

**上気道炎症の病態と制御**  
**—臨床における疑問に挑む—**

---

## 序文

耳鼻咽喉科医として忙しい臨床に携わりながら、一流の研究を続けるための唯一の道はオンリーワンを追求することにある。トップワンを争っても基礎の研究者にとっても太刀打ちできない。臨床検体を得やすい利点を生かしてオンリーワンの研究を目指す必要がある。そのためには、「何ができるか」ではなく「何がしたいか」の発想が重要で、流行に飛びつかないこと、すでに他領域でわかっていることや、論文のためだけの研究に手を出さないこと、などが重要である。その研究がどれくらい重要かということに常に判断できる冷静さも要求される。

私自身の経験を振り返ると、大学院生のときは明確な目的もなくがむしゃらに研究をしていた。今から思うととても恥ずかしいが、少なくとも「自分の頭で考える」ことは身についた。大学院修了後の米国留学において、初めて「仮説を立ててそれを検証する研究手法」と、「論文作成のための論理的思考法」を学び、遅ればせながらこれが研究かと感じ入った。何ができるかではなく、目的のためには何をしたらよいかという発想のもと、目的を見据えた「大河小説のようなストーリー性のある研究」「大樹に次々と花を咲かせて、枝を広げていく研究」を目指したい。

オンリーワンの研究を見つけるもう一つの秘訣は「素朴な疑問を大切にすること」にある。自然界の摂理は美しいので、直感的になじまない定説は、まず疑ってみる必要がある。また、疑問は持ち続けることが重要で、5年10年と考えているうちに、思いがけないところから答えが生まれ、時代が進歩して解決に導いてくれる。長年にわたって疑問に思っていたことが解決したときは、自然界の真理に触れたような充足感を覚える。

本モノグラフは、私がこれまで大切にしてきた、上気道炎症の病態と制御に関する素朴な疑問が、どのように解決され、果たしてその成果が臨床に還元されているか、という視点で執筆した。私が入局したときの三重大学耳鼻咽喉科の恩師、三吉康郎教授は1971年に「上気道粘膜の生理と病態」で、坂倉康夫教授は1989年に「上気道液の生理と病態」で宿題報告を担当された。1983年の入局時には、粘液線毛輸送機能に関する研究が盛んに行われていたが、実は粘液分泌に関する研究が欠如していた。そこで、米国留学後には「粘液分泌」を研究テーマにして、1991年から疑問の解明に取り組んだ。

2004年から滋賀医科大学で研究活動を開始したが、2000年代初めごろから好酸球性鼻副鼻腔炎の病態が新たに注目され、2015年にJESRECスタディによる診断基準が作成された。2010年には2型自然リンパ球が発見され、上皮由来サイトカインの研究が進み、気道炎症における自然免疫の役割が注目された。アレルギー性鼻炎の有病率は2019年には49.2%に急増し、とくに、小児から若年者のスギ・ヒノキ花粉症患者の増加が著しい。2014年からはスギ花粉舌下免疫療法が開始され、2015年にダニ舌下免疫療法が導入され、2018年から対象が小児に拡大された。さらに、2020年から新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が流行し、3年経過した現在でも、まだ収束する気配を見せない。「上気道炎症の病態と制御—臨床における疑問に挑む—」と題した第124回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会（2023年）の臨床講演では、滋賀医大で行った研究成果を中心に、こうした「好酸球性鼻副鼻腔炎」「アレルギー性鼻炎」「舌下免疫療法」「COVID-19」など、時代に即した新たな病態に関する疑問にどのように対応してきたか紹介する。

基礎研究者と比較して、耳鼻咽喉科医が持つ大きな利点は、「臨床での疑問を有すること」、「臨床検体が容易に手に入ること」、「成果を臨床へ還元させる視点を有すること」にある。こうした点に、耳鼻

咽喉科医が研究を続ける意義があり、研究の重要性の判断には、「それが臨床にどうかかわるのか？」という冷静な問いかけも必要である。

卒後臨床研修が開始され、大学は独立行政法人化し、研究活動を取り巻く医療情勢は大きく変化している。こうした厳しい研究環境の中でも、たゆまずに医局員と研究を継続してきたことが大きな財産である。これまで、長年にわたって研究に協力し、支えていただいた先生方に心から感謝したい。

2023年5月

滋賀医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

清水 猛史

## 著者略歴

1983年	三重大学医学部卒業 耳鼻咽喉科学教室（三吉康郎教授）入局
1987年	三重大学大学院医学研究科博士課程修了
1988年	米国国立環境衛生科学研究所（NIH）留学
1996年	三重大学医学部附属病院講師（中央手術部）
2001年	三重大学医学部附属病院助教授（中央手術部）
2004年	滋賀医科大学医学部教授（耳鼻咽喉科学講座）
2020年	滋賀医科大学医学部医学科長（併任）

表紙絵 「鑑（あぶみ）骨舞う」

耳みて、鼻みて、口みて、のどみて。

裏表紙絵「真夜中のユニット」

小さい耳鏡，細い吸引管が足りない朝はありませんか？

作者 鴨川志野「工房カモ」

# 目次

序文 .....	ii
序章 臨床での疑問に気づくまで —病態気道における上皮細胞の再生と分化—	
Ⅰ 細胞分化の研究には何が必要か? .....	2
—細胞特異的分化マーカーの検索—	
1. 多列線毛円柱上皮	
2. 定常状態における気道上皮の細胞動態	
3. 各種分化モデルにおける気道上皮細胞の再生と分化	
4. 細胞特異的分化マーカーの検索	
1) レクチンによる検索	
2) ケラチンに対するモノクローナル抗体の検索	
5. ラット気管上皮細胞に対する8種類のモノクローナル抗体の作成	
Ⅱ 気道上皮細胞の再生と分化はどのように生じるか? .....	7
—各種細胞分化モデルを利用した検討—	
1. Repopulated tracheal graft (移植気管内の上皮細胞の再生)	
2. 機械的傷害時の上皮細胞の再生	
3. 胎児発生時の細胞分化	
4. 気道上皮の細胞修復機序—胎生期の細胞分化との比較—	
第1章 粘液分泌の疑問	
Ⅰ 粘液分泌の研究には何が必要か? .....	12
—粘液産生・分泌研究のための新たな手法・細胞培養モデル・動物モデル—	
1. 気道粘液の生理	
2. 気道粘液の構成	
3. 気道炎症と粘液過分泌	
4. 粘液分泌の研究に求められる新たな手法	
5. ヒト慢性鼻副鼻腔炎鼻汁に対する18種類のモノクローナル抗体の作成	
6. 分泌細胞などの分化形態を有するヒト鼻粘膜上皮の細胞培養モデル	
7. ラット鼻粘膜の粘液産生・分泌モデル	
1) LPS点鼻刺激モデル	
①粘液産生と杯細胞化生／②粘液分泌	
2) アレルギー炎症モデル	
①粘液産生と杯細胞化生／②粘液分泌	

<b>II</b>	<b>杯細胞化生はどのように生じるか？</b> .....	<b>21</b>
	—LPS 点鼻刺激によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生—	
	1. 杯細胞化生	
	2. LPS 点鼻刺激（1～3日間）によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生機序	
<b>III</b>	<b>感染とアレルギー性炎症における粘液産生・分泌はどのように生じるか？</b> .....	<b>23</b>
	—ラット鼻粘膜上皮の粘液産生・分泌モデルを利用した検討—	
	1. LPS 点鼻刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生・分泌機序	
	1) 粘液産生	
	2) 粘液分泌	
	2. アレルギー性炎症におけるラット鼻粘膜上皮の粘液産生・分泌機序	
	1) 粘液産生	
	2) 粘液分泌	
<b>IV</b>	<b>炎症に伴う粘液の変化にはどのような生理的役割があるか？</b> .....	<b>28</b>
	—異なる pH による AB-PAS 染色と、レクチン染色による検討—	
	1. 気道炎症と粘液の性状変化	
	2. 異なる pH を利用した AB-PAS 染色	
	3. レクチン染色による反応性の変化	
<b>V</b>	<b>インドメタシンがアレルギー性炎症の粘液産生を増加させるのは何故か？</b> .....	<b>31</b>
	—予想外の結果に新しい発見が隠れている—	
	1. インドメタシンがアレルギー性炎症の粘液産生を増加させた	
	2. 制御系メディエーターの役割	

## 第2章 好酸球性鼻副鼻腔炎の疑問

<b>I</b>	<b>鼻茸はどのように形成されるか？</b> .....	<b>34</b>
	—好酸球性鼻副鼻腔炎と組織リモデリング—	
	1. 好酸球性鼻副鼻腔炎の歴史	
	2. 慢性鼻副鼻腔炎のフェノタイプ・エンドタイプ	
	3. 鼻茸形成と鼻副鼻腔組織リモデリング	
<b>II</b>	<b>ニカワ様鼻汁の本体は何か？</b> .....	<b>38</b>
	—組織リモデリングにおける凝固線溶系因子の役割—	
	1. ニカワ様鼻汁	
	2. 血液凝固線溶系	
	3. 好酸球性鼻副鼻腔炎では凝固系が活性化されている	
	1) 組織因子（TF：tissue factor）	
	2) トロンピン（IIa）	
	3) 線溶系の抑制	
	4. 凝固線溶系因子によるプロテアーゼ受容体を介した炎症とのかかわり	
	1) プロテアーゼ受容体（PARs：protease activated receptors）	
	2) トロンピンなどの凝固因子は PARs を介して、鼻粘膜上皮細胞や線維芽細胞からの 粘液・サイトカイン・細胞外基質産生を誘導する	

- 3) 好酸球性鼻副鼻腔炎における凝固系の活性化と組織リモデリングの機序
- 5. 凝固線溶系をターゲットにした新たな治療戦略
  - 1) 活性化プロテイン C (APC : activated protein C)
  - 2) ヘパリン

### III 好酸球は病態形成にどうかかわるか? ..... 53

#### —好酸球と組織構成細胞の相互作用—

- 1. 好酸球性鼻副鼻腔炎における好酸球浸潤
  - 1) 気道炎症における好酸球の役割
  - 2) 好酸球性鼻副鼻腔炎における好酸球の役割
- 2. 好酸球と気道上皮細胞の相互作用と EGF 受容体の transactivation
  - 1) 好酸球と気道上皮細胞の共培養
  - 2) 相互作用における EGF 受容体の関与
  - 3) EGF 受容体の transactivation
- 3. EGF 受容体阻害薬を利用した治療戦略
  - 1) 培養気道上皮細胞からの MUC5AC ムチン, サイトカイン産生
  - 2) LPS 刺激とアレルギー性炎症におけるラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデル
- 4. 好酸球と鼻茸線維芽細胞の相互作用とエクソソームの役割
  - 1) 細胞外小胞 (エクソソーム) による細胞間情報伝達
  - 2) 好酸球と鼻茸線維芽細胞の共培養による VEGF 産生
  - 3) エクソソーム阻害薬による相互作用の抑制

### IV アラキドン酸代謝の不均衡は病態形成にどうかかわるか? ..... 63

#### —制御系脂質メディエーターを利用した治療戦略—

- 1. アラキドン酸代謝物とその作用
- 2. 好酸球性鼻副鼻腔炎におけるアラキドン酸代謝の不均衡
- 3. 制御系メディエーターとしてのアラキドン酸代謝物
  - 1) プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)
    - ① EP1, EP2, EP3, EP4 受容体とその役割/② EP アゴニストを利用した治療戦略
  - 2) プロスタグランジン I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)
  - 3) リポキシン A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>)
- 4. ω3 脂肪酸代謝物を利用した治療戦略
  - 1) ω3 脂肪酸代謝物
  - 2) 17,18-epoxy-eicosatetraenoic acid (17,18-EpETE) の気道上皮細胞に対する抗炎症作用
  - 3) 17,18-EpETE と 17,18-diHETE の 2 型自然リンパ球 (ILC2s) に対する抗炎症作用
- 5. 短鎖脂肪酸と抗炎症作用
  - 1) 腸内細菌叢と短鎖脂肪酸
  - 2) 鼻腔細菌叢と酪酸
  - 3) 酪酸による 2 型炎症の抑制作用

<b>V</b>	<b>自然免疫の役割は？</b> .....	<b>77</b>
	—上皮由来サイトカイン TSLP, IL-25, IL-33 と 2 型自然リンパ球 (ILC2s) —	
	1. 自然免疫と気道上皮細胞	
	2. 上皮由来サイトカイン, TSLP, IL-25, IL-33	
	1) TSLP	
	2) IL-25	
	3) IL-33	
	4) 好酸球性鼻副鼻腔炎における TSLP, IL-25, IL-33 の発現	
	3. 2 型自然リンパ球 (ILC2s)	
	1) 自然リンパ球サブセット	
	2) 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸における 2 型自然リンパ球 (ILC2s)	
	3) 好酸球性鼻副鼻腔炎末梢血における 2 型自然リンパ球 (ILC2s)	
	4) 好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における 2 型自然リンパ球 (ILC2s) の役割	
	4. 内因性プロテアーゼインヒビターを利用した治療戦略	
	1) 内因性プロテアーゼインヒビター	
	2) 好酸球性鼻副鼻腔炎における内因性プロテアーゼインヒビターの役割	
	3) 好酸球性慢性炎症マウスモデルにおける内因性プロテアーゼインヒビターの点鼻投与の効果	
<b>VI</b>	<b>炎症制御因子の役割は？</b> .....	<b>90</b>
	—制御性 T 細胞と制御系サイトカイン—	
	1. 制御性 T 細胞	
	1) 制御性 T 細胞のサブセットと機能	
	2) 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸における, Th2 細胞, Tr1 細胞, Foxp3 <sup>+</sup> Treg, ST2 <sup>+</sup> Treg	
	3) IL-33 による ST2 <sup>+</sup> Treg の誘導	
	2. 制御系サイトカイン	
	1) IL-10, IL-35, IL-27	
	2) 鼻茸中の IL-10, IL-35, IL-27 濃度と IL-27 産生細胞	
	3) 末梢血単核球からの IL-5, IL-13, IL-10 産生と, Th2 細胞, Tr1 細胞の誘導に対する IL-27 の作用	
<b>VII</b>	<b>鼻粘膜基底細胞の役割は？</b> .....	<b>96</b>
	—基底細胞の過形成と上皮由来サイトカイン産生—	
	1. 基底細胞の過形成	
	2. 基底細胞への分化を促進する細胞培養法	
	3. 基底細胞の性質	
	1) TSLP, TLR3, PAR-2 の mRNA 発現と TSLP 産生	
	2) IL-6, IL-8, TLR4 の mRNA 発現と IL-6, IL-8 産生	
	3) IL-4, IL-13 刺激による細胞増殖	
	4) RNA-sequence による網羅的解析	
	4. 鼻茸における基底細胞の検討	
	1) p63, Ki67, TSLP の免疫蛍光染色	
	2) p63 陽性細胞 (基底細胞) 数と Ki67 陽性細胞数	

### 第3章 アレルギー性鼻炎の疑問

- I スギ・ヒノキ花粉の飛散状況は今後どう変化するか? ..... 102  
—スギ・ヒノキ花粉飛散は減少するのか?—
1. スギ・ヒノキ花粉症の現状
  2. スギ・ヒノキ花粉飛散予測
  3. 20年以上にわたるスギ・ヒノキ花粉飛散数の測定からわかること
- II 自然免疫の役割は? ..... 107  
—自然免疫を考慮した新たな治療戦略—
1. アレルギー性鼻炎と上皮由来サイトカイン (TSLP, IL-25, IL-33)
    - 1) TSLP, IL-25, IL-33 の産生機序と S100 蛋白, ATP, HMGB1 の役割  
① TSLP / ② IL-25 / ③ IL-33 /  
④カルプロテクチン (S100A8/S100A9 蛋白), ATP, HMGB1 の役割
    - 2) スギ花粉症と IL-25  
①スギ花粉症における鼻粘膜上皮からの IL-25 産生 / ②スギ花粉による IL-25 産生機序
    - 3) アレルギー性鼻炎における自然免疫の役割
  2. アレルギー性鼻炎と 2 型自然リンパ球 (ILC2s)
    - 1) 末梢血における 2 型自然リンパ球 (ILC2s)
    - 2) 鼻粘膜における 2 型自然リンパ球 (ILC2s)  
① 2 型自然リンパ球 (ILC2s) 数 / ② 2 型自然リンパ球 (ILC2s) の活性化機序
  3. 木村病と 2 型自然リンパ球 (ILC2s)
    - 1) 木村病の病態
    - 2) 2 型自然リンパ球 (ILC2s) と IL-4, IL-5, IL-13
    - 3) 木村病の臨床経過と 2 型自然リンパ球 (ILC2s)
- III I 型アレルギー炎症はどのように制御されるか? ..... 124  
—I 型アレルギー炎症を制御する新たな治療戦略—
1. 濾胞性ヘルパー T (T<sub>fh</sub>) 細胞と IgE 抗体産生
  2. Th2 細胞と 2 型サイトカイン産生
  3. Th1 反応の活性化による新たな治療戦略
- IV Local allergic rhinitis は存在するか? ..... 130  
—マウスモデルの確立とアレルギー性鼻炎の病態における役割—
1. Local allergic rhinitis (LAR) とは?
  2. マウスモデルを利用した LAR の検討
    - 1) カモガヤ (ragweed) 花粉の片側点鼻刺激
    - 2) FTY720 を利用した頸部リンパ節 (cLN) の機能抑制
- V 血管収縮作用があるトロンボキサン A<sub>2</sub> はどのように鼻粘膜腫脹を引き起こすか? ..... 135  
—プロスタグランジン (PG) D<sub>2</sub>・トロンボキサン (TX) A<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の作用機序—
1. TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> とシステイニルロイコトリエン (CysLTs)
  2. モルモットの鼻アレルギーモデルにおける TXA<sub>2</sub> と CysLTs の作用
  3. Cushion vein とは何か?
  4. TXA<sub>2</sub> によって鼻粘膜の血管は拡張するのか収縮するのか?



## 第4章 舌下免疫療法の疑問

- I 舌下免疫療法研究に何が必要か?…………… 142  
—同一患者の治療前後の血清と末梢血単核球を利用した検討—
1. アレルゲン免疫療法の歴史
    - 1) 皮下免疫療法
    - 2) 舌下免疫療法
  2. 舌下免疫療法の臨床的有効性
    - 1) スギ花粉症舌下免疫療法の臨床的有効性
    - 2) ダニ舌下免疫療法の臨床的有効性
    - 3) 舌下免疫療法の副反応
    - 4) 小児に対する有効性と安全性
    - 5) スギ花粉とダニの併用舌下免疫療法
  3. 血清と末梢血単核球を利用した舌下免疫療法の分子機序解明のための研究
- II 舌下免疫療法は末梢血単核球サブセットとその機能にどのような変化をもたらすか?…………… 148  
—制御性 T・B 細胞と制御系サイトカイン—
1. Th2 細胞と濾胞性ヘルパー T (Tfh: follicular helper T) 細胞
    - 1) Th2 細胞と制御性 T (Treg: regulatory T) 細胞
    - 2) 濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞と濾胞性制御性 T (Tfr) 細胞
    - 3) ダニ舌下免疫療法は、末梢血のヘルパー T 細胞 (CD4<sup>+</sup>T 細胞) サブセットと、末梢血単核球からのサイトカイン産生にどのような変化をもたらすか?
      - ① Th2 細胞, Treg 細胞, Tr1 細胞/② Tfh2 細胞と Tfr 細胞/
      - ③ダニ抗原刺激による末梢血単核球からの IL-5, IL-10 産生/
      - ④臨床症状との相関/⑤舌下免疫療法の作用機序
  2. 制御系サイトカイン IL-35
    - 1) IL-35 の役割
    - 2) IL-35 の機能
      - ①末梢血単核球/② CD4<sup>+</sup>T 細胞/③ Th2 細胞, 2 型自然リンパ球 (ILC2s), B 細胞
    - 3) スギ花粉舌下免疫療法と IL-35
      - ①制御性 T・B 細胞/②血清中の IL-35 値と臨床症状との相関
- III スギ花粉舌下免疫療法はヒノキ花粉症に免疫学的効果が期待できるか?…………… 156  
—特異的反応性と非特異的反応性, 交差反応性について—
1. スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する臨床効果
    - 1) スギ花粉とヒノキ花粉の相同性
    - 2) スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉飛散期の臨床効果
  2. スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する免疫学的効果
    - 1) 末梢血単核球からのサイトカイン産生と抗原特異的 IgE, IgG4 抗体産生
      - ①抗原刺激による末梢血単核球からのサイトカイン産生/
      - ②抗原特異的 IgE, IgG4 抗体

- 2) DCP マイクロアレイを利用して測定したスギ・ヒノキ花粉抗原特異的免疫グロブリンの経年的変化
  - ① DCP マイクロアレイ／②スギ花粉抗原特異的免疫グロブリンの変化／
  - ③ヒノキ花粉抗原特異的免疫グロブリンの変化

**IV 舌下免疫療法後に一時的に抗原特異的 IgE 抗体が増加しても治療効果が得られるのは何故か？**…………… 163

—特異的 IgE 抗体の抗原親和性 (avidity) の変化について—

1. 抗原親和性 (avidity) とは何か？
2. 舌下免疫療法後の抗原特異的 IgE 抗体の抗原親和性 (avidity) の変化
  - 1) 抗原親和性 (avidity) の測定
  - 2) スギ花粉舌下免疫療法後の抗原親和性の変化と Tfh 細胞分画の変化
  - 3) ダニ舌下免疫療法後の抗原親和性の変化と臨床効果

**V 舌下免疫療法後に長期間効果が持続するのは何故か？**…………… 168

—治療効果を反映したメモリー T 細胞の機能変化—

1. メモリー T 細胞の役割
2. メモリー T 細胞のアポトーシス
  - 1) DNA マイクロアレイによるメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞の網羅的遺伝子解析
  - 2) RT-PCR 法によるメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシス関連遺伝子発現
  - 3) FasL-Fas 経路を介したメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシス
3. 制御性 B 細胞 (BR1 細胞) によるメモリー Th2 細胞, メモリー Tfh2 細胞のアポトーシス誘導

**第 5 章 嗅覚・味覚障害の疑問**

**I 感冒後嗅覚障害の長期予後は？**…………… 174

—滋賀医科大学嗅覚味覚専門外来での臨床研究から—

1. 感冒後嗅覚障害とは
2. 感冒後嗅覚障害患者の嗅覚は 1 年後にどの程度まで回復するか？
3. 感冒後嗅覚障害患者の嗅覚回復傾向は、いつまで持続するか？
4. 感冒後嗅覚障害患者の予後因子は何か？

**II バルプロ酸ナトリウムは感冒後嗅覚障害の治療薬になるか？**…………… 177

—動物 (マウス) モデルと医師主導臨床試験による検討—

1. 感冒後嗅覚障害の治療
2. バルプロ酸の神経細胞分化促進作用
3. バルプロ酸ナトリウム内服は、マウス嗅上皮傷害モデルにおける嗅神経再生を促進する
4. バルプロ酸ナトリウム内服は、感冒後嗅覚障害患者の嗅覚回復を促進する

**III 先天性嗅覚障害の診断における MRI 検査の役割は？**…………… 181

—MRI 検査による嗅球・嗅溝の観察—

1. 先天性嗅覚障害の診断
2. MRI 検査による嗅脳の計測
3. 嗅球無形成は、先天性嗅覚障害を強く示唆する
4. 嗅脳の計測により、先天性と後天性嗅覚障害を区別することは可能か？

- IV 鼻粘膜はアルツハイマー病早期診断のターゲットになるか？…………… 184
- 脳神経が外界に露出する唯一の部位としての嗅上皮—
1. アルツハイマー病 (AD) の病態と診断
  2. 鼻腔検体を利用したアルツハイマー病 (AD) の診断
  3. 若年性アルツハイマー病 (AD) 患者の剖検組織における嗅上皮の変化
  4. 鼻粘膜擦過物を利用したアルツハイマー病 (AD) 診断の可能性
  5. 神経細胞由来のエクソソームを利用した診断
- V アルツハイマー型認知症により味覚機能は低下するか？…………… 189
- 濾紙法と電気味覚検査による検討—
1. 味覚の中樞伝達経路
  2. アルツハイマー型認知症患者の味覚機能検査

## 第6章 COVID-19の疑問

- I カニクイザルの嗅上皮における感染病態は？…………… 194
- 気導性嗅覚障害と嗅神経性嗅覚障害の病理組織変化—
1. COVID-19 と嗅覚障害
  2. SARS-CoV-2 感染カニクイザルモデル
  3. SARS-CoV-2 感染による嗅上皮の変化
    - 1) SARS-CoV-2 の局在
    - 2) 嗅上皮の病理組織学的変化
    - 3) 免疫担当細胞としての支持細胞の役割は何か？
    - 4) メラノサイトの役割は何か？
- II ブレインフォグと呼ばれる中枢神経症状は嗅上皮を介した感染が原因か？…………… 200
- 嗅球を介した頭蓋内感染の可能性—
1. COVID-19 の中枢神経症状
  2. SARS-CoV-2 の嗅覚系を介した頭蓋内感染の可能性
    - 1) 嗅神経細胞から嗅糸まで
    - 2) 嗅球を介した脳への感染
- III 抗ウイルス作用・免疫調節作用を有する 14, 15 員環マクロライド系抗菌薬は重症化の抑制に有効か？…………… 203
- パンデミック感染時における 14, 15 員環マクロライドの役割—
1. マクロライド療法と 14, 15 員環マクロライドの免疫調節作用
  2. 抗菌作用を持たない新規エリスロマイシン誘導体, EM900 の新たな薬剤としての可能性
  3. マクロライド療法と薬剤性 QT 延長症候群
  4. 14, 15 員環マクロライドの抗ウイルス作用
  5. インフルエンザウイルス・コロナウイルスによるパンデミックの歴史
  6. カニクイザルの高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1, H7N9) 感染に対するクラリスロマイシンの効果
  7. COVID-19 における 14, 15 員環マクロライドの役割

<b>附章 オンリーワン研究のすすめ</b> .....	<b>211</b>
—これから研究を始める若い先生方へ伝えたい「研究の心得」—	
1. 「仮説を立ててそれを検証する研究手法」	
2. 「何ができるか？」ではなく「何をしたいか？」	
3. どうすればオンリーワンのテーマを見つけることができるか？	
4. 疑問を大切に持ち続ける	
5. 予想に反する結果が得られたときこそチャンスであり，大きな発見がある	
6. 研究の落とし穴	
7. 新しい疑問	
8. まとめ	
<b>共同研究者</b> .....	<b>218</b>
<b>謝辞</b> .....	<b>219</b>

# 序章

## 臨床での疑問に気づくまで —病態気道における上皮細胞の再生と分化—

- I. 細胞分化の研究には何が必要か？
- II. 気道上皮細胞の再生と分化はどのように生じるか？

# I 細胞分化の研究には何が必要か？

## —細胞特異的分化マーカーの検索—

### 1. 多列線毛円柱上皮

鼻腔、気管などの気道粘膜を構成する呼吸上皮は多列線毛円柱上皮で、動物種や部位によって若干の異なりがあるが、主として基底細胞、線毛細胞、分泌細胞の3種類の細胞から成り立っている(図1)。線毛細胞は粘液線毛輸送機能にかかわり、異物を排除する生体防御機構の第一線で働いている。分泌細胞の中には多量の粘液を産生する杯細胞があり、この他 brush cell や neuroendocrine cell などの存在も報告されているが、その分布は極めて少なく機能についても不明な点が多い。さらに、これらいずれの細胞の特徴も有しない中間型、移行型の細胞として intermediate cell などの存在も報告されている<sup>1,2)</sup>。

定常状態では多列線毛円柱上皮が維持されているが、何らかの物理的・化学的刺激や傷害、細菌・ウイルス感染、栄養障害などが加わった病的状態では、上皮の肥厚や増殖を来し、分泌細胞(杯細胞)化生や扁平上皮化生が生じる。杯細胞化生は粘液過分泌を引き起こし粘膜防御に働くが、過剰な粘液の産生はしばしば炎症の遷延化の一因になり、病態に深くかかわる。扁平上皮化生は上皮の物理的バリアーとしての役割を果たす一方で、気道粘膜の乾燥や痂皮形成、あるいは発癌の母地となり得る問題をはらんでいる。

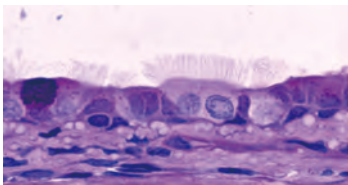


図1 ラット気管上皮

基底細胞、線毛細胞、分泌細胞(杯細胞)などから構成される。

### 2. 定常状態における気道上皮の細胞動態

気道上皮細胞の turnover time は動物種や報告者によって差があるが、ラット、ハムスター、マウスの気管では8~250日前後と推定される<sup>3)~5)</sup>。こうした長い turnover time のため DNA 合成の指標である [<sup>3</sup>H] thymidine 取り込み試験では、24時間後にラベルされる細胞の割合は、いずれも1~2%以下と極めて少ない。

Breuer ら<sup>6)</sup> は、 [<sup>3</sup>H] thymidine を注入したハムスターの気管支上皮細胞を経時的に検討し、注入1時間後には主として基底細胞と顆粒の乏しい分泌細胞に取り込まれるが、時間の経過とともにラベルされた基底細胞の割合が減少し、当初はほとんどラベルされない、顆粒の豊富な分泌細胞(杯細胞)や線毛細胞が標識されてくる。したがって、定常状態での気道上皮では基底細胞に stem cell としての役割が大きく、線毛細胞と顆粒の豊富な分泌細胞(杯細胞)は最終分化段階であると推測している。しかし、長い turnover time のため、定常状態での観察は困難な面が多く、実際には以下に述べる各種の分化モデルを利用した検討が多い。

### 3. 各種分化モデルにおける気道上皮細胞の再生と分化

さまざまな病的刺激に伴う細胞動態の変化や上皮の再生と分化の方向、機序については、ラット、マウス、ハムスター、サルなどにおける、SO<sub>2</sub>、タバコ、オゾン、NO<sub>2</sub>、LPS、エラストラーゼ、種々の発癌物質などによる化学的傷害や、上皮の擦過による機械的傷害、ウイルス感染やビタミンA欠乏による影響などが報告され、顕微鏡・電顕的な

細胞動態の観察，mitotic index や [<sup>3</sup>H] thymidine を利用した細胞増殖能の検討が行われている<sup>7)</sup>。

このうち，SO<sub>2</sub> やタバコの吸入刺激では，鼻腔や気管上皮の肥厚と細胞分裂像の増加，分泌細胞（杯細胞）の増加が観察され，漿液細胞や intermediate cell から杯細胞化生が生じると推測される<sup>8)</sup>。 [<sup>3</sup>H] thymidine を利用した検討では，オゾンや NO<sub>2</sub> の吸入刺激により，small mucous granule cell や intermediate cell が出現・増殖して傷害の回復に働き，杯細胞化生にかかわる<sup>9,10)</sup>。エラスターゼの気管内注入においても，顆粒の乏しい分泌細胞や intermediate cell が杯細胞化生を引き起こすと考えられている<sup>11,12)</sup>。機械的傷害における細胞修復過程については，ラットに気管切開を行って気道上皮を擦過し，線毛細胞と分泌細胞のみを傷害すると，残った基底細胞が分裂増殖し，分泌細胞，線毛細胞へ分化するが<sup>13)</sup>，ハムスターの気管で基底細胞まで擦過，傷害して同様の検討を行うと，周辺の基底細胞と分泌細胞が分裂増殖しながら創部へ移動し，重層上皮化したのちに多列線毛円柱上皮へ分化する<sup>14,15)</sup>。このように機械的傷害時の修復においては，基底細胞とともに分泌細胞の役割も注目される。

#### 4. 細胞特異的分化マーカーの検索

上述したように，定常状態や病的刺激による気道上皮細胞の動態変化については，各種の分化モデルなどを利用して，光顕・電顕による形態学的研究や細胞増殖能の検討により，多くの報告がある。しかしながら，いずれの研究も形態学的所見に依存しているため，形態学という制約から結果は明らかにできても，その過程は解明できない問題が残されている。

線毛細胞は最終分化段階と考えられ，通常は分化・増殖にほとんど関与しないが，基底細胞や分泌細胞は分化・増殖能を有している。基底細胞が stem cell と考えられる重層扁平上皮とは異なり，大きく形態の異なる3種類の細胞から構成される気道上皮の細胞動態はより複雑である。基底細胞は hemidesmosome を介して上皮と基底膜の接合に働く分化した細胞とも考えられる。杯細胞化生

や扁平上皮化生の機序のみならず，stem cell の認識や線毛細胞に至る細胞分化の過程，intermediate cell などと呼ばれる中間型細胞群の役割など，いまだに解明されていないことが多い。

そこで，気道上皮細胞の再生や分化の過程を明らかにする新たな手段として，各種の上皮細胞を認識する細胞特異的分化マーカーを利用することを考えた。こうした細胞特異的な分化マーカーを得ることができれば，細胞分化の過程を認識できる可能性があり，上皮細胞の分化・再生の研究に画期的な一手法を加えることができる。これまで形態学のみ頼らざるを得なかった研究に大きな発展が期待され，各種細胞の同定やそのサブタイプの認識，フローサイトメトリーを利用した細胞分離などに応用することも可能である。

##### 1) レクチンによる検索

レクチンとは，特定の糖鎖構造と結合する能力を有するタンパク質の総称で，植物，動物，菌類などに由来する多くの種類が知られている。細胞表面の糖鎖構造の違いによって，結合できるレクチンが異なり，細胞の分化に伴って細胞表面の糖鎖構造も変化することが知られている。そこで，こうしたレクチンを細胞分化の生化学的マーカーとして利用できないかと考え，ラット気管上皮細胞における反応性を網羅的に調べて，以下の8種類のレクチンについて詳細に検討した：*Griffonia simplicifolia I isolectin B<sub>4</sub>* (GSI-B<sub>4</sub>)，*Arachis hypogaea* (PNA)，*Wisteria floribunda* (WFA)，*Glycine max* (SBA)，*Dolichos biflorus* (DBA)，*Helix pomatia* (HPA)，*Ulex europaeus* (UEA-1)，*Madura pomifera* (MPA)<sup>16)</sup>。その結果，分泌細胞はさまざまな割合で多くのレクチンに認識されるが，基底細胞のほとんどが GSI-B<sub>4</sub> と PNA で認識され，末梢気管支ではクララ細胞のほとんどが MPA で認識されることが明らかになった。とくに，α-D-galactosyl groups を認識する GSI-B<sub>4</sub> はすべての基底細胞と反応した（図2）。一部の分類できない円柱細胞やごく少数の線毛細胞や分泌細胞も認識されたが，PAS 染色陽性の分泌細胞とはほとんど反応しなかった。ラットの気管近位部では，すべての基底細胞が GSI-B<sub>4</sub> に認

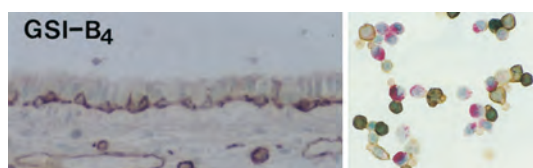


図2 GSI-B<sub>4</sub> lectin による染色<sup>16)</sup>  
 基底細胞が特異的に染色される (左図), PAS 陽性細胞は染色されない (右図).

識され, GSI-B<sub>4</sub> 陽性細胞の 84% が基底細胞であることが確認され, GSI-B<sub>4</sub> はラットの気管上皮では基底細胞の分化マーカーとして使用できると考えた。

## 2) ケラチンに対するモノクローナル抗体の検索

ケラチンは上皮細胞の細胞骨格を形成するタンパク質の総称で, 組織や動物種によって違いがあるが, 一般にケラチン 5, 14 が基底側の細胞に認められ, ケラチン 7, 8, 18, 19 が管腔側の細胞に存在することが報告されている<sup>17)</sup>。そこで, こうしたケラチンに対するモノクローナル抗体を利用して, ラット気管上皮での反応性を検討したところ, ケラチン 14 に対するモノクローナル抗体 (LL002) が基底細胞を認識し, ケラチン 18 に対するモノクローナル抗体 (CK18-2) が分泌細胞と線毛細胞を含む円柱細胞を認識することが明らかになった<sup>18)</sup> (図 3)。

フローサイトメトリーを利用して, GSI-B<sub>4</sub> 陽性細胞と陰性細胞を分離してその反応性を比較し

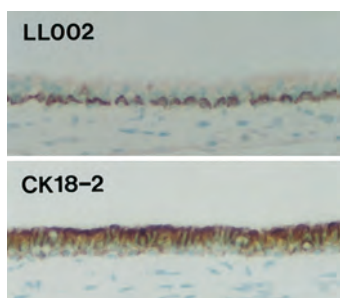


図3 ケラチン 14 に対するモノクローナル抗体 (LL002) とケラチン 18 に対するモノクローナル抗体 (CK18-2) の免疫染色

たところ, GSI-B<sub>4</sub> 陽性細胞ではその 95% がケラチン 14 陽性であったが, GSI-B<sub>4</sub> 陰性細胞におけるケラチン 14 陽性細胞は 2% 程度であった。以上の結果から, ラットの気管上皮では, ケラチン 14 が基底細胞のマーカーとして, ケラチン 18 が円柱細胞 (分泌細胞と線毛細胞) のマーカーとして利用できると考えた<sup>19)</sup>。

## 5. ラット気管上皮細胞に対する 8 種類のモノクローナル抗体の作成

レクチンとケラチンに対するモノクローナル抗体の検索によって, 3 種類の基底細胞と円柱細胞に対する分化マーカーを得ることができたが, より多くの細胞特異的マーカーを得るために, ラット気管上皮細胞に対するモノクローナル抗体を作成した<sup>20)</sup>。

モノクローナル抗体の作成においては, 抗原として何を使用するか, そして無数に作られる抗体のうち, 自分が必要とする抗体を産生しているクローンを, 短期間にいかにスクリーニングして選び出すかが重要である。そこで, できるだけ多くの種類の抗体を得るため, 抗原には基底細胞, 分泌細胞, 線毛細胞のすべてを含んだ分離直後のラット気管上皮細胞をそのまま使用した。ラットの気管内腔を 1% pronase で満たして 4°C で一晩放置し, 翌日気管内を洗浄して気管上皮細胞を回収し, マウスの尾静脈に注入した。免疫組織学的にラットの気管上皮細胞を染色してマウス血清中の抗体価を測定し, 9 回の静脈内注入を経て抗体価が 1,000 倍以上上昇した 110 日目に, マウスの脾細胞を取り出してマウスミエローマ NS-1 細胞と融合させてハイブリドーマを作成した。

スクリーニングには少量の抗原で一度に多数の検体が処理でき, さらに認識する細胞をその場で評価できる新たな手法を開発した。スライドグラスに疎水性ペンで 16 個の円を作成し, 各円内に約 8,000 個のラット気管上皮細胞を付着させて乾燥し, -20°C のアセトンで固定保存した<sup>21)</sup> (図 4)。ハイブリドーマの培養上清を用いてこのスライドを染色して, 免疫組織学的に抗体の反応性を検討した。初回のスクリーニングで検索した 1,344 個



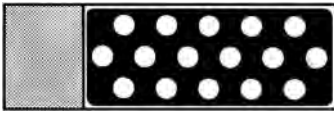


図4 組織学的スクリーニングに利用したラット気管上皮細胞を付着させたスライド<sup>21)</sup>

の well のうち 649 個が陽性であった。さらに 4 回の同様なスクリーニングと、ラット胸腺細胞を利用したネガティブスクリーニング、さらにラット気管上皮の凍結切片とパラフィン切片 (2 回)、合わせて 8 回のスクリーニングの後、最終的に 8 種類のモノクローナル抗体を産生するクローンを得た<sup>21)</sup>。

作成したモノクローナル抗体はその染色パターンから 4 つに分類できた (図 5)。①すべての気管上皮細胞を認識する抗体: RTE1 (後日の検討でケラチン 19 を認識していた)、②基底細胞と分泌細胞を含む非線毛細胞に対する抗体: RTE2, 7, 13 (分子量 69 KD の共通する抗原を認識していた)、③線毛細胞表面と線毛を認識する抗体: RTE3, ④分泌細胞の分泌顆粒に対する抗体: RTE9, 11, 12 で、このうち RTE12 はすべての分泌顆粒と反応し、RTE9, 11 はムチン様高分子量物質を認識して、すべての粘液顆粒と一部の漿液顆粒に反応した。このうち RTE9 が IgG<sub>3</sub> でその他の抗体はすべて IgG<sub>1</sub> であった<sup>20)</sup>。

スクリーニングの難しさからか、こうした気道上皮細胞の一部を特異的に認識するモノクローナル抗体はこれまで作成されていなかった。そこで、

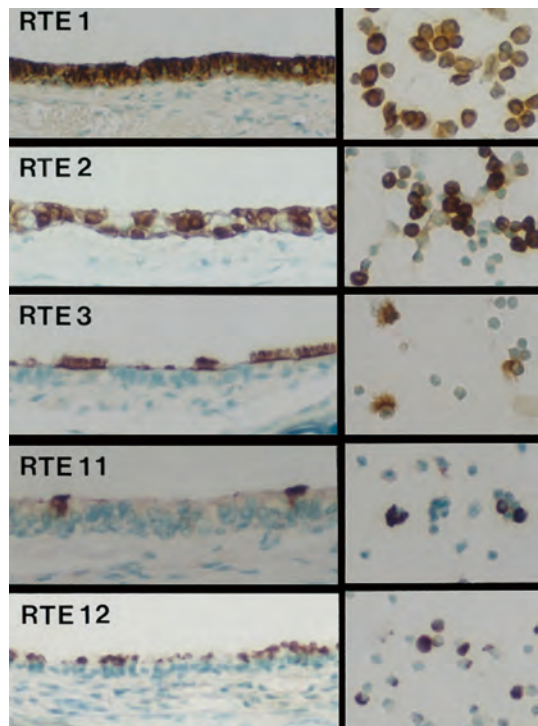


図5 ラット気管上皮細胞に対して作成したモノクローナル抗体の免疫染色<sup>20)</sup>

GSI-B<sub>4</sub> レクチン、ケラチン 14 と 18 に対するモノクローナル抗体、今回作成した 8 種類のラット気管上皮細胞に対するモノクローナル抗体の、合わせて 11 種類の細胞特異的分化マーカーを利用して、ラットモデルを用いた気管上皮細胞の分化・再生機序について検討した。

## まとめ

**疑問：細胞分化の研究には何が必要か？**

**答え：**レクチンによる網羅的検索とケラチンに対するモノクローナル抗体、新たに作成したラット気管上皮細胞に対するモノクローナル抗体の、合わせて 11 種類の細胞特異的分化マーカーを利用することで、細胞分化の過程を認識できるようになり、これまで形態学だけに頼らざるを得なかった細胞分化・再生の研究が大きく発展した。

文献

1. Jeffery PK. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:S14-20.
2. McDowell EM, Combs JW, Newkirk C. A quantitative light and electron microscopic study of hamster tracheal epithelium with special attention to so-called intermediate cells. *Exp Lung Res* 1983;4:205-226.
3. Blenkinsopp WK. Proliferation of respiratory tract epithelium in the rat. *Exp Cell Res* 1967;46:144-154.
4. Bowden DH. Cell turnover in the lung. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:S46-48.
5. Basbaum C, Jany B. Plasticity in the airway epithelium. *Am J Physiol* 1990;259:L38-46.
6. Breuer R, Zajicek G, Christensen TG, et al. Cell kinetics of normal adult hamster bronchial epithelium in the steady state. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;2:51-58.
7. 清水猛史, 坂倉康夫. 病気気道における上皮細胞の再生と分化. *耳鼻免疫アレルギー* 1994;12:1-12.
8. Jeffery PK, Ayers M, Rogers D. The mechanisms and control of bronchial mucous cell hyperplasia. *Adv Exp Med Biol* 1982;144:399-409.
9. Wilson DW, Plopper CG, Dungworth DL. The response of the macaque tracheobronchial epithelium to acute ozone injury. A quantitative ultrastructural and autoradiographic study. *Am J Pathol* 1984;116:193-206.
10. Evans MJ, Shami SG, Cabral-Anderson LJ, et al. Role of nonciliated cells in renewal of the bronchial epithelium of rats exposed to NO<sub>2</sub>. *Am J Pathol* 1986;123:126-133.
11. McDowell EM, Combs JW, Newkirk C. Changes in secretory cells of hamster tracheal epithelium in response to acute sublethal injury: a quantitative study. *Exp Lung Res* 1983;4:227-243.
12. Breuer R, Christensen TG, Lucey EC, et al. An ultrastructural morphometric analysis of elastase-treated hamster bronchi shows discharge followed by progressive accumulation of secretory granules. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:698-703.
13. Gordon RE, Lane BP. Regeneration of rat tracheal epithelium after mechanical injury. II. Restoration of surface integrity during the early hours after injury. *Am Rev Respir Dis* 1976;113:799-807.
14. Keenan KP, Combs JW, McDowell EM. Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. I. Focal lesions: quantitative morphologic study of cell proliferation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1982;41:193-214.
15. Keenan KP, Wilson TS, McDowell EM. Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. IV. Histochemical, immunocytochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1983;43:213-240.
16. Shimizu T, Nettesheim P, Mahler JF, et al. Cell type-specific lectin staining of the tracheobronchial epithelium of the rat: quantitative studies with *Griffonia simplicifolia* I isolectin B<sub>4</sub>. *J Histochem Cytochem* 1991;39:7-14.
17. Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, et al. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci* 1990;97(Pt 1):39-50.
18. Shimizu T, Nettesheim P, Ramaekers FC, et al. Expression of "cell-type-specific" markers during rat tracheal epithelial regeneration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:30-41.
19. Randell SH, Shimizu T, Bakewell W, et al. Phenotypic marker expression during fetal and neonatal differentiation of rat tracheal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:546-555.
20. Shimizu T, Nettesheim P, Eddy EM, et al. Monoclonal antibody (Mab) markers for subpopulations of rat tracheal epithelial (RTE) cells. *Exp Lung Res* 1992;18:323-342.
21. 清水猛史. ラット気管上皮細胞の分化マーカーとしてのモノクローナル抗体の作成. *耳鼻免疫アレルギー* 1992;10:70-75.

## II 気道上皮細胞の再生と分化はどのように生じるか？ —各種細胞分化モデルを利用した検討—

前述した 11 種類の細胞特異的分化マーカーを利用して、Repopulated tracheal graft (移植気管内の上皮細胞の再生)<sup>1)</sup>、針金で気管内に傷をつけた機械的傷害時の上皮細胞の再生<sup>2)</sup>、胎児発生時の気管上皮細胞の細胞分化<sup>3)</sup>について、ラットモデルで検討した。それぞれの分化マーカーと使用した固定・包埋法を表 1 に示す。

### 1. Repopulated tracheal graft (移植気管内の上皮細胞の再生)<sup>1)</sup>

気管内腔を 1% pronase で満たして 4°C で一晩放置して分離・回収したラットの気管上皮細胞を、冷凍と解凍を繰り返して枠組みだけにした気管内に注入し、気管ごと他のラットの背部皮下に移植すると、移植した気管内に上皮が再生してくる。この上皮再生過程を光顕・電顕的に検討すると、細胞注入 4 日目には内腔はグリコーゲン顆粒に富んだ 1～3 層の未分化細胞に覆われる。7 日目には分泌細胞や基底細胞の分化が始まり、9 日目には未熟な線毛細胞が出現し、11 日目にはほぼ正常な多列線毛円柱上皮が認められる (図 1)。

この過程を各種分化マーカーで検討すると、4 日目に出現する未分化細胞は形態学的にはどの細胞

の特徴も有しないが、すべて基底細胞のマーカーである GSI-B<sub>4</sub> と LL002 と反応し、この反応性は分泌細胞や線毛細胞への分化に伴って徐々に消失した。しかし、形態学的には正常な多列円柱線毛上皮が認められる 11 日目においても、なお GSI-B<sub>4</sub> や LL002 に陽性な分泌細胞や線毛細胞が認められた。円柱細胞のマーカーである CK18-2 の反応性は、4 日目の未分化細胞では一部の細胞表面に薄く認められるのみであったが、7～11 日目にはすべての円柱細胞に認められた。RTE11 で認識される分泌細胞は、7 日目から観察され、11 日目には杯細胞が認められ、管腔内に分泌された粘液も染色された。一方、RTE3 で認識される線毛細胞は、分泌細胞より遅れて分化が開始され、9 日目に未熟な線毛細胞が出現し、14 日目に成熟した線毛細胞へ分化した (図 1)。

### 2. 機械的傷害時の上皮細胞の再生<sup>2)</sup>

ラットに気管切開を行い、針金で気管内に傷をつけて機械的に傷害した気管上皮の細胞修復過程を同様の方法で検討した。標本採取 6 時間前にコルヒチンの腹腔内投与を行い、分裂期にある細胞数を計測して細胞増殖能の検討も行った。受傷後

表 1 ラット気管上皮細胞の細胞特異的分化マーカー

細胞特異性	マーカー	固定法	包埋法
すべての上皮細胞	mAb RTE 1 (keratin 19)	アセトン	パラフィン
基底細胞	mAb LL002 (keratin 14)	アセトン	パラフィン
	GSI-B <sub>4</sub> lectin	B5-G	パラフィン
円柱細胞	mAb CK18-2 (keratin 18)	アセトン	パラフィン
線毛細胞	mAb RTE 3	4% PFA	パラフィン
分泌細胞	mAbs RTE 9, 11	アセトン	パラフィン
	mAb RTE 12	未固定	凍結切片
非線毛細胞	mAbs RTE 2, 7, 13	アセトン	パラフィン

PFA: paraformaldehyde, B5-G: 0.1% glutaraldehyde を加えた B5 固定液

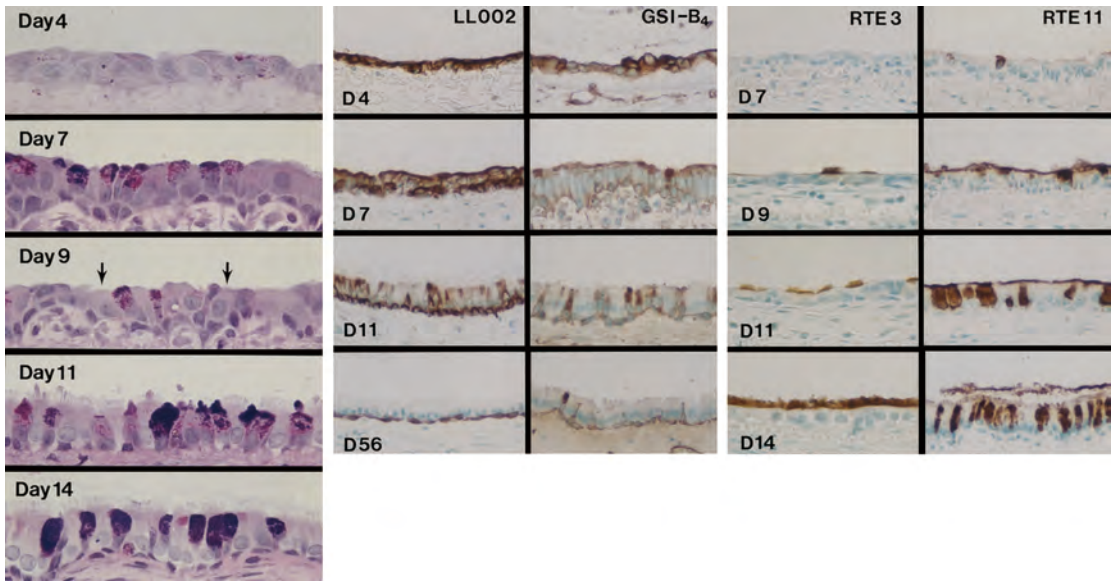


図1 移植気管内の上皮再生過程<sup>1)</sup>

4日目には未分化な細胞で覆われ、7日目に基底細胞と分泌細胞が出現し、9日目に未熟な線毛細胞が出現し(矢印)、2週間で正常な上皮に再生した。4日目に出現する未分化細胞は基底細胞マーカー(LL002, GSI-B<sub>4</sub>)と反応し、細胞分化が進むと分泌細胞や線毛細胞の反応性が徐々に消失した。分泌細胞(RTE11)の分化は7日目から、線毛細胞(RTE3)の分化は9日目から確認された。

は創部周辺の正常な上皮細胞が扁平化し、未分化細胞へ脱分化しながら創面へ移動し、24時間後には創部は1~2層の未分化細胞で覆われた。48時間後には数層の上皮細胞に重層化し、72時間後から基底細胞と分泌細胞、遅れて線毛細胞の分化が始まり、7~14日目にはほぼ正常な多列線毛円柱上皮に置き換わった(図2)。

細胞増殖能の指標として、総細胞数における分裂細胞の割合を mitotic rate (MR) として表すと、12時間後の脱分化段階ではMR 1.8%(正常上皮は0.4%)であるが、24時間(MR 23.4%)から48時間(MR 24.0%)にかけて未分化細胞が急激

に分裂・増殖し、48時間後には総細胞数は正常上皮のレベルまで回復した。72時間以降は分裂像に乏しく(MR 1.7%)、増殖した未分化細胞が分裂することなくそれぞれの細胞に分化すると考えられた。

この過程を各種分化マーカーで検討すると、12時間後の脱分化段階の細胞や24時間後に出現する未分化細胞は、すべて基底細胞のマーカー(GSI-B<sub>4</sub>, LL002)と反応した。この反応性は72時間以降、分泌細胞や線毛細胞への分化に伴って徐々に消失した。円柱細胞のマーカー(CK18-2)の反応性は12~24時間後には一部の細胞表面に

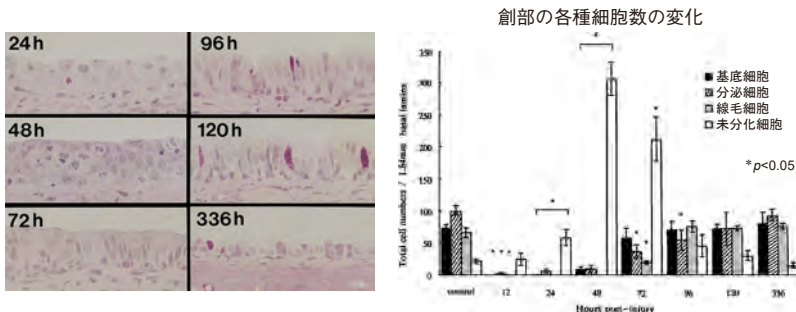
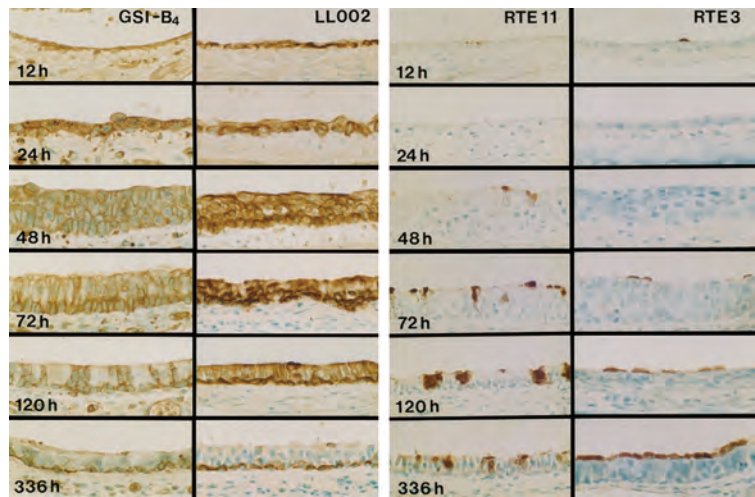


図2 機械的傷害時の細胞修復過程<sup>2)</sup>

受傷後は創部周辺の正常な上皮細胞が、未分化細胞へ脱分化しながら創面へ移動し、24~48時間後には細胞分裂により数層の上皮細胞に重層化し(分裂像が認められる)、72時間後から細胞分化が開始される。

図3 基底細胞 (LL002, GSI-B<sub>4</sub>) と線毛細胞 (RTE3) と分泌細胞 (RTE11) マーカーの反応性<sup>2)</sup>

創面を覆った未分化細胞は基底細胞マーカーと反応し、細胞分化が進むと分泌細胞や線毛細胞の反応性が徐々に消失した。分泌細胞の分化は48時間後から、線毛細胞の分化は遅れて72時間後から開始された。



認められたが、48時間後には上皮細胞の細胞表面がごく薄く反応するのみであった。72時間以降は細胞分化に伴って徐々に円柱細胞の反応性が增強した。RTE11で認識される分泌細胞の分化は48時間後から、RTE3で認識される線毛細胞の分化は遅れて72時間後から開始され、細胞分化に伴ってその反応性が增強した (図3)。

### 3. 胎児発生時の細胞分化<sup>3)</sup>

胎生期および新生児期におけるラット気管上皮の細胞分化過程も同様の方法で検討した。胎生17日目には気管上皮はグリコーゲン顆粒が豊富な未分化細胞で覆われている。胎生18日目には未分化な分泌細胞と線毛細胞が出現し、胎生19日目には分泌細胞と線毛細胞が急激に増加した。胎生20日目に基底細胞が出現し多列上皮化して、生下時 (胎生21日目) には多列線毛円柱上皮で覆われた。

この過程を各種分化マーカーで検討すると、胎生期の未分化細胞は Repopulated tracheal graft や機械的傷害時に出現した未分化細胞とは異なり、基底細胞のマーカー (GSI-B<sub>4</sub>, LL002) とは反応しなかった。細胞分化の機序も前2者とは異なり、胎生18日目に RTE3 で認識される線毛細胞と RTE9, 11 で認識される分泌細胞の分化が開始され、基底細胞の分化は遅れて胎生20日目に認められた。基底細胞のマーカーである GSI-B<sub>4</sub> の反

応性は胎生20日目から上皮全体に認められ、出生後に円柱細胞での反応性が徐々に消失した。LL002の反応性は生後1日目から基底細胞のみに出現した。胎生18日目から生後1日目までに豊富に認められる分泌顆粒は RTE9, 11 で認識された。一方、RTE12で認識される分泌顆粒は生後1日目に出現して、徐々に増加した。

### 4. 気道上皮の細胞修復機序—胎生期の細胞分化との比較—

上述した Repopulated tracheal graft や機械的傷害で代表される、広範な気管上皮傷害時の細胞修復は、基底細胞や分泌細胞が直接分化増殖するのではなく、図4に示すように未分化細胞を中心とした、①脱分化 (dedifferentiation)、②増殖 (proliferation)、③再分化 (redifferentiation) の過程を経て生じると考えられる。最初に、気管内へ注入した上皮細胞や創部周辺の上皮細胞が、扁平化して創面を覆いながら未分化細胞へ脱分化 (dedifferentiation) し、次いで、この未分化細胞が急激に分裂・増殖 (proliferation) して創面を数層の上皮細胞で覆った後、最後に分裂・増殖することなく個々の細胞へ再分化 (redifferentiation) する。この過程の中心になる未分化細胞は、形態学的にどの細胞の特徴も有しないが、基底細胞のマーカー (GSI-B<sub>4</sub>, LL002) と反応し、その反応性は分泌細胞や線毛細胞への分化に伴って徐々に

消失した。

最初に観察される未分化細胞への脱分化には、基底細胞と分泌細胞の果たす役割が大きい。文献的には特殊な条件下で線毛細胞も分裂・増殖する可能性があることが確認されているが<sup>4)</sup>、今回の検討では脱分化の過程で線毛細胞のマーカ―はほとんど認められず、実際の傷害修復における役割は乏しいと考えられる。また、線毛細胞の分化が分泌細胞の分化より遅れて開始されたことから、線毛細胞が未分化細胞から分化する以外に、分泌細胞を介する経路も考えられるが、線毛細胞と分

泌細胞の両方のマーカ―と反応し、移行段階を証明する細胞は見つけることができなかった。

発生段階で出現する胎生期の未分化細胞は、上皮細胞修復過程で出現する未分化細胞とは異なり、基底細胞のマーカ― (GSI-B<sub>4</sub>, LL002) と反応しなかった。細胞分化の機序も線毛細胞が最後に分化する細胞修復時とは異なり、胎生 18 日目に線毛細胞と分泌細胞の分化が始まり、遅れて胎生 20 日目に基底細胞の分化が開始された。このことから、上皮細胞修復時の細胞分化は、発生段階の細胞分化と異なった機序で生じると考えられた。

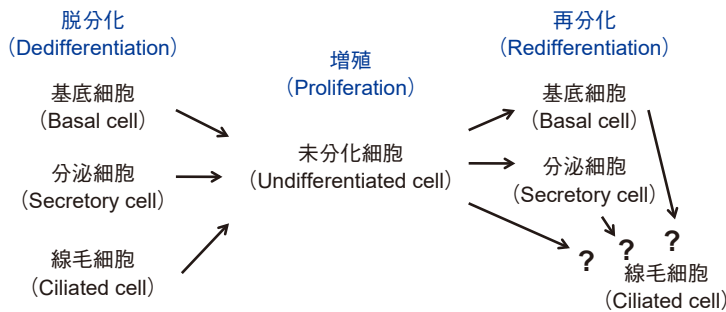


図 4 病態気道における上皮細胞の再生と分化<sup>5)</sup>

## まとめ

**疑問：気道上皮細胞の再生と分化はどのように生じるか？**

**答え：**広範な気道上皮傷害時の細胞修復は、基底細胞や分泌細胞が、①脱分化 (dedifferentiation) して形成された未分化細胞が、急激に、②増殖 (proliferation) した後、分裂・増殖することなく個々の細胞に、③再分化 (redifferentiation) して生じると考えられる。こうした上皮細胞の再生・分化の機序は、胎児発生時の細胞分化の機序とは全く異なる。

## 文献

1. Shimizu T, Nettesheim P, Ramaekers FC, et al. Expression of "cell-type-specific" markers during rat tracheal epithelial regeneration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:30-41.
2. Shimizu T, Nishihara M, Kawaguchi S, et al. Expression of phenotypic markers during regeneration of rat tracheal epithelium following mechanical injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11:85-94.
3. Randell SH, Shimizu T, Bakewell W, et al. Phenotypic marker expression during fetal and neonatal differentiation of rat tracheal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:546-555.
4. Rutten AA, Beems RB, Wilmer JW, et al. Ciliated cells in vitamin A-deprived cultured hamster tracheal epithelium do divide. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988;24:931-935.
5. 清水猛史, 坂倉康夫. 病態気道における上皮細胞の再生と分化. *耳鼻免疫アレルギー* 1994;12:1-12.

# 第1章

## 粘液分泌の疑問

- I. 粘液分泌の研究には何が必要か？
- II. 杯細胞化生はどのように生じるか？
- III. 感染とアレルギー性炎症における粘液産生・分泌はどのように生じるか？
- IV. 炎症に伴う粘液の変化にはどのような生理的役割があるか？
- V. インドメタシンがアレルギー性炎症の粘液産生を増加させるのは何故か？

# Ⅰ 粘液分泌の研究には何が必要か？

## — 粘液産生・分泌研究のための新たな手法・ 細胞培養モデル・動物モデル —

### 1. 気道粘液の生理

気道の粘液層はゲル層である外層粘液とゾル層である線毛間液から構成される（図1）。線毛間液は主として、上皮細胞を介したイオントランスポートによる水とイオンの分泌によって維持され、外層粘液は上皮の分泌細胞（杯細胞）と固有層の粘膜下腺（粘液細胞と漿液細胞の混合腺）から分泌される分泌液に由来する。気道粘液の主要な構成成分であるムチンは、主として杯細胞と粘液細胞から分泌される。線毛打は線毛間液中で行われ、線毛の先端で粘弾性を有する外層粘液をひっかくようにとらえて線毛打の方向へ送る、粘液線毛輸送機能を有している<sup>1,2)</sup>。

気道の粘液層は生体防御の第一線として、吸気加湿・加温、粘膜の保護、有毒ガスの吸着と中和などの物理作用とともに、異物を捕捉し排除する粘液線毛輸送機能の一端を担い、遊走した炎症細胞や炎症メディエーターによる生体反応の場になっている。正常状態の分泌液は少量であるが、刺激や炎症が加わると粘液産生が増加し、杯細胞や粘膜下腺の増生が生じる。過剰な粘液産生は粘液輸送機能の破綻や、炎症の遷延化・慢性化の原因になるとともに、鼻漏・後鼻漏、喀痰となって患者さんを苦しめる。耳鼻咽喉科医の日常診療は、こうした分泌粘液との戦いにあるといっても過言ではなく、治療にあたってはいかにして粘液過分

泌を制御するかが重要である。

しかしながら、粘液分泌は生体にとって重要な防御反応のひとつであり、やみくもに粘液分泌を制御することは、むしろ正常な防御反応を阻害する可能性も考えられる。これまで、気道炎症においては、粘液過分泌の「負」の側面ばかり注目されることが多く、本来の生体防御における「正」の役割はほとんど検討されていない。本章では、気道粘液の産生機序とともに、生体防御における役割を解明し、粘液分泌の功罪それぞれに配慮した制御・治療法を明らかにしたい。

### 2. 気道粘液の構成

気道粘液の主要な構成成分であるムチンは、平均  $10^6$  ダルトン以上の巨大な高分子糖蛋白で、MUC 遺伝子で規定されるコア蛋白のセリンとスレオニンに O- グルコシド結合により数百を超える糖残基が結合している（図2）。糖含有率は 50～90%にもなり、通常 1～2%の硫酸基を含んで、強力な陰性荷電を有し、S-S 結合や水素結合により重合しながら、極めて複雑な重合体を形成している<sup>1)</sup>。

ムチンのコア蛋白を規定する MUC 遺伝子は、ヒトでは 20 種類以上が複数の染色体上に見つけられている<sup>3)</sup>。鼻粘膜では主として MUC1, MUC2,

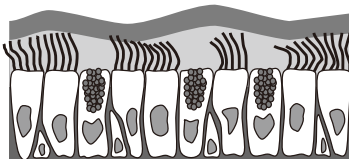


図1 外層粘液と線毛間液<sup>1)</sup>

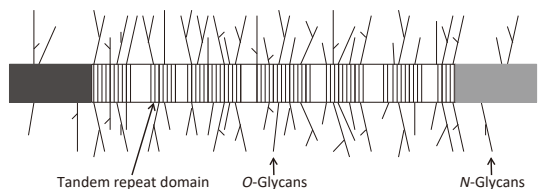


図2 ムチンの構造<sup>1)</sup>



表 1 鼻粘膜にみられる代表的なムチン遺伝子

MUC 遺伝子	Mucin subfamily	遺伝子座	発現組織
MUC1	膜結合型	1q21-q24	上皮細胞
MUC2	分泌型, ゲル形成	11p15.5	杯細胞
MUC4	膜結合型	3q29	上皮細胞
MUC5AC	分泌型, ゲル形成	11p15.5	杯細胞
MUC5B	分泌型, ゲル形成	11p15.5	粘液細胞 (粘膜下腺)
MUC7	分泌型, ゲル形成なし	4q13.3	漿液細胞 (粘膜下腺)
MUC8	分泌型, ゲル形成	12q24.3	杯細胞, 粘液細胞 (粘膜下腺)

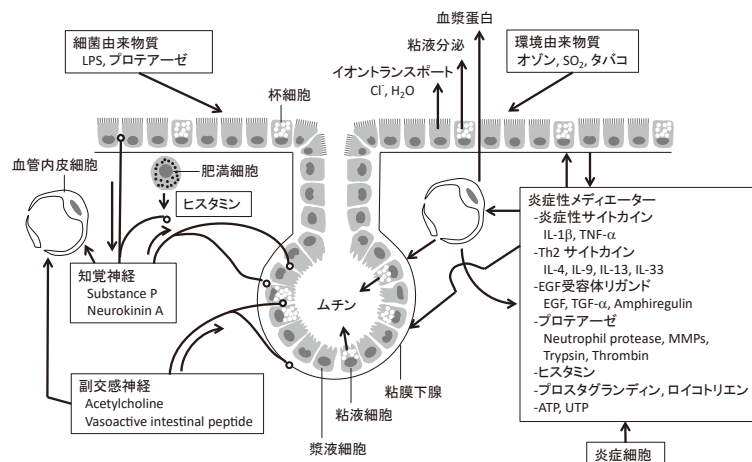
MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC8 の発現が確認され、膜結合型ムチンと分泌型ムチンに分けられる<sup>4, 5)</sup> (表 1)。MUC1 と MUC4 が膜結合型ムチンで、シグナル伝達につながる生理活性を有しているが、MUC4 には分泌型ムチンとしての機能も知られている<sup>6)</sup>。分泌型ムチンのうち MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC8 はゲル形成能があり、主として MUC2 と MUC5AC が杯細胞に、MUC5B は粘膜下腺の粘液細胞に、MUC8 がその両者に局在している。MUC7 は粘膜下腺の漿液細胞に局在するが、ゲル形成能がないため粘液の有する粘弾性には関与しない<sup>7, 8)</sup>。

気道においては、刺激や炎症に応じて MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B などの発現が亢進することが知られているが、中でも MUC5AC は粘液過分泌にかかわる最も重要なムチンで、その産生機序について詳細な検討が行われている<sup>9)</sup>。細胞内でのムチン産生は、刺激に応じた情報伝達の後、①核での MUC 遺伝子の transcription, ②小

胞体での translation, ③ゴルジ装置での糖転移酵素による glycosylation, ④分泌顆粒の exocytosis を経て分泌される。

### 3. 気道炎症と粘液過分泌

図 3 に示すように、ウイルス・細菌感染や SO<sub>2</sub>, オゾン, タバコなど、気道に加わるさまざまな刺激によって粘液産生・分泌が生じる<sup>1)</sup>。神経系ではコリン作動性の副交感神経が重要で、気道粘膜の物理化学的刺激やヒスタミンなどによる知覚神経刺激に反応して、即時的に粘液分泌が生じる。知覚神経の神経ペプチドであるサブスタンス P やニューロキニン A なども分泌刺激作用があり、軸索反射を介した機序も考えられる。慢性炎症反応における杯細胞や粘膜下腺細胞の増生や、持続的な粘液産生・分泌には、lipopolysaccharides (LPS) をはじめとする細菌由来物質や、上皮細胞や炎症細胞由来のサイトカインなど、さまざま

図 3 気道粘液分泌機序<sup>1)</sup>

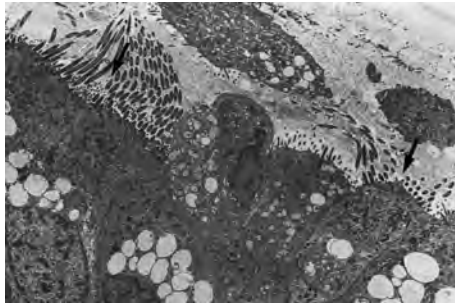


図4 病的粘液と小児滲出性中耳炎の中耳粘膜<sup>11)</sup>

外層粘液が線毛間腔に侵入して(矢印), 線毛運動を妨げている。

な炎症メディエーターが、直接的あるいは間接的に関与している。しかし、その作用は病態によって異なり、粘液産生と粘液分泌も異なった機序で生じている。

気道炎症における粘液過分泌は、粘液線毛輸送機能を障害して、炎症の遷延化・慢性化の原因になる。その機序として、①線毛間腔が減少し外層粘液が線毛間腔に侵入して、線毛運動が障害されること、②新たに産生される粘液量が多く、粘弾性が高く、粘液線毛輸送に適さないこと、③外層粘液と杯細胞が連なる「繋ぎ止め現象」が生じやすいこと<sup>10)</sup>、が考えられる。私たちは小児滲出性中耳炎の中耳粘膜で、外層粘液が線毛間腔に侵入していることを電顕的に確認している<sup>11)</sup> (図4)。慢性鼻副鼻腔炎患者に生理食塩水のネブライザーを行うと、減少していた線毛間腔が増加して粘液線毛輸送機能が改善する<sup>12)</sup>。また、慢性鼻副鼻腔炎の鼻汁は定常状態のそれに比べて粘弾性ははるかに高く、粘液線毛輸送速度が遅い<sup>13)</sup>。さらに、慢性鼻副鼻腔炎の上顎洞粘膜においても組織学的に外層粘液が上皮の杯細胞と連なる「繋ぎ止め現象」が確認できる (図5)。

図6に慢性鼻副鼻腔炎における粘液過分泌機序を示す。感染や炎症が生じると、産生される炎症メディエーターによって、粘液産生・分泌が亢進する。過剰な分泌粘液は、上皮傷害による線毛機能障害とあいまって粘液輸送機能を破綻させ、また副鼻腔入口部の腫脹・狭窄のため、病的分泌液が停滞する。停滞・貯留した病的分泌液は、細菌感染再燃の場になるとともに、分泌液中の炎症メディエーターによる組織傷害や粘液産生・分泌刺激が持続し、炎症の遷延化・慢性化を引き起こす。

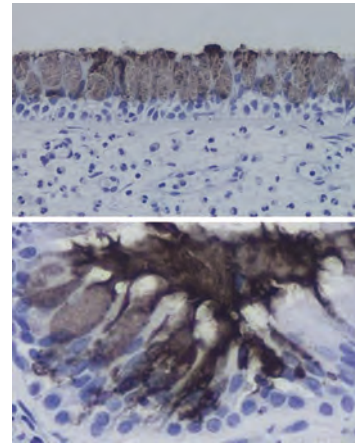


図5 慢性鼻副鼻腔炎上顎洞粘膜の杯細胞化生と粘液の繋ぎ止め現象<sup>1)</sup> (MUC5AC 免疫染色)

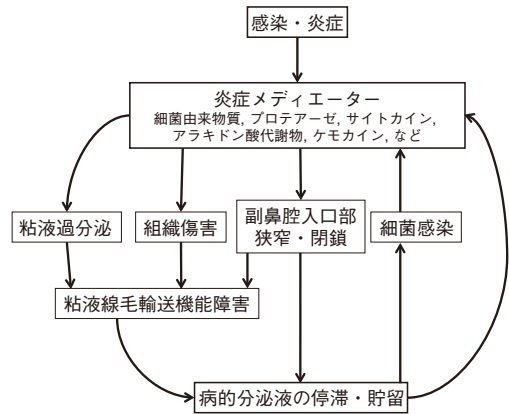


図6 慢性鼻副鼻腔炎における粘液過分泌機序

#### 4. 粘液分泌の研究に求められる新たな手法

1990年代に、ムチンのコア蛋白を規定するMUC遺伝子が次々と明らかになり、その構造が解明されるまでは、粘液産生・分泌の研究はほと

んど行われていなかった。その理由として、①粘液が極めて複雑な性状をしているため、定量的な測定ができず、粘液の違いや変化を認識する手段が乏しいこと、②正常な上皮細胞を細胞培養すると、すぐに分泌細胞などの分化形態を失うため、培養細胞を用いて粘液分泌能を検討することができないこと、③粘液産生・分泌を検討するための、容易で再現性のある動物モデルが確立されていないこと、が考えられた。

細菌・ウイルス由来物質や物理化学的刺激、副交感神経系、多くの炎症メディエーターなどが、粘液産生・分泌にかかわっているが、実際の生体の炎症病態における粘液産生・分泌にどの因子が最も重要かということについては十分解明されていない。炎症時には粘液の粘弾性が増加し、Alcian blue (AB) で青く濃染される粘液が産生されるが、こうした粘液の性状の変化とその役割についても不明で、粘液産生・分泌の研究ではいまだに解明されていない疑問が多く残されている。

そこで、こうした研究を進展させる新たな手段として、①鼻汁粘液に対する18種類のモノクローナル抗体を作成した<sup>14)</sup>。モノクローナル抗体を利用すれば、これまで困難であった粘液の定量的測定が可能になり、粘液の性状の変化を認識する手段としても有用である。次いで、②正常な鼻粘膜上皮細胞を用いて Air-liquid interface の培養法を確立して、分泌細胞の機能を有する細胞培養モデ

ルを作成した<sup>15)</sup>。さらに、③LPS点鼻刺激とアレルギー性炎症による、ラット鼻粘膜上皮の粘液産生、粘液分泌の動物モデルを作成した<sup>16)~19)</sup>。

## 5. ヒト慢性鼻副鼻腔炎鼻汁に対する18種類のモノクローナル抗体の作成<sup>14)</sup>

17人の慢性鼻副鼻腔炎患者(9歳から66歳、平均32歳)の粘膿性鼻汁を回収してプールし、超音波処理してホモゲナイズし、27,000gで40分間超遠沈した上清を、セファロースCL-4Bを用いたクロマトグラフィーで分離した。高分子量で、ヘキソースを多く含み、ムチン様糖蛋白を含有すると考えられる void volume 分画を回収して、凍結・乾燥させて精製鼻汁(PNS: purified nasal secretion)とした。

1mg(100μl)のPNS(精製鼻汁)をincomplete Freund's adjuvantとともにマウスの腹腔内に5回注入し、54日目にマウスの脾細胞を取り出し、マウスミエローマSP2/0細胞と融合させてハイブリドーマを作成した。スクリーニングにはPNSを利用したELISA法と、慢性鼻副鼻腔炎患者の上顎洞粘膜の凍結切片を利用して行い、最終的に18個のモノクローナル抗体を得た。

作成したモノクローナル抗体はその分泌顆粒の染色パターンから4つに分類できた(図7)。①杯

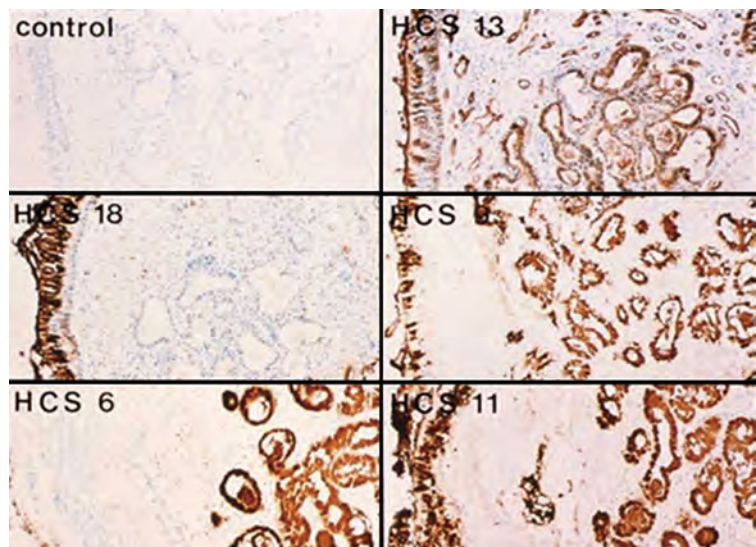


図7 ヒト慢性鼻副鼻腔炎鼻汁に対するモノクローナル抗体の鼻粘膜での染色性<sup>14)</sup>

細胞を認識する抗体：HCS18, ②粘膜下腺細胞を認識する抗体：HCS4, 5, 6, 16, ③杯細胞と粘膜下腺細胞の両方を認識する抗体：HCS1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, ④杯細胞と粘膜下腺細胞の分泌顆粒に加えて血管内皮細胞とも反応する抗体：HCS13, 15で、このうち HCS1, 2, 7, 11, 13, 16 が IgM でその他は IgG1 であった。慢性鼻副鼻腔炎患者の下鼻甲介を用いた検討でも、上顎洞粘膜と同様の染色性が確認できたが、HCS18 は、下鼻甲介では粘膜下の粘液腺とも弱く反応した。すべての抗体はアセトン固定のパラフィン切片で同様の反応が得られたが、多くの抗体は (HCS3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 16) 4% Paraformaldehyde 固定で染色性が失われた。すべての抗体で、抗原の periodate oxidation 処理によってその反応性が低下したことから、抗原性には carbohydrates がかわっていると考えられた。

HCS18 は杯細胞のみを認識する抗体で、鼻粘膜のみならず気管でも同様の反応性が得られた。粘膜下腺細胞のみを認識する抗体も 4 種類確認されたことから、杯細胞と粘膜下腺細胞の粘液はその性状が異なることが明らかになった。シアル酸を加えることで HCS18 の反応性が抑制されたことから、ムチン糖蛋白のシアル酸構造が HCS18 の認識に関与していると考えられる。このことはシアル酸を認識するレクチン (limulin) が杯細胞と強く反応した報告と関連して興味深い<sup>20)</sup>。

ダニによる通年性アレルギー性鼻炎と正常人の下鼻甲介粘膜の反応性を比較したところ、多くは慢性鼻副鼻腔炎患者の下鼻甲介粘膜と同様の反応性が認められたが、HCS18 は正常人の粘膜下腺とはほとんど反応せず、HCS1, 7 も正常人とアレルギー性鼻炎患者では粘膜下腺における反応性が低下していた。こうした抗体は疾患特異的な粘液の変化を認識できる可能性が考えられる。

## 6. 分泌細胞などの分化形態を有するヒト鼻粘膜上皮の細胞培養モデル<sup>15)</sup>

気道上皮細胞の機能を調べる目的で、培養細胞を利用した検討が数多く行われている。しかしな

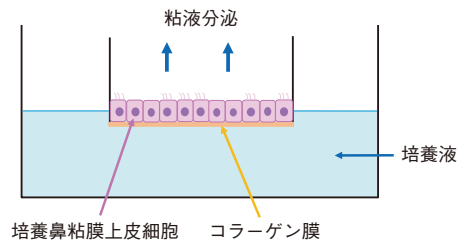


図8 Air-liquid interface による細胞培養法

がら、上皮細胞を分離して培養すると、線毛細胞や分泌細胞などの分化した形態はすぐに失われるため、培養上皮細胞の機能は生体内における反応と異なる点が問題であった。そこで、retinoic acid を加えた serum-free の培養液を用いて、Air-liquid interface で培養することで、分泌細胞などの分化形態を有するヒト鼻粘膜上皮の細胞培養モデルを作成した (図8)。

鼻茸から分離した上皮細胞 ( $5 \times 10^4$  cell in 0.5 ml) を 0.4 ml の type I collagen gel で覆った Transwell-Col tissue culture insert (4.5 mm, 0.45 μm pore size) 上で培養し、最初の 24 時間は 10% fetal bovine serum を含んだ培養液で、次いで  $5 \times 10^8$  mol/l の retinoic acid を含む serum-free の培養液を 1 日おきに交換して培養し、confluent になった 10 日目ごろに上方の培養液を除去して、Air-liquid interface で培養し、毎日下方の培養液を交換した。

7 ~ 10 日目の confluent の段階では、抗 AE1/AE3 抗体と反応する上皮系の 1 ~ 3 層の未分化な立方形細胞で構成され、線毛や分泌顆粒などの分化形態は観察できない。Air-liquid interface での培養 7 日目になる 17 日目には、線毛細胞が観察されるようになるが、その数は 1% 以下と少なく、その後も線毛細胞数は増加しなかった。AB-PAS 染色や、杯細胞顆粒を認識するモノクローナル抗体 HCS18 で認識される分泌細胞は、17 日目から徐々に増加し、31 日目には約半数が分泌細胞に分化した (図9上)。電顕的にも小胞体とゴルジ体、粘液顆粒を細胞質に含む分泌細胞が確認できた。

上室側に分泌される分泌液を 0.5 ml の PBS で回収して、HCS18 を利用したドットプロット法

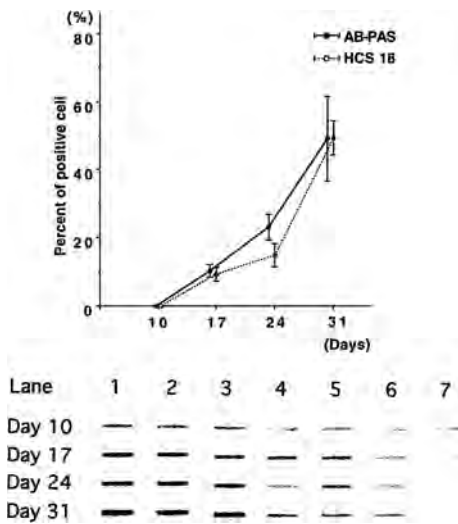


図9 AB-PAS染色とHCS18(分泌顆粒に対するモノクローナル抗体)染色による、分泌細胞の割合(上図)と産生された粘液のHCS18抗体によるスロットブロット染色(下図)<sup>15)</sup>

Lane 1-3: 上室への分泌, Lane 4-6: 下室への分泌, Lane 7: コントロール

分泌細胞への分化が生じ、上室へ極性のある粘液分泌が観察された。

で粘液産生量を測定したところ、17、24、31日目には段階的に上室側への粘液分泌が増加した。基底側の培養液中には粘液が確認できなかったことから、生体と同様に極性を有した粘液分泌が確認できた(図9下)。さらに、基底側の培養液に24時間、IL-1 $\beta$  (20 ng/ml) や TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) を加えて、上室側へ分泌される粘液を回収して、HCS18を利用したELISA法で粘液分泌量を測定すると、72時間後まで粘液産生が増加していた。この培養モデルは、生体の機能を反映して、刺激と反応を上室側、基底側の両方から別々に検討することができる利点があり、杯細胞の顆粒を認識するモノクローナル抗体HCS18を利用することで、容易に定量的な粘液分泌を測定できると考えられた。

## 7. ラット鼻粘膜の粘液産生・分泌モデル

鼻粘膜からの粘液産生、粘液分泌の機序を解明し、その制御法を検討するため、容易で再現性や

可逆性がある動物モデルとして、LPS (lipopolysaccharides) 点鼻刺激とOVA (ovalbumin) の腹腔内感作と点鼻投与によるアレルギー性炎症のラットモデルを作成した。

### 1) LPS 点鼻刺激モデル

#### ①粘液産生と杯細胞化生<sup>16, 21)</sup>

エーテル麻酔下にラット前鼻孔より鼻腔内に、0.1 mg (100  $\mu$ l) のLPSを24時間ごとに1, 3, 7, 14日間連日注入し、最終点鼻24時間後にラット鼻腔のincisive papillaの部分で冠状断切片を作成し、AB-PAS-Hematoxylin染色を行って、鼻中隔上皮の中央部分における杯細胞化生、粘液産生と好中球浸潤について検討した(図10)。粘液産生の程度は、鼻粘膜上皮の総面積に占める粘液顆粒面積の割合をイメージアナライザーで測定して、パーセント表示した。

正常鼻中隔粘膜では杯細胞はほとんど認められず、粘液顆粒も極めて少ないが、LPS点鼻により、1日目から杯細胞化生と粘液産生、好中球浸潤が生じ、粘液顆粒の占める面積は急激に増加し、3日間のLPS点鼻後には上皮の面積の約40%を占めた。上皮内の粘液顆粒量は3日間の点鼻投与でピークに達し、7日間、14日間投与との間に有意差は認められなかった(図11)。LPSを7日間点鼻して作成した杯細胞化生は、さらに7日間放置することで消退し、正常な鼻粘膜上皮に回復した(図12)。

以上の結果から、LPSを3日間点鼻するだけで、ラット鼻粘膜上皮に著明な杯細胞化生、粘液産生、好中球浸潤が生じ、放置すればすぐに消退して正常な鼻粘膜を得ることができた。このモデルは、安易に作成でき、傷害性に乏しく、再現性や可逆

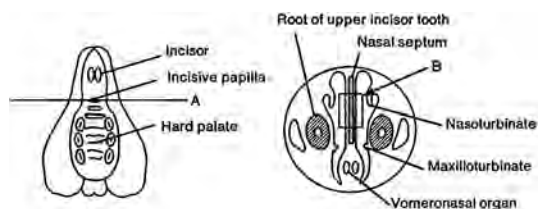


図10 Incisive papillaのAの部位で冠状断切片を作成し、鼻中隔中央(B)の粘膜を観察した<sup>16)</sup>。

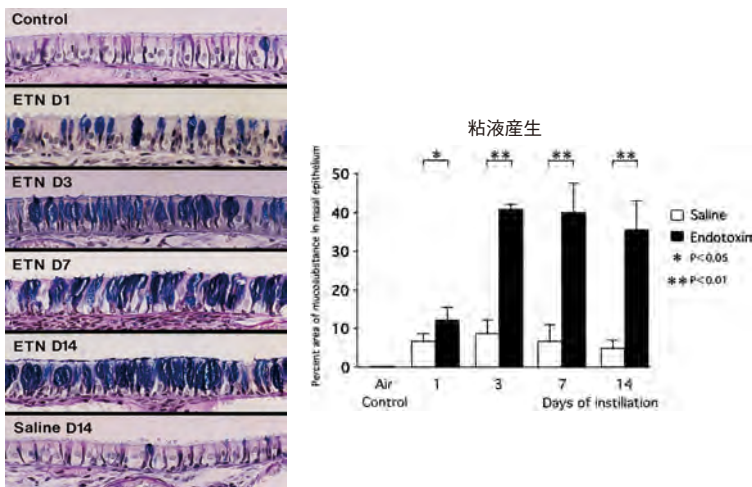


図11 LPS (ETN : endotoxin) の点鼻によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生と上皮における粘液顆粒の占める面積の割合<sup>16)</sup>

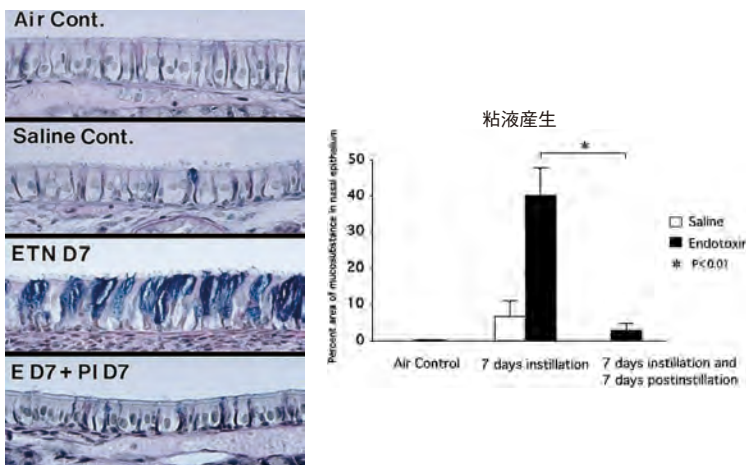


図12 LPS (ETN : endotoxin) の7日間点鼻と、さらに7日間放置後の変化<sup>16)</sup>

性のある粘液産生モデルとして有用である。さらにエラスターゼ (0.5 mg) や IL-8 (5 µg) の3日間点鼻投与でも LPS 刺激と同様な粘液産生が認められ、LPS 以外の物質の粘液産生に対する作用の検討にも応用できる。

## ②粘液分泌<sup>18)</sup>

粘液産生と粘液分泌は生体における異なる現象で、粘液分泌は上皮内の杯細胞化生、粘液産生に引き続いて生じる。そこで、3日間のLPS点鼻刺激で粘液産生と杯細胞化生を生じさせてから、24時間後にもう一度LPSを点鼻投与して、鼻粘膜上皮における粘液顆粒量の変化を1, 3, 6, 12, 24時間後に経時的に検討した。粘液顆粒量は、LPS点鼻後1~12時間まで、3~6時間をピークに一旦減少するが、24時間後には回復した。こうした一過性の粘液顆粒量の減少は放出された

粘液分泌の程度を反映していると考えられ、この方法で粘液分泌に対する直接的あるいは間接的作用を検討することができる。

## 2) アレルギー炎症モデル

### ①粘液産生と杯細胞化生<sup>17)</sup>

ラットの腹腔内にOVA (ovalbumin 200 µg) と alum で全身感作 (1, 2, 3, 11日目) を行ってから、19日目から1, 3, 7日間、エーテル麻酔下にラット前鼻孔より鼻腔内にOVA (10 mg) を点鼻投与して、24時間後にLPS点鼻刺激モデルと同様に鼻腔の冠状断切片を作成して、鼻中隔上皮の粘液産生、杯細胞化生、好中球・好酸球浸潤を測定した。

OVA全身感作後の点鼻投与により、著明な粘液産生と杯細胞化生、好中球・好酸球浸潤が認め

図 13 OVA (ovalbumin) の腹腔内感作 (p) と点鼻投与 (n) によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生, 好酸球浸潤と粘液顆粒の占める面積の割合<sup>17)</sup>

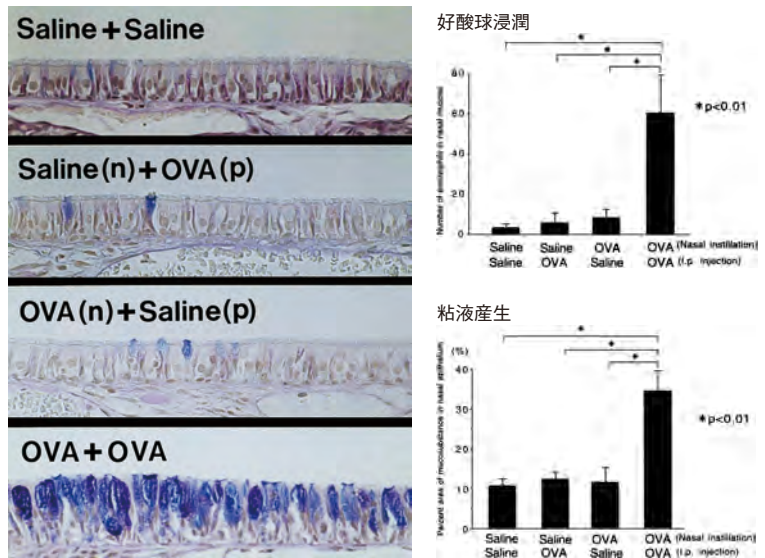
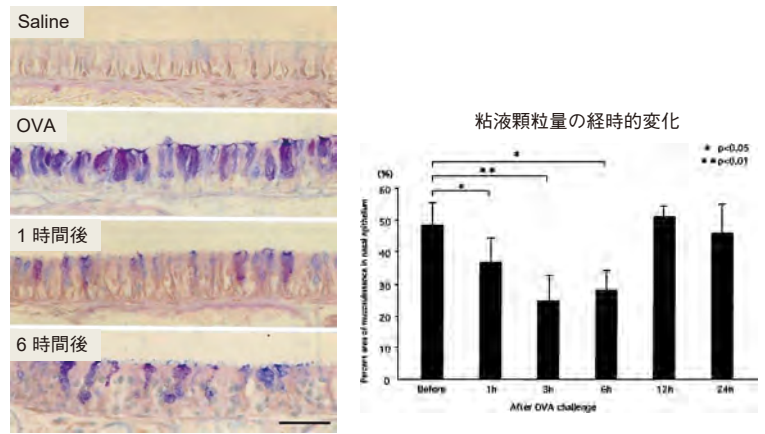


図 14 鼻アレルギーモデルラットにおける OVA (ovalbumin) 最終点鼻後, 鼻粘膜上皮の粘液顆粒量の経時的変化<sup>19)</sup>



られ, 3日間の点鼻投与でピークに達し, 3日間と7日間投与では有意差を認めなかった。さらに, ヒトのアレルギー発作と同様なくしゃみ発作が観測され, 血清中のOVA特異的IgE抗体が有意に上昇し, OVA全身感作と3日間の点鼻投与で, 容易にアレルギー性炎症の粘液産生モデルが作成できる(図13)。

②粘液分泌<sup>19)</sup>

このアレルギー炎症モデルで, OVAの3日間点鼻投与で粘液産生を生じさせから, 24時間後に再度OVAを点鼻投与して, 1, 3, 6, 12, 24時間

後に経時的に鼻粘膜上皮内の粘液顆粒量を測定した。上皮内の粘液顆粒量は点鼻投与1時間後には有意に減少し, 3~6時間後に最低になり, 12~24時間後には刺激前の状態に回復した(図14)。I型アレルギー反応には, 肥満細胞由来のメディエーターの作用が主体の即時相と, 浸潤細胞が中心になる遅発相の反応があるが, このモデルではOVA点鼻1時間後と6時間後の状態を比較することで, 即時相と遅発相の反応を別々に評価できる利点も有している。

## まとめ

疑問：粘液分泌の研究には何が必要か？

答え：粘液の定量的測定やその性状の違いを認識する手段として、慢性鼻副鼻腔炎鼻汁粘液に対する18種類のモノクローナル抗体を作成した、また、Air-liquid interfaceの培養法を利用して、粘液分泌能を有する細胞培養モデルを確立し、粘液産生・分泌を検討するための、容易で再現性のあるラット鼻粘膜の粘液産生・分泌モデルを確立した。

## 文献

1. Shimizu T. Mucus, goblet cell, submucosal gland. In: Celebi ÖÖ, Önerci TM, editors, *Nasal physiology and pathophysiology of nasal disorders*. Springer, Switzerland; 2023, p. 1-14.
2. Tarran R, Button B, Boucher RC. Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress. *Annu Rev Physiol* 2006;68:543-561.
3. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006;86:245-278.
4. Ali MS, Pearson JP. Upper airway mucin gene expression: a review. *Laryngoscope* 2007;117:932-938.
5. Martínez-Antón A, Debolós C, Garrido M, et al. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy* 2006;36:448-457.
6. Moniaux N, Escande F, Batra SK, et al. Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associated MUC4 mucins. *Eur J Biochem* 2000;267:4536-4544.
7. Ali MS, Wilson JA, Bennett M, et al. Mucin gene expression in nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 2005;125:618-624.
8. Martínez-Antón A, Roca-Ferrer J, Mullol J. Mucin gene expression in rhinitis syndromes. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6:189-197.
9. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 2009;135:505-512.
10. Ukai K, Sakakura Y. Newcastle disease viral infection in chicken nasal turbinate and maxillary sinus. *Acta Otolaryngol* 1992;112:710-716.
11. Inagaki M, Sakakura Y, Majima Y, et al. Ultrastructure of mucous blanket in otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988;97:313-317.
12. Majima Y, Sakakura Y, Matsubara T, et al. Mucociliary clearance in chronic sinusitis: related human nasal clearance and in vitro bullfrog palate clearance. *Biorheology* 1983;20:251-262.
13. Majima Y, Harada T, Shimizu T, et al. Effect of biochemical components on rheologic properties of nasal mucus in chronic sinusitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:421-426.
14. Kishioka C, Shimizu T, Fujita K, et al. Monoclonal antibody-detectable carbohydrate epitopes of human nasal secretions are differentially expressed in tissue and diseases. *Am J Rhinol* 1999;13:37-43.
15. Usui S, Shimizu T, Kishioka C, et al. Secretory cell differentiation and mucus secretion in cultures of human nasal epithelial cells: use of a monoclonal antibody to study human nasal mucin. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:271-277.
16. Shimizu T, Takahashi Y, Kawaguchi S, et al. Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1412-1418.
17. Shimizu T, Hirano H, Majima Y, et al. A mechanism of antigen-induced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats. A comparison with lipopolysaccharide-induced mucus production. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1648-1654.
18. Shimizu T, Takahashi Y, Takeuchi K, et al. Role of neutrophil elastase in endotoxin-induced mucus hypersecretion in rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:1049-1054.
19. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, et al. A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:119-125.
20. Mazza M, Lhermitte M, Lafitte JJ, et al. Use of lectins for detection of glycoconjugates in the glandular cells of the human bronchial mucosa. *J Histochem Cytochem* 1982;30:956-966.
21. Takahashi Y, Shimizu T, Sakakura Y. Effects of indomethacin, dexamethasone, and erythromycin on endotoxin-induced intraepithelial mucus production of rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:683-687.



## II 杯細胞化生はどのように生じるか？ —LPS 点鼻刺激によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生—

### 1. 杯細胞化生

気道上皮に対する物理化学的刺激や慢性炎症によって気道粘液が産生され、上皮細胞では杯細胞化生 (goblet cell metaplasia) が認められる。一般に、化生 (metaplasia) とは、分化・成熟した細胞が機能や形態の異なる別の細胞へ変化することで、細胞の分化異常によって生じる。一方、過形成 (hyperplasia) は個々の細胞数が増加して生じる現象である。それでは、気道上皮で観察される杯細胞の増加は、どのように生じるのだろうか？線毛細胞や基底細胞が杯細胞に変化しているのであれば、杯細胞化生、杯細胞が分裂増殖しているのであれば、杯細胞過形成と呼ぶのが正しいのかもしれない。

気道上皮における杯細胞化生の機序については、光顕・電顕による評価と細胞増殖能の検討による細胞動態の観察が行われている。サルにオゾンを吸入させると、気管上皮の障害と杯細胞の増加が認められるが、同時に [ $^3\text{H}$ ] thymidine 取り込み試験を行うと、small mucous granule cell と

intermediate cell が出現・増殖して、杯細胞の増加にかかわる<sup>1)</sup>。同様に、ラットに  $\text{NO}_2$  を吸入させて [ $^3\text{H}$ ] thymidine 取り込み試験を行うと、気管上皮では分泌細胞と intermediate cell が増殖すること<sup>2)</sup>、ハムスターの気管内にエラストラーゼを注入して、同時にコルヒチン処理して細胞動態を観察すると、杯細胞の増加には顆粒の乏しい分泌細胞や intermediate cell がかかわっていることが報告されている<sup>3,4)</sup>。

私たちは、LPS を 1～3 日間点鼻投与すると、ラット鼻粘膜上皮で著明な杯細胞の増加 (杯細胞化生?) が生じることを確認しているが、わずか 1～3 日間で細胞の再分化と増殖を伴う化生 (metaplasia) や、細胞増殖による過形成 (hyperplasia) が生じるとは考えにくく、安易に「杯細胞化生」と呼んで良いのか以前から疑問に感じていた。そこで、このラットモデルを用いて、杯細胞化生の機序について、電顕的に詳細な細胞の変化を検討するとともに、コルヒチンで前処理して細胞分裂を中期で停止させて、細胞分裂細胞数を測定することで細胞増殖能の検討も行った。

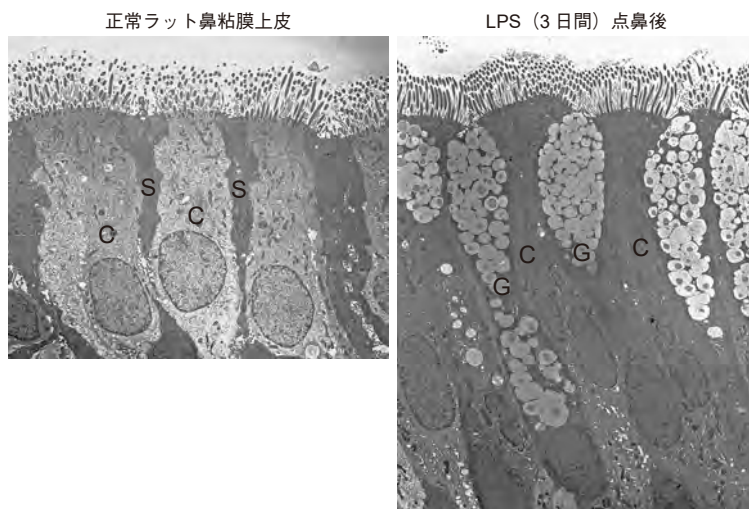


図1 ラット鼻粘膜上皮 (左上) と LPS 点鼻 (3 日間) 後の変化 (右)<sup>5)</sup>  
C: ciliated cell, S: secretory cell, G: goblet cell

## 2. LPS 点鼻刺激（1～3日間）によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生機序<sup>5)</sup>

前述した LPS 点鼻刺激（1～3日間）によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生，杯細胞化生モデルを利用して，鼻粘膜上皮細胞の各種細胞数の変化を電顕的に測定した。さらに，鼻粘膜を採取する6時間前にコルヒチン（100 mg/kg）を腹腔内投与し，コルヒチンによる細胞分裂中期での分裂停止作用を利用して，MR（mitotic rate）を測定することで，細胞増殖能について検討した。

その結果，鼻粘膜上皮（1 mm 長）における総細胞数に変化はなく，細胞増殖能を表す MR もいずれも 1% 以下で，定常状態と比べて変化を認めなかった。基底細胞数や線毛細胞数にも変化はなかった。定常状態では，基底細胞と線毛細胞以外は，電顕的に小胞体とゴルジ体，豊富なミトコンドリアを有し，電子密度の高い（electron-dense）少量の分泌顆粒を有する分泌細胞がほとんどを占めているが，LPS 点鼻刺激後にはこうした分泌細胞数が減少し，代わりに，電子密度の低い（electron-lucent）粘液顆粒を有する杯細胞数が増加した（図 1，図 2）。以上より，LPS 点鼻刺激後，

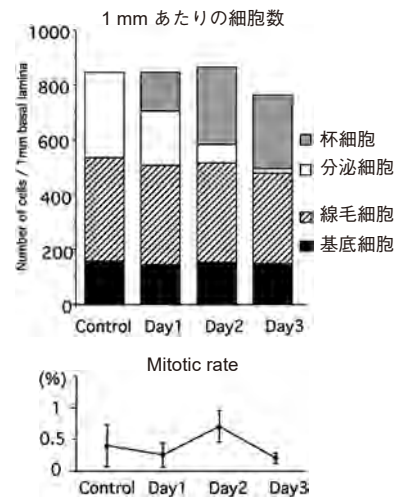


図 2 LPS 点鼻後の各細胞数の変化（上図）と Mitotic rate（下図）<sup>5)</sup>

LPS 点鼻後は分泌細胞が減少し，代わりに杯細胞が増加した。

わずか 1～3 日間で生じる杯細胞化生は，もともと存在していた electron-dense な少量の分泌顆粒を有する分泌細胞が，electron-lucent な大量の粘液顆粒を産生するようになる変化で，細胞増殖や細胞分化などの形態変化を伴わず，刺激に対する分泌顆粒の質的・量的変化によって生じると考えられた。

### まとめ

疑問：杯細胞化生はどのように生じるか？

答え：LPS の点鼻投与（1～3日間）におけるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生は，少量の分泌顆粒を有する分泌細胞が，多量の粘液顆粒を産生するようになって，分裂・増殖することなく直接杯細胞に移行して生じる。

### 文献

1. Wilson DW, Plopper CG, Dungworth DL. The response of the macaque tracheobronchial epithelium to acute ozone injury. A quantitative ultrastructural and autoradiographic study. *Am J Pathol* 1984;116:193-206.
2. Evans MJ, Shami SG, Cabral-Anderson LJ, et al. Role of nonciliated cells in renewal of the bronchial epithelium of rats exposed to NO<sub>2</sub>. *Am J Pathol* 1986;123:126-133.
3. McDowell EM, Combs JW, Newkirk C. Changes in secretory cells of hamster tracheal epithelium in response to acute sublethal injury: a quantitative study. *Exp Lung Res* 1983;4:227-243.
4. Breuer R, Christensen TG, Lucey EC, et al. An ultrastructural morphometric analysis of elastase-treated hamster bronchi shows discharge followed by progressive accumulation of secretory granules. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:698-703.
5. Shimizu T, Takahashi Y, Kawaguchi S, et al. Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1412-1418.

### III 感染とアレルギー性炎症における粘液産生・分泌はどのように生じるか？

#### —ラット鼻粘膜上皮の粘液産生・分泌モデルを利用した検討—

##### 1. LPS 点鼻刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生・分泌機序

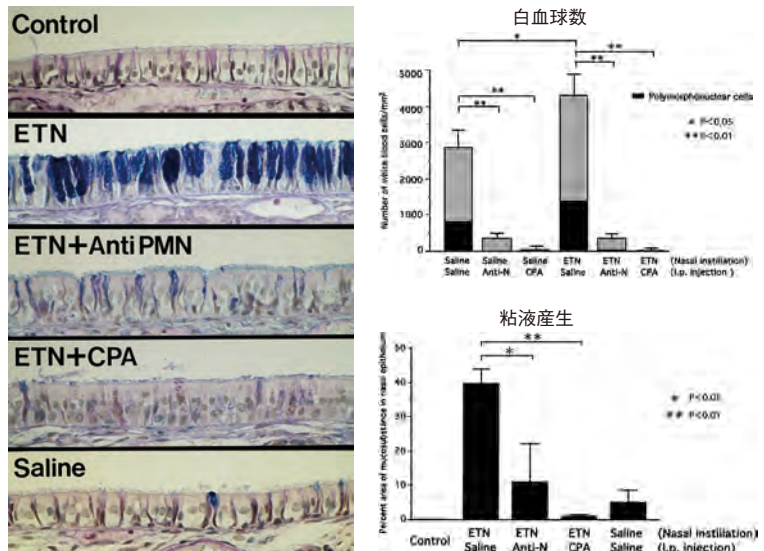
気道上皮における粘液産生，粘液分泌には，物理化学的刺激や細菌やウイルス由来物質，炎症反応（炎症細胞浸潤やさまざまな炎症メディエーター）が，直接あるいは間接的にかかわっている。しかしながら，その作用は病態によって大きく異なり，粘液産生と粘液分泌の機序も異なる。そこで，実際の生体内での炎症病態における粘液産生や粘液分泌にどの因子が重要で，臨床的に何を制御すれば良いのか明らかにする目的で，LPS 点鼻刺激とアレルギー性炎症のラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルを用いて，粘液産生と粘液分泌の機序について比較検討した。

##### 1) 粘液産生<sup>1)~4)</sup>

LPS 点鼻刺激（3日間）によるラット鼻粘膜上

皮の粘液産生に対する好中球の影響を検討する目的で，抗ラット多核球血清や cyclophosphamide を利用して好中球欠乏状態を作成した。抗ラット多核球血清（1ml）は LPS 点鼻投与時に腹腔内に3日間投与し，cyclophosphamide（20 mg）は LPS 点鼻の2日前から5日間腹腔内投与した。抗ラット多核球血清や cyclophosphamide によって，血液中の多核球は消失し，単核球も減少し，とくに cyclophosphamide 投与では単核球も消失した。こうした多核球や白血球の欠乏状態では，LPS 刺激による粘液産生は著明に抑制され，とくに cyclophosphamide による白血球欠乏状態では粘液産生はほとんど認められなかった（図1）。また，好中球由来酵素であるエラスターゼ（0.5 mg）や，好中球遊走因子の IL-8（5 μg）の3日間点鼻投与でも，LPS 点鼻投与と同様な粘液産生が認められ，エラスターゼ刺激による粘液産生は抗ラット多核球血清や cyclophosphamide 投与による白血球欠

図1 LPS (ETN : endotoxin) 3日間点鼻による杯細胞化生や粘液産生は，CPA (cyclophosphamide) や抗ラット多核球血清 (Anti-PMN) による白血球欠乏状態では，著明に抑制された<sup>1)</sup>。



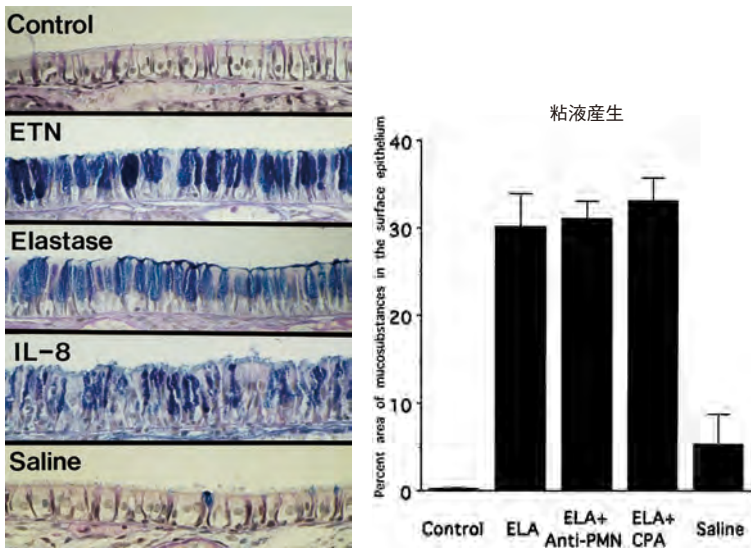


図2 エラスターゼやIL-8の3日間点鼻でも、LPS (ETN) 点鼻と同様な杯細胞化生と粘液産生が認められた(左図)。エラスターゼ刺激による粘液産生はCPA (cyclophosphamide) や抗ラット多核球血清 (Anti-PMN) による白血球欠乏状態でも抑制されなかった<sup>3)</sup>。

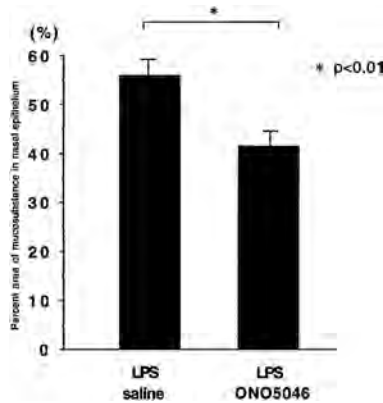


図3 LPS (3日間点鼻) 刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生に対する、好中球エラスターゼ阻害薬 (ONO5046) の抑制作用<sup>1)</sup>。

乏状態でも抑制されなかった(図2)。さらに、LPS点鼻投与の1時間前に、好中球エラスターゼ阻害薬 (ONO-5046 1.5 mg/100 μl) を3日間点鼻投与すると、LPS点鼻刺激による粘液産生は部分的に抑制された(図3)。以上の結果から、LPS点鼻投与によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生には、好中球浸潤や好中球エラスターゼが直接かかっていると考えられる。

## 2) 粘液分泌<sup>3)</sup>

LPS点鼻刺激(3日間)で粘液産生と杯細胞化生を生じさせてから、24時間後にもう一度LPSを点鼻投与すると、3~6時間をピークに粘液顆

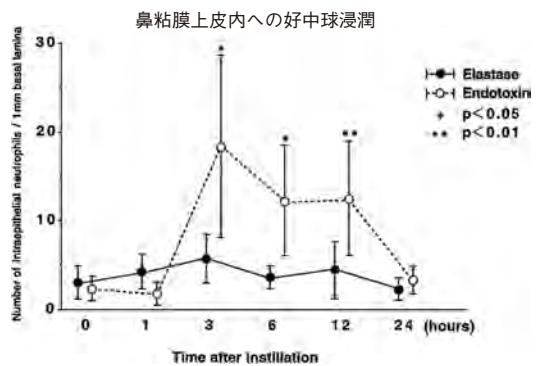
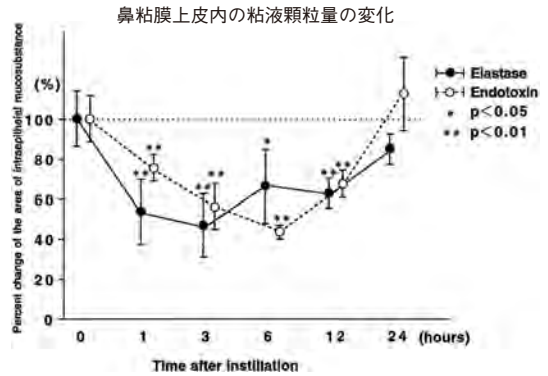


図4 エラスターゼ刺激とLPS (endotoxin) 刺激後の、粘液顆粒量の減少(粘液分泌)と好中球浸潤<sup>3)</sup>。

量が一旦減少し、24時間後には回復する。LPSの代わりにエラスターゼを点鼻投与すると、LPSより早期に、点鼻後1~3時間をピークに粘液顆粒量が減少して12時間には回復した(図4)。一方、LPS点鼻刺激後の上皮内への好中球浸潤は、

粘液分泌（粘液顆粒量の減少）のピークと一致して、3～6時間に最大になったが、エラスターゼ点鼻刺激では好中球浸潤は見られなかった。このことから、LPS点鼻刺激による粘液分泌機序にも浸潤した好中球や好中球エラスターゼが直接関与していると考えられる。

## 2. アレルギー性炎症におけるラット鼻粘膜上皮の粘液産生・分泌機序

### 1) 粘液産生<sup>4)</sup>

アレルギー性炎症における粘液産生と好酸球浸潤の機序を明らかにする目的で、各種薬剤の影響をLPS点鼻刺激と比較検討した。このうち、H1阻害薬 (*d*-chlorpheniramine malate 5 mg/kg)、H2阻害薬 (cimetidine 200 mg/kg)、デキサメタゾン (4 mg/kg)、インドメタシン (2 mg/kg) はOVAの点鼻投与1日前から4日間腹腔内投与した。ロイコトリエン (cys LTs) 阻害薬 (ONO1078: planlucast 200 mg/kg) はOVA点鼻投与の1時間前に3日間経口投与し、Th2サイトカイン阻害薬 (suplatast tosilate 30 or 100 mg/kg) はOVAの全身感作時に14日間とOVA点鼻投与時に3日間経口投与した。抗ラット多核球血清はOVA点鼻投与1日前から4日間腹腔内投与した。

H1阻害薬は好酸球浸潤を有意に抑制したが、粘液産生には影響を与えなかった。ヒスタミン (0.1～1,000 μg/100 μl) を点鼻投与 (3日間) しても粘液産生は認められなかった。H2阻害薬は好酸球浸潤や粘液産生に影響を与えなかった (図5)。

デキサメタゾンはLPS点鼻刺激と同様に、アレルギー性炎症における粘液産生と好酸球浸潤を著明に抑制した。インドメタシンはLPS点鼻刺激による粘液産生を抑制したが、アレルギー性炎症における粘液産生に対しては、むしろやや増加させた。

ロイコトリエン阻害薬 (ONO1078) は、LPS点鼻刺激による粘液産生には影響を与えず、アレルギー性炎症における好酸球浸潤にも影響を与えないが、粘液産生は有意に抑制した (図6上)。一方、LPS点鼻刺激による粘液産生を抑制した抗多核球血清は、アレルギー性炎症における好酸球

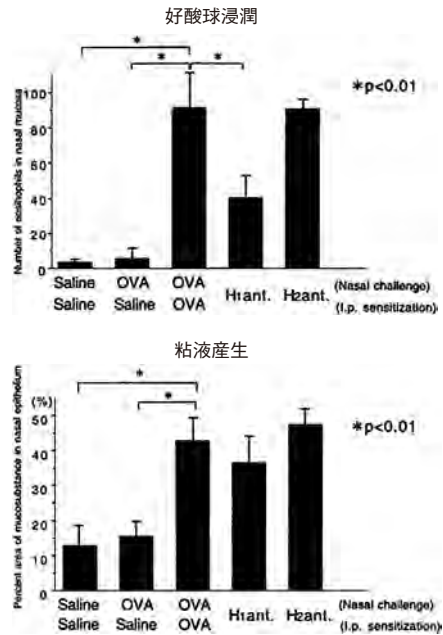


図5 H1阻害薬は、OVA (ovalbumin) の腹腔内感作と点鼻投与で作成した鼻アレルギーモデルラットの好酸球浸潤を抑制したが、粘液産生には影響がなかった<sup>4)</sup>。

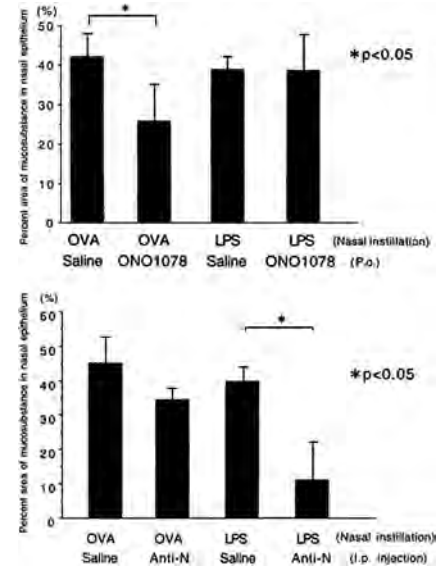


図6 ロイコトリエン阻害薬 (ONO1078) は鼻アレルギーモデルラットの粘液産生を抑制し、抗ラット多核球血清 (Anti-N) による白血球欠乏状態では、LPS刺激による粘液産生が抑制された<sup>4)</sup>。

浸潤を著明に抑制したが、粘液産生には影響を与えなかった (図6下)。Th2サイトカイン阻害薬は、濃度依存性にアレルギー性炎症における好酸球浸潤と粘液産生を抑制し (図7)、この作用はOVA

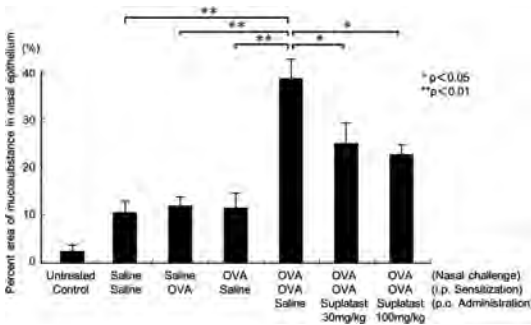


図7 Th2 阻害薬 (suplatast tosilate) は鼻アレルギーモデルラットの粘液産生を抑制した<sup>6)</sup>。

全身感作時のみの投与では認められないが、OVA 点鼻投与時のみの投与で確認された。

以上の結果、アレルギー性炎症の粘液産生には cysLTs の LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> や、IL-13 などの Th2 サイトカインが重要で、好酸球浸潤とは無関係に生じていること、アレルギー性炎症と LPS 点鼻刺激では異なった機序で粘液産生が生じると考えられる (表1)。

## 2) 粘液分泌<sup>5)</sup>

OVA の全身感作と点鼻投与で作成したアレルギー性炎症モデルで、24 時間後に再度 OVA を点

鼻投与すると、抗原刺激 1～6 時間後には粘液分泌によって粘液顆粒量が減少し、12 時間後に刺激前の状態に回復する。I 型アレルギーは肥満細胞のメディエーターが主体の即時相と浸潤細胞が中心になる遅発相の反応に分けられるが、抗原刺激 1 時間後の即時相と 6 時間後の遅発相の反応に分けて、各種薬剤の影響を検討した。

H1 阻害薬 (d-chlorpheniramine malate 5 mg/kg), H2 阻害薬 (cimetidine 200 mg/kg), アトロピン (1 mg/kg), インドメタシン (2 mg/kg) は OVA の最終点鼻 30 分前に腹腔内投与し、ロイコトリエン (cys LTs) 阻害薬 (plankast 200 mg/kg) は 1 時間前に経口投与した。抗ラット多核球血清は OVA 点鼻投与 2 日目から 3 日間腹腔内投与した。

その結果、抗原刺激 1 時間後の粘液分泌 (粘液顆粒量の減少) は、H1 阻害薬、アトロピン、ロイコトリエン阻害薬で有意に抑制された。一方、抗原刺激 6 時間後の粘液分泌はロイコトリエン阻害薬と抗ラット多核球血清で抑制され、H1 阻害薬やアトロピンの影響は受けなかった。H2 阻害薬やインドメタシンはいずれの粘液分泌にも影響を与えなかった (表2)。

以上の結果、抗原刺激 1 時間後の即時相の粘液分泌には、H1 受容体を介したヒスタミンの作用

表1 ラット鼻アレルギーモデルの好酸球浸潤、粘液産生、ラット鼻粘膜の LPS 点鼻による粘液産生に対する各種薬剤の抑制効果

	H1-ant.	H2-ant.	DEX	IND	LT-ant.	Th2 阻害	抗多核球
アレルギー好酸球浸潤	抑制	NC	抑制	NC	NC	抑制	抑制
アレルギー粘液産生	NC	NC	抑制	NC	抑制	抑制	NC
LPS 刺激粘液産生	ND	ND	抑制	抑制	NC	ND	抑制

ND: not done, NC: no change, DEX: dexamethasone, IND: indomethacin, LT: leukotriene

表2 ラット鼻アレルギーモデルの即時相 (1 時間後) と遅発相 (6 時間後) の粘液分泌に対する各種薬剤の抑制効果

	H1-ant.	H2-ant.	Atropine	IND	LT-ant.	抗多核球
即時相 抗原刺激 1 時間後	抑制	NC	抑制	NC	抑制	NC
遅発相 抗原刺激 6 時間後	NC	NC	NC	NC	抑制	抑制

NC: no change, IND: indomethacin, LT: leukotriene

と副交感神経系，さらに LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> などが重要で，抗原刺激 6 時間後の遅発相の粘液分泌には，LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> などとともに好中球や好酸球などの

浸潤細胞が重要な役割を果たしていると考えられた。

## まとめ

**疑問：感染とアレルギー性炎症における粘液産生・分泌はどのように生じるか？**

**答え：**LPS の点鼻投与によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生・分泌には好中球浸潤と好中球エラスターゼが関与し，アレルギー性炎症による粘液産生には LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> や Th2 サイトカインが重要で，好酸球浸潤の機序とは異なる。即時相の粘液分泌には H1 受容体と副交感神経系が，遅発相の粘液分泌には炎症細胞浸潤が重要で，LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> はその両方にかかわる。

## 文献

1. Shimizu T, Takahashi Y, Kawaguchi S, et al. Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1412-1418.
2. Takahashi Y, Shimizu T, Sakakura Y. Effects of indomethacin, dexamethasone, and erythromycin on endotoxin-induced intraepithelial mucus production of rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:683-687.
3. Shimizu T, Takahashi Y, Takeuchi K, et al. Role of neutrophil elastase in endotoxin-induced mucus hypersecretion in rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:1049-1054.
4. Shimizu T, Hirano H, Majima Y, et al. A mechanism of antigen-induced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats. A comparison with lipopolysaccharide-induced mucus production. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1648-1654.
5. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, et al. A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:119-125.
6. Shimizu S, Hattori R, Majima Y, et al. Th2 cytokine inhibitor suplatast tosilate inhibits antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118:67-72.

## IV 炎症に伴う粘液の変化にはどのような生理的役割があるか？

### —異なる pH による AB-PAS 染色と、 レクチン染色による検討—

#### 1. 気道炎症と粘液の性状変化

炎症病態に応じて新たに産生される粘液の生体防御における役割については、物理的バリアとしての作用以外にはまだわかっていないことが多い。気道粘液の主要な構成成分であるムチンは、炎症や刺激によってコア蛋白であるムチン遺伝子の発現が亢進するとともに、異なる糖転移酵素の作用によってムチンを構成する糖鎖構造も変化する。気道炎症では杯細胞から AB-PAS 染色で青く染まる粘液が産生されるが、その生物学的な意義については不明のままであった。私は、粘液分泌に関する研究を開始した当初から、

「杯細胞から新たに産生される AB 染色で青く染まる粘液の生理的役割は何か？」

と疑問に思っていたが、解明することができなかった。

そこで、最初に鼻中隔粘膜におけるムチンのコア蛋白であるラットの Muc5ac の mRNA 発現が、LPS 点鼻刺激とアレルギー性炎症で違いがあるか検討したところ、どちらの炎症でも同様に Muc5ac mRNA 発現が亢進し、産生されるムチンのコア蛋白は共通であると考えられた<sup>1)</sup> (図 1)。

次に、新たに産生されたムチンの糖鎖構造の変化について、①異なる pH を利用した AB-PAS 染色と、②レクチン染色を用いて、定常状態の粘液顆粒と LPS 点鼻刺激とアレルギー性炎症の粘液顆粒と比較検討した。定常状態では鼻中隔粘膜上皮にはほとんど杯細胞や粘液顆粒が認められないため、同一切片で口蓋側の incisive duct 内の杯細胞の粘液顆粒を定常状態の粘液顆粒の指標とした<sup>1)</sup>。

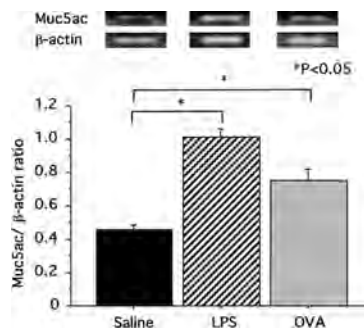


図 1 LPS 点鼻刺激と OVA (ovalbumin) を用いたアレルギー性鼻炎モデルラットにおける、鼻中隔粘膜上皮のラット Muc5ac の mRNA 発現<sup>1)</sup>

LPS 刺激でもアレルギー性炎症でも新たに産生される粘液のコア蛋白 (Muc5ac) に差は認められなかった。

#### 2. 異なる pH を利用した AB-PAS 染色

ラットの鼻中隔粘膜と同じ切片の口蓋側の incisive duct における上皮内の粘液顆粒を、① AB(pH 2.6)-PAS 染色、②シアリダーゼ処理 (切片を 37°C, 12 時間前処理) 後、AB(pH 2.6)-PAS 染色、③ AB(pH 1.0)-PAS 染色、の 3 通りの方法で染色し比較検討した。粘液顆粒は、いずれの AB 染色でも染まらず PAS に赤染される中性糖蛋白と、AB(2.6) で青染するがシアリダーゼ処理で消失するシアリダーゼ感受性のシアロムチン、消失しないシアリダーゼ抵抗性のシアロムチン、さらに AB(1.0) に青染されるスルホムチンの 4 種類に分けることができる。

杯細胞が多く認められる、incisive duct 上皮の粘液顆粒は、定常状態に比べて LPS 点鼻刺激とアレルギー性炎症では、シアリダーゼ感受性のシアロムチンの割合がやや増加したが、もともと中性糖蛋白の含有割合が 70% 以上と多く、炎症刺



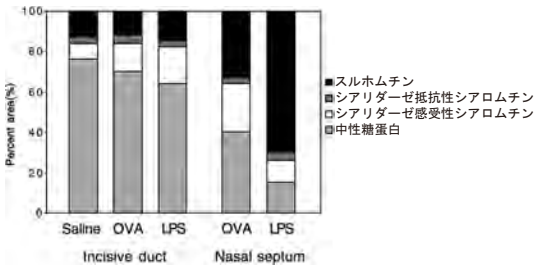


図2 LPS刺激とアレルギーモデルラット (OVA) で、鼻中隔上皮の杯細胞に産生される粘液の、異なる pH を利用した AB-PAS 染色<sup>1)</sup>

LPS 刺激やアレルギー性炎症で新たに産生される粘液にはスルホムチンが多く含まれていた。

刺激後も大きな変化は認められなかった。しかしながら、LPS 点鼻刺激やアレルギー性炎症で鼻中隔粘膜上皮に新たに産生される粘液顆粒は、中性糖蛋白は少なく、ほとんどが AB に青染されるシアロムチンかスルホムチンであった。とくに LPS

点鼻刺激ではスルホムチンの産生が多く、約 70% を占めていた (図 2)。

スルホムチンは多くの硫酸基を含むため、強力な陰性荷電を有して、cationic inflammatory protein である好中球エラスターゼやリゾチムと結合して、その作用を抑制することが報告されている<sup>2)~4)</sup>。つまり、気道粘液は炎症時にはスルホムチンを多く含有することで、こうした炎症メディエーターの働きを中和・抑制して、炎症反応を制御している。このように、炎症時に産生される粘液には炎症を取束させる重要な役割があると考えられる。

### 3. レクチン染色による反応性の変化

レクチンは、特定の糖鎖構造と結合する能力を有しているため、その反応性によって粘液の糖鎖

表 1 粘液の染色に利用した 6 種類のレクチン

Abbreviation	Lectin	Carbohydrate specificity	Inhibitory Sugar
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Galβ1,3GalNAc > α- and β-Gal	Lactose
MAL-II	<i>Maackia amurensis II</i>	αNeuNAc2,3Gal	Sialic acid
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	αNeuNAc2,6Gal	Sialic acid
UEA-1	<i>Ulex europaeus I</i>	α-L-Fuc	α-L-Fucose
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAcα1,3GalNAc >> αGalNAc	N-Acetylgalactosamine
PSA	<i>Pisum sativum</i>	αMan > αGlc = GlcNAc	α-Methyl-mannose

Fuc = fucose; Gal = galactose; GalNAc = N-acetylgalactosamine; Glc = glucose; GlcNAc = N-acetylglucosamine; Man = mannose; NeuNAc = N-acetylneuraminic acid

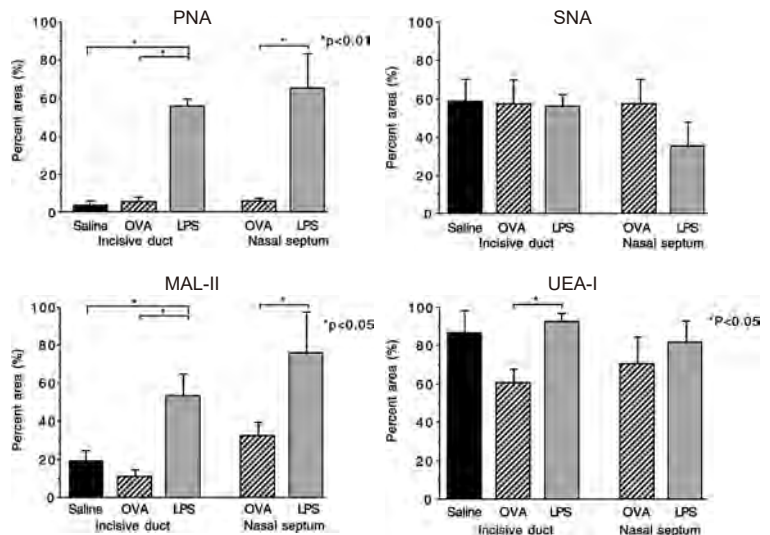


図3 LPS刺激とアレルギーモデルラット (OVA) で、鼻中隔上皮の杯細胞に産生される粘液の、各種レクチンとの反応性<sup>1)</sup>

LPS 刺激で新たに産生される粘液では PNA と MAL-II との反応性が増加した。

構造の変化を認識することができる。そこで表1に示した6種類のレクチン染色を行って、粘液顆粒の変化を検討した。このうち、PNA (*Arachis hypogaea*), MAL-II (*Maachia amurensis II*), SNA (*Sambucus nigra*), UEA-I (*Ulex europaeus I*) の4種類のレクチンが、ラット鼻粘膜の粘液顆粒と反応した。とくに、LPS点鼻刺激では定常状態やアレルギー性炎症で産生される粘液に比べて、PNAとMAL-IIに反応する粘液顆粒が優位に増加していた。SNAやUEA-Iでは、こうした刺激による変化は認められなかった(図3)。

LPS点鼻刺激で増加した糖鎖構造は、PNAと反応するgalactose-N-acetyl galactosidaseやMAL-IIと

反応する $\alpha$ 2,3 sialic acid-galactoseなどが考えられるが、これらの糖鎖構造はそれぞれ、*Pseudomonas aeruginosae*, *Pseudomonas cepacia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* や *Mycoplasma pneumoniae*, *Influenza virus* など、各種の細菌やウイルスの接着部位になることが知られている<sup>5)~9)</sup>。つまり、感染時に気道粘液は目的に応じて微生物の接着に関与する糖鎖構造を増加させて、微生物を捕捉し粘液線毛輸送で排除する、生体防御における重要な役割を有していることが推測される。アレルギー性炎症ではこうした糖鎖構造の変化が認められないことも、こうした推測を裏付けている。

## まとめ

**疑問：**炎症に伴う粘液の変化にはどのような生理的役割があるか？

**答え：**気道炎症では、粘液が刺激に応じてその糖鎖構造を変化させることで、細菌やウイルスの捕捉・排除や、好中球エラスターゼやリゾチームなどの中和・抑制に働き、生体防御や炎症反応の収束に能動的にかかわる。

## 文献

1. Shimizu T, Hirano H, Shimizu S, et al. Differential properties of mucous glycoproteins in rat nasal epithelium. A comparison between allergic inflammation and lipopolysaccharide stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1077-1082.
2. Van-Seuningen I, Aubert JP, Davril M. Interaction between secretory leucocyte proteinase inhibitor and bronchial mucins or glycopeptides. Physiopathological implications for the protection of mucins against proteolysis by human leucocyte elastase. *Biochem J* 1992;281(Pt 3):761-766.
3. Van-Seuningen I, Houdret N, Hayem A, et al. Strong ionic interactions between mucins and two basic proteins, mucus proteinase inhibitor and lysozyme, in human bronchial secretions. *Int J Biochem* 1992;24:303-311.
4. Nadziejko C, Finkelstein I. Inhibition of neutrophil elastase by mucus glycoprotein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:103-107.
5. Lamblin G, Lhermitte M, Klein A, et al. The carbohydrate diversity of human respiratory mucins: a protection of the underlying mucosa? *Am Rev Respir Dis* 1991;144:S19-24.
6. Ramphal R, Carnoy C, Fievre S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal beta 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal beta 1-4GlcNAc) disaccharide units. *Infect Immun* 1991;59:700-704.
7. Krivan HC, Ginsburg V, Roberts DD. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to ganglio-tetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch Biochem Biophys* 1988;260:493-496.
8. Roberts DD, Olson LD, Barile MF, et al. Sialic acid-dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified glycoproteins. *J Biol Chem* 1989;264:9289-9293.
9. Suzuki Y, Nagao Y, Kato H, et al. Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached. *J Biol Chem* 1986;261:17057-17061.

## V インドメタシンがアレルギー性炎症の 粘液産生を増加させるのは何故か？

—予想外の結果に新しい発見が隠れている—

### 1. インドメタシンがアレルギー性炎症の粘液産生を増加させた

研究では、しばしば予想外の結果が得られる。経験の乏しい研究者は、研究手技に問題があると考え、予想通りのデータや、仮説をサポートするデータばかりを求めがちである。しかし、実は予想と違ったときこそチャンスであり、疑問の中に大きな発見が隠れている。

私は、1995～1996年頃にLPS点鼻刺激やアレルギー性炎症のラット鼻粘膜上皮における粘液産生機序を、各種の薬剤を用いて比較検討しているときに、奇妙な現象に気が付いた。抗炎症薬で、cyclooxygenase (COX) 阻害作用を有するインドメタシンは、LPS点鼻刺激による粘液産生を抑制したが、アレルギー性炎症による粘液産生には影響を与えず、むしろやや増加させた(図1)。粘

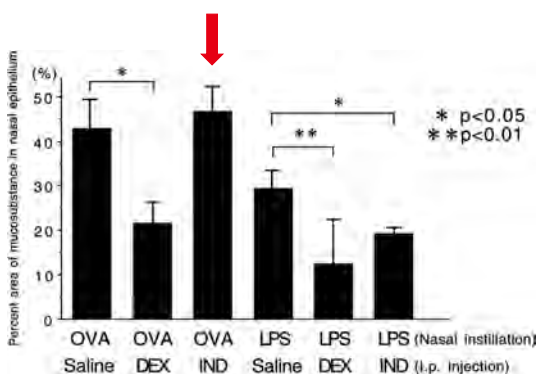


図1 OVA (ovalbumin) を用いたアレルギー性鼻炎モデルラットとLPS点鼻刺激による、鼻粘膜上皮の粘液産生に対するデキサメタゾン (DEX) とインドメタシン (IND) の作用<sup>1)</sup>

デキサメタゾンはアレルギー性炎症とLPS刺激による粘液産生をどちらも抑制した。インドメタシンはLPS刺激による粘液産生を抑制したが、アレルギー性炎症による粘液産生はむしろやや増加した(赤矢印)。

液産生と杯細胞化生を最大限生じさせて、薬剤の抑制作用を検討していたため、それ以上に粘液顆粒が増加しても統計学的に有意な変化としてとらえることはできなかったが、肉眼的には粘液顆粒がこぼれ落ちるほど増加していた<sup>1)</sup>。

抗炎症薬が粘液産生を増加させることは、想像もしていなかった現象で、先入観を捨ててじっくりとデータを見直して、この奇妙な現象の疑問を解明できれば、新たな発見が期待できたとと思う。しかしながら、当時はこれ以上追及することができず、

「インドメタシンを投与するとアレルギー炎症における粘液産生が増加するのは何故か？」という疑問だけ持ち続けていた。

### 2. 制御系メディエーターの役割

そのうちに、1990年代後半にはアラキドン酸代謝物の受容体が次々にクローニングされ、受容体の刺激薬 (アゴニスト)・抑制薬 (アンタゴニスト) などを利用した検討によって、それまでは代謝が早くその機能が十分わからなかった、アラキドン酸代謝物の作用が受容体側からの解析によって徐々に明らかにされた。その結果、アラキドン酸代謝物には炎症の促進に作用する物質と抑制に働く物質があり、その相互作用によって生体の恒常性が維持され、炎症が進行すると自然に消炎に働く機序が存在することがわかってきた(第2章IV-3参照)(図2)。

後日になって、遅ればせながら、インドメタシンはCOX阻害作用によって、アレルギー性炎症に対する制御系メディエーターであるPGE<sub>2</sub>やPGL<sub>2</sub>の産生を抑制し、ロイコトリエンの産生を増加させることで粘液産生を増加させたことに思

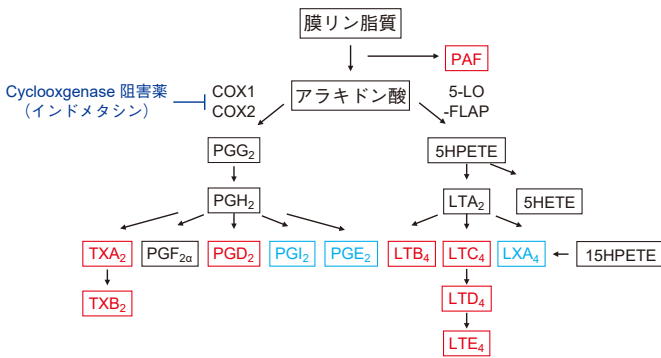


図2 アラキドン酸代謝物における炎症性メディエーター(赤字)と制御系メディエーター(青)

PG: prostaglandin, TX: thromboxane, LT: leukotriene, LX: lipoxin, PAF: platelet-activating factor

い当たった。いわゆる NSAIDs 過敏喘息（アスピリン喘息）の作用機序と共通し、好酸球性鼻副鼻腔炎の病態とも関連している。この疑問がきっかけになって、気道炎症に対する制御系脂質代謝物

である PGE<sub>2</sub><sup>2,3)</sup> やリポキシン<sup>4)</sup>、ω3 脂肪酸代謝物<sup>5)</sup>、短鎖脂肪酸などの研究に発展し、現在まで継続している（第2章 IV 参照）。

### まとめ

疑問：インドメタシンがアレルギー性炎症の粘液産生を増加させるのは何故か？

答え：インドメタシンは COX 阻害作用により、アラキドン酸代謝物のうち制御系メディエーターである PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 産生を抑制し、ロイコトリエン産生を増加させ、いわゆる NSAIDs 過敏喘息と同じ機序でアレルギー性炎症における粘液産生を増加させる。

### 文献

1. Shimizu T, Hirano H, Majima Y, et al. A mechanism of antigen-induced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats. A comparison with lipopolysaccharide-induced mucus production. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1648-1654.
2. Hattori R, Shimizu S, Majima Y, et al. EP4 agonist inhibits lipopolysaccharide-induced mucus secretion in airway epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:51-58.
3. Hattori R, Shimizu S, Majima Y, et al. Prostaglandin E2 receptor EP2, EP3, and EP4 agonists inhibit antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118:536-541.
4. Shimizu S, Ogawa T, Seno S, et al. Pro-resolution mediator lipoxin A4 and its receptor in upper airway inflammation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2013;122:683-689.
5. Hara S, Tojima I, Shimizu S, et al. 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid inhibits TNF-α-induced inflammation in cultured human airway epithelium and LPS-induced murine airway inflammation. *Am J Rhinol Allergy* 2022;36:106-114.

## 第2章

### 好酸球性鼻副鼻腔炎の疑問

- I. 鼻茸はどのように形成されるか？
- II. ニカワ様鼻汁の本体は何か？
- III. 好酸球は病態形成にどうかかわるか？
- IV. アラキドン酸代謝の不均衡は病態形成にどうかかわるか？
- V. 自然免疫の役割は？
- VI. 炎症制御因子の役割は？
- VII. 鼻粘膜基底細胞の役割は？

# 1 鼻茸はどのように形成されるか？

## —好酸球性鼻副鼻腔炎と組織リモデリング—

### 1. 好酸球性鼻副鼻腔炎の歴史

1980年代までの我が国における慢性鼻副鼻腔炎は、蓄膿症と呼ばれる慢性化膿性鼻副鼻腔炎が中心であった。1990年代に慢性鼻副鼻腔炎に対する治療法は大きく発展し、薬物療法として、マクロライド療法（14員環マクロライドの少量長期投与法）の有用性が確立され、さまざまな抗炎症作用による新たな作用機序が解明された<sup>1)</sup>。手術療法として、内視鏡下鼻副鼻腔手術が普及し、マイクロデブリッターやナビゲーションシステムなどの手術支援機器が開発され、低侵襲で安全な手術が可能になった。こうしたマクロライド療法と内視鏡下鼻副鼻腔手術により、慢性鼻副鼻腔炎は容易に根治できる疾患になった。

しかしながら、2000年頃から手術を行っても早期に鼻茸が再発し、治療に抵抗する慢性鼻副鼻腔炎の難治例が目ざされ始めた。難治症例の特徴として、成人発症、両側性病変、篩骨洞優位の副鼻腔陰影があり、鼻茸と嗅覚障害を伴うことが多く、末梢血の好酸球数増多と鼻粘膜に著明な好酸球浸潤が認められることから、2001年に春名らにより「好酸球性副鼻腔炎」の概念が提唱された<sup>2)</sup>。

さらに、2015年に藤枝らは多施設共同疫学研究（JESREC study：Japanese Epidemiological Survey of Refractory Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis Study）の結果をもとに、内視鏡下鼻副鼻腔手術後にも鼻茸が再発する難治症例のエンドタイプ・フェノタイプの検討から、両側性病変、鼻茸、篩骨洞優位の副鼻腔陰影（CT）、末梢血好酸球増多などの特徴を有し、組織中好酸球数が1視野あたり70個以上あるものをスコア化（JESRECスコア）して、好酸球性副鼻腔炎の診断基準が作成された。また5%以上の末梢血好酸球割合と篩骨洞優位の陰影の有無、さらに気管支

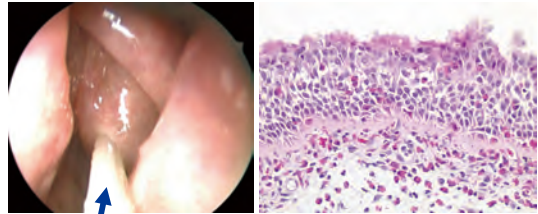


図1 好酸球性鼻副鼻腔炎（左鼻腔）における粘稠なニカワ様鼻汁（矢印）と、鼻茸上皮の著明な好酸球浸潤（HE染色）

喘息やNSAID過敏喘息の合併の有無により、重症・中等症・軽症に分類した<sup>3)</sup>。

このように、好酸球性鼻副鼻腔炎は、再発傾向の強い多発性の鼻茸形成と、組織や鼻汁中への著しい好酸球浸潤、極めて粘稠なニカワ様鼻汁を特徴とし（図1）、鼻閉や嗅覚障害を生じやすい。喘息を伴うことが多く、マクロライド療法の効果が乏しく、手術を行っても術後に鼻茸が再発しやすい難治性疾患である（表1）。ステロイドの全身・局所投与以外に有効な薬物療法がなかったが、近年、生物学製剤（抗IL-4受容体α鎖抗体）の有効性が明らかになった<sup>4)</sup>。ただ、その成因や病態については不明なまま、多くの疑問が残されている。

### 2. 慢性鼻副鼻腔炎のフェノタイプ・エンドタイプ

慢性鼻副鼻腔炎はさまざまな病因と病態を含み、実際には多くのフェノタイプやエンドタイプが複合して病態を形成している。欧米では、鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎（CRSwNP：chronic rhinosinusitis with nasal polyp）と鼻茸を伴わない慢性鼻副鼻腔炎（CRSsNP：chronic rhinosinusitis without nasal polyp）に分類され、CRSwNPはほとんどが好酸球優位の2型炎症が中心で、CRSsNPは好中

表1 従来の慢性鼻副鼻腔炎と好酸球性鼻副鼻腔炎の比較

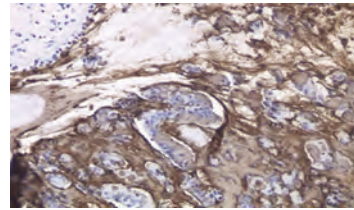
	従来の慢性鼻副鼻腔炎	好酸球性鼻副鼻腔炎
浸潤細胞	リンパ球, 好中球	好酸球
鼻汁	膿性, 粘膿性	粘稠性, ニカワ様
鼻茸	多くない	両側性, 多発性, 再発性
症状	鼻漏, 後鼻漏	鼻閉, 嗅覚障害
罹患洞	上顎洞中心	篩骨洞中心
喘息合併	まれ	多い (60~80%) とくに NSAIDs 過敏喘息
マクロライド療法	有効	効果が乏しい

球優位の1型・3型炎症であることが多い<sup>5)</sup>。マクロライド療法の効果については、二重盲検試験によりロキシシロマイシンがCRSsNPに有効であったが<sup>6)</sup>、アジシロマイシンはCRSwNPに効果が乏しく<sup>7)</sup>、好酸球優位の2型炎症にはマクロライド療法の効果が乏しい。

欧米と我が国を含む東アジア諸国では慢性鼻副鼻腔炎の病態が異なることも明らかになった<sup>8)</sup>。JESRECスコアを利用した診断基準において、我が国では好酸球性鼻副鼻腔炎はCRSwNP手術例の約55%を占めるが、欧州では約90%を占めると推測される<sup>9)</sup>。したがって我が国では、CRSwNPであっても半数近くが好中球優位の1型・3型炎症でマクロライド療法の効果が期待できる。ただ、我が国を含めた東アジア諸国においても好酸球性鼻副鼻腔炎症例が増加傾向にあり、近年の生活習慣の変化などの影響が考えられる。

### 3. 鼻茸形成と鼻副鼻腔組織リモデリング

持続する炎症によって生じる組織構築の不可逆的变化を組織リモデリングと呼び、鼻副鼻腔では鼻茸形成や杯細胞化生、基底膜の肥厚、粘膜固有層の線維化、上皮の過形成などが観察される。組織リモデリングにかかわる因子として、粘液分泌や杯細胞化生にかかわるMUC5ACムチン、線維化などの組織変化に働くPDGF (Platelet-derived growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) などが知られ、細胞外マトリックスとしてフィブロネクチンなどがある。好酸球性鼻副鼻腔炎におい

図2 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸のMUC5AC免疫染色<sup>17)</sup>

ては、MUC5ACムチン産生が生じ<sup>10)</sup>、PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ とその受容体<sup>11)~14)</sup>、さらにフィブロネクチンの発現が亢進し<sup>15, 16)</sup>、鼻茸形成にかかわっている。

MUC5ACムチンは主として杯細胞に局在し、粘膜下腺の粘液細胞にみられるMUC5Bムチンとともに、ゲル形成能を有する分泌型ムチンとして鼻粘膜の杯細胞化生や粘液過分泌の主体になる<sup>17)</sup> (図2)。とくに2型炎症が中心の好酸球性鼻副鼻腔炎においては、IL-4やIL-13などの2型サイトカインが杯細胞化生やムチン産生にかかわっている<sup>18)</sup>。

PDGFは血小板、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞などから産生され、線維芽細胞の増殖・遊走や細胞外マトリックス産生を促進する。われわれは、鼻汁中に高濃度のPDGFが存在し、とくに好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻汁で有意に高濃度であること (図3)、アレルギー性鼻炎や慢性鼻副鼻腔炎では、鼻粘膜や鼻茸におけるPDGFとその受容体のmRNA発現が亢進し、とくに好酸球性鼻副鼻腔炎でさらに強く発現していること (図4)、免疫組織化学によって、鼻茸ではPDGFは上皮細胞と粘膜下腺細胞、血管内皮細胞、好酸球やマクロファージなどの炎症細胞に局在し、その受容

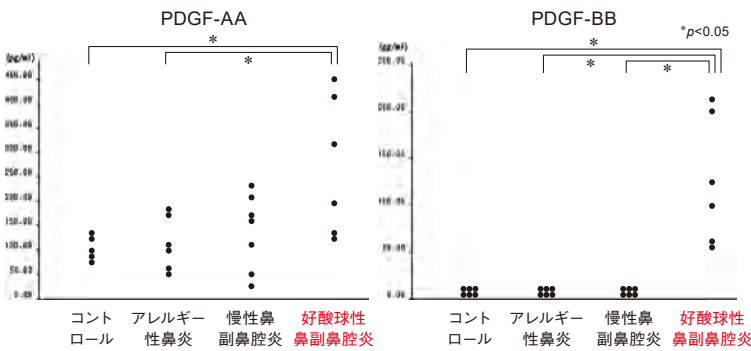


図3 鼻汁中のPDGF-AAとPDGF-BBの濃度<sup>11)</sup>

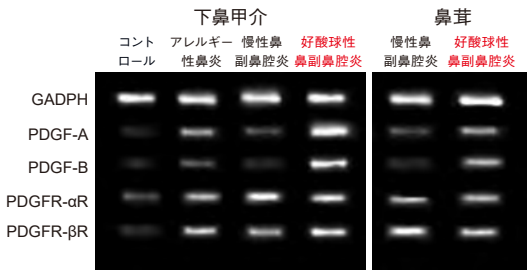


図4 下鼻甲介と鼻茸におけるPDGFとその受容体のmRNA発現<sup>11)</sup>

体が上皮細胞と線維芽細胞に発現していることを確認している<sup>11)</sup>。

VEGFは上皮細胞，血管内皮細胞，線維芽細胞

などから産生され，内皮細胞の増殖・分化（血管新生）や血管透過性の亢進作用がある。私たちは免疫組織化学で，好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸上皮細胞や線維芽細胞にVEGFが強く発現していることを確認している<sup>19)</sup>。TGF-βにはβ1, β2, β3の3種類のアイソフォームがあり，多くの細胞種の増殖抑制，細胞分化などにかかわっている。とくに，TGF-β1は細胞外マトリックスの産生・沈着と線維化に重要である。

本章では，こうした鼻茸形成にかかわるさまざまな炎症メディエーターの動態を通して，臨床における好酸球性鼻副鼻腔炎の疑問に挑む。

## まとめ

疑問：鼻茸はどのように形成されるか？

答え：好酸球性鼻副鼻腔炎では，粘液分泌や杯細胞化生にかかわるMUC5ACムチン，線維化などの組織変化に働くPDGF, VEGF, TGF-βとその受容体，さらに細胞外マトリックスとしてフィブロネクチンなどの発現や産生が亢進し，組織リモデリングにより鼻茸が形成される。

## 文献

1. Shimizu T, Suzaki H. Past, present and future of macrolide therapy for chronic rhinosinusitis in Japan. *Auris Nasus Larynx* 2016;43:131-136.
2. 春名眞一, 鴻信義, 柳清ら. 好酸球性副鼻腔炎 (Eosinophilic Sinusitis). *耳展* 2001;44:195-201.
3. Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy* 2015;70:995-1003.
4. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet* 2019; 394:1638-1650.
5. Bachert C, Zhang N, Hellings PW, et al. Endotype-driven care pathways in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:1543-1551.



6. Wallwork B, Coman W, Mackay-Sim A, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of macrolide in the treatment of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006;116:189-193.
7. Videler WJ, Badia L, Harvey RJ, et al. Lack of efficacy of long-term, low-dose azithromycin in chronic rhinosinusitis: a randomized controlled trial. *Allergy* 2011;66:1457-1468.
8. Zhang Y, Gevaert E, Lou H, et al. Chronic rhinosinusitis in Asia. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:1230-1239.
9. Fujieda S, Imoto Y, Kato Y, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int* 2019;68:403-412.
10. Zhang Y, Wang X, Jiao J, et al. Expression of T helper cytokines associated with MUC5AC secretion in eosinophil-based endotypes of nasal polyps. *Allergy* 2021;76:604-609.
11. **Kouzaki H, Seno S, Fukui J, et al. Role of platelet-derived growth factor in airway remodeling in rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2009; 23:273-280.**
12. Matsune S, Ohori J, Sun D, et al. Vascular endothelial growth factor produced in nasal glands of perennial allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 2008;22:365-370.
13. Wittekindt C, Hess A, Bloch W, et al. Immunohistochemical expression of VEGF and VEGF receptors in nasal polyps as compared to normal turbinate mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002;259:294-298.
14. Zaravinos A, Soufla G, Bizakis J, et al. Expression analysis of VEGFA, FGF2, TGFbeta1, EGF and IGF1 in human nasal polyposis. *Oncol Rep* 2008;19:385-391.
15. Meng J, Zhou P, Liu Y, et al. The development of nasal polyp disease involves early nasal mucosal inflammation and remodelling. *PLoS One* 2013;8:e82373.
16. Nakagawa T, Yamane H, Shigeta T, et al. Interaction between fibronectin and eosinophils in the growth of nasal polyps. *Laryngoscope* 1999;109:557-561.
17. **Shimizu T. Mucus, goblet cell, submucosal gland. In: Celebi ÖÖ, Önerci TM, editors, *Nasal physiology and pathophysiology of nasal disorders*. Springer, Switzerland; 2023, p. 1-14.**
18. Zhang Y, Derycke L, Holtappels G, et al. Th2 cytokines orchestrate the secretion of MUC5AC and MUC5B in IL-5-positive chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy* 2019;74:131-140.
19. **Shimizu S, Gabazza EC, Ogawa T, et al. Role of thrombin in chronic rhinosinusitis-associated tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy* 2011;25:7-11.**

## II ニカワ様鼻汁の本体は何か？

### —組織リモデリングにおける凝固線溶系因子の役割—

#### 1. ニカワ様鼻汁

好酸球性鼻副鼻腔炎では、極めて粘稠でニカワ様と形容される鼻汁が特徴的である。しかし、その成因についてはわかっていない。通常の吸引処置では除去できず、鉗子で鼻茸を取り除くように処置する必要があり、見方によっては鼻茸やポリープ様粘膜と類似している。

ニカワ様鼻汁は、内部に多数の崩壊した好酸球と MUC5AC ムチンが認められることから、好酸球性ムチンとも呼ばれ、好酸球の細胞死 (ETosis: extracellular trap cell death) によって放出された網状の DNA (クロマチン線維) が鼻汁の粘稠性にかかわっている可能性がある<sup>1)</sup>。ETosis はもともと好中球の新しい細胞死として提唱された概念で、網状の DNA (NETs: neutrophil extracellular traps) を放出して病原体を補足し殺菌する生体防御反応のひとつである<sup>2)</sup>。好酸球性鼻副鼻腔炎や好酸球性中耳炎の貯留液中には豊富な EETs (eosinophil extracellular traps) が存在し、NETs と比較して粘性が高く安定した構造であることが確認されている<sup>3)</sup>。

一方、好酸球性鼻副鼻腔炎の術後経過を注意深く観察していると、当初はニカワ様鼻汁に思われていた部分そのまま基質化して鼻茸が形成される印象が得られることがある。ニカワ様鼻汁の免疫染色を行うと、多数の好酸球や MUC5AC ムチンの存在とともに、フィブリンやフィブリノーゲンが鼻汁中だけでなく粘膜固有層にも豊富に認められる<sup>4,5)</sup> (図 1)。われわれは、以上の点から、「凝固系の活性化によるフィブリン形成がニカワ様鼻汁の本体ではないか?」「ニカワ様鼻汁が基質化して鼻茸形成が生じるのではないか?」

との仮説をもとに研究をすすめてきた。実際に、

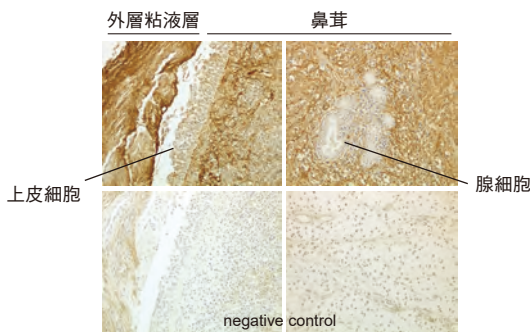


図 1 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸の Fibrin/Fibrinogen 免疫染色<sup>4,5)</sup>

トロンピンをはじめとする凝固線溶系因子には、血液凝固や止血血栓の形成以外に多彩な生理作用があり、さまざまな組織の恒常性の維持や多くの疾患の病態形成にかかわっている。

本項では、気道炎症における凝固線溶系因子の役割、好酸球性鼻副鼻腔炎で凝固系が活性化されていること、凝固系因子が粘液産生や鼻茸形成などの組織リモデリングにかかわっていること、さらに、好酸球性鼻副鼻腔炎に対する新たな治療法として、凝固線溶系をターゲットとした治療戦略について、われわれの研究結果を中心に概説する。

#### 2. 血液凝固線溶系

止血・血栓機構は、血小板凝集、血液凝固、線溶活性とその制御系によって複雑に調整されている。血管組織に破綻が生じると、最初に血小板が凝集し、次いで凝固カスケードが活性化して、最終的に生成されたトロンピンがフィブリノーゲンをフィブリンに転換させ血栓が形成される。一方で、生じた血栓を速やかに溶解する線溶活性も備わり、さらに、こうした凝固・線溶系に対する制御系因子と、プロテイン C 凝固制御系が複雑な

## —凝固線溶系—

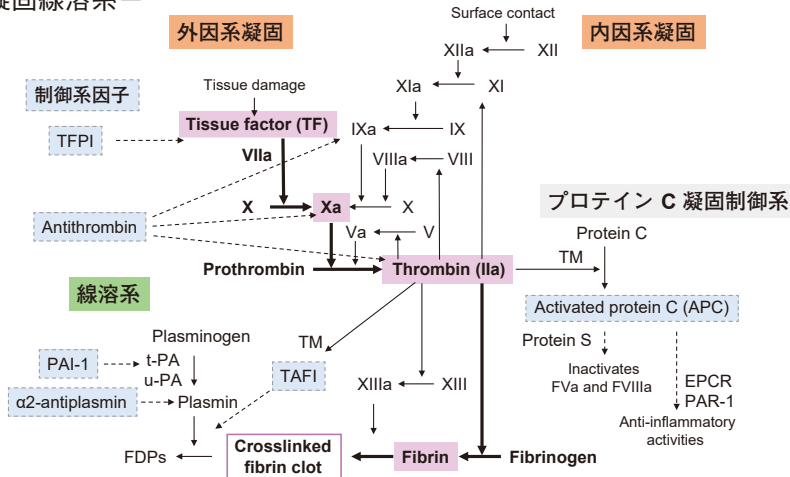


図2 凝固線溶系 実線：促進作用，点線：抑制作用

ネットワークを形成している<sup>4,5)</sup> (図2)。

凝固カスケードは、血管内の傷害で開始される内因系経路と、血液が血管外へ出て組織因子 (TF: tissue factor) と接触して開始される外因系経路があり、止血・血栓形成においては外因系経路が重要である。一方、内因系経路は補体系やキニン・カリクレイン系を活性化させ、自然免疫にもかかわっている可能性がある<sup>6)</sup>。

組織因子 (TF) は外因系凝固の起点となり、鼻粘膜では上皮細胞や線維芽細胞、好酸球を含む白血球などの表面に存在する<sup>7)</sup>。組織中に漏出した血漿中の VIIa 因子と結合した TF-VIIa 因子複合体は X 因子を活性化し (Xa)、プロトロンビンを トロンビン (IIa) に変換する。トロンビンは外因系・内因系経路の両方で生成される重要な凝固因子で、フィブリノーゲンをフィブリンに変換させるだけでなく、XIII 因子を活性化して (XIIIa)、フィブリンモノマーの架橋結合により血栓を安定化させる。さらに、V 因子、VIII 因子を活性化させるフィードバック活性を有し、トロンボモジュリンの存在下にプロテイン C 凝固制御系も活性化させる。凝固因子はほとんどがセリンプロテアーゼで、下流の蛋白を切断して作用するが、例外として TF と V、VIII 因子は糖蛋白、XIII 因子がトランスグルタミナーゼである。

凝固の制御因子として、TF pathway inhibitor (TFPI) は TF-VIIa-Xa 因子複合体を制御するセリ

ンプロテアーゼインヒビターで、上皮細胞や内皮細胞、線維芽細胞、血小板、白血球、平滑筋細胞などから産生される<sup>8)</sup>。アンチトロンビン (アンチトロンビン III) もセリンプロテアーゼインヒビターで、肝臓で産生され、トロンビンや IXa、Xa、XIa 因子の作用を抑制する。トロンビンはアンチトロンビンとすぐに結合してトロンビン-アンチトロンビン複合体 (TATc) を形成する。血漿中のトロンビン抑制作用の 80% はアンチトロンビンによるもので、ヘパリンはアンチトロンビンとトロンビンや Xa 因子との結合を増強させて、抗凝固作用を発揮する。プロテイン C 凝固制御系は、トロンビンとトロンボモジュリン (TM) の複合体によって活性化され、活性化プロテイン C (APC) がプロテイン S の存在下で Va、VIIIa 因子を不活化する。さらに、APC は上皮細胞や内皮細胞上の固有の受容体 EPCR (endothelial protein C receptor) を介した抗炎症作用も有している<sup>9,10)</sup>。

線溶系には過剰なフィブリン形成を抑制し、血栓を溶解する作用があり、肝臓で産生されたプラスミノゲンが t-PA (tissue plasminogen activator) や u-PA (urokinase plasminogen activator) によってプラスミンに変換され、プラスミンがフィブリン血栓を分解して FDPs (fibrin degradation products) に変換する。PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) はセリンプロテアーゼインヒビ

ターで、t-PA と u-PA の作用を抑制する。t-PA, u-PA, PAI-1 は、内皮細胞や上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、肥満細胞などから産生される<sup>11)</sup>。線溶系はさらに、肝臓で産生される $\alpha 2$  アンチプラスミンなどによってプラスミンの活性化が抑制され、トロンビンによって活性化された TAFI (thrombin activable fibrinolysis inhibitor) によって、プラスミンや t-PA のフィブリンへの結合が阻害され、その機能が制御されている<sup>12)</sup>。

### 3. 好酸球性鼻副鼻腔炎では凝固系が活性化されている

鼻副鼻腔に炎症が生じると血管透過性が亢進し、血漿中の凝固線溶系因子が血管外へ漏出する。すると、血管外組織に豊富に存在する外因系凝固の第一段階である組織因子 (TF : tissue factor) を起点として、トロンビンを始めとする凝固線溶系が局所で活性化される。すでに下気道においては、肺線維症患者の気管支肺胞洗浄液中でトロンビン活性が上昇し、凝固線溶系が活性化されていること<sup>13, 14)</sup>、気管支喘息患者の気道粘液では TF や Xa 因子、トロンビン活性などが上昇していること<sup>15, 16)</sup> などが報告されている。

われわれは、好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻粘膜上皮

細胞や浸潤した好酸球が TF を強く発現していること<sup>7)</sup>、アレルギー性鼻炎や慢性鼻副鼻腔炎の鼻汁中に高いトロンビン活性があり、高濃度のトロンビン-アンチトロンビン複合体 (TATc) が存在すること、とくに喘息を伴う慢性鼻副鼻腔炎 (好酸球性鼻副鼻腔炎) で有意に高い活性と濃度が認められること<sup>17, 18)</sup> を確認した。鼻副鼻腔に炎症が生じると局所で凝固系が活性化され、好酸球性鼻副鼻腔炎ではその活性が亢進している。

#### 1) 組織因子 (TF : tissue factor)

TF は外因系凝固の起点となる糖蛋白で、鼻茸の鼻粘膜では上皮細胞の基底側や好酸球を含む炎症細胞に強く、粘膜下腺細胞に弱く発現している (図 3)。上皮細胞や好酸球上における TF 活性を、培養気道上皮細胞 (A549 細胞) や培養好酸球性細胞株 (EoL-1 細胞) に X 因子と活性化 VII 因子 (VIIa) を加えて、活性化された X 因子 (Xa) を測定する方法で検討すると、トロンビンや TNF (tumor necrosis factor)- $\alpha$  は上皮細胞や EoL-1 細胞上の TF 活性を亢進させて外因系凝固を活性化させた (図 3)<sup>18)</sup>。また、トロンビンとその受容体刺激薬 (PAR-1 アゴニスト)、さらに TNF- $\alpha$  は培養正常鼻粘膜上皮細胞からの TF 産生を濃度依存性に亢進させた (図 4)。以上の結果、炎症が

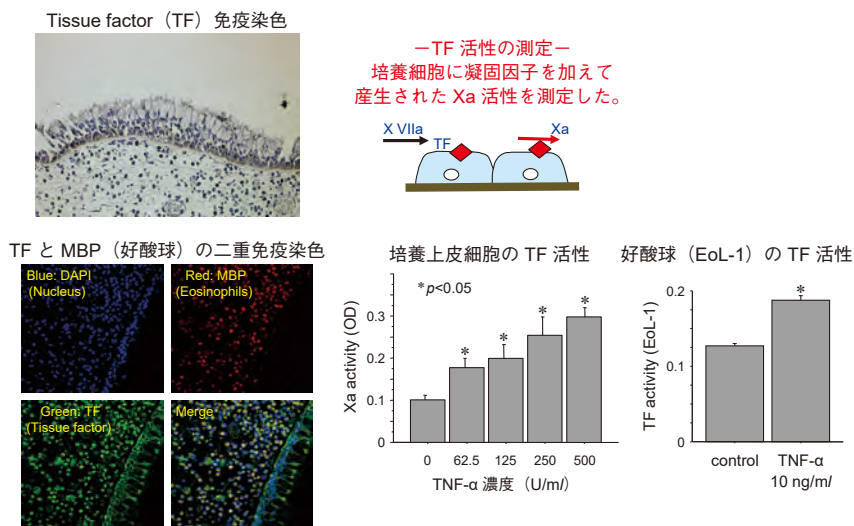


図 3 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸における TF (Tissue factor) の免疫染色と、培養上皮 (A549) 細胞、好酸球性細胞株 (EoL-1) 細胞における TF 活性<sup>18)</sup>

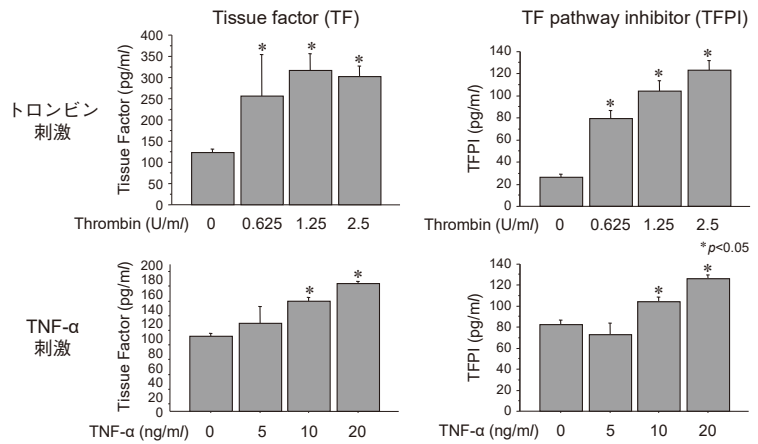


図4 トロンビン刺激とTNF-α刺激による培養正常鼻粘膜上皮細胞からのTF (Tissue factor) とTFPI (Tissue factor pathway inhibitor) 産生<sup>7)</sup>

生じると、TNF-αのような炎症メディエーターやトロンビン自体によっても、TFの活性化やその産生を介して、鼻粘膜局所で凝固系が活性化されることが明らかになった。TFは上皮細胞の基底側で発現が亢進しているが、TFは基底細胞の接着・増殖などにかかわっている可能性も考えられる<sup>19)</sup>。

組織因子 (TF) による凝固活性を制御するTFPI (TF pathway inhibitor) は、鼻茸組織では上皮細胞の管腔側と粘膜下腺細胞に弱く発現していた。ELISA法での測定で、鼻汁中にもTFとTFPIが認められ、TF濃度は正常鼻汁とアレルギー性鼻炎、慢性鼻副鼻腔炎鼻汁で差を認めないが、TFPIは喘息を伴う慢性鼻副鼻腔炎 (好酸球性鼻副鼻腔炎) 鼻汁中の濃度が上昇していた (図5)。また、トロンビンやその受容体刺激薬 (PAR-1アゴニスト)、さらにTNF-αは培養正常鼻粘膜上皮細胞からのTFPI産生を濃度依存性に亢進させた (図4)<sup>7)</sup>。以上の点から、TFPIは炎症や凝固活性が生じると、局所で産生されて過剰な凝固反応を制御すると考えられる。

## 2) トロンビン (IIa)

トロンビンは外因系・内因系凝固の最終段階で、フィブリノーゲンをフィブリンに変換する重要な凝固因子で、血漿中のアンチトロンビンと結合してトロンビン-アンチトロンビン複合体 (TATc) を形成して不活化される。われわれの検討では、ハウスダストによるアレルギー性鼻炎患者の誘発

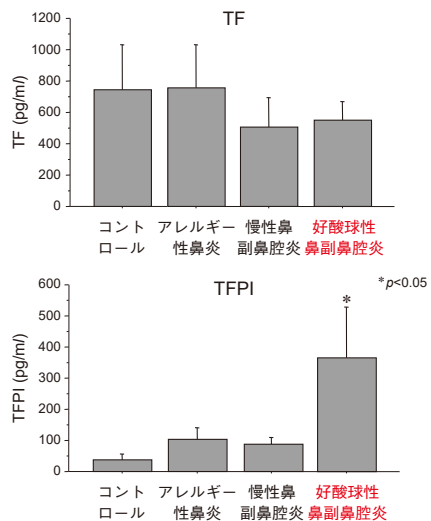


図5 鼻汁中のTF (Tissue factor) とTFPI (Tissue factor pathway inhibitor) 濃度<sup>7)</sup>

鼻汁中のトロンビン活性は、誘発前に比べて有意に上昇し (図6)<sup>17)</sup>、アレルギー性鼻炎や慢性鼻副鼻腔炎患者の鼻汁中には、正常鼻汁に比べて高いトロンビン活性があり、高濃度のTATcが存在した。とくに喘息を伴う慢性鼻副鼻腔炎 (好酸球性鼻副鼻腔炎) 患者の鼻汁では有意に高い活性と濃度が認められた (図7)<sup>18)</sup>。前述したように、好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸の粘液層 (ニカワ様鼻汁) や粘膜固有層には多量のフィブリン沈着が認められたこと (図2) と合わせて、好酸球性鼻副鼻腔炎では鼻粘膜局所で凝固系が活性化されていることが裏付けられる。

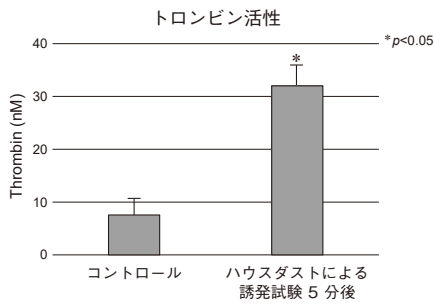


図6 ハウスダスト誘発試験5分後の鼻汁中のトロンビン活性<sup>17)</sup>

### 3) 線溶系の抑制

鼻茸ではフィブリンの分解産物である d-dimer の量が少なく、線溶系が抑制されている可能性も報告されている。IL-4, IL-5 などの Th2 サイトカインは培養気道上皮細胞からの t-PA 産生を抑制し、鼻茸では t-PA 発現が低下している結果、プラスミノゲンからプラスミンへの変換が抑制されて、フィブリンの分解が遅延すると考えられる<sup>20)</sup>。また、鼻茸では IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインで誘導される M2 マクロファージ由来の XIII-A (XIII 因子のサブユニット) 発現が増加していて、これがフィブリン網を安定させる可能性も指摘されている<sup>21)</sup>。喘息を伴う慢性鼻副鼻腔炎 (好酸球性鼻副鼻腔炎) の鼻腔洗浄液中には高濃度の TATc と TAFI (thrombin activable fibrinolysis inhibitor) が存在し<sup>22)</sup>、TAFI はプラスミンや t-PA のフィブリンへの結合を阻害して線溶系を抑制するが、鼻茸におけるフィブリン沈着に

は凝固系の活性化とともに、こうした線溶系の抑制がかかわっている可能性がある。

## 4. 凝固線溶系因子によるプロテアーゼ受容体を介した炎症とのかかわり

凝固線溶系因子は止血・血栓の形成や創傷治癒に働くばかりでなく、さまざまな生理活性を有し、炎症病態に直接かかわっている。血小板はトロンボキサンやヒスタミン、セロトニン、PAF (platelet-activating factor) などの炎症メディエーターを供給するとともに、p-selectin の発現を介して好酸球やリンパ球浸潤にかかわる<sup>12)</sup>。一方、プロテイン C 凝固制御系の活性化プロテイン C (APC: activated protein C) は固有の受容体である EPCR (endothelial protein C receptor) を介した抗炎症作用によって、炎症の制御にかかわる<sup>23)</sup>。

トロンビン, Xa 因子, TF-VIIa 因子複合体, プラスミンなどの凝固線溶系因子は、細胞膜上のプロテアーゼ受容体 (PARs: protease activated receptors) を介して多彩な生理作用を発揮することが知られている<sup>24)</sup>。

### 1) プロテアーゼ受容体 (PARs: protease activated receptors)

生体のほとんどすべての細胞膜上にはプロテアーゼの限定分解を受けて活性化される複数のプロテアーゼ受容体 (PARs) が存在する。PARs は 7 回細胞膜貫通構造を有する典型的な G 蛋白共役

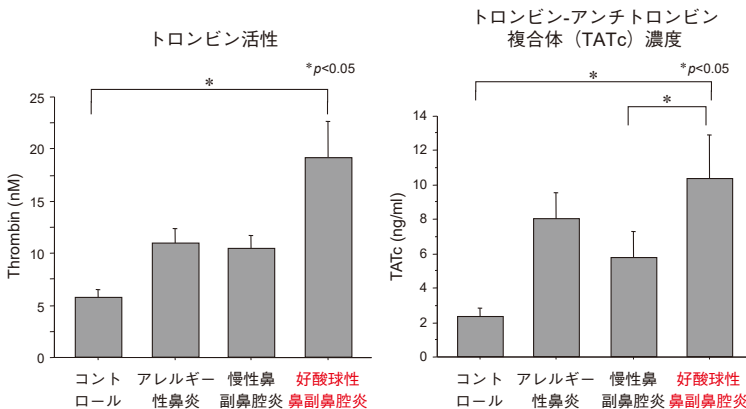


図7 鼻汁中のトロンビン活性とトロンビン-アンチトロンビン複合体 (TATc) 濃度<sup>18)</sup>

型受容体で、プロテアーゼは細胞外 N 末端領域の一部を限定分解することで N 末端側ペプチドが遊離され、それまで隠れていた領域が露呈される。この新たに露呈されたペプチド領域がアゴニストとして自らの受容体にシグナルを伝達して、細胞が活性化される。現在 4 種類のプロテアーゼ受容体 (PAR-1, -2, -3, -4) が確認され、各組織におけるそれぞれの受容体の分布や発現量の違いによって、作用の特異性が決定される。ダニや真菌などの外来抗原由来のプロテアーゼや、肥満細胞由来のトリプターゼや好中球エラスターゼなどの内因性プロテアーゼによって活性化されるが、ト

ロンビンは PAR-1, -3, -4 を活性化させる (図 8)。気道を構成する上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、浸潤細胞における PARs の発現や機能も徐々に明らかになっている。われわれは、鼻粘膜上皮細胞や鼻茸由来の線維芽細胞に、こうした 4 種類受容体がすべて発現していることを、免疫組織化学や RT-PCR 法で確認した (図 9)<sup>17, 25)</sup>。そこで、鼻副鼻腔炎症における凝固系因子の新たな役割を明らかにする目的で、培養鼻粘膜上皮細胞や培養線維芽細胞からのサイトカイン産生や粘液産生に対するトロンビンなどの凝固系因子の作用を検討した。

プロテアーゼ受容体 (PARs: protease activated receptors)

PAR-1	Thrombin, FXa, TF/FVIIa, Activated protein C, Plasmin, Trypsin, Chymase, MMP-1-3,8,9,12,13, Cathepsin G, Neutrophil elastase, Proteinase 3, Granzyme A,B,K, Der p 1
PAR-2	FXa, TF/FVIIa, Plasmin, Trypsin, Tryptase, Chymase, Cathepsin G,S, Neutrophil elastase, Proteinase 3, Papain, HDM (Der p 1-3,9), Cockroach, <i>Alternaria</i> , Japanese cedar pollen
PAR-3	Thrombin, FXa, Trypsin
PAR-4	Thrombin, Trypsin, Cathepsin G, Papain, Der p 3

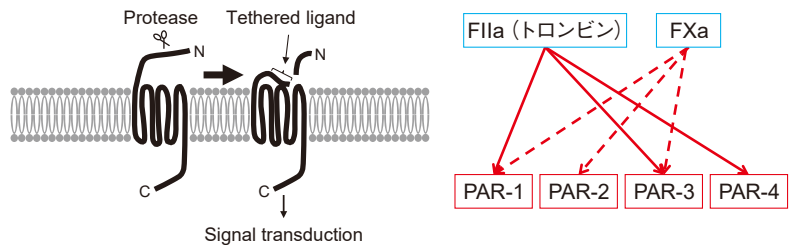


図 8 プロテアーゼ受容体 (PARs: protease activated receptors)

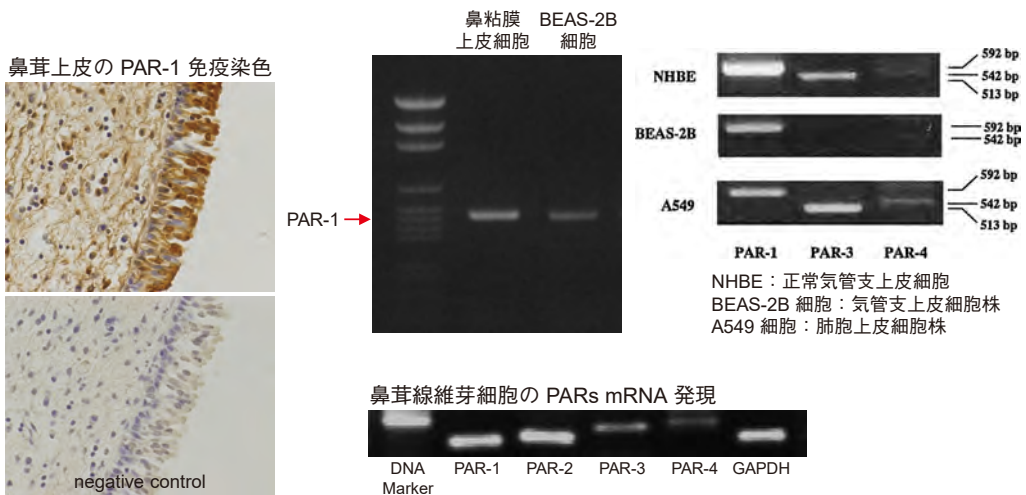


図 9 鼻粘膜上皮細胞、鼻茸線維芽細胞、気道上皮細胞におけるプロテアーゼ受容体 (PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4) の発現<sup>17, 25)</sup>

## 2) トロンビンなどの凝固因子は PARs を介して、鼻粘膜上皮細胞や線維芽細胞からの粘液・サイトカイン・細胞外基質産生を誘導する

われわれは、以前から気道炎症における凝固因子の役割に注目していた研究背景があり、トロンビンで刺激した正常気管支上皮細胞の培養上清に、線維芽細胞や平滑筋細胞に対する増殖活性があることを見出し、この増殖活性が抗 PDGF (platelet-derived growth factor) 抗体で抑制されたことから (図 10)、トロンビンが気道上皮細胞からの PDGF 産生を介して組織リモデリングにかかわること、さらに、気管支上皮細胞にはトロンビン受容体 (PAR-1, -3, -4) が存在し、PAR-1 アゴニストペプチドが PDGF 産生を亢進させる

こと確認して 2000 年に報告した<sup>26)</sup>。

鼻副鼻腔粘膜においても、トロンビンと PAR-1 アゴニストペプチドは、培養鼻粘膜上皮細胞からの PDGF と VEGF (vascular endothelial growth factor) 産生を濃度依存性に亢進させ、好酸球形鼻副鼻腔炎で観察される鼻汁や鼻粘膜組織中の PDGF・VEGF 発現の亢進にかかわることを明らかにした (図 11)<sup>17, 18)</sup>。また、トロンビンと PAR-1 アゴニストペプチドは鼻粘膜上皮細胞や気管支上皮細胞からの MUC5AC ムチン産生を濃度依存性に亢進させ、MUC5B ムチンの mRNA 発現も亢進させること (図 12)、ムチン分泌にかかわる EGF (epidermal growth factor) 受容体の発現を亢進させること、EGF 受容体阻害薬 (AG1478) がトロンビンによる MUC5AC 産生を抑制するこ

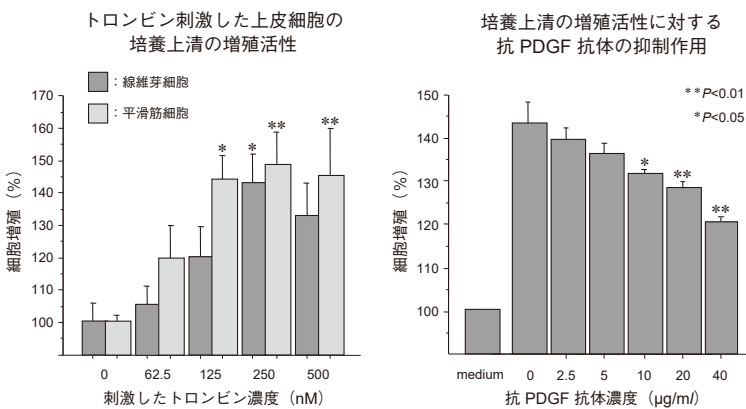


図 10 トロンビン刺激した正常気管支上皮細胞の培養上清の、線維芽細胞や平滑筋細胞に対する増殖活性と、この増殖活性に対する抗 PDGF 抗体の抑制作用<sup>26)</sup>

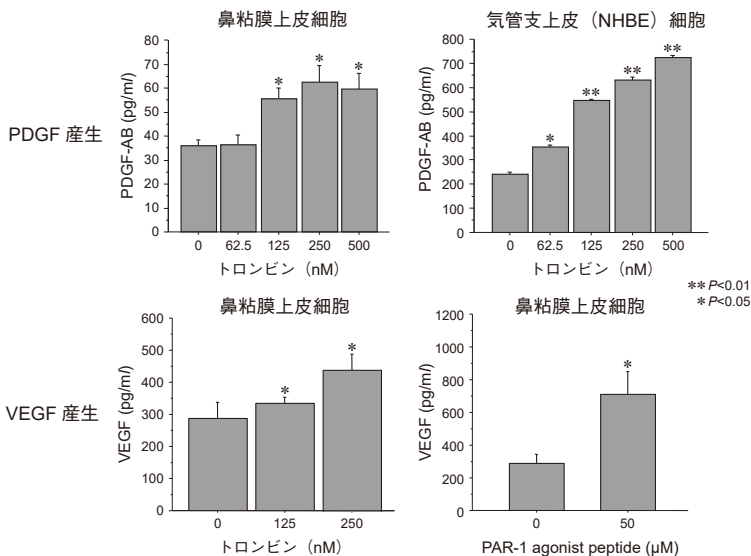


図 11 Air-liquid interface 培養による鼻粘膜上皮細胞や気管支上皮細胞からの、トロンビン刺激と PAR-1 アゴニスト刺激による PDGF, VEGF 産生<sup>17)</sup>



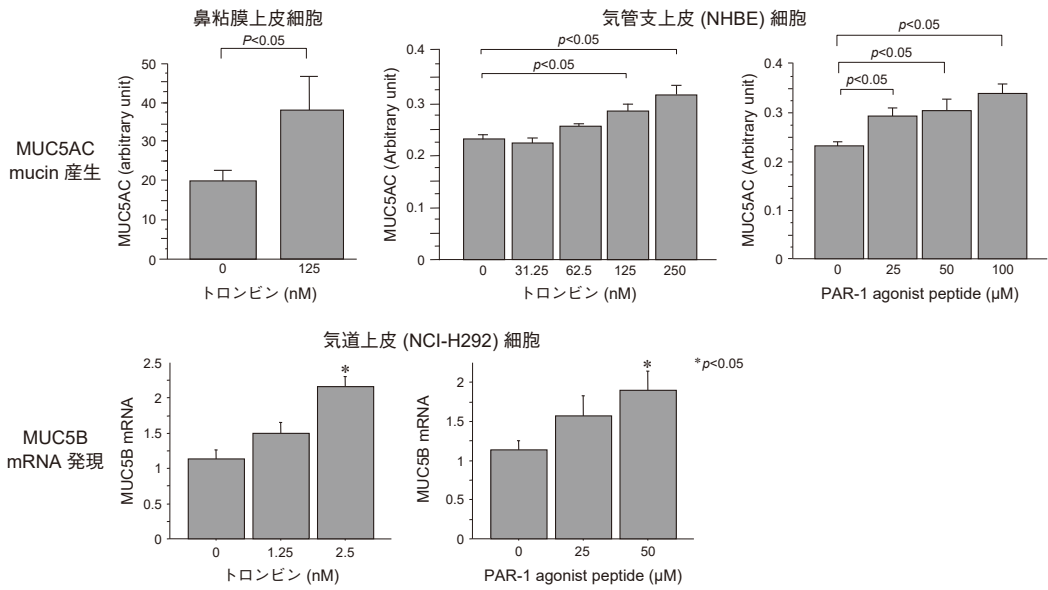


図 12 Air-liquid interface 培養による培養鼻粘膜上皮細胞や気管支上皮細胞からのトロンピン刺激と PAR-1 アゴニスト刺激による MUC5AC mucin 産生と気道上皮 (NCI-H292) 細胞における MUC5B mRNA 発現<sup>17)</sup>

とを明らかにした<sup>17)</sup>。つまり、トロンピンの PAR-1 を介したムチン分泌亢進作用には EGF 受容体が関与している。実際に、好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻粘膜上皮では EGF 受容体が発現している (図 13)。さらに、ラットに *in vivo* でトロンピンを 3 日間点鼻すると、鼻粘膜上皮に杯細胞化生と粘液産生が生じることも見出した (図 14)<sup>17)</sup>。つまり、トロンピンは上皮細胞の PAR-1 受容体に作用して、PDGF, VEGF, MUC5AC ムチン産生を促進して、好酸球性鼻副鼻腔炎における鼻茸形成や粘液産生などに直接かかわっている。

次に、鼻茸由来の培養線維芽細胞に対する作用

を検討したところ、トロンピンと Xa 因子、PAR-1 および PAR-2 アゴニストペプチドは、組織の線維化にかかわる TGF (transforming growth factor)- $\beta$  や細胞外基質のフィブロネクチン、好酸球遊走因子の eotaxin-1 と RANTES, 好中球遊走因子の IL-8, さらに IL-6 などの産生を亢進させた (図 15)<sup>25)</sup>。また、トロンピンと Xa 因子は培養鼻粘膜上皮細胞から、好酸球の成熟や生存に働く GM-CSF 産生を亢進させ、トロンピンは培養鼻粘膜上皮細胞からの IL-8, eotaxin-1, RANTES 産生も亢進させた<sup>27)</sup>。以上の結果、トロンピンや Xa 因子は線維芽細胞の PAR-1, PAR-2 受容体を

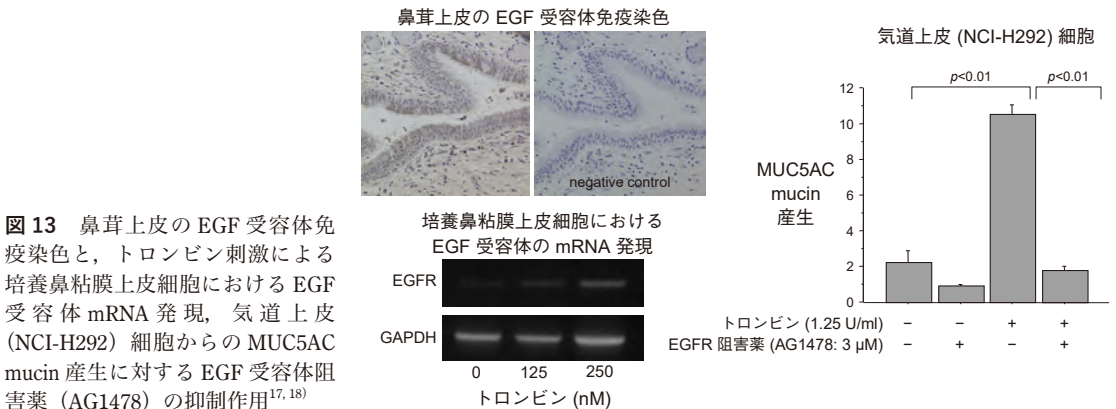


図 13 鼻茸上皮の EGF 受容体免疫染色と、トロンピン刺激による培養鼻粘膜上皮細胞における EGF 受容体 mRNA 発現、気道上皮 (NCI-H292) 細胞からの MUC5AC mucin 産生に対する EGF 受容体阻害薬 (AG1478) の抑制作用<sup>17, 18)</sup>

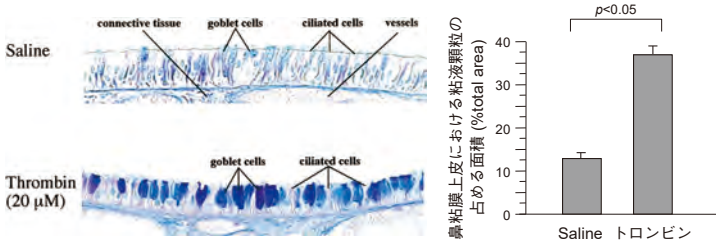


図14 トロンビン (20 μM) の3日間点鼻によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生と粘液産生<sup>17)</sup>

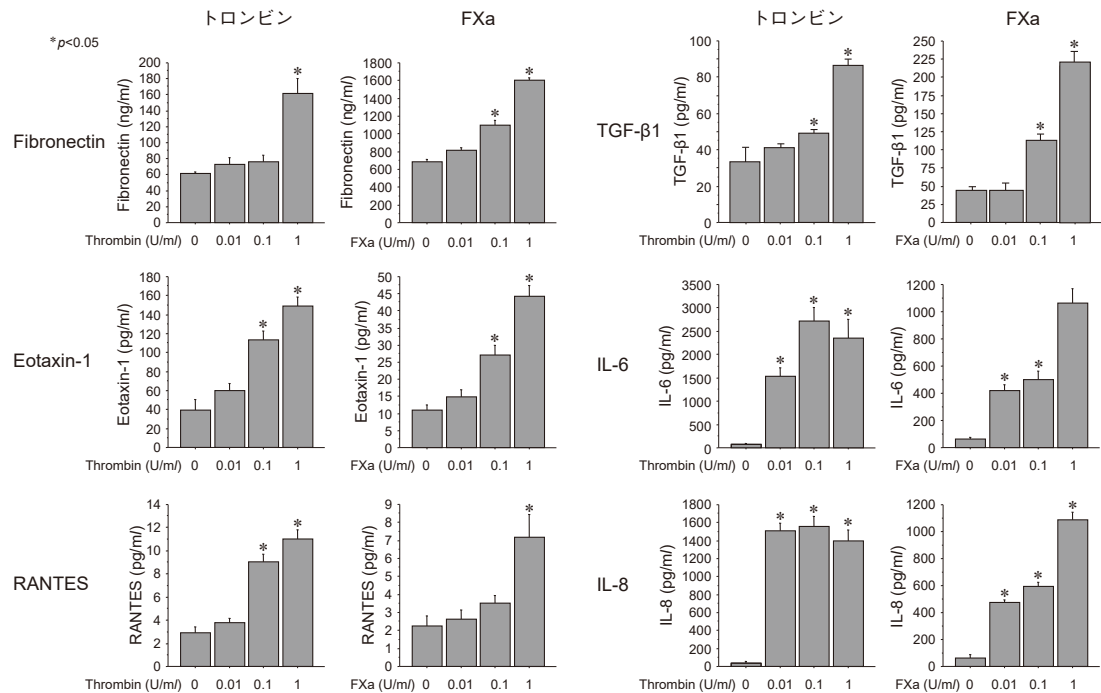


図15 トロンピンとXaによる鼻茸線維芽細胞からのフィブロネクチン, eotaxin-1, RANTESとTGF (transforming growth factor)-β, IL-6, IL-8の産生<sup>25)</sup>

介して、組織リモデリングにかかわる TGF-β やフィブロネクチン産生を亢進させるとともに、上皮細胞や線維芽細胞からの好酸球・好中球遊走因子産生などを介して、炎症細胞浸潤にもかかわっている。

酸球の表面における TF 活性を亢進させて、凝固系を活性化させる。血小板からはさまざまな炎症メディエーターが産生され、p-selectin の発現などを介して炎症細胞浸潤も促進される。一方、凝

### 3) 好酸球性鼻副鼻腔炎における凝固系の活性化と組織リモデリングの機序

鼻副鼻腔炎症と凝固線溶系には相互作用があり、炎症反応と凝固線溶反応は複雑に関連している<sup>5)</sup> (図16)。炎症が生じると血管透過性が亢進し、凝固線溶系因子が漏出して、組織因子 (TF) との接触で凝固系が活性化される。さらに TNF-α などの炎症メディエーターは鼻粘膜上皮細胞や好

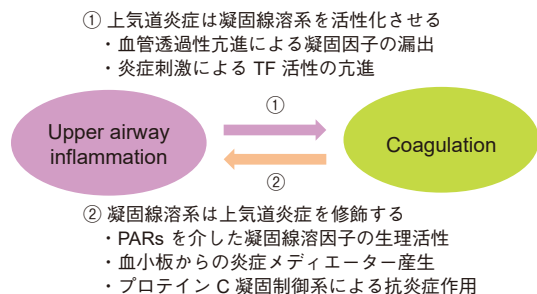


図16 上気道炎症と凝固線溶系の相互作用

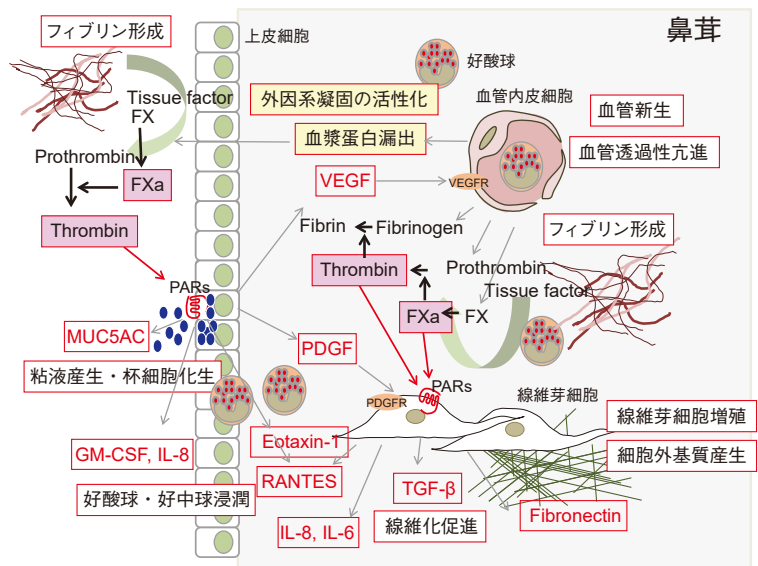


図 17 好酸球性鼻副鼻腔炎における凝固系の活性化と組織リモデリングの機序<sup>4,5)</sup>

固線溶系因子は PARs を介したさまざまな生理作用を介して炎症反応を修飾する。トロンピンによって活性化されるプロテイン C 凝固制御系では、活性化プロテイン C (APC) が特有の受容体 (EPCR) を介した抗炎症作用を有し、炎症の制御にもかかわっている。

図 17 に好酸球性鼻副鼻腔炎における凝固系の活性化と、上皮細胞や線維芽細胞を介した、トロンピンや Xa 因子による組織リモデリングについてまとめた<sup>4,5)</sup>。炎症が生じると血管透過性が亢進し血漿蛋白が漏出して、TF と凝固因子の作用で外因系凝固が活性化される。最終的には、漏出した血漿蛋白のプロトロンピンがトロンピンに変換され、トロンピンはフィブリン形成に作用するとともに、Xa 因子とも相まって、PARs 受容体を介して上皮細胞や線維芽細胞からのサイトカインやムチン、細胞外基質産生を引き起こす。その結果、PDGF による線維芽細胞増殖・細胞外基質産生、VEGF による血管新生・血管透過性亢進、TGF- $\beta$  による線維化促進、MUC5AC ムチンなどの粘液産生、IL-8 や eotaxin-1, RANTES, GM-CSF などによる好中球・好酸球浸潤などを経て、鼻茸形成や杯細胞化生などの組織リモデリングが生じる。

つまり、分泌された粘液と形成されたフィブリンの混合物が、好酸球性鼻副鼻腔炎に特徴的なニ

カワ様鼻汁の本態で、これが PDGF, VEGF, TGF- $\beta$  などの作用で基質化して、鼻茸が形成されるのではないだろうか。実際に、好酸球性鼻副鼻腔炎患者の術後経過を注意深く観察していると、はじめはニカワ様鼻汁に見えていた部分が、次第に基質化して鼻茸が形成される印象が得られる。

## 5. 凝固線溶系をターゲットにした新たな治療戦略

気道炎症における凝固線溶系因子の新たな役割が明らかになるとともに、凝固線溶系をターゲットとした新たな治療戦略の可能性が検討されている。とくに下気道においては、肺線維症モデルラットでトロンピン抑制薬が組織リモデリングを抑制し<sup>28)</sup>、喘息モデルマウスで PAI-1 抑制薬<sup>29,30)</sup> や u-PA<sup>31)</sup>、活性化プロテイン C (APC)<sup>32)</sup> が気道炎症を抑制すること、ヒトでの臨床研究においても、ヘパリンの吸入が喘息患者の気道炎症を改善させることなどが報告されている<sup>33,34)</sup>。

好酸球性鼻副鼻腔炎は、凝固線溶系の活性化がその病態に深くかわり、鼻茸形成などの著明な組織リモデリングを特徴とした難治性疾患である。現在、ステロイドの全身投与や高価な生物学製剤 (抗 IL-4 受容体  $\alpha$  鎖抗体) 以外に有効な薬

物療法がなく、新たな治療手段の開発が期待されている。われわれは凝固線溶系に注目して、抗凝固作用とともに多彩な抗炎症作用を有する、APCとヘパリンを利用した新たな局所療法の可能性について検討しているので紹介する。

### 1) 活性化プロテイン C (APC : activated protein C)

プロテイン C 凝固制御系は、トロンボモジュリンとトロンビンの結合がプロテイン C を活性化させ、活性化プロテイン C (APC) は Va 因子, VIIIa 因子を不活化させる抗凝固作用と、PAI-1 を不活化させる線溶亢進作用を有している。APC はプロテイン C 欠乏による血栓症の治療薬としてすでに臨床で薬剤として使用されている。さらに、抗凝固・線溶亢進作用以外に、内皮細胞の受容体 (EPCR : endothelial protein C receptor) と

PAR-1 を介して、さまざまな抗炎症作用を有する<sup>23)</sup>ことも明らかになり、気道炎症以外に脳障害、関節リウマチ、腎障害、脊髄損傷などにおける抗炎症作用や、臨床的にも敗血症に対する有効性が報告されている<sup>35)</sup>。

われわれは、正常気管支上皮細胞や鼻粘膜上皮細胞などの気道上皮細胞や THP-1 細胞 (単球由来細胞株) に EPCR が発現していることを確認し、トロンビン刺激による正常気管支上皮細胞からの PDGF 産生と、LPS 刺激による THP-1 細胞からの PDGF 産生は APC によって抑制された。この作用は抗 EPCR 抗体で消失したことから、APC の作用が EPCR を介していることが確認できる (図 18)<sup>9)</sup>。また、APC はトロンビン刺激や EGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激による正常気管支上皮細胞からの MUC5AC ムチン産生を抑制した (図 19)。APC の鼻腔内点鼻投与は、トロンビンの 3 日間

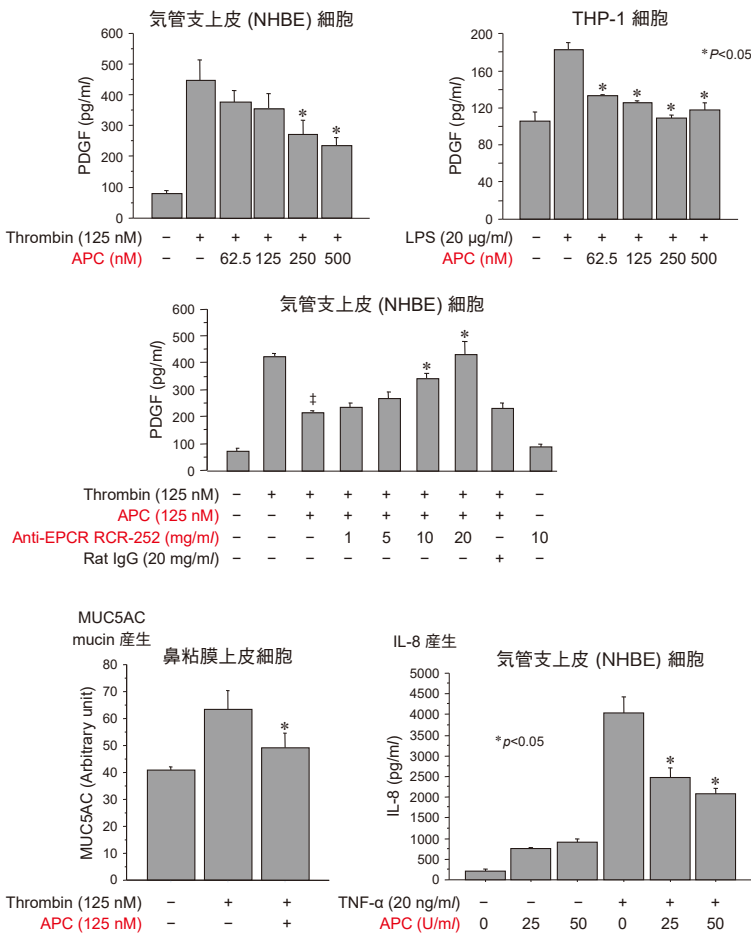


図 18 トロンビン刺激による正常気管支上皮細胞からの PDGF 産生と、LPS 刺激による THP-1 細胞 (単球由来細胞株) からの PDGF 産生に対する APC の抑制作用、さらに抗 EPCR (APC 受容体) 抗体による抑制の解除<sup>9)</sup>

図 19 トロンビン刺激による鼻粘膜上皮細胞からの MUC5AC mucin 産生と、TNF- $\alpha$  刺激による正常気管支上皮細胞からの IL-8 産生に対する APC の抑制作用<sup>17)</sup>

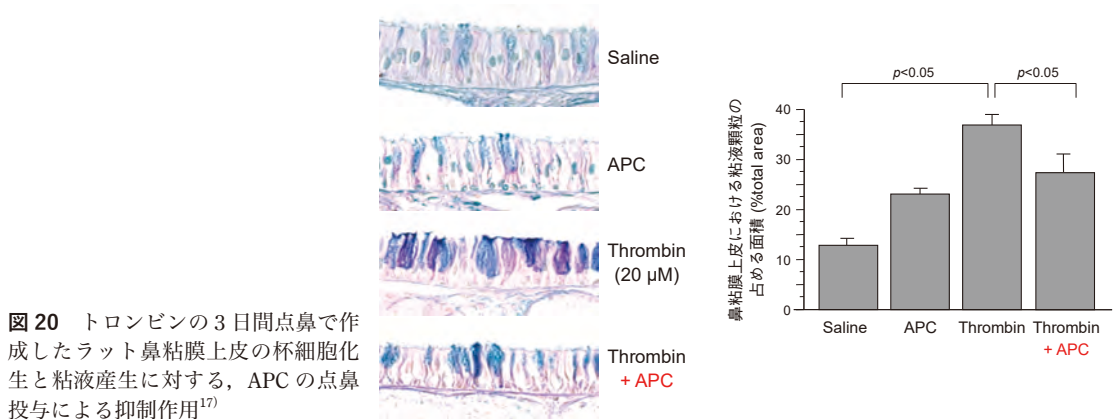


図20 トロンビンの3日間点鼻で作成したラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生と粘液産生に対する、APCの点鼻投与による抑制作用<sup>17)</sup>

点鼻刺激で作成したラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生と粘液産生を有意に抑制した(図20)<sup>17)</sup>。さらに、ブレオマイシンによるマウスの肺線維症モデルで、APCの気管内投与が気管支洗浄液中のPDGF, TNF- $\alpha$ , IL-6産生と肺における組織リモデリングを抑制し、抗EPCR抗体がその作用を解除した<sup>9)</sup>。このほか、APCにはEPCRを介して好中球や好酸球などの炎症細胞浸潤を抑制すること<sup>36, 37)</sup>、APCの吸入は喘息モデルマウスの好酸球浸潤やTh2サイトカイン産生、気道過敏性を抑制すること<sup>32)</sup>などが報告されている。

このように、APCには抗凝固作用と線溶促進作用による、トロンビン活性化抑制とフィブリン形成抑制とともに、EPCRを介して鼻粘膜上皮細胞からのサイトカイン産生や粘液産生を抑制する抗炎症作用があり、局所投与によって気道炎症と、鼻茸形成や杯細胞化生などの組織リモデリングを抑制できる可能性がある。すでに臨床で使用されている薬剤であることから、将来の局所投与薬としての応用が容易に期待できる。

## 2) ヘパリン

ヘパリンは臨床で広く使用される抗凝固薬で、アンチトロンビンに結合してトロンビンやXa因子などの凝固因子に対する不活化反応を飛躍的に促進させる。一方で、多くの生体内物質にヘパリン結合部位があり、多彩な抗炎症作用を有することが知られている<sup>38)</sup>。気道炎症に対しては、ヘパリンが喘息モデルやアレルギー性鼻炎モデル動物の気道炎症を抑制することが確認され<sup>39)~41)</sup>、臨

床的にもヘパリンの吸入が喘息患者の呼吸機能を改善させること、また、出血傾向などの副作用が認められないことが報告されている<sup>33, 34, 42)~44)</sup>。このほか、火傷や潰瘍性大腸炎、関節リウマチなどへの有効性も確認されている。

われわれは、未分画ヘパリンがTNF- $\alpha$ 刺激による培養気道上皮細胞(NCI-H292細胞)からのMUC5ACムチンとIL-8産生を濃度依存性に抑制すること(図21)、ヘパリンの点鼻投与が、LPS点鼻刺激によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生・粘液産生と好中球浸潤を抑制することを確認した(図22)<sup>45)</sup>。ヘパリンの作用機序についてはまだ不明な点が多いが、TNF- $\alpha$ 刺激による好酸球性(EoL-1)細胞からのIL-8産生には影響を与えなかったことから、その作用機序はTNF- $\alpha$ に対する中和作用ではなく、すでに報告されている転写因子NF $\kappa$ Bの抑制などを介していると考えられる<sup>45)</sup>。

低分子ヘパリンは未分画ヘパリンに比べて高価であるが、血漿蛋白や内皮細胞との結合が少なく、半減期が長く、出血などの副作用も少ないため、臨床応用がしやすい利点がある。われわれは、低分子ヘパリンにも未分画ヘパリンと同等の、*in vitro*での気道上皮細胞からのMUC5AC産生・IL-8産生抑制作用、*in vivo*でLPS刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生・好中球浸潤抑制作用があることを確認している<sup>45)</sup>。さらに、低分子ヘパリンの点鼻投与は、OVA(ovalbumin:卵白アルブミン)の腹腔内投与と点鼻投与で作成した、アレルギー性炎症モデルラットの鼻粘膜上皮にお

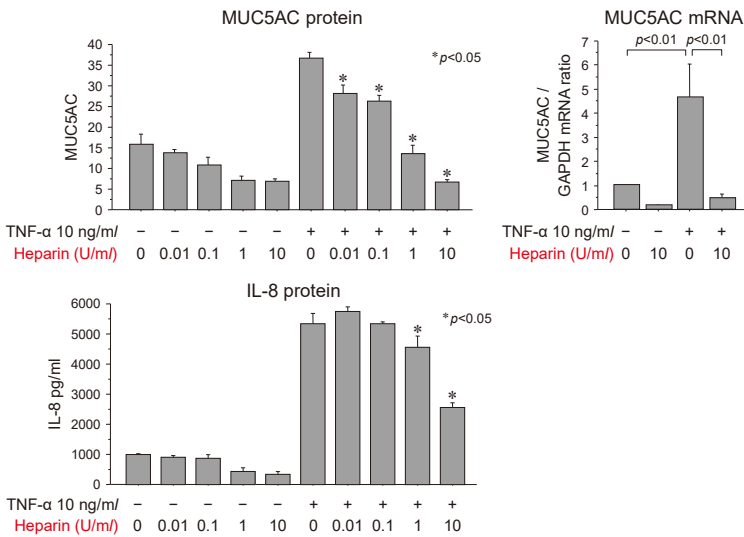


図 21 TNF-α 刺激による気道上皮 (NCI-H292) 細胞からの MUC5AC mucin 産生, MUC5AC mRNA 発現, IL-8 産生に対する未分画ヘパリンの抑制作用<sup>45)</sup>

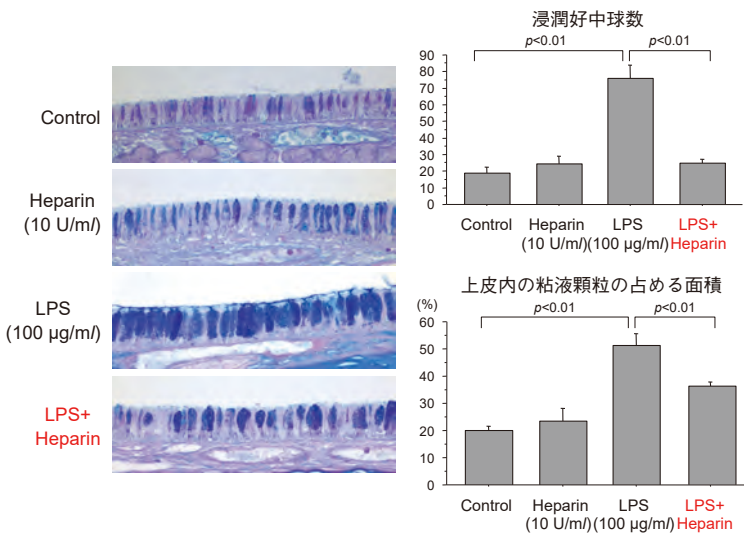


図 22 LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生, 粘液産生, 好中球浸潤に対する未分画ヘパリン点鼻投与の効果<sup>45)</sup>

る, 杯細胞化生・粘液産生と好酸球・好中球浸潤を濃度依存性に抑制した<sup>46)</sup>。

このように, ヘパリンには抗凝固作用によるフィブリン形成抑制とともに, 多彩な抗炎症作用

を有していて, 術前・術後の点鼻やネブライザーなどによる局所投与が, 難治性の好酸球性鼻副鼻腔炎に対する新たな治療手段になる可能性が考えられる。

## まとめ

疑問：ニカワ様鼻汁の本体は何か？

答え：好酸球性鼻副鼻腔炎では局所で凝固系が活性化していて, トロンビンなどの凝固因子がフィブリン形成に働くとともに, 上皮細胞や線維芽細胞のプロテアーゼ受容体 (PARs) を介した MUC5AC ムチン産生や PDGF, VEGF, TGF-β などのサイトカイン産生と細胞外基質 (フィブロネクチン) 産生により組織リモデリングが, IL-8, GM-

CSF, Eotaxin-1, RANTES 産生により炎症細胞浸潤が生じる。つまり、分泌された粘液と形成されたフィブリンの混合物がニカワ様鼻汁の本態で、これが PDGF, VEGF, TGF- $\beta$  などの作用で基質化して鼻茸が形成される。

活性化プロテイン C (APC) やヘパリンは、抗凝固作用とともに多彩な抗炎症作用を有し、局所投与によって気道炎症や組織リモデリングが抑制され、新たな局所治療薬としての可能性が考えられる。

## 文献

1. Ueki S, Melo RC, Ghiran I, et al. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood* 2013;121:2074-2083.
2. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-1535.
3. Ueki S, Konno Y, Takeda M, et al. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:258-267.
4. 清水猛史, 清水志乃. 鼻副鼻腔組織リモデリングにおける凝固線溶系因子の関わり. *血栓止血誌* 2017;28:603-611.
5. Shimizu T, Shimizu S. The coagulation system and rhinosinusitis. In: Celebi ÖÖ, Önerci TM, editors, *Nasal physiology and pathophysiology of nasal disorders*. Springer, Switzerland; 2023, p. 15-28.
6. Long AT, Kenne E, Jung R, et al. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost* 2016; 14:427-437.
7. Shimizu S, Ogawa T, Takezawa K, et al. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in nasal mucosa and nasal secretions of chronic rhinosinusitis with nasal polyp. *Am J Rhinol Allergy* 2015;29:235-242.
8. Adams M. Tissue factor pathway inhibitor: new insights into an old inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:129-134.
9. Shimizu S, Gabazza EC, Taguchi O, et al. Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1416-1426.
10. Suzuki K, Gabazza EC, Hayashi T, et al. Protective role of activated protein C in lung and airway remodeling. *Crit Care Med* 2004;32:S262-265.
11. Kim DY, Cho SH, Takabayashi T, et al. Chronic Rhinosinusitis and the Coagulation System. *Allergy Asthma Immunol Res* 2015;7:421-430.
12. de Boer JD, Majoor CJ, van 't Veer C, et al. Asthma and coagulation. *Blood* 2012;119:3236-3244.
13. Kotani I, Sato A, Hayakawa H, et al. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res* 1995;77: 493-504.
14. Günther A, Mosavi P, Ruppert C, et al. Enhanced tissue factor pathway activity and fibrin turnover in the alveolar compartment of patients with interstitial lung disease. *Thromb Haemost* 2000;83:853-860.
15. Gabazza EC, Taguchi O, Tamaki S, et al. Thrombin in the airways of asthmatic patients. *Lung* 1999;177:253-262.
16. Terada M, Kelly EA, Jarjour NN. Increased thrombin activity after allergen challenge: a potential link to airway remodeling? *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:373-377.
17. Shimizu S, Shimizu T, Morser J, et al. Role of the coagulation system in allergic inflammation in the upper airways. *Clin Immunol* 2008;129:365-371.
18. Shimizu S, Gabazza EC, Ogawa T, et al. Role of thrombin in chronic rhinosinusitis-associated tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy* 2011;25:7-11.
19. Ahmad S, Ahmad A, Rancourt RC, et al. Tissue factor signals airway epithelial basal cell survival via coagulation and protease-activated receptor isoforms 1 and 2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;48:94-104.
20. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:49-57.
21. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:584-592.e584.

22. Imoto Y, Kato A, Takabayashi T, et al. Increased thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144:1566-1574.e1566.
23. Danese S, Vetrano S, Zhang L, et al. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010;115:1121-1130.
24. Gabazza EC, Taguchi O, Kamada H, et al. Progress in the understanding of protease-activated receptors. *Int J Hematol* 2004;79:117-122.
25. Shimizu S, Tojima I, Takezawa K, et al. **Thrombin and activated coagulation factor X stimulate the release of cytokines and fibronectin from nasal polyp fibroblasts.** *Am J Rhinol Allergy* 2017;31:13-18.
26. Shimizu S, Gabazza EC, Hayashi T, et al. **Thrombin stimulates the expression of PDGF in lung epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L503-510.
27. Shimizu S, Takezawa-Yasuoka K, Ogawa T, et al. **The epidermal growth factor receptor inhibitor AG1478 inhibits eosinophilic inflammation in upper airways.** *Clin Immunol* 2018;188:1-6.
28. Howell DC, Goldsack NR, Marshall RP, et al. Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2001;159:1383-1395.
29. Tezuka T, Ogawa H, Azuma M, et al. IMD-4690, a novel specific inhibitor for plasminogen activator inhibitor-1, reduces allergic airway remodeling in a mouse model of chronic asthma via regulating angiogenesis and remodeling-related mediators. *PLoS One* 2015;10:e0121615.
30. Lee SH, Eren M, Vaughan DE, et al. A plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor reduces airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46:842-846.
31. Kuramoto E, Nishiuma T, Kobayashi K, et al. Inhalation of urokinase-type plasminogen activator reduces airway remodeling in a murine asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296:L337-346.
32. Yuda H, Adachi Y, Taguchi O, et al. Activated protein C inhibits bronchial hyperresponsiveness and Th2 cytokine expression in mice. *Blood* 2004;103:2196-2204.
33. Ahmed T, Garrigo J, Danta I. Preventing bronchoconstriction in exercise-induced asthma with inhaled heparin. *N Engl J Med* 1993;329:90-95.
34. Ahmed T, Gonzalez BJ, Danta I. Prevention of exercise-induced bronchoconstriction by inhaled low-molecular-weight heparin. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:576-581.
35. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
36. Sturn DH, Kaneider NC, Feistritz C, et al. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood* 2003;102:1499-1505.
37. Feistritz C, Sturn DH, Kaneider NC, et al. Endothelial protein C receptor-dependent inhibition of human eosinophil chemotaxis by protein C. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:375-381.
38. Lever R, Page CP. Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:140-148.
39. Suchankova J, Mata M, Cortijo J, et al. Effects of bemparin on airway responses to antigen in sensitized Brown-Norway rats. *Eur J Pharmacol* 2005;507:261-271.
40. Ahmed T, Ungo J, Zhou M, et al. Inhibition of allergic late airway responses by inhaled heparin-derived oligosaccharides. *J Appl Physiol* (1985) 2000;88:1721-1729.
41. Al Suleimani YM, Dong Y, Walker MJ. Differential responses to various classes of drugs in a model of allergic rhinitis in guinea pigs. *Pulm Pharmacol Ther* 2008;21:340-348.
42. Diamant Z, Timmers MC, van der Veen H, et al. Effect of inhaled heparin on allergen-induced early and late asthmatic responses in patients with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1790-1795.
43. Bendstrup KE, Jensen JL. Inhaled heparin is effective in exacerbations of asthma. *Respir Med* 2000;94:174-175.
44. Bendstrup KE, Gram J, Jensen JL. Effect of inhaled heparin on lung function and coagulation in healthy volunteers. *Eur Respir J* 2002;19:606-610.
45. Ogawa T, Shimizu S, Tojima I, et al. **Heparin inhibits mucus hypersecretion in airway epithelial cells.** *Am J Rhinol Allergy* 2011;25:69-74.
46. Ogawa T, Shimizu S, Shimizu T. **The effect of heparin on antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats.** *Allergol Int* 2013;62:77-83.



### III 好酸球は病態形成にどうかかわるか？

#### —好酸球と組織構成細胞の相互作用—

#### 1. 好酸球性鼻副鼻腔炎における好酸球浸潤

##### 1) 気道炎症における好酸球の役割

好酸球は、ほとんどが気道、腸管などの組織内に存在し、微生物や寄生虫感染に対する防御機構の主役として働いている。含有する4種類の顆粒蛋白、すなわちMBP (major basic protein)、ECP (eosinophil cationic protein)、EDN (eosinophil-derived neurotoxin)、EPO (eosinophil peroxidase) や、産生される活性酸素には強い細胞傷害性があり、微生物や寄生虫を退治する。気道のアレルギー性炎症においても多数の好酸球浸潤が認められ、こうした顆粒蛋白や活性酸素は、気道上皮細胞傷害と知覚神経刺激をもたらし、気道過敏性を亢進させると推測される。

好酸球は、ロイコトリエン (LT) やプロスタグランジン (PG)、PAF (platelet-activating factor) などの脂質メディエーターの主要な産生細胞であるとともに、IL-4、IL-5、IL-13などの2型サイトカインを産生し、アレルギー性炎症を増悪させる。とくに、脂質メディエーターを介して血管透過性の亢進、気道分泌、気道平滑筋の収縮などを惹起し、気道過敏性を亢進させる。また、好酸球はTGF (transforming growth factor)- $\beta$ の主要な産生細胞で、TGF- $\beta$ の有する抗炎症作用や免疫抑制作用による炎症の収束にもかかわっている。一方で、TGF- $\beta$ には平滑筋や線維芽細胞の増殖刺激、細胞外マトリックス産生亢進作用などがあり、非可逆的組織変化である気道リモデリング(平滑筋・線維芽細胞増殖、杯細胞化生、基底膜肥厚など)を引き起こす。このように、好酸球はアレルギー性炎症において、組織傷害と炎症の促進、炎症の鎮静化と組織リモデリング、免疫調節などさまざまな作用で病態形成にかかわる<sup>1)</sup>。

##### 2) 好酸球性鼻副鼻腔炎における好酸球の役割

好酸球性鼻副鼻腔炎においては、鼻汁や鼻粘膜組織中に著明な好酸球浸潤が認められる。JESREC スタディによると、顕微鏡400倍視野において、1視野あたりの組織中好酸球数が70個以上あると、手術後の鼻茸再発率が高いことから、好酸球性鼻副鼻腔炎の確定診断として組織中好酸球数が70個以上であることを規定している<sup>2)</sup>。つまり、組織中の好酸球数が難治性の指標になり、好酸球が鼻茸形成などの難治病態にかかわっていると推測される。

実際に、好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻粘膜や鼻茸では、好酸球の遊走や活性化にかかわるRANTESやeotaxin、IL-5が増加し、好酸球の接着にかかわるVCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) 発現が亢進し、好酸球の顆粒蛋白であるMBPやECPが増加し、さらに好酸球から産生されるシステニルロイコトリエン (cysLTs: leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>) などが多く含まれる<sup>3,4)</sup>。しかしながら、こうした所見は著明な好酸球浸潤があれば必ず伴う、いわばあたりまえの現象である。好酸球集積の原因や、好酸球が難治性炎症にどのようにかかわっているかなど、その病因や病態についてはほとんど解明されていない。

われわれは、

#### 「好酸球と鼻粘膜構成細胞の相互作用が病態形成にかかわっているのではないか？」

との仮説をもとに研究をすすめてきた。とくに、好酸球と鼻粘膜上皮細胞の相互作用、さらに、好酸球と鼻茸線維芽細胞との相互作用に注目し、好酸球と気道上皮細胞、あるいは好酸球と鼻茸線維芽細胞を共培養する方法で、上皮細胞や線維芽細胞からのPDGF、VEGF、TGF- $\beta$ 、IL-8などのサイトカイン産生やMUC5ACムチン産生に対する

作用を明らかにした。本項では、好酸球と鼻粘膜構成細胞の相互作用の分子機序と、相互作用の制御をターゲットとした新たな治療戦略について、われわれの研究結果を中心に概説する。

## 2. 好酸球と気道上皮細胞の相互作用とEGF受容体のtransactivation

### 1) 好酸球と気道上皮細胞の共培養

図1に示すように、気道上皮系細胞株のNCI-H292細胞に、好酸球性細胞株のEoL-1細胞あるいは末梢血好酸球を加えて共培養し、MUC5AC

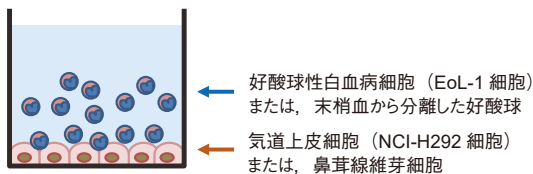
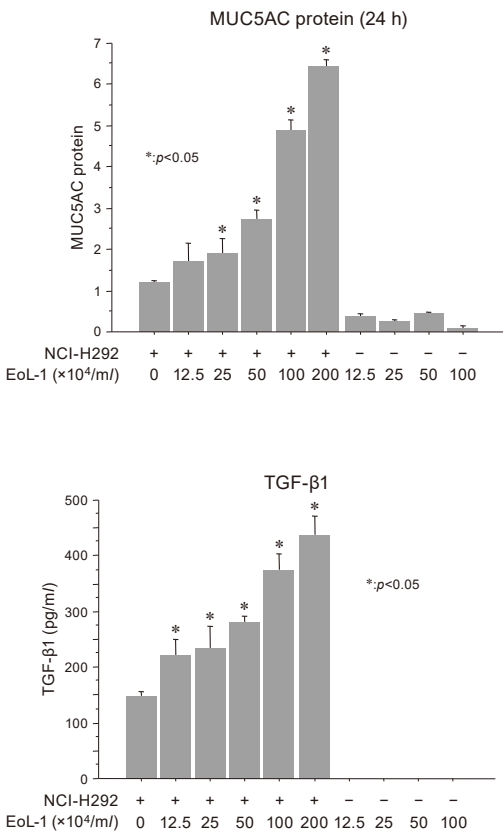


図1 気道上皮細胞や鼻茸線維芽細胞と好酸球性細胞株 (EoL-1) や末梢血好酸球との共培養<sup>3)</sup>



ムチンとサイトカイン産生について検討した。その結果、加えたEoL-1細胞数に依存して、MUC5ACムチン産生と(図2)、TGF-β, VEGF, PDGF, IL-8産生が著しく増加することを見出した(図3)。さらに、末梢血から分離した好酸球を加えても同様の作用が認められた。

こうした相互作用によるMUC5ACムチン産生は、ナイロンメッシュのフィルターを用いて上皮細胞と好酸球の接着を遮っても認められたが、好酸球の培養上清を加えただけでは認められなかった(図4)<sup>5)</sup>。このことから、細胞が接着していなくても相互作用が認められるが、上清のみの添加では認められず、上皮細胞と好酸球が互いに刺激しあう相互作用が重要であると考えられた。

このように、組織に浸潤した好酸球は上皮細胞との相互作用を介して、MUC5ACムチンやPDGF, VEGF, TGF-β産生を誘導し、杯細胞化生や鼻茸形成など、好酸球性鼻副鼻腔炎に特徴的な組織リモデリングが生じること、さらに、IL-8

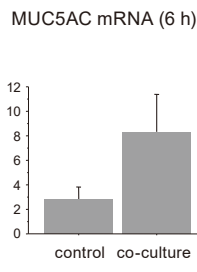


図2 気道上皮 (NCI-H292) 細胞と好酸球性細胞株 (EoL-1) の共培養による MUC5AC ムチン産生<sup>5)</sup>

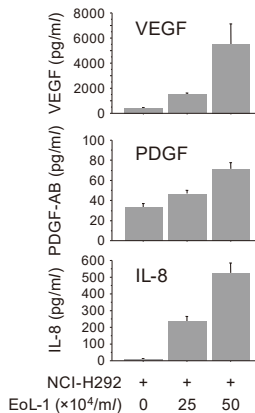


図3 気道上皮 (NCI-H292) 細胞と好酸球性細胞株 (EoL-1) の共培養による TGF-β1, VEGF, PDGF, IL-8 産生<sup>5)</sup>

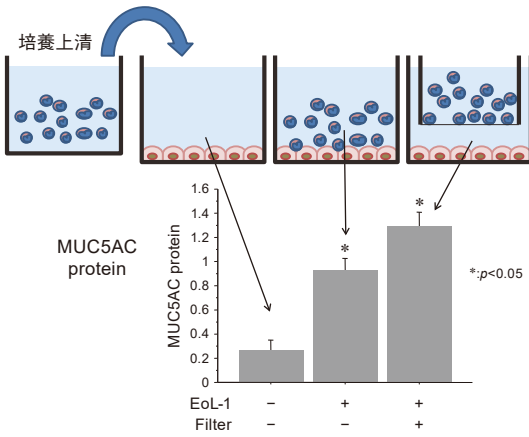


図4 好酸球の培養上清を上皮細胞に加えても MUC5AC ムチン産生は生じないが、ナイロンメッシュで上皮細胞と好酸球の接着を防止しても MUC5AC ムチン産生が生じた<sup>5)</sup>。

による炎症細胞浸潤も惹起し、好酸球が病態形成に深くかかわることが明らかになった。

## 2) 相互作用における EGF 受容体の関与

次に、相互作用の機序を明らかにする目的で、MUC5AC ムチンの産生機序について詳細に検討した。MUC5AC ムチンの産生には、タバコ刺激、LPS や細菌由来物質による刺激、好中球エラストラーゼによる刺激のほか、IL-1 $\beta$ 、IL-13、TNF- $\alpha$  と EGF 受容体のリガンドがかかわることが知られている<sup>6)</sup>。共培養の状態では、タバコや細菌由来物質、好中球などはかかわらないので、最初に IL-1 $\beta$ 、IL-13、TNF- $\alpha$  の関与について検討したが、

共培養を行ってもこうしたサイトカインは産生されず、それぞれに対する中和抗体を加えても、共培養による MUC5AC ムチン産生は抑制されなかった。そこで、残された EGF 受容体の関与について検討すると、EGF 受容体阻害薬 (AG1478) は共培養による MUC5AC ムチン産生を抑制した (図5)。さらに、共培養による PDGF、VEGF、IL-8 産生も抑制されたが、TGF- $\beta$  産生は影響を受けなかった (図6)<sup>5)</sup>。

EGF 受容体のリガンドについて検討したところ、共培養により添加した EoL-1 細胞数に依存して amphiregulin の産生が増加し、その中和抗体は共培養による MUC5AC ムチン産生を抑制した。また、TGF- $\alpha$  は培養液中への産生は認められなかったが、その中和抗体が共培養による MUC5AC ムチン産生を抑制した<sup>5)</sup>。共培養によって上皮細胞から産生された amphiregulin と TGF- $\alpha$  が、EGF 受容体を介してムチン産生やサイトカイン産生にかかわっていると考えられる。

## 3) EGF 受容体の transactivation

Amphiregulin や TGF- $\alpha$  などの EGF 受容体のリガンドは、通常は細胞膜に結合したプロリガンドの状態が存在し、ADAMs (a disintegrin and metalloprotease) と呼ばれるメタロプロテアーゼ活性を有する膜結合蛋白によって切り出される shedding 機構によって、フリーのリガンドとして EGF 受容体に作用する。メタロプロテアーゼ阻害薬 (GM6001) は濃度依存性に共培養による

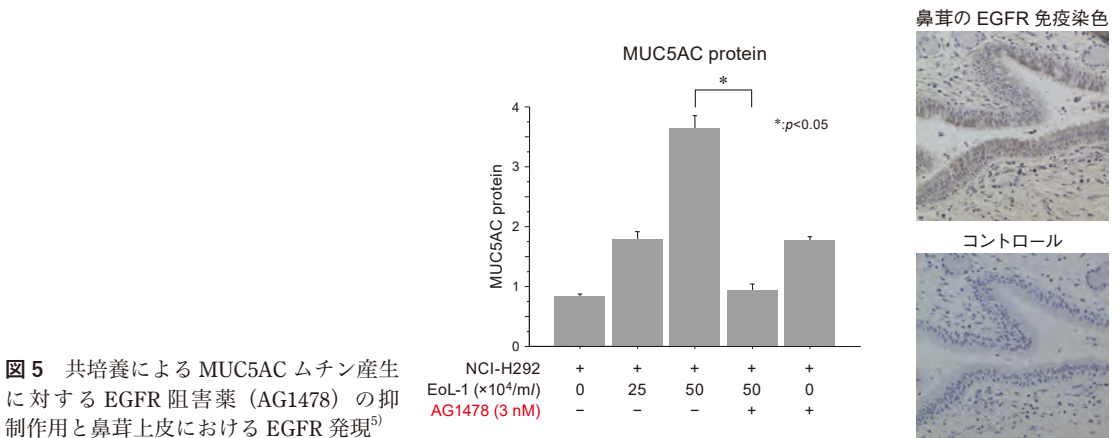


図5 共培養による MUC5AC ムチン産生に対する EGFR 阻害薬 (AG1478) の抑制作用と鼻茸上皮における EGFR 発現<sup>5)</sup>

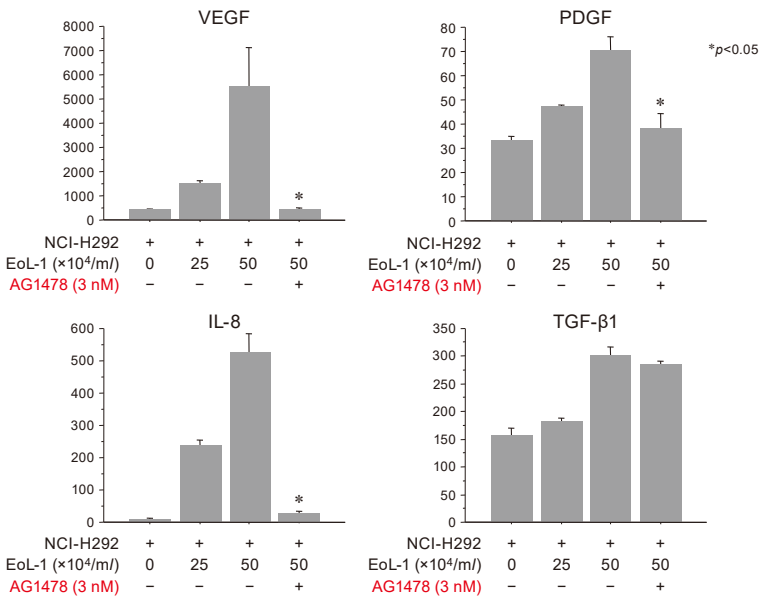


図6 共培養による VEGF, PDGF, IL-8, TGF-β 産生に対する EGFR 阻害薬 (AG1478) の抑制作用<sup>5)</sup>

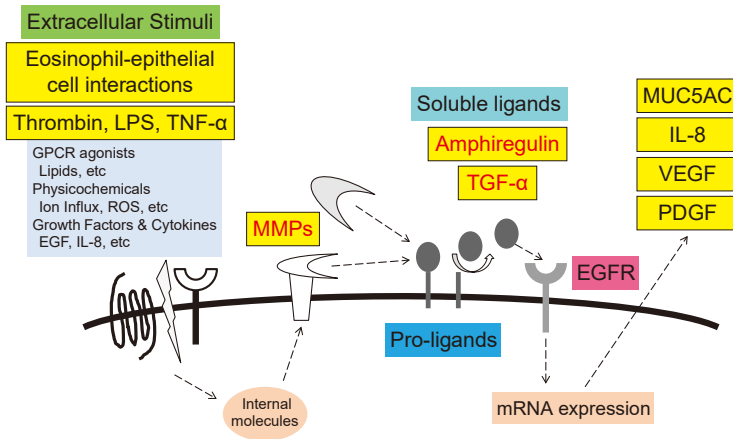


図7 共培養による EGF 受容体の transactivation 機序<sup>3)</sup>.

MMPs : matrix metalloproteinases

amphiregulin 産生と MUC5AC ムチン産生を抑制したこと<sup>5)</sup>から、ADAMs による amphiregulin と TGF-α の shedding 機構を介した EGF 受容体の transactivation が相互作用に重要であると考えられる (図7)。一方で、相互作用による TGF-β 産生は、EGF 受容体阻害薬の影響を受けないことから、異なった機序がかかわっている可能性がある。

EGF 受容体は、リガンドである EGF や amphiregulin, TGF-α などを介して、細胞増殖や遊走、血管新生、細胞分化・生存など、さまざまな生理作用にかかわっている<sup>7)</sup>。こうした、EGF 受容体を介したシグナル経路には、ロイコトリエンなどの脂質メディエーターや TLR (toll-like receptor) のリガンド、活性酸素などの細胞外刺

激によって上方調節を受けている<sup>8)~10)</sup>。たとえば、アレルゲンやウイルス、好中球エラスターゼ、タバコなどの刺激による気道上皮細胞からの MUC5AC ムチン産生は、いずれも EGF 受容体阻害薬で抑制される<sup>11)</sup>。われわれは、こうした EGF 受容体の transactivation が、好酸球との共培養以外に、LPS 刺激や TNF-α 刺激、トロニンと PAR-1 受容体などによる、気道上皮細胞からの MUC5AC ムチン産生にもかかわっていることを確認している<sup>12, 13)</sup>。また、EGF 受容体はアレルギー性鼻炎、鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎、気管支喘息の気道上皮でその発現が亢進している<sup>14)~16)</sup>。このように、気道炎症において、EGF 受容体は多くの刺激物質に共通した作用部位で

ある可能性がある。そこで、EGF 受容体をターゲットとした新たな治療戦略の可能性について検討した。

### 3. EGF 受容体阻害薬を利用した治療戦略

下気道においては、EGF 受容体阻害薬がラットあるいはマウスのアレルギー炎症を抑制し、杯細胞化生や好酸球・好中球浸潤が抑制されることが報告されている<sup>17, 18)</sup>。しかし、鼻副鼻腔における作用や、アレルギー性炎症以外の刺激については検討されていない。そこで、鼻副鼻腔炎症における EGF 受容体の役割を明らかにし、EGF 受容体を標的とした新たな局所治療薬の可能性を検討することを目的として、培養気道上皮細胞からのサイトカイン・MUC5AC ムチン産生や、LPS 点鼻刺激や OVA (ovalbumin) の感作・点鼻刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルにおける、EGF 受容体阻害薬 (AG1478) の作用を検討した。

#### 1) 培養気道上皮細胞からの MUC5AC ムチン、サイトカイン産生

LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) や TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) は NCI-H292 細胞からの MUC5AC ムチンと IL-8 の産生と mRNA 発現を誘導するが、EGF 受容体阻害薬 (AG1478) は濃度依存性にこれを抑制した<sup>13)</sup>。さらに、トロンビン (1 U/ml) は培養鼻粘膜上皮細胞からの GM-CSF や eotaxin-1, RANTES の産生を誘導するが、EGF 受容体阻害薬 (AG1478) はこの作用を濃度依存性に抑制した<sup>19)</sup>。つまり、AG1478 は気道上皮細胞と好酸球の共培養による、MUC5AC ムチン産生や IL-8 産生、PGDF, VEGF 産生だけでなく、LPS や TNF- $\alpha$  刺激、トロンビン刺激による MUC5AC ムチン産生や IL-8 産生、さらにトロンビン刺激による、好酸球の遊走や生存にかかわる GM-CSF, eotaxin-1, RANTES 産生も抑制した。そこで、LPS 刺激やアレルギー性炎症における、ラット鼻粘膜上皮の粘液産生や好中球・好酸球浸潤に対する EGF 受容体阻害薬の作用について検討した。

#### 2) LPS 刺激とアレルギー性炎症におけるラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデル

LPS (0.1 mg/0.1 ml) を 3 日間連続して点鼻投与すると、ラット鼻粘膜上皮に杯細胞化生・粘液産生と好中球浸潤が生じる。この変化は LPS 点鼻投与の 1 時間前に EGF 受容体阻害薬 (AG1478, 1 ~ 10 mg/kg) を腹腔内投与することで濃度依存性に抑制された (図 8)<sup>13)</sup>。また、卵白アルブミン (OVA : ovalbumin) の腹腔内感作と、3 日間の点鼻投与で作成したアレルギー炎症モデルにおいても、AG1478 の腹腔内投与によって、ラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生、粘液産生、好中球・好酸球浸潤が濃度依存性に抑制された (図 9)<sup>19)</sup>。

ゲフィチニブやエルロチニブなど、主として肺がんに対する治療薬として臨床で使用される EGF 受容体阻害薬は、しばしば皮膚粘膜傷害、胃腸障害、間質性肺炎、急性肺障害などの副作用を生じる。そこで、われわれはより副作用が少ない、EGF 受容体阻害薬 (AG1478) の局所点鼻投与の効果についても検討した。LPS 刺激あるいはアレルギー性炎症のラットモデルで、LPS あるいは OVA を点鼻した 1 時間後に AG1478 を点鼻投与したところ、杯細胞化生、粘液産生、好中球・好酸球浸潤が抑制され、その効果は腹腔内投与と同等であった<sup>13, 19)</sup>。

以上の結果、気道上皮細胞と好酸球の相互作用やトロンビン刺激、LPS 刺激や TNF- $\alpha$  刺激、アレルギー性炎症など、多くの炎症性刺激に EGF 受容体がかかわり、EGF 受容体阻害薬に、好酸球性鼻副鼻腔炎などの難治性気道疾患に対する新たな局所治療薬としての可能性が考えられた。

### 4. 好酸球と鼻茸線維芽細胞の相互作用とエクソソームの役割

#### 1) 細胞外小胞 (エクソソーム) による細胞間情報伝達

これまでの検討で、好酸球と気道上皮細胞の相互作用に、ADAMs による amphiregulin と TGF- $\alpha$  の shedding 機構を介した EGF 受容体の transactivation がかわること、さらに、好酸球と上皮細胞が互いに刺激しあう相互作用が重要であること

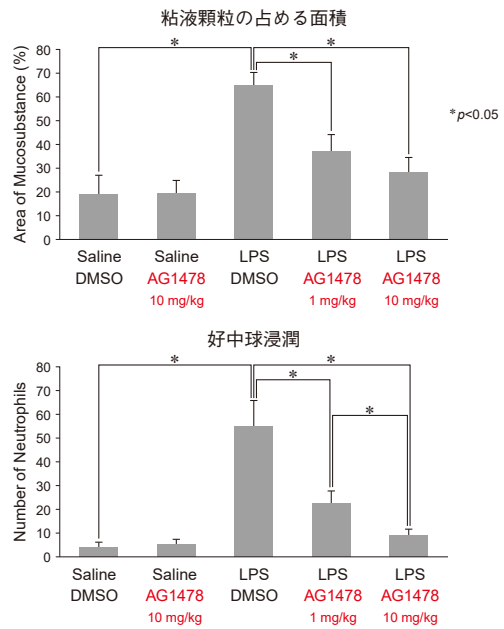
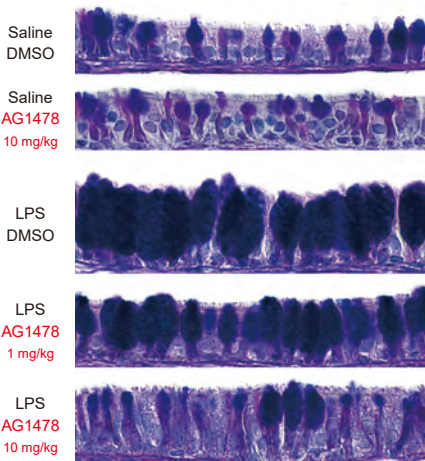


図8 LPS刺激によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生，粘液産生，好中球浸潤に対するEGFR阻害薬（AG1478）腹腔内投与の抑制作用<sup>13)</sup>

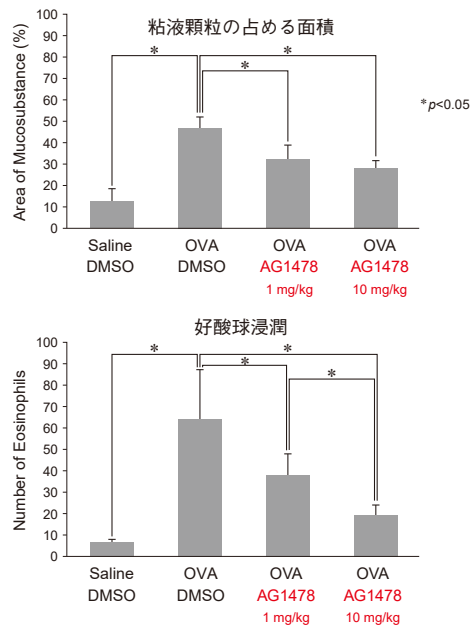
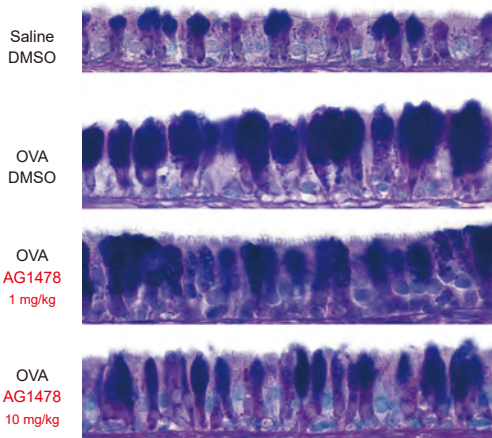


図9 OVAの腹腔内感作と点鼻投与で作成したアレルギー性炎症のラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生，粘液産生，好酸球浸潤に対するEGFR阻害薬（AG1478）腹腔内投与の抑制作用<sup>19)</sup>

を明らかにした。

さらに、

「細胞間相互作用がどのようにしてADAMsの活性化を引き起こすか？」

についても検討したが、その過程で蛋白・脂質な

どの液性因子や、細胞の接触では説明できない新たな細胞間情報伝達機構がある可能性が考えられた。

エクソソームを含む細胞外小胞は50～1,000 nmの粒子径を有する微小な膜小胞体で、

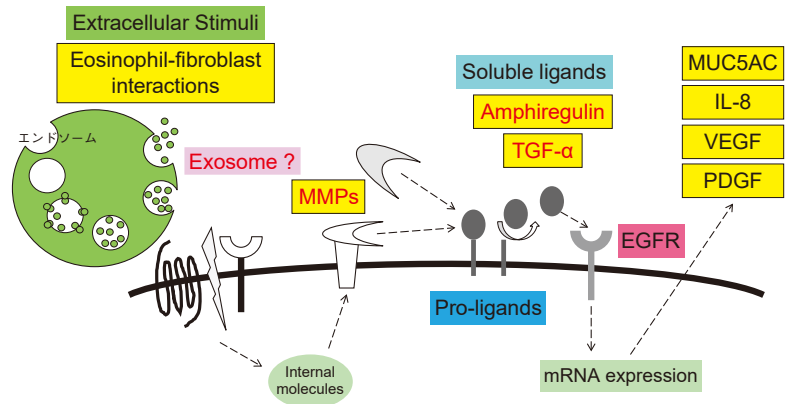


図10 エクソソームを介した細胞間相互作用

細胞の活性化やアポトーシスの誘導によりさまざまな細胞から放出され、生体の恒常性維持や病態にかかわっている。細胞外小胞は、細胞膜表面から出芽・放出されるマイクロベシクルと、エンドソームの内側に出芽した膜小胞を含む多胞性エンドソームが細胞膜と融合して放出されるエクソソームに分けられる。エクソソームは直径30～150 nmの細胞外小胞で、由来細胞の蛋白、脂質、mRNA、miRNA、代謝産物などを含有して、細胞間あるいは組織間の情報伝達を担っている(図10)。エクソソームは血液だけでなく、脳脊髄液、唾液、尿、関節液、気管支肺胞洗浄液などさまざまな体液中に放出されている。鼻腔洗浄液中にもエクソソームが存在し<sup>20, 21)</sup>、われわれは鼻腔洗浄液中のエクソソームを単離精製したが、ナノサイト解析による粒子径の平均は $153 \pm 3.3$  nmであった。さらに、由来蛋白のプロテオソーム解析により、数百種類の蛋白を検出している。

そこで、好酸球と気道上皮細胞の相互作用にエクソソームがかかわっている可能性について検討した。気道上皮細胞として利用したNCI-H292細胞などの細胞株は多量のエクソソームを放出するため、より生体環境に近い細胞として、好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸から分離した線維芽細胞を利用して好酸球との共培養を行った。

## 2) 好酸球と鼻茸線維芽細胞の共培養によるVEGF産生

分離した鼻茸線維芽細胞と末梢血好酸球を24時間共培養すると、好酸球はほとんどエクソソ

ームやVEGFを産生しないが、共培養によりエクソソーム産生とVEGF産生が増加した。鼻茸線維芽細胞と好酸球性細胞株(EoL-1細胞)の共培養でも、エクソソームとVEGF産生が増加し(図11)、共培養を開始した3時間後の比較的早期からエクソソームとVEGF産生が増加することも確認できた<sup>22)</sup>。

鼻茸線維芽細胞から放出される細胞外小胞を超遠心法で回収し、ナノサイト解析による粒子径と粒子濃度解析、さらに走査電子顕微鏡でその形態を確認し、その形態がエクソソームに類似していることを確認した。この細胞外小胞(エクソソーム濃度25 pg/ml)をEoL-1細胞に加えるとVEGF産生が認められたが、鼻茸線維芽細胞からのVEGF産生には影響を与えなかった(図12)<sup>22)</sup>。下気道においては、喘息患者由来の気管支線維芽細胞由来のエクソソームが気管支上皮細胞の増殖を促進することも報告され<sup>23)</sup>、線維芽細胞由来のエクソソームが気道炎症における組織リモデリングにかかわっていると考えられる。

## 3) エクソソーム阻害薬による相互作用の抑制

鼻茸由来線維芽細胞を、エクソソーム阻害薬で18時間前処理してから、EoL-1細胞との共培養によるエクソソームとVEGF産生について検討した。エクソソーム産生阻害薬GW4869(10 μM)とエクソソーム分泌阻害薬DMA(5-(N,N-dimethyl)amiloride hydrochloride)(10 μg/ml)は、いずれも共培養によるエクソソーム産生とVEGF産生

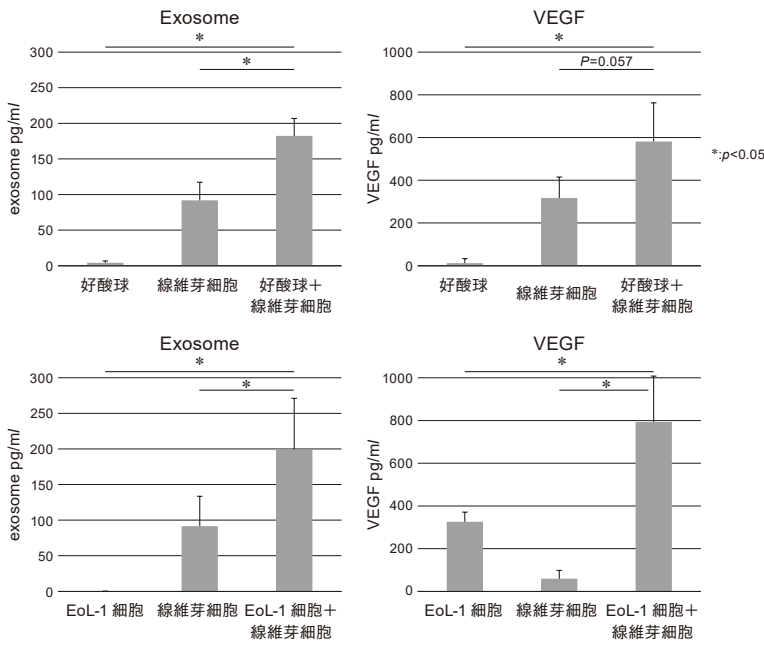


図11 鼻茸線維芽細胞と好酸球,あるいは鼻茸線維芽細胞とEoL-1細胞の共培養によるエクソソームとVEGF産生<sup>22)</sup>

鼻茸線維芽細胞由来のエクソソーム

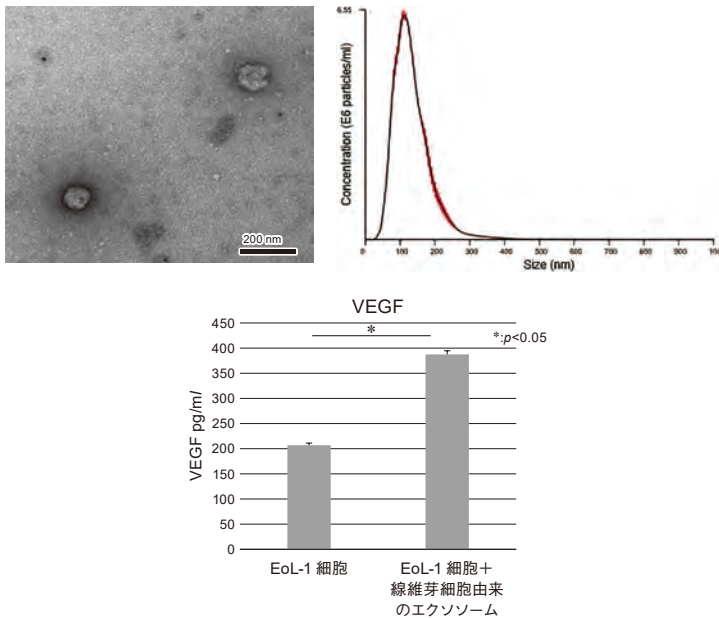


図12 鼻茸線維芽細胞由来のエクソソームとエクソソーム刺激によるEoL-1細胞からのVEGF産生<sup>22)</sup>

を抑制した (図13)<sup>22)</sup>。以上の結果,好酸球と鼻茸線維芽細胞の共培養によるVEGF産生に,新たな細胞間情報伝達物質であるエクソソームがかかわり,エクソソームの制御が新たな治療標的になる可能性が明らかになった。

一方,好酸球もエクソソームを放出することが知られていて,喘息患者の好酸球由来のエクソ

ソームは,平滑筋増殖や上皮細胞のアポトーシス,好酸球自体の遊走・接着を亢進させる<sup>24, 25)</sup>。今回の検討では,共培養によるエクソソーム産生増加が,線維芽細胞由来なのか好酸球由来なのか判断することができなかった。また,使用できる細胞数に制限があり,末梢血好酸球数(100,000/ml)はEoL-1細胞(1,000,000/ml)に比べて1/10の濃



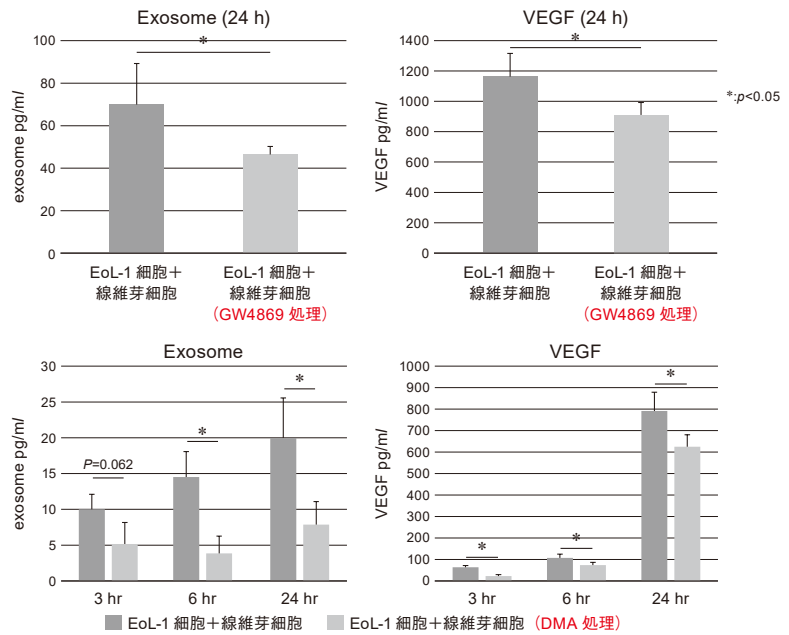


図 13 鼻茸線維芽細胞をエクソソーム産生阻害薬 (GW4869) あるいはエクソソーム分泌阻害薬 (DMA) で前処理した場合の、EoL-1 細胞との共培養によるエクソソームと VEGF 産生<sup>22)</sup>

度で共培養に使用した。線維芽細胞だけでなく好酸球由来のエクソソームが病態形成にかかわっている可能性も高く、今後の検討課題である。さらに、低酸素や小胞体ストレスなど、細胞にかかる

さまざまなストレスがエクソソーム放出にかかわることが報告されているが<sup>23)</sup>、エクソソーム産生・放出の機序については不明の点が多く、この領域での研究の発展が期待できる。

まとめ

疑問：好酸球は病態形成にどうかかわるか？

答え：好酸球と組織構成細胞（気道上皮細胞や線維芽細胞）の相互作用により、MUC5AC ムチン産生や PDGF, VEGF, TGF-β, IL-8 などのサイトカイン産生が生じ、粘液産生や炎症細胞浸潤と、杯細胞化生、鼻茸形成などの組織リモデリングが誘導される。

好酸球と気道上皮細胞の相互作用には、ADAMs による amphiregulin と TGF-α の shedding 機構を介した EGF 受容体の transactivation がかわり、EGF 受容体阻害薬は気道炎症や組織リモデリングを抑制し、新たな局所治療薬としての可能性が考えられる。さらに、好酸球と線維芽細胞の相互作用には、エクソソームを介した細胞間情報伝達が重要で、今後の研究の発展に期待したい。

文献

1. 清水猛史. 慢性炎症の概念と病態 炎症担当細胞の役割. *JOHNS* 2011;27:1729-1733.
2. Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy* 2015;70: 995-1003.
3. 清水猛史. 好酸球性副鼻腔炎の疑問 ニカワ様鼻

汁の本態は何か？好酸球は何をしているのか？耳鼻臨床 2012;105:803-812.

4. 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.
5. Shimizu S, Kouzaki H, Ogawa T, et al. Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate

- the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling. Am J Rhinol Allergy 2014;28:103-109.**
6. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 2009;135:505-512.
  7. Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, et al. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci* 2008;99:214-220.
  8. McGovern T, Risse PA, Tsuchiya K, et al. LTD<sub>4</sub> induces HB-EGF-dependent CXCL8 release through EGFR activation in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299:L808-815.
  9. Takeyama K, Dabbagh K, Jeong Shim J, et al. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol* 2000;164:1546-1552.
  10. Koff JL, Shao MX, Ueki IF, et al. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L1068-1075.
  11. Burgel PR, Escudier E, Coste A, et al. Relation of epidermal growth factor receptor expression to goblet cell hyperplasia in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:705-712.
  12. Shimizu S, Shimizu T, Morser J, et al. Role of the coagulation system in allergic inflammation in the upper airways. *Clin Immunol* 2008;129:365-371.
  13. Takezawa K, Ogawa T, Shimizu S, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitor AG1478 inhibits mucus hypersecretion in airway epithelium. *Am J Rhinol Allergy* 2016;30:1-6.
  14. Matovinovic E, Solberg O, Shusterman D. Epidermal growth factor receptor—but not histamine receptor—is upregulated in seasonal allergic rhinitis. *Allergy* 2003;58:472-475.
  15. Polosa R, Prosperini G, Tomaselli V, et al. Expression of c-erbB receptors and ligands in human nasal epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1124-1131.
  16. Amishima M, Munakata M, Nasuhara Y, et al. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1907-1912.
  17. Takeyama K, Tamaoki J, Kondo M, et al. Role of epidermal growth factor receptor in maintaining airway goblet cell hyperplasia in rats sensitized to allergen. *Clin Exp Allergy* 2008;38:857-865.
  18. Hur GY, Lee SY, Lee SH, et al. Potential use of an anticancer drug gefitinib, an EGFR inhibitor, on allergic airway inflammation. *Exp Mol Med* 2007;39:367-375.
  19. Shimizu S, Takezawa-Yasuoka K, Ogawa T, et al. **The epidermal growth factor receptor inhibitor AG1478 inhibits eosinophilic inflammation in upper airways. Clin Immunol 2018;188:1-6.**
  20. Lässer C, O'Neil SE, Ekerljung L, et al. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *Am J Rhinol Allergy* 2011;25:89-93.
  21. Takahashi T, Kato A, Berdnikovs S, et al. Micro-particles in nasal lavage fluids in chronic rhinosinusitis: Potential biomarkers for diagnosis of aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:720-729.
  22. Shimizu S, Tojima I, Nakamura K, et al. Nasal polyp fibroblasts (NPFs)-derived exosomes are important for the release of vascular endothelial growth factor from cocultured eosinophils and NPFs. *Auris Nasus Larynx* 2022;49:407-414.
  23. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:193-208.
  24. Mazzeo C, Cañas JA, Zafra MP, et al. Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1603-1613.
  25. Cañas JA, Sastre B, Mazzeo C, et al. Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. *J Leukoc Biol* 2017;101:1191-1199.

# IV アラキドン酸代謝の不均衡は病態形成に どうかかわるか？

## —制御系脂質メディエーターを利用した治療戦略—

### 1. アラキドン酸代謝物とその作用

生体膜のリン脂質からホスホリパーゼによって産生される生理活性物質で、特異的受容体に作用して生体機能を発揮する物質を脂質メディエーターと呼び、免疫、アレルギー、代謝、細胞増殖、細胞分化、発熱、疼痛など、炎症反応や生体機能の調節に深くかかわっている。主として転写レベルで調節されるサイトカインや、あらかじめ分泌顆粒内で蓄えられて刺激によって放出されるペプチドホルモンとは異なり、脂質メディエーターは生体膜成分として蓄えられたリン脂質から酵素的に産生・放出される。その機能を理解するには、産生経路と関連酵素の活性調節機構、さらに特異的受容体についての知識が重要である。

ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> によってリン脂質から遊離するアラキドン酸の代謝物はエイコサノイドと総称される (図 1)。シクロオキシゲナーゼ (COX: cyclooxygenase) を介して産生されるプロスタグランジン (PG: prostaglandin) とトロンボキサン (TX: thromboxane) はプロスタノイドと呼ば

れ、PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXA<sub>2</sub> などに選択的受容体として DP (DP1), CRTH2 (DP2), EP1-4, IP, FP, TP 受容体が存在する。一方、5-リポキシゲナーゼ (LOX: lipoxygenase) を介してロイコトリエン (LT: leukotriene) とリポキシン (LX: lipoxin) が産生され、LTB<sub>4</sub> に対して BLT1, 2 受容体, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> などのシステイニルロイコトリエン (CysLTs: cysteinyl LTs) に CysLT1, 2 受容体, LTE<sub>4</sub> の新たな受容体として P2Y12, LXA<sub>4</sub> の受容体として ALX/FPR2 (FPRL-1) などが同定されている。また、こうしたエイコサノイドの代謝・産生にかかわる酵素についての研究も進展し、たとえば、COX には構成型の COX-1 と誘導型の COX-2 が存在することが良く知られている<sup>1)</sup>。

アラキドン酸代謝物の詳細な生理作用は、受容体側からの解析によって解明されてきた。アレルギー性鼻炎では、PGD<sub>2</sub> が即時相でヒスタミンとともに肥満細胞から放出され、TXA<sub>2</sub> と CysLTs は好酸球を中心とした浸潤細胞の活性化により、即時相とともに遅発相でも放出される<sup>2)</sup>。PGD<sub>2</sub>

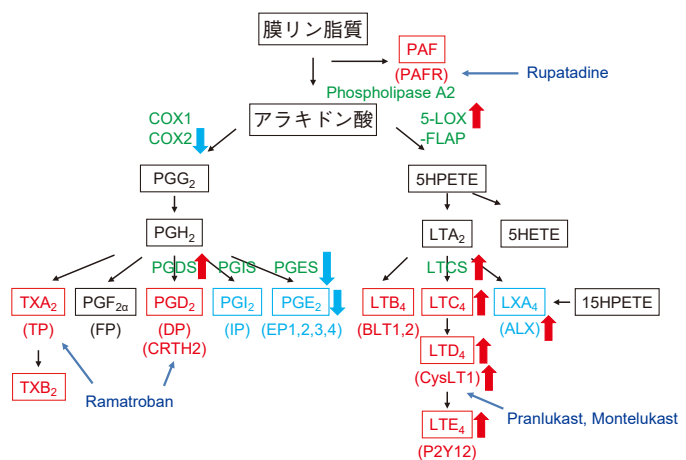


図 1 好酸球性鼻副鼻腔炎におけるアラキドン酸代謝の不均衡  
炎症性メディエーター (赤字) と制御系メディエーター (青字)

は上皮細胞，血管内皮細胞，浸潤細胞などに発現する DP 受容体と，Th2 細胞，好酸球，好塩基球などに発現してその遊走や活性化にかかわる CRTH2 受容体に作用する。TXA<sub>2</sub> は血管内皮細胞の TP 受容体を介して血管透過性を亢進させ，鼻閉に働く。CysLTs は血管内皮細胞の CysLT1 受容体を介して血管拡張と血管透過性亢進作用で鼻閉に働くとともに，好酸球や好中球，肥満細胞，マクロファージなどの炎症細胞にも発現してその活性化にかかわっている<sup>1)</sup>。

現在，臨床で使用されているラマトロバンは，TP 拮抗薬として開発されたが，CRTH2 拮抗作用も有していることが明らかになり，鼻閉の改善とともに好酸球浸潤の抑制などを介して，鼻漏やくしゃみにも効果が認められる。CysLT1 拮抗薬として使用されるプラナルカスト，モンテルカストも鼻閉の改善とともに，炎症細胞に作用して鼻漏やくしゃみにも効果が認められる。また，第2世代抗ヒスタミン薬として開発されたルパタジンは PAF (platelet-activating factor) 受容体拮抗作用も有している。PAF はアラキドン酸代謝物ではないが，その合成経路はアラキドン酸代謝と密接にかかわり，好酸球や肥満細胞などから産生され，好酸球の活性化や血管透過性亢進などの多彩な生理活性を有している。

このように，PGD<sub>2</sub>，TXA<sub>2</sub>，CysLTs，PAF などはアレルギー性炎症などの気道炎症の増悪因子として作用し，その受容体拮抗薬がすでに臨床で使用されている。一方，PGE<sub>2</sub>，PGL<sub>2</sub>，LXA<sub>4</sub> などは気道炎症に抑制的に働き，炎症反応の消退にかかわっている可能性がある。NSAIDs 過敏喘息（アスピリン喘息）は，COX-1 の阻害作用による CysLTs の過剰産生とともに，PGE<sub>2</sub> などの炎症制御因子の産生低下が病態形成にかかわっている。つまり，気道炎症では増悪因子と制御因子として作用する脂質メディエーターの相互作用によって，炎症反応が調節され生体の恒常性が維持されている。本項では，NSAIDs 過敏喘息を伴うことが多い好酸球性鼻副鼻腔炎の病態におけるアラキドン酸代謝の不均衡について，さらに，制御系脂質メディエーターをターゲットとした新たな治療薬の可能性について，われわれの研究結果を中心に概説する。

## 2. 好酸球性鼻副鼻腔炎におけるアラキドン酸代謝の不均衡

好酸球性鼻副鼻腔炎では NSAIDs 過敏喘息（アスピリン喘息）を伴うことが多いが，アラキドン酸代謝の不均衡がその病態にかかわっている。鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎においては，鼻茸中の COX-2 の mRNA 発現が低下し，PGE<sub>2</sub> 濃度が低下し，一方で 5-LOX の mRNA 発現が亢進し，CysLTs の過剰産生が生じている<sup>3)~5)</sup>。こうした変化は，その重症度や NSAIDs 過敏喘息の合併と関連している。COX-2 の発現低下に加えて，慢性鼻副鼻腔炎の鼻茸では PGD<sub>2</sub> synthase の mRNA 発現が亢進し，PGE<sub>2</sub> synthase の mRNA 発現が低下し，それぞれ鼻茸中の浸潤好酸球数や CT による重症度と相関する<sup>6)</sup>。実際に，NSAIDs 過敏喘息患者の鼻茸由来の培養上皮細胞や線維芽細胞では PGE<sub>2</sub> 産生能が低下している<sup>7, 8)</sup>。以上より，COX-2 の発現低下と PGE<sub>2</sub> 産生能の低下が，好酸球性鼻副鼻腔炎の病態にかかわる可能性がある。

また，鼻茸や鼻汁中には高濃度の CysLTs が認められ，鼻茸では 5-LOX とともに LTC<sub>4</sub> synthase の mRNA 発現や CysLT1 受容体の発現が亢進している<sup>3, 5, 9)</sup>。喘息患者の尿中には CysLTs の代謝物である LTE<sub>4</sub> 濃度が上昇し，とくに NSAIDs 過敏喘息や鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎の合併と関連する。こうした症例で内視鏡下鼻副鼻腔手術を行うと尿中 LTE<sub>4</sub> 値が減少することから，鼻茸が CysLTs の産生源と推測される<sup>10)</sup>。さらに，重症の喘息患者では軽症例に比べて，血中や気管支肺胞洗浄液中の CysLTs 濃度が高いが，LXA<sub>4</sub> 濃度は低下している<sup>11, 12)</sup>。鼻茸中の LXA<sub>4</sub> 濃度は正常の鼻粘膜に比べて高いが，NSAIDs 過敏喘息の合併例では低下し<sup>3)</sup>，好酸球性鼻副鼻腔炎では鼻茸における LXA<sub>4</sub> の産生低下が病態にかかわる可能性がある。

われわれも，慢性鼻副鼻腔炎の鼻茸では，COX-2 の mRNA 発現が低下し，5-LOX と CysLT1 受容体の mRNA 発現が亢進していることを確認している<sup>13)</sup> (図 1)。このように，好酸球性鼻副鼻腔炎の病態には，CysLTs の過剰産生とともに，炎症の制御に働く PGE<sub>2</sub> や LXA<sub>4</sub> の産生低下が

かわる。そこで、アラキドン酸代謝物における制御系メディエーターとしての  $\text{PGE}_2$ 、 $\text{PGI}_2$  や  $\text{LXA}_4$  の役割と、制御系メディエーターをターゲットとした新たな治療戦略について検討した。

### 3. 制御系メディエーターとしてのアラキドン酸代謝物

#### 1) プロスタグランジン $\text{E}_2$ ( $\text{PGE}_2$ )

##### ① EP1, EP2, EP3, EP4 受容体とその役割

$\text{PGE}_2$  は、疼痛、発熱、炎症、免疫・アレルギー、生殖・分娩、骨代謝などに関する多彩な生理作用を有している。気道炎症においては、上皮細胞や平滑筋細胞、好中球、好酸球、マクロファージなどから産生され、平滑筋収縮を抑制して喘息の病態抑制に働き、リンパ球の増殖を抑制し、好中球やマクロファージからのサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-12) 産生やケモカイン (CCL3、CCL4) 産生を抑制する抗炎症作用を有している。

$\text{PGE}_2$  には、4 種類の受容体 (EP1, EP2, EP3, EP4) があり、その局在の違いによってさまざまな機能を有する (表 1)。このうち EP1 は Ca 上昇を来し、疼痛や平滑筋収縮にかかわり、EP2, EP4 は cAMP の上昇を来し、平滑筋を弛緩させ、好中球やマクロファージからのサイトカイン産生を抑制する<sup>14, 15)</sup>。EP3 には数種類のアイソフォームがあるが、主として cAMP を低下させ、EP3 アゴニストはマスト細胞の EP3 受容体を介してヒスタミンやロイコトリエン産生を抑制する<sup>16)</sup>。

$\text{PGE}_2$  の合成酵素には、cPGES (cytosolic PGE synthase)、mPGES-1 (microsomal PGE synthase-1)、mPGES-2 の 3 種類が同定されている。cPGES は細胞質に構成的に発現し COX-1 と関連する。

表 1  $\text{PGE}_2$  受容体 (EP1-4) とその作用

受容体	作用
EP1	疼痛, 気道収縮, 胃粘膜防御
EP2	平滑筋弛緩, サイトカイン産生抑制 (好中球・マクロファージ), 排卵, 受精, 骨吸収
EP3	疼痛, 発熱, 肥満細胞機能抑制, 胃酸分泌抑制, 血小板凝集, 血管新生
EP4	平滑筋弛緩, サイトカイン産生抑制 (好中球・マクロファージ), 胃粘膜防御, 骨吸収

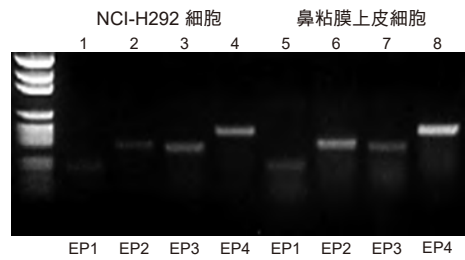


図 2 気道上皮 (NCI-H292) 細胞と鼻粘膜上皮細胞における  $\text{PGE}_2$  受容体 (EP1-4) の mRNA 発現<sup>21)</sup>

mPGES-2 も通常構成的に脂質膜に結合して発現し、COX-1、COX-2 と機能関連する。mPGES-1 は核膜に局在し、COX-2 と関連して炎症刺激によって発現誘導され、抗原刺激によってマクロファージや気道上皮細胞に強く発現する<sup>17, 18)</sup>。NSAIDs 過敏喘息の鼻茸では COX-2 の mRNA 発現が低下し、 $\text{PGE}_2$  濃度が低く、COX-2 阻害薬は喘息を誘発しにくい<sup>19)</sup>。NSAIDs 過敏喘息の鼻茸線維芽細胞では IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 と mPGES-1 の mRNA 発現が低下していることも確認されている<sup>20)</sup>。

われわれは、ヒト正常鼻粘膜上皮細胞や mucoepidermoid carcinoma の細胞株である NCI-H292 細胞において、EP1, EP2, EP3, EP4 のすべての受容体の mRNA が発現していることを確認した<sup>21)</sup> (図 2)。しかし、気道上皮細胞における  $\text{PGE}_2$  の作用はほとんどわかっていない。そこで、各種の EP アゴニストを利用して、LPS 刺激やアレルギー性炎症におけるラット鼻粘膜上皮からの粘液産生や好中球・好酸球浸潤に対する影響を検討した。

##### ② EP アゴニストを利用した治療戦略

LPS (0.1 mg/0.1 ml) を 3 日間連続して点鼻投与すると、ラット鼻粘膜上皮に杯細胞化生・粘液産生と好中球浸潤が生じる。こうした粘液産生・好中球浸潤は LPS 点鼻時に EP4 アゴニストを皮下投与 (1 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) することで濃度依存性に抑制された (図 3)<sup>21)</sup>。EP3 アゴニストにも粘液産生抑制作用が認められたが、EP1 アゴニストや EP2 アゴニストにはこうした作用は認められなかった。次に、気道上皮細胞に対する直接作用について、LPS 刺激 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) による NCI-H292 細胞からの MUC5AC ムチン産生と IL-8 産生に対

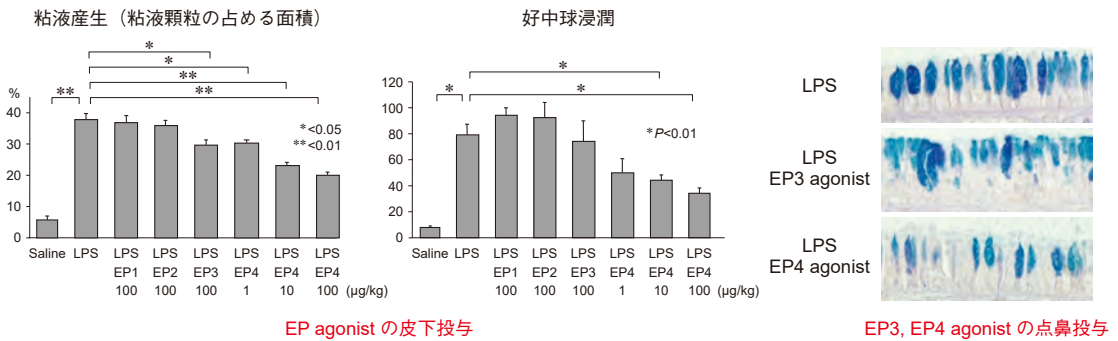
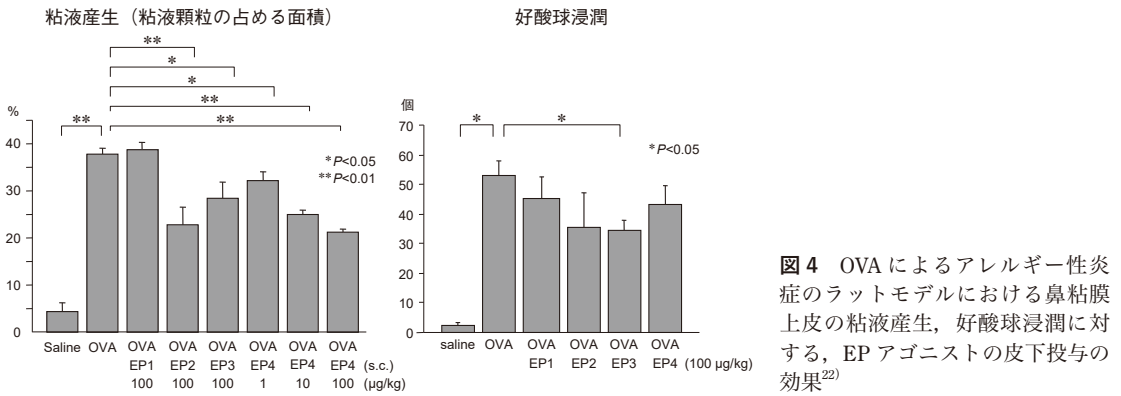


図3 LPSの3日間点鼻におけるラット鼻粘膜の杯細胞化生、粘液産生、好中球浸潤に対する、EPアゴニストの皮下投与、点鼻投与の効果<sup>21)</sup>



する作用を検討した。EP3アゴニストとEP4アゴニスト ( $10^{-6}$  M) はLPS刺激による培養気道上皮細胞からのMUC5ACムチンとIL-8産生を抑制した<sup>21)</sup>。こうした抑制作用は自発的なムチン産生やIL-8産生に対しては認められず、PGE<sub>2</sub>は気道上皮のEP3やEP4受容体を介して、LPS刺激による気道炎症の制御にかかわっている。

卵白アルブミン (OVA: ovalbumin) の腹腔内感作と、3日間の点鼻投与で作成したアレルギー炎症モデルにおいても、ラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生や粘液産生はEP2アゴニスト、EP3アゴニスト、EP4アゴニスト (100 µg/kg) の皮下投与によって抑制され、好酸球浸潤はEP3アゴニストによって抑制された (図4)<sup>22)</sup>。なかでもEP4アゴニストの作用は最も強く、濃度依存性で (1 ~ 100 µg/kg)、OVAの腹腔内感作時のみの投与では効果がないが、OVA点鼻時のみの投与で抑制効果があり、PGE<sub>2</sub>はアレルギー性炎症においても局所で作用して炎症の制御にかかわっている。

実際の臨床応用を考えた場合、PGE<sub>2</sub>には多彩な生理作用があるため、皮下投与では副作用が出現する可能性がある。そこで、ラットのLPS点鼻1時間後にEP4アゴニスト (100 µg/kg, 40 µl) を点鼻投与して、その作用を検討したところ、点鼻投与でも皮下投与と同等の制御作用が確認された (図3)、EP4アゴニストの局所投与による臨床応用の可能性が考えられる。

## 2) プロスタグランジン I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)

PGI<sub>2</sub>は、IP受容体を介して血小板凝集抑制や血管平滑筋の弛緩による血管拡張作用を有している。一方、TXA<sub>2</sub>は、TP受容体を介して血小板凝集作用や血管平滑筋の収縮作用を有し、血栓形成に対してTXA<sub>2</sub>は促進的に、PGI<sub>2</sub>は抑制的に働いて、この両者のバランスの乱れが血栓症や動脈硬化症の発症にかかわっている。臨床では、PGI<sub>2</sub>の経口・静注薬が肺高血圧症の治療に使用されている。

近年、 $\text{PGI}_2$  が気道炎症に対しても抑制的に作用することが明らかになった。IP 欠損マウスでは、喘息モデルにおいて炎症細胞浸潤や Th2 サイトカイン産生、特異的 IgE 抗体産生が亢進し、気道粘膜の線維化や杯細胞化生などの組織リモデリングが増強する<sup>23, 24)</sup>。 $\text{PGI}_2$  とそのアナログは、樹状細胞や Th2 細胞、2 型自然リンパ球などの機能を抑制して、サイトカイン産生を減少させる<sup>25)~27)</sup>。また、制御性 T 細胞の分化誘導に働き、IL-10 産生を増加させる<sup>28)</sup>。 $\text{PGI}_2$  アナログの点鼻投与や IP アゴニストの皮下投与は、マウス下気道のアレルギー性炎症を抑制することも確認されている<sup>25, 28)</sup>。今後、 $\text{PGI}_2$  アナログや IP アゴニストなど、 $\text{PGI}_2$ -IP 受容体をターゲットとした創薬が新たな治療薬の開発につながる可能性が考えられる。

一方、 $\text{TXA}_2$  は、気道炎症において平滑筋を収縮させて喘息の病態形成にかかわり、鼻粘膜では TP 受容体を介して鼻閉に働く。実際に、TP 受容体拮抗作用を有するラマトロバンは、鼻閉に対する有効性が高い。しかしながら、血管平滑筋を弛緩させて血管拡張作用がある  $\text{PGI}_2$  に対して、 $\text{TXA}_2$  は血管平滑筋を収縮させて血管を収縮させる。それでは、

### 「血管収縮作用がある $\text{TXA}_2$ はどのように鼻粘膜腫脹を引き起こすか？」

この疑問は、長年にわたって解決されないまま、頭の片隅で思い続けてきたが、最近になってようやくその答えが見えてきた。 $\text{TXA}_2$  が鼻閉を引き起こす機序については、本書の第 3 章 V 項で概説する。

### 3) リポキシン $\text{A}_4$ ( $\text{LXA}_4$ )

$\text{PGE}_2$  や  $\text{PGI}_2$  がプロスタノイドにおける炎症制御因子であるとすれば、ロイコトリエン類の制御因子としてリポキシン (LX) の役割が注目される。気道炎症におけるロイコトリエン類の合成には、白血球由来の 5-LOX が重要で、 $\text{LTA}_4$  から  $\text{LTB}_4$  と CysLTs が産生される。 $\text{LXA}_4$  の産生には 2 種類の経路があり、気道上皮細胞や単球、好酸球由来の 15-LOX によってアラキドン酸から 15-HpETE (hydroperoxyeicosatetraenoic acid) が産

生され、次いで白血球の 5-LOX によって産生される経路と、5-LOX を介して産生された  $\text{LTA}_4$  から血小板の 12-LOX によって産生される経路がある。 $\text{PGD}_2$  や  $\text{PGE}_2$ 、また、IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインは気道上皮細胞における 15-LOX-1 発現を誘導する<sup>29)</sup>。したがって、炎症の進展とともに、気道上皮細胞における 15-LOX-1 発現の亢進や、血小板の浸透などを介して、 $\text{LTA}_4$ 、 $\text{LTB}_4$  産生から  $\text{LXA}_4$  産生への転換が生じて消炎反応が開始される機序が存在する。さらに、アスピリンは COX-2 の酵素活性を変化させて、アラキドン酸から 15-epi- $\text{LXA}_4$  の産生を誘導することも明らかになり、15-epi- $\text{LXA}_4$  の抗炎症作用についても注目されている<sup>30)</sup>。

喘息患者では、血中や気管支肺胞洗浄液中の CysLTs 濃度や  $\text{LXA}_4$  濃度が高いが、とくに重症例で  $\text{LXA}_4$  濃度が低下している<sup>11, 12)</sup>。鼻茸中には  $\text{LXA}_4$  が高濃度で存在するが、NSAIDs 過敏喘息では、15-LOX の mRNA 発現と  $\text{LXA}_2$  濃度が減少し<sup>3)</sup>、末梢白血球における  $\text{LXA}_2$  産生能が低下している<sup>31)</sup>。われわれは、鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎患者ではアレルギー性鼻炎患者に比べて、鼻汁中の  $\text{LXA}_4$  濃度が低下していること、鼻茸ではアレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介と比較して、5-LOX と 15-LOX-1 の mRNA 発現が亢進していること、一方で 12-LOX の mRNA 発現が低下していることを確認している (図 5)<sup>13)</sup>。つまり、鼻茸などの炎症組織では  $\text{LXA}_4$  が産生され炎症反応が制御されているが、NSAIDs 過敏症を伴うような重症例では、 $\text{LXA}_4$  産生能の低下がその病態にかかわることが推測される。

$\text{LXA}_4$  には ALX/FPR2 (FPRL-1) などと呼ばれる受容体が存在し、好中球や好酸球を中心とした白血球の遊走、接着、脱顆粒、サイトカイン産生の抑制、線維芽細胞の増殖抑制、血管透過性の抑制、喘息モデルマウスにおける気道収縮抑制作用など、さまざまな抗炎症作用を有している<sup>32)~34)</sup>。また、 $\text{LXA}_4$  は CysLT1 受容体に対する拮抗作用があることも報告されている<sup>31)</sup>。われわれは、ヒト鼻粘膜上皮細胞に  $\text{LXA}_4$  受容体の FPRL-1 (formyl peptide receptor-like-1) が発現していること、鼻茸ではアレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介に比べ

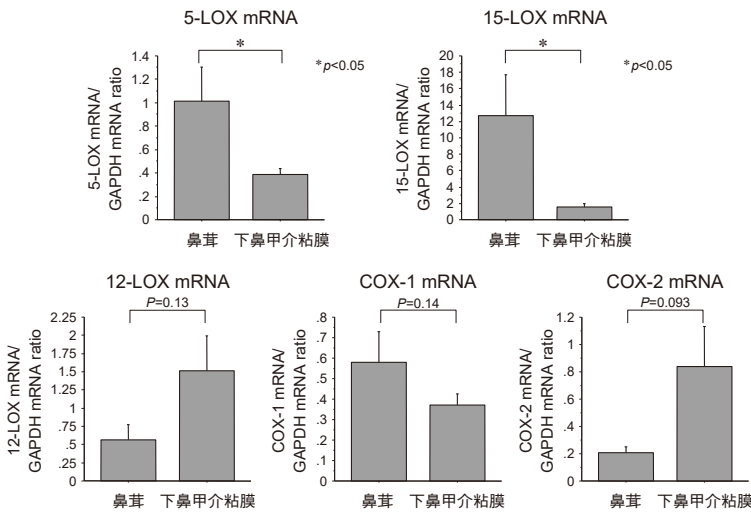


図5 鼻茸における5-LOX, 15-LOX, 12-LOX, COX-1, COX-2 mRNA 発現 (アレルギー性鼻炎下鼻甲粘膜との比較)<sup>13)</sup>

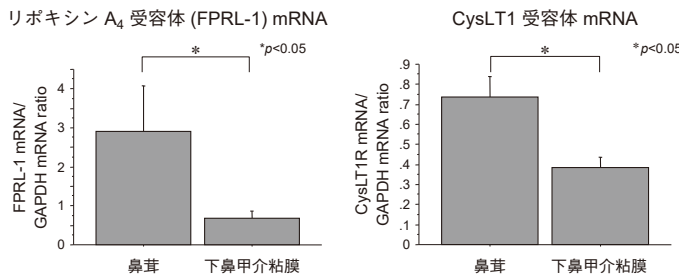
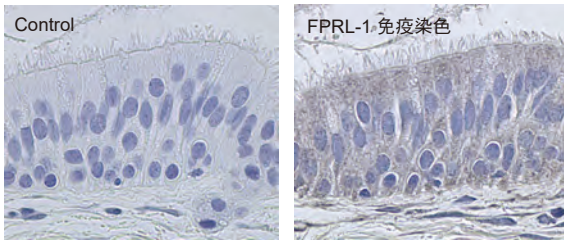


図6 鼻茸上皮におけるLXA<sub>4</sub>受容体 (FPRL-1) の免疫染色と、鼻茸におけるFPRL-1, CysLT1受容体 mRNA 発現 (アレルギー性鼻炎下鼻甲粘膜との比較)<sup>13)</sup>

て、FPRL-1 と CysLT1 受容体の mRNA 発現が亢進していること (図 6), LXA<sub>4</sub> が FPRL-1 を介して正常ヒト気管支上皮細胞からの TNF-α 刺激による IL-8 産生を抑制することを確認した<sup>13)</sup>。好酸球形鼻副鼻腔炎においても、LXA<sub>4</sub> とその異性体 LXB<sub>4</sub> には炎症制御因子としての役割が考えられ、LXA<sub>4</sub> とその受容体をターゲットにした新たな治療薬の可能性が期待される。

## 4. ω3 脂肪酸代謝物を利用した治療戦略

### 1) ω3 脂肪酸代謝物

脂肪酸は、不飽和結合の有無により飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸に、不飽和脂肪酸はさらに一価と多価に分かれる。多価不飽和脂肪酸代謝物のうち、ω6 脂肪酸であるリノール酸はアラキドン酸に代謝され、続いてプロスタグランジンやロイコトリエンなどに代謝されて炎症反応にかかわる。一方、ω3 脂肪酸であるαリノレン酸は、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) に代謝され、続いてさまざまな代謝産物



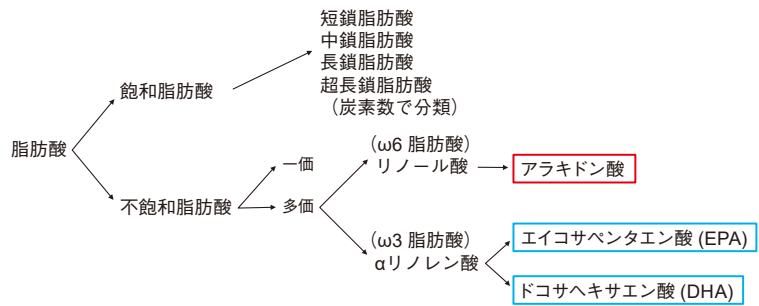


図7 ω3脂肪酸とω6脂肪酸

が合成され、炎症の抑制にもかかわる (図7)。ω3, ω6脂肪酸はヒトの生体内では合成されない必須脂肪酸で、ω6が多い肉中心の食事ではなく、ω3を多く含む魚中心の食事を摂取すると、喘息やアトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の発症が抑制されることが報告されている<sup>35)</sup>。アラキドン酸に多くの代謝物が存在し、さまざまな生理活性を有するように、EPAやDHAにも多数の代謝物が存在する<sup>36)</sup>。こうした代謝物の詳細な機能はまだ十分に解明されていない。

好酸球性気道炎症におけるω3脂肪酸代謝物の制御作用については、12/15リポキシゲナーゼ(12/15LOX)欠損マウスで、IL-33刺激による好酸球性炎症が増悪するが、12/15LOXによってDHAから合成される14(S)-hydroxy docosahexaenoic acid (HDoHE)の投与により抑制されること、12/15-LOXの代謝産物であるHDoHE, 10(S),17(S)-diHDoHE, resolvin D1, maresin 1 (MaR1)などが2型自然リンパ球(ILC2s)からのサイトカイン産生を抑制すること<sup>37)</sup>、MaR1はOVAによるマウスのアレルギー性気道炎症を抑制し、制御性T細胞(Treg)の誘導によるTGF-β産生を介してILC2sからのサイトカイン産生を抑制すること<sup>38)</sup>などが報告されている。また鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎患者では、血清中のmaresin濃度が低下し、鼻汁中の濃度が上昇していることも報告されている<sup>39)</sup>。その意義や病態における役割はわかっていない。

## 2) 17,18-epoxy-eicosatetraenoic acid (17,18-EpETE)の気道上皮細胞に対する抗炎症作用

αリノレン酸(ω3脂肪酸)の多い食餌で飼育さ

れたマウスの腸内では、17,18-EpETEやその代謝物である17,18-dihydroxy-eicosa-5,8,11,14-tetraenoic acid (17,18-diHETE)が増加する。また17,18-EpETEの腹腔内投与は、マウスの腸管アレルギーを抑制する<sup>40)</sup>。17,18-EpETEの受容体として、細胞膜受容体であるG protein-coupled receptor 40 (GPR40)<sup>41)</sup>と核膜受容体であるperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$ <sup>42)</sup>が報告され、17,18-EpETEは血中では速やかに17,18-diHETEに代謝される<sup>43)</sup>。一方、17,18-EpETEを含むエポキシ化ω3脂肪酸が、マスト細胞を介したアレルギー炎症の維持にかかわる報告もあり<sup>36)</sup>、その働きにはまだ不明な点が多い。

われわれは、17,18-EpETEがGPR40受容体を介して、TNF-α刺激による培養ヒト正常気管支上皮(NHBE)細胞からのIL-6, IL-8産生や、培養気道上皮(NCI-H292)細胞からのMUC5ACムチン産生を抑制することを明らかにした。また、17,18-EpETEの点鼻投与(300 ng)あるいは腹腔内投与(300 ng)が、LPS点鼻刺激によるマウス鼻粘膜の粘液産生や好中球浸潤を抑制し、点鼻投与では肺胞洗浄液(BAL)中のKCやMIP-2(いずれもヒトIL-8に相当)、G-CSF産生を抑制し(図8)、腹腔内投与では肺組織中のKCやMIP-2, TNF-α産生を抑制したことから<sup>44)</sup>、17,18-EpETEには局所投与による上気道炎症の治療薬としての可能性が考えられる。

## 3) 17,18-EpETEと17,18-diHETEの2型自然リンパ球(ILC2s)に対する抗炎症作用

末梢血から分離したヒトILC2sに対する作用についても検討したところ、17,18-EpETEあるいは

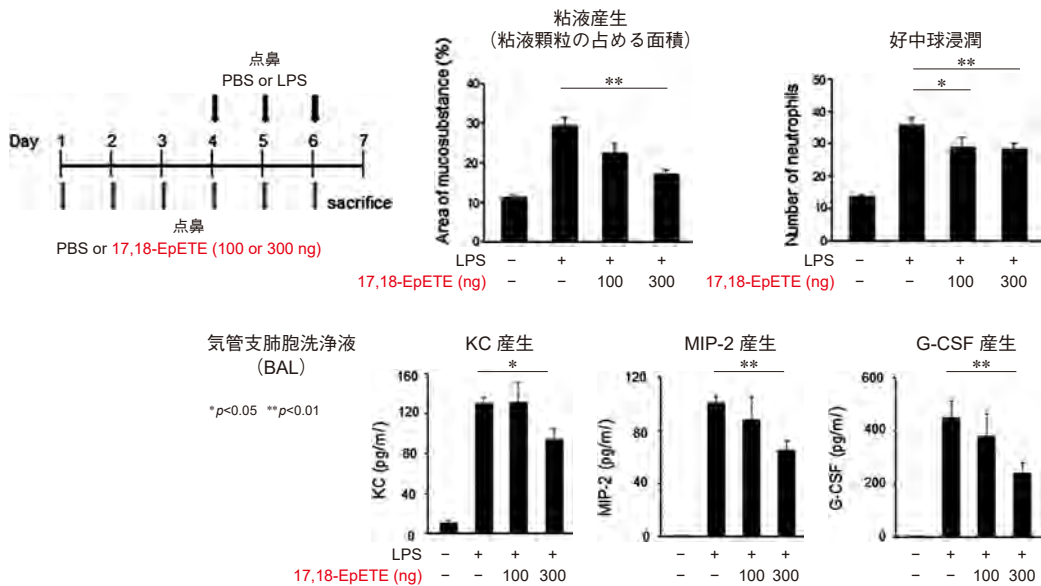


図8 LPS点鼻刺激によるマウス鼻粘膜の粘液産生、好中球浸潤に対する17,18-EpETE点鼻投与(300ng)の効果<sup>42)</sup>

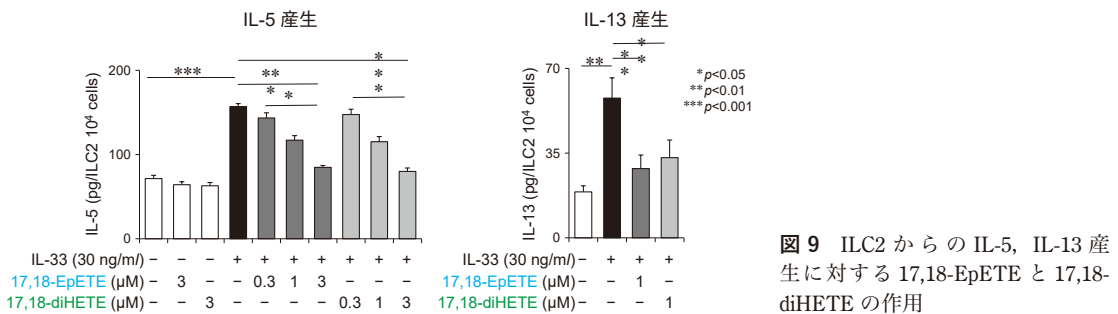


図9 ILC2からのIL-5, IL-13産生に対する17,18-EpETEと17,18-diHETEの作用

はその代謝産物である17,18-diHETEは、IL-33刺激によるILC2からのIL-5, IL-13産生を濃度依存性に抑制した(図9)。ILC2sは17,18-EpETEの受容体であるGPR40とPPAR $\gamma$ を発現していたが、ILC2sからのIL-5, IL-13産生抑制作用は、GPR40阻害薬(GW1100)やPPAR $\gamma$ 阻害薬(GW9662)により部分的に解除された。渉猟したかぎり17,18-diHETEの受容体についての報告はないが、17,18-EpETEと17,18-diHETEはともにこの2種類の受容体を介してILC2sの制御にかかわっていると考えられる。また、IL-33刺激により、2型サイトカイン産生にかかわる転写因子GATA-3の発現が増加したが、17,18-EpETEと17,18-diHETEはILC2sにおけるGATA-3発現を抑制した。

次に、IL-33を3日ごとに3回点鼻して作成し

た好酸球性炎症のマウスモデルで、17,18-EpETEと17,18-diHETEの点鼻投与の効果を検討した。このマウスでは、血清中のIgE抗体の上昇が認められず、獲得免疫を介さない好酸球炎症が惹起される。17,18-EpETEあるいは17,18-diHETEの点鼻投与(300ng)は、IL-33点鼻刺激による鼻粘膜上皮の杯細胞化生、粘液産生、好酸球浸潤を抑制し、肺組織や気管支肺胞洗浄液(BAL)中のIL-5, IL-13産生も抑制した(図10)。一方、17,18-EpETEの腹腔内投与では、こうした抑制効果は乏しかった。

さらに、マウスにIL-33を単回点鼻投与して、6時間後に産生されるIL-5, IL-13を測定することで、ILC2sによるサイトカイン産生に対する効果を検討した。17,18-EpETEや17,18-diHETEの点鼻投与(300ng)は、IL-33刺激6時間後の肺

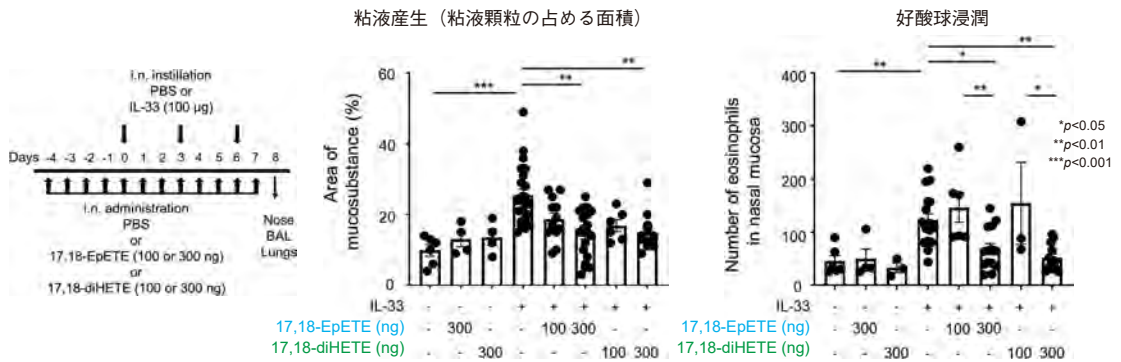


図 10 IL-33 (100 µg) 点鼻刺激によるマウス鼻粘膜上皮の粘液産生，好酸球浸潤に対する 17,18-EpETE と 17,18-diHETE 点鼻投与 (300 ng) の効果

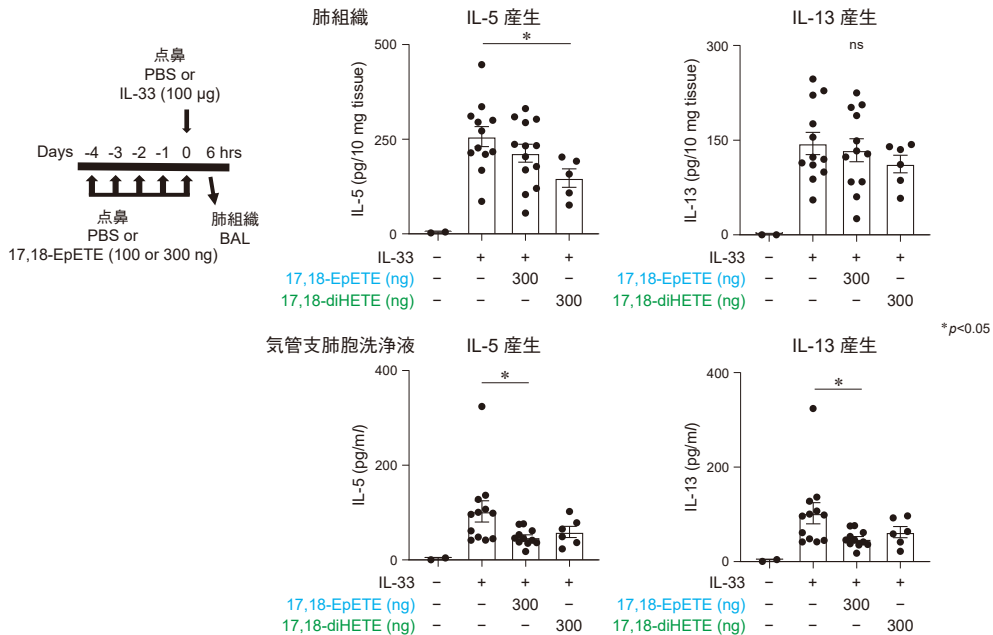


図 11 IL-33 (100 µg) 単回点鼻刺激 6 時間後の，マウス肺組織と気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の IL-5, IL-13 産生に対する 17,18-EpETE と 17,18-diHETE 点鼻投与 (300 ng) の効果

組織や BAL 中の IL-5, IL-13 産生を抑制した (図 11). 17,18-EpETE や 17,18-diHETE はマウスモデルにおいても, ILC2s の機能を制御することが確認できた。

以上の結果, 17,18-EpETE の点鼻投与は, その代謝産物である 17,18-diHETE の作用とも相まって, 気道上皮細胞からの IL-6, IL-8 産生や MUC5AC ムチン産生を抑制するとともに, ILC2s からの IL-5, IL-13 産生を抑制して, 上気道炎症を制御すると考えられる。好酸球性鼻副鼻腔炎では鼻粘膜上皮細胞とともに ILC2s が 2 型炎症の

病態形成に重要であるが, ω3 脂肪酸代謝物である 17,18-EpETE の局所投与は, こうした ILC2s を介した好酸球性上気道炎症に対する新たな治療薬となる可能性が考えられる。

## 5. 短鎖脂肪酸と抗炎症作用

### 1) 腸内細菌叢と短鎖脂肪酸

近年, 腸内細菌叢が宿主であるヒトの栄養代謝や病原体の排除, 免疫反応などに極めて重要な役割を果たしていることが注目されている。短鎖脂

脂肪酸は炭素数が6個未満の脂肪酸で、腸内細菌が難消化性の食物繊維を嫌気発酵させて消化することで産生される。ヒトでは酪酸、酢酸、プロピオン酸の3種類がそのほとんどを占め、大腸上皮細胞から吸収されて重要なエネルギー源になる。また、腸管内を弱酸性にして病原体の繁殖を抑制するほか、受容体であるGPR41やGPR43を介してさまざまな免疫反応にかかわる<sup>35)</sup>。とくにクロストリジウム属などから生成される酪酸には抗炎症作用があり、大腸上皮細胞のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC: histone deacetylase)を阻害することで、制御性T細胞(Treg)を誘導する<sup>36)</sup>。炎症性腸疾患では腸管内の短鎖脂肪酸が減少していることも報告されている<sup>37)</sup>。このように、腸内細菌が発酵によって産生する短鎖脂肪酸は腸管の過剰な免疫反応を制御し、良好な腸内環境の維持に重要である。さらに、口腔や皮膚にも細菌叢があり、生体の恒常性維持にかかわっているが、鼻腔細菌叢の役割についてはほとんどわかっていない。

## 2) 鼻腔細菌叢と酪酸

鼻腔の常在細菌叢についての報告では、慢性鼻副鼻腔炎患者ではラクトバシラス属などの乳酸菌群や、プレボテラ属、サクシニビブリオ属などの常在菌が健康人と比べて減少している<sup>38, 39)</sup>。しかしながら、その役割や機能については不明で、短鎖脂肪酸については検討されていない。われわれはヒトの鼻腔洗浄液中に酪酸が存在することを見出し、好酸球形鼻副鼻腔炎患者では慢性鼻副鼻腔炎やコントロール群(アレルギー性鼻炎、副鼻腔嚢胞など)と比較して、鼻腔洗浄液中の酪酸濃度が有意に低下していた(図12)。これは、鼻腔の細菌叢が酪酸を産生していることを示唆する結果で、好酸球形鼻副鼻腔炎の病態には、こうした鼻腔細菌叢が産生する短鎖脂肪酸の変化がかかわると考えられる。この酪酸濃度の低下は鼻腔細菌叢が変化していることを示唆しているが、細菌叢の変化との関連については今後の検討課題である。

## 3) 酪酸による2型炎症の抑制作用

われわれは2型炎症に対する短鎖脂肪酸の抗炎

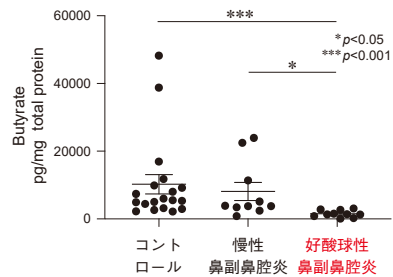


図12 鼻腔洗浄液中の酪酸濃度

症作用について、末梢血単核球や鼻茸由来の培養細胞を利用して検討した。正常人から採取した末梢血単核球をIL-33(100 ng/ml)で刺激すると多量のIL-5とIL-13が産生される。酪酸は濃度依存性(0.1~10 mM)に、IL-33刺激によるIL-5, IL-13産生を抑制したが、酢酸やプロピオン酸にはこうした作用は認められなかった。また、フローサイトメトリーで2型自然リンパ球(ILC2s)とTh2細胞、B細胞をそれぞれ分離培養して、酪酸の作用を検討した。酪酸はIL-33(100 ng/ml)とTSLP(100 ng/ml)刺激によるILC2sからのIL-5, IL-13産生を抑制し、IL-33刺激によるTh2細胞からIL-5, IL-13産生を抑制し、CD40L刺激によるB細胞からのIgE産生を抑制した。さらに、好酸球形鼻副鼻腔炎患者の末梢血単核球と鼻茸分離細胞を利用して酪酸の作用を検討したところ、酪酸はTSLP刺激による末梢血単核球からのIL-5, IL-13産生を抑制し、IL-33とTSLP刺激による鼻茸分離細胞からのIL-5, IL-13産生を抑制した(図13)。

次に、ハウスダスト(HDM)、アルテルナリア、黄色ブドウ球菌プロテアーゼを混合したアレルゲン(MAAs: multiple airborne allergens)を点鼻投与して作成した、好酸球形慢性炎症のマウスモデルを利用して、短鎖脂肪酸の点鼻投与の効果について検討した。このマウスモデルでは鼻粘膜での好酸球浸潤やIL-5, IL-13産生が誘導され、1~2か月間の長期点鼻によりVEGF産生を伴う組織リモデリングが生じて、鼻粘膜に鼻茸様の上皮の肥厚が観察される<sup>40)</sup>。短鎖脂肪酸のうち、酪酸の点鼻投与(1~10 mM)はMAAs3日間点鼻投与による肺組織でのIL-5, IL-13産生を濃度依存性

に抑制したが、酢酸やプロピオン酸にはこうした作用は認められなかった (図 14)。次に、MAAs 14 日間点鼻投与における酪酸の抗炎症作用を検討したところ、酪酸は鼻粘膜における IL-5、IL-13 産生と好酸球浸潤、杯細胞化生を抑制し、

血清中の IgE 産生も抑制した (図 15)。さらに、酪酸の点鼻投与 (10 mM) は MAAs 60 日間点鼻投与による鼻粘膜上皮の鼻茸様変化も抑制した (図 16)。

このように、短鎖脂肪酸のうち酪酸には抗炎症

図 13 IL-33 (100 ng/ml) (+TSLP 100 ng/ml) 刺激による末梢血単核球、鼻茸分離細胞、Th2 細胞、ILC2s からの IL-5、IL-13 産生に対する酪酸 (Butyrate) (1 mM) とデキサメタゾン (Dex) (100 nM) の抑制作用

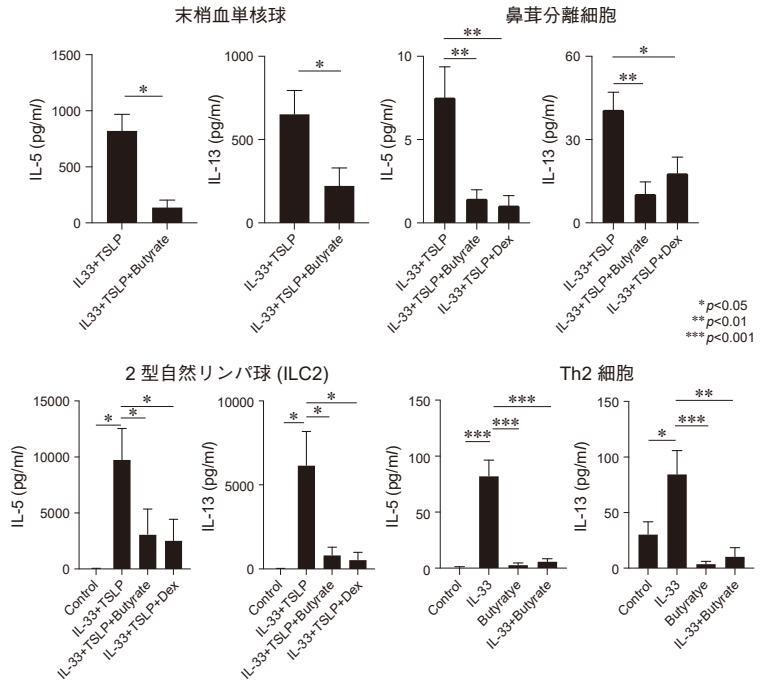


図 14 好酸球性炎症マウスモデル (MAAs : multiple airborne allergens 3 日間点鼻) の肺組織での IL-5、IL-13 産生に対する短鎖脂肪酸点鼻投与 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸) (0.1 ~ 10 mM) の効果

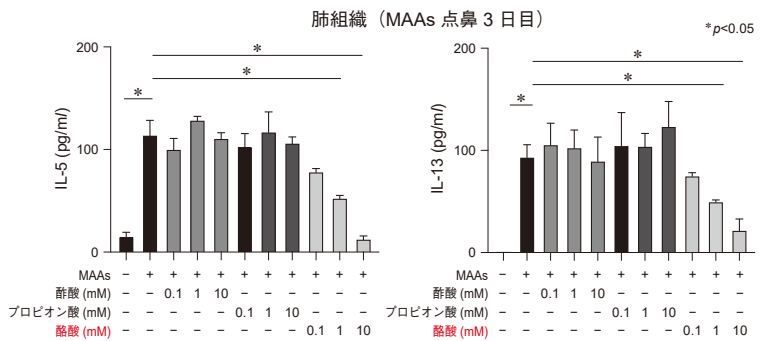
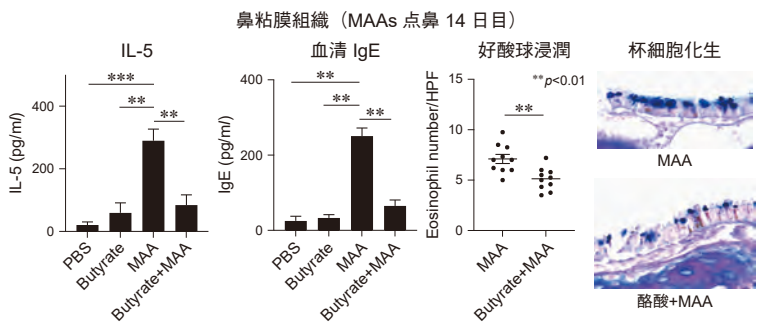


図 15 好酸球性炎症モデルマウス (MAAs 14 日間点鼻) の鼻粘膜における IL-5 産生、好酸球浸潤、杯細胞化生と血清中の IgE 抗体に対する酪酸 (Butyrate) 点鼻投与 (10 mM) の効果



鼻粘膜組織 (MAAs 点鼻 60 日目)

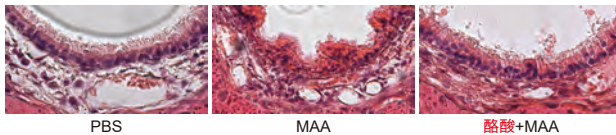


図 16 好酸球形炎症モデルマウス (MAAs 60 日間点鼻) における鼻粘膜のポリープ様変化と酪酸点鼻投与 (10 mM) の効果

作用があり、制御性 T 細胞の分化誘導<sup>36)</sup>のほか、ILC2s<sup>41)</sup> や Th2 細胞などからの 2 型サイトカイン産生の抑制、B 細胞からの IgE 産生抑制などを介して、2 型炎症による好酸球浸潤を抑制し、杯細胞化生や鼻茸形成などの組織リモデリングを抑制

できる可能性がある。酪酸の点鼻投与による抗炎症作用は、難治性の 2 型炎症である好酸球形鼻副鼻腔炎に対する新たな治療薬の開発につながる可能性がある。

## まとめ

**疑問：アラキドン酸代謝の不均衡は病態形成にどうかかわるか？**

**答え：好酸球形鼻副鼻腔炎では、COX-2 の発現低下とそれに伴う PGE<sub>2</sub> の産生低下、5-LOX 発現亢進とそれに伴う CysLTs の産生亢進など、NSAIDs 過敏喘息に類似した病態が認められる。アラキドン酸代謝物で炎症を制御する作用がある PGE<sub>2</sub> や LXA<sub>4</sub>、 $\omega$ 3 脂肪酸代謝物で強い抗炎症作用を有する 17,18-EpETE、鼻腔細菌叢が産生する短鎖脂肪酸の酪酸などに、新たな局所治療薬としての可能性が期待できる。**

## 文献

1. 清水猛史. 気道炎症とアラキドン酸代謝物の新しい展開. 耳鼻臨床 2007;100:157-166.
2. Tojima I, Matsumoto K, Kikuoka H, et al. Evidence for the induction of Th2 inflammation by group 2 innate lymphoid cells in response to prostaglandin D<sub>2</sub> and cysteinyl leukotrienes in allergic rhinitis. Allergy 2019;74:2417-2426.
3. Pérez-Novo CA, Watelet JB, Claeys C, et al. Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol 2005;115:1189-1196.
4. Picado C, Fernandez-Morata JC, Juan M, et al. Cyclooxygenase-2 mRNA is downexpressed in nasal polyps from aspirin-sensitive asthmatics. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:291-296.
5. Steinke JW, Bradley D, Arango P, et al. Cysteinyl leukotriene expression in chronic hyperplastic sinusitis-nasal polyposis: importance to eosinophilia and asthma. J Allergy Clin Immunol 2003;111:342-349.
6. Okano M, Fujiwara T, Yamamoto M, et al. Role of prostaglandin D2 and E2 terminal synthases in chronic rhinosinusitis. Clin Exp Allergy 2006;36:1028-1038.
7. Kowalski ML, Pawliczak R, Wozniak J, et al. Differential metabolism of arachidonic acid in nasal polyp epithelial cells cultured from aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:391-398.
8. Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, et al. Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E(2) in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. J Allergy Clin Immunol 2011;128:66-72.e61.
9. Picado C, Ramis I, Roselló J, et al. Release of peptide leukotriene into nasal secretions after local instillation of aspirin in aspirin-sensitive asthmatic patients. Am Rev Respir Dis 1992;145:65-69.
10. 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.
11. Levy BD, Bonnans C, Silverman ES, et al. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:824-830.
12. Planagumà A, Kazani S, Marigowda G, et al. Airway

- lipoxin A4 generation and lipoxin A4 receptor expression are decreased in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:574-582.
13. Shimizu S, Ogawa T, Seno S, et al. **Pro-resolution mediator lipoxin A4 and its receptor in upper airway inflammation.** *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2013;122:683-689.
  14. Yamane H, Sugimoto Y, Tanaka S, et al. Prostaglandin E(2) receptors, EP2 and EP4, differentially modulate TNF-alpha and IL-6 production induced by lipopolysaccharide in mouse peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:224-228.
  15. Takayama K, García-Cardena G, Sukhova GK, et al. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* 2002;277:44147-44154.
  16. Kunikata T, Yamane H, Segi E, et al. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol* 2005;6:524-531.
  17. Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, et al. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* 2002;168:5811-5816.
  18. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000;275:32783-32792.
  19. Stevenson DD, Simon RA. Lack of cross-reactivity between rofecoxib and aspirin in aspirin-sensitive patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:47-51.
  20. Machado-Carvalho L, Martín M, Torres R, et al. Low E-prostanoid 2 receptor levels and deficient induction of the IL-1 $\beta$ /IL-1 type I receptor/COX-2 pathway: vicious circle in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:99-107.e107.
  21. Hattori R, Shimizu S, Majima Y, et al. **EP4 agonist inhibits lipopolysaccharide-induced mucus secretion in airway epithelial cells.** *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:51-58.
  22. Hattori R, Shimizu S, Majima Y, et al. **Prostaglandin E2 receptor EP2, EP3, and EP4 agonists inhibit antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats.** *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118:536-541.
  23. Takahashi Y, Tokuoka S, Masuda T, et al. Augmentation of allergic inflammation in prostanoid IP receptor deficient mice. *Br J Pharmacol* 2002;137:315-322.
  24. Nagao K, Tanaka H, Komai M, et al. Role of prostaglandin I2 in airway remodeling induced by repeated allergen challenge in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:314-320.
  25. Zhou W, Toki S, Zhang J, et al. Prostaglandin I2 signaling and inhibition of group 2 innate lymphoid cell responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:31-42.
  26. Zhou W, Zhang J, Goleniewska K, et al. Prostaglandin I2 suppresses proinflammatory chemokine expression, CD4 T cell activation, and STAT6-independent allergic lung inflammation. *J Immunol* 2016;197:1577-1586.
  27. Müller T, Dürk T, Blumenthal B, et al. Iloprost has potent anti-inflammatory properties on human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1214-1221.
  28. Norlander AE, Bloodworth MH, Toki S, et al. Prostaglandin I2 signaling licenses treg suppressive function and prevents pathogenic reprogramming. *J Clin Invest* 2021;131.
  29. Claesson HE. On the biosynthesis and biological role of eoxins and 15-lipoxygenase-1 in airway inflammation and Hodgkin lymphoma. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;89:120-125.
  30. Chiang N, Bermudez EA, Ridker PM, et al. Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15178-15183.
  31. Sanak M, Levy BD, Clish CB, et al. Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin-intolerant asthmatics. *Eur Respir J* 2000;16:44-49.
  32. Levy BD, Lukacs NW, Berlin AA, et al. Lipoxin A4 stable analogs reduce allergic airway responses via mechanisms distinct from CysLT1 receptor antagonism. *FASEB J* 2007;21:3877-3884.
  33. Bannenberg G, Moussignac RL, Gronert K, et al. Lipoxins and novel 15-epi-lipoxin analogs display potent anti-inflammatory actions after oral administration. *Br J Pharmacol* 2004;143:43-52.
  34. Haworth O, Levy BD. Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation. *Eur Respir J* 2007;30:980-992.
  35. Le Poul E, Loison C, Struyf S, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty

- acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* 2003;278:25481-25489.
36. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013;504:446-450.
  37. Machiels K, Joossens M, Sabino J, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014;63:1275-1283.
  38. Abbas EE, Li C, Xie A, et al. Distinct clinical pathology and microbiota in chronic rhinosinusitis with nasal polyps endotypes. *Laryngoscope* 2021;131:E34-e44.
  39. De Boeck I, van den Broek MFL, Allonsius CN, et al. Lactobacilli have a niche in the human nose. *Cell Rep* 2020;31:107674.
  40. Kouzaki H, Matsumoto K, Kikuoka H, et al. Endogenous protease inhibitors in airway epithelial cells contribute to eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:737-747.
  41. Thio CL, Chi PY, Lai AC, et al. Regulation of type 2 innate lymphoid cell-dependent airway hyperreactivity by butyrate. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:1867-1883.e1812.
  42. Hara S, Tojima I, Shimizu S, et al. 17,18-Epoxyeicosatetraenoic acid inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammation in cultured human airway epithelium and LPS-induced murine airway inflammation. *Am J Rhinol Allergy* 2022;36:106-114.



## V 自然免疫の役割は？

### —上皮由来サイトカイン TSLP, IL-25, IL-33 と 2型自然リンパ球 (ILC2s) —

#### 1. 自然免疫と気道上皮細胞

人類は、病原体である感染微生物に対する防御機構として、自然免疫と獲得免疫の2種類の免疫応答を効率よく使い分けている。自然免疫は、主として好中球、好酸球、単球、マクロファージ、補体などがかわり、病原体や異物はTLR (Toll-like receptor) や細胞内核酸受容体のRIG-1ファミリーなどを介した認識機構により、貪食・排除される。TLRはヒトで10種が同定され、そのリガンドとして細菌や真菌、ウイルス由来のパターン構造が知られ、PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) と呼ばれている。自然免疫は多くの病原体に幅広く即時的に反応できる特徴がある。一方、獲得免疫は抗原特異的な反応で、自然免疫による抗原の受け取りなどによりT細胞やB細胞が活性化され、抗原認識を介して免疫反応が惹起される。抗原特異的な強い反応が得られるが、起動に時間がかかる特徴がある。ただし、一旦免疫学的学習が成立すると、再学習により即応性も維持される。

気道上皮細胞は、物理的なバリアとしての働きや粘液線毛輸送機能により、病原体や外来抗原の侵入を防いでいるが、PAMPsを認識するTLRやRIG-1ファミリー、C型レクチン受容体、プロテアーゼ受容体 (PARs: protease activated receptors)などを介して、サイトカインやケモカインを産生し、局所での免疫応答に直接かかわっている。近年、上皮細胞が、アレルゲンや化学物質、細菌・ウイルス感染、寄生虫などさまざまな刺激に対して、TSLP (tissue stromal lymphopoietin) やIL-25, IL-33などの上皮由来サイトカインを産生し、2型炎症を誘導することが注目されている<sup>1)~4)</sup>。

自然免疫には、微生物に対するPAMPsとは別に、感染や組織傷害による細胞壊死によって細胞外へある種の内在因子が放出される、DAMPs (damage-associated molecular patterns) があり、IL-33など後者は「alarmin」と呼ばれている。IL-33は、上皮細胞や血管内皮細胞の核内に存在し、核内因子として転写制御にかかわるが、細胞外へ放出されると、2型炎症を引き起こす。TSLP, IL-25, IL-33は樹状細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、2型自然リンパ球 (ILC2s: group 2 innate lymphoid cells) などに作用して自然免疫を活性化させるが、TSLPは樹状細胞を介して、Th2細胞の分化を誘導し、IL-25, IL-33とともにTh2細胞の増殖、2型サイトカイン産生などを促進して獲得免疫も活性化させる。

このように気道上皮細胞は、炎症担当細胞として上皮由来サイトカインを産生し、自然免疫反応に極めて重要であるが、IL-33の放出機序などまだ十分に解明されていないことも多い。好酸球性鼻副鼻腔炎などの好酸球性慢性炎症における役割もほとんど検討されていない。そこで、好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における自然免疫の役割について、2型炎症を誘導する上皮由来サイトカイン (TSLP, IL-25, IL-33) と2型自然リンパ球 (ILC2s) を中心に検討した。

#### 2. 上皮由来サイトカイン, TSLP, IL-25, IL-33

##### 1) TSLP

TSLPはIL-2サイトカインファミリーに属し、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、マスト細胞、樹状細胞などから産生され、TSLP受容体とIL-7受容体 $\alpha$ 鎖からなるヘテロ二量体に結合す

る<sup>5)</sup>。細菌やウイルス、アレルゲン、物理化学的  
刺激など、さまざまな環境刺激に反応して気道上  
皮細胞で産生される<sup>6)</sup>。われわれは、アルテルナ  
リアに含まれるシステインプロテアーゼやセリン  
プロテアーゼが、気道上皮細胞の PAR-2 受容体  
を介して TSLP が放出される機序を明らかにした<sup>2)</sup>。慢性鼻副鼻腔炎鼻茸上皮には TSLP が高発  
現していること<sup>7, 8)</sup>、鼻茸抽出物中のプロ蛋白質  
転換酵素が切断型 TSLP を生成して、樹状細胞と  
ILC2s を強力に活性化させることなども報告され  
ている<sup>9)</sup>。

## 2) IL-25

IL-25 は IL-17E としても知られ、IL-17 ファミ  
リーに属し、上皮細胞、血管内皮細胞、マスト細  
胞、好酸球、マクロファージなどから産生され、  
IL-25 受容体 (IL-17RA と IL-17RB のヘテロ二量  
体) に結合して、Th2 細胞や ILC2s を活性化させ  
る<sup>10)</sup>。ヒト鼻粘膜上皮では苦みや甘み受容体を有  
する solitary chemosensory cell (brush cell と呼  
ばれる) が IL-25 を産生し、慢性鼻副鼻腔炎鼻茸  
上皮では solitary chemosensory cell が増加してい  
ること、IL-13 が solitary chemosensory cell の細  
胞増殖と IL-25 産生を促進することが報告されて  
いる<sup>11, 12)</sup>。われわれは、ハウスダスト (HDM)  
やスギ花粉などのアレルゲンに含有されるプロテ  
アーゼ刺激により、PAR-2 受容体を介して気管支  
上皮細胞や鼻粘膜上皮細胞から IL-25 が放出され  
ることを明らかにした<sup>1, 13)</sup>。慢性鼻副鼻腔炎鼻茸  
上皮では IL-25 が高発現し<sup>14)</sup>、IL-25 の mRNA の  
発現は CT スコアによる重症度と相関する<sup>15)</sup>。

## 3) IL-33

IL-33 は IL-1 ファミリーに属し、上皮細胞や血  
管内皮細胞、線維芽細胞などの核内に発現してい  
る。細胞傷害、アレルゲンの曝露、ウイルスや細  
菌、寄生虫感染などによって細胞外へ放出され、  
ST2 と IL-1RAP (IL-1 receptor accessory protein)  
の二量体に結合して、Th2 細胞、ILC2s、樹状細胞、  
好酸球、好塩基球、マスト細胞などを活性化させ  
る<sup>16)</sup>。細胞傷害後 1 時間で急速に細胞外へ放出さ  
れるが、この放出は一過性であるため、恒常的に

細胞外に IL-33 を検出することは難しい。

恒常状態では、IL-33 は未熟型として上皮細胞  
の核内に存在するが、アレルゲンや細菌、ウイル  
スの曝露により、アレルゲン由来の外因性プロテ  
アーゼや、マスト細胞や好中球由来の内因性プロ  
テアーゼによって切断され、成熟型の IL-33 とし  
て働く<sup>17)~19)</sup>。われわれは、アルテルナリアのプ  
ロテアーゼ刺激により気道上皮細胞で ATP が産  
生され、ATP 受容体の P2Y2R を介して IL-33 が  
放出されること、凍結融解による細胞壊死により  
IL-33 放出が誘導されることなどを明らかにして  
いる<sup>3)</sup>。慢性鼻副鼻腔炎の鼻粘膜や鼻茸では IL-  
33 と ST2 受容体の発現が亢進している<sup>15, 20, 21)</sup>。

## 4) 好酸球性鼻副鼻腔炎における TSLP, IL-25, IL-33 の発現

健常人の下鼻甲介 (IT) と鉤状突起 (UT)、慢  
性鼻副鼻腔炎患者と好酸球性鼻副鼻腔炎患者の下  
鼻甲介 (IT) と鼻茸 (NP) から得た鼻粘膜上皮  
細胞を培養し、TSLP と IL-25, IL-33 の蛋白量と  
mRNA 発現について比較検討した。TSLP と IL-25  
の mRNA 発現と、IL-25 と IL-33 の蛋白濃度は、  
健常人に比べて慢性鼻副鼻腔炎で増加し、好酸  
球性鼻副鼻腔炎でさらに増加していた (図 1)。  
鼻茸上皮の免疫組織染色では、TSLP, IL-25,  
IL-33 ともに好酸球性鼻副鼻腔炎で発現が亢進し  
ていた (図 2)。また、TSLP と IL-25 の mRNA  
発現は Lund-Mackay スコアによる CT での重症  
度と相関し (図 3)、TSLP と IL-33 の mRNA 発  
現は鼻茸中の浸潤好酸球数と相関した<sup>22)</sup>。

次に、健常人の鉤状突起、慢性鼻副鼻腔炎と好  
酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸から得た鼻粘膜上皮細胞  
を培養し、アレルゲンやプロテアーゼ刺激による  
TSLP, IL-25 産生について検討した。HDM やア  
ルテルナリア、黄色ブドウ球菌由来プロテアー  
ゼ、トリブシン、パパイン刺激によって TSLP,  
IL-25 が産生され、好酸球性鼻副鼻腔炎由来の培  
養鼻粘膜上皮細胞では、有意に産生量が増加し  
た<sup>22)</sup> (図 4)。

われわれは、気道上皮細胞からの TSLP や IL-  
25 の産生に PAR-2 がかわり<sup>1, 2)</sup>、IL-33 の産生  
に ATP を介して P2Y2R がかわることを見出し

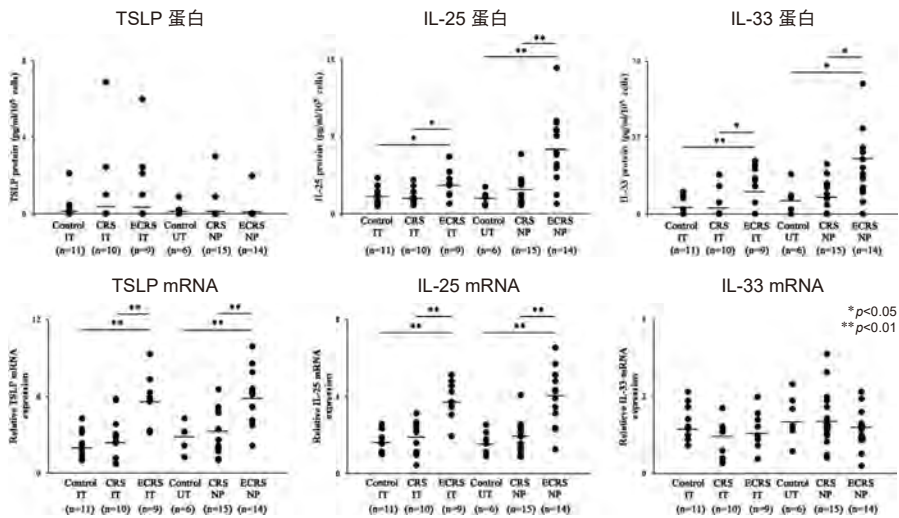


図1 健常人と慢性鼻副鼻腔炎 (CRS), 好酸球性鼻副鼻腔炎 (ECRS) の下鼻甲介 (IT), 鉤状突起 (UT), 鼻茸 (NP) 由来の培養鼻粘膜上皮細胞における, TSLP, IL-25, IL-33 蛋白量と mRNA 発現<sup>22)</sup>

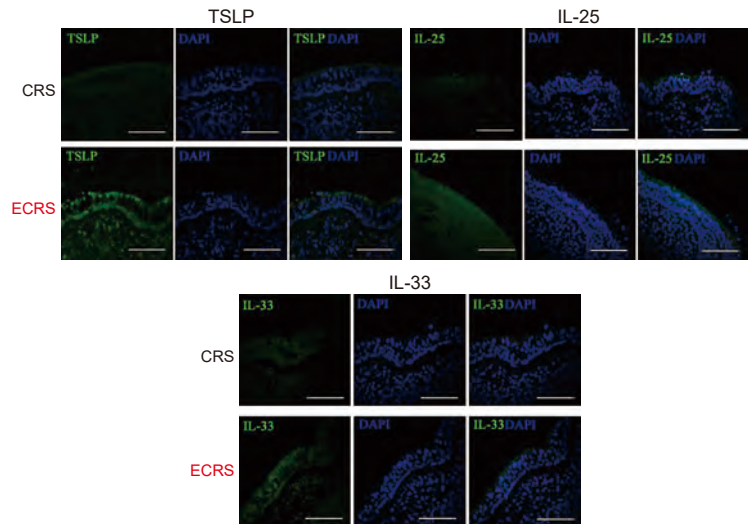


図2 慢性鼻副鼻腔炎 (CRS) と好酸球性鼻副鼻腔炎 (ECRS) 鼻茸上皮における, TSLP, IL-25, IL-33 の免疫組織染色<sup>22)</sup>

た<sup>3)</sup>. そこで, 下鼻甲介や鉤状突起, 鼻茸から得た培養鼻粘膜上皮細胞で PAR-2 と P2Y2R の mRNA 発現を検討したところ, 好酸球性鼻副鼻腔炎で有意に亢進していた. 鼻茸の免疫組織染色でも, 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸の上皮細胞でいずれも発現が亢進していた (図5). さらに, TSLP と IL-25 の mRNA 発現は PAR-2 の mRNA 発現と相関し, IL-33 の mRNA 発現は P2Y2R の mRNA 発現と相関した<sup>22)</sup>.

このように, 好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻粘膜や鼻茸上皮では, アレルゲン刺激により TSLP, IL-25, IL-33 産生が促進され, PAR-2 や P2Y2R を介

した上皮由来サイトカインの産生が, 好酸球浸潤や CT スコアによる重症度とかがわっている. TSLP, IL-25, IL-33 産生機序の解明とその制御は新たな治療ターゲットになる可能性がある.

### 3. 2型自然リンパ球 (ILC2s)

#### 1) 自然リンパ球サブセット

自然リンパ球は, 遺伝子再構成による抗原特異的受容体を持たず, 樹状細胞や T 細胞, B 細胞その他の血球系細胞に特徴的な表面抗原マーカー (lineage markers) を発現しないリンパ球で,

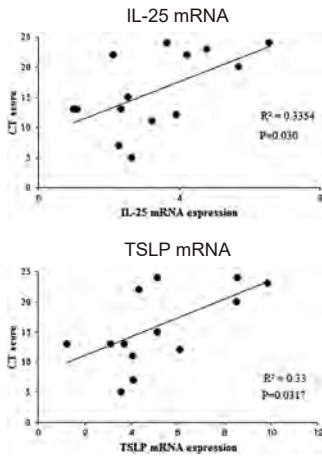


図3 好酸球形鼻副鼻腔炎鼻茸由来の培養鼻粘膜上皮細胞の TSLP, IL-25 の mRNA 発現と Lund-Mackay CT スコアによる重症度との相関<sup>31)</sup>

1975年にNK細胞が報告され、1997年には胎生期のリンパ節やパイエル板などのリンパ組織形成にかかわる、リンパ組織誘導細胞(LTi細胞: lymphoid tissue inducer cell)が報告された<sup>23, 24)</sup>。その後、新たな自然リンパ球として、2010年には2型サイトカインを産生する、NH (natural helper) 細胞<sup>25)</sup>、nuocyte<sup>26)</sup>、Ih2 (innate helper type 2) 細胞<sup>27)</sup>などが報告された。次いで、IFN- $\gamma$  など1型サイトカインを産生する細胞群や、IL-17やIL-22など3型サイトカインを産生する細胞群が同定され、2013年には、それぞれTh1, Th2,

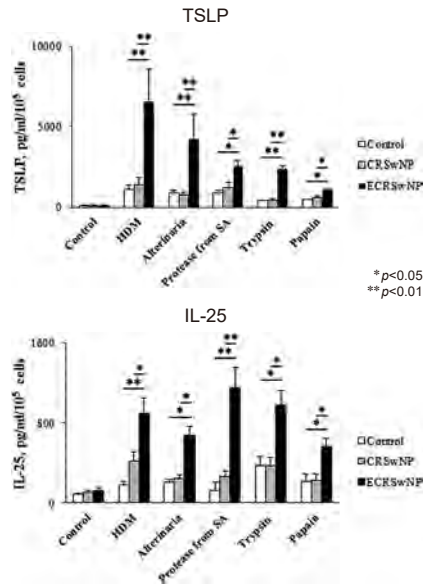


図4 健常人の鉤状突起と慢性鼻副鼻腔炎鼻茸, 好酸球形鼻副鼻腔炎鼻茸由来の培養鼻粘膜上皮細胞からの TSLP と IL-25 産生<sup>22)</sup>: HDM (100  $\mu$ g/ml), *Alternaria* (400  $\mu$ g/ml), protease from *S. aureus* (1  $\mu$ g/ml), trypsin (100 nM), papain (1  $\mu$ M), Poly(I:C) (10  $\mu$ g/ml)

Th17サブセットに対応して、1型(ILC1s), 2型(ILC2s), 3型自然リンパ球(ILC3s)に分類された<sup>23, 28)</sup>。

ILC1sは、転写因子T-betを発現し、IL-12やIL-18に反応してIFN- $\gamma$ を産生する細胞群で、癌細胞やウイルス感染細胞などの標的細胞を認識して、パーフォリンやグランザイムを産生して細胞

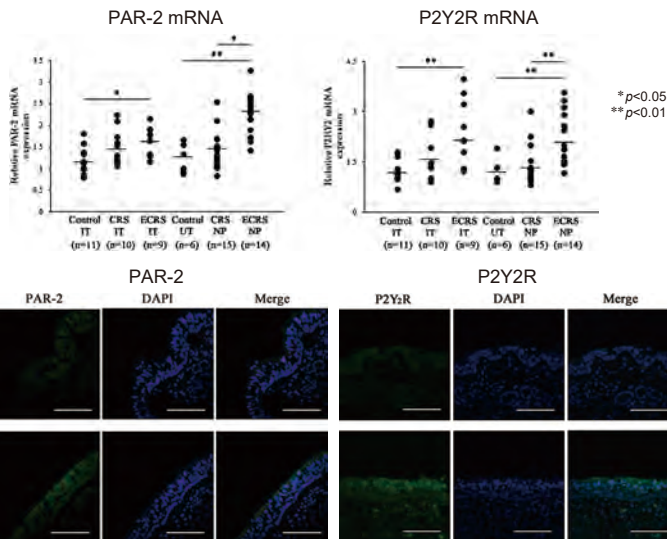


図5 健常人と慢性鼻副鼻腔炎(CRS), 好酸球形鼻副鼻腔炎(ECRS)の下鼻甲介(IT), 鉤状突起(UT), 鼻茸(NP)由来の培養鼻粘膜上皮細胞における, PAR-2とP2Y2RのmRNA発現と, 鼻茸上皮の免疫組織染色<sup>22)</sup>

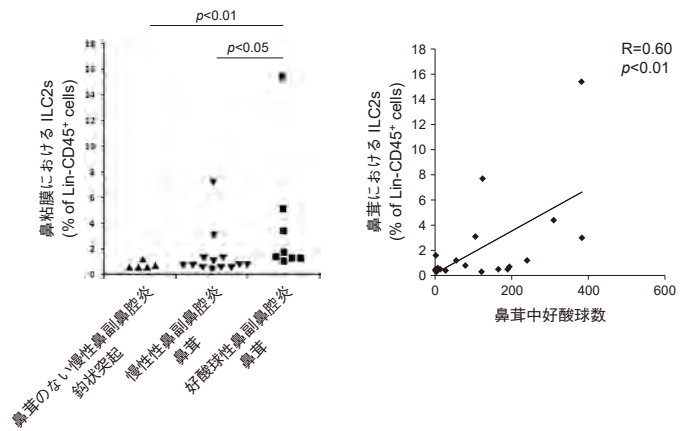


図6 鼻茸のない慢性鼻副鼻腔炎の鉤状突起、慢性鼻副鼻腔炎と好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸における ILC2s の割合と、組織中好酸球数との相関<sup>31)</sup>

傷害性を発揮する NK 細胞と、細胞傷害性は乏しいがマクロファージによる貪食作用を活性化する ILC1 が含まれ、抗腫瘍免疫や細胞内病原体に対する免疫応答にかかわる。

ILC2s は、IL-33 受容体の ST2 や IL-25 受容体の IL-17RB, PGD<sub>2</sub> 受容体の CRTH2 などを発現し、その分化と機能発現に IL-7 と転写因子 GATA3 がかわる。TSLP や IL-25, IL-33 に反応して多量の IL-5 や IL-13 を産生し、寄生虫感染に対する免疫応答やアレルギー疾患の病態形成にかかわり、amphiregulin を産生して気道上皮の修復にも働く<sup>29)</sup>。

ILC3s は、その分化と機能発現に IL-7 と転写因子 RORγt がかわり、IL-1β や IL-23 に反応して IL-17, IL-22 を産生する細胞群で、LTi 細胞、NCR<sup>+</sup>ILC3, NCR ILC3 のサブセットに分類され、細胞外病原体に対する免疫応答や腸管上皮における自然免疫にかかわる。

このうち、ILC2s は、TSLP や IL-25, IL-33 に反応して 2 型炎症を誘導し、気道粘膜やアトピー性皮膚炎の皮膚などとともに、慢性鼻副鼻腔炎鼻茸でも確認され<sup>30)</sup>、篩骨洞粘膜中の ILC2s の割合が鼻茸を伴う慢性鼻副鼻腔炎で多いと報告されている<sup>21)</sup>。そこで、本項では TSLP や IL-25, IL-33 の発現が亢進している好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における ILC2s の役割について検討した。

## 2) 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸における 2 型自然リンパ球 (ILC2s)

われわれは、フローサイトメトリーを利用して鼻茸組織と血液から ILC2s (Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CRTH<sup>+</sup>) を分離同定し、鼻茸由来の ILC2s が血液由来の ILC2s と同様に、IL-2 と IL-33 刺激により多量の IL-5 と IL-13 を産生するとともに自己増殖することを確認した。また、好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸では、鼻茸を伴わない慢性鼻副鼻腔炎の鉤状突起粘膜や慢性鼻副鼻腔炎鼻茸に比べて有意に ILC2s の割合が高く、ILC2s の割合と浸潤好酸球数が相関していた<sup>31, 32)</sup> (図 6)。好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸では TSLP や IL-25, IL-33 に反応して ILC2s が多量の IL-5, IL-13 を産生して、2 型炎症の病態形成に重要であると考えられる。

ステロイドの内服治療によって鼻茸中の ILC2s はアポトーシスを生じて減少することが報告されている<sup>33)</sup>。近年、制御系サイトカインの IL-10 を産生する制御性自然リンパ球 (ILCreg) が、好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸で増加し、IL-13 の存在下で上皮細胞から産生されるレチノイン酸によって ILC2s から誘導されることが報告され<sup>34)</sup>、過剰な好酸球性炎症を制御している可能性が考えられる。また、ILC2s は IL-1β や IL-12 によって、IFN-γ を産生する ILC1s の性質に変化することも報告され<sup>35)</sup>、ILC2s は周囲の微小環境でその性質が変化すると考えられる。

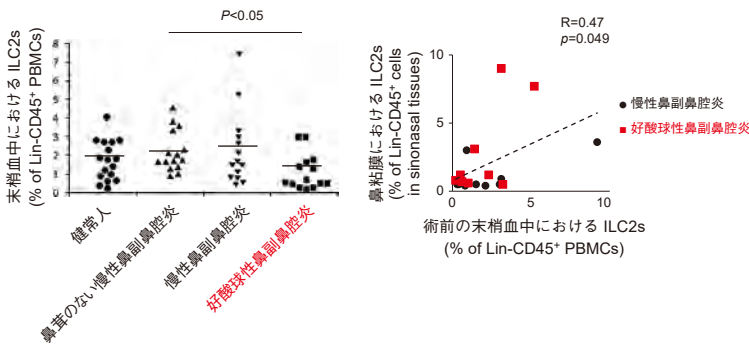


図7 健常人と鼻茸のない慢性鼻副鼻腔炎、鼻茸のある慢性鼻副鼻腔炎、好酸球性鼻副鼻腔炎患者の血液中 ILC2s の割合と、鼻茸中の ILC2s との相関<sup>31)</sup>

### 3) 好酸球性鼻副鼻腔炎末梢血における 2 型自然リンパ球 (ILC2s)

ILC2s は胎生期に分化して組織内に常駐する寿命の長い細胞と考えられるが、炎症時には骨髄から ILC2s の前駆細胞が炎症局所へ遊走することがマウスで確認されている<sup>36)</sup>。われわれの検討では、血液中の ILC2s と鼻粘膜中の ILC2s の割合に正の相関を認めたが、好酸球性鼻副鼻腔炎患者の血液中の ILC2s は健常人などに比べても増加していない<sup>31)</sup> (図 7)。NSAIDs 過敏喘息 (アスピリン喘息) 患者の鼻内に COX-1 抑制薬を点鼻投与すると、鼻粘膜の ILC2s は増加するが、血液中の ILC2s は低下する<sup>37)</sup>。血液中の ILC2s の役割についてはよくわかっていないが、好酸球性鼻副鼻腔炎では鼻粘膜組織内へ遊走する役割が考えられる。

われわれは、好酸球性鼻副鼻腔炎 12 例と慢性鼻副鼻腔炎 10 例を対象に、内視鏡下鼻副鼻腔手術 (ESS) の術前と、術後平均 6 か月での血液中の ILC2s の割合を末梢血好酸球数とともに測定し、術後平均 14 か月での CT 評価による予後との関連を検討した。その結果、ESS によって、末梢血の ILC2s の割合は、末梢血好酸球数や Lund-Mackay CT (LMK-CT) スコアとともに低下した。さらに、末梢血における ILC2s の割合は、予後良好群 (LMK-CT スコア  $\geq 50\%$ ) では術後 6 か月で低下したが、予後不良群 (LMK-CT スコア  $< 50\%$ ) では低下しなかった<sup>38)</sup> (図 8)。術後 6 か月時点での末梢血における ILC2s の低下は、その後の予後予測に有用であると考えられる。

### 4) 好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における 2 型自然リンパ球 (ILC2s) の役割

好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における 2 型自然リンパ球の役割を図 9 に示す。ダニや真菌、花粉などのアレルゲンや病原微生物の刺激は、PAR-2 受容体などを介して鼻粘膜上皮細胞から TSLP, IL-25, IL-33 を産生させ、ILC2s を活性化させる。また、マスト細胞などから放出されるシステニルロイコトリエン (CysLTs: LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>) やプロスタグランジン (PG) D<sub>2</sub> は、CysLT1, CRTH2 受容体を介して ILC2s を活性化し、IL-4, IL-5, IL-13 などの 2 型サイトカインが産生される。IL-5 は好酸球の集簇や活性化に、IL-4, IL-13 は IgE 抗体産生、杯細胞の過形成と粘液分泌、フィブリン網の形成など、組織リモデリングにかかわる。近年、Th2 細胞から産生され鼻茸内で増加している、TNF スーパーファミリーに属する RANK-L (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) が ILC2s を活性化することが報告された<sup>39)</sup>。ILC2s の活性化や制御機構についてはまだわかっていないことも多く、新たな治療ターゲットとして重要である<sup>40)</sup>。

## 4. 内因性プロテアーゼインヒビターを利用した治療戦略

### 1) 内因性プロテアーゼインヒビター

気道炎症においては、花粉やダニ、真菌などのアレルゲン由来や、細菌、ウイルス由来の外因性プロテアーゼと、好中球エラスターゼやマスト細胞由来のトリプターゼ、キマーゼなどの内因性プロテアーゼが病態形成に深くかかわる<sup>41, 42)</sup>。アレ

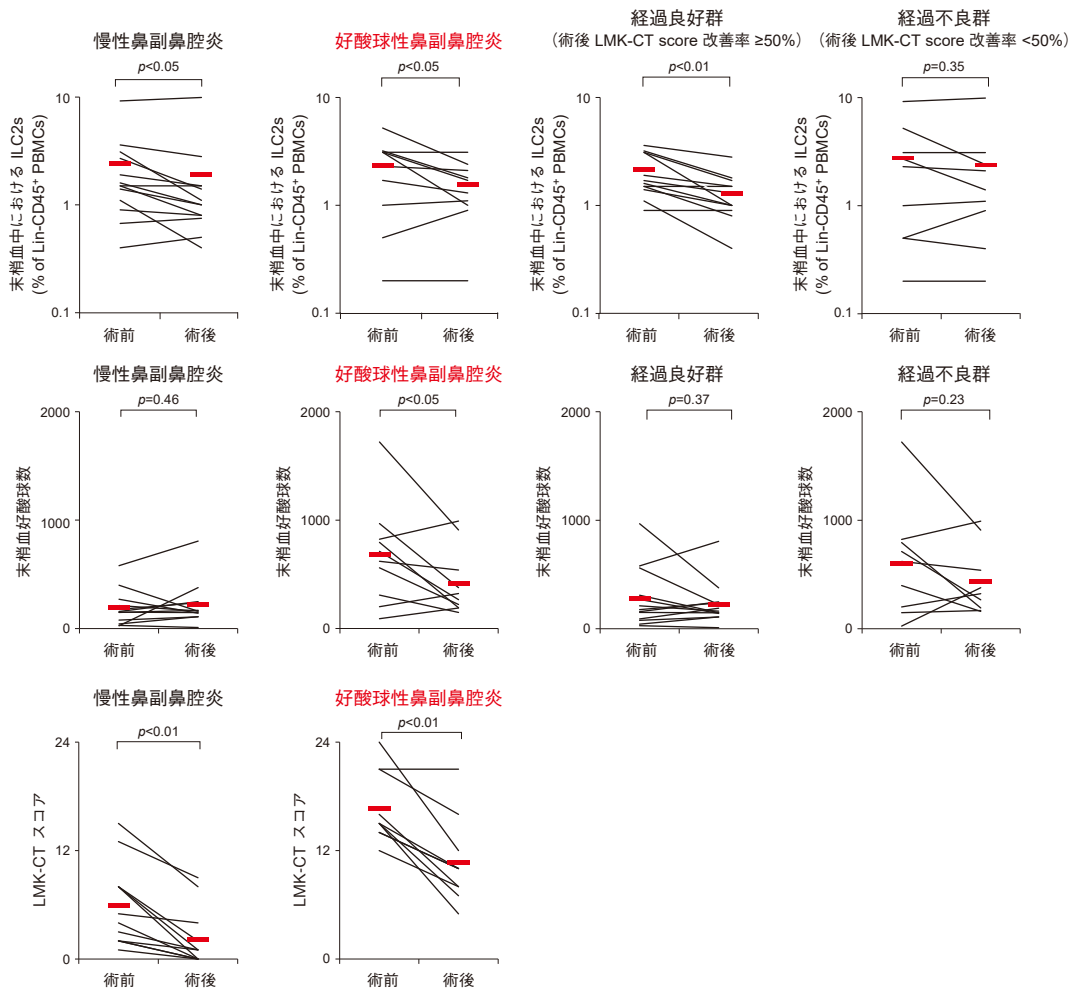


図8 内視鏡下鼻副鼻腔手術 (ESS) の術前と術後平均6か月での血液中の ILC2s の割合, 末梢血好酸球数と, 術後14 か月での CT 評価による予後との関連<sup>38)</sup>

ルゲンなどに由来する外因性プロテアーゼは, 上皮のバリア機能を破綻させアレルギーの侵入を容易にするとともに, 内因性プロテアーゼとともに, PARs (protease activated receptors) を介した自然免疫反応を誘導する。上皮細胞から TSLP, IL-25, IL-33 産生を促進し, マスト細胞や好酸球, 好塩基球, 線維芽細胞などを活性化させて, 2 型炎症を増悪させる<sup>1)~3) 13, 43)</sup>。トロンビンなどの凝固因子も多くはセリンプロテアーゼで, PARs を介して上皮細胞や線維芽細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生を促進する<sup>44)~46)</sup>。

一方, 生体内には内因性プロテアーゼインヒビターが備わっていて, 外因性, 内因性プロテアーゼの作用を制御している。アトピー性皮膚炎と

関連して, システインプロテアーゼインヒビターであるシスタチン A や SCCA2 (squamous cell carcinoma antigen 2) が, HDM の主要抗原である Der p 1 や Der f 1 の作用を抑制すること<sup>47)~49)</sup>, セリンプロテアーゼインヒビターである SPINK5 がカリクレイン 5 による PAR-2 を介した TSLP 産生を抑制することなどが報告されている<sup>50)</sup>。また, 慢性鼻副鼻腔炎の鼻粘膜では SPINK5 の発現が低下している<sup>51)</sup>。そのほか, エラスターゼインヒビターとして, SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor),  $\alpha$ 1-antitrypsin, elafin などが知られている<sup>41)</sup>。

このように, 内因性プロテアーゼインヒビターは気道炎症を制御すると考えられるが, 気道上皮

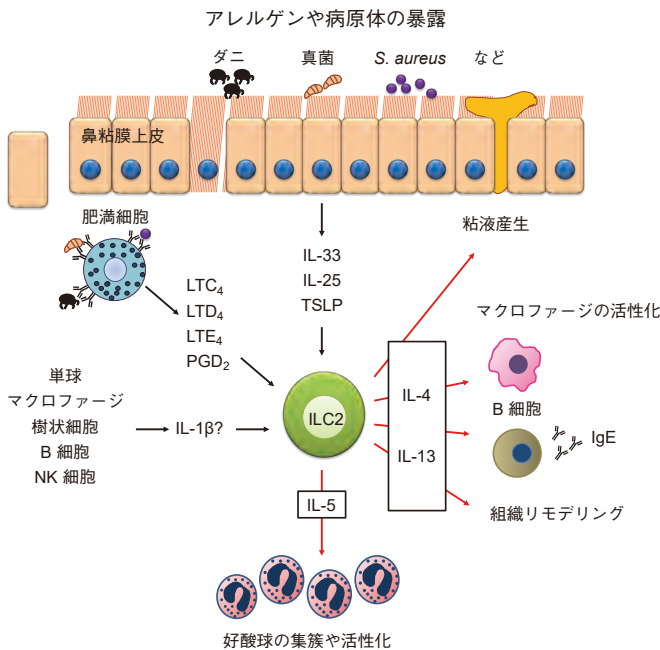


図9 好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における2型自然リンパ球 (ILC2s) の役割

細胞における働きや、鼻副鼻腔の炎症病態における役割はほとんど検討されていない。そこで、本項では好酸球性鼻副鼻腔炎における役割について検討した。

## 2) 好酸球性鼻副鼻腔炎における内因性プロテアーゼインヒビターの役割

健常人の下鼻甲介 (IT) と鉤状突起 (UT)、慢性鼻副鼻腔炎患者と好酸球性鼻副鼻腔炎患者の下鼻甲介 (IT) と鼻茸 (NP) から得た鼻粘膜上皮細胞を培養し、シスタチン A (システインプロテ

アーゼインヒビター) と SPINK5 (セリンプロテアーゼインヒビター) の蛋白量と mRNA 発現について比較検討した。シスタチン A と SPINK5 の発現は好酸球性鼻副鼻腔炎の下鼻甲介や鼻茸由来の培養鼻粘膜上皮細胞で有意に低下していた。鼻茸の免疫染色でも好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸上皮では、シスタチン A と SPINK5 の発現が低下していた (図 10)<sup>52)</sup>。

次に、培養ヒト正常気管支上皮 (NHBE: normal human bronchial epithelial) 細胞をトリプシン、パパインで刺激し TSLP、IL-25 産生に対する、

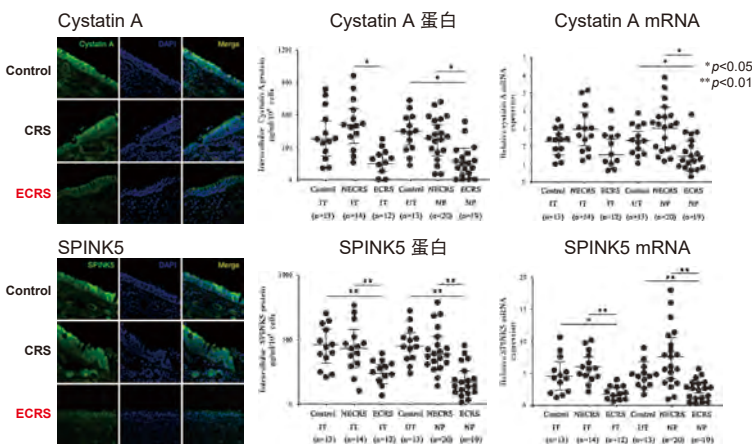


図10 鼻茸上皮におけるシスタチン A と SPINK5 の免疫染色と、健常人と慢性鼻副鼻腔炎 (CRS)、好酸球性鼻副鼻腔炎 (ECRS) の下鼻甲介 (IT)、鉤状突起 (UT)、鼻茸 (NP) 由来の培養鼻粘膜上皮細胞における、シスタチン A と SPINK5 の蛋白量と mRNA 発現<sup>52)</sup>



シスタチン A と SPINK5 の作用を検討した。セリンプロテアーゼのトリプシンはセリンプロテアーゼインヒビターの SPINK5 で前処理すると TSLP, IL-25 産生が抑制され、システインプロテアーゼのパパインはシステインプロテアーゼインヒビターのシスタチン A の前処理で TSLP, IL-25 産生が抑制された。シスタチン A と SPINK5 はそれぞれ特異的にシステインプロテアーゼとセリンプロテアーゼの作用を抑制すると考えられる。また、HDM とアルテルナリア、黄色ブドウ球菌由来プロ

ロテアーゼ刺激による、NHBE 細胞からの TSLP, IL-25, IL-33 産生はいずれもシスタチン A と SPINK5 との前処理で抑制され、シスタチン A と SPINK5 には相加作用が認められた (図 11)。さらに、siRNA で NHBE 細胞におけるシスタチン A と SPINK5 の発現をノックダウンさせると、それぞれの刺激による TSLP, IL-25, IL-33 がいずれも有意に増加した (図 12)。つまり、外因性プロテアーゼの機能を抑制する内因性プロテアーゼインヒビターのシスタチン A と SPINK5 が気道

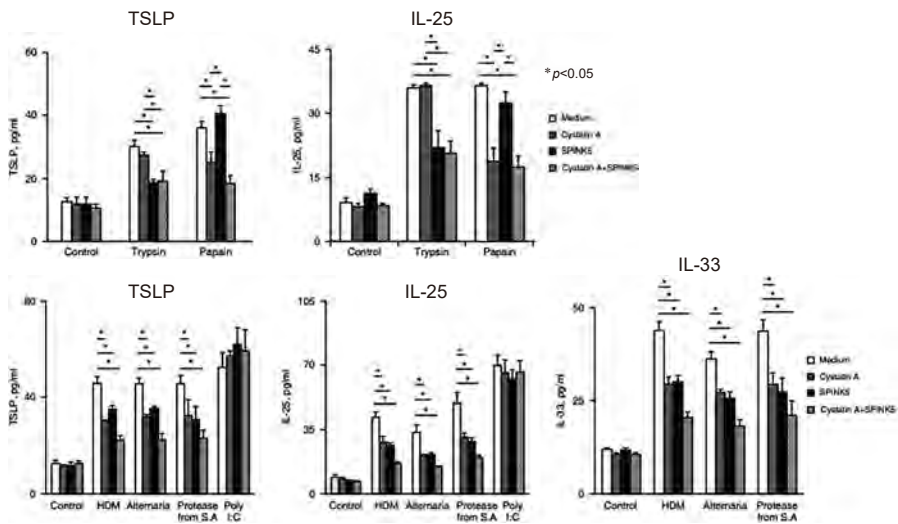


図 11 トリプシン (セリンプロテアーゼ)、パパイン (システインプロテアーゼ) と HDM, アルテルナリア, 黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼ刺激による、正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) 細胞からの TSLP, IL-25, IL-33 産生に対する、シスタチン A と SPINK5 の前処理の効果<sup>52)</sup>

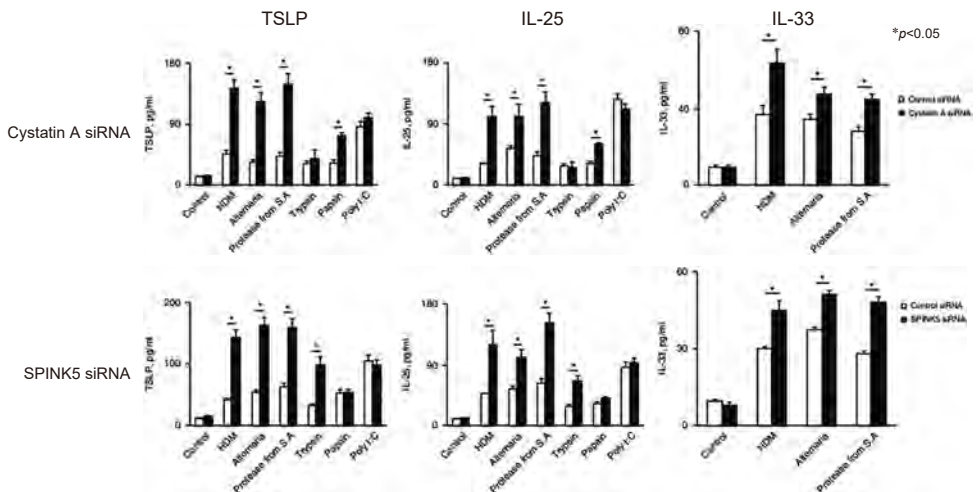


図 12 siRNA でシスタチン A と SPINK5 の発現をノックダウンさせた正常ヒト気管支上皮 (NHBE) 細胞における、アレルゲン刺激による TSLP, IL-25, IL-33 産生<sup>52)</sup>

上皮細胞に内在していて、プロテアーゼ刺激による炎症反応を制御しているが、好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻粘膜では発現が低下している<sup>52)</sup>。

### 3) 好酸球性慢性炎症マウスモデルにおける内因性プロテアーゼインヒビターの点鼻投与の効果

HDM とアルテルナリア, 黄色ブドウ球菌由来

プロテアーゼを混合したアレルゲン (MAAs : multiple airborne allergens) を1日おきに16週間点鼻投与して好酸球性慢性炎症のマウスモデルを作成し、鼻腔洗浄液 (NL) 中の好中球と好酸球, VEGF, シスタチン A と SPINK5, 鼻粘膜組織中の IL-5 と IL-13, IL-33, 血清中の IgE と、鼻粘膜の組織変化について検討した。このマウスモデルでは、IgE 産生や鼻粘膜での好酸球浸潤が誘導

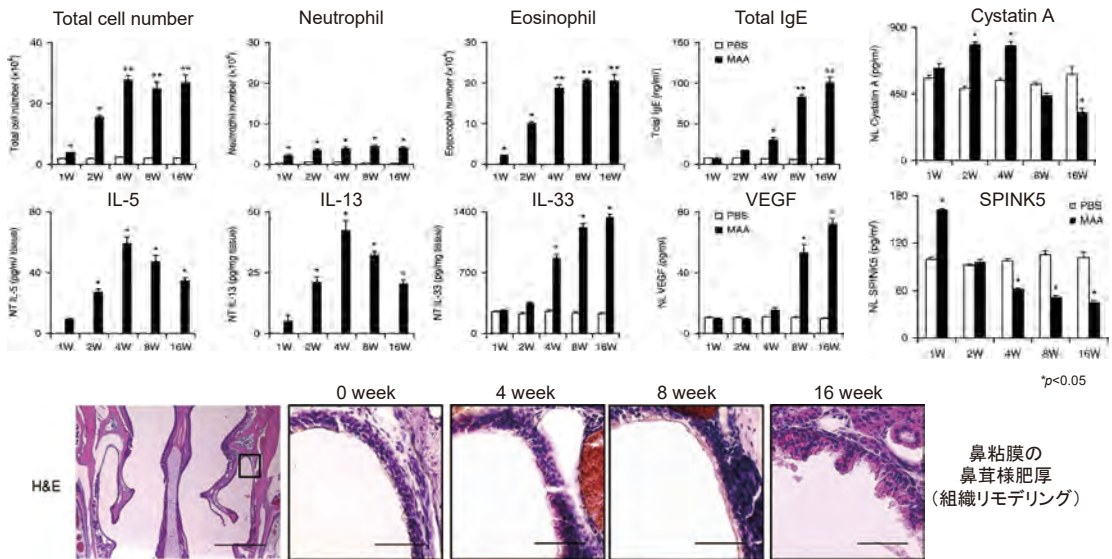


図 13 HDM とアルテルナリア, 黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼを混合したアレルゲン (MAAs : multiple airborne allergens) を1日おきに16週間点鼻投与して作成した好酸球性慢性炎症のマウスモデルにおける、鼻腔洗浄液 (NL) 中の好中球と好酸球, VEGF, シスタチン A と SPINK5, 鼻粘膜組織中の IL-5 と IL-13, IL-33, 血清中の IgE と、鼻粘膜の組織変化 (HE 染色)<sup>52)</sup>

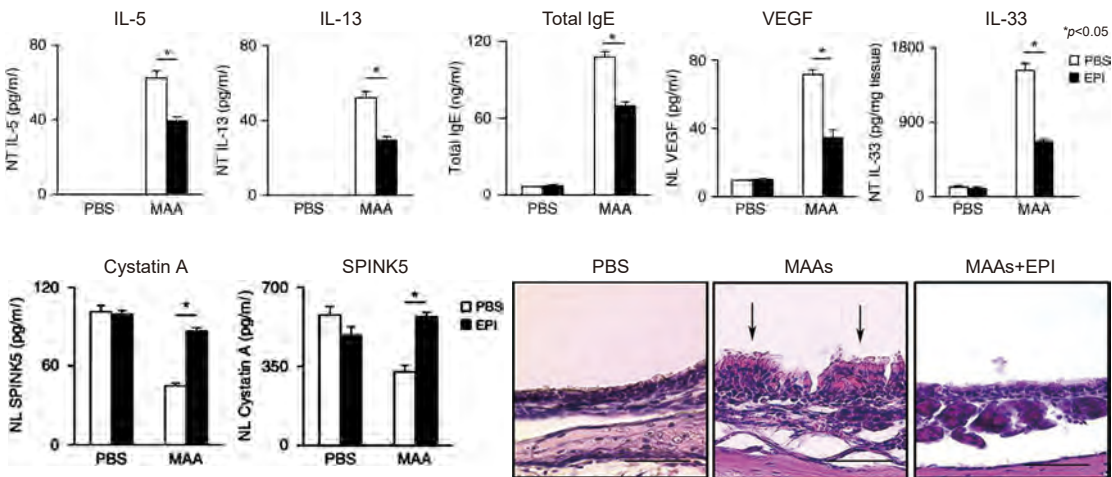


図 14 MAAs の16週間点鼻で作成した好酸球性慢性炎症マウスモデルにおける、シスタチン A と SPINK5 (EPI : endogenous protease inhibitors) の点鼻投与の効果, 4週後の組織中 IL-5, IL-13 濃度と、16週後の組織中 IL-33 濃度, 血清 IgE, 鼻腔洗浄液 (NL) 中 VEGF, シスタチン A, SPINK5 と16週後の鼻粘膜の鼻茸様変化 (HE 染色)<sup>52)</sup>

され、鼻粘膜組織中のIL-5とIL-13は4週後をピークに増加するが16週後には徐々に減少する。一方、組織中のIL-33やNL中のVEGFは8～16週後に増加し、16週後には鼻粘膜に鼻茸様の変化が認められ、慢性炎症による組織リモデリングが生じる。NL中のシスタチンAは4週後をピークにいったん増加するが、8～16週後には減少し、SPINK5は1週間後をピークに一旦増加するが、4～16週後には減少し、鼻粘膜上皮の蛍光免疫染色でも同様の変化が認められる(図13)。

そこで、このマウスモデルを用いてシスタチンAとSPINK5(EPI: endogenous protease inhibitors)の点鼻投与の効果を検討した。4週後の組織中

IL-5、IL-13濃度や、16週後の組織中IL-33濃度とNL中VEGF、血清IgE値の上昇はいずれもEPIの点鼻投与で抑制された。また、16週後のNL中のシスタチンAとSPINK5の減少や免疫組織化学による鼻粘膜上皮での発現低下はEPIの点鼻投与で回復した。さらに、EPIの点鼻投与は鼻粘膜の鼻茸様変化も抑制した(図14)<sup>52)</sup>。このように、内因性プロテアーゼインヒビターは複数アレルゲンの長期刺激による好酸球性慢性炎症を制御し、鼻粘膜上皮における鼻茸様の組織リモデリングを抑制できる可能性があり、新たな局所治療薬としての可能性が考えられる。

## まとめ

### 疑問：自然免疫の役割は？

**答え：**好酸球性鼻副鼻腔炎では、鼻粘膜上皮におけるTSLP、IL-25、IL-33の発現が亢進し、CTスコアによる重症度や好酸球浸潤と相関する。好酸球性鼻副鼻腔炎由来の培養鼻粘膜上皮細胞ではHDMやアルテルナリア、黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼ刺激によるTSLP、IL-25、IL-33産生が亢進している。また、鼻茸中にはTSLP、IL-25、IL-33によって活性化され多量の2型サイトカインを放出する2型自然リンパ球(ILC2s)が増加し、好酸球浸潤と相関して病態形成にかかわる。

内因性プロテアーゼインヒビターのシスタチンAとSPINK5はHDMやアルテルナリア、黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼ刺激による気道上皮細胞からのTSLP、IL-25、IL-33産生を抑制するが、好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸上皮ではシスタチンAとSPINK5の発現が減少している。内因性プロテアーゼインヒビター(シスタチンAとSPINK5)の点鼻投与は、HDM、アルテルナリア、黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼの長期点鼻投与で作成した好酸球性慢性炎症のマウスモデルにおける組織リモデリングを抑制し、新たな局所治療薬としての可能性が考えられる。

## 文献

1. Kouzaki H, Tojima I, Kita H, et al. Transcription of interleukin-25 and extracellular release of the protein is regulated by allergen proteases in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:741-750.
2. Kouzaki H, O'Grady SM, Lawrence CB, et al. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 2009; 183:1427-1434.
3. Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, et al. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol* 2011;186: 4375-4387.
4. 清水猛史. 慢性炎症の概念と病態 炎症担当細胞の役割. *JOHNS* 2011;27:1729-1733.
5. Park LS, Martin U, Garka K, et al. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med* 2000;192:

- 659-670.
6. Corren J, Ziegler SF. TSLP: from allergy to cancer. *Nat Immunol* 2019;20:1603-1609.
  7. Kimura S, Pawankar R, Mori S, et al. Increased expression and role of thymic stromal lymphopoietin in nasal polyposis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011; 3:186-193.
  8. Mjösberg J, Bernink J, Golebski K, et al. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 2012;37:649-659.
  9. Poposki JA, Klingler AI, Stevens WW, et al. Proprotein convertases generate a highly functional heterodimeric form of thymic stromal lymphopoietin in humans. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:1559-1567. e1558.
  10. Divekar R, Kita H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015;15:98-103.
  11. Kohanski MA, Workman AD, Patel NN, et al. Solitary chemosensory cells are a primary epithelial source of IL-25 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:460-469. e467.
  12. Carey RM, Lee RJ. Taste receptors in upper airway innate immunity. *Nutrients* 2019;11.
  13. **Kouzaki H, Kikuoka H, Matsumoto K, et al. A mechanism of interleukin-25 production from airway epithelial cells induced by Japanese cedar pollen. *Clin Immunol* 2018;193:46-51.**
  14. Inuma T, Okamoto Y, Yamamoto H, et al. Interleukin-25 and mucosal T cells in noneosinophilic and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015;114:289-298.
  15. Lam M, Hull L, Imrie A, et al. Interleukin-25 and interleukin-33 as mediators of eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2015;29:175-181.
  16. Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): a nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev* 2018; 281:154-168.
  17. Cayrol C, Duval A, Schmitt P, et al. Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nat Immunol* 2018;19:375-385.
  18. Lefrançois E, Duval A, Mirey E, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:15502-15507.
  19. Roy A, Ganesh G, Sippola H, et al. Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation. *J Biol Chem* 2014;289:237-250.
  20. Baba S, Kondo K, Kanaya K, et al. Expression of IL-33 and its receptor ST2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope* 2014;124:E115-122.
  21. Shaw JL, Fakhri S, Citardi MJ, et al. IL-33-responsive innate lymphoid cells are an important source of IL-13 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:432-439.
  22. **Kouzaki H, Matsumoto K, Kato T, et al. Epithelial cell-derived cytokines contribute to the pathophysiology of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *J Interferon Cytokine Res* 2016;36: 169-179.**
  23. Spits H, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013;13:145-149.
  24. Hazenberg MD, Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood* 2014;124:700-709.
  25. Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 2010;463: 540-544.
  26. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010;464:1367-1370.
  27. Price AE, Liang HE, Sullivan BM, et al. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:11489-11494.
  28. 清水猛史. アレルギー性鼻炎研究の新たな展開 自然リンパ球. **JOHNS** 2016;32:684-688.
  29. Lam AJ, MacDonald KN, Pesenacker AM, et al. Innate control of tissue-reparative human regulatory T cells. *J Immunol* 2019;202:2195-2209.
  30. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol* 2011;12:1055-1062.
  31. **Tojima I, Kouzaki H, Shimizu S, et al. Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Clin Immunol* 2016;170:1-8.**
  32. **Tojima I, Shimizu T. Group 2 innate lymphoid**

- cells and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2019;19:18-25.**
33. Walford HH, Lund SJ, Baum RE, et al. Increased ILC2s in the eosinophilic nasal polyp endotype are associated with corticosteroid responsiveness. *Clin Immunol* 2014;155:126-135.
  34. Morita H, Kubo T, Rückert B, et al. Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:2190-2201.e2199.
  35. Bal SM, Bernink JH, Nagasawa M, et al. IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat Immunol* 2016;17:636-645.
  36. Ghaedi M, Takei F. Innate lymphoid cell development. *J Allergy Clin Immunol* 2021;147:1549-1560.
  37. Eastman JJ, Cavagnero KJ, Deconde AS, et al. Group 2 innate lymphoid cells are recruited to the nasal mucosa in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:101-108.e103.
  38. **Tojima I, Murao T, Nakamura K, et al. Increased blood group 2 innate lymphoid cells are associated with the clinical severity of Kimura disease. *Allergol Int* 2022.**
  39. Ogasawara N, Poposki JA, Klingler AI, et al. Role of RANK-L as a potential inducer of ILC2-mediated type 2 inflammation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Mucosal Immunol* 2020;13:86-95.
  40. 戸嶋一郎, 清水猛史. 上気道の好酸球性炎症におけるアラキドン酸代謝物を介した2型自然リンパ球活性化機構. *耳鼻免疫アレルギー* 2019;37:217-222.
  41. Takai T, Ikeda S. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases. *Allergol Int* 2011;60:25-35.
  42. Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:997-1008;quiz 1009.
  43. Hara K, Iijima K, Elias MK, et al. Airway uric acid is a sensor of inhaled protease allergens and initiates type 2 immune responses in respiratory mucosa. *J Immunol* 2014;192:4032-4042.
  44. Shimizu S, Shimizu T, Morser J, et al. Role of the coagulation system in allergic inflammation in the upper airways. *Clin Immunol* 2008;129:365-371.
  45. Shimizu S, Gabazza EC, Ogawa T, et al. Role of thrombin in chronic rhinosinusitis-associated tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy* 2011;25:7-11.
  46. Shimizu S, Tojima I, Takezawa K, et al. Thrombin and activated coagulation factor X stimulate the release of cytokines and fibronectin from nasal polyp fibroblasts. *Am J Rhinol Allergy* 2017;31:13-18.
  47. Ogawa T, Takai T, Kato T, et al. Upregulation of the release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from keratinocytes stimulated with cysteine protease activity of recombinant major mite allergens, Der f 1 and Der p 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146:27-35.
  48. Sakata Y, Arima K, Takai T, et al. The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1. *J Biol Chem* 2004;279:5081-5087.
  49. Kato T, Takai T, Mitsuishi K, et al. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: biochemical skin barrier against mite cysteine proteases. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:169-176.
  50. Briot A, Deraison C, Lacroix M, et al. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med* 2009;206:1135-1147.
  51. Fruth K, Goebel G, Koutsimpelas D, et al. Low SPINK5 expression in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2012;122:1198-1204.
  52. **Kouzaki H, Matsumoto K, Kikuoka H, et al. Endogenous protease inhibitors in airway epithelial cells contribute to eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:737-747.**

# VI 炎症制御因子の役割は？

## —制御性 T 細胞と制御系サイトカイン—

### 1. 制御性 T 細胞

#### 1) 制御性 T 細胞のサブセットと機能

制御性 T 細胞 (Treg) は、自己抗原に対する免疫学的無反応性の維持や、宿主にとって有害な過剰な免疫反応の抑制に働く<sup>1)</sup>。アレルギー性炎症に対しても、抗原提示細胞や Th2 細胞、2 型自然リンパ球 (ILC2s) の機能制御、B 細胞からの IgE 抗体産生抑制、制御系サイトカインの IL-10, IL-35, TGF- $\beta$  の産生、マスト細胞の機能制御など、獲得免疫と自然免疫の反応をとともに抑制して免疫寛容に働き、慢性炎症による気道リモデリングを抑制する<sup>2)</sup>。

制御性 T 細胞には、主として胸腺に由来する natural occurring Treg (nTreg) と末梢のリンパ組織でナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞から誘導される inducible Treg (iTreg) がある (図 1)<sup>3, 4)</sup>。Foxp3 は制御性 T 細胞のマスタート転写因子と考えられ<sup>5)</sup>、TGF- $\beta$  と IL-2 の存在下で CD4<sup>+</sup>T 細胞から Foxp3<sup>+</sup>Treg (iTreg) を誘導することができる<sup>6)</sup>。さらに、iTreg には、それぞれ特異的な表現型とサイトカイン産生能を有するサブタイプとして、IL-10 を産生する Tr1 (type 1 regulatory T) 細胞、TGF- $\beta$  を産生する Th3 細胞、IL-35 を産生する iTreg35 などが報告されている<sup>7, 8)</sup>。Tr1 細胞は、Foxp3 を持たない制御性 T 細胞の誘導性サブセットで、高レベルの IL-10 を産生する<sup>9)</sup>。われわれは、ダ

ニアレルギー性鼻炎では末梢血単核球中の Tr1 細胞が減少しているが、舌下免疫療法 1 年後には増加することを確認している。一方、Foxp3<sup>+</sup>Treg は IL-35, TGF- $\beta$  とともに IL-10 も産生する<sup>10)</sup>。

近年、制御性 T 細胞のうち、Foxp3 とともに IL-33 受容体の ST2 を発現し、IL-5 や IL-13 などの 2 型サイトカインを産生する細胞集団、ST2<sup>+</sup>Treg が報告された (図 1)<sup>11, 12)</sup>。IL-33 の存在下では免疫抑制活性を失い、2 型炎症を促進して喘息の難治化にかかわり、amphiregulin を産生して組織修復などにも働く可能性がある。

これまで、好酸球性鼻副鼻腔炎における制御性 T 細胞の役割についてはほとんど検討されていない。好酸球性慢性炎症病態の形成には、炎症を促進する因子と、炎症を抑制し収束させる因子の両方を考慮する必要がある。そこで、本項では炎症の制御にかかわる制御性 T 細胞の機能について、ST2<sup>+</sup>Treg の関与も含めて検討した。

#### 2) 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸における、Th2 細胞, Tr1 細胞, Foxp3<sup>+</sup>Treg, ST2<sup>+</sup>Treg

好酸球性鼻副鼻腔炎患者の末梢血単核球からフローサイトメトリーを利用して ST2<sup>+</sup>Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) を分離し、2 型サイトカインの IL-5, IL-13 の発現とメモリー T 細胞マーカーの CD45RO の発現について検討した (図 2)。ST2<sup>+</sup>Treg は ST2<sup>-</sup>Treg に比べて、IL-5,

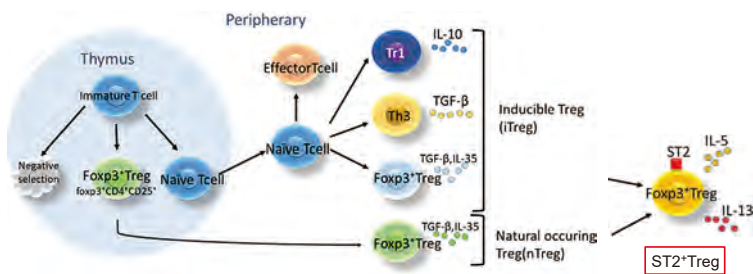


図 1 制御性 T 細胞サブセットと ST2<sup>+</sup>Treg

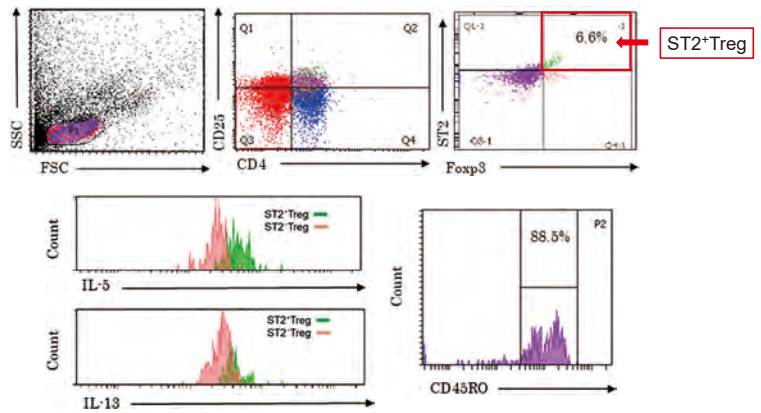


図2 末梢血単核球中の ST2<sup>+</sup>Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) は ST<sup>-</sup>Treg に比べて IL-5, IL-13 を多く発現し、メモリーT細胞のマーカーである CD45RO を発現していた。

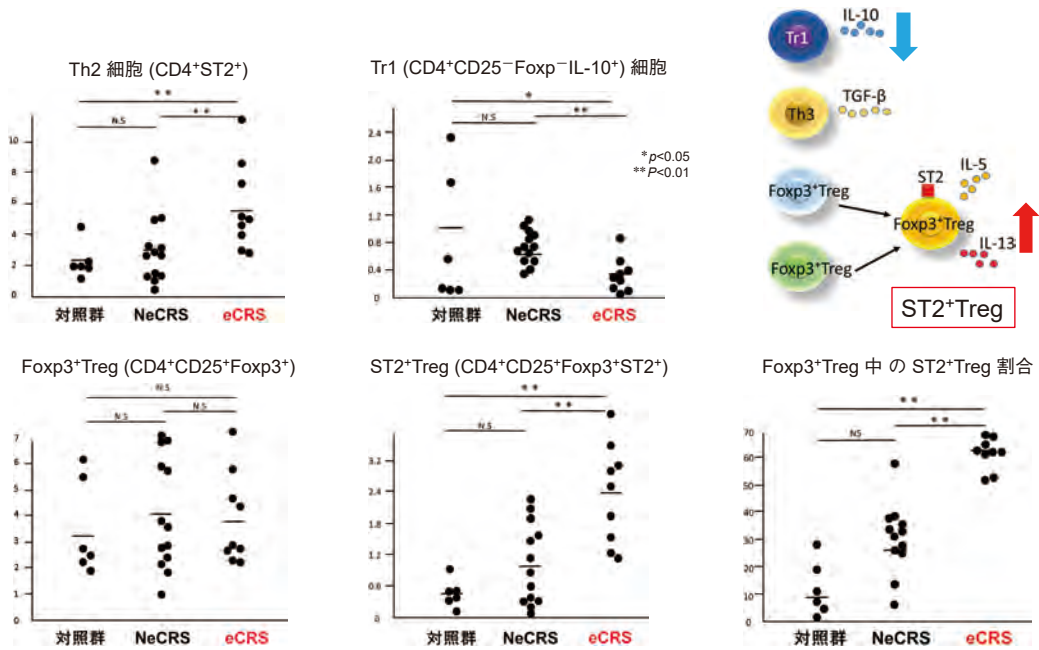


図3 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸中の各種細胞の CD4<sup>+</sup>T 細胞に占める割合 (%)  
非好酸球性鼻副鼻腔炎 (NeCRS) と好酸球性鼻副鼻腔炎 (eCRS)

IL-13 の発現が多く、CD45RO を発現することから、ST2<sup>+</sup>Treg はメモリー機能を有し、2型サイトカインを産生して炎症の増悪にかかわると考えられる。

次に、対照群としての健常者の鉤状突起粘膜、非好酸球性鼻副鼻腔炎 (NeCRS) の鼻茸、好酸球性鼻副鼻腔炎 (eCRS) の鼻茸における CD4<sup>+</sup>T 細胞中の Th2 (CD4<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>) 細胞、Tr1 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>) 細胞、Foxp3<sup>+</sup>Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) および ST2<sup>+</sup>Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) の割合を比較検討した。

CD4<sup>+</sup>T 細胞における Th2 細胞の割合は、非好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸と比較して好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸で有意に増加していた。一方、CD4<sup>+</sup>T 細胞中の Tr1 細胞の割合は有意に減少していた。Foxp3<sup>+</sup>Treg の割合には差がなかったが、ST2<sup>+</sup>Treg の割合は、好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸で有意に増加した。好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸では、Foxp3<sup>+</sup>Treg の 60% 程度が 2 型サイトカインを産生する ST2<sup>+</sup>Treg で占められていた (図 3)。

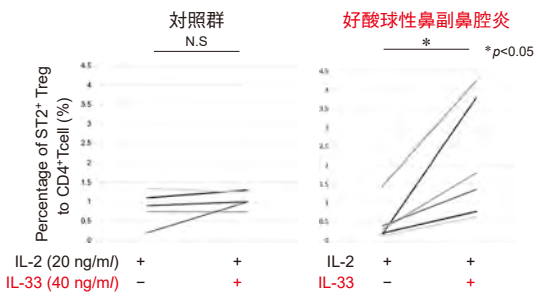


図4 IL-33によるST2<sup>+</sup>Tregの誘導

### 3) IL-33によるST2<sup>+</sup>Tregの誘導

好酸球性鼻副鼻腔炎患者および健常者の末梢血単核球をIL-2 (20 ng/ml) およびIL-33 (40 ng/ml) とともに72時間培養し、フローサイトメトリーによりCD4<sup>+</sup>T細胞中のST2<sup>+</sup>Tregの割合を調べた。好酸球性鼻副鼻腔炎患者の末梢血単核球では、IL-33刺激によってST2<sup>+</sup>Tregが有意に増加した(図4)。

以上の結果、好酸球性鼻副鼻腔炎ではIL-33の刺激によって、免疫抑制機能を失い2型サイトカインを産生して、炎症の増悪に作用するST2<sup>+</sup>Tregが誘導され、Foxp3<sup>+</sup>Tregの約60%がST2<sup>+</sup>Tregに置き換わっていた。また、IL-10を産生するTr1細胞も減少し、2型炎症の制御機構が損なわれていることが好酸球性慢性炎症の病態にかかわると考えられる。

## 2. 制御系サイトカイン

### 1) IL-10, IL-35, IL-27

制御性T細胞(Treg)から産生される代表的な制御系サイトカインにIL-10とIL-35がある。IL-10は、Th2細胞から分泌されTh1細胞からのIFN- $\gamma$ 産生などを抑制するサイトカインとして最初に同定された<sup>13)</sup>。その後、樹状細胞やマクロファージ、単球など多くの白血球サブセットから産生され、樹状細胞の抗原提示能低下、マクロファージからのサイトカイン産生抑制、CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖抑制などの免疫抑制作用を有する一方で、B細胞からの抗体産生や形質細胞への分化を誘導する多彩な機能を有することが明らかになった<sup>10, 14)</sup>。われわれは、スギ花粉舌下免疫療法後に

はスギ抗原(Cry j1)特異的に末梢血単核球からのIL-10産生が増加し、臨床症状の改善と関連することを明らかにし<sup>15)</sup>、IL-10は舌下免疫療法による免疫寛容に重要であると考えている。

IL-35は、IL-12サイトカインファミリーに属し、EBI-3とp35のヘテロ二量体で構成される。制御性T細胞(Treg)や制御性B細胞(Breg)から産生され、T細胞の分化・増殖を抑制して、免疫抑制に働く<sup>16)</sup>。われわれは、IL-35がTh2細胞や2型自然リンパ球(ILC2s)の細胞増殖とIL-5、IL-13産生を抑制し、B細胞からのIgE抗体産生を抑制すること<sup>17)</sup>、スギ花粉舌下免疫療法後にはスギ花粉飛散期に血清IL-35値が増加し、臨床症状の改善と関連することを明らかにし<sup>18)</sup>、IL-35も舌下免疫療法による免疫寛容にかかわると考えている。

IL-27も、IL-12サイトカインファミリーに属し、EBI-3とp28のヘテロ二量体で構成される。主として活性化した抗原提示細胞から産生され、Th1細胞やCD8<sup>+</sup>T細胞、濾胞性ヘルパーT(Tfh)細胞の分化を誘導する一方、さまざまな免疫抑制作用を有する<sup>19, 20)</sup>。Th2細胞やTh17細胞の分化やサイトカイン産生を抑制し、2型自然リンパ球(ILC2s)の機能を抑制して、2型炎症を制御する働きがある<sup>21)~23)</sup>。さらに、IL-27は、IL-10を産生する制御性T細胞サブセットのTr1細胞を誘導する<sup>24)</sup>。

好酸球性鼻副鼻腔炎の病態においても、炎症の収束にはこうした制御系サイトカインの働きが重要である。そこで、好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸中のIL-10, IL-35, IL-27について検討した。

### 2) 鼻茸中のIL-10, IL-35, IL-27濃度とIL-27産生細胞

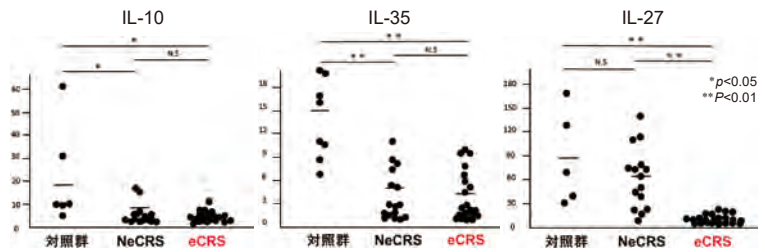
対照群としての健常人の鉤状突起粘膜、非好酸球性鼻副鼻腔炎(NeCRS)の鼻茸、そして好酸球性鼻副鼻腔炎(eCRS)の鼻茸中のIL-10, IL-35, IL-27について、総蛋白濃度(mg/ml)分のIL-10, IL-35あるいはIL-27蛋白濃度(pg/ml)で表示して、比較検討した(図5)。鼻茸中のIL-10とIL-35は、健常人の鉤状突起粘膜に比べて有意に低下していたが、非好酸球性鼻副鼻腔炎と好酸



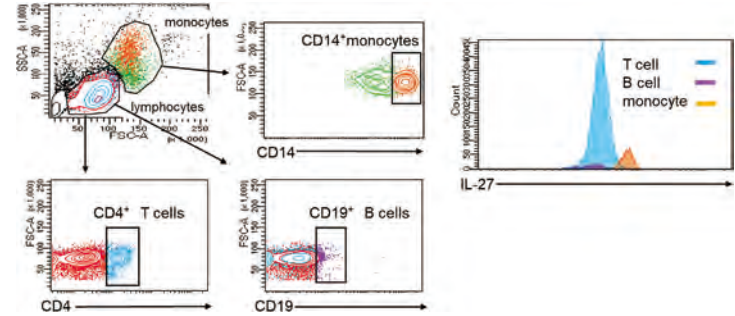
図5 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸中のIL-10, IL-35, IL-27

各蛋白濃度 (pg/ml) / 総蛋白濃度 (mg/ml) で表示

NeCRS (非好酸球性鼻副鼻腔炎) と eCRS (好酸球性鼻副鼻腔炎)



#### 末梢血単核球



#### 鼻茸

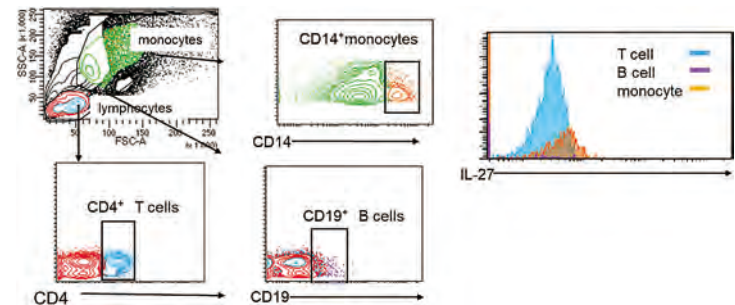


図6 末梢血単核球と鼻茸から分離したCD14<sup>+</sup>細胞がIL-27を高発現していた

球性鼻副鼻腔炎では差を認めなかった。一方、IL-27は、健常人の鉤状突起粘膜と非好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸では差を認めなかったが、好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸で有意に低下していた。

次に、IL-27産生細胞について、好酸球性鼻副鼻腔炎患者の末梢血と鼻茸からCD4<sup>+</sup>T細胞、CD19<sup>+</sup>B細胞、CD14<sup>+</sup>細胞を分離し、IL-27の発現を検討したところ、どちらもCD14<sup>+</sup>細胞でIL-27発現が亢進し、IL-27は単球系の細胞が産生すると考えられた(図6)。

### 3) 末梢血単核球からのIL-5, IL-13, IL-10産生と、Th2細胞, Tr1細胞の誘導に対するIL-27の作用

健常人の末梢血単核球にIL-2 (20 ng/ml) とIL-33 (40 ng/ml) を加えて7日間培養して、IL-5, IL-13, IL-10産生をELISA法で測定した。

IL-33投与により、IL-5とIL-13の産生が増加したが、IL-27 (40 ~ 100 ng/ml) は濃度依存性にIL-33刺激によるIL-5, IL-13産生を抑制した。一方、IL-33はIL-10産生を抑制したが、IL-27はこれを回復させた(図7)。

次に、健常人の末梢血単核球にIL-2 (20 ng/ml) とIL-33 (40 ng/ml) を加えて72時間培養して、Th2細胞の誘導をフローサイトメトリーで測定した。IL-33投与によりTh2細胞が誘導され、CD4<sup>+</sup>T細胞中のTh2細胞の割合が増加したが、IL-27 (100 ng/ml) はこれを抑制した。さらに、IL-27 (100 ng/ml) は72時間の培養で末梢血単核球からTr1細胞を誘導し、CD4<sup>+</sup>T細胞中のTr1細胞の割合が増加した(図8)。いずれの実験も、好酸球性鼻副鼻腔炎患者の末梢血単核球を利用した検討で同様の結果が得られた。

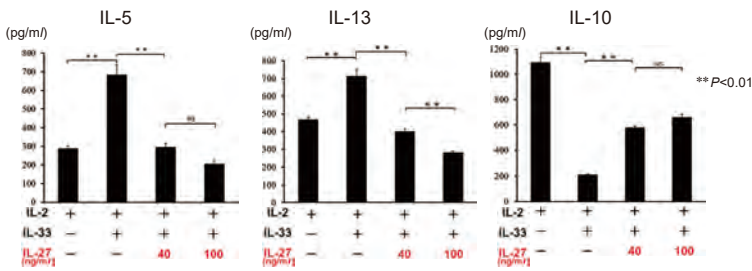


図7 末梢血単核球からの IL-33 刺激による IL-5, IL-13, IL-10 産生に対する IL-27 の作用

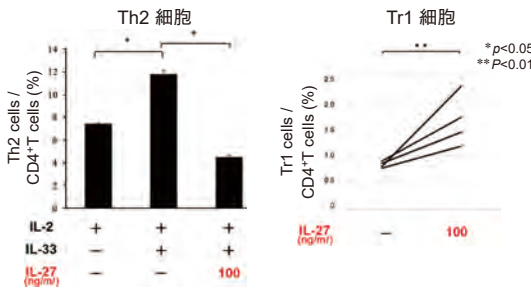


図8 末梢血単核球からの IL-33 刺激による Th2 細胞誘導に対する IL-27 の作用と、IL-27 による Tr1 細胞の誘導

以上の結果, IL-27 は Th2 細胞の誘導を抑制して IL-5, IL-13 産生を抑制し, Tr1 細胞の誘導などを介して IL-10 産生に働き, 2 型炎症を制御すると考えられる. 好酸球性鼻副鼻腔炎では IL-27 の組織濃度の低下が好酸球性慢性炎症の病態形成にかかわると考えられる.

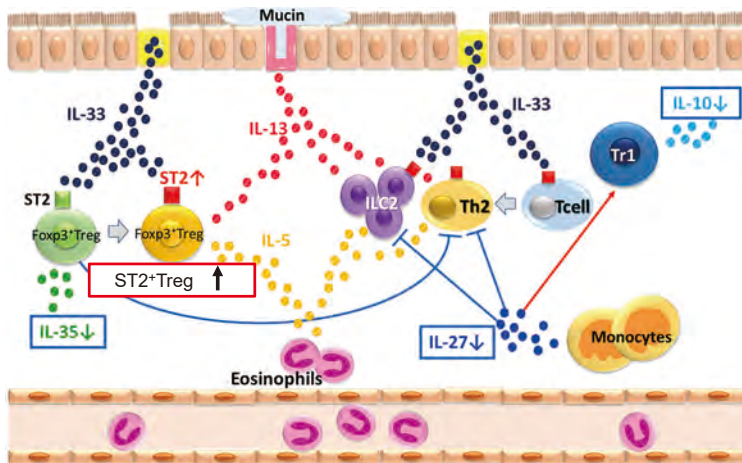


図9 好酸球性鼻副鼻腔炎鼻茸における制御性 T 細胞と制御系サイトカイン (IL-10, IL-35, IL-27) の変化, Tr1 細胞の減少と ST2<sup>+</sup>Treg の増加, IL-10, IL-35, IL-27 の減少が認められる.

まとめ

疑問：炎症制御因子の役割は？

答え：好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸では, IL-33 の刺激により制御性 T 細胞 (Treg) が ST2 受容体を発現して, 2 型サイトカインを産生する ST2<sup>+</sup>Treg に変化し, 免疫抑制能が失われている. また, IL-10 を産生する制御性 T 細胞サブセットの Tr1 細胞が減少し, 2 型炎症の制御機構が損なわれている. 鼻茸組織では制御系サイトカインの IL-10, IL-35, IL-27 が減少し, とくに好酸球性鼻副鼻腔炎で IL-27 が低下している. IL-27 には Th2 細胞への誘導を抑制し, Tr1 細胞への誘導を促進する作用が認められる (図 9). 今後は, 制御性 T 細胞や制御系サイトカインをターゲットとした新たな治療戦略の可能性が考えられる.

## 文献

1. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-787.
2. Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:617-624.e616.
3. Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol* 2004;25:374-380.
4. Van Bruaene N, Pérez-Novo CA, Basinski TM, et al. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1435-1441, 1441.e1431-1433.
5. Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol* 2011;707:3-17.
6. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
7. Laurence A, Amarnath S, Mariotti J, et al. STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. *Immunity* 2012;37:209-222.
8. Sawant DV, Hamilton K, Vignali DA. Interleukin-35: expanding its job profile. *J Interferon Cytokine Res* 2015;35:499-512.
9. Matsuda M, Terada T, Kitatani K, et al. Roles of type 1 regulatory T (Tr1) cells in allergen-specific immunotherapy. *Front Allergy* 2022;3:981126.
10. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010;10:170-181.
11. Chen CC, Kobayashi T, Iijima K, et al. IL-33 dysregulates regulatory T cells and impairs established immunologic tolerance in the lungs. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:1351-1363.e1357.
12. Lam AJ, MacDonald KN, Pesenacker AM, et al. Innate control of tissue-reparative human regulatory T cells. *J Immunol* 2019;202:2195-2209.
13. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-2095.
14. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. *Immunity* 2019;50:871-891.
15. Kikuoka H, Kouzaki H, Matsumoto K, et al. **Immunological effects of sublingual immunotherapy with Japanese cedar pollen extract in patients with combined Japanese cedar and Japanese cypress pollinosis.** *Clin Immunol* 2020; **210:108310.**
16. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566-569.
17. Kouzaki H, Arai Y, Nakamura K, et al. **Anti-inflammatory roles of interleukin-35 in the pathogenesis of Japanese cedar pollinosis.** *Asia Pac Allergy* 2021;11:e34.
18. Kouzaki H, Arikata M, Koji M, et al. **Dynamic change of anti-inflammatory cytokine IL-35 in allergen immune therapy for Japanese cedar pollinosis.** *Allergy* 2020;75:981-983.
19. Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity* 2012;37:960-969.
20. Hall AO, Silver JS, Hunter CA. The immunobiology of IL-27. *Adv Immunol* 2012;115:1-44.
21. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, et al. Interleukin-27 in T cell immunity. *Int J Mol Sci* 2015;16:2851-2863.
22. Moro K, Kabata H, Tanabe M, et al. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat Immunol* 2016;17:76-86.
23. Artis D, Villarino A, Silverman M, et al. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol* 2004;173:5626-5634.
24. Chihara N, Madi A, Karwacz K, et al. Differentiation and characterization of Tr1 cells. *Curr Protoc Immunol* 2016;113:3.27.21-23.27.10.

## VII 鼻粘膜基底細胞の役割は？

### —基底細胞の過形成と上皮由来サイトカイン産生—

#### 1. 基底細胞の過形成

好酸球性鼻副鼻腔炎の病態の中心は好酸球性の2型炎症にある。われわれは、好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻粘膜や鼻茸上皮で、TSLP、IL-25、IL-33などの上皮由来サイトカインとそのmRNAの発現が亢進していること<sup>1)</sup>、鼻茸中の2型自然リンパ球(ILC2s)が増加し、組織内の好酸球浸潤と相関すること、鼻茸由来のILC2sがIL-33刺激により多量のIL-5、IL-13を産生すること<sup>2)</sup>、などを明らかにし、好酸球性鼻副鼻腔炎では鼻粘膜上皮を介した自然免疫反応が2型炎症の病態に深くかかわっている。

好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸上皮を観察すると、従来の慢性鼻副鼻腔炎の鼻茸と比較して、明らかに上皮に占める基底細胞層の割合が増加し、基底細胞の過形成が生じている(図1)。基底細胞は細胞分化能を有しているが、一方で上皮層の接着などにかかわる分化した細胞群と考えられる。近年、慢性鼻副鼻腔炎の篩骨洞粘膜のsingle cell RNA-sequenceにおいて、TSLPの遺伝子発現が上皮の基底細胞に限局していることが明らかになり、基底細胞の過形成がTSLP産生を介して2型炎症の病態形成にかかわる可能性が考えられる<sup>3)</sup>。そこで、本項では好酸球性鼻副鼻腔炎の病態における基底細胞の役割について検討した。

#### 2. 基底細胞への分化を促進する細胞培養法

われわれは、Air-Liquid interface培養の前段階で使用する培養液PneumaCult™-Ex Plusに、基底細胞への分化促進作用があることを見出した。そこで、この培養液を用いて正常ヒト気管支上皮(NHBE)細胞を3回継代した細胞を作成した。また、2継代目から従来の培養液BEGM™で2回継代して培養した細胞を作成し、これら2種類の細胞の性質について比較検討した(図2)。

フローサイトメトリーによる検討では、PneumaCult™-Ex Plusで培養したNHBE細胞は93.9%の細胞が、基底細胞に特徴的な細胞表面マーカーのCD49f/CD271<sup>4)</sup>を発現していたが、BEGM™で培養したNHBE細胞では、CD49f/CD271の発現率は1.2%で、ほとんど認められなかった(図3)。

蛍光免疫染色による検討では、PneumaCult™-Ex Plusで培養したNHBE細胞は、基底細胞に特徴的な核のマーカーであるp63<sup>5)</sup>を発現していたが、BEGM™で培養したNHBE細胞では、p63を発現していなかった(図3)。

以上の結果、PneumaCult™-Ex Plusで培養したNHBE細胞は、基底細胞の表面マーカーと核のマーカーをともに発現することから、基底細胞の

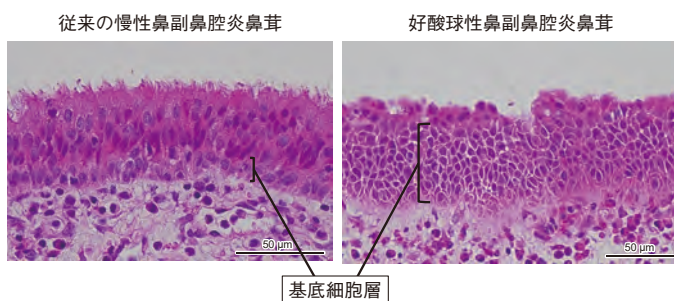


図1 従来の慢性鼻副鼻腔炎と好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸組織 (HE染色)

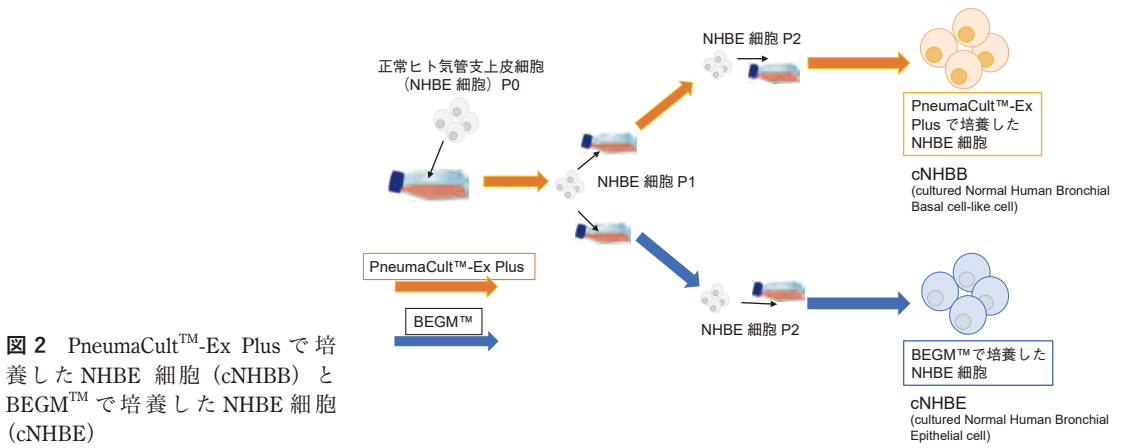


図2 PneumaCult™-Ex Plus で培養した NHBE 細胞 (cNHBB) と BEGM™ で培養した NHBE 細胞 (cNHBE)

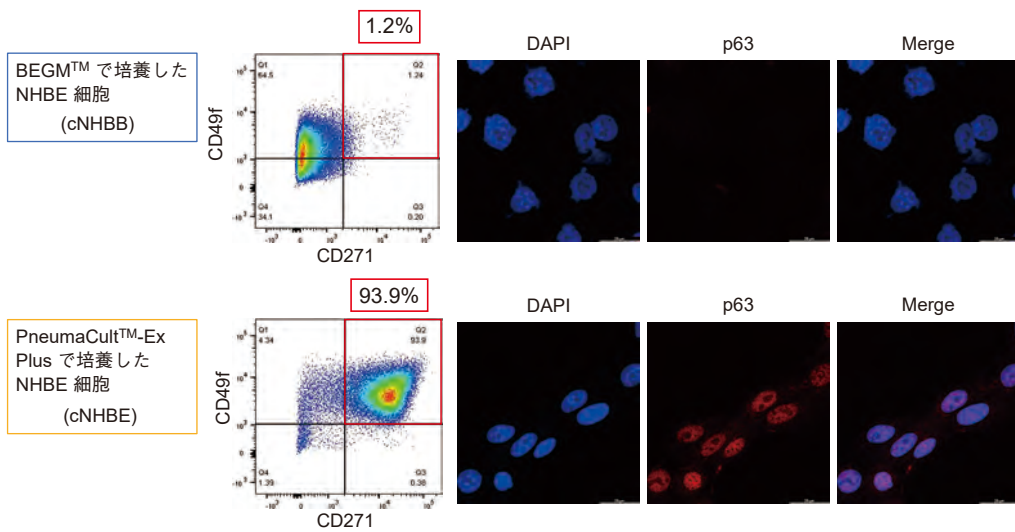


図3 cNHBB と cNHBE における基底細胞マーカー (CD49f/CD271 と p63) の発現

形質を有すると考え、cNHBB (cultured Normal Human Bronchial Basal cell-like cell) と名付けた。一方、BEGM™ で培養した NHBE 細胞は基底細胞の形質を有しないことから、cNHBE (cultured Normal Human Bronchial Epithelial cell) とした。

### 3. 基底細胞の性質

#### 1) TSLP, TLR3, PAR-2 の mRNA 発現と TSLP 産生

TLR3 (Toll-like receptor 3) は、ウイルス由来の dsRNA や Poly(I:C) を認識し TSLP の産生を促す受容体で、PAR-2 (protease-activated receptor-2) は、アルテルナリアやダニなどのプロテアーゼに

より活性化し TSLP の産生を促す受容体である。基底細胞の形質を有する cNHBB では TSLP と TLR3 の mRNA 発現が亢進し、cNHBE では PAR-2 の mRNA 発現が亢進していた (図4)。

次に、ハウスダスト (HDM)、アルテルナリア、黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼ、Poly(I:C) 刺激による TSLP 産生について検討したところ、基底細胞の形質を有する cNHBB では、TLR3 リガンドの Poly(I:C) 刺激による TSLP 産生が有意に増加し、cNHBE では、PAR-2 リガンドのアルテルナリアや黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼ刺激による TSLP 産生が有意に増加した (図4)。

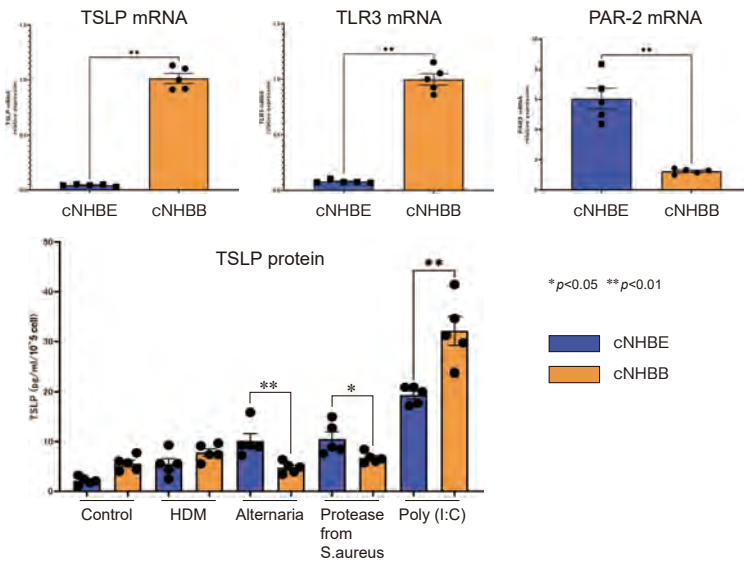


図4 cNHBBとcNHBEにおけるTSLP, TLR3, PAR-2のmRNA発現とTSLP産生

## 2) IL-6, IL-8, TLR4のmRNA発現とIL-6, IL-8産生

基底細胞の形質を有するcNHBBでは、TLR4のmRNA発現が亢進し、IL-8のmRNA発現とアルテルナリア、黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼ、Poly(I:C)刺激によるIL-8産生が増加し、cNHBEではIL-6のmRNA発現と、HDM、アルテルナリア、Poly(I:C)刺激によるIL-6産生が増加した。TLR4リガンドのLPS刺激では、cNHBBでは有意にIL-6、IL-8産生が増加したのに対して、cNHBEでは明らかな産生増加を認めなかった。

## 3) IL-4, IL-13刺激による細胞増殖

基底細胞の過形成機序を明らかにする目的で、2型サイトカインのIL-4、IL-13刺激による細胞増殖能について検討した。基底細胞の形質を有するcNHBBは、IL-4 (0.5 ng/ml)、IL-13 (5 ng/ml)の刺激で有意に細胞数の増加を認めたが、cNHBEでは細胞数の増加を認めなかった(図5)。

## 4) RNA-sequenceによる網羅的解析

cNHBBとcNHBEの遺伝子発現の違いについて、RNA-sequenceによる網羅的解析を行ったところ、cNHBBでは、TSLP、IL-8、TLR3、TLR4の発現とIL-33の放出にかかわるATP受容体P2Y2Rの発現が亢進し、cNHBEではPAR-2の発

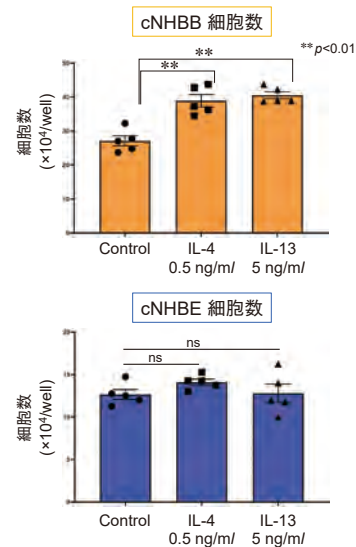


図5 IL-4, IL-13刺激によるcNHBB, cNHBEの細胞増殖

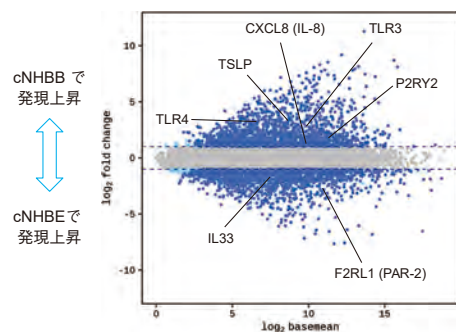


図6 RNA-sequence解析における、cNHBB, cNHBEの発現変動遺伝子

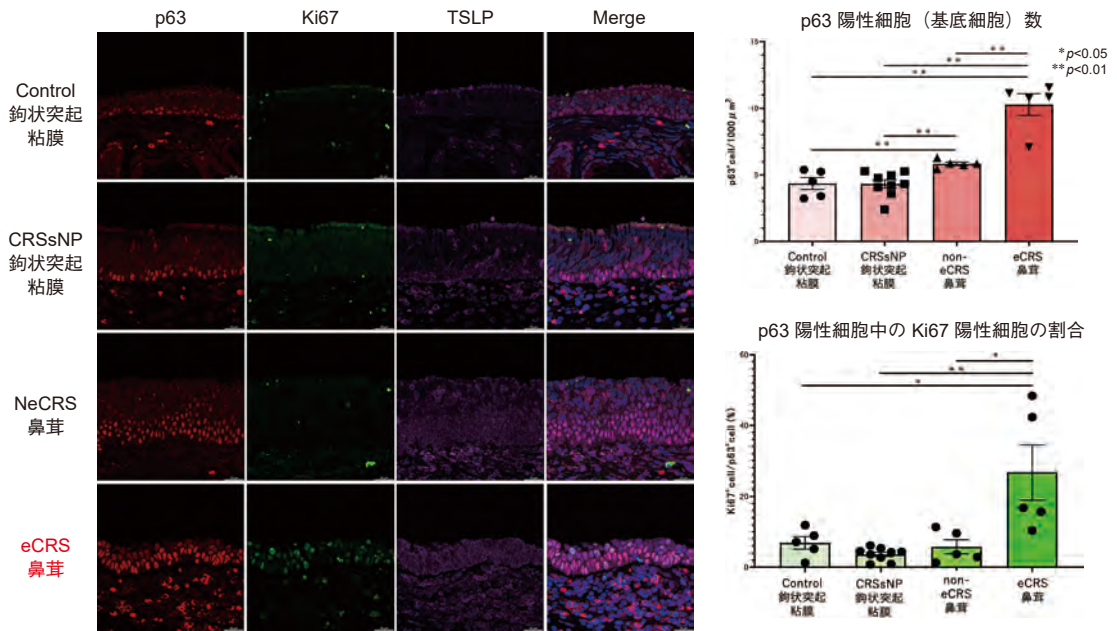


図7 鼻粘膜上皮の蛍光免疫染色 (p63, Ki67, TSLP) と p63 陽性細胞数 (1,000  $\mu\text{m}^2$ )、そのうちの Ki67 陽性細胞の割合

現が亢進していた (図6)。

以上の結果、基底細胞は TSLP と IL-8, TLR3, TLR4 などの発現が亢進していて、炎症病態においては、Poly(I:C) 刺激による TSLP 産生や LPS 刺激による IL-8 産生などの主体になると考えられる。

#### 4. 鼻茸における基底細胞の検討

##### 1) p63, Ki67, TSLP の免疫蛍光染色

好酸球性鼻副鼻腔炎 (eCRS: eosinophilic CRS) と非好酸球性鼻副鼻腔炎 (NeCRS: non-eosinophilic CRS) の鼻茸、鼻茸を伴わない慢性鼻副鼻腔炎 (CRSsNP) と健常人の鉤状突起粘膜について、p63 (基底細胞の核のマーカー) と Ki67 (細胞増殖能のマーカー)、TSLP の発現を蛍光免疫染色で検討した (図7)。

健常人、CRSsNP の鉤状突起粘膜では、p63 で染色される基底細胞の増生は乏しく、Ki67 陽性細胞もほとんど認めなかった。また、TSLP の明らかな染色像も認めなかった。NeCRS と eCRS の鼻茸では、どちらも p63 陽性の基底細胞の増生を認め、とくに eCRS の鼻茸で上皮に占める基底

細胞の割合が高かった。また、Ki67 で染色される細胞増殖能の高い細胞も eCRS の鼻茸で多く認められた。TSLP は、p63 で染色される基底細胞層を中心に認められた。

##### 2) p63 陽性細胞 (基底細胞) 数と Ki67 陽性細胞数

鼻茸上皮では、鉤状突起粘膜と比較して上皮 1,000  $\mu\text{m}^2$  あたりの p63 陽性細胞 (基底細胞) 数が増加し、とくに eCRS の鼻茸で増加していた。

p63 陽性細胞 (基底細胞) 中の Ki67 陽性細胞の割合は、健常人や CRSsNP の鉤状突起粘膜、NeCRS の鼻茸と比較して、eCRS の鼻茸で有意に増加していた。つまり、eCRS の鼻茸上皮では細胞増殖能の高い基底細胞が増生し、基底細胞の過形成が生じている (図7)。

好酸球性鼻副鼻腔炎では、基底細胞は TSLP を産生して 2 型炎症を惹起するが、2 型サイトカインの IL-4, IL-13 は基底細胞の増殖を促進して、基底細胞のさらなる過形成を誘導する悪循環が生じていると考えられた。

## まとめ

疑問：鼻粘膜基底細胞の役割は？

答え：基底細胞の形質を有する培養上皮細胞（cNHBB）では、TSLP、IL-8、TLR3、TLR4などのmRNA発現が亢進し、Poly(I:C)刺激でTSLP産生が、LPS刺激でIL-8産生が誘導され、IL-4、IL-13刺激により細胞増殖が認められた。好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸上皮では、細胞増殖能の高い基底細胞が増殖し、基底細胞の過形成が認められた。好酸球性鼻副鼻腔炎では、基底細胞から産生されたTSLPが2型炎症を増悪させ、2型サイトカイン（IL-4、IL-13）の作用で、基底細胞のさらなる過形成が誘導される悪循環が生じている可能性がある。

## 文献

1. Kouzaki H, Matsumoto K, Kato T, et al. Epithelial cell-derived cytokines contribute to the pathophysiology of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *J Interferon Cytokine Res* 2016;36: 169-179.
2. Tojima I, Kouzaki H, Shimizu S, et al. Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Clin Immunol* 2016;170:1-8.
3. Ordovas J, Dwyer DF, Nyquist SK, et al. Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells. *Nature* 2018;560: 649-654.
4. Rock JR, Onaitis MR, Rawlins EL, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106: 12771-12775.
5. Wang D-Y, Li Y, Yan Y, et al. Upper airway stem cells: understanding the nose and role for future cell therapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015;15: 490.



## 第3章

### アレルギー性鼻炎の疑問

- I. スギ・ヒノキ花粉の飛散状況は今後どう変化するか？
- II. 自然免疫の役割は？
- III. I型アレルギー性炎症はどのように制御されるか？
- IV. Local allergic rhinitis は存在するか？
- V. 血管収縮作用があるトロンボキサン  $A_2$  はどのように鼻粘膜腫脹を引き起こすか？

# Ⅰ スギ・ヒノキ花粉の飛散状況は今後どう変化するのか？

## —スギ・ヒノキ花粉飛散は減少するのか？—

### 1. スギ・ヒノキ花粉症の現状

アレルギー性鼻炎全体の有病率は過去20年間で急増し、1998年の29.8%から2008年には39.4%、2019年には49.2%で、現在は日本人の約半数がアレルギー性鼻炎に罹患している<sup>1)</sup>。その原因の多くはスギ花粉症の増加によるもので、1998年の有病率16.2%から、2008年は26.5%、2019年には38.8%に増加した。とくに、小児から若年層のスギ花粉症の有病率の増加が著しく、5～9歳では1998年の7.5%から2019年の30.1%に、10～19歳では1998年の19.7%から2019年の49.5%に増加し、10歳代から50歳代ではスギ花粉症に40%台後半の有病率を有している<sup>2)</sup>。したがって、今後は小児から学童、若年者のスギ花粉症にどのように対応するかが大きな課題である。

スギとヒノキは同じヒノキ科に属し、スギ花粉の主要アレルゲンコンポーネントであるCry j 1、Cry j 2は、ヒノキ花粉のCha o 1、Cha o 2と高い相同性があり<sup>3)</sup>、スギ花粉症患者の70～80%はヒノキ花粉症も有している。スギは北海道と沖縄を除く全国に植林されているが、ヒノキは雪に弱

いため、北陸から東北地方には植林されていない。一方、西日本ではヒノキが多く、ヒノキ花粉の飛散量がスギ花粉を上回る地域も多い。患者は2～4月のスギ花粉飛散に続く、3～5月のヒノキ花粉飛散により、3～4か月間の長期間鼻症状に悩まされることになる。ヒノキ花粉飛散が多い西日本では、ヒノキ花粉症への対応が重要で、スギ花粉症に連続したヒノキ花粉症の治療が必要である。

スギ・ヒノキ花粉症が急増している最も大きな原因は、戦後の植林政策にあり、スギ・ヒノキの人工林が増えた結果、その花粉量が爆発的に増加している。林野庁のデータによると、日本の国土の約7割が森林で、そのうち植林された人工林が41%を占めている。さらに人工林のうち44%をスギが、25%をヒノキが占め、我が国の森林面積の3～4分の1はスギ・ヒノキの人工林で覆われている<sup>4)</sup>。

スギ・ヒノキの造林は、戦後の森林の復旧を図るため、1946年から1972年の間に行われ、1980年以降は少ない。スギは樹齢30年以上から花粉を多く産生するようになり、樹齢70年頃までは、ほぼ同様の生産能力を維持する<sup>5)</sup>。林野庁のスギ・

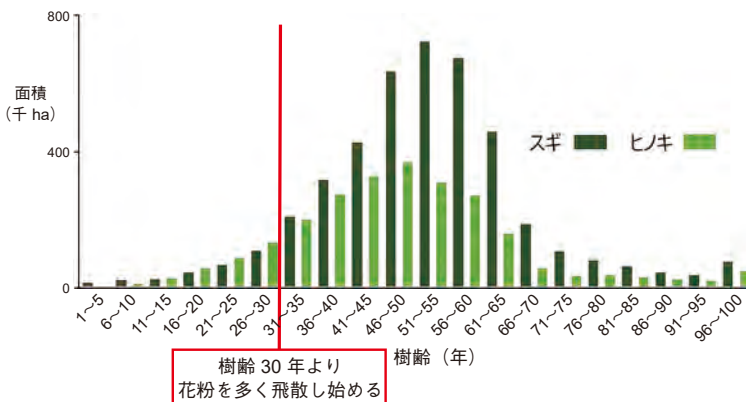


図1 スギ・ヒノキ人工林の齢級構成 (2017年3月31日) (林野庁ホームページより改変<sup>4)</sup>)

ヒノキ人工林の齢級構成によると、現在は樹齢30年以下の若い木は極めて少なく、スギは樹齢60年、ヒノキは樹齢55年前後がピークになっている(図1)<sup>4)</sup>。今後は樹齢70年を超える老木の割合が多くなると考えられる。スギ・ヒノキの老木がどれくらい花粉を産生するかについてはよくわかっていないが、今後老木が増えるにつれて、長期的には花粉量が減少する可能性も考えられる。

近年、花粉症対策のため、花粉の少ないスギ・ヒノキあるいは無花粉のスギが開発され、こうした花粉症対策苗木のシェアが年々増加している<sup>5)</sup>。しかしながら、新たな植林自体が少ない現状では、こうした取り組みが花粉症対策として効果を発揮するにはまだまだ時間がかかる。

## 2. スギ・ヒノキ花粉飛散予測

スギ・ヒノキ花粉症対策では、「抗原の回避」が最も重要で、花粉飛散情報に注意する必要がある。われわれは花粉飛散情報を広く提供するために、1995年から28年間にわたって、滋賀医科大学医学部臨床研究棟屋上(地上高21m)に設置したダーラム型捕集器を使用して花粉数を測定し、滋賀県大津市のスギ・ヒノキ花粉飛散数として、

ホームページ上に毎日の花粉飛散数を公表している(<https://hqotola.jp>)。さらに、前年7月の平均気温や日照時間、降水量などの気象状況と、10月の雄花芽の着生状況などに基づいて、翌年のスギ・ヒノキ花粉の飛散予測を行っている<sup>6)</sup>。

図2に滋賀県大津市における経年的なスギ・ヒノキ花粉飛散総数の変化を示す。スギ・ヒノキ花粉ともに隔年で増減を繰り返す傾向が認められる。このように花粉飛散数が多い年と少ない年を繰り返す、樹木の生物学的周期に加えて、前年7月の気象条件が翌年の花粉飛散数に影響する。一般に、前年7月の最高気温、平均気温が高く、日照時間が長いほど、翌年の花粉飛散量は増加し、平均湿度が高く、降水量が多いほど減少する。

過去のわれわれの測定結果を前年7月の大津市の気象条件と比較すると、生物学的周期で花粉飛散数が多くなる年で、前年7月の平均気温が高く、降水量が少なく、日照時間が長い、2005年、2009年、2011年、2013年、2019年は大量飛散が認められ、生物学的に飛散数が少なくなる年で、前年7月の気象条件が花粉の生育に適さない2004年、2006年、2008年、2010年、2016年、2020年は少量飛散であった(図3)。とくに、2018年7月の気温は例年を2度以上上回る猛暑

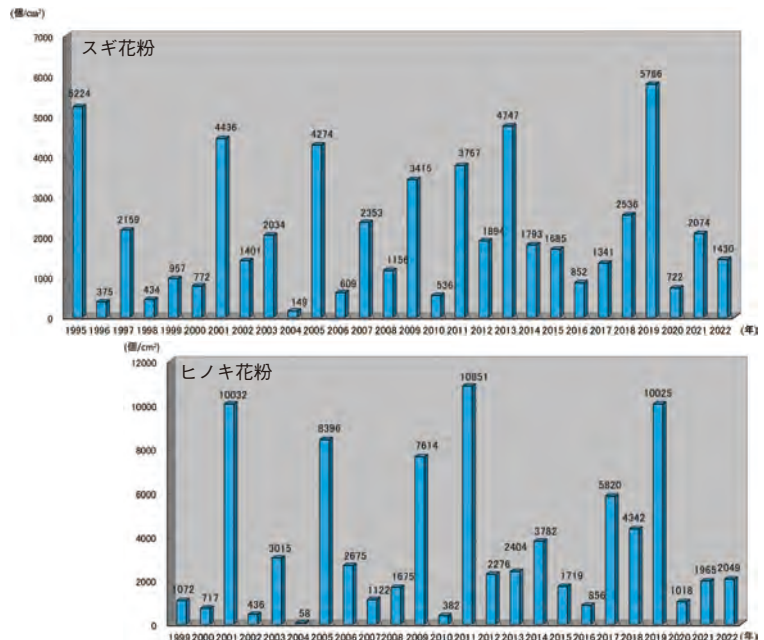


図2 1995年から2022年のスギ・ヒノキ花粉飛散総数(滋賀県大津市)。

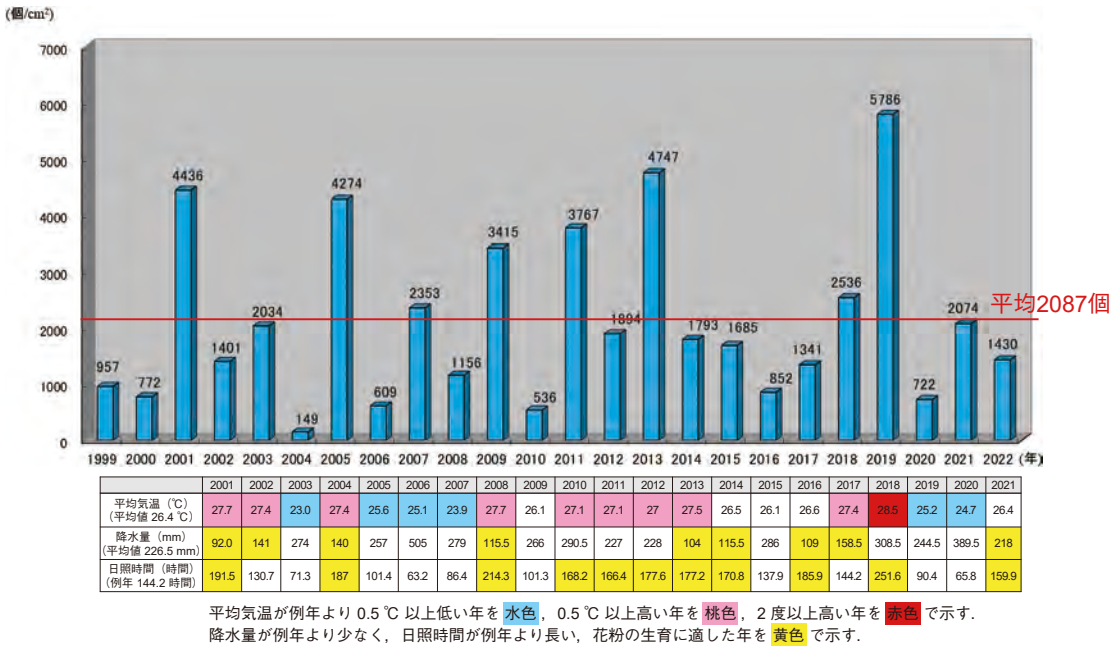


図3 スギ花粉飛散総数と前年7月の平均気温、降水量、日照時間との関係（滋賀県大津市）

で、降水量が多いにもかかわらず日照時間が長い亜熱帯のような気候であったが、翌2019年は過去最大の大量飛散が認められた。日照時間が長ければ、降水量が多いほうが花粉の生育に適している可能性もある。今後も地球温暖化に伴い、2018年夏のような気象状況が生じると、スギ花粉飛散数が増加すると考えられる。

一方、2015年と2017年は生物学的に花粉飛散数が多くなる年で、前年7月の気象条件も例年並みで比較的良好であったが、予想に反して花粉飛散数が少なかった。2018年の大量飛散の年を除けば、2014年以降は花粉飛散が少ない傾向が続いていて、今後老木が増えるにしたがって、長期的にはスギ花粉飛散量が減少する可能性も考えられる。

ヒノキ花粉飛散総数もスギ花粉飛散総数と同様に隔年で増減を繰り返す傾向があり、スギ花粉飛散数が多い年はヒノキ花粉飛散数も多い。滋賀県大津市ではヒノキ花粉飛散数がスギ花粉飛散数を上回ることが多いが、ヒノキは花粉飛散期に雨が降ると飛散数が少なくなる傾向や、花粉の生育に長期間の気候の影響を受ける可能性があり、スギに比べると花粉飛散予測が難しい。

花粉症に対する初期療法の有用性から、スギ花粉飛散開始日を予測することも重要である。スギの雄花は休眠中の花芽が冬季に一定期間低温にさらされ、その後気温が上昇することにより休眠が打破され、温度条件が揃うと開花する<sup>7)</sup>。1月1日からの平均気温や最高気温の積算値が飛散開始日の予測に用いられることが多いが、スギ花粉飛散開始日は前年11月中旬の平均気温と関連し、気温が低いと花粉飛散開始日が早くなるとする報告もある<sup>8)</sup>。われわれは、1月1日からの最高気温の積算値が400を超える頃に飛散開始すると予測している。2007年以降で最高気温の積算値が400を超えた日と、実際のスギ花粉飛散開始日との間に7日以上之差が生じたのは、2008年と2022年の2回のみで、いずれも寒い日が続き、飛散開始が予測よりも遅れる傾向が認められた(図4)。1月1日からの最高気温の積算値を公表し、周知することで、適切な時期にスギ花粉症に対する初期療法を開始することができると考えられる。

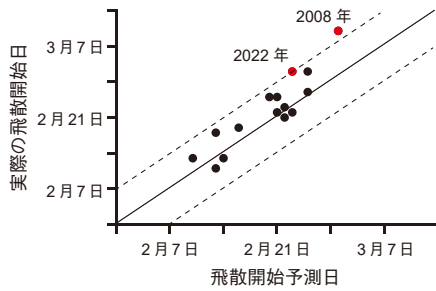


図4 スギ花粉飛散開始予測日と実際の飛散開始日 (2007～2022年)

### 3. 20年以上にわたるスギ・ヒノキ花粉飛散数の測定からわかること

20年以上にわたる測定において、スギ・ヒノキ花粉飛散総数は、年によって差はあるもののほぼ横ばいである(図2)。しかしながら、スギ花粉飛散量は2014年以降は、2019年の大量飛散年を除くと、少量飛散が続いている。その原因の一つに、樹齢70年以上の老木の割合が増加していることが考えられる。現在のスギ人工林は樹齢60年にピークがあり、今後は急速に老木の割合が増えてくる。樹齢70年以上の老木がどれくらいの花粉を産生するかについては、よくわかっていないが、今後も継続して注意深く花粉飛散数の変化を調査する必要がある。また、地域差につい

ても配慮する必要がある。造林された時期が早い地域ではスギ・ヒノキの老齢化がすすんでいるが、遅く造林された地域ではこれからもしばらくの間多くの花粉飛散が続くと考えられる。

地球温暖化の影響で、夏季の気温は長期的に上昇する傾向があり、降水量の多い異常気象が各地で観測されている。前年7月の平均気温が高いと翌年のスギ花粉飛散数が多くなるが、一方で、気温の上昇とそれに伴う蒸散の増加がストレスになり、花粉飛散量が減少する可能性も報告され<sup>9)</sup>、今後の気候変化が花粉飛散数にどのような影響を与えるかについても注意深く観察する必要がある。

ヒノキ花粉の飛散量にはスギ花粉と同様の傾向が認められるが、大津市では2014年以降はスギ花粉飛散数を上回り、むしろ全体に増加している。現在のヒノキ人工林は樹齢55年がピークで、スギに比べて造林の時期が遅かったこと、ヒノキが花粉を飛散する樹齢もスギより約10年遅れることなどから<sup>10)</sup>、スギに比べるとヒノキ花粉飛散量は、しばらく多い状態が続く可能性がある。ただ、長期的にはスギと同様に老木が増加すると、花粉飛散量が減少に転じる可能性が考えられる。いずれにしても、毎年花粉飛散数にとらわれることなく、長期的な展望を持って花粉飛散数の変化を観察する必要がある。

#### まとめ

疑問：スギ・ヒノキ花粉の飛散状況は今後どう変化するか？

答え：スギ・ヒノキ花粉飛散総数は、隔年で増減を繰り返す傾向があるが、過去20年以上にわたってほぼ横ばいである。前年7月の平均気温などの気象条件が翌年の花粉飛散量にかかわる。2014年以降は、2019年の大量飛散年を除くとスギ花粉飛散数は減少傾向にあるが、ヒノキ花粉飛散数はむしろやや増加している。戦後植林されたスギ人工林は樹齢60年にピークがあり、今後樹齢70年以上の老木の割合が増加すると花粉飛散量も減少する可能性がある。ヒノキ人工林は樹齢55年にピークがあり、スギに比べるとやや若い木が多いが、長期的には老木化の影響が考えられ、花粉飛散量の変化について継続して観察する必要がある。

文献

1. 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会編. 鼻アレルギー診療ガイドライン—通年性鼻炎と花粉症—2020年度版. 改訂第9版. 東京: ライフ・サイエンス: 2020.
2. 松原篤, 坂下雅文, 後藤穰, 他. 鼻アレルギーの全国疫学調査2019 (1998年, 2008年との比較)速報. 耳鼻咽喉科医およびその家族を対象として. 日耳鼻 2020;123:485-490.
3. Osada T, Okano M. Japanese cedar and cypress pollinosis updated: new allergens, cross-reactivity, and treatment. *Allergol Int* 2021;70:281-290.
4. スギ・ヒノキ林に関するデータ. 林野庁ホームページ. [https://www.rinya.maff.go.jp/j/sin\\_riyou/kafun/data.html](https://www.rinya.maff.go.jp/j/sin_riyou/kafun/data.html)
5. 花粉の少ない苗木生産量について. 林野庁ホームページ. [https://www.rinya.maff.go.jp/j/sin\\_riyou/kafun/naegi.html](https://www.rinya.maff.go.jp/j/sin_riyou/kafun/naegi.html)
6. 菊岡弘高, 有方雅彦, 神前英明, 他. 滋賀県大津市における, スギ・ヒノキ花粉飛散結果からみる今後の展望 スギ花粉飛散総数は減少するのか? *職業・環境アレルギー誌* 2018;25:77-83.
7. 平英彰, 寺西秀豊, 剣田幸子. スギの花粉飛散開始日の予測について 植物生理の観点から. *アレルギー* 1992;41:86-92.
8. 湯田厚司, 荻原仁美, 宮本由起子, 他. 11月中旬の気温によるスギ花粉飛散開始日予測. *日鼻誌* 2011;50:13-18.
9. 村山貢司. スギ花粉飛散の現状と将来. *医と薬学* 2017;74:95-101.
10. 横山敏孝. スギ・ヒノキ林の現況と花粉の生産. *医のあゆみ* 2002;200:341-345.

## II 自然免疫の役割は？

### —自然免疫を考慮した新たな治療戦略—

#### 1. アレルギー性鼻炎と上皮由来サイトカイン (TSLP, IL-25, IL-33)

気道炎症における自然免疫の役割については、第2章V項において詳述し、上皮由来サイトカインのTSLP, IL-25, IL-33と2型自然リンパ球(ILC2s)の好酸球性気道炎症における作用について紹介した。

アレルギー性鼻炎は、IgE抗体による獲得免疫が中心のI型アレルギー反応と考えられるが、その病態にも自然免疫が関与することが、近年注目を集めている。アレルギー性鼻炎の鼻汁中には、TSLP, IL-25, IL-33が増加<sup>1)~3)</sup>、鼻粘膜におけるmRNA発現や蛋白レベルの上昇<sup>4)~6)</sup>、血清中のIL-33の増加<sup>7, 8)</sup>などが報告されている。アレルギー性鼻炎のゲノムワイド関連解析では、TSLPと花粉症発症との関連<sup>9, 10)</sup>やIL-33とスギ花粉症との関連<sup>7)</sup>が認められる。マウスのアレルギー性鼻炎モデルで、こうした上皮由来サイトカインがその発症と維持に重要であることが確認されている<sup>4, 5, 11, 12)</sup>。

また、IL-33は感染や傷害によって誘導される細胞死などによって細胞外へ放出され、炎症応答を誘導するDAMPs (damage associated molecular patterns)の一種で、「alarmin」とも呼ばれている。代表的なalarminに、IL-33やIL-1 $\alpha$ のようなサイトカイン、S100蛋白やHMGB1 (high mobility group box 1), ATP, HSP (heat shock protein)などがある。そこで本項では、アレルゲンによる気道上皮細胞からのTSLP, IL-25, IL-33産生とその機序、さらにalarminとしてのS100蛋白やHMGB1, ATPの役割などについても、われわれの研究内容を中心に紹介する。

#### 1) TSLP, IL-25, IL-33の産生機序とS100蛋白, ATP, HMGB1の役割

##### ① TSLP

われわれは、システインプロテアーゼであるトリプシンやセリンプロテアーゼのパパインが、気道上皮細胞株であるBEAS-2B細胞のプロテアーゼ受容体であるPAR-2に作用して、TSLPが産生されることを確認した。そこで、環境抗原の一種であるアルテルナリアの作用について検討したところ、アルテルナリア抽出物は濃度依存性にBEAS-2B細胞におけるTSLPのmRNA発現(6h)とTSLP産生(6~24h)を亢進させた(図1)。IL-4はアルテルナリアによるTSLP産生を促進したが、IFN- $\gamma$ はこれを抑制した。また、アルテルナリアの作用は、56°Cでの前処理や、システインプロテアーゼ阻害薬(E64)の前処理で抑制された。また、BEAS-2B細胞のPAR-2をsiRNAでノックダウンすると、TSLP産生が抑制され、PAR-2アゴニストはTSLP産生を誘導した<sup>13)</sup>(図2)。以上より、アルテルナリアなどのアレルゲ

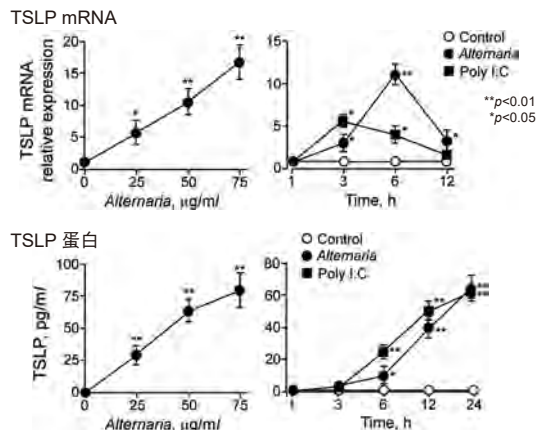


図1 アルテルナリア抽出物による気道上皮細胞株(BEAS-2B細胞)のTSLP mRNA発現(6h)とTSLP産生(6~24h)<sup>13)</sup>

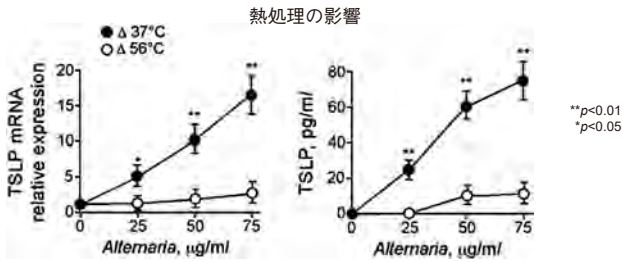
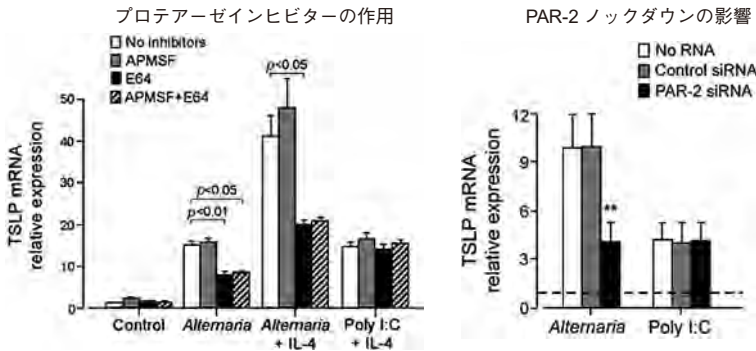


図2 アルテルナリア抽出物の熱処理とプロテアーゼ阻害薬処理, さらにBEAS-2B細胞のPAR-2ノックダウンによる, TSLP mRNA 発現と TSLP 産生の抑制<sup>13)</sup>



E64: システインプロテアーゼ阻害薬, APMSF:セリンプロテアーゼ阻害薬

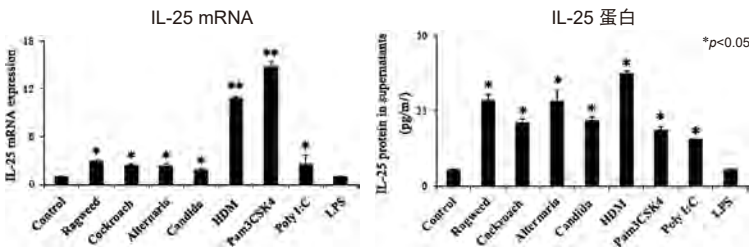


図3 培養ヒト正常気管支上皮 (NHBE) 細胞における IL-25 mRNA 発現 (4 h) と IL-25 産生 (8 h)<sup>14)</sup>

ragweed (100 µg/ml), cockroach (400 µg/ml), *Alternaria* (400 µg/ml), *Candida* (400 µg/ml), house dust mite (HDM) (100 µg/ml), Pam3CSK4 (2 µg/ml), poly(I:C) (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml)

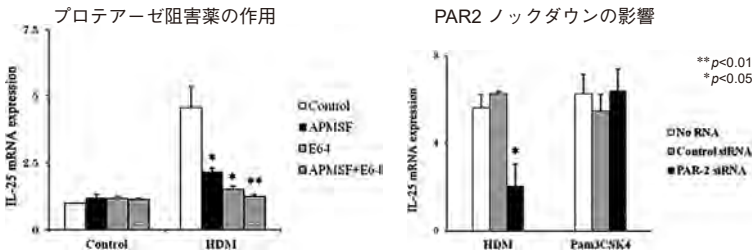


図4 HDM (100 µg/ml) のプロテアーゼ阻害薬前処理と, 正常気管支上皮 (NHBE) 細胞の PAR-2 ノックダウンによる, IL-25 mRNA 発現の抑制<sup>14)</sup>

E64: システインプロテアーゼ阻害薬, APMSF:セリンプロテアーゼ阻害薬

ンが含有するプロテアーゼ活性によって, 気道上皮細胞の PAR-2 受容体を介して TSLP が産生されると考えられる。

## ② IL-25

われわれは, ブタクサ (ragweed) や, ゴキブリ, アルテルナリア, カンジダ, ハウスダスト (HDM) などさまざまな抗原刺激によって, 培養ヒト正常気管支上皮 (NHBE) 細胞における IL-25 mRNA 発現 (4 h) が亢進し, IL-25 が産生 (8 h) されることを確認した (図3)。また, HDM による作

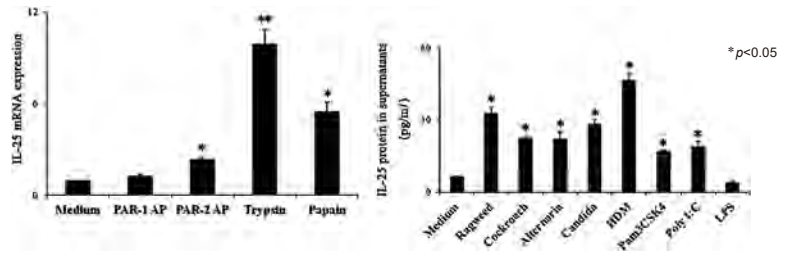
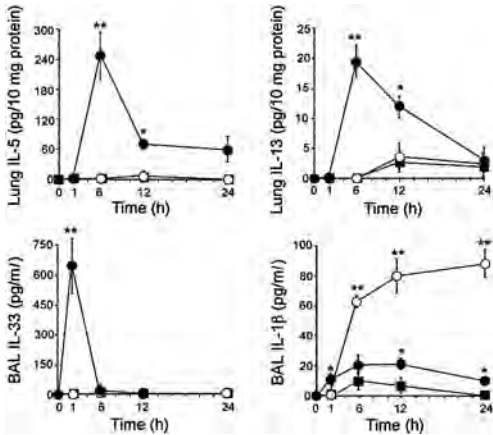
用は 56°C の前処理や, システインプロテアーゼ阻害薬 (E64) やセリンプロテアーゼ阻害薬 (APMSF) の前処理で消失し, NHBE 細胞の PAR-2 を siRNA でノックダウンすると抑制された (図4)。トリプシンやパピインの刺激で IL-25 が産生され, PAR-2 アゴニストの刺激でも IL-25 が産生されるが, PAR-1 アゴニスト刺激では産生されなかった。HDM の主要抗原である Der p 1 は IL-25 産生を誘導したが, Der p 2 にはこうした作用は認められなかった。さらに, 正常ヒト鼻



培養ヒト鼻粘膜上皮細胞における IL-25 mRNA 発現と IL-25 産生

図5 培養正常ヒト鼻粘膜上皮細胞における IL-25 mRNA 発現と IL-25 産生<sup>14)</sup>

PAR-1 agonist (100  $\mu$ M), PAR-2 agonist (100  $\mu$ M), Trypsin (10 nM), Papain (10 nM)

肺の IL-5, IL-13 と BAL 中 IL-33, IL-1 $\beta$ 

ST2 ノックアウトマウスの変化

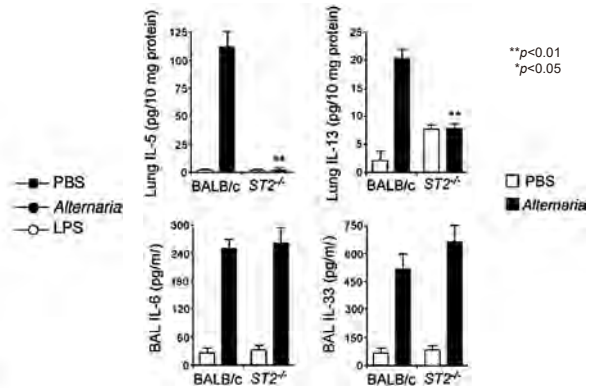


図6 アルテルナリア抽出物 (50  $\mu$ g) の点鼻投与で作成したマウスの2型炎症モデル<sup>15)</sup>

粘膜上皮細胞においても、トリプシンやパパイ、PAR-2 アゴニスト刺激によって、IL-25 mRNA 発現が亢進し、ブタクサ (ragweed) や、ゴキブリ、アルテルナリア、カンジダ、ハウスダスト (HDM) などの抗原刺激によって IL-25 産生が誘導された<sup>14)</sup> (図5)。以上より、HDM (Der p 1) などのアレルゲンが含有するプロテアーゼ活性によって、気道上皮細胞の PAR-2 受容体を介して IL-25 産生が誘導されると考えられる。

### ③ IL-33

われわれは、アルテルナリア抽出物 (50  $\mu$ g) をマウスに点鼻投与することによって、1時間後に気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の IL-33 が上昇し、次いで6時間後に肺に IL-5 と IL-13 が増加することを確認した。こうした変化は成熟した T/B 細胞が欠損した Rag1 ノックアウトマウスでも認められたが、IL-33 受容体の ST2 欠損マウスでは、IL-33 は上昇するが IL-5 と IL-13 の増加は認められなかった<sup>15)</sup> (図6)。以上より、このモデルではアレルゲン刺激によって IL-33 が産生され、獲得

免疫を介さずに2型炎症が惹起されると考えられる。

ヒトの鼻粘膜では上皮細胞の核内に IL-33 が存在し、培養ヒト正常気管支上皮 (NHBE) 細胞をアルテルナリア抽出物 (50  $\mu$ g/ml) で刺激すると、IL-33 は細胞質へ移動し、活性化した状態で放出された (2~8 h)。ゴキブリ抽出物の刺激でも IL-33 が放出されたが、TLR2, TLR3, TLR4 のリガンドである zymosan, Poly I:C, LPS では IL-6 産生は誘導されるが、IL-33 産生は認められなかった<sup>15)</sup> (図7)。IL-33 は細胞傷害によって放出される danger signal と考えられているが、アルテルナリア刺激による NHBE 細胞からの放出では、細胞傷害を伴わなかった。

また、アルテルナリアあるいはゴキブリ抽出物の刺激により、細胞外 ATP 濃度が上昇し、ATP は P2X7, P2Y2 受容体を介して、Ca<sup>2+</sup> の細胞内流入を引き起こして、IL-33 が放出されることがわかった。実際にマウスでアルテルナリアとともに、P2 受容体阻害薬の oATP や suramin を同時

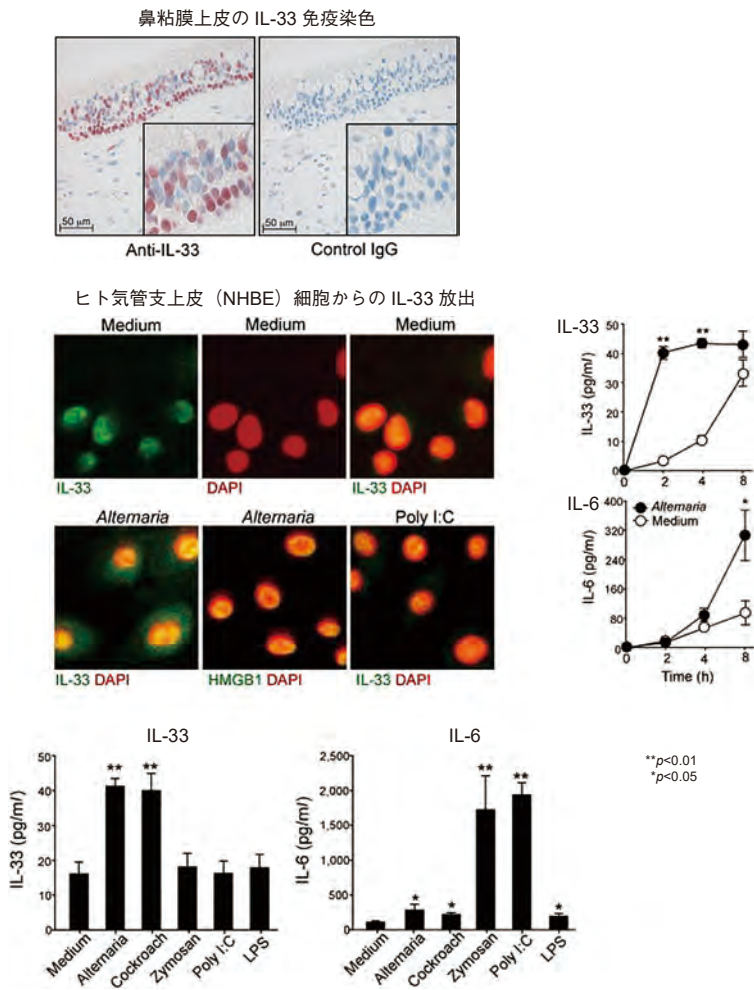


図7 鼻粘膜上皮の IL-33 免疫染色とヒト気管支上皮 (NHBE) 細胞からの IL-33 放出<sup>15)</sup>

投与すると、BAL 中の IL-33 産生が認められない。さらに、P2Y2 ノックアウトマウスでは、アルテリナリア刺激による肺での IL-5、IL-13 産生が抑制された<sup>15)</sup> (図 8)。

そのほか、アルテルナリアに含まれるセリンプロテアーゼが気道上皮細胞の PAR-2 受容体の活性化と ATP 産生を介して、IL-33 産生を誘導する報告もある<sup>16)</sup>。IL-33 の放出機序については、まだ十分解明されていないことも多いが、プロテアーゼ活性と PAR-2 受容体、ATP や Ca<sup>2+</sup> がかわり、アレルゲン刺激によって気道上皮細胞から放出され、アレルギー炎症を促進すると考えられる。

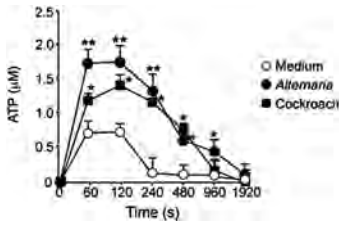
気道上皮細胞から放出された IL-33 は 2 型自然リンパ球 (ILC2s) などに作用して、2 型サイトカイン産生を誘導する。われわれは、IL-33 が好塩基球からの IL-5 産生を誘導することを、IL-33

を遺伝子導入した気道上皮細胞と好塩基球細胞株の KU812 細胞を共培養することで明らかにした。さらに、共培養によって気道上皮細胞と KU812 細胞の両方から、IL-33 の機能を中和する可溶性 ST2 受容体が産生され、過剰な炎症反応を制御するフィードバック機構が存在していることが判明した<sup>17)</sup>。

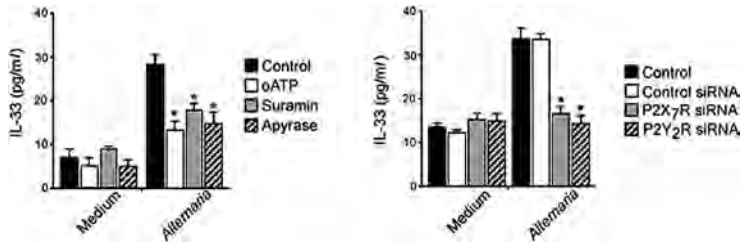
#### ④カルプロテクチン (S100A8/S100A9 蛋白)、ATP、HMGB1 の役割

カルプロテクチンは S100A8 と S100A9 蛋白のヘテロダイマーで、IL-33 や ATP と同様に細胞死などで放出される「alarmin」の一種と考えられる。上皮細胞とともに好中球や単球から放出され、抗微生物作用や好中球、単球の遊走因子としての役割を有する<sup>18)</sup>。また、TLR4 と RAGE を受容体として気道上皮細胞やケラチノサイトから IL-8 や

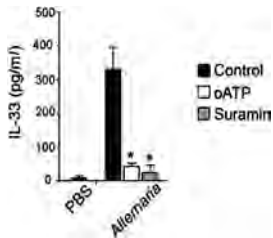
抗原刺激による細胞外 ATP 濃度の変化



アルテルナリア刺激による IL-33 産生に対する P2 受容体阻害薬と siRNA の抑制作用



P2 受容体阻害薬の点鼻投与による BAL 中 IL-33 産生抑制



P2Y2 ノックアウトマウスにおける肺の IL-5, IL-13 産生抑制

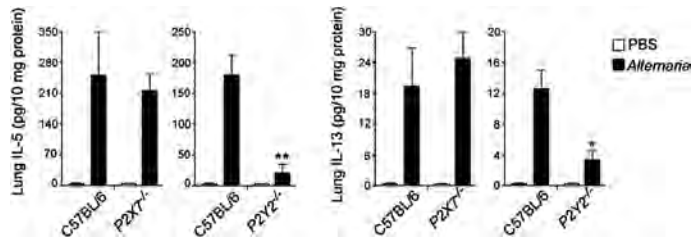


図 8 ヒト正常気管支上皮 (NHBE) 細胞からの ATP, IL-33 産生と、マウスのアルテルナリア点鼻モデルにおける、P2 受容体阻害薬 (oATP, suramin), P2X7, P2Y2 受容体のノックダウン, ノックアウトの影響<sup>15)</sup>

TNF- $\alpha$  産生を誘導する<sup>19, 20)</sup>。鼻茸組織や鼻腔洗浄液中にも存在するがその機能についてまだ十分に解明されていない<sup>21)</sup>。

われわれは、アルテルナリアや HDM, 黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼの刺激, トリプシン, パパインなどによって, Poly(I:C) や LPS 刺激と同様に, 培養ヒト正常気管支上皮 (NHBE) 細胞からカルプロテクチン産生が誘導されることを明らかにした。また, アルテルナリアや HDM, 黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼの刺激によるカルプロテクチン産生は, プロテアーゼ阻害薬の E64 や APMSF の前処理によって抑制されたことから, TSLP や IL-25 と同様にアレルゲンが含有するプロテアーゼ活性がカルプロテクチン産生に関与している (図 9)。また, カルプロテクチンは ATP やアルテルナリアとの相互作用で TSLP や IL-25 産生を亢進させた (図 10)。アルテルナリアによる TSLP, IL-25 産生は, P2 受容体阻害薬や, S100A8 や S100A9 のノックダウン, カルプロテクチンの受容体である TLR4 や RAGE のノックダウンで抑制された (図 11)。以上より, アルテルナリアによる TSLP, IL-25 産生には, アレルゲンが含有するプロテアーゼ活性とともに ATP やカルプロテクチンがかかわっていると考えられ

る。さらに, 好酸球性鼻副鼻腔炎由来の培養鼻粘膜上皮細胞では, アルテルナリアや HDM, 黄色ブドウ球菌由来プロテアーゼの刺激によるカルプ

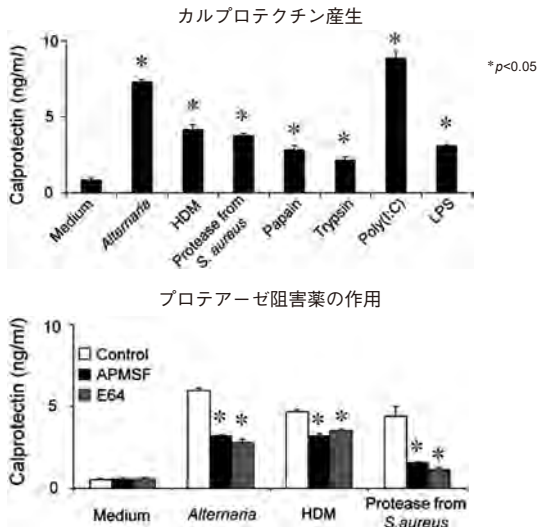


図 9 培養ヒト正常気管支上皮細胞からのカルプロテクチン産生 (24 h) とプロテアーゼ阻害薬の作用<sup>22)</sup>

Alternaria (200  $\mu\text{g/ml}$ ), HDM (100  $\mu\text{g/ml}$ ), protease from *S. aureus* (1  $\mu\text{g/ml}$ ), papain (10 nM), trypsin (10 nM), poly(I:C) (10  $\mu\text{g/ml}$ ), LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ), E64: システインプロテアーゼ阻害薬, APMSF: セリンプロテアーゼ阻害薬

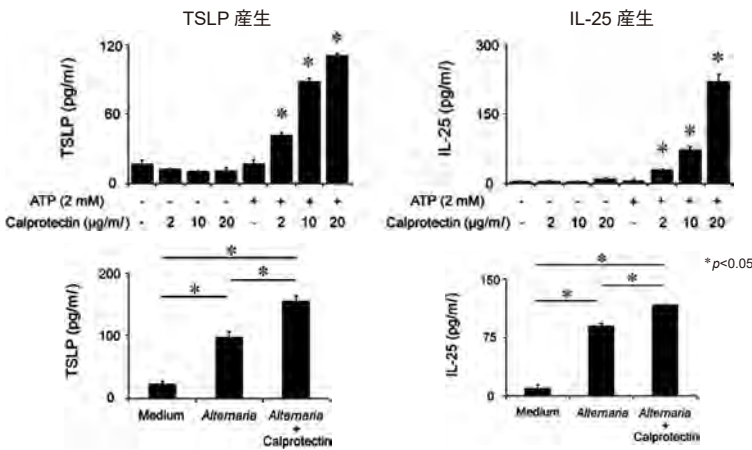


図10 カルプロテクチンとATP刺激、カルプロテクチン(2 µg/ml)とアルテルナリア刺激による培養ヒト正常気管支上皮(NHBE)細胞からのTSLP, IL-25産生<sup>22)</sup>

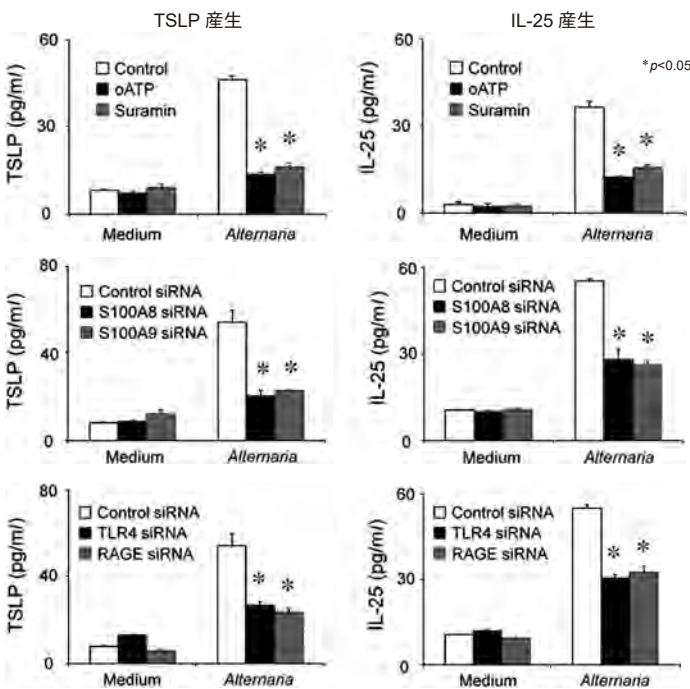


図11 アルテルナリア刺激によるTSLP, IL-25産生に対する、P2受容体阻害薬(oATP, suramin), siRNAによるS100A8, S100A9, TLR4, RAGEのノックダウンの影響<sup>22)</sup>

ロテクチン産生が亢進していた。一方、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜上皮中のカルプロテクチン量は健常人と差を認めないが、好酸球性鼻副鼻腔炎患者の鼻粘膜上皮ではカルプロテクチン量が低下していた<sup>22)</sup>。

HMGB1は核内に存在する非ヒストン核蛋白質で、さまざまな転写因子活性を間接的に調節している。細胞死によって放出される alarmin の1種と考えられ、TLR4やRAGE受容体を介して炎症反応を誘導するが、実際には上述したIL-33やカルプロテクチンと同様に細胞死を伴わない能動的

な分泌機序が存在する。われわれは、アレルギー性鼻炎や慢性鼻副鼻腔炎の鼻汁中に高濃度のHMGB1が存在すること、TNF-α(10~20 ng/ml)は細胞死を伴わずに培養鼻粘膜上皮細胞からのHMGB1産生を増加させること、HMGB1(100 ng/ml)がTLR4を介して培養鼻粘膜上皮細胞からのIL-6, IL-8産生を亢進させて、炎症反応を誘導することを確認している<sup>23)</sup>。このように、気道上皮細胞は自然免疫にかかわるさまざまな炎症因子を放出して、アレルギー性鼻炎や慢性鼻副鼻腔炎などの炎症反応に直接かかわっている。

図12 鼻汁中の IL-25 濃度 (左図) と、スギ花粉抽出液 (JC: 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と poly(I:C) (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 刺激による培養鼻粘膜上皮細胞からの IL-25 産生 (24 h) (右図)<sup>24)</sup>

JC: スギ花粉症患者由来, HC: 健康人由来の培養鼻粘膜上皮細胞 (右図)

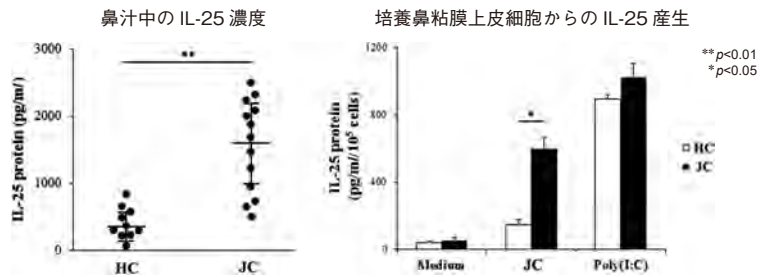
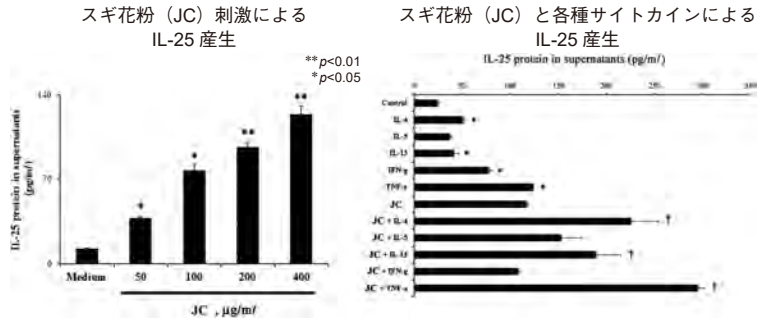


図13 培養ヒト正常気管支上皮 (NHBE) 細胞からの IL-25 産生 (24 h)<sup>24)</sup>

右図: スギ花粉 (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IL-4 (100 ng/ml), IL-5 (100 ng/ml), IL-13 (100 ng/ml), IFN- $\gamma$  (100 ng/ml), TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), \* $P > 0.05$ : 培地のみとの比較, † $P > 0.05$ : JC 刺激との比較



## 2) スギ花粉症と IL-25

### ①スギ花粉症における鼻粘膜上皮からの IL-25 産生

さまざまな環境抗原が上皮由来サイトカイン産生にかかわることが明らかになったが, スギ花粉の作用についてはほとんど検討されていない。そこで, スギ花粉症における鼻粘膜上皮細胞からの IL-25 産生について検討した。

スギ花粉症患者では健康人と比較して, スギ花粉飛散期の鼻汁中に高濃度の IL-25 が認められた。また, スギ花粉症患者由来の培養鼻粘膜上皮細胞では, 健康人由来の培養鼻粘膜上皮細胞に比べて, スギ花粉抽出物の刺激による IL-25 産生が亢進していた (図12)。また, スギ花粉抽出物は濃度依存性に培養ヒト正常気管支上皮 (NHBE) 細胞からの IL-25 産生を誘導した。スギ花粉刺激による IL-25 産生に対する各種サイトカインの影響を検討したところ, IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  それ自体が IL-25 産生を誘導するが, IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$  はスギ花粉による IL-25 産生を相乗的に亢進させた<sup>24)</sup> (図13)。つまり, アレルギー炎症が存在する状態や, アレルギー素因のある患者では, スギ花粉の曝露による IL-25 産生が亢進すると考えられる。

### ②スギ花粉による IL-25 産生機序

スギ花粉には主要抗原である Cry j 1 や Cry j 2 以外に, PGE<sub>2</sub> や LTB<sub>4</sub> などのエイコサノイド, セリンプロテアーゼやアスパラギン酸プロテアーゼ, NADPH オキシダーゼなどが含まれ, 直接的にあるいはアジュバントとして間接的にアレルギー炎症にかかわっている。そこで, スギ花粉による IL-25 産生がどのように誘導されるか検討したところ, Cry j 1 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Cry j 2 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), LTB<sub>4</sub> (10 nM), PGE<sub>2</sub> (1  $\mu\text{M}$ ) はいずれも NHBE 細胞からの IL-25 産生を誘導しなかった<sup>24)</sup>。

次に, スギ花粉抽出物 (JC: 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいは Poly(I:C) (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を NADPH オキシダーゼ阻害薬 (VAS-2870, DPI) あるいは各種プロテアーゼ阻害薬 (Pepstatin A, APMSF, E64) で30分間前処理して, IL-25 産生について検討した。さらに, PAR-2 阻害薬 (ENMD-1068) で30分間前処理した NHBE 細胞あるいは siRNA で PAR-2 をノックダウンした NHBE 細胞を用いて検討した。スギ花粉刺激による IL-25 産生は NADPH オキシダーゼ阻害薬 (VAS-2870, DPI) やセリンプロテアーゼ阻害薬 (APMSF) の前処理で抑制され, PAR-2 阻害薬 (ENMD-1068) で前処理した NHBE 細胞や, PAR-2 をノックダウンした NHBE 細胞でもスギ花粉刺激による IL-25 産生が抑制さ

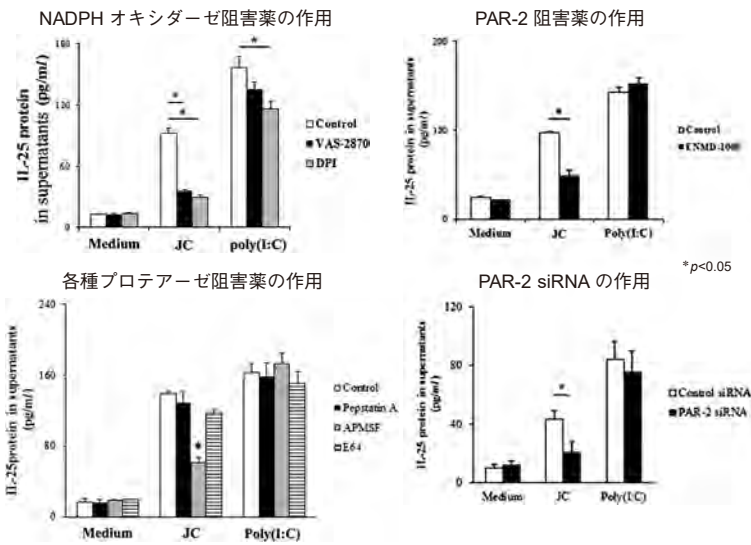


図 14 スギ花粉抽出液 (JC: 200 µg/ml) と poly(I:C) (10 µg/ml) 刺激による培養ヒト正常気管支上皮 (NHBE) 細胞からの IL-25 産生に対する作用<sup>24)</sup>

NADPH オキシダーゼ阻害薬 (VAS-2870, DPI), アスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬 (Pepstatin A), セリンプロテアーゼ阻害薬 (APMSF), システインプロテアーゼ阻害薬 (E64), PAR-2 阻害薬 (ENMD-1068)

れた<sup>24)</sup> (図 14)。

スギ花粉の細胞質にはセリンプロテアーゼ (CPA9) とアスパラギン酸プロテアーゼ (CPA63) が存在するが<sup>25)</sup>, このうちセリンプロテアーゼが上皮細胞の PAR-2 受容体を介して IL-25 産生にかかわると考えられる。また, スギ花粉やブタクサ花粉などほとんどの花粉は NADPH オキシダーゼを含有し, 気道上皮細胞での活性酸素産生を誘導する<sup>26)</sup>。NADPH オキシダーゼを除去したブタクサ花粉や, 抗酸化物質を同時投与したブタクサ花粉刺激ではマウスのアレルギー性炎症が抑制されることも確認されている<sup>27, 28)</sup>。さらに, アレルゲンによって産生される ATP が気道上皮細胞の NADPH オキシダーゼの DUOX1 を活性化して IL-33 や IL-1α, IL-25 産生にかかわることも報告されている<sup>16, 29)</sup>。

つまり, スギ花粉を含むアレルゲンには, 各種プロテアーゼや NADPH オキシダーゼが含まれ, 気道上皮細胞における ATP やカルプロテクチン, 活性酸素の産生, PAR-2 受容体の活性化などを介した相互作用により, IL-25 とともに TSLP, IL-33 などの産生も誘導して 2 型炎症が促進されることが考えられる。

### 3) アレルギー性鼻炎における自然免疫の役割

スギ花粉や HDM などのアレルゲンは, さまざま

なアレルゲンコンポーネントやプロテアーゼ活性, NADPH オキシダーゼ活性などを含有し, こうしたアレルゲン分子の生化学的活性が, 鼻粘膜上皮細胞のバリア機能や自然免疫機構を攪乱, 刺激して, アレルギー炎症の感作や増悪にかかわっている。気道上皮細胞は物理的なバリアとしてアレルゲンの侵入を防いでいるが, アレルゲン由来の各種プロテアーゼはバリア機能を破綻させ, アレルゲンの粘膜内への侵入を容易にして, 獲得免疫を含めた各種の免疫応答を誘導する。一方で鼻粘膜上皮細胞はアレルゲンに由来するプロテアーゼ活性や NADPH オキシダーゼ活性などのさまざまな刺激により, ATP やカルプロテクチン産生, PAR-2 受容体の活性化, DUOX1 の活性化や活性酸素産生などを介して, TSLP, IL-25, IL-33 などの上皮由来サイトカインを産生する。こうした上皮由来サイトカインは樹状細胞を活性化し, Th2 細胞や濾胞性ヘルパー T (Th) 細胞の分化増殖を誘導し, 抗原特異的 IgE 産生にいたる獲得免疫を活性化する。また, マスト細胞や好塩基球, 好酸球などを活性化するとともに, 2 型自然リンパ球を刺激して, 自然免疫反応を活性化させる。このようにアレルゲン刺激に対しては, 鼻粘膜上皮細胞が起点となって, 自然免疫と獲得免疫が相互に作用しながら, アレルギー炎症の病態が形成される (図 15)。

近年, IL-5 や IL-4, IL-13 などの 2 型サイトカ

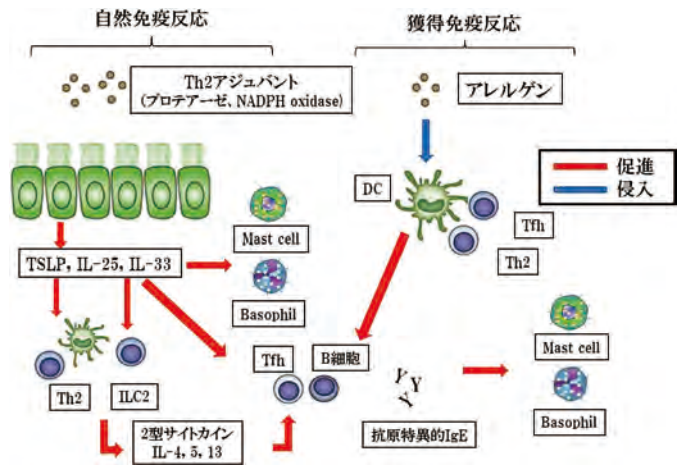


図 15 アレルギー性鼻炎における自然免疫と獲得免疫の相互作用

インや IgE に対する生物学的製剤が開発され、気管支喘息、好酸球性鼻副鼻腔炎、スギ花粉症などの臨床的有効性が確認されている。TSLP や IL-25, IL-33 などに対する生物学的製剤の開発もすすみ、近い将来に臨床で使用できるようになる可能性がある。しかし、アレルギーに含まれる分子を標的とした創薬についてはまだほとんど検討されていない。アレルギー由来の新たな分子や、新たなサイトカインや細胞集団とその生理機能など、次々と新しい事象が明らかになる免疫・アレルギー領域はまだ解明されていない部分が多く、今後も新たな治療ターゲットが明らかになる可能性が高い。

## 2. アレルギー性鼻炎と 2 型自然リンパ球 (ILC2s)

IgE 抗体による獲得免疫が中心のアレルギー性鼻炎で、上皮由来サイトカインなどの自然免疫の関与が明らかになり、2 型自然リンパ球 (ILC2s) の役割が注目されている。マウスの気道炎症モデルにおいて、肺の ILC2s は  $CD4^+T$  細胞の増殖や 2 型サイトカイン産生を増強させ<sup>30)</sup>、樹状細胞の遊走、活性化やメモリー Th2 細胞の増殖、活性化を誘導して<sup>31)</sup>、抗原刺激によるアレルギー炎症を増悪させる。卵白アルブミン (OVA) とパパインを点鼻投与して作成したアレルギー性鼻炎モデルマウスでも、パパイン刺激によって誘導される ILC2s は Th2 細胞による好酸球浸潤

や鼻粘膜肥厚を増悪させる<sup>32)</sup>。実際のアレルギー性鼻炎において、ILC2s 由来の 2 型サイトカインがどの程度重要であるかについては、十分解明されていないが、OVA による喘息モデルマウスの肺では、ILC2s が IL-5, IL-13 の主要な産生源になっている<sup>33)</sup>。そこで、アレルギー性鼻炎における末梢血中の ILC2s と鼻粘膜中の ILC2s の役割について、われわれの研究内容を含めて概説する。

### 1) 末梢血における 2 型自然リンパ球 (ILC2s)

アレルギー性鼻炎では、ネコアレルギー患者にアレルギーを点鼻投与すると、4 時間後に末梢血中の ILC2s が増加する<sup>34)</sup>。セイヨウモモの花粉尘患者では花粉飛散期に末梢血中 ILC2s が増加し、皮下免疫療法 (8~36 か月間) 後には、花粉飛散期の増加が抑制される<sup>35)</sup>。イネ科、カバノキ、ブタクサなどによるアレルギー性結膜炎患者でも、花粉飛散期に末梢血中 ILC2s が増加するが、4 か月間の舌下免疫療法では効果が認められない<sup>36)</sup>。ダニアレルギー性鼻炎患者で末梢血中の ILC2s が増加し、血清 IL-13 値や臨床的重症度と相関する報告もある<sup>37)</sup>。

われわれの検討では、喘息のないアレルギー性鼻炎患者は、健常人に比べて末梢血中の ILC2s の割合が高く、とくに血清 IgE 値が高い患者で ILC2s が増加している傾向が認められた。一方、喘息患者は末梢血中 ILC2s が低下していた<sup>38)</sup> (図 16)。

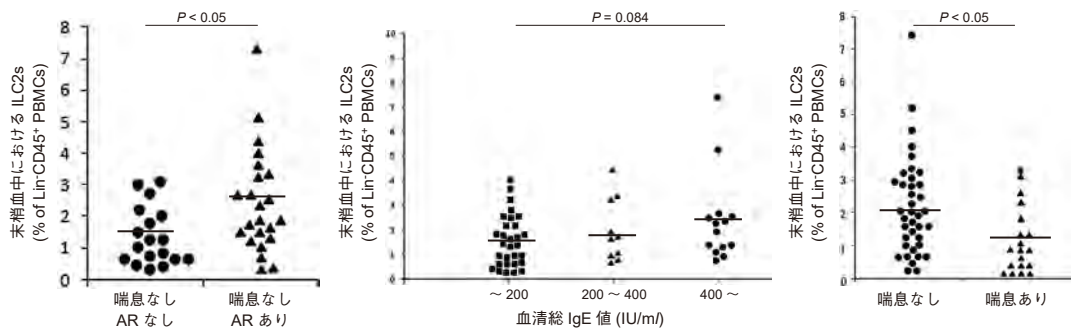


図16 末梢血中の2型自然リンパ球 (ILC2s) の割合<sup>38)</sup>

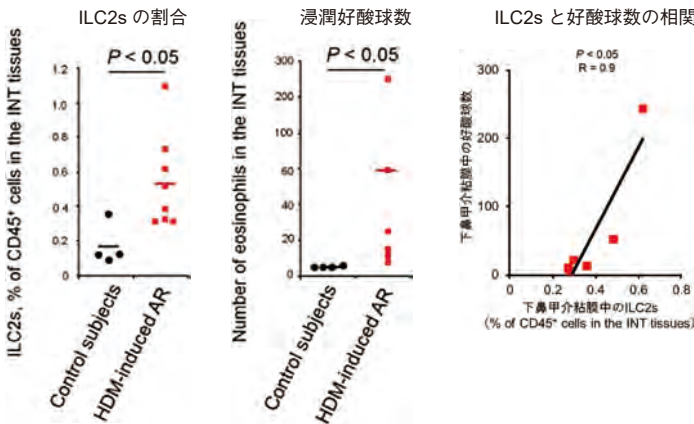


図17 アレルギー性鼻炎下鼻甲介中の2型自然リンパ球 (ILC2s) の割合と浸潤好酸球数<sup>42)</sup>

舌下免疫療法との関連で、ダニアレルギー性鼻炎患者では末梢血中の ILC2s が増加し ILC1s が低下しているが、舌下免疫療法が有効な症例ではこの不均衡が是正されること<sup>39)</sup>、アレルギー性鼻炎患者では IL-10 を産生する制御性 ILC2s が減少しているが、舌下免疫療法後には回復すること<sup>40)</sup>などが報告されている。われわれも、スギ花粉舌下免疫療法2年後には、末梢血中の ILC2s が減少することを確認している (未発表データ)。

## 2) 鼻粘膜における2型自然リンパ球 (ILC2s)

### ① 2型自然リンパ球 (ILC2s) 数

喘息を伴う花粉症患者の鼻粘膜をアレルゲンで刺激すると、6時間後の鼻粘膜擦過サンプル中の ILC2s 数が増加する<sup>41)</sup>。喘息の影響が除外できないが、アレルギー性鼻炎ではアレルゲン曝露により末梢血中の ILC2s が鼻粘膜へ遊走する可能性が考えられる。われわれは、ダニアレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介粘膜中の ILC2s をフローサイトメトリーで測定したところ、健常人に比べて

ILC2s が増加し、浸潤好酸球数と相関していた (図17)。また、アレルギー性鼻炎の下鼻甲介由来の ILC2s を分離培養して、IL-2 (50 ng/ml) の存在下で、IL-33 (10 ng/ml) や、PGD<sub>2</sub> (1 μM)、LTD<sub>4</sub> (50 nM) で刺激すると、健常人由来の ILC2s に比べて多量の IL-5、IL-13 を産生すること、さらに CysLT1 受容体の発現が亢進していることを確認した<sup>42)</sup>。以上より、アレルギー性鼻炎の病態にも鼻粘膜局所の ILC2s が深くかかわると考えられる。

### ② 2型自然リンパ球 (ILC2s) の活性化機序

次に、アレルギー性鼻炎の鼻粘膜における ILC2s の活性化機序について検討した。アレルギー性鼻炎の鼻粘膜や鼻汁中では、TSLP、IL-25、IL-33 などの上皮由来サイトカインが増加する報告が多い<sup>1)~6)</sup>。われわれは、ダニアレルギー患者に HDM ディスクによる誘発試験を行い、10分後に鼻腔洗浄液を採取して TSLP、IL-25、IL-33 について検討したが、いずれも有意な増加は認められなかった。一方、PGD<sub>2</sub> と CysLTs (LTC<sub>4</sub>、



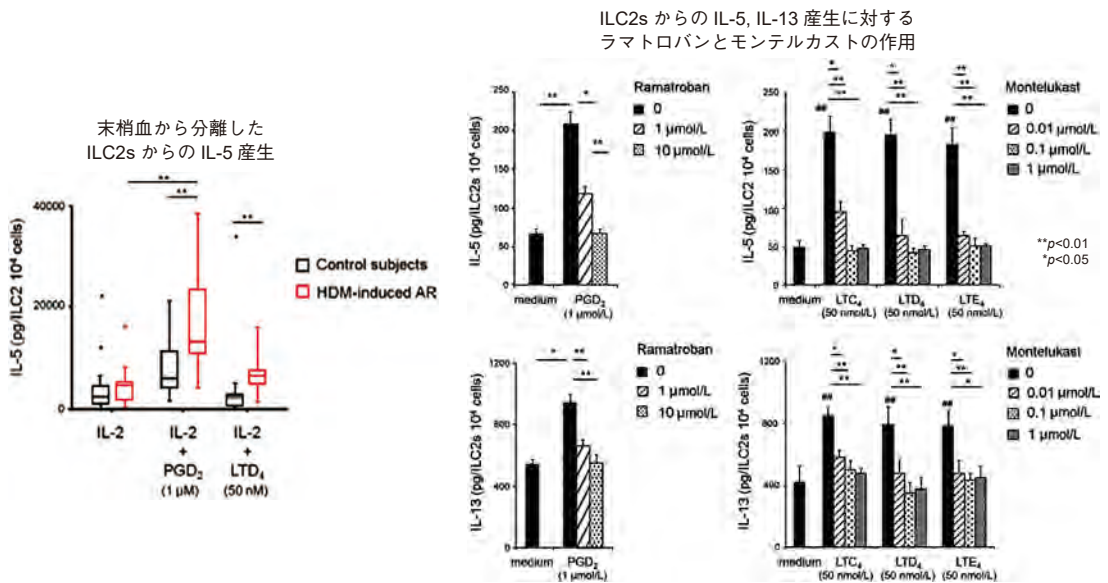


図 18 末梢血から分離した ILC2s からの IL-5, IL-13 産生と、ラマトロバンとモンテルカストの作用<sup>42)</sup>

D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>) は著明に増加した<sup>42)</sup>。

また、末梢血由来の ILC2s を分離培養して、IL-2 (50 ng/ml) 存在下に IL-5/IL-13 産生について検討したところ (24 h), PGD<sub>2</sub> (1 μM) と LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> (50 nM) は、IL-33 や IL-25 (10 ~ 100 ng/ml) と同様に ILC2s からの IL-5/IL-13 産生を増加させたが、トロンボキサン A<sub>2</sub> や PAF (platelet-activating factor), ヒスタミン, ニューロキニン A, サブスタンス P などにはこうした作用は認められなかった。アレルギー性鼻炎患者由来の ILC2s では、健康人由来の ILC2s に比べて、PGD<sub>2</sub> (1 μM) や LTD<sub>4</sub> (50 nM) 刺激による IL-5 産生が有意に増加していた (図 18)。さらに、PGD<sub>2</sub> 受容体の 1 つである CRTH2/ トロンボキサン受容体阻害薬のラマトロバンと、CysLT1 受容体阻害薬のモンテルカストは、それぞれ PGD<sub>2</sub> と LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> による ILC2s からの IL-5/IL-13 産生を抑制した<sup>42)</sup> (図 18)。

以上の結果、アレルギー性鼻炎の即時相における反応では、マスト細胞から放出される PGD<sub>2</sub> や CysLTs (LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>) が、鼻粘膜中に増加し活性化している ILC2s からの 2 型サイトカイン産生を誘導すると考えられる。ラマトロバンやモンテルカストによる臨床効果には、ILC2s からの 2 型サイトカイン産生を抑制する作用が含まれて

いることが示唆され、ILC2s の制御法を検討することが、新たな治療法の開発につながる可能性がある。

### 3. 木村病と 2 型自然リンパ球 (ILC2s)

#### 1) 木村病の病態

軟部好酸球肉芽腫症 (木村病) は、顔面や頸部などの皮下軟部組織に、無痛性で境界不明瞭な軟らかい腫瘤を形成し、慢性の経過をたどる難治性の肉芽腫性疾患である。かゆみを伴うことが多く、耳下腺とその周囲の皮下組織に発生しやすい。血液検査で好酸球増多と血清 IgE 値の高値が認められ、病理検査では結合組織中に好酸球浸潤を伴うリンパ濾胞が認められる。1948 年に木村ら<sup>43)</sup>、1959 年には飯塚らにより木村病として提唱された<sup>44)</sup>。東アジアの若年男性に多く、過去 30 年間に 238 症例が報告されているまれな疾患である<sup>45)</sup>。かゆみを伴う皮下腫瘤は、外科的切除や経口ステロイド薬により一時的に緩和するが、再燃する場合が多い。

木村病の原因はほとんどわかっていないが、カンジダに対する特異的 IgE 抗体が陽性になる例も多く、その病態には 2 型炎症が関与している。かゆみを伴う局所病変には、好酸球浸潤とともに

表1 木村病患者とダニアレルギー性鼻炎患者、健常人の血液検査所見

	健常人 (n = 13)	ダニアレルギー性鼻炎 (n = 16)	木村病 (n = 4)
年齢	38.8 ± 3.0	30.8 ± 2.2	34.3 ± 9.1
性別, 男/女	8/5	11/5	4/0
末梢血好酸球率	2.1 ± 0.5	3.7 ± 0.5	14.2 ± 2.8**
血清総IgE値 (IU/ml)	56 ± 30	625 ± 475*	1652 ± 181**
RAST: ダニクラス	0	3.1 ± 0.4**	0.3 ± 0.3 †
痒み (%)	0	25	100*** †

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , vs 健常人 †  $P < 0.05$ , vs ダニアレルギー性鼻炎

IL-4 や IL-5 を発現するマスト細胞や T 細胞が集簇し<sup>46)</sup>, 末梢血単核球では, Th2 細胞の割合 (CD4<sup>+</sup> 細胞中の CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 細胞) が増加し, IL-4, IL-5, IL-13 の mRNA 発現とその産生が亢進し, 末梢血好酸球数と相関する<sup>47, 48)</sup>.

しかしながら, IL-4, IL-5, IL-13 を多量に産生する 2 型自然リンパ球 (ILC2s) など, 自然免疫の役割については検討されていない。そこで, 木村病における自然免疫の関与について, 2 型自然リンパ球 (ILC2s) の役割を中心に検討した。

## 2) 2 型自然リンパ球 (ILC2s) と IL-4, IL-5, IL-13

木村病患者から採血して, 末梢血中の ILC2s の割合をフローサイトメトリーで検討し, 血清中の IL-4, IL-5, IL-13, IL-31, TSLP 値を ELISA 法で測定した。木村病患者は, ダニアレルギー性鼻炎患者や健常人に比べて, 血中好酸球率や血清総 IgE 値が高く, 全例でかゆみ症状を訴えた (表 1)。また, 末梢血の CD45<sup>+</sup> 細胞における ILC2s の割合 (末梢血 ILC2s 率) が高く, 末梢血 ILC2s 率は末梢血好酸球率と強く相関し, 血清総 IgE 値とも弱く相関した。血清中の IL-4 値と TSLP 値には差を認めず, IL-5 値は検出感度以下であったが, 木村病では IL-13 値が上昇し, IL-31 値が低下し, 末梢血 ILC2s 率は血清 IL-13 値と相関する傾向が認められた<sup>49)</sup> (図 19)。

次に, 木村病の末梢血から ILC2s を分離培養して, IL-2 (50 ng/ml) とともに PGD<sub>2</sub> (1 μM), LTD<sub>4</sub> (50 nM) などと 12 時間培養して, 上清中の IL-4, IL-5, IL-13, IL-31 値を測定した。木村病患者由来の ILC2s は, ダニアレルギー性鼻炎

患者や健常人由来の ILC2s に比べて, PGD<sub>2</sub> や LTD<sub>4</sub> による IL-4, IL-5, IL-13 産生が増加し (図 20), デキサメタゾン (10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-7</sup> M) はこうした ILC2s からの IL-5, IL-13 産生を抑制した。一方, IL-31 の産生は認められなかった<sup>49)</sup>。

このように, 木村病では末梢血中に活性化した ILC2s が増加し, 2 型サイトカインを産生して病態に深くかかわっている。かゆみ症状について, IL-4, IL-13, IL-31 は感覚神経を直接刺激して, ヒスタミンより強くかゆみを誘導する<sup>50, 51)</sup>。IL-31 は Th2 細胞などから産生され<sup>52)</sup>, アトピー性皮膚炎や気管支喘息では血清 IL-31 値が上昇し, 重症度と相関する<sup>53, 54)</sup>。とくに, アトピー性皮膚炎のかゆみには IL-31 が関与し, 抗 IL-31 受容体抗体がかゆみの緩和に有効である<sup>55)</sup>。しかしながら, 木村病では血清 IL-31 値は低く, ILC2s などから産生される IL-13 がかゆみ症状にかかわる可能性が考えられた。

## 3) 木村病の臨床経過と 2 型自然リンパ球 (ILC2s)

右耳下腺周囲の腫脹とかゆみを主訴に受診した 41 歳男性の臨床経過と, 末梢血の ILC2s 率, 好酸球率の変化を図 21 にまとめた。初診時の末梢血 ILC2s 率は 4.9% と極めて高く, 末梢血好酸球率 15.9%, 血清総 IgE 値 1,434 IU/ml, VAS スコアで評価した全身のかゆみや日常生活の支障度はともに 10 点 (10 点満点) で, 木村病と診断された。耳下腺および周囲の病変を外科的に切除し, 同時にプレドニゾロン (PSL) を 125 mg から減量しながら投与したところ, 術後 1 日目から末梢血 ILC2s 率, 好酸球率とも低下し, かゆみと日常生活

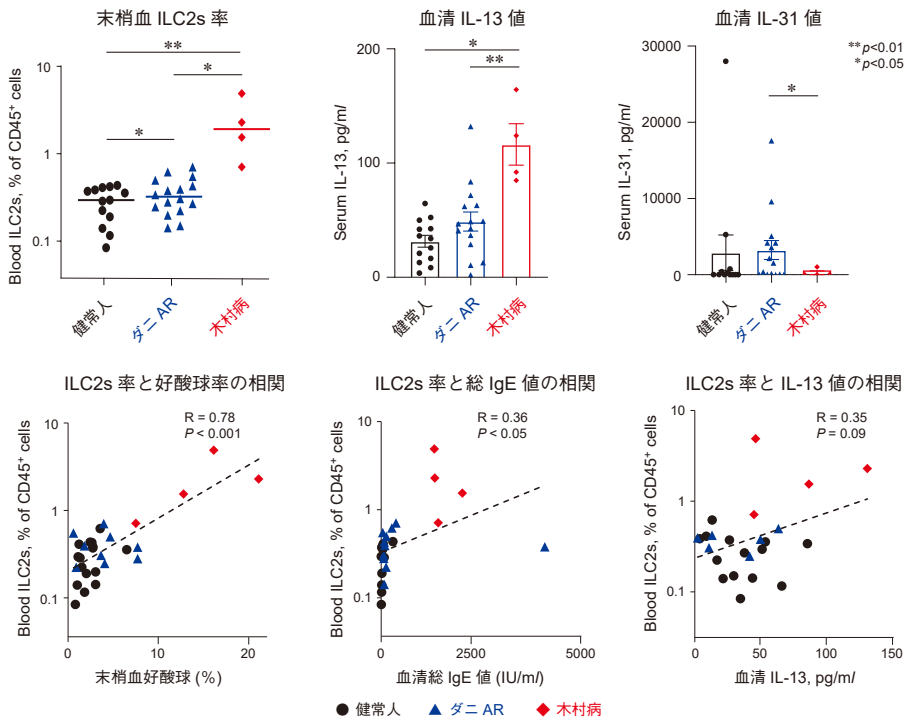


図 19 木村病患者とダニアレルギー性鼻炎患者，健康人の末梢血 ILC2s 率と血清 IL-13，IL-31 値，末梢血 ILC2s 率と末梢血好酸球率，血清総 IgE 値，血清 IL-13 値との相関<sup>49)</sup>

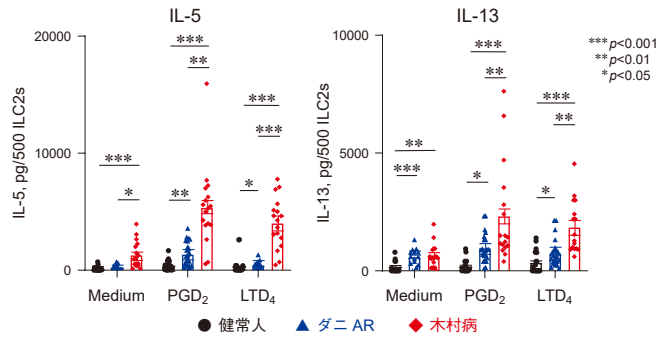


図 20 木村病患者とダニアレルギー性鼻炎患者，健康人由来の ILC2s からの IL-5，IL-13 産生<sup>49)</sup>

活の支障度の VAS スコアはいずれも 0 点まで低下した。

術後 3～5 年経過するに従って，耳下腺周囲の腫脹が増悪し，かゆみや日常生活に関する VAS スコアの上昇とともに，末梢血 ILC2s 率や好酸球率が増加した。そこで PSL を再投与（30 mg あるいは 15 mg）すると，臨床症状や VAS スコ

アの改善とともに，末梢血の ILC2s 率と好酸球率が連動して低下した。木村病における末梢血中の ILC2s 率は，好酸球率とともに，病態の重症度を反映すると考えられた。ステロイド以外に有効な薬物療法がない木村病に対して，IL-5 や IL-13 に対する生物学的製剤や ILC2s の制御が新たな治療法になる可能性がある。

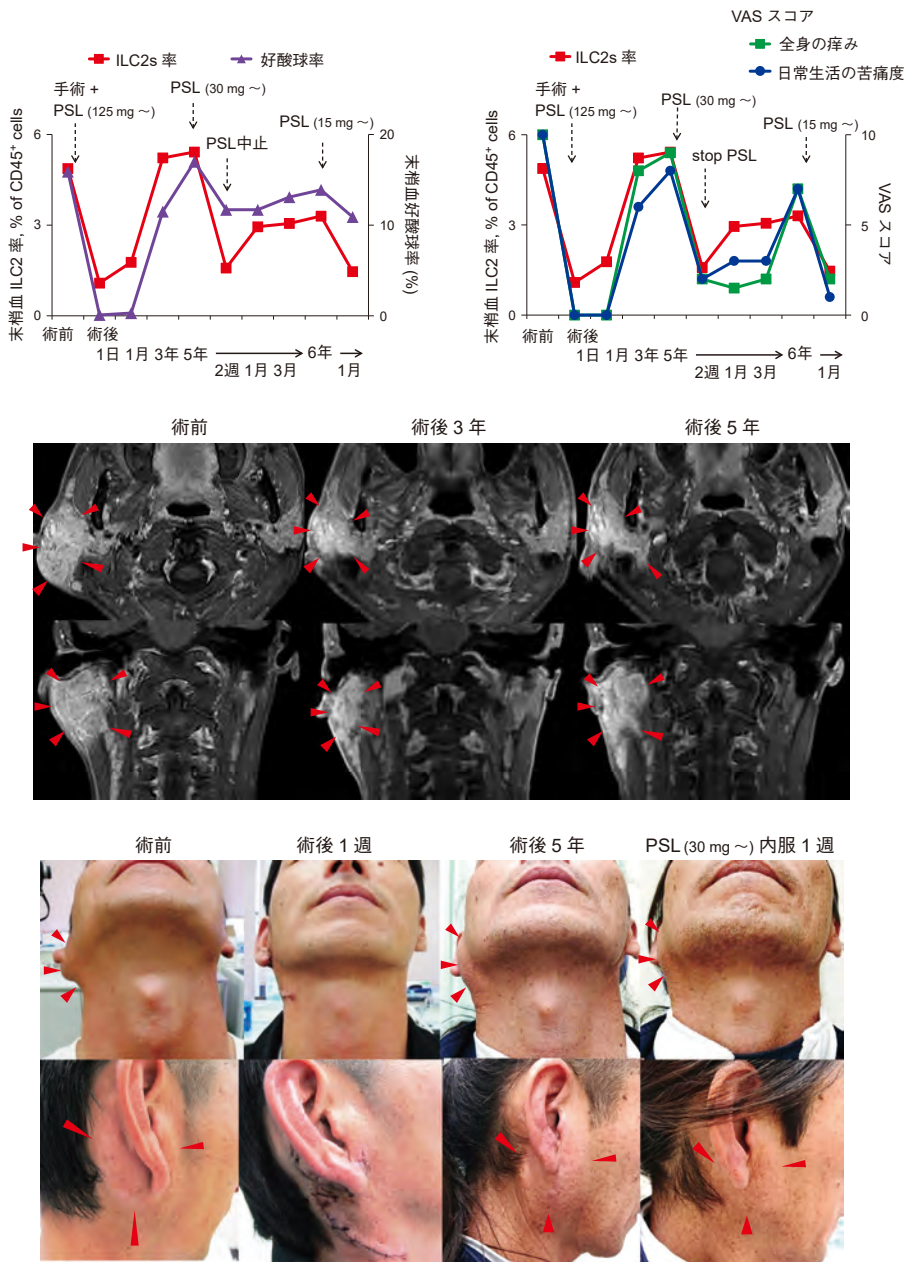


図 21 木村病事例の臨床症状の変化と末梢血 ILC2s 率, 好酸球率の変化<sup>49)</sup>

まとめ

疑問：自然免疫の役割は？

答え：スギ花粉やダニなどのアレルゲンは、さまざまなアレルゲンコンポーネントとともに、各種プロテアーゼ活性や NADPH オキシダーゼ活性などを含有し、こうした生物学的活性が鼻粘膜上皮細胞のバリア機能を破綻させ、上皮細胞から上皮由来サイトカインの TSLP, IL-25, IL-33 産生を誘導して自然免疫を活性化させる。また、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜には活性化した 2 型自然リンパ球 (ILC2s) が存在し、上皮由来サ

イトカインだけでなく、マスト細胞から放出される PGD<sub>2</sub> や LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> 刺激などによって多量の 2 型サイトカインが産生される。アレルギー性鼻炎の本態は自然免疫と獲得免疫の相互作用にある。近い将来に TSLP や IL-25, IL-33 に対する生物学的製剤が臨床応用される可能性があるが、将来的に、アレルゲンの上皮細胞とのかかわりや、2 型自然リンパ球 (ILC2s) の制御などが新たな治療ターゲットになる可能性が考えられる。

原因不明の難治性疾患である木村病の病態にも、2 型自然リンパ球 (ILC2s) などの自然免疫がかかわり、IL-13 がかゆみ症状に関与している。ステロイド以外に有効な薬物療法がない木村病に対して、こうしたサイトカインに対する生物学的製剤などに臨床的有効性が期待できる。

## 文献

- Xu G, Zhang L, Wang DY, et al. Opposing roles of IL-17A and IL-25 in the regulation of TSLP production in human nasal epithelial cells. *Allergy* 2010;65:581-589.
- Asaka D, Yoshikawa M, Nakayama T, et al. Elevated levels of interleukin-33 in the nasal secretions of patients with allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;158 Suppl 1:47-50.
- Tyurin YA, Lissovskaya SA, Fassahov RS, et al. Cytokine profile of patients with allergic rhinitis caused by pollen, mite, and microbial allergen sensitization. *J Immunol Res* 2017;2017:3054217.
- Kim DW, Kim DK, Eun KM, et al. IL-25 Could be involved in the development of allergic rhinitis sensitized to house dust mite. *Mediators Inflamm* 2017; 2017:3908049.
- Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:184-194.e111.
- Kamekura R, Kojima T, Koizumi J, et al. Thymic stromal lymphopoietin enhances tight-junction barrier function of human nasal epithelial cells. *Cell Tissue Res* 2009;338:283-293.
- Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, et al. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1875-1881.
- Kamekura R, Kojima T, Takano K, et al. The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2012;42:218-228.
- Ramasamy A, Curjuric I, Coin LJ, et al. A genome-wide meta-analysis of genetic variants associated with allergic rhinitis and grass sensitization and their interaction with birth order. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:996-1005.
- Nilsson D, Henmyr V, Halldén C, et al. Replication of genomewide associations with allergic sensitization and allergic rhinitis. *Allergy* 2014;69:1506-1514.
- Akasaki S, Matsushita K, Kato Y, et al. Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways. *Int Immunol* 2016;28:65-76.
- Miyata M, Hatsushika K, Ando T, et al. Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis. *Eur J Immunol* 2008;38:1487-1492.
- Kouzaki H, O'Grady SM, Lawrence CB, et al. **Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2.** *J Immunol* 2009; 183:1427-1434.
- Kouzaki H, Tojima I, Kita H, et al. **Transcription of interleukin-25 and extracellular release of the protein is regulated by allergen proteases in airway epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:741-750.
- Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, et al. **The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses.** *J Immunol* 2011; 186:4375-4387.
- Snelgrove RJ, Gregory LG, Peiró T, et al. *Alternaria*-derived serine protease activity drives IL-33-mediated asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:583-592.e586.
- Matsumoto K, Kouzaki H, Kikuoka H, et al. **Soluble ST2 suppresses IL-5 production by human basophilic KU812 cells, induced by epithelial cell-derived IL-33.** *Allergol Int* 2018;67S: S32-S37.
- Striz I, Trebichavský I. Calprotectin—a pleiotropic

- molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 2004;53:245-253.
19. Nukui T, Ehama R, Sakaguchi M, et al. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *J Cell Biochem* 2008;104:453-464.
  20. Ahmad A, Bayley DL, He S, et al. Myeloid related protein-8/14 stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:523-530.
  21. Tieu DD, Peters AT, Carter RG, et al. Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:667-675.
  22. **Kato T, Kouzaki H, Matsumoto K, et al. The effect of calprotectin on TSLP and IL-25 production from airway epithelial cells. *Allergol Int* 2017;66:281-289.**
  23. Shimizu S, Kouzaki H, Kato T, et al. **HMGB1-TLR4 signaling contributes to the secretion of interleukin 6 and interleukin 8 by nasal epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy* 2016;30:167-172.**
  24. **Kouzaki H, Kikuoka H, Matsumoto K, et al. A mechanism of interleukin-25 production from airway epithelial cells induced by Japanese cedar pollen. *Clin Immunol* 2018;193:46-51.**
  25. Fujimura T, Kawamoto S. Spectrum of allergens for Japanese cedar pollinosis and impact of component-resolved diagnosis on allergen-specific immunotherapy. *Allergol Int* 2015;64:312-320.
  26. Wang XL, Takai T, Kamijo S, et al. NADPH oxidase activity in allergenic pollen grains of different plant species. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;387:430-434.
  27. Boldogh I, Bacsı A, Choudhury BK, et al. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J Clin Invest* 2005;115:2169-2179.
  28. Dharajiji N, Choudhury BK, Bacsı A, et al. Inhibiting pollen reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-induced signal by intrapulmonary administration of antioxidants blocks allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:646-653.
  29. Hristova M, Habibovic A, Veith C, et al. Airway epithelial dual oxidase 1 mediates allergen-induced IL-33 secretion and activation of type 2 immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1545-1556.e1511.
  30. Drake LY, Iijima K, Kita H. Group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice. *Allergy* 2014;69:1300-1307.
  31. Halim TY, Hwang YY, Scanlon ST, et al. Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat Immunol* 2016;17:57-64.
  32. Morikawa T, Fukuoka A, Matsushita K, et al. Activation of group 2 innate lymphoid cells exacerbates and confers corticosteroid resistance to mouse nasal type 2 inflammation. *Int Immunol* 2017;29:221-233.
  33. Klein Wolterink RG, Kleinjan A, van Nimwegen M, et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol* 2012;42:1106-1116.
  34. Doherty TA, Scott D, Walford HH, et al. Allergen challenge in allergic rhinitis rapidly induces increased peripheral blood type 2 innate lymphoid cells that express CD84. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1203-1205.
  35. Lao-Araya M, Steveling E, Scadding GW, et al. Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:1193-1195.e1194.
  36. Lombardi V, Beuraud C, Neukirch C, et al. Circulating innate lymphoid cells are differentially regulated in allergic and nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:305-308.
  37. Zhong H, Fan XL, Yu QN, et al. Increased innate type 2 immune response in house dust mite-allergic patients with allergic rhinitis. *Clin Immunol* 2017;183:293-299.
  38. **Tojima I, Kouzaki H, Shimizu S, et al. Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Clin Immunol* 2016;170:1-8.**
  39. Mitthamsiri W, Pradubongsa P, Sangasapaviliya A, et al. Decreased CRTH2 expression and response to allergen re-stimulation on innate lymphoid cells in patients with allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res* 2018;10:662-674.
  40. Golebski K, Layhadi JA, Sahiner U, et al. Induction of IL-10-producing type 2 innate lymphoid cells by allergen immunotherapy is associated with clinical response. *Immunity* 2021;54:291-307.e297.
  41. Dhariwal J, Cameron A, Trujillo-Torralbo MB, et al.

- mucosal Type 2 innate lymphoid cells are a key component of the allergic response to aeroallergens. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:1586-1596.
42. Tojima I, Matsumoto K, Kikuoka H, et al. Evidence for the induction of Th2 inflammation by group 2 innate lymphoid cells in response to prostaglandin D<sub>2</sub> and cysteinyl leukotrienes in allergic rhinitis. *Allergy* 2019;74:2417-2426.
  43. 木村哲二, 吉村三郎, 石川栄世. リンパ組織増生変化を伴う異常肉芽腫について特に他の類似変化の組織像との比較. *東京医事新誌* 1948;65:216.
  44. 飯塚栄. 好エオジン球性リンパ腺炎およびリンパ肉芽腫症—木村氏病の提唱—. *日大医誌* 1959;18:900-908.
  45. Kakehi E, Kotani K, Otsuka Y, et al. Kimura's disease: effects of age on clinical presentation. *QJM* 2020;113:336-345.
  46. Kimura Y, Pawankar R, Aoki M, et al. Mast cells and T cells in Kimura's disease express increased levels of interleukin-4, interleukin-5, eotaxin and RANTES. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1787-1793.
  47. Katagiri K, Itami S, Hatano Y, et al. In vivo expression of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN-gamma mRNAs in peripheral blood mononuclear cells and effect of cyclosporine A in a patient with Kimura's disease. *Br J Dermatol* 1997;137:972-977.
  48. Yamazaki K, Kawashima H, Sato S, et al. Increased CD45RO+ CD62L+ CD4+ T-cell subpopulation responsible for Th2 response in Kimura's disease. *Hum Immunol* 2013;74:1097-1102.
  49. Tojima I, Murao T, Nakamura K, et al. Increased blood group 2 innate lymphoid cells are associated with the clinical severity of Kimura disease. *Allergol Int* 2022;22:S1323-8930(22)00118-6.
  50. Oetjen LK, Mack MR, Feng J, et al. Sensory neurons co-opt classical immune signaling pathways to mediate chronic itch. *Cell* 2017;171:217-228.
  51. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, et al. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:1.
  52. Stott B, Lavender P, Lehmann S, et al. Human IL-31 is induced by IL-4 and promotes TH2-driven inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:446-54.e5.
  53. Nakashima C, Otsuka A, Kabashima K. Interleukin-31 and interleukin-31 receptor: new therapeutic targets for atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2018;27:327-331.
  54. Lai T, Wu D, Li W, et al. Interleukin-31 expression and relation to disease severity in human asthma. *Sci Rep* 2016;6:22835.
  55. Kabashima K, Matsumura T, Komazaki H, et al. Trial of Nemolizumab and topical agents for atopic dermatitis with pruritus. *N Engl J Med* 2020;383:141-150.

### III I型アレルギー炎症はどのように制御されるか？ —I型アレルギー炎症を制御する新たな治療戦略—

#### 1. 濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞と IgE 抗体産生

アレルギー性気道炎症の病態は、抗原特異的 IgE 抗体を介した I 型アレルギー反応と、好酸球性炎症を生じる 2 型炎症が中心である<sup>1)</sup>。どちらも IL-4 や IL-5 などの 2 型サイトカインがかかわることから、I 型アレルギー反応と 2 型炎症は区別されずに考えられてきたが、近年それぞれが別々に制御されることがわかってきた<sup>2)</sup>。

抗原特異的 IgE 抗体はリンパ節の胚中心で B 細胞や形質細胞から産生される。この胚中心の形成や B 細胞から形質細胞への誘導、およびそれらの維持に重要な役割を果たすのが濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞である<sup>3)</sup>。Tfh 細胞は抗原暴露後にリンパ節において、ナイーブな CD4<sup>+</sup>T 細胞から Bcl6 を主要な転写因子として分化する<sup>4)</sup>。わ

れわれは、卵白アルブミン (OVA : ovalbumin) とアルテルナリアの点鼻によって作成したアレルギー性気道炎症モデルマウスで、CD4<sup>+</sup>T 細胞特異的に Bcl6 を欠損させた *Bcl6<sup>fl/fl</sup>CD4-Cre* (Bcl6 cKO) マウスでは、血清中の抗原特異的 IgE 抗体と IgG1 抗体がほぼ消失したが、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数や、肺における 2 型サイトカイン (IL-5, IL-13) 産生には変化がないことを見出した (図 1)。次に、抗原暴露後の縦隔リンパ節内の CD4<sup>+</sup>T 細胞をフローサイトメトリーで検討すると、アレルギーモデルマウスでは Tfh 細胞が Th2 細胞とともに誘導されたが、Bcl6 cKO マウスでは Tfh 細胞は誘導されなかった。さらに、Bcl6 cKO マウスでは胚中心 B 細胞の誘導もみられなかった (図 2)。

以上より、Tfh 細胞は胚中心 B 細胞の誘導に不可欠で、抗原特異的 IgE 抗体産生を誘導すること

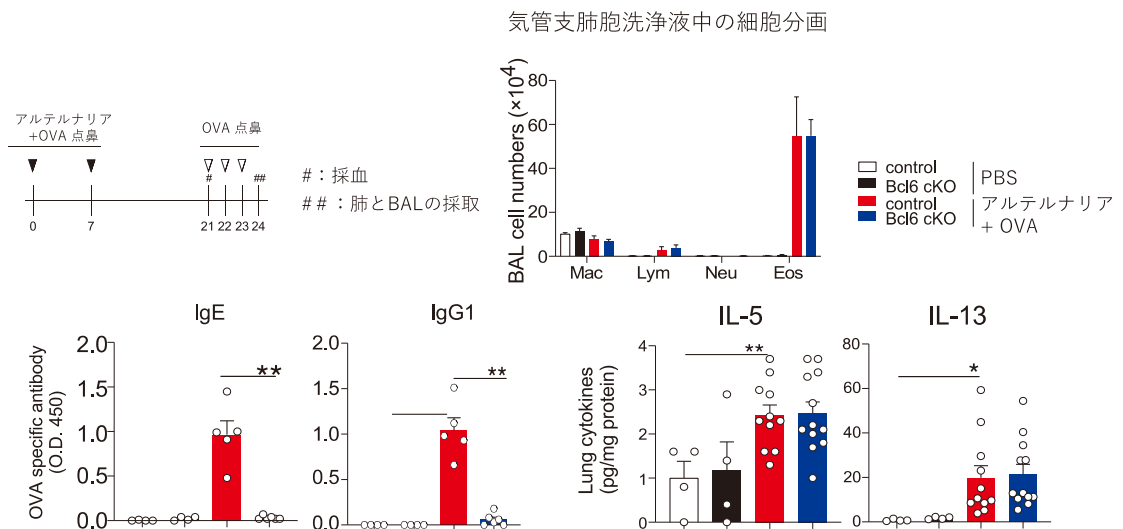


図 1 アレルギーモデルマウスにおける Bcl6 の役割。

Bcl6 cKO マウスでは、抗原特異的 IgE 抗体、IgG1 抗体が産生されない。Bcl6 cKO マウスは気管支肺胞洗浄液中の細胞数や、肺における IL-5、IL-13 産生に変化を認めない。



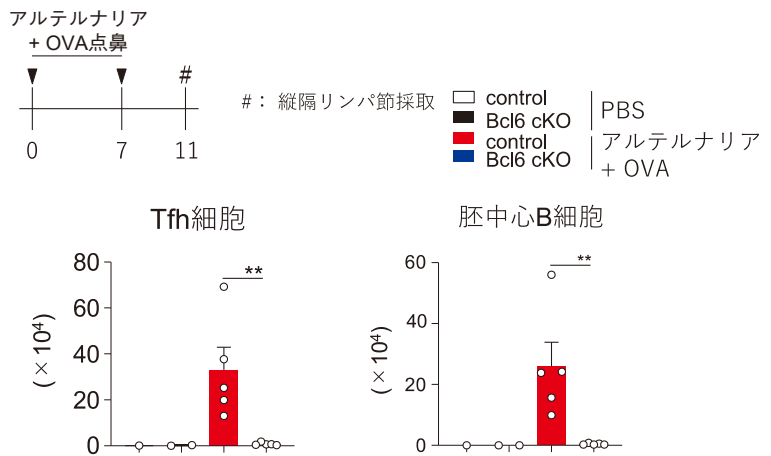


図2 アレルギーモデルマウスのリンパ節内におけるBcl6の役割。  
Bcl6 cKO マウスでは縦隔リンパ節中のTfh細胞と胚中心B細胞が誘導されない。

が明らかになった。一方、Tfh細胞は好酸球性の2型炎症には関与していなかった。転写因子Bcl6の発現の制御が、特異的IgE抗体を介したI型アレルギー反応の制御につながる可能性がある。

## 2. Th2細胞と2型サイトカイン産生

好酸球性の2型炎症には、Th2細胞や2型自然リンパ球(ILC2s)から産生される2型サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13)が重要で、I型アレルギー反応とともにアレルギー性気道炎症の病態にかかわる<sup>5)</sup>。ILC2sは、自然免疫反応として抗原非特異的に2型サイトカインを産生し<sup>6)</sup>、Th2細胞は抗原特異的に2型サイトカインを産生する<sup>7)</sup>。

アレルギー性気道炎症において、リンパ節で樹状細胞やマクロファージなどから抗原提示されたナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞はTfh細胞とTh2細胞へ分化するが、Th2細胞の分化には転写因子Blimp-1がかかわる<sup>8)</sup>。われわれは、前述したアレルギー性気道炎症モデルマウスで、CD4<sup>+</sup>T細胞特異的にBlimp-1を欠損した*Prdm1<sup>fl/fl</sup>CD4-Cre* (Blimp-1 cKO) マウスでは、気管支肺胞洗浄液(BAL)中の好酸球数が減少し、肺における2型サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13)産生が著明に抑制されることを明らかにした(図3)。リンパ節におけるTh2細胞の分化について検討したところ、興味深いことにBlimp-1 cKOマウスでもST2陽性のTh2細胞が誘導され、その数に有意な差はなかつ

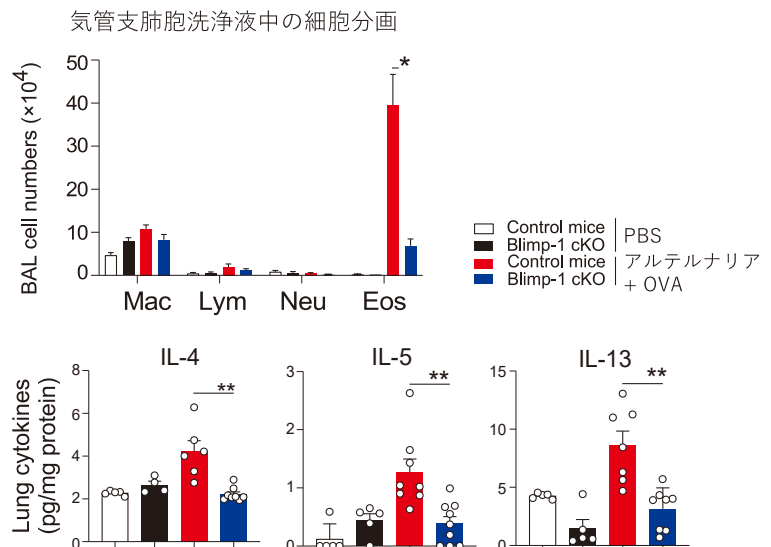


図3 アレルギーモデルマウスにおけるBlimp-1の役割。  
Blimp-1 cKO マウスでは気管支肺胞洗浄液中の好酸球数が減少し、肺におけるIL-4, IL-5, IL-13産生が抑制された。

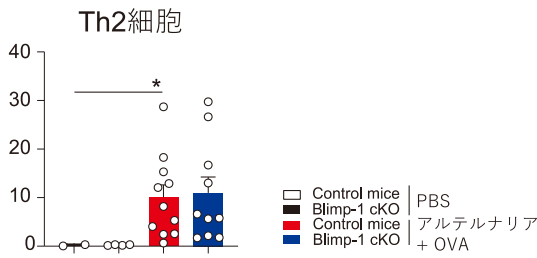


図4 アレルギーモデルマウスのリンパ節における Blimp-1 の役割。

Blimp-1 cKO マウスでは、縦隔リンパ節における Th2 細胞の誘導に変化を認めない。

た (図4)。次に、最終感作から点鼻刺激まで 35 日と長期間空けたマウスのアレルギーモデルでメモリー Th2 細胞の作用を検討したところ、抗原の再暴露で速やかに、多量の 2 型サイトカインが肺で産生された。この 2 型サイトカイン産生は Blimp-1 cKO マウスで抑制されたことから、メモリー Th2 細胞による 2 型サイトカイン産生に転写因子 Blimp-1 が重要であると考えられる (図5)。さらに、肺の局所にとどまる CD4<sup>+</sup>T 細胞における、Th2 細胞のマーカーである ST2 と tissue resident memory 細胞のマーカーである CD69 の発現を検討した。アレルギーモデルマウスでは、ST2<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> の tissue resident memory 型 Th2 細胞が増加していたが、Blimp-1 cKO マウスでは有意に減少した (図6)。このことからアレルギー性気道炎症では、リンパ節で分化した Th2 細胞のうち、一部が肺などの炎症局所にとどまり、tissue resident memory 型 Th2 細胞として、長期間存在し、抗原の再暴露時に迅速かつ強力に 2 型

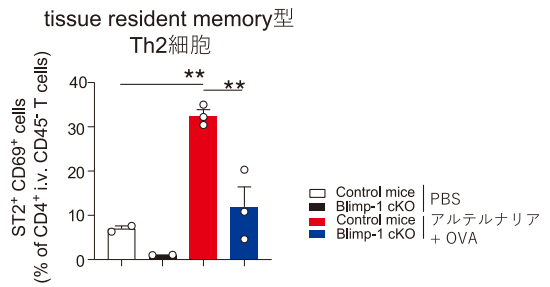


図6 肺における tissue resident memory 型 Th2 細胞誘導における Blimp-1 の役割。

Blimp-1 cKO マウスでは、tissue resident memory 型 Th2 細胞の誘導が抑制された。

サイトカインを産生すると考えられた。この tissue resident memory 型 Th2 細胞の誘導に転写因子 Blimp-1 が重要で、今後、転写因子 Blimp-1 の発現を制御することで、好酸球性鼻副鼻腔炎などの慢性的な 2 型気道炎症を制御できる可能性がある。

### 3. Th1 反応の活性化による新たな治療戦略

ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞は Th1 細胞, Th2 細胞, Tfh 細胞, Th17 細胞, 制御性 T 細胞などさまざまなサブセットに分化する<sup>9)</sup>。その中で、ウイルスや細菌の感染によって誘導される Th1 細胞と、寄生虫感染で誘導され、アレルギー性気道炎症を引き起こす Th2 細胞は古くからその存在が確認され、Th1 細胞と Th2 細胞の不均衡がアレルギー性疾患発症の一因になる<sup>10)~12)</sup>。

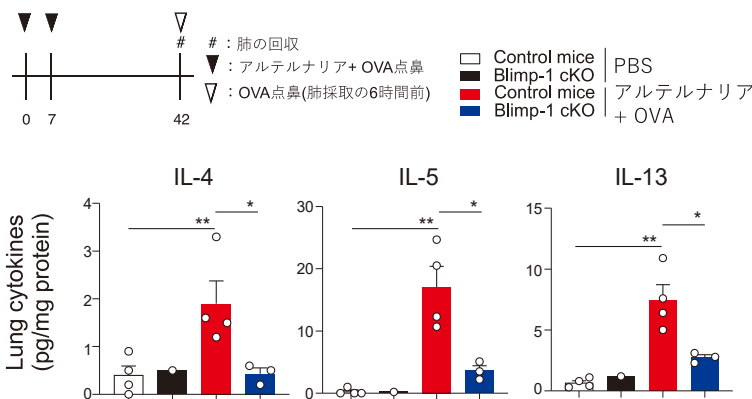


図5 肺における 2 型サイトカイン産生における Blimp-1 の役割。

42 日後の点鼻によるアレルギー性炎症では、Blimp-1 cKO マウスでは IL-4, IL-5, IL-13 産生が抑制された。

図7 末梢血単核球からのサイトカイン産生に対するGLAの作用<sup>16)</sup>.

GLAは、スギ花粉抽出抗原刺激によるスギ花粉症患者由来末梢血単核球からのIL-5産生を抑制し、IFN- $\gamma$ 、IL-10産生を促進した。

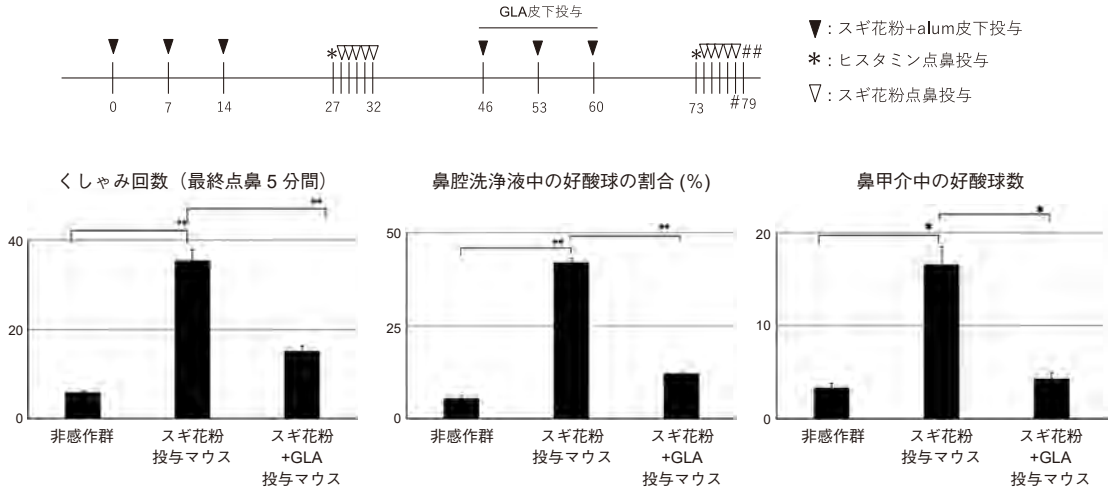
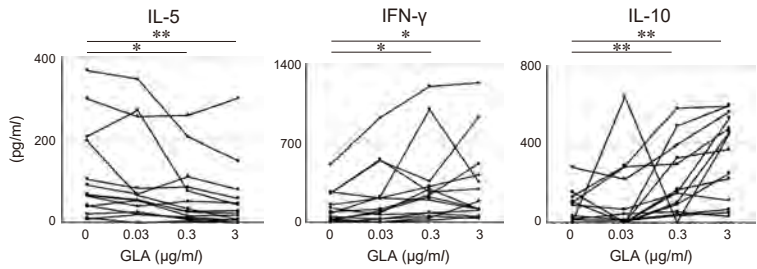


図8 スギ花粉症モデルマウスに対するGLA皮下投与の効果<sup>16)</sup>.

GLA皮下投与は、抗原刺激後のくしゃみ回数と鼻腔洗浄液中の好酸球数を減少させ、鼻甲介の好酸球数浸潤を抑制した。

自然免疫に重要なTLR (toll like receptor) 4は、樹状細胞やB細胞、線維芽細胞、上皮細胞などに発現し、グラム陰性菌の細胞膜成分であるLPS (lipopolysaccharides) を認識してTh1細胞を誘導する<sup>13)</sup>。近年、TLR4アゴニストがTh1細胞とTh2細胞の不均衡を是正して、アレルギー性炎症を制御する可能性が指摘され<sup>14)</sup>、アレルギー免疫療法のアジュバントとして注目されている<sup>15)</sup>。

われわれは、TLR4アゴニストのスギ花粉症に対する効果を、スギ花粉症患者の末梢血単核球とスギ花粉症モデルマウスを用いて検討した。スギ花粉症患者の末梢血単核球をスギ花粉抽出抗原で6日間刺激するとIL-5が産生されるが、TLR4アゴニストであるGLA (glucopyranosyl lipid A) は濃度依存性にIL-5産生を抑制した。また、GLAは、

Th1細胞から産生されるIFN- $\gamma$ や制御性T細胞などから産生され免疫寛容を誘導するIL-10の産生を濃度依存性に誘導した(図7)。このことからTLR4アゴニストはIFN- $\gamma$ やIL-10産生を誘導し、Th2細胞による2型サイトカイン産生を抑制すると思われる<sup>16)</sup>。

次に、スギ花粉症モデルマウスにおいて、GLAの皮下投与は、くしゃみ回数、鼻腔洗浄液中の好酸球数、鼻甲介中の好酸球数浸潤をいずれも抑制した(図8)<sup>16)</sup>。

以上より、TLR4アゴニストがTh1細胞とTh2細胞の不均衡を是正すること、また免疫寛容を誘導するIL-10を産生することによって、スギ花粉症などのアレルギー性気道炎症の新たな治療薬となる可能性が考えられる。

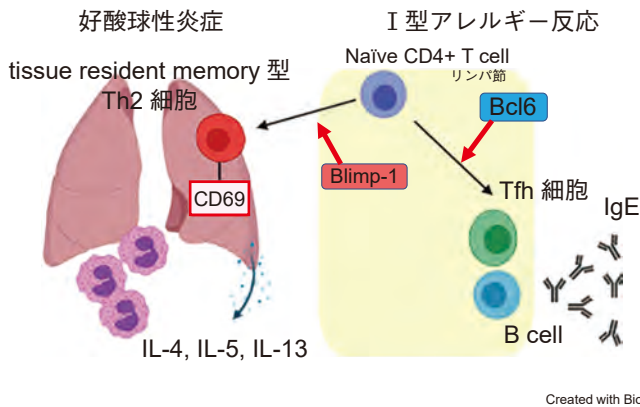


図9 アレルギー炎症のメカニズム。

抗原暴露後、Bcl6はTfh細胞を誘導し、胚中心B細胞を増加させ、抗原特異的IgE抗体産生を誘導する。Blimp-1は炎症局所でのtissue resident memory型Th2細胞を誘導して好酸球性2型炎症を引き起こす。

## まとめ

**疑問：I型アレルギー炎症はどのように制御されるか？**

**答え：**抗原刺激により、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞はTfh細胞とTh2細胞に分化する。Tfh細胞は、リンパ節で胚中心B細胞を誘導して抗原特異的IgE抗体産生にかかわり、Th2細胞は2型サイトカインを産生して好酸球性炎症にかかわる。Tissue resident memory型Th2細胞は局所にとどまって好酸球性慢性炎症に重要である。Tfh細胞の分化は転写因子Bcl6によって制御され、炎症局所のtissue resident memory型Th2細胞の分化は転写因子Blimp-1によって制御されるが、こうした制御機構の解明が新たな治療手段の開発につながる可能性がある(図9)。

一方、TLR4アゴニストのGLAは、Th1細胞とTh2細胞の不均衡を改善し、免疫寛容にかかわるIL-10産生を増加させることで、I型アレルギー炎症を制御する可能性が考えられる。

## 文献

- Greiner AN, Hellings PW, Rotiroti G, et al. Allergic rhinitis. *Lancet* 2011;378:2112-2122.
- Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:185-189.
- Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011;29:621-663.
- Choi YS, Kageyama R, Eto D, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 2011;34:932-946.
- Duncan EM, Fahy JV. The role of type 2 inflammation in the pathogenesis of asthma exacerbations. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12 Suppl 2:S144-149.
- Kato A. Group 2 Innate Lymphoid cells in airway diseases. *Chest* 2019;156:141-149.
- Lamiable O, Mayer JU, Munoz-Erazo L, et al. Dendritic cells in Th2 immune responses and allergic sensitization. *Immunol Cell Biol* 2020;98:807-818.
- Crotty S. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. *Immunity* 2019;50:1132-1148.
- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, et al. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:925135.
- Oriss TB, McCarthy SA, Morel BF, et al. Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. *J Immunol* 1997;158:3666-3672.
- Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-1260.
- Cher DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T

- cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987;138:3688-3694.
13. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
  14. Velasco G, Campo M, Manrique OJ, et al. Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:218-224.
  15. Kirtland ME, Tsitoura DC, Durham SR, et al. Toll-like receptor agonists as adjuvants for allergen immunotherapy. *Front Immunol* 2020;11:599083.
  16. **Matsumoto K, Kouzaki H, Yamamoto S, et al. In vitro and in vivo inhibitory effects of TLR4 agonist, glucopyranosyl lipid A (GLA), on allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. *Allergy* 2020;75:446-449.**

## IV Local allergic rhinitisは存在するか？ —マウスモデルの確立とアレルギー性鼻炎の 病態における役割—

### 1. Local allergic rhinitis(LAR)とは？

アレルギー性鼻炎 (AR) は、くしゃみ、水様性鼻漏、鼻閉の3主徴と局所所見、①皮膚テスト (プリックテストやスクラッチテスト)、②血清中の抗原特異的 IgE 抗体測定、③鼻粘膜誘発テスト、④鼻汁中好酸球検査などによって総合的に診断される。LAR (Local allergic rhinitis) は、通年性や季節性のアレルギー性鼻炎の症状を有するが、皮膚テストや血清中の抗原特異的 IgE 抗体が陰性、一方で鼻粘膜に好酸球などを伴う2型炎症が認められ、局所で抗原特異的 IgE 抗体が産生される病態である。したがって、鼻粘膜誘発テストが陽性で、鼻汁中に特異的 IgE 抗体が検出される<sup>1,2)</sup>。

近年、欧米を中心に、LAR の概念が確立され、2017年のEAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) や<sup>3)</sup>、2018年のInternational Consensus Statement on Allergy and Rhinology で<sup>4)</sup>、NAR (nonallergic rhinitis) と区別する疾患として、診断基準などが提唱されている。Rondónらは通年性の鼻炎症状を有するNAR患者のうち、54%がハウスダストによる鼻粘膜誘発テストが陽性で、22%で鼻汁中に抗原特異的 IgE 抗体が認められたと報告している<sup>1)</sup>。さらに、アレルギー性鼻炎症状を有する患者452名に、血清中の特異的 IgE 抗体測定、プリックテスト、複数抗原による鼻粘膜誘発テストを行ったところ、ARが63.1%、LARが25.7%、NARが11.2%で認められた<sup>5)</sup>。このように、従来NARと診断されていた症例の中には一定の割合でLARが存在することが考えられる。

LARの診断には、鼻粘膜局所での特異的 IgE 抗体産生の証明や、鼻粘膜誘発テストが陽性であることが必要であるが、実際にはこうした検査を

通常の診療で実施することは難しく、LARの病態については、まだ十分に解明されていない。一部のLAR患者ではARへの進展や喘息が増悪しやすいことが報告されているが、LARはAR発症への通過点ではなく、別の独立した疾患とする見解もあり<sup>6)</sup>、アレルギー性鼻炎の病態にどのようにかかわるのか、多くの疑問が残されている。治療はARと同様に鼻噴霧用ステロイド薬や抗ヒスタミン薬が有効で、皮下免疫療法にもある程度の有効性が期待できる<sup>7,8)</sup>。

われわれは、LARの病態を明らかにする目的で、マウスを用いて実験的にLARが作成できるか検討した。

### 2. マウスモデルを利用したLARの検討

#### 1) カモガヤ (ragweed) 花粉の片側点鼻刺激

Balb/cマウスに、カモガヤ (ragweed) 花粉抽出液 (50 µg/5 µl) またはPBS (5 µl) を14日間左鼻腔に点鼻投与し (14日目まで)、その2週間後にさらに14日間 (42日目まで)、さら2週間後に14日間 (70日目まで)、片側の左鼻腔に点鼻投与した。抗原投与量が5 µlと少ないため、このマウスでは下気道に抗原が侵入しない。点鼻投与の14日後、42日後、70日後に、以下の検討を行った。

左右の鼻腔に別々にカモガヤ花粉抽出液を点鼻投与して10分後のくしゃみ回数を測定すると、左鼻腔の点鼻では14日後からくしゃみ回数が増加したが、右鼻腔の点鼻では70日後からくしゃみ回数が増加した。血清中のカモガヤ抗原特異的 IgE、IgG1抗体は、70日後から増加した (図1)。

次に、マウスから左右鼻粘膜のNALT (nasal-associated lymphoid tissue) と左右の頸部リンパ

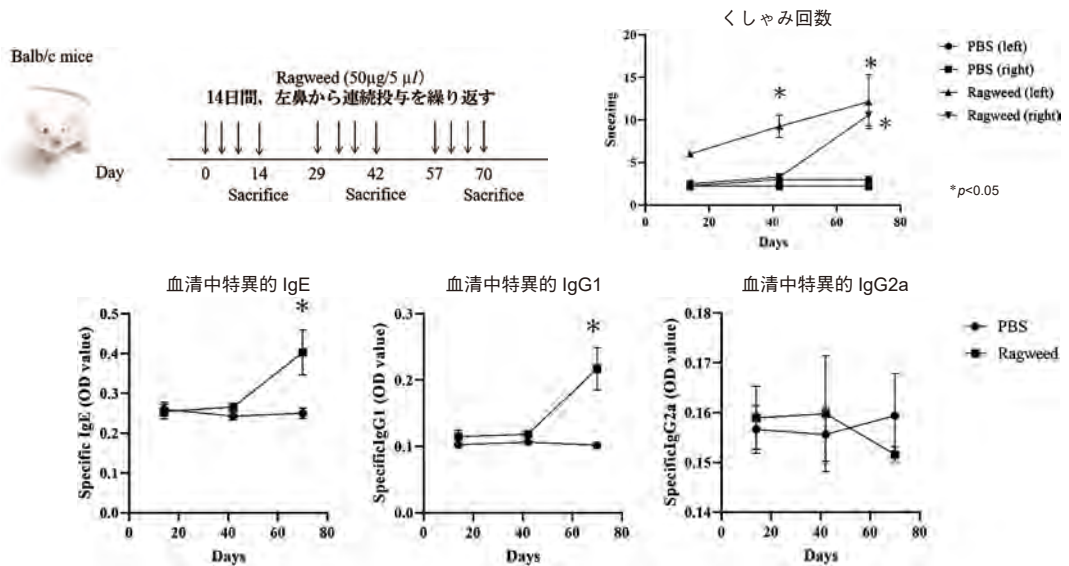


図1 片側カモガヤ花粉点鼻モデルにおける、点鼻10分後のくしゃみ回数と血清中特異的IgE, IgG1, IgG2抗体(14, 42, 70日後), n = 6.

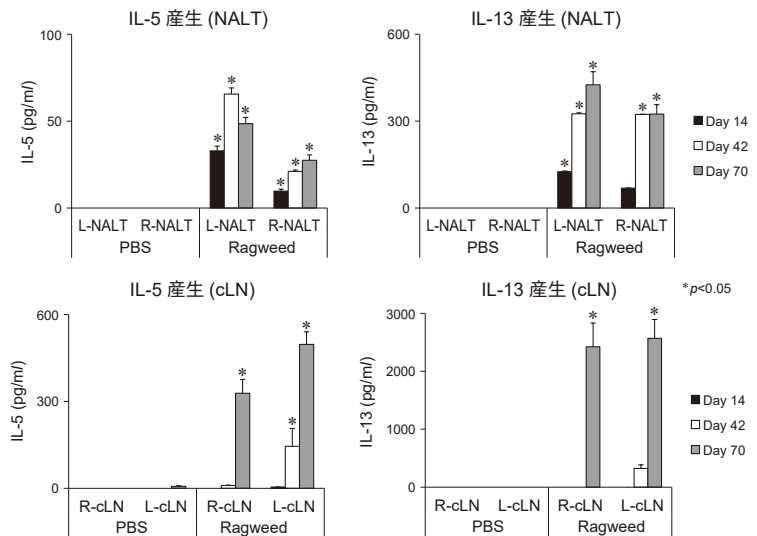


図2 ホモジナイズして培養した、左右のNALT (nasal-associated lymphoid tissue) と頸部リンパ節 (cLN) からの、抗原刺激によるIL-5, IL-13産生(14, 42, 70日後), n = 6.

節 (cLN) をそれぞれ採取し、ホモジナイズして、カモガヤ花粉抽出液とともに3日間培養し、IL-5, IL-13産生について検討した。左右のNALTからは14日後にIL-5, IL-13産生が認められたが、左頸部リンパ節では42日後から右頸部リンパ節では70日後からIL-5, IL-13産生が確認された(図2)。

NALTと頸部リンパ節におけるIL-4<sup>+</sup>濾胞性ヘルパーT (T<sub>fh</sub>)細胞とIL-4<sup>+</sup>Th2細胞の推移について、CD4<sup>+</sup>T細胞に占める割合をフローサイト

メトリーで検討した。IL-4<sup>+</sup>T<sub>fh</sub>細胞は、左NALTでは14日後から増加し、右NALTでは70日後から増加した。IL-4<sup>+</sup>Th2細胞は左NALTでは14日後から増加し、右NALTでは42日後から増加した。一方、頸部リンパ節(cLN)では、IL-4<sup>+</sup>T<sub>fh</sub>細胞は左側で42日後から増加し、右側では70日後から増加した。IL-4<sup>+</sup>Th2細胞は両側ともに70日後から増加した(図3)。

さらに、NALT, および頸部リンパ節(cLN)からB細胞を分離し、B細胞の分化・成熟因子

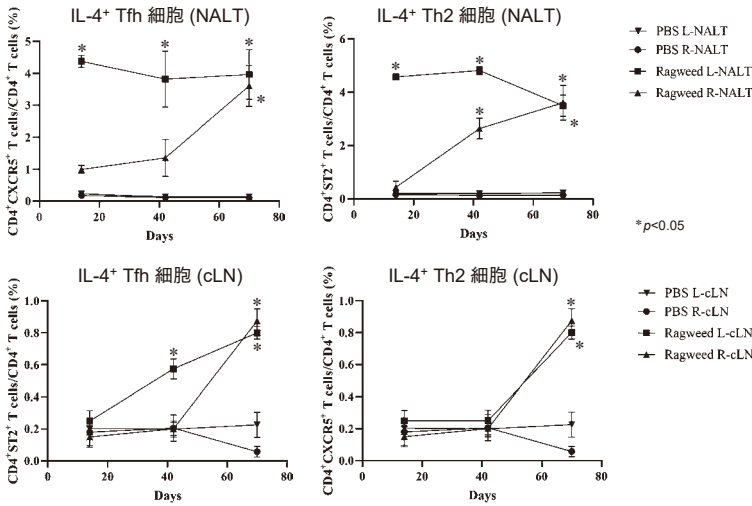


図3 左右のNALT(nasal-associated lymphoid tissue)と頸部リンパ節(cLN)における、CD4<sup>+</sup>T細胞に占めるIL-4<sup>+</sup>Tfh (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>)細胞とIL-4<sup>+</sup>Th2 (CD4<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>)細胞の割合の推移(14, 42, 70日後), n = 6.

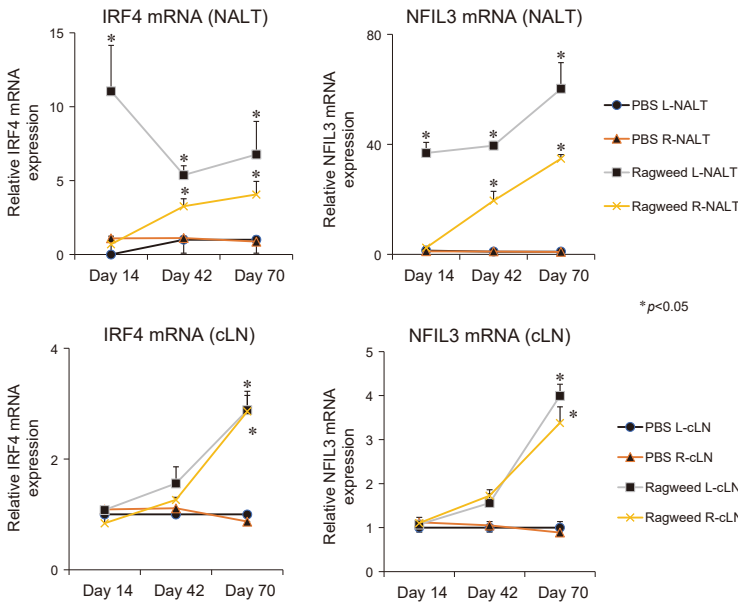


図4 NALT (nasal-associated lymphoid tissue)と頸部リンパ節(cLN)から分離したB細胞におけるIRF4とNFIL3のmRNA発現の推移(14, 42, 70日後). n = 6.

としてIRF4, クラススイッチとIgE産生にかかわる因子としてNFIL3のmRNA発現を検討した. 左NALTでは14日後から, 右NALTでは, 42日後からB細胞におけるIRF4とNFIL3のmRNA発現が増加した. 一方, 両側の頸部リンパ節(cLN)では, 70日後になって, B細胞におけるIRF4とNFIL3のmRNA発現が増加した(図4).

以上の結果, カモガヤ花粉抽出液の片側点鼻刺激によって, 42日目から同側刺激のみでくしゃみ症状が出現すること, 同側のNALTでは14日目の早期からIL-4<sup>+</sup>Tfh細胞とIL-4<sup>+</sup>Th2細胞が増加し, 抗原刺激によるIL-5, IL-13産生が認められ,

さらに, B細胞の成熟やクラススイッチが生じていることが明らかになった. 一方で, 頸部リンパ節におけるIL-4<sup>+</sup>Tfh細胞とIL-4<sup>+</sup>Th2細胞の増加は, NALTから遅れて42日から70日後に始まり, B細胞の成熟やクラススイッチも70日後になって確認された. したがって, 42日後に認められた同側抗原刺激によるくしゃみ症状は, 鼻粘膜局所のNALTにおける特異的IgE抗体産生などによる, LARの病態を反映すると考えられ, 局所の免疫反応のみでアレルギー症状が惹起されることが確認された.



図5 片側カモガヤ花粉点鼻モデルにおける，抗原刺激後のくしゃみ回数と血清中特異的 IgE, IgG1 抗体（70 日後）に対する，FTY720 腹腔内投与の影響，n = 6.

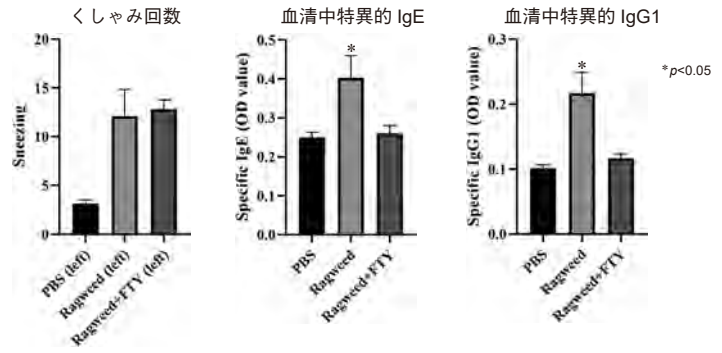
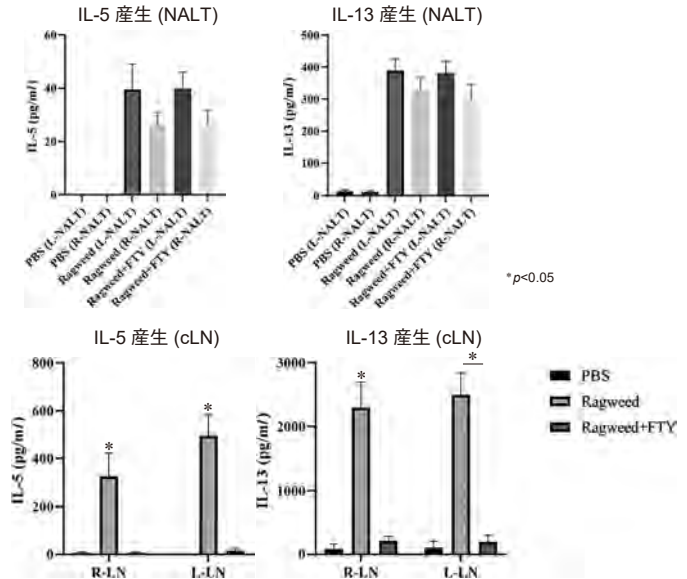


図6 ホモジナイズして培養した，左右の NALT (nasal-associated lymphoid tissue) と頸部リンパ節 (cLN) からの，抗原刺激による IL-5, IL-13 産生（70 日後）に対する，FTY720 腹腔内投与の影響，n = 6.



## 2) FTY720 を利用した頸部リンパ節 (cLN) の機能抑制

FTY720 は，冬虫夏草菌類の活性作用から見出された免疫抑制薬で，リンパ組織からのリンパ球の遊走を抑制して，血液中のリンパ球が減少する。そこで，カモガヤ (ragweed) 花粉抽出液の点鼻時に，FTY720 (0.1 mg/kg) を腹腔内投与して，頸部リンパ節の機能を抑制して，70 日後における鼻粘膜局所における LAR の病態について検討した。

FTY720 の腹腔内投与により，70 日後の血清中の抗原特異的 IgE, IgG1 抗体産生は著明に抑制されたが，カモガヤ花粉抽出液の点鼻刺激によるくしゃみ回数には影響を与えなかった (図5)。

左右の NALT からの抗原刺激による IL-5, IL-13 産生は認められたが，頸部リンパ節における IL-5, IL-13 産生はほとんど認められなかった (図6)。左右の NALT における IL-4<sup>+</sup>Tfh 細胞と IL-4<sup>+</sup>Th2 細胞の増加は，FTY720 の腹腔内投与の影響を受けなかったが，頸部リンパ節においては，IL-4<sup>+</sup>Tfh 細胞と IL-4<sup>+</sup>Th2 細胞はともに増加しなかった (図7)。

このように，FTY720 の投与により，頸部リンパ節を含めた全身感作は成立しなくなるが，局所における免疫反応は誘導され，アレルギー性炎症が惹起されて，くしゃみ症状が認められることが確認できた。今後，LAR の病態を検討するための動物モデルとして有用であると考えられる。

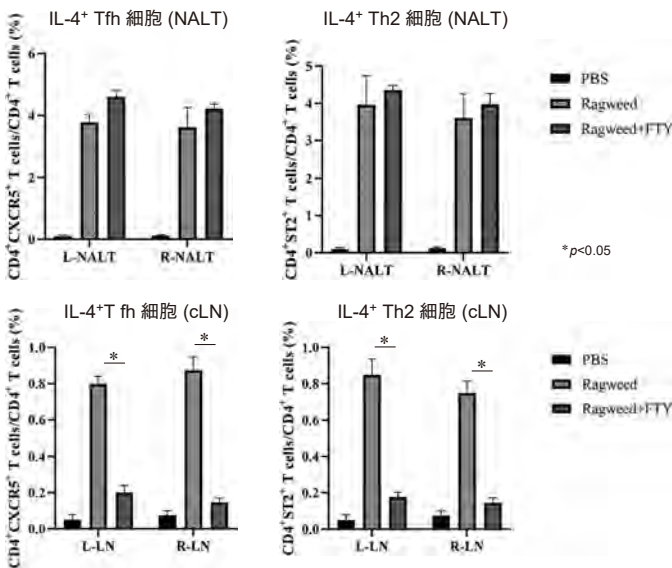


図7 左右のNALT (nasal-associated lymphoid tissue) と頸部リンパ節 (cLN) における、CD4<sup>+</sup>T細胞に占めるIL-4<sup>+</sup>Tfh (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>) 細胞とIL-4<sup>+</sup>Th2 (CD4<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>) 細胞の割合 (70日後) に対する、FTY720腹腔内投与の影響、n = 6。

## まとめ

### 疑問：Local allergic rhinitis は存在するか？

答え：片側抗原刺激のマウスモデルでは、14日から42日目までの早期段階では、全身感作が成立していなくても、鼻粘膜局所のNALTを介した免疫反応のみで、アレルギー性炎症が惹起された。さらに、FTY720の腹腔内投与により全身感作が生じない状態を作成しても、鼻粘膜局所の免疫反応のみでアレルギー性炎症が生じることが確認できた。Local allergic rhinitisの病態を反映したマウスモデルとして有用であると考えられる。

## 文献

- Rondón C, Romero JJ, López S, et al. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:899-905.
- Rondón C, Campo P, Togias A, et al. Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1460-1467.
- Hellings PW, Klimek L, Cingi C, et al. Non-allergic rhinitis: position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 2017;72:1657-1665.
- Wise SK, Lin SY, Toskala E, et al. International consensus statement on allergy and rhinology: allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2018;8:108-352.
- Rondón C, Campo P, Galindo L, et al. Prevalence and clinical relevance of local allergic rhinitis. *Allergy* 2012;67:1282-1288.
- Rondon C, Campo P, Eguiluz-Gracia I, et al. Local allergic rhinitis is an independent rhinitis phenotype: the results of a 10-year follow-up study. *Allergy* 2018;73:470-478.
- Rondón C, Blanca-López N, Aranda A, et al. Local allergic rhinitis: allergen tolerance and immunologic changes after preseasonal immunotherapy with grass pollen. *J Allergy Clin Immunol* 2011;1069-1071.
- Rondón C, Blanca-López N, Campo P, et al. Specific immunotherapy in local allergic rhinitis: a randomized, double-blind placebo-controlled trial with Phleum pratense subcutaneous allergen immunotherapy. *Allergy* 2018;73:905-915.

## V 血管収縮作用があるトロンボキサン $A_2$ はどのように鼻粘膜腫脹を引き起こすか？

### —プロスタグランディン (PG) $D_2$ ・トロンボキサン (TX) $A_2$ 受容体拮抗薬の作用機序—

#### 1. $TXA_2$ , $PGD_2$ とシステイニルロイコトリエン (CysLTs)

アレルギー性鼻炎に対して、とくに鼻閉に効果がある薬剤として、臨床では脂質メディエーターの受容体拮抗薬であるプラナルカスト・モンテルカストとラマトロバンが使用される。

プラナルカスト・モンテルカストは CysLTs ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ ) の CysLT1 受容体を阻害して、CysLTs の血管内皮細胞を介した血管拡張作用と血管透過性亢進作用を抑制する。さらに、CysLTs には平滑筋収縮作用や炎症細胞の遊走・活性化作用、粘液分泌作用、ヒスタミン過敏性亢進作用などがあるので、プラナルカスト・モンテルカストは鼻閉に加えてくしゃみや鼻漏にも効果がある。

ラマトロバンは  $TXA_2$  の TP 受容体拮抗薬として開発されたが、 $PGD_2$  の CRTH2 受容体の拮抗作用も有している。 $PGD_2$  には DP ( $DP1$ ) と CRTH2 ( $DP2$ ) の 2 種類の受容体があり、DP 受容体は上皮細胞、血管内皮細胞、浸潤細胞などに発現し、炎症局所でその発現が亢進しアレルギー性炎症の増悪にかかわる。CRTH2 受容体は浸潤細胞に発現し、炎症局所ではその発現が低下する。つまり、 $PGD_2$  は CRTH2 受容体を介して炎症細胞浸潤と活性化を惹起し、炎症局所では DP 受容体を介してアレルギー性炎症を引き起こすと考えられる。したがって、ラマトロバンは CRTH2 受容体拮抗作用で炎症細胞浸潤を抑制することによって、鼻閉に加えてくしゃみや鼻漏にも効果が認められる。

$TXA_2$  は、TP 受容体を介して血小板凝集作用

や血管平滑筋の収縮作用を有している。一方、 $PGI_2$  は血小板凝集抑制作用や血管平滑筋弛緩作用を有し、血栓形成に対して  $TXA_2$  は促進的に、 $PGI_2$  は抑制的に働いて、この両者のバランスの乱れが血栓症や動脈硬化症の発症にかかわっている。 $TXA_2$  は気道炎症においては平滑筋を収縮させて喘息の病態形成にかかわり、鼻粘膜では TP 受容体を介して鼻閉に働く。しかしながら、

**「血管収縮作用がある  $TXA_2$  がどのように鼻粘膜腫脹や鼻閉を引き起こすか？」**

については、明快に説明できないまま今日に至っている。本項では、これまでの動物実験やヒトでの研究結果をもとに、この疑問に挑む。

#### 2. モルモットの鼻アレルギーモデルにおける $TXA_2$ と CysLTs の作用

$TXA_2$  や CysLTs の鼻粘膜血管透過性や鼻腔抵抗に対する作用について、鼻アレルギーモルモットを利用した多くの検討がある。モルモットに TP アゴニスト (U-46619) や  $LTC_4$  を吸入させるとヒスタミンと同様に、鼻粘膜の血管透過性が亢進し、鼻腔抵抗が増大するが、 $PGD_2$  や  $PGF_{2\alpha}$  ではこうした作用は認められない。卵白アルブミン (OVA) を利用した鼻アレルギーモデルでは、鼻粘膜血管透過性の亢進と鼻腔抵抗の増加が認められ、鼻腔洗浄液中に  $TXA_2$  の代謝産物である  $TXB_2$  が増加するが、TP アンタゴニスト (セラトロダスト, S-1452) あるいはプラナルカストの経口投与は鼻粘膜の血管透過性と鼻腔抵抗の増加を抑制する<sup>1,2)</sup>。 $TXA_2$  合成酵素阻害薬のオザグレルの経口投与も鼻アレルギーモデルにおける血管

透過性亢進を抑制する<sup>1)</sup>。次に、スギ花粉を用いた鼻アレルギーモデルでは、即時相と遅発相の2相性に鼻腔抵抗が上昇し、同時に鼻腔洗浄液中のTXB<sub>2</sub>とCysLTsが増加する。セラトロダストやプラナルカストの経口投与はくしゃみ回数に影響を与えなかったが、こうした鼻腔抵抗の増加を抑制する。一方、抗ヒスタミン薬のテルフェナジンはくしゃみ回数を抑制するが、鼻腔抵抗の増加は抑制できない<sup>3)</sup>。以上の結果から、鼻アレルギーモルモットでは即時相と遅発相でTXA<sub>2</sub>とCysLTsが産生され、血管透過性の亢進と鼻腔抵抗の増大を引き起こし、TPアンタゴニストのセラトロダストとCysLT1アンタゴニストのプラナルカストがこれを抑制すると考えられる。

また、TPアゴニスト(U-46619)とCysLTsの鼻腔内投与は鼻腔抵抗を相加的に増加させる。NO(一酸化窒素)合成酵素阻害薬はCysLTsによる鼻腔抵抗の増大を完全に抑制するが、TPアゴニスト(U-46619)による鼻腔抵抗の増大は抑制しない。さらに、外科的に鼻粘膜を露出させて顕微鏡下に鼻粘膜の表面血管を観察すると、CysLTsは明らかに血管を拡張させる。TXA<sub>2</sub>にもCysLTsの作用より弱い軽度の表面血管拡張作用が観察される<sup>4, 5)</sup>。つまり、TXA<sub>2</sub>とCysLTsは鼻粘膜を腫脹させ鼻腔抵抗を増加させる作用を有するが、その作用機序は異なり、CysLTsはNOの産生を介した鼻腔血管拡張作用を介している。それではTXA<sub>2</sub>の鼻粘膜血管に対する作用はどうか？

### 3. Cushion vein とは何か？

市村は<sup>6)</sup>、鼻粘膜の静脈洞拡張機序仮説として、①ヒスタミンやPGE<sub>2</sub>による交感神経系末端でのノルアドレナリン(NA)放出抑制、②CysLTsによるNOを介した血管拡張など、血管作動物質によるもの、③cushion vein(throttle vein)の収縮、④骨膜・骨管内交感神経系刺激低下による動脈拡張に伴い圧迫された静脈の還流悪化、などをあげている(図1)。われわれは、ラット鼻粘膜の血管周囲にはNOを伝達物質とする副交感神経が網目状に走行し(図2)、翼口蓋神経節由来の副交感神経の電気刺激により、同側の鼻粘膜の血流が増加すること、さらにNO合成酵素阻害薬(nitro-L-arginine 10 mg/kg)がこれを抑制したことから、副交感神経刺激はNO産生を介して鼻粘膜血管拡張に働くことを確認している<sup>7)</sup>。

TXA<sub>2</sub>の作用機序について、Tanakaら<sup>5)</sup>は、前述したモルモットでの研究結果をもとにTXA<sub>2</sub>は鼻粘膜静脈洞の導出静脈(throttle vein)を収縮させて血管拡張と鼻粘膜腫脹を引き起こすと考えた(図1)<sup>5)</sup>。しかしながら、TP受容体は鼻粘膜のすべての血管内皮細胞と血管平滑筋に局在するので<sup>8)</sup>、導出静脈だけが収縮することは考えられない。

1970年代には電子顕微鏡による検討から、血管平滑筋が肥厚した鼻粘膜の静脈をcushion veinと呼び、導出静脈の収縮にかかわっている可能性が指摘された<sup>9)</sup>。しかしながら、こうした所見は鼻粘膜以外にもどこにでも認められ、表在性と深在性血管の移行部や導出静脈に特徴的なものでは

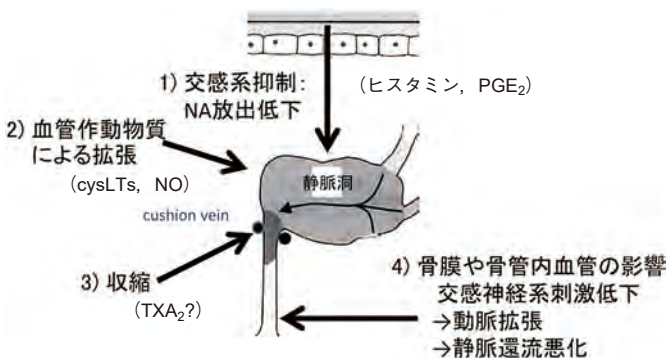


図1 鼻粘膜の静脈洞拡張機序仮説(論文6より改変)

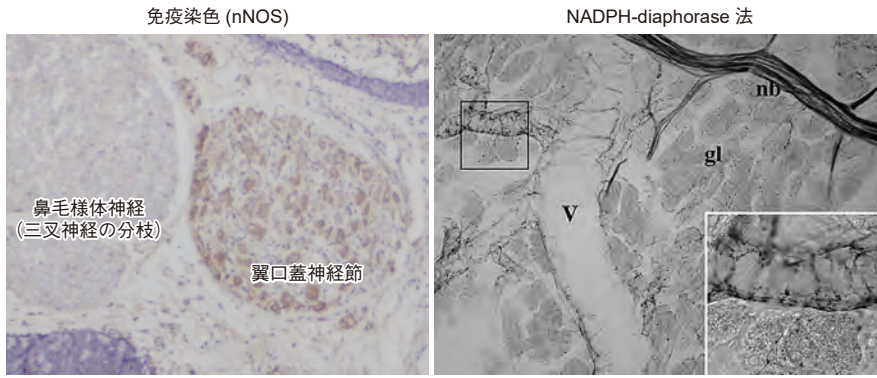


図2 ラット翼口蓋神経節の nNOS (neuronal nitric oxide synthase) の免疫染色と、鼻粘膜の NADPH-diaphorase 法による染色<sup>7)</sup>

nNOS は翼口蓋神経節に認められるが、三叉神経の枝である鼻毛様体神経には認められない。NADPH-diaphorase 法は NO 産生時の酸化還元反応を利用して NOS の存在を確認する方法で、神経線維束 (nb) と、血管 (V) や分泌腺 (gl) 周囲の varicosity (こぶ状の膨らみ) を有する神経線維が染色される。

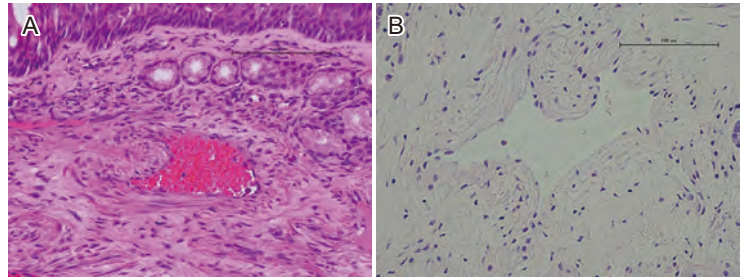


図3 血管平滑筋が肥厚した鼻粘膜の静脈 (cushion vein)

A: カニクイザルの鼻甲介, B: ヒト下鼻甲介

なく、現在は形態学的に鼻粘膜における表在性と深在性静脈を区別すること自体が疑問であると考えられている<sup>10, 11)</sup>。実際に、血管平滑筋を伴うある程度の大きさがある静脈であれば、下鼻甲介のどこにでもこうした所見を観察することができる(図3)。私見であるが、こうした血管平滑筋の肥厚は静脈弁的な作用を有していて、逆流防止や血液の拍出に重要で、静脈叢の拡張にはかかわっていないと考える。実際に、イヌの鼻粘膜の静脈には静脈弁が形成されている<sup>12)</sup>。下鼻甲介には血管が豊富に認められ、粘膜腫脹にかかわっていることに間違いはないが、

**「静脈洞や導出静脈などの解剖学的構造が本当に存在するのか？」**

という疑問に対しては、十分な学術的な根拠が乏しく、少なくとも下鼻甲介組織の病理組織所見からは判断できない。

#### 4. TXA<sub>2</sub> によって鼻粘膜の血管は拡張するのか収縮するのか？

健康人やアレルギー性鼻炎患者でレーザードップラー法や posterior rhinomanometry を利用した、鼻粘膜の血流量や鼻腔抵抗の測定も行われ、LTD<sub>4</sub> はヒスタミンやサブスタンス P などと同様に、鼻腔内投与によって鼻粘膜の血流増加と鼻腔抵抗の増加を引き起こし、プラニルカストは抗原刺激による鼻腔抵抗の増加を抑制する<sup>13)~15)</sup>。TXA<sub>2</sub> を直接鼻腔内投与した報告をみつけることができなかったが、レーザードップラー法と acoustic rhinometry を利用した検討で、ダニによる鼻アレルギー患者の抗原刺激後の鼻腔面積の減少がラマトロバンの内服で抑制される。しかし、抗原刺激後の鼻粘膜血流量の増加はラマトロバンでは抑制できない<sup>16)</sup>。つまり、TXA<sub>2</sub> の鼻粘膜血流量に対する直接作用は不明であるが、TP アンタゴニストが抗原刺激による血流量増加を抑制で

きないことから、TXA<sub>2</sub>は血流量増加にかかわっていない可能性が考えられる。

この結果を支持する動物実験として、TXA<sub>2</sub>は血管透過性を亢進させて組織の浮腫を引き起こすが、血管を収縮させ血流量は減少する報告がある。マウスの耳介にTPアゴニスト(U-46619)を投与すると、血管は収縮し血流量が減少するが、一方で、VE-cadherinによる血管内皮のバリア機能が破綻し、血管透過性が亢進して浮腫が生じ

る<sup>17)</sup>。TXA<sub>2</sub>は、血管を収縮させて血流量を減少させるが、それを上回る血管透過性亢進作用で組織の浮腫が惹起される。ヒトの鼻粘膜におけるTXA<sub>2</sub>の血管や血流量に対する作用を直接検討した報告はないが、少なくともCysLTsのようなNOを介した血管拡張作用はなく、むしろ血管は収縮させても、より強力な血管透過性亢進作用によって鼻粘膜腫脹が生じるのではないだろうか。

## まとめ

**疑問：血管収縮作用があるTXA<sub>2</sub>はどのように鼻粘膜腫脹を引き起こすか？**

**答え：鼻粘膜の血管に対する直接作用を検討した報告はないが、TXA<sub>2</sub>にはCysLTsのようなNOを介した血管拡張作用はなく、むしろ血管は収縮させるが、より強力な血管透過性亢進作用によって鼻粘膜腫脹が生じる。**

## 文献

1. Yamasaki M, Matsumoto T, Fukuda S, et al. Involvement of thromboxane A2 and histamine in experimental allergic rhinitis of guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:1471-1479.
2. Yasui K, Asanuma F, Furue Y, et al. Involvement of thromboxane A2 in antigen-induced nasal blockage in guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:400-405.
3. Yamasaki M, Mizutani N, Sasaki K, et al. Involvement of thromboxane A2 and peptide leukotrienes in early and late phase nasal blockage in a guinea pig model of allergic rhinitis. *Inflamm Res* 2001;50:466-473.
4. Nakanishi Y, Nabe T, Mizutani N, et al. Synergism between cysteinyl leukotrienes and thromboxane A2 to induce allergic late phase nasal blockage in guinea pigs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2004;74:125-137.
5. Tanaka Y, Mizutani N, Fujii M, et al. Different mechanisms between thromboxane A2- and leukotriene D4-induced nasal blockage in guinea pigs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006;80:144-154.
6. 市村恵一. 鼻粘膜血管の構造と役割, その異常. *耳鼻免疫アレルギー* 2015;33:225-230.
7. Ogawa F, Hanamitsu M, Ayajiki K, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on increase in nasal mucosal blood flow induced by sensory and parasympathetic nerve stimulation in rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010;119:424-430.
8. Shirasaki H, Kikuchi M, Seki N, et al. Expression and localization of the thromboxane A2 receptor in human nasal mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;76:315-320.
9. Cauna N, Cauna D. The fine structure and innervation of the cushion veins of the human nasal respiratory mucosa. *Anat Rec* 1975;181:1-16.
10. Grevers G. Electron-microscopic observations on the muscular coat of swell bodies in human nasal mucosa. *Laryngoscope* 1994;104:1285-1289.
11. Grevers G, Kamargakis WN. Intervascular smooth muscle fibers and muscular bolsters in nasal swell bodies of humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104:144-148.
12. Lung MA, Wang JC. An anatomical investigation of the nasal venous vascular bed in the dog. *J Anat* 1989; 166:113-119.
13. Bisgaard H, Olsson P, Bende M. Effect of leukotriene D4 on nasal mucosal blood flow, nasal airway resistance and nasal secretion in humans. *Clin Allergy* 1986;16:289-297.
14. Konno A, Nagata H, Nomoto M, et al. Role of capsaicin-sensitive trigeminal nerves in development of hyperreactive nasal symptoms in guinea pig model of nasal allergy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:730-

- 735.
15. Numata T, Konno A, Yamakoshi T, et al. Comparative role of peptide leukotrienes and histamine in the development of nasal mucosal swelling in nasal allergy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:467-473.
  16. Terada N, Yamakoshi T, Hasegawa M, et al. The effect of ramatroban (BAY u 3405), a thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, on nasal cavity volume and minimum cross-sectional area and nasal mucosal hemodynamics after nasal mucosal allergen challenge in patients with perennial allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol Suppl* 1998;537:32-37.
  17. Kobayashi K, Horikami D, Omori K, et al. Thromboxane A<sub>2</sub> exacerbates acute lung injury via promoting edema formation. *Sci Rep* 2016;6:32109.





## 第4章

### 舌下免疫療法の疑問

- I. 舌下免疫療法研究に何が必要か？
- II. 舌下免疫療法は末梢血単核球サブセットとその機能にどのような変化をもたらすか？
- III. スギ花粉舌下免疫療法はヒノキ花粉症に免疫学的効果が期待できるか？
- IV. 舌下免疫療法後に一時的に抗原特異的 IgE 抗体が増加しても治療効果が得られるのは何故か？
- V. 舌下免疫療法後に長期間効果が持続するのは何故か？

# 1 舌下免疫療法研究に何が必要か？

## —同一患者の治療前後の血清と末梢血単核球を利用した検討—

### 1. アレルゲン免疫療法の歴史

#### 1) 皮下免疫療法

アレルゲン免疫療法の歴史は古く、1911年に Noon がイネ科花粉症に対する皮下免疫療法の症例報告をしたことに始まる<sup>1)</sup>。我が国では、1963年にハウスダスト、1969年にスギ花粉の皮下免疫注射液が発売されてから皮下免疫療法が広まり、その有効性が報告されてきた。しかしながら、抽出抗原の希釈液を用いていたため、製造ロットによってアレルゲン量が統一されていなかった。そこで、アレルゲンエキスの標準化が行われ、2000年に含有アレルゲン量を主要抗原 Cry j 1 濃度で統一規格したスギ花粉標準化治療薬が発売された。その後、2015年にダニの標準化治療薬も発売されている。

#### 2) 舌下免疫療法

皮下免疫療法は、注射のための通院が必要で、頻度は少ないがアナフィラキシーなどの全身性副反応が生じる問題が認められる。そこで、重篤な副反応が少なく、家庭で行うことができ、注射の痛みがない舌下免疫療法の検討がすすめられ、1986年に Scadding ら<sup>2)</sup>により、ダニ舌下免疫療法の二重盲検試験による有効性が初めて報告された。我が国では、2003年頃から大久保らを中心に厚生労働省班研究で皮下注射液の転用によるスギ花粉舌下免疫療法の臨床研究が開始され、2008年に二重盲検試験による有効性が確認された<sup>3)</sup>。その後の大規模臨床試験<sup>4)</sup>を経て、2014年にスギ花粉舌下液（シダトレン<sup>®</sup>）が発売された（2021年3月まで）。さらに、保存が容易で劣化しにくい錠剤の利点を生かして、2015年に世界に先駆けて、高容量のアレルゲンを含有するダニ舌下錠（アシテア<sup>®</sup>とミティキュア<sup>®</sup>）が承認された。ス

ギ花粉も液剤状態で濃縮すると糖鎖特性により粘性が増して高濃度にできないため、ダニ同様に錠剤化がすすめられ、2018年にスギ花粉舌下錠（シダキュア<sup>®</sup>）が発売された。2018年には、スギ花粉とダニともに12歳未満の小児にも投与できるようになり、激増する小児のアレルギー性鼻炎に対する新たな治療法として、急速に全国に広がっている。2021年時点で小児への投与が認められているのは日本だけである。

### 2. 舌下免疫療法の臨床的有効性

#### 1) スギ花粉症舌下免疫療法の臨床的有効性

スギ花粉舌下免疫療法は、治療開始数か月以降に効果が出現する。シダトレン<sup>®</sup>は2014年10月に発売されたため、最初のスギ花粉飛散期までに3～4か月の治療期間しかなかったが、初年度から効果を示した<sup>5)</sup>。また、1～5年と治療を続けると、年ごとに有効性が増大した（図1）<sup>6,7)</sup>。

シダトレン<sup>®</sup>は2021年に販売が終了し、舌下錠のシダキュア<sup>®</sup>に移行したが、シダキュア<sup>®</sup>でも治療初年度から効果が認められ<sup>8)</sup>、治療1年目に比べて3年目で効果が増強した<sup>9)</sup>。患者の治療に対する印象度は極めて良好で、2022年スギ花粉中等度飛散年に442名に行った治療印象度のアンケート調査では、5段階評価で、「すごく良くなった」43.6%、「良くなった」28.9%、「治療前より良くなった」24.4%であった。「変わらない」と「悪化している」は合わせて2.9%で、97%の有効性を示した。

#### 2) ダニ舌下免疫療法の臨床的有効性

ダニ舌下免疫療法も治療初年度から効果が認められ、ミティキュア<sup>®</sup>で治療した64例の検討<sup>10)</sup>では、治療6か月後と1年後ともに、くしゃみ、

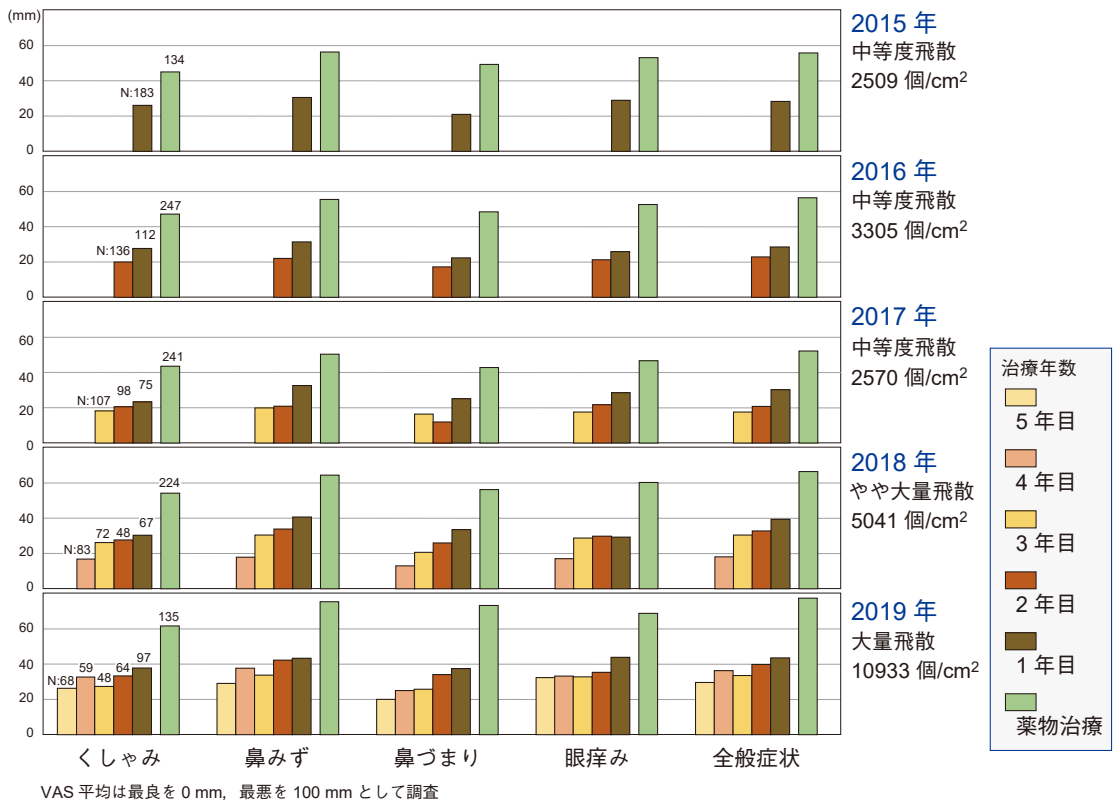


図1 スギ花粉舌下免疫療法（シダトレン<sup>®</sup>）治療1～5年間の花粉飛散ピーク期VAS平均値

鼻漏、鼻閉の3症状がそれぞれ有意に改善し、フェイススケール（0～4）のスコアは治療前が $1.7 \pm 0.9$ 、6か月後に $1.2 \pm 0.9$ 、1年後に $1.1 \pm 0.8$ に改善した。1年後の重症度変化は、改善26例（40.6%）、軽度改善26例（40.6%）、不変12例（18.8%）、悪化0例であった。

さらに、3年間治療成績を追跡した115例の検討でも、全般症状のVAS（visual analogue scale）平均値（100 mm長）は、治療前 $42.5 \pm 28.7$  mmから1年後 $19.9 \pm 20.3$  mmと有意に改善し、3年後も $18.9 \pm 19.4$  mmであった。スギ花粉症舌下免疫療法では治療年数とともに効果の増強が認められたが、ダニ舌下免疫療法では治療1年後には効果が確立し、3年後と差が認められなかった。

### 3) 舌下免疫療法の副反応

皮下免疫療法ではアナフィラキシーなどの重篤な全身性副反応に注意する必要があるが、米国で5,440万回の注射で7名の関連死が報告されてい

る<sup>11)</sup>。一方、舌下免疫療法では、処置が不要な軽微な局所副反応が多く、死亡に至る重篤な副反応は報告されていない。

われわれは、最初に発売されたシダトレン<sup>®</sup>の発売翌年に207例の最初の副反応報告を行った。違和感やピリピリ感などの口腔咽頭感覚症状と口腔内腫脹などの口腔咽頭症状が27.1%、くしゃみ、鼻水などの鼻炎症状が14.0%、目のかゆみなどの眼症状が6.8%、耳のかゆみが9.7%で認められたが、こうした副反応の多くは早期に消失し、2か月以上持続するのは8%程度であった<sup>12)</sup>。その後、ミティキュア<sup>®</sup>やシダキュア<sup>®</sup>に対する副反応についても報告し<sup>8,10)</sup>、ミティキュア<sup>®</sup>ではシダキュア<sup>®</sup>に比べて口腔咽頭の浮腫やかゆみ、ピリピリ感や違和感が多く認められたが、いずれも重篤な副反応は認められなかった。

局所的な副反応のため、予定より長く低用量で維持したり、一時的に減量してから再増量することもある。低用量から徐々にアレルゲンを増量す

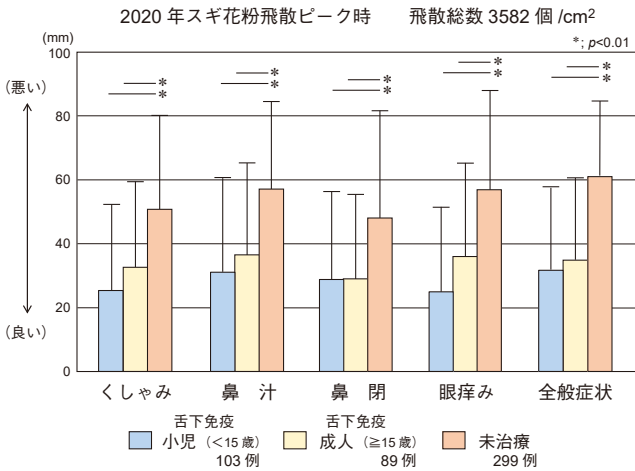


図2 スギ花粉舌下免疫療法（シダキュア®）1シーズン目の花粉飛散ピーク期VAS値—小児と成人の比較<sup>14)</sup>

るシダトレン®（2000 JAU 液剤）では投与量を減量する例を経験しなかった。シダキュア®（5000 JAU 錠剤）では少数例で一時的に減量したが早期に再増量し、全例が維持量で治療できた。一方、アレゲン量の多いミティキュア®（10000 JAU 錠剤）は、局所の浮腫などのため12.5%の例で一時的に減量した。多くは再増量が可能であったが、2%の例で低用量での維持を余儀なくされた<sup>13)</sup>。

#### 4) 小児に対する有効性と安全性

2018年から12歳未満の小児に適応が拡大されたが、小児の投与量は成人と同様で、同じプロトコルで行われる。そこで、スギ花粉およびダニ舌下免疫療法における小児（15歳未満）の有効性と安全性を、成人（15歳以上）と比較検討した。

スギ花粉舌下免疫療法（シダキュア®）の1シーズン目の治療効果は小児と成人で差を認めず、スギ花粉飛散ピーク期のVASによる鼻眼症状評価では、いずれも有意に症状が抑制された<sup>14)</sup>（図2）。また、ダニ舌下免疫療法（ミティキュア®）の治療効果も小児と成人で差を認めず、1年後のJRQLQ No1やVASによる症状評価では、いずれも有意に症状が抑制された<sup>15)</sup>（図3）。副反応の比較では、スギ花粉舌下免疫療法の成人例で「のどの痒み」と「耳の痒み」の感覚症状が多く認められたが、その他は小児と成人で差を認めなかった<sup>14, 15)</sup>（表1）。小児でも成人と同様な有効性と安全性が確認できた。

#### 5) スギ花粉とダニの併用舌下免疫療法

近年、我が国のスギ花粉症の有病率は急増し、現在では10～50代の約半数がスギ花粉症に罹患し、ダニによる通年性アレルギー性鼻炎を合併することも多い。実際に、ダニ舌下免疫療法を導入した患者の90%以上がスギ花粉症にも罹患していた<sup>8)</sup>。こうした患者にはスギ花粉とダニの併用舌下免疫療法（Dual SLIT）を行うことが望ましい。

そこで、われわれは、スギ花粉症とダニによる通年性アレルギー性鼻炎を合併する症例に、まず苦痛度の高いほうを先行治療として舌下免疫療法を開始し、最低1か月以上副反応を観察して安全性を確認してから、後行薬を追加した。当初は、朝夕に分けて舌下投与したが、1か月以上の観察で安全性が確認できたら、両薬剤を5分間隔で舌下投与した。2018年に併用舌下免疫療法を行った53例の安全性を報告したが、重篤な副反応はなく、副反応はダニを投与した時期に最も多く、併用による副反応の増加は認められなかった<sup>16)</sup>。

その後、先行薬を4週間投与後、後行薬を追加して5分以内の間隔で舌下投与する方法で、多施設共同臨床試験が行われ、最終的に104例の解析で安全性が証明されている<sup>17)</sup>。

### 3. 血清と末梢血単核球を利用した舌下免疫療法の分子機序解明のための研究

舌下免疫療法の研究が進んでいない理由とし

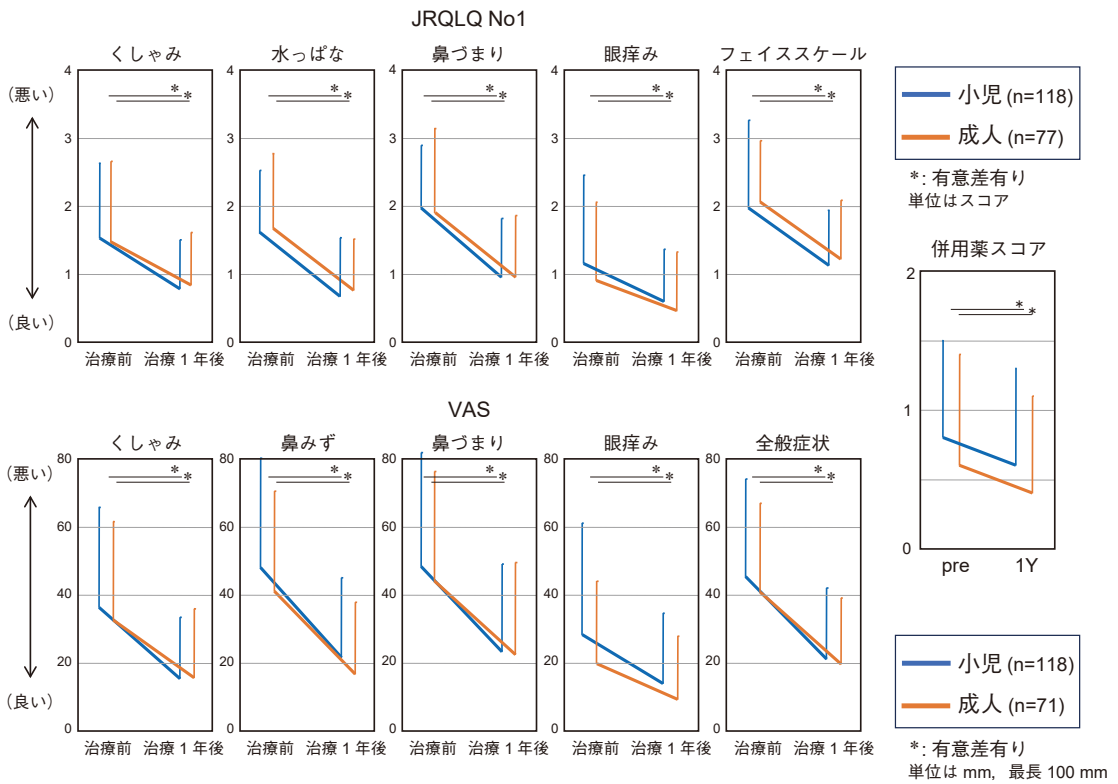


図3 ダニ舌下免疫療法（ミティキュア®）治療前と1年目のJRQLQ No1 とVAS による評価—小児と成人の比較<sup>15)</sup>

表1 スギ花粉舌下免疫療法（シダキュア®）とダニ舌下免疫療法（ミティキュア®）の副反応—小児と成人の比較<sup>14, 15)</sup>

		ダニ舌下免疫療法（ミティキュア®）		スギ花粉舌下免疫療法（シダキュア®）	
		小児 (<15歳) (n = 121)	成人 (≥15歳) (n = 77)	小児 (<15歳) (n = 49)	成人 (≥15歳) (n = 54)
口腔咽頭	副反応総数	70 (57.9%)	45 (58.4%)	49 (47.6%)	54 (60.7%)
	浮腫	24 (19.8%)	18 (23.4%)	10 (9.7%)	15 (16.9%)
	局所痒み	20 (16.5%)	14 (18.2%)	11 (10.7%)	10 (11.2%)
	ピリピリ感	21 (17.4%)	10 (13.0%)	11 (10.7%)	7 (7.9%)
	口内炎	8 (6.6%)	1 (1.3%)	5 (4.9%)	4 (4.5%)
	違和感	18 (14.9%)	13 (16.9%)	12 (11.7%)	11 (12.4%)
鼻眼症状	喉痒み	4 (3.3%)	6 (7.8%)	8 (7.8%)	18 (20.2%)
	くしゃみ	1 (0.8%)	1 (1.3%)	2 (1.9%)	1 (1.1%)
	鼻みず	9 (7.4%)	3 (3.9%)	3 (2.9%)	7 (7.9%)
	鼻閉	2 (1.7%)	2 (2.6%)	1 (1.0%)	3 (3.4%)
	鼻痒み	4 (3.3%)	1 (1.3%)	1 (1.0%)	2 (2.2%)
	眼の痒み	4 (3.3%)		3 (2.9%)	3 (3.4%)
その他	耳痒み	6 (5.0%)	5 (6.5%)	7 (6.8%)	16 (18.0%)
	皮膚痒み	2 (1.7%)	2 (2.6%)	3 (2.9%)	0 (0%)
	咳	2 (1.7%)	2 (2.6%)	3 (2.9%)	1 (1.1%)
	腹部症状	0 (0%)	2 (2.6%)	4 (3.9%)	2 (2.2%)
	胸部症状	3 (2.5%)	1 (1.3%)		
	蕁麻疹	1 (0.8%)			

て、①まだ歴史が浅く、症例数が少ないこと、②花粉飛散総数や臨床症状との紐づけが重要であること、③同一患者の治療前後の比較が必要なこと、④血清を用いた検討だけでなく、末梢血単核球のサブセットやその機能の解析が待たれること、などがあげられる。そのためには、多くの症例数を有する施設と連携して、同一患者の治療前後の血液検体を採取し、臨床症状の変化と紐づけて、末梢血単核球の機能解析を含めた検討を行う必要がある。

臨床症状の検討には、日本アレルギー性鼻炎標準 QOL 調査票 (JRQLQ NO.1), VAS, フェイススケール, 患者の治療印象アンケートなどの手法が使われる。スギ花粉症では花粉飛散総数は年と地域によって大きく異なるので、患者が居住する地域の花粉飛散総数を測定したうえで、同一地域で複数年の情報を得ることが望ましい。ダニによる通年性アレルギー性鼻炎では、生活環境におけるアレルゲン量が季節ごとに変化し、スギ花粉症などの季節性アレルギー性鼻炎の影響も受けるため、同じ時期の経年変化を検討する必要がある。

基礎的な研究は、患者の協力を得て採取する血液検体での検討が主になり、免疫学的変化が客観的評価や機序解明の手がかりになる。-20°C で適正に保管すれば、保存血清は IgE 抗体などの免疫グロブリンやサイトカインの測定に使用でき、保

存血球は遺伝子解析などに利用できる。一方、末梢血単核球サブセットやその機能の解析においては、新鮮な血液をできるだけ早く密度勾配遠心法で分離し、液体窒素などで超低温保管する必要がある。これまでは、こうした処理の複雑さから、血清を用いた研究は多いが、末梢血単核球を利用した検討はほとんど行われていない。

そこで、われわれは 2,000 例を超える舌下免疫療法症例を有する「ゆたクリニック (湯田厚司先生)」と連携して、2017 年から採血直後に血清と末梢血単核球を分離・保存するシステムを確立した。同一患者で治療前後の 3 年間毎年採血し、詳細な臨床症状の変化と対比させながら、舌下免疫療法の分子機序を研究している。滋賀医大と三重県津市の「ゆたクリニック」は高速道路を利用すれば、車で 1 時間くらいの距離にある。毎年 200 名を超える患者さんから採血し、血清と末梢血単核球を分離して、一時的に -80°C で保管したうえで、医局員が交代で週に 1~2 回、超低温下に検体を移送している。また、一部の検体は同日中に移送し、滋賀医科大学で分離保管している。

本章では、こうして採取、保管した検体を利用した研究成果を中心に、臨床症状の変化と対比させて、舌下免疫療法の免疫学的作用機序について紹介する。

## まとめ

**疑問：舌下免疫療法研究に何が必要か？**

**答え：**舌下免疫療法の免疫学的機序を検討するためには、同一患者で治療前後に血液を採取し、臨床症状と紐づけながら、血清中の免疫グロブリンやサイトカインだけでなく末梢血単核球のサブセットやその機能の解析を行う必要がある。末梢血単核球の研究では、採血直後に分離して保管する必要があるが、われわれは 2,000 例を超える舌下免疫療法症例を有する三重県津市の「ゆたクリニック」と連携して、採血直後に血清と末梢血単核球を分離保管するシステムを確立し、臨床症状の変化と対比させながら、舌下免疫療法の分子機序を検討している。

## 文献

1. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911;1:1572-1573.
2. Scadding GK, Brostoff J. Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to house dust mite. *Clin Allergy* 1986;16:483-491.
3. Okubo K, Gotoh M, Fujieda S, et al. A randomized double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergol Int* 2008;57:265-275.
4. Okamoto Y, Okubo K, Yonekura S, et al. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy for two seasons in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2015;166:177-188.
5. 湯田厚司, 小川由起子, 鈴木祐輔, 他. スギ花粉症における舌下免疫療法 191 例の初年度治療成績. *アレルギー* 2015;64:1323-1333.
6. 湯田厚司, 小川由起子, 鈴木祐輔, 他. スギ花粉症舌下免疫療法のスギ花粉多量飛散年での臨床効果と治療年数の効果への影響. *アレルギー* 2018;67:1011-1019.
7. 湯田厚司, 小川由起子, 鈴木祐輔, 他. スギ花粉症舌下免疫療法の治療 2 年目における症状改善の増強効果. *日耳鼻* 2017;120:44-51.
8. 湯田厚司, 小川由起子, 鈴木祐輔, 他. スギ花粉舌下免疫療法治療薬シダキュア® 69 例の初年度治療成績. *アレルギー* 2019;68:958-965.
9. 湯田厚司. スギ花粉とダニの舌下免疫療法の最近の動向. *日耳鼻* 2022;125:1071-1077.
10. 湯田厚司, 小川由起子, 神前英明, 他. ダニアレ  
ルゲン舌下免疫療法 64 例の治療 1 年目の臨床検討. *日耳鼻* 2019;122:1516-1521.
11. Epstein TG, Liss GM, Berendts KM, et al. AAAAI/ACAAI subcutaneous immunotherapy surveillance study (2013-2017): fatalities, infections, delayed reactions, and use of epinephrine autoinjectors. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019;7:1996-2003.
12. 小川由起子, 湯田厚司, 有方雅彦, 他. スギ花粉症に対する舌下免疫療法 207 例の副反応の検討. *日耳鼻* 2015;118:1429-1435.
13. 湯田厚司, 神前英明, 新井宏幸, 他. 舌下免疫療法のアレルゲン・剤型・維持量に伴う副反応による治療スケジュールへの影響. *日鼻誌* 2020;59:398-405.
14. 湯田厚司, 小川由起子, 鈴木祐輔, 他. 実地診療での小児スギ花粉症に対する舌下免疫療法の治療 1 シーズン目の効果と安全性の検討. *アレルギー* 2020;69:909-917.
15. 湯田厚司, 小川由起子, 鈴木祐輔, 他. 小児通年性アレルギー性鼻炎に対するダニ舌下免疫療法における成人と比較した治療 1 年後の効果と安全性. *アレルギー* 2021;70:186-194.
16. 湯田厚司, 小川由起子, 新井宏幸, 他. スギ花粉とダニの併用舌下免疫療法の安全性. *日耳鼻* 2019;122:126-132.
17. Gotoh M, Okubo K, Yuta A, et al. Safety profile and immunological response of dual sublingual immunotherapy with house dust mite tablet and Japanese cedar pollen tablet. *Allergol Int* 2020;69:104-110.

## II 舌下免疫療法は末梢血単核球サブセットとその機能に どのような変化をもたらすか？

### —制御性 T・B 細胞と制御系サイトカイン—

#### 1. Th2細胞と濾胞性ヘルパー T (Tfh: follicular helper T) 細胞

##### 1) Th2 細胞と制御性 T (Treg: regulatory T) 細胞

ヘルパー T 細胞は、産生するサイトカインの違いによって、主として IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞と IL-4, IL-5, IL-13 など産生する Th2 細胞, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 など産生する Th17 細胞に分けることができる。Th1 細胞はマクロファージなど単核球中心の細胞性免疫を誘導し、細胞内病原体の排除のほか炎症性疾患・自己免疫疾患に関与する。Th2 細胞は液性免疫を誘導し、IL-4 による B 細胞からの IgE 産生や、IL-5 による好酸球の誘導や活性化、IL-13 による杯細胞化生や気道過敏性の亢進などを介して、寄生虫感染の防御やアレルギー炎症にかかわる。Th17 細胞は好中球性炎症の誘導や、細胞外細菌と真菌の排除にかかわるが、過剰な活性化は関節リウマチや慢性炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎）、多発性硬化症における自己免疫反応の病態に関与する。Th1, Th2, Th17 細胞は互いにバランスをとりながら免疫応答を制御している。アレルギー性鼻炎では、Th1 と Th2 のバランスが Th2 優位に傾いているが、舌下免疫療法の作用機序の一つにこうした Th1 細胞と Th2 細胞のアンバランスを是正することがあげられる<sup>1)~3)</sup>。

一方、免疫応答を制御するヘルパー T 細胞として、転写因子 Foxp3 を発現する制御性 T (Treg) 細胞が存在する。胸腺由来で免疫自己寛容の維持に働く nTreg (naturally occurring Treg) 細胞と末梢リンパ組織で TGF- $\beta$  やレチノイン酸によって誘導される iTreg (inducible Treg) 細胞があり、TGF- $\beta$  や IL-10, IL-35 などの制御系サイトカイン

を産生し、CTLA-4 の発現を介して副刺激分子の機能を抑制するなど、複数の免疫抑制機序を有している。さらに、IL-10 によって分化誘導され、Foxp3 を発現せずに IL-10 を高産生する Tr1 (type 1 regulatory) 細胞<sup>4)</sup> や、後述する濾胞性制御性 T (Tfr: follicular regulatory T) 細胞<sup>5, 6)</sup> など、さまざまな制御性 T 細胞サブセットが報告されている。舌下免疫療法後にはこうした制御性 T 細胞群が増加し、過剰な免疫反応を制御して免疫寛容を誘導する可能性が考えられる<sup>7)~10)</sup>。

##### 2) 濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞と濾胞性制御性 T (Tfr) 細胞

濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞は、リンパ組織での胚中心の形成と B 細胞から形質細胞への誘導、免疫グロブリン産生に不可欠な細胞として同定された<sup>11, 12)</sup>。Tfh 細胞は、抗原曝露後にリンパ節においてナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞から Bcl6 を主要な転写因子として分化し、CXCR-5, PD-1, ICOS, CD40L などを発現する<sup>13, 14)</sup>。Tfh 細胞は末梢血にも存在し、Th1, Th2, Th17 細胞に対応して、それぞれ Tfh1, Tfh2, Tfh17 細胞などに分けることができる。アレルギー性鼻炎では Tfh2 細胞が増加し、抗原特異的 IgE 抗体の産生にかかわる<sup>15)</sup>。

一方、Tfh 細胞に対応して、胚中心反応を抑制する濾胞性制御性 T (Tfr) 細胞も存在する<sup>5, 6, 16)</sup>。Tfr 細胞は Foxp3 や CTLA-4 など Treg 細胞に特徴的なマーカーとともに、Tfh 細胞に特徴的な Bcl6, PD-1 や ICOS を発現し、Tfh 細胞と Treg 細胞の性質を併せ持つと考えられるが、その機能はまだ十分に解明されていない<sup>17, 18)</sup>。ダニのアレルギー性鼻炎では末梢血中の Tfr 細胞が減少しているが、皮下免疫療法後には増加し、臨床症状の改善と相関することが報告されている<sup>19)</sup>。



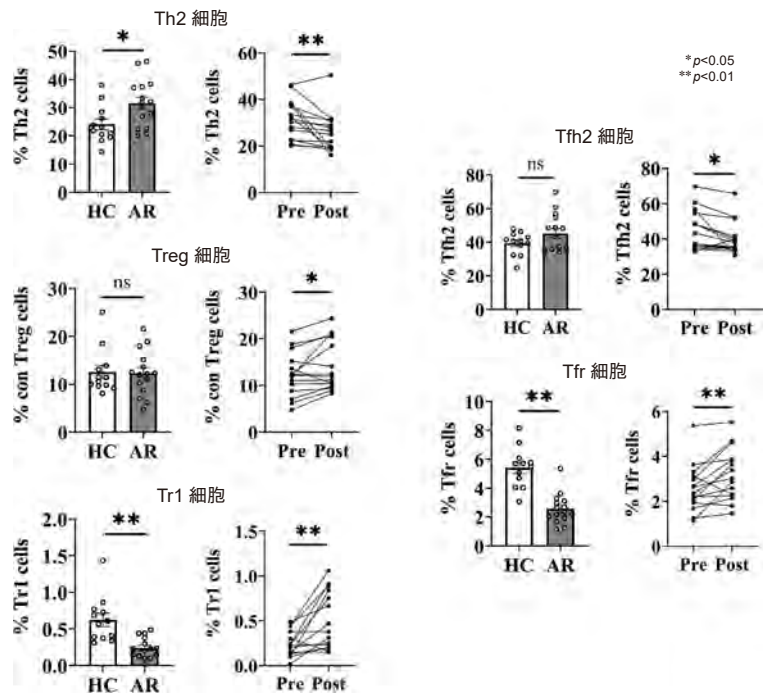


図1 ダニ舌下免疫療法（1年間）に伴う末梢血ヘルパーT細胞サブセットの動態

HC：健常人，AR：アレルギー性鼻炎患者

### 3) ダニ舌下免疫療法は、末梢血のヘルパーT細胞（CD4<sup>+</sup>T細胞）サブセットと、末梢血単核球からのサイトカイン産生にどのような変化をもたらすか？

ダニ舌下免疫療法（1年間）の前後で、同一患者から採血し、末梢血単核球を分離してフローサイトメトリーで、ヘルパーT細胞（CD4<sup>+</sup>T細胞）サブセットのTh2（CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR-5<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>CCR-6<sup>-</sup>CXCR-3<sup>-</sup>）、Treg（CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR-5<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>）、Tr1（CD4<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>）、Tfh2（CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR-5<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CCR-6<sup>-</sup>CXCR-3<sup>-</sup>）、Tfr（CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR-5<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>）細胞の変化について検討した。さらに、末梢血単核球をダニ抗原で48時間刺激して産生されるIL-5とIL-10の変化について検討した。

#### ① Th2細胞，Treg細胞，Tr1細胞

ダニアレルギー性鼻炎患者では健常人に比べて、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR-5<sup>-</sup>T細胞におけるTh2細胞の割合が高かったが、Treg細胞の割合には差を認めなかった。CD4<sup>+</sup>T細胞におけるTr1細胞の割合は低かった。つまり、Th2細胞が増加し、Tr1細胞が減少していた。ダニ舌下免疫療法1年後には、Th2細胞の割合が減少し、Treg細胞や

Tr1細胞の割合は増加した（図1）。

#### ② Tfh2細胞とTfr細胞

ダニアレルギー性鼻炎患者では、Tfh（CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR-5<sup>+</sup>）細胞におけるTfh2細胞の割合には有意な差を認めなかったが、Tfr細胞の割合は低かった。ダニ舌下免疫療法1年後には、Tfh2細胞の割合が減少し、Tfr細胞の割合が増加した（図1）。

#### ③ダニ抗原刺激による末梢血単核球からのIL-5，IL-10産生

ダニアレルギー性鼻炎患者では、ダニ粗抗原刺激（50 μg/ml，48時間）による末梢血単核球からのIL-5産生が亢進し、制御性サイトカインであるIL-10の産生が抑制されているが、ダニ舌下免疫療法1年後にはダニ抗原刺激によるIL-5産生が減少し、反対にIL-10産生が増加した（図2）。つまり、抗原特異的なTh2細胞などからのIL-5産生が抑制され、制御性T（Treg）細胞などからのIL-10産生が促進されたと考えられる。

#### ④臨床症状との相関

ダニ舌下免疫療法1年後の臨床症状の変化を、TNOSS（total nasal ocular symptom score：0～18点）とVASスコア（visual analogue scale：0～

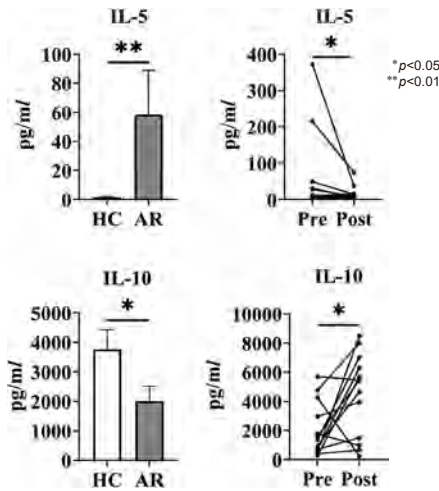


図2 ダニ舌下免疫療法(1年間)とダニ粗抗原刺激(48時間)による末梢血単核球からのIL-5, IL-10産生の変化  
 HC: 健常人, AR: アレルギー性鼻炎患者

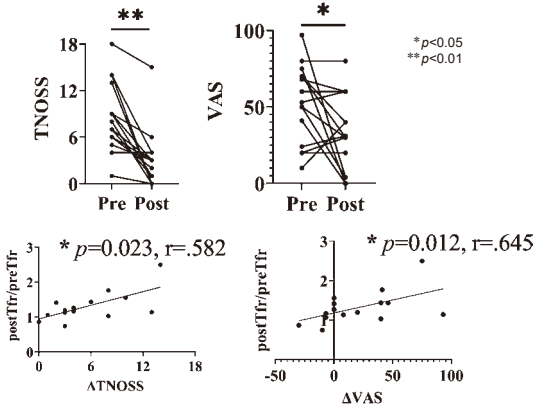


図3 ダニ舌下免疫療法1年後の臨床症状の改善率とTfr細胞の変化率との相関  
 TNOSS: total nasal ocular symptom score (0~18点),  
 VAS: visual analogue scale (0~100点)

100点)を用いて評価した。舌下免疫療法1年後にはTNOSSもVASスコアとともに有意に改善した(図3)。次に、臨床症状スコアの改善度に関連する因子について、Th2細胞、Tr1細胞、Tfr細胞の割合と、末梢血単核球からのIL-5とIL-10産生の変化について検討したところ、臨床症状スコアの改善度とTfr細胞の変化率(治療後の割合/治療前の割合)に正の相関が認められ(図3)、Tfr細胞の変化率(増加)が舌下免疫療法の有効性を予測する指標になる可能性が考えられる。

## ⑤舌下免疫療法の作用機序

ダニ舌下免疫療法後にはTh2細胞やTfh2細胞などの2型炎症担当細胞が減少し、Treg細胞、Tr1細胞、Tfr細胞などの制御系細胞が増加し、抗原刺激によるIL-5産生が減少し、制御系サイトカインのIL-10産生が増加した。舌下免疫療法の作用機序として、Th2細胞やTfh2細胞の減少と制御系ヘルパーT細胞の増加、それに伴うサイトカイン産生の変化が、臨床症状の改善にかかわると考えられる。

## 2. 制御系サイトカインIL-35

### 1) IL-35の役割

IL-35は、IL-12サイトカインファミリーに属し、EBI-3とp35のヘテロ二量体で構成される。制御性T(Treg)細胞や制御性B(Breg)細胞から産生され、T細胞の分化・増殖を抑制して、免疫抑制に働く<sup>20,21)</sup>。

IL-35は抗原刺激によるT細胞からの2型サイトカイン産生を抑制する一方で、制御系サイトカインのIL-10、IL-27産生を促進すること<sup>22)</sup>、点鼻投与によりアレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻症状や鼻粘膜への好酸球浸潤を抑制すること<sup>23)</sup>、抗原特異的なmemory/effector Th2細胞による気道炎症やIgE産生を抑制すること<sup>24)</sup>、抗原刺激による樹状細胞の分化や機能を抑制すること<sup>25)</sup>などが報告され、2型炎症を制御する役割が考えられる。

舌下免疫療法の作用機序として、制御性T(Treg)細胞や制御性B(Breg)細胞が誘導され、制御系サイトカインであるTGF-βやIL-10、IL-35の産生などを介して、免疫寛容が誘導される<sup>26,27)</sup>と考えられるが、IL-35の機能や舌下免疫療法に伴う変化についてはまだ十分に解明されていない。

### 2) IL-35の機能

#### ①末梢血単核球

スギ花粉症患者の末梢血単核球に、スギ花粉抽出物を加えて72時間培養してサイトカイン産生に対するIL-35の作用を検討した。IL-35(0.1~

10  $\mu\text{g/ml}$ ) は抗原刺激による IL-17, IFN- $\gamma$  産生を濃度依存的に抑制し, 高濃度の IL-35 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) は抗原刺激による IL-5 産生を抑制し, IL-10 産生を増加させた<sup>28)</sup> (図 4).

## ② CD4<sup>+</sup>T 細胞

末梢血単核球からメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し, 抗 CD3/CD28 抗体で 72 時間刺激して, サイトカイン産生に対する影響を検討したところ, IL-35 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) は Th2 細胞の主要な転写因子である GATA3 mRNA の発現 (6 時間) を抑制し, IL-5, IL-13 産生を抑制したが, IFN- $\gamma$  産生は増加した (図 5).

次に, 樹状細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞をそれぞれ分離して, 1:10 の割合で 72 時間共培養して, スギ花粉抽出物を加えてサイトカイン産生について検討したところ, IL-35 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) は抗原刺激による IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$  産生を抑制した<sup>28)</sup> (図 6).

つまり, IL-35 は Th2 細胞への分化を抑制し, T 細胞からの炎症性サイトカイン産生を抑制するが, 制御系サイトカイン IL-10 産生は促進すると考えられる. そこで, Th2 細胞や 2 型自然リンパ球 (ILC2s), B 細胞に対する IL-35 の作用について検討した.

図 4 スギ抗原刺激による末梢血単核球からのサイトカイン産生に対する IL-35 ( $\mu\text{g/ml}$ ) の作用<sup>28)</sup>

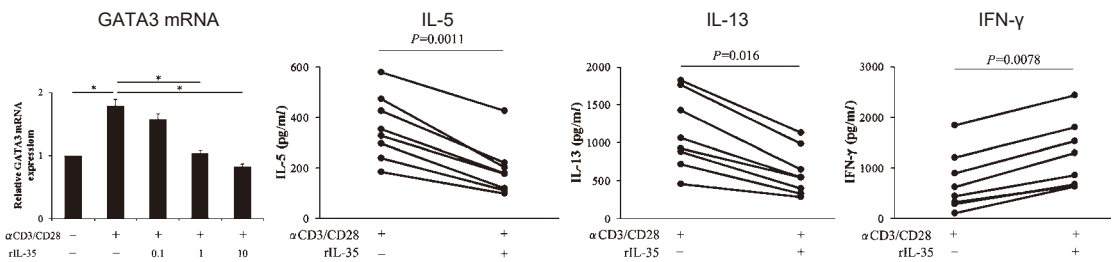
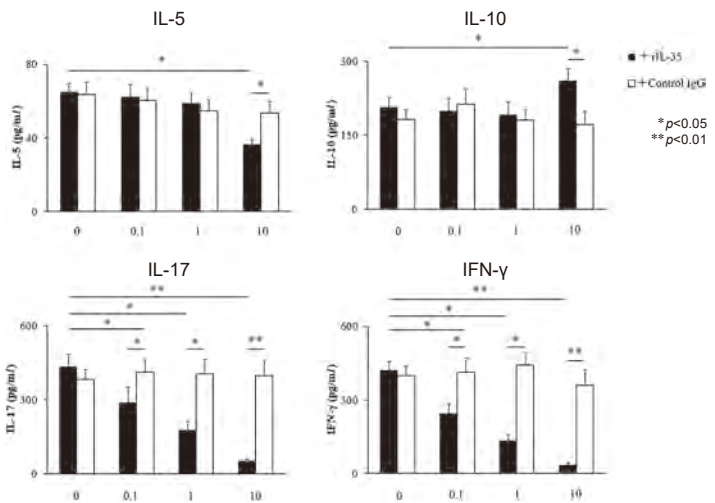
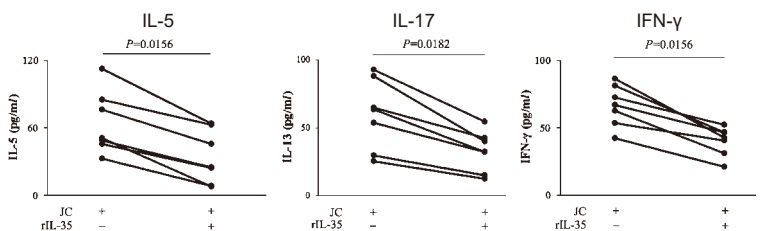


図 5 メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞における, 抗 CD3/CD28 抗体刺激による GATA3 mRNA 発現とサイトカイン産生に対する IL-35 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) の作用<sup>28)</sup>

図 6 樹上細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞の共培養 (1:10) における, スギ抗原刺激によるサイトカイン産生に対する IL-35 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) の作用<sup>28)</sup>



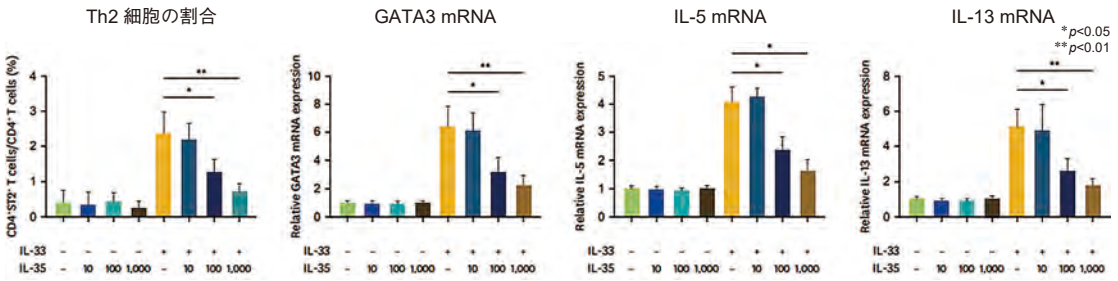


図7 分離した CD4<sup>+</sup>T 細胞からの Th2 細胞への分化と、Th2 細胞における GATA3、IL-5、IL-13 の mRNA 発現に対する IL-35 (ng/ml) の作用<sup>29)</sup>

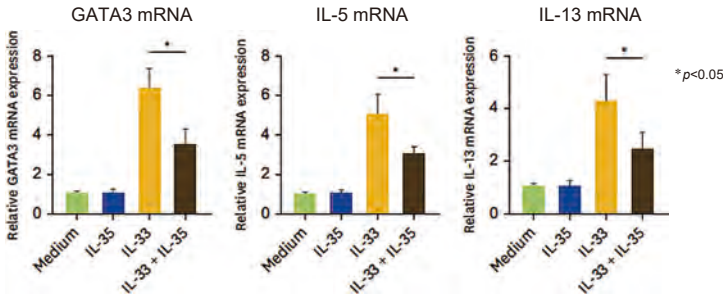


図8 2型自然リンパ球 (ILC2s) における GATA3、IL-5、IL-13 の mRNA 発現に対する IL-35 (100 ng/ml) の作用<sup>29)</sup>

③ Th2 細胞, 2型自然リンパ球 (ILC2s), B 細胞

スギ花粉症患者の末梢血単核球から CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し、IL-33 (100 ng/ml) とともに5日間培養して、Th2 (CD4<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>) 細胞への分化に対する IL-35 の作用を検討した。IL-33 により CD4<sup>+</sup>T 細胞における Th2 細胞の割合が増加するが、IL-35 (100 ~ 1,000 ng/ml) はこれを抑制した。また、分離した Th2 細胞を IL-33 (100 ng/ml) とともに6時間培養して、GATA3、IL-5、IL-13 の mRNA 発現に対する IL-35 の作用を検討した。IL-35 (100 ~ 1,000 ng/ml) は Th2 細胞における GATA3、IL-5、IL-13 の mRNA 発現をいずれも抑制した<sup>29)</sup> (図7)。

次に、2型自然リンパ球 (ILC2s) を分離して、IL-2 (50 ng/ml) と2週間培養すると細胞増殖が認められるが、IL-35 (100 ng/ml) はこれを抑制した。増殖した ILC2s を、IL-33 (100 ng/ml) で6時間刺激して GATA3、IL-5、IL-13 の mRNA 発現を検討したところ、IL-35 (100 ng/ml) は ILC2s における GATA3、IL-5、IL-13 の mRNA 発現を抑制した<sup>29)</sup> (図8)。

さらに、B 細胞を分離して、CD40L (100 ng/

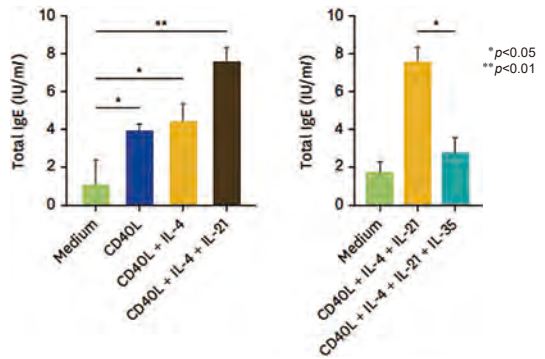


図9 B 細胞からの IgE 産生に対する IL-35 (100 ng/ml) の作用<sup>29)</sup>

ml), IL-4 (100 ng/ml), IL-21 (100 ng/ml) を加えると、相加性に IgE 産生が認められる。IL-35 (100 ng/ml) はこうした B 細胞からの IgE 産生も抑制した<sup>29)</sup> (図9)。

このように、IL-35 は CD4<sup>+</sup>T 細胞の Th2 細胞への分化を抑制し、ILC2s の分化、増殖を抑制し、Th2 細胞と ILC2s からの 2型サイトカイン産生を抑制し、B 細胞からの IgE 産生も抑制して、2型炎症を制御すると考えられる。

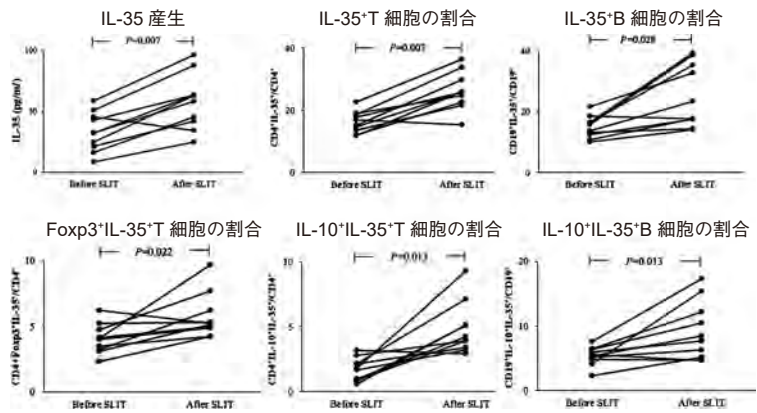


図 10 スギ花粉舌下免疫療法 1 年後の変化：抗原刺激による末梢血単核球からの IL-35 産生，CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL-35<sup>+</sup> 細胞と Foxp3<sup>+</sup>IL-35<sup>+</sup> 細胞と IL-10<sup>+</sup>IL-35<sup>+</sup> 細胞の割合，CD19<sup>+</sup>B 細胞における IL-35<sup>+</sup>B 細胞と IL-10<sup>+</sup>IL-35<sup>+</sup>B 細胞の割合<sup>28)</sup>

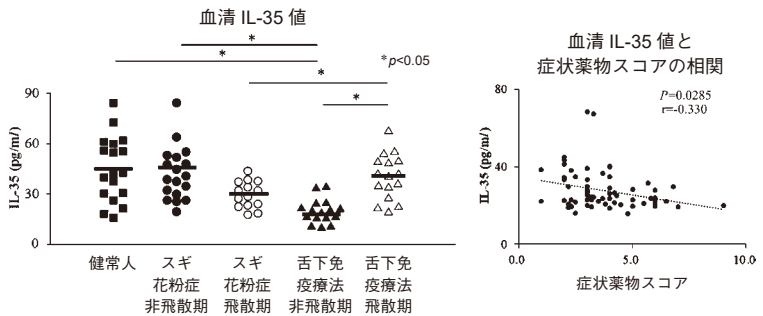


図 11 健常人とスギ花粉症，スギ花粉舌下免疫療法 1 年後の患者の，スギ花粉飛散期と非飛散期の血清中 IL-35 値と，スギ花粉舌下免疫療法 1 年後の花散期と非飛散期の血清 IL-35 値と症状薬物スコアとの相関<sup>28)</sup>

### 3) スギ花粉舌下免疫療法と L-35

#### ①制御性 T・B 細胞

スギ花粉舌下免疫療法患者の治療前と治療 1 年後の血液から末梢血単核球を分離し，スギ花粉抽出物を加えて 48 時間培養し，上清中の IL-35 濃度の測定とフローサイトメトリーによる検討を行った。

舌下免疫療法 1 年後には，抗原刺激による末梢血単核球からの IL-35 産生が増加した。また，IL-35 を発現する CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD19<sup>+</sup>B 細胞の割合がいずれも増加した。さらに，CD4<sup>+</sup>T 細胞における Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の割合には変化を認めないが，Foxp3<sup>+</sup>IL-35<sup>+</sup>T 細胞と IL-10<sup>+</sup>IL-35<sup>+</sup>T 細胞の割合が増加した。CD19<sup>+</sup>B 細胞における IL-10<sup>+</sup>IL-35<sup>+</sup>B 細胞の割合も増加した<sup>28)</sup> (図 10)。つまり，舌下免疫療法によって IL-35 を産生する制御性 T・B 細胞が増加し，抗原刺激によって IL-35 産生が誘導される。

#### ②血清中の IL-35 値と臨床症状との相関

健常人とスギ花粉症，スギ花粉舌下免疫療法 1 年後の患者から，スギ花粉飛散期と非飛散期に採血し，血清中の IL-35 値を ELISA 法で測定した。健常人とスギ花粉症患者で血清中の IL-35 値は差を認めないが，スギ花粉症患者では花粉飛散期の IL-35 値が低下していた。一方，スギ花粉舌下免疫療法後には血清 IL-35 値は低下するが，花粉飛散期には IL-35 値が上昇した。さらに，舌下免疫療法後の花粉飛散期における血清 IL-35 値と症状薬物スコア (symptom medication score) の間に負の相関が認められ，舌下免疫療法後の血清 IL-35 値の上昇が臨床症状の改善と関連していた<sup>28)</sup> (図 11)。

つまり，スギ花粉症患者では花粉飛散期の血清 IL-35 値が低下するが，舌下免疫療法後には抗原刺激によって IL-35 が産生され，花粉飛散期に血清 IL-35 が上昇することが臨床の有効性に寄与すると考えられる。

## まとめ

**疑問：舌下免疫療法は末梢血単核球サブセットとその機能にどのような変化をもたらすか？**

**答え：舌下免疫療法によって Th2 細胞や濾胞性ヘルパー T (Tfh2) 細胞などの 2 型炎症を誘導する細胞が減少し、制御性 T・B (Treg・Breg) 細胞, Tr1 細胞, 濾胞性制御性 T (Tfr) 細胞などの制御系細胞が増加し、抗原刺激による IL-5 産生が減少し、制御系サイトカインの IL-10, IL-35 産生が増加する。IL-35 は Th2 細胞や 2 型自然リンパ球の分化・増殖と 2 型サイトカイン産生を抑制し、B 細胞からの IgE 産生を抑制する機能を有する。舌下免疫療法後には花粉飛散期の抗原刺激により制御系細胞から IL-35 が産生され、血清中 IL-35 値が上昇し、臨床症状の改善に寄与する。**

## 文献

- Nomura T, Suzuki M, Yokota M, et al. Effect of Japanese cedar-specific sublingual immunotherapy on allergen-specific TH2 cell counts in blood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016;117:72-78.e74.
- Sakurai D, Yonekura S, Inuma T, et al. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: subjective versus objective tools to evaluate its success. *Rhinology* 2016;54:221-230.
- Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:395-400.
- Gagliani N, Magnani CF, Huber S, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 2013;19:739-746.
- Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest* 2004;114:1640-1649.
- Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005;175:4180-4183.
- Fujita H, Soyka MB, Akdis M, et al. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy* 2012;2:2.
- Fujimura T, Yonekura S, Taniguchi Y, et al. The induced regulatory T cell level, defined as the proportion of IL-10(+)Foxp3(+) cells among CD25(+) CD4(+) leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy: a preliminary report. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153:378-387.
- Yamanaka K, Yuta A, Kakeda M, et al. SLIT improves cedar pollinosis by restoring IL-10 production from Tr1 and monocytes~IL-10 productivity is critical for becoming allergic~. *Allergol Int* 2011;60:45-51.
- Huang Y, Chen Z, Wang H, et al. Follicular regulatory T cells: a novel target for immunotherapy? *Clin Transl Immunology* 2020;9:e1106.
- Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011;29:621-663.
- Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* 2001;193:1373-1381.
- Choi YS, Kageyama R, Eto D, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 2011;34:932-946.
- Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 2009;325:1001-1005.
- Kamekura R, Shigehara K, Miyajima S, et al. Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. *Clin Immunol* 2015;158:204-211.
- Chung Y, Tanaka S, Chu F, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* 2011;17:983-988.
- Xie MM, Chen Q, Liu H, et al. T follicular regulatory cells and IL-10 promote food antigen-specific IgE. *J Clin Invest* 2020;130:3820-3832.
- Clement RL, Daccache J, Mohammed MT, et al. Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. *Nat Immunol* 2019;20:1360-1371.
- Yao Y, Wang ZC, Wang N, et al. Allergen immunotherapy improves defective follicular regulatory T cells in

- patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144:118-128.
20. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566-569.
  21. Egwuagu CE, Yu CR, Sun L, et al. Interleukin 35: Critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26:587-593.
  22. Yokota M, Suzuki M, Nakamura Y, et al. Cytokine modulation by IL-35 in mice with allergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy* 2015;29:251-256.
  23. Suzuki M, Yokota M, Nakamura Y, et al. Intranasal administration of IL-35 inhibits allergic responses and symptoms in mice with allergic rhinitis. *Allergol Int* 2017;66:351-356.
  24. Huang CH, Loo EX, Kuo IC, et al. Airway inflammation and IgE production induced by dust mite allergen-specific memory/effector Th2 cell line can be effectively attenuated by IL-35. *J Immunol* 2011;187: 462-471.
  25. Dong J, Wong CK, Cai Z, et al. Amelioration of allergic airway inflammation in mice by regulatory IL-35 through dampening inflammatory dendritic cells. *Allergy* 2015;70:921-932.
  26. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, et al. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:654-665.
  27. Shamji MH, Ljørring C, Würtzen PA. Predictive biomarkers of clinical efficacy of allergen-specific immunotherapy: how to proceed. *Immunotherapy* 2013;5: 203-206.
  28. Kouzaki H, Arikata M, Koji M, et al. **Dynamic change of anti-inflammatory cytokine IL-35 in allergen immune therapy for Japanese cedar pollinosis.** *Allergy* 2020;75:981-983.
  29. Kouzaki H, Arai Y, Nakamura K, et al. **Anti-inflammatory roles of interleukin-35 in the pathogenesis of Japanese cedar pollinosis.** *Asia Pac Allergy* 2021;11:e34.

### III スギ花粉舌下免疫療法はヒノキ花粉症に 免疫学的効果が期待できるか？

#### —特異的反応性と非特異的反応性，交差反応性について—

#### 1. スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する臨床効果

##### 1) スギ花粉とヒノキ花粉の相同性

日本の森林面積の約4割が人工林で，その7割をスギ林とヒノキ林が占めている．ヒノキは雪に弱いので，北陸から東日本以北には少ないが，西日本においてはスギ林とヒノキ林はほぼ同じ面積を占め（図1），ヒノキ花粉飛散総数がスギ花粉飛散総数を上回る地域も多い．地域によってはスギ花粉症患者の80%以上がヒノキ花粉症を合併し，ヒノキ単独の花粉症はまれである．

スギとヒノキは植物学的に同じヒノキ科に属し，スギ花粉の主要アレルゲンコンポーネントであるCry j 1とCry j 2は，ヒノキ花粉のCha o 1, Cha o 2とアミノ酸配列でそれぞれ80%と74%の高い相同性を有している<sup>1, 2)</sup>．スギ花粉とヒノキ花粉はこの高い相同性により，特異的IgE抗体やT細胞レベルで交差反応性を示すことが報告され<sup>3)~6)</sup>，スギ花粉舌下免疫療法は，合併するヒノキ花粉症に対しても症状抑制効果が期待された．

一方，2016年にヒノキ花粉の新たなアレルギー

コンポーネントであるCha o 3が発見され，ヒノキ花粉症の87.5%がCha o 3に感作されていた<sup>7)</sup>．その後，対応するスギ花粉のアレルゲンコンポーネントとしてアミノ酸配列で84%の相同性があるCry j 4が同定されたが，スギ花粉におけるCry j 4の含有量が少ないため，スギ花粉舌下免疫療法ではCha o 3の感作に対して免疫寛容が誘導できない可能性が示されている<sup>8)</sup>．

そこで，スギ花粉舌下免疫療法がヒノキ花粉症にどれくらい臨床効果があるのか，ヒノキ花粉症を合併するスギ花粉症患者にスギ花粉舌下免疫療法を行い，スギ花粉飛散期とヒノキ花粉飛散期の症状改善度について比較検討した．

##### 2) スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉飛散期の臨床効果

ヒノキ花粉症を合併するスギ花粉症患者173例に，スギ花粉舌下免疫療法（シダトレン<sup>®</sup>）を2年間行い，ヒノキ花粉飛散期の症状についてアンケート調査を行った．スギ花粉飛散期の症状は95%の症例で改善していたが，ヒノキ花粉飛散期の症状は「非常に良かった」と「良かった」が

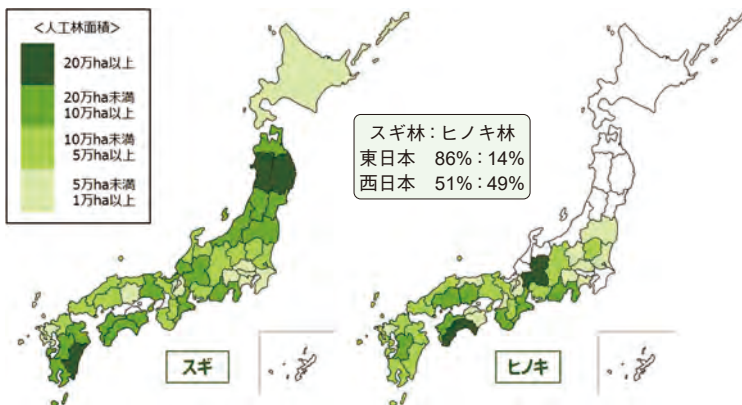


図1 スギ・ヒノキ人工林の全国分布（平成29年3月31日）（林野庁ホームページより <https://www.rinya.maff.go.jp/j/keikaku/genkyou/h29/4.html>）



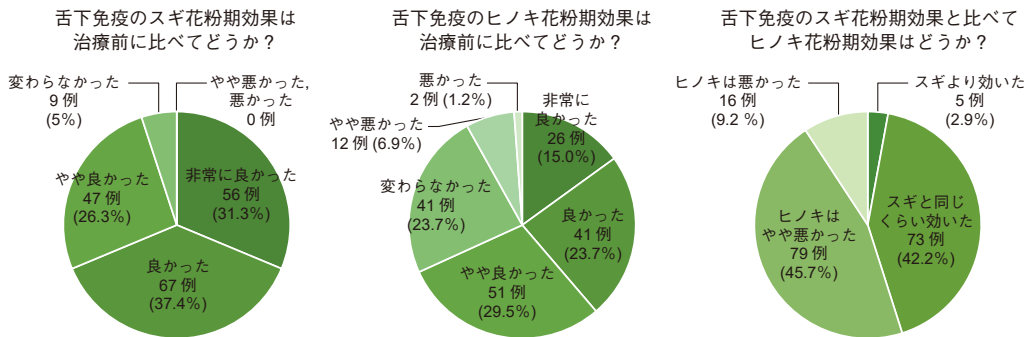


図2 スギ花粉舌下免疫療法（シダトレン®）173例（2年間）のヒノキ花粉飛散期の臨床効果<sup>9)</sup>

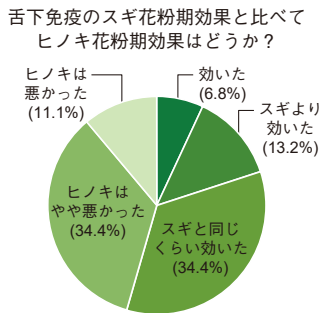


図3 スギ花粉舌下免疫療法（シダキュア®）394例（2年間）のヒノキ花粉飛散期の臨床効果

38.7%，「やや良かった」が29.5%，「変わらない」と「悪かった」が31.8%で，ヒノキ花粉飛散期の効果がスギ花粉飛散期より悪い症例が54.9%を占めていた<sup>9)</sup> (図2)。

次に，ヒノキ花粉症を合併するスギ花粉症患者394例にシダキュア®による舌下免疫療法を2年間行ったところ，ヒノキ花粉飛散期の効果がスギ花粉飛散期より悪い症例は45.5%で，シダトレン®に比べて若干良くなったが，スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉症への効果は限定的であった(図3)。

スギ花粉舌下免疫療法がヒノキ花粉症にある程度の効果がある理由として，交差反応性による免疫学的作用による以外に，非特異的な免疫抑制作用によるもの，スギ花粉飛散期の症状が抑えられるため連続するヒノキ花粉症の症状が重症化しないことなどが考えられる。そこで，スギ花粉舌下免疫療法はヒノキ花粉症に対して免疫学的効果があるのか，抗原刺激による末梢血単核球からのサイトカイン産生と抗原特異的免疫グロブリンの変化を検討した。

## 2. スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する免疫学的効果

### 1) 末梢血単核球からのサイトカイン産生と抗原特異的 IgE, IgG4 抗体産生

#### ① 抗原刺激による末梢血単核球からのサイトカイン産生

舌下免疫療法の作用機序として，Th1/Th2 ratioが増大すること，IL-10を産生する制御性T/B細胞が増加すること，抗原特異的IgG4抗体が産生され阻止抗体として作用することが考えられる<sup>10)~15)</sup>。そこで，最初に抗原刺激による末梢血単核球からのサイトカイン産生について，2型サイトカインのIL-5，1型サイトカインのIFN- $\gamma$ ，3型サイトカインのIL-17，制御系サイトカインのIL-10について検討した。

スギ花粉舌下免疫療法を1~2年間行った，スギ・ヒノキ花粉症患者と，舌下免疫療法を受けていないスギ・ヒノキ花粉症患者，健康人の血液を花粉非飛散期に採取した。末梢血単核球を分離培養し，Cry j 1, Cha o 1, Cha o 3 (いずれも10  $\mu$ g/ml)で5日間刺激して培養上清中のサイトカイン濃度をELISA法で測定した。

スギ・ヒノキ花粉症患者では，Cry j 1, Cha o 1, Cha o 3刺激によるIL-5産生が増加したが，舌下免疫療法患者はいずれの刺激によるIL-5産生も抑制された。IL-17やIFN- $\gamma$ 産生はスギ・ヒノキ花粉症患者で健康人と差を認めないが，舌下免疫療法患者はいずれの刺激に対するIL-17, IFN- $\gamma$ 産生も抑制された。

一方，舌下免疫療法患者ではCry j 1刺激によ

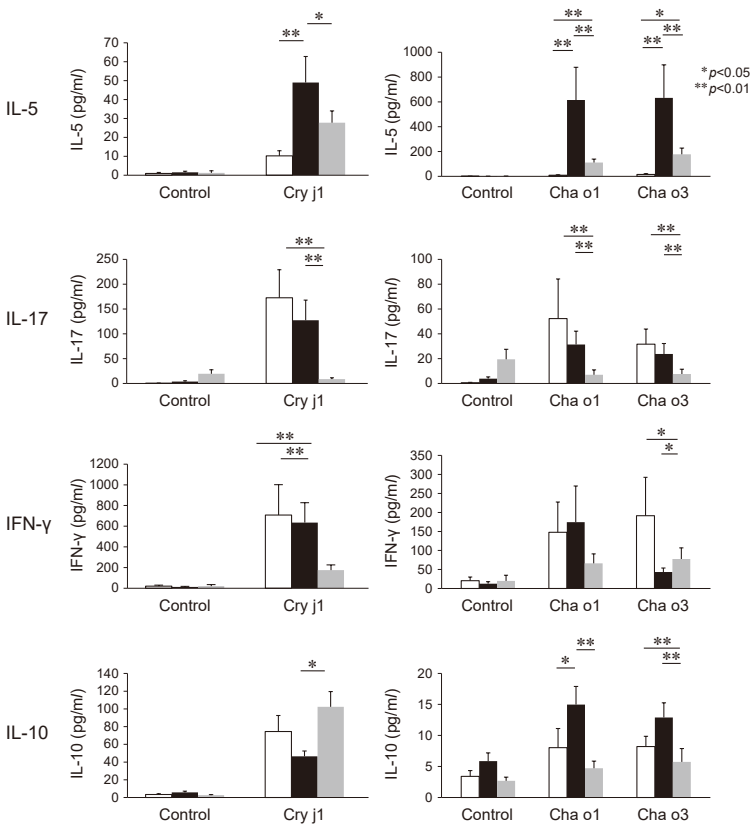


図4 Cry j 1, Cha o 1, Cha o 3 刺激 (10 μg/ml, 5日間) による末梢血単核球からの IL-5, IL-17, IFN-γ, IL-10 産生<sup>16)</sup>

健康人 (白), スギ・ヒノキ花粉症患者 (黒), 舌下免疫療法患者 (灰色)

る IL-10 産生が増加したが, Cha o 1, Cha o 3 刺激による IL-10 産生は減少した (図 4). Cry j 1 刺激による IL-10/IL-5 値は, スギ花粉飛散期の VAS スコアによる臨床症状と負の相関を認めた<sup>16)</sup> (図 5).

つまり, 舌下免疫療法患者では Cry j 1, Cha o 1, Cha o 3 刺激による IL-5 産生が抑制されたが, IL-17 や IFN-γ 産生もすべて抑制された. また, Cha o 1, Cha o 3 刺激による IL-10 産生も抑制された. このことには制御性 T 細胞などを介した, Th 細胞に対する非特異的な免疫抑制作用の存在が考えられる. 一方, Cry j 1 抗原特異的に IL-10 産生が認められ, 舌下免疫療法後には抗原特異的に制御性 T/B 細胞が誘導され IL-10 産生が生じると考えられる. Cha o 1, Cha o 3 における交差反応性は認められず, 非特異的な免疫抑制反応による IL-5 の産生低下と, Cry j 1 特異的な IL-10 産生が臨床症状と相関し, 舌下免疫療法の有効性にかかわっていた.

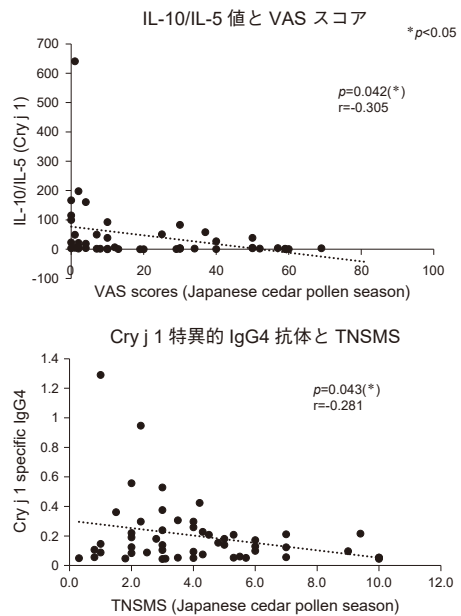


図5 Cry j 1 刺激による末梢血単核球から産生された IL-10/IL-5 値と Cry j 1 特異的血清 IgG4 抗体値と, スギ花粉飛散期の臨床症状 (VAS スコア, total nasal symptom medication score) との相関<sup>16)</sup>

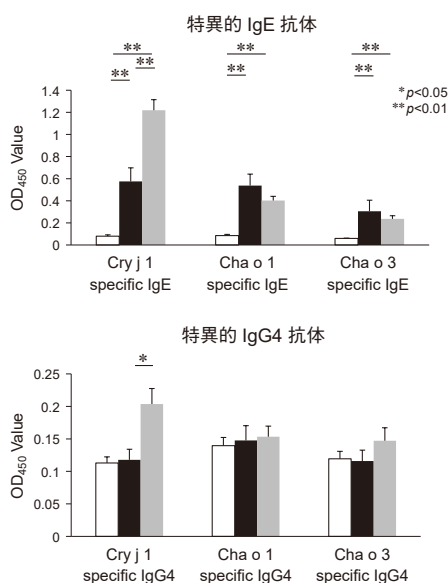


図6 血清中の抗原特異的IgE, IgG4抗体<sup>16)</sup>

健康人(白), スギ・ヒノキ花粉症患者(黒), 舌下免疫療法患者(灰色)

## ②抗原特異的IgE, IgG4抗体

次に、血清中の抗原特異的IgE, IgG4抗体についてELISA法で測定した。スギ・ヒノキ花粉症患者ではCry j 1, Cha o 1, Cha o 3特異的IgE抗体がいずれも上昇しているが、舌下免疫療法患者ではCry j 1特異的IgE抗体と、Cry j 1特異的IgG4抗体が増加し、Cha o 1, Cha o 3特異的IgE, IgG4抗体には変化を認めなかった(図6)。血清中のCry j 1特異的IgG4抗体値は、スギ花粉飛散期のVASスコアによる臨床症状と負の相関を認めた(図5)<sup>16)</sup>。つまり、舌下免疫療法後にはCry j 1特異的なIgE, IgG4抗体が産生され、Cha o 1, Cha o 3との交差反応性は乏しく、Cry j 1特異的IgG4抗体値が臨床症状と相関し、舌下免疫療法の有効性にかかわっている。

## 2) DCP マイクロアレイを利用して測定したスギ・ヒノキ花粉抗原特異的免疫グロブリンの経年的変化

舌下免疫療法によって血清中の抗原特異的IgE抗体は一旦増加し、長期的に徐々に減少することが知られている<sup>17)</sup>。一方、阻止抗体である抗原特異的IgG4抗体を含むIgG抗体や、抗原特異的

IgA抗体は徐々に増加する<sup>18)~20)</sup>。われわれは、スギ花粉舌下免疫療法を行った同一患者から治療前後に採血し、高感度の測定が可能なDCPマイクロアレイを利用して、血清中のスギ花粉特異的免疫グロブリンの経年的変化について検討するとともに、ヒノキ花粉特異的免疫グロブリンとダニ特異的免疫グロブリンを測定して、交差反応性の有無について検討した。

### ① DCP マイクロアレイ

徳島大学の木戸博教授が開発したDCPマイクロアレイを使用して、血清中の抗原特異的免疫グロブリンを測定した。DCPマイクロアレイは、抗原蛋白が共有結合で高密度に固定化されたDCP(densely carboxylated protein)チップを利用し、抗原を固着させたプレートに測定対象の血清を加えて、抗原に結合した特異的抗体を発色させてその蛍光強度を測定する。高感度の測定が可能ならぬに、測定に必要な血清量は20~100μlと少なく、最大36種類の抗原に対する特異的抗体の測定が可能である<sup>21)~23)</sup>。

### ②スギ花粉抗原特異的免疫グロブリンの変化

スギ花粉舌下免疫療法を施行したスギ花粉症患者60例を対象に、舌下免疫療法前、舌下免疫療法後1年、2年、3年の同一患者血清を用いて、スギ粗抗原特異的IgE, IgA, IgG1, IgG4抗体と、Cry j 1, Cry j 2特異的IgE抗体、ダニ粗抗原特異的IgE抗体について経年的に検討した。

スギ粗抗原特異的IgE抗体は治療1年後に一旦増加するが、2年後、3年後には著明に減少した。同様に、スギ花粉の主要なアレルゲンコンポーネントであるCry j 1とCry j 2に対する特異的IgE抗体も1年後には一旦増加するが、2年後、3年後には減少した。ダニ粗抗原特異的IgE抗体には変化を認めなかった。

スギ粗抗原特異的IgA, IgG1, IgG4抗体は1年後、2年後、3年後と経年的に増加した(図7)。抗原特異的IgE抗体の減少(2~3年後)と抗原特異的IgA, IgG1, IgG4抗体の経年的増加が舌下免疫療法の有効性にかかわると考えられる。

### ③ヒノキ花粉抗原特異的免疫グロブリンの変化

次に、スギ花粉舌下免疫療法を施行した、ヒノ

キ花粉症を合併するスギ花粉症患者 56 例を対象に、舌下免疫療法前、舌下免疫療法後 1 年、2 年、3 年の同一患者血清を用いて、ヒノキ粗抗原特異的 IgE、IgA、IgG1、IgG4 抗体と、Cha o 1、Cha o 3 特異的 IgE 抗体、ダニ粗抗原特異的 IgE 抗体について経年的に検討した。

スギ花粉舌下免疫療法にもかかわらず、ヒノキ

粗抗原特異的 IgE 抗体は治療 1 年後に有意な増加は認められないが、2 年後、3 年後には減少した。ヒノキ花粉の主要なアレルゲンコンポーネントである Cha o 1 特異的 IgE 抗体も 2 年後、3 年後に減少したが、Cha o 3 特異的 IgE 抗体には変化を認めず、ダニ粗抗原特異的 IgE 抗体も変化を認めなかった。このことから Cry j 1 との相関性が高い

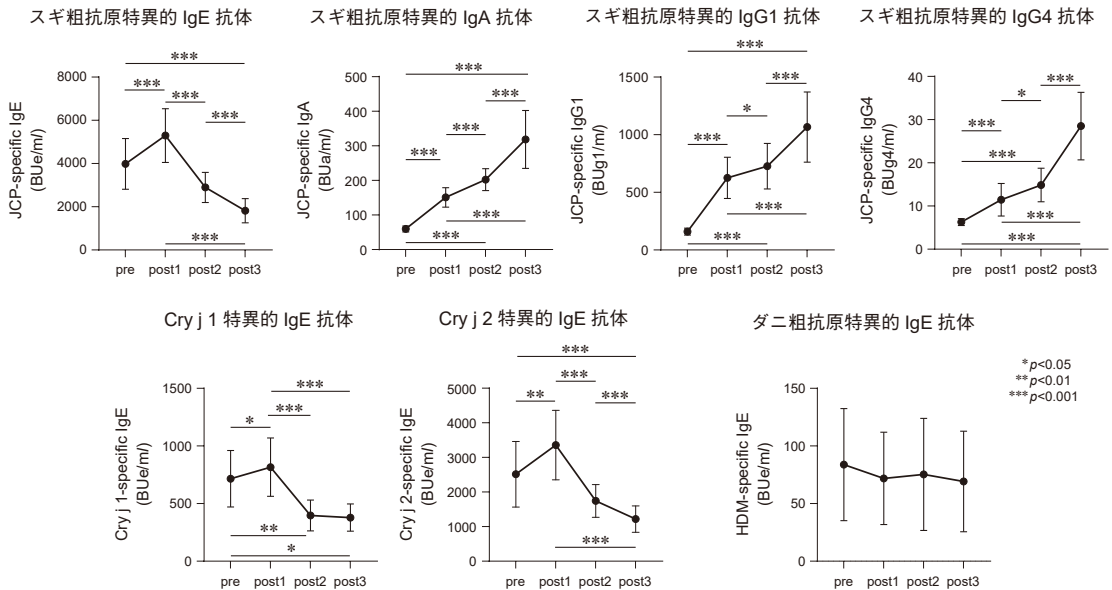


図7 スギ花粉舌下免疫療法前と治療後 1 年、2 年、3 年の同一患者血清における、スギ粗抗原特異的 IgE、IgA、IgG1、IgG4 抗体と、Cry j 1、Cry j 2 特異的 IgE 抗体、ダニ粗抗原特異的 IgE 抗体の変化

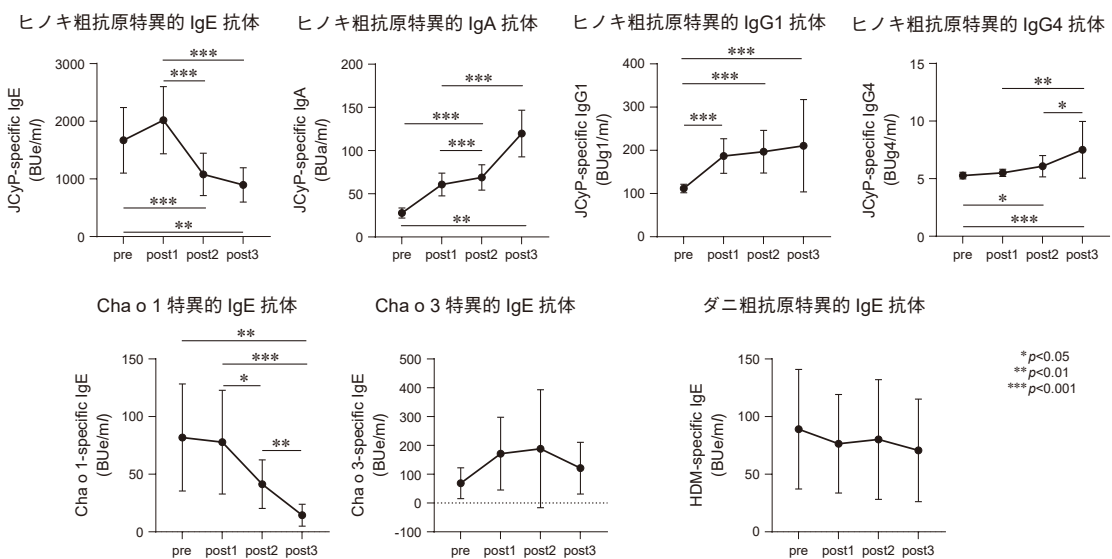


図8 スギ花粉舌下免疫療法前と治療後 1 年、2 年、3 年の同一患者血清における、ヒノキ粗抗原特異的 IgE、IgA、IgG1、IgG4 抗体と、Cha o 1、Cha o 3 特異的 IgE 抗体、ダニ粗抗原特異的 IgE 抗体の変化

Cha o 1 との交差反応性を有する IgE 抗体の存在が示唆される。一方、スギ花粉では Cha o 3 に対応する Cry j 4 の含有量が少ないためか、Cha o 3 との交差反応性は認められなかった。

ヒノキ粗抗原特異的 IgA 抗体は 1 年後、2 年後、3 年後と経年的に増加し、ヒノキ粗抗原特異的 IgG1、IgG4 抗体も同様に増加したが、スギ粗抗

原特異的抗体に比べると増加率が乏しかった (図 8)。

以上の結果、スギ花粉舌下免疫療法は、Cry j 1 と Cha o 1 など相同性の高いアレルゲンコンポーネントに対する交差反応性により、ヒノキ花粉症にもある程度の効果が得られている可能性が考えられる。

## まとめ

**疑問：スギ花粉舌下免疫療法はヒノキ花粉症に免疫学的効果が期待できるか？**

**答え：スギ花粉舌下免疫療法は、臨床的にヒノキ花粉症にもある程度の効果が期待できるが、不十分である。ヒノキ花粉症に対する免疫学的効果は、①抗原刺激による末梢血単核球からの IL-5、IFN- $\gamma$ 、IL-17 産生抑制など非特異的な免疫抑制効果が得られる部分と、②抗原刺激による IL-10 産生などスギ花粉抗原特異的な免疫学的効果が認められる部分、③抗原特異的免疫グロブリンなど、Cry j 1 と Cha o 1 などの相同性の高いアレルゲンコンポーネントによる交差反応性がある程度存在する部分が混在している。ヒノキ花粉症に十分な臨床効果を得るためには、ヒノキ抗原を含んだ舌下免疫療法の開発が望まれる。**

## 文献

1. Suzuki M, Komiya N, Itoh M, et al. Purification, characterization and molecular cloning of Cha o 1, a major allergen of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. *Mol Immunol* 1996;33:451-460.
2. Mori T, Yokoyama M, Komiya N, et al. Purification, identification, and cDNA cloning of Cha o 2, the second major allergen of Japanese cypress pollen. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:166-171.
3. Sone T, Dairiki K, Morikubo K, et al. Identification of human T cell epitopes in Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1, elucidates the intrinsic mechanism of cross-allergenicity between Cha o 1 and Cry j 1, the major allergen of Japanese cedar pollen, at the T cell level. *Clin Exp Allergy* 2005;35:664-671.
4. Sone T, Dairiki K, Morikubo K, et al. Recognition of T cell epitopes unique to Cha o 2, the major allergen in Japanese cypress pollen, in allergic patients cross-reactive to Japanese cedar and Japanese cypress pollen. *Allergol Int* 2009;58:237-245.
5. Yasueda H, Saito A, Sakaguchi M, et al. Identification and characterization of a group 2 conifer pollen allergen from *Chamaecyparis obtusa*, a homologue of Cry j 2 from *Cryptomeria japonica*. *Clin Exp Allergy* 2000;30:546-550.
6. Ito H, Nishimura J, Suzuki M, et al. Specific IgE to Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) in patients with nasal allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74:299-303.
7. Osada T, Harada T, Asaka N, et al. Identification and gene cloning of a new major allergen Cha o 3 from *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:911-913.e917.
8. Osada T, Tanaka Y, Yamada A, et al. Identification of Cha o 3 homolog Cry j 4 from *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) pollen: limitation of the present Japanese cedar-specific ASIT. *Allergol Int* 2018;67:467-474.
9. 湯田厚司, 小川由起子, 荻原仁美, 他. スギ花粉舌下免疫療法でのヒノキ花粉飛散期の臨床効果. *日耳鼻* 2017;120:833-840.
10. Nomura T, Suzuki M, Yokota M, et al. Effect of Japanese cedar-specific sublingual immunotherapy on allergen-specific TH2 cell counts in blood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016;117:72-78.e74.
11. Sakurai D, Yonekura S, Iinuma T, et al. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: subjective versus objective tools to evaluate its success. *Rhinology*

- 2016;54:221-230.
12. Fujimura T, Yonekura S, Taniguchi Y, et al. The induced regulatory T cell level, defined as the proportion of IL-10(+)Foxp3(+) cells among CD25(+)CD4(+) leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy: a preliminary report. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153:378-387.
  13. Yamanaka K, Yuta A, Kakeda M, et al. SLIT improves cedar pollinosis by restoring IL-10 production from Tr1 and Monocytes~IL-10 productivity is critical for becoming allergic~. *Allergol Int* 2011;60:45-51.
  14. Yamanaka K, Shah SA, Sakaida H, et al. Immunological parameters in prophylactic sublingual immunotherapy in asymptomatic subjects sensitized to Japanese cedar pollen. *Allergol Int* 2015;64:54-59.
  15. Boonpiyathad T, van de Veen W, Wirz O, et al. Role of Der p 1-specific B cells in immune tolerance during 2 years of house dust mite-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:1077-1086.e1010.
  16. **Kikuoka H, Kouzaki H, Matsumoto K, et al. Immunological effects of sublingual immunotherapy with Japanese cedar pollen extract in patients with combined Japanese cedar and Japanese cypress pollinosis. *Clin Immunol* 2020;210:108310.**
  17. Aasbjerg K, Backer V, Lund G, et al. Immunological comparison of allergen immunotherapy tablet treatment and subcutaneous immunotherapy against grass allergy. *Clin Exp Allergy* 2014;44:417-428.
  18. Suárez-Fueyo A, Ramos T, Galán A, et al. Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:130-138. e131-132.
  19. Scadding GW, Calderon MA, Shamji MH, et al. Effect of 2 years of treatment with sublingual grass pollen immunotherapy on nasal response to allergen challenge at 3 years among patients with moderate to severe seasonal allergic rhinitis: The GRASS Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2017;317:615-625.
  20. Shamji MH, Larson D, Eifan A, et al. Differential induction of allergen-specific IgA responses following timothy grass subcutaneous and sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2021;148:1061-1071. e1011.
  21. Kamemura N, Tada H, Shimojo N, et al. Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:113-121.e112.
  22. Suzuki K, Hiyoshi M, Tada H, et al. Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins. *Anal Chim Acta* 2011;706:321-327.
  23. 木戸博, 杉本真. クラススイッチを基盤に免疫応答をモニターする高性能タンパクチップの臨床応用. *アレルギー* 2016;65:764-769.

## IV 舌下免疫療法後に一時的に抗原特異的 IgE 抗体が増加しても治療効果が得られるのは何故か？

### —特異的 IgE 抗体の抗原親和性 (avidity) の変化について—

#### 1. 抗原親和性 (avidity) とは何か？

抗体は抗原と結合する可変領域と抗体の機能を定める定常領域で構成され、抗体と抗原が結合する際の抗体側の結合部位をパラトープ、抗原側の結合部位をエピトープという。パラトープとエピトープの結合力がアフィニティ (affinity) で、抗体は2か所以上の抗原結合部位を有し、この結合力の総和が抗原親和性 (アビディティ: avidity) である<sup>1)</sup>。抗原親和性はリンパ節の胚中心で成熟し、繰り返す抗原刺激による抗体のクラススイッチと可変領域の体細胞高頻度突然変異 (SHM: somatic hypermutation) によって高まる<sup>2)</sup>。

抗原特異的 IgE 抗体は、抗原親和性の違いから高親和性の抗体と低親和性の抗体があり<sup>3)</sup>、低親和性の抗原特異的 IgE 抗体は IgM<sup>+</sup>B 細胞から直接クラススイッチした B 細胞から産生され、高親和性の抗原特異的 IgE 抗体は IgM<sup>+</sup>B 細胞から IgG3 産生 B 細胞、IgG1 産生 B 細胞を経てクラススイッチした B 細胞から産生される<sup>4)</sup>。クラススイッチする間に体細胞高頻度突然変異が生じて抗原親和性が高まる。

抗原親和性の成熟とクラススイッチに重要なのが濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞で、Tfh 細胞は二次リンパ組織中で胚中心を構成し、B 細胞との相互作用で抗原親和性の異なる抗原特異的 IgE 抗体の産生にかかわる。Tfh 細胞分画のうち、抗原親和性の成熟にかかわるのが Tfh2 細胞と Tfh13 細胞で、Tfh2 細胞は IL-4 を産生し、低親和性の抗原特異的 IgE 抗体にクラススイッチした B 細胞を誘導し、Tfh13 細胞は IL-4 と IL-13 を産生し、高親和性の抗原特異的 IgE 抗体にクラススイッチした B 細胞を誘導する<sup>3)</sup>。ピーナツアレルギー患者では、健常人に比べて末梢血中の Tfh 細胞に占

める Tfh13 細胞の割合が高いことや、吸入抗原に感作されていると Tfh13 細胞の割合が高いことが報告されている<sup>5)</sup>。

マウスの耳介に抗原特異的 IgE 抗体を含む血清を皮下注射し、抗原を静注すると、高親和性の抗原特異的 IgE 抗体では局所的なアナフィラキシー反応が誘発されるが、低親和性の抗原特異的 IgE 抗体では誘発されない。さらに、高親和性抗体と低親和性抗体を混ぜて皮下注射するとアナフィラキシー反応が抑制されるが、高親和性 IgE 抗体と抗原特異的 IgG1 抗体や IgM 抗体を混ぜても抑制できない。つまり、低親和性の IgE 抗体が、高親和性の IgE 抗体の、マスト細胞上の受容体 (FcεRI) との結合を競合し、I 型アレルギー反応が抑制されると考えられる<sup>6)</sup>。また、食物アレルギーに関連して、生後6か月の乳児の血液中の OVA (ovalbumin) 特異的 IgG1 抗体が少なく、高親和性の OVA 特異的 IgE 抗体が多いと湿疹の有病率が高い (84.6%) のに対して、OVA 特異的 IgG1 抗体が多く、低親和性の OVA 特異的 IgE 抗体も多いと、湿疹の有病率が低い (42.2%) と報告されている<sup>7)</sup>。

このように、抗原特異的 IgE 抗体の抗原親和性 (avidity) と病態との関連については、食物アレルギーの分野で知見が得られ始めているが、アレルギー性鼻炎では全く検討されていない。われわれは、

**「舌下免疫療法後に一時的に抗原特異的 IgE 抗体が増加しても臨床症状が改善するのは、低親和性の抗原特異的 IgE 抗体が産生されるため？」**

ではないかと考え、舌下免疫療法後の抗原親和性の変化について検討した。

## 2. 舌下免疫療法後の抗原特異的 IgE 抗体の抗原親和性 (avidity) の変化

### 1) 抗原親和性 (avidity) の測定

抗原親和性の測定は、徳島大学の先端酵素学研究所の木戸博教授が開発した DCP マイクロアレイ法 (図1) を利用して行った。抗原特異的 IgE 抗体の測定は、抗原を固着させたプレートに患者血清を加え、抗原と結合した IgE 抗体を発色させて測定する。抗原親和性については、血清にあらかじめ抗原を添加して測定すると、高親和性抗体が多い場合は加えた抗原に抗体が吸着されやすいため、少ない抗原量の添加で反応が阻害されるが、低親和性抗体が多いと反応を阻害するために多くの抗原量が必要になる。そこで、阻害率が50%となる抗原濃度を IC<sub>50</sub> (inhibition concentration)

として抗原親和性の指標とした。したがって、抗原特異的 IgE 抗体の抗原親和性が低くなるほど、IC<sub>50</sub> (抗原濃度) は高値を示す<sup>8)</sup>。

### 2) スギ花粉舌下免疫療法後の抗原親和性の变化と Tfh 細胞分画の変化

スギ花粉舌下免疫療法を施行した60例を対象に、舌下免疫療法前、舌下免疫療法後1年、2年、3年の同一患者血清を用いて、スギ花粉粗抗原とスギ花粉の主要なアレルゲンコンポーネントである Cry j 1, Cry j 2 に対する抗原特異的 IgE 抗体量と、その抗原親和性を測定した (図2)。スギ花粉粗抗原に対する抗原特異的 IgE 抗体は、舌下免疫療法1年後には一旦上昇するが、2年後、3年後には徐々に減少した。

Cry j 1, Cry j 2 に対する抗原特異的 IgE 抗体も

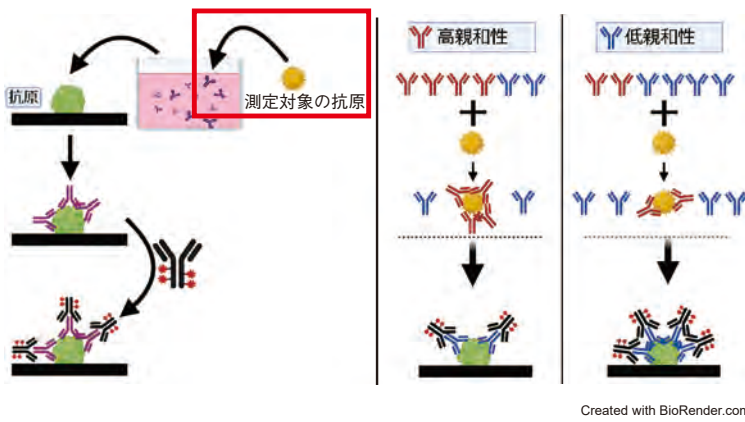


図1 抗原特異的 IgE 抗体の抗原親和性 (avidity) の測定

抗原特異的 IgE 抗体を含む血清にあらかじめ抗原を加えて抗体を吸着させ、阻害率が50%となる抗原濃度を IC<sub>50</sub> として表示した。低親和性抗体は反応の阻害に多くの抗原を必要とするため、IC<sub>50</sub> が高値を示す。

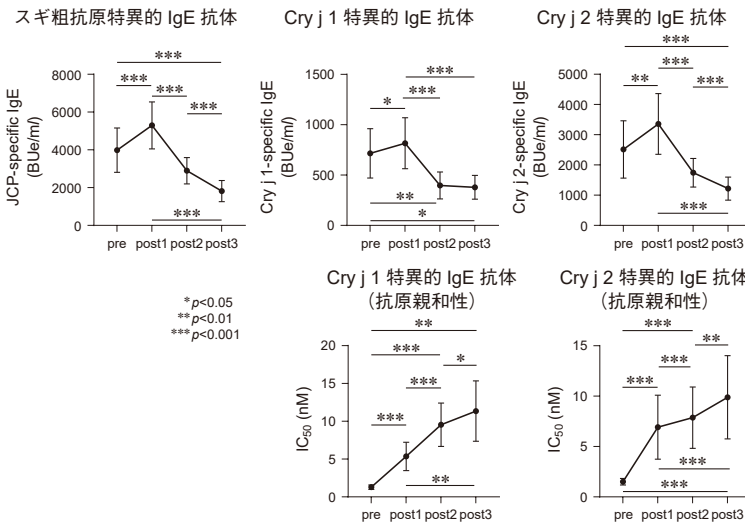
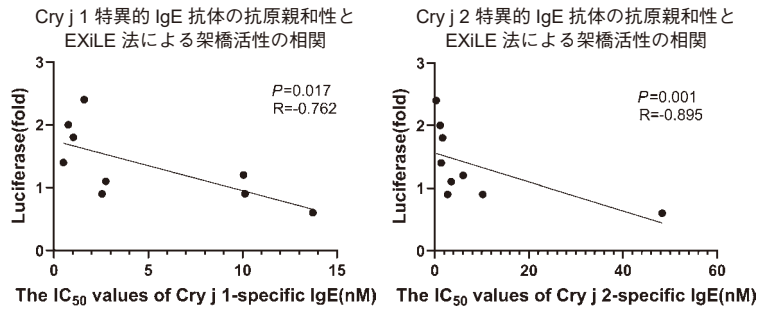


図2 スギ花粉舌下免疫療法1年、2年、3年後の同一患者における、血清中のスギ粗抗原特異的 IgE 抗体の変化と、Cry j 1 および Cry j 2 特異的 IgE 抗体とその抗原親和性の変化



図3 スギ花粉舌下免疫療法1年後の、Cry j 1あるいはCry j 2特異的IgE抗体の抗原親和性の低下は、EXiLE法による抗原と特異的IgE抗体の架橋活性の低下と相関していた。



同様に、舌下免疫療法1年後には一旦上昇し、2年後、3年後には徐々に減少した。しかしながら、Cry j 1あるいはCry j 2特異的IgE抗体の抗原親和性は、舌下免疫療法1年後には低下し（IC<sub>50</sub>が上昇）、2年後、3年後にはさらに低下して、抗原親和性が低下したIgE抗体に置き換わっていた（図2）。一方、同一患者でダニのアレルゲンコンポーネントであるDer f 1やDer f 2特異的IgE抗体値やその抗原親和性は、スギ花粉舌下免疫療法後に変動を示さなかった。

血清中には抗原特異的IgAやIgG4抗体なども含まれるため、添加した抗原がこうした抗体に吸着される可能性があり、抗原親和性の低下が低親和性抗体の増加によるものか他の抗体の競合阻害によるものか判断できない。そこで、抗原特異的IgE抗体の架橋活性をEXiLE法で測定し、測定した抗原親和性との関連を検討した。EXiLEとはIgE Cross-induced Luciferase Expressionの略で、ヒトFcεRI（IgE抗体受容体）を発現させたラットマスト細胞に、転写因子NF-AT（nuclear factor of activated T cells）の活性化依存的にルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を組み込んだ細胞株（RS-ATL8）を用いる。希釈した患者血清で感作させた後、洗浄して抗原を加えると、マスト細胞に結合した抗原特異的IgE抗体と架橋してルシフェラーゼが発現し、架橋活性を定量できる<sup>9)</sup>。血清中に存在する抗原特異的IgAやIgG4抗体は洗浄で除去され、抗原特異的IgE抗体の架橋活性だけを評価できる。

舌下免疫療法1年後でスギ粗抗原特異的IgE抗体が5,500～8,000 BUe/mlであった患者血清を用いて、EXiLE法で架橋活性を測定した。Cry j 1特異的IgE抗体あるいはCry j 2特異的IgE抗体

の抗原親和性と、その架橋活性には強い相関を認め、抗原親和性が低くなるほど架橋活性が低下した（図3）。つまり、舌下免疫療法1年後に測定されるCry j 1あるいはCry j 2特異的IgE抗体の抗原親和性の低下は、抗原と抗原特異的IgE抗体の架橋活性の低下を反映し、架橋活性が減弱し抗原親和性が低い抗原特異的IgE抗体が産生されていることを示している。

次に、スギ花粉舌下免疫療法を施行した14例を対象に、舌下免疫療法前、舌下免疫療法後1年、2年の同一患者の末梢血単核球を、スギ花粉抽出抗原で刺激し、フローサイトメトリーでTfh細胞分画の変化を検討した。CD4陽性T細胞のうちCXCR5陽性、CD45RA陰性の細胞集団が循環型Tfh細胞で、このうちIL-4陽性、IL-13陰性がTfh2細胞、IL-4陽性、IL-13陽性がTfh13細胞である。Tfh2細胞の割合は治療前後で変化を認めなかったが、Tfh13細胞は治療前と比較して2年後には減少した（図4）。スギ花粉舌下免疫療法後には、Tfh13細胞が減少し、抗原親和性が低く、架橋活性が減弱したIgE抗体が産生され、マスト細胞からの脱顆粒が抑制されることが、臨床効果につながると考えられる。

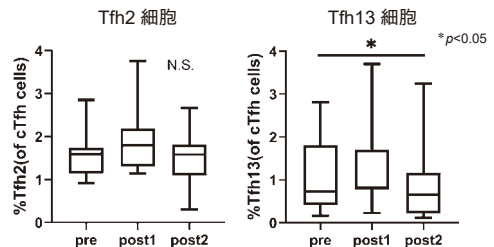


図4 スギ花粉舌下免疫療法1年、2年後の循環型Tfh細胞における、Tfh2細胞とTfh13細胞の割合の変化

### 3) ダニ舌下免疫療法後の抗原親和性の変化と臨床効果

ダニ舌下免疫療法を施行した43例を対象に、舌下免疫療法前、舌下免疫療法後1年、2年の同一患者血清を用いて、ダニの主要なアレルゲンコンポーネントであるDer f 1, Der f 2に対する抗原特異的IgE抗体量とその抗原親和性の変化を測定した。

Der f 1, Der f 2に対する抗原特異的IgE抗体は、舌下免疫療法1年後には一旦上昇し、2年後には減少した。しかしながら、Der f 1あるいはDer f 2特異的IgE抗体の抗原親和性は、舌下免疫療法1年後には低下し（ $IC_{50}$ が上昇）、抗原親和性が低下したIgE抗体が産生されていた（図5）。

次に、舌下免疫療法1年後のDer f 1, Der f 2に対する抗原特異的IgE抗体の抗原親和性とFace Scaleによる臨床症状スコアとの関連を検討した。Face Scaleは症状なしが0点、非常に重いのが4点の5段階で評価した。治療後1年のDer f 1あるいはDer f 2特異的IgE抗体の抗原親和性とFace Scaleの間には相関を認め、抗原親和性が低い（ $IC_{50}$ が高い）ほどFace Scaleが低く、臨床症状が改善していた（図6）。

ダニ舌下免疫療法1年後には、血清中のDer f 1, Der f 2特異的IgE抗体が一旦上昇するが、抗原親

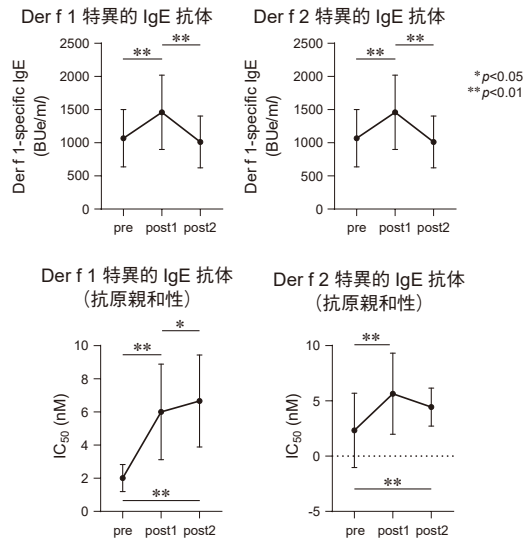


図5 ダニ舌下免疫療法1年、2年後の同一患者における、血清中のDer f 1およびDer f 2特異的IgE抗体とその抗原親和性の変化

和性が低いIgE抗体が産生され、抗原親和性の低下とFace Scaleによる臨床症状の間に相関を認めた。舌下免疫療法後に抗原特異的IgE抗体は一旦上昇するが、抗原親和性が低下したIgE抗体が産生されるため、マスト細胞からの脱顆粒が抑制されて臨床症状が改善すると考えられた。

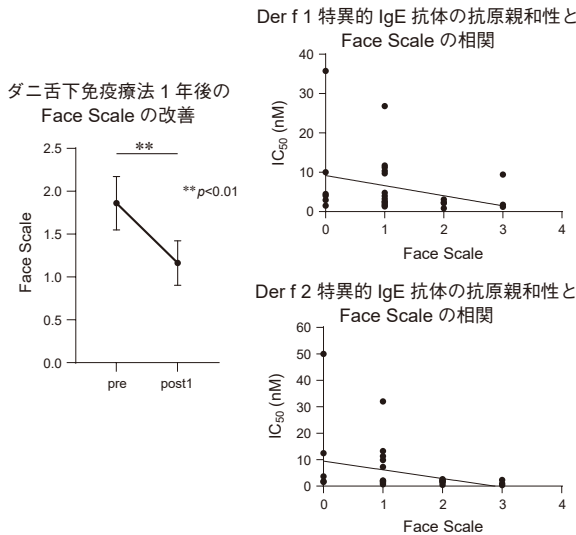


図6 ダニ舌下免疫療法1年後のFace Scaleの改善と、Der f 1, Der f 2特異的IgE抗体の抗原親和性の低下（ $IC_{50}$ の上昇）とFace Scaleの相関

## まとめ

**疑問：舌下免疫療法後に一時的に抗原特異的 IgE 抗体が増加しても治療効果が得られるのは何故か？**

**答え：抗原特異的 IgE 抗体は抗原親和性（Avidity）に違いがあり，低親和性の抗体と高親和性の抗体が存在する．舌下免疫療法後には一旦血清中の抗原特異的 IgE 抗体が上昇するが，Tfh13 細胞が減少して，抗原親和性が低く，架橋活性が減弱した IgE 抗体が産生されるため，マスト細胞からの脱顆粒が抑制されて臨床効果が得られる．**

## 文献

1. Sato M, Yamamoto-Hanada K, Tada H, et al. Diagnostic performance of IgE avidity for hen's egg allergy in young infants. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020;8:2417-2420.e6.
2. Collins AM, Jackson KJ. A temporal model of human IgE and IgG antibody function. *Front Immunol* 2013;4:235.
3. Xie MM, Dent AL. Interleukin-13 is unlucky for allergy sufferers. *Trends Pharmacol Sci* 2019;40:714-716.
4. Looney TJ, Lee JY, Roskin KM, et al. Human B-cell isotype switching origins of IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:579-586.e7.
5. Gowthaman U, Chen JS, Zhang B, et al. Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science* 2019;365.
6. Xiong H, Dolpady J, Wabl M, et al. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J Exp Med* 2012;209:353-364.
7. Irahara M, Shinahara W, Sugimoto M, et al. Trajectories of class-switching-related egg and cow's milk allergen-specific immunoglobulin isotype formation and its modification by eczema with low- and high-affinity immunoglobulin E during early infancy. *Immun Inflamm Dis* 2019;7:74-85.
8. Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, et al. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:904-905.e6.
9. Nakamura R, Ishiwatari A, Higuchi M, et al. Evaluation of the luciferase assay-based in vitro elicitation test for serum IgE. *Allergol Int* 2012;61:431-437.

# V 舌下免疫療法後に長期間効果が持続するのは何故か？ —治療効果を反映したメモリー T 細胞の機能変化—

## 1. メモリー T 細胞の役割

アレルギー性鼻炎患者が自然寛解に至らない理由として、長期生存するメモリー T 細胞の役割が注目される。ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞は抗原刺激によって活性化されてエフェクター CD4<sup>+</sup>T 細胞に分化・増殖する。抗原が排除されると大部分はアポトーシスを生じるが、一部が抗原特異的メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞として長期にわたり生存する。再度の抗原刺激によって、メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞は再活性化しエフェクター CD4<sup>+</sup>T 細胞として増殖する<sup>1)</sup>。

末梢血中のメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞には、2 型免疫応答を引き起こす細胞として、メモリー 2 型ヘルパー T (Th2 : type 2 T helper) 細胞と 2 型濾胞性ヘルパー T (Tfh2 : type 2 follicular T helper) 細胞が存在する。抗原特異的なメモリー Th2 細胞および Tfh2 細胞は、特定の抗原に曝露されると直ちに活性化される。メモリー Th2 細胞は、2 型サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) を産生し、好酸球性炎症と IgE 抗体産生を活性化する<sup>2)~4)</sup>。スギ花粉症患者では抗原刺激により末梢血中のメモリー Th2 細胞が増加することや、ダニの免疫療法後にはメモリー Th2 細胞が減少することが確認されている<sup>5,6)</sup>。メモリー Tfh2 細胞は IL-4 を産生し、B 細胞における IgE へのクラススイッチと形質細胞への分化を促進する<sup>7)</sup>。ダニアレルギー性鼻炎患者では末梢血中の Tfh2 細胞が増加し、ダニの免疫療法後にダニ抗原特異的 IL-4<sup>+</sup>Tfh2 細胞が減少することが確認されている<sup>8,9)</sup>。

アレルゲン特異的免疫療法として、我が国ではスギ花粉舌下免疫療法が 2014 年 10 月から保険診療が開始された。3~5 年と長期の治療期間が推奨されるが、十分な症状改善効果が期待でき、治療終了後も長期間にわたって臨床効果が持続す

る<sup>10)~12)</sup>。

舌下免疫療法の作用機序として、2 型炎症の抑制、制御性 T 細胞および制御性 B 細胞の誘導、B 細胞からの抗原特異的 IgE 抗体産生の抑制および IgG4 抗体産生の誘導などがあげられる<sup>13)</sup> が、長期寛解にかかわるメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞に対する作用は解明されていない。

われわれは、

**「舌下免疫療法後の長期寛解には、メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞の機能変化がかかわる」**  
と考え、その作用機序を検討した。

## 2. メモリー T 細胞のアポトーシス

### 1) DNA マイクロアレイによるメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞の網羅的遺伝子解析

われわれは、スギ花粉舌下免疫療法が奏効した患者では、メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞に何らかの機能変化が生じていると考え、DNA マイクロアレイを利用して<sup>14)</sup>、遺伝子発現の変化を検討した。スギ花粉症患者およびスギ花粉舌下免疫療法が奏効した患者 (奏効群) と無効であった患者 (無効群) の、末梢血単核球からメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し、DNA マイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。スギ花粉症患者や無効群と比較して、舌下免疫療法奏効群ではアポトーシス抑制遺伝子である DPF2 (D4, zinc, and double plant homeodomain fingers family 2) の発現が低下していた<sup>15)</sup> (図 1)。つまり、舌下免疫療法奏効群では、メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスが促進されている可能性が考えられる。

### 2) RT-PCR 法によるメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシス関連遺伝子発現

次に、スギ花粉舌下免疫療法が奏効した同一患



スギ花粉症－SLIT 奏功例      SLIT 無効例－SLIT 奏功例

図1 メモリー CD4<sup>+</sup> T 細胞における遺伝子発現のマイクロアレイ解析<sup>15)</sup>

舌下免疫療法 (SLIT) 奏功例で DPF2 の発現が低下していた。

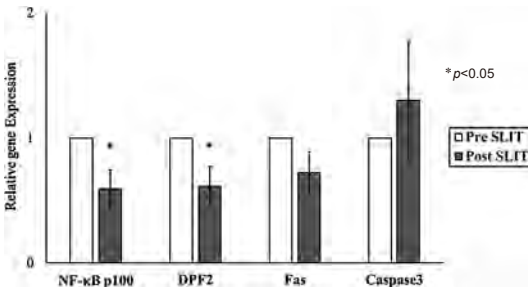


図2 メモリー CD4<sup>+</sup> T 細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現<sup>15)</sup>

者の治療前および治療 1 年後の末梢血単核球からメモリー CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し、アポトーシス関連遺伝子について、アポトーシスを促進する Caspase 3 と Fas、アポトーシスを抑制する NF-κB p100 と DPF2 の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した。Caspase 3 と Fas の mRNA 発現には変化を認めなかったが、NF-κB p100 と DPF2 の mRNA 発現は治療 1 年後には有意に減少した<sup>15)</sup> (図 2)。以上より、舌下免疫療法は NF-κB p100 と DPF2 の発現低下を介して、メモリー CD4<sup>+</sup> T 細胞のアポトーシスを促進すると考えられる。

ちなみに、DPF2 は、ジンクフィンガー様構造モチーフを特徴とする d-4 ドメインファミリーの 1 つで、NF-κB 非古典的シグナル経路の抗アポトーシス遺伝子である。NF-κB は、免疫反応、炎症、細胞の増殖と生存、発生など、さまざま生物学的プロセスに関与する転写因子ファミリーを形成する<sup>16)</sup>。NF-κB ファミリーは、NF-κB1 (p50)、NF-κB2 (p52)、RelA (p65)、RelB および c-Rel を含み、通常 NF-κB は inhibitor of B (IB) と結合した非活性細胞質複合体として存在する<sup>17, 18)</sup>。

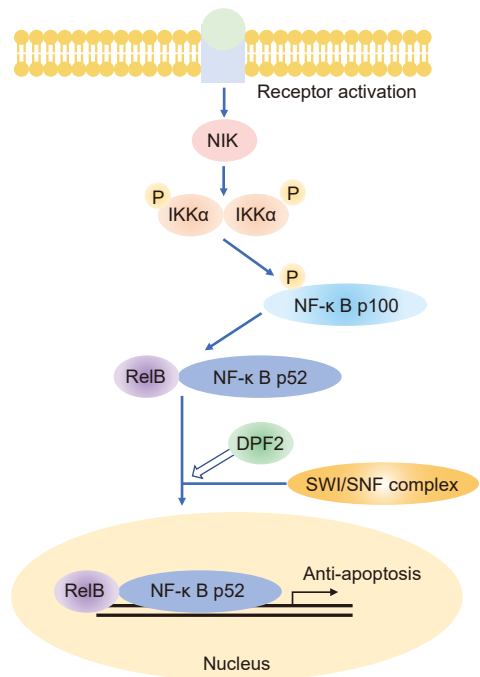


図3 NF-κB 非古典的経路

NIK: NF-κB inducing kinase, IKKα: IκB kinase α, P: Phosphoric acid.

NF-κB ファミリーは、古典的経路および非古典的経路によって活性化されるが、非古典的経路はリン酸化による NF-κB p100 のプロセッシングに依存し、NF-κB2 (p52) /RelB 複合体の持続的な活性化を媒介して、アポトーシスを抑制する。DPF2 はクロマチン構造変換因子である SWI/SNF 複合体と NF-κB2 (p52) /RelB 複合体を仲介するアダプター蛋白で、SWI/SNF 複合体や p52 と結合する性質がある。DPF2 が SWI/SNF 複合体を p52/RelB 依存的に標的プロモーターへ誘導することにより、NF-κB 非古典的経路の最下流で機能し、アポトーシスを抑制する (図 3)<sup>19)</sup>。

### 3) FasL-Fas 経路を介したメモリー CD4<sup>+</sup> T 細胞のアポトーシス

アポトーシスは、プログラムされた細胞死の一形態で、内因性経路と外因性経路によって誘導される。内因系経路は、ミトコンドリアに局在する Bcl-2 ファミリー蛋白を介して制御され、細胞ストレスによって活性化される。外因性経路は腫瘍壊死因子 (TNF: tumor necrosis factor) や FasL (Fas

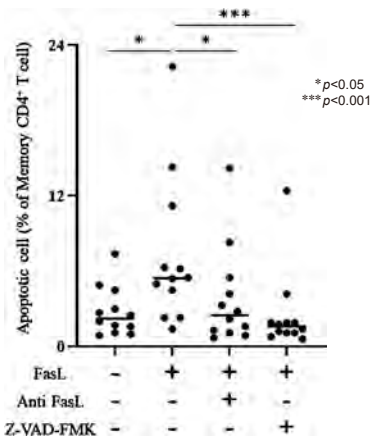


図4 FasL 刺激によるメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシス<sup>15)</sup>

Z-VAD-FMK：全 Caspase 阻害薬。

Ligand) などの細胞外リガンドと細胞表面の細胞死受容体の結合を介して活性化される<sup>20)</sup>。FasL が細胞表面の Fas 受容体 (CD95) に結合すると、Fas 受容体の細胞質尾部にあるデスドメインが活性化され、その結果、Caspase が活性化されてアポトーシスが誘導される<sup>21)~23)</sup>。FasL と Fas 受容体の相互関係が T 細胞の恒常性を維持し、免疫系の制御にかかわっている<sup>24)</sup>。

末梢血中のメモリー T 細胞は Fas を発現する<sup>25)</sup>。そこで、スギ花粉症患者の末梢血単核球からメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し、FasL-Fas 経路を介したメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスについて Caspase 3/7 を指標にフローサイトメトリーで検討した。FasL 刺激はメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスを誘導したが、抗 FasL 抗体や全 Caspase 阻害薬である Z-VAD-FMK 処理を行うと、メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスが抑制された<sup>15)</sup> (図 4)。以上の結果、FasL-Fas 経路がメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスにかかわる可能性が示唆された。

### 3. 制御性 B 細胞 (BR1 細胞) によるメモリー Th2 細胞, メモリー Tfh2 細胞のアポトーシス誘導

制御性 B 細胞は IL-10, TGF-β, IL-35 などの制御系サイトカインを産生する B 細胞サブセッ

トである<sup>26)</sup>。ヒトにおける制御性 B 細胞には、関節リウマチやシェーグレン症候群に関連する B10 細胞や、多発性硬化症などの自己免疫疾患に関連するプラズマブラスト、アレルギー疾患に関連する BR1 細胞などが報告されている<sup>27)</sup>。制御性 B 細胞は IL-10 の産生を介して IgG4 産生を促進し、制御性 T 細胞を誘導して T 細胞免疫応答を制御する。ハチアレルギー患者に対するアレルゲン免疫療法では、抗原特異的 IL-10 産生制御性 B 細胞が増加する<sup>28)</sup>。また、制御性 B 細胞は FasL を発現して、FasL-Fas 経路によるアポトーシスを誘導する<sup>29)</sup>。われわれは、スギ花粉舌下免疫療法により制御性 B 細胞が誘導され、FasL-Fas 経路によってメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞 (メモリー Th2 細胞, メモリー Tfh2 細胞) のアポトーシスが誘導されると考えた。

そこで、スギ花粉舌下免疫療法が奏効した同一患者の治療前と治療 1 年後の末梢血単核球をスギ花粉抽出抗原, IL-33, TGF-β で刺激し、メモリー Th2 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>)、メモリー Tfh2 細胞 (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>)、BR1 細胞 (CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup>) の割合を検討した。また、BR1 細胞における FasL 発現や IL-10 産生の変化についても検討した。

スギ花粉症患者では健康人と比較して、CD4<sup>+</sup>T 細胞におけるメモリー Th2 細胞とメモリー Tfh2 細胞の割合が高く、CD19<sup>+</sup>B 細胞における BR1 細胞の割合は少ない。舌下免疫療法 1 年後には治療前に比べて、メモリー Th2 細胞とメモリー Tfh2 細胞の割合が減少し、BR1 細胞の割合は増加した<sup>15)</sup> (図 5)。また、スギ花粉舌下免疫療法 1 年後の BR1 細胞では FasL と IL-10 の発現が増加した<sup>15)</sup> (図 6)。

以上の結果、舌下免疫療法によって誘導された BR1 細胞が FasL-Fas 経路を介してメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞 (メモリー Th2 細胞, メモリー Tfh2 細胞) のアポトーシスを誘導し、メモリー細胞が減少することで舌下免疫療法による長期寛解が得られると考えられる。さらに、BR1 細胞は、IL-10 産生を介して制御性 T 細胞を誘導して T 細胞免疫応答の制御にもかかわっている。

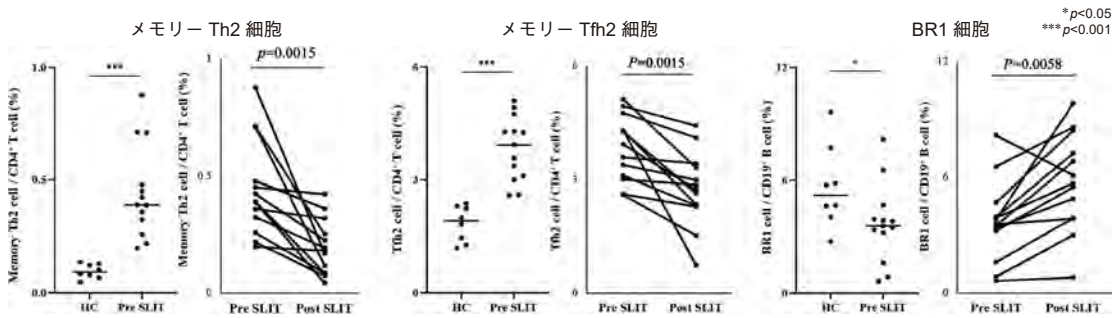


図5 健常人 (HC) とスギ花粉症患者 (舌下免疫療法前と治療1年後) の末梢血単核球中のメモリー Th2 細胞, メモリー Tfh2 細胞, BR1 細胞の割合<sup>15)</sup>

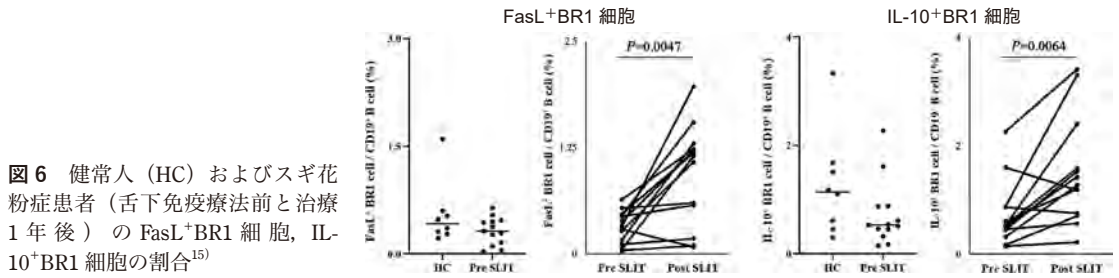


図6 健常人 (HC) およびスギ花粉症患者 (舌下免疫療法前と治療1年後) の FasL<sup>+</sup>BR1 細胞, IL-10<sup>+</sup>BR1 細胞の割合<sup>15)</sup>

## まとめ

疑問：舌下免疫療法後に長期間効果が持続するのは何故か？

答え：舌下免疫療法により、アポトーシス抑制遺伝子である DPF2 と NF-κB p100 の発現が低下し、メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスが誘導される。舌下免疫療法により FasL と IL-10 を発現する制御性 B 細胞の BR1 細胞が誘導されるが、BR1 細胞の FasL とメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞に発現する Fas の作用で FasL-Fas 経路によるアポトーシスが誘導され、メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞 (メモリー Th2 細胞, メモリー Tfh2 細胞) が減少し、舌下免疫療法による長期寛解が得られる。

## 文献

1. Valujskikh A, Li XC. Frontiers in nephrology: T cell memory as a barrier to transplant tolerance. J Am Soc Nephrol 2007;18:2252-2261.
2. Onodera A, Kokubo K, Nakayama T. Epigenetic and transcriptional regulation in the induction, maintenance, heterogeneity, and recall-response of effector and memory Th2 cells. Front Immunol 2018;9:2929.
3. Yeon SM, Choi A, Hong MS, Jung YW. Mediators of the homeostasis and effector functions of memory Th2 cells as novel drug targets in intractable chronic allergic diseases. Arch Pharm Res 2019;42:754-765.
4. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol 2008;8:218-230.
5. Inuma T, Okamoto Y, Morimoto Y, et al. Pathogenicity of memory Th2 cells is linked to stage of allergic rhinitis. Allergy 2018;73:479-489.
6. Ihara F, Sakurai D, Yonekura S, et al. Identification of specifically reduced Th2 cell subsets in allergic rhinitis patients after sublingual immunotherapy. Allergy 2018;73:1823-1832.
7. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity 2011; 34:108-121.
8. Yao Y, Chen CL, Yu D, Liu Z. Roles of follicular helper and regulatory T cells in allergic diseases and allergen immunotherapy. Allergy 2021;76:456-470.
9. Yao Y, Chen CL, Wang N, et al. Correlation of allergen-

- specific T follicular helper cell counts with specific IgE levels and efficacy of allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:321-324.e310.
10. Marogna M, Spadolini I, Massolo A, et al. Long-lasting effects of sublingual immunotherapy according to its duration: a 15-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:969-975.
  11. Durham SR, Walker SM, Varga EM, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999;341:468-475.
  12. Masuyama K, Matsuoka T, Kamijo A. Current status of sublingual immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. *Allergol Int* 2018;67:320-325.
  13. Tsabouri S, Mavroudi A, Feketea G, et al. Subcutaneous and sublingual immunotherapy in allergic asthma in children. *Front Pediatr* 2017;5:82.
  14. Saito H, Abe J, Matsumoto K. Allergy-related genes in microarray: an update review. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:56-59.
  15. **Arai H, Kouzaki H, Muraio T, et al. Sublingual immunotherapy with Japanese cedar pollen extract induces apoptosis of memory CD4(+) T cells. *Clin Exp Allergy* 2022;52:974-978.**
  16. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693-733.
  17. Nabel GJ, Verma IM. Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature. *Genes Dev* 1993;7:2063.
  18. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280-288.
  19. Tando T, Ishizaka A, Watanabe H, et al. Requiem protein links RelB/p52 and the Brm-type SWI/SNF complex in a noncanonical NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 2010;285:21951-21960.
  20. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
  21. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998;17:3237-3245.
  22. Enari M, Talanian RV, Wong WW, et al. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1996;380:723-726.
  23. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009;30:180-192.
  24. Yamada A, Arakaki R, Saito M, et al. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Front Immunol* 2017;8:403.
  25. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, et al. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992;149:3753-3758.
  26. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol* 2015;27:479-486.
  27. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, et al. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:654-665.
  28. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1204-1212.
  29. Braza F, Chesne J, Castagnet S, et al. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy* 2014;69:1454-1463.



# 第5章

## 嗅覚・味覚障害の疑問

- I. 感冒後嗅覚障害の長期予後は？
- II. バルプロ酸ナトリウムは感冒後嗅覚障害の治療薬になるか？
- III. 先天性嗅覚障害の診断における MRI 検査の役割は？
- IV. 鼻粘膜はアルツハイマー病早期診断のターゲットになるか？
- V. アルツハイマー型認知症により味覚機能は低下するか？

# 1 感冒後嗅覚障害の長期予後は？

## —滋賀医科大学嗅覚味覚専門外来での臨床研究から—

### 1. 感冒後嗅覚障害とは

急性上気道炎により嗅覚障害が併発することがあるが、多くは、嗅裂を含む鼻副鼻腔粘膜の炎症により生じる気導性嗅覚障害で、炎症が治まれば嗅覚障害も治癒する。しかし、一部の患者では、炎症が軽快した後も数か月にわたり嗅覚障害が残存し、長期間遷延する場合がある。これは、ウイルスにより、嗅神経より中枢の嗅覚伝達経路が傷害された嗅神経性嗅覚障害または中枢性嗅覚障害と考えられ、感冒後嗅覚障害と呼ぶ。

感冒後嗅覚障害は、自然回復傾向があるため、難治例でも長期経過で嗅覚が回復する可能性がある。では、実際に患者は、回復するまでどれくらい待てばよいのか、また、どの程度まで回復が期待できるのだろうか。感冒後嗅覚障害の予後については、海外から多くの報告があり、ドイツを中心に使用されている嗅覚検査の Sniffin' Sticks を用いた研究では、観察期間3か月、14か月、37か月で、改善率はそれぞれ、6%<sup>1)</sup>、32%<sup>2)</sup>、66%<sup>3)</sup> という結果であった。また、自覚症状を電話調査した研究では、平均観察期間33か月で86%の患者に改善がみられた<sup>4)</sup>。つまり、発症後2～3年という長期間の経過で、高率に嗅覚の回復が観察され、この傾向は、我が国でも同様であると考えられる。しかし、海外での嗅覚検査は、主に Sniffin' Sticks が使用され、治療は行われなことが多い。一方、我が国における嗅覚検査は基準嗅力検査で、当帰芍薬散など投薬治療も行われるため、海外で報告された改善率をそのまま当てはめることはできない。

われわれは、2007年から2015年に当科で治療した感冒後嗅覚障害患者の改善率について検討した<sup>5)</sup>。嗅覚障害の程度、治療効果は基準嗅力検査スコアにより評価し(表1, 2)、自覚症状は「正

表1 基準嗅力検査平均認知域値による嗅覚障害の程度

平均認知域値	嗅覚障害の程度
～1.0	正常
1.2～2.4	軽度低下
2.6～4.0	中等度低下
4.2～5.4	高度低下
5.6～	脱失

表2 平均認知域値による嗅覚障害治療効果判定基準

治癒	2以下に改善
軽快	1以上改善
悪化	1以上悪化
不変	上記以外

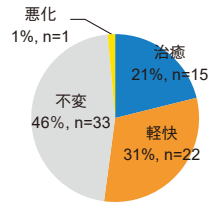
治癒または軽快に至った場合を、改善と判定する。

しくにおう」「少し弱い」「近づくとにおう」「ほとんどにおわない、かすかににおう」「全くにおわない」の5段階スケールで評価した。

### 2. 感冒後嗅覚障害患者の嗅覚は1年後にどの程度まで回復するか？

受診した患者の嗅覚が1年後にどの程度回復するか明らかにするため、中等度以上の嗅覚障害を有し、受診時と1年後の嗅覚機能を評価できた71例について検討した。患者背景は、年齢58歳±13歳、女性46例、男性25例、受診時の病悩期間は9.1±14か月であった。治療は、当帰芍薬散内服を中心に、短期間のステロイド点鼻やATP、ビタミンB12、亜鉛の内服を行った。その結果、52%が「改善」し、21%が「治癒」に至った。初診時に嗅覚脱失と判定された患者の半数は何らかの嗅感を取り戻し、基準嗅覚検査で13%が正常嗅覚に回復した。治療の目標は、患者自身が、「正しくにおう」と感じるようになることで、最終的には自覚症状の正常化が望まれる。しかし、自覚

基準嗅力検査による治療効果判定



基準嗅力検査による嗅覚障害重症度

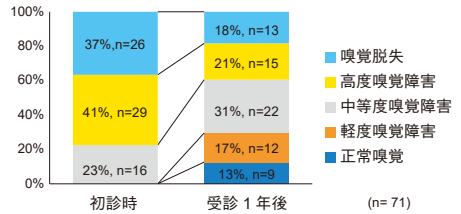
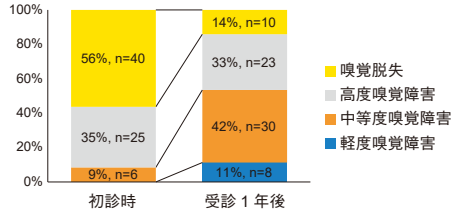


図1 感冒後嗅覚障害患者の初診時と1年後の治療効果判定, 嗅覚障害重症度, 自覚症状スコア<sup>5)</sup>

1年後には嗅覚脱失例は半数になり, 13%の患者が基準嗅覚検査で正常嗅覚に回復した. 自覚的に53%の患者が「近づけば大体におう」以上の嗅覚を感じるようになるが, 「正しくにおう」まで回復した患者はいない.

自覚症状スコア



症状スコアで「正しくにおう」まで回復した患者はなく, 「少し弱い」まで回復した患者も11%と少数であった. 全体として, 53%の患者が「近づけば大体におう」以上の嗅覚を感じるようになったが, 一方で, 46%の患者が, 「全くにおわない」, または, 「かすかににおう」状態で, 自覚症状は不良のままであった<sup>5)</sup> (図1). 以上より, 中等症以上の嗅覚障害の患者では, 受診1年後には, 約半数の患者で検査上有意な嗅覚の回復がみられ, 自覚的にも何らかの嗅感が得られるようになるが, 正常嗅覚とを感じるまで回復する患者はほとんどいない.

嗅覚の回復傾向は30か月後まで持続した(図2). 一方, 30か月以上経過してから, 「改善」または「治療」した症例はなかったことから, 回復傾向が鈍化することが推測される. ただし, 本検討でのり

### 3. 感冒後嗅覚障害患者の嗅覚回復傾向は, いつまで持続するか？

次に, 患者の嗅覚回復傾向がいつまで持続するのか明らかにするために, カプラン・マイヤー法を用いて長期経過を検討した. 対象は, 中等度以上の嗅覚障害を有する患者82例で, 患者背景は, 年齢56歳±14歳, 女性56例, 男性26例, 受診時の病期期間は7.4±12か月であった. 治療は, 当帰芍薬散単独治療(31例)か当帰芍薬散と亜鉛の併用内服治療(51例)を行った患者のみを対象にした. 他の薬物治療を行った患者は除外し, 嗅覚刺激療法は行っていない. その結果, 受診後6か月以内に「改善」に至る患者が多く, その後,

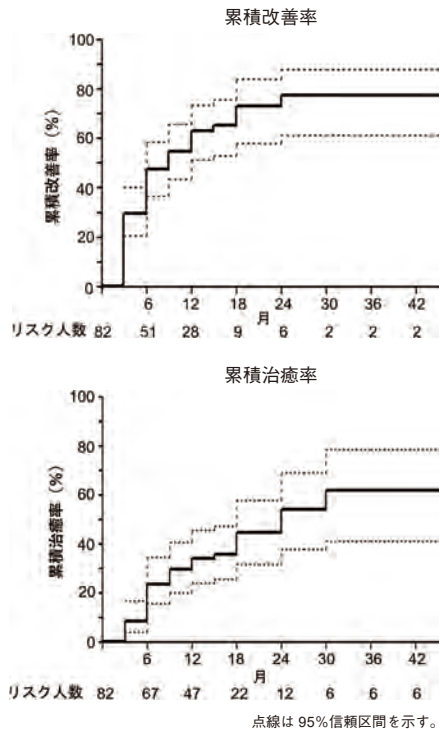


図2 感冒後嗅覚障害患者の長期回復経過<sup>5)</sup>

受診後6か月以内に「改善」に至る患者が多く, 嗅覚の回復傾向は30か月後まで持続した.

スク人数は少なく、回復の可能性を否定するものではない。最終的に、77%の患者が「改善」し、61%の患者が「治癒」に至り、多くの患者で嗅覚回復が期待できることがわかった。自覚症状に関しては、65%の患者で「近づけば大体におう」以上の状態まで回復し、日常生活で、何らかのにおいを感じる事ができた。一方、残りの35%の患者は、「全くにおわない」または、「かすかににおう」の嗅覚不良な状態のままであった。また、「正しくにおう」と感じるまで回復した患者は1例のみで、「少し弱い」まで回復した患者を含めても全体の22%と少なく、自覚的に良好な嗅覚を取り戻す患者の割合は低い<sup>5)</sup>。

#### 4. 感冒後嗅覚障害患者の予後因子は何か？

感冒後嗅覚障害の予後因子についても検討した。前述した Kaplan・マイヤー法で得た結果を

ログランク検定で単変量解析した後、コックス比例ハザードモデルを適用して多変量解析した。予後因子の候補として、性別、年齢、病悩期間、治療法（当帰芍薬散単独内服 vs 当帰芍薬散と亜鉛内服併用）、受診時の嗅覚機能（基準嗅力検査認知域値）をあげた。その結果、年齢（65歳以下）と嗅覚障害の重症度（平均認知域値5.6未満の症例）が予後良好となる因子であった<sup>5)</sup>。つまり、年齢が若く、残存嗅覚がある場合は、「改善」しやすい。これまでに報告されている予後良好となる因子には、年齢が若い、嗅覚障害の重症度が低い、病悩期間が短い、観察期間が長い、MRI検査で測定した嗅球体積が大きい<sup>6)</sup>、などがあるが、年齢と嗅覚障害の重症度は、共通して報告され、とくに重要である。病態として、加齢とともに嗅神経細胞の再生力が低下すること<sup>7)</sup>や、ウィルス傷害後の増殖可能細胞の残存が回復に影響することが推測される。

#### まとめ

##### 疑問：感冒後嗅覚障害の長期予後は？

答え：感冒後嗅覚障害患者の嗅覚回復は受診後30か月まで持続する。ただし、それ以降も回復する可能性は否定できない。基準嗅力検査による評価では、1年後に52%、最終的には77%の患者で「改善」に至る。一方で、自覚症状スコアによる評価では、嗅覚良好と感じるようになった患者の割合は22%と低い。嗅覚予後良好となる因子は、年齢が若いこと（65歳未満）と残存嗅覚があること（平均認知域値5.6未満）であった。

#### 文献

1. Hummel T, Rissom K, Reden J, et al. Effects of olfactory training in patients with olfactory loss. *Laryngoscope* 2009;119:496-499.
2. Reden J, Lill K, Zahnert T, et al. Olfactory function in patients with postinfectious and posttraumatic smell disorders before and after treatment with vitamin A: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Laryngoscope* 2012;122:1906-1909.
3. Duncan HJ, Seiden AM. Long-term follow-up of olfactory loss secondary to head trauma and upper respiratory tract infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:1183-1187.
4. Lee DY, Lee WH, Wee JH, et al. Prognosis of postviral olfactory loss: follow-up study for longer than one year. *Am J Rhinol Allergy* 2014;28:419-422.
5. Ogawa T, Nakamura K, Yamamoto S, et al. Recovery over time and prognostic factors in treated patients with post-infectious olfactory dysfunction: a retrospective study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2020;129:977-982.
6. Hummel T, Lötsch J. Prognostic factors of olfactory dysfunction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;136:347-351.
7. Rawson NE, Gomez G, Cowart B, et al. The use of olfactory receptor neurons (ORNs) from biopsies to study changes in aging and neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1998;855:701-707.

## II バルプロ酸ナトリウムは感冒後嗅覚障害の 治療薬になるか？

### —動物（マウス）モデルと医師主導臨床試験による検討—

#### 1. 感冒後嗅覚障害の治療

感冒後嗅覚障害は、感冒ウイルスによって嗅神経より中枢の嗅覚伝達経路が傷害されることにより生じる。自然回復傾向があるが、自覚的に治癒に近い状態まで回復する患者は少ない。また、回復までに2～3年と長期間かかる患者も多い。薬物療法が確立されていないため、有効な治療薬の開発が望まれ、これまで、亜鉛、エストロゲン、ミノサイクリン、ビタミンA、 $\alpha$ -リポ酸を利用した臨床研究が行われたが、いずれも比較研究での有効性は証明できていない。唯一、クエン酸ナトリウム鼻腔内投与による有効性が比較研究で証明され<sup>1)</sup>、今後の進展に注視したい。我が国では治療として、嗅覚刺激療法や当帰芍薬散の内服が行われている。嗅覚刺激療法は、近年その有効性が中規模の対照研究で証明されている<sup>2)</sup>。当帰芍薬散は、嗅球における神経成長因子の増加作用と、嗅神経の再生促進作用があることがマウスや培養細胞を利用した研究で確認され<sup>3)</sup>、また、安全性が高いため、長期内服が必要な感冒後嗅覚障害の治療に向いている。しかし、有効性に関しては、ランダム化比較試験などによる高いエビデンスはない。

感冒後嗅覚障害や頭部外傷による嗅覚障害患者では、嗅上皮の嗅神経細胞が高度に変性・脱落しているが、基底細胞層は残存している症例が多い<sup>4,5)</sup>。嗅上皮基底細胞層には、嗅神経幹細胞と考えられる球状基底細胞が存在し、自己複製による増殖と成熟した嗅神経細胞への分化が生涯にわたり行われる。したがって、嗅神経性嗅覚障害の治療薬には、傷害後に残存した嗅神経幹細胞の増殖・分化を促進させる作用が求められる。

#### 2. バルプロ酸の神経細胞分化促進作用

バルプロ酸は、躁うつ病、てんかん・片頭痛の発作予防に対して臨床で広く使用されている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を有し、神経細胞の分化を促進させる。海馬由来の神経幹細胞をバルプロ酸存在下で培養すると、神経細胞への分化促進作用がみられ<sup>6)</sup>、マウス外傷性脊髄損傷モデルでは、損傷部位に神経幹細胞を移植し、バルプロ酸を投与すると、移植した神経幹細胞が分化して歩行が可能になる<sup>7)</sup>。

われわれは、この作用に注目し、嗅神経性嗅覚障害の新規治療薬となる可能性を検討した。神経幹細胞が神経細胞やグリア細胞へと分化していく過程には、サイトカインや増殖因子などの「細胞外因子」と、転写因子やエピジェネティックなゲノム修飾を含む「細胞内在性因子」の協調作用が重要で、そのバランスにより分化方向が決定される。核内染色体は、ヒストンにDNAが絡みつくらせん構造を形成し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用により、ヒストンのアセチル化が促進され、クロマチン構造が緩む（脱凝縮した状態となる）ことで、サイトカインや成長因子などがDNAにアクセスしやすい状態になる。その結果、転写が活性化し、神経細胞の分化が促進される。以上が、バルプロ酸による神経細胞の分化促進作用の機序と考えられている。

#### 3. バルプロ酸ナトリウム内服は、マウス嗅上皮傷害モデルにおける嗅神経再生を促進する

われわれは、メチマゾールの腹腔内投与による

マウス嗅上皮傷害モデルを利用して、嗅神経再生に対するバルプロ酸の作用を組織学的に検討した<sup>8)</sup>。このモデルでは、嗅上皮選択的にアポトーシスが誘導され、薄い基底層を残して嗅上皮が剥脱した後、基底細胞の増殖・分化が誘導され、続いて成熟嗅神経細胞が再生する。嗅神経再生の程度は、嗅上皮の厚みと OMP (olfactory marker protein) 陽性細胞で評価した。嗅上皮の厚みは、嗅上皮内の嗅神経細胞数を反映し、厚みの回復は嗅神経細胞の回復程度を示す。抗 OMP 抗体で免疫染色される OMP 陽性細胞は、成熟嗅神経細胞を反映する。細胞増殖は、抗 Ki-67 抗体陽性細胞と、抗 BrdU 抗体陽性細胞で評価した。Ki-67 は、細胞周期の G0 期を除く全活動期に発現し、BrdU はチミジン類似体の一つで、細胞周期の S 期において、DNA に組み込まれ、いずれも細胞増殖能を反映する。細胞分化は、抗 GAP (growth associated protein) -43 抗体で免疫染色される未熟な嗅神経細胞数で評価した (図 1)。

バルプロ酸ナトリウム内服投与 (150 ~ 300 mg) により、用量依存性に 3 ~ 5 日目に Ki-67 陽性細胞 (増殖細胞) 数が、5 ~ 8 日目には GAP-43 陽性細胞 (未熟な嗅神経細胞) 数が増加し、より早期に嗅神経幹細胞からの分化、増殖が誘導された (図 2)。さらに、8, 15, 22 日目には嗅上皮の厚みが増し、OMP 陽性細胞 (成熟嗅神経細胞) 数が増加し、嗅上皮の再生が用量依

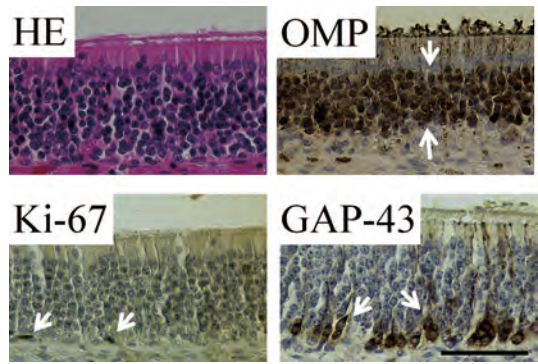


図 1 正常嗅上皮の組織所見 (ICR マウス, 10 週齡, male)

HE: ヘマトキシリン・エオジン染色, OMP: 抗 olfactory marker protein 抗体による免疫染色 (矢印は成熟嗅神経細胞), Ki-67: 抗 Ki-67 抗体による免疫染色 (矢印は増殖細胞), GAP-43: 抗 growth associated protein 抗体による免疫染色 (矢印は未熟な嗅神経細胞)

存性に促進された (図 3)。以上の結果より、バルプロ酸は感冒後嗅覚障害の嗅覚回復を促進させる可能性が考えられる。

#### 4. バルプロ酸ナトリウム内服は、感冒後嗅覚障害患者の嗅覚回復を促進する

次に、臨床第 II 相試験として、感冒後嗅覚障害患者に対するバルプロ酸ナトリウム内服投与の効果を検証した<sup>9)</sup>。バルプロ酸ナトリウムは既存

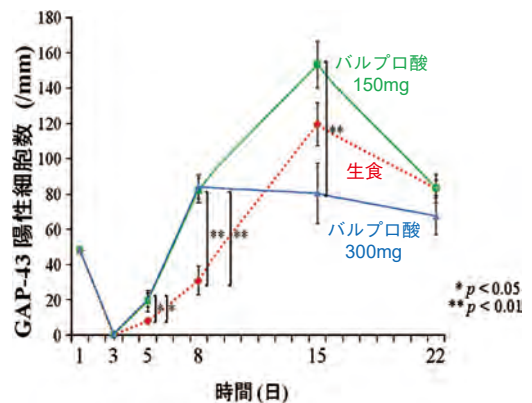
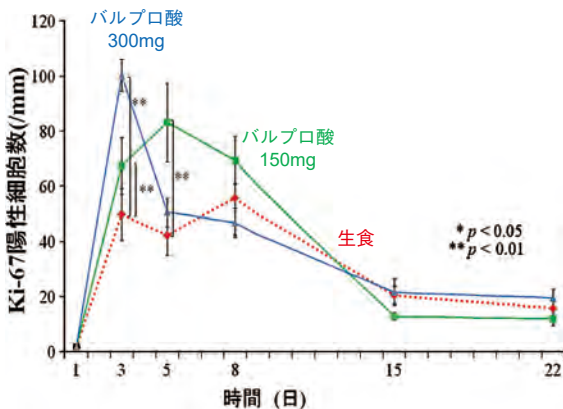


図 2 マウス嗅上皮傷害後の細胞増殖と分化に対するバルプロ酸ナトリウム内服の作用<sup>8)</sup>

嗅上皮傷害 3 ~ 5 日目に増殖細胞 (Ki-67 陽性細胞) が増加し、5 ~ 8 日目に未熟な嗅神経細胞 (GAP-43 陽性細胞) が増加した。

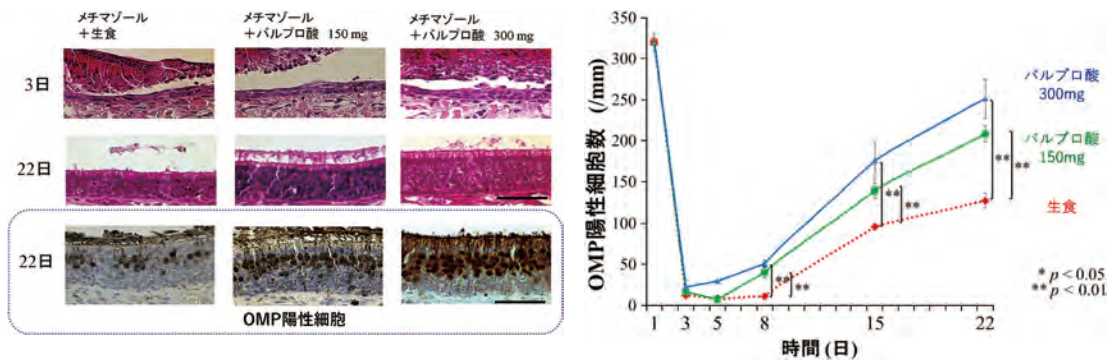


図3 マウス嗅上皮傷害後の嗅神経細胞再生に対するバルプロ酸ナトリウム内服の作用<sup>8)</sup>  
 嗅上皮傷害 5, 15, 22 日目に、嗅上皮の厚みと成熟嗅神経細胞 (OMP 陽性細胞) の回復が、促進された。

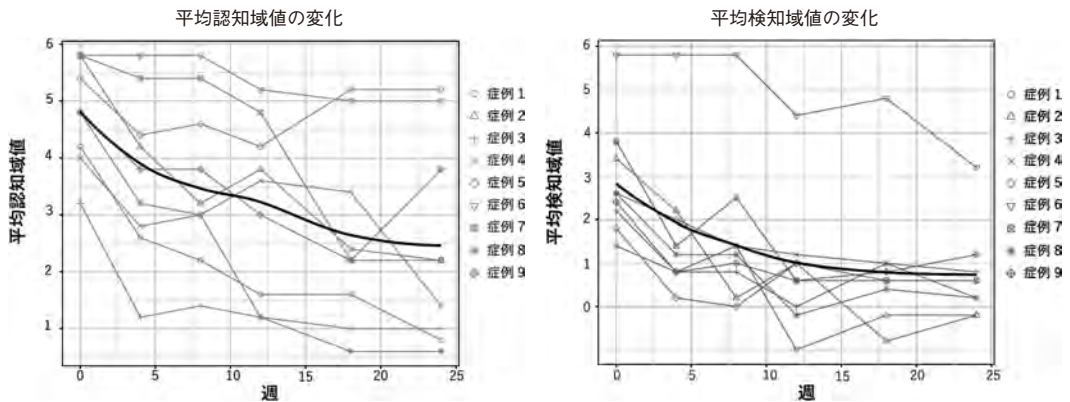


図4 感冒後嗅覚障害患者に対するバルプロ酸ナトリウム内服後の嗅覚検査スコア<sup>9)</sup>  
 9例中7例で、4週目から嗅覚スコアの回復を認めた。症例5, 6は、「改善」に至らなかった。太線は平均値を示す。

薬で、一定の安全性が確立されているが、中枢神経系への抑制作用、催奇形性、アレルギー性機序が関与する特異体質による急性期反応などへの注意が必要である。そのため、66歳以上、妊娠可能な女性、肝機能検査異常などを研究対象の除外基準とし、血液検査を含めた副作用モニタリングを厳格に行った。バルプロ酸ナトリウムとして、デパケン R200mg錠<sup>®</sup> (協和発酵キリン、東京) を1日2回、24週間内服投与した。患者背景は、年齢55歳 ± 8.0歳、女性10例、男性1例、受診時の病悩期間は11.5 ± 13か月であった。

研究を完遂できた9例の基準嗅力検査スコアを示す(図4)。9例中7例で内服後4週から嗅覚スコアが回復した。嗅覚障害の治療効果は、内服後12週で、改善率78% (7例/9例)、治癒率33% (3例/9例)、内服後24週では、改善率78% (7例/9例)、治癒率44% (4例/9例) であっ

た。当帰芍薬散を中心とする従来の治療では、2～3年の長期経過で観察される治癒率・改善率が、バルプロ酸ナトリウム内服では、3か月という短期間で観察されたことから、バルプロ酸のもつ嗅神経再生促進作用が、感冒後嗅覚障害患者の治療に有用である可能性がある。一方、嗅覚回復が乏しかった症例が2例(症例5, 症例6)あった。症例5は、病悩期間が33か月と長く、その間も回復を認めなかった症例で、症例6は検知域値、認知域値ともに嗅覚脱失していた症例であった。以上より、ウイルスによる傷害が高度で、嗅上皮に、増殖可能な細胞が残存していない場合は、治療効果が期待できないことが推測される。

本研究においては、重篤な副作用を認めなかったが、2例が血液検査異常により研究を中止した。1例は、軽度の肝機能異常を認め、バルプロ酸中止後に正常化した。もう1例は、激しい筋力トレ

ニングを行ったことによるCPK, GOT, GPT, LDHの上昇と蛋白尿が検出され, 研究を中止したが, 2週間後には異常値は正常化した。その他,

軽度の眠気を訴えた患者が1例あったが研究は継続できた。

## まとめ

**疑問：バルプロ酸ナトリウムは感冒後嗅覚障害の治療薬になるか？**

**答え：感冒後嗅覚障害に対するバルプロ酸ナトリウム内服療法（24週間）は、従来の治療法と比較し、良好な嗅覚回復促進効果を認め、重篤な副作用は認めなかった。当帰芍薬散の内服や嗅覚刺激療法に比べて、副作用のリスクがあるが、早期の嗅覚回復を希望する患者に対する選択肢の一つになる可能性がある。**

## 文献

1. Whitcroft KL, Merkonidis C, Cuevas M, et al. Intranasal sodium citrate improves olfaction in post-viral hyposmia. *Rhinology* 2016;54:1-6.
2. Damm M, Pikart LK, Reimann H, et al. Olfactory training is helpful in postinfectious olfactory loss: a randomized, controlled, multicenter study. *Laryngoscope* 2014;124:826-831.
3. Noda T, Shiga H, Yamada K, et al. Effects of tokishakuyakusan on regeneration of murine olfactory neurons in vivo and in vitro. *Chem Senses* 2019;44:327-338.
4. Jafek BW, Murrow B, Michaels R, et al. Biopsies of human olfactory epithelium. *Chem Senses* 2002;27:623-628.
5. Yamagashi M, Okazoe R, Ishizuka Y. Olfactory mucosa of patients with olfactory disturbance following head trauma. *Ann Otol Rhinol Otolaryngol* 1994;103:78-84.
6. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, et al. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16659-16664.
7. Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, et al. Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest* 2010;120:3255-3266.
8. **Ogawa T, Takezawa K, Shimizu S, et al: Valproic acid promotes neural regeneration of olfactory epithelium in adult mice after methimazole-induced damage. *Am J Rhinol Allergy* 2014;28:e95-99.**
9. **Ogawa T, Matsumoto K, Tojima I, et al. Therapeutic potential of valproic acid for postviral olfactory dysfunction: a single-arm pilot study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2022, Online ahead of print.**



### III 先天性嗅覚障害の診断における MRI 検査の役割は？ —MRI 検査による嗅球・嗅溝の観察—

#### 1. 先天性嗅覚障害の診断

先天性嗅覚障害と診断されることは、今後嗅覚を獲得する可能性がないことを意味し、患者やその家族は大きなショックを受ける。そのため、慎重に診断し、心境に配慮した説明が必要である。診断には問診が重要で、生来の嗅覚障害があることを推測したうえで、後天性嗅覚障害の原因となる疾患を除外して、総合的に診断する。しかし、後天的に嗅覚障害が生じたことを、問診以外の客観的検査により証明することは難しい。また、においの認識・学習が始まる前、つまり、においの概念を獲得する前にウイルス感染など何らかの後天的原因により嗅覚を失うと、「生来においが無い」といった先天性嗅覚障害と同様の訴えになる。したがって、実際には、後天性嗅覚障害の可能性を完全に除外することは難しく、非症候群例として報告されている症例の多くは、厳密には後天性嗅覚障害の可能性が除外できない。原因遺伝子は少しずつ明らかになっているが、遺伝子診断はまだ研究段階である。先天性嗅覚障害を確実に診断する検査法はないが、MRI 検査は客観的な検査法として有用である。先天性嗅覚障害患者では、嗅球・嗅溝などの嗅脳構造異常が高率に認めら

れる。本項では先天性嗅覚障害の診断における MRI 検査の役割について、われわれの研究をもとに概説する。

#### 2. MRI 検査による嗅脳計測

MRI 検査で、嗅球・嗅溝の微細構造を評価するため、鶏冠を中心に、前頭葉下面を 2 mm スライスで冠状断撮像した T2 強調像を利用した (図 1)。後天性嗅覚障害でも嗅球は高度に委縮するため、先天性嗅覚障害の診断においては、嗅球の低形成か無形成かを鑑別することが重要である。上記条件では、嗅球が無形成なのか低形成なのか判断に迷う症例があるため、脂肪抑制を併用した Cube-FLAIR 画像を追加した<sup>1)</sup>。FLAIR は水を抑制した T2 強調像で、これに脂肪抑制を併用することで脳脊髄液に囲まれる嗅球を良好なコントラストで描出することができる (図 1)。さらに、Rombaux ら<sup>2)</sup> の報告を参考に、嗅球体積と嗅溝の深さを測定した。嗅球体積は、冠状断 T2 強調像で得られた嗅球の断面積を計測し、それに、スライス厚の 2 mm を乗じたものを加算して算出した。嗅球体積の計測を行うためには、ギャップレスで撮影する必要がある。嗅球の長さは約 10 mm

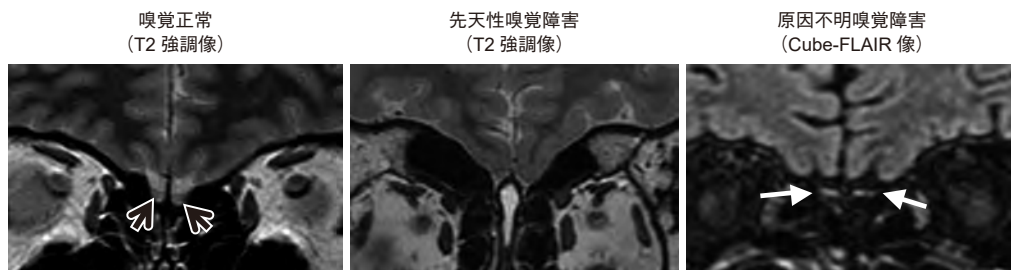


図 1 MRI 検査による嗅球、嗅溝所見

嗅覚正常者：嗅球 (矢印) と嗅溝が観察できる。先天性嗅覚障害患者：嗅球無形成、嗅溝低形成 (この断面より後方で嗅溝が形成されていた) である。原因不明嗅覚障害患者：嗅球の高度委縮 (矢印) が認められる。

程度なので、正常であれば4～5スライスで嗅球全体が観察できる。さらに、眼球後端レベルの冠状断像で、眼窩回と直回の外側縁に引いた直線を底面として、ここから嗅溝最深部までの長さを、嗅溝の深さとして測定した<sup>1)</sup>。

### 3. 嗅球無形成は、先天性嗅覚障害を強く示唆する

当科で先天性嗅覚障害と診断した16例（5歳から69歳，中間値20歳）を対象とした。このうち、嗅球無形成が11例/16例（69%）と高率に認められた。他施設での検討でも同様に、無形成の割合は65～84%と報告されている<sup>3)~5)</sup>。嗅覚正常者においても、0.6%の頻度で嗅球無形成者が存在するという報告<sup>6)</sup>を留意する必要があるが、生来の嗅覚障害の症状を訴える患者における嗅球無形成の所見は先天性を強く示唆する。また、嗅溝について、眼球後端レベルにおける嗅溝が観察できない高度の低形成は、嗅覚正常例や原因不明嗅覚障害例には認められず<sup>7)</sup>、先天性嗅覚障害者に特徴的であった。

### 4. 嗅脳の計測により、先天性と後天性嗅覚障害を区別することは可能か？

先天性嗅覚障害では、嗅球の低形成や嗅溝の深さの短縮が観察される。そこで、嗅覚正常者と原因不明の後天性嗅覚障害、先天性嗅覚障害患者の3群で比較検討した<sup>7)</sup>（表1）。統計解析は、Kruskal-Wallis検定を行った後、Mann-Whitney U検定、bonferroni補正を行った。先天性嗅覚障害患者では、嗅球・嗅溝無形成側を除く、嗅球12側、嗅溝29側で検討した。その結果、嗅球体積は、嗅覚正常者と比較し、原因不明例、先天性例ともに有意に小さく、さらに、先天性例は原因不明例と比較しても有意に小さかった。嗅溝の深さは、嗅覚正常者と比較し、先天性例で有意に短縮し、原因不明例では短縮を認めなかった（図2）。続いて、嗅球体積や嗅溝の深さが先天性と後天性を鑑別する指標になるか検討するため、先天性例と原因不明例の2群間でROC分析を行った。その結果、嗅球体積では、44 mm<sup>3</sup>をカットオフとした場合、特異度0.72、感度0.56で、嗅溝の深さは、7.9 mmをカットオフとした場合、特異度0.72、感度0.64であった。つまり、これらの嗅脳の測定値だけでは、先天性と後天性を充分区別することはできなかった。

表1 原因不明嗅覚障害患者，先天性嗅覚障害患者，嗅覚正常者における嗅球体積と嗅溝の深さの比較

	症例数	年齢	性別	嗅球体積 (mm <sup>3</sup> )	嗅溝の深さ (mm)
原因不明嗅覚障害患者	18	63 ± 18	女性10例，男性8例	53 ± 22	8.4 ± 1.7
先天性嗅覚障害患者	15	26 ± 17	女性8例，男性8例	27 ± 22 (12側)	4.8 ± 4.1 (29側)
嗅覚正常者	12	60 ± 18	女性4例，男性8例	78 ± 15	7.9 ± 1.1

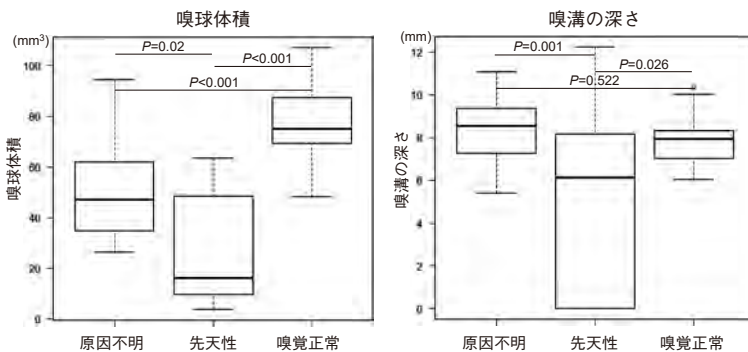


図2 MRI検査による嗅球体積と嗅溝の深さの比較

先天性嗅覚障害患者では嗅覚正常者や後天性嗅覚障害患者に比べて、嗅球体積が小さく、嗅溝の深さが短い。

## まとめ

**疑問：先天性嗅覚障害の診断における MRI 検査の役割は？**

**答え：**MRI 検査は有用で、嗅球無形成と眼球後端面レベルでの嗅溝無形成は、先天性嗅覚障害を強く示唆する。また、無形成でなくても、先天性嗅覚障害患者では嗅球体積が小さく、嗅溝の深さが短い例が多い。しかしながら、MRI 検査のみでは先天性嗅覚障害の確定診断はできない。先天性嗅覚障害が疑われる患者に対しては、症候群性の可能性を考慮し、性腺機能の精査や視覚、聴覚などの関連する合併症がないかについても確認する必要がある。

## 文献

1. 小河孝夫, 加藤智久, 小野麻友ら. 先天性嗅覚障害と診断した 16 例の臨床像と MRI 所見. *日耳鼻* **2015**;118:1016-1026.
2. Rombaux P, Grandin C, Duprez T. How to measure olfactory bulb volume and olfactory sulcus depth? *B-ENT* 2009;5 Suppl 13:53-60.
3. Levy LM, Degnan AJ, Sethi I, et al. Anatomic olfactory structural abnormalities in congenital smell loss: magnetic resonance imaging evaluation of olfactory bulb, groove, sulcal, and hippocampal morphology. *J Comput Assist Tomogr* 2013;37:650-657.
4. Yousem DM, Geckle RJ, Bilker W, et al. MR evaluation of patients with congenital hyposmia or anosmia. *AJR Am J Roentgenol* 1996;166:439-443.
5. Koenigkam-Santos M, Santos AC, Versiani BR, et al. Quantitative magnetic resonance imaging evaluation of the olfactory system in Kallmann syndrome: correlation with a clinical smell test. *Neuroendocrinology* 2011;94:209-217.
6. Weiss T, Soroka T, Gorodisky L, et al. Human olfaction without apparent olfactory bulbs. *Neuron* 2019;35-4. e5.
7. 大江祐一郎, 小河孝夫, 谷口怜子ら. 原因不明嗅覚障害患者の MRI による嗅球体積の測定. *耳鼻ニューロサイエンス* **2018**;32:61-63.

# IV 鼻粘膜はアルツハイマー病早期診断のターゲットになるか？

## —脳神経が外界に露出する唯一の部位としての嗅上皮—

### 1. アルツハイマー病 (AD) の病態と診断

日本には 600 万人の認知症患者が存在し、そのうち 60% がアルツハイマー型認知症である。発症にはアミロイドカスケード仮説が提唱され、まずアミロイド  $\beta$  が神経細胞外に沈着し老人斑を形成する。次にリン酸化タウの神経細胞への蓄積が誘発されて、神経原線維変化が生じて神経細胞が障害され、認知症を発症する (図 1)。初期には、

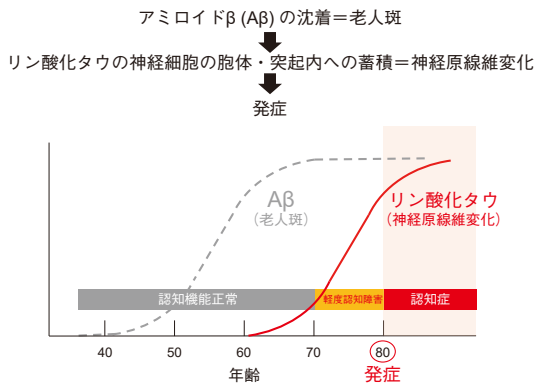


図 1 アルツハイマー病のアミロイドカスケード仮説  
発症の 20 年ほど前から組織変化が始まり、生活に支障を来した時点では不可逆的に進行している。

記憶にかかわる海馬が障害されやすく、患者は物忘れを主訴に、認知症を疑い病院を受診することが多い。実際には発症の 20 年ほど前から、組織での変化が始まっているため、病院を受診する時点ではすでに病態が不可逆的に進行している。根本的な治療法がない現在では、できるだけ早期に診断して、認知機能が正常な時期から治療を開始することが重要である。早期診断のため、現状では髄液検査によるアミロイド  $\beta_{42}$  の検出や、特殊な PET 検査 (アミロイドイメージング) が試みられるが、より低侵襲で安価な診断方法の開発が求められる (図 2)<sup>1)</sup>。

一方、アルツハイマー病 (AD: Alzheimer's disease) では早期から嗅覚障害を伴いやすい<sup>2)</sup>。ある香りを嗅ぐと過去の記憶がよみがえることがあるように、嗅覚は記憶と深く結びついた感覚である。香りの刺激は嗅上皮から嗅球、嗅皮質へ送られ、さらに嗅内皮質と海馬に伝わり、記憶として残される。早期診断に嗅覚検査を利用する試みもある。しかし、AD に伴う嗅覚障害を加齢に伴う変化と区別することは難しく、また、認知機能が低下した患者に嗅覚検査を行うこと自体が困難で、嗅覚検査を AD の早期診断に用いることは実用化していない。

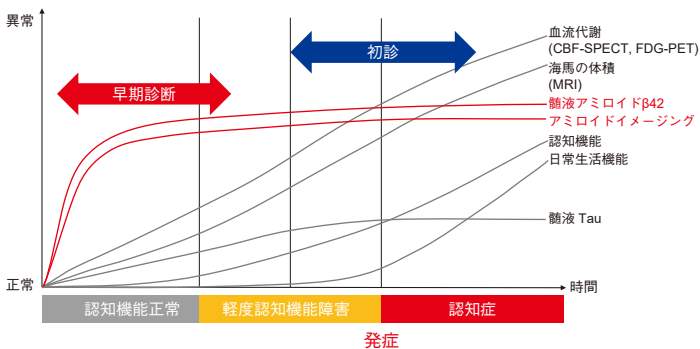


図 2 アルツハイマー病の早期診断 (論文 1 を改変)

認知機能が正常な時期の早期診断には、髄液検査 (髄液アミロイド  $\beta$  測定) や特殊な PET 検査 (アミロイドイメージング) が必要である。

## 2. 鼻腔検体を利用したアルツハイマー病 (AD) の診断

嗅神経は外界に神経細胞が露出する唯一の脳神経で、AD 患者の嗅上皮には、特異的蛋白のアミロイド  $\beta$  やリン酸化タウが検出される<sup>3,4)</sup>。ヒトの嗅上皮は上鼻甲介と鼻中隔に挟まれた狭い範囲に存在し、生検による嗅上皮採取の成功率は 16 ~ 100% と採取方法によっても大きく異なる<sup>5)</sup>。剖検による検討では、嗅裂全体の約 30% が嗅上皮で、篩板から 8 mm の部位で組織を採取すると、61% で嗅上皮が採取できるが、60 歳以上に限定すると採取率は 31% に減少し、加齢に伴って嗅上皮の面積は縮小する<sup>6)</sup>。嗅上皮の生検による AD の診断は、高くない成功率と、手技の侵襲性や危険性を考慮すると、現実的ではない。

動物実験においては、アイソトープで標識したアミロイド  $\beta$  が血管を介さずに頭蓋内から鼻腔に移行することや、AD のモデルマウスでは脳へのアミロイド  $\beta$  の沈着に一致して鼻腔粘膜にもアミロイド  $\beta$  が沈着することが報告されている<sup>7,8)</sup>。また、AD の初期から嗅球が障害される報告があり<sup>9)</sup>、脳組織と同様に、AD 特異的な病理変化が、発症前から嗅球から嗅上皮に生じている

可能性が考えられる。そこで、AD 患者の剖検組織で嗅上皮の観察を行った。

## 3. 若年性アルツハイマー病 (AD) 患者の剖検組織における嗅上皮の変化

高齢の AD 患者の剖検組織では、嗅裂の嗅上皮は高度に変性・萎縮し、一部は呼吸上皮化して、AD 特異的な変化を観察できなかった。そこで、48 歳で発症し 62 歳で呼吸不全のため死亡した若年性 AD 患者の剖検組織を検討した<sup>10)</sup>。

側頭葉や海馬ではアミロイド  $\beta$  陽性の老人斑や、リン酸化タウ陽性でガリアス染色陽性の神経原線維変化が観察され (図 3)、嗅球にも同様に老人斑と神経原線維変化が認められた (図 4)。

正常な嗅上皮は基底膜上に水平基底細胞と球状基底細胞、その上層に 2 ~ 3 層の嗅神経細胞、最外層に支持細胞が認められる。この症例では、通常の嗅上皮以外に、嗅神経細胞が減少し線維組織に置換された部分や、高齢者の嗅上皮で観察されるような、嗅神経細胞がほとんど消失し、基底細胞と支持細胞のみが存在する部分が認められた (図 4)。

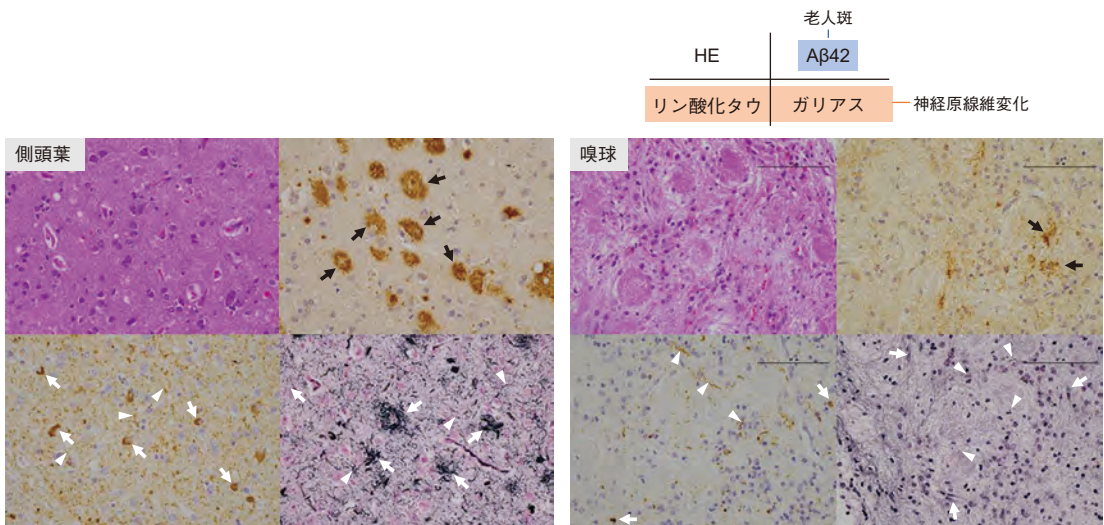


図 3 側頭葉と嗅球の病理組織変化：HE 染色，A $\beta$ 42 染色（老人斑），リン酸化タウ染色，ガリアス染色（神経原線維変化）<sup>10)</sup>

黒矢印：老人斑，白矢印：神経細胞，白矢頭：神経軸索

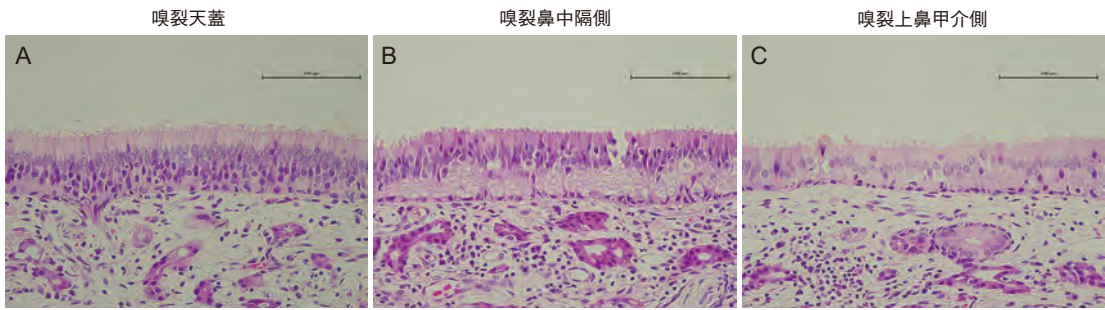


図4 嗅上皮の病理組織変化 (HE 染色)<sup>10)</sup>

A: 基底細胞と2～3層の嗅神経細胞と支持細胞が確認できる (嗅裂天蓋). B: 嗅神経細胞が減少し, 繊維性構造物が認められる (鼻中隔側). C: 基底細胞と支持細胞が目立ち, 嗅神経細胞が乏しい上皮 (上鼻甲介側).

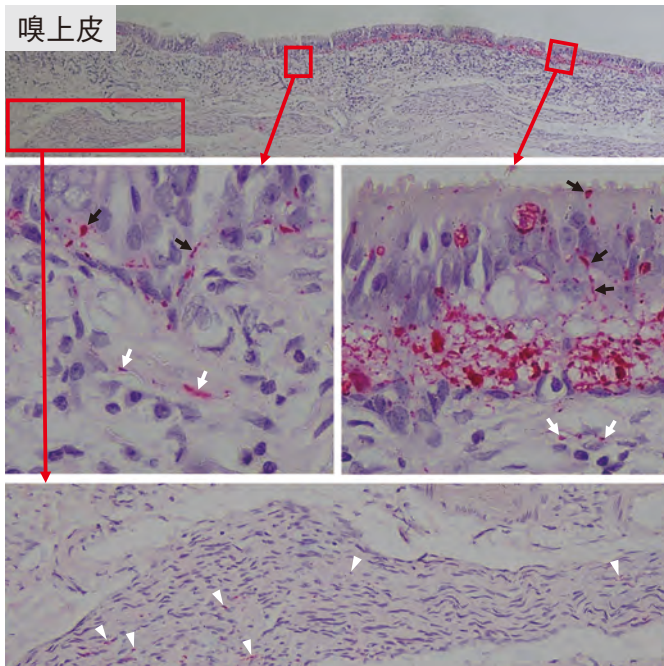


図5 嗅上皮のリン酸化タウに対する免疫染色<sup>10)</sup>

嗅上皮の神経原線維変化や変性した嗅神経細胞, 鼻腔に伸びる樹状突起 (黒矢印) と粘膜固有層の神経軸索 (白矢印), 深部を走行する神経軸索 (白矢頭) に病的なリン酸化タウが認められる.

免疫染色ではアミロイドβ陽性の老人斑は認められず, 嗅神経細胞が置換された線維組織はリン酸化タウ陽性でガリアス染色陽性の神経原線維変化そのものであった. 詳細に観察すると, 嗅上皮の神経原線維変化は嗅神経細胞に沿って, 粘膜固有層の神経軸索, さらに嗅糸に連続して存在した (図5). 嗅神経細胞は周期的に再生される特殊性があり, 変性した細胞は排除あるいは脱落する. したがって, 嗅上皮の神経原線維変化は同時期の脳組織の病理学的変化を反映している. つまり, 鼻腔検体を利用すれば, 発症前の早期の神経病理変化を診断できる可能性が考えられる.

#### 4. 鼻粘膜擦過物を利用したアルツハイマー病 (AD) 診断の可能性

われわれは, 綿棒で採取した鼻粘膜擦過物からADの異常蛋白であるアミロイドβなどを計測する新規の高感度測定法を開発した<sup>11)</sup>. また, 鼻腔検体を採取するための生体組織採取器を開発し (登録番 意匠登録第 1512806 号), 一つの検体からアミロイドβ, タウおよびリン酸化タウを測定する方法について特許 (特許 6883847) を取得した.

そこで, 検査に協力することができる軽症のアルツハイマー病患者と健常高齢者の, 嗅裂, 中鼻

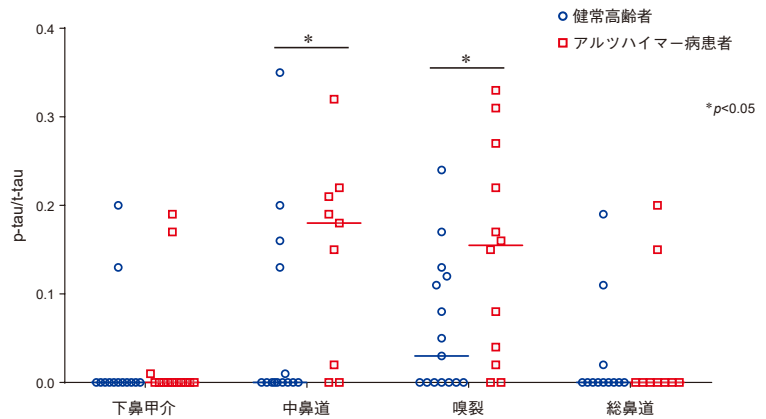


図6 鼻粘膜擦過検体のリン酸化タウ／総タウ比<sup>12)</sup>

軽症のAD患者では健康高齢者に比べて、中鼻道と嗅裂の擦過検体でリン酸化タウ／総タウ比が有意に高い

道、下鼻甲介、総鼻道の4か所から得た鼻粘膜擦過検体を利用して、AD特異的蛋白を測定した。その結果、AD患者では、嗅裂と中鼻道の検体で、リン酸化タウ／総タウ比が健康高齢者に比べて有意に高く、ADの早期診断に役立つ可能性が考えられた(図6)<sup>12)</sup>。

## 5. 神経細胞由来のエクソソームを利用した診断

血液中のエクソソーム由来のアルツハイマー病特異的蛋白を検出して診断に用いる、いわゆるリ

キッドバイオプシーの試みもすすんでいる。神経細胞に特異的な表面抗原を目印に神経細胞由来のエクソソームを分離する技術が一般的になれば、鼻腔で回収した神経細胞由来のエクソソームを用いた診断が可能になる。われわれは、鼻腔洗浄液から回収したエクソソームのプロテオーム解析を行い、中枢神経細胞由来の蛋白が検出されることを確認している(未発表データ)。今後は、発症前の鼻腔擦過検体のエクソソームから疾患特異的マーカーを検出する方法についても検討をすすめたい。

### まとめ

疑問：鼻粘膜はアルツハイマー病早期診断のターゲットになるか？

答え：若年性アルツハイマー病患者の剖検組織では、脳組織から嗅上皮に連続して神経原線維変化が観察された。また、鼻粘膜擦過検体で測定したリン酸化タウ／総タウ比は、嗅裂および中鼻道において軽症のAD患者では健康高齢者に比べて有意に高かった。嗅上皮はADの神経病理変化を反映し、鼻粘膜擦過検体におけるAD特異的異常蛋白の測定が、ADの早期診断に役立つ可能性が考えられる。

### 文献

1. Aisen PS, Petersen RC, Donohue MC, et al. Clinical core of the Alzheimer's disease neuroimaging initiative: progress and plans. *Alzheimers Dement* 2010;6:239-246.
2. Doty RL, Reyes PF, and Gregor T. Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 1987;18:597-600.
3. Lee JH, Goedert M, Hill WD, et al. Tau proteins are abnormally expressed in olfactory epithelium of Alzheimer patients and developmentally regulated in human fetal spinal cord. *Exp Neurol* 1993;121:93-105.
4. Arnold SE, Lee EB, Moberg PJ, et al. Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2010; 67:462-469.

5. Garcia ECD, Rossaneis AC, Pipino AS, et al. Safety and efficacy of superior turbinate biopsies as a source of olfactory epithelium appropriate for morphological analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020;277:483-492.
6. Paik SI, Seiden AM, Duncan HJ, et al. Human olfactory biopsy: the influence of age and receptor distribution. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;118:731-738.
7. Kameshima N, Yanagisawa D, Tooyama I.  $\beta$ -Amyloid peptide (1-40) in the brain reaches the nasal cavity via a non-blood pathway. *Neurosci Res* 2013;76:169-172.
8. Kameshima N, Nanjou T, Fukuhara T, et al. Correlation of A $\beta$  deposition in the nasal cavity with the formation of senile plaques in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2012;513:166-169.
9. Struble RG, Clark HB. Olfactory bulb lesions in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1992;13:469-473.
10. Shimizu S, Tojima I, Nakamura K, et al. A Histochemical analysis of neurofibrillary tangles in olfactory epithelium, a study based on an autopsy case of juvenile Alzheimer's disease. *Acta Histochem Cytochem* 2022;55:93-98.
11. Nanjo T, Fukuhara T, Kameshima N, et al. Development of a high-sensitivity method for the measurement of human nasal A $\beta$ 42 (techniques and methods). *J Brain Sci* 2013;42:5-20.
12. Liu Z, Kameshima N, Nanjo T, et al. Development of a high-sensitivity method for the measurement of human nasal A $\beta$ 42, tau, and phosphorylated tau. *J Alzheimers Dis* 2018;62:737-744.



# V アルツハイマー型認知症により味覚機能は低下するか？

## —濾紙法と電気味覚検査による検討—

アルツハイマー型認知症患者では、食欲低下や異食などの食行動の異常がみられる。施設の職員から、入居しているアルツハイマー病（AD：Alzheimer's disease）患者が食事を味わうことができているのだろうかかと相談があり、AD患者の味覚機能について検討した。ADでは、早期から嗅覚障害を伴いやすく、そのほか視覚、聴覚などの感覚器障害が合併することが知られているが、味覚機能への影響については十分解明されていない。

### 1. 味覚の中樞伝達経路

アルツハイマー型認知症では、脳に神経原線維変化が生じるが、味覚への影響を検討するには、味覚刺激の伝達がどのように行われるのか理解する必要がある。味覚刺激は、末梢において、舌、咽頭、軟口蓋に広く分布する味蕾に存在する味細胞により受容される。味細胞は、I型、II型、III型に分類され、それぞれ味質特異性を有し、受容した味覚情報を顔面神経、舌咽神経、迷走神経の3対の味覚神経を介して、延髄孤束核へ同側性に入力する。

中枢での味覚情報伝達については、サルにおいて、孤束核からの二次ニューロンは同側優位性に上行し、視床後内側腹側核小細胞部に投射する。視床からは前頭弁蓋部から島皮質にかけての領域に神経投射し、さらに、そこから眼窩前頭皮質（12野、13野）に神経投射する。前頭弁蓋部から島皮質にかけての領域が大脳皮質第一次味覚野で、眼窩前頭皮質が第二次味覚野であると考えられる。これら第一次味覚野の島皮質と第二次味覚野は扁桃体にも神経投射し、さらに扁桃体から海馬への神経投射もある。末梢からの味覚情報は、第一次味覚野で処理・識別され、味刺激の弁別、味質、味の強さの情報処理にかかわる。扁桃体は、

味や風味への嫌悪・嗜好にかかわり、第二次味覚野は食物による報酬、嗜好、感性満腹感、嗅覚との統合にかかわる<sup>1)</sup>。

ヒトにおける味覚の中樞処理については十分に解明されていないが、fMRI、PET、MEGといった脳活動を非侵襲的に評価できる技術の開発により、少しずつ明らかになってきた。現在までに、島皮質周辺、前頭弁蓋部、眼窩前頭皮質、扁桃体、帯状回で、味覚に関連した活動が確認されている<sup>2)</sup>。線維化したタウ蛋白が蓄積する神経原線維変化は、通常に加齢性変化でも移行嗅内野や嗅内野に出現するが、アルツハイマー型認知症では、この領域を超えて、海馬、海馬傍回、扁桃、島皮質などにより構成される側頭葉内側部に拡大し、さらに、帯状回後部と楔前部、頭頂連合野といった大脳新皮質連合野全般に拡大していく。これらの領域は、前述した味覚の中樞伝達経路として重要な役割を有し、AD患者の味覚機能に影響を与える可能性がある。

### 2. アルツハイマー型認知症患者の味覚機能検査

AD患者の味覚機能に関する研究では、味覚検査として、濾紙法か全口腔法が選択されている。濾紙法で検討した報告の多くは味覚低下を認めるが、全口腔法による検討では味覚低下を認めていない。これは、検査精度の違いによるものと考えられる。濾紙法は、味溶液をしみこませた濾紙を舌にのせ、舌局所で味を判断するのに対して、全口腔法は、味溶液を舌に滴下して、拡散する味液を口腔全体で判断するので、刺激の空間的加重が加わる。食事の味は口腔咽頭全体で感じるため、全口腔法のほうがより生理的であるが、味覚障害

表1 高齢者とAD(Alzheimer's disease)患者の味覚機能<sup>4)</sup>

	コントロール群 (N = 49)		AD群 (N = 22)
	前期高齢者 (N = 28)	後期高齢者 (N = 21)	
年齢	69 ± 3.4	83 ± 5.7	84 ± 5.9
男性:女性	8:28	5:16	4:19
喫煙率(N)	2	0	3
MMSEスコア	—	—	18 ± 3.8

MMSE: mini mental state examination, 30点満点のうち21点以下で認知症の疑いが強い。

を検出する閾値検査として使用する場合には、濾紙法が優れている。全口腔法による異常検出感度は低く、味覚障害患者101例での検討では、患者の多くで、全口腔法による味覚スコアが、正常人の95%信頼限界内である<sup>3)</sup>。

我が国では、濾紙法に加えて電気味覚検査が使用される。電気味覚検査は、ステンレス製の電極を刺激電極として、直流電流で味覚神経の神経終末を刺激し、定性評価はできないが、21段階の詳細な刺激調整が可能で、味覚の定量検査として世界的に最も優れている。これまで、電気味覚検

査でAD患者の味覚機能を検討した報告はない。

われわれは、認知機能が軽度から中等度のAD患者22例(平均年齢84 ± 5.9歳)と年齢を一致させた自覚的味覚障害がない後期高齢者21例(平均年齢83 ± 5.7歳)、さらに、前期高齢者28例(平均年齢69 ± 3.4歳)の3群で味覚検査を行い、AD患者の味覚機能と、高齢期における味覚の変化について検討した(表1)<sup>4)</sup>。味覚検査は、濾紙法(テストディスク:三和化学)と、電気味覚検査(TR-06:リオン)を用いた。統計解析は、Steel-Dwass法を用いた。その結果、AD患者では、年齢を一致させた対照群(後期高齢者群)と比較して、電気味覚検査による味覚閾値は同程度であったが(図1)、濾紙法による味覚閾値は、甘味・塩味・酸味・苦味すべての味質で有意に高く、味覚機能が低下していた(図2)。この結果、AD患者の味覚機能低下の病態として、味覚刺激の末梢受容器からの伝達障害ではなく、より中枢における味質の質的認識力が低下している可能性があり、味覚刺激の識別力低下にかかわる第一次味覚野である島皮質や弁蓋部の活動低下が関与していることが推測された。また、後期高齢者群では、

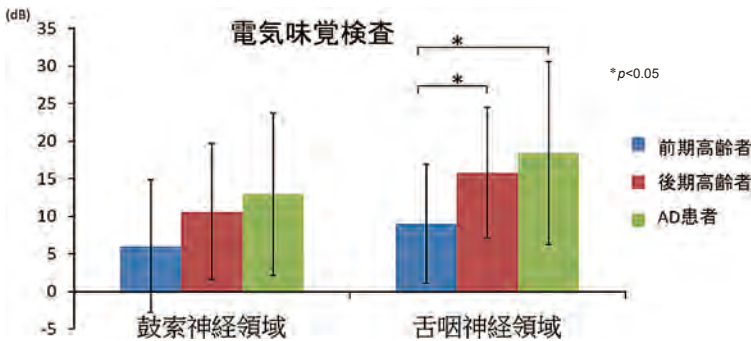


図1 電気味覚検査による高齢者とAD患者の味覚機能<sup>4)</sup>

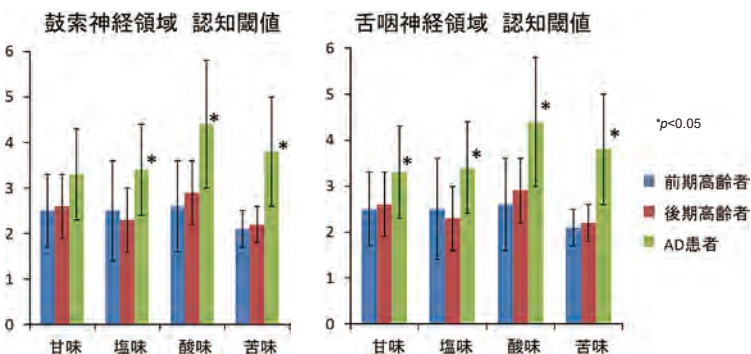


図2 濾紙法による高齢者とAD患者の味覚機能<sup>4)</sup>

前期高齢者群と比較して、電気味覚検査閾値は高値であったが、濾紙法による味覚閾値は同等であったことから、60代以降に起こる味覚の加齢

性変化は緩やかであると考えられる。したがって、60代以降の高齢期に進行する味覚機能の低下はAD患者の臨床症状の一つと考えられる。

## まとめ

**疑問：アルツハイマー型認知症により味覚機能は低下するか？**

**答え：アルツハイマー病（AD）患者では、電気味覚検査による味覚閾値には変化がないが、濾紙法ではすべての味質に対する味覚閾値が上昇していた。その病態として、味覚刺激の末梢受容器からの伝達障害ではなく、より中枢における味質の質的認識力が低下している可能性が考えられる。**

## 文献

1. 齋藤幸子, 小早川達 (編) : 味嗅覚の科学 ; 人の受容体遺伝子から製品設計まで. 食と味嗅覚の人間科学, 朝倉書店, 東京, 2018, p. 87-104.
2. Kobayakawa T, Saito S, Goto N. Temporal characteristics of neural activity associated with perception of gustatory stimulus intensity in humans. *Chemosensory Perception* 2012;5:80-86.
3. 富田寛 (編) : 味覚障害の全貌. 診断と治療社, 東京, 2011, p.159-161.
4. Ogawa T, Irikawa N, Yanagisawa D, et al. Taste detection and recognition thresholds in Japanese patients with Alzheimer-type dementia. *Auris Nasus Larynx* 2017;44:168-173.



## 第 6 章

### COVID-19 の疑問

- I. カニクイザルの嗅上皮における感染病態は？
- II. ブレインフォグと呼ばれる中枢神経症状は嗅上皮を介した感染が原因か？
- III. 抗ウイルス作用・免疫調節作用を有する 14, 15 員環マクロライド系抗菌薬は重症化の抑制に有効か？

# Ⅰ カニクイザルの嗅上皮における感染病態は？ —気導性嗅覚障害と嗅神経性嗅覚障害の病理組織変化—

## 1. COVID-19 と嗅覚障害

2019年に中国の武漢から始まった新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、発熱、倦怠感、咳、嗅覚障害などの症状を伴うことが多い。とくに、原因ウイルスである SARS-CoV-2 の感染早期から嗅覚障害が生じやすく<sup>1)</sup>、鼻閉や鼻汁などの鼻炎症状を伴った嗅覚障害もあれば、鼻炎症状なく嗅覚障害のみ発症する場合もある。嗅覚障害の多くは発症後2週間程度で軽快するが、中には数か月以上にわたって後遺症として残存する場合がある。症状の経過や検査所見から、気導性嗅覚障害、嗅神経性嗅覚障害、中枢性嗅覚障害の異なるタイプの嗅覚障害が混在していると考えられる。SARS-CoV-2 は武漢株に始まって、アルファ株、ベータ株、デルタ株、さらにオミクロン株へとさまざまな変異を重ね、それぞれ嗅覚障害の発症頻度が異なる。当初は、欧州で COVID-19 の軽症から中等症例の 86% に嗅覚障害が認められると報告されたが<sup>2)</sup>、最近のオミクロン株では咽頭痛症状が強く、嗅覚障害の発症頻度は 12～36% に減少している<sup>3)~5)</sup>。

我が国では、厚生労働科学特別研究事業による調査（代表、三輪高喜金沢医大教授）で、第4波のアルファ株感染時に 58% で嗅覚障害がみられた。COVID-19 による嗅覚障害の約 80% は 1 か月以内に回復するが、10～20% は長期にわたって後遺症として残存する<sup>6)~8)</sup>。1 か月以内の早期に回復する例は、嗅裂部の浮腫などが原因である気導性嗅覚障害の可能性が高く<sup>9)</sup>、長期に症状が持続する例は、嗅神経性あるいは中枢性嗅覚障害と考えられるが、その発症機序は十分に解明されていない。

SARS-CoV-2 は、エンベロープの最も外側にあるスパイク蛋白が細胞表面の ACE2（Angiotensin-

converting enzyme 2：アンジオテンシン変換酵素 II）に結合し、ウイルスが細胞内に侵入する。また、細胞膜上のセリンプロテアーゼ（TMPRSS2）などの酵素がウイルスの侵入を補助する。ウイルス受容体の ACE2 や TMPRSS2 などは呼吸上皮だけでなく嗅上皮にも発現しているが、SARS-CoV-2 感染でヒトの嗅上皮にどのような神経病理学的変化が生じるかわかっていない<sup>10)</sup>。そこで、ヒトに類似した霊長類のカニクイザルの SARS-CoV-2 感染モデルを利用して、嗅上皮の変化を病理組織学的に検討した。

## 2. SARS-CoV-2 感染カニクイザルモデル

SARS-CoV-2 は、ヒト以外の実験動物ではハムスターとサルなどの霊長類に COVID-19 を発症させる。したがって、動物モデルでの検討が難しく、嗅覚障害の機序も十分解明されていない。嗅上皮の変化についてはハムスターを利用した検討が行われているが、ヒトと類似した組織構造を有する霊長類では検討されていない。

滋賀医科大学動物生命科学研究センターでは霊長類の疾患モデルを用いた幅広い分野の研究が行われている。非臨床試験において霊長類を用いた研究結果は極めて重要である。SARS-CoV-2 感染の病態解明や治療薬の開発においても同様で、2019年末からの COVID-19 パンデミックで、病態の解明や治療薬の開発が急がれる中、滋賀医科大学病理学講座でカニクイザルを用いた SARS-CoV-2 感染モデルが確立された<sup>11, 12)</sup>。このモデルでは、結膜、鼻腔、口腔、気管内に SARS-CoV-2 を感染させるが、感染7日目まで鼻腔内に感染性のあるウイルスが存在することが確認されている。そこで、感染3日目と7日目の嗅上皮の変化

を中心に、病理組織学的検討を行った。

カニクイザルの鼻腔構造は、解剖学的にヒトに類似し、鼻甲介はヒトの上鼻甲介に相当する ethmoturbinate と下鼻甲介に相当する maxilloturbinate が存在する<sup>13)</sup>。嗅上皮は鼻中隔と ethmoturbinate に挟まれた嗅裂部に観察され、一部は ethmoturbinate の外側面にも認められる。嗅裂・鼻甲介・鼻腔底が同時に観察できるように、頭蓋底から鼻腔底までの冠状断切片を作製し、SARS-CoV-2 感染後に生じる炎症病態を観察した。

### 3. SARS-CoV-2 感染による嗅上皮の変化

#### 1) SARS-CoV-2 の局在

ウイルス受容体である ACE2 と TMPRSS2 は、主として嗅上皮の支持細胞とボーマン腺、さらに呼吸上皮細胞に認められた (図 1)。SARS-CoV-2 の N 蛋白に対する免疫染色では、感染 3 日目と 7 日目の早期から、嗅上皮、呼吸上皮ともにウイルス感染細胞が観察され、嗅上皮では支持細胞と嗅神経細胞、さらに粘膜固有層を走行する神経軸索にウイルス蛋白が認められた (図 2, 図 3)。一部の個体では嗅球の糸球体周囲にもウイルス蛋白が存在することを確認した。

図 1 カニクイザルの嗅上皮における OMP 免疫染色 (成熟嗅細胞), ACE2 と TMPRSS2 の免疫染色

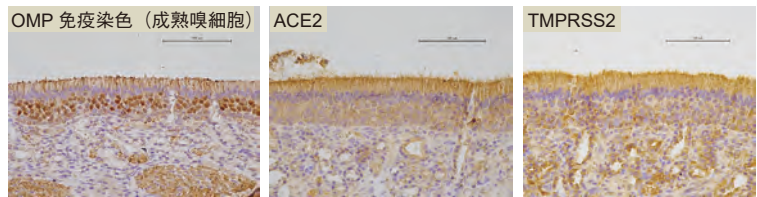


図 2 嗅上皮と呼吸上皮の SARS-CoV-2 (N 蛋白) 免疫染色 (感染 7 日目)

嗅上皮では支持細胞、嗅神経細胞と嗅神経細胞の軸索 (矢印) に、呼吸上皮では上皮細胞にウイルス蛋白が認められる。

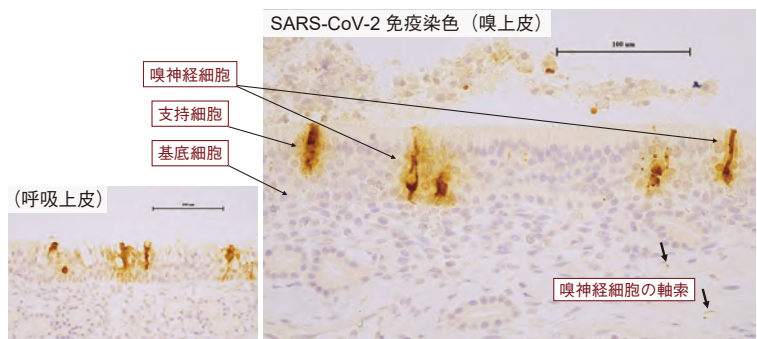
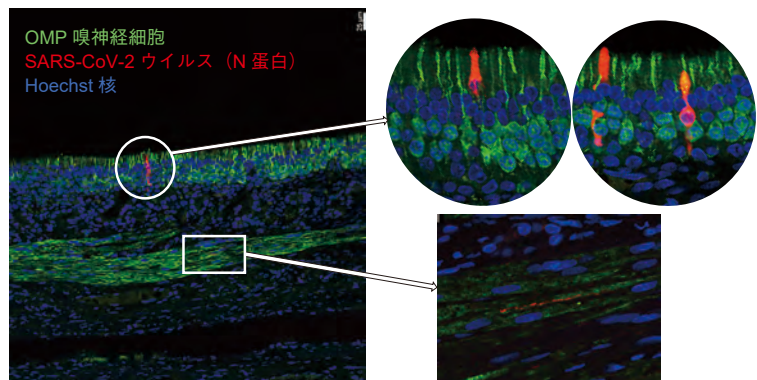


図 3 嗅上皮の蛍光免疫染色 : OMP (嗅神経細胞 : 緑), SARS-CoV-2 N 蛋白 (赤)

支持細胞と嗅神経細胞、粘膜固有層の神経軸索にウイルス蛋白が認められる。



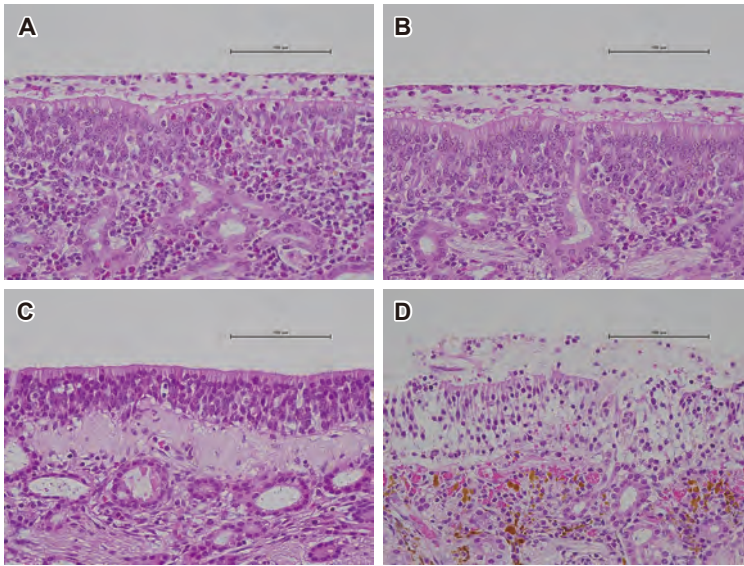


図4 嗅上皮の病理組織変化 (SARS-CoV-2感染7日目:HE染色)

リンパ球浸潤と好酸球浸潤 (A), 粘液の増加と粘液中の炎症細胞の増加 (B), 浮腫や細胞外マトリックスの沈着 (C), 上皮の剥離と毛細血管の拡張 (D) など多彩な炎症所見が観察される。

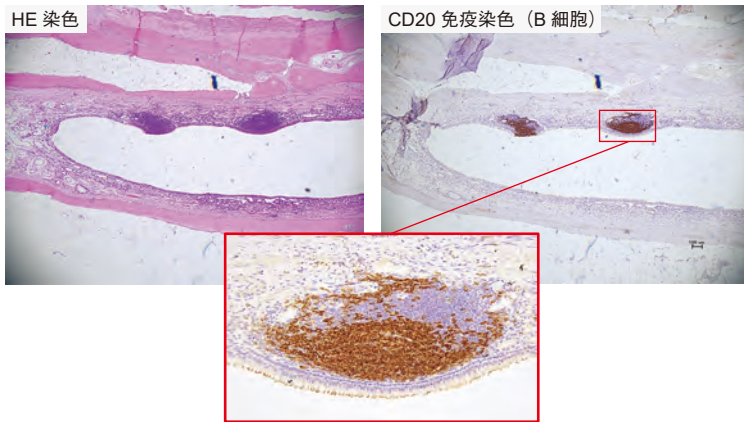


図5 誘導型鼻関連リンパ組織 (iNALT: inducible nose-associated lymphoid tissue) 形成

嗅裂部の嗅上皮・呼吸上皮下にリンパ球の集簇を認める。CD20陽性所見よりリンパ濾胞形成が確認できる。

## 2) 嗅上皮の病理組織学的変化

SARS-CoV-2感染7日目には、嗅上皮にリンパ球や好酸球などの炎症細胞浸潤、粘液の増加、粘液中の炎症細胞の増加、浮腫、細胞外マトリックスの沈着、上皮の剥脱、毛細血管の拡張など多彩な炎症性病理変化が観察され (図4)、また、呼吸上皮にも同様な炎症所見が認められた。COVID-19では直接的あるいは間接的に気導性嗅覚障害と嗅神経性嗅覚障害が生じていると考えられる。さらに、嗅上皮・呼吸上皮で胚中心を有するリンパ球の集簇を確認した。集簇した細胞にはCD20陽性のB細胞が認められ、リンパ濾胞であると考えられる (図5)。こうした変化は嗅裂だけでなく、鼻中隔・鼻甲介・鼻腔底にも認められた。

マウスなどの鼻腔で観察されるNALT

(nasopharynx-associated lymphoid tissue) はヒトの口蓋扁桃やアデノイドに相当する組織であると考えられるが、ヒト鼻粘膜でのリンパ濾胞形成の報告はない。カニクイザルのインフルエンザウイルス感染モデルでは、気管支にBALT (bronchus-associated lymphoid tissue) が観察され、鼻腔擦過検体からはIgAやIgGを含む免疫グロブリンが検出される<sup>14,15)</sup>。また、SARS-CoV-2感染によってもカニクイザルの気管支にBALTが形成される<sup>11)</sup>。今回の検討で、SARS-CoV-2に感染したカニクイザルの鼻粘膜において、誘導型鼻関連リンパ組織 (iNALT: inducible nose-associated lymphoid tissue) が形成されることが初めて明らかになった。また、iNALTに続く上皮直下にはIgGおよびIgA産生細胞が豊富に存在し、IgGは主と



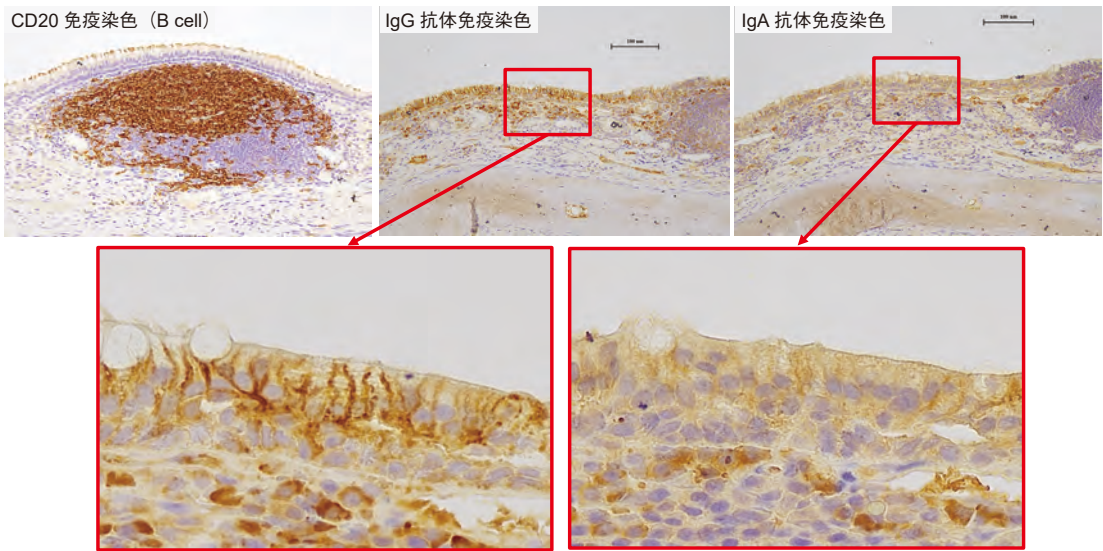


図6 上皮下の IgG 産生細胞と IgA 産生細胞  
iNALT に隣接する上皮下に IgG 産生細胞と IgA 産生細胞が認められる。

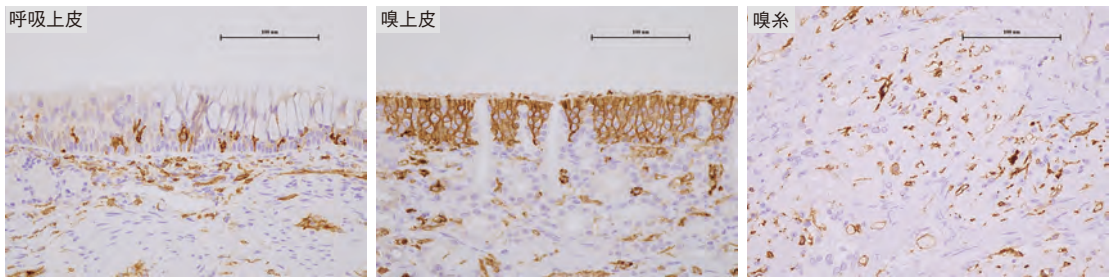


図7 呼吸上皮と嗅上皮，嗅糸の HLA-DR 免疫染色（SARS-CoV-2 感染7日目）

樹状細胞や単球，マクロファージなどとともに，嗅上皮の支持細胞に HLA-DR が発現している。嗅糸の嗅神経軸索と嗅神経鞘細胞周囲に多数の HLA-DR 陽性細胞が認められる。

して上皮細胞の間隙に，IgA は上皮細胞の細胞質と間隙の両方に認められ，活発な免疫反応が生じていることが示唆された（図6）。ウイルス感染早期にヒトの鼻粘膜組織を観察する機会はないが，おそらくヒトにおいても同様の iNALT が存在する可能性が考えられる。

### 3) 免疫担当細胞としての支持細胞の役割は何か？

HLA-DR は MHC クラス II 分子の 1 つで，樹状細胞，単球，マクロファージ，B 細胞，一部の内皮細胞などの抗原提示細胞に発現し，食作用で取り込んだ外来抗原をヘルパー T 細胞などに提示して，免疫応答の開始に重要な役割を果たしてい

る。SARS-CoV-2 感染 7 日目には，呼吸上皮に HLA-DR 陽性の樹状細胞や単球，マクロファージが観察されるが，上皮細胞には HLA-DR は発現しない。一方，嗅上皮では，樹状細胞などとともに，支持細胞に HLA-DR が発現しているが，嗅神経細胞やボーマン腺細胞には発現しない。さらに嗅糸の嗅神経軸索と嗅神経鞘細胞周囲に多数の HLA-DR 陽性細胞が認められた（図7）。つまり，嗅上皮の支持細胞は貪食能とともに，抗原提示能を有し，免疫担当細胞としての役割が考えられる。それでは，

### 「嗅上皮における免疫担当細胞としての支持細胞の役割は何か？」

おそらく嗅上皮から嗅神経を介した頭蓋内感染

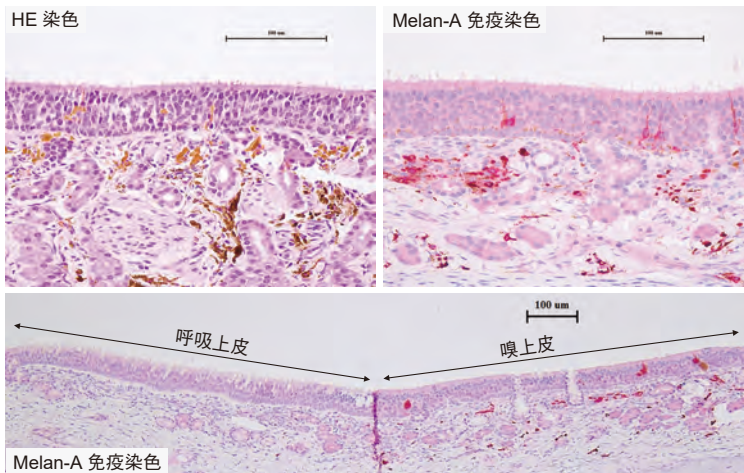


図8 嗅上皮のMelan-A（メラノサイト）免疫染色（SARS-CoV-2感染7日目）

HE染色で、嗅上皮内や基底細胞、粘膜固有層に色素沈着が認められる。色素沈着に一致してメラノサイト（Melan-A陽性）が認められる。こうした変化は嗅上皮だけに認められ、呼吸上皮には認められない。

を防止するため、支持細胞が免疫担当細胞として、生体防御の最前線に存在していると推測される。嗅糸においても多くのHLA-DR陽性細胞が存在し、感染防御に働いていると考えられる。しかしながら支持細胞の免疫における役割や、嗅上皮から嗅糸における免疫応答についてはまだほとんど解明されていない。

#### 4) メラノサイトの役割は何か？

嗅上皮には色素沈着が認められ、臨床的にも嗅上皮の色調が呼吸上皮と異なることは良く知られている。SARS-CoV-2感染により、カニクイザルの嗅上皮の基底細胞層や粘膜固有層を中心に色素

顆粒が増加した。Melan-Aによる免疫染色では、この色素顆粒を有する細胞はメラノサイトであると考えられた（図8）。呼吸上皮ではこうした変化は認められなかった。メラノサイトの役割についてはわかっていないことが多く、とくに嗅上皮におけるメラノサイトについてはその存在自体が報告されていない。

#### 「嗅上皮におけるメラノサイトの役割は何か？」

おそらく炎症病態や神経再生などにおける重要な役割があると推測されるが、今後の大きな検討課題である。

### まとめ

#### 疑問：カニクイザルの嗅上皮における感染病態は？

答え：SARS-CoV-2に感染したカニクイザルでは、感染3日目と7日目の早期に嗅上皮の支持細胞、嗅神経細胞、固有粘膜層の神経軸索にウイルス蛋白が認められる。また、嗅上皮にはリンパ球や好酸球などの炎症細胞浸潤、粘液の増加、粘液中の炎症細胞の増加、浮腫、細胞外マトリックスの沈着、上皮の剥脱、毛細血管の拡張、メラノサイトの浸潤など多彩な炎症性病変が観察される。さらに上皮下には胚中心を伴う誘導型鼻関連リンパ組織（iNALT：inducible nose-associated lymphoid tissue）が形成され、IgA、IgG抗体が産生され、活発な免疫反応が生じている。

嗅上皮の支持細胞にはHLA-DRが発現し、支持細胞は貪食能とともに抗原提示能を有すると考えられた。嗅糸にも多くのHLA-DR陽性細胞が認められ、いずれも嗅上皮から嗅神経を介した頭蓋内感染の防御にかかわる可能性がある。嗅上皮から嗅糸における免疫応答については今後の検討課題である。

## 文献

1. Tong JY, Wong A, Zhu D, et al. The prevalence of olfactory and gustatory dysfunction in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2020;163:3-11.
2. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Sisti DR, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020;277:2251-2261.
3. Brandal LT, MacDonald E, Veneti L, et al. Outbreak caused by the SARS-CoV-2 omicron variant in Norway, November to December 2021. *Euro Surveill* 2021;26:2101147.
4. Boscolo-Rizzo P, Tirelli G, Meloni P, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19)-related smell and taste impairment with widespread diffusion of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) omicron variant. *Int Forum Allergy Rhinol* 2022;12:1273-1281.
5. Vaira LA, Lechien JR, Deiana G, et al. Prevalence of olfactory dysfunction in D614G, alpha, delta and omicron waves: a psychophysical case-control study. *Rhinology* 2023;61:32-38.
6. Riestra-Ayora J, Yanes-Diaz J, Esteban-Sanchez J, et al. Long-term follow-up of olfactory and gustatory dysfunction in COVID-19: 6 months case-control study of health workers. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2021;278:4831-4837.
7. Amer MA, Elsherif HS, Abdel-Hamid AS, et al. Early recovery patterns of olfactory disorders in COVID-19 patients; a clinical cohort study. *Am J Otolaryngol* 2020;41:102725.
8. Mullol J, Alobid I, Mariño-Sánchez F, et al. The loss of smell and taste in the COVID-19 outbreak: a tale of many countries. *Curr Allergy Asthma Rep* 2020;20:61.
9. Eliezer M, Hamel AL, Houdart E, et al. Loss of smell in patients with COVID-19: MRI data reveal a transient edema of the olfactory clefts. *Neurology* 2020;95:e3145-e3152.
10. Bilinska K, Jakubowska P, Von Bartheld CS, et al. Expression of the SARS-CoV-2 entry proteins, ACE2 and TMPRSS2, in cells of the olfactory epithelium: identification of cell types and trends with age. *ACS Chem Neurosci* 2020;11:1555-1562.
11. Ishigaki H, Nakayama M, Kitagawa Y, et al. Neutralizing antibody-dependent and -independent immune responses against SARS-CoV-2 in cynomolgus macaques. *Virology* 2021;554:97-105.
12. Itoh Y. Establishment of a nonhuman primate model for development of vaccines and anti-viral drugs against COVID-19. *Translational and Regulatory Sciences* 2021; advpub.
13. Chamanza R, Taylor I, Gregori M, et al. Normal anatomy, histology, and spontaneous pathology of the nasal cavity of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Toxicol Pathol* 2016;44:636-654.
14. Nakayama M, Ozaki H, Itoh Y, et al. Vaccination against H9N2 avian influenza virus reduces bronchus-associated lymphoid tissue formation in cynomolgus macaques after intranasal virus challenge infection. *Pathol Int* 2016;66:678-686.
15. Nakayama M, Itoh Y, Shichinohe S, et al. Potential risk of repeated nasal vaccination that induces allergic reaction with mucosal IgE and airway eosinophilic infiltration in cynomolgus macaques infected with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. *Vaccine* 2017;35:1008-1017.

## II ブレインフォグと呼ばれる中枢神経症状は 嗅上皮を介した感染が原因か？ —嗅球を介した頭蓋内感染の可能性—

### 1. COVID-19 の中枢神経症状

COVID-19 では、物忘れなどの記憶障害や集中力や気力の低下など、ブレインフォグと呼ばれる中枢神経症状が後遺症として、生活の質を著しく低下させる。嗅覚は記憶と深く結びついた感覚で、嗅覚刺激は嗅上皮から嗅球、嗅皮質へ送られ、さらに嗅内皮質と海馬に伝わり記憶として残る。COVID-19 は嗅覚障害を伴いやすいが、嗅神経系を介した SARS-CoV-2 の頭蓋内感染が、嗅覚中枢を介して記憶中枢に伝播して中枢神経症状が生じる可能性が考えられる。しかしながら、ウイルスの頭蓋内感染経路についてはまだ十分に解明されていない。

鼻腔内投与された種々のウイルスが、嗅上皮から嗅神経を介して嗅球へさらに中枢神経系へ感染することが、多くの実験動物で確認されている。一方で、嗅球はウイルス感染に対してインターフェロンや TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  産生などによる自然免疫、さらにリンパ球浸潤を介した獲得免疫の場として、免疫反応によってウイルスの侵入を防止している可能性も考えられる<sup>1)</sup>。

SARS-CoV-2 では、COVID-19 患者の剖検組織の解析から、嗅球や脳組織にウイルスが存在することが確認されている<sup>2,3)</sup>。また、軽症であっても COVID-19 患者の MRI 検査では、嗅球や嗅覚に関係する脳の萎縮が認められる<sup>4)~6)</sup>。ハムスターを用いた研究でも、SARS-CoV-2 の嗅上皮から嗅神経、嗅球への感染が嗅覚障害と関連する<sup>7)</sup>。こうした結果は、嗅上皮を介した頭蓋内感染の可能性を示唆するが、嗅覚系と関係が乏しい脳幹や小脳にもウイルスが検出されるので、血行性に頭蓋内感染している可能性もある。さらに、中枢神経症状の原因には血栓症などによる脳血管障害

や、ウイルス蛋白に対する免疫反応などの影響も考えられる。

そこで、SARS-CoV-2 感染のカニクイザルモデルを利用して、ウイルスの嗅上皮から嗅球を介した頭蓋内感染の可能性について検討した。

### 2. SARS-CoV-2 の嗅覚系を介した頭蓋内感染の可能性

#### 1) 嗅神経細胞から嗅糸まで

嗅上皮では、SARS-CoV-2 は支持細胞とともに嗅神経細胞にも感染し、粘膜固有層の嗅神経軸索にもウイルスの N 蛋白が認められる (図 1)。しかし、N 蛋白の免疫染色では嗅神経軸索で確認されたウイルスを、中枢側に嗅糸まで追うことができなかった。粘膜固有層では嗅神経鞘細胞が複数の嗅神経軸索を束ねて取り巻くが、嗅神経鞘細胞には変性した軸索の除去や新たな軸索の誘導などの機能があり<sup>8)</sup>、SARS-CoV-2 に感染し変性した嗅神経軸索に対するなんらかの排除機能が働いている可能性も考えられる。

#### 2) 嗅球を介した脳への感染

ヒトの嗅球は前頭蓋底の篩板に接して存在するが、カニクイザルでは前頭蓋底に嗅球が入る陥凹があり、嗅球が取まっている。SARS-CoV-2 の N 蛋白に対する免疫染色では、嗅球の糸球体周囲が陽性で、ウイルスの嗅球への感染が疑われた (図 2)。

そこで、RT-PCR 法でウイルス RNA の検出を試みたところ、感染 3 日目の嗅球では 6 検体中 3 検体、感染 7 日目の嗅球では 22 検体中 12 検体でウイルス RNA を検出した。感染 28 日目の嗅球 3 検体ではいずれも検出されなかった。感染 7 日目の個体の中には、嗅球のウイルス RNA 量が肺組

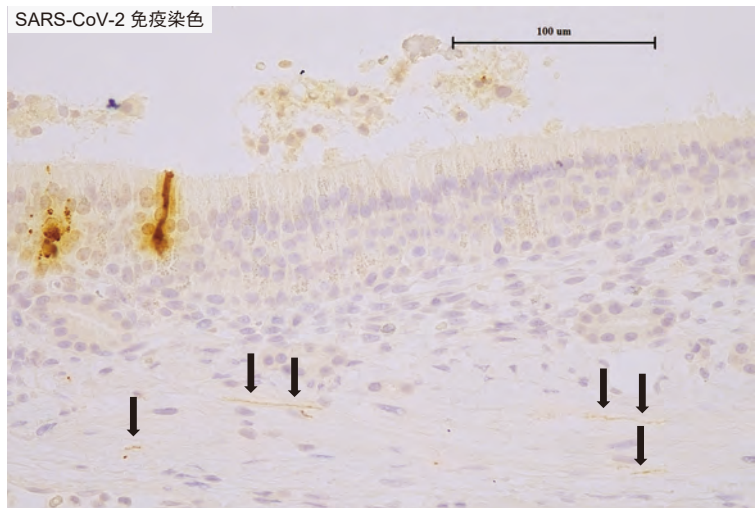


図1 嗅上皮の SARS-CoV-2 (N 蛋白) 免疫染色 (感染 7 日目)  
矢印：嗅神経細胞の軸索にウイルス蛋白が認められる。

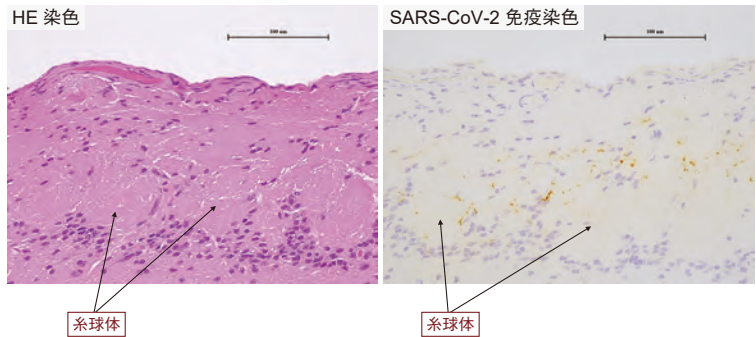


図2 嗅球の SARS-CoV-2 (N 蛋白) 免疫染色 (感染 7 日目)  
糸球体周囲にウイルス蛋白が認められる。

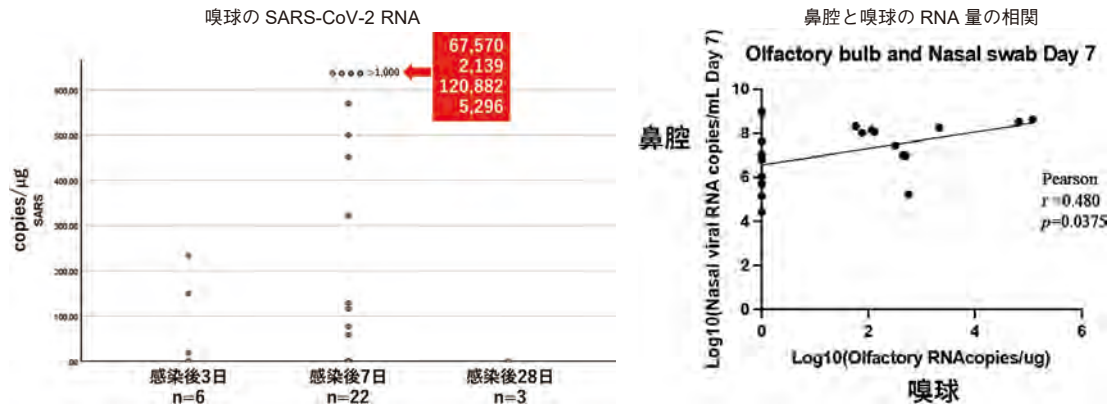


図3 嗅球の SARS-CoV-2 RNA (感染 3, 7, 28 日目) と鼻腔と嗅球のウイルス RNA 量の相関 (感染 7 日目)

織のウイルス RNA 量に匹敵する個体が存在し、鼻腔のウイルス RNA 量と嗅球のウイルス RNA 量との間には正の相関が認められた (図 3)。実際に、ヒトの剖検組織での解析では、発症から日数の短い検体の嗅上皮、嗅球でウイルス RNA 量が多いと報告されている<sup>2)</sup>。

次に、嗅球のウイルス RNA 量が多い 4 個体の脳組織を検討したところ、感染 3 日目と 7 日目の早期から脳内にウイルス RNA が検出されたが、そのコピー数は嗅球で検出されたウイルス RNA に比べると極めて少なかった (図 4)。

今回、脳組織で検出されたウイルス RNA に感

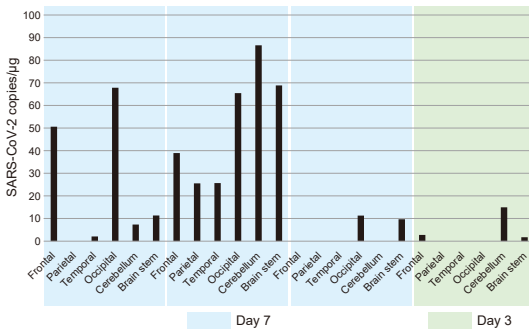


図4 脳組織のSARS-CoV-2 RNA (感染3, 7日目)

染性があるかどうか検討できていないが、感染3日目、7日目の感染早期に嗅上皮から嗅球のルー

トを介してウイルスが頭蓋内に侵入する可能性が考えられる。しかしながら、脳内のウイルスRNA量は嗅球に比べて極めて少ないことから、「嗅球がSARS-CoV-2の頭蓋内感染を防止している可能性？」も考えられる。

また、小脳や脳幹にウイルスRNAが検出されることから、血行性頭蓋内感染の可能性も考えられる。さらに、ウイルス蛋白に対する炎症反応が中枢神経症状の原因である可能性もある。今回、海馬の免疫染色ではウイルス蛋白を検出することができなかったが、今後は嗅内皮質を含めた詳細な検討が必要である。

### まとめ

疑問：ブレインフォグと呼ばれる中枢神経症状は嗅上皮を介した感染が原因か？

答え：嗅神経細胞とその軸索にウイルス蛋白が存在し、嗅球からウイルス蛋白とウイルスRNAが検出され、脳組織においてもウイルスRNAが認められる。検出されたウイルスに感染性があるかどうか不明であるが、ウイルスの侵入ルートとして嗅覚系が関与する可能性が考えられる。一方、侵入したウイルス蛋白への免疫反応が中枢神経症状の原因である可能性もある。

### 文献

1. Durrant DM, Ghosh S, and Klein RS. The olfactory bulb: an immunosensory effector organ during neurotropic viral infections. *ACS Chem Neurosci* 2016;7:464-469.
2. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 2021;24:168-175.
3. Xydakis MS, Albers MW, Holbrook EH, et al. Post-viral effects of COVID-19 in the olfactory system and their implications. *Lancet Neurol* 2021;20:753-761.
4. Chiu A, Fischbein N, Wintermark M, et al. COVID-19-induced anosmia associated with olfactory bulb atrophy. *Neuroradiology* 2021;63:147-148.
5. Griffanti L, Raman B, Alfaro-Almagro F, et al. Adapting the UK biobank brain imaging protocol and analysis pipeline for the C-MORE multi-organ study of COVID-19 survivors. *Front Neurol* 2021;12:753284.
6. Douaud G, Lee S, Alfaro-Almagro F, et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature* 2022;604:697-707.
7. de Melo GD, Lazarini F, Levallois S, et al. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci Transl Med* 2021;13.
8. Li Y, Field PM, and Raisman G. Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *GLIA* 2005;52:245-251.

# III 抗ウイルス作用・免疫調節作用を有する 14, 15 員環マクロライド系抗菌薬は重症化の抑制に有効か？

## —パンデミック感染時における 14, 15 員環マクロライドの役割—

### 1. マクロライド療法と 14, 15 員環マクロライドの免疫調節作用

工藤翔二先生によって発見されたエリスロマイシンの少量長期投与方法は、難治性疾患であったびまん性汎細気管支炎（DPB：diffuse panbronchiolitis）の予後を著しく改善させた<sup>1)</sup>。その後、この作用が抗菌作用によるものではなく、14, 15 員環マクロライドの有する免疫調節作用に由来することが明らかになり、慢性呼吸器疾患に対する 14, 15 員環マクロライドの少量長期投与方法（マクロライド療法）の有用性が確立された。慢性鼻副鼻腔炎に対しては、DPB に併発する症例での有効性が報告されて以来、下気道病変の有無にかかわらず、その優れた臨床効果が多くの研究によって確認された。現在マクロライド療法は、我が国における慢性鼻副鼻腔炎に対する標準的な薬物療法として広く用いられる<sup>2)</sup>。

14, 15 員環マクロライドは、サイトカインやケモカインの産生抑制、粘液分泌抑制、炎症細胞機能の制御、バイオフィーム産生やクオラムセンシング（quorum sensing）といった細菌機能の抑制など、さまざまな免疫調節作用によって炎症の遷延化・慢性化を抑制する<sup>3)</sup>。

われわれは、14 員環のクラリスロマイシンやエリスロマイシン、15 員環のアジスロマイシンに粘液分泌抑制作用があり、鼻粘膜上皮細胞（Air-liquid interface での培養）や気道上皮（NCI-H292）細胞からの、TNF- $\alpha$  刺激（20 ng/ml）による MUC5AC ムチン産生や MUC5AC mRNA 発現を濃度依存性（ $10^{-4}$  ～  $10^{-7}$  M 濃度）に抑制するが、アンピシリンにはこうした作用がないこと、さらに、LPS 点鼻投与（3 日間）で作成した

ラット鼻粘膜炎症モデルや、OVA の腹腔内感作と点鼻投与（3 日間）で作成したアレルギー性炎症ラットモデルで、クラリスロマイシンやエリスロマイシン、アジスロマイシンの経口投与（5 ～ 10 mg/kg 体重）が濃度依存性に鼻粘膜上皮の杯細胞化生、粘液産生、好中球浸潤を抑制すること、16 員環のジョサマイシンやアンピシリンの経口投与ではこうした作用が得られないことを確認している<sup>4)~6)</sup>（図 1）。

臨床的にもクラリスロマイシンによるマクロライド療法は、慢性鼻副鼻腔炎患者の鼻漏や後鼻漏、鼻のかみやすきなど鼻汁関連症状に対する有効性が高く<sup>7)</sup>、好中球機能を制御することから、好中球性炎症が主体の慢性鼻副鼻腔炎に有効である<sup>8)</sup>。一方で、好酸球性鼻副鼻腔炎には効果が乏しい。プラセボを対象とした二重盲検試験で鼻茸を伴わない慢性鼻副鼻腔炎にロキシスロマイシンの少量長期投与の有効性が確認されたが<sup>9)</sup>、対象症例の約半数が喘息を合併し、好酸球性鼻副鼻腔炎が多く含まれる慢性鼻副鼻腔炎に対する、アジスロマイシンの二重盲検試験では有効率が 44% で、プラセボ群の 28% と比較して有意差が認められない<sup>10)</sup>。

### 2. 抗菌作用を持たない新規エリスロマイシン誘導体、EM900 の新たな薬剤としての可能性

マクロライド療法が広く用いられるようになると、長期間投与により耐性菌を誘導する可能性が問題になる。すでに我が国では、肺炎球菌とインフルエンザ菌のほとんどが 14 員環マクロライドに耐性化している。そこで、本来有する抗菌活性

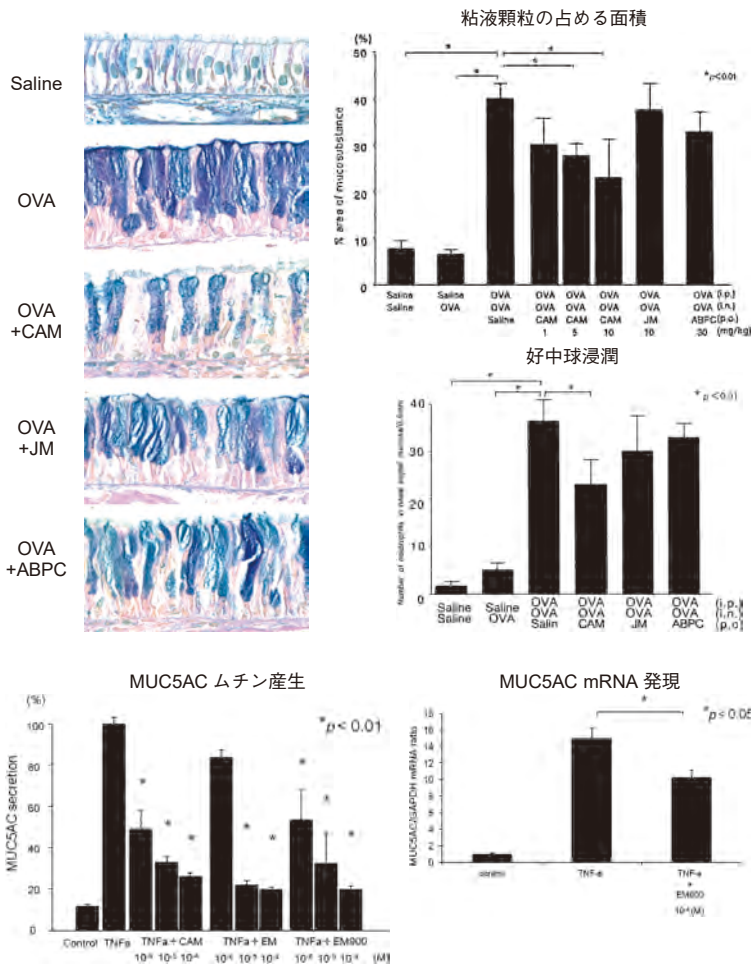


図1 OVAの腹腔内感作と点投与（3日間）で作成したアレルギー性炎症によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生、粘液産生、好中球浸潤に対する、クラリスロマイシン（CAM）、ジョサマイシン（JM）、アンピシリン（ABPC）の経口投与の効果<sup>4)</sup>

図2 培養気道上皮（NCI-H292）細胞からのTNF-α刺激（20 ng/ml）によるMUC5AC ムチン産生とMUC5AC mRNA発現に対するクラリスロマイシン（CAM）、エリスロマイシン（EM）、EM900の抑制作用<sup>13)</sup>

を消失させた新しいエリスロマイシン誘導體、EM900が開発され、その抗炎症作用が期待されている<sup>11, 12)</sup>。

われわれは、EM900がエリスロマイシンやクラリスロマイシンと同様に、 $10^{-4} \sim 10^{-6}$  M濃度で、TNF-α（20 ng/ml）刺激による気道上皮（NCI-H292）細胞からのMUC5AC ムチン産生とmRNA発現を抑制することを確認している（図2）。さらに、EM900（1～10 mg/kg）の内服投与はLPSの3日間点鼻によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生と粘液産生を、クラリスロマイシンと同様に濃度依存性に抑制した<sup>13)</sup>（図3）。以上の結果、EM900にはクラリスロマイシンと同様な粘液分泌抑制作用があり、抗菌作用を有さない免疫調整薬としての可能性が期待できる。

### 3. マクロライド療法と薬剤性QT延長症候群

14, 15員環マクロライドの添付文書には、重大な副作用としてQT延長（QTP）が記載されている。薬剤性のQT延長は、torsade de pointes（TdP）と呼ばれる特徴的な心室頻拍や心室細動などの致命的不整脈を生じて、突然死を引き起こす可能性がある。テネシー州のコホート研究では、アモキシシリン内服では認められないが、アジスロマイシン内服（5日間）は2.88倍の心血管死のリスクが認められる<sup>14)</sup>。デンマークの研究でも、アジスロマイシン内服（5日間）は2.85倍のリスクがあり<sup>15)</sup>、クラリスロマイシンもペニシリンVと比較して2.5倍の心血管死のリスクが報告されている<sup>16)</sup>。2015年～2017年の2年間に米国食品



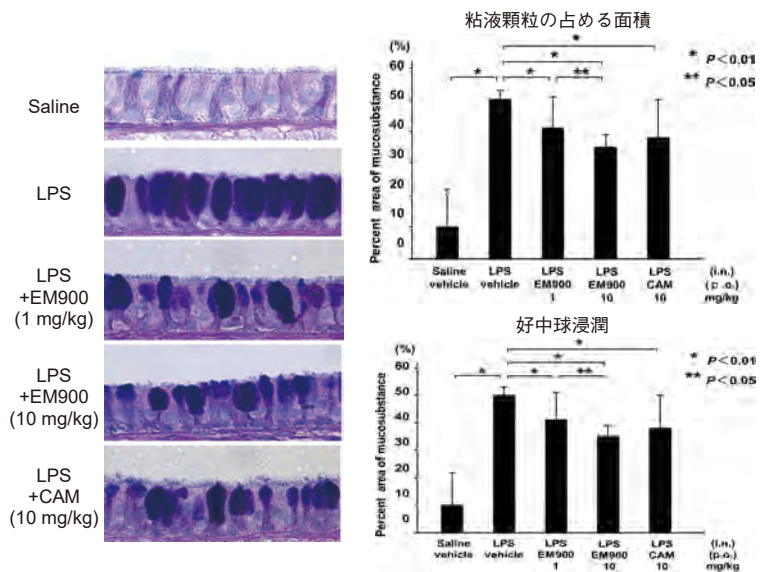


図3 LPS点鼻刺激(3日間)によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生, 粘液産生, 好中球浸潤に対する, EM900とクラリスロマイシン(CAM)の経口投与の効果<sup>13)</sup>

医薬品局 (FDA) に報告されたマクロライドの副作用 4,092 件のうち 108 件が TdP/QTP で<sup>17)</sup>, アジスロマイシンとクラリスロマイシンの投与においてはこうした危険性を認識する必要がある。AHA (American Heart Association) は, リスクのある薬剤の長期投与においては 3 ~ 6 か月に 1 回の心電図検査を薦めている<sup>18)</sup>。

日本循環器学会の遺伝性不整脈の診療に関するガイドライン (2017 年改訂版) によると, TdP/QTP を生じる薬剤として最も多いのが抗不整脈薬で, その発生確率は 2.0 ~ 2.8% である。一方, 抗不整脈薬以外の薬剤による TdP/QTP 発生率は年間 1 人/1 ~ 10 万人と見積もられている。また, 抗不整脈薬以外の薬剤による TdP/QTP 発症には, QT 延長の遺伝的背景が潜在している頻度が高い<sup>19)</sup>。心電図で QT 間隔 (QTc) > 500 ms であれば, QT 延長症候群と診断されるが, 軽度な QT 延長にも十分注意する必要がある。抗不整脈薬との併用投与にはとくに注意が必要である。マクロライド療法では常用量に対する半量投与が行われている。エビデンスはないが, 投与量が少ないと QT 延長のリスクも少なくなると考えられる。我が国では, マクロライド療法時の心電図検査は一般に行われていないが, QT 延長などの心疾患の有無や抗不整脈薬の投与の有無には十分注意する必要がある。

#### 4. 14, 15 員環マクロライドの抗ウイルス作用

DPB に対する治療法として発見されたマクロライド療法は, その後慢性鼻副鼻腔炎を始めとするさまざまな慢性気道疾患に対する有効性が確認され, 慢性気管支炎, 気管支拡張症, 嚢胞性線維症などの治療に用いられている。そのほか, 慢性閉塞性肺疾患 (COPD: chronic obstructive pulmonary disease), 人工呼吸器関連肺炎, 重症肺炎などにおける有効性が検討されている。

COPD 患者にマクロライド療法を行うと, 感冒に伴う急性増悪を生じにくくなることが我が国から報告され<sup>20)</sup>, 米国での大規模な二重盲検試験でアジスロマイシン (250 mg/日) を 1 年間服用した群では, 感冒罹患を抑制して急性増悪を生じる回数が減少することが確認されている<sup>21)</sup>。マクロライドは, ①ウイルスの接着抑制, ②ウイルスの増殖抑制, ③ウイルスに対する過剰な免疫反応の抑制, などのさまざまな抗ウイルス作用を有している。エリスロマイシンやクラリスロマイシンは, 活性酸素や IFN- $\gamma$  による肺傷害を抑制して, インフルエンザウイルス感染マウスの致死率を減少させる<sup>22)</sup>。また, 培養気道上皮細胞におけるライノウイルス, インフルエンザウイルス, RS ウイルスの受容体発現とウイルス RNA の侵入を制御し

て、ウイルスの感染・増殖を抑制することが確認されている<sup>23)~25)</sup>。

インフルエンザウイルス感染症に対する臨床研究も行われ、成人のインフルエンザ A ウイルス感染症に対して、抗ウイルス薬であるオセルタミビルとアジスロマイシンの併用群では、オセルタミビル単独群に比べて発熱と咽頭痛の症状が早期に改善する<sup>26)</sup>。小児のインフルエンザ A 感染症でも、オセルタミビルとクラリスロマイシンの併用投与で咳症状が早期に改善することが報告されている<sup>27)</sup>。しかしながら、オセルタミビルが十分有効なインフルエンザ A 感染症にマクロライドを併用しても、その効果はわずかで臨床的意義は少ない。

もし、より重篤な重症化を生じやすいウイルス感染症であれば、マクロライドは宿主側のサイトカインストームを抑制し、致死的な重症化を抑制できる可能性があり、将来のパンデミックウイルス感染時に有用かもしれない。実際に、人工呼吸器関連肺炎や重症肺炎などの重篤な呼吸器感染症に対する併用効果も報告されている<sup>28, 29)</sup>。また、マクロライドは途上国においても比較的安価に手に入れやすい薬剤である。そこで、現在ヒト-ヒト感染は限定的であるが、極めて高い致死率を有する高病原性トリインフルエンザウイルス感染に注目して、カニクイザルにおける H5N1 および H7N9 トリインフルエンザウイルス感染に対するクラリスロマイシン内服の効果を検討した。

## 5. インフルエンザウイルス・コロナウイルスによるパンデミックの歴史

新型インフルエンザウイルス感染症は 10～40 年の周期で発生し、世界的大流行（パンデミック）を生じている。1918 年にはスペイン・インフルエンザ A (H1N1)、1957 年にアジア・インフルエンザ A (H2N2)、1968 年に香港・インフルエンザ A (H3N2)、1977 年にソ連・インフルエンザ A (H1N1)、そして 2009 年にブタ由来の新型インフルエンザ A (H1N1pdm09) が世界的に流行し、現在は香港・インフルエンザ A (H3N2)

と新型インフルエンザ A (H1N1pdm09) が季節性インフルエンザウイルスとして流行している。

2000 年代になって、コロナウイルスによる新たな感染症も注目され、2002 年 11 月には中国で重症急性呼吸器症候群（SARS：severe acute respiratory syndrome）が発生し、ハクビジンからの感染が推測された。2003 年 7 月には WHO から終息宣言が出されたが、8,098 人が感染し 774 人が死亡した（致死率 9.6%）。2012 年 6 月にはサウジアラビアで中東呼吸器症候群（MERS：middle east respiratory syndrome）が発生し、ヒトコブラクダからの感染が疑われた。2015 年 5 月には韓国で感染が拡大し、12 月に韓国での終息宣言が出されるまでに韓国で 186 人が感染し 38 人が死亡した。MERS は現在でも収束に至らず、2020 年までに 2,490 人が感染し 850 人が死亡している（致死率 15.5%）。2019 年 12 月には武漢で新型コロナウイルス感染症が発生し、COVID-19（coronavirus disease 2019）と名付けられ、現在まで世界中で猛威を振るっている。

一方、家禽から感染する重篤な呼吸器感染症にトリインフルエンザウイルス感染症がある。1997 年に香港で高病原性トリインフルエンザ A (H5N1) ウイルスのヒトへの感染が確認された。当初は家禽からの感染であったが、2003 年には野鳥や渡り鳥にも感染が広がり、東アジア諸国やヨーロッパ・アフリカの一部でヒトへの感染が拡大した。ヒト-ヒト感染はまだ限定的だが、一旦感染すると致死率が高く 2003 年から 2019 年までに 861 人が感染し 455 人が死亡している（致死率 52.8%）。2013 年には中国で、新たな高病原性トリインフルエンザ A (H7N9) ウイルスのヒトへの感染が確認され、2019 年までの 6 年間に中国各地で 1,568 人が感染し 616 人が死亡している（致死率 39.3%）。大変興味深いことに、2018 年からは、高病原性トリインフルエンザウイルス感染症（H5N1, H7N9）が、ほとんどみられなくなった。もしかすると、代わりに COVID-19 がすでに 2018 年頃から中国で流行していた可能性が考えられる。

予想とは異なり COVID-19 のパンデミックが発生したが、われわれは、次にパンデミックを起こ

す致死的な呼吸器疾患として、高病原性トリインフルエンザウイルスのヒト-ヒト感染を考え、その際には 14, 15 員環マクロライドが宿主側のサイトカインストームを抑制し、致死的な重症化を予防できるのではないかと仮説をもとに、カニクイザルを用いてその効果を検討した。

## 6. カニクイザルの高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1, H7N9) 感染に対するクラリスロマイシンの効果

カニクイザルにトリインフルエンザウイルス H5N1 あるいは H7N9 を、鼻腔、口腔、気管内に注入して感染させ、体温、姿勢、呼吸状態、食欲、皮膚症状などをスコア化した臨床症状を 7 日間測定し、7 日目に安楽死させて、肺におけるサイトカイン量 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) を測定した。感染初日からクラリスロマイシン (15 mg/kg) を 7 日間で服させた群 (同時投与群) と感染 3 日前からあわせて 10 日間で服させた群 (予防投与群)

で、クラリスロマイシンの効果を検討した<sup>30)</sup>。

H5N1 感染では、感染翌日から 7 日間発熱が認められるが、クラリスロマイシンの同時投与群、予防投与群では 5 日目から臨床症状の改善とともに有意な解熱傾向が認められ、気管内ウイルス量も有意に減少した。7 日目の肺における IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 産生も抑制され、とくに予防投与群で減少していた (図 4)。H7N9 感染では、臨床症状はそれほど重症化しなかったが、同時投与群で 5 日目から解熱傾向が認められ、気管内ウイルス量が減少し、7 日目の肺における IL-8 と IFN- $\gamma$  産生が有意に抑制された。

以上の結果、クラリスロマイシンは高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の臨床症状を改善させた。また、肺におけるサイトカイン産生を抑制することから、宿主側のサイトカインストームを抑制して致死的な重症化を抑制できる可能性が考えられる。本研究を行った時期には COVID-19 のパンデミックは予測できなかったが、クラリスロマイシンは COVID-19 における致死的な重症化の抑制にも効果がある可能性がある。

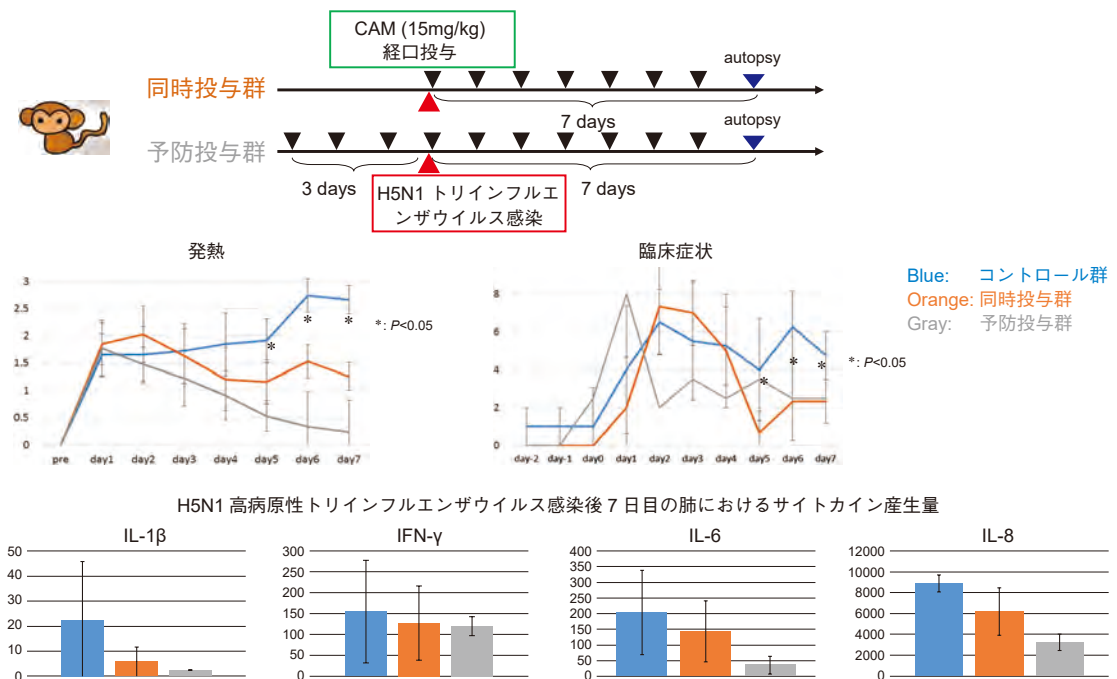


図 4 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させたカニクイザルの臨床症状と、肺におけるサイトカイン産生 (7 日目) に対する、CAM (15 mg/kg) 経口投与 (同時投与と 3 日前からの予防投与) の効果<sup>30)</sup>

## 7. COVID-19における14, 15員環マクロライドの役割

COVID-19に対して、当初は抗マラリア薬であるヒドロキシクロロキンとアジスロマイシンの併用が、ウイルスの早期の消失や致死率の減少に有効であったとする報告<sup>31, 32)</sup>があり、多くの臨床研究が行われた。ただし、その後に行われた臨床研究結果のメタアナリシスによると、その臨床的有効性は十分に確認されていない<sup>33, 34)</sup>。われわれのカニクイザルにおける高病原性鳥インフルエンザ感染症では、クラリスロマイシンの内服投与が肺におけるサイトカイン産生を抑制して重症化を

抑制したが、臨床研究における軽症から重症までの対象患者の違いや、ウイルス亜種による違い、投薬時期や投薬期間の違いによって、結果が異なる可能性が考えられる。COVID-19に対する、クラリスロマイシンの早期投与が臨床症状の改善に有効であったとする報告もあり<sup>35)</sup>、我が国では、COVID-19肺炎に対するクラリスロマイシンの有効性を検討する多施設共同研究も進められている<sup>36)</sup>。14, 15員環マクロライドの抗ウイルス作用や抗炎症作用は、少量長期投与で初めて効果が発揮されるように、即効性や強力な作用は期待できない。有効性の検討においては、どのような患者でいつ投与するかについての検討が重要になる。

### まとめ

**疑問：**抗ウイルス作用・免疫調節作用を有する14, 15員環マクロライド系抗菌薬は重症化の抑制に有効か？

**答え：**14, 15員環マクロライド系抗菌薬には免疫調節作用があり、クラリスロマイシンの内服は、カニクイザルの高病原性トリインフルエンザウイルス（H5N1, H7N9）感染の病状を軽減し、肺におけるサイトカインストームを抑制する。したがって、パンデミック感染時には、抗ウイルス作用とともに宿主側の過剰な免疫反応であるサイトカインストームを抑制して、致死的な重症化を抑制できる可能性がある。しかしながら、現時点では即効性や強力な作用は期待できないので、対象患者や投与時期などについての検討が必要である。

### 文献

1. Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, et al. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1829-1832.
2. Shimizu T, Suzaki H. Past, present and future of macrolide therapy for chronic rhinosinusitis in Japan. *Auris Nasus Larynx* 2016;43:131-136.
3. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:590-615.
4. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, et al. In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:581-587.
5. Shimizu T, Shimizu S. Azithromycin inhibits mucus hypersecretion from airway epithelial cells. *Mediators Inflamm* 2012;2012:265714.
6. Takahashi Y, Shimizu T, Sakakura Y. Effects of indomethacin, dexamethasone, and erythromycin on endotoxin-induced intraepithelial mucus production of rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:683-687.
7. 間島雄一, 坂倉康夫. 慢性副鼻腔炎に及ぼすクラリスロマイシン少量長期投与の効果. 耳展 1997;40:126-132.
8. Fujita K, Shimizu T, Majima Y, et al. Effects of macrolides on interleukin-8 secretion from human nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257:199-204.
9. Wallwork B, Coman W, Mackay-Sim A, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of macrolide in the treatment of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006;116:189-193.

10. Videler WJ, Badia L, Harvey RJ, et al. Lack of efficacy of long-term, low-dose azithromycin in chronic rhinosinusitis: a randomized controlled trial. *Allergy* 2011;66:1457-1468.
11. Sugawara A, Sueki A, Hirose T, et al. Novel 12-membered non-antibiotic macrolides from erythromycin A; EM900 series as novel leads for anti-inflammatory and/or immunomodulatory agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:3373-3376.
12. Sugawara A, Sueki A, Hirose T, et al. Novel 12-membered non-antibiotic macrolides, EM900 series with anti-inflammatory and/or immunomodulatory activity; synthesis, structure-activity relationships and in vivo study. *J Antibiot (Tokyo)* 2012;65:487-490.
13. **Tojima I, Shimizu S, Ogawa T, et al. Anti-inflammatory effects of a novel non-antibiotic macrolide, EM900, on mucus secretion of airway epithelium. *Auris Nasus Larynx* 2015;42:332-336.**
14. Ray WA, Murray KT, Hall K, et al. Azithromycin and the risk of cardiovascular death. *N Engl J Med* 2012;366:1881-1890.
15. Svanström H, Pasternak B, Hviid A. Use of azithromycin and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2013;368:1704-1712.
16. Svanström H, Pasternak B, Hviid A. Use of clarithromycin and roxithromycin and risk of cardiac death: cohort study. *BMJ* 2014;349:g4930.
17. Teng C, Walter EA, Gaspar DKS, et al. Torsades de pointes and QT prolongation associations with antibiotics: a pharmacovigilance study of the FDA adverse event reporting system. *Int J Med Sci* 2019;16:1018-1022.
18. Tisdale JE, Chung MK, Campbell KB, et al. Drug-induced arrhythmias: a scientific statement from the American heart association. *Circulation* 2020;142:e214-e233.
19. Itoh H, Sakaguchi T, Ding WG, et al. Latent genetic backgrounds and molecular pathogenesis in drug-induced long-QT syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009;2:511-523.
20. Suzuki T, Yanai M, Yamaya M, et al. Erythromycin and common cold in COPD. *Chest* 2001;120:730-733.
21. Albert RK, Connett J, Bailey WC, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2011;365:689-698.
22. Sato K, Suga M, Akaike T, et al. Therapeutic effect of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:853-857.
23. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, et al. Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1113-1118.
24. Yamaya M, Shinya K, Hatachi Y, et al. Clarithromycin inhibits type a seasonal influenza virus infection in human airway epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:81-90.
25. Asada M, Yoshida M, Suzuki T, et al. Macrolide antibiotics inhibit respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *Antiviral Res* 2009;83:191-200.
26. Kakeya H, Seki M, Izumikawa K, et al. Efficacy of combination therapy with oseltamivir phosphate and azithromycin for influenza: a multicenter, open-label, randomized study. *PLoS One* 2014;9:e91293.
27. Sawabuchi T, Suzuki S, Iwase K, et al. Boost of mucosal secretory immunoglobulin A response by clarithromycin in paediatric influenza. *Respirology* 2009;14:1173-1179.
28. Rodrigo C, McKeever TM, Woodhead M, et al. Single versus combination antibiotic therapy in adults hospitalised with community acquired pneumonia. *Thorax* 2013;68:493-495.
29. Giamarellos-Bourboulis EJ, Pechère JC, Routsis C, et al. Effect of clarithromycin in patients with sepsis and ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008;46:1157-1164.
30. **Arikata M, Itoh Y, Shichinohe S, et al. Efficacy of clarithromycin against H5N1 and H7N9 avian influenza a virus infection in cynomolgus monkeys. *Antiviral Res* 2019;171:104591.**
31. Gautret P, Lagier JC, Parola P, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents* 2020;56:105949.
32. Arshad S, Kilgore P, Chaudhry ZS, et al. Treatment with hydroxychloroquine, azithromycin, and combination in patients hospitalized with COVID-19. *Int J Infect Dis* 2020;97:396-403.
33. Ghazy RM, Almaghraby A, Shaaban R, et al. A systematic review and meta-analysis on chloroquine and hydroxychloroquine as monotherapy or combined with azithromycin in COVID-19 treatment. *Sci Rep* 2020;10:22139.
34. Fiolet T, Guihur A, Rebeaud ME, et al. Effect of hy-

- droxychloroquine with or without azithromycin on the mortality of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2021;27:19-27.
35. Tsiakos K, Tsakiris A, Tsibris G, et al. Early start of oral clarithromycin is associated with better outcome in COVID-19 of moderate severity: the ACHIEVE open-label single-arm trial. *Infect Dis Ther* 2021; 10:2333-2351.
36. Yamamoto K, Hosogaya N, Sakamoto N, et al. Efficacy of clarithromycin in patients with mild COVID-19 pneumonia not receiving oxygen administration: protocol for an exploratory, multicentre, open-label, randomised controlled trial (CAME COVID-19 study). *BMJ Open* 2021;11:e053325.

## 附章

### オンリーワン研究のすすめ

—これから研究を始める若い先生方へ伝えたい  
「研究の心得」—

## オンリーワン研究のすすめ

### —これから研究を始める若い先生方へ伝えたい「研究の心得」—

これまで診療や手術にかかわる教育セミナーは数多く行われているが、研究の考え方や進め方について学ぶ機会はほとんどない。そこで本章では、若い先生方のこれからの研究活動に、少しでもお役に立てることを期待して、私自身の40年近くに及ぶ研究活動を通して学んだ「研究の心得」についてお伝えしたい。

#### 1. 「仮説を立ててそれを検証する研究手法」

私自身はこれまでの研究活動の中で、研究指導を受けた経験がない。三重大学の大学院生のときは、当時の坂倉康夫教授から「滲出性中耳炎の遊出細胞」というテーマを与えられた。誰に相談することもなく、染色法や貯留液の好中球遊走活性および殺菌能などを、基礎の先生に教えを請い、テキストブックや他の論文を参考に実験を行った<sup>1)~3)</sup>。当時はPCRなどの実験手技もなく、今から思うととても恥ずかしいが、少なくとも「自分の頭で考える」ことは身についた。人に言われて行うのではなく、「自分が面白いと思った内容だけを研究テーマにしてきた」ことが、これまで研究を継続することができた一番の要因かもしれない。

大学院卒業後に米国留学の機会をいただいたが、このときに初めて「仮説を立ててそれを検証する研究手法」と「論文作成のための論理的思考法」を知り、遅ればせながらこれが研究かと感じ入った。これから研究を始める先生方は、まずこうした基本的な考え方を知る必要がある。

英語論文を多数読み込めばすぐにこうした考え方に慣れると思うが、とくに論文を書く際には、「仮説を立ててそれを検証していく論理的な思考能力」が要求され、同じ研究内容でも記載方法で

論文の質が異なってくる。日本語論文をそのまま英訳したのでは決して受理されない。レベルが高い雑誌ほど査読内容も厳しいが、受理されなくても投稿を繰り返していくうちに、論文の質の違いや研究の考え方が理解できるようになるので、常に一段レベルが高い雑誌への挑戦を続けることも大切である。

#### 2. 「何ができるか？」ではなく「何をしたいか？」

さて、耳鼻咽喉科医として臨床に携わりながら一流の研究を続けるための唯一の道はオンリーワンを追求することにある。トップワンを争っても基礎の研究者にとっても太刀打ちできない。臨床検体が得やすい利点を生かしてオンリーワンの研究を目指す必要がある。

それには、「何ができるか？」ではなく「何をしたいか？」の発想が重要で、手段や技術から研究を選ぶのではなく、目的を見据えた「大河小説のようなストーリー性のある研究」が理想である。自分の手法でできることだけを行う「茶摘み研究」ではなく、「大樹に次々と花を咲かせて、枝を広げていく研究」を目指したい。そのためには、流行に飛びつかないこと、すでに他領域でわかっていることや論文のためだけの研究に手を出さないこと、などが大切である。たとえば、最新の研究と考えられる内容の多くは、自分がやらなくても必ず目ざとい誰かがすぐ行うので、実績が欲しい先生や学位論文が欲しい先生に任せておけば良い。では、どうすればオンリーワンのテーマを見つけることができるのだろうか？ 少し長くなるが、私自身の経験をお話したい。



### 3. どうすればオンリーワンのテーマを見つけることができるか？

米国留学中、最初は無我夢中で手足を動かしているうちに「病態気道における上皮細胞の再生と分化」というテーマが現われた。従来の形態学だけに頼る研究では細胞分化の過程を認識できないと考え、各種の細胞に特異的な分化マーカーを見つけることから研究を開始した。その結果、各種のレクチンとサイトケラチンに対するモノクローナル抗体の中からいくつかの分化マーカーを見つけることができた<sup>4,5)</sup>。さらに、分化マーカーとして使えるように、ラットの各種気管上皮細胞に対するモノクローナル抗体を作成した<sup>6)</sup>。留学先の研究室ではモノクローナル抗体を作れないので、別の研究室を紹介してもらって研究を進めた。このときに、「何ができるかではなく、目的のために何をすればよいか！」考えることを学んだと思う。

こうして得られた分化マーカーを利用して、1) 移植気管内での細胞分化<sup>7)</sup>、2) 胎児発生時の細胞分化<sup>5)</sup>の研究を行ない、さらに帰国後も3) 機械的傷害時の細胞修復過程の研究<sup>8)</sup>へ発展した。一方で、帰国時にはオンリーワンとなる自分の研究テーマを考えていた。当時の三重大大学耳鼻咽喉科では、米国留学中の1989年に坂倉康夫教授が「上気道液の生理と病態」と題した宿題報告を行い、粘液線毛輸送機能について研究していた。しかし、線毛運動や粘液の性状についての研究が中心で、粘液分泌については研究されていなかった。留学前に行われた検討会で、「粘液分泌の研究が欠如している！」と指摘したことを覚えていた私は、帰国後は「粘液分泌」を研究テーマにしたいと思っていた。

それまで粘液分泌の研究が進んでいなかったのには理由があり、1) 粘液が極めて複雑な性状のため、定量的な測定や粘液の性質の変化を認識する指標がなかったこと、2) 細胞培養を行なうと上皮細胞は脱分化して粘液分泌能を失ってしまうこと、3) 容易で可逆性のある粘液産生・分泌の動物モデルがないこと、などの問題があった。そこで、まず1) ヒトの鼻汁に対するモノクローナル

抗体を作成して定量的な測定や粘液の性状の変化の検討に役立て<sup>9)</sup>、2) Air-liquid interface を利用した新しい培養方法により、粘液分泌能のある細胞培養モデルを確立し<sup>10)</sup>、3) ラット鼻粘膜での粘液産生・分泌モデルを作成する<sup>11,12)</sup>、以上の計画を抱いて帰国したところ、幸いにもそのすべてを実現させることができた。こうした手法を有している研究室はほとんどなかったため、以後の研究はオンリーワンの内容で、競争することなくゆっくり自分のペースで粘液産生や分泌の機序に関する研究<sup>13)~18)</sup>を継続した。やはり、何ができるかではなく、「目的のために何をしたらよいか」という発想が、オンリーワンの研究の秘訣だと思う。

### 4. 疑問を大切に持ち続ける

オンリーワンの研究を見つけるもう一つの秘訣は、「素朴な疑問を大切にすること」にある。自然界の摂理は美しいので、直感的になじまない定説は、まず疑ってみる必要がある。また、疑問は持ち続けることが重要で、5年10年と考え続けているうちに、思いがけないところから答えが生まれ、時代が進歩して解決に導いてくれる。長年にわたって疑問に思っていたことが解決したときは、自然界の真理に触れたような充足感を覚える。

基礎研究者と比較して、耳鼻咽喉科医が有する大きな利点は、「臨床での疑問を有すること」、「臨床検体が容易に手に入ること」、「成果を臨床へ還元させる視点を有すること」にある。こうした点に、耳鼻咽喉科医が研究を続ける意義があり、臨床での素朴な疑問が私たちの研究活動の原点である。一方で、研究の重要性の判断には、「それが臨床にどうかかわるのか？」という冷静な問いかけも必要である。

本書では、私自身がこれまで大切にしてきた、上気道炎症の病態と制御に関する素朴な疑問が、どのように解決され、果たしてその成果が臨床に還元されているか、という視点で、これまでの研究内容を紹介した。いずれの疑問も、最初は全く答えがわからなかったが、10年、20年と研究を続けているうちに、疑問を持ち続けていれば、いつか自然に解決への道が見えてくることがわかっ

てきた。厳しい研究環境の変化の中でも、医局員と地道に研究活動を継続してきたことが、大きな財産になった。

## 5. 予想に反する結果が得られたときこそチャンスであり、大きな発見がある

研究では、「仮説を立てて、それを検証する」中で、しばしば予想に反する結果が得られる。若い先生方は、仮説通りにいかないと研究手技に問題があると考へて、仮説を補強するデータばかり探しがちである。しかし、実際には予想と違ったときこそチャンスであり、最もワクワクする瞬間である。疑問の中に大きな発見が隠れている可能性があり、先入観を捨ててデータを見直し、じっくり考え直して欲しい。

私は、1995～1996年ごろ粘液産生の機序を各種の抑制薬を利用して明らかにしているときに、興味深い現象に出会った。LPS刺激やアレルギー性炎症におけるラット鼻粘膜の粘液産生に何かかかわっているのか検討する目的で、さまざまな薬剤の抑制作用を調べた中で、抗炎症薬であるCOX阻害薬のインドメタシンはLPS刺激による粘液産生を抑制した。しかし、予想に反してインドメタシンはアレルギー性炎症における粘液産生を増加させた<sup>15)</sup>。抗炎症薬が粘液産生を増加させる事実がどうしても理解できず、今であればこの現象に興味を持ってさらに研究をすすめると思うが、当時はこれ以上追及できなかった。ただ、「インドメタシンを投与するとアレルギー性炎症における粘液産生が増加するのは何故か？」という疑問だけ持ち続けていた。

そのうちに、1990年代後半にはアラキドン酸代謝物の受容体が次々にクローニングされ、受容体側からの解析でアラキドン酸代謝物の新たな作用が明らかになり、時代が疑問に追いついてきた。つまり、アラキドン酸代謝物の中には制御系のメディエーターが存在し、インドメタシンはアレルギー炎症に対する制御系メディエーターであるPGE<sub>2</sub>やPGI<sub>2</sub>産生を抑制することでかえって粘液産生を増加させたと考えられる。いわゆる

NSAIDs過敏喘息（アスピリン喘息）のメカニズムと共通し、好酸球性鼻副鼻腔炎の病態とも関連している。この疑問がきっかけになって、それから10～20年後に、PGE<sub>2</sub><sup>19,20)</sup> やリポキシン<sup>21)</sup>、 $\omega$ 3脂肪酸代謝物<sup>22)</sup>、短鎖脂肪酸などの制御系脂質代謝物の研究へ発展した。このように、予想と違う結果が得られたときは、先入観を持たずにデータを見直し、たとえ説明できなくても、疑問を持ち続けてレセプターを発現し続けることが重要で、長年考え続けているうちに、思いがけないところから自然に答えが生まれ、研究が発展する。

## 6. 研究の落とし穴

オンリーワンの研究においては「それがどれくらい重要か？」と言うことを常に判断できる冷静さも要求される。そのためには自分の専門領域のみに興味を集中するのではなく、広い視野で全体を俯瞰できる目を育てる必要がある。自分が解明した事実を強調したいのはよく理解できるが、小さな結果ですべてを説明しがちな視野の狭い内容に陥らない注意が必要で、何が重要かという全体像を見失わないことが大切である。

一般に、耳鼻咽喉科医が研究を行う際は、以下のステップで研究がすすめられる。1) 臨床での疑問と臨床検体を利用した検討から仮説を得る。2) 仮説を *in vitro* の培養細胞などで検討し、次いで *in vivo* の動物モデルで確認する。3) 研究成果を臨床へ還元する視点で研究を発展させる。このうち1) 臨床での疑問や臨床検体の使用と、3) 成果を臨床へ還元させる視点は、耳鼻咽喉科医が基礎の研究者に明らかに優っている点で、研究活動における耳鼻咽喉科医ならではの役割はこうした点に求められる。

研究をすすめるに当たってもう一つ忘れてならないのは、「実験が特殊な環境下で行われている」ことである。細胞培養では癌化した細胞株が使われることが多いが、こうした研究は人体の機能を調べるのにフランケンシュタインのような怪物を使うようなもので、その研究結果には、「特殊な細胞で、ある培養条件のもとで」との但し書きが必要である。この但し書きは、当初は研究者間に

暗黙の了解があっても、いつの間にか普遍的な結果であるように思ってしまう陥穽がある。それでは、正常な培養細胞を用いればよいかと言うと、そうとも言えない難しさがある。気道上皮細胞は培養すると1～2日で分化形態を失って未分化な細胞に脱分化する。Air-liquid interfaceなどの培養法で再分化させることもできるが、やはり「支持細胞のない、特殊な培養液の条件のもとで」との但し書きが必要になる。

実験動物を利用した研究も多いが、やはりヒトと違うことを忘れてはならない。たとえば、マウスの免疫機構とヒトのそれとは多くの点で異なっている。昨今ではノックアウトマウスでの検討がないと一流誌に掲載されにくい、「マウスでは」との但し書きが忘れられていないだろうか？鼻科学の分野でも、マウスやラットにはヒトのような副鼻腔がないし、鼻粘膜上皮の多くは嗅上皮である。粘液分泌の主体になる細胞も異なっている。ヒトの鼻腺は粘液細胞と漿液細胞の混合腺であり、炎症病態では上皮の杯細胞数には変化がないが、腺細胞が増加する。一方、マウスやラットでは粘液腺細胞がないため、杯細胞が粘液分泌の主体をなして、炎症によって容易に杯細胞数が増える特徴がある。こうした違いが忘れられ、むしろ多くは知られないままに研究が行われていないだろうか？

## 7. 新しい疑問

研究を続けていると、最初の疑問は解決しても次々と新たな疑問が生まれ、大樹が枝を伸ばすように研究が発展する。本書の中からも、多くの新しい疑問を見出すことができる。

たとえば、好酸球性鼻副鼻腔炎の鼻茸では、局所で多くのIgE抗体が産生される。IgE抗体はマスト細胞に結合してI型アレルギー反応にかかわるが、慢性好酸球性炎症の病態におけるIgE抗体の役割は十分に解明されていない。産生されるIgE抗体にどのような作用があるのだろうか。

好酸球はさまざまな機能を有していて、興味は尽きない。SARS-CoV-2感染で障害を受けた嗅上皮にも集簇する。細胞傷害性を有する顆粒を含有

するため、生体内で細胞死（ETosis：extracellular trap cell death）することは少ないと考えている。多くの好酸球は鼻腔・腸管など管腔内へ出て細胞死に至ると推測するが、好酸球はどのような機序で鼻腔内へ遊走するのだろうか。

そもそも、舌下に抗原を含ませると、なぜTh2細胞やTfh2細胞が減少し、制御性T・B細胞が誘導されるのだろうか。アナフィラキシーショックが生じないのはなぜだろうか。IgG4は阻止抗体として働いているのだろうか。

嗅上皮にはなぜか色素沈着が認められる。SARS-CoV-2を感染させた嗅上皮ではメラノサイトが増加するが、呼吸上皮ではこうした変化はみられない。内耳の血管条にもメラノサイトが存在するが、皮膚以外のメラノサイトにはどんな役割があるのだろうか。

このように素朴な疑問が次々と湧き上がってくる。疑問を持ち続けて、いつか必ず解明されることを楽しみにしたい。まさに、「学問は最高の娯楽である。」と思う。

## 8. まとめ

若い先生方はまず「仮説を立ててそれを検証する研究手法」を学ぶ必要があるが、こうした考え方は、一流の英語論文を読み質の高い英文雑誌への投稿を繰り返しているうちに、自然に身についてくる。とくに、若い先生方に伝えたい研究の心得として、トップワンではなく「オンリーワン研究」の重要性、「大河小説のようなストーリー性のある研究」を目指すこと、予想外の結果が得られたときこそチャンスであり新しい発見があることを述べた。

オンリーワンのテーマを見つけるためには、「何ができるか？」ではなく「何をしたいか？」の発想、他領域でわかっていることや流行に手を出さないこと、素朴な疑問を大切にすることが重要である。疑問は持ち続けることが大切で、レセプターを発現し続けていれば、いつの日か必ず解決し、時代が疑問に追いついてくる。一方で、研究の落とし穴として、「それがどれくらい重要か？」ということ冷静に判断できる能力が要求され、実

験があくまで特殊な条件下に行われていることを忘れてはならない。

最後に、耳鼻咽喉科医が研究を行うにあたって基礎研究者に優っている点として、「臨床での疑

問」と「臨床検体を利用した検討」から仮説を得ることができること、「研究結果を臨床へ還元する視点」を有することがあり、耳鼻咽喉科医が研究活動を行うことには大きな意義がある。

## まとめ

- 1) これから研究を始める若い先生方に伝えたいこと
  - ・オンリーワン研究の重要性。
  - ・大河小説のようなストーリー性のある研究を目指す。
  - ・予想外の結果が得られたときに、新しい発見が隠れている。
- 2) どうしたらオンリーワンのテーマを見つけることができるか？
  - ・「何ができるか」ではなく「何がしたいか」の発想。
  - ・他領域でわかっていることや、流行に手を出さない。
  - ・疑問を持ち続ける。
- 3) 研究の落とし穴
  - ・*In vitro* 実験の限界。
  - ・実験動物とヒトは違う。
  - ・「それがどのくらい重要か？」判断する広い視野を失わない。

## 文献

1. Shimizu T, Harada T, Majima Y, et al. Bactericidal activity of middle ear effusion on a single isolate of non-typable *Haemophilus influenzae*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1988;16:211-217.
2. Shimizu T, Harada T, Hamaguchi Y, et al. Effects of middle ear effusion on neutrophil function. *Am J Otolaryngol* 1989;10:132-137.
3. Shimizu T. Bacteriology, cytology and chemotactic activity of middle ear effusion. *Mie Med J* 1987;37:107-119.
4. Shimizu T, Nettesheim P, Mahler JF, et al. Cell type-specific lectin staining of the tracheobronchial epithelium of the rat: quantitative studies with *Griffonia simplicifolia* I isolectin B4. *J Histochem Cytochem* 1991;39:7-14.
5. Randell SH, Shimizu T, Bakewell W, et al. Phenotypic marker expression during fetal and neonatal differentiation of rat tracheal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:546-555.
6. Shimizu T, Nettesheim P, Eddy EM, et al. Monoclonal antibody (Mab) markers for subpopulations of rat tracheal epithelial (RTE) cells. *Exp Lung Res* 1992;18:323-342.
7. Shimizu T, Nettesheim P, Ramaekers FC, et al. Expression of "cell-type-specific" markers during rat tracheal epithelial regeneration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:30-41.
8. Shimizu T, Nishihara M, Kawaguchi S, et al. Expression of phenotypic markers during regeneration of rat tracheal epithelium following mechanical injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:85-94.
9. Kishioka C, Shimizu T, Fujita K, et al. Monoclonal antibody-detectable carbohydrate epitopes of human nasal secretions are differentially expressed in tissue and diseases. *Am J Rhinol* 1999;13:37-43.
10. Usui S, Shimizu T, Kishioka C, et al. Secretory cell differentiation and mucus secretion in cultures of human nasal epithelial cells: use of a monoclonal antibody to study human nasal mucin. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:271-277.
11. Shimizu T, Takahashi Y, Kawaguchi S, et al. Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotox-

- in. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1412-1418.
12. Shimizu T, Takahashi Y, Takeuchi K, et al. Role of neutrophil elastase in endotoxin-induced mucus hypersecretion in rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:1049-1054.
  13. Takahashi Y, Shimizu T, Sakakura Y. Effects of indomethacin, dexamethasone, and erythromycin on endotoxin-induced intraepithelial mucus production of rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:683-687.
  14. Fujita K, Shimizu T, Majima Y, et al. Effects of macrolides on interleukin-8 secretion from human nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257:199-204.
  15. Shimizu T, Hirano H, Majima Y, et al. A mechanism of antigen-induced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats. A comparison with lipopolysaccharide-induced mucus production. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1648-1654.
  16. Shimizu T, Hirano H, Shimizu S, et al. Differential properties of mucous glycoproteins in rat nasal epithelium. A comparison between allergic inflammation and lipopolysaccharide stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1077-1082.
  17. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, et al. A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:119-125.
  18. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, et al. In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:581-587.
  19. Hattori R, Shimizu S, Majima Y, et al. EP4 agonist inhibits lipopolysaccharide-induced mucus secretion in airway epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:51-58.
  20. Hattori R, Shimizu S, Majima Y, et al. Prostaglandin E2 receptor EP2, EP3, and EP4 agonists inhibit antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118:536-541.
  21. Shimizu S, Ogawa T, Seno S, et al. Pro-resolution mediator lipoxin A4 and its receptor in upper airway inflammation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2013;122:683-689.
  22. Hara S, Tojima I, Shimizu S, et al. 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammation in cultured human airway epithelium and LPS-induced murine airway inflammation. *Am J Rhinol Allergy* 2022;36:106-114.

## 共同研究者

Paul Nettesheim 教授（故人）（米国国立環境衛生科学研究所 NIH）

紀太博仁教授（Mayo Clinic）

遠山育夫教授（滋賀医科大学神経難病研究センター）

小笠原一誠教授，伊藤靖教授，仲山美沙子先生（滋賀医科大学病理学講座）

木戸博教授（徳島大学先端酵素学研究所）

湯田厚司先生（ゆたクリニック）

### 滋賀医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座（敬称略）

神前英明，戸嶋一郎，小河孝夫，有方雅彦，清水志乃，安岡（竹澤）公美子，菊岡弘高，松本晃治，原思織，中村圭吾，小池（山本）小百合，新井宏幸，富山昌那（琉球大学），村尾拓哉，川北憲人

### 三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室（敬称略）

坂倉康夫（故人），間島雄一，川口信也，高橋志光，田中（岸岡）睦子，白井智子，藤田健一郎，服部玲子，荻原（平野）仁美

## 研究協力者

鈴木宏治教授，ガバザ・エステバン教授（元三重大学医学部分子病態学講座）

伊藤康彦教授（元三重大学医学部微生物学講座）

岡村富夫教授，安屋敷和秀助教授（元滋賀医科大学薬理学講座）

善本知広教授（元兵庫医科大学免疫学講座）

### 滋賀医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座（敬称略）

花満雅一，大脇成広，櫻井弘徳，園田聡，中山潤，小川富美雄，瀬野悟史，柴山将之，永田智也，中嶋大介，星参，高原恵理子，谷鉄兵，入川直矢，大道千奈津，中多祐介，奥由歩，岩崎成仁，加藤智久，小野麻友，立石碧，大江祐一郎，豊川怜子，伊藤千尋，高原亜弥，堀井翔平，須藤智之，上田寛，久保良仁，西口達治，山崎開，樋上雅子，池田智紀，小澤桃子，松山記子

## 執筆協力者（敬称略）

神前英明，戸嶋一郎，小河孝夫，清水志乃，松本晃治，中村圭吾，新井宏幸，村尾拓哉，川北憲人，湯田厚司

## 後援

日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会，日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会滋賀県地方部会，滋賀県耳鼻咽喉科医会，三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室同窓会，滋賀医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室同門会

## 謝辞

臨床講演「上気道炎症の病態と制御—臨床における疑問に挑む—」を第124回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会（2023年）において発表する栄誉を与えていただいた、中川尚志会長ならびに日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会の村上信五理事長はじめ、役員、代議員、会員の先生方に心より感謝申し上げます。また、司会の労をおとりくださいました島根大学名誉教授川内秀之先生に厚く御礼申し上げます。

本モノグラフでは、序章としてまだ臨床の疑問に気づいていなかった米国留学時の研究内容を紹介し、第1章では帰国後に三重大学で行った「粘液分泌」の研究について、第2章から第6章までは、滋賀医科大学での「好酸球性鼻副鼻腔炎」「アレルギー性鼻炎」「舌下免疫療法」「嗅覚味覚障害」「COVID-19」に関する新たな病態研究について、それぞれ臨床における疑問に答える形式で記載しました。時代の変遷とともに新たに湧き上がる疑問に、どのように対応して解明しようとしてきたか、是非楽しみながら読んでいただけると有難いです。まさに、「学問は最高の娯楽である。」と思います。

さらに、附章として「オンリーワン研究のすすめ—これから研究を始める若い先生方へ伝えたい『研究の心得』—」として、第30回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会で講演し、学会誌（耳鼻免疫アレルギー 30:265-269, 2012）に投稿した内容を、加筆修正して掲載しました。若い先生方のこれからの研究活動に、少しでもお役に立つことができれば、望外の喜びです。

「ワールドシリーズを目指せ！」と世界に目を向かせてくれた故坂倉康夫教授、「仮説を立ててそれを検証する」基本的な研究姿勢を学んだ故 Paul Nettesheim 教授、4名の医局員の留学を指導していただき、最新の免疫アレルギー学を教わった紀太博仁教授、アルツハイマー病研究の遠山育夫教授、高病原性トリインフルエンザウイルスやSARS-CoV-2の感染モデルサル研究の小笠原一誠教授、伊藤靖教授、仲山美沙子先生、抗原特異的IgE抗体のAvidity研究の木戸博教授、舌下免疫療法の血液検体の採取・処理と詳細な臨床研究の湯田厚司先生など、多くの共同研究者や研究協力者に助けていただきました、心から感謝し御礼を申し上げます。

また、物心両面でご支援いただいた、日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会滋賀県地方部会、滋賀県耳鼻咽喉科医会、三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室同窓会、滋賀医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室同門会に深謝いたします。

最後に、多忙な教育・診療活動の中で、厳しい研究環境にあってもたゆまずに研究を継続し、長年にわたって協力し支えてくれた医局員の先生、診療や教室の運営を支えてくれた教室スタッフ、歴代秘書の戸嶋（園田）英子さん、平田（荒木）茉莉子さん、松原裕子さん、川村まゆみさん、横井美香さんに、心から感謝申し上げます。

2023年5月  
清水 猛史

研究報告 2023  
上気道炎症の病態と制御  
—臨床における疑問に挑む—

発行日：2023年5月

発行者：清水 猛史

滋賀医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座  
〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町

印刷所：中西印刷株式会社

〒602-8048 京都府京都市上京区下立売通小川東入ル