

201324120A

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）

重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と 治療法確立に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤枝 重治

平成26(2014)年5月

目次		
I. 研究組織	-----	1
II. 総括研究報告		
1. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準と重症度分類 (JESREC Study)		
藤枝 重治	-----	3
III. 分担研究報告		
1. 発現を指標とした好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定に関する研究		
野口 恵美子	-----	13
2. 重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と治療法確立に関する研究		
玉利 真由美	-----	17
3. 好酸球性中耳炎における中耳貯留液の抗原特異的IgE抗体に関する研究		
飯野 ゆき子	-----	23
4. 慢性副鼻腔炎術後の呼気NO濃度に関する研究		
春名 眞一	-----	29
5. 慢性好酸球性炎症疾患の遺伝子解析と蛋白質解析に関する研究		
平川 勝洋	-----	33
6. イルソグラジンマレイン酸によるヒト鼻粘膜上皮バリア機能の変化に関する研究		
氷見 徹夫	-----	41
7. TLR3 を介した好酸球性副鼻腔炎の制御作用に関する研究		
岡野 光博	-----	45
8. 喘息を合併する慢性副鼻腔炎の難治化因子に関する研究		
吉川 衛	-----	49
9. 好酸球性副鼻腔炎に対する手術術式に関する研究		
鴻 信義	-----	53
10. 重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と治療法確立に関する研究		
三輪 高喜	-----	59
11. 重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と治療法確立に関する研究		
小林 正佳	-----	63
12. 好酸球性副鼻腔炎における IL-33 及びその受容体 ST2 の発現に関する研究		
近藤 健二	-----	65
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	71
V. 研究成果の刊行物・別刷	-----	81

I. 研究組織

研究代表者

藤 枝 重 治 福井大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学・教授

研究分担者

野口 恵美子 筑波大学医学医療系遺伝医学分野・教授

玉利 真由美 独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
呼吸器・アレルギー疾患研究チーム・チームリーダー

飯野 ゆき子 自治医科大学附属さいたま医療センター 耳鼻咽喉科・教授

石戸谷 淳一 横浜市立大学附属市民総合医療センター 耳鼻咽喉科・教授

春名 眞一 獨協医科大学医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科・教授

平川 勝洋 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学
・教授

氷見 徹夫 札幌医科大学医学部 耳鼻咽喉科学・教授

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

吉川 衛 東邦大学医学部 耳鼻咽喉科・准教授

鴻 信義 東京慈恵会医科大学 耳鼻咽喉科・准教授

浦島 充佳 東京慈恵会医科大学 分子疫学・教授

三輪 高喜 金沢医科大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学・教授

小林 正佳 三重大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学・准教授

近藤 健二 東京大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科・講師

意元 義政 福井大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科・助教

研究協力者

池田 浩己 日本赤十字社和歌山医療センター・耳鼻咽喉科

広田 朝光 理化学研究所統合生命医科学研究センター呼吸器・アレルギー疾患研究チーム

吉田 尚弘 自治医科大学附属さいたま医療センター・耳鼻咽喉科

金沢 弘美	自治医科大学附属さいたま医療センター・耳鼻咽喉科
佐久間 康德	横浜市立大学附属市民総合医療センター・耳鼻咽喉科
中山 次久	東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科
竹野 幸夫	広島大学大学院医歯薬保健学研究院 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学
石野 岳志	広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
野田 礼彰	広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
久保田 和法	広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
樽谷 貴之	広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
高野 賢一	札幌医科大学医学部・耳鼻咽喉科学
関 伸彦	札幌医科大学医学部・耳鼻咽喉科学
小笠原 徳子	札幌医科大学医学部・耳鼻咽喉科学
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
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
松脇 由典	東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科
浅香 大也	東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科
大櫛 哲史	東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科
寺口(山田)奏子	金沢医科大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
坂井田 寛	三重大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学
馬場 信太郎	東京大学医学部 耳鼻咽喉科学
平野 真希子	東京大学医学部 耳鼻咽喉科学
鈴川 佳吾	東京大学医学部 耳鼻咽喉科学
菊田 周	東京大学医学部 耳鼻咽喉科学
西寫 大宣	東京大学医学部 耳鼻咽喉科学
龍谷 領二	東京大学医学部 耳鼻咽喉科学
高林 哲司	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
意元 義政	福井大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科
富田 かおり	福井大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科
徳永 貴広	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
二之宮 貴裕	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

Ⅱ. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総括研究報告書

好酸球性副鼻腔炎の診断基準と重症度分類（JESREG Study）

研究代表者	藤 枝 重 治	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授
研究分担者	飯野 ゆき子	自治医科大学附属さいたま医療センター耳鼻咽喉科 教授
	春 名 眞 一	獨協医科大学 耳鼻咽喉・頭頸部外科学 教授
	平 川 勝 洋	広島大学大学院医歯薬保健学研究院耳鼻咽喉科学 教授
	氷 見 徹 夫	札幌医科大学 耳鼻咽喉科 教授
	岡 野 光 博	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉科 准教授
	吉 川 衛	東邦大学医学部耳鼻咽喉科 准教授
	鴻 信 義	東京慈恵会医科大学耳鼻咽喉科 准教授
	浦 島 充 佳	東京慈恵会医科大学分子疫学 教授
	近 藤 健 二	東京大学医学部耳鼻咽喉科 講師
	小 林 正 佳	三重大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科 准教授
	三 輪 高 喜	金沢医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授
	野 口 恵 美 子	筑波大学医学医療系遺伝医学分野 教授
	玉 利 真 由 美	理化学研究所統合生命医科学研究センター チームリーダー
	石 戸 谷 淳 一	横浜市立大学附属市民総合医療センター耳鼻咽喉科 教授
	意 元 義 政	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教
研究協力者	徳 永 貴 広	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 医員

研究要旨：

最近本邦では、好酸球浸潤優位の好酸球性副鼻腔炎（Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis: ECRS）が増加してきた。ECRS は鼻内視鏡手術とマクロライド療法に抵抗性であり、鼻茸が再発し易く、嗅覚障害を生じ、著しい QOL を障害する難治性疾患である。ECRS の診断は各施設で勝手に行われていたため、まずは的確な診断基準作成が急務とされていた。そこで本研究では、以下のように臨床スコアによる術前 ECRS の診断基準を作成した。両側の病変 3 点、鼻茸あり 2 点、篩骨洞優位な陰影 2 点、末梢血中の好酸球率 2-5%を 4 点、5-10%を 8 点、10%以上を 10 点として、各症例の臨床スコア 11 点以上を ECRS と診断するように決定した。感度 83%、特異度 66%、陽性的中率 62%、陰性的中率 85%であった。鼻茸組織中の好酸球数は、400 倍視野において 70 個以上で有意に再発率が高くなり、この数を確定診断とした。さらに重症度を反映する難治性因子として、末梢好酸球数 5%以上と CT にて篩骨洞優位な陰影の両方を認めれば、因子 A において 1 点、気管支喘息の合併・既往、アスピリンアレルギーの合併、NSAID アレルギー合併のいずれかを認めれば因子 B において 1 点として、因子 A と B の合計で、0 点は低リスク群、1 点は中等度リスク群、2 点は高度リスク群とした。非 ECRS 群では再発率 12.7%・難治率 3.3%、低リスク群：再発率 23.4%・難治率 11.7%、中等度リスク群：再発率 31.1%・難治率 16.6%、高度リスク群：再発率 51.8%・難治率 29.4%と 4 群間で有意な差を認めた。

治療に関しては、フィブリンを効率的に溶解させることが鼻茸の減少、ECRS の治療につなが

ることを見出し、安全性点からその候補としてナットウキナーゼを考えた。また L-plastin、IL-33 の受容体である ST-2 が浸潤好酸球に有意に発現しており、分子標的治療の可能性を見出した。Periostin、serpinB2、CLC 遺伝子も ECRS に関連していた。

A. 研究目的

本邦における鼻副鼻腔疾患は、ウイルス感染とそれに続発する細菌感染による好中球浸潤を主体とする炎症病変が中心であった。それに対し医療側は、抗菌薬の開発、マクロライド少量長期投与、内視鏡鼻副鼻腔手術 (ESS) の改良で対応し、治癒率を有意に向上させた。その一方で、アレルギー疾患の増加とともに難治性の好酸球浸潤を主体とする副鼻腔炎が増えてきた。森山・春名は、篩骨洞病変が主体、嗅覚障害が主訴、鼻茸の存在、鼻粘膜・血中好酸球増加を伴う好酸球性副鼻腔炎の疾患概念を提唱した (春名眞一, 他. 耳展 44(3):195-201, 2001)。この疾患は、成人発症であり気管支喘息の合併率が高く、ESS 後も鼻茸の再発を起しやすく、再度の手術を要する。また感覚神経障害 (嗅覚神経) を伴う特徴があった。

この好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) に対して唯一治療効果があるのはステロイド内服である。しかし本疾患が致死性疾患でないため、副作用を考慮し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、再発しやすいことかつ嗅覚障害の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となる。現在これらの疾患治療に悩む患者、臨床医の数は徐々に増加しているが、これまで大規模調査などは行われておらず、有病率、気管支喘息合併率などははっきりしたことは全くわかっていなかった。さらに的確な診断基準も存在しなかった。

平成 22 年度難治疾患克服事業において全国 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。この診断基準では、スコア 5 点以上が好酸球性副鼻腔炎であると判定すると、感度 76%、特異度 72%であった。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、主治医が診断をした症例から得られたものであった。

一方で、好酸球性副鼻腔炎にも重症度の違いが存在する可能性もわかってきた。すなわち鼻茸に好酸球が多数浸潤していても治癒する症例がある程度存在した。

そこで本研究では、研究分担者を増やし施設を追加するとともに、すべての症例の予後を追跡調査した。すなわち、「ECRS は難治性副鼻腔炎である」を定義し検討した。

B. 研究方法

2-1) 症例の登録

症例の多い都会を中心に 15 施設で共同研究を行った。平成 19 年 1 月 1 日から平成 21 年 12 月 31 日までの 3 年間で行った副鼻腔炎手術症例を抽出し、データシートを作成した。データシートは、個人を特定できる情報を削り、代わりに新しく符号を付けて作成した。症例の抽出は、鼻茸もしくは鼻粘膜の病理組織があるも

のとした。病理組織を福井大学に集め、同一医師により浸潤している好酸球数を 400 倍視野で計測した。1 症例あたり 3 ヲ所測定し、その平均値をとった。病理組織を運びだせない施設には、福井大学から同一医師を派遣した。広島大学、札幌大学の 2 施設は、測定する医師 1 名に十分スライドで説明し、自大学で測定した。

エンドポイントとして ESS 術後に鼻茸・副鼻腔炎の再発を認める（再発性）、術後処置や内服を行っても鼻茸・副鼻腔炎の状態が最終診断日に改善していない（難治性）を定義した。

2-2) 症例解析

データシートはすべて福井大学に集め、コンピューター入力した。すべての入力が終了した段階で、慈恵会医科大学・浦島医師に送り、解析を行った。解析は、各項目陽性症例数と陰性症例数、もしくは 3~4 段階を付け、再発、難治性に関し単変量 Cox 比例ハザードモデルで解析し、その後多変量 Cox 比例ハザードモデルで有意な項目を選出した。

組織中好酸球数に関して、特定の好酸球数以上・未満で再発、難治性で有意差が得られるところを cut-off 値とし、その値を調べた。そして cut-off 値以上群と未満の群で再度多変量解析し、step wise 法により変数を絞り込み ROC カーブを書き (AUC =0.8)、臨床上使いやすいように重み付けを整数として、有意な変数のみを残した。そして最終的な診断基準を決定した。

(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解析に関する研究」、「慢性副鼻腔炎に関する疫学調査と遺伝子解析研究」の題

名で各大学倫理委員会の承認を受け、本研究を行った。またデータシートの作成は、個人を特定できる情報を削り、代わりに新しく符号を付けた。血清・血球の使用に関しては、実験に使用することを患者に十分説明し、文書で同意を得た。試料や診療記録は、分析する前に住所、氏名、生年月日などの個人を特定できる情報を削り、代わりに新しく符号を付け、どこの誰の試料かがわからないようにした上で厳重に保管し、研究に使用した。

C. 研究結果

全国 15 施設および関連病院で平成 19 年 1 月 1 日~平成 21 年 12 月 31 日までの 3 年間に行った、病理組織がある慢性副鼻腔炎手術症例を抽出し、データシートを作成した。データシートは 3251 例集まり、解析した。症例数は札幌医大：185 例、獨協医大：200 例、自治医科大学附属大宮医療センター：122 例、慈恵会医大：655 例、順天堂大学：151 例、横浜市大：149 例、大阪医大：109 例、岡山大学：667 例、和歌山日赤：218 例、広島大学：253 例、島根医大：33 例、三重大学：105 例、東京大学：100 例、金沢医大：18 例、福井大学：286 例であった。これらの症例のうち、術前ステロイド内服があったり、不明だったりした症例、再発調査が不能あったり、観察期間が 28 日未満だったりした症例は除外した。最終的に 1716 例を解析対象とした。この症例数が診断基準作成のための重み付けを決定する上で、十分な症例数であることを確認した。

対象症例の再発率は、 Kaplan-Meier 法によると 72 ヲ月で 50%であった。最初の 1 年で 20%が再発し、次の 1 年で 10%、その後各年に 5%づつの再発率であった。

再発に関して単変量 Cox 比例ハザードモデルで有意だった項目は、40 歳以上、両側性、鼻茸あり、粘調な鼻汁あり、嗅覚障害、嗅裂閉鎖、末梢血中好酸球率、吸入抗原特異的 IgE 陽性、CT における篩骨洞優位な陰影、アスピリン喘息、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、薬物アレルギー (NSAIDs)、蕁麻疹の合併であった。さらに多変量 Cox 比例ハザードモデルで解析すると表 1 に示す結果であった。

表 1 再発に関与する有意な項目

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

症状に関する項目は、多変量解析にて消失してしまっ。具体的にあスピリンアレルギー合併の有無で鼻茸・副鼻腔炎無再発率を Kaplan-Meier 法で記載すると図 1 のようになり、アスピリンアレルギー合併症例では、4 年以内に全例再発を認めることが判明した。

気管支喘息の有無では図 2 のとおりであった。すなわち気管支喘息を合併しても 25% の症例では、再発を認めていない。

末梢血中の好酸球率による再発率の違いは、図 3 に示すとおり 5% を超えると有意に再発が多くなり、10% を超えると早い段階で再発を認めるが 4 年以降は 5% から 10% の群とほとんど違いが認められなかった。

図 1 アスピリン喘息の有無による経年的鼻茸無再発率

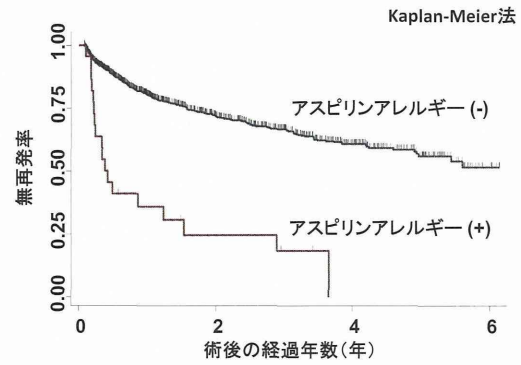


図 2. 気管支喘息合併経年的鼻茸無再発率

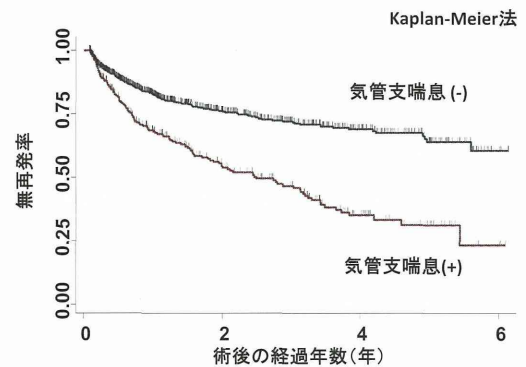
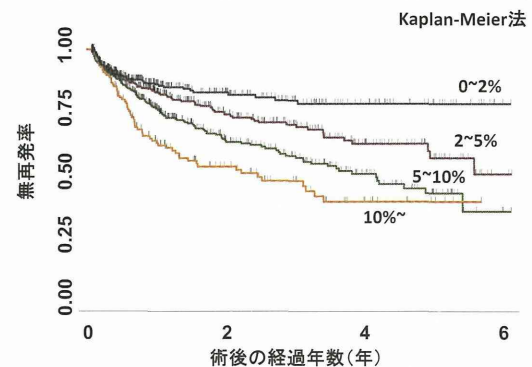


図 3 末梢血中好酸球率による経年的鼻茸無再発率



次に難治性に関しても同様に検討した。単変量 Cox 比例ハザードモデルで有意だった項目は、男性、鼻茸あり、嗅覚障害、嗅裂閉鎖、末梢血中好酸球率、CT における篩骨洞優位な陰影であった。これらの項目は再発とは異なっていた。さらに多変量 Cox 比例ハザードモデルで解析すると表 2 に示す結果であった。

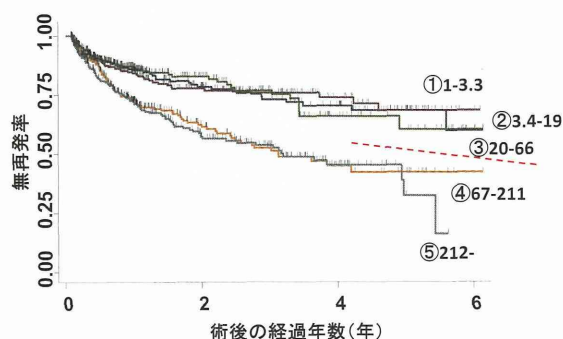
表2 難治性に關与する有意な項目

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

ここでも臨床症状は全て有意でなくなり、末梢血中の好酸球率5%以上とCTにおける篩骨洞優位な陰影のみとなった。

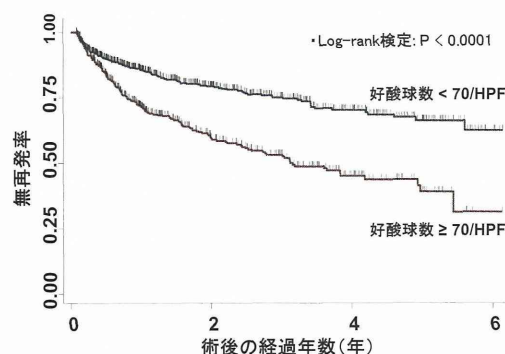
組織中の好酸球数に関しては、全ての症例を5等分して再発率を計算した。すなわち400倍1視野あたり好酸球が0-3.3個、3.4-19個、20-66個、67個-211個、212個以上の5群、各群の症例数は342から345例とした。その結果、図4に示すように67個以上の2つの群は66個以下の3つの群に比べて有意に再発率が高いことがわかった。

図4 組織中好酸球数別による鼻茸無再発率



組織中好酸球数が67個というのは、あまりに中途半端なので、70個で再度計算すると図5のようにさらに有意な差となった。

図5 組織中好酸球数:70個/HPFをカットオフとする



そこでこの組織好酸球数70個以上と未満を含めて再度再発、難治性に関し多変量解析をしたところ、有意な項目とはならなかった。

最終の解析として、組織中好酸球数が70個以上の群と未満の群にて群別をして、多変量解析後、step wise 法により変数を絞り込みROCカーブを書き (AUC = 0.8)、臨床上使いやすいように重み付けを整数として有意な変数のみを残した。その結果、好酸球性副鼻腔炎の最終診断基準項目は、両側性、鼻茸あり、CTにおける篩骨洞優位な陰影、末梢血中の好酸球率の4項目となった。それぞれの臨床スコアを表3に示す。

表3. 好酸球性副鼻腔炎診断基準

項目	スコア
病側：両側	3点
鼻茸あり	2点
篩骨洞優位な陰影	2点
末梢血中の好酸球率	
2-5%	4点
5-10%	8点
10%以上	10点

症例ごとの臨床スコア、11点以上を好酸球性副鼻腔炎とすると感度83%、特異度66%、陽性的中率62%、陰性的中率85%になった。

さらに重症度を反映する難治性因子として、因子 A と因子 B を作成した。因子 A は末梢好酸球数 5%以上と CT にて篩骨洞優位な陰影の項目であり、両方認めれば因子 A において 1 点する（片方では 0 点）。因子 B は気管支喘息の合併・既往、アスピリンアレルギーの合併、NSAID アレルギー合併であり、いずれかを認めれば因子 B において 1 点とする。因子 A と B の合計で、0 点は低リスク群、1 点は中等度リスク群、2 点は高度リスク群とした（図 6）。この 4 群間にて再発率と難治率を計算すると表 4 のようになった。4 群間にはいずれも有意差を認めた。

表 4 : ECRS 重症度分類

	再発率	難治率
非 ECRS	12.7%	3.3%
低リスク群	23.4%	11.7%
中等度リスク群	31.1%	16.6%
高度リスク群	51.8%	29.4%

最終診断は、手術などで採取された鼻茸や鼻粘膜において、400 倍視野で 70 個以上の好酸球浸潤を認めれば ECRS 確定とする。

ECRS に関連する遺伝子、蛋白の同定は、網羅的な解析を用いた。遺伝子解析から Periostin、SERPINB2、CLC 遺伝子が、蛋白解析から L-plastin が見つかった。候補遺伝子発現解析から ST2 が見出された。また詳細な免疫組織化学、機能解析から ECRS の鼻茸の特徴は、炎症による血管漏出蛋白による浮腫であり、凝固系・線溶系の制御異常から過度に形成されたフィブリン網が漏出した血漿タンパクを粘膜下に保持していることが判明した。す

なわちフィブリンを効率的に溶解させるもの、ナットウキナーゼがその候補であることが判明した。preliminary なデータでは 1 日 2 回の納豆摂取により、驚くほどの鼻茸の縮小化と鼻内所見の改善を認めた。

D. 考察

今回決定した最終の診断基準（表 3）は、全ての項目が耳鼻咽喉科専門医でなく、家庭医でもわかる項目となった。このことは大変価値がある。気管支喘息があり、鼻閉、嗅覚障害、粘調な鼻汁、鎮痛薬によるアレルギーなどの臨床症状があれば、採血で末梢血中の好酸球を調べるとともに CT を依頼し、その読影結果で ECRS と診断できる。診断できれば専門医にスムーズに紹介ができ、手術などの治療に移行する。

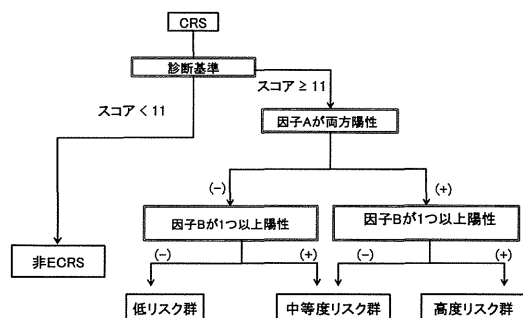
手術において再発と予後に関する患者への説明は極めて重要である。結果で述べたようにアスピリンアレルギー、NSAIDs アレルギー、気管支喘息合併、末梢血中好酸球率 5%以上、篩骨洞優位な陰影を認めれば、再発しやすいことを説明できるとともに、末梢血中好酸球率 5%以上、篩骨洞優位な陰影があれば重症例であり、術後に確実な経過観察、タイミングの良いステロイド追加治療が必要であることを示している。

経口ステロイド以外の治療薬については、抗 IgE 抗体、抗 IL-5 抗体などが有力な候補となりえる。またこれまでの基礎的研究から、線溶系、凝固系の異常が鼻茸形成に深く関与しており、ナットウキナーゼが突破口になる可能性が高いと考えている。

E. 結論

好酸球性副鼻腔炎は表3において合計スコアが11点以上を好酸球性副鼻腔炎と診断する。採取された鼻茸において400倍視野において70個以上の好酸球浸潤を認めれば確定する。図6のアルゴリズムに沿って、重症度分類を行う。

図6 ECRS重症度分類



F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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[Epub ahead of print]
- 2) 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, 132(3):584-592, 2013.
- 3) 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, 187(1):49-57, 2013.
- 4) Yoshikawa M, Wada K, Yoshimura T, Asaka D, Okada N, Matsumoto K, Moriyama H : Increased CXCL10 Expression in Nasal Fibroblasts from Patients with Refractory Chronic Rhinosinusitis and Asthma. Allergy International, 62:495-502, 2013.
- 5) Baba S, Kondo K, Kanaya K, Suzukawa K, Ushio M, Urata S, Asakage T, Kakigi A, Suzukawa M, Ohta K, Yamasoba T : Expression of IL-33 and its receptor ST2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyp. Laryngoscope, 2013, in press.
- 6) 藤枝重治, 坂下雅文, 意元義政, 徳永貴広, 二之宮貴裕 : 好酸球性副鼻腔炎の診断と治療. 日耳鼻 117:96-102, 2014.
- 7) 藤枝重治, 坂下雅文, 意元義政 : 好酸球性副鼻腔炎の疫学と診断. 耳鼻臨床, 106(6):477-484, 2013.
- 8) 馬場信太郎, 近藤健二 : 免疫と耳鼻咽喉科関連疾患の病態 好酸球性副鼻腔炎, JOHN

S, 29:503-506, 2013.

- 9) 藤枝重治 : 鼻副鼻腔炎. 山口徹, 等 (編) : 今日の治療指針. 2012, 医学書院, 1258, 2011.12
- 10) 藤枝重治 : アレルギー性鼻・副鼻腔炎 2) 病態・診断・疫学 小児科臨床 63(12):2659-2664, 2010.12.

2. 学会発表

- 1) Fujieda S: Diagnosis for eosinophilic chronic rhinosinusitis. The 12th Taiwan-Japan conference on otolaryngology-head and neck surgery. Symposium 2013. Taipei.
- 2) Fujieda S: Eosinophilic chronic rhinosinusitis. The 45th annual meeting of Korean Rhinology Society. 2013. Seoul.
- 3) Iino Y: Eosinophilic otitis media. The 7th International Symposium on Recent Advances in Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. 2013. Shimane.
- 4) Haruna S: Endoscopic eosinophilic revision surgery. Second European ENT Congress, 2013. Nice.
- 5) 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. 東京.
- 6) 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. 東京.
- 7) 藤枝重治 : 好酸球性副鼻腔炎診断の診断基準. 第52回日本鼻科学会総会・学術講演会 シンポジウム, 2013. 福井.
- 8) 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. 札幌.
- 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. 横浜.
- 10) 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回日本呼吸器学会, 2013. 東京.
- 11) 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. 倉敷.
- 12) 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, 2013.2.8. 倉敷.
- 13) 飯野ゆき子 : 上気道における好酸球性炎症性疾患のエビデンスと今後の展望. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2013. 倉敷.

- | | |
|--|--|
| <p>14) 金沢弘美, 吉田尚弘, <u>飯野ゆき子</u> : 好酸球性中耳炎における憎悪因子について. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2013. 倉敷.</p> <p>15) <u>飯野ゆき子</u> : 好酸球性中耳炎の発症のメカニズムと治療. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2013. 横浜.</p> <p>16) 原真理子, <u>飯野ゆき子</u>, 吉田尚弘, 金沢弘美, 新鍋晶浩, 長谷川雅世, 松澤真吾 : 当科において入院加療を行った好酸球性中耳炎症例. 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2013. 札幌.</p> <p>17) 金沢弘美, 原真理子, 松澤真吾, 長谷川雅世, 新鍋晶浩, 吉田尚弘, <u>飯野ゆき子</u> : 好酸球性中耳炎を重症・難治化させる危険因子について. 第23回日本耳科学会総会・学術講演会, 2013. 宮崎.</p> <p>18) <u>飯野ゆき子</u> : 好酸球性中耳炎の基礎と臨床. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2013. 東京.</p> <p>19) <u>春名眞一</u>, 中山元次 : 好酸球性副鼻腔炎の術後経過. 第52回日本鼻科学会総会・学術講演会, 2013. 福井.</p> <p>20) 馬場信太郎, <u>近藤健二</u>, 鈴木佳吾, 山嵜達也 : 好酸球性副鼻腔炎のポリープ中IgEレセプターとIgEクラススイッチの検討. 第31回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2013. 倉敷.</p> | <p>アスピリン喘息における分子標的治療
(出願予定)</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|--|--|

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

Ⅲ. 分担研究報告

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))
分担研究報告書

発現を指標とした好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定に関する研究

研究分担者 野口 恵美子 筑波大学医学医療系遺伝医学 教授
研究協力者 徳永 貴広 福井大学医学部耳鼻咽喉科 医員

研究要旨

好酸球性副鼻腔炎は難治性の副鼻腔疾患であるが、その病態についてはいまだ不明な点が多い。本研究では好酸球性副鼻腔炎、慢性副鼻腔炎患者の鼻茸から抽出した RNA を用いて最新の手法である RNA-Seq ならびにマイクロアレイ法を用いて好酸球性副鼻腔炎に特徴的な遺伝子群の同定を目的に解析を行っている。本年度はマイクロアレイ法を中心に解析を行い、好酸球特異的な遺伝子群の他に、複数の新規の候補遺伝子を同定した。

A. 研究目的

好酸球性副鼻腔炎は難治性の副鼻腔疾患であるが、その病態についてはいまだ不明な点が多い。本研究では最新の手法である RNA-Seq ならびにマイクロアレイ法を用いて好酸球性副鼻腔炎に特徴的な遺伝子群の同定を目的に解析を行い、病態解明にせまることを目的とする。

B. 研究方法

手術時に採取された好酸球性副鼻腔炎または慢性副鼻腔炎の鼻茸から RNA を抽出し、illumina totalprep rna amplification kit (Ambion) を使用してビオチン化 RNA を増幅した。増幅した RNA を使用して HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit(illumina) にハイブリ後、蛍光を Illumina® Beadstation 500(illumina) を使用してスキャンを行った。得られたデータは GenomeStudio software (illumina) で数値化した後に GeneSpring version 12 (Agilent) を使用して発現差が存在する遺伝子を抽出した。

(倫理面への配慮)

患者に対して研究に対する説明を行い、研究参加に対するインフォームドコンセントを取得した。本研究は福井大学および筑波大学の倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

使用したアレイの搭載されている 47321 プローブの抽出を以下の手順で行った。少なくとも慢性副鼻腔炎(5 例)と好酸球性副鼻腔炎(4 例)のサンプルのうち 1 つで発現している (24950)。慢性副鼻腔炎と好酸球性副鼻腔炎を比較して Fold change > 2.0(好酸球性副鼻腔炎で上昇 676、慢性副鼻腔炎で上昇 977)。P < 0.05 (427)。パスウェイ解析では特に慢性副鼻腔炎においてインターフェロン遺伝子が enrich されている結果が得られた (P = 6.0 x 10⁻⁵)。好酸球性副鼻腔炎では POSTN, SERPINB2, CLC など好酸球浸潤により上昇している可能性の高い遺伝子群と、好酸球に発現がみられない PSORS1C1 等の遺伝子が同定されている。

D. 考察

慢性副鼻腔炎においては特にインターフェロン関連の遺伝子が発現量の高い遺伝子として enrich されており、感染の関与が推察された。好酸球性副鼻腔炎について発現差が認められた遺伝子について、RNA-seq の結果とあわせて、特に好酸球と関連しない遺伝子群についてサンプル数を増やすとともに、realtime PCR 法によりバリデーションを行う予定である。慢性副鼻腔炎と分類された患者の中で、線毛の構造

E. 結論

慢性副鼻腔炎と比較して、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸に有意に高く(低く)発現している遺伝子群を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Imoto Y, Tokunaga T, Fujieda S, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies HLA-C in a Japanese Population. PLoS One 8:e80941.
- 2) Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, Yamada H, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N.

Asthma phenotypes in Japanese adults - their associations with the CCL5 and ADRB2 genotypes. Allergol Int 62:113-21.

- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) 野口恵美子. アトピー性疾患の感受遺伝子探索:次世代シーケンサの管理と今後課題 東京女子医科大学第9回 テニユアトラック教員支援セミナー
- 2) 野口恵美子. 「アトピー素因ってなんだろう」～アレルギーは遺伝するの?. 第30回日本難治性喘息・アレルギー疾患学会
- 3) 谷田貝洋平, 増子裕典, 山田英恵, 金子美子, 透坂, 飯島弘晃, 内藤隆志, 野口恵美子, 広田朝光, 玉利真由美, 檜澤伸之. 喘息関連遺伝子多型と血清総IgE値関連遺伝子多型のGWASによる比較. 第25回日本アレルギー学会春季学術大会 2013年5月 東京
- 4) 谷田貝洋平, 山田英恵, 金子美子, 増子裕典, 透坂, 野口恵美子, 飯島弘晃, 内藤隆志, 広田朝光, 玉利真由美, 檜澤伸之. 喘息の起源としてのアレルギー特異的IgE反応性の役割—GWASの結果による考察. 第63回日本アレルギー学会

ギー学会秋季学術大会 2013年11月 東京

5) 山田英恵, 谷田貝洋平, 増子裕典, 飯島弘晃,
内藤隆志, 透坂, 野口恵美子, 広田朝光, 玉利
真由美, 檜澤伸之. 健常人における一秒量, 一秒
率及び努力性肺活量における遺伝率の推定. 第
63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013
年11月 東京

6) 山田英恵, 谷田貝洋平, 金子美子, 増子裕典,
透坂, 野口恵美子, 飯島弘晃, 内藤隆志, 広田
朝光, 玉利真由美, 檜澤伸之. 日本人における
閉塞性換気障害に影響を与える遺伝因子. 第25
回日本アレルギー学会春季学術大会 2013年5
月 東京

7) 意元義政, 徳永貴広, 野口恵美子, 藤枝重治.
鼻粘膜上皮細胞における Cystatin SN の役割.
第63回日本アレルギー学会秋季学術大会
2013年11月 東京

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

重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と治療法確立に関する研究

研究分担者 玉利 真由美 理化学研究所 統合生命医科学研究センター
呼吸器・アレルギー疾患研究チーム チームリーダー
研究協力者 広田 朝光 理化学研究所 統合生命医科学研究センター
呼吸器・アレルギー疾患研究チーム 研究員

研究要旨

本研究は好酸球性副鼻腔炎の病態の科学的な解明を通じ、より良い予防法、治療法を確立することを目的とする。我々は鼻粘膜上皮をアルテルナリアで刺激し、マイクロアレイ解析を行い、発現が誘導される遺伝子群の同定を行った。その結果、インターフェロン誘導遺伝子である *IFIT1*、*IFIT3*、*CXCL10*、*CXCL11* の発現が強く誘導されていた。さらに本年度は慢性副鼻腔炎の内視鏡下副鼻腔手術患者における呼吸機能について検討を行い、気管支喘息の診断を受けていない高齢の患者で閉塞性換気障害 (FEV1/FVC, 一秒率 < 70%) が多数認められることを報告した (Allergol Int. 2014;63:27-35)。

A. 研究目的

好酸球性副鼻腔炎は嗅覚障害を主訴とし、難治再発性の副鼻腔炎である。しばしば重症気管支喘息を合併し、社会生活に影響をおよぼすことからその科学的な病態解明が待たれている。本研究は好酸球性副鼻腔炎の病態に関連する遺伝子群を同定し、疾患発症の機序を科学的に解明し、新しい治療法の開発へ向けてエビデンスを提示していくことを目的とする。近年、慢性副鼻腔炎において空中真菌のアルテルナリアに対する液性免疫が亢進していること、血中に IL-5、IL-13、IFN- γ 等、Th1 および Th2 サイトカイン陽性の CD4+T 細胞が増加していることが報告されている。

B. 研究方法

我々はヒト鼻粘膜上皮細胞を空中環境真菌であるアルテルナリア (50 μ g/ml) で4時間および10時間刺激し、mRNAを抽出、3' IVT Express kitを用いcDNAを合成した。マイクロアレイ (Human U133 Plus2.0 Chip) により発現の変動を検討した。
山梨大学耳鼻咽喉科で内視鏡下副鼻腔手術を受けた

210名の慢性副鼻腔炎患者の臨床情報について検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

C. 研究結果

マイクロアレイにより発現を検討した。気道上皮細胞において、アルテルナリア刺激によりインターフェロン誘導遺伝子である、無刺激状態と10時間後を比較し、*IFIT1*、*IFIT3* がそれぞれ9.8倍、2.2倍増加していた。また、*CXCL10*、*CXCL11* もそれぞれ3.1倍、3.4倍増加していた。

臨床情報の検討では気管支喘息の診断をうけていない鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎患者の13%に、さらに末梢血好酸球数5%以上の患者に絞り込むと20%の患者で閉塞性換気障害 (一秒率 < 70%) を認めた。気管支喘息の診断をうけていない60歳以上の末梢血好酸球数5%以上の鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎患者患者では50%