The mean percent of Syk positive cells in nasal polyps were associated with serum total IgE.

Eosinophils are well known to be induced and activated by several cytokines and chemokines. In allergic disease, the up-regulation of Interleukin-5 (IL-5), granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), eotaxin and RANTES cause blood and tissue eosinophilia. Patients with allergic nasal polyposis had significantly higher tissue densities of IL-4, IL-5, GM-CSF and IL-3 compared with those with non-allergic nasal polyposis [21,22]. Fan et al. also reported that EG2 and IL-5 positive cells were abundant in the submucosa of patients with allergic sinusitis, especially in the superficial layer. About half of the IL-5 producing cells were eosinophils and apoptotic eosinophils were less numerous in the superficial layer [23]. Human eosinophils have IL-3/IL-5/GM-CSF receptor on

the surface. IL-5 receptor activation in eosinophils has been shown to stimulate JAK2, STAT1, Lyn and Syk [24]. IL-5 and GM-CSF inhibited the apoptosis of eosinophils *in vitro* and *in vivo*. Both Syk and Lyn are essential signal molecules for the activation of the anti-apoptotic pathway(s) induced by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor subunit in human eosinophils [25]. Thus, one possibility is that Syk expression in the nasal polyps of AR may indicate the activation of Syk by IL-5 receptor to lead to the elongation of eosinophil-survival.

Conversely, the analysis of Syk-knock out mice (Syk^{-/-}) demonstrated that the anti-apoptotic effect of IL-5 in cells does not require Syk despite the activation of this tyrosine kinase upon IL-5 receptor ligation [26]. However, Syk is important in activation events (oxidative burst or phagocytosis) induced by Fcγ receptor (FcγR) stimulation [26]. FcγR is found on the surface of eosinophils and plays a critical role in eosinophil activation in cooperation with Syk phosphorylation. Among several FcγRs, allergen-specific IgG1 and IgG3 induces degranulation of eosinophils as inflammatory reaction through FcγRII (CD32) [27]. Also, FcγRII may pivotally regulate both the survival and death of eosinophils, depending on the manner of receptor ligation and β2 integrin involvement [28]. The integrin family of cell adhesion receptors mediates both cell–cell and cell–matrix interaction and plays critical roles in development, inflammation, angiogenesis, migration, metastasis and other important biological processes [29]. The binding of β2 integrin receptors to their ligands (ICAM-1) is critical for firm attachment, spreading and the transendothelial migration of eosinophils [30]. Syk is essential to activate signal transduction cascades initiated by the binding of β2 integrin receptors to their ligands [31]. Thus, Syk expression might suggest that signal transduction from β2 integrin receptors in eosinophils was working to migrate into the nasal polyp. As Syk is regulated by multiple classes of integrins, Syk is deeply associated with the integrin family [32]. Additionally, signaling by integrin and ICAM-1 prolong eosinophil survival [33].

Aggregation of the high affinity IgE receptor (FcεRI) by IgE binding results in the sequential activation of Syk and Lyn on mast cells [34]. Local IgE class switchings and local IgE syntheses were demonstrated in human allergic nasal mucosa [35,36]. IgE itself up-regulates FcεRI, which prevents protease digestion at the cell surface [37]. Recently, nasal polyps have been characterized by a high concentration of IgE in the nasal polyp associated with presence of *Staphylococcus aureus* enterotoxin-specific IgE [38]. These data led us to speculate that Syk-dependent FcεRI signaling is working well in nasal polyps of AR. However, the positive expression of Syk in mast cells was less than eosinophils in this study (Fig. 3D–F). Although eosinophils express FcεRI, most of the protein is confined to the cytoplasm [39]. Our data showed that IgE in the serum was correlated with the Syk score in nasal polyps in AR patients. However, there is little evidence for IgE-dependent function in eosinophils.

IgG appears to be more important for eosinophil activation in allergic disease than IgE.

Recently, it was reported that enhanced IFN-α signaling and proinflammatory function were dependent on the tyrosine kinase Syk and on adaptor proteins that activate Syk through immunoreceptor tyrosine activation motifs [40]. IFN-α inhibited IL-5 and GM-CSF generation of cord blood. IFN-α receptor was found on eosinophils collected from patients with various eosinophilic disorders and inhibited the release of eosinophil granule proteins, such as eosinophil cationic protein, neurotoxin, or IL-5 [41]. The oromucosal administration of IFN-α reduced allergen-specific IgE production and allergen-induced eosinophil recruitment in the absence of detectable toxicity for the treatment of allergic disease [42]. However, our previous study showed that IFN-α was not detected in the nasal lavage from patients with AR and nasal polyps [5] and in the supernatant of nasal polyp-derived fibroblasts (data not shown). There might be the possibility that Syk activation in eosinophils of allergic rhinitis polyp induces suppressive signaling for allergic disease, but this possibility was low.

The delivery of Syk antisense oligodeoxynucleotides (ASO) by aerosol to rat lungs *in vivo* has the potential to reduce Syk expression in infiltrated immune cells and to suppress Ag-pulmonary inflammation [43]. Additionally, the treatment of Syk ASO greatly inhibited the number of eosinophils in the lung parenchyma [44]. They suggested that Syk ASO may be a useful anti-inflammatory agent. Intranasal application of Syk inhibitor R112 improved allergic symptoms of seasonal allergy in a park setting [45]. They suggested that intranasal application of Syk inhibitor become a new treatment of a seasonal allergy.

The degree of Syk expression is not equal to the activity of Syk in cells, while no expression of Syk does not mean any activities of Syk in cells. The autophosphorylation and activation of Syk (phosphorylation of adaptor molecule) produce the signal pathway in eosinophils. Constitutive phosphorylated Syk was detected in nasal polyps with a high Syk expression from patients with AR by Western blotting in this study (data not shown). Although further study is necessary to investigate how Syk works in nasal polyps with AR, Syk may be a target molecule for the treatment of nasal polyps with allergy.

Acknowledgements

This study was supported by KAKENHI (17390458) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan and by KAKENHI (H17-Immunology-001) from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

We thank Taniguchi H, Sugiura A, and Naito T for their excellent technical assistant in Ichinomiya municipal hospital.

References

- [1] Bernstein JM. The molecular biology of nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:262–7.
- [2] Hamilos DL. Chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:213–27.
- [3] Takeuchi K, Yuta A, Sakakura Y. Interleukin-8 gene expression in chronic sinusitis. *Am J Otolaryngol* 1995;16:98–102.
- [4] Suzuki H, Shimomura A, Ikeda K, Furukawa M, Oshima T, Takasaka T. Inhibitory effect of macrolides on interleukin-8 secretion from culture human nasal epithelial cells. *Laryngoscope* 1997;107:1661–6.
- [5] 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;14:143–8.
- [6] Elovic A, Wong DT, Weller PF, Matossian K, Galli SJ. Expression of transforming growth factors-alpha and beta 1 messenger RNA and product by eosinophils in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:864–9.
- [7] Rudack C, Stoll W, Bachert C. Cytokine in nasal polyposis acute and chronic sinusitis. *Am J Rhinol* 1998;12:383–8.
- [8] Finotto S, Ohno I, Marshall JS, Gaudie J, Denburg JA, Dolovich J, et al. TNF-alpha production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). *J Immunol* 1994;153:2278–89.
- [9] Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Woolley K, et al. Eosinophils as a potential source of platelet-derived growth factor B-chain (PDGF-B) in nasal polyposis and bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:639–47.
- [10] Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki 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* 1991;266:15790–6.
- [11] Yamada T, Taniguchi T, Yang C, Yasue S, Saito H, Yamamura H. Association with B-cell-antigen receptor with protein kinase p72Syk and activation by engagement of membrane IgM. *Eur J Biochem* 1993;213:455–9.
- [12] Benhamou M, Ryba NJ, Kihara H, Nishikata H, Siraganian RP. Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling: identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* 1993;268:23318–24.
- [13] Yousefi S, Hoessli DC, Blaser K, Mills GB, Simon HU. Requirement of Lyn and Syk tyrosine kinases for the prevention of apoptosis by cytokines in human eosinophils. *J Exp Med* 1996;183:1407–14.
- [14] Chan AC, van Oers NS, Tran A. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol* 1994;152:4758–66.
- [15] Yan SR, Huang M, Berton G. Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosin kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J Immunol* 1997;158:1902–10.
- [16] Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Sunaga H, et al. Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *J Immunol* 2001;166:538–43.
- [17] Coopman PJ, Do MT, Barth M, Bowden ET, Hayes AJ, Basyuk E, et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 2000;406:742–7.
- [18] Tsuchida S, Yanagi S, Inatome R, Ding J, Hermann P, Tsujimura T, et al. Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem* 2000;127:321–7.
- [19] Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Yamamoto H, 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;167:283–8.
- [20] Mori S, Fujieda S, Sunaga H, Fox SB, Saito H. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascularity in the nasal mucosa from allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1637–44.
- [21] Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Cunningham L, Bean DK, Yasrael Z, et al. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:537–44.
- [22] Kleinjan A, Dijkstra MD, Boks SS, Severijnen LA, Mulder PG, Fokkens WJ. Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:441–50.
- [23] Fan GK, Itoh T, Imanaka M, Fujieda S, Takenaka H. Eosinophilic apoptosis in sinus mucosa: relationship to tissue eosinophilia and its resolution in allergic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:551–8.
- [24] Adachi T, Alam R. The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am J Physiol* 1998;275:C623–33.
- [25] Yousefi S, Hoessli DC, Blaser K, Mills GB, Simon HU. Requirement of Lyn and Syk tyrosine kinases for the prevention of apoptosis by cytokines in human eosinophils. *J Exp Med* 1996;183:1407–14.
- [26] Lach-Trifilieff E, Menear K, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Walker C. Syk-deficient eosinophils show normal interleukin-5-mediated differentiation, maturation, and survival but no longer respond to Fc gamma R activation. *Blood* 2000;96:2506–10.
- [27] Kaneko M, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H. Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. *J Clin Invest* 1995;95:2813–21.
- [28] Kim JT, Schimming AW, Kita H. Ligation of Fc gamma RII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils. *J Immunol* 1999;162(7):4253–9.
- [29] Vines CM, Potter JW, Xu Y, Geahlen RL, Costello PS, Tybulewicz VL, et al. Inhibition of beta 2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity* 2001;15:507–19.
- [30] Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, Pizcueta P, Schleiffenbaum BE, Tedder TF, et al. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J Cell Biol* 1994;125:1417–27.
- [31] Schymeinsky J, Then C, Walzog B. The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *J Cell Physiol* 2005 [Epub ahead of print].
- [32] Woodside DG, Obergfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, et al. Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* 2001;11:1799–804.
- [33] Chihara J, Kakazu T, Higashimoto I, Saito N, Honda K, Sannohe S, et al. Signaling through the beta2 integrin prolongs eosinophil survival. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(1 Pt 2):S99–103.
- [34] Benhamou M, Ryba NJ, Kihara H, Nishikata H, Siraganian RP. Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signalling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* 1993;268:23318–24.
- [35] 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;19:507–12.
- [36] Ghaffar O, Durham SR, Al-Ghamdi K, Wright E, Small P, Frenkiel S, et al. Expression of IgE heavy chain transcripts in the sinus mucosa of atopic and nonatopic patients with chronic sinusitis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:706–11.
- [37] Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz CS, Noben-Trauth N, Ra C, et al. IgE enhances Fc epsilon receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc epsilon receptor I expression and mediator release. *J Immunol* 1999;162:5455–65.
- [38] Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, Cuvelier C, Cauwenberge P, Bachert C. Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE

- formation to *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyp tissue. *Allergy* 2005;60:71–9.
- [39] Kita H, Kaneko M, Bartemes KR, Weiler DA, Schimming AW, Reed CE, et al. Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy? *J Immunol* 1999;162:6901–11.
- [40] Tassiulas I, Hu X, Ho H, Kashyap Y, Paik P, Hu Y, et al. Amplification of IFN-alpha-induced STAT1 activation and inflammatory function by Syk and ITAM-containing adaptors. *Nat Immunol* 2004;5:1181–9.
- [41] Aldebert D, Lamkhioued B, Desaint C, Gounni AS, Goldman M, Capron A, et al. Eosinophils express a functional receptor for interferon alpha: inhibitory role of interferon alpha on the release of mediators. *Blood* 1996;87:2354–60.
- [42] Meritet JF, Maury C, Tovey MG. Effect of oromucosal administration of IFN-alpha on allergic sensitization and the hypersensitive inflammatory response in animals sensitized to ragweed pollen. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:583–93.
- [43] Stenton GR, Kim MK, Nohara O, Chen CF, Hirji N, Wills FL, et al. Aerosolized Syk antisense suppresses Syk expression, mediator release from macrophages, and pulmonary inflammation. *J Immunol* 2000;164:3790–7.
- [44] Stenton GR, Ulanova M, Dery RE, Merani S, Kim MK, Gilchrist M, et al. Inhibition of allergic inflammation in the airways using aerosolized antisense to Syk kinase. *J Immunol* 2002;169:1028–36.
- [45] Meltzer EO, Berkowitz RB, Grossbard EB. An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:791–6.



VIII. 外科的治療 ～粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経選択的切断術～

Yamada Takechiyo

山田武千代*¹⁾

Mori Shigehito

森 繁人*

Sakashita Masafumi

坂下 雅文*

Fujieda Shigeharu

藤枝 重治*²⁾

Takahashi Noboru

高橋 昇*

*福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 ¹⁾講師 ²⁾教授



下気道である気管支粘膜下部には平滑筋が存在するが、下甲介粘膜下部では骨であり、アレルギー性鼻炎では骨を基盤に粘膜の肥厚が高度になり鼻腔流量が減少する。下甲介骨を取り除くのが粘膜下下甲介骨切除術である。後鼻神経選択的切断術はムスカリン性アセチルコリン受容体である M3 を介する鼻汁分泌がその主な作用である。下甲介骨(膜)由来の線維芽細胞は M3 を最も強く発現していた。線維芽細胞へのアセチルコリン作動性物質の作用効果、本術式、長期術後成績を紹介し、手術の意義と将来の課題と展望を考察する。



粘膜下下甲介骨切除術/後鼻神経選択的切断術/線維芽細胞/アセチルコリン

はじめに

保存的治療に抵抗性の重症鼻閉通年性アレルギー性鼻炎に対して、当科では、粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経(選択的)切断術を採用している。下甲介粘膜の深部は骨であり、これを取り除くのが粘膜下下甲介骨切除術である。後鼻神経切断術は、Vidian 神経の末梢枝であり、Vidian 神経切断術と同様の結果が期待される。後鼻神経は、副交感神経線維、三叉神経第 2 枝からの知覚線維を含み、アセチルコリンによる鼻腺由来の鼻汁分泌がその主な作用として知られている。本術式と長期術後治療成

績、採取した下甲介骨(膜)由来の線維芽細胞とアセチルコリン作動性物質による鼻腺以外への作用効果の実験データを紹介する。

I. 下甲介の構造とアレルギー性鼻炎

アレルギー性鼻炎では、樹状細胞、T細胞、B細胞、形質細胞、肥満細胞、好塩基球、好酸球、単球、気道上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、神経細胞、血小板など多くの細胞が関与して下甲介の肥厚を起こしている。気管支喘息における下気道の組織学的再構築(リモデリング)には基底膜の肥厚、杯細胞増殖、気管支平滑筋肥大・

増殖，血管新生，細胞浸潤，粘膜下腺の肥大・過形成，上皮の破壊が認められる¹⁾。下甲介の組織所見においても，アレルギー性鼻炎では，非アレルギーに比べると，基底膜の肥厚(van Gieson 染色)と血管新生(CD34 陽性血管数の増加)が強く起こっていることを我々は確認しており，下気道リモデリングと類似の変化が認められた。気管支喘息ではリモデリングの結果として気道内腔が狭小化し気道抵抗が増大している。同様に鼻腔では下甲介の肥厚により鼻腔が狭小化し鼻腔流量が減少する。下気道である気管支粘膜下部は平滑筋が存在し，気道抵抗に関与している。一方，図1のように，下甲介粘膜下部では平滑筋は存在せず，その深部は骨であり，骨を土台に粘膜の肥厚が高度になり鼻腔流量が減少する。

Ⅱ. 粘膜下下甲介骨切除術

図2のように，粘膜下下甲介骨切除術では，下甲介の土台となっている下甲介骨を摘出する。梨状口縁切開を行い(図3)，下甲介前端で下甲介骨を露出し，前方から後方へと，鼻中隔側，下鼻道側，下縁の順に剥離していく。この際，後方から鼻中隔側に上へと走行する末梢の後鼻神経が確認できることが多い。下甲介骨があると血液を吸引しやすいので，最後まで下甲介骨を残して操作が終了した時点で除去している。粘膜肥厚が高度な症例では先端に薄い小さな骨が残りがやすく，完全除去をしないと粘膜肥厚再発の原因となるので徹底的に除去している。

下甲介の肥厚を改善するには，下甲介骨

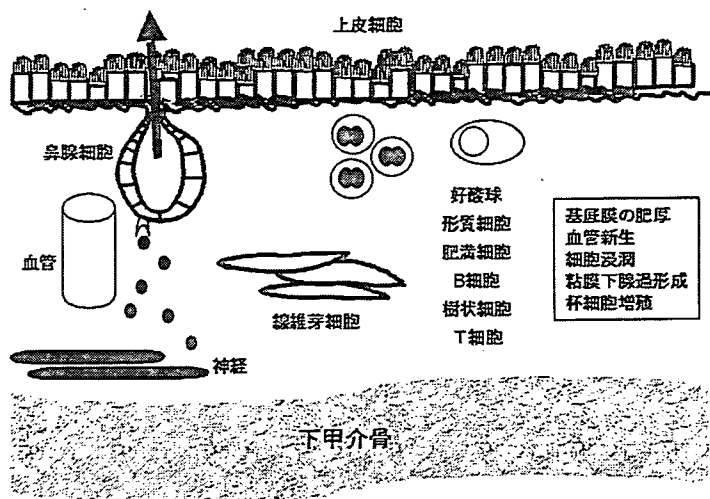


図1 下甲介の構造とアレルギー性鼻炎に関与する細胞
アレルギー性鼻炎の場合である下甲介では，粘膜の最深部が骨であることが特徴で，下気道では平滑筋である。

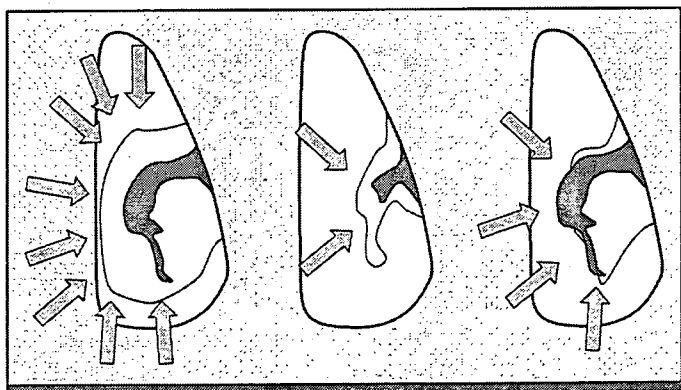


図2 粘膜下下甲介骨切除術と下甲介肥厚の軽減
左鼻腔前額断を示す。下甲介の肥厚(図左)を改善するには，下甲介骨(黒塗り)を残した粘膜切除(図右)よりも，粘膜を残す粘膜下下甲介骨切除術が優れており(図中)，抗原曝露(矢印)の機会を最も軽減しうる。

を残した粘膜切除よりも，粘膜を残す粘膜下下甲介骨切除術が更に優れており，抗原曝露の機会をより軽減しうる。機能面をみても粘膜を残すため，術後にみられる痂皮がほとんど形成されず，この術式では治療機転が早い。

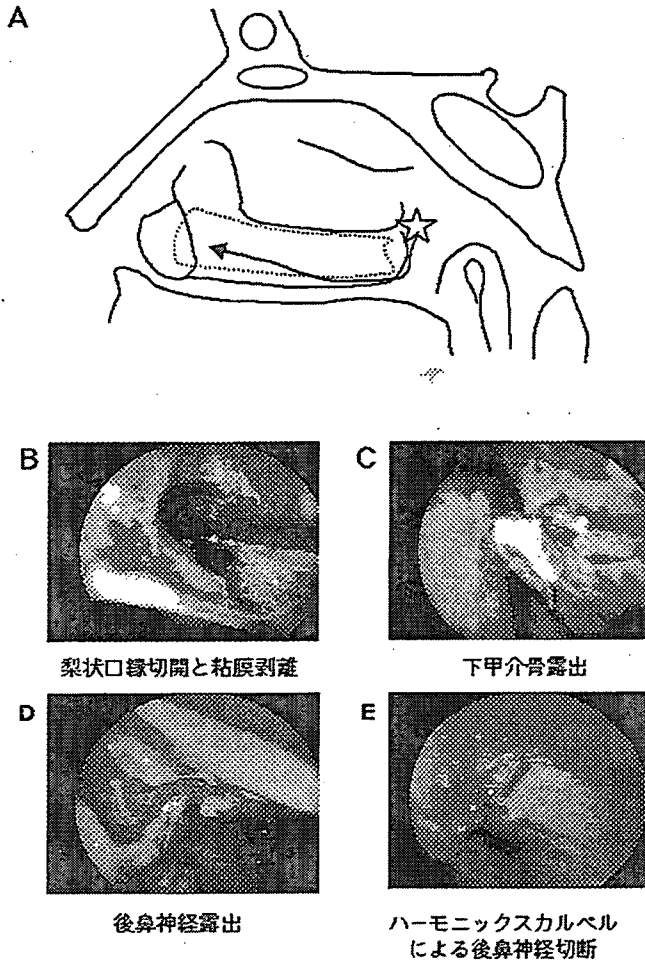


図3 粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経切断術(手術手技)
 梨状口縁を切開し、蝶口蓋孔(☆)から矢印で示すように走行する後鼻神経を切断し、点線の部位の下甲介骨を除去する(A)。左側の下甲介を示す(B~E)。内視鏡下において、梨状口縁切開と粘膜剥離後、下甲介骨と後鼻神経を露出し、ハーモニックスカルペルで切断した後、最後に下甲介骨を除去する(B~E)。

Ⅲ. 後鼻神経切断術

粘膜下下甲介骨切除術で、内視鏡下に剥離を下甲介後端に進め、蝶口蓋孔より下甲介粘膜下に向かって走行する白色の索状物に到達し、後鼻神経を超音波メス(ハー-

モニックスカルペル)で切断する(図3)。

後鼻神経は蝶口蓋孔から下鼻甲介粘膜下に広く分布している。この神経の切断により、鼻腔に分布する遠心性分泌性副交感神経のすべてが切断されるため、鼻汁分泌の80%が減少し、また鼻腔に分布する求心性知覚神経の3分の1が切断されるため、くしゃみの30%が減少する。副交感神経の神経伝達物質であるアセチルコリンは、鼻腺細胞の細胞内Ca²⁺濃度と膜電位を変化させる作用を持ち、ムスカリン性アセチルコリン受容体であるM3を介して、鼻腺からの鼻汁分泌を促すが^{2), 3)}、鼻腺以外への作用の可能性も考えられる。

Ⅳ. 後鼻神経と線維芽細胞

線維芽細胞はアレルギーや炎症の病態において重要な働きをしていることが示唆されている。我々も鼻茸の鼻粘膜から単離培養した線維芽細胞を用いて刺激によりケモカイン産生が誘導されることや特異な性格を持っていることを証明してきた⁴⁾。同様の方法で下甲介から線維芽細胞を単離培養し、ムスカリン性アセチルコリン受容体の発現をreal time PCRで検討した。受容体は、分泌腺や神経節にM1、平滑筋や心臓にM2、分泌腺や平滑筋にM3、中枢神経にM4とM5が発現しているが、下甲介由来の線維芽細胞では、M3の発現が最も強く、M1、M2、M4、M5に比べて10倍以上であった。

手術時に同時採取した鼻粘膜と下甲介骨を用いてそれぞれ線維芽細胞を単離培養し、vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type 1 α , Eotaxin-1の

Ⅷ. 外科的治療～粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経選択的切断術～

発現を real time PCR で測定すると、下甲介骨由来線維芽細胞では、鼻粘膜由来線維芽細胞に比べて6倍、VEGFの発現が有意に増強していた。後鼻神経には副交感神経線維が含まれていることを考えて、アセチルコリン作動性物質であるメサコリンを作用させ前後で比較すると、特に下甲介骨由来線維芽細胞では、アセチルコリン作動性物質により VEGF, Eotaxin-1 の発現が有意に増強した。

VEGF は主に血管新生に関与するが、好酸球への効果も最近報告されている⁵⁾。Eotaxin は好酸球浸潤の強い効果を有するため、図4のように、後鼻神経と下甲介骨は重要な働きをしており、これを操作するのが、粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経切断術と考えている。

V. 長期術後治療成績

粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経切断術の長期治療成績を表1に示す。対象は2000年1月以降に手術後経過を観察し得た84例である。

術前後のアレルギー症状の評価は、症状スコアを採用し、外来受診時に問診で症状を点数化した。くしゃみは1日の平均発作回数を、鼻汁の程度は1日の平均そう鼻回数を、鼻閉の程度は口呼吸と鼻閉の時間から、それぞれ0, 1, 2, 3, 4と点数化し評価した。鼻閉の客観的評価として、鼻腔通気度計 (model MPR-2100, Nihon Koden, Tokyo, Japan) を使い、アンテリオール法の呼気流量(100 Pa において)を測定した。鼻誘発テストはハウスダストを用いた誘発用抗

原ディスク (Torii, Tokyo, Japan) を用いた。ディスクは下鼻甲介の前部に置き、5分後に評価した。

鼻閉と鼻汁の症状スコアと呼気流量は

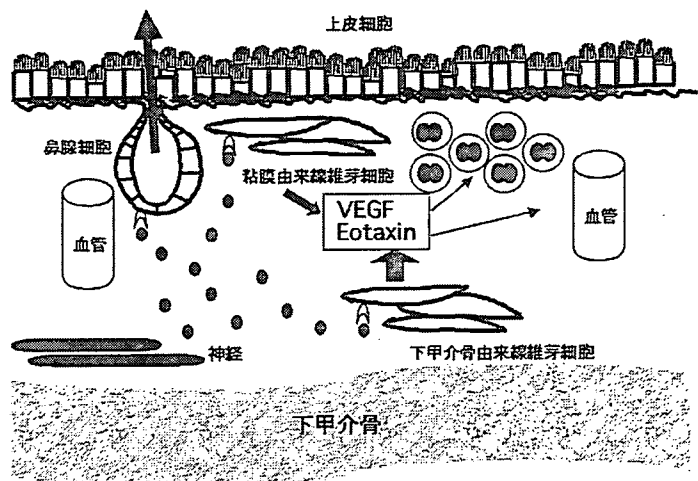


図4 後鼻神経と線維芽細胞

アセチルコリンは鼻腺細胞に働き鼻汁を分泌させるが、鼻粘膜の線維芽細胞にもアセチルコリン受容体が発現している。下甲介骨由来線維芽細胞では、鼻粘膜由来線維芽細胞に比べ、アセチルコリン作動性物質により VEGF, Eotaxin の発現を強く促した。

表1 長期術後治療成績

検査項目 (方法)	結果 (平均)		
	前	1年後	2年後
鼻閉 (症状スコア)	2.12	0.41**	0.47**
鼻汁 (症状スコア)	2.36	0.95**	1.27*
くしゃみ (症状スコア)	1.70	0.44**	1.37
鼻腔通気度 (mL/sec) (100 Pa での呼気流速)	252.6	394.0*	435.6*
誘発試験 (ディスク法)	1.58	0.04*	1.06

鼻閉と鼻汁の症状スコア、鼻腔通気度による呼気流量は術前に比べ、1年後、2年後と有意に改善している (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

12カ月後, 24カ月後において, くしゃみの症状スコアー及び鼻誘発テストでは12カ月後に有意に改善した。

後鼻神経の切断では鼻腔に分布する遠心性分泌性副交感神経のすべてが切断されるため, 鼻汁の症状スコアーは制御可能であった。一方, 鼻腔に分布する求心性知覚神経の3分の1のみが切断されるため, くしゃみについては後鼻神経切断術を併用しても有効でない部分もあり, くしゃみのスコアーにおいて術後24カ月で有意な改善が認められなくなったことと一致している。

鼻腔通気度計による呼気流量は, 12カ月後に比べ24カ月後に更に改善している。下甲介骨切除と後鼻神経切断による効果で鼻粘膜のリモデリングを抑制していると考えられる。図4で, VEGFとEotaxinの関与を示唆したが, 実際, 術後の下甲介組織でも, 好酸球などの浸潤細胞数とCD34陽性血管(新生血管)数は減少していることを確認している。図5は, 粘膜下下甲介骨切

除術と後鼻神経切断術前後の前額断CT所見である。術後の症例では下甲介骨が摘出され下甲介の肥厚が改善し, 鼻腔通気が改善している。鼻粘膜を切除すると正常の粘膜が再生し繊毛運動機能が正常化するまでに6カ月を有するといわれているが, 粘膜下下甲介骨切除術では粘膜が保存されているため, 繊毛運動機能も保存される。

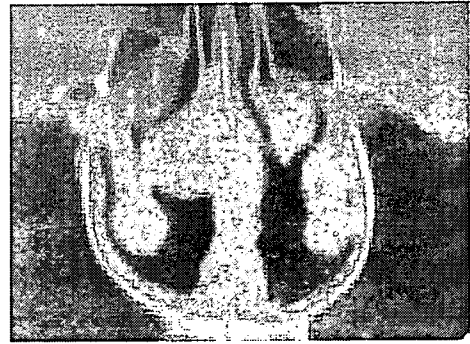
VI. 課題と展望

アレルギー疾患の増加に伴い, 保存的治療に抵抗性を示す重症アレルギー性鼻炎も増加している。レーザー, 高周波凝固装置, 化学薬品を用いた鼻粘膜焼灼術や, 下甲介手術が各施設で行われているが, 長期予後についての報告は少ない。術直後は症状が改善するが, 数年後に「良い状態」かそれとも「術前に戻ってしまう」のか, その情報を術前に提供することが望ましく, 当科では長期術後成績を重要視している。

重症鼻閉通年性アレルギー性鼻炎に対して, 以前まで我々は粘膜下下甲介骨切除術



手術前の症例



手術後の症例

図5 粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経切断術前後のCT所見

重症鼻閉の通年性アレルギー性鼻炎患者では, 下甲介骨粘膜の肥厚が高度で鼻腔通気が悪いが, 術後の症例では粘膜下下甲介骨切除術により鼻腔通気も改善している(前額断)。

のみを行っていた。その長期術後成績を、同様にくしゃみ、鼻汁、鼻閉をスコア化し、鼻腔通気度、鼻腔誘発試験と共に評価し、良い結果を得ている⁶⁾が、症状が悪化する症例もあり、3年、5年の長期成績では症状の変動がみられた。現在は、粘膜下下甲介骨切除術に後鼻神経切断術を併用してその2年間の成績を表1にまとめた。更に、3年、5年と長期成績を目標に注意深く観察中である。ほとんどの症例が満足し全体では良い成績であるが、やはり、悪化する症例もあり、今回の検討では、くしゃみのスコアと鼻誘発テストの成績が変動した。その原因の一つには後鼻神経の再生も否定出来ない。後鼻神経の切断後、その処理法に工夫を加える必要があり、最近の症例で切断後の蝶口蓋孔にアパセラムを留置し検討中である。

鼻誘発テストでは誘発後のくしゃみと、抗原曝露による鼻粘膜の局所所見で決定するため、アレルギー体質が強い場合、鼻誘発テスト陽性になってくる症例が存在するためと考えられた。

アレルギー体質を治療する新治療では、経口減感作療法の外、抗IgE (immunoglobulin E) 抗体療法、ペプチド免疫療法、CpG DNA 抗原療法、BCG (Bacille Calmette et Guérin) 接種などが挙げられる。抗IgE抗体療法は良好な結果が期待できるが、投与を中止すると血清IgE値が戻るため、通年性アレルギー性鼻炎に対してどう対処するかが課題であり、IgE産生を制御する治療が求められている。粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経切断術の入院中に急速

減感作療法を行い、退院後に減感作療法(将来的には経口)を行うのも一つの手段である。

手術単独でアレルギー性鼻炎を完全治療せしめるには課題も多いが外科医としての立場を考えて、当科では検討を続けていく予定である。また、アレルギー医として手術以外のアレルギー新治療を目指して経口減感作療法の臨床(共同)研究、CpG やキメラ抗体によるIgE産生制御の研究を行っている^{7), 8)}。

文 献

- 1) Busse W, Elias J, Sheppard D et al : Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 160 : 1035-1042, 1999
- 2) Furukawa M, Yamaya M, Ikeda K et al : Culture and characterization of human nasal gland cells. *Am J Physiol* 271 : 593-600, 1996
- 3) Tai CF, Baraniuk JN : Upper airway neurogenic mechanisms. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2 : 11-19, 2002
- 4) 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* 166 : 538-543, 2001
- 5) Feistritz C, Kaneider NC, Sturm DH et al : Expression and function of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 in human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30 : 729-735, 2004
- 6) Mori S, Fujieda S, Yamada T et al : Long-term effect of submucous turbinectomy in patients with perennial allergic rhinitis. *Laryngoscope* 112 : 865-869, 2002
- 7) Fujieda S, Iho S, Kimura Y et al : Synthetic oligodeoxynucleotides inhibit IgE induction in human lymphocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 162 : 232-239, 2000
- 8) Yamada T, Zhu D, Zhang K et al : Inhibition of interleukin-4-induced class switch recombination by a human immunoglobulin Fcγ-Fcε chimeric protein. *J Biol Chem* 278 : 32818-32824, 2003