

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))
総括研究報告書

好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究

研究代表者 藤 枝 重 治 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授
研究分担者 坂 下 雅 文 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
意 元 義 政 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教

研究要旨

これまで本邦で多かった好中球浸潤優位の慢性副鼻腔炎にかわって、好酸球浸潤が著明な好酸球性副鼻腔炎 (Eosinophilic chronic rhinosinusitis: ECRS) が増加してきた。この副鼻腔炎は、難治性でステロイド内服のみが有効であるが、発症機序は不明であり、病態の理解も曖昧であった。H22年に全国11共同研究施設で過去3年間の副鼻腔炎手術症例3014例(うちECRS 27.6%)を解析検討し、ECRSに対する整数の重み付け診断基準案を作成した。これは8項目の臨床データからなるが、最終にスコア5点以上がECRSであると術前に判定すると、感度76%、特異度72%となった。この基準をもとに2年間(H23~24年)の手術症例を対象に、前向き研究を行った。これは診断基準から術前にECRSを診断し、組織結果とともに最終確認をしてその有用性を判断するものである。これまで574例の登録があり、うち33.8%がECRSであった。その結果、ECRSでも短期間で再発をきたす重症群と一般的副鼻腔炎のように順調な経過をたどる軽症群に分かれることが判明した。そこで再度、H22年に集めた3014例の予後調査を行い、重症群とそれ以外の違いを統計学的に検討している。一方で、ステロイド以外に有効な治療手段がないECRSの新しい治療法を確立することも重要である。標的分子として、鼻茸の網羅的蛋白解析から得られたL-plastin、上皮から産生し自然免疫に重要なTSLPとIL-33、マイクロアレーからCCL18とCCL26、Indoleamine 2,3-deoxygenase、IL-17、ヘモオキシゲナーゼが新たに見出された。また鼻腔一酸化窒素や尿中LTE4、PGD2、リポキシンA4を臨床マーカーとして使用できる可能性も見出し、CTや末梢中好酸球率をベースにした慢性副鼻腔炎分類案なども提案できた。これらの成果は日本鼻科学会、日本耳鼻咽喉科学会、日本呼吸器学会、各種研究会で代表者および分担者が発表したとともに、鼻アレルギー診療ガイドライン、喘息予防・管理ガイドラインにも記載した。

A. 研究目的

好中球浸潤を主体とする慢性副鼻腔炎が本邦の特徴であったが、最近好酸球浸潤を主体とし、成人発症で気管支喘息を伴い、嗅覚脱失に至るステロイドにしか反応しない好酸球性副鼻腔炎が増加してきた。進行すると好酸球浸潤は中耳にまで進展し、聾に至る。唯一、効果の

あるステロイド内服も本疾患が致死的疾患でないため長期の服用は行えず、休薬中に炎症が悪化してしまう。一方で感覚神経障害(嗅覚神経・聴神経)が必発なため通院が終わることはなく、費やされる医療費は膨大なものである。これらの疾患に悩む患者、臨床医の数は増加しているが、大規模調査は行われておらず、有病

率などはっきりしたことはわかっていない。この疾患が成人発症であることから、今後確実に増えていくと思われ、ガイドライン作成とともに病因を解明し、青少年期からの予防対策が厚生労働行政には必須である。

平成 22 年度事業において全国 12 施設から平成 19~21 年度の副鼻腔炎手術 3014 症例の組織標本と臨床データを回収した。全組織標本中の好酸球数測定を終了し、各臨床項目との関係を多変量解析し、ガイドライン作成に向けた重み付けを行った。その結果、年齢 15 歳未満：-3 点、70 歳以上：-1 点 両側病変あり：+1 点、鼻茸あり：+1 点、嗅裂閉鎖あり：+1 点、薬物アレルギーあり：+1 点、篩骨洞陰影優位：+1 点、血中好酸球率が 3-5%：+2 点、5-8%：+3 点、8%以上：+4 点の重み付けを決定した。しかしこの診断基準は、すでに病理組織が存在する状態で、あとから診断をした症例から得られたもので、術前の診断には使用されていないものである。そこで、平成 23 年と 24 年の 2 年間において、術前に診断基準を用いて、臨床スコアを計算し、その後手術治療を行い確定診断をし、この診断基準が本当に有用であるか検討した。

またステロイドしか有効な手段がない現在、新しい治療標的分子の同定も急務である。そこで鼻茸を用いた網羅的な解析を行い検討することとした。

B. 研究方法

平成 23 年 1 月から平成 24 年 12 月の間、各施設において行われる副鼻腔炎手術症例において、レントゲン、内視鏡検査、各種聴力検査、細胞診、鼻汁・中耳好酸球検査、末梢血液像、一般採血、CT を行い、完全な臨床データ作成

(図 1) と診断基準による術前診断を行った。さらに網羅的解析用末梢血と血清を回収した。手術終了後、データシートを回収し福井大学に集め、データを入力、慈恵医大で解析した。好酸球性副鼻腔炎診断の重み付けに則り、各症例のスコアを算出した後、術後の病理診断と最終的に比較検討した。さらに重み付けを適応し、診断の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を検討した。

摘出した鼻茸は、網羅的蛋白解析と次世代シーケンサーによる網羅的 RNA 発現解析を行った。手術中に鼻茸組織を採取し、すぐに液体窒素中で凍結保存した。RIPA バッファーで蛋白を抽出し、IgG 除去キットを用いて蛋白精製を行った。蛋白濃度を一定に揃えた後、DIGE 用のバッファーへバッファー変換を行った。Ettan DIGE システムにより、8cm のゲルを用い、pH レンジを 4-7 の範囲で、2-DIGE 電気泳動を行った。Decyder により各スポットの発現強度を GeneSpring により解析した。統計的有意な変化を示しているスポットについて質量分析 (mass spectrometry) を行った。ゲルを銀染色し、目的のスポットを Ettan Spot Picker により切り出した後、MALDI-TOFMS: AXIMA-CFR plus を用いて解析、得られた Peptide mass fingerprint を Mascot データベースにより解析した。Mascot で得られた結果と Swiss-2DPAGE のデータが一致した、または複数回の MALDI-TOFMS→Mascot 解析により結果が再現された場合に同定したと判定した。

一方別に保存した鼻茸は、QIAzol を用い AGPC 法によって total RNA を抽出し、Ribo-Zero™Gold Kit を用いて rRNA を除去後、SOLiD™Total RNA-Seq Kit を用いてライブ

ラリーを作成した。次に Emulsion PCR 法にてライブラリーを増幅し、SOLiDTM 5500xl でシーケンシングを行った。Lifescape™ Genomic Analysis Software を用いてゲノムマッピングを行い、Avadis NGS にてデータの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は福井大学医学部倫理委員会および各分担研究者施設の承認を得て行った。鼻粘膜細胞の採取も、患者さんから文書での研究材料使用承諾書を得て行った。

C. 研究結果

前向き研究は、574 例が登録された。うち術前での ECRS 診断は 33.8%であった。H22 の後ろ向き研究の時よりも ECRS の率が約 5% 増加した。血清 528 例、遺伝子解析に用いる全血 515 例、鼻茸 130 例が福井大学に送付され登録番号が付けられ保存された。現在検討中であるが、これまでの結果、短期間で再発をきたす重症群と一般的副鼻腔炎のように順調な経過をたどる軽症群に分かれることが判明した。

網羅的蛋白解析では、アスピリン喘息に伴う鼻茸で高発現をしていた L-plastin が ECRS の鼻茸においても高い発現を示していた。そこで免疫組織化学において、一般的慢性副鼻腔炎鼻茸、気管支喘息を伴う副鼻腔炎鼻茸、アスピリン喘息を合併する副鼻腔炎鼻茸の 3 群で浸潤している好酸球数と L-plastin の発現を検討した。すると一般的慢性副鼻腔炎鼻茸では、好酸球浸潤数は気管支喘息合併例、アスピリン喘息に比べ有意に低値を示した。すなわち気管支喘息を伴う副鼻腔炎鼻茸、アスピリン喘息を合併

する副鼻腔炎は ECRS であった。次に L-plastin 陽性細胞を調べた。すると一般的慢性副鼻腔炎鼻茸と気管支喘息合併鼻茸では、ほとんど差を認めなかった。一方で、アスピリン喘息を合併する副鼻腔炎鼻茸は、両群に比較して有意に L-plastin 陽性細胞が増加していた。L-plastin 陽性細胞は二重染色の結果、ほとんど好酸球であることが判明した。

次世代シーケンサーでは、36579 のゲノムマッピングを行い、全サンプルで低発現のものを除去し、ECRS と慢性副鼻腔炎で有意な発現差を認めるものを取り出すと、10 の既知遺伝子と 2 つの新規遺伝子が見つかった。また gene ontology 解析では、17 の候補遺伝子が見出され、線毛に関連するものが多く認められた。

D. 考察

平成 22 年に定めた診断基準は、より ECRS の可能性ある症例を拾い上げるに優れるように作成した。しかしスコアを高くしてもより重症な ECRS が選択されるわけではなかった。

この診断基準を作成した症例の診断は、各施設に任せていた。ECRS と診断した症例、ECRS 以外と診断した症例を集めて 3014 例となっており、ほとんどの施設は病理診断書のコメントに「多数の好酸球を認める」と書かれていること、これまで春名らが提唱してきた臨床所見との一致性から診断がなされていた。すなわち ECRS と診断したものからさらに積み上げて ECRS の診断基準を作成したことになる。このことは、正式な診断基準が決定していない疾患の疫学調査上、仕方のないことであるが、問題も残る。そこで平成 23 年から 24 年の 2 年間は、鼻茸や鼻粘膜の組織診断を受ける前に、ECRS か慢性副鼻腔炎かどうかを表 1 の診断

基準で決定後、術後病理標本で最終診断をするという、前向き研究を行うこととした。さらに ECRS には、①気管支喘息を合併していない群、②通常の気管支喘息合併群、③アスピリン喘息や Churg-Strauss 症候群の合併群、計 3 つの群に分類できることがわかってきた。この中で①気管支喘息を合併していない群は、術後成績が一般的慢性副鼻腔炎とほぼ同等かやや劣っている程度で ECRS では予後が良好であった。②通常の気管支喘息合併群では、成績は明らかに低下し、③アスピリン喘息や Churg-Strauss 症候群の予後は最も不良であった。すなわち②と③が重症 ECRS、もしくは真の ECRS であると言え、この診断基準の作成が最終的に必要となってきた。鼻茸組織における L-plastin 陽性好酸球浸潤は、見事にこの分類と一致していた。最も予後不良の重症 ECRS で L-plastin 陽性好酸球浸潤が多いことを示した。L-plastin は、actin binding protein の一つで、大腸がん細胞に発現し、癌浸潤の関与していることが証明されている。また好酸球の刺激サイトカイン GM-CSF にてリン酸化が起こることも報告されている。T 細胞の活性化や B 細胞のリンパ濾胞形成に重要とされている。これまで我々が行った L-plastin の機能解析では、GM-CSF による細胞移動と走化性、血管浸潤 in vitro モデルにおける血管浸潤の亢進に深く浸潤の方向に関与していることがわかっている。今後更なる研究を行い、ECRS の標的治療分子になりえないか同定していきたい。次世代シーケンサーでスクリーニングされた遺伝子 12 個と 17 個に関しては、免疫組織化学や細胞株での発現を調べながら、今後機能的解析へと進んでいく予定である。

E. 結論

ECRS にも重症度分類が必要である可能性が臨床的にも、また L-plastin の免疫組織化学を用いた病理組織学的にもみいだされた。

重症の ECRS が真の難治性 ECRS であると考えられるが、その診断基準は、3014 例の鼻茸再発を基準にした予後調査、また平成 23 年からの前向き研究での予後調査で、作成可能であると考えている。

作成した診断基準や臨床所見は、これまで多くの学会、研究会で発表しているの、かなりの啓蒙活動はできていると思われる。今後プライマリー医師でも、ECRS の可能性が見出せる診断手引きも必要であると考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP.: Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2013 [Epub ahead of print]

2) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Cho SH, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP.: Excessive fibrin deposition in nasal polyps

caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187(1):49-57.

3) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP.: Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 ; 130(2):410-20.e5.

4) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M.: Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012; 44(11):1222-6.

5) Yamada T, Yamamoto H, Kubo S, Sakashita M, Tokunaga T, Susuki D, Narita N, Ogi K, Kanno M, Yamashita S, Terasawa Y, Kayano Y, Masada M, Fujieda S.: Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with

perennial allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.* 2012; 33(2):e9-16.

6) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M.: Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy.* 2013; 68(1):92-100.

7) Kubo S, Yamada T, Osawa Y, Ito Y, Narita N, Fujieda S.: Cytosine-phosphate-guanosine-DNA induces CD274 expression in human B cells and suppresses T helper type 2 cytokine production in pollen antigen-stimulated CD4-positive cells. *Clin Exp Immunol.* 2012;169(1):1-9.

8) Yamamoto H, Yamada T, Sakashita M, Kubo S, Susuki D, Tokunaga T, Ogi K, Terasawa Y, Yamashita S, Kayano Y, Masada M, Kimura Y, Fujieda S.: Efficacy of prophylactic treatment with montelukast and montelukast plus add-on loratadine for seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.* 2012;33(2):e17-22.

9) Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(1):184-94. e11.

- 10) Fujieda S, Kurono Y, Okubo K, Ichimura K, Enomoto T, Kawauchi H, Masuyama K, Goto M, Suzaki H, Okamoto Y, Takenaka H.: Examination, diagnosis and classification for Japanese allergic rhinitis: Japanese guideline. *Auris Nasus Larynx*. 2012 Dec;39(6):553-6. Epub 2012 Mar 7.
- 11) Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, Hsi E, Juo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M.: ORAI1 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One*. 2012;7(1):e29387.
- 12) Yamada T, Saito H, Kimura Y, Kubo S, Sakashita M, Susuki D, Ito Y, Ogi K, Imoto Y, Fujieda S. CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. *Cytokine*. 2012;57(2):245-50.
- 13) Osawa Y, Suzuki D, Ito Y, Narita N, Ohshima Y, Ishihara Y, Ishihara Y, Tsuchida S, Fujieda S.: Prevalence of inhaled antigen sensitization and nasal eosinophils in Japanese children under two years old. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012;76(2):189-93.
- 14) 藤枝重治, 坂下雅文, 鈴木弟, 富田かおり, 徳永貴広 : 鼻茸 *JOHNS* 2012; 28:1105-10
- 15) 藤枝重治, 坂下雅文 : 好酸球性副鼻腔炎とアスピリン喘息の治療とステロイドの位置づけ *ENTONI* 2012; 139:73-80.
2. 学会発表
- 1) Susuki D, Tanaka Y, Ito Y, Yamada T, Nomi N, Kodama S, Suzuki M, Tsukidate T, Haruna S, Fujieda S. Proteomics analysis of nasal polyps in aspirin intolerant asthma (AIA) and chronic rhinosinusitis (CRS). The 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, April, 13, 2012, Kyoto.
- 2) Fujieda S, Susuki D, Tanaka Y, Tsukidate T, Haruna S, Yamada T. Proteomics analysis of nasal polyps from patients with aspirin intolerant asthma (AIA). *Collegium oto-rhino-laryngologicum micitiae sacrum*. August 27, 2012, Roma.
- 3) 鈴木 弟 : アスピリン不耐症患者と慢性副鼻腔炎患者における鼻茸の相違・網羅的蛋白解析による検討- 第 51 回日本鼻科学会総会・学術講演会 シンポジウム 千葉市 2012. 9.28. 千葉
- 4) Fujieda S.: Eosinophilic chronic rhinosinusitis. The 45th congress of the Korean Rhinology Society. Sepecial lecture Seoul 2013, 3.10
- 5) 藤枝重治 : 併存症としての鼻・副鼻腔炎 (好酸球性中耳炎を含む) 第 53 回日本期間呼吸器学会 東京 2013.4.21

6) 藤枝重治：好酸球性副鼻腔炎の取り扱い
第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会 札幌
2013.5.16

H. 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

表1 改訂データシート

ケースカード:慢性好酸球性炎症疾患

(施設番号) E (整理番号)

性別(M F) 年齢 ___才 生年月日 _____

H22 疫学参加あり、前回番号()-()

慢性副鼻腔炎 好酸球性副鼻腔炎

慢性中耳炎 好酸球性中耳炎

記入時状況 手術前 外来管理

発症年齢

<10 10-19 20-39
 40-49 50-59 60<

病変 片側 両側

術前状況

術前、2週以内の内服ステロイド使用
 (あり(増悪時屯用含む) なし)

抗菌薬への反応 (あり なし 使用なし)

ステロイドへの反応
 点鼻 (あり なし 使用なし)
 内服 (あり なし 使用なし)

身体所見について

鼻茸 (あり なし)
 粘稠な鼻汁 (あり なし)
 後鼻漏 (あり なし)
 顔面痛 (あり なし)
 嗅覚障害 (脱失、あり なし)
 嗅裂閉塞 (あり なし)
 滲出性中耳炎 (あり なし)
 ニカワ状中耳貯留液 (あり なし)
 骨導閾値上昇(1周波数でも 30dB 以上)
 (あり なし 未測定)

術後再発傾向について (あり なし)

鼻茸 粘稠な鼻汁 後鼻漏 顔面痛 嗅覚障害
 嗅裂閉塞 滲出性中耳炎 ニカワ状中耳貯留液
 骨導閾値上昇 (複数回答可)

喫煙について

今まで喫煙歴なし 以前ある(本/日、年間)

現在ある(本/日、年間)

室内ペット飼育 (受診時あり 以前あり なし)

この症例の診断は、(各施設での基準で診断)

採血について

採血日 _____ 手術前 外来管理
 採血時、2週以内の内服ステロイド使用
 (あり なし)

呼吸機能検査について 手術前 外来管理

FVC 実測 _____ml 予想の _____%

FEV1.0 実測 _____ml 予想の _____%

上顎洞と篩骨洞の陰影濃度(Lund-Mackay: 0, 1, 2)

	F	AE	PE	M	S	OMC	OC
Rt							
Lt							

標本所見について 好酸球数(x400、一視野あたり)

① _____個 ② _____個 ③ _____個 平均 _____個

術中ステロイド使用 (あり なし)

合併症について

好酸球性中耳炎 (+ -)

好酸球性筋膜炎 (+ -)

好酸球性食道炎 (+ -)

好酸球性胃腸炎 (+ -)

好酸球性肺炎 (+ -)

好酸球性膿疱性毛包炎 (+ -)

慢性中耳炎 (+ -)

アスピリン喘息 (+ -)

アレルギー性鼻炎 (+ -)

気管支喘息 (+ -)

アトピー性皮膚炎 (+ -)

食物アレルギー (+ -)

蕁麻疹、薬剤アレルギー (+ -)

(薬剤名 _____)

Churg-Strauss syndrome (+ -)