

201442076A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

重症好酸球性副鼻腔炎に対する新しい治療戦略

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 藤枝 重治

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））による委託業務として、国立大学法人福井大学長眞弓 光文が実施した平成26年度「重症好酸球性副鼻腔炎に対する新しい治療戦略」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

好酸球性副鼻腔炎の診断基準と重症度分類の決定、患者数の推定に関する研究

藤枝 重治 ----- 1

II. 委託業務成果報告（好酸球性副鼻腔炎治療に関する臨床研究）

1. 重症好酸球性副鼻腔炎に対する新しい治療戦略

高林 哲司 ----- 5

2. 次世代シーケンサーを用いたWhole transcriptome解析（RNA-seq）による
好酸球性副鼻腔炎の解析

徳永 貴広 ----- 9

3. 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

4. 副鼻腔炎の遺伝要因に関する研究

玉利 真由美 ----- 15

5. 好酸球性中耳炎の聴力推移と中耳粘膜に関する研究

飯野 ゆき子 ----- 19

6. 重症好酸球性副鼻腔炎の診断に関する研究

佐久間 康徳 ----- 23

7. 好酸球性副鼻腔炎はなぜ両側性病変を呈するか

春名 眞一 ----- 25

8. 重症好酸球性副鼻腔炎に対する新しい治療戦略

平川 勝洋 ----- 27

9. ヒト鼻粘膜バリアにおけるmicroRNAの役割に関する研究

氷見 徹夫 ----- 31

10. 鼻茸線維芽細胞のPGD2に対するVEGF産生に関する研究

岡野 光博 ----- 35

1 1. 喘息を合併する慢性副鼻腔炎における組織中periostinの解析	吉川 衛	37
1 2. 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	41
1 3. 慢性副鼻腔炎におけるT細胞の検討に関する研究	岡本 美孝	45
1 4. 多重代入法による臨床データ解析に関する研究	浦島 充佳	47
1 5. 鼻茸マウスモデルの作成に関する研究	神田 晃	49
委託業務成果報告（好酸球性副鼻腔炎治療に関する探索研究）		
1 6. 好酸球性副鼻腔炎鼻ポリープ由来の培養構成細胞からのサイトカインの分泌に関する研究	池田 勝久	53
1 7. 好酸球性副鼻腔炎における嗅覚障害の予後因子に関する研究	三輪 高喜	55
1 8. 好酸球性副鼻腔炎による嗅覚障害に関する研究	小林 正佳	59
1 9. 好酸球性副鼻腔炎の病態生理と発症メカニズムの解析	近藤 健二	61
2 0. 嗅覚障害を呈する慢性副鼻腔炎に関する研究	都築 建三	67
III. 学会等発表実績		73
IV. 研究成果の刊行物・別刷		99

I. 委託業務成果報告（総括）

平成 26 年度 厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))
委託業務成果報告(総括)

好酸球性副鼻腔炎の診断基準と重症度分類の決定、患者数の推定に関する研究

業務主任者 藤 枝 重 治 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授

研究要旨：
1990 年代後半から増加してきた好酸球性副鼻腔炎に関し、大規模多施設疫学研究 (Japanese Epidemiological Survey of Refractory Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis Study: JESREC Study)を行い、両側病変、鼻茸あり、CT 所見、血中好酸球比率からなる臨床スコア (JESRE スコア) による簡便な診断基準を作成した。さらに JESREC スコア、アスピリン不耐症、NSAIDs アレルギー、気管支喘息の合併症、CT 所見、血中好酸球比率による重症度分類も決定した。この診断基準および重症度分類であれば、耳鼻咽喉科専門医でなくても好酸球性副鼻腔炎を容易に診断できる。このアルゴリズムにより、早期に手術を含めた専門的治療を行える施設への紹介が可能となった。4 段階の重症度分類は、術後の鼻茸再発と有意に相関し、最も易再発性かつ難治性の重症好酸球性副鼻腔炎は全国に約 2 万人いることが判明した。

①好酸球性副鼻腔炎治療に関する臨床研究
飯野ゆき子：自治医科大学附属さいたま医療センター・教授
佐久間康徳：横浜市立大学附属市民総合医療センター・講師
春名眞一：獨協医科大学・教授
平川勝洋：広島大学大学院医歯薬保健学研究院・教授
氷見徹夫：札幌医科大学・教授
岡野光博：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
吉川 衛：東邦大学医学部・教授
鴻 信義：東京慈恵会医科大学・教授
岡本美孝：千葉大学大学院医学研究院・教授
大久保公裕：日本医科大学大学院医学研究科・教授
浦島充佳：東京慈恵会医科大学・教授
徳永貴広：福井大学医学部・医員
上谷幸男：福井大学医学部附属病院・薬務主任
野口恵美子：筑波大学医学医療系・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
神田 晃：関西医科大学・講師

②好酸球性副鼻腔炎治療に関する探索研究
池田勝久：順天堂大学医学部・教授
三輪高喜：金沢医科大学・教授
小林正佳：三重大学大学院医学系研究科・准教授

近藤健二：東京大学大学院医学系研究科・講師
都築建三：兵庫医科大学・講師

A. 研究目的

これまで日本における慢性副鼻腔炎は、好中球浸潤が主体で、内視鏡鼻副鼻腔手術とマクロライド少量長期投与にてかなり治療成績が向上してきた。しかし 1990 年代後半からそれらの治療に抵抗性を示し、易再発性の難治性副鼻腔炎が増加してきた。この副鼻腔炎は、成人発症で、嗅覚障害を伴い、両側に鼻茸があり、篩骨洞優位の陰影があった。末梢好酸球も多く、気管支喘息やアスピリン不耐症の合併もあった。このような副鼻腔炎の粘膜には多数の好酸球浸潤が認められていたため、好酸球性副鼻腔炎と命名された。好酸球性副鼻腔炎は、徐々に増加傾向を示してきたが、好酸球性副鼻腔炎の概念、診断基準はあまり明確に普及していかなかった。

気管支喘息やアスピリン不耐症では、上気道炎症の制御すなわち鼻副鼻腔炎の制御によって、下気道の治療効果や臨床状態により良い効果があることが知られていた。しかし呼吸器専門医や家庭などは、好酸球性副鼻腔炎などの診断基準を知らないために、なんとなく鼻疾患がありそうだけでも、そこには目をつむり喘息治療のみを継続し、芳しい効果が得られず、内服や経口ステロイドの量を増加させていた現実があった。そのようなコントロール不良の患者に対して、また医療効率

に関し利益を供与できる手段としても、好酸球性副鼻腔炎の概念、診断基準の確立が望まれていた。

B. 研究方法

調査は、各施設において平成 19 年 1 月 1 日から平成 21 年 12 月 31 日の 3 年間に行った病理組織がある慢性副鼻腔炎に対する内視鏡下鼻副鼻腔炎手術症例 (ESS 症例) を抽出し、各種臨床データを検討した。計 3251 例の解析データシートが集まった。平均年齢 52 歳、5 歳から 93 歳まで幅広い分布であった。主治医が好酸球性副鼻腔炎の診断をした症例は 28% であった。臨床データシートは、年齢、病変、術前の内服状況、コルチコステロイドの使用 (経口・点鼻)、鼻茸の有無、粘調な鼻汁、後鼻漏、嗅覚障害、耳症状、骨導閾値上昇、嗅裂閉塞、喫煙状況、末梢血検査データ、抗原特異的 IgE、CT 所見、合併症からなる。さらに全症例の病理標本において 400 倍顕微鏡下 1 視野あたり浸潤している好酸球を福井大学にて計測した。

3251 症例においてコルチコステロイドの内服や点鼻は、好酸球浸潤を減少させるので、術前にステロイド使用があったり、不明だったりした症例は除外した。また再発調査が不可能あったり、観察期間が 28 日未満だったりした症例も除外した。最終的に 1716 例が解析対象症例となった。この症例数が解析に十分であることは、統計学的に確認した。好酸球性副鼻腔炎は、易再発性で難治性であると定めたので、ESS 後再発をした症例を再発性あり、最終診察日に治癒していなかった症例 (症状が存在していた症例) を難治性ありと定義し、検討した。最長 6 年の予後を調査した。

再発性に有意に関連する因子、難治性に有意に関連する因子は、多変量 Cox 比例ハザードモデルで解析した。診断に関しては、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。各症例において、この有意な変数の総和を JESREC スコアとして用いることとした。

(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での倫理委員会承認を得て行った。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。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、匿名化した上で厳重に保管し、研究に使用した。

C. 研究結果

好酸球性副鼻腔炎の診断基準は、JESREC スコアで決定した。

好酸球性副鼻腔炎診断基準 (JESREC スコア)

表 1 項目

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% 以下	4 点
5-10% 以下	8 点
10% を超える	10 点

各症例の JESREC スコア 11 点以上で、生検もしくは手術で得られた組織標本において、400 倍視野で好酸球数が 70 個以上認められる場合を好酸球性副鼻腔炎の確定診断とした。

JESREC スコア 11 点以上では、感度 83%、特異度 66%、陽性的中率 62%、陰性的中率 85% であった。

再発性に関し、1) アスピリン不耐症合併、2) NSAIDs アレルギー合併、3) 気管支喘息合併、4) 血中好酸球率 10% を超える、5) 篩骨洞優位な陰影が有意な因子であった。難治性に関しては、1) 血中好酸球率 5% を超える、2) 篩骨洞優位な陰影が有意な因子であった。

そこで以下のようなアルゴリズムを作成した。

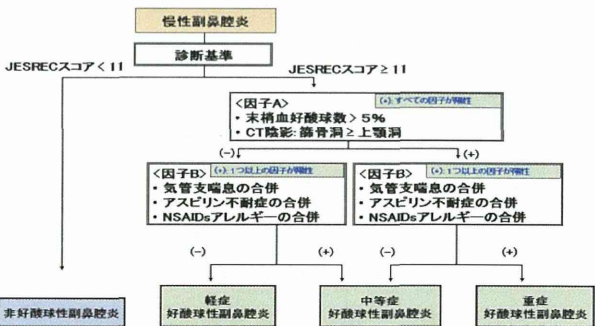
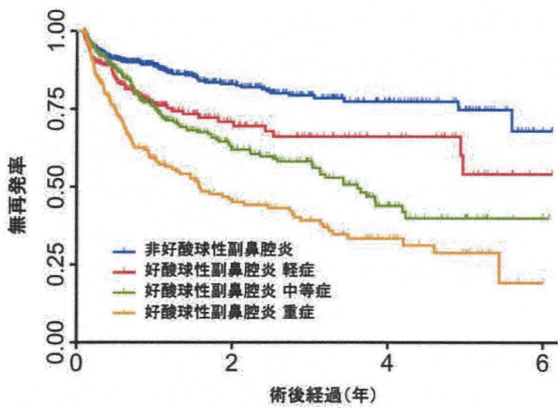


表 2:好酸球性副鼻腔炎の重症度分類別再発率と難治率

	再発率	難治率
非好酸球性副鼻腔炎	12.7%	3.3%
軽症好酸球性副鼻腔炎	23.4%	11.7%
中等症好酸球性副鼻腔炎	31.1%	16.6%
重症好酸球性副鼻腔炎	51.8%	29.4%

無再発率を Kaplan-Meier 法を用いて計算すると以下のようなグラフになる。4 群間には有意な差を認める。



対象症例 1548 名に関し、この 4 つの分類に分けると非好酸球性副鼻腔炎 700 名 (45.2%)、軽症 265 名 (17.1%)、中等症 386 名 (24.9%)、重症 197 名 (12.7%) であった。このことから全国の年間に視鏡下鼻副鼻腔手術は、約 16000 件あるので、全国で重症 2000 人が手術を受けていることになる。慢性副鼻腔炎の患者が 100～200 万人とされている。好酸球性副鼻腔炎患者は、約 20 万人、そして重症好酸球性副鼻腔炎患者が 2 万人と推測される。

D. 考察

今回、JESREC スコアを用いた診断基準を完成させた。重症度分類は、合併症と末梢好酸球率と CT の篩骨洞陰影優位で行い、再発率、難治率で 4 群間に有意な差を認めた。

これまでの日本における慢性副鼻腔炎の分類は、1)慢性副鼻腔炎 鼻茸あり・鼻茸なし
2)好酸球性副鼻腔炎 鼻茸あり・鼻茸なしであったが、以下のように変更できる。

- 慢性副鼻腔炎
- 鼻茸なし
 - 鼻茸あり
- 非好酸球性副鼻腔炎
- 好酸球性副鼻腔炎
- 軽症
- 中等症
- 重症

今後、これを啓蒙していく予定である。

E. 結論

好酸球性副鼻腔炎に関し、病理組織を必要としない簡便な診断法と重症度分類ができるアルゴリズムを作成できた。また新しい慢性副鼻腔炎の分類法を提唱した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) 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
- 2) 藤枝重治.好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
- 3) 徳永貴広、坂下雅文、二之宮貴裕、意元義政、富田かおり、森川太洋、藤枝重治: 好酸球性副鼻腔炎の診断基準. アレルギー・免疫. 22(1):22-28, 2015.1
- 4) 藤枝重治: 慢性副鼻腔炎 Progress in Medicine 34(10):1745-1750, 2014.10.
- 5) 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(2): 96-102. 2014.2.
- 6) 藤枝重治、坂下雅文、徳永貴広、他: 好酸球性副鼻腔炎の診断基準:JESREC Study. 日鼻誌. 53(1): 75-76. 2014.1.
- 7) 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.

8) 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.

9) Yamada T, Saito H, Fujieda S. Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. *J Allergy Clin Immunol*. 133(3):632-9.e5. 2014.3.

10) Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, Fujieda S, Matsushita K, Yoshimoto T. Nasal sensitization with ragweed pollen induces local-allergic-rhinitis-like symptoms in mice. *PLoS One*. 9(8):e103540. 2014.8.

11) 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.

12) 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.

13) 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

14) Ishii-Mizuno Y, Umeki Y, Takahashi Y, Kato Y, Takabayashi T, Fujieda S, Takakura Y, Nishikawa M. Nasal delivery of Japanese cedar pollen Cryj1 by using self-gelling immunostimulatory DNA for effective induction of immune responses in mice. *J Control Release*. 2015 Feb 28;200:52-9.

15) 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) 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

2) 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

3) 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

Ⅱ. 委託業務成果報告

(好酸球性副鼻腔炎治療に関する臨床研究)

重症好酸球性副鼻腔炎に対する新しい治療戦略

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：

好酸球性副鼻腔炎は著明な好酸球浸潤を特徴とした副鼻腔の炎症性疾患で近年世界規模で増加傾向にある。従来の中球炎症主体の副鼻腔炎に比べ嗅覚障害や喘息の合併が多く、薬物療法に抵抗性を示し、手術を行っても再発率が極めて高いため新規の治療法が切望されている。

本疾患の治療を最も困難にしているのは易再発性の鼻茸であるが、鼻茸形成の詳細なメカニズムはまだ解明されていない。鼻茸は組織学的に著明な浮腫によって形成されその内容は主に血漿蛋白のアルブミンである。同じ鼻腔の疾患であるアレルギー鼻炎では炎症の際に末梢血管から漏出した蛋白は速やかに鼻粘膜上皮を通過して鼻腔に放出され鼻汁となるのに対し、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸においては上皮を通過することなく鼻粘膜に保持され過度の浮腫が遷延化している原因となっている。我々は鼻茸組織における浮腫の遷延化は、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元に、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、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸では、フィブリン網が過剰に形成され、それは凝固系が異常に亢進している結果生じている可能性を示唆する結果を得た。近年組織における凝固系の亢進は炎症、特に Th2 炎症と深く関与することが報告されており、フィブリン自体も炎症細胞の遊走因子としての働きがあることから過剰なフィブリン網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原因であると考えた。

好酸球性副鼻腔炎における鼻茸の形成は、組織における凝固系の異常亢進の結果過剰なフィブリン網が形成されること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、本疾患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

好酸球性副鼻腔炎は近年工業化に伴うアレルギー疾患の増加に伴い世界規模で増加傾向にある。日本においても10数年前までは好中球炎症主体の副鼻腔炎がほとんどであり、手術療法や薬物療法が非常に有効であった。特に日本においてはマクロライドの少量持続療法は副鼻腔炎の標準治療として普及した。好酸球性副鼻腔炎は嗅覚障害や喘息などの合併が多く、症状が重症であり、マクロライドを含めた薬物療法に非常に抵抗し、手術後の再発率も極めて高い。ステロイドの内服や点鼻の効果も限定的で副作用の面からも長期に投与することは困難であり新規の治療法が切望されている。

本疾患の治療を困難にしている鼻茸形成の詳

細なメカニズムはまだ解明されていない。鼻茸は組織学的に著明な浮腫によって形成されその内容は主に血漿蛋白のアルブミンである。同じ鼻腔の疾患であるアレルギー鼻炎では炎症の際に末梢血管から漏出した蛋白は速やかに鼻粘膜上皮を通過して鼻腔に放出され鼻汁となるのに対し、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸においては上皮を通過することなく鼻粘膜に保持され過度の浮腫が遷延化している。

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凝固因子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 BIUE 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と、フィブリン網の形成に関与する凝固系に関する分子に関してマイクロアレイを用いて検討した。マイクロアレイの結果を元にその発現について検討を行った。

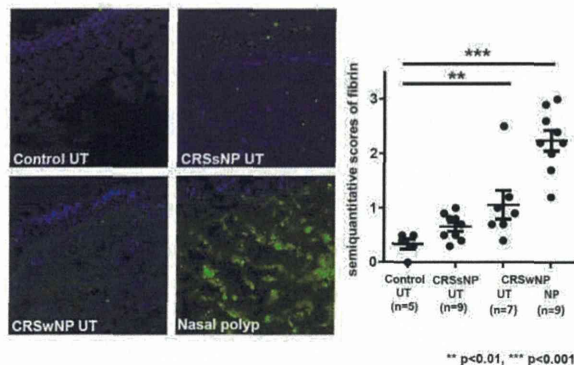
これらの検討には免疫組織化学、リアルタイム PCR、ELISA の手法を用いた。

(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。

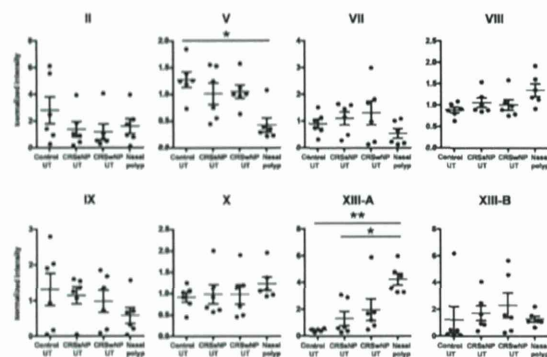
C. 研究結果

図 1



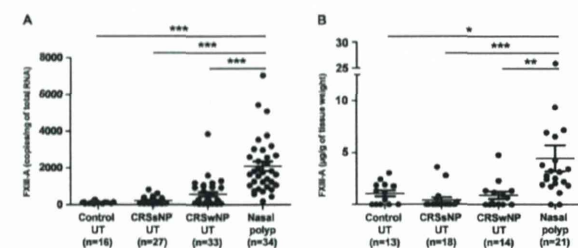
鼻茸 (Nasal polyp) の粘膜下組織には過剰なフィブリン網の形成が認められ (緑蛍光)、半定量化による検討で有意差が認められた。

図 2



鼻粘膜組織のマイクロアレイ解析による凝固因子の発現。凝固因子 XIII A が鼻茸組織に多く発現している。

図 3

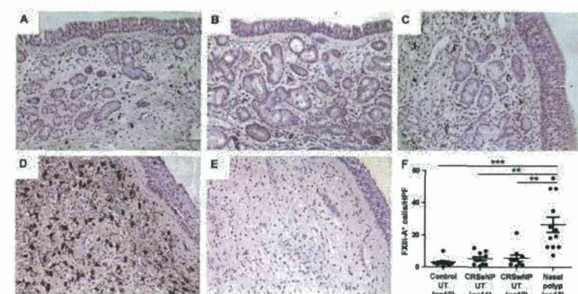


凝固因子 FXIII A の鼻粘膜組織における発現量の検討 (右 mRNA, 左蛋白)

鼻茸 (Nasal polyp) 組織においては FXIII A の発現量が mRNA, 蛋白の両方で著明に増加していた。

この結果は凝固系の最終段階でフィブリン網の結合をより強固にする FXIII A の発現量の増加が鼻茸 (Nasal polyp) におけるフィブリン網の過剰な沈着に関与している可能性が示唆された。

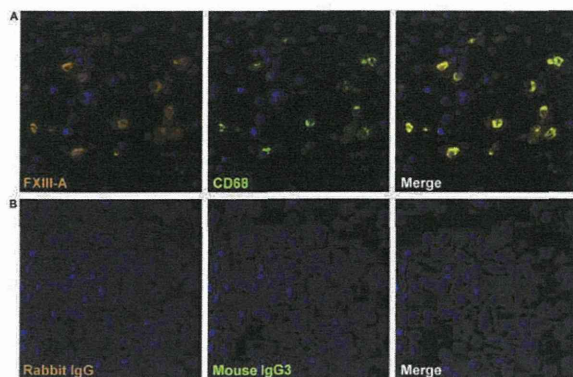
図 4



FXIII A 免疫組織化学

鼻茸 (Nasal polyp) において FXIII A 陽性の炎症細胞の浸潤が著明に増加している。

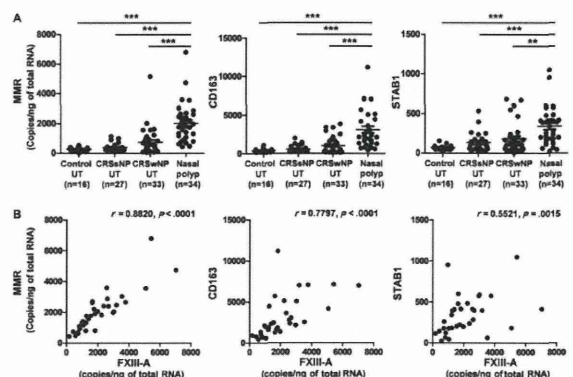
図5



鼻茸におけるFXIII-Aの蛍光免疫染色

鼻茸(Nasal polyp)においてFXIII-A陽性細胞はマクロファージのマーカであるCD68陽性細胞であることからマクロファージがFXIII-Aは発現していることが示唆された。

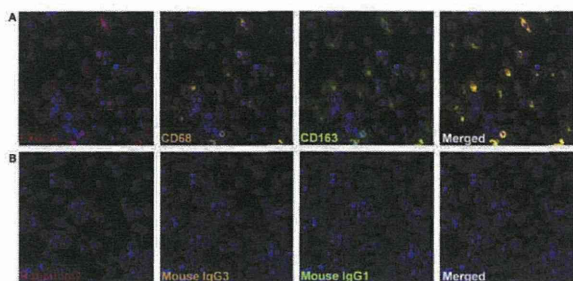
図6



鼻粘膜組織におけるM2マクロファージの発現(qPCR)とFXIII-Aとの相関

鼻茸(Nasal polyp)組織においてM2マクロファージの発現が有意に増加しており、それぞれ3つのマーカーがFXIII-Aの発現量と正の相関関係にあった。この事はFXIII-Aを発現している細胞がM2マクロファージである可能性を示唆する結果である。

図7



鼻茸(Nasal polyp)組織におけるFXIII-AとM2マクロファージの蛍光免疫染色

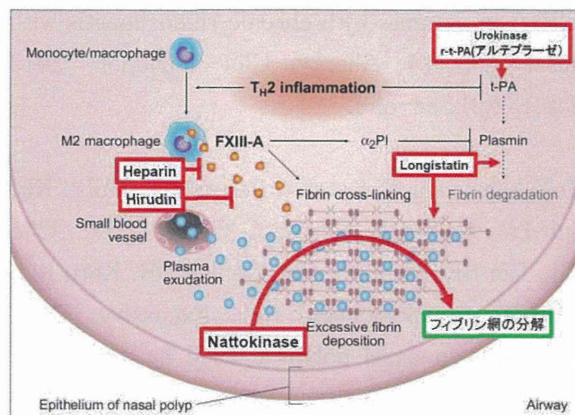
FXIII-AはM2マクロファージのマーカであるCD163に陽性であることから鼻茸(Nasal polyp)組織におけるFXIII-A陽性細胞がM2マクロファージであることが分かった。

D. 考察

今回の我々の検討で好酸球性副鼻腔炎の鼻茸組織においてフィブリン網の過剰な沈着が認められ、これが血漿漏出蛋白を保持することによって組織の浮腫が遷延する原因であることを示唆する研究結果を得た。また好酸球性副鼻腔炎に多く浸潤が認められるM2マクロファージに発現する凝固因子FXIII-Aが増加することにより凝固系が亢進し、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。

図8



今回の結果を踏まえて好酸球性副鼻腔炎の治療に使える可能性のあるものを図8に示した。

- 1)フィブリン網の分解を行う線溶系を正に制御する蛋白:ウロキナーゼ、リコンビナントt-PA(アルテプララーゼ)、ダニの唾液に含まれる酵素であるLongistatinが候補に挙げられる。
- 2)フィブリン網の合成を行う凝固系を正に制御する蛋白:ヘパリン、蛭の唾液に含まれる酵素であるHirudinが候補に挙げられる。
- 3)フィブリン網を直接分解する働きがある蛋白:納豆に含まれる酵素、Nattokinaseには凝固系抑制効果と線溶系亢進作用の両方がある。

E. 結論

好酸球性副鼻腔炎の鼻茸における組織の著明な浮腫の遷延化は、鼻粘膜組織におけるフィブリン網の過剰な沈着によるものであることが分かった。このフィブリン沈着は凝固因子 FXIIIa が鼻茸に多数浸潤する M2 マクロファージに発現しており、これによる凝固系の著明な更新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。

今回の結果を踏まえた上で好酸球性副鼻腔炎の治療には凝固系の制御、または線溶系の抑制、フィブリン網の分解などの作用を持つ分子が可能性として考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

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 Jan 1;187(1):49-57.

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) Takabayashi T, Schleimer, R, Fujieda S : 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.

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

次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析(RNA-seq)による
好酸球性副鼻腔炎鼻茸の解析

担 当 責 任 者	藤 枝 重 治	福井大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 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 医員
	高 林 哲 司	福井大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
	野 口 恵 美 子	筑波大学 遺伝医学 教授

研究要旨：

好酸球性副鼻腔炎についての遺伝子発現解析は、病態の解明や新たな診断・治療の確立に重要な役割を果たすが、本疾患においては未だ十分な解析がなされていない。我々は 15 の共同研究施設及び協力機関において術後の再発性についての疫学的解析を行い、好酸球性副鼻腔炎の診断基準を作成した。その結果を基に、好酸球性副鼻腔炎を定義し、その鼻茸における Whole transcriptome (RNA-seq)を、次世代シーケンサー(NGS)を用いて行い、新規トランスクリプトを同定した。その結果、好酸球性副鼻腔炎群において特異的に差があり、かつ有意差のあった遺伝子が 12 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、好酸球性副鼻腔炎が注目されている。

我々は、本研究で好酸球性副鼻腔炎の難治・再発性を分類するアルゴリズムを作成した。今後行うべきことは、新しい治療法の開発であるが、その方法として好酸球性副鼻腔炎の難治性と遺伝子発現との関連を解析する。この方法は、病態の解明や新たな診断・治療の確立に重要な役割を果たすが、本疾患においては未だ十分な解析がなされていない。

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。本研究では、好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸におけるWhole transcriptome

(RNA-seq)をNGSを用いて行い、新規トランスクリプトを同定することを目的とした。

B. 研究方法

対象は当科で ESS を行った症例で、前述の診断基準を用いて、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例を検討した。

鼻茸から 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™ 5500xl (LifeTechnologies 社)を用いてシーケンスを行い、Lifescope™ 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。

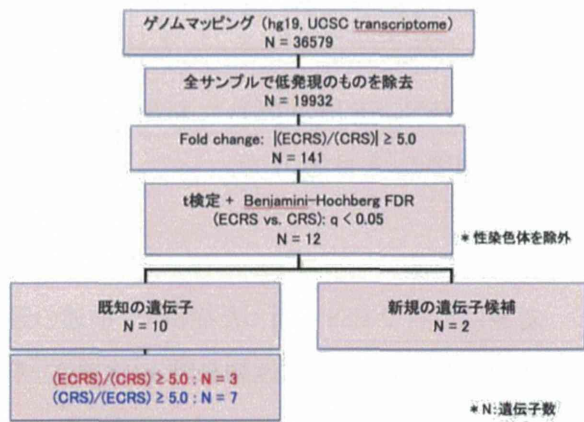
(倫理面への配慮)

本研究は福井大学倫理委員会の承認を得て、被験者への説明・同意は文書で実施した。

C. 研究結果

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。これら 12 個の遺伝子のうち既知の遺伝子は 10 遺伝子、新規の遺伝子候補は 2 個であった(図 1)。

図 1. ECRS 対 non-ECRS の発現差解析フローチャート



既知の遺伝子のうち、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遺伝子の内、過去の報告で末梢血好酸球に発現がない遺伝子として TRPV3 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3)が同定された。(表 1)

Real-time PCR や組織免疫染色にて結果の追認を行ったところ、TRPV3 は鼻茸組織に浸潤している好酸球に多く発現し、さらに末梢血好酸球にも発現していることがわかった。すなわち、RNA-seq を行うことによって、今までのマイクロ

レイでは発現を指摘できなかった TRPV3 が好酸球に発現していることを示すことができた。

TRPV3 は6回膜貫通型陽イオンチャネルであり、活性化すると Ca イオンが細胞内に流入し、その刺激で TGF-αが放出され、EGFR を介した反応が亢進すると報告されている。この TRPV3 を介した TGF-α・EGFR 反応系の亢進が、ECRS の難治性に関与している可能性がある。

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。

表 1. Fold change : ECRS で高発現を正、non-ECRSで高発現を負とした。Eosinophil:マイクロレイでの末梢血好酸球における発現(P: 発現あり、A: 発現なし、N.A.: データなし)

(既知の遺伝子)					
Gene	Locus	Gene Type	Fold change	q-value	Eosinophil
高発現 (Fold change>5.0)					
SIGLEC8	chr19	protein coding	7.76	0.047	P
TRPV3	chr17	protein coding	5.81	0.045	A
GPR97	chr16	protein coding	5.56	0.047	P
低発現 (Fold change<-5.0)					
LOC285141	chr2	protein-coding	-5.41	0.045	N.A.
HABP2	chr10	protein-coding	-6.22	0.045	A
GGDC153	chr11	protein-coding	-6.59	0.046	N.A.
LOC100652764	chr1	miscRNA	-6.79	0.030	N.A.
SCG3	chr15	protein-coding	-7.57	0.030	A
LRRIC18	chr10	protein-coding	-9.98	0.046	A
C1orf129	chr1	protein-coding	-11.47	0.030	N.A.
(新規遺伝子候補)					
Gene	Locus	Fold change	q-value		
低発現 (Fold change<-5.0)					
New gene A	chr7	-6.73	0.045		
New gene B	chr9	-7.26	0.045		

E. 結論

難治性の好酸球性副鼻腔炎に対して、Whole transcriptome 解析を行い、疾患関連遺伝子の候補を同定した。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) 徳永貴広、坂下雅文、二之宮貴裕、意元義政、富田かおり、森川太洋、藤枝重治: 好酸球性副鼻腔炎の診断基準. 好酸球性副鼻腔炎の診断

基準. アレルギー・免疫. 2015; 22(1): 22-28.

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2報). 第33回日
本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2015.2. 東
京

2) 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

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

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

担当責任者 野口 恵美子 筑波大学遺伝医学 教授
研究協力者 徳永 貴広 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 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 RNAseq 法を中心に解析を行い、マイクロアレイでは同定困難な新規関連遺伝子を同定した。

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。本報告では RNA-seq の結果を示す。

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、Total RNA から ribosomal RNA を除去後、SOLiD Total RNA-seq kit (Lifetechnologies)を使用してシークエンスライブラリーを作成した。Emulsion PCR で増幅後、SOLiD5500xl (Lifetechnologies)を使用してシークエンスを行った。解析は、LifeScope version 2.5.1 でマッピング後、Avadis NGS を使用してシークエンスデータの解析を行った。

(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

好酸球性副鼻腔炎において、高発現 (Fold change

>5) の遺伝子が 3 遺伝子、低発現 (Fold change < -5) のものが 7 つ同定された。高発現の遺伝子のうちの 2 つについては好酸球に発現していることが確認されているものであった。残りの 1 つの遺伝子については好酸球における遺伝子発現はほとんど認められないものである。リアルタイム PCR によっても発現の上昇が確認されており、個体を使用した免疫染色によっても組織における該当遺伝子の発現が確認された。

D. 考察

マイクロアレイではプローブがあらかじめ配置されているため、すべてのトランスクリプトを検出することはできない。一方、RNA-Seq は原理的にスプライスバリエーションを含めた全てのトランスクリプトを検出できるため、今まで検出されていない疾患関連遺伝子の同定につながる可能性がある。今回検出された遺伝子はマイクロアレイ法では検出されていないものであり、本手法の有効性が示されたことになる。今後サンプル数を増やすとともに、同一個人の非罹患部位と比較した検討を行う予定である。

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

なし

2. 学会発表

1) 野口恵美子. 次世代シーケンサーとアレルギー疾患:どのように使えるのか?(シンポジウム). 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014年5月 東京 2014.

2) 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. 健常人における吸入抗原のアレルギー感作に対するゲノム網羅的関連解析(ミニシンポジウム). 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014年5月 東京 2014.

3) 意元義政, 徳永貴広, 野口恵美子, 藤枝重治. スギ花粉症の感作・発症にかかわる遺伝子の機能解析(シンポジウム). 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014年5月 東京 2014

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

副鼻腔炎の遺伝要因に関する研究

担当責任者	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

慢性副鼻腔炎は粘性や膿性鼻汁、鼻閉、後鼻漏、嗅覚障害などの症状を 8 週間以上有する頻度の高い疾患である。そのうち粘膜やポリープに好酸球浸潤を伴う副鼻腔炎症例は高率に気管支喘息を合併し、難治性で再発を繰り返すことから、その病態解明および新たな治療法や予防法の開発が待たれている。本研究は症例対照関連解析による遺伝要因の解明を通じて病態の理解を深めることを目的とする。本年は副鼻腔炎症例計 424 例のゲノムを抽出した。現在、ゲノムワイド関連解析(Genome-wide association study, GWAS)で同定された気管支喘息とアレルギー性鼻炎の関連領域の遺伝子多型について、ケース 424 例およびコントロール 901 例を用いて症例対照関連解析を行っている。気管支喘息の GWAS で報告された TSLP の遺伝子多型と副鼻腔炎との強い関連を認めた。今後、鼻茸の有無や好酸球数等、臨床病態による層別化解析も行っていく。

A. 研究目的

本研究は慢性副鼻腔炎およびその関連形質(鼻茸の有無、末梢血好酸球数、気管支喘息合併等)の遺伝要因の解明を行うことにより、それらの科学的な病態解明を目的とする。近年、GWAS の手法を用い、気管支喘息やアレルギー性鼻炎など、気道の炎症性疾患において病態関連遺伝子が多数同定されてきた。本年度はこれまで GWAS で同定されたそれらの関連領域にある遺伝子多型と副鼻腔炎の病態との関連について検討した。

B. 研究方法

これまで気管支喘息の大規模 GWAS で同定された IL1RL1/IL18R1, HLA-DQ, IL33, SMAD3, ORMDL3/GSDMB, GSDMA, IL2RB, SLC22A5, IL13, RORA, IKZF4, TSLP, GATA3, NOTCH4, LOC729675, GAB1, PYHIN1, IL1RL1, TSLP, IL33, GSDMB, HLA-DPB1, IL6R, LRRC32 領域内の遺伝子多型について、またアレルギー性鼻炎の大規模 GWAS で同定された HLA, C11orf30/LRRC32, TMEM232/SLCA25A46, ENTPD6, SEMA6A, CLEC16A, IL2, PPM1A/DHRS7, GLI3, EPS15,

DNAH5, TMEM108, CROCC, ABL2, TSLP, TLR6, NOD1 領域内の遺伝子多型について検討を行っている。計 424 例の副鼻腔炎症例と 901 例のコントロールについて Invader 法を用いてタイピングを行い、症例対照関連解析を行っている。

(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

本年度は 424 例のゲノムの抽出および調整を行った。現在、前述の遺伝子多型のタイピングを行っている。これまでの結果では、気管支喘息の GWAS で報告された TSLP の遺伝子多型と副鼻腔炎との強い関連を認めた。

D. 考察

TSLP はライノウイルスをはじめとするウイルス感染により、また空中真菌であるアルテルナリアにより気