

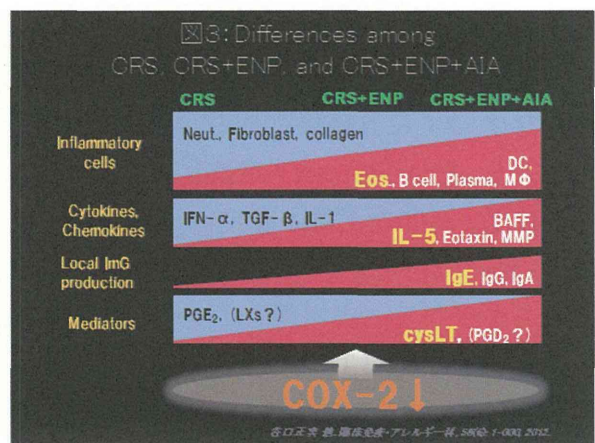
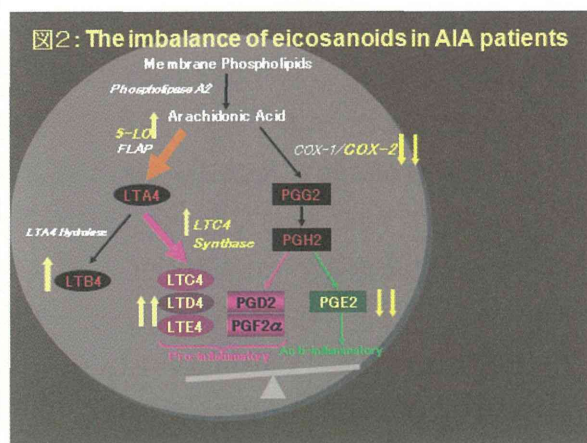
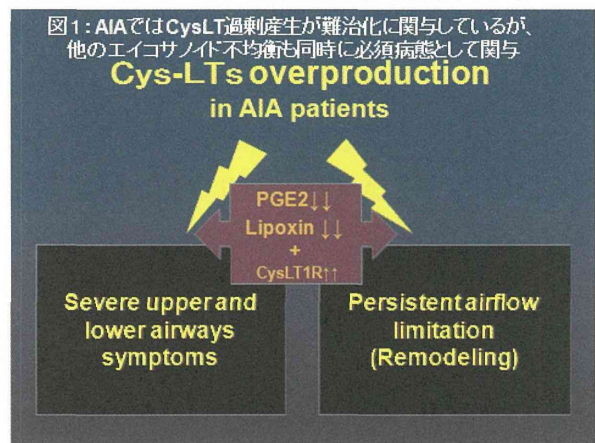
NSAIDs 過敏喘息の病態におけるエイコサノイド不均衡：

- 1) CysLT 過剰産生病態の意義
- 2) LTB4 産生亢進、
- 3) 抗炎症性エイコサノイド産生低下 (PGE2 とリポキシン)
- 4) 自然 COX 2 誘導 [喫煙] の影響、に関する研究

研究代表者 谷 口 正 実 国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部 部長
 研究協力者 東 憲 孝 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員
 三 井 千 尋 国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部 研究員
 梶 原 景 一 国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部 研究員
 林 浩 昭 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
 福 富 友 馬 国立病院機構相模原病院臨床研究センター診断・治療薬研究室 室長
 山 口 裕 礼 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院呼吸器内科 医師
 小野 恵 美 子 ハーバード大学・ブリガムウィミンズホスピタル 研究員
 三 田 晴 久 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員

研究要旨：

AIA の基本重要病態として CysLT 過剰産生と抗炎症性メディエーター産生低下を見出した。
 またエイコサノイド不均衡が必須病態であることも確認した。これらの特徴的な病態にシクロオキシゲナーゼ、特に COX2 の低下が関与していると推定した。また自然界の COX2 誘導因子である喫煙が AIA 発症を抑制している可能性を発見した。
 これらはすべて新知見であり、AIA 病態の世界的な解明に寄与すると確信する。



A. 研究目的

1) CysLT は好酸球性気道炎症や気道アレルギー

ーにおける強力な最終メディエーターと考えられている。

すでに我々は、アスピリン喘息 (AIA) において、CysLT 過剰産生が AIA 病態の特徴であり、安定期でも非 AIA の数倍、COX1 阻害時にはさらに数 10 倍に U-LTE4 が増加することを報告してきた (JACI2002, 2003, 2004, 2010, 2011)。またその値と喘息難治化が有意に関連することを報告した (別項参照)。しかし、その一方で、U-LTE4 増加病態が AIA や喘息以外でも生じることを見出した。例えばアナフィラキシー (Allergy2008,CEA2009)、血管炎 (JACI2002) などにおける増加である。また NSAIDs 過敏蕁麻疹/血管性浮腫 (JACI2002) や肺局所での増加＝好酸球性肺炎や過敏性肺炎での U-LTE4 増加 (ERJ2005,2008) も見出したが、実はこれらでは肺機能低下や喘息症状はほとんど伴わない。

今回の目的は我々の過去に蓄積された CysLTs 過剰産生病態の中から、「好酸球性炎症やマスト細胞活性化非喘息病態＝好酸球性肺炎やアナフィラキシー症例の急性期 U-LTE4」と「AIA のアスピリン誘発時」、「非 AIA の自然喘息発作時」の 3 者の U-LTE4 の比較をし、CysLTs 過剰産生と喘息発作出現との関連を明らかにすることである。

2) すでに尿中ロイコトリエン E₄ 濃度 (U-LTE4) は、生体内の CysLTs 産生を反映する最も適切な指標として広く認識されている。しかし尿中 LTE4 測定は、尿量による影響 (クレアチニン補正が必要)、尿中測定阻害物質の存在、さらに月経時や排尿後に採取不能となるなど、幾つかの欠点も指摘される。さらにまた尿中における LTB₄ 濃度は正確には測定困難であった。そこで今回、我々は、それらの欠点を有せず、かつ非侵襲的に繰り返し採取可能な唾液中の CysLTs と LTB₄ 濃度に着目し、その濃度測定の可否や意義を、特にアスピリン喘息 (AIA) で明らかにすることを目的とした。

3) アスピリン喘息の特徴的病態として、CysLTs 過剰産生があるが、その抑制因子である PGE₂ の産生能については、結論が得られ

ていない。気道局所 (鼻茸組織中) と尿中 PGE₂ 代謝産物の濃度を AIA、

非 AIA、非 AIA 喘息例で比較検討する。また Lipoxin/15-epi-Lipoxin (LX/15-epi-LX) は、炎症細胞浸潤を抑制し、LT 受容体に対して拮抗作用を示すことから、抗炎症性脂質メディエーターとして注目されつつある。さらに、近年、生体内における LX 産生能が低いことが重症喘息の喀痰・気管支肺胞洗浄液を用いた検討により報告されている。今回は、アスピリン喘息 (AIA) での安定期の産生能を評価し、さらに診断に有用か否かも併せて検討した。

4) 背景：AIA の特徴的基本病態として気道での PGE₂ 産生低下がある。その機序として気道におけるシクロオキシゲナーゼ (COX) 2 活性の低下が推定されている。ヒト気道において、最も気道の COX 2 活性を刺激するものとして、喫煙があげられている。

仮説：AIA 患者では喫煙者が少ない、もしくは喫煙が AIA 発症を抑制する仮説が成立する。

B. 研究方法

1) 対象：アスピリン負荷試験で確定診断し、U-LTE4 を測定した AIA 4 5 例、および非 AIA 喘息発作時、好酸球性肺炎急性期、アナフィラキシー急性期 10～20 例の U-LTE4 を蓄積データから解析した。

2) 対象：アスピリン負荷試験で確定診断した AIA 1 5 例および。年齢、性別、重症度をほぼマッチさせ負荷試験で NSAIDs 過敏が否定された非 AIA 1 1 例と健常人 10 例を対照とした。1 - 2 ml の唾液を午前中に採取後、-35 度で測定まで 0 - 2 ヶ月保存した。測定は既報の方法 (HPLC で精製後に Cayman の EIA キット) にて LTC₄, D₄, E₄, B₄ を測定した。

3) 既報の方法 (JACI 2010) による測定方法で、鼻茸組織中と尿中の PGE₂ 濃度 (代謝産物含め) + CysLTs 濃度を測定した。また過去の研究論文 300 編以上から、AIA の基本病態

を考察した。またアスピリン負荷試験にて陽性であった AIA16 例を対象とした。対照群として 非 AIA (ATA) 患者 15 名 Healthy control (HC) 群 10 名も検討した。サンプルは 午前中に採取した随時尿とし、すべて HPLC による精製・抽出後に測定した。

4) AIA 確定例 127 例と非 AIA (負荷試験で確定した ATA1=100 例と疫学調査での相模原市における非 AIA=1270 例) の問診から得られた喫煙歴を正確に比較する (症例対照研究)。

(倫理面への配慮)

検査結果や臨床背景は (独) 国立病院機構相模原病院における調査はカルテ記載事項からの調査であり、通常の医療行為の範囲である。調査の個人情報情報は暗号化されており、保護には十分配慮した。また本研究内容は倫理委員会での承認済みである。患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

1) 【AIA におけるアスピリン誘発時の U-LTE4 濃度推移】 AIA 4 1 例全てで前値 (基礎値) の数倍から数 10 倍の U-LTE4 増加が確認された。

【健常人、喘息発作時、アナフィラキシー、好酸球性肺炎急性期における U-LTE4 濃度】

図 2 に示すように、アナフィラキシー、好酸球性肺炎ともに非 AIA 喘息自然発作時の 5-10 倍以上の U-LTE4 増加を示し、AIA 誘発時の増加程度とほぼ同等であった。しかしながら、これらの症例では、喘息合併例も含まれたが、臨床的に喘息発作は認めず、気道閉塞も生じていなかった(詳細は AI2011 など参照)。

2) 【唾液中の CysLTs 濃度と LTB4 濃度測定の可否と再現性】 図 1, 2 に示すように、十分な測定感度をもって唾液中の CysLTs と LTB4 は測定可能であることが確認できた。また再現性も十分であった (データ省略)。【唾液中各

CysLTs 濃度とアスピリン過敏性】 従来尿中ではとらえられなかった LTC₄、D₄ 濃度も十分測定可能であることが判明した。また AIA では LTE₄ だけでなく、LTC₄ が非 AIA に比し有意に高値であった。【唾液中の LTB₄ 濃度の比較】尿中では測定困難であった LTB₄ 濃度が唾液中で測定でき、かつ AIA での有意な増加が初めて確認された (AI2012)。

3) アスピリン喘息では、気道局所だけでなく、全身性の PGE₂ 産生低下を認めた (JACI2010、AI2013) 。尿中 LX 濃度は尿中 15-epi-LXA₄ と正の相関が見られるが、腎臓での 15-PGDH の代謝を受け有意に低値で 15-epi-LX の方が、感度の面で尿のバイオマーカーとして有用であった。尿中 15-epi-LX 濃度は、末梢血好酸球数と有意に負の相関を示した(図表省略)

4) 尿中 15-epi-LX 濃度は、AIA 群は非 AIA 群と比較して有意に低値 (median, 21.5 pg/mg-cre vs 95.3 pg/mg-cre, p<0.05,)、LTE₄/15epi-LX 比は有意に高値であった (14.5 vs 1.9, p<0.01)。重症持続型の 2 群比較においても尿中 15-epi-LX 濃度は AIA 群で有意に低値であった。(26.7 pg/mg-cre vs. 100.7pg/mg-cre, p<0.05)アスピリン喘息の診断に尿中 LTE₄/15-epi-LXA₄ が非常に有用である (CEA2012 参照)。

5) AIA では有意に現喫煙者が少なかった。また AIA では過去喫煙があるも、喘息発症前に禁煙している割合が有意に多かった。

D. 考察

詳細は個別の年度別の成果に記載したが、各研究ともに新規の国際的な発見や知見が得られた。今回の成果をまとめると 2 つの病態、意義が明らかとなった。

①CysLT 過剰産生病態が必要条件であるが十分でなく、他の抗炎症性メディエーター産生低下も必須病態である (図 1)。②各種エイコサノイド不均衡が基礎病態として特徴的である

(図2)。③すべての基本に COX2 低下が関与している可能性があり、喫煙 (COX2 誘導因子) は AIA 発症を抑制する可能性がある。

3. その他
なし

E. 結論

AIA の基本重要病態として CysLT 過剰産生と抗炎症性メディエーター産生低下を見出した。またエイコサノイド不均衡が必須病態であることも確認した。これらの特徴的な病態にシクロオキシゲナーゼ、特に COX2 の低下が関与していると推定した。また自然界の COX2 誘導因子である喫煙が AIA 発症を抑制している可能性を発見した。これらはすべて新知見であり、AIA 病態の世界的な解明に寄与すると確信する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 2. 学会発表 参照のこと

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

アスピリン不耐症喘息患者における難治性鼻茸の網羅的蛋白解析と 次世代シーケンサーを用いた Whole Transcriptome 解析 (RNA-Seq) による解析

研究分担者 藤 枝 重 治 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学 教授
研究協力者 徳 永 貴 広 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学 医員
鈴木 弟 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学 医員
田 中 幸 枝 福井大学医学部分子生命化学 助教
高 林 哲 司 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学 助教
春 名 眞 一 獨協医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授

研究要旨：

アスピリン不耐症喘息患者には鼻茸の合併が多く、かつ難治性である。われわれはアスピリン不耐症患者 (AIA) と慢性副鼻腔炎患者のそれぞれの鼻茸について、プロテオーム解析を行い、AIA 鼻茸において L-plastin の発現がアスピリン耐性喘息 (ATA) 鼻茸に比べ増加し、その発現は主に好酸球であることを見出した。機能としては好酸球の遊走に関与していることが判明した。これまでのアスピリン負荷試験などリスクを伴う診断法以外の方法として、L-plastin が有用である可能性が示唆された。

一方で鼻茸中の Whole transcriptome (RNA-seq) を、次世代シーケンサー (NGS) を用いて解析し、新規トランスクリプトを同定した。その結果、アスピリン喘息を合併する好酸球性副鼻腔炎群において特異的に発現量が多く、かつ有意差のあった遺伝子が 112 個同定された。NGS によって、好酸球性副鼻腔炎に関与する遺伝子を検索することができた。

A. 研究目的

マクロライド療法や内視鏡下副鼻腔手術 (ESS) の発達に伴い、慢性副鼻腔炎に対する治療成績は、近年向上した。しかし、それらの治療によっても治癒しえない易再発性・難治性の慢性副鼻腔炎として、好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) が注目されている。そのような副鼻腔炎では、アスピリン不耐症 (AIA)、NSAIDs アレルギー、気管支喘息の合併が有意に関与していることがわかった。

AIA 患者における鼻茸の解明のために、我々はこれまで網羅的蛋白解析 (プロテオーム解析) を行ってきた。その結果、AIA 群で有意に発現が 2 倍以上亢進している 61 スポットと、発現が 0.5 倍以下に減少している 33 スポットを同定した。そのうち、AIA 群において有意に発現亢進している蛋白として L-plastin を同定した。本研究では、まず L-plastin の機能

解析を行った。

また一方で、近年実用化された次世代シーケンサー (NGS) は、大量の塩基配列を一度に解析できる高性能シーケンサーであり、未知の配列も含めた網羅的な解析が可能である。

そこで更なる基礎的件研究として AIA 患者の鼻茸における Whole transcriptome (RNA-seq) を NGS を用いて解析した。

B. 研究方法

1) L-plastin の発現誘導：

好酸球における L-plastin 機能解析を行うために、apicidin で好酸球に分化誘導した好酸球様細胞株 EoL-1 を用いて実験を行った。好酸球の活性化・生存・浸潤に重要であるサイトカイン・ケモカイン (IL-4、IL-5、IL-13、RANTES、Eotaxin、TNF α)、LTB₄、LTD₄ にて刺激し、

L-plastin の発現変化を real time polymerase chain reaction (PCR)法で検討した。

2) Lipopolysaccharide (LPS)とアスピリンの好酸球に及ぼす影響：

EoL-1 細胞株を使用し、LPS、アスピリンそれぞれの存在下、もしくは L-plastin に対する siRNA 遺伝子導入後、EoL-1 細胞株における L-plastin と CysLT1R の mRNA 発現変化を real time PCR 法にて測定した。

3) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞の生存率測定：

EoL-1 細胞に L-plastin と negative control に対する siRNA を各々トランスフェクションした。トランスフェクション 1 日目、2 日目、3 日目でトリパンブルー染色し各々の生存率を計測した。細胞数計測には、Countess™ Automated Cell Counter を使用した。

4) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞の遊走能測定：

CytoSelect™ 24-well Cell Migration (3 μm), Fluorometric を用いて、L-plastin と negative control の siRNA をトランスフェクションした各々の EoL-1 細胞の細胞遊走能を検討した。さらに GM-CSF1000ng/ml で刺激した。

5) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞における CysLT1R の発現：

EoL-1 細胞に L-plastin 及び negative control の siRNA を各々トランスフェクションし、リアルタイム PCR を用いてシステニルロイコトリエン 1 受容体 (CysLT1R) mRNA の発現変化を測定した。

6) Whole transcriptome (RNA-seq)：トランスクリプトーム解析

アスピリン喘息合併を含む好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) と非好酸球性副鼻腔炎 (non-ECRS)

とに分類した。ECRS 群の鼻茸 5 例、non-ECRS 群の鼻茸 5 例と、健常者鼻粘膜擦過細胞 (Control) 5 例を検討した。

鼻茸および擦過細胞から total RNA を抽出し、rRNA を除去し、断片化した cDNA ライブラリーを作成し、SOLiD™ 5500x1 (LifeTechnologies 社) を用いてシーケンスを行い、Lifescopy™ Genomic Analysis Software (LifeTechnologies 社) を用いてゲノムマッピングを行い、Avadis® NGS software (Strand Scientific Intelligence 社) を用いて発現解析を行った。

発現差解析は、マッピングされた全トランスクリプトームから、全てのサンプルで低発現のものを除去し、ECRS と non-ECRS とで発現差が 5 倍以上のものを抽出し、t 検定および Benjamini-Hochberg FDR 補正を行って有意であるものを抽出した。

(倫理面への配慮)

「慢性好酸球性炎症疾患の網羅的遺伝子解析と網羅的蛋白に関する研究」、「慢性副鼻腔炎に関する疫学的調査と遺伝子解析研究」の題名で福井大学医学部倫理委員会の承認を受け、本研究を行った。また、データシート作成は、個人を同定できる情報を削り、代わりに符号をつけて区別管理した。

C. 研究結果

1) 分化誘導した EoL-1 細胞株を IL-4、IL-5、IL-13、RANTES、Eotaxin、TNFα、LTB4、LTD4 で刺激しても、L-plastin の mRNA 発現変化は認められなかった。

2) LPS で刺激することにより、CysLT1R は発現が有意に増加し、L-plastin の発現も増加傾向がみられた。またアスピリンの処理によって LTC4mRNA の発現は上昇した。次に

L-plastin の siRNA を導入すると LPS 刺激による CysLT1R mRNA の上昇は解除された。

3) L-plastin に対する siRNA をトランスフェクションした EoL-1 細胞は、negative control の siRNA 導入した細胞群より、導入 2 日目で生存率が低かった。

4) L-plastin の siRNA 導入により、EoL-1 細胞の GM-CSF 刺激による遊走能は低下した。しかし、GM-CSF1000ng/ml の高濃度刺激では遊走能に差が認められなかった。

5) L-plastin の siRNA 導入により、EoL-1 細胞における CysLT1R mRNA の発現が低下した。

6) ECRS 群対 non-ECRS 群の発現差解析において、有意差のある遺伝子を 12 個同定した。ECRS 群で高発現のものは 3 個、反対に non-ECRS 群で高発現のものが 9 個同定された。ECRS 群で高発現の 3 遺伝子のうち、過去の報告で末梢血好酸球に発現がない遺伝子が 1 個同定された。これら 12 個の遺伝子のうち既知の遺伝子は 10 遺伝子、新規は 2 遺伝子であった。

また、Control 群を加えた 3 群間の発現差解析では、ECRS 群に有意に高く発現しているが、末梢血好酸球には発現していない遺伝子が 112 個同定された。また non-ECRS 群の中に遺伝子発現プロファイルが異なる 2 群が存在することも示され、Gene ontology 解析にて 2 群間で線毛関連遺伝子 17 個に有意な発現差がみられることがわかった。

しかし、この 2 群間で、症状や再発性・難治性、診断基準スコアに有意な違いは認められなかった。

D. 考察

好酸球様細胞株 EoL-1 を LPS で刺激することにより、CysLT1R 及び L-plastin の発現が増加した。CysLT1R は AIA で発現が亢進しており、AIA 発症に重要な因子の一つである。このことは EoL-1 細胞における LPS 刺激が AIA の in vitro モデルになる可能性が見出された。さらに、L-plastin の発現は CysLT1R 発現に関連しており、L-plastin がアスピリン不耐症に重要な役割を担っていることが示唆された。

好酸球細胞株 EoL-1 細胞において L-plastin の発現低下とともに、好酸球細胞株の生存率及び遊走能も低下した。このことは、AIA においては、L-plastin の発現が亢進していることで、好酸球の局所への遊走及び生存を促し、好酸球炎症を惹起していると考えられる。これに加え、L-plastin と好酸球 CysLT1R の発現も関連あることが示された。これまでの報告で、CysLT1R は AIA と深く関連が示されており、L-plastin はこの点からも AIA にとって重要な役割を担っていると考えられる。また、前回の検討で、好酸球細胞株にアスピリンで刺激すると LTC₄ の発現が亢進することがわかった。AIA においては、L-plastin 発現亢進することによって、生存延長し、CysLT1R の発現が亢進した好酸球が局所へ遊走され、自身がアスピリン刺激により産生したロイコトリエンで負の循環に陥っていることが、AIA 発症や AIA 鼻茸が難治性である原因の一つではないかと考えられた。これらより、L-plastin は AIA の診断と治療にも結び付く可能性が示唆された。

トランスクリプトーム解析で同定された 112 個の遺伝子は、ECRS で特異的に発現しており、鼻茸に浸潤している好酸球と正常末梢血好酸球との発現の違いを反映しているか、あるいは鼻茸中の好酸球以外の組織での発現を反映していると考えられる。NGS は網羅性や新規配列の発見には優れているが、配列読み取り

にバイアスがあるなどの問題点も指摘されており、マイクロアレイなど他の解析法での結果もあわせて検討し、最終的には real-time PCR での追認が必要である。

また、診断基準で non-ECRS と分類された中に、線毛関連遺伝子の発現プロファイルが異なる 2 群が存在することがわかった。線毛機能の障害が副鼻腔炎発症の一因となっていることは以前から知られているが、non-ECRS の中に線毛機能障害の程度や性質が異なるものが存在し、それらが発症機序や病態に関与することが示されれば、遺伝学的な治療へのアプローチができるようになるかもしれない。

本研究で同定された遺伝子発現の違いが、ECRS の難治性・再発性に関与しているか否かについて、さらなる遺伝子機能解析が必要である。

E. 結論

好酸球における L-plastin の発現亢進は、好酸球の生存・遊走に重要な役割を担い、なおかつ CysLT1R の発現を亢進させることにより、AIA 発症及び AIA 鼻茸の生成・難治性に関与している可能性を見出した。

また Whole transcriptome 解析を行い、疾患関連遺伝子の候補を同定した。今後その機能について検討していく。

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 Sep;132(3):584-592.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2013.02.003. Epub 2013 Mar 28.

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 t-PA Expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jan 1;187(1):49-57. doi: 10.1164/rccm.201207-1292OC. Epub 2012 Nov 15

3) Tanaka S, Hirota T, Kamijo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M.: Lung Functions of Japanese Patients with Chronic Rhinosinusitis Who Underwent Endoscopic Sinus Surgery. *Allergol Int.* 2013 Nov 25. [Epub ahead of print]

4) 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 Aug ;130(2):410-20.e5.

5) 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 Oct 7;44(11):1222-6.
- 6) 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 Mar-Apr;33(2):e9-16.
- 7) 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.
- 8) 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.* 57(2):245-50, 2012.2.
- 9) 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.* 7(1):e29387. 2012.1.
- 10) Yamada T, Jiang X, Kubo S, Sakashita M, Narita N, Yamamoto H, Sunaga H, Fujieda S: B type CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced BlyS expression and production in human tonsillar fibroblasts. *Clin Immunol.* 141:365-71, 2011.12.
- 11) Yoshimura K, Kawata R, Haruna S, Moriyama H, Hirakawa K, Fujieda S, Masuyama K, Takenaka H: Clinical epidemiological study of 553 patients with chronic rhinosinusitis in Japan. *Allergol Int.* 60(4):491-6, 2011.12.
- 12) Higashino M, Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Narita N, Kojima A, Hyo S, Kawata R, Takenaka H, Fujieda S: Interleukin-19 downregulates interleukin-4-induced eotaxin production in human nasal fibroblasts. *Allergol Int.* 60(4):449-57, 2011.12.
- 13) Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Noguchi E, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M: Variants of C-C motif chemokine 22 (CCL22) are associated with susceptibility to atopic dermatitis: case-control studies. *PLoS One.* 6(11):e26987. 2011.11.
- 14) Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M,

Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K: Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet.* 7(7):e1002170. 2011.7.

15) Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchio E, Odajima H, Takenaka H, Baba K: Japanese Society of Allergology: Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol Int.* 60(2):171-89, 2011.3.

16) 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. *Allergol Int.* 60(1):79-85, 2011.3.

17) Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S: Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int.*;60(1):87-92, 2011.3.

18) Imoto Y, Kojima A, Osawa Y, Sunaga H, Fujieda S: Cough reflex induced by capsaicin inhalation in patients with dysphagia. *Acta Otolaryngol.* 131(1):96-100, 2011.1.

2. 学会発表

1) 徳永貴広、意元義政、坂下雅文、藤枝重治. 次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析 (RNA-seq)による好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定. 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2014.2. 徳島

2) Fujieda S: Diagnosis for eosinophilic chronic rhinosinusitis. The 12th Taiwan

-Japan conference on otolaryngology -head and neck surgery. Symposium 2013.12. Taipei

3) 高林哲司、加藤 厚、藤枝重治、Schleimer RP: 肥満細胞の多様性と好酸球性副鼻腔炎に関する検討. 第 63 回日本アレルギー学会 シンポジウム 2013.11. 東京

4) 高林哲司、加藤 厚、藤枝重治、Schleimer RP: 好酸球性副鼻腔炎の病態形成メカニズム. 第 63 回日本アレルギー学会 シンポジウム 2013.11. 東京

5) Tokunaga T, Ninomiya T, Imoto Y, Sakashita M, Takabayashi T, Noguchi E, Arinami T, Fujieda S. Whole Transcriptome using next-generation sequencer (RNA-seq) identifies genes associated with eosinophilic chronic rhinosinusitis. 7th International symposium on recent advances in rhinosinusitis and nasal polyposis. 2013.10. Matsue.

6) 藤枝重治. 好酸球性副鼻腔炎診断ガイドライン -好酸球性副鼻腔炎の診断基準-. 第 52 回日本鼻科学会総会・学術講演会. 2013.9. 福井

7) 富田かおり、鈴木弟、藤枝重治: アスピリン不耐性喘息関連タンパクの機能解析. 第 52 回日本鼻科学会 2013.9. 福井

8) 高林哲司、藤枝重治: 線溶系制御異常による慢性副鼻腔炎の病態形成メカニズムに関する検討 第 52 回日本鼻科学会 基礎アップデートセミナー 2013.9. 福井

9) 高林哲司、加藤 厚、藤枝重治、Schleimer RP: 好酸球性副鼻腔炎の病態形成における肥

満細胞の役割 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 シンポジウム 2013.5. 横浜

10) 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・学術講演会 ランチョンセミナー2013.5. 札幌

11) Fujieda S: Eosinophilic chronic rhino-sinusitis. The 45th annual meeting of Korean Rhinology Society. 2013.3. Seoul

12) 富田かおり、鈴木弟、藤枝重治: アスピリン不耐性喘息関連タンパクの機能解析. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2013.2. 倉敷

13) 徳永貴広、意元義政、坂下雅文、藤枝重治. 次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析 (RNA-seq)による好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013.2. 倉敷

14) 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.

15) 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.

16) 鈴木弟、田中幸枝、月舘利治、伊藤有未、能美希、児玉悟、鈴木正志、山田武千代、

出原賢治、春名眞一、藤枝重治: 鼻茸組織におけるアスピリン不耐症特異的蛋白の検索. アスピリン不耐症・難治性喘息研究会 2011.11. 東京

17) 鈴木弟、田中幸枝、月舘利治、伊藤有未、能美希、児玉悟、鈴木正志、山田武千代、出原賢治、春名眞一、藤枝重治: アスピリン不耐症と慢性副鼻腔炎における鼻茸の相違 第50回日本鼻科学会学術講演会 2011.12. 岡山

18) Fujieda S, Sakashita M, Hirota T, Osawa Y, Harada M, Yoshimoto T, Tamari M: Association between genetic variant of interleukin-33 and seasonal allergic rhinitis in the Japanese population. Collegium Oro-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum 2011.9. Bruges, Belgium

19) Fujieda S: New clinical marker for allergic rhinitis.14th International Rhinology Society & 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose 2011.9. Tokyo, Japan

20) Fujieda S: New therapeutic strategy for allergic rhinitis. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2011.12. Kobe, Japan

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

NSAIDs 過敏副鼻腔炎の難治化メカニズムに関する研究

研究分担者 岡野光博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学 准教授
研究協力者 春名威範 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学 医員
野山和廉 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学 医員

研究要旨：

NSAIDs 過敏気道疾患では、高率に副鼻腔炎(鼻茸)を合併し、難治である。我々は、NSAIDs 過敏副鼻腔炎の難治化メカニズムに関する以下の研究を行った。①TLRを介する微生物曝露による病態の増悪メカニズムにおけるNSAIDsの関与について鼻茸細胞を用いて解析した。その結果、NSAIDsを添加した場合には、鼻茸細胞はTLR4リガンドであるリポ多糖(LPS)の刺激に対して有意なIL-5およびIL-13の産生を示した。この産生はPGE₂の添加により有意に抑制された。以上より、TLRを介した微生物曝露によるNSAIDs過敏気道疾患の増悪メカニズムのひとつに、NSAIDsによるCOX阻害に伴う内因性PGE₂の合成阻害が関与する可能性が示唆された。②鼻茸粘膜におけるIL-22の発現と、鼻茸細胞によるIL-22産生のNSAIDsによる調節作用について検討した。その結果、IL-22の発現はNSAIDs過敏の有無で差を認めなかったが、エンテロトキシン刺激に対して誘導される鼻茸細胞からのIL-22産生はNSAIDs添加により有意に抑制されたことから、NSAIDs過敏の発現メカニズムのひとつとしてIL-22の産生抑制作用がある可能性が考えられた。③鼻副鼻腔粘膜における芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor: AhR)の発現を観察し、NSAIDs過敏の有無によるAhR発現の差異について、免疫染色およびリアルタイムPCRにて検討した。その結果、NSAIDs過敏喘息患者由来鼻茸ではNSAIDs耐性喘息患者由来鼻茸と比較してAhR mRNA発現量が有意に低下していた。NSAIDs過敏の発現メカニズムのひとつとしてAhRの発現抑制に伴う過剰な免疫応答の惹起が関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

アスピリン喘息や好酸球性鼻茸などNSAIDs過敏気道疾患の病因のひとつとして、NSAIDsによるCOX阻害、特に内因性PGE₂の合成阻害による免疫制御機構の破綻が疑われている。今回の検討では、外的因子として微生物曝露、特にTLR4リガンドであるリポ多糖(LPS)、内的因子としてIL-22および芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor: AhR)に注目し、NSAIDs過敏副鼻腔炎における発現や機能的解析を行った。

B. 研究方法

NSAIDs過敏喘息患者およびNSAIDs耐性

喘息患者、および非喘息患者から鼻茸を採取した。コントロールとして、副鼻腔炎患者および非副鼻腔炎患者より鉤状突起(非鼻茸組織)を採取した。免疫染色にてこれらの粘膜組織におけるIL-22やAhRの局在を観察し、mRNA量をリアルタイムPCRにて定量化し、各副鼻腔炎フェノタイプでの発現量を比較した。また手術時に得られた鼻茸を酵素処理し、細胞を分離した。鼻茸細胞をLPSや黄色ブドウ球菌エンテロトキシンにて刺激し、培養上清中のIL-5、IL-13およびIL-22をELISAにて測定した。NSAIDsの影響を検討するために、DNPCsをジクロフェナック(Diclofenac: DIC)にて前処置し、同様の検討を行った。

(倫理面への配慮)

副鼻腔炎患者からの検体(鼻茸粘膜)採取に関しては、学術的な意義について十分な説明を行い、同意・協力が得られた上で採取保存する。本研究は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・倫理委員会による審査を受け(課題名:慢性副鼻腔炎およびアレルギー性鼻炎患者の鼻腔・副鼻腔内におけるアラキドン酸代謝関連酵素に関する研究、受付番号 372)、承認されている。

C. 研究結果

①微生物曝露による病態の増悪メカニズムにおける NSAIDs の関与について

鼻茸細胞を LPS にて刺激をしても、単独では有意な IL-5 および IL-13 の産生は誘導されなかった。一方、NSAIDs 曝露、すなわち DIC で前処置した場合には、鼻茸細胞は LPS の刺激に対しても有意な IL-5 および IL-13 の産生を示した。このサイトカイン産生は PGE₂ の添加により抑制された。

②NSAIDs 過敏副鼻腔炎における IL-22 の役割について

鼻茸および鉤状突起粘膜にはいずれも IL-22 の発現を認めた。鼻茸では非副鼻腔炎患者由来の鉤状突起に比較して IL-22mRNA 量が有意に亢進したが、鼻茸間では NSAIDs 過敏の有無では有意な差を認めなかった。鼻茸細胞はエンテロトキシン刺激に対して有意な IL-22 産生を示し、この産生は NSAIDs 添加により有意に抑制された。

③NSAIDs 過敏副鼻腔炎における AhR の発現について

鼻茸および鉤状突起粘膜にはいずれも AhR タンパクの発現を認めた。AhR の mRNA 発現量は鉤状突起粘膜に比較して鼻茸で有意に亢進した。鼻茸間での発現量を比較すると、

NSAIDs 過敏喘息患者由来鼻茸では NSAIDs 耐性喘息患者由来鼻茸と比較して AhR mRNA 発現量が有意に低下していた。

D. 考察

①微生物曝露による病態の増悪メカニズムにおける NSAIDs の関与について

今回の検討からは、鼻茸は TLR を介した微生物曝露による好酸球性炎症の惹起に対して、潜在的に NSAIDs 過敏であることが示唆された。さらに TLR を介した微生物曝露による NSAIDs 過敏に伴う気道好酸球性炎症の増悪メカニズムのひとつとして、内因性 PGE₂ の合成能低下が関与する可能性が考えられた

②NSAIDs 過敏副鼻腔炎における IL-22 の役割について

鼻茸

IL-22 の発現が特に喘息患者由来鼻茸で亢進していることが示され、NSAIDs 過敏の有無に関わらず IL-22 が Negative Regulator として作用している可能性が考えられた。鼻茸細胞のエンテロトキシン刺激による IL-22 産生は NSAIDs の添加により有意に抑制されたことから、NSAIDs 過敏の発現メカニズムのひとつとして IL-22 の産生抑制作用がある可能性が考えられた。

③NSAIDs 過敏副鼻腔炎における AhR の発現について

最近の報告では、AhR の活性化は Th17 細胞の増殖を抑制することや B 細胞の免疫グロブリン産生細胞への分化を抑制することが明らかとなっている (Esser C, et al. Trends Immunol 2009)。今回の結果からは、NSAIDs 過敏の発現メカニズムのひとつとして AhR の発現抑制に伴う過剰な免疫応答の惹起が関与する可能性が考えられた。

E. 結論

NSAIDs 過敏副鼻腔炎の病態に、COX 阻害による PGE₂ 産生低下や IL-22 産生抑制が重要であること、AhR の発現抑制に過剰な免疫応答の惹起が関与する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okano M, Fujiwara T, Haruna T, Kariya S, Makihara S, Higaki T, Nishizaki K. Role of fungal antigens in eosinophilia-associated cellular responses in nasal polyps: comparison with enterotoxin. *Clinical and Experimental Allergy* 41: 171-178, 2011.

2) Okano M, Fujiwara T, Higaki T, Makihara S, Haruna T, Noda Y, Kanai K, Kariya S, Yasueda H, Nishizaki K. Characterization of pollen antigen-induced IL-31 production by peripheral blood mononuclear cells in allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127: 277-279, 2011.

3) Eguchi M, Kariya S, Okano M, Higaki T, Makihara S, Fujiwara T, Nagata K, Hirai H, Narumiya S, Nakamura M, Nishizaki K. Lipopolysaccharide induces pro-inflammatory cytokines and chemokines in experimental otitis media through the prostaglandin D₂ receptor (DP)-dependent pathway. *Clinical and Experimental Immunology* 163: 260-269, 2011.

4) Hosoya K, Satoh T, Yamamoto Y, Saeki K,

Igawa K, Okano M, Moriya T, Imamura O, Nemoto Y, Yokozeki H. Gene silencing of STAT6 with siRNA ameliorates contact hypersensitivity and allergic rhinitis. *Allergy* 66: 124-31, 2011.

5) Makihara S, Okano M, Fujiwara T, Kimura M, Higaki T, Haruna T, Noda Y, Kanai K, Kariya S, Nishizaki K. Early interventional treatment with intranasal mometasone furoate in Japanese cedar/cypress pollinosis: a randomized placebo-controlled trial. *Allergology International* 61: 295-304, 2012.

6) Higaki T, Okano M, Fujiwara T, Makihara S, Kariya S, Noda Y, Haruna T, Nishizaki K. COX/PGE₂ axis critically regulates effects of LPS on eosinophilia-associated cytokine production in nasal polyps. *Clinical and Experimental Allergy* 42: 1217-1226, 2012.

7) Ohta N, Makihara S, Okano M, Kurakami K, Ishida A, Furukawa T, Suzuki Y, Watanabe T, Kakehata S, Aoyagi M. Roles of IL-17, Th1, and Tc1 cells in patients with IgG4-related sclerosing sialadenitis. *Laryngoscope* 122: 2169-2174, 2012.

8) Okano M, Fujiwara T, Makihara S, Fujiwara R, Higaki T, Kariya S, Noda Y, Haruna T, Nishizaki K. Characterization of IL-18 expression and release in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *International Archives of Allergy and Immunology* 160: 275-286, 2012.

9) Higaki T, Okano M, Makihara S, Fujiwara T, Haruna T, Noda Y, Kariya S,

Nishizaki K. Early interventional treatment with intranasal corticosteroids is superior to post-onset treatment in pollinosis. *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 109: 458-464, 2012.

10) Higaki T, Okano M, Kariya S, Fujiwara T, Haruna T, Hirai H, Murai A, Gotoh M, Okubo K, Yonekura S, Okamoto Y, Nishizaki K. Determining minimal clinically important differences in Japanese cedar/cypress pollinosis. *Allergolgy International* 62: 487-493, 2013.

11) Gotoh M, Yuta A, Okano M, Ohta N, Matsubara A, Okubo K. Severity assessment of Japanese cedar pollinosis using the practical guideline for the management of allergic rhinitis in Japan and the allergic rhinitis and its impact of asthma guideline. *Allergolgy International* 62: 181-189, 2013.

12) Hirai H, Kariya S, Okano M, Fukushima K, Kataoka Y, Maeda Y, Nishizaki K. Expression of toll-like receptors in chronic otitis media and cholesteatoma. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 77: 674-676, 2013.

13) Imoto Y, Tokunaga T, Matsumoto Y, Hamada Y, Ono M, Yamada T, Ito Y, Arinami T, Okano M, Noguchi E, Fujieda S. Cystatin SN upregulation in patients with seasonal allergic rhinitis. *PLoS One* 8: e67057, 2013.

2. 学会発表

1) 岡野光博. 免疫療法の有用性と限界-スギ花粉症治療の救世主となれるか-.第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 千葉. 2011 年

(シンポジウム) .

2) 岡野光博. 小児アレルギー性鼻炎における治療のポイント.第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 千葉. 2011 (教育セミナー) .

3) 岡野光博. スギ・ヒノキ花粉症に対する免疫療法. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 大阪. 2012 年 (シンポジウム) .

4) 岡野光博. アレルギー性鼻炎における鼻噴霧用ステロイド薬の位置づけ-早期介入の意義-.第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 大阪. 2012 年 (教育セミナー) .

5) 岡野光博. アレルギー性鼻炎の治療-点鼻ステロイドの利点. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜. 2013 年 (シンポジウム) .

6) 岡野光博. アレルギー性鼻炎における Minimal Persistent Inflammation. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京. 2013 年 (教育講演) .

7) 岡野光博. Th2 サイトカイン阻害薬の可能性. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京. 2013 年 (教育セミナー) .

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

好酸球性副鼻腔炎での呼気 NO の評価と IgE 抗体の関与について

研究分担者 春 名 眞 一 獨協医科大学耳鼻咽喉・頭頸部外科 教授
研究協力者 月 舘 利 治 獨協医科大学耳鼻咽喉・頭頸部外科 講師
吉 村 剛 獨協医科大学越谷病院耳鼻咽喉科 講師
中 山 次 久 獨協医大耳鼻咽喉・頭頸部外科 講師

研究要旨：

下気道において呼気 NO は、喀痰や血中の好酸球と相関を認めることから、気管支喘息における好酸球性炎症を評価するバイオマーカーである。そこで好酸球性副鼻腔炎の術前および術後の病態評価のために、呼気鼻 NO 測定を検討した。術前においては、鼻ポリープによる鼻腔閉鎖のため、重症度との相関はなかった。術後、各副鼻腔が開放された状態では、好酸球数と相関が認められ、上気道の評価に使用できる可能性が示された。

また、好酸球性副鼻腔炎での経口ステロイド薬以外の治療法を探索するために、喘息において有効性が指摘されている抗 IgE 療法の有効性について検討した。副鼻腔粘膜にも多数の IgE の存在が指摘され、抗 IgE 療法の有効性の可能性が想定された。

A. 研究目的

好酸球性副鼻腔炎は、喘息やアスピリン喘息を合併することが多く、治療として内視鏡下鼻内副鼻腔手術を施行しても予後不良であり、経口ステロイド薬のみが著効とされる。また臨床評価は自覚症状、鼻内内視鏡所見と CT が中心で、薬物治療の選択がなされている。しかしながら、粘膜線毛機能障害に対してサッカリンテストなどの呼吸粘膜改善機能で評価することが重要であるが簡便さに欠ける。最近では喘息病態の指標として NO の測定がルーチン化している。以前より副鼻腔粘膜から多量の NO が産生され、粘液線毛機能と関連すると報告される (Lundberg,1996)。呼気 NO (一酸化窒素) 濃度の測定は、気管支喘息における病態、重症度の判定のみならず、治療評価においてもその有用性は知られている。下気道において呼気 NO は、喀痰や血中の好酸球と相関を認めることから、気管支喘息における好酸球性炎症を評価するバイオマーカーである。一方、上気道においても、好酸球性炎症の評価としてのバイオマーカーとして期待されるが、

未だその評価に対しては十分確立されていない。喘息においての低侵襲で信頼性の高い NO 濃度を、術前および術後に検討した。

一方、病態には、副鼻腔粘膜に浸潤した多数の好酸球のみでなく、組織中の IgE 抗体の増多が指摘されている。すなわち、Nasal polyposis では staphylococcus aureus が存在し、その enterotoxin がスーパー抗原となり Th2 リンパ球を刺激して IgE 抗体産生を増強しているとされる。好酸球性副鼻腔炎では、肥満細胞の増加も指摘され、IgE と架橋してどのような病態形成しているかは不明である。近年、重症喘息における抗 IgE 療法の有効性が証明されている。術後の再燃に対して、経口ステロイド薬以外の治療法を求めて、喘息において有効性確率され保険収載されている IgE 抗体療法について上気道の評価を加えた。

B. 研究方法

慢性副鼻腔炎に対して内視鏡下鼻内手術を施行した 33 例を対象とした。除外症例とし

て片側性副鼻腔炎症例、再手術症例、喫煙者、アスピリン喘息症例、完全鼻閉で NO を測定しえなかった症例とした。検討項目は CT score (Zinreich method), Polyp score (0-4), 血清総 IgE 値, 血中好酸球数, 組織中 MBP 陽性細胞数 (鉤状突起), 気管支喘息, 通年性アレルギー性鼻炎とし、呼気 NO、鼻呼気 NO に影響を与える因子を重回帰分析で解析をした。携帯型 NO 測定器 (Nobreath, Bedfont 社) を用いて oral FeNO (呼気流速 50ml/秒) と nasal FeNO を口を閉じた状態で、呼気流速 50ml/秒で測定した。副鼻腔粘膜における NOS2 の発現を検討するために術中に採取し凍結保存した鉤状突起を用いて iNOS に対する免疫組織染色を施行した。一次抗体として NOS2 (Stanz Cruz Biotechnology, INC) を 400 倍の希釈率で反応させた。粘膜上皮下の NOS2 陽性浸潤細胞数をカウントした。

また慢性副鼻腔炎 (非好酸球性) と好酸球性副鼻腔炎の術後の呼気 NO 濃度を携帯型測定器 (NioxMino) で計測した。測定は安静呼気で呼気口腔と鼻腔経由の 2 つのルートで計測した。同時に血中および組織中好酸球数と血中総 IgE、内視鏡所見と CT 画像と比較した。術後に数回測定し、正常値以下になる場合にはステロイドを減量あるいは中止できるかもを評価した。

アスピリン喘息合併副鼻腔炎 (AIA sinusitis), 非アスピリン喘息合併副鼻腔炎 (ATA sinusitis), 喘息合併しない副鼻腔炎 (sinusitis) の各群における再燃例において、手術前後における鼻ポリープを採取して、好酸球数、IgE 抗体陽性数、肥満細胞数 (AA1 抗体陽性数)、Amphiregulin 陽性細胞数を比較した。同時に血中 IgE 値の推移も比較した。

(倫理面への配慮)

1. 本研究は大学倫理委員会の認可を得ている。
2. 患者には以下の内容を説明し、同意書を得る。

①採取組織は、手術時の病的粘膜であり、患者の不利益になることはない。

②採取した組織は、匿名化番号がつけられ、獨協医大耳鼻咽喉・頭頸部外科教室に保管する。

③研究用試料の遺伝子の状態や発現等の遺伝子についての測定ではなく、家系的に遺伝する遺伝子の特徴を見ることもない。

④協力に同意されなくても今後の治療や経過観察において、不利益になることはない。

C. 研究結果

1. 慢性副鼻腔炎術前の呼気 NO 濃度は喘息と血中好酸球数と有意な相関をみたが、アレルギー性鼻炎、血中総 IgE 値組織中 MBP 陽性細胞数、polyp score, CT score とは相関しなかった。一方、鼻呼気 NO 濃度は喘息と CT score に有意な相関を認めたが、アレルギー性鼻炎、血中総 IgE 値、血中好酸球数、組織中 MBP 陽性細胞数、polyp score とは相関しなかった。

鼻副鼻腔粘膜上皮下の NOS2 陽性細胞数は鼻呼気 NO 値に相関しなかった。一方、MBP 陽性細胞と鼻呼気 NO 値は有意な相関を示した。

2. 非好酸球性慢性副鼻腔炎と好酸球性副鼻腔炎の術後経過良好での鼻腔経由 NO は有意に好酸球性が高かった。

また、術後経過不良時では両者に有意差が認められ、好酸球性副鼻腔炎の良好例と不良例との間には有意差はないが増加する傾向が認められた。血中好酸球数と IgE と鼻腔経由 NO との相関が認められた。

3. AIA sinusitis (4 例)、ATA sinusitis (6 例)、sinusitis (6 例) における手術時に採取した鼻ポリープ中の組織学的結果は以下の結果となった。

	AIAsinusitis	ATAsinusitis	Sinusitis
血中好酸球数	8.43%	8.29%	6.45%
組織好酸球数(x400)	355	121	170
血清総 IgE 値	354	770	135
AA1 (x100)	49	62	88
Amphiregulin(x100)	2.55	1.2	1.5
組織 IgE (x100)	32	49	33

	AIAsinusitis	ATAsinusitis	Sinusitis
血中好酸球数	10.9%	6.75%	5.8%
組織中好酸球数 (x400)	197	217	110
血清総 IgE 値	312	677	118
AA1 (x100)	54	59	45
Amphiregulin(x100)	2.33	1.1	0.9
組織 IgE (x100)	44	39	28

D. 考察

1. 呼気 NO 値に関しては、これまでの報告と同様に血中好酸球数と喘息の合併が影響していた。慢性副鼻腔炎において、鼻呼気 NO は、CT における重症度や鼻茸の大きさと逆相関の関係にあると報告されている。

(Colantonio D, et al. Clin Exp Allergy. 2002;32:698-701. Ragab SM, et al. Allergy. 2006;61:717-24.) 検討においては、CT スコアだけではなく、喘息も鼻呼気 NO に大きな影響を与えていることが明らかになった。その理由として、副鼻腔自然孔が閉鎖されることにより、副鼻腔からの NO の排泄が阻害されるとされる。

上皮下 NOS2 陽性細胞数は好酸球炎症との関連は認められるものの、鼻呼気 NO との関連は認められなかった。従って、慢性副鼻腔炎の術前においては、鼻呼気 NO は、副鼻腔の好酸球性炎症のバイオマーカーとしては適当でない可能性がある。

2. 経過良好時の非好酸球性副鼻腔炎の鼻腔経路 NO の中央値は約 100ppB であり、口腔経路 NO の正常値が 50ppB であり、鼻腔経路 NO の正常値は 100ppB 前後であると予想された。全体の手術の NO と手術で採取した組織中の好酸球数とも有意な相関があり、好酸球浸潤の増減を反映していると考えられた。経過良好時の好酸球性副鼻腔炎の鼻腔経路 NO は有意に高い値を示し、内視鏡所見や CT で良好でも両者の粘膜機能に差異のあることが示唆された。術後経過不良時、好酸球性副鼻腔炎の鼻腔経路 NO は増加する傾向が認められ、同時に好酸球数も増加するので NO の増加は経過不良の指標になると考えられた。今後は、ステロイド等の薬物療法による病態の変動に伴い NO の変化を計測し、内視鏡所見や CT のみならず NO での病態が把握でき、術後治療の目安になるかを検討していく。

3. 手術時の好酸球数、肥満細胞数、組織 IgE 陽性細胞は 3 群ともに高値を示した。血中好酸球数は高いが、血清総 IgE 値は、好酸球数と相関はなかった。再燃時においても同様な結果が得られた。したがって、局所での IgE 抗体と肥満細胞が産生増加し、同時に好酸球増多を引き起こすことが、好酸球性副鼻腔炎の再燃に関与していることが示唆された。抗 IgE 療法（アマリズマブ）の適応は成人で血中 IgE 濃度が 30-700IU/mL となっており、今回の対照症例ではいずれの群も合致する。IgE 抗体における好酸球性副鼻腔炎の効果についての報告は散見のみだが、鼻症状の改善を示すが鼻ポリープの消失あるいは縮小を認めないとの結果である。さらに、中断することで再燃するとの報告もある。また、好酸球性中耳炎では、治療後に耳漏が改善し、気骨導が軽度改善したと報告される。

E. 結論

1. 術前の呼気 NO においては、以前の報告と同様に、好酸球炎症との関連が認められた。それに対して、鼻呼気 NO に関しては好酸球炎症との関連は認められなかった。しかし、鼻副鼻腔粘膜における NOS2 陽性細胞と MBP 陽性細胞は関連があることから、副鼻腔自然孔がポリープなどにより閉鎖することが、鼻呼気 NO の低下を来していると考えられた。

2. 一方、術後では、大きく各副鼻腔が開放され、呼気鼻 NO 濃度の上昇があり、病態把握の可能性が指示された。

3. 抗 IgE 療法は、重症喘息のみならず十分に好酸球性副鼻腔炎でも臨床的効果が期待でき、今後、多くの症例に抗 IgE 療法を適用して臨床的評価を行うべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshimura K, Kawata R, Haruna S, Moriyama H, et al. Clinical epidemiological study of 553 patients with chronic rhinosinusitis in Japan. Allergol Int. 2011 Dec;60(4):491-6.2011.

2) Majima Y, Kurono Y, Hirakawa K, Ichimura K, Haruna S, et al. Efficacy of combined treatment with S-carboxymethylcysteine (carbocysteine) and clarithromycin in chronic rhinosinusitis patients without nasal polyp or with small nasal polyp. Auris Nasus Larynx. 2012 Feb;39(1):38-47.2011.

3) Tsukidate T, Haruna S, et al. Long-term evaluation after endoscopic sinus surgery for chronic pediatric sinusitis with polyps. ANL39:583-7,2012.

4) Kuboki A, Haruna S. new technique using an energy-based device versus conventional technique in open thyroidectomy. ANL 40:558-62,2013.

2. 学会発表

1) Haruna S, Tsukidate T. Clinical management for eosinophilic sinusitis. Japan-Taiwan2011,12, Kobe.

2) Haruna S. Eosinophilic revision surgery and post operative treatment. ISLAN & IRS,2011,9,Tokyo.

3) Haruna S. Eosinophilic sinusitis and postoperative treatment. 2011.8, Seattle.

4) Haruna S. Workshop:Endoscopic sinus surgery including eosinophilic sinusitis or revision sinusitis.Toulouse.2012.6

5) 中山次久、春名眞一. 慢性副鼻腔炎における鼻呼気 NO 濃度の意義.第31回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会.倉敷.2013.2

6) Haruna S. Revision surgery and treatment of eosinophilic sinusitis 5th World Congress for endoscopic surgery of the brain,skull base & spine combined the first global update on FESS, the sinuses & the nose. Vienna.2012.3

7) Haruna S. (Revision) Endoscopic sinus surgery for Eosinophilic sinusitis. In JAPAN.Tokyo.2012.10

8) Haruna S. surgical management for chronic pediatric sinusitis with polyps. Seoul.2013.6

9) Haruna S. RHINOLOGY 「Foundations in 8」 Rhinoplastic and Nasal Airway Surgery」 Reconstruction of Septal Deviation. Maui. 2013.7

10) Haruna S. Endoscopic sinus surgery of frontal sinus disease.ARSR Tokyo.2013.9

11) Haruna S. Surgical management of Fungal Rhinosinusitis in Japan.Advanced nasal polyp and sinusitis.Shimane.2013.10.

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