

好酸球性副鼻腔炎におけるバイオマーカー、上下気道病態の関連性、手術療法に関する研究

研究分担者	竹野幸夫	広島大学	教授
研究協力者	石野岳志	広島大学病院	講師
	堀部裕一郎	広島大学病院	助教
	高原 大輔	広島大学病院	助教
	西田 学	広島大学病院	医科診療医
	小田 尊志	広島大学病院	医科診療医
	竹本 浩太	広島大学病院	医科診療医
	川住 知広	広島大学	医科診療医

研究要旨

前年に引き続き鼻副鼻腔炎症例の臨床データ収集を行ない、JESREC study により確立した診断基準の妥当性について検討した。また基礎的研究として、1) 鼻副鼻腔粘膜における SARS-CoV-2 関連受容体の発現制御と NO 産生能力の関連性の解析、2) 鼻茸組織のトランスクリプトーム解析による好酸球性副鼻腔炎 (ECSR) と non-ECSR における相違の検討。臨床研究として、3) 下気道病変から見た ECSR 病態と抗体製薬の有用性について検討した。

A. 研究目的

好酸球性副鼻腔炎 (ECSR) の疾患概念が提唱され、JESREC スコアをもとにした診断基準と重症度分類が確立されている。この概念は病態と臨床予後に密な関連性が検証され、国際的にも認知が進んでいる。しかしながら実地臨床では、本疾患は極めて薬剤抵抗性で難治であり、内視鏡下副鼻腔手術 (ESS) の術後再発も高頻度である。また診断基準作成から間もないため、疫学調査と臨床データの集積も十分ではない。また、新規に抗体製薬の保険適応承認が 2020 年より得られており、ステロイド内服にかわる新規治療として期待が持たれている。これらに関して、本年度も引き続き臨床背景と治療予後に関するデータ収集を下気道疾患（特に合併気管支喘息）との関連性に焦点をあてて行なった。

また基礎的研究として、1) ヒト生体内で産生される一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の多機能性に焦点を当て、生理的に主要な NO 産生臓器であるヒト鼻副鼻腔における感染防御機構の解析、新型コロナウイルス感染と鼻副鼻腔炎病態の解析、2) 副鼻腔粘膜組織のトランスクリプトーム解析による好酸球性副鼻腔炎 (ECSR) と non-ECSR における相違、の検討を行った。

COVID-19 の原因である SARS-CoV-2 は鼻腔粘膜への強い親和性を有しており、この要因として鼻副鼻

腔粘膜に宿主側受容体である ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) と TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2) が共発現していることが想定されている。この点に着目し ACE2 の発現制御機構の解析が NO を介した感染制御の解明の一助となると考え、慢性鼻副鼻腔炎病態に伴う変化を検討した。

またこれまでのオミクス解析により正常 control と比較し、ECSR および non-ECSR とも明らかな RNA 発現の相違が確認されており、この相違が病態形成に関与していることが想定されている。

さらに臨床研究として、3) 当院呼吸器内科と診療連携し重症喘息に対して抗体製薬を使用した症例について ECSR の合併有無と気道過敏性に対する有効性の変化についても検討した。

B. 研究方法

基礎的研究

1) 鼻副鼻腔粘膜における SARS-CoV-2 関連受容体の発現制御と NO 産生能力の関連性の解析、ACE2、TRPMSS2 の遺伝子発現と局在を real-time RT-PCR 法、ELISA 法、蛍光二重免疫組織染色と共焦点レーザー顕微鏡 (LSCM) にて検討した。また臨床背景と副鼻腔炎のエンドタイプ、重症度、Type1・Type2 サイトカイン炎症との関連性を解析した。

2) 鼻副鼻腔組織のトランスクリプトーム解析によ

る ECRS と non-ECRS における解析。

手術中に採取した粘膜組織を用いて、ライブラリを作成し single cell RNA seq 法を用いて遺伝子解析を各 phenotype 病態ごとに、発現遺伝子の優位性を解析した。

3) 呼吸器内科で加療中の気管支喘息患者を対象とした、各種抗体製薬の気道病変に対する有効性の検討。

2018 年～2020 年までの期間において、当院呼吸器内科から重症喘息の診断にて抗体製薬の投与が開始された症例を対象とした。喘息の評価には喘息コントロールテスト (ACT)、肺機能 (FEV1.0)、FeNO、OCS 投与量 (PSL 換算)、好酸球数を測定し投与前後での比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画の骨子についての倫理的内容については、広島大学倫理委員会にて、「上気道炎症疾患の遺伝子解析と炎症誘導因子の解析に関する研究」(許可番号 ヒ-136 号)、「好酸球性副鼻腔炎に対する手術治療および保存的治療の予後調査」(許可番号 第 E-996 号)、「気管支喘息などの慢性下気道疾患が好酸球性・アレルギー性鼻副鼻腔疾患病態に及ぼす影響の研究」(許可番号 第 E-2033 号)にて承諾が得られている。

これらの指針に従い、研究対象となる患者様に対しては、あらかじめ説明文書と同意文書にて、本研究の目的と趣旨を説明し、インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1) 鼻副鼻腔粘膜における SARS-CoV-2 関連受容体の発現制御と NO 産生能力の関連性の解析

ACE2 と TMPRSS2 の mRNA 発現は、ECRS 群が non-ECRS 患者とコントロール群に比べて有意に低下していた。また両者の発現量には、密な正の相関を認めた。ACE2 は、TNF- α や IL-1 β の Th1 由来のサイトカインと有意に正の相関があった。反対に Th2 由来の eotaxin-3、IL-13 の間には負の相関があった。免疫組織学的に ACE2 は上皮層、炎症細胞を主体に発現していた。蛋白レベルでも ACE2 の発現は、non-ECRS 群>コントロール群>ECRS 群の順に亢進していた。また線毛上皮細胞において ACE2 と TMPRSS2 の共発現が観察された。

2) トランスクリプトーム解析による ECRS と non-ECRS における比較

正常 control と比較し、JESREC score に基づいた分類である ECRS および non-ECRS とも明らかな

RNA 発現の相違が認められた。一方でアスピリン喘息合併 (AERD) の交絡因子を加味したところ、各グループ (non-ECRS、ECRS、AERD) 間における発現遺伝子の profile 変化は異なるものとなった。一方、発現 RNA の観点で各副鼻腔炎を検討したところ、各副鼻腔炎とも大まかに 2 群に分類可能であることが判明した。

3) 下気道病変から見た ECRS 病態と抗体製薬の有用性

現在までの解析症例における、抗体製剤の種類別の ECRS における有効性の評価を記載する。ACT の平均値は ECRS 群では非 ECRS 群に比較してより大きな改善を示す傾向が示唆された。肺機能および FeNO は ECRS 群 6 例中 4 例に改善を認め、非 ECRS 群では 4 例中 2 例が改善している。OCS は両群において不変あるいは減量を認めたが、ECRS 群ではほぼ終了することが可能な症例も存在した。好酸球数は ECRS 群において有意差をもって改善した。FeNO、FEV1.0 に関しては一定の傾向は得られなかった。また ECRS 群の CT スコアは 4 例中半数が改善した。

D. 考察

1) 鼻副鼻腔粘膜における SARS-CoV-2 関連受容体の発現制御と NO 産生能力の関連性の解析

ヒト上気道が元来有する NO 産生を用いた抗ウイルス効果の検証は、個人レベルにおける新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に対する効果的な予防法と新規局所治療法に繋がる有望なテーマと考えられる。2019 年 12 月よりわが国でも outbreak した SARS-CoV-2 に対する NO による抗菌・抗ウイルス作用誘導に至る因子の解明について研究を行なった。

NO による抗ウイルス作用は一般的な呼吸器ウイルス (ライノウイルス、インフルエンザウイルス) に対する活性窒素酸素種 (RNOS) による障害作用や、ウイルス複製などに必要なアミノ酸のシステイン残基を S-ニトロシル化により不活化する機序が報告されている。また代表的な上気道炎症である副鼻腔炎病態において、副鼻腔における NO 濃度は低下しており、NO 産生を介した防御機構の低下が想定されている。

鼻副鼻腔におけるウイルスの感染・侵入と複製を可能にする宿主細胞の同定と機能解析は、その感染予防対策に不可欠なテーマである。SARS-CoV-2 はエンベロープウイルスであるため、その放出に細胞溶解を必要としない。従って臨床症状を伴わない初期段階で鼻粘膜細胞が有する既存の分泌経路を利用している可能性がある。これらの事象は同時に NO による生理的

防御機構の構築と局所治療の標的とする早期介入の理論的根拠となりうると思われる。

今回の検討で、ACE2 と TMPRSS2 が副鼻腔線毛細胞に一致して共発現しており、非好酸球性副鼻腔炎に代表される Type 1 炎症病態により増強していることを解明した。引き続き Type 1、Type 2 炎症性サイトカインの影響や、合成 spike 蛋白を用いた protein binding assay などの手法によるウイルスへの易感染性の評価を試みる予定である。

2) 鼻茸組織のトランスクリプトーム解析による ECRS と non-ECRS の各群の検討では、ECRS および non-ECRS の両者で明らかな RNA 発現の相違が認められた。他方でアスピリン喘息合併 ECRS(+AERD)の下気道病態も合わせての各グループ間での比較検討では異なるプロファイリングが認められ、むしろ炎症背景として大まかに 2 群に分類可能であることが推測された。今回の結果からでは、鼻茸発症機序の観点（フェノタイプ）で既存の慢性副鼻腔炎を分類するには従来とは異なる分類方法が必要である可能性が同時に推測された。また臨床背景として手術患者を除く嗅覚障害患者の治療成績と末梢血好酸球数との関連において、好酸球数が 8.0%以上の高値で治療成績が不良であった。このように治癒不良例における発症背景として好酸球性炎症はあるものの、さらに他の要因による発症も考える必要があることが想定された。

3) One airway one disease の概念の元、上気道と下気道の病態を包括的に俯瞰することにより、ECRS の治療戦略においても気管支喘息への対応が密接に関与することが想定される。

近年、Type2 炎症あるいは好酸球性炎症を標的とした各種抗体医薬品の臨床応用が進んでいる。一方で気管支喘息と異なり、ECRS における鼻茸形成とサイズ維持における好酸球浸潤以外の複合的な要因が関与していることと、また症状改善のため機能手術介入 (ESS) が重要であることが知られている。

今回の検討では、呼吸器内科と共同で下気道病変から見た ECRS 病態と抗体製薬の有用性について検討した。エントリー症例数が限られているために明瞭な有意差は認められなかったが、ACT の平均値は ECRS 群では非 ECRS 群に比較してより大きな改善を示す傾向を示した。同時に経口ステロイドの投与量に関しても両群において減量可能である点が示唆された。同時に好酸球数も ECRS 群において有意差をもって改善した。

今回の検討からも、生物学的製剤の適切な使用と普

及には、上気道と下気道とで独立したエンドタイプ分類の確立とともに著効例を予測できるバイオマーカーの探索も重要であると考えられる。

E. 結論

本年度も ECRS の病態と治療に関して基礎的研究と、臨床研究として抗体製薬の適応と手術療法の治療効果についてデータ収集を行なった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawasumi T, Takeno S, Nishimura M, Ishino T, Ueda T, Hamamoto T, Takemoto K, Horibe Y. Differential expression of angiotensin-converting enzyme-2 in human paranasal sinus mucosa in patients with chronic rhinosinusitis. *J Laryngol Otol*. 2021 Sep;135(9):773-778. doi: 10.1017/S0022215121001225. Epub 2021 Apr 30. PMID: 33928889

Ogawa Y, Kunimoto M, Takeno S, Sonoyama T, Ishino T, Hamamoto T, Ueda T. Pneumococcal conjugate vaccines reduce myringotomy with tympanostomy tube insertion in young children in Japan. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2021 Dec 11;7(1):259-265. doi: 10.1002/lio.2.710. PMID: 35155806

Takemoto, Kota; Takeno, Sachio; Ishino, Takashi; Ueda, Tsutomu; Hamamoto, Takao; Horibe, Yuichiro; Takahara, Daisuke; Kawasumi, Tomohiro. Nitric oxide synthase-2 (CCTTT)n polymorphism is associated with local gene expression and clinical manifestations in patients with chronic rhinosinusitis. *EUROPEAN JOURNAL OF INFLAMMATION* 2021 <https://doi.org/10.1177/20587392211052948>

Kawasumi T, Takeno S, Ishino T, Ueda T, Hamamoto T, Takemoto K, Horibe Y, Takashi O. Co-Expression and Localization of Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE2) and the Transmembrane Serine Protease 2 (TMPRSS2) in Paranasal Ciliated Epithelium of Patients with Chronic Rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2022 Jan 6:19458924211059639. doi: 10.1177/19458924211059639. Epub ahead of print.

2. 学会発表

○竹野幸夫, 藤枝重治, A.T. Peters, Z. M. Solar, R. C. Kern, E. Heffler, J. F. Masper, L. Crampette, A. P. Lane, 井上知之, 藤田浩之, H. Zhang, S. Nash, A. H. Khan, S. Siddiqui, J. A. Jacob-Nara, P. J. Rowe, Y. Deniz : 鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎における患者報告による味覚と嗅覚に対する Dupilumab の効果 (SINUS-24/52) (第 60 回日本鼻科学会、9 月 23-25 日、大津)

竹野幸夫 : 第 21 回日本 NO 学会 シンポジウム「鼻副鼻腔疾患から見た NO の多機能性」(2021 年 5 月 19・20 日、仙台市、2021)

小田 尊志, 竹野 幸夫, 竹本 浩太, 西田 学, 築家 伸幸, 石野 岳志 : 当科における生物学的製剤 (Benralizumab および Dupilumab) の臨床経験。第 1 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 (令和 3 年 7 月 1-3 日、金沢)

前田文彬、石川知慧、堀部裕一郎、石野岳志、竹野幸夫 : 広島におけるスギ・ヒノキ花粉や、ハウスダスト・ダニの重複感作例の経年的変化について。第 46 会日耳鼻中国四国連合学会 (令和 3 年 7 月 10・11 日、広島)

小田尊志, 石野岳志, 岩本博志, 高原大輔, 堀部裕一郎, 竹本浩太, 西田学, 竹野幸夫, 服部登 : 当院における好酸球性副鼻腔炎を合併した重症喘息症例に対する生物学的製剤の有効性についての検討 第 60 回日本鼻科学会 (令和 3 年 9 月 23-25 日、大津)

川住知弘, 小田尊志, 竹本浩太, 堀部裕一郎, 石野岳志, 竹野幸夫 : 慢性副鼻腔炎を背景としたヒト副鼻腔粘膜細胞における ACE2 と TMPRSS2 の発現変化。第 60 回日本鼻科学会 (令和 3 年 9 月 23-25 日、大津)

前田文彬、竹野幸夫、堀部裕一郎 : 広島県におけるアレルギー重複感作例の増加とダニとハウスダスト抗原感作の低年齢化について。第 4 回日本アレルギー学会中国・四国地方会 (令和 4 年 1 月 29 日)

小田 尊志, 竹本 浩太, 西田 学, 築家 伸幸, 竹野幸夫 : ECRS を合併した重症喘息症例に対するベンラリズマブの有効性についての検討。第 2 回耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会。(令和 4 年 4 月 14 日、弘前)

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