

合併例と比較して有意に高値であることを示している<sup>33)</sup>。

## おわりに

以上、上気道からみた“*One airway, one disease*”について、特にSCUADsの病態および臨床経過に与える喘息のインパクトについて概説した。SCUADsの多くは下気道病変を合併しており、上下気道は連鎖している。これらの疾患において、上下気道を個別に治療するのでは十分な効果が期待できないことは想像に難くない。“Airway科”として、中耳を含めた気道を1つのユニットとして考え、自然経過などの疫学、病態の解明および早期介入を含めた新しい予防・治療法の開発など、取り組む必要性を感じる。

## 文 献

- 1) Bousquet J, Bachert C, Canonica GW, et al: Unmet needs in severe chronic upper airway diseases (SCUAD). *J Allergy Clin Immunol* 124 : 428-433, 2009
- 2) Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N: Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108 : S147-S334, 1998
- 3) Corren J: Allergic rhinitis and asthma; how important is the link? *J Allergy Clin Immunol* 99 : S781-786, 1997
- 4) Leynaert B, Neukirch C, Kony S, et al: Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 113 : 86-93, 2004
- 5) Demoly P, Bozonnet MC, Dacosta P, et al: The diagnosis of asthma using a self-questionnaire in those suffering from allergic rhinitis; a pharmaco-epidemiological survey in everyday practice. *Allergy* 61 : 699-704, 2006
- 6) Antonicelli L, Muccucci C, Voltolini S, et al: Allergic rhinitis and asthma comorbidity; ARIA classification of rhinitis does not correlate with the prevalence of asthma. *Clin Exp Allergy* 37 : 954-960, 2007
- 7) Yamauchi K, Tamura G, Akasaka T, et al: Bronchial asthma and allergic rhinitis by questionnaire in 10,009 patients. *Allergol Int* 58 : 55-61, 2009
- 8) 馬場 実: アレルギーマーチ. *小児科診療* 61 : 481-485, 1998
- 9) Kewr J, Hartert TV: The atopic march; what's the evidence? *Ann Allergy Asthma Immunol* 103 : 282-289, 2009
- 10) Masuda S, Fujisawa T, Katsumata H, et al: High prevalence and young onset of allergic rhinitis in children with bronchial asthma. *Periatr Allergy Immunol* 19 : 517-522, 2008
- 11) 高橋 清: 成人喘息発症の予知と難治化対策. *アレルギー* 55 : 10-16, 2006
- 12) 谷本 安, 岡田千春: 成人発症喘息の危険因子と予防—内科の立場から—. *臨床免疫・アレルギー科* 47 : 55-59, 2007
- 13) Chakir J, Laviolette M, Boutert M, et al: Lower airway remodeling in nonasthmatic subjects with allergic rhinitis. *Lab Invest* 75 : 735-744, 1996
- 14) Braunstahl GJ, Overbeek S, Kleinjan A, et al: Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 107 : 469-476, 2001
- 15) Corren J, Adinoff AD, Irvin CG: Changes in bronchial responsiveness following nasal provocation with allergen. *J Allergy Clin Immunol* 89 : 611-618, 1992
- 16) Nishioka K, Meguro T, Okano M, et al: Seasonal change in maximal expiratory flow-volume pattern in patients with Japanese cedar pollinosis. *Acta Medica Okayama* 47 : 151-156, 1993
- 17) Huxley EJ, Viroslav J, Gray WR, et al: Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am J Med* 64 : 564-568, 1978
- 18) Settipane RJ, Hagy GW, Settipane GA: Long term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis; a 23 year follow up study of college students. *Allergy Proc* 15 : 21-25, 1994
- 19) Burgess JA, Walters EH, Byrnes GB, et al: Childhood allergic rhinitis predicts asthma incidence and persistence to middle age; a longitudinal study. *J Allergy Clin Immunol* 120 : 863-869, 2007
- 20) Purello-D'Ambrosio F, Gangemi S, Merendino RA, et al: Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *Clin Exp Allergy* 31 : 1295-1302, 2001
- 21) Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA, et al: Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-Study). *J Allergy Clin Immunol* 109 : 251-256, 2002
- 22) Virchow JC, Bachert C: Efficacy and safety of montelukast in adults with asthma and allergic

- rhinitis. *Respir Med* 100 : 1952-1959, 2006
- 23) Corren J, Adinoff AD, Buchmeier AD, et al : Nasal beclomethasone prevents the seasonal increase in bronchial responsiveness in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 90 : 250-256, 1992
- 24) Reed CE, Marcoux JP, Welsh PW : Effects of topical nasal treatment on asthma symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 81 : 1042-1047, 1988
- 25) Warner JO ; ETAC Study Group. Early Treatment of the Atopic Child : A double-blinded, randomized placebo-controlled trial of cetirizine in preventing the onset of asthma in children with atopic dermatitis ; 18 months' treatment and 18 months' posttreatment follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 108 : 929-937, 2001
- 26) Sagara H, Yukawa T, Kashima R, et al : Effects of pranlukast hydrate on airway hyperresponsiveness in non-asthmatic patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Allergol* 58 : 277-287, 2009
- 27) 春名眞一 : 好酸球性副鼻腔炎の治療戦略. *臨床免疫・アレルギー科* 48 : 300-306, 2007
- 28) Dejjima K, Hama T, Miyazaki M, et al : A clinical study of endoscopic sinus surgery for sinusitis in patients with bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 138 : 97-104, 2005
- 29) 岡野光博 : 好酸球性副鼻腔炎の病態と発症機序. *アレルギー科* 17 : 163-170, 2004
- 30) Borish L : Sinusitis and asthma ; entering the realm of evidence-basic medicine. *J Allergy Clin Immunol* 109 : 606-608, 2002
- 31) Iino Y : Eosinophilic otitis media ; a new middle ear disease entity. *Curr Allergy Asthma Rep* 8 : 525-530, 2008
- 32) 松谷幸子 : 好酸球性中耳炎の概念. *JOHNS* 23 : 879-882, 2007
- 33) Nonaka M, Fukumoto A, Ozu C, et al : IL-5 and eotaxin levels in middle ear effusion and blood from asthmatics with otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol* 123 : 383-387, 2003

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
分担研究報告書

スギ花粉症患者の制御性 T 細胞に関する研究

研究分担者	増山敬祐	山梨大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科	教授
研究協力者	近松一朗	山梨大学附属病院頭頸部・耳鼻咽喉科	講師
	山西貴大	山梨大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科	助教

研究要旨

スギ花粉症患者の末梢血中の CD4+CD25+制御性 T 細胞 (nTreg) の Th1/Th2 免疫応答の制御に関する研究を行ったところ、Th2 ではなく Th1 優位にサイトカイン産生の抑制を行っていることが明らかになった。さらに、ELISPOT 法によりスギ抗原特異的制御性 T 細胞の存在を確認した。今後、スギ抗原特異的 Th1、Th2、nTreg の花粉飛散あるいはペプチドを含めた免疫療法によるバランスの変動について検討を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

外来抗原に対する免疫応答の抑制的制御に、ヘルパー T 細胞サブセットのひとつである CD4+CD25+制御性 T 細胞 (nTreg) が重要な役割を担っていることはよく知られている事実である。しかしながら、スギ花粉症患者の nTreg による抗原特異的免疫応答の制御については不明な点が多い。

今回我々は、スギ花粉症患者の末梢血を用いて、スギ花粉抗原に対する特異的免疫反応の制御に及ぼす nTreg の機能的解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

スギ花粉症患者 12 名および健常者 3 名の末梢血よりリンパ球を比重遠心法にて分離し、CD4+T 細胞 (nTreg 含有群) と CD4+CD25-T 細胞 (nTreg 除去群) に分けた。これらをスギ花粉抗原 Cry j 1 および HLA-DP5 拘束性 Cry j 1 関連ペプチド (p61-75) で刺激し、30Gy 照射した CD4+細胞を APC として共に 6 日間培養した。抗原特異的増殖能とサイトカイン産生をそれぞれフローサイトメトリおよび ELISA 法にて測定し、両群を比較検討した。また、Cry j 1 特異的 IL-10 産生 Treg の検出を ELISPOT 法にて行った。

(倫理面への配慮)

山梨大学医学部倫理委員会で承認の得られた同意説明文書を被験者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、試験参加希望者の自由意志による試験への参加について同意を文書で受け取った。同意説明書には予期される副作用と効果、試験への参加は任意であることと同意しない場合ことをもって不利益な対応は受けないこと、参加の同意はいつでも撤回できること、試験に伴う補償の有無、個人情報の取扱いと関連する手続き

などの内容が含まれている。

C. 結果

細胞増殖能には Cry j 1 および Cry j 1 関連ペプチド (p61-75) 刺激いずれにおいても両群間で差は認めなかった。IFN- $\gamma$  産生に関しては Cry j 1 刺激において、nTreg 除去によりその産生は有意に増加した。一方、IL-5 産生に関しては、nTreg 除去の影響はいずれの刺激 (抗原およびペプチド) においても認めなかった。さらに、IL-10 の産生は、Cry j 1 刺激において nTreg の除去により有意に低下した。ペプチド刺激においても低下傾向を認めた。

次に、Cry j 1 特異的 IL-10 産生細胞を検討するため、CD4+CD25+細胞を Cry j 1 で 2 日間刺激し、3 名のスギ花粉症患者において IL-10 産生細胞のスポットを ELISPOT にて確認できた。

D. 考察:

Treg に関してこれまで、住宅環境や季節などによる抗原曝露状況の変化あるいは HLA などの個体差などにより Treg の制御機構が影響を受けること、またその制御機構の程度は Th1 と Th2 で異なる可能性があること、などが報告されている。今回の解析では、スギ花粉症患者においては、nTreg は Th2 よりも Th1 優位に抑制機構が働いていることがわかった。また、スギ花粉症患者の末梢血には Cry j 1 特異的 IL-10 産生 Treg が存在し、スギ抗原特異的免疫応答の制御に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

スギ抗原特異的制御性 T 細胞 (nTreg) の存在を確認し、その機能は主に Th1 優位に抑制している可

能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ouyang Y, Miyata M, Masuyama K, Nakao A, et al. TGF- $\beta$  signaling may play a role in the development of goblet cell hyperplasia in a mouse model of allergic rhinitis. *Allergol Int* 2010;59:313-9.
- 2) 松崎全成、増山敬祐. アレルギーに関する検査 鼻汁好酸球検査. *JOHNS* 2010;26:1137-39.
- 3) 増山敬祐、松岡伴和、他. 内科医が留意すべき耳鼻咽喉科疾患の診断と治療、予防 患者の症状から見逃さないためのコツとポイント 鼻漏・くしゃみ. *Progress in medicine* 2010;30:1063-69.
- 4) 山梨県におけるスギ、ヒノキ花粉観測と花粉症患者動向調査. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* 2010;28:21-27.

### 2. 学会発表

- 1) 田中翔太、宮田正則、上條 篤、増山敬祐：鼻中隔より発生した平滑筋腫の一例. 第49回日本鼻科学会総会、2010.
- 2) 上條 篤、高橋吾郎、山西貴大、松岡伴和、増山敬祐、他：スギ花粉症に対するボツリヌス治療の有効性の検討 2010 (E-BOAT Study2). 第49回日本鼻科学会総会、2010.

- 3) 宮田政則、上條 篤、松岡伴和、森山元大、増山敬祐：ボツリヌス毒素の鼻内注射前後における鼻汁中サイトカインの変化についての検討. 第49回日本鼻科学会総会、2010.
- 4) 高橋吾郎、増山敬祐、峯田周幸：スギ花粉症に対するモメタゾンフランカルボン酸点鼻液の常用点鼻と屯用点鼻に関する無作為化比較試験. 第111回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2010.
- 5) 松岡伴和、増山敬祐：スギ花粉症患者に対するQOL調査. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会、2010.
- 6) 宮田政則、松岡伴和、増山敬祐、他：山梨県における春季花粉症患者のいびきと日中の眠気に関する質問票調査. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会、2010.
- 7) 増山敬祐：減感作療法の理論と実際. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会、2010.

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

# TGF- $\beta$ Signaling May Play a Role in the Development of Goblet Cell Hyperplasia in a Mouse Model of Allergic Rhinitis

Yuhui Ouyang<sup>1,2</sup>, Masanori Miyata<sup>1,2</sup>, Kyosuke Hatsushika<sup>1,2</sup>, Yuko Ohnuma<sup>1</sup>, Ryohei Katoh<sup>3</sup>, Hideoki Ogawa<sup>4</sup>, Ko Okumura<sup>4</sup>, Keisuke Masuyama<sup>2</sup> and Atsuhito Nakao<sup>1,4</sup>

## ABSTRACT

**Background:** Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) levels are elevated in the nasal mucosa in allergic rhinitis. However, because TGF- $\beta$  is secreted extracellularly in latent complexes, it remains unclear whether the local TGF- $\beta$  expression actually drives active signaling and affects the pathophysiology of allergic rhinitis. The objective of this study is to investigate whether TGF- $\beta$  signaling is activated in allergic rhinitis and plays a role in the pathophysiology of allergic rhinitis.

**Methods:** An ovalbumin (OVA)-sensitized and -nasally challenged mouse model of allergic rhinitis was established and phosphorylation of Smad2 in the nasal mucosa was examined by immunohistochemistry. In addition, the effects of the pharmacological inhibition of endogenous TGF- $\beta$  signaling on the allergic rhinitis model were histologically examined. Furthermore, phosphorylation of Smad2 in the nasal mucosa samples obtained from patients with allergic rhinitis was also evaluated.

**Results:** In the mouse model of allergic rhinitis, OVA challenge induced phosphorylation of Smad2 predominantly in epithelial cells in the nasal mucosa. In addition, the administration of an inhibitor of TGF- $\beta$  type I receptor kinase activity during OVA challenge suppressed goblet cell hyperplasia in the nasal mucosa. Furthermore, phosphorylated Smad2 expression increased in nasal epithelial cells in patients with allergic rhinitis.

**Conclusions:** These results suggest that TGF- $\beta$  signaling is activated in epithelial cells in the nasal mucosa in allergic rhinitis and may contribute to the development of goblet cell hyperplasia.

## KEY WORDS

allergic rhinitis, epithelial cells, Smad, TGF- $\beta$

## ABBREVIATIONS

OVA, ovalbumin.

## INTRODUCTION

Allergic rhinitis (OMIM #607154) is a common chronic disease of the nasal mucosa. Over 10% of the population in developed countries suffers from allergic rhinitis, which creates societal burdens due to such factors as increased medical expenses and a loss of productivity.<sup>1,2</sup> Allergic rhinitis is pathologi-

cally characterized by Th2-type allergic inflammation, including eosinophil infiltration, goblet cell hyperplasia, and mast cell accumulation in the nasal mucosa.<sup>3</sup>

TGF- $\beta$  is a multifunctional cytokine that regulates cell growth, differentiation, and survival, belonging to a large family of structurally related proteins, known as the TGF- $\beta$  family, to which also activins and bone morphogenetic proteins (BMPs) belong.<sup>4</sup> TGF- $\beta$  fam-

<sup>1</sup>Department of Immunology, <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, <sup>3</sup>Department of Human Pathology, University of Yamanashi Faculty of Medicine, Yamanashi and <sup>4</sup>Atopy Research Center, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan.

Correspondence: Atsuhito Nakao, Department of Immunology,

Faculty of Medicine, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan.

Email: anakao@yamanashi.ac.jp

Received 5 January 2010. Accepted for publication 5 February 2010.

©2010 Japanese Society of Allergology

ily ligands bind to two different types of serine/threonine kinase receptors, termed type I and type II. Type I receptor is activated by type II receptor upon ligand binding and transduces signals principally through the Smad family of proteins.<sup>5</sup> Smad2 and Smad3 are phosphorylated by activated TGF- $\beta$  and Smad1, Smad5, and Smad8 are phosphorylated by activated BMP type I receptors.<sup>5,6</sup> Several small molecule inhibitors of TGF- $\beta$  type I receptor kinase activity have been recently developed and are considered to be a promising reagent for the treatment of cancer and fibrotic diseases.<sup>7</sup>

In patients with allergic rhinitis, TGF- $\beta$  protein expression is significantly increased in the epithelial cells in the nasal mucosa.<sup>8</sup> However, because TGF- $\beta$  is secreted extracellularly as latent complexes and thus requires activation to mediate its effects,<sup>9</sup> the actual activity of TGF- $\beta$  in the nasal mucosa of allergic rhinitis and its roles in the pathophysiology of allergic rhinitis remain uncertain.

In this study, we assessed the activation of TGF- $\beta$  signaling and its roles in allergic rhinitis using a mouse model of allergic rhinitis and the nasal mucosa specimens derived from patients with allergic rhinitis by the detection of phosphorylation of Smad2 and by the pharmacological inhibition of endogenous TGF- $\beta$  signaling.

## METHODS

### MICE

Female 4-6 wks BALB/c mice were purchased from Japan SLC (Tokyo, Japan) and were bred under specific pathogen-free conditions.

### ALLERGIC RHINITIS MODEL

An allergic rhinitis model was established as previously described with some modifications.<sup>10</sup> Briefly, the mice were actively immunized i.p. with 10  $\mu$ g of ovalbumin (OVA, Sigma Aldrich, St. Louis, MS, USA) in 4 mg of aluminum hydroxide on Day 0 and Day 7. Starting on Day 14, they were challenged intranasally with 100  $\mu$ g OVA in 10  $\mu$ l PBS twice per day for 1 week (total 14 times/week). The mice were challenged intranasally with PBS in a similar manner for the negative control. For some experiments, HTS 466284 (10 mg/kg) (Calbiochem, San Diego, CA, USA)<sup>11</sup> or a control vehicle (DMSO) was intraperitoneally administered every other day, starting on Day 14 until sacrifice. The dosage of HTS466284 (10 mg/kg) was based on previous experiments.<sup>12</sup> The animal experiments were approved by the Institutional Review Board of the University of Yamanashi.

### HISTOLOGY

Twelve hours after the final nasal challenge, mice were killed with carbon dioxide. The heads were removed, fixed, and decalcified. Coronal nasal sections

were visualized by staining with hematoxylin and eosin (HE) or Hansel staining (to demonstrate eosinophils), or periodic acid-Schiff (PAS)/hematoxylin (to demonstrate goblet cells).

### IMMUNOHISTOCHEMISTRY

To detect phosphorylated Smad1 and Smad2, the coronal nasal sections were deparaffinized and stained with anti-phosphorylated Smad2 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) or anti-phosphorylated Smad1 antibody<sup>13</sup> through the use of peroxidase-based VECTASTAIN ABC kits with DAB substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Nuclei were counter-stained with hematoxylin. The sections were photographed by digital color-CCD camera (BX50, Olympus, Tokyo, Japan).

### QUANTIFICATION OF HISTOLOGICAL EXAMINATION

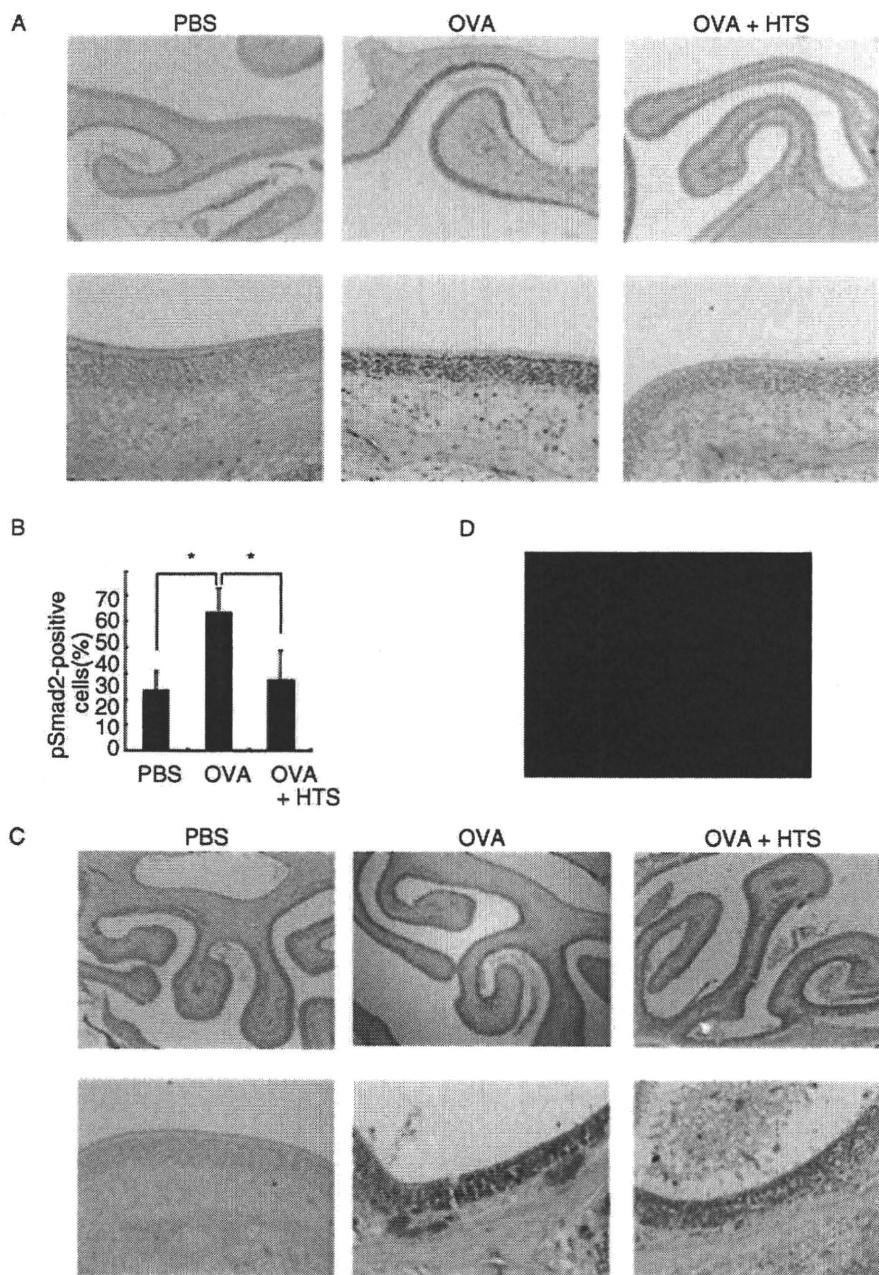
The number of phosphorylation of Smad2-positive cells in the nasal sections was counted as previously described.<sup>14</sup> Briefly, a minimum of 500 cells in the nasal epithelium was counted in at least 6 high power fields ( $\times 400$ ) in each sample. The percentage of phosphorylated Smad2-positive cells in the total nasal epithelial cells was expressed (%) and the mean percentage was calculated in 6 animals or 4 human samples. The number of infiltrating eosinophils in the nasal mucosa and PAS-positive goblet cells in the nasal mucosa in the posterior portion of nasal septum was determined microscopically in a blinded manner and expressed as the number per high-power field ( $400\times$ ). Two or four specimens of the Hansel- or PAS-stained coronal sections from one mouse were selected. The mean score was counted, and then the mean scores were calculated in 6 animals.

### IMMUNOFLUORESCENCE

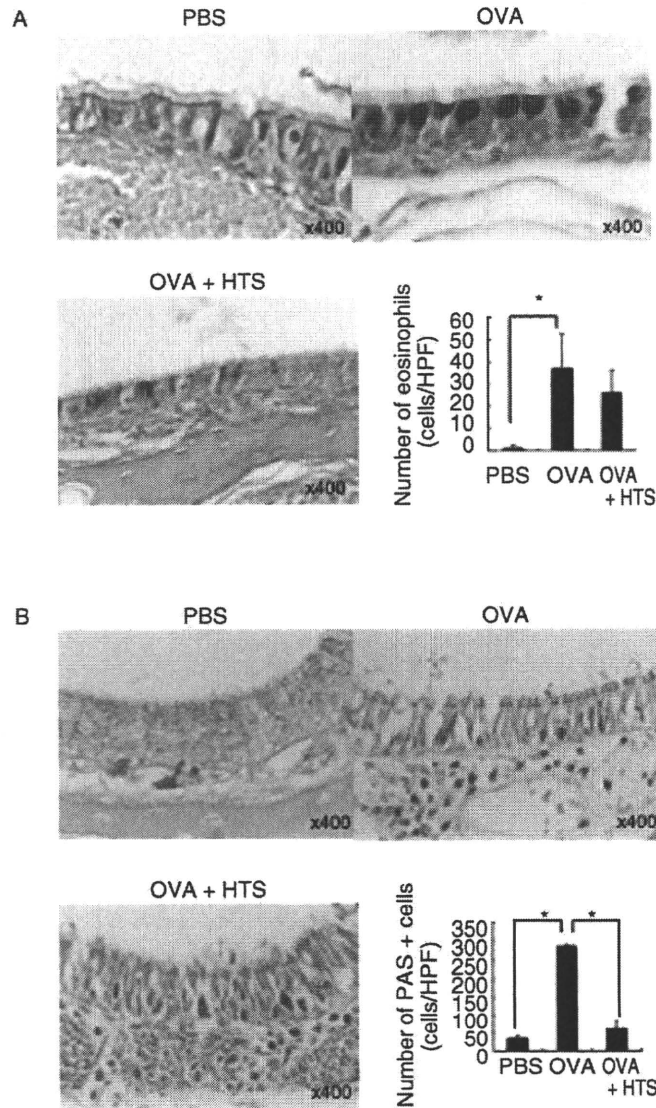
For phosphorylated Smad2 (pSmad2) labeling, the coronal nasal sections were blocked for 10 minutes in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incubated with rabbit anti-pSmad2 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., 1 : 200 in 1% BSA, 2 hours at room temperature) and then incubated with swine anti-rabbit antibody conjugated to RITC (red) (1 : 20 in PBS, 40min) (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark). The pictures were taken on an Olympus fluorescent microscope (DP30BW, Olympus, Tokyo, Japan).

### BIOPSY SAMPLES

Inferior turbinate thin biopsies of 4 seasonal allergic rhinitis patients were obtained using a cup forceps device under local anesthesia. Control biopsy samples were obtained from 4 patients with idiopathic maxillary cyst during the surgical operations. The control patients had no history of allergic diseases at the operations. Informed consent for the described



**Fig. 1** Phosphorylation of Smad2 was detected predominantly in epithelial cells in the nasal mucosa in a mouse model of allergic rhinitis. The OVA-sensitized mice were intranasally challenged with OVA or PBS. During the OVA challenge, HTS466284 (OVA + HTS) or the control vehicle DMSO (OVA) was administered intraperitoneally every other day. PBS: OVA-sensitized and PBS-challenged control mice. **A-C**. Representative pictures (upper panels:  $\times 40$ , lower panels:  $\times 400$ ) of immunohistochemical staining with anti-phosphorylated Smad2 antibody (**A**) or anti-phosphorylated Smad1 antibody (**C**) and a quantitative analysis of the epithelial phosphorylated Smad2 expression in the model of allergic rhinitis (**B**). Positive staining indicates as brown. **D**. Immunofluorescent analysis with anti-phosphorylated Smad2 antibody (red). Representative pictures of the nasal mucosa obtained from the OVA-sensitized and -challenged mice treated with control vehicle (DMSO) are shown. Positive staining indicates as red. Values represent the mean  $\pm$  SD of 6 mice in each group. \* $p < 0.05$ .



**Fig. 2** TGF- $\beta$  signaling may contribute to the development of goblet cell hyperplasia in the nasal mucosa in a mouse model of allergic rhinitis. The allergic rhinitis model was established as described in Figure 1 legend. **A-B.** Representative picture of Hansel (**A**) and PAS (**B**) staining of the nasal mucosa obtained from the mice treated with HTS466284 (OVA + HTS) or control vehicle DMSO (OVA) or OVA-sensitized and PBS-challenged control mice (PBS). Bar graphs show quantitative analysis of the number of eosinophils in the nasal mucosa and PAS-positive goblet cells in the nasal epithelium. Values represent the mean  $\pm$  SD of 6 mice in each group. \* $p < 0.05$ .

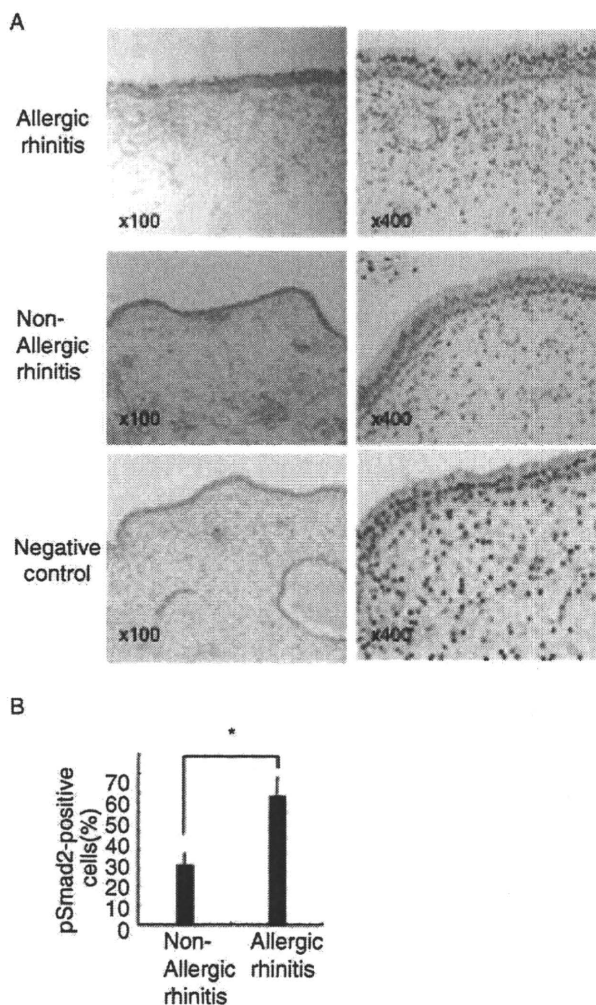
procedure was obtained from all patients. Approval for the study was given by the ethics committee of the University of Yamanashi. The specimens were fixed in 4% paraformaldehyde for 3 hours and then embedded in paraffin. The number of phosphorylated Smad2-positive cells in the nasal sections was

counted as described above.

**STATISTICAL ANALYSIS**

The data are summarized as the mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney *U* test to compare data in different two





**Fig. 3** Phosphorylation of Smad2 was detected predominantly in epithelial cells in the nasal mucosa in patients with allergic rhinitis. **A.** Four allergic rhinitis or 4 non-allergic rhinitis tissue specimens were immunohistochemically stained with anti-phosphorylated Smad2 antibody. Representative pictures are shown. Negative control: allergic rhinitis tissue specimens stained with control rabbit IgG antibody. **B.** A quantitative analysis of the epithelial phosphorylated Smad2 expression in allergic rhinitis and non-allergic rhinitis specimens ( $n = 4$  in each group). \* $p < 0.05$ .

groups. A value of  $P < 0.05$  was considered to be significant.

## RESULTS

### PHOSPHORYLATION OF SMAD2 WAS DETECTED PREDOMINANTLY IN EPITHELIAL CELLS IN THE NASAL MUCOSA IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC RHINITIS

To determine whether TGF- $\beta$  signaling is active in allergic rhinitis, we examined the phosphorylation of Smad2 in the nasal mucosa in a mouse model of allergic rhinitis because phosphorylation of Smad2 is a

key event for initial TGF- $\beta$  signal transduction.<sup>5</sup>

Immunohistochemical staining for phosphorylated Smad2 revealed the immunoreactivity to be increased predominantly in the nasal epithelium and in some submucosal cells after the induction of allergic rhinitis (Fig. 1A, B). Interestingly, we also found that immunoreactivity for phosphorylated Smad1, a key indicator for initial BMP signaling, also increased predominantly in the nasal epithelium (Fig. 1C).

Consistent with the immunohistochemical findings, an immunofluorescence staining also confirmed the phosphorylated Smad2-positive cells to be present predominantly in the nasal epithelium (Fig. 1D). These results suggested that epithelial cells predominantly received endogenous TGF- $\beta$  activity in the nasal mucosa in a mouse model of allergic rhinitis.

### ACTIVATION OF TGF- $\beta$ SIGNALING MAY CONTRIBUTE TO THE DEVELOPMENT OF GOBLET CELL HYPERPLASIA IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC RHINITIS

Because active TGF- $\beta$  signaling was present in the nasal mucosa in a mouse model of allergic rhinitis (Fig. 1), we determined whether activation of TGF- $\beta$  signaling plays some roles for the development of the allergic rhinitis model. For this purpose, the effects of TGF- $\beta$  type I receptor kinase inhibitor<sup>11</sup> HTS466284 on the development of allergic rhinitis were pathologically evaluated. The administration of HTS 466284 during OVA challenge significantly inhibited phosphorylation of Smad2, but not Smad1, in the nasal epithelium (Fig. 1A, C), suggesting that the inhibitor was indeed specific to TGF- $\beta$  signaling.

OVA-sensitized BALB/c mice treated with control vehicle (DMSO) during OVA challenge showed massive infiltration of eosinophils into the nasal mucosa and increased number of PAS-positive goblet cells in the nasal mucosa (Fig. 2A, B). OVA-sensitized mice treated with HTS466284 during OVA challenge showed marginal reduction of the infiltration of eosinophils into the nasal mucosa (Fig. 2A). Importantly, the number of PAS-positive goblet cells in the nasal mucosa decreased to the basal levels in HTS 466284-treated mice (Fig. 2B). These results suggested that the pharmacological blockade of endogenous TGF- $\beta$  signaling inhibited the development of goblet cell hyperplasia in the nasal mucosa in a mouse model of allergic rhinitis without affecting eosinophil infiltration into the nasal mucosa.

### PHOSPHORYLATION OF SMAD2 WAS DETECTED PREDOMINANTLY IN EPITHELIAL CELLS IN THE NASAL MUCOSA IN PATIENTS WITH ALLERGIC RHINITIS

Finally, the relevance of the findings in mice to humans was investigated. The nasal mucosa specimens derived from 4 patients with allergic rhinitis showed an increase in the number of phosphorylated Smad2-

positive cells in nasal epithelium when compared with that in non-allergic rhinitis subjects (Fig. 3A, B). These results suggested that epithelial cells predominantly received endogenous TGF- $\beta$  activity in the nasal mucosa in patients with allergic rhinitis.

## DISCUSSION

A previous study using immunohistochemistry showed significantly increased immunoreactivity for TGF- $\beta$  in the epithelial layer, with predominant localization to the superficial columnar epithelial cells, of the nasal mucosa obtained from patients with allergic rhinitis.<sup>8</sup> However, because TGF- $\beta$  is secreted extracellularly as latent complexes, it remains unclear whether the local TGF- $\beta$  expression actually drives active signaling and, if any, what roles the active TGF- $\beta$  signaling play in allergic rhinitis. In this study, we suggest that active TGF- $\beta$  signaling is present in the nasal mucosa of allergic rhinitis and it may play a role in the development of goblet cell hyperplasia in allergic rhinitis.

Phosphorylation of Smad1 as well as that of Smad2 was detected in the nasal epithelium in the allergic rhinitis model (Fig. 1C). Because Smad1 principally mediates BMP signals,<sup>5,6</sup> these results suggest that endogenous BMP signaling may be also involved in the pathophysiology of allergic rhinitis. In a mouse model of asthma and in human asthmatics, BMP signaling was reported to be activated upon allergen provocation in the airway epithelium,<sup>3,15</sup> suggesting that BMP signaling may be involved in the tissue repair and control of inflammation. Thus, active BMP signaling in allergic rhinitis may also play a role in these processes. The precise roles of BMP signaling in allergic rhinitis as well as in asthma remain to be determined.

TGF- $\beta$  has been implicated in the regulation of airway mucin production.<sup>16</sup> For instance, TGF- $\beta$  increased mucin MUC5AC protein expression in cultured human bronchial epithelial cells<sup>17</sup> and neutralization of TGF- $\beta$  activity using anti-TGF- $\beta$  antibody or a TGF- $\beta$  type I receptor kinase inhibitor suppressed antigen-induced increase in PAS-positive cells in mouse models of asthma.<sup>18,19</sup> In addition, Smad3-deficient mice developed a significantly reduced percentage of airway epithelium that stained positive with PAS in a model of asthma when compared with wild type mice.<sup>20</sup> Taken together with our current *in vivo* findings, it is very likely that TGF- $\beta$  signaling in allergic rhinitis contributes to the development of goblet cell hyperplasia in the nasal mucosa. Because it remains unclear whether TGF- $\beta$  signaling exerts its effects either directly or indirectly on nasal epithelial cells, in particular, *in vivo* situations, future studies should focus on the effects of TGF- $\beta$  signaling on the regulation of goblet cell differentiation, proliferation, and mucin production.

The pharmacological blockade of endogenous

TGF- $\beta$  signaling did not affect the number of eosinophils infiltrated into the nasal mucosa in the allergic rhinitis model (Fig. 2). These results are consistent with the previous findings obtained from mouse models of asthma, showing that the blockade of endogenous TGF- $\beta$  signaling did not affect airway inflammation.<sup>18,20,21</sup> However, it should be noted that the roles of TGF- $\beta$  in airway inflammation are still controversial, depending on the models and protocols<sup>22</sup> and thus requires further investigations.

In summary, this study suggests that TGF- $\beta$  signaling is activated in the nasal mucosa in allergic rhinitis and may contribute to the development of goblet cell hyperplasia in the nasal mucosa in allergic rhinitis. To our knowledge, this is the first report showing that active TGF- $\beta$  signaling is present in allergic rhinitis and addressing possible roles of TGF- $\beta$  signaling in the pathophysiology of the disease. Based on the current results, TGF- $\beta$  signaling in nasal mucosa might become a potential target for the prevention of a selective pathological feature of allergic rhinitis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Carl-Henrik Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) for providing us with anti-phosphorylated Smad1 antibody, and Mutsuko Hara for general assistance. This work was supported in part by the grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

## REFERENCES

1. International Rhinitis Management Working Group. International consensus report on the diagnosis and management of allergic rhinitis. *Allergy* 1994;49:5-34.
2. Malone DC, Lawson KA, Smith DH, Arrighi HM, Battista CA. A cost of illness study of allergic rhinitis in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:22-7.
3. Baraniuk JN. Mechanisms of allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:207-17.
4. Massague J. The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
5. Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-71.
6. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF- $\beta$  superfamily. *Science* 2002;296:1646-7.
7. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF- $\beta$  signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:1011-22.
8. Salib RJ, Kumar S, Wilson SJ, Howarth PH. Nasal mucosal immunoexpression of the mast cell chemoattractants TGF- $\beta$ , eotaxin, and stem cell factor and their receptors in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:799-806.
9. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF- $\beta$  activation. *J Cell Sci* 2003;116:217-24.
10. Ogasawara H, Asakura K, Saito H, Kataura A. Role of CD4-positive T cells in the pathogenesis of nasal allergy in the murine model. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:37-43.

11. Singh J, Chuaqui CE, Boriack-Sjodin PA *et al.* Successful shape-based virtual screening: the discovery of a potent inhibitor of the type I TGF- $\beta$  receptor kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:4355-9.
12. Sakuma M, Hatsushika K, Koyama K *et al.* TGF- $\beta$  type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody. *Int Immunol* 2007;19:117-26.
13. Rosendahl A, Pardali E, Speletas M, Ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P. Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:160-9.
14. Sagara H, Okada T, Okumura K *et al.* Activation of TGF- $\beta$ /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:249-54.
15. Kariyawasam HH, Xanthou G, Barkans J, Aizen M, Kay AB, Robinson DS. Basal expression of bone morphogenetic protein receptor is reduced in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1074-81.
16. Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R. Regulation of airway mucin gene expression. *Annu Rev Physiol* 2008;70:405-29.
17. Chu HW, Balzar S, Seedorf GJ *et al.* Transforming growth factor- $\beta$ 2 induces bronchial epithelial mucin expression in asthma. *Am J Pathol* 2004;165:1097-106.
18. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF- $\beta$  antibody: effect on the Smad signaling pathway. *J Immunol* 2005;174:5774-80.
19. Leung SY, Niimi A, Noble A *et al.* Effect of transforming growth factor- $\beta$  receptor I kinase inhibitor 2,4-disubstituted pteridine (SD-208) in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:586-94.
20. Le AV, Cho JY, Miller M, McElwain S, Golgotiu K, Broide DH. Inhibition of allergen-induced airway remodeling in Smad3-deficient mice. *J Immunol* 2007;178:7310-6.
21. Alcorn JF, Rinaldi LM, Jaffe EF *et al.* Transforming growth factor- $\beta$ 1 suppresses airway hyperresponsiveness in allergic airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:974-82.
22. Salib RJ, Howarth PH. Transforming growth factor- $\beta$  in allergic inflammatory disease of the upper airways: friend or foe? *Clin Exp Allergy* 2009;39:1128-35.

### 3. 内科医が留意すべき耳鼻科疾患の診断と治療, 予防 —患者の症状から見逃さないためのコツとポイント—

## 7) 鼻漏・くしゃみ

Masuyama Keisuke  
増山 敬祐<sup>1)</sup>  
Matsuzaki Zensei  
松崎 全成<sup>2)</sup>

Endo Shuichiro  
遠藤周一郎<sup>1)</sup>

Matsuoka Tomokazu  
松岡 伴和<sup>1)</sup>

Kamijo Atsushi  
上條 篤<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科・頭頸部外科  
<sup>2)</sup>まつざきクリニック耳鼻咽喉科・アレルギー科

表1 鼻炎の分類

- |            |                                   |  |
|------------|-----------------------------------|--|
| 1. 感染性     | a. 急性鼻炎                           | b. 慢性鼻炎  |
| 2. 過敏性非感染性 | a. 複合型(鼻過敏症)                      | i) アレルギー性: 通年性鼻炎, 季節性鼻炎<br>ii) 非アレルギー性: 血管運動性(本態性)鼻炎, 好酸球増多性鼻炎 |
|            | b. 鼻漏型: 味覚性鼻炎, 冷気吸入性鼻炎, 老人性鼻炎     |  |
|            | c. うっ血型: 薬物性, 心因性, 妊娠性, 内分泌性, 寒冷性 |  |
|            | d. 乾燥型: 乾燥性鼻炎                     |  |
| 3. 刺激性     | a. 物理性鼻炎                          | b. 化学性鼻炎   |
|            |                                   | c. 放射線性鼻炎  |
| 4. その他     | a. 萎縮性鼻炎                          | b. 特異性肉芽腫性鼻炎   |

(文献1より引用改変)

### はじめに

鼻漏・くしゃみを呈する疾患は、その多くはいわゆる鼻炎と呼称できるものである。大きく分けて、感染性鼻炎と過敏性鼻炎があり、これらが日常臨床の大半を占める。表1に鼻アレルギー診療ガイドライン(改訂第6版)<sup>1)</sup>に掲載されている鼻炎の分類を示す。この中で、急性鼻炎(いわゆる鼻かぜ)とアレルギー性鼻炎(花粉症を含む過敏性鼻炎)が代表的鼻炎である。したがって、アレルギー性鼻炎の診断のポイントをまずおさえておきたい。

### 鼻炎の診断

アレルギー性鼻炎は、くしゃみ、水様性鼻漏、鼻閉を3主徴とする鼻過敏症である。鼻汁は水様性、あるいは粘性であることが多く、典型例は発作性のくしゃみ(くしゃみを連発)が出現する。このような症例では、鼻汁好酸球検査を行いたい。鼻汁中に好酸球が認められれば、アレルギー性鼻炎の疑いが強くなる(図1)<sup>2)</sup>。次に、アレルギー性鼻炎を診断するためには抗原診断が必須である。典型的症状がいつ出現するのか確認する。1年中であれば通年性抗原(ハウスダスト・ダニ)、季節性があれば花粉症を疑う。地域により多少異なるが、2~5月の連休まで症状がみられればスギ・ヒノキ花粉症、5~7月に症状があればカモガヤ花粉症、9~10月に症状があればブタクサ花粉症が疑われる。もちろん、これらすべての花粉に感作され発症すれば、1年中症状出現ということになる。また、ハウスダス

ト・ダニでは季節の変わり目だけに症状が強く出現することもある。したがって、症状の発現時期の確認は重要であるが、原因抗原の確定は、皮膚テストや血清特異的IgE抗体検査を施行し、症状との一致が認められた場合である。

表2に、くしゃみ、鼻漏、鼻閉を訴える、いわゆる鼻過敏症症例に対して行ったアレルギー検査の結果とその診断を示す<sup>3)</sup>。アレルギー性鼻炎の診断では鼻誘発テストが行われることもあるが、一般内科医での施行は難しいし、誘発に用いる市販のディスクも限られている。表2からいえることは、皮膚テストあるいは血清特異的IgE抗体検査が陽性であれば、鼻過敏症を

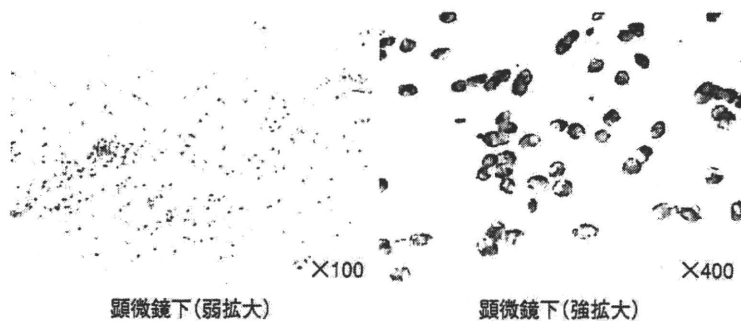


図1 鼻汁好酸球検査  
赤い顆粒をもつ好酸球が群在している(3+)。(文献2より引用)

表2 くしゃみ・鼻漏・鼻閉を訴える鼻過敏症症例の内訳(361例)

・皮膚テストあるいは血清特異的IgE抗体, 誘発テスト, 鼻汁好酸球すべて陽性	210例(58.2%)
・皮膚テストあるいは血清特異的IgE抗体が陽性で, 誘発テストまたは鼻汁好酸球いずれかが陽性	69例(19.1%)
・誘発テストと鼻汁好酸球のみ陽性	17例(4.7%)
～ここまでがアレルギー性鼻炎と診断可～	
・鼻汁好酸球のみ陽性	22例(6.1%)
・すべて陰性	27例(7.5%)
・不明	16例(4.4%)

訴える患者の約8割はアレルギー性鼻炎の診断が可能であろうということである。6～7%で、鼻汁好酸球のみ陽性の症例、あるいはすべて陰性の症例が存在する。これらは、表1の分類2-a-iiに相当する。過敏性非感染性鼻過敏症で非アレルギー性鼻炎である。それぞれ、好酸球増多性鼻炎、本態性鼻炎(血管運動性鼻炎)と呼ばれるものである。アレルギー性鼻炎と同様に治療可能であるが、アレルギーの診断がつかなければ耳鼻咽喉科医にコンサルトした方がよい。

以上をまとめると、アレルギー性鼻炎の診断のポイントは、①鼻過敏症症状を呈すること、②鼻汁好酸球が陽性であること、③皮膚テストあるいは血清特異的IgE抗体検査が陽性であること、④症状の発現時期と原因抗原が一致すること、である。

### ●●●●急性鼻炎と花粉症の鑑別

次に、急性鼻炎(鼻かぜ)と花粉症の鑑別は、眼の症状の有無が1つのポイントである。眼症状(眼のかゆみや充血)があれば花粉症が疑わしい。かぜでは、咽頭

痛や発熱、頭痛を伴う場合もある。ウイルス性の急性鼻炎(副鼻腔炎を含む)であれば、1週間程度で軽快することが多い。長引く場合には細菌性の急性鼻(副鼻腔)炎を考える必要がある。この場合には粘膿性の鼻漏である。

### ●●●●小児の特徴

花粉症は成人に多い疾患(30～50歳代の有病率が通年性の有病率より高い)であるが、ハウスダスト・ダニによる通年性アレルギー性鼻炎は小児に多い疾患(10歳未満、10～20歳代での有病率が花粉症のそれより高い)である(図2)。

通年性アレルギー性鼻炎症例の副鼻腔陰影について検討したところ、10歳未満の症例では、それ以上の年齢に比較して、有意に上顎洞に陰影が認めるケースが多かった<sup>4)</sup>。さらに、陰影の有無は鼻汁好酸球とは関連がなく、むしろ鼻汁好中球と関連しており、好中球陽性の症例は副鼻腔陰影も出現し、副鼻腔陰影を合併している可能性が示唆された。

ここで、小児鼻副鼻腔の特徴をまとめて述べる。解剖学的には鼻腔は狭い。少量の鼻汁の貯留で鼻がつまってしまう。副鼻腔は発達途上であるが、1歳を過ぎると上顎洞は小さいながらも形成されてくる。生理学的には分泌細胞の割合が高く、鼻汁は粘り気強い。10歳未満、特に乳幼児期には感染を受けやすく、感染性鼻副鼻腔炎を来しやすい、あるいはアレルギー性鼻炎に合併する。さらに、自覚症状に乏しい上、鼻もよくかめず鼻汁が長く貯留して細菌の温床となり、中耳炎や副鼻腔炎の引き金を引く。鼻がかめず鼻をすすり耳が悪くなる。後鼻漏は咳や痰として症状を表すため、鼻副鼻腔炎が見逃される可能性がある。また、幼児期や学童期では、長期の鼻閉があっても口を開けるため、

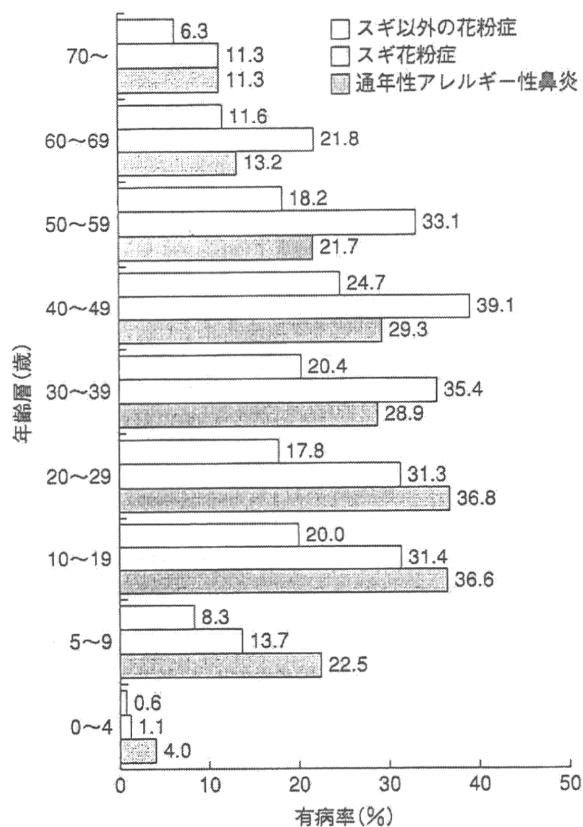


図2 年齢層別有病率

鼻症状に慣れてくるため鼻症状が見逃されることもある。したがって、症状を訴えることの少ない小児では、鼻すすり、咳・痰、口呼吸なども重要なサインである。また、副鼻腔炎の合併も多いので、鼻汁好中球の検査、副鼻腔レントゲンなども参考にするとよい。

### ●●●●● 成人の慢性副鼻腔炎

気管支喘息を合併している患者で鼻漏やくしゃみがあれば、アレルギー性鼻炎の合併は考えやすい。いわゆるOne airway, One diseaseの概念である。IgE型の喘息であれば、そのように考えても差し支えないであろう。しかしながら、非IgE型の喘息の場合には、鼻漏に加え嗅覚障害があれば慢性副鼻腔炎・鼻茸の合併を考える。アスピリン喘息に合併する鼻茸・慢性副鼻腔炎が典型的の疾患である。近年では、いわゆる鼻茸中に好酸球が多数存在する、好酸球性鼻副鼻腔炎が増えてきている。好酸球性中耳炎を合併することもある。喘息患者で嗅覚障害があり、耳閉感を訴える場合には耳鼻咽喉科専門医へコンサルトしていただきたい。

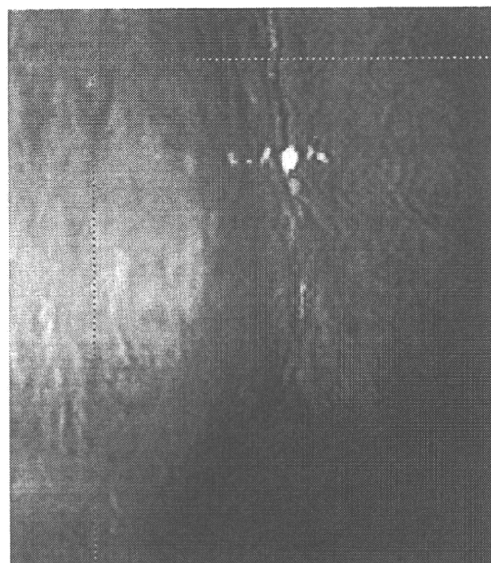


図3 点鼻薬性鼻炎の鼻粘膜所見  
鼻粘膜血管の充血が著明で腫れ上がっている。

### ●●●●● 非典型症例について

#### 1. 点鼻薬性鼻炎

鼻炎で医療施設を受診する人はむしろ少ない。大抵は市販の内服薬、あるいは点鼻薬で済ませる方が多いのではないと思われる。しかしながら、鼻炎用の市販の内服薬は、眠気が強く作用時間が短い第1世代抗ヒスタミン薬がほとんどであり、第2世代でもかなり古いもので、眠気の強さは第1世代と変わらない。したがって、花粉症のように数カ月にわたって症状が継続する持続性鼻炎では、もし長期間使用すれば服用による副作用が確実に出現し、QOLが高度に障害される。

また、市販の点鼻薬も血管収縮薬が主体であり、これに第1世代の抗ヒスタミン薬などが含まれている。鼻粘膜には、その機能上血管が豊富にあるから、一般の方は市販の点鼻薬使用により鼻粘膜血管が収縮し、鼻の通りが良くなってすごく効いたように錯覚する。ただし、効果は一時的であり、鼻がつまるとまた使用するという悪循環を繰り返す。鼻づまりは花粉症の症状だと思っているが、実は点鼻薬のせいということも往々にしてある。これがいわゆる点鼻薬性鼻炎である。鼻粘膜は充血して腫れ上がり、耳鼻咽喉科専門医なら診断は容易である(図3)。診断のポイントは、市販の点鼻薬を長期に、しかも頻回に使用していることを聞き出す。治療は、鼻噴霧用のステロイド薬に変更して、血管収縮薬は必要最低限の使用にとどめる。

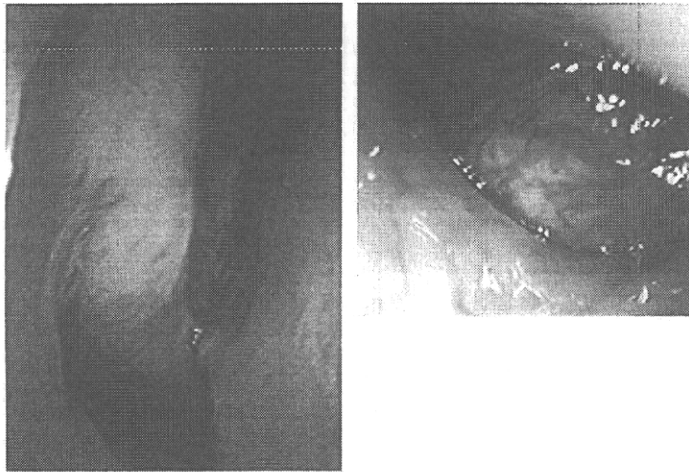


図4 若年性血管線維腫

左：鼻粘膜所見（一見蒼白でアレルギーと間違う）。  
右：鼻腔の奥に上咽頭腫瘍を認めた。

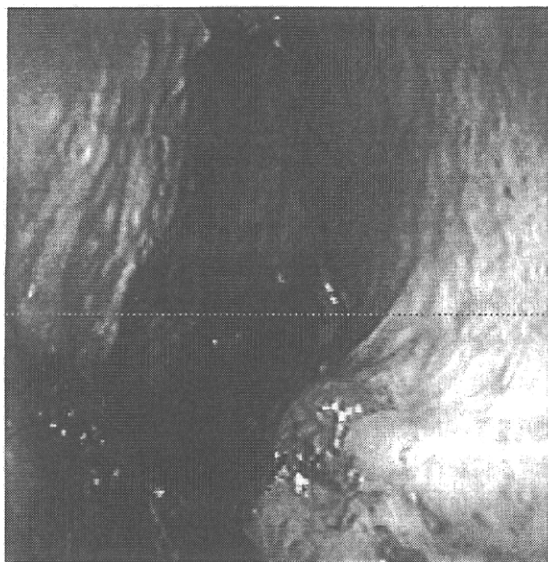


図5 NKTリンパ腫の鼻内所見  
萎縮性鼻炎の所見である。

## 2. 若年性血管線維腫

アレルギー性鼻炎は若年者に多いため、腫瘍性の鑑別疾患はまれである。しかしながら、若年性血管線維腫は、アレルギー性鼻炎世代の男児にみられる疾患で、特に男児の通年性アレルギー性鼻炎の鑑別には頭に入れておきたい。鑑別のポイントは、典型的な鼻炎症状ではないということである。鼻閉と鼻出血が主訴になることが多い。裏を返せば、典型的な鼻炎症状でない場合に、鼻炎の治療を行って症状の改善がみられなければ、耳鼻咽喉科専門医に診察を依頼する方がよい。鼻内所見は、一見すると鼻出血のため鼻粘膜が蒼白で、

専門医でもうっかりするとダニアレルギーと診断する可能性がある疾患である(図4)。鼻炎の非典型的な症状には注意が必要である。

## 3. 髄液鼻漏

水様性鼻漏はアレルギー性鼻炎の3主徴の1つであった。ただし、水様性鼻漏だけではアレルギー性鼻炎とはいえない。これも非典型的な症状の1つの例である。繰り返しになるが、アレルギー性鼻炎を診断する際には、その‘定義’に戻っていただきたい。そして、どのような鼻漏の出方であるのか(例えば、起き上がる時に片方の鼻からたらたらと水様性の鼻漏が流れるなど)を確認するだけで、髄液鼻漏の疑いをもつことは容易である。

## 4. NKTリンパ腫、ウェゲナー肉芽腫症

まれではあるが、両者は致死性の疾患であり、絶対に鑑別しなければならないものである(図5)。むしろ、急性の鼻副鼻腔疾患との鑑別が必要となる場合が多い。疾患の詳細は他書を参照されたい。

## 治療について

治療の項では、アレルギー性鼻炎、特に花粉症の治療について述べる。日本のガイドラインからみた花粉症(主にスギ・ヒノキ科花粉症)の治療である。

### 1. はじめに

鼻アレルギー診療ガイドライン<sup>1)</sup>では、花粉症の治療法の選択が提示されている(表3)。大きく分けると、本格飛散前治療(初期療法)と本格飛散後治療である。

表3 重症度に応じた花粉症に対する治療法の選択

重症度	初期療法	軽症	中等症		重症・最重症	
病型			くしゃみ・ 鼻閉型	鼻閉型または 鼻閉を主とする 完全型	くしゃみ・ 鼻漏型	鼻閉型または 鼻閉を主とする完全型
治療	①第2世代抗ヒスタミン薬 ②遊離抑制薬 ③Th2サイトカイン阻害薬 ④抗LTs薬 ⑤抗PGD <sub>2</sub> ・TXA <sub>2</sub> 薬  ①, ②, ③, ④, ⑤のいずれか一つ。	①第2世代抗ヒスタミン薬 ②鼻噴霧用ステロイド薬  ①と点眼薬で治療を開始し, 必要に応じて②を追加。	第2世代抗ヒスタミン薬 + 鼻噴霧用ステロイド薬	抗LTs薬 + 鼻噴霧用ステロイド薬 + 第2世代抗ヒスタミン薬	鼻噴霧用ステロイド薬 + 第2世代抗ヒスタミン薬	鼻噴霧用ステロイド薬 + 抗LTs薬 + 第2世代抗ヒスタミン薬  必要に応じて点鼻用血管収縮薬を治療開始時の7~10日間に限って用いる。鼻閉が特に強い症例では経口ステロイド薬4~7日間処方でも治療開始することもある。
		点眼用抗ヒスタミン薬または遊離抑制薬			点眼用抗ヒスタミン薬, 遊離抑制薬またはステロイド薬	
					鼻閉型で鼻腔形態異常を伴う症例では手術	
					特異的免疫療法	
					抗原除去・回避	

遊離抑制薬：ケミカルメディエーター遊離抑制薬、抗LTs薬：抗ロイコトリエン薬、抗PGD<sub>2</sub>・TXA<sub>2</sub>薬＝抗プロスタグランジンD<sub>2</sub>・トロンボキサンA<sub>2</sub>薬。

(文献1より引用)

初期療法は、花粉症に対する早期介入療法である。例年強い花粉症症状を示す症例では、初期療法を勧める。花粉飛散初期、あるいは症状発現初期から治療を開始し、飛散ピーク時の症状の緩和を図るものである。私見であるが、治療開始は、症状が少しでも出現した症例に対して行うのがベターと思う。また、飛散後治療とは重症度と病型に合わせた薬物療法で、飛散開始後に発症して来院した場合の導入療法である。

## 2. 花粉症治療の薬物の選択

### 1) 初期療法

初期療法では、選択される薬剤として、第2世代抗ヒスタミン薬、ケミカルメディエーター遊離抑制薬、Th2サイトカイン阻害薬、抗ロイコトリエン薬、抗プロスタグランジンD<sub>2</sub>・トロンボキサンA<sub>2</sub>薬の5つが挙げられている。この中で、プラセボ対照としたスタディでエビデンスが示されているのは、第2世代抗ヒスタミン薬、ケミカルメディエーター遊離抑制薬、抗ロイコトリエン薬である。ガイドラインでは、第2世

代抗ヒスタミン薬は花粉飛散予測日、あるいは症状が少しでも表れた時点で投与を開始するとしている。最近の第2世代抗ヒスタミン薬は即効性が期待できるからである。

前述したように、初期療法の目的は飛散ピーク時の症状をいかに軽減するかである。ところで、鼻粘膜のアレルギー性炎症は、前年の秋に少量飛散があればその年の飛散開始前に既に起こっているであろうし、またその年の初観測日以降では、*minimal persistent inflammation* (最小持続炎症)が鼻粘膜に起こっていると考えられる<sup>5)</sup>。初観測日から飛散開始日までに花粉症患者の約30%で発症が認められ、これらを高感受性群という<sup>6)</sup>。よって、飛散ピーク時の症状を抑えるには、その時期までの鼻粘膜のアレルギー性炎症の増悪をいかにコントロールするかにかかっている。

初期療法を行う上で大切なことは、飛散のピークに向かうにつれ、症状は多くの場合重症化するということである。これまで初期療法では第2世代抗ヒスタミ



ン薬が多用されていたが、第2世代抗ヒスタミン薬を用いた初期療法では飛散初期には有意な効果が認められるが、飛散ピークになるにつれ飛散後治療群と症状の抑制において有意差がみられなくなることが多い。したがって、症状の増悪がみられる場合には、鼻噴霧用ステロイド薬を中心とした飛散後治療に速やかに移行し、治療内容をステップアップする。

一方、ARIAガイドラインでは、スギ花粉症のようないわゆる持続性鼻炎では、鼻噴霧用ステロイド薬を最初に使用することが推奨されている<sup>5)</sup>。われわれは、第2世代抗ヒスタミン薬と鼻噴霧用ステロイド薬の初期療法に関するランダム化比較試験を行ったところ、鼻噴霧用ステロイド薬を先行させた治療群の方がシーズンを通しての症状コントロールは良好であった<sup>7)</sup>。さらなる検討が必要である。

## 2) 飛散後治療

### a) 軽症

第2世代抗ヒスタミン薬と点眼薬(抗ヒスタミン薬または遊離抑制薬)にて治療を開始し、必要に応じて鼻噴霧用ステロイド薬を追加する。症状が軽快しないか、または増悪がみられる場合には、速やかに鼻噴霧用ステロイド薬を追加すべきである。ただし前述したごとく、ARIAガイドライン<sup>5)</sup>に従えば、その逆も可であると思われる。

### b) 中等症(くしゃみ・鼻漏型, 鼻閉・充全型)

中等症では併用療法が主体となる。鼻噴霧用ステロイド薬を第一選択とし、くしゃみ・鼻漏型では第2世代抗ヒスタミン薬を併用し、鼻閉・充全型ではこれらに加え、抗ロイコトリエン薬を併用することを検討する。

ところで、海外の花粉症のデータではあるが、抗ロイコトリエン薬の鼻噴霧用ステロイド薬への併用add on効果は明らかではない<sup>8)</sup>。また、別の海外のデータでは、昼間あるいは夜間の鼻閉において、抗ロイコトリエン薬の単独効果が、鼻噴霧用ステロイド薬に比べて、必ずしも勝っているわけではないことが示されている<sup>9)</sup>。さらに、メタアナリシスの結果では、抗ロイコトリエン薬は、抗ヒスタミン薬とアレルギー性鼻炎に対する効果は同等であった<sup>10)</sup>。今後、スギ花粉症飛散後治療における抗ロイコトリエン薬の位置づけについて、さらに検討を重ねる必要がある。

### c) 重症・最重症(くしゃみ・鼻漏型, 鼻閉・充全型)

重症以上では、鼻噴霧用ステロイド薬と第2世代抗ヒスタミン薬を主体とし、症状が強い充全型では抗ロ

イコトリエン薬を併用し、さらに経口ステロイド薬を4~7日程度用いる。また、必要に応じて点鼻用血管収縮薬を7~10日間程度使用する。点眼薬は、抗ヒスタミン薬、ケミカルメディエーター遊離抑制薬またはステロイド薬を用いる。

以上、日本の鼻アレルギー診療ガイドラインで示された、花粉症の薬物療法の選択を基本とした治療法を紹介した。

## 専門医への紹介のタイミング

鼻噴霧用ステロイド薬にても症状のコントロールが不十分な患者、長期の薬物療法を好まない患者、薬物療法で好ましくない副作用が現れる患者などでは、皮下免疫療法の適応についてアレルギー専門医、あるいは耳鼻咽喉科専門医に紹介する。また、前述した非典型的な症状例で、鼻炎の薬剤にてコントロール不良の患者、薬剤抵抗性の下鼻甲肥厚や鼻中隔彎曲、慢性副鼻腔炎・鼻ポリープや腫瘍の疑いがある場合には、耳鼻咽喉科専門医に紹介する。

## 文 献

- 1) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会編: 鼻アレルギー診療ガイドライン—通年性鼻炎と花粉症—2009年版(改訂第6版), ライフサイエンス, 東京, 2008.
- 2) 松崎全成, 松岡伴和, 増山敬祐: 鼻アレルギー検査. MB ENT 2009; 107: 63-73.
- 3) 増山敬祐: 鼻過敏症のアトピーおよび非アトピー的側面. アレルギー科 1998; 6: 211-215.
- 4) 増山敬祐: 小児アレルギー性鼻副鼻腔炎の病態, 診断と治療. 日本耳鼻咽喉科学会専門医通信 2005; 82: 8-9.
- 5) ARIA2008日本語版編集委員作成, ARIA日本委員会監修: ARIA2008(日本語版), 協和企画, 東京, 2008.
- 6) 馬場廣太郎: 鼻粘膜の抗原に対する過敏性. 耳鼻臨床 1998; 91: 209-217.
- 7) 高橋吾郎, 松崎全成, 増山敬祐: スギ花粉症初期療法におけるプロピオン酸フルチカゾンと塩酸フェキソフェナジンに関するランダム化比較試験. アレルギー 2008; 57: 1442.
- 8) Di Lorenzo G, Pacor ML, Pellitteri ME, et al: Randomized placebo-controlled trial comparing fluticasone aqueous nasal spray in mono-therapy, fluticasone plus cetirizine, fluticasone plus montelukast and cetirizine plus montelukast for seasonal allergic rhinitis. Clin Exp Allergy 2004; 34: 259-267.
- 9) Pullertis T, Praks L, Ristioja V, et al: Comparison of a nasal glucocorticoid, antileukotriene, and a combina-

- tion of antileukotriene and antihistamines in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ; 109 : 949-955.
- 10) Wilson AM, O'Byrne PM, Parameswaran K : Leukotriene receptor antagonists for allergic rhinitis : a systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2004 ; 116 : 338-344.

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
分担研究報告書

スギ花粉症に関する SNP 解析と鼻粘膜の網羅的解析

研究分担者 (藤枝 重治) (福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授)  
研究協力者 (坂下 雅文) (福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員)  
(意元 義政) (福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 大学院)  
(玉利真由美) (理化学研究所遺伝子多型センター チームリーダー)  
(野口恵美子) (筑波大学人類遺伝学 講師)

研究要旨

スギ花粉症をはじめとするアレルギー性鼻炎の罹患率及び抗原感作率はかなり増加している。その原因はほとんどわかっていないが、原因追究のため候補遺伝子アプローチによる遺伝子多型 (SNP) 解析を行った。スギ花粉症患者と 7 項目の代表的抗原陰性であるコントロールの 2 群を対象とし、小児アトピー型気管支喘息において報告された ORMDL3 遺伝子を解析したところ、ORMDL3 における 13SNP 中 9 SNP において有意な相関を認めた。とりわけアトピー型喘息での責任 SNP (rs7216389) において、有意な高い相関を示した。その部位のリスクアレルは TT であり、EB ウイルスにより不活化した B 細胞株での検討で、リスクアレル型では ORMDL3 発現が有意に亢進していた。ORMDL3 発現は、鼻粘膜上皮、線維芽細胞で認め、それぞれ poly-IC 刺激で発現が亢進した。アレル別に末梢血から CD4 陽性細胞を分離し、poly-IC 刺激を行うとリスクアレル TT で IL-10, IL-17 の産生が有意に高かった。さらにスフィンゴシン 1 リン酸もリスクアレル TT で高値であった。

また病態の解明と新しい標的分子の探索を兼ね、花粉症患者及びスギ感作されているが発症していない人、及び感作も発症もしていない人での鼻粘膜細胞におけるマイクロアレーによる網羅的遺伝子発現解析では、スギ花粉症で Intelectin-1 とその他 17 の遺伝子が有意に異なることが判明した。Intelectin-1 は鼻粘膜上皮で産生されることが同定でき、スギ花粉発症者で高値を示すとともに、非発症者においても皮内反応陽性 RAST 陽性者でも陰性者に比べ有意発現しており、発症直前に関与する可能性が示唆された。Intelectin-1 は、鼻粘膜を培養すると発現が消失するが、IL-4、IL-13 刺激によって発現が亢進した。

A. 研究目的

2006 年～2008 年に当教室で行った 20 歳から 50 歳まで約 2000 名の疫学調査で、7 項目の吸入アレルゲン (ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、スギ、カモガヤ、ブタクサ、カンジダ、アスペルギルス) のうち 1 項目でも抗原特異的 IgE が陽性である人は、70%を占めることが判明し、この 10 年間でスギ花粉症の発症率も 10%以上増加したことも判明した。その原因のいくらかは、遺伝的要因も占めると思われる。そこで、候補遺伝子アプローチと鼻粘膜における網羅的遺伝子発現解析を行い、スギ花粉症患者の特徴を検討した。得られた遺伝子情報を元に、スギ花粉症治療に関する新規標的分子を開発する目的のためこの研究を行った。

B. 研究方法

候補遺伝子アプローチは、研究対象者として、スギ花粉症患者 734 名、吸入アレルゲン 7 項目がいずれも陰性であり、アレルギー疾患の既往ないもの (陰性コントロール) 370 名を用いた。候補遺

伝子として、小児気管支喘息の全ゲノム解析 (GWAS) にて報告された ORMDL3 遺伝子に関して 13SNP を解析し、最も有意な相関を認める部位のスギ花粉症のリスクアレルを同定した。さらに以下のことを調べた。①検索したアレル別 B 細胞での ORMDL3 の蛋白発現の程度、② ORMDL3 の発現細胞を同定、③いかなる刺激にて ORMDL3 の発現増強するか、④アレル別細胞での刺激によるサイトカイン産生の違い、⑤アレル別細胞でのスフィンゴシン 1 リン酸の産生である。EB ウイルスにより不活化した B 細胞 70 細胞株において rs7216389 の SNP リを調べるとともに、アレル別に ORMDL3 の蛋白発現をリアルタイム PCR で検討した。ORMDL3 の発現細胞も各ヒトの臓器を用いてリアルタイム PCR にて調べた。一般的サイトカイン、ケモカイン、toll-like receptor アンタゴニストの刺激にて ORMDL3 の蛋白発現が増強するか同じくリアルタイム PCR にて調べた。またアレル別に CD4 陽性細胞を集め、dsRNA 刺激にてサイトカイン産生に違いがないか、各種 ELISA を用いて検討した。さらにアレル群別 CD4

陽性細胞からのスフィンゴシン1リン酸産生に違いがないか、ELISAにて測定した。

スギ特異的IgE陽性かつスギ花粉症発症者、スギ特異的IgE陽性ながらスギ花粉未発症者、スギ特異的IgE陰性かつスギ花粉未発症の3群で、それぞれ鼻粘膜を擦過後RNAを抽出し、マイクロアレーを行い、各群で有意な発現の差を認めた因子を同定した。得られた因子が、どのような刺激で発現増強するか検討した。

### C. 研究結果

ORMDL3における13SNP中9SNPにおいて有意な相関を認めた。とりわけアトピー型喘息での責任SNP(rs7216389)においても高く有意な相関を示した(P<0.0012)。その部位のリスクアレルはTTであり、EBウイルスにより不活化したB細胞株70種類においてアレル別ORMDL3発現を調べるとリスクアレルTT型でORMDL3発現が有意に発現していた。ORMDL3発現は、肝臓、肺、脾臓、甲状腺で発現が高かったが、鼻粘膜上皮が最も高く、鼻線維芽細胞でも発現が認められた。そこで鼻線維芽細胞を用いて、ウイルス感染を模倣して、poly-ICで刺激をするとORMDL3の発現が亢進した。LPS, MALP-2の刺激ではORMDL3の発現は変化しなかった。

rs7216389のアレル別3群において末梢血からCD4陽性細胞を分離し、poly-IC刺激を行うとリスクアレルTTでIL-10, IL-17の産生が有意に高かった。さらにスフィンゴシン1リン酸もリスクアレルTTで高値であった。スギ花粉飛散期に血清中スフィンゴシン1リン酸をアレル別で測定したが、有意な差は認められなかった。

鼻粘膜の解析では、スギ花粉症でIntelectin-1とその他17の遺伝子が有意に変動した。Intelectin-1は鼻粘膜上皮で産生されることが同定でき、スギ花粉症発症者で高値を示すと同時に、非発症者においても皮内反応陽性RAST陽性者でも陰性者に比べ有意発現しており、発症直前に関与する可能性が示唆された。Intelectin-1は、鼻粘膜を培養すると発現が消失するが、IL-4, IL-13刺激によって発現が亢進した。それ以上にスギ花粉飛散期に発現が亢進する遺伝子も存在した。

### D. 考察:

スギ花粉症において、アトピー型喘息と同じORMDL3のSNPと相関が認められたことは、予想されたことであった。機能解析においてリスクアレルによってORMDL3の発現が有意に高く、ウイルス感染模倣にてさらに発現が亢進した。スギ花粉症発症にはIL-10, IL-17が関与し、スフィンゴシン1リン酸産生もORMDL3を介して関与

している可能性が見出された。

鼻粘膜の網羅的解析からは、Intelectin-1がスギ花粉症患者の花散期に有意に高くなることを見いだすと同時に、培養細胞ではTh2サイトカイン刺激で発現が亢進した。また感作あり未発症者においても面白い発現をしていたことは、今後ノックアウトマウスやアレルギーマウスモデルにおいてその発現を調べることで、今後治療の標的分子となる可能性を秘めていると考えられた。

### E. 結論

潰瘍性大腸炎においてORMDL3、Intelectin-1が発症に関与している可能性がトップジャーナルの報告され、これらが炎症遺伝子の可能性もあると思われる。スギ花粉症というアレルギー炎症において深い関与が示されたことは、炎症という分類で治療標的分子が得られる可能性があると思われた。また今回は報告していないが、鼻粘膜において有意な発現を示した他の17遺伝子それぞれも大変面白く、今後花粉症との関連を順次解析していく予定である。100倍以上の変化を示した分子もあり、これまでの報告では予想もつかないような分子であった。ここに、網羅的解析の面白さを感じた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

- 1) Yamamoto H, Yamada T, Kubo S, Osawa Y, Kimura Y, Oh M, Susuki D, Takabayashi T, Okamoto M, Fujieda S.: Efficacy of oral olopatadine hydrochloride for the treatment of seasonal allergic rhinitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy Asthma Proc.* 2010. 31(4):296-303.
- 2) Imoto Y, Kojima A, Osawa Y, Sunaga H, Fujieda S.: Cough reflex induced by capsaicin inhalation in patients with dysphagia. *Acta Otolaryngol.* 2011, 131(1):96-100.
- 3) Makino Y, Noguchi E, Takahashi N, Matsumoto Y, Kubo S, Yamada T, Imoto Y, Ito Y, Osawa Y, Shibasaki M, Uchida K, Meno K, Suzuki H, Okubo K, Arinami T, Fujieda S. Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 126(6):1163-9.e5.
- 4) Yamamoto H, Yamada T, Takabayashi T, Sunaga H, Oh M, Narita N, Kojima A, Fujieda S.: Platelet derived endothelial cell growth factor/Thymidine phosphorylase enhanced human IgE production.