

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

分担研究報告書

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、
COVID-19 禍によるアレルギー感作に関する研究

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	広島大学病院	医科診療医
	石川 智慧	広島大学病院	医科診療医

研究要旨

鼻副鼻腔炎症例の臨床データ収集を行ない、各評価項目に関して EDC によるデータ収集を担当した。これにより JESREC study により確立した診断基準の妥当性、治療効果について検討した。また疫学研究として、1) コロナ禍における感染予防策がスギ花粉症感作と発症に及ぼす影響の調査。基礎的研究として、1) 鼻副鼻腔粘膜における苦み味覚受容体の genotype 解析を含めた発現制御と NO 産生能力の関連性の解析、2) 鼻茸組織における transglutaminase isoforms の発現が、病態に及ぼす影響について検討した。

A. 研究目的

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) 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（難治）であり、内視鏡下鼻副鼻腔手術 (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と効果的な治療法の集積も十分ではない。また、新規に抗体製薬 (dupilumab) 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。これらの疑問に関して、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行なった。

一方で、2020 年初頭からわが国でも pandemic となった COVID-19 感染流行の影響は、日本人の生活習慣と衛生行動に大きな影響を与えている。すなわち、不織布製マスクの着用、手洗い・うがいの励行、などの習慣化は外出時の抗原暴露の機会と程度を減少させている可能性が考えられる。そこで今回、過去 22 年間 (2000 年～2021 年) のスギ・ヒノキ花粉の飛散程度と抗原感作の指標である特異的 IgE 値を測定した症例を集計し、コロナ禍における感作と重症度の変化を

検証した。

また基礎的研究として、1) 鼻副鼻腔粘膜における苦み味覚受容体 (T2R) の genotype 解析を含めた発現制御と NO 産生能力の関連性の解析、2) 鼻茸組織における transglutaminase isoform の発現が、ECRS 病態に及ぼす影響について検討した。

臨床研究として、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上気道病変の合併有無と気道過敏性に対する治療効果の変化について検討した。

B. 研究方法

1) 疫学研究： 過去 22 年間 (2000 年～2021 年) で何らかのアレルギー症状を有し、精査目的にて広島大学病院で特異的 IgE 値を測定した症例 (約 20,000 名) を集計した。そしてスギ、ヒノキ花粉などの花粉抗原、ハウスダスト、ダニなどの通年性抗原などに対する陽性率、RAST スコアなどの項目に関して経年的、年齢別変化を集計・解析した。比較期間としては 2015-2022 (COVID-19 流行前 2015-2019、流行後 2020-2022) と設定した。

2) 基礎的研究：

2-1) 味覚受容体の発現と局在の解析。

鼻副鼻腔疾患で手術施行した症例の T2R38 の遺伝子多型 (SNP) を解析した。また T2R14、38 の mRNA 発現を RT-PCR にて測定した。口腔 (舌乳頭、陽性対照) と鼻副鼻腔組織を免疫染色により発現を確認した。これらの測定結果と疾患 (control, AR, non-ECRS, ECRS) における関係を解析した。

2-2) 鼻茸組織と対照群として鈎状突起を用い、TGM アイソフォームの発現を RT-PCR を用いて定量し、各群における TGM アイソフォーム mRNA の発現量の差について検討を行った。有意な発現量の差を認めた TGM アイソフォームについて、発現量と鼻茸組織中好酸球数との間の相関について検討した。さらに各 TGM アイソフォームにおいて、HE 染色と免疫組織化学染色を行い同蛋白の産生細胞について検討した。さらにレーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSCM) を用いて、TGM アイソフォームの細胞内局在について検討した。

さらに TGM アイソフォームと第 XIII A 因子において、 α -トロンビン存在下でフィブリン凝固能を評価し、凝固物を分解した上清を用いて、SDS-PAGE でフィブリン重合反応の相違を検討した。

(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)、「アレルギー疾患患者の抗原感作にスギ・ヒノキ花粉飛散が及ぼす影響に関する研究」(許可番号 第 E-1738 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) 疫学研究

COVID 以前の患者 1,879 名と COVID-19 期間の患者 686 名が後ろ向きに登録された。両群で年齢・性別の分布に大きな違いはなかった。スギ・ヒノキの花粉飛散量と飛散時期は、COVID-19 期間で増加する傾向にあったが有意差は認められなかった。

40~59 歳代においてスギとヒノキの陽性率が、COVID 以前の時代と比較して、COVID-19 期間には有意に減少していた。この年齢層では、感作陽性率はスギ

で 63.2% から 51.4% に ($p < 0.05$)、ヒノキで 53.7% から 31.0% に ($p < 0.01$) に減少が観察された。

また COVID-19 パンデミックが始まった後の患者の社会的行動と自覚的アレルギー症状の変化を、臨床記録に基づいて調査した。CAP スコアが陽性であるスギ/ヒノキ花粉症患者への問診では、COVID 時代の開始後に鼻症状と眼症状の改善を報告した患者の割合は、それぞれ 47.5% (58/122) と 30.3% (37/122) であった。鼻症状の改善率は、眼症状の改善率よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。

2) 基礎研究

2-1) 対象症例の TAS2R38 の遺伝子多型を解析した。疾患群ごとの比較では、副鼻腔炎群では PAV/PAV (いわゆる super taster) の genotype の割合が少なく、PAV/AVI と AVI/AVI の割合が多い傾向を認めた。組織由来の mRNA レベルにおいて T2R14、38 の発現を確認した。Non-ECRS の篩骨粘膜と ECRS の鼻茸組織において、T2R38 mRNA 発現量は有意差をもって低下を認め、病態との関連性が示唆された。

2-2) TGM 1、2、3、5 は両群間の各サンプルにおいてそれぞれ mRNA 発現を認め、TGM 1、2、3、5 は対象群と比較して、CRS wNP 群で有意な mRNA 高発現を認めた。また TGM2 では有意な低発現が認められた ($p < 0.01$)。TGM1 の発現量は鼻茸組織中好酸球数密度と有意な正の相関 ($p < 0.05$, $r = 0.513$) を示した。

免疫組織化学染色において、TGM1 産生細胞は主として粘膜下層に認められたが、鈎状突起に比べて鼻茸でより高度に認められた。LSCM による評価にて、TGM1 産生細胞が好酸球 (MBP 陽性細胞) と共陽性所見を示しており、好酸球の細胞質領域に TGM1 が局在していることが示された。また α -トロンビンの存在下において、TGM1 は第 XIII A 因子と同様のフィブリン重合能を示した。SDS-PAGE におけるフィブリン重合体の構成要素の検討から、 α -、 β -、 γ -フィブリン単量体、 γ - γ 二量体、 α - α 重合体が TGM1 と第 XIII A 因子でほぼ同様に確認された。

D. 考察

感作されたスギ・ヒノキ花粉症患者では、抗原特異的 IgE レベルは、花粉曝露の量と期間によって強く影響を受ける。これらの患者の CAP スコアは、大量の花粉にさらされたり、長期間に及び花粉に暴露されると上昇し、次のシーズンまで高く維持される。COVID-19 以前までの解析では、スギとヒノキの両方の CAP スコアが陽性である患者の割合は過去 18 年間継続的に増加しており、かつヒノキの CAP スコアの増加率は

25%で、スギに比較しより顕著であることが報告されている。対照的に COVID-19 パンデミック期間中の感染予防処置は、潜在的に花粉感作能力を減弱したといえる。花粉 (10~100 μm) やダニの糞 (10~40 μm) などの吸入された空気中のアレルゲンは、アレルギー性鼻炎の典型症状において、IgE を介した免疫応答を引き起こす重要な役割を果たしている。これらは通常のサージカルマスクで十分な、防塵効果が得られるものと思われた。

2-1) 味覚受容体は口腔・舌のみならず気道系 (鼻副鼻腔) にも存在している。中でも苦味受容体 (T2R) と甘味受容体 (T1R) は上気道自然免疫に関与していることが近年、脚光をあびている。T2R には 25 種のサブタイプがあり、特に T2R38 はグラム陰性菌に刺激されることによって防御反応を引き起こす。また T2R38 には遺伝子多型 (SNP) の存在が確認されており、PAV / PAV 遺伝子型をもつ患者は AVI をもつ患者と比較して苦味に敏感で、副鼻腔感染頻度が低いことが海外で明らかになりつつある。そこでこの度、日本人を対象とした慢性鼻副鼻腔炎を含む症例の遺伝子多型や発現を検討することにした。そして慢性鼻副鼻腔炎における T2R38 を介した自然免疫機序の解析を行い、興味深い結果を得ることができた。

2-2) 鼻茸の成因に関する基礎的研究 :

組織中好酸球浸潤を伴う鼻茸が特徴の ECRS の病態は Type2 炎症が中心であり、好酸球の活性化による脱顆粒などにより生じた粘膜組織障害が末梢血管からの血漿タンパク漏出を誘導することなどで鼻茸が形成される機序が想定されている。そこで本年度は慢性鼻副鼻腔炎患者から採取した鼻茸を用いて、既知の第 XIII 因子を除く各 TGM アイソフォームの発現、TGM アイソフォーム発現量と鼻茸組織中好酸球との関連、第 XIII 因子と比較した TGM のフィブリン重合能に関して検討を行った。

また好酸球の細胞溶解と脱顆粒はフィブリノーゲンや IL-5、IL-33 などの II 型サイトカインの過剰な活性化によって誘導されるが、過剰活性化された Type2 サイトカインとフィブリノーゲンを含む漏出血漿タンパクにより生じる浮腫状粘膜においては、細胞質内および細胞膜結合性に存在する TGM1 が好酸球の脱顆粒を契機に放出されている可能性が考えられた。

E. 結論

COVID-19 感染流行の影響は、日本人の生活慣習と衛生行動に大きな影響を与えた。同時に不織布製マスクの着用、手洗い・うがいの励行、などの習慣化は外出時の花粉抗原暴露の機会と程度を減少させている可

能性が考えられた。

苦味受容体、特に T2R38 は慢性鼻副鼻腔炎の自然免疫能力を反映し、T2R38 の発現量や遺伝子多型の解析は副鼻腔炎の病型と治療予後推測に有用であると考えられる。

TGM isoform、特に TGM 1 の鼻茸形成における能動的機序が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Oda T, Maeda F, Takeno S, Tsuru Y, Ishikawa C, Ishino T, Takemoto K, Hamamoto T, Ueda T, Kawasumi T, et al. Impact of Preventive Measures on Subjective Symptoms and Antigen Sensitization against Japanese Cedar, Cypress Pollen and House Dust Mites in Patients with Allergic Rhinitis: A Retrospective Analysis in the COVID - 19 Era. *Atmosphere* 2022, 13, 1000. <https://doi.org/10.3390/atmos13071000>

Ishino T, Takeno S, Takemoto K, Yamato K, Oda T, Nishida M, Horibe Y, Chikuie N, Kono T, Taruya T, Hamamoto T, Ueda T. Distinct Gene Set Enrichment Profiles in Eosinophilic and Non-Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps by Bulk RNA Barcoding and Sequencing. *Int J Mol Sci.* 2022 May 18;23(10):5653. doi: 10.3390/ijms23105653.

Sonoyama T, Ishino T, Takemoto K, Yamato K, Oda T, Nishida M, Horibe Y, Chikuie N, Kono T, Taruya T, Hamamoto T, Ueda T, Takeno S. Deep Association between Transglutaminase 1 and Tissue Eosinophil Infiltration Leading to Nasal Polyp Formation and/or Maintenance with Fibrin Polymerization in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 26;23(21):12955. doi: 10.3390/ijms232112955.

Takemoto K, Lomude LS, Takeno S, Kawasumi T, Okamoto Y, Hamamoto T, Ishino T, Ando Y, Ishikawa C, Ueda T. Functional Alteration and Differential Expression of the Bitter Taste Receptor T2R38 in Human Paranasal Sinus in Patients with Chronic Rhinosinusitis. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 24;24(5):4499. doi: 10.3390/ijms24054499.

2. 学会発表

Takeno S. Endoscopic resection of posterior

nasal nerves for severe allergic rhinitis in the COVID-19 era in Japan. BACO International 2023 (British Academic Conference in Otorhinolaryngology), (14-16 Feb, 2023, Buringham, UK)

竹野 幸夫, 高原 大輔, 岡野 敬子, 濱本 隆夫, 上田 勉: 慢性鼻副鼻腔炎の表現型の違いによる味覚機能の解析 第 35 回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会 (令和 4 年 9 月 8・9 日、倉敷)

竹野 幸夫, 石川 智慧, 小川 結衣, 竹本 浩太, 築家 伸幸, 西田 学, 小田 尊志, 堀部 裕一郎, 石野 岳志: 広島県におけるアレルギー感作の経年変化と COVID-19 流行の影響。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)

川住知弘, 岡野敬子, 高原大輔, 石野岳志, 竹野幸夫: 閉塞性睡眠時無呼吸症候群に対する CPAP 治療アドヒアランスに及ぼす鼻腔生理因子の検討。第 61 回日本鼻科学会 (令和 4 年 10 月 13-15 日、金沢)

小田尊志 1, 石野岳志 1, 竹本浩太 1, 西田学 1, 堀

部裕一郎 1, 竹野幸夫 1, 岩本博志 2, 服部登 2: 嗅覚/味覚障害を呈した成人喘息症例と好酸球性副鼻腔炎の合併に関する検討。第 61 回日本鼻科学会 (令和 4 年 10 月 13-15 日、金沢)

石川智慧, 石野岳志, 竹野幸夫: Oncostatin M (OSM) の好酸球性副鼻腔炎における病態形成への関与についての検討。第 61 回日本鼻科学会 (令和 4 年 10 月 13-15 日、金沢)

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