

表1 春名らによる好酸球性副鼻腔炎の診断基準<sup>1)</sup>

## 絶対条件

- 1) 成人発症
- 2) 両側性副鼻腔病変
- 3) CT所見で上顎洞よりも篩骨洞の陰影が優位.
- 4) 主訴の中に嗅覚障害がある.
- 5) 内視鏡所見で鼻ポリープを認める.
- 6) 血中好酸球6% (300個/mL) 以上, もしくは副鼻腔組織中好酸球100個以上で好酸球優位.

## 付帯条件

- 1) ステロイド薬, 特に経口ステロイド薬が臨床所見の改善に有効.
- 2) 気管支喘息, アスピリン喘息を合併する.
- 3) 内視鏡下鼻内副鼻腔手術後に経過不良を呈する.
- 4) マクロライド療法の効果は不明.
- 5) 粘稠性分泌物が認められる.

炎患者が含まれないことを示す.

好酸球性副鼻腔炎を含む副鼻腔炎の手術成績は詳細に検討されている<sup>3)~6)</sup>. その結果, 好酸球浸潤程度は重要な予後因子であるが, 全身性疾患との関連も重要な因子であることが判明した. すなわち好酸球性副鼻腔炎は, 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アスピリン喘息合併群の3つの群に分類できた. 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だった. 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アスピリン喘息合併群は最も不良であった. 一方で, 好酸球性副鼻腔炎を単純型と複合型の2つに分け, 複合型から難治性型を切り離した分類もある<sup>7)</sup>. 好酸球炎症が, 鼻副鼻腔に限局しているものを単純型, 気管支喘息あるいは好酸球性中耳炎の合併を認めるか, 血中好酸球分画が10%以上のものを複合型とした. そして最も難治性型がアスピリン喘息, Churg-Strauss 症候群の合併とした. 重症度分類としてはこの2つの分類は類似しており, アスピリン耐性気管支喘息の一部とアスピリン不耐性気管支喘息 (アスピリン喘息), Churg-Strauss 症候群合併例が, 当初いわれていた難治性である好酸球性副鼻腔炎といえるのかもしれない.

## 好酸球性副鼻腔炎疫学研究

これまで大まかには表1が好酸球性副鼻腔炎の診断基準として使用されていたが, 全国規模での好酸球性副鼻腔炎に関する疫学調査はいまだ一度も行われていなかった.

表2 石戸谷らによる好酸球性副鼻腔炎の診断基準<sup>2)</sup>

- 1) 血中好酸球6%以上
- 2) CT所見 (嗅裂陰影スコア1以上, 後部篩骨洞陰影スコア1以上)
- 3) 気管支喘息合併の有無

た. さらに明確な診断基準も決まっていないことから, ガイドライン作成を考慮に入れ, 平成22年度厚生労働省難治疾患克服事業「好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究」(研究代表者: 藤枝重治) を立ち上げた. 参加施設は, 札幌医大, 獨協医大, 自治医科大学附属さいたま医療センター, 慈恵会医大, 順天堂大, 横浜市大, 大阪医大, 岡山大, 和歌山日赤, 広島大, 島根大, 福井大の12施設およびそれらの関連病院とした<sup>8)</sup>.

平成19年1月1日~平成21年12月31日の3年間に行った, 病理組織が確実にある慢性副鼻腔炎手術症例を抽出し, 各種臨床データを解析した. 計3,014例の解析データシートが集まった. 平均年齢 $51.9 \pm 16.0$ 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832例 (27.6%) であった. 各施設の診断基準は, 篩骨洞病変が主体, 嗅覚障害があり, 鼻茸があり, 血中好酸球率6%以上もしくは粘膜組織中好酸球浸潤が多いとの病理医のコメントがあった場合, 好酸球性副鼻腔炎としていた. 全症例における400倍顕微鏡下1視野当たり, 好酸球浸潤は $116.3 \pm 184.1$ 個 (平均 $\pm$ 標準偏差) であった. 1視野当たり120個以上の症例数は903例 (30%), 150個以上は797例 (26%), 200個以上は606例 (20%), 300個以上は368例 (12%) であった.

好酸球性副鼻腔炎診断ガイドライン作成<sup>9)~10)</sup>

ESSを行う場合, 術後の経過予測, 術後通院の必要性, 処方内容などを術前に説明する. その際, 通常の慢性副鼻腔炎と好酸球性副鼻腔炎では内容がかなり異なってくる. これまで好酸球性副鼻腔炎の診断には, 組織中における多数の好酸球浸潤を証明することが必須だと考えられていた. しかし実際の臨床において手術前の生検は, 極めて不都合である. そのような時, 生検を必要とせず臨床所見のみから判断できる診断基準があると極めて有用だと考え, 臨床所見・検査からの好酸球性副鼻腔炎診断基準作成に着手した.

まずデータを好酸球性副鼻腔炎と一般的慢性副鼻腔炎に分け, 単ロジスティック解析し, 好酸球性副鼻腔炎であるリスクを算出した. 表3に示すが, 高い倍率を示すと好酸球性副鼻腔炎の可能性が高いことを示す. このま

表 3 各要因における好酸球性副鼻腔炎の危険倍率<sup>8)</sup>

病変：	両側	vs	片側	5.2倍
鼻茸：	あり	vs	なし	3.4倍
粘調な鼻汁：	あり	vs	なし	4.3倍
嗅裂閉鎖：	あり	vs	なし	3.5倍
気管支喘息合併：	あり	vs	なし	2.8倍
薬物アレルギー合併：	あり	vs	なし	2.5倍
アレルギー性鼻炎合併：	あり	vs	なし	1.7倍
CT 陰影：	篩骨洞優位	vs	上顎洞優位	6.1倍
血中好酸球率：	0 % 以上～3 % 未満	vs	3 % 以上～5 % 未満	3.7倍
	0 % 以上～3 % 未満	vs	5 % 以上～8 % 未満	6.9倍
	0 % 以上～3 % 未満	vs	8 % 以上	11.6倍
各項目抗原特異的 IgE：	陽性	vs	陰性	1.4倍～1.9倍

表 4 好酸球性副鼻腔炎の疫学，診断基準作成等に関する研究班の診断基準（第一案）<sup>8)</sup>

1) 年齢	15歳未満：－3点，70歳以上：－1点
2) 症状	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，篩骨洞陰性優位：＋1点
3) 末梢血好酸球率	3～5 %：＋2点，5～8 %：＋3点，8 %以上：＋4点

までは診断基準として使用できないため，多変量解析し，step wise 法により変数を絞り込むとともに 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化した．その結果，表 4 のようになった．この 7 項目からなる診断基準で，各症例について初診時にスコアを計算するようにした<sup>8)9)</sup>．

たとえば「57歳男性，嗅覚障害と鼻閉で来院した．両側に鼻茸がある．嗅裂には鼻茸があるが閉鎖までしていない．CT では篩骨洞の陰影が優位である．薬物アレルギーがある．気管支喘息の既往もない．末梢血好酸球は 7 % である．」この症例を診断基準に照らし合わせると，両側 1 点＋鼻茸 1 点＋篩骨洞陰影優位 1 点＋薬物アレルギー 1 点＋好酸球 3 点となり，合計 7 点，好酸球性副鼻腔炎であろうとなる．このスコアを基盤にして，好酸球性副鼻腔炎の感度と特異度を計算すると表 5 のようになる．感度とは好酸球性副鼻腔炎患者がこの診断基準で陽性になる率であり，特異度は一般的慢性副鼻腔炎を除外できる率であり，当然ともに高い数値が優れている．感度と特異度のバランスから考えるとスコア 5 点以上を好酸球性副鼻腔炎としたらよいのではないかと考えた．5 点の区切りでは Positive predictive value：53%，Negative predictive value：88%であった．この区切りは，正確なものではなく，広く好酸球性副鼻腔炎の可能性がある症例をスクリーニングできるように設定した．今後厳格な診断基準作成においては，変数などの見直しも必要

表 5 診断基準案によるスコア化を基盤にした好酸球性副鼻腔炎の診断<sup>8)</sup>

	感度	特異度
4 点以上	86%	59%
5 点以上	76%	72%
6 点以上	61%	81%
7 点以上	41%	90%

になってくる．臨床的には，スコア 5 点以上は要注意ということで，術後の経過観察が大切であると主治医と患者双方が自覚すれば，この診断基準の有用性はとても高まる．

好酸球性副鼻腔炎の治療経過（Ⅰ）

治療経過としてはいくつかのパターンがある．一般に初診の場合，鼻閉と嗅覚障害を主訴に来院することが多い．鼻腔には膿性鼻汁と多発性鼻茸を認めるので，まずは抗菌薬を処方する．アモキシリンを内服させると膿性は軽快するが，粘調な鼻汁は変化がない．感受性試験結果を参考にしながら，ニューキノロンに変更してみる．膿性はほとんどなくなるものの，やはり粘調ないわゆる mucous discharge は残存する．鼻茸の大きさは変化ない．嗅覚障害も改善しない．そこでセレスタミン<sup>®</sup> 2 錠（分 2）を処方する．すると粘調な鼻汁は軽減し，鼻茸も縮小する．嗅覚障害も改善してくる<sup>11)</sup>．これが典型的

な好酸球性副鼻腔炎の経過である。セレスタミンにて眠気の副反応がある場合には、プレドニン® (5mg) 4錠 (朝) に変更する。まず2週間投与し、鼻腔内の所見を観察後、軽快しない場合にはプレドニン6錠に増量する。これでほとんどの症例が反応する。症状の改善を認めてきたならば、セレスタミン1錠もしくはプレドニン2錠 (朝のみ) に減量していく。その後数カ月間、セレスタミン・プレドニンの服用を隔日に、もしくは2日置き、3日置きと延長しながら継続し、その途中でESSを勧めている。経口ステロイド内服の期間が2カ月を超えた頃から、朝開院後すぐに来院してもらい、血中コルチゾールを測定する。異常がなければ治療を継続する。その後、臨床症状をみて可能であればステロイドを中止して経過を観察する。風邪症状や細菌感染が起こると再度増悪することが多いので、そのような際には必ず受診するように指導するとともに、増悪した場合には、最初から治療をやり直す。

#### 好酸球性副鼻腔炎の治療経過 (Ⅱ)

通常の場合、術前には好酸球性副鼻腔炎の診断をつけにくい。開業している先生の所で一般的慢性副鼻腔炎の治療を行っていたが、鼻茸のため、ESSの紹介をいただく場合がある。かなり治療を受けていたこともあり、粘調な鼻汁と多発性の鼻茸を認めるが、極めてひどい状態ではない。副鼻腔CTにて篩骨洞優位の陰影を認める。気管支喘息や薬物アレルギーの既往はなく、予定通りESSを行う。手術は問題なく終了し、提出した病理標本には、かなりの好酸球浸潤が認められる。1視野当たり100個を超えていた。術前の末梢血中好酸球率は6%であった。術前から予想はされていたが、以上から好酸球性副鼻腔炎の診断が術後に正式に決まる。術後マクロライドとセレスタミンを約1カ月処方するが、順調に鼻腔は正常化し、その後再発なく経過していく。このような症例もある。気管支喘息を合併していない、副鼻腔限局型であり、好酸球性副鼻腔炎の中で予後が良い症例の経過である。

#### 好酸球性副鼻腔炎治療経過 (Ⅲ)

これまで3回鼻の手術を受けたが、再度鼻閉が生じ来院した。嗅覚は数年前から分からない。咳が出て、胸がぜいぜい鳴っていることもあるが、耐えられないこともないので呼吸器内科の診察を受けたことはない。薬はほとんど飲まないが、一度風邪薬を飲んだら、唇がはれ、息も少しづつなくなったことがある。しかし何とか治った。鼻腔内には、多発性の鼻茸が充満しており、膿性の鼻汁もある。鼻閉が強いのですぐに手術してほしいと訴

える。ESSを行うと、これまでの手術のため、術中正確な解剖が分からない。ナビゲーション下に慎重に手術を進める。鼻茸をマイクロデブリッターで順次摘出していくと、中鼻甲介はほとんどなく、下鼻甲介も薄くなっていた。術後すぐに粘膜が浮腫状になり鼻茸の再発を認める。セレスタミンを処方するといったん軽快する。生食による鼻洗浄も強く勧め、確実にしてもらう。その後の内服は、治療経過 (Ⅰ) に準じて行っていく。術後マクロライドも3カ月程度継続する。さらに鼻噴霧用ステロイドも併用する。経口ステロイド内服中は調子もよく、嗅覚も改善する。しかしいったんステロイドを中止するとすぐに嗅覚は分からなくなり、洞内粘膜は浮腫状になり鼻茸を形成してくる。そこでまたステロイドを再開する。そのうち仕事が忙しいと来院間隔が空いてくる。ついに受診しなくなり、2年後再度鼻閉と嗅覚障害で再受診する。ここ数回感冒を経験したと言う。鼻腔には前回手術前と同様の多発性鼻茸が存在する。今度は手術よりも、まずはステロイドの内服を処方してほしいと希望する。このような症例が最も難渋する症例である。

#### ステロイド薬

ステロイド薬内服が、好酸球性副鼻腔炎に対して最も有効である。逆にいえば、実地臨床の場では鼻茸を縮小させたり、嗅覚障害を軽快させたりできるのは、ステロイド以外ないともいえる。筆者の投与開始量は、治療経過 (Ⅰ) のごとくである。長期の内服には、朝早い時間で血中コルチゾール値測定が重要である。ただしこれが確実ではなく、適宜内分泌・代謝内科医との連携が大切である。

周術期におけるステロイド薬投与の有用性に関しては、プラセボ対照二重盲検試験などで検討した高いエビデンスはないが、術前のステロイド薬使用にて術中の出血量の減少、手術時間の短縮、手術が行いやすくなること、術後の使用では、鼻副鼻腔粘膜の正常化が早く得られることなどが報告されている<sup>7)12)13)</sup>。しかしアスピリン喘息患者のESSでは、再発率も高く、周術期でのステロイド使用の有用性は認められなかったとの報告もある<sup>7)</sup>。

内服による全身投与ではなく、点鼻による局所投与も試みられている。この場合 bioavailability の観点から、全身に対する副反応はほとんどないとされている。しかし残念ながら、全身投与ほどの効果は、期待できない。これまでプロピオン酸フルチカゾンの6カ月投与によって、鼻茸中の好酸球浸潤が減少するとともに、鼻茸の縮小が報告されている<sup>14)</sup>。最近はさらに強い効果を持った1日1回投与型の鼻噴霧用ステロイド薬が登場し、もう

表6 平成22年度「好酸球性副鼻腔炎の疫学，診断基準作成等に関する研究」  
参加施設と分担研究者<sup>8)</sup>

札幌医科大学	氷見 徹夫	関 伸彦
獨協医科大学	春名 眞一	月舘 利治
自治医科大学附属さいたま医療センター	飯野ゆき子	吉田 尚弘
東京慈恵会医科大学	鴻 信義	
東邦大学	吉川 衛	
順天堂大学	池田 勝久	村田 潤子
横浜市立大学附属市民総合医療センター	石戸谷淳一	佐久間康德
大阪医科大学	河田 了	吉村 勝弘
日本赤十字社和歌山医療センター	池田 浩己	
岡山大学大学院医歯学総合研究科	岡野 光博	檜垣 貴哉
島根大学	川内 秀之	森倉 一朗
広島大学大学院医歯薬学総合研究科	平川 勝洋	竹野 幸夫
筑波大学人間総合科学研究科	野口恵美子	
理化学研究所ゲノム医科学研究センター	玉利真由美	
東京慈恵会医科大学・疫学	浦島 充佳	
福井大学	富田かおり	森川 太洋

少しで内服に迫る効果が得られるのではないかと期待されている。ドライパウダー製剤であるリノコート<sup>®</sup>を好酸球性副鼻腔炎の術後に使用した場合，組織吸着性，被覆保護作用，drug delivery system の観点から有用との報告もある<sup>15)</sup>。しかしこれらは，ESS 術後の補助療法として用いられるのが一般的である。

ではどうしてステロイドは好酸球性副鼻腔炎に有効なのであろうか。好酸球をはじめとして浸潤細胞や鼻粘膜は，グルココルチコイド受容体を持っている。ステロイドは，この受容体を介して，強力な抗炎症作用を発揮する。好酸球自身に対しても直接的にアポトーシスの誘導や増殖抑制作用を有する。さらに鼻粘膜上皮や線維芽細胞からの好酸球遊走因子（Eotaxin）の誘導も抑制する。好酸球性副鼻腔炎の組織内では，有意に多くの Eotaxin-1，2，3 が産生されている<sup>16)</sup>。Eotaxin は，IL-4 の刺激によって上皮・線維芽細胞から産生されるが<sup>17)</sup>，ステロイド投与によって SOCS-1 発現が変動し，最初の投与では確実に IL-4 刺激で誘導されるシグナルを抑制し，Eotaxin 産生が抑制される<sup>18)</sup>。それによって好酸球浸潤が減少するとされる。さらにステロイドは，血管内皮細胞にも働き接着因子の発現を低下させ，好酸球を含めた多種の細胞浸潤を抑制するとされる。

他の内服薬

鼻粘膜に浸潤した好酸球から LTC4，LTD4，LTE4 などの CysLT が放出される。好酸球には CysLT の受容体が存在し，好酸球から産生・放出される CysLT によっ

て，好酸球表面上の CysLT 受容体発現・活性化がさらに誘導され，相乗的效果でさらに CysLT が産生・放出されるという好酸球炎症の循環的悪化，autocrine 的機構が存在する<sup>19)</sup>。アスピリン喘息に伴う鼻茸および好酸球性副鼻腔炎の粘膜では，大量の CysLT が産生されていると推測される。そのためアスピリン患者の尿中には有意に多くの LTE4 が含まれ，鼻茸を摘出すると LTE4 が低下する<sup>20)</sup>。抗ロイコトリエン薬投与は，有意な好酸球浸潤抑制を示しアレルギー炎症鎮火に貢献し得るので，好酸球性副鼻腔炎の治療薬になり得る可能性がある。実際に好酸球性副鼻腔炎に抗 LT 薬を 6 カ月間投与すると，鼻茸における好酸球浸潤が減少し，鼻茸が縮小したと報告された<sup>14)</sup>。さらにモンテルカストに鼻噴霧用ステロイド薬を併用すると，好酸球浸潤の減少と鼻茸の縮小に相乗効果を認めた。しかしその後，抗 LT 薬が有効であるという報告や高いエビデンスレベルの論文はない。

好酸球遊走には，IL-4 をはじめとする Th2 サイトカインが関与する。また Th2 細胞や好酸球には PGD2 受容と CRTH2 受容体が存在し，好酸球浸潤，粘液分泌促進に PGD2 や CRTH2 も重要な役割を担っている。そのため Th2 サイトカイン阻害薬やこれら受容体に結合してその活性を阻害する抗 PGD2/CRTH2 受容体拮抗薬は，好酸球性副鼻腔炎に有効であることが期待されるが，治療効果に関する論文はない。

### 抗体治療

黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが、スーパー抗原としてもしくはアジュバントとして、鼻粘膜の好酸球性炎症に関与している可能性が高いと欧米では考えられている<sup>21)</sup>。その根拠として鼻茸やムチンの中に黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが検出され、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的IgEが検出されたからである。さらに鼻茸内での非特異的なIgEのポリクローナルな増加が、鼻茸形成に重要とされている<sup>22)</sup>。ヒト化抗IgE抗体が作製され、現在では重症難治性喘息に対して適応がある。この抗IgE抗体は鼻茸を伴う好酸球性副鼻腔炎にも有効であるとの報告がなされている<sup>23)24)</sup>。本邦においても、36例の副鼻腔炎を伴う重症難治性喘息患者に抗IgE抗体を投与し、副鼻腔炎の改善が認められたとの報告もあった<sup>25)</sup>。好酸球性副鼻腔炎に対してステロイドの効果に匹敵する治療薬である可能性もあるが、高額であることが最大の問題点である。

また抗IL-5抗体も候補として挙げられる。IL-5は好酸球の遊走、活性化に重要なサイトカインである。また前駆細胞から好酸球へと分化誘導も引き起こし、増殖にも関与する。好酸球性気道炎症を有する重症難治性気管支喘息においては、抗IL-5抗体投与によって、プラセボに対し呼吸機能や気道過敏性の有意な改善は認めなかったが、気管支喘息増悪頻度の低下、QOLスコアの改善、経口ステロイドの減量が認められた<sup>26)</sup>。さらに抗IL-5抗体は、好酸球浸潤優位の鼻茸に有効であったという報告がなされている<sup>27)</sup>。本邦ではまだ気管支喘息に対しても適応が得られていないが、将来性はあると思われる。

### 最後に

本研究は、表6に示す今回の厚生労働省研究班全員の共同研究であること強調したい。好酸球性副鼻腔炎は、現在、東アジアの鼻科学でも中心的テーマになりつつある。一方でアスピリン喘息に伴う鼻茸は、30年以上も前から研究されているが、いまだにその病因は分かっていない。何ら根拠はないが、ウイルス感染、chemical agent、NSAID、この3つが絡みあって難治性の好酸球浸潤優位鼻茸形成がなされるのではないかと筆者は考えている。いかなるブレイクスルーが生まれるのか。われわれもそれに関与できるのかどうかは、今が正念場かもしれない。

### 文 献

- 1) 春名眞一, 鴻 信義, 柳 清, 他: 好酸球性副鼻腔炎. 耳展 2001; 44: 195-201.

- 2) Sakuma Y, Ishitoya J, Komatsu M, et al: New clinical diagnostic criteria for eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx* 2011; 38: 583-588.
- 3) Matsuwaki Y, Ookushi T, Asaka D, et al: Chronic rhinosinusitis: risk factors for the recurrence of chronic rhinosinusitis based on 5-year follow-up after endoscopic sinus surgery. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146 Suppl 1: 77-81.
- 4) Haruna S, Shimada C, Ozawa M, et al: A study of poor responders for long-term, low-dose macrolide administration for chronic sinusitis. *Rhinology* 2009; 47: 66-71.
- 5) Nakayama T, Yoshikawa M, Asaka D, et al: Mucosal eosinophilia and recurrence of nasal polyps—new classification of chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 2011; 49: 392-396.
- 6) Nakayama T, Asaka D, Yoshikawa M, et al: Identification of chronic rhinosinusitis phenotypes using cluster analysis. *Am J Rhinol Allergy* 2012; 26: 172-176.
- 7) 出島健司: 好酸球性副鼻腔炎. *JOHNS* 2011; 27: 871-874.
- 8) 藤枝重治: 好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究. 平成22年度厚生労働省科学研究費補助金難治疾患克服事業 総括・分担報告書; 2011.
- 9) 藤枝重治: 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. 平成24年度厚生労働省科学研究費補助金 難治疾患克服事業 総括・分担報告書; 2013.
- 10) 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* 2013; 106: 477-484.
- 11) 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. *MB ENT* 2012; 139: 73-80.
- 12) Sieskiewicz A, Olszewska E, Rogowski M, et al: Preoperative corticosteroid oral therapy and intraoperative bleeding during functional endoscopic sinus surgery in patients with severe nasal polyposis: a preliminary investigation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115: 490-494.
- 13) Wright ED, Agrawal S: Impact of perioperative systemic steroids on surgical outcomes in patients with chronic rhinosinusitis with polyposis: evaluation with the novel Perioperative Sinus Endoscopy (POSE) scoring system. *Laryngoscope* 2007; 117(11 Pt 2 Suppl 115): 1-28.
- 14) 野中 学: 好酸球性副鼻腔炎の保存的治療. *JOHNS* 2007; 23: 857-861.
- 15) Takeno S, Hirakawa K, Ishino T: Pathological mechanisms and clinical features of eosinophilic chronic rhinosinusitis in the Japanese population. *Allergol Int*

- 2010; 59: 247-256.
- 16) Yao T, Kojima Y, Koyanagi A, et al: Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. *Laryngoscope* 2009; 119: 1053-1059.
- 17) Nonaka M, Pawankar R, Fukumoto A, et al: Induction of eotaxin production by interleukin-4, interleukin-13 and lipopolysaccharide by nasal fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 804-811.
- 18) Suzuki T, Arakawa H, Mizuno T, et al: Differential regulation of eotaxin expression by dexamethasone in normal human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38: 707-714.
- 19) 藤枝重治: 花粉症 耳鼻咽喉科の立場から (アレルギー性鼻炎). *診断と治療* 2011; 99: 237-244.
- 20) Higashi N, Taniguchi M, Mita H, et al: Clinical features of asthmatic patients with increased urinary leukotriene E4 excretion (hyperleukotrienuria): Involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 277-283.
- 21) Bachert C, Zhang N, Holtappels G, et al: Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 962-968.
- 22) Patou J, Gevaert P, Van Zele T, et al: Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 110-115.
- 23) Grundmann SA, Hemfort PB, Luger TA, et al: Anti-IgE (omalizumab): a new therapeutic approach for chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 257-258.
- 24) Bobolea I, Barranco P, Fiandor A, et al: Omalizumab: a potential new therapeutic approach for aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; 20: 448-449.
- 25) 小林良樹, 安場広高, 荏原順一: Omalizumabの有効性に対する副鼻腔炎の影響. *アレルギー* 2011; 60: 1340.
- 26) Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al: Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009; 360: 973-984.
- 27) Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, et al: Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 989-995. e1-8.

---

連絡先 〒910-1193 吉田郡永平寺町松岡下合月23

福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 藤枝重治

## 特集

## 鼻アレルギー診療におけるエビデンス

## 4. 他の疾患・領域との関連

## 1) 慢性副鼻腔炎

Fujieda Shigeharu

藤枝 重治\*

\*福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教授

## はじめに

鼻アレルギーにおける反応部位は、主に下鼻甲介などの鼻腔である。一方で副鼻腔炎は、鼻腔を含む副鼻腔で起こる。副鼻腔は上顎洞、篩骨洞、蝶形洞、前頭洞からなり、それぞれが狭い自然口によって固有鼻腔と連続している。副鼻腔の役割は、肺に入る空気の加温と加湿であり、洞内は薄い粘膜で覆われている。このような副鼻腔にウイルス感染やそれにひき続く細菌感染が起こると、粘膜に炎症反応が惹起される。炎症によって浮腫が生じると、自然口は狭くなる。洞内では粘液分泌が亢進するとともに、排出障害によって分泌物の貯留が起こる。治癒の遷延化、低酸素状態、酸化ストレスによって、いったん生じた炎症はさらなる炎症の増悪を繰り返し、慢性的な経過をたどる。これが副鼻腔炎である。また、ウイルスや細菌感染とは異なった免疫反応や、全身的疾患の反応として起こることも報告されている<sup>1,2)</sup>。

慢性副鼻腔炎は、8週間以上症状を有する場合と定義されている。症状発現が4週間以内のものを、急性副鼻腔炎としている。すなわち風邪をひいた後など、膿性の鼻汁がしばらく継続するものは、急性副鼻腔炎ということになる<sup>3)</sup>。

## 慢性副鼻腔炎の症状と診断

粘性や膿性鼻汁、鼻閉、頬部痛、歯痛、頭重感、嗅覚障害、後鼻漏などの症状を呈する。診断は十分な問診後、鼻副鼻腔内視鏡検査にて、鼻腔における鼻茸(ポ

リープ)の有無、鼻汁の性状、鼻汁流出経路を把握する。さらに副鼻腔X線単純撮影にて、上顎洞、篩骨洞の状態を調べる。陰影を認めた場合、さらなる精査の目的で、副鼻腔単純CTや磁気共鳴画像(MRI)を行う。各洞内の貯留液や粘膜の肥厚の状態、貯留液の性状の確認、腫瘍との鑑別、骨の状態、石灰化の有無などを把握する。

## 慢性副鼻腔炎の種類：欧米との違い

欧米において慢性副鼻腔炎は、鼻茸の有無により chronic rhinosinusitis with nasal polyp (CRSwNP) と chronic rhinosinusitis without nasal polyps (CRSsNP) に分けられている<sup>1,2)</sup>。CRSwNPは好酸球浸潤優位であり、疾患の中心的プレーヤーとされている。好酸球の寿命の延長や遊走には、IL-4/IL-5をはじめとするTh2サイトカインが重要なので、ほとんどの論文がTh1-Th2バランス理論におけるTh2サイトカインの優位な発現を報告している<sup>2)</sup>。また、欧米人の鼻茸やムチンの中に黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが検出され、黄色ブドウ球菌由来エンテロトキシン特異的IgEが、症例の少なくとも50%のCRSwNP中に証明されることから、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンがスーパー抗原として、もしくはアジュバントとして鼻粘膜の好酸球性炎症に関与している可能性が高いと考えられている<sup>4)</sup>。最近では、鼻粘膜上皮からIL-33やThymic stromal lymphopoietin (TSLP)が産生され、Th2サイトカインを誘導すると報告されている<sup>5,6)</sup>。一方でCRSsNPは、Th1型の反応によるもので、CRSwNPとは疾患概念が異なるとされていた。

表1 一般的慢性副鼻腔炎と好酸球性副鼻腔炎の違い

項 目	慢性副鼻腔炎	好酸球性副鼻腔炎
好発年齢	全年齢	成人以降
主要症状	鼻漏・鼻閉・頭痛	嗅覚障害
ポリープの形態	単発、片側もある 中鼻道中心	両側性 中鼻道・嗅裂
鼻汁の性状	粘液性・膿性	にかわ状・粘稠
病変部位	上顎洞優位	篩骨洞優位
合併症	特になし 時に気管支拡張症 びまん性汎細気管支炎	気管支喘息・アスピリン喘息 薬物アレルギー

本邦を中心とする東アジア圏では、急性副鼻腔炎から、炎症の慢性化・遷延化が起こり何らかの機序で鼻茸が形成され、慢性副鼻腔炎になると考えられていた。主体プレーヤーは、欧米とは異なり、CRSwNPでも好中球であった。この細胞浸潤の差は、生体の反応性の違いから起こるとされている。病原体が感染すると、Th17細胞がIL-17を産生して生体を防御する。その際、好中球の浸潤を伴うことが多い。また transforming growth factor (TGF)- $\beta$  とIL-6は共同してTh17細胞を誘導する。一方でIL-6非存在下においてTGF- $\beta$ は、制御性T細胞(Treg)を誘導する。TregはTh17の分化を抑制するとともにTh1とTh2の機能を制御する。まず、欧米人・アジア人ともにCRSwNPではTGF- $\beta$ が低下しているので、Tregの誘導が抑制されていた<sup>7)</sup>。一方IL-6は、CRSwNPにおいて欧米人もアジア人ともに大量に産生されていた。しかし欧米人のCRSwNPでは、IL-6受容体のシグナルSTAT3がうまく機能しないため、Th17はほとんど誘導されず、IL-17は低値であった<sup>8)</sup>。そのため好中球は誘導されていない。一方で、アジア人のCRSwNPにおいては、多くのTh17が誘導され、IL-17が産生されるのでTh1への偏移を伴いながら、好中球浸潤が誘導される。TregとIL-17がともに低値の欧米人では、制御がきかないのでTh2優位になって好酸球浸潤が主となっている<sup>9)</sup>。

## 好酸球性副鼻腔炎

本邦における鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎治療は、鼻副鼻腔内視鏡手術(ESS)とマクロライド少量長期投与により、著しく改善した。しかし1990年代後半から、この治療法に抵抗性で、ESSを行ってもすぐに鼻茸がす

くに再発し、根治できない症例が増えてきた。この疾患の臨床像は、成人発症で篩骨洞病変が主体であり、嗅覚障害を主訴とし、両側に多発性の鼻茸を有していた。さらに気管支喘息、アスピリン喘息の合併を認めることが多かった。鼻茸や副鼻腔粘膜には、好中球ではなく著しい好酸球浸潤を認めた。このような副鼻腔炎を、森山・春名らは、好酸球性副鼻腔炎と命名した<sup>10)</sup>。表1に一般的慢性副鼻腔炎と好酸球性副鼻腔炎の違いを示す。

これまで好酸球性副鼻腔炎に関しては、明確な診断基準は存在せず、病理組織にて好酸球の浸潤が多いことの報告書から臨床症状を照らし合わせて、診断されることが多かった。そこで厚生労働省難治疾患克服事業の1つとして、多施設共同大規模疫学調査(Japanese Epidemiological Survey of Refractory Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis Study: JESREC Study)を行い、表2に示す臨床スコアによる診断基準を作成した<sup>11)</sup>。診断は、鼻茸の生検や手術を行う前にできることを原則とした。3,400例を超えるESS施行症例から、病理組織中の好酸球が70個(400倍視野)を診断根拠として、術前にステロイド薬(経口・点鼻)を使用していた症例、使用不明な症例、28日以上経過観察が行えなかった症例を除外して決定した。治療前に両側の病変、鼻茸あり、篩骨洞優位な陰影、末梢血中の好酸球率から臨床スコアを計算し、11点以上を好酸球性副鼻腔炎と診断した。末梢好酸球がちょうど2%は0点、5%は4点、10%は8点とする。鼻茸組織中に400倍視野当たり70個以上の好酸球浸潤を認めた場合を確定診断とした。さらに鼻茸・副鼻腔炎の再発を指標として、①末梢血好酸球率が5%以上、CTにて篩骨洞優位の陰影が存在する。これらをA項目とした。②気管支喘

表2 好酸球性副鼻腔炎の診断基準 (JESREC Study)

項 目	スコア
病側：両側	3 点
鼻茸	2 点
篩骨洞陰影優位	2 点
末梢血中好酸球(%)	
2 < ≤ 5	4 点
5 < ≤ 10	8 点
10 <	10 点

合計スコアが11点以上であること。  
確定：鼻茸組織中好酸球数 $\geq 70$ 個  
(400倍1視野当たり)。

表 3 好酸球性副鼻腔炎の分類

慢性副鼻腔炎	臨床スコア：11点未満
好酸球性副鼻腔炎	臨床スコア：11点以上
軽 症：	A項目陽性 1項目以下 + B項目合併なし
中等症：	A項目ともに陽性 + B項目合併なし or A項目陽性 1項目以下 + B項目いずれかの合併あり
重症：	A項目ともに陽性 + B項目いずれかの合併あり
A項目：	①末梢血好酸球が5%以上。 ②CTにて篩骨洞優位の陰影が存在する。
B項目：	①気管支喘息 ②アスピリンアレルギー ③NSAIDアレルギー

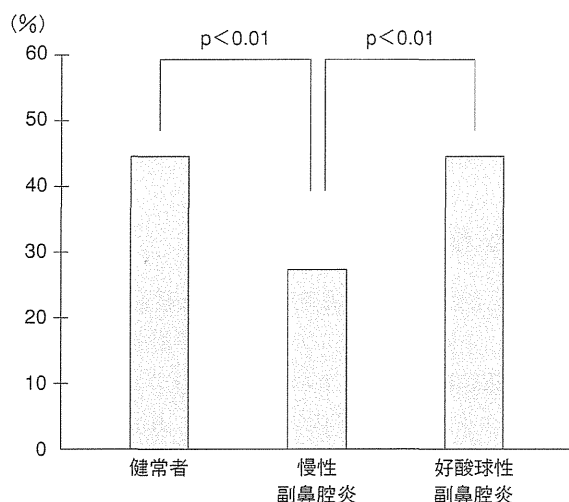


図1 副鼻腔炎の種類によるアレルギー性鼻炎の罹患率

息, アスピリンアレルギー, NSAIDアレルギーの合併がある。これらをB項目とした。臨床スコアが11点以上か未満から始め, A項目がともに陽性かどうか, B項目のうち1つでも合併症があるかによって, 3段階の重症度分類が可能となった(表3)。この分類によって, 鼻茸の無再発率をKaplan-Meire法で解析すると, 3群間で有意な差を認めるとともに, これまでの慢性副鼻腔炎とも軽症であれ, 有意な差を認めた。

これまでの好酸球形副鼻腔炎診断の1視野(400倍)あたりの好酸球数は、70個<sup>12)</sup>ないしは120個<sup>13)</sup>のカットオフ値が設定されていたが、今回のJESREC Studyの結果では70個が一致していた。

では、同じ好酸球浸潤が起こることから、アレルギー性鼻炎と好酸球性副鼻腔炎は同じような原因や病因が存在するのだろうか。これまでの報告では、主にTh2優位であることは共通しているが、どうして

Th2優位になったのか、その程度はどうかとの点については共通性が見出せない。また、副鼻腔炎の症状を有する者の方が、健常者に比べアレルギー性鼻炎の罹患率が高いとの考え方もある。そこでJESREC Studyでは、好酸球性副鼻腔炎患者と慢性副鼻腔炎患者のアレルギー性鼻炎合併率を調べてみた。その結果、好酸球性副鼻腔炎患者のアレルギー性鼻炎合併率は44.3%、慢性副鼻腔炎のアレルギー性鼻炎合併率は29.3%であり、有意な差を認めた。しかし健常者のアレルギー性鼻炎罹患率が44.1%であることから<sup>14)</sup>、慢性副鼻腔炎患者のアレルギー性鼻炎合併が低いのみで、好酸球性副鼻腔炎にアレルギー性鼻炎が合併しやすいわけではないことが判明した(図1)。

## アレルギー性鼻炎と慢性副鼻腔炎の関連

鼻粘膜で起こるアレルギー反応は、一般に鼻副鼻腔での炎症反応を誘導しやすくなり、増強したりする傾向にあると考えられやすい。すなわち、アレルギー性鼻炎があると副鼻腔炎が起こりやすかったり、重症化したりする傾向にあるとの解釈である。実験モデルでは、副鼻腔に感作されている抗原が侵入すると副鼻腔粘膜は腫脹し、自然口は狭小化し、閉鎖しやすくなる<sup>15)</sup>。そのようなときに、病原微生物が侵入すると、換気、排膿、低酸素状態から感染が起こりやすくなり、炎症の遷延化が起こるとの理論である<sup>16)</sup>。しかし臨床的に、花粉飛散中に副鼻腔炎が起こりやすかったり、重症化しやすかったりすることはなく、疫学調査でも否定的である<sup>17)</sup>。また、アレルギー性鼻炎の症状が副鼻腔炎の症状を増悪させるかについては、両者が鼻汁、鼻閉など共通する症状が多く、厳密にどの副鼻腔炎の

症状がアレルギー性鼻炎によって増強されたかの判定は、現実不可能であると考えられている。また、血清中特異的IgEや皮膚プリックテストの陽性・陰性、アレルギー症状の有無で、副鼻腔炎のCT所見に違いは認められない<sup>18)</sup>。おそらく抗原の侵入によって副鼻腔炎が起こりやすくなるかどうかという問いに対しては、急性副鼻腔炎ではそのようなことが考えられる可能性があるが、慢性副鼻腔炎では考えられないと答えるべきであろう<sup>19)</sup>。

副鼻腔炎は、多くの因子が相互に複雑に作用することによって起こっており、その1つの局面ないしは鼻副鼻腔粘膜炎症の1つとしてアレルギー性鼻炎が存在するとの考え方がある<sup>20)</sup>。アレルギー性鼻炎において、浸潤細胞、上皮細胞、線維芽細胞、腺細胞など多くの細胞とケモカイン、サイトカインが関与するが、慢性副鼻腔炎では、非アレルギー性炎症機序も含めさらに複雑性を増す。IgEを介した獲得免疫が中心のアレルギー性鼻炎に対して、副鼻腔炎では、自然免疫と獲得免疫がより複雑に絡み合っている<sup>19)</sup>。

しかしこれらの考えは、成人に絞られ、小児ではまた違った考えが存在する。元来、小児と成人では、副鼻腔炎の病理学もしくは生理学において、異なるものとされてきた。小児の副鼻腔炎では、好酸球浸潤が少なく、リンパ球浸潤が多い。上皮と基底膜は薄く、粘膜下腺組織も少ない。さらに上皮脱落なども小児では少ない<sup>21)</sup>。一方、成人では粘膜のポリープ様変性、腺の過形成、粘膜固有層の浮腫が著明である<sup>19)</sup>。すなわち小児においては、感染に対しても抗原に対しても急性なしは初期の対応であり、抗体産生においては感作という初期段階であるため、より幼弱化した反応であると考えられる。

最近では、慢性副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎、非アレルギー性鼻炎など様々な難治性の重症上気道疾患を severe chronic upper airways disease (SCUAD) として取り扱い、そのメカニズム、新しい治療戦略の探索を行っていかうとしている<sup>22)</sup>。

## アレルギー性真菌性副鼻腔炎 (Allergic fungal sinusitis : AFS)と 真菌性副鼻腔炎

抗原感作と副鼻腔炎は関連がないと上述したが、1つの疾患のみ例外がある。それは真菌に対するIgEと関連するAFSである。AFSでは、血清中真菌特異的IgE

陽性(例えば抗アスペルギルスIgEや抗クラドスポリウムIgEなど)や皮内テストと、副鼻腔炎所見に関連が認められる。片側性の病変で、鼻茸を認め、非常に粘稠な鼻汁でそこにムチンが存在し、著しい好酸球浸潤が認められる。若い女性に多い傾向があるが、本邦ではあまり多い疾患ではない。真菌の侵入と対応するIgEの反応で起こる副鼻腔炎である。この疾患も再発しやすい。

一方、高齢者や糖尿病患者においては、真菌が副鼻腔に感染することによって、副鼻腔炎を起こす。多くは片側性であるが、両側性のこともある。慢性副鼻腔炎と類似した膿性鼻汁を認め、マクロライド少量長期投与を延々と受けていることが多い。CTにて上顎骨の肥厚(特に前壁)を認め、石灰化や造影剤によるまだらな増強効果を示す。アスペルギルスなどの検出が多いが、IgEなどのI型アレルギーは関与していない。ESSで容易に治癒する。

## おわりに

SCUADの概念が提唱され、様々な検討がなされている<sup>22)</sup>。この疾患には、アスピリン不耐症、気管支喘息が密接に関係する。また副鼻腔炎のフェノタイプ、エンドタイプも提唱されつつある<sup>23)</sup>。JESREC Studyが提唱している分類もフェノタイプである<sup>11)</sup>。Akdisらは、Th2炎症、抗IL-5抗体の反応性、抗IgE抗体の反応性、IL-32の程度、AFS、アスピリン過敏性による好酸球性炎症を伴うCRSwNPのフェノタイプを提唱している<sup>2)</sup>。今後はさらなる臨床マーカー、具体的には一酸化窒素(NO)、補体価、線溶系マーカー、凝固系マーカー、そしてステロイド、抗ヒスタミン薬、抗菌薬、抗ロイコトリエン薬の反応性による分類で、上気道炎症の分類が進んで行くと思う。

## 文献

- 1) 藤枝重治, 坂下雅文, 鈴木 弟ほか: 鼻茸. *JOHNS* 2012; 8: 1105-1110.
- 2) Akdis CA, Bachert C, Cingi C, et al: Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: a PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 31: 1479-1490.
- 3) Yamanaka N, Iino Y, Uno Y, et al: Practical guideline for management of acute rhinosinusitis in Japan.

- Auris Nasus Larynx 2014 [Epub ahead of print].
- 4) Bachert C, Zhang N, Holtappels G, et al : Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010 ; **126** : 962-968.
  - 5) Reh DD, Wang Y, Ramanathan M Jr, et al : Treatment-recalcitrant chronic rhinosinusitis with polyps is associated with altered epithelial cell expression of interleukin-33. *Am J Rhinol Allergy* 2010 ; **24** : 105-109.
  - 6) Nonaka M, Fukumoto A, Ogiwara N, et al : Synergistic induction of thymic stromal lymphopoietin by tumor necrosis factor alpha and Th2 cytokine in nasal polyp fibroblasts. *Am J Rhinol Allergy* 2010 ; **24** : e14-e18.
  - 7) Van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, et al : Pathogenesis of chronic rhinosinusitis : inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2011 ; **128** : : 728-732.
  - 8) Peters AT, Kato A, Zhang N, et al : Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2010 ; **125** : : 397-403.
  - 9) Zhang N, Van Zele T, Perez-Novo C, et al : Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008 ; **122** : 961-968.
  - 10) 春名眞一, 鴻 信義, 柳 清ほか : 好酸球性副鼻腔炎. 耳展 2001 ; **44** : 195-201.
  - 11) 藤枝重治, 坂下雅文, 徳永貴広ほか : 好酸球性副鼻腔炎の診断基準 : JESREC Study 日鼻誌 2014 ; **53** : 75-76.
  - 12) Nakayama T, Yoshikawa M, Asaka D, et al : Mucosal eosinophilia and recurrence of nasal polyps-new classification of chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 2011 ; **49** : 392-396.
  - 13) Matsuwaki Y, Ookushi T, Asaka D, et al : Chronic rhinosinusitis : risk factors for the recurrence of chronic rhinosinusitis based on 5-year follow-up after endoscopic sinus surgery. *Int Arch Allergy Immunol* 2008 ; **146** (Suppl 1) : 77-81.
  - 14) Sakashita M, Hirota T, Harada M, et al : Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol* 2010 ; **151** : 255-261.
  - 15) Baroody FM, Mucha SM, Detineo M, et al : Nasal challenge with allergen leads to maxillary sinus inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2008 ; **121** : 1126-1132. e7.
  - 16) Naclerio R, Blair C, Yu X, et al : Allergic rhinitis augments the response to a bacterial sinus infection in mice : A review of an animal model. *Am J Rhinol* 2006 ; **20** : 524-533.
  - 17) Karlsson G, Holmberg K : Does allergic rhinitis predispose to sinusitis? *Acta Otolaryngol Suppl* 1994 ; **515** : 26-28.
  - 18) Pearlman AN, Chandra RK, Chang D, et al : Relationships between severity of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis, asthma, and atopy. *Am J Rhinol Allergy* 2009 ; **23** : 145-148.
  - 19) Georgalas C, Vlastos I, Picavet V, et al : Is chronic rhinosinusitis related to allergic rhinitis in adults and children? Applying epidemiological guidelines for causation. *Allergy* 2014 ; **69** : : 828-833.
  - 20) Ahmad N, Zacharek MA : Allergic rhinitis and rhinosinusitis. *Otolaryngol Clin North Am* 2008 ; **41** : 267-281.
  - 21) Veling MC : The role of allergy in pediatric rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2013 ; **21** : 271-276.
  - 22) Prokopakis EP, Vlastos IM, Ferguson BJ, et al : SCUAD and chronic rhinosinusitis. Reinforcing hypothesis driven research in difficult cases. *Rhinology* 2014 ; **52** : 3-8.
  - 23) Nakayama T, Asaka D, Yoshikawa M, et al : Identification of chronic rhinosinusitis phenotypes using cluster analysis. *Am J Rhinol Allergy* 2012 ; **26** : 172-176.

### *Chronic Rhinosinusitis*

Shigeharu Fujieda\*

\*Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, University of Fukui, Fukui, Japan

Chronic rhinosinusitis (CRS) is one of the most common chronic diseases and characterized by nasal purulent discharge, nasal blockage and hyposmia. Neutrophil infiltration has been traditionally dominant in Japanese CRS. Recently a new subtype of CRS has been increasing in Japan with the westernization of eating habits and environments. CRS of this subtype shows less response to standard treatment endoscopic sinus surgery and macrolide therapy, and a higher tendency of recurrence. This subtype is called by as eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS), because strong eosinophil infiltration is found in nasal polyps. Japan Epidemiological Survey of Refractory ECRS study (JESREC Study) established criteria of ECRS.

The relationship between CRS and allergic rhinitis (AR) has been assessed in the world. AR

is thought to be one mechanism of sinonasal mucosal inflammation via IgE. CRS is caused by inflammation, edema, and the interplay of several factors occurring in concert. Recently, severe forms of CRS, AR and non-AR have been classified as severe chronic upper airway diseases (SCUAD), which pathophysiological mechanism is now being investigated in the world.

## Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps

Tetsuji Takabayashi, MD,<sup>a,c</sup> Atsushi Kato, PhD,<sup>a</sup> Anju T. Peters, MD,<sup>a</sup> Kathryn E. Hulse, PhD,<sup>a</sup> Lydia A. Suh, BSc,<sup>a</sup> Roderick Carter, BSc,<sup>a</sup> James Norton, MS,<sup>a</sup> Leslie C. Grammer, MD,<sup>a</sup> Bruce K. Tan, MD,<sup>b</sup> Rakesh K. Chandra, MD,<sup>b</sup> David B. Conley, MD,<sup>b</sup> Robert C. Kern, MD,<sup>b</sup> Shigeharu Fujieda, MD,<sup>c</sup> and Robert P. Schleimer, PhD<sup>a,b</sup> *Chicago, Ill, and Fukui, Japan*

**Background:** Profound edema or formation of a pseudocyst containing plasma proteins is a prominent characteristic of nasal polyps (NP). However, the mechanisms underlying NP retention of plasma proteins in the submucosa remain unclear. Recently, we reported that impairment of fibrinolysis causes excessive fibrin deposition in NP and this might be involved in the retention of plasma proteins. Although the coagulation cascade plays a critical role in fibrin clot formation at extravascular sites, the expression and role of coagulation factors in NP remain unclear.

**Objective:** The objective of this study was to investigate the expression of coagulation factors in patients with chronic rhinosinusitis (CRS).

**Methods:** Sinonasal tissues were collected from patients with CRS and control subjects. We assayed mRNA for factor XIII-A (FXIII-A) by using real-time PCR and measured FXIII-A protein by means of ELISA, immunohistochemistry, and immunofluorescence.

**Results:** FXIII-A mRNA levels were significantly increased in NP tissue from patients with CRS with NP ( $P < .001$ ) compared with uncinat tissue from patients with CRS or control subjects. Similarly, FXIII-A protein levels were increased in NP.

Immunofluorescence analysis revealed that FXIII-A expression in inflammatory cells and FXIII-A<sup>+</sup> cell numbers were

significantly increased in NP. Most FXIII-A staining was observed within CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> M2 macrophages in NP. Levels of FXIII-A correlated with markers of M2 macrophages, suggesting that M2 macrophages are major FXIII-A-producing cells in NP.

**Conclusion:** Overproduction of FXIII-A by M2 macrophages might contribute to the excessive fibrin deposition in the submucosa of NP, which might contribute to the tissue remodeling and pathogenesis of CRS with NP. (*J Allergy Clin Immunol* 2013;132:584-92.)

**Key words:** Chronic rhinosinusitis, nasal polyps, factor XIII-A (FXIII-A), M2 macrophages, fibrin, coagulation cascade

Chronic rhinosinusitis (CRS) is a heterogeneous disease characterized by local inflammation of the upper airways and sinuses, with symptoms lasting longer than 12 weeks despite medical management. CRS is one of the most common chronic diseases in adults in the United States and affects up to 15% of the population.<sup>1-4</sup> Primarily on the basis of physical examination, histology, and clinical course, CRS is typically classified into 2 types: CRS with nasal polyps (CRSwNP) and CRS without nasal polyps (CRSsNP). The etiology and pathogenesis of CRS remain controversial; however, allergy, bacterial and fungal infections, and structural abnormalities have all been theorized to play a role.<sup>5</sup> In general, CRSwNP is associated more closely with clinical complaints of nasal obstruction and olfactory loss, and more frequently linked to comorbidities such as asthma and aspirin hypersensitivity. Sinonasal tissue from patients with CRSsNP displays a predominant infiltration of neutrophils and presence of T<sub>H</sub>1 cytokines, whereas CRSwNP tissue is characterized by more intense eosinophilic infiltration and a T<sub>H</sub>2-based cytokine profile.<sup>6</sup>

Nasal polyps (NP) usually present as edematous masses originating in and around the middle nasal meatus or paranasal sinuses. Histologically, NP are characterized by an infiltration by inflammatory cells, predominantly eosinophils, intense edematous stroma, and the formation of pseudocysts filled with plasma proteins, mainly albumin.<sup>7</sup> Profound inflammation causes plasma exudation from capillaries; however, the exuded plasma may not only induce edema but also pass through the airway epithelial layer.<sup>8</sup> Antigen stimulation of the nasal cavity of patients with seasonal nasal allergy induces the influx of plasma proteins into the nasal lumen, as detected in nasal lavage.<sup>9</sup> The mechanism responsible for the retention of exuded plasma proteins in NP submucosa is not fully understood. Recently, we reported that

From <sup>a</sup>the Division of Allergy and Immunology, Department of Medicine, and <sup>b</sup>the Department of Otolaryngology, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago; and <sup>c</sup>the Division of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Department of Sensory and Locomotor Medicine, University of Fukui, Fukui.

Supported by National Institutes of Health grants R37HL068546-27, R01HL078860, and RO1AI072570 and the Ernest S. Bazley Trust.

Disclosure of potential conflict of interest: A. Kato and B.K. Tan have received grants from the National Institutes of Health (NIH). A. T. Peters has received payments for lectures from Baxter. L. C. Grammer has received a grant and travel support from the NIH; has received a Bazley Foundation grant; has consultant arrangements with Astellas Pharmaceuticals; is employed by Northwestern University and Northwestern Medical Faculty Foundation; has received grants from the NIH, the Food Allergy Network, and S&C Electric; has received payment for lectures from the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and has received royalties from Lippincott, UpToDate, BMJ, and Elsevier. R. P. Schleimer has received grants from the NIH and has consultant arrangements with Intersect ENT, GlaxoSmithKline, Allakos, and Aurasense. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest. Received for publication January 8, 2013; revised January 31, 2013; accepted for publication February 7, 2013.

Available online March 28, 2013.

Corresponding author: Robert P. Schleimer, PhD, Division of Allergy and Immunology, Department of Medicine, Northwestern University Feinberg School of Medicine, 240 E Huron, Chicago, IL 60611. E-mail: rpschleimer@northwestern.edu.

0091-6749/\$36.00

© 2013 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.003

#### Abbreviations used

CRS: Chronic rhinosinusitis  
CRSsNP: CRS without nasal polyps  
CRSwNP: CRS with nasal polyps  
FXIII-A: Factor XIII-A  
FXIII-B: Factor XIII-B  
MMR: Macrophage mannose receptor  
NP: Nasal polyps  
STAB1: Stabilin 1  
t-PA: Tissue plasminogen activator  
UT: Uncinate tissue

excessive fibrin deposition and low levels of d-dimer, a fibrin degradation product, were observed in NP tissue from patients with CRSwNP. Our study suggested that downregulation of tissue plasminogen activator (t-PA) in NP may lead to insufficient fibrin degradation by plasmin, because t-PA converts plasminogen to plasmin and low levels of plasmin cause this excessive fibrin deposition, which would be expected to contribute to the retention of plasma proteins in NP tissue.<sup>10</sup>

Activation of the coagulation cascade and deposition of fibrin as a consequence of inflammation is well known, and is thought to play a critical role in host defense and to be involved in containing microbial or toxic agents.<sup>11</sup> However, dysregulation of the coagulation cascade may play an etiologic role in many diseases through excessive fibrin deposition, including rheumatoid arthritis, severe asthma, glomerulonephritis, delayed-type hypersensitivity, and Crohn disease.<sup>12-16</sup>

In this study, we hypothesized that activation of coagulation factors is involved in excessive fibrin deposition in NP, leading to retention of plasma proteins and formation of intense edema and pseudocysts in NP. We sought to investigate the expression of coagulation factors in sinonasal tissue from subjects with CRS. We found that factor XIII-A (FXIII-A) levels were upregulated in patients with CRSwNP and examined the cell types that produce this coagulation factor.

## METHODS

### Patients and biopsy specimens

Patients with CRS were recruited from the Allergy-Immunology and Otolaryngology Clinics of the Northwestern Medical Faculty Foundation and the Northwestern Sinus Center at the Northwestern Medical Faculty Foundation. Sinonasal and NP tissues were obtained from routine functional endoscopic sinus surgery in patients with CRS. All patients met the criteria for CRS, as defined by the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Chronic Rhinosinusitis Task Force.<sup>1,17</sup> Patients with an established immunodeficiency, pregnancy, coagulation disorder, diagnosis of classic allergic fungal sinusitis, Samter's triad, Churg-Strauss syndrome, or cystic fibrosis did not participate in the study. Details of subjects' characteristics are included in Table I and in this article's Methods section in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org). All subjects signed informed consent, and the protocol and consent forms governing procedures for the study were approved by the Institutional Review Board of Northwestern University Feinberg School of Medicine.

### Microarray and real-time PCR

Total RNA from sinus tissue was extracted with QIAzol (Qiagen, Valencia, Calif), and the quality of total RNA from sinus tissue was assessed with 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, Calif). A comprehensive

microarray was performed as described previously, and gene expression was measured with GeneChip Human U133 Plus 2.0 probe arrays (Affymetrix, Santa Clara, Calif).<sup>18,19</sup> Real-time RT-PCR was performed with a TaqMan method, as described previously.<sup>20</sup> Detailed protocols are found in this article's Methods section in the Online Repository. All microarray data have been deposited to gene expression omnibus: GSE36830.

## ELISA

The concentration of FXIII-A in cell-free supernatant was determined by using a specific ELISA kit (HYPHEN BioMed, Neuville-Sur-Oise, France). Details are provided in this article's Methods section in the Online Repository.

## Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as described previously.<sup>21</sup> Briefly, blocked sections were incubated with anti-human FXIII-A antibody (CELL MARQUE, Rocklin, Calif) at 4°C overnight. After washing, sections were incubated in ABC reagent (Vector Laboratories, Burlingame, Calif) for 1 hour. Sections were rinsed and incubated in DAB reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif) and then counterstained with hematoxylin. Slides were blinded, and 10 photographic fields were randomly taken from each slide. The number of FXIII-A<sup>+</sup> cells in the nasal mucosa was counted by a blinded observer. Details of the methods for immunofluorescence and immunohistochemistry are described in this article's Methods section in the Online Repository.

## Statistical analysis

All data are reported as mean  $\pm$  SEM unless otherwise noted. Differences between groups were analyzed with the Kruskal-Wallis ANOVA with Dunnett *post hoc* testing. Correlations were assessed by using the Spearman rank correlation. A *P* value of less than .05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Screen of the coagulation factors in sinonasal tissue

We analyzed data from a previously performed microarray analysis to compare coagulation factor gene expression in uncinate tissue (UT) from patients with CRSsNP, patients with CRSwNP, and control subjects, as well as in NP tissue from patients with CRSwNP.<sup>19</sup> We observed that mRNA levels of the FXIII-A were substantially increased in NP tissues from patients with CRSwNP in comparison with levels seen in UT from either patients with CRS or control subjects (see Fig E1 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Interestingly, we found no difference between patients with CRS and control subjects in UT mRNA levels of factor XIII-B (FXIII-B), a subunit that forms a tight tetrameric complex with FXIII-A (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) in the plasma (Fig E1).

### FXIII-A expression in patients with CRS

Sinonasal and polyp tissues were collected from 56 subjects with CRSsNP, 95 subjects with CRSwNP, and 35 control subjects to determine the presence of FXIII-A expression in patients with CRS. Subjects' characteristics are shown in Table I.

We further assessed the expression of FXIII-A in UT from patients with CRSsNP, patients with CRSwNP, and control subjects, as well as in NP tissue from patients with CRSwNP by using real-time PCR. FXIII-A mRNA levels were significantly increased in NP tissues from patients with CRSwNP (*P* < .001) in comparison with levels seen in UT from either patients with CRS or control subjects (Fig 1, A). To confirm this observation at the protein level, we made detergent extracts from homogenates of UT and NP tissues and then measured the concentration

TABLE I. Subjects' characteristics

	Control			CRSsNP			CRSwNP			CRSwNP polyp
Total no. of subjects	n = 35 (14M/21F)			n = 56 (22M/34F)			n = 95 (56M/39F)			—
Age (y), median (range)	49 (16-72)			36 (20-73)			40 (23-72)			—
	Y	N	U	Y	N	U	Y	N	U	—
Atopy	1	32	S	19	29	8	47	26	22	—
Asthma	0	35	0	5	48	3	45	47	3	—
Methodology used:										
Tissue RNA	n = 16 (7M/9F)			n = 27 (8M/19F)			n = 33 (21M/12F)			n = 34 (22M/12F)
Age (y), median (range)	45 (16-62)			35 (20-59)			38 (23-67)			39 (23-67)
Tissue extract	n = 14 (5M/9F)			n = 20 (8M/12F)			n = 19 (10M/9F)			n = 24 (13M/11F)
Age (y), median (range)	46 (35-72)			30 (24-73)			45 (26-68)			44 (28-72)
Immunohistochemistry	n = 10 (3M/7F)			n = 11 (5M/6F)			n = 10 (7M/3F)			n = 12 (8M/4F)
Age (y), median (range)	48 (27-64)			44 (25-67)			36 (28-55)			42 (28-71)

F, Female; M, male; N, no; U, unknown; Y, yes.

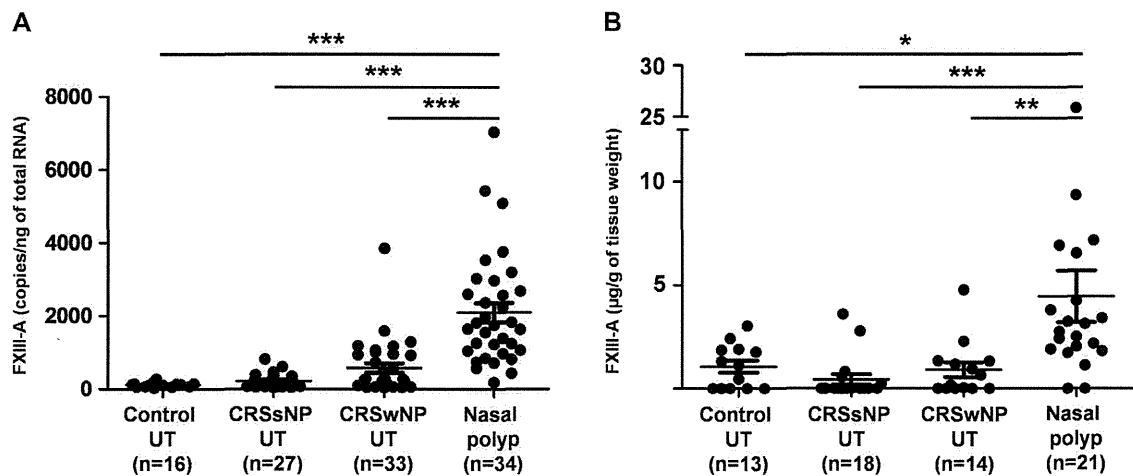


FIG 1. Increased expression of FXIII-A in NP tissue. **A**, Total RNA was extracted from UT and NP, and expression of FXIII-A was analyzed by using real-time PCR. **B**, Expression of FXIII-A protein in tissue homogenates of UT and NP from patients with CRSwNP was measured by using ELISA. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , and \*\*\* $P < .001$ .

of FXIII-A by ELISA. In agreement with the mRNA data, FXIII-A protein levels were significantly increased in NP tissue from patients with CRSwNP ( $P < .05$ ) in comparison with those seen in UT from either patients with CRS or control subjects (Fig 1, B).

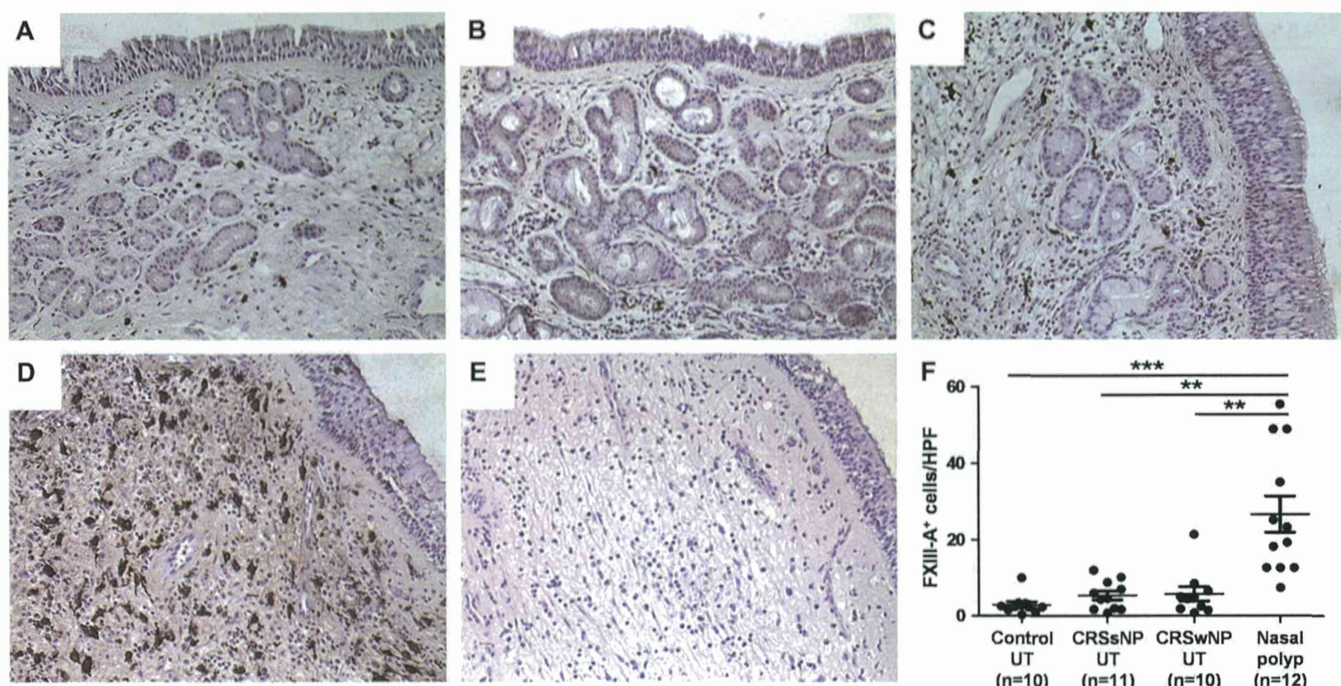
Immunohistochemical analysis of FXIII-A in sinonasal tissue

To further characterize the expression of FXIII-A proteins in patients with CRS, we performed immunohistochemical analysis of surgical samples from control subjects and patients with CRS to determine whether FXIII-A expression could be detected. As shown in Fig 2, we detected FXIII-A staining mainly in submucosal inflammatory cells. We found that FXIII-A<sup>+</sup> inflammatory cell numbers were highly elevated in NP (Fig 2, D). We counted the number of FXIII-A<sup>+</sup> inflammatory cells by using a semiquantitative method and confirmed that FXIII-A<sup>+</sup> inflammatory cell numbers were significantly increased in NP from patients with CRSwNP compared with those seen in UT from patients with either CRS or control subjects ( $P < .01$ ; Fig 2, F). FXIII-A is expressed primarily in cells of bone marrow origin including platelets, megakaryocytes, and macrophages.<sup>22-25</sup> We

therefore focused on macrophages and performed dual-immunofluorescence analysis by using anti-FXIII-A and antibody against markers of macrophages (CD68). We found a high degree of colocalization of FXIII-A with CD68<sup>+</sup> macrophages in NP (Fig 3, A).

Detection of FXIII-A in M2 macrophages

Macrophages are now widely recognized to be polarized by their microenvironment, especially by T-helper cytokines and pathogens.<sup>26-30</sup> Classically activated macrophages (also known as M1 macrophages) develop in response to proinflammatory stimuli, such as T<sub>H</sub>1 cytokines (IFN- $\gamma$ ) or bacterial products (LPS). In contrast, alternatively activated macrophages are induced by exposure to T<sub>H</sub>2 cytokines, including IL-4 and IL-13, and are therefore called M2 macrophages. Recent studies have suggested that increased expression of FXIII-A is present in M2 macrophages.<sup>25,31</sup> Therefore, we next examined whether M2 macrophages are major FXIII-A-producing cells in NP. We first determined levels of M2 macrophage markers, macrophage mannose receptor (MMR), CD163, and stabilin 1 (STAB1) in UT and NP using real-time PCR. Levels of mRNA for MMR, CD163, and



**FIG 2.** Immunohistochemistry of FXIII-A was performed with anti-human FXIII-A antibody. Representative immunostaining for FXIII-A in UT from control subject (A), a patient with CRSsNP (B), a patient with CRSwNP (C), and NP tissue (D). Negative control antibody staining in NP tissue from a patient with CRSwNP (E) is shown. The number of FXIII-A<sup>+</sup> cells in UT from control subjects (n = 10), patients with CRSsNP (n = 11), and patients with CRSwNP (n = 10) and in NP (n = 12) was counted by using a semiquantitative method (F). Magnification  $\times 400$ . \*\* $P < .01$  and \*\*\* $P < .001$ . HPF, High-power field.

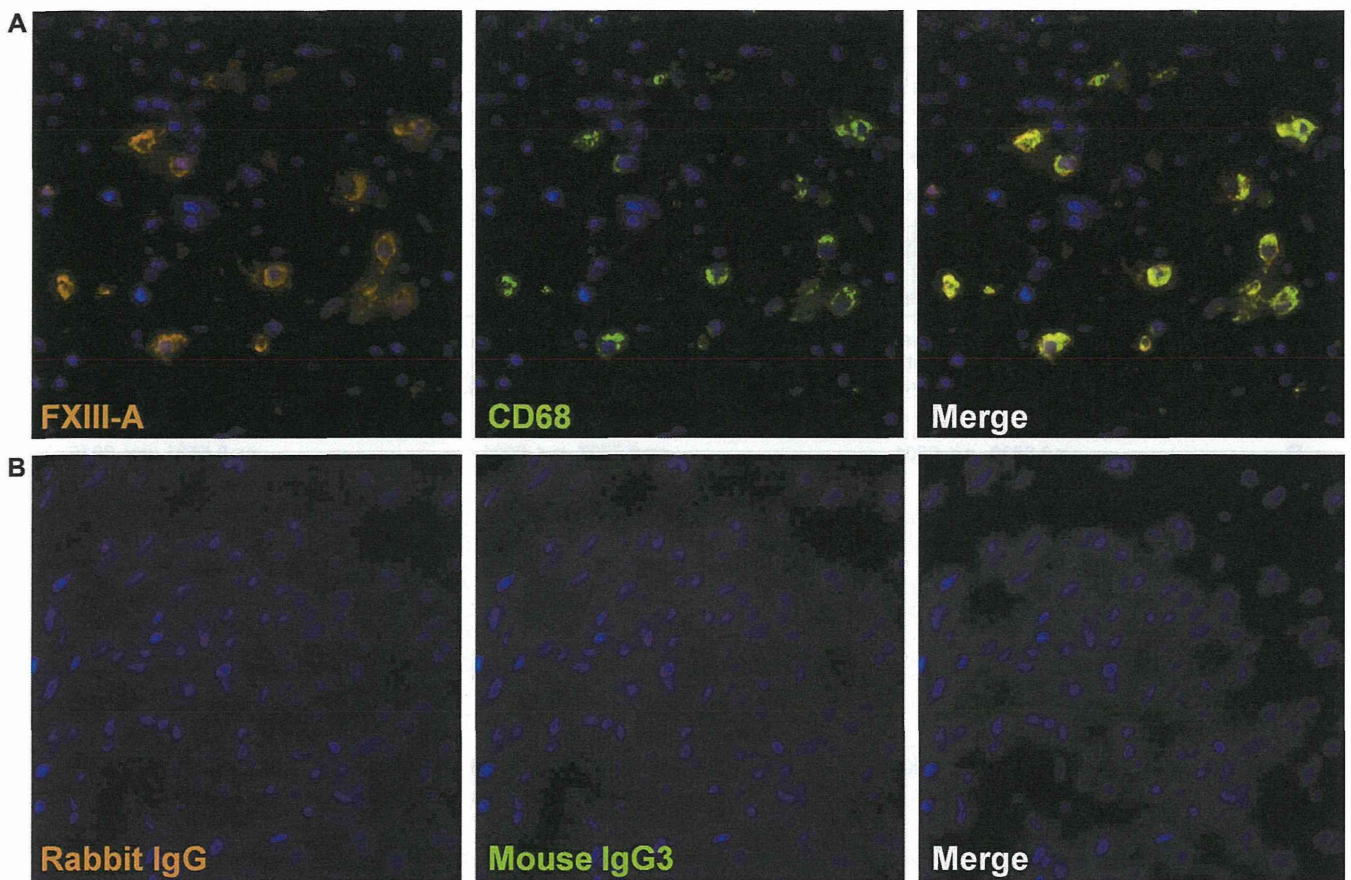
STAB1 were significantly upregulated in NP ( $P < .01$ ) in comparison with those seen in UT from either patients with CRS or control subjects (Fig 4, A). We also found that the expression of FXIII-A significantly and positive correlated with the expression of MMR ( $r = 0.8820$ ,  $P < .0001$ ), CD163 ( $r = 0.7797$ ,  $P < .0001$ ), and STAB1 ( $r = 0.5521$ ,  $P = .0015$ ; Fig 4, B). Levels of MMR also significantly correlated with levels of CD163 ( $r = 0.6434$ ,  $P < .0001$ ) and STAB1 ( $r = 0.4741$ ,  $P = .0046$ ).

To further investigate whether M2 macrophages were the FXIII-A-producing cells in NP, we performed triple-immunofluorescence analysis by using anti-FXIII-A and antibodies against a marker of M2 macrophages, CD163. We detected FXIII-A in CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> cells in NP (Fig 5). These results suggest that M2 macrophages are the sole or major FXIII-A-producing cells in NP.

## DISCUSSION

Previous studies have demonstrated that NP exhibit a high degree of tissue eosinophilia and mast cell infiltration as well as T-cell cytokines demonstrating skewing toward a  $T_H2$  pattern.<sup>6,32,33</sup> In NP tissue, activation of eosinophils and mast cells facilitates plasma exudation, intense edema, or pseudocyst formation, which are major histopathologic characteristics of NP.<sup>7,34</sup> We observed high levels of albumin, a major constituent of plasma, in NP compared with UT from patients with CRS and control subjects (see Fig E2 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), in line with a previous report.<sup>7</sup> However, the mechanism by which NP tissue retains plasma proteins in the stroma has not been explored. Most recently, we showed that excessive fibrin deposition is seen in NP tissue from patients with

CRSwNP and is associated with a reduction of t-PA, which is involved in fibrinolysis by converting plasminogen to plasmin.<sup>10</sup> We hypothesized that profound fibrin deposition is responsible for the retention of exuded plasma proteins and the formation of intense edema and pseudocysts in NP tissue.<sup>10</sup> To further test this hypothesis in the current study, we evaluated the components of the coagulation cascade in control and NP tissues. We demonstrated that FXIII-A levels are increased in NP tissue from patients with CRSwNP (Fig 1). Coagulation factor XIII is a transglutaminase that participates in the final stage of the coagulation cascade. There are 2 forms of FXIII. Plasma FXIII consists of 2 enzymatically active A subunits (FXIII-A) and 2 inhibitory/carrier B subunits (FXIII-B), whereas cellular FXIII is a dimer of FXIII-A, present in platelets, monocytes, and macrophages.<sup>35,36</sup> During the process of plasma FXIII activation, first, thrombin cleaves off an activation peptide from FXIII-A, then FXIII-B dissociates in the presence of  $Ca^{2+}$ , and finally, FXIII-A is transformed into an active transglutaminase. In contrast, cellular FXIII, which lacks the inhibitory B subunit, does not require the cleavage of the activation peptide for its activation, and typical levels of  $Ca^{2+}$  present in tissue are sufficient to convert this pro-transglutaminase into an active transglutaminase. Activated FXIII catalyzes the formation of covalent cross-links between  $\gamma$ -glutamyl and  $\epsilon$ -lysyl residues on adjacent fibrin chains in polymerized fibrin to yield the mature clot, and also cross-links  $\alpha 2$ -plasmin inhibitor with fibrin. The cross-linking of fibrin enhances its stiffness and rigidity, which allows it to retain plasma proteins. Cross-linking of  $\alpha 2$ -plasmin inhibitor to fibrin in the matrix has the predominant role of protecting the newly formed fibrin from degradation by the fibrinolytic enzyme, plasmin.<sup>25,35</sup> We also observed a significant positive correlation between the



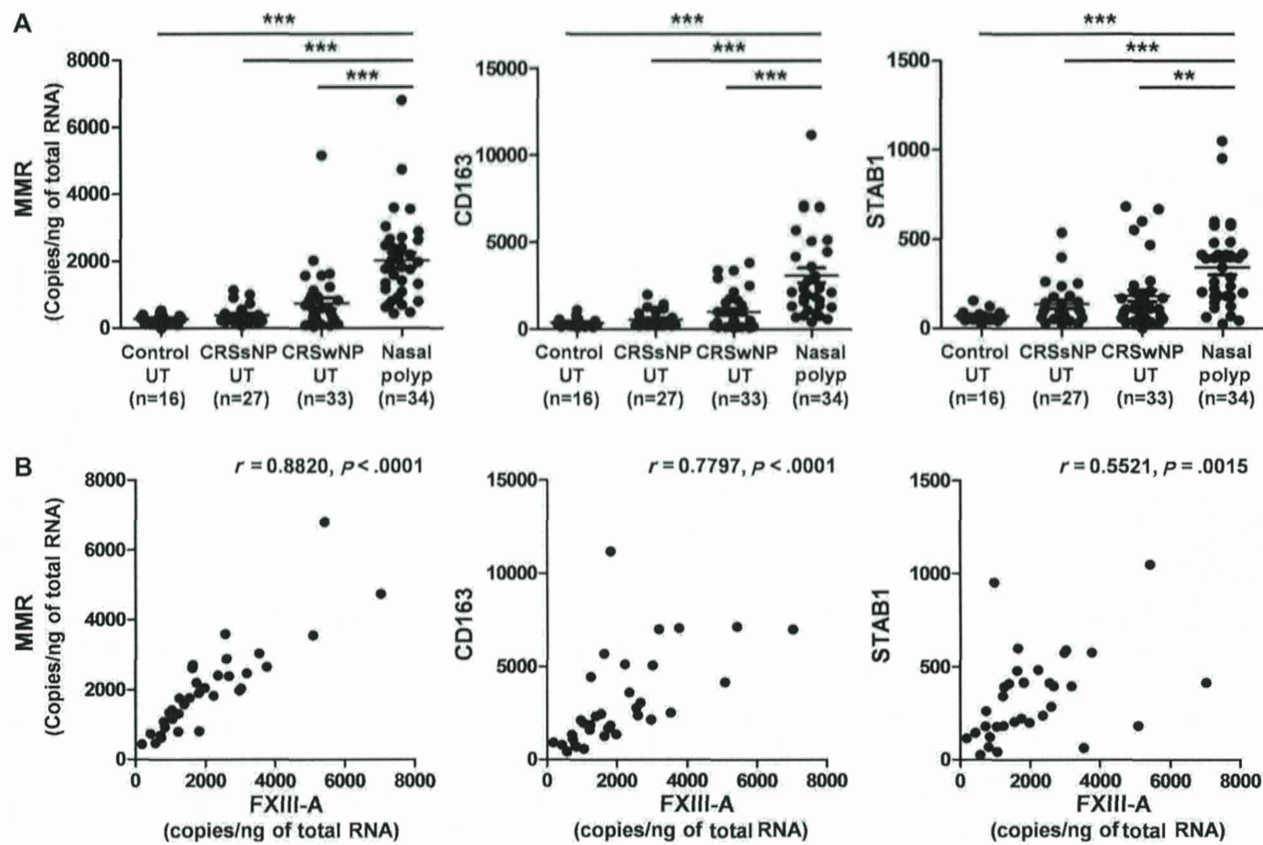
**FIG 3.** Immunofluorescence of FXIII-A in NP tissue. Immunofluorescence assay was performed with anti-FXIII-A (orange fluorescence) and anti-CD68 mAb (green fluorescence) for macrophages (A), and control IgG (B). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue fluorescence). The results are representative of 4 separate subjects.

protein levels of albumin and FXIII-A in nasal tissues ( $r = 0.441$ ,  $P < .0001$ ; see Fig E3 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Taken together, these data support a hypothesis that the upregulation of FXIII-A plays a critical role in forming excessive fibrin deposition, which is involved in the retention of exuded plasma proteins in NP tissue.

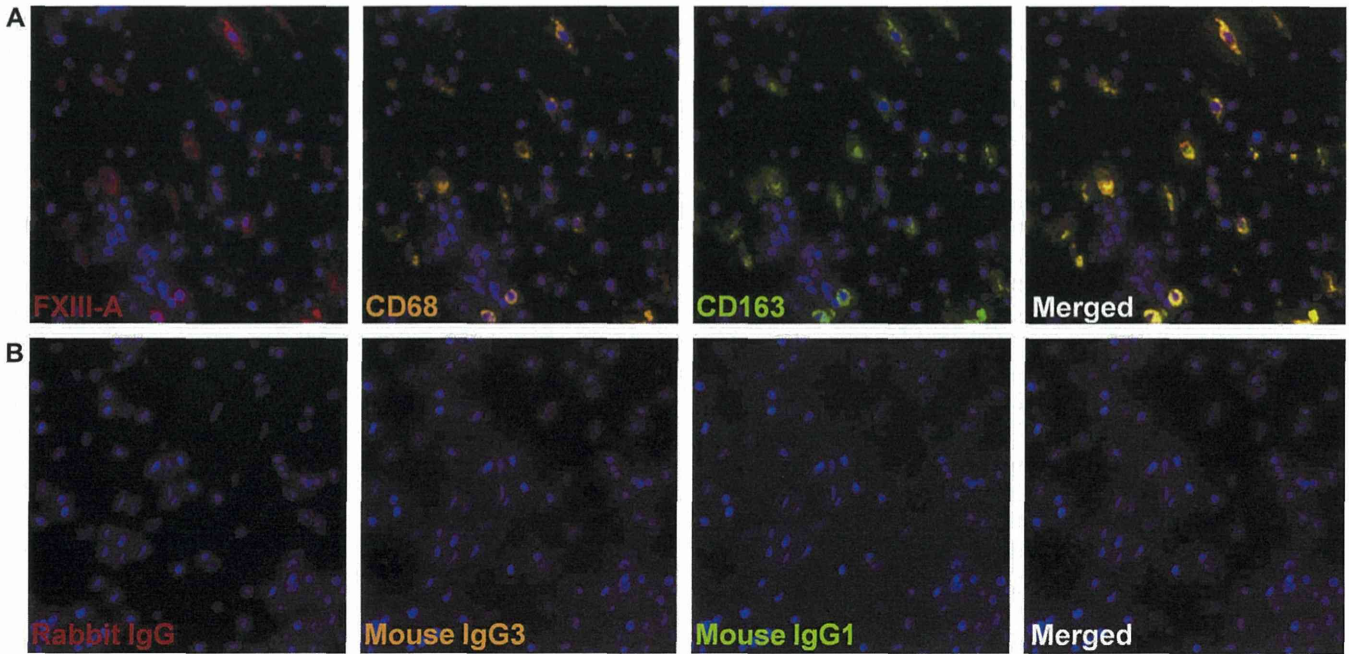
Growing evidence indicates that FXIII-A is a multifunctional protein that plays an important role in a wide variety of physiologic and pathologic process.<sup>25</sup> Using FXIII-A-deficient mice, an essential role of FXIII-A in the wound-healing process was clearly demonstrated, and it was shown that angiogenesis plays a critical role in this process.<sup>37,38</sup> It has been reported that activated FXIII regulates the key steps of angiogenesis by increasing endothelial cell migration, proliferation, and survival, which are found to be dependent on the transglutaminase activity of FXIII-A. These effects of FXIII-A on endothelial cells are accompanied by the downregulation of thrombospondin-1, one of the best characterized antiangiogenic factors.<sup>39</sup> Activated FXIII binding to  $\alpha_v\beta_3$  integrin elicited an intracellular signaling cascade leading to c-Jun upregulation, which, in turn, downregulated thrombospondin-1.<sup>40</sup> High levels of angiogenesis are one of the reported characteristics of NP tissue.<sup>41,42</sup> Taken together, the upregulation of FXIII-A in NP may induce fibrin deposition and plasma protein retention as well as angiogenesis, which might also be involved in tissue remodeling in NP tissue. A previous report demonstrated that the induction of fibrin-fibronectin cross-linking by FXIII

also plays a critical role in migration, proliferation, and survival of fibroblasts.<sup>43</sup> Because the activation of fibroblasts is considered to be an important event leading to NP development,<sup>32</sup> the role of FXIII-A in these processes is worthy of further investigation.

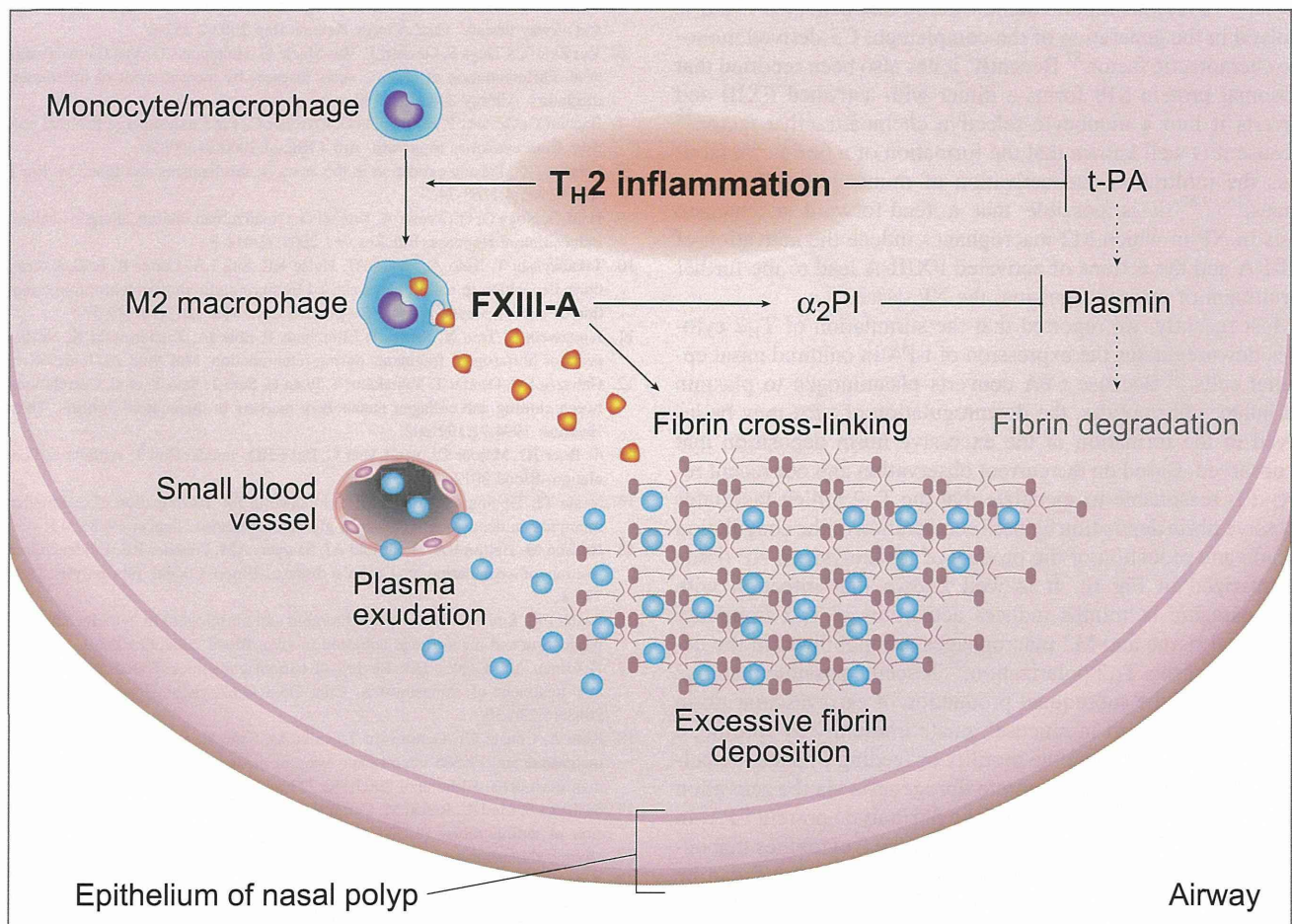
Recently, Krysko et al<sup>44</sup> and Peterson et al<sup>45</sup> showed that numbers of MMR<sup>+</sup> M2 macrophages, but not M1 macrophages, were increased in NP. In the current study, we also confirmed that the M2 macrophage markers MMR, CD163, and STAB1 were significantly upregulated in NP (Fig 4, A). It is possible that the increased number of M2 macrophages could be explained by either the T<sub>H</sub>2 milieu of CRSwNP or the presence of mast cell and type 2 innate lymphoid cells, as demonstrated in recent reports.<sup>28,46,47</sup> However they are recruited to NP, the role of macrophages in the pathogenesis of CRS remains unclear. Importantly, it has been reported that M2 macrophages express FXIII-A.<sup>48-50</sup> We found that FXIII-A was detected in CD163<sup>+</sup> macrophages but not in CD163<sup>-</sup> macrophages in NP (Fig 5 and data not shown). We also showed that levels of M2 macrophage markers correlated well with levels of FXIII-A (Fig 4, B). These results indicate that M2 macrophages are the sole or major FXIII-A-producing cell type in NP. Although there is a general agreement on the cytoplasmic localization of FXIII-A in macrophages, FXIII-A lacks an identifiable endoplasmic reticulum signal sequence and it is not clear how it can be released from macrophages to the extracellular milieu.<sup>35</sup> Recent reports demonstrate the appearance of FXIII-A in bronchoalveolar lavage fluid and



**FIG 4.** Correlation of FXIII-A with markers of M2 macrophages in NP tissue. **A**, Total RNA was extracted from UT from control subjects ( $n = 16$ ), patients with CRSsNP ( $n = 27$ ), and patients with CRSwNP ( $n = 33$ ) and NP tissue ( $n = 34$ ). The expression of FXIII-A and M2 macrophage markers MMR, CD163, and STAB1 was analyzed by using real-time PCR. **B**, The correlation in NP tissue was assessed by using a Spearman rank correlation test.  $**P < .01$  and  $***P < .001$ .



**FIG 5.** Detection of FXIII-A in M2 macrophages in NP tissue. Immunofluorescence assay was performed with anti-FXIII-A (red fluorescence), anti-CD68 mAb (orange fluorescence) for macrophages, and anti-CD163 mAb (green fluorescence) for M2 macrophage (**A**), and control IgG (**B**). Nuclei were counterstained with DAPI (blue fluorescence). The results are representative of 4 separate subjects. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.



**FIG 6.** Hypothetical model in which the  $T_H2$  milieu facilitates excessive fibrin deposition in NP tissue.  $T_H2$  inflammation leads to the recruitment of M2 macrophages and the subsequent production of FXIII-A, which induces excessive fibrin deposition by cross-linking of fibrin and via the antifibrinolytic effect through binding  $\alpha_2PI$  to fibrin. In the presence of  $T_H2$  cytokines, t-PA levels are reduced, causing impaired plasmin generation, which, in turn, decreases fibrinolysis.  $\alpha_2PI$ ,  $\alpha_2$ -Plasmin inhibitor.

in the culture medium of macrophages, and there is evidence that FXIII-A is released by an alternative secretory pathway in human macrophages.<sup>35,49,51</sup> In fact, extravascular fibrin deposition is frequently observed within and around tumor matrix, and tumor-associated macrophages containing profound levels of FXIII-A have been reported.<sup>52,53</sup> It is reasonable to speculate that infiltrating M2 macrophages might contribute to excessive fibrin deposition by secreting FXIII-A in NP tissue, but this will require further experiments to test. In spite of presenting prominent inflammation, NP tissue shows low levels of fibrosis.<sup>4,10</sup> A previous report suggested that the downregulation of TGF- $\beta$  may partially explain the low levels of collagen detected in NP tissue.<sup>4</sup> It has also been reported that M2 macrophages are involved in the suppression of tissue fibrosis by the production of IL-10, resistin-like molecule alpha, and arginase-1.<sup>28</sup> However, M1 macrophages, which have been identified as key regulators in demyelinating diseases of the central nervous system, produce significant amounts of TGF- $\beta$ .<sup>54</sup> Thus, predominant infiltration of M2 macrophages might prevent or diminish fibrosis in NP tissue. Phagocytosis is one of the most important functions of macrophages, in which the rearrangement of cell cytoskeleton is deeply involved, and FXIII-A is implicated in phagocytic activities by catalyzing

alterations in certain cytoskeletal components, including actin, myosin, vinculin, small heat shock protein HSP27, and thymosin  $\beta_4$ .<sup>24,50</sup> Macrophages from FXIII-A-deficient patients showed an impaired capacity of Fc $\gamma$ , complement, and lectin-like receptor-mediated phagocytosis.<sup>55</sup> FXIII-A plays a critical intracellular role in receptor-mediated phagocytosis of macrophages. However, a recent study suggested that the phagocytic capacity of M2 macrophages is impaired in NP tissue and facilitated the increased presence of *Staphylococcus aureus* in CRSwNP.<sup>44</sup> Further studies are required to determine how and whether FXIII-A participates in the alteration of phagocytosis in M2 macrophages associated with nasal polyposis.

We found that M2 macrophages were major FXIII-A-expressing cells in NP. However, the regulation of macrophage recruitment in NP is poorly understood. We recently demonstrated that CCL23, known as a chemokine for macrophage, is elevated in NP tissue and CCL23 might play a critical role in macrophage infiltration.<sup>56</sup> It is possible that FXIII-A may play some role. Activated FXIII enhances the proliferation of peripheral blood monocytes, accelerates their migration, and inhibits monocyte apoptosis through the downregulation of thrombospondin-1 and due to the upregulation of c-Jun and

Egr-1.<sup>25,43</sup> Previous reports demonstrated that activated FXIII is involved in the generation of the complement C5-derived monocyte chemotactic factor.<sup>57</sup> Recently, it has also been reported that ribosomal protein S19 forms a dimer with activated FXIII and converts it into a monocyte-selective chemoattractive factor.<sup>58</sup> Because it is well known that the formation of a fibrin clot facilitates the infiltration and activation of monocytes and macrophages,<sup>16,59,60</sup> it is possible that a feed-forward mechanism exists in NP in which M2 macrophages induce the activation of FXIII-A and the actions of activated FXIII-A lead to the further recruitment of macrophages into the NP tissue.

Most recently, we reported that the stimulation of T<sub>H</sub>2 cytokines downregulates the expression of t-PA in cultured nasal epithelial cells.<sup>10</sup> Because t-PA converts plasminogen to plasmin and induces fibrinolysis, the downregulation of t-PA may be involved in the formation of the excessive fibrin deposition that we observed. Based on the current observation and our recent report, it is reasonable to speculate that the T<sub>H</sub>2 milieu facilitates excessive fibrin deposition by both acceleration of the coagulation cascade and reduction of the process of fibrinolysis in NP tissue (summarized in Fig 6). It is well known that infection with many parasitic helminths induces activation of T<sub>H</sub>2 immunity in mucosal tissue and M2 macrophages are mobilized in the development of this T<sub>H</sub>2 polarization.<sup>61</sup> It seems possible that T<sub>H</sub>2 immunity, and the subsequent production of extravascular fibrin deposition, takes part in mucosal innate immunity by forming a fibrin mesh and impeding the motility or feeding of parasitic helminths. This process may promote fibrogenesis via the activation of FXIII-A and the suppression of the fibrinolytic protein t-PA. In this scenario, the excessive activation of type 2 cytokines that occurs in CRSwNP and may lead to the formation of NP can be viewed as a localized sterile antiparasite response.

We report here that tissue levels of FXIII-A were profoundly increased in NP tissue and that M2 macrophages are the sole or major FXIII-A-producing cell in NP. Overproduction of FXIII-A may lead to the acceleration of the coagulation cascade, resulting in excessive fibrin deposition, which, in turn, retains exuded plasma proteins and participates in tissue remodeling, intense edema, or pseudocyst formation in the submucosa of NP tissue. Our results imply that targeting the local production of FXIII-A from M2 macrophage might therefore be of therapeutic value for treating patients with CRSwNP.

**Clinical implications: Overexpression of FXIII-A may have a pathogenic role in CRSwNP and strategies to reduce the activity of the coagulation cascade might have therapeutic value in the treatment of CRSwNP.**

## REFERENCES

- Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, et al. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:S1-62.
- Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol* 2008;22:549-59.
- Schleimer RP, Kato A, Peters A, Conley D, Kim J, Liu MC, et al. Epithelium, inflammation, and immunity in the upper airways of humans: studies in chronic rhinosinusitis. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:288-94.
- Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, De Ruyck N, et al. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:253-9.
- Bachert C, Gevaert P, van Cauwenberge P. *Staphylococcus aureus* superantigens and airway disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2:252-8.
- Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy* 2006;61:1280-9.
- Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Cuvelier C, van Cauwenberge P. Nasal polypoidosis: from cytokines to growth. *Am J Rhinol* 2000;14:279-90.
- Persson CG. Plasma exudation in the airways: mechanisms and function. *Eur Respir J* 1991;4:1268-74.
- Hanf G, Noga O, O'Connor A, Kunkel G. Omalizumab inhibits allergen challenge-induced nasal response. *Eur Respir J* 2004;23:414-8.
- Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of t-PA expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;187:49-57.
- Jennewein C, Tran N, Paulus P, Ellinghaus P, Eble JA, Zacharowski K. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol Med* 2011;17:568-73.
- Gabazza EC, Osamu T, Yamakami T, Ibata H, Sato T, Sato Y, et al. Correlation between clotting and collagen metabolism markers in rheumatoid arthritis. *Thromb Haemost* 1994;71:199-202.
- de Boer JD, Majoor CJ, van't Veer C, Bel EHD, van der Poll T. Asthma and coagulation. *Blood* 2012;119:3236-44.
- Neale TJ, Tipping PG, Carson SD, Holdsworth SR. Participation of cell-mediated immunity in deposition of fibrin in glomerulonephritis. *Lancet* 1988;2:421-4.
- Hudson M, Hutton RA, Wakefield AJ, Sawyerr AM, Pounder RE. Evidence for activation of coagulation in Crohn's disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992;3:773-8.
- Szaba FM, Smiley ST. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood* 2002;99:1053-9.
- Pearlman AN, Conley DB. Review of current guidelines related to the diagnosis and treatment of rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;16:226-30.
- Kato A, Chustz RT, Ogasawara T, Kulka M, Saito H, Schleimer RP, et al. Dexamethasone and FK506 inhibit expression of distinct subsets of chemokines in human mast cells. *J Immunol* 2009;182:7233-43.
- Seshadri S, Lin DC, Rosati M, Carter RG, Norton JE, Suh L, et al. Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy* 2012;67:920-8.
- Kato A, Truong-Tran AQ, Scott AL, Matsumoto K, Schleimer RP. Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 2006;177:7164-72.
- Kato A, Peters A, Suh L, Carter R, Harris KE, Chandra R, et al. Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1385-92.
- Katona EE, Ajzner E, Toth K, Karpati L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* 2001;258:127-35.
- Malara A, Gruppi C, Rebuzzi P, Visai L, Perotti C, Moratti R, et al. Megakaryocyte-matrix interaction within bone marrow: new roles for fibronectin and factor XIII-A. *Blood* 2011;117:2476-83.
- Adany R, Bardos H. Factor XIII subunit A as an intracellular transglutaminase. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1049-60.
- Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatric and cellular functions. *Physiol Rev* 2011;91:931-72.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69.
- Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010;32:593-604.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-37.
- Fairweather D, Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun* 2009;33:222-30.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008;13:453-61.
- Torocsik D, Szeles L, Paragh G Jr, Rakosy Z, Bardos H, Nagy L, et al. Factor XIII-A is involved in the regulation of gene expression in alternatively activated human macrophages. *Thromb Haemost* 2010;104:709-17.
- Pawliczak R, Lewandowska-Polak A, Kowalski ML. Pathogenesis of nasal polyps: an update. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005;5:463-71.
- Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Suh LA, Carter R, Norton J, et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:410-20.e5.
- Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2010;10:440-52.