

論 文 要 旨

IL-4 and TNF- α increased the secretion of eotaxin from cultured fibroblasts of nasal polyps with eosinophil infiltration

〔IL-4 および TNF- α は、好酸球浸潤鼻茸由来線維芽細胞からの eotaxin 分泌を増加させる〕

吉福 孝介

【序論および目的】

鼻茸は慢性副鼻腔炎の一亜型として考えられており、好酸球は鼻茸における炎症細胞の中で最も一般的である。活性化好酸球の著しい集族を伴う鼻茸は極めて難治性であり、しばしば非アトピー性の喘息やアスピリン喘息を伴っている。しかしながら、鼻茸に選択的に好酸球浸潤がおこる機序については不明である。

以前から、eotaxin、RANTES などのケモカインや VCAM-1 などの接着因子は、呼吸粘膜への選択的な好酸球浸潤に重要であることが知られている。鼻茸から分離された線維芽細胞からの VCAM-1 の産生が TNF- α 刺激により増強され、TNF- α 、IL-4、13、エンドトキシンに反応して eotaxin や RANTES も産生する。

しかし、好酸球浸潤の豊富な鼻茸 (Enp) および好酸球浸潤のない鼻茸 (NEnp) における鼻線維芽細胞からの好酸球特異的ケモカインや接着因子の産生の相違については、明らかにされていない。そこで本研究では、Enp および NEnp から分離された鼻線維芽細胞からの eotaxin、RANTES、VCAM-1 の産生について観察し、ケモカインや接着因子の生産レベルを比較することで、鼻茸組織における好酸球浸潤の機序について論じた。

【材料および方法】

①Enp と NEnp の分類

12 人の慢性副鼻腔炎患者から手術により得られた鼻茸組織をホルマリン固定後に H-E 染色し、200 倍で検鏡し好酸球数をカウントした。12 鼻茸検体において、5 検体が好酸球数 100 以上であり、3 検体が好酸球数 10 以上 100 未満であり、4 検体が 10 または少数の好酸球数であった。好酸球数が 10~100 である 3 検体については、本検討から除外し、好酸球数 100 以上を Enp、10 または少数の好酸球数を NEnp とした。

②細胞

内視鏡下鼻内副鼻腔手術により得られたヒト鼻茸から分離培養を行い、第 2 世代目のヒト鼻茸線維芽細胞をすべての実験に用いた。

③ELISA

鼻茸線維芽細胞を TNF- α 、IL-4 で単独あるいは同時刺激、24 時間後の培養上清中の eotaxin、RANTES、VCAM-1 濃度を ELISA 法にて測定した。

④RT-PCR

無刺激の鼻茸線維芽細胞をコントロールとし、TNF- α 単独刺激および TNF- α と IL-4 の同時刺激後に鼻茸線維芽細胞より mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて IL-4mRNA を測定した。

【結果】

①VCAM-1 産生

Enp, NEnp の両者において、TNF- α および IL-4 の同時刺激にて VCAM-1 の産生が著明に増加していた。TNF- α および IL-4 の同時刺激による VCAM-1 産生は TNF- α または IL-4 単独刺激よりも有意に増加しており、相乗効果と考えられた。しかし、NEnp と Enp との間に有意差はなかった。

②RANTES 産生

RANTES の産生は TNF- α 刺激で有意に増強され、IL-4 刺激では変化しなかった。TNF- α および IL-4 の同時刺激による RANTES 産生はコントロール群と比較して高値であったが相乗効果は認められなかった。また、NEnp と Enp との間に有意差はなかった。

③eotaxin 産生

eotaxin の産生は、NEnp、Enp はともに IL-4 刺激で有意に増強され、TNF- α 刺激では増強されなかった。IL-4 刺激による eotaxin 産生は NEnp よりも Enp において著明であり、TNF- α および IL-4 の同時刺激にて著明に増加していた。さらに、TNF- α および IL-4 の同時刺激による eotaxin の産生は、TNF- α または IL-4 単独刺激よりも有意に増加し、相乗効果が認められた。

④IL-4mRNA の発現

IL-4mRNA の発現はコントロール群においても認められ、TNF- α 刺激での増強効果はなかった。また、TNF- α および IL-4 の同時刺激にても IL-4mRNA の有意な亢進はなく、NEnp と Enp との間にも有意差はなかった。

【結論及び考察】

本研究によって、鼻茸線維芽細胞からの eotaxin 産生は IL-4 刺激により誘導され、TNF- α との共刺激により相乗的に増強されることが分かった。また、eotaxin の産生は、NEnp よりも Enp が有意に高く、これに対して、VCAM-1 や RANTES の産生は Enp と NEnp とで有意差を認めなかった。これらの所見から、Enp における好酸球の遊走活性に eotaxin が重要な役割を担い、鼻茸線維芽細胞の eotaxin に対する反応性は NEnp よりも Enp のほうが高く、これが好酸球性副鼻腔炎や鼻茸の病態に深く関与していることが示唆された。

論 文 審 査 の 要 旨

報告番号	医論第 1453 号	氏名	吉福 孝介
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	松山 隆美	河野 嘉文

IL-4 and TNF- α increased the secretion of eotaxin from cultured fibroblasts of nasal polyps with eosinophil infiltration

(IL-4 および TNF- α は、好酸球浸潤鼻茸由来線維芽細胞からの eotaxin 分泌を増加させる)

鼻茸は慢性副鼻腔炎の一亜型として考えられており、好酸球は鼻茸における炎症細胞の中で最も一般的である。活性化好酸球の著しい集族を伴う鼻茸は極めて難治性であり、しばしば非アトピー性の喘息やアスピリン喘息を伴っている。

しかしながら、鼻茸に選択的に好酸球浸潤がおこる機序については不明である。また好酸球浸潤の豊富な鼻茸 (Enp) および好酸球浸潤のない鼻茸 (NEnp) における鼻線維芽細胞からの好酸球特異的ケモカインや接着因子の産生の相違については、明らかにされてはいない。そこで本研究では、Enp および NEnp から分離された鼻線維芽細胞からの eotaxin、RANTES、VCAM-1 の産生について観察し、ケモカインや接着因子の生産レベルを比較することで、鼻茸組織における好酸球浸潤の機序について検討した。

その結果、鼻茸線維芽細胞からの eotaxin 産生は IL-4 刺激により誘導され、TNF- α との共刺激により相乗的に増強されることが分かった。また、eotaxin の産生は、NEnp よりも Enp が有意に高く、これに対して、VCAM-1 や RANTES の産生は Enp と NEnp とで有意差を認めなかった。

以上の結果から、Enp における好酸球の遊走活性に eotaxin が重要な役割を担い、鼻線維芽細胞の eotaxin に対する反応性は NEnp よりも Enp のほうが高く、これが好酸球性副鼻腔炎や鼻茸の病態に深く関与していることが示唆された。

本研究は、難治性の好酸球性副鼻腔炎における eotaxin の役割を明らかにし、今後 eotaxin を標的とした治療戦略の可能性を示唆すると考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1453 号	氏名	吉福 孝介
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	松山 隆美	河野 嘉文
<p>主査および副査の3名は、平成20年1月10日、学位請求者 吉福 孝介君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1：鼻茸は一塊としてあるのか、それとも多発性に存在するのか？また、検体の採取部位あるいは左右で好酸球浸潤の相違はあるのか？ 回答：採取部位の比較検討は行っていない。今回、異なる5視野を検鏡しその平均値を算出したが、その際、観察部位でそれほど好酸球浸潤に差がなかったことから、部位別そして左右で大きな相違はないと思われる。</p> <p>質問2：Enp と NEnp とで好酸球の形態学的相違があったか？ 回答：HE染色で見える限りでは形態学的相違は明らかでなかった。しかし、免疫染色などを行えば、たとえばEG2陽性細胞の頻度などに差があるかもしれない。</p> <p>質問3：今回、100以上をEnp、10以下をNEnpとしているが、これは何らかの基準にもとづくものか？ 回答：これは当科で独自に決めた基準であり、国内外で統一した診断基準は未だ定められていない。</p> <p>質問4：好酸球性副鼻腔炎は難治性疾患と言われているが、本研究では一年以上ステロイドを使用していない症例を対象としていることから、軽症例のみを対象としたと考えてよいか？ 回答：Enp 症例の多くに喘息が合併し、ステロイドが使用されることが少なくない。したがってステロイドの影響を避けるために、これらは対象から除外した。しかし、本研究には、重症例も含まれており、ステロイド未使用例がすべて軽症とは言えない。</p> <p>質問5：ステロイドの使用により、Enpの鼻茸中好酸球浸潤は抑制されるのか？ 回答：<i>in vivo</i> そして <i>in vitro</i> の研究でステロイドやロイコトリエン受容体拮抗薬が好酸球浸潤を抑制することが報告されている。</p> <p>質問6：eotaxinをターゲットにした治療が現在すでに行われているか？ 回答：eotaxin に対する治療薬はまだ検討されていない。しかし、好酸球遊走に関わる他のいくつかの因子に対して臨床試験が行われている。</p> <p>質問7：好酸球以外の炎症細胞、たとえばIL-4を産生する肥満細胞やTNF-αを産生する単球についても観察したか？ 回答：今回は行っていない。重要な問題点であり、今後検討したい。</p> <p>質問8：第2世代の培養細胞を用いているが、それはなぜか？ 回答：第3世代以上の鼻茸線維芽細胞の反応性が弱いという当教室の過去の検討結果にもとずいて、第2世代の細胞で研究を行った。</p> <p>質問9：TNF-αとIL-4の相乗効果を認めているが、IL-4の濃度によって変化するのか？ 回答：予備実験でIL-4の至適濃度を10ng/mlと決めたため、他の濃度では検討していないがその可能性はあると考える。</p>			

質問10 : IL-4に対する反応性を考察するうえで、その受容体の発現を観察しているが、その他にも *in vivo* で様々な刺激を受けて、なんらかの遺伝的な変化がおこっているのではないか。

回答 : 十分に考えられることであり、今後検証したい。

質問11 : Enp と I 型アレルギーの関連性については、どの程度解明されているのか？

回答 : Enp に I 型アレルギーはあまり関与しないと言われているが、全く否定はできない。たとえば真菌や黄色ブドウ球菌に対する IgE 抗体が関与するという報告もある。また、アトピー型が少ないとはいっても多くの症例が喘息を合併し、鼻茸摘出後に尿中のロイコトリエン代謝産物の濃度が低下することが知られている。

質問12 : Enp 症例と NEnp 症例とで末梢血好酸球数に差があるのか

回答 : Enp 症例は NEnp 症例と比較して末梢血好酸球数が多く、また ECP 濃度も高いことが報告されている。

質問13 : 鼻茸中の好酸球は再循環するのか？

回答 : 鼻茸組織内でアポトーシスを起こし、再循環はしないと考えられている。

質問14 : Enp に対して局所ステロイド薬は有効か？

回答 : 鼻茸の縮小効果はあるが消失する事はないと言われている。しかし、最近組織への浸透性が非常に強いステロイド点鼻薬が開発され欧米ではすでにその有効性が報告されている。

質問15 : Enp は術後に再発することはないか？

回答 : 好酸球浸潤が強い鼻茸ほど再発しやすい。そのため、術後に経口ステロイド薬やロイコトリエン受容体拮抗薬を投与している。

質問16 : Enp の発症頻度に都会と田舎で差があるか？

回答 : アレルギー性鼻炎のように都会と田舎で比較した報告はないが、Enp はヨーロッパの先進国に多く、日本でも増加しつつあることから何らかの環境因子が関与していると思われる。

質問17 : 鼻茸内の好酸球は増殖するのか？

回答 : 増殖するか否かについては未だ明らかにされていない。しかし、ロイコトリエンや IL-5 によって好酸球の寿命が延長し、その結果、鼻茸中の好酸球数が増加すると考えられている。

質問18 : 空気中に含まれる Endotoxin や有機物質が喘息を悪化させることが知られているが、これらも Enp の増悪因子となり得るか？また季節的な変化はあるか？

回答 : 鼻処置や鼻洗浄によって改善し、術後再発も抑制できることから鼻腔に入る様々な物質が増悪因子になると考えられるが、それが何かは明らかにされていない。季節的な変化については検討していない。

質問19 : 実験の過程で肥満細胞や単球、血小板などの混入はなかったか？最近、消化管の培養細胞を用いた研究でごくわずかの細胞混入が問題となっている。

回答 : 培養細胞の Purity は 99% と純度の高い細胞を使用した。しかし、1% のレベル以下で混入する細胞とその影響を全く否定することはできない。

質問20 : IL-4 受容体の発現をフローサイトメトリーやウエスタンブロッティングなどを用い、タンパクレベルで観察したか？

回答 : 今回は遺伝子レベルでしか観察していない。今後、そうしたことも含めて、好酸球浸潤の機序を解明したい。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。