

厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患等実用化研究事業(免疫アレルギー-疾患等実用化研究事業(免疫アレルギー-疾患実用化研究分野))
委託業務成果報告(業務項目)

アスピリン喘息患者における難治性鼻茸メカニズムに関する検討

担当責任者	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	高 林 哲 司	福井大学医学部	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	助教
	鈴 木 弟	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
	徳 永 貴 広	福井大学医学部	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	医員

研究要旨：

アスピリン喘息は非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)に対する過敏症状で、これらの摂取により鼻閉、呼吸困難などの上下気道の症状が引き起こされる。易再発性で難治性の鼻茸、重症の喘息症状が特徴であるがその病態の解明はまだ十分ではなく新規の治療法の開発が切望されている。

本疾患における鼻茸は病理組織学的には著明な組織浮腫の遷延によって形成されている。組織の浮腫は炎症や障害によって形成されるが、通常数日で消退する。なぜアスピリン喘息において組織の浮腫が遷延するのかは、良く分かっていない。

我々は、鼻茸組織における浮腫の遷延化が、正常な創傷治癒の過程に何らかの障害が起きた結果生じているという仮説をもとに、鼻茸における創傷治癒に関する分子生物学的検討を行った。その結果、鼻茸組織では、通常の鼻粘膜に比べて著明に線溶系が低下しており、フィブリン網の過剰な形成が起きていることが分かった。フィブリン網の過剰な形成が鼻茸における浮腫の遷延化に強く関与し、局所における炎症が持続すると考えられた。

鼻茸や副鼻腔炎の炎症は、組織における線溶系の異常によって生じており、これらをコントロールすることによって、アスピリン喘息に対する新規治療法の開発につながる可能性が示唆された。

A．研究目的

アスピリン喘息は成人喘息の10%を占め、その症状も重症であり、治療も困難であることが多い。アスピリン喘息の症状は通常上気道である鼻症状が先行し、病期の進行とともに下気道に及ぶことが知られている。鼻症状は主に粘膜の著明な浮腫性の変化によって生じた鼻茸によるものであるが、手術でこれらの病変を除去することによって、アスピリン喘息における下気道の症状が改善し、さらに血中や尿中のCysLT濃度が低下することが最近の研究で分かってきた。つまりアスピリン喘息の病態には鼻副鼻腔の病変が深く関与しており、これらの病態メカニズムを解明することは、本疾患の新しい治療法の開発につながる可能性がある。難治性鼻茸の病理組織学的な特徴は、著明な好

酸球浸潤を伴う組織の浮腫の異常な遷延化であるが、組織における浮腫が長期間にわたって持続する原因はほとんど分かっていない。組織の浮腫は創傷治癒過程の初期に、炎症によって末梢血管の透過性が亢進し、血漿蛋白が漏出することによって生じるものである。今回の検討では、難治性の鼻茸において、創傷治癒の初期段階で組織の浮腫に重要な役割を果たしている線溶系について分子生物学的な検討を行った。

B．研究方法

手術によって採取した鼻粘膜組織を、正常鼻粘膜、通常の慢性副鼻腔炎の鼻粘膜、難治性鼻茸に分類した。組織からRNAを抽出し

(NucleoSpin® RNA)、cDNA を合成した (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits)。蛋白の抽出には BULLET BLENDER BLUE を用いて組織をホモジナイズし溶解液(PBS supplemented with 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich))に懸濁後遠心分離によって上清を分離した。

鼻粘膜組織におけるフィブリン網の形成と、フィブリン網の分解に関する線溶系に関する分子の発現および好酸球のマーカーとして ECP の検討をおこなった。

これらの検討には免疫組織化学、リアルタイム PCR、ELISA の手法を用いた。

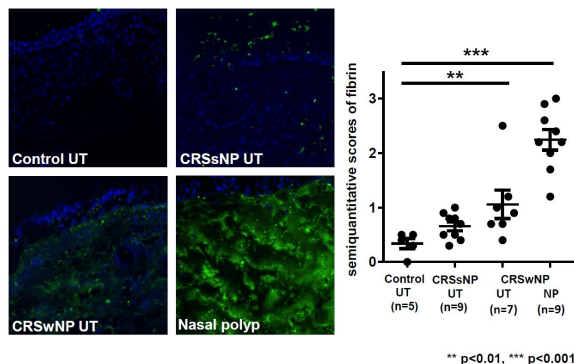
鼻茸上皮の線溶系に及ぼす影響を検討するためにヒト気管支上皮細胞 (NHBE)およびヒト鼻粘膜上皮細胞 (NEC) を用いて、サイトカイン刺激 (IL-4: 0, 10, 100ng/ml, IL-13: 0, 10, 100ng/ml) を行い、urokinase-plasminogen activator, tissue plasminogen activator の発現量をリアルタイム PCR、ELISA の手法を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

患者から同意を得て組織サンプルを採取し、サンプルから個人が同定されないようサンプルは記号化して管理を行っている。

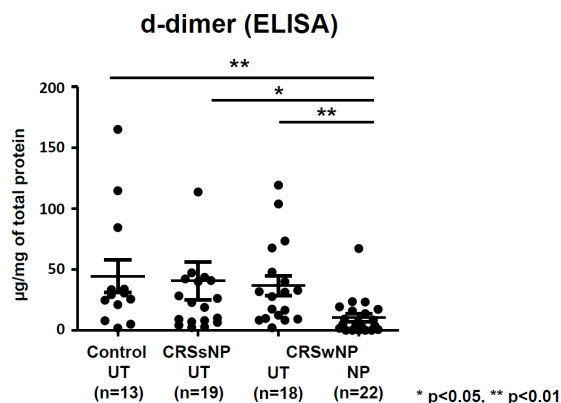
C . 研究結果

図 1



鼻茸 (Nasal polyp) の粘膜下組織には過剰なフィブリン網の形成が認められ (緑蛍光)、半定量化による検討で有意差が認められた。

図 2



鼻茸 (Nasal polyp) においてフィブリン網の分解産物である d-dimer の量が有意に減少している。この結果は鼻茸組織において線溶系が低下していることを示唆している。

図 3

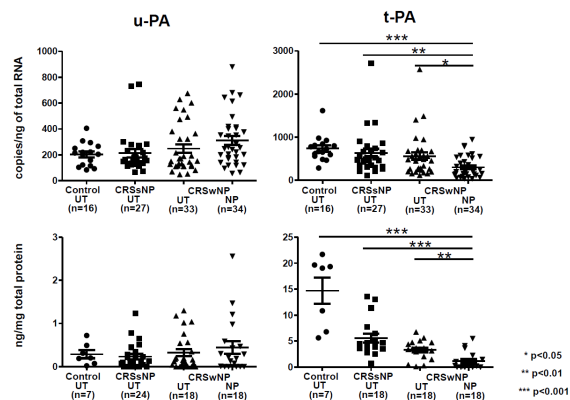
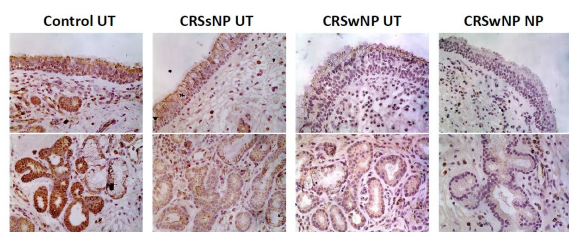


図 3 は線溶系を正に制御する u-PA (urokinase-plasminogen activator) と t-PA (tissue-plasminogen activator) の発現量を測定したもので上段が mRNA, 下段が蛋白のデータである。

鼻茸 (Nasal polyp) 組織においては t-PA の発現量が mRNA, 蛋白の両方で著明に低下していた。

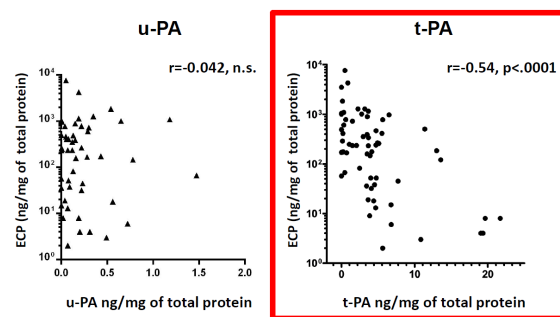
この結果は t-PA の発現量の低下によって鼻茸 (Nasal polyp) における線溶系を抑制させ、これが組織におけるフィブリン網の過剰な沉着に関連している可能性が示唆された。

図 4



t-PA 免疫組織化学によって t-PA は鼻粘膜の上皮細胞と腺細胞に発現していることが分かった。リアルタイム PCR と ELISA のデータと同様に鼻茸 (Nasal polyp) において t-PA の発現量が少ないことが分かった。

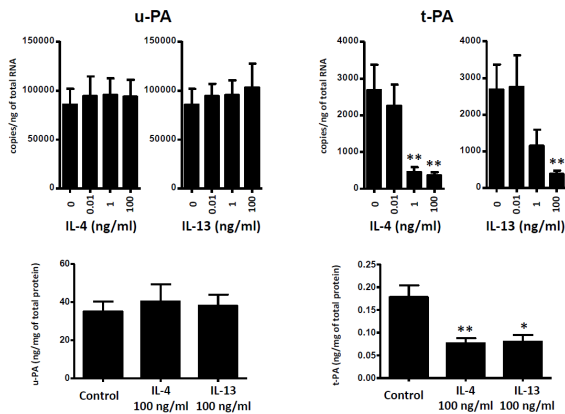
図 5



* ECP: Eosinophilic cationic protein

鼻粘膜における好酸球のマーカーである ECP と t-PA の発現量は逆相関の関係にあることが分かった。好酸球炎症は鼻粘膜における t-PA の発現を負に制御する可能性が示唆された。

図 6



Th2 サイトカインである IL-4 と IL-13 の刺激によってヒト気管支上皮細胞 (NHBE) における t-PA の発現量が mRNA (上段) レベル、および蛋白 (下段) レベルの両方で有意に低下する。u-PA の発現量には影響を及ぼさなかった。ヒト鼻粘膜上皮細胞 (NEC) においても同様の結果が得られた。

D . 考察

今回の我々の検討で難治性鼻茸において線溶系が低下することによって、組織のフィブリン網の過剰な蓄積が誘導され、これが浮腫の遷延化の原因であることを明らかにした。

フィブリン網自身にも炎症細胞を遊走させる働きがあるため、フィブリン網が過剰に形成されることは炎症の遷延化にも直接関与していると考えられる。

線溶系を正に制御する u-PA と t-PA のうち t-PA の発現が鼻茸組織において有意に減少していることが分かった。更に t-PA の発現量は好酸球の浸潤と有意に負の相関関係にあることから Th2 炎症が鼻茸組織における t-PA の発現を抑制し、線溶系を低下させることによってフィブリン網の過剰な蓄積を来しているのではないかと考えられた。

ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) やヒト鼻粘膜上皮細胞 (NEC) を用いた検討において Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 が t-PA の発現量を抑制することから、アスピリン喘息における難治性鼻茸の形成には Th2 環境による鼻粘膜上皮からの t-PA 産生の低下が深く関与しているものと思われる。

E . 結論

難治性鼻茸における組織の著明な浮腫の遷延化が、t-PA 量の減少による、線溶系の著明な抑制によるものであることを今回の検討によって明らかにした。アスピリン喘息において鼻茸や副鼻腔の粘膜病変をコントロールすることが本疾患の新しい治療法開発の重要な鍵となる可能性がある。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Ogi K, Takabayashi T, Sakashita M, Susuki D, Yamada T, Manabe Y, Fujieda S. Effect of Asian sand dust on Japanese cedar pollinosis. *Auris Nasus Larynx*. 41(6):518-22, 2014.1.

2) 藤枝重治, 坂下雅文、徳永貴広. 好酸球性副鼻腔炎 (JESREC Study) . *アレルギー* 64(1):38-45, 2015.1

3) 藤枝重治:酸球性副鼻腔炎は日本独自の疾患概念なのだろうか? *アレルギー・免疫* 22(1):11-15, 2015.1

4) Kanno M, Yazawa T, Kawabe S, Imamichi Y, Usami Y, Ju Y, Matsumura T, Mizutani T, Fujieda S, Miyamoto K. Sex-determining region Y-box 2 and GA-binding proteins regulate the transcription of liver receptor homolog-1 in early embryonic cells. *Biochim Biophys Acta*. 1839(5):406-14, 2014.3.

5) Tamari M, Saeki H, Hayashi M, Umezawa Y, Ito T, Fukuchi O, Nobeyama Y, Yanaba K, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Fujieda S, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Hirota T. An association study of 36 psoriasis susceptibility loci for psoriasis vulgaris and atopic dermatitis in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 76(2):156-7, 2014.11.

6) Kimura Y, Chihara K, Honjoh C, Takeuchi K, Yamauchi S, Yoshiki H, Fujieda S, Sada K. Dectin-1-mediated signaling leads to characteristic gene expressions and cytokine

secretion via spleen tyrosine kinase (Syk) in rat mast cells. J Biol Chem. 289(45):31565-75, 2014.11.

7) Hayashi M, Nakayama T, Hirota T, Saeki H, Nobeyama Y, Ito T, Umezawa Y, Fukuchi O, Yanaba K, Kikuchi S, Nakagawa H, Tsunemi Y, Shibata S, Sato S, Tada Y, Miyatake A, Fujieda S, Tamari M. Novel IL36RN gene mutation revealed by analysis of 8 Japanese patients with generalized pustular psoriasis. J Dermatol Sci. 76(3):267-9, 2014.12.

8) Okamoto M, Iguchi T, Hattori T, Matsuzaki S, Koyama Y, Taniguchi M, Komada M, Xie MJ, Yagi H, Shimizu S, Konishi Y, Omi M, Yoshimi T, Tachibana T, Fujieda S, Katayama T, Ito A, Hirotsune S, Tohyama M, Sato M. DBZ Regulates Cortical Cell Positioning and Neurite Development by Sustaining the Anterograde Transport of Lis1 and DISC1 through Control of Ndel1 Dual- Phosphorylation. J Neurosci. 35(7): 2942-58, 2015.2.

2 . 学会発表

1) 高林哲司：好酸球性副鼻腔炎の病態形成における好酸球と肥満細胞の相互作用に関する検討.第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2015.2

2)高林哲司：好酸球性副鼻腔炎の病態形成における分子生物学的検討.第 53 回日本鼻科学会総会・学術講演会, 好酸球シンポジウム 2014.9

3) T. Takabayashi, R. Schleimer, S. Fujieda: Excessive fibrin deposition in patents with

CRSwNP. European Respiratory Society Symposium: basic research in rhinosinusitis 2014.6

4) 高林哲司、岡本昌之、富田かおり、藤枝重治：好酸球性副鼻腔炎の病態における肥満細胞と気道上皮の相互作用について.第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2014.5

5) 藤枝重治：好酸球性副鼻腔炎の基礎と臨床. 第 115 回日本耳鼻咽喉科総会・学術講演会 2014.5

6)藤枝重治：好酸球性副鼻腔炎（JESREC Study）. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014.5

7)藤枝重治：好酸球性副鼻腔炎. 第 1 回 日本総合アレルギー講習会 2014.12

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