

博士論文

好酸球性副鼻腔炎の臨床像及び局所炎症細胞、サイトカイン、
I g Eの動態の解析

馬場信太郎

要旨

好酸球性副鼻腔炎症例の臨床像、炎症細胞、サイトカイン、IgE クラススイッチについて、非好酸球性副鼻腔炎、非副鼻腔炎コントロール症例と比較し検討した。

好酸球性副鼻腔炎症例のポリープにおいて IL-33 のレセプターである ST2 がタンパク、mRNA レベルともに上昇しており、ST2 陽性好酸球も増多していた。IL-33 と ST2 が好酸球性副鼻腔炎の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

好酸球性副鼻腔炎ポリープ局所での IgE へのクラススイッチが示唆され、IgE は主にマスト細胞に存在することが示された。好酸球性副鼻腔炎症例のポリープ局所での IgE 産生細胞は形質細胞であることが示唆された。鼻粘膜局所の IgE 増多は副鼻腔炎の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

目次

1. 序文

1-1. 慢性副鼻腔炎とその治療について	5
1-2. 好酸球性副鼻腔炎について	7
1-3. 副鼻腔炎と IL-33 について	8
1-4. 好酸球性副鼻腔炎の局所 IgE 増多について	10
1-5. 本研究の目的	15

2. 対象と方法

2-1. 好酸球性副鼻腔炎の臨床像の検討	16
2-2. 鼻粘膜組織の検討	
2-2-1. 症例	16
2-2-2. 倫理面への配慮	17
2-2-3. 検体の採取	18
2-2-4. ELISA	18
2-2-5. 免疫染色	19
2-2-6. 二重染色（酵素抗体法）	23
2-2-7. 二重染色（蛍光抗体法）	25

2-2-8. 細胞数計測	26
2-2-9. Real-time 定量 PCR	26
2-2-10. 統計解析	28
3. 結果	
3-1. 好酸球性副鼻腔炎の臨床像	29
3-2. 組織学的研究	
3-2-1. 患者像	33
3-2-2. 鼻粘膜中炎症細胞の組織学的解析	35
3-2-3. 鼻粘膜中の IL-33、ST2 について	39
3-2-4. T reg/Th1/Th2/Th17 の転写因子の発現	46
3-2-5. Th1/Th17/Treg 関連サイトカイン発現について	48
3-2-6. Th2 サイトカインとそのレセプターについて	50
3-2-7. 鼻粘膜中の IgE 動態とそのレセプターについて	52
3-2-8. 鼻粘膜中の IgE クラススイッチと局所での抗体産生で発現する 因子	60
3-2-9. 結果のまとめ	63

4. 考察	
4-1. 好酸球性副鼻腔炎の臨床像	65
4-2. 好酸球性副鼻腔炎のサイトカイン動態	
4-2-1. Th2 サイトカインの動態について	67
4-2-2. サイトカインと IgE クラススイッチについて	70
4-3. 好酸球性副鼻腔炎の細胞動態	
4-3-1. T 細胞動態について	73
4-3-2. IgE と細胞動態について	76
5. 結論	81
6. 謝辞	82
7. 本論文を構成する論文	84
8. 引用文献	85

1. 序文

1-1. 慢性副鼻腔炎とその治療について

慢性副鼻腔炎は副鼻腔の炎症および膿性鼻漏、鼻閉、口呼吸、持続咳、頭痛、頭重感などの症状が 3 か月以上持続するものと定義されており、副鼻腔の炎症は体質や感染、アレルギー、構造的な要因が複雑に影響して発症するものと考えられている[1]。

古典的な慢性副鼻腔炎の病態生理については 1960 年代にドイツで理論構築がなされ、これが現在の内視鏡下手術の基礎となっている[2,3]。これは *osteomeatal complex* 理論と呼ばれ、*osteomeatal complex* とは中鼻道とこれに開口する前頭洞、前部篩骨洞、上顎洞の自然口を一体視した領域を指す概念である（図 1）。副鼻腔が健全な状態を保つには換気と排泄が維持されていることが不可欠であるが、解剖学的に中鼻道と前篩骨蜂巢は構造上狭く、炎症や感染による粘膜肥厚で容易に各副鼻腔の排泄路が閉塞し、洞の炎症が慢性化するとともに、さらに炎症が中鼻甲介の病変を介して後部篩骨洞、蝶形骨洞に進展していく。各副鼻腔粘膜自体は病変が不可逆化しているわけではなく、適切な交通路が再確保されれば自然に正常の状態に復する能力を持っている。病的副鼻腔粘膜の除去はむしろ

る治癒を遅延かつ不完全にさせるので不適切であり、粘膜を温存して排泄路の確保を行うことでより正常に近い治癒が得られる。

この理論に基づいて、現在の慢性副鼻腔炎の治療は以下のような方法で行われている。保存的治療として鼻処置、ネブライザー療法、薬物療法（抗生物質、マクロライド少量長期投与、抗アレルギー薬、点鼻ステロイド）、副鼻腔洗浄が行われており、改善のない場合は手術療法が行われ、構造的な問題の改善を図る。内視鏡下鼻内手術では副鼻腔の排泄口の拡大が目的であり、鼻茸切除、副鼻腔自然口の拡大、対孔の造設などを行う。必要に応じて鼻腔の形態異常の矯正を並行して行い、鼻中隔彎曲の矯正、下鼻甲介粘膜切除を行う。

図1 Osteomeatal complex



黄色の○の部位が Osteomeatal complex。前頭洞、篩骨洞、上顎洞との位置関係を示す。

1-2. 好酸球性副鼻腔炎について

マクロライド系抗生物質と内視鏡下鼻内手術の導入により、慢性副鼻腔炎の治療成績は飛躍的に向上し一時期はこれで慢性副鼻腔炎は制圧されたかのようにとらえられた時期もあったが、そのころからこの両者の治療に抵抗する一群の副鼻腔炎が疾患としてクローズアップされた。2001年に春名ら[4]は好酸球性副鼻腔炎の疾患概念を提唱し、1. しばしば成人発症型の喘息（非アトピー型）に合併する。2. 中鼻甲介周囲（中鼻道、嗅裂）の両側性多発性鼻茸（嗅覚障害がほぼ必発）。3. 副鼻腔病変は篩骨洞中心（ニカワ様の非常に粘度の高い貯留液）。4. 末梢血好酸球の増多。5. 摘出鼻茸組織に著明な活性化好酸球浸潤。6. 難治性の中耳炎を合併することも多い（好酸球性中耳炎）。7. 手術後の鼻茸の再発が多い。8. 再発鼻茸に経口ステロイドが著効する（マクロライド療法に抵抗性）ことを特徴とすると報告した。

欧米においては保存的治療や手術治療に抵抗するポリープ形成を伴う慢性副鼻腔炎 Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNPs) という疾患概念が既に存在し、その特徴は鼻茸中の好酸球浸潤やヘルパーT細胞 type 2 (Th2) 優位の炎症で Interleukin-5 (IL-5) の高発現が特徴とされる [5]。一方で我が国をはじめとする東アジアでは CRSwNPs にはサブタイプが存在するとされており、我

が国における CRSwNPs 症例の半数は前述の好酸球性副鼻腔炎であると報告されている[6,7]。我が国においては CRSwNPs は好酸球性副鼻腔炎 Eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) と非好酸球性副鼻腔炎 Non-eosinophilic chronic rhinosinusitis (non-ECRS) の2つのサブタイプに分類され、好酸球性副鼻腔炎は欧米の CRSwNPs と同様に鼻茸中の好酸球浸潤と Th2 細胞優位の炎症が特徴とされているが、非好酸球性副鼻腔炎はヘルパーT 細胞 type Th1 細胞優位の炎症であると報告されている [6]。しかし、好酸球性、非好酸球性で細胞動態やサイトカインの動態を詳細に比較した検討はまだない。

好酸球性副鼻腔炎の病態生理の詳細は依然不明であり、ステロイド以外に有効な薬物療法も確立していないため、罹患患者は長期間のステロイド内服を余儀なくされ副作用に難渋する例も少なくない。こうした背景から好酸球性副鼻腔炎の病態の解明、治療法の確立は鼻科学に課せられた急務であると考えられる。

1-3. 副鼻腔炎と IL-33 について

近年では IL-33 は Th2 細胞に関連した好酸球性炎症に重要な役割を果たしているという報告[8]や、IL33 レセプター遺伝子の polymorphisms と喘息の重症度と

の関わり[9]が報告されており、アレルギー疾患とのかかわりが注目されている。

IL-33 は、気道上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞や平滑筋細胞で産生されるサイトカインであり、Th2 型のアレルギー性炎症の誘導・増悪に関与することが知られている[10]。IL-1 ファミリーのサイトカインであり、レセプターは ST2 である[11]。IL-33 は Th2 細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、NKT 細胞、NK 細胞より IL-4、IL-5、IL-13 などのサイトカインを分泌させる[11-14]。また、IL-33 は Th2 細胞の増殖や innate lymphoid cell からの Th2 細胞系サイトカインの分泌を促す働きがあると報告されている[15-17]。アレルギー性鼻炎モデルマウスにおいて、IL-33 はアレルゲンの暴露により鼻粘膜上皮細胞より分泌され、くしゃみの誘発、鼻粘膜への好酸球、好塩基球の遊走、マスト細胞からのヒスタミンの遊離、好塩基球からのケモカイン産生促進を誘導すると報告されている[18]。またポリープを伴う慢性副鼻腔炎(CRSwNP)においても鼻粘膜上にの培養細胞に発現が確認されている[19]。ごく最近の報告では Shaw JL ら [20]が、ポリープを伴う慢性副鼻腔炎(CRSwNP)の症例より採取した篩骨洞粘膜で IL-33 のレセプターである ST2 の発現がポリープを伴わない副鼻腔炎、コントロールと比較して亢進していることを報告しており、IL-33 は病的鼻粘膜内の Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s)から IL-13 分泌亢進を促すことを示した。

1-4. 好酸球性副鼻腔炎の局所 IgE 増多について

諸家の報告では CRSwNPs の症例は IL-5 等の Th2 系サイトカインの上昇とともに、ポリープ局所の IgE の著明な上昇を認めており、さらに局所 IgE の上昇は皮膚プリックテストや血清総 IgE 量とは相関しない[21,22]。また、局所の総 IgE 濃度は IL-5, eosinophil cationic protein (ECP)、ロイコトリエン leukotriene (LT) C4/D4/E4 と相関があり[23]、局所での IgE 濃度上昇は好酸球性炎症と相関があることが示唆される。さらに、近年局所にポリクローナル IgE の集積を認める CRSwNPs 症例に抗 IgE 抗体による治療効果が報告されており[24]、これらの所見は局所 IgE 増多が CRSwNPs の病因に寄与していることが示唆される。

IgE や IgE 陽性細胞はどのようにして作られ、鼻粘膜に存在するのか。アレルギー性鼻炎においては以下の3つの経路が提唱されている。

① IgE はほかの部位で産生され、血流もしくはリンパ流によって鼻粘膜に供給される。すなわち、誘導組織と実行組織が別々の組織であるという考え方である。これはマウスに放射性同位元素で標識した IgE を投与すると粘膜に集積することでその可能性が証明されている[25]。

② ほかの場所で IgE にクラススイッチした IgE 産生 B 細胞がリンパ流や血流によって鼻粘膜に動員され、鼻粘膜で IgE 産生を行う。ヒト鼻腔に抗原刺激を

行うと鼻腔洗浄液中に IgE 産生細胞が増加し、抗原特異的 IgE も増加することは証明されている[26]。

③ 鼻粘膜局所で IgE へのクラススイッチが誘導され、そこで IgE 産生が行われる。

B 細胞の免疫グロブリン H 鎖(heavy chain)遺伝子は、 μ (IgM)- δ (IgD)- γ 3(IgG3)- γ 1(IgG1)- α 1(IgA1)- γ 2(IgG2)- γ 4(IgG4)- ϵ (IgE)- α 2(IgA2)の順に各クラスが上流から並び、IgD を除く各クラス遺伝子はそれぞれ定常部をコードする C 領域から構成されている。各クラスの C 領域遺伝子 5' 上流には intervening(I) と呼ばれる領域が存在する (図 2) [27]。

ナイーブな B 細胞である IgM+IgD+B 細胞が各クラスへスイッチを起こす際、スイッチングに先立って特有の転写(transcription)が誘導される[28]。これは I 領域から始まり、C 領域に至るものであるが、転写物自体は germ-line transcript(GLT) と呼ばれ、I 領域での多数のストップコドンの存在によってこの RNA はタンパク質に翻訳されない。この IgE の ϵ GLT 発現は、ヒトの場合は IL-4 で誘導される[29]。GLT の発現はどのクラスへのスイッチングにおいても S 領域間での遺伝子組み換え前に起こり、その発現が染色体構造を変えることによってスイッチングに必須であると考えられている。スイッチが起こった細胞では、この GLT は消滅する (図 3)。

次に、IL-4 の刺激に続いて CD40 リガンドの刺激が加わると、IgE クラスの S ϵ 領域と IgM の S 領域 (S μ) との間で遺伝子組み換えによる DNA の再構成が生じる[30,31]。これは 1 本の染色体上で S 領域を逆向きに並べてループを描き、環状 DNA が胎児型 DNA から欠失することによる。

これら GLT と環状 DNA を証明することは、クラススイッチを直接証明することになる[27]。スイッチした細胞内の GLT と環状 DNA はすぐに分解されてしまい、そこから増殖・分化する細胞は存在しないからである。

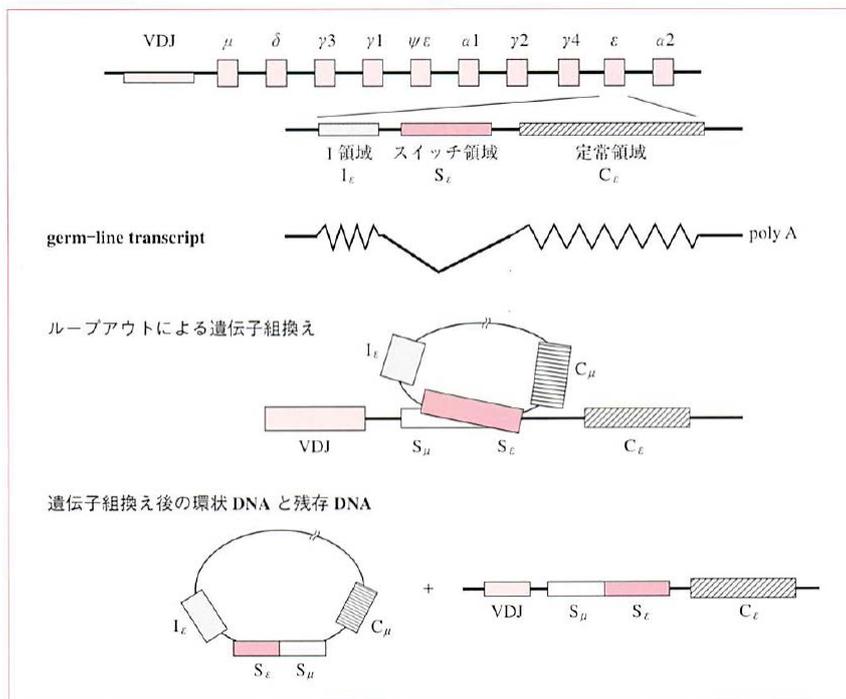


図2 ヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子構造とクラススイッチ機序 文献[27]より

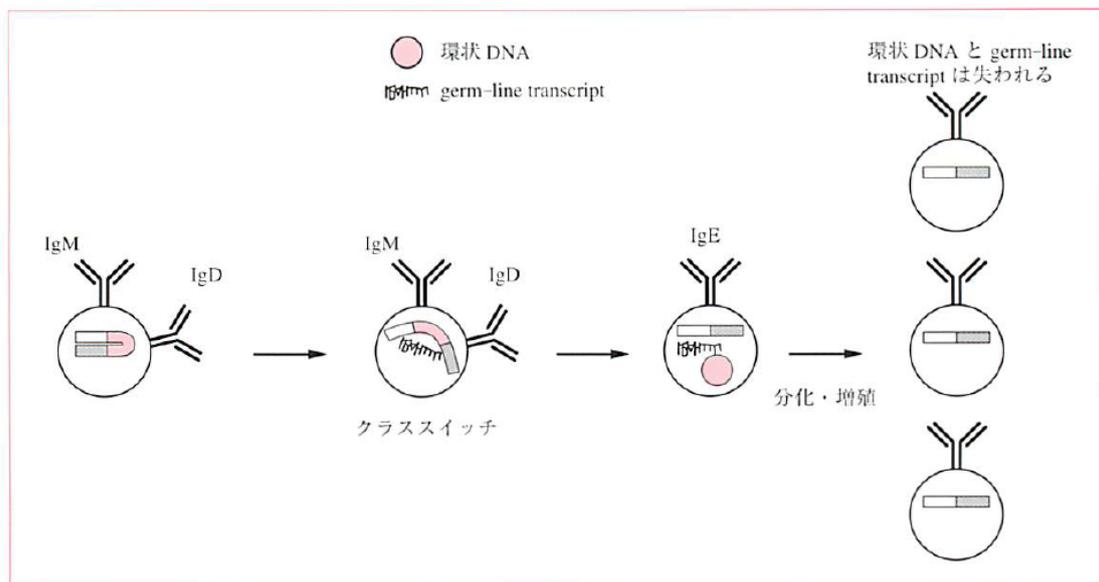


図3 germ-line transcript と環状 DNA のクラススイッチにおける意義 文献[27]より

B 細胞内で抗体が IgM クラスから IgG、IgA、IgE のクラスに転換する過程で、胚中心内でその抗原に反応する B 細胞が再度遺伝子再構成を行い、異なる組み合わせの V 領域遺伝子再構成の組み合わせを生み出す。これを Receptor Editing/Receptor Revision と定義されている。胚中心 B 細胞では centroblast 細胞で初期 B 細胞で限定的に発現する遺伝子切断分子 products of the recombination activating genes : RAG1/RAG2 分子の発現、遺伝子再構成が起こっており[32]、RAG1/RAG2 が Receptor Revision のマーカーとされるようになった[33]。

IgE へのクラススイッチは Th2 細胞より産生される IL-4 か IL-13 の刺激により開始される[34,35]。IL-4 はクラススイッチ誘導に必要な Activation-induced cytidine deaminase (AID) も誘導する[36] [37]。IL-4、13 の刺激に続いて CD40 リガンドの刺激も IgM から IgE のクラススイッチには必須である[38]。クラススイッチはリンパ組織の胚中心で行われ[39]、気道粘膜でも証明されている。近年喘息症例の気道粘膜生検標本において IL-4,13 の上昇、 ϵ germline gene transcripts (ϵ GLTs)の検出による IgE クラススイッチの証明、IgE 高親和性レセプターである Fc ϵ RI mRNA の高発現が報告されており[30,40-44]、さらにアレルギー性鼻炎 allergic rhinitis (AR) [31,45-47] 、CRSwNP [48]症例においても鼻粘膜局所の IgE クラススイッチが証明された。

1-5. 本研究の目的

本研究の目的は好酸球性副鼻腔炎の病態生理の解明である。欧米においては CRSwNPs を対象とした研究は数多いが、好酸球性、非好酸球性で細胞動態やサイトカインの動態を詳細に比較した検討はまだない。まず東京大学耳鼻咽喉科鼻外来の症例を対象として疫学調査を行い、本疾患の臨床像の把握を行った。次に好酸球性副鼻腔炎、非好酸球性副鼻腔炎症例の鼻粘膜における炎症細胞の局在、T 細胞動態の検討、IgE やそのレセプターの局在を免疫組織学的検討、Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) 、 real time-polymerase chain reaction (PCR)にて検討した。鼻粘膜局所の T 細胞動態検索のため、制御性 T 細胞 (T regulatory (Treg) cells)、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞についてそれぞれの転写因子である The expression of forkhead box P3 (FOXP3)、T-box transcription factor (Tbet)、GATA3、retinoid acid-related orphan receptor C (RORc)について mRNA の定量を行った。また、我々は IgE 陽性細胞の種類を同定するため IgE と種々の細胞マーカーを用いて二重染色を施行した。さらに、我々は好酸球性副鼻腔炎症例の鼻ポリープ粘膜内で B 細胞の IgE クラススイッチ、IgE 産生が起こっていることを証明するため、PCR にて Th2 関連サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13、IL-33)、 ϵ GLTs、IgE mature transcript、IgG mature transcript 、AID、RAG1,2 を非好酸球性副鼻腔炎、非副鼻腔炎コントロール群で検討した。

2. 対象と方法

2-1. 好酸球性副鼻腔炎の臨床像の検討

東京大学耳鼻咽喉科鼻外来を 2002 年から 2009 年に受診した好酸球性副鼻腔炎症例、男性 83 例、女性 53 例の計 136 例について臨床像を検討した。好酸球性副鼻腔炎症例の選別基準は①末梢血好酸球分画の最大値が 6%以上、または絶対値が $350/\text{mm}^3$ 以上。②両側鼻内に多発性の鼻茸、または中鼻道周囲の粘膜浮腫を認める。③副鼻腔 CT で篩骨洞優位の副鼻腔陰影を認める[6]。とし以上に該当しないポリープ形成を伴った副鼻腔炎を非好酸球性副鼻腔炎とした。年齢、性別、発症年齢、合併症の有無、血中好酸球などについて検討した。

2-2. 鼻粘膜組織の検討

2-2-1. 症例

CRSwNPs は EAACI position paper [49]に基づき診断した。すなわち、鼻閉、前鼻漏、後鼻漏、顔面痛、圧迫感、嗅覚障害のうち 2 つ以上の症状が 3 か月以

上持続し、かつ内視鏡下にポリープを認める症例を CRSwNPs と診断した。副鼻腔気管支症候群、Churg-Strauss 症候群、Cystic fibrosis の症例は除外した。全症例において少なくとも術前 1 ヶ月はステロイド経口投与をされていないが、数例で抗ヒスタミン薬、マクロライド系抗菌薬を投与されていた。

症例は好酸球性副鼻腔炎群、非好酸球性副鼻腔炎群の 2 群に分けて検討した。

好酸球性副鼻腔炎の診断は病理組織学的に行い、ポリープの粘膜下組織において好酸球数が 400 倍 1 視野あたり 50 個以上を好酸球性副鼻腔炎とし[6]、これに該当しないポリープを伴う慢性副鼻腔炎を非好酸球性副鼻腔炎とした。また非副鼻腔炎症例（前頭洞のう胞 3 例、上顎洞腫瘍 5 例）の鉤状突起を採取し、コントロール群とした。

2-2-2. 倫理面への配慮

好酸球性副鼻腔炎患者の診療録、検査データを用いた後ろ向き研究および患者の鼻汁、鼻粘膜組織、血液等の検体を用いた臨床研究に関してはすでにどちらも東京大学附属病院の倫理審査委員会に申請し、承認済みである（承認番号 2487、2656）。検体を用いた研究に関しては対象症例を意思表示できる成人患者のみとし、本研究に関する標本・摘出物の研究使用について文書を用いて説明し、同意承諾書を文面で得た。個人情報とは特定の管理場所以外で保管しないこ

ととし研究の対象になる患者には新たな ID 番号を作成した。カルテ上の ID 番号との対応表を作成して連結可能な匿名化を行い、対応表についても厳重な管理をした。

2-2-3. 検体の採取

鼻ポリープおよびコントロールの鼻粘膜は内視鏡下鼻副鼻腔手術時に採取した。一部は 10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後、厚さ 4 μ m にスライスし、MAS コートスライドガラス（松浪硝子、大阪）に伸展、接着しヘマトキシリン - エオジン染色、免疫染色に用いた。一部は RNA later®(Life Technologies, Carlsbad, CA, US)で処理し、PCR 解析用検体とし、一部は生標本のまま-80°Cで凍結させ、ELISA 解析用検体とした。数例においては PCR 用と ELISA 用の検体については検体量が十分採取できないものもあった。

2-2-4. ELISA

採取された鼻粘膜は凍結解凍後、約 0.1g に調整し、CellLytic™ MT Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich Japan) 5ml、protease inhibitor cocktail (P8340 Sigma-Aldrich Japan) 50 μ l、benzonase endonuclease (E1014 Sigma-Aldrich Japan) 1 μ l の混合液でホモジェナイズした。ホモジェナイズされたサンプルは 4°C、15,000 回転で 10

分間遠心し、上澄を ELISA 測定に用いた。吸光度は 450nm マイクロプレートリーダーを用いて測定した。IgE、IL-33、ST2 についてタンパク定量を行い、それぞれ abcam 社（東京）のキットを使用した。

2-2-5. 免疫染色

使用した一次抗体は以下の通り。

- ・抗 IgE 抗体 (rabbit polyclonal, against ϵ -Heavy Chain, from Nichirei, Tokyo, Japan)
- ・抗 eosinophil major basic protein (MBP)抗体 (mouse monoclonal, clone BMK-13, Millipore, CA, USA)
- ・抗 Fc ϵ receptor1 抗体 (mouse monoclonal, clone 9E1, from abcam, Tokyo, Japan)
- ・抗 Fc ϵ receptor2 (CD23) 抗体 (mouse monoclonal, clone 1B12, from Nichirei, Tokyo, Japan)
- ・抗 mast cell tryptase 抗体 (mouse monoclonal, clone AA1, Thermo Fisher Scientific, CA, USA)
- ・抗ヒト形質細胞 (plasma cell) 抗体 (mouse monoclonal, clone VS38c, Dako Cytomation Japan, Kyoto, Japan)
- ・抗 CD3 (T 細胞) 抗体 (rabbit monoclonal, clone SP7, Nichirei, Tokyo, Japan)

- ・抗 CD4 抗体 (rabbit monoclonal, clone SP35; Acris Antibodies Inc, San Diego, California)
- ・抗 CD8 抗体 (mouse monoclonal, clone C8/144B; Nichirei, Tokyo, Japan)
- ・抗 CD20 (B 細胞) 抗体 (rabbit monoclonal, clone L26, Nichirei, Tokyo, Japan)
- ・抗 FOXP3 抗体 (mouse monoclonal, clone 236A/E7; abcam, Tokyo, Japan)
- ・抗 IL-33 抗体 (mouse monoclonal, clone Nesy-1, from Alexis Biochemicals, CA, USA)
- ・抗 ST2 抗体 (mouse monoclonal, clone HB12, from Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)

IgE、Fcε receptor1、CD23、mast cell tryptase、形質細胞、CD3、CD4、CD8、CD20、FOXP3、IL-33、ST2 の単染色のため、切片を純キシレンとエタノールの希釈系にて脱水した後 10 mM クエン酸 buffer (pH6.0, Dako Cytomation Japan, Kyoto, Japan) で 121°C、20 分間抗原賦活化目的でオートクレーブした。MBP 染色について抗原賦活化はプロテイナーゼ(Sigma-Aldrich Japan) を 0.5mg/ml Tris-HCl (pH7.6)で希釈したもので常温 3 分浸透させた。次に内因性ペロキシダーゼ活性除去のため 10% 過酸化水素水に室温で浸透させ、その後非特異的な抗体の結合を減少させる目的でブロッキング液(2% ウシ血清アルブミン

(Sigma-Aldrich Japan)、0.1% Triton X-100、0.1% アジ化ナトリウムを含んだ PBS, pH 7.4)に室温 30 分間浸透させた。その後ブロッキング液で希釈した一次抗体を浸透させた。希釈倍率と浸透時間は以下の通り。これらは予備実験の結果決定した。

抗 IgE 抗体 1:750 常温一晩

抗 MBP 抗体 1:50 常温一晩

抗 IL-33 抗体 1:100 常温 4 時間

抗 ST2 抗体 1:100 4° C 一晩

抗 Fcε receptor1 抗体 1:100 4°C 一晩

抗 CD23 抗体 (ready-to-use) 4° C 一晩

抗 mast cell tryptase 抗体 1:2000 常温 1 時間

抗 CD3 抗体 1:400 4°C 一晩

抗 CD4 抗体 1:100 4° C 一晩

抗 CD8 抗体 1:100 4° C 一晩

抗 CD20 抗体 1:100 4° C 一晩

抗 FOXP3 抗体 1:100 4° C 一晩

PBS (pH 7.4)にて数回洗浄後、西洋ワサビペロキシダーゼ (horseradish

peroxidase、HRP)結合抗マウス、またはウサギ IgG 抗体(Simplestain MAX-PO, (M) and (R), ready-to-use; Nichirei, Tokyo, Japan)に常温 30 分浸透させた。抗体の動物種は一次抗体の動物種により決定した。PBS (pH 7.4)で数回洗浄後、ペロキシダーゼ発色のため Diaminobenzidine (DAB) (Simplestain DAB, ready-to-use; Nichirei)に浸透させ、その後蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンで核染色脱水、封入した。陰性コントロールとして一次抗体を除いて染色を行った。この結果非特異的な染色は認めなかった。

2-2-6. 二重染色（酵素抗体法）

MBP と ST2 の二重染色は、双方の抗体の動物種がマウスであり、蛍光二重染色が不可能なため、我々は酵素抗体法による二重染色を選択した。切片を脱パラフィンした後、抗原賦活化のためプロテイナーズ(Sigma-Aldrich Japan) を 0.5mg/ml Tris-HCl (pH7.6)で希釈したもので常温 3 分浸透させた。次に内因性ペロキシダーゼ活性除去のため 10% 過酸化水素水に室温で浸透させ、上記のブロッキング液に室温 30 分間浸透させた。その後ブロッキング液で 50 倍希釈した抗 MBP 抗体を常温で 1 晩浸透させた。PBS (pH 7.4)にて数回洗浄後、西洋ワサビペロキシダーゼ (horseradish peroxidase 、HRP)結合抗マウス IgG 抗体 (Simplestain MAX-PO, Nichirei)に常温 30 分浸透させた。PBS (pH 7.4)で数回洗浄後、ペロキシダーゼ発色のため Diaminobenzidine (DAB) (Simplestain DAB, Nichirei)に浸透させた。PBS (pH 7.4)洗浄後、10 mM クエン酸 buffer (pH6.0, Dako Cytomation Japan) で 121° C、20 分間、二次抗体に対して抗 MBP 抗体を失活させるため[50]、また ST2 抗原賦活化目的でオートクレーブした。PBS (pH 7.4)洗浄後、切片をブロッキング液で 100 倍希釈した抗 ST2 抗体を 4°C で 1 晩浸透させた。さらに PBS (pH 7.4)洗浄後、切片をビオチン標識マウス二次抗体(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)に常温で 30 分浸透させ、PBS 洗浄後アビジン

- ビオチン アルカリフォスファターゼ混合液 (Vectastain ABC-AP Kit; Vector Labs, Burlingame, CA, USA)に常温で 30 分浸透させた。その後アルカリフォスファターゼ発色のため、Vector Red kit (Vector Labs)を使用した。その後蒸留水で洗浄後、脱水、封入した。

Mast cell tryptase と ST2 の二重染色についても双方の抗体の動物種がマウスであるため酵素抗体法で行った。切片を脱パラフィンした後、mast cell tryptase 抗原賦活化目的で 10 mM クエン酸 buffer (pH6.0, Dako Cytomation Japan) で 121° C、20 分間オートクレーブした。上記のごとくブロッキング処理後、ブロッキング液で 2000 倍希釈した抗 Mast cell tryptase 抗体を常温 1 時間切片に浸透させた。PBS (pH 7.4)にて数回洗浄後、西洋ワサビペロキシダーゼ (horseradish peroxidase、HRP)結合抗マウス IgG 抗体(Simplestain MAX-PO, Nichirei)に常温 30 分浸透させた。PBS (pH 7.4)で数回洗浄後、ペロキシダーゼ発色のため Diaminobenzidine (DAB) (Simplestain DAB, Nichirei)に浸透させた。PBS (pH 7.4) 洗浄後、10 mM クエン酸 buffer (pH6.0, Dako Cytomation Japan) で 121° C、5 分間、二次抗体に対して抗 Mast cell tryptase 抗体を失活させる目的でオートクレーブした。以下は抗 MBP 抗体 - 抗 ST2 抗体二重染色と同様の方法で行った。また、抗 CD3 抗体 - 抗 ST2 抗体二重染色は抗 Mast cell tryptase 抗体 - 抗 ST2 抗体二重染色と同様の方法で行った。

2-2-7. 二重染色（蛍光抗体法）

切片を脱パラフィン、抗原賦活処理後、一次抗体である抗 IgE 抗体と抗 mast cell tryptase 抗体を前述のとおり希釈し、4°C一晩浸透させた。その後切片を蛍光標識二次抗体の混合液に浸透させた。抗 IgE 抗体に対してはヤギ抗ウサギ Alexa 488 を、抗 mast cell tryptase 抗体に対してはヤギ抗マウス Alexa 594 抗体 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands)を使用した。核染は DAPI (Molecular Probes)を、切片の封入には Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA)を使用した。

二次抗体の非特異染色がないことを確認するため、切片を一次抗体の代わりにブロッキング液のみで浸透させた後、二次抗体を浸透させたものを作成した。また、一次抗体同士の相互作用がないことを確認するためそれぞれの一次抗体 - 二次抗体で相互作用を確認した。抗 IgE 抗体 - 抗ヒト形質細胞抗体、抗 IgE 抗体 - 抗 CD20 抗体の二重染色については上記と同様の方法で施行した。

標本の撮影は Carl Zeiss Axioskop 2 microscope (with a 60× plan apo oil immersion objective)の Radiance 2100 コンフォーカルシステムで行い、ソフトウェアは LSM5Pascal ver.3.2 software (Carl Zeiss Microscopy Ltd, Jena, Germany)を使用した。

2-2-8. 細胞数計測

組織浸潤好酸球数の測定のため、著者（馬場）および共同研究者 2 人（近藤、籠谷）が独立して H-E 切片を光学顕微鏡にて高倍率（400 倍）で観察し、無作為に 5 視野で好酸球数を数え、平均した。各炎症細胞数も免疫染色標本において同様の方法で細胞数計測を行った。

2-2-9. Real-time 定量 PCR

RNA later®(Life Technologies, Carlsbad, CA, US)で処理された組織を ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan)で溶解し、総 RNA を抽出した。mRNA 発現は Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)で測定した。プライマー及びプローブは human β -actin、IL-4、5、13、33、ST2、Fc ϵ R1 α 、CD23 については PE Applied Biosystems で市販されているものを購入し mRNA 発現は TaqMan detection system で測定した。 ϵ GLT、AID、RAG1,2、FOXP3、GATA3、Tbet、RORc、IL-10、IL-17A、TGF- β 1、IFN- γ 、IgE mature transcripts、IgG mature transcripts の mRNA は SYBR Green detection system で測定した[45,51]。Forward プライマー、Reverse プライマーの塩基配列は表 1 に記載した。RAG1,2、FOXP3、GATA3、Tbet、RORc、IL-10、IL-17A、TGF- β 1、IFN- γ のプライマーについては SABiosciences で市販されている製品を使用した。Nuclease-free water

を陰性コントロールとして使用した。

相対的定量のため $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた。ハウスキーピング遺伝子 (housekeeping gene, HKG) をリファレンスとして mRNA 量の補正を行った。HKG としては TaqMan detection system では β -actin (ACTB) を SYBR Green detection system では glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [52] を用いた。それぞれの検出法でサイトカインと HKG の threshold cycle (ΔCt sample, ΔCt control) を測定し、 ΔCt value ($\Delta\Delta Ct$, ΔCt sample - ΔCt control) を計算した。その値より relative quantitation (RQ) value ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) を計算した。

表 1 Real-time PCR プライマー

Official symbol	Official full name (other name)	Gene ID	Primers (5'→3')
AID	activation-induced cytidine deaminase	AB040431	F:GGACTTTGGTTATCTTCGCAATAAG R:GTCGGGCACAGTCGTAGCA F:ATAGCCATCATGACCTTCAAAGATT R:GCCGAAGCTGTCTGGAGAGA
IgE	IgE mature transcripts (IGHE)	X86359 J00222	F:ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG R:CAGAGTCACGGAGGTGGCATT
IgG	IgG mature transcripts (IGHG1)	X86359 J00228	F:ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG R:GTTCCACGACACCGTCACC
εGLT			
IεF2	Human IgE switch region (S epsilon)	X56797	F:GGCCACACATCCACAGGC
CεR	immunoglobulin epsilon chain	X95746	R:GGGGTGAAGTCCCTGGAGC
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AF261085	F:CAAGGGCATCCTGGGCTAC R:TTGAAGTCAGAGGAGACCACCTG

F: forward primers, R: reverse primers

2-2-10. 統計解析

統計処理は SPSS 統計ソフト (SPSS, Chicago, IL, USA)を用いた。細胞数、PCR のデータは、各群の中央値、四分位数範囲[IQR]で表した。ELISA のデータは、平均±標準誤差で表わした。グループ間の比較は Kruskal-Wallis test を、2群間の比較は Mann-Whitney U test を用いた。ELISA のデータについては各群間の比較に t 検定を用いた。有意差は $p < .05$ の場合とした。

3. 結果

3-1. 好酸球性副鼻腔炎の臨床像

性別は男性 83 例 (61%)、女性 53 例 (39%) と男性の方が多い傾向にあった。男性の方が 20 歳以下での発症数が多く、平均年齢は男性のほうが有意に若かった (平均男性 42.2 歳、女性 48.0 歳, $p < 0.05$, T test) (図 4)。血中好酸球値 (%) は平均で男性 10.6%、女性 12.0% と女性の方が高い傾向 (図 5) であるが、統計学的有意差は認めなかった ($p > 0.05$, Z test)。好酸球 16% 以上の重症例の比率を比較すると、男性 12.0% (10/83)、女性 26.4% (14/53) と女性の方が高率となっていた。好酸球性副鼻腔炎症例の主訴は男性では鼻閉を主訴に受診される症例が 7 割程度であり、女性では嗅覚障害を主訴にする症例がより多い傾向であった (図 6)。実際に症状の有無を比較すると男女ともそれほど大きな傾向の差はなかった (図 7)。

合併症についてアレルギー性鼻炎合併率は男性 55.4% (46/83)、女性 49.1% (26/53) と有意差は認めなかった ($p > 0.05$, χ^2 test)。喘息合併率は男性 50.6%、女性 79.2% と有意に女性の方が高率であった ($p < 0.01$, χ^2 test) (図 8)。好酸球性中耳炎合併率も男性 3.6% (3/83)、女性 18.9% (10/53) と有意に女性の方が高率であった ($p < 0.01$, χ^2 test) (図 9)。

受診時の末梢好酸球値と患者の自己申告による副鼻腔炎症状の発症年齢は明らかな傾向は認められなかった（図 10）。副鼻腔炎症状の発症年齢と喘息症状の発症年齢は明らかな正の相関があり（図 11）、大多数の症例で発症はほぼ同時期であった。末梢血好酸球値と血中総 IgE 値の関係を検討したが明らかな相関は認められなかった（図 12）。

図4 発症年齢と性別

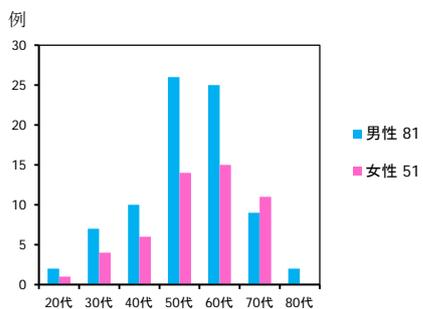


図5 末梢血好酸球と性別

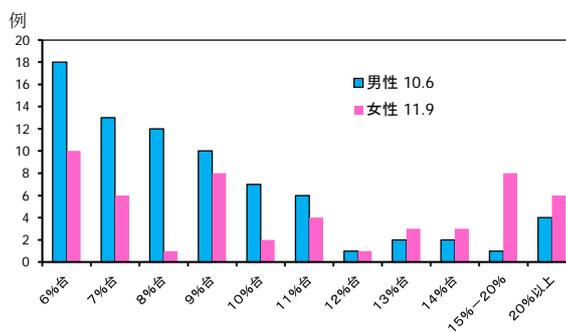


図6 主訴と性別

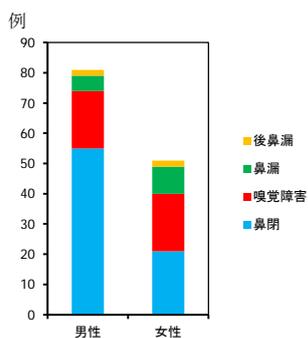


図7 症状の有無と性別



図8 喘息の有無

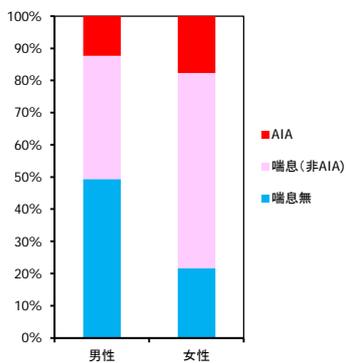


図9 好酸球性中耳炎の有無

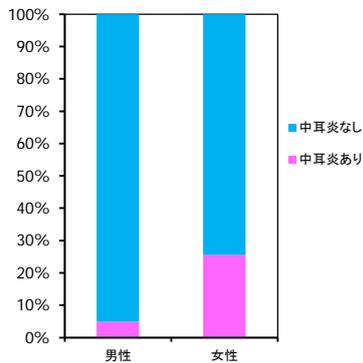


図 10

末梢血好酸球値と発症年齢

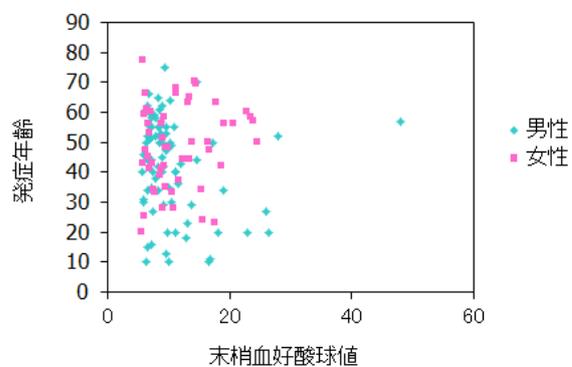


図 11

副鼻腔炎発症と喘息発症の年齢

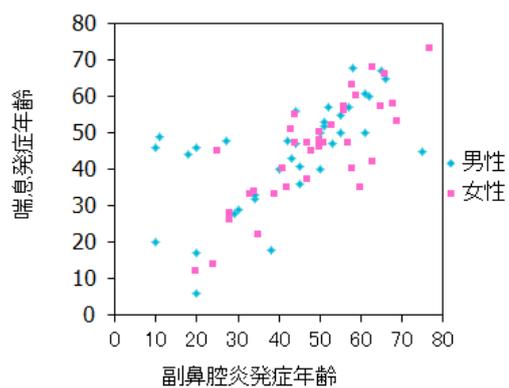
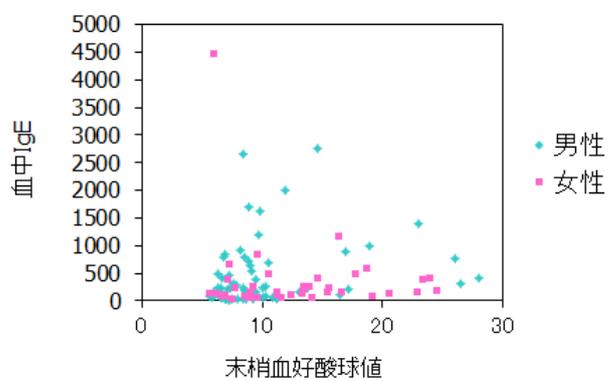


図 12

末梢血好酸球値と血中IgE



3-2. 組織学的研究

3-2-1.患者像

好酸球性副鼻腔炎群の患者構成は男性 18 例であり、年齢は 31–76 歳で平均 56.8 歳、末梢血好酸球は平均 7.6% (3.1-23.0%)、絶対数の平均は $483.1/\text{mm}^3$ ($210.8-1817/\text{mm}^3$)であった。合併症は 8 例にアレルギー性鼻炎、3 例に喘息、1 例にアスピリン不耐症があり、9 例は合併症なしであった。非好酸球性副鼻腔炎群の患者構成は男性 13 例、女性 5 例の合計 18 例であり年齢は 40–72 歳で平均 57.6 歳、末梢血好酸球は平均 2.1% (0.4-5.2%)、絶対数の平均は $131.4/\text{mm}^3$ ($40.0-252.0/\text{mm}^3$)であった。合併症は 3 例にアレルギー性鼻炎を合併している以外は特に認めなかった。非副鼻腔炎コントロール群の患者構成は男性 5 例、女性 3 例の計 8 例であり、年齢は 30–69 歳で平均 52.6 歳、末梢血好酸球は平均 2.2% (1.0-3.7%)、絶対数の平均は $126.5/\text{mm}^3$ ($50.0-210.9/\text{mm}^3$)であった。合併症は 2 例にアレルギー性鼻炎を合併している以外は特に認めなかった。3 群間で年齢の有意差は認めなかったが、末梢血好酸球数は好酸球性副鼻腔炎群で他 2 群と比較し優位に上昇を認めた($p < .001$)。患者像の詳細は表 2 に示す。

表 2 患者像

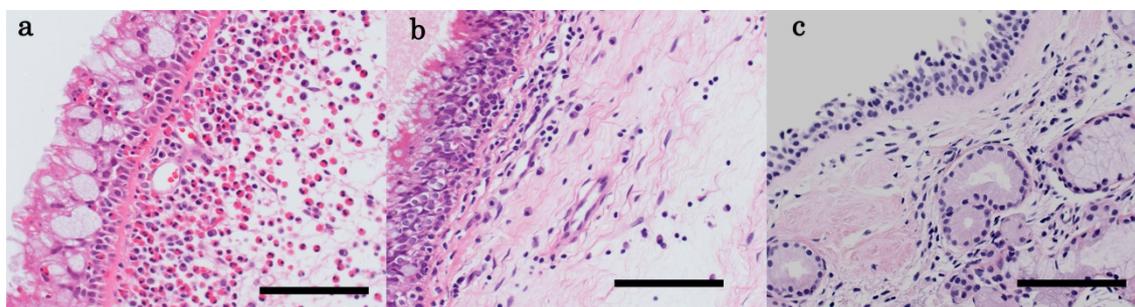
患者群	症例数	男:女	年齢 (歳)*	喘息の 既往	アレルギー 一性鼻炎	末梢血好酸球数 (%)*	組織中好酸球数 †
好酸球性副鼻腔炎群	18	18:0	56.8 (31-76)	4/18	8/18	7.6 (3.1-23.0)	127.6 (53.2-385.2)
非好酸球性副鼻腔炎群	18	13:5	57.6 (40-72)	0/18	3/18	2.1 (0.4-5.2)	3.3 (0-47.8)
コントロール群	8	5:3	52.6 (30-69)	0/8	2/8	2.2 (1.0-3.79)	0.0 (0-3.8)

*平均値と範囲

† 中央値と範囲

組織像は好酸球性副鼻腔炎群のポリープでは好酸球優位の細胞浸潤像を認めた (図 13-a)。それに対して非好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは浸潤細胞はリンパ球と形質細胞が中心であり (図 13-b)、非副鼻腔炎群 (コントロール) では炎症細胞の浸潤はリンパ球を中心に認めた (図 13-c)。

図 13



(a)好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、(b)非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、(c)非副鼻腔炎コントロール群ポリープの H-E 染色像。Scale bar = 100µm

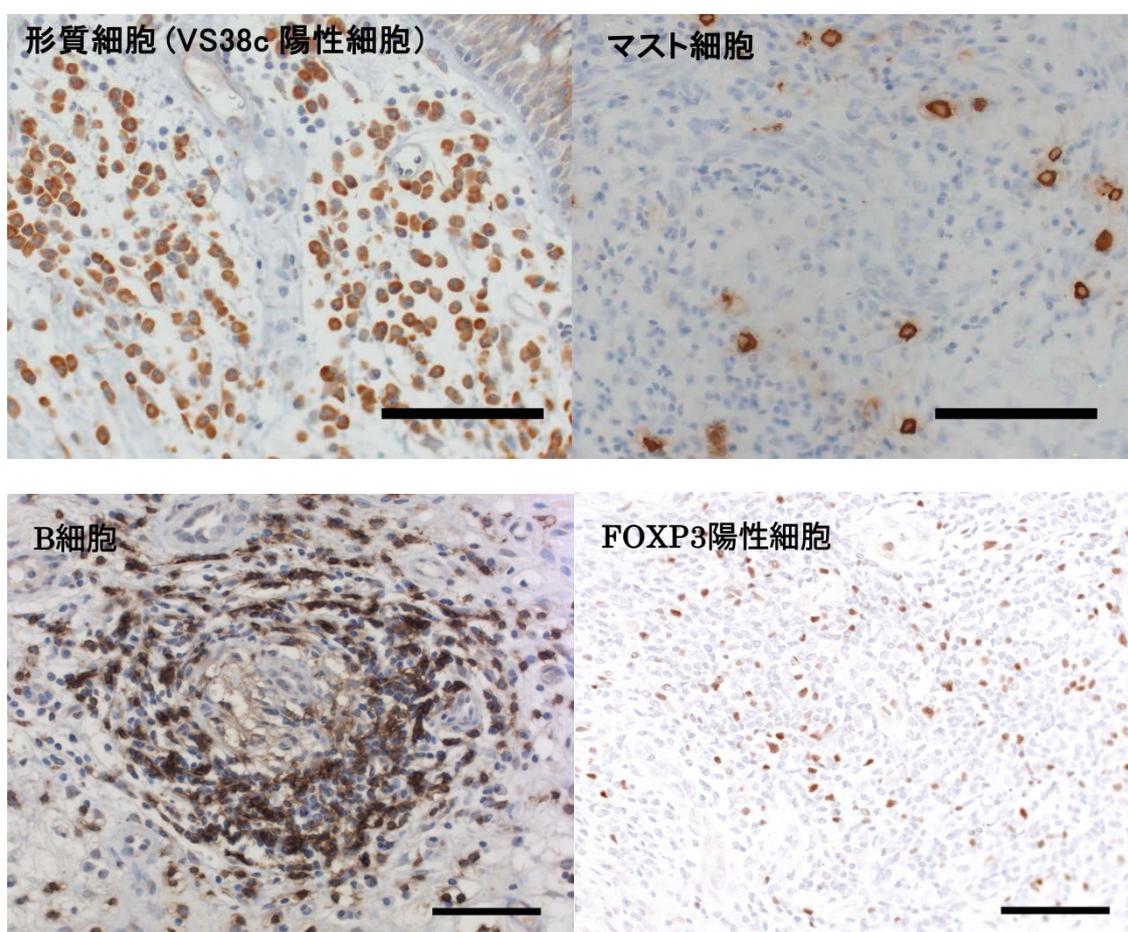
3-2-2. 鼻粘膜中炎症細胞の組織学的解析

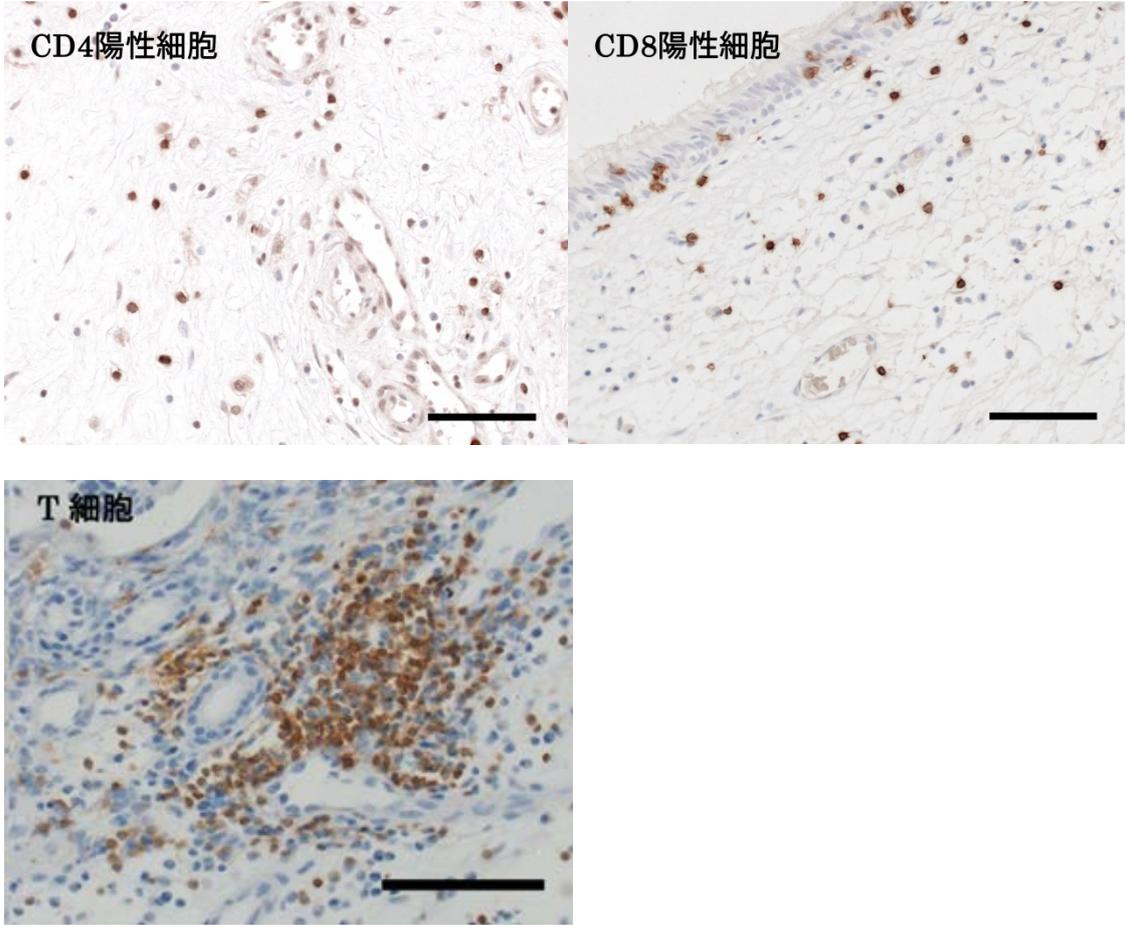
好酸球数 (H-E 染色)、マスト細胞数 (mast cell tryptase 陽性細胞)、形質細胞数 (VS38c 陽性細胞)、T 細胞数 (CD3 陽性細胞)、CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数、B 細胞数 (CD20 陽性細胞) を好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群正常鼻粘膜で計測した (図 14)。図 15 については中央値、四分位数範囲[IQR]を記した。好酸球数は好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=18, 中央値 127.6; 最小値-最大値 53.2-385.2)でコントロール(n=8, 0.0; 0-3.8; $p < .001$)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=18, 3.3; 0-47.8; $p < .001$)と比較し優位に増多していた。形質細胞数は非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=16, 33.1; 11.8-84.2)でコントロール(n=7, 6.0; 2.0-7.4; $p < .001$)、好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=17, 21.6; 2.4-51.2; $p < .001$)と比較し優位に増多していた。B 細胞数も同様に非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=18, 94.6; 16.0-282.3)でコントロール(n=7, 3.3; 2.25-13.5; $p < .001$)、好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=17, 54.0; 22.7-183.3; $p < .005$)と比較し優位に増多していた。マスト細胞数、T 細胞数については各群で有意差を認めなかった($p > .05$)。

CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞数は非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=15, CD4: 16.4; 0-43.4, CD8: 63.2; 28.8-155.8)で好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=12,

CD4: 3.4; 1.2-16.4; $p < .005$, CD8: 36.6; 8.4-91.4; $p < .005$)と比較し有意に増多していた。さらに、CD4 陽性 T 細胞は好酸球性副鼻腔炎群ポリープでコントロール (n=7, CD4: 13.3; 7.8-21.3; $p < .01$)と比較し有意に減少していた。

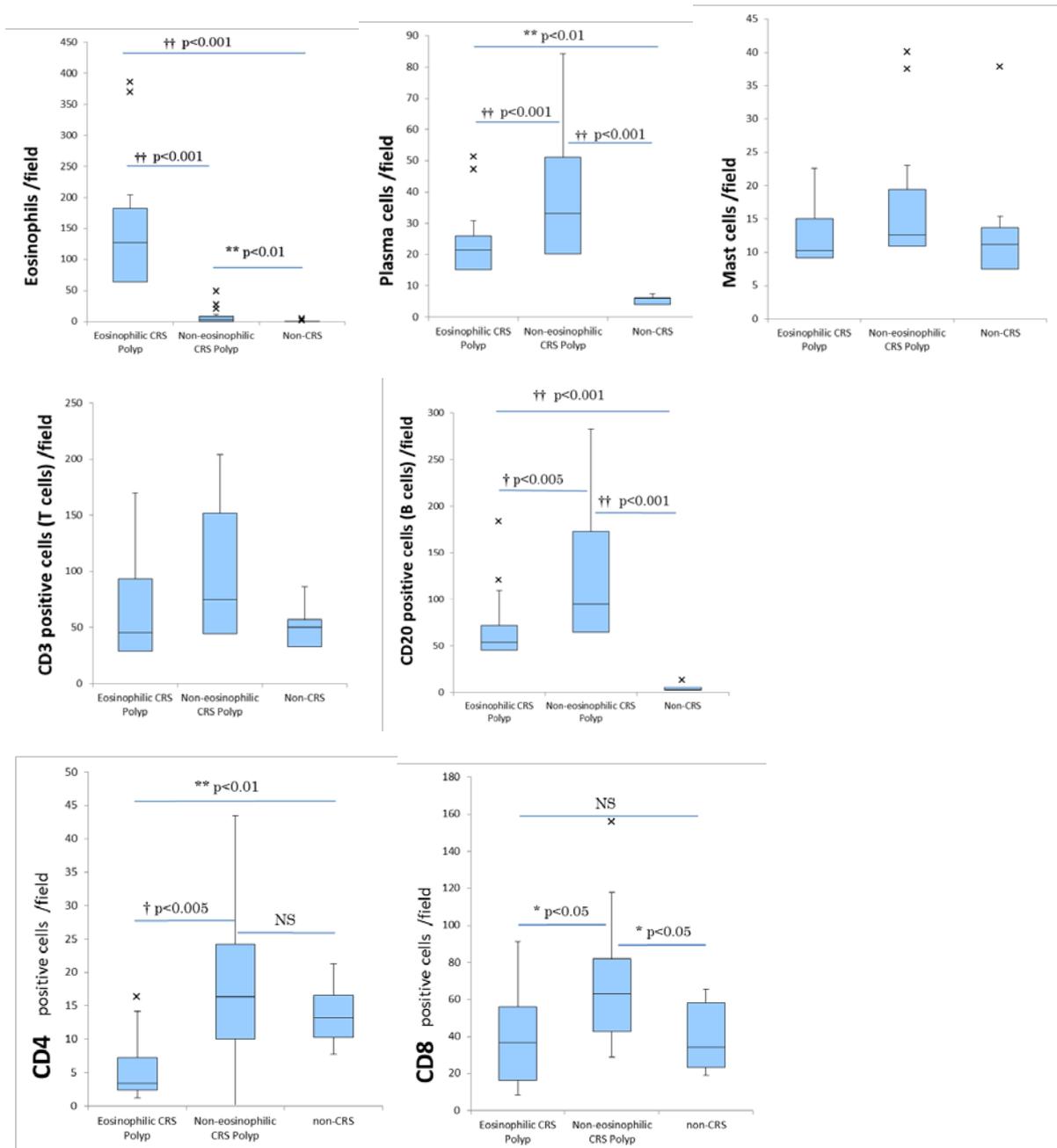
図 14





いずれも好酸球性副鼻腔炎症例ポリープの各炎症細胞の免疫染色像
陽性細胞の標識は DAB（茶）、核はマイヤーのヘマトキシリンで染色。
Scale bar = 100 μ m

図 15

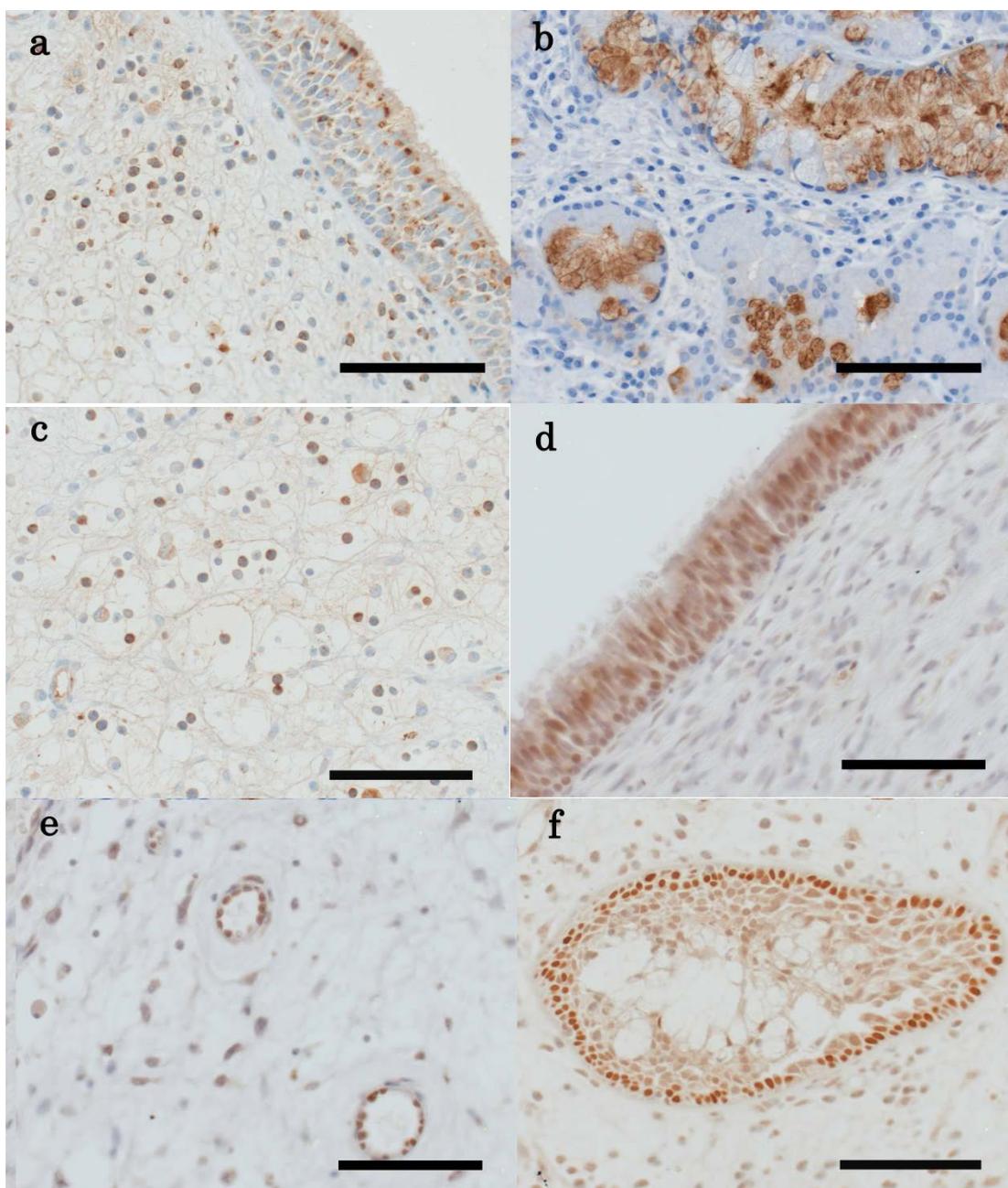


400 倍 1 視野あたりの組織中好酸球数、形質細胞数、マスト細胞数、T 細胞数、B 細胞数。右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75% 値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(††p<0.001, †p<0.005, **p<0.01, *p<0.05, NS=not significant)

3-2-3. 鼻粘膜中の IL-33、ST2 について

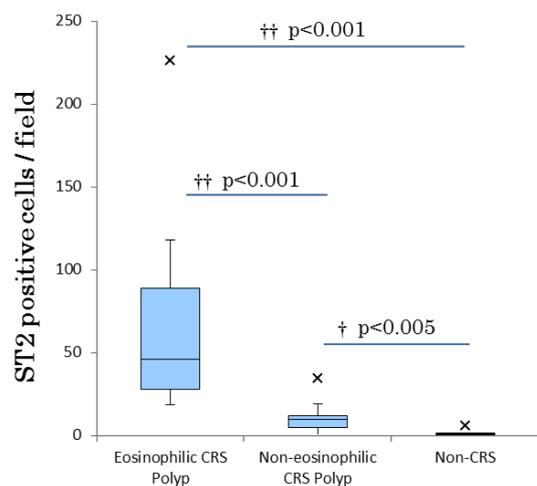
IL-33 のレセプターである ST2 免疫染色 (図 16) において陽性細胞を好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群正常鼻粘膜で計測した (図 17)。図 17 については中央値、四分位数範囲[IQR]を記した。ST2 陽性細胞は全ての群で上皮細胞、血管内皮細胞、腺細胞に分布しており、好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは上皮下層の炎症細胞に分布していた (図 16 a-c)。ST2 陽性細胞数は好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=11, 中央値 65.0; 最小値-最大値 9.6-225.6)でコントロール(n=6, 1.5; 0-5.2; $p<.0001$)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=13, 10.2; 0.4-34; $p<.0001$)と比較し有意に増加していた (図 17)。IL-33 は核に分布しており、すべての群において上皮細胞、腺細胞、血管内皮細胞に分布しており、染色パターンは全ての群で同様であった (図 16 d-f)。

図 16



好酸球性副鼻腔炎群ポリープの ST2 (a-c)、IL-33 (d-f) 免疫染色像
(a-c) ST2 陽性細胞は上皮(a)、腺細胞(b)、上皮下層の炎症細胞(c)に認める。
(d-f) IL-33 陽性細胞は上皮(a)、血管内皮細胞(b)、腺細胞(c)に認める。
陽性細胞の標識は DAB (茶)、核はマイヤーのヘマトキシリンで染色。
Scale bar = 100 μ m

図 17

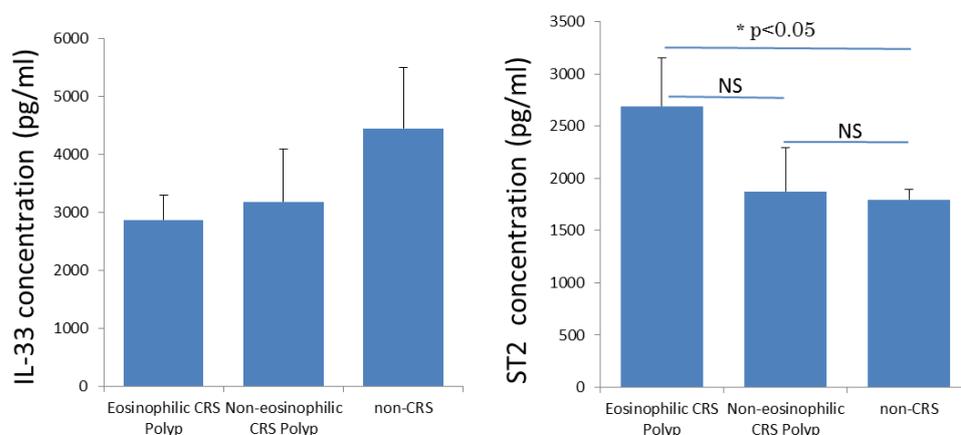


400倍1視野あたりの組織中ST2陽性細胞数。右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=11)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=13)、非副鼻腔炎コントロール群(n=6)。

データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下75%値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(†† p<0.001, † p<0.005)

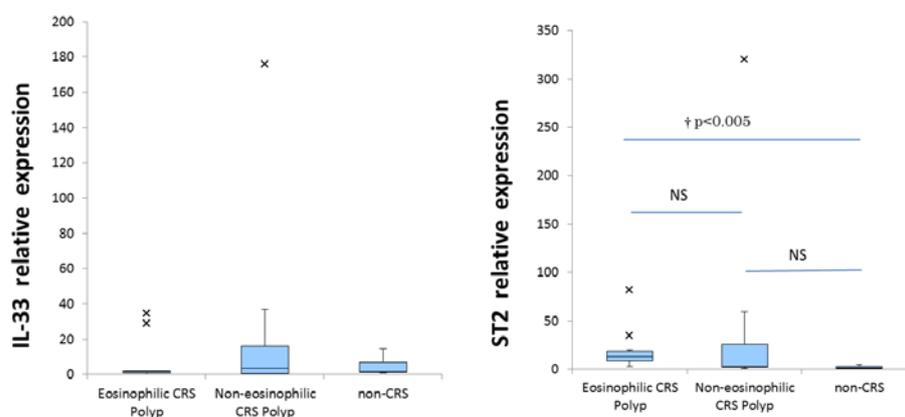
IL-33、ST2についてELISA法によるタンパク定量と定量PCRによるmRNAの定量を行った。IL-33についてはmRNAレベル、タンパクレベルとも各群で有意差を認めなかった(図18, 19)。ST2はmRNAレベル、タンパクレベル(ELISAによる定量)とも好酸球性副鼻腔炎群ポリープでコントロールと比較し有意に増加していた(図18, 19)。非好酸球性副鼻腔炎群ポリープとは有意差を認めなかった。

図 18



ELISA による IgE、ST2 タンパク濃度。右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=8)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=6)、非副鼻腔炎コントロール群(n=5)。エラーバーは標準誤差 (Standard error, SE)。(*p < 0.05, NS=not significant)

図 19

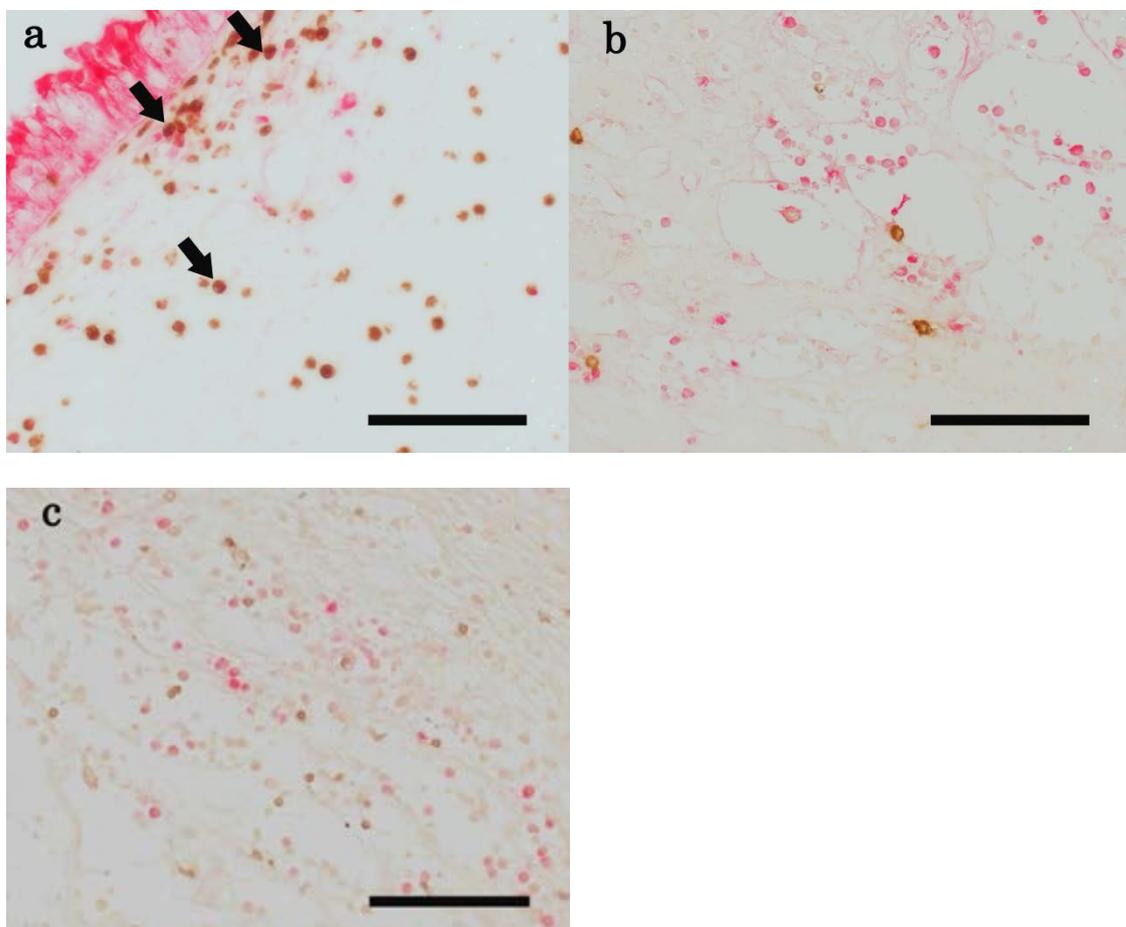


各種サイトカイン、レセプターのリアルタイム PCR による mRNA レベルの相対値：右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=18)、非副鼻腔炎コントロール群(n=5)。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75% 値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(††p < 0.001, †p < 0.005, **p < 0.01, *p < 0.05, NS=not significant)

次に ST2 陽性細胞種同定のため酵素抗体法による 2 重染色を行った (図 20)。

ST2 と好酸球を標識する MBP の二重染色において、二重陽性細胞は好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは MBP 陽性好酸球中の 14.9-58.7% (中央値 38.3%, n=7) であり、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは二重陽性率は 0-10.3% (中央値 0%, n=7) であった (図 21)。また、ST2 陽性細胞中の ST2-MBP 二重陽性率は好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは 78.9-97.1% (中央値 89.8%, n=7) である、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは 0-15.5% (中央値 0%, n=7) であった(図 21)。MBP 陽性細胞中、ST2 陽性細胞中ともに二重陽性率は好酸球性副鼻腔炎群ポリープで非好酸球性副鼻腔炎群ポリープと比較し有意に高かった ($p < .0005$)。ST2-マスト細胞二重染色では各群とも二重陽性細胞はほとんどなく、ST2-CD3 (T 細胞) 二重染色では各群で二重陽性細胞を認めなかった。

図 20



好酸球性副鼻腔炎群ポリープの ST2 と各炎症細胞の酵素抗体法による二重染色像

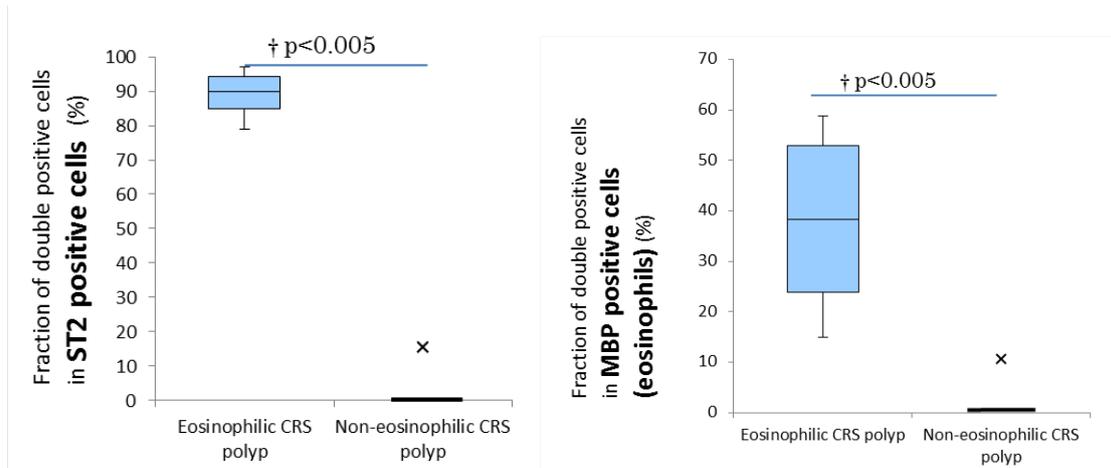
a : ST2-MBP 二重染色像 赤 : ST2 茶 : MBP 陽性好酸球 矢印 : 二重陽性細胞

b : ST2-Madt cell tryptase 二重染色像 赤 : ST2 茶 : マスト細胞

c : ST2-CD3 二重染色像 赤 : ST2 茶 : CD3 陽性 T 細胞

Scale bar = 100 μ m

図 21



左：ST2 陽性細胞中の ST2-MBP 二重陽性率

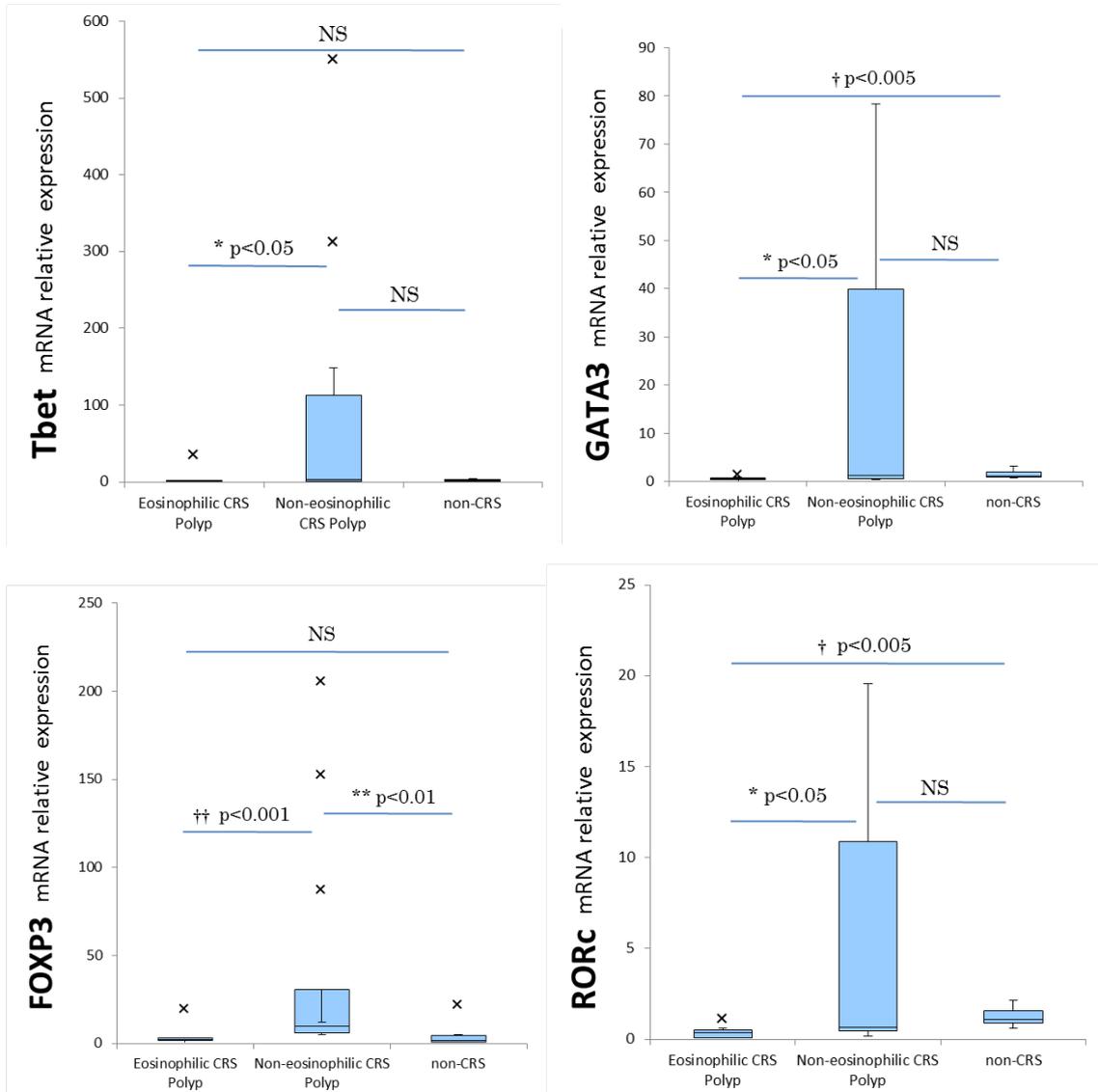
右：MBP 陽性好酸球中の ST2-MBP 二重陽性率

グラフ右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=7)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=7)。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下75%値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(† p<0.005)

3-2-4. Treg/Th1/Th2/Th17 の転写因子の発現（リアルタイム PCR 結果）

Treg 転写因子である FOXP3、Th1/Th2/Th17 のそれぞれの転写因子である Tbet/GATA3/RORc の mRNA 発現について定量リアルタイム PCR で解析した(図 22)。GATA3 mRNA は好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10)でコントロール(n=7, $p < .005$)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10, $p < .05$)と比較し有意に発現低下していた。RORc mRNA についても好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10)でコントロール(n=7, $p < .005$)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10, $p < .05$)と比較し有意に発現低下していた。Tbet mRNA 発現については非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10)とコントロール(n=7)の間に有意差を認めなかったが、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープで好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10, $p < .05$)と比較し有意に発現上昇していた。さらに、FOXP3 mRNA は非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10)でコントロール(n=7, $p < .01$)、好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10, $p < .001$)と比較し有意に発現上昇していた。

図 22

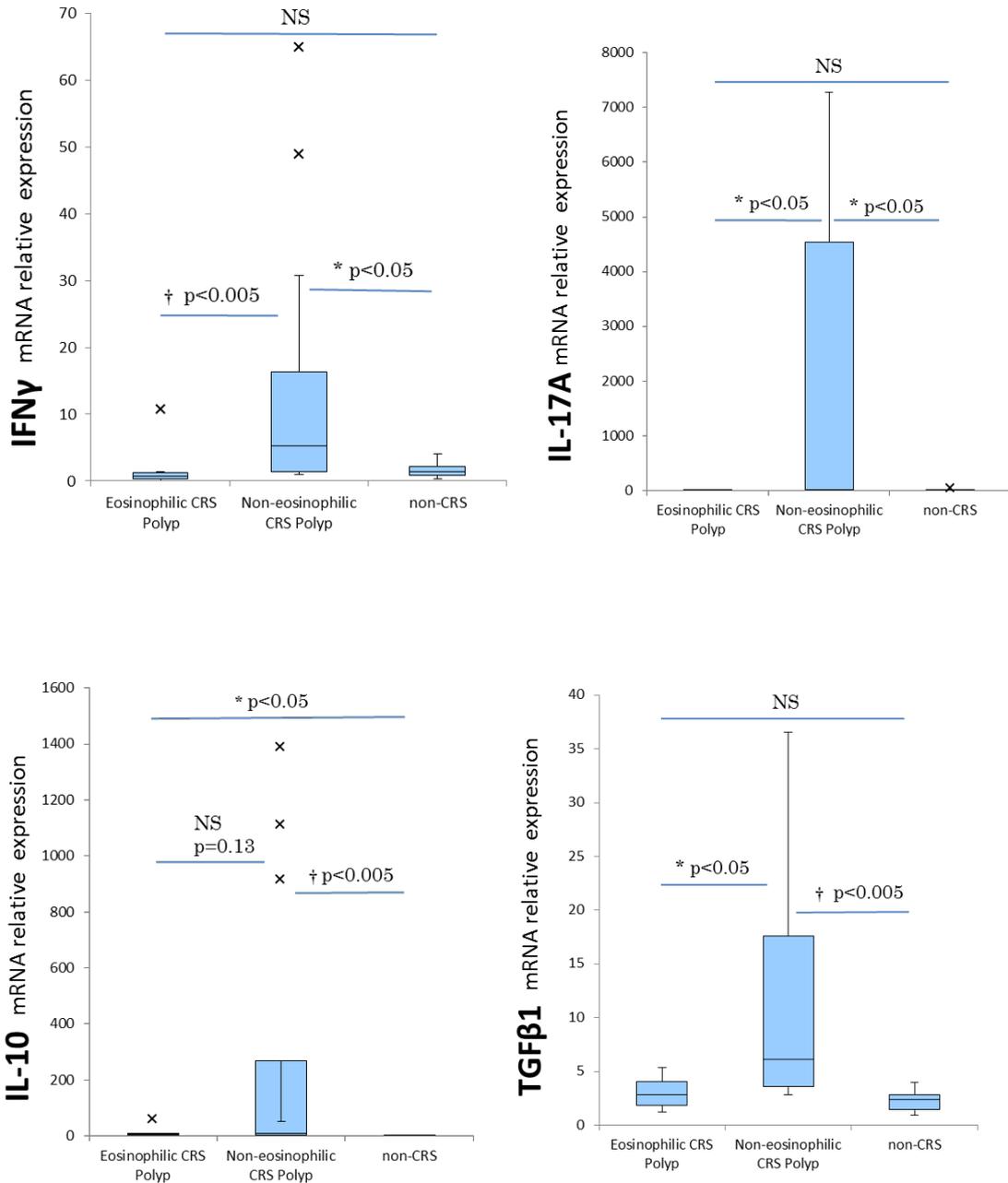


各 T 細胞誘導因子のリアルタイム PCR による mRNA レベルの相対値
 右より好酸球性副鼻腔炎群ポリプ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリプ、非副鼻
 腔炎コントロール群。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75%値、
 最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(††p<0.001, †p<0.005, **p<
 0.01, *p<0.05, NS=not significant)

3-2-5. Th1/Th17/Treg 関連サイトカイン発現について (図 23)

Th1 サイトカインである IFN- γ 、Th17 サイトカインである IL-17A、Treg サイトカインである TGF- β 1 は mRNA レベルで非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(IFN- γ : n=12, IL-17A : n=10, TGF- β 1 : n=10)、コントロール(IFN- γ : n=6, IL-17A : n=7, TGF- β 1 : n=7)、好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(IFN- γ : n=10, IL-17A : n=10, TGF- β 1 : n=10)と比較して有意に発現上昇を認めた。また、Treg サイトカインである IL-10 は mRNA レベルで非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=12) でコントロール(n=7)と比較し、有意に発現上昇を認め、好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=10)ではコントロールと比較し有意に発現低下を認めた。

図 23



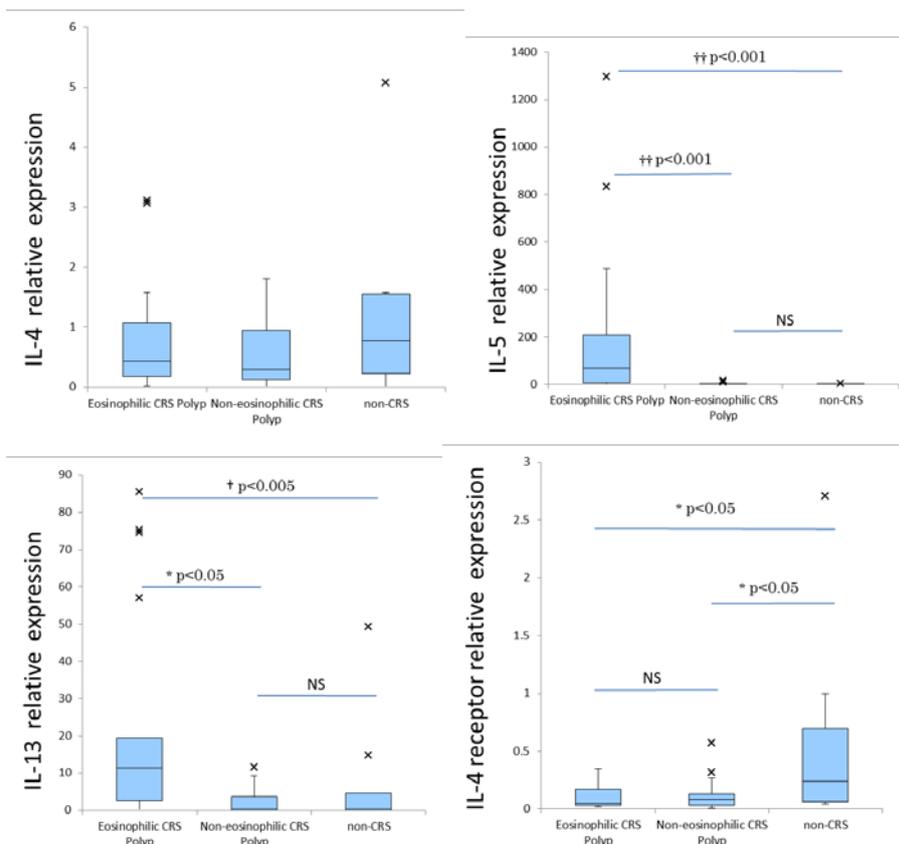
各種サイトカインのリアルタイム PCR による mRNA レベルの相対値
 右より好酸球性副鼻腔炎群ポリプ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリプ、非副鼻腔炎コントロール群。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75%値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(† $p < 0.005$, $*p < 0.05$, NS=not significant)

3-2-6. Th2 関連サイトカインとそのレセプターについて(リアルタイム PCR 結果)

IL-5、IL-13 は mRNA レベルで好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(IL-5 : n=15, IL-13 : n=15)でコントロール(IL-5 : n=8, IL-13 : n=8)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(IL-5 : n=13, IL-13 : n=16)と比較し有意に増加していた (図 24)。IL-4 については mRNA レベルで各群(ECRS : n=17, non-ECRS : n=18, control : n=8)で有意差を認めなかった (図 24)。

IL-4、IL-13 の共通のレセプターである IL-4 レセプターについては mRNA レベルで好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=14)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=14)でコントロール(n=8)と比較し有意に減少していた (図 24)。

図 24

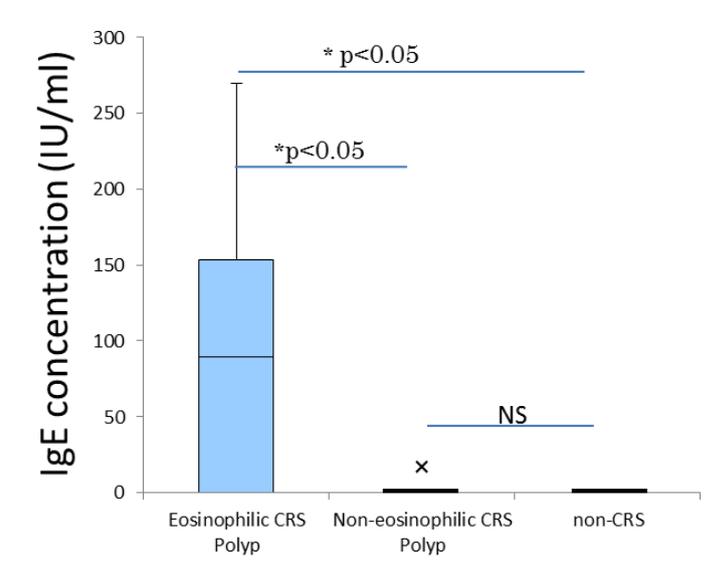


各種サイトカイン、レセプターのリアルタイム PCR による mRNA レベルの相対値：右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75% 値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(†† $p < 0.001$, † $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, NS=not significant)

3-2-7. 鼻粘膜中の IgE 動態とそのレセプターについて

鼻粘膜中の総 IgE タンパク濃度は ELISA 法で測定した。鼻粘膜組織をホモジェナイズし、その上澄の総 IgE タンパク濃度は好酸球性副鼻腔炎群ポリープ (n=7, 中央値 89.1; 最小値-最大値 0.0-269.3) で非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ (n=8, 0.0; 0.0-16.7; p<.05)、コントロール(n=6, 0.0; 0.0-0.0; p<.05)と比較し優位に高かった (図 25)。

図 25

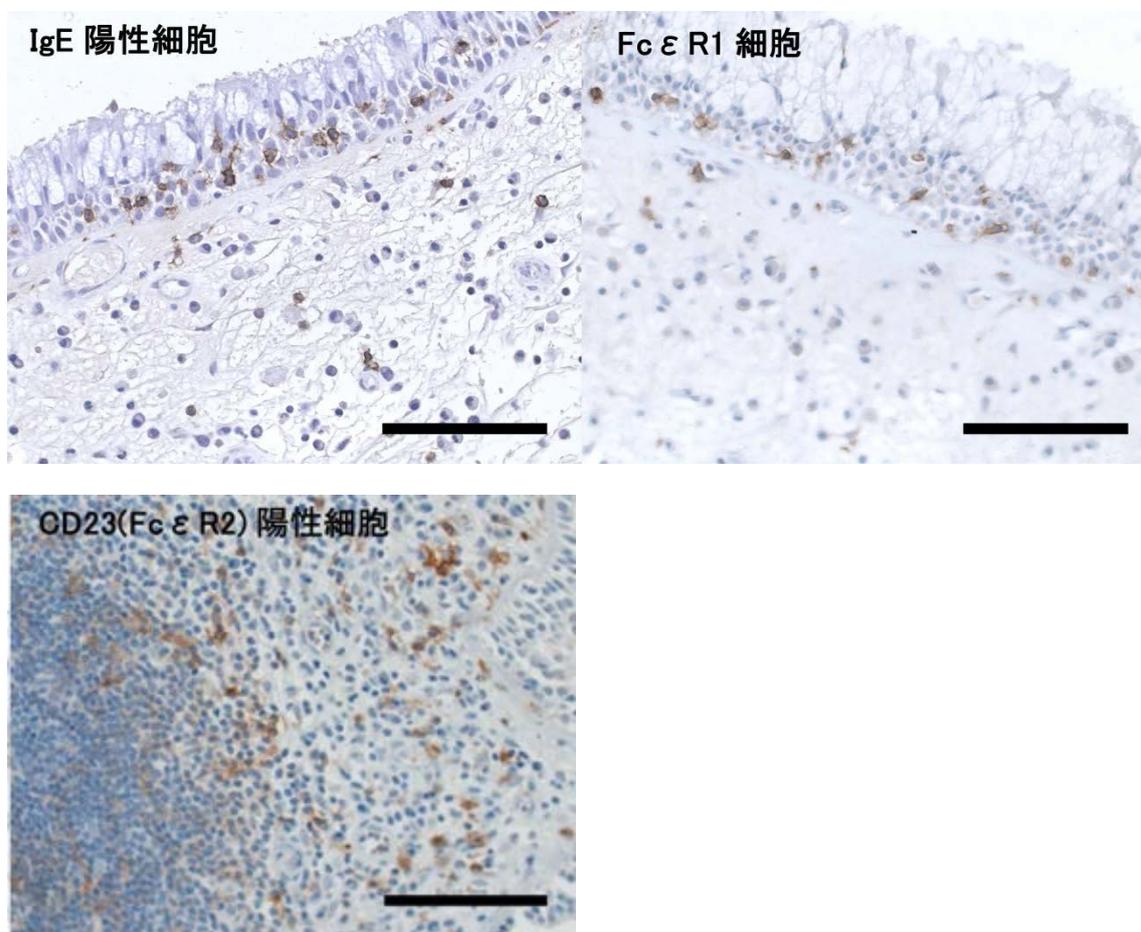


ELISA による総 IgE タンパク濃度。右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75%値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(*p < 0.05, NS=not significant)

IgE 免疫染色にて各群の IgE 陽性細胞について検討した。IgE 陽性細胞は好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープの上皮下層の炎症細胞に分布していた (図 26)。IgE 陽性細胞数は好酸球性副鼻腔炎群ポリープ (n=16, 中央値 14.8; 最小値-最大値 4.4-28.8) でコントロール (n=7, 0.0; 0.0-3.8; $p<.001$)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ (n=18, 3.8; 0.0-20.0; $p<.001$) と比較し優位に増多していた (図 27)。

FcεR1 陽性細胞も IgE 陽性細胞と同様に好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープの上皮下層の炎症細胞に分布していた (図 26)。FcεR1 陽性細胞数は好酸球性副鼻腔炎群ポリープ (n=15, 7.0; 3.2-15.0)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ (n=17, 5.8; 1.0-17.4) でそれぞれコントロール群 (n=7, 1.0; 0.2-4.4; それぞれ $p<.001$, $p<.005$) より優位に増多していた (図 27)。また、上皮下層の FcεR1 陽性細胞数は IgE 陽性細胞と優位に正の相関関係にあった (n = 39, $r = 0.9821$, $p<.005$; 図 28)。CD23 陽性細胞は血管周囲に主に分布しているが、各群とも非常に細胞数が少なかった (図 26)。

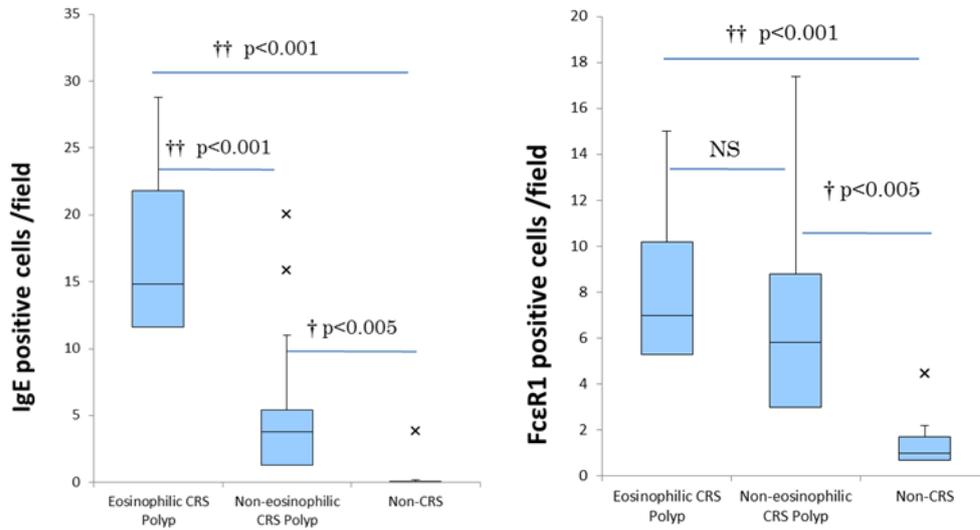
図 26



好酸球性副鼻腔炎症例ポリープの IgE、Fc ϵ R1、CD23 (Fc ϵ R2) 免疫染色像
陽性細胞の標識は DAB (茶)、核はマイヤーのヘマトキシリンで染色。

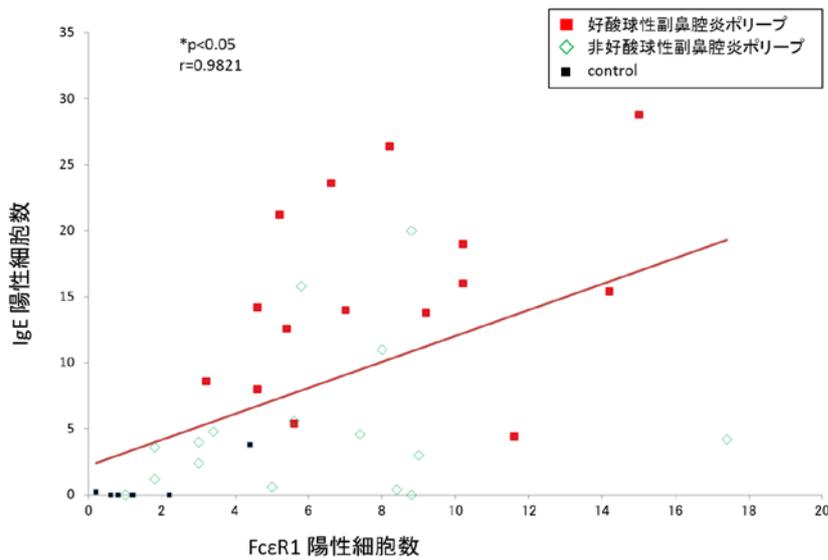
Scale bar = 100 μ m

図 27



400 倍 1 視野あたりの IgE 陽性細胞数 (左)、Fc ε R1 陽性細胞数 (右)。右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群。(††p<0.001, †p<0.005, NS=not significant)

図 28



上皮下層の Fc ε R1 陽性細胞数と IgE 陽性細胞との相関

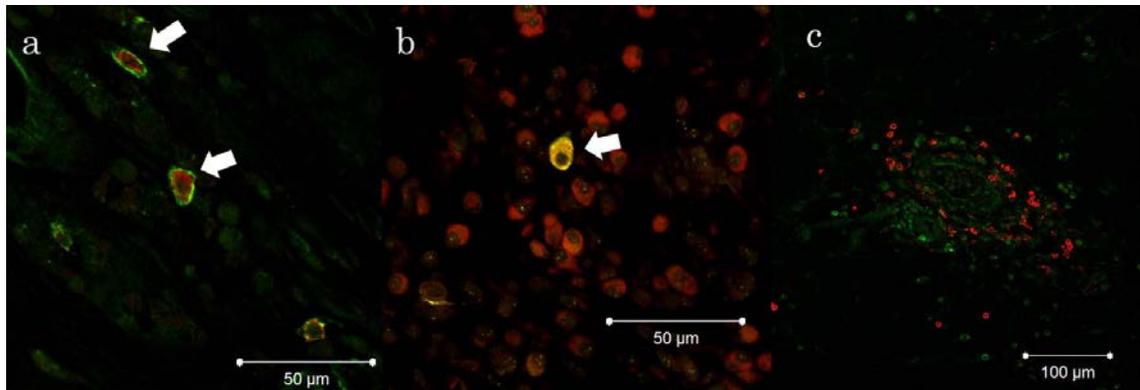
次に IgE 陽性細胞種同定のため蛍光二重染色を行った (図 29)。IgE-マスト細胞二重染色像において、IgE はマスト細胞の表面に局在しており、細胞表面のレセプターに結合している可能性が示唆された (図 29-a)。全マスト細胞中の IgE 陽性率は好酸球性副鼻腔炎群ポリープで 39.7 -72.0% (中央値 56.8%, n=7) であり、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは 0-45.0% (中央値 9.0%, n=6) であった (図 30 左)。マスト細胞中の IgE 陽性率は好酸球性副鼻腔炎群で非好酸球性副鼻腔炎群と比較し優位に高率であった($p < .005$)。また、IgE 陽性細胞中のマスト細胞 - IgE 二重陽性率は好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは 54.0-95.0% (中央値 75.9%, n=7) 、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは 57.5-100% (中央値 97.8%, n=6) でどちらも高率で各群での陽性率の有意差はなかった($p=0.12$)。

IgE - 形質細胞 IgE 二重染色像において、IgE は細胞質に局在しており (図 29-b)、細胞質内での IgE 産生が示唆された。全形質細胞中の IgE 陽性率は好酸球性副鼻腔炎群ポリープで 5.6-16.4% (中央値 8.3%, n=10) であり、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは 0-4.4 % (中央値 2.5%, n=10) であった (図 30 中央)。形質細胞中の IgE 陽性率は好酸球性副鼻腔炎群で非好酸球性副鼻腔炎群と比較し有意に高率であった($p < .005$)。また、IgE 陽性形質細胞の絶対数も好酸球性副鼻腔炎群ポリープで、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープと比較し有意に増多していた (図 30 右 $p < .005$)。

CD20-IgE 二重陽性細胞は好酸球性副鼻腔炎群、非好酸球性副鼻腔炎共に認められなかった (図 29 - c)。

MBP-IgE 二重染色もマスト細胞や形質細胞と同様の方法で行ったが、抗 MBP 抗体の抗原部活化にプロテイナーゼを使用したため、抗 IgE 抗体の反応を妨げてしまい、うまく行かなかった。抗 IgE 抗体の単染色では形態学上、IgE 陽性好酸球を認めたが、数は少ない印象であった。

図 29



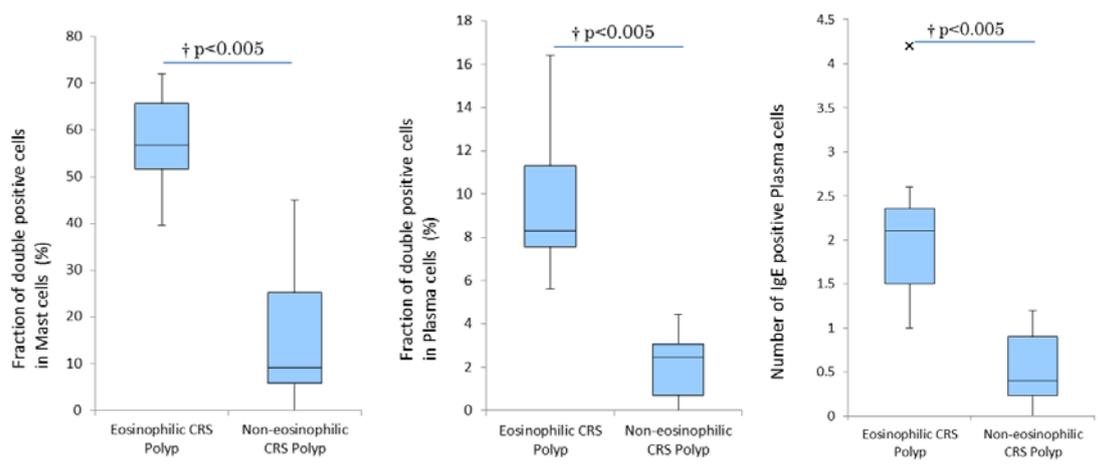
いずれも好酸球性副鼻腔炎症例ポリープの染色像

a : IgE-Mast cell tryptase 二重染色像 赤 : マスト細胞 緑 : IgE 陽性細胞 矢印 : 二重陽性細胞

b : IgE- VS38c 二重染色像 赤 : 形質細胞 緑 : IgE 陽性細胞 矢印 : 二重陽性細胞

c : IgE-CD20 二重染色像 赤 : CD20 陽性 B 細胞 緑 : IgE 陽性細胞

図 30



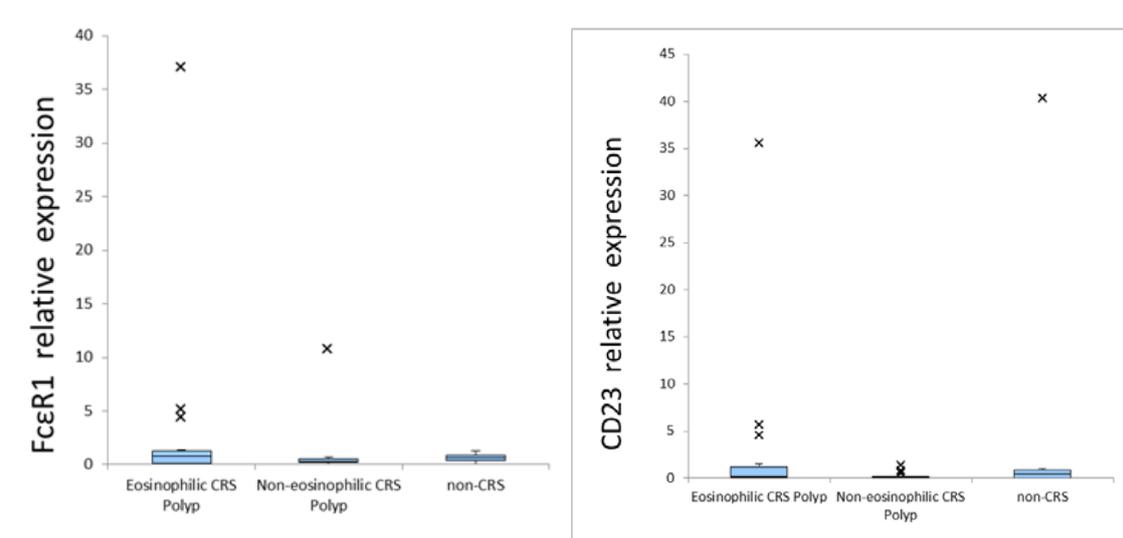
左 : マスト細胞中の IgE-マスト細胞二重陽性率

中央 : 形質細胞中の IgE-形質細胞二重陽性率

右 : IgE 陽性形質細胞の絶対数 ($\dagger p < 0.005$)

定量 PCR による IgE レセプターの解析の解析を行った。IgE 高親和性レセプターである FcεR1α(ECRS : n=15, non-ECRS : n=14, control : n=6)と低親和性レセプターである CD23(ECRS : n=14, non-ECRS : n=14, control : n=8)ともに mRNA レベルでは発現に有意差を認めなかった (図 31)。

図 31



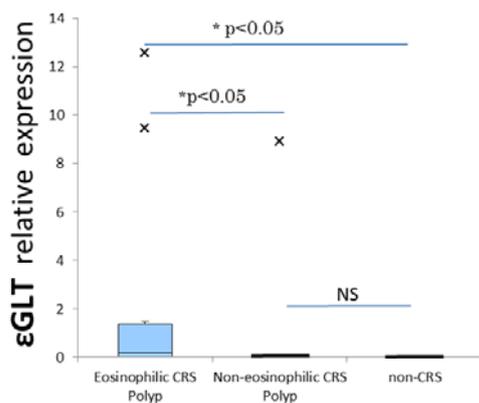
FcεR1α と CD23 のリアルタイム PCR による mRNA レベルの相対値
右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75%値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。

3-2-8. 鼻粘膜中の IgE クラススイッチと局所での抗体産生で発現する因子

今回我々は IgE クラススイッチの存在を示す ϵ GLT の mRNA を好酸球性副鼻腔炎群ポリープで 14 例中 8 例、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ 13 例中 1 例で検出し、コントロール群では 7 例全てで検出されなかった。また、 ϵ GLT mRNA 定量においては好酸球性副鼻腔炎群ポリープでコントロール、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープと比較し有意に増加していた(ともに $p < .05$ 図 32)。

また、我々は環状 DNA の nested PCR による検出も試みたが、度重なる施行にもかかわらず、どの群でも検出することができなかった。

図 32

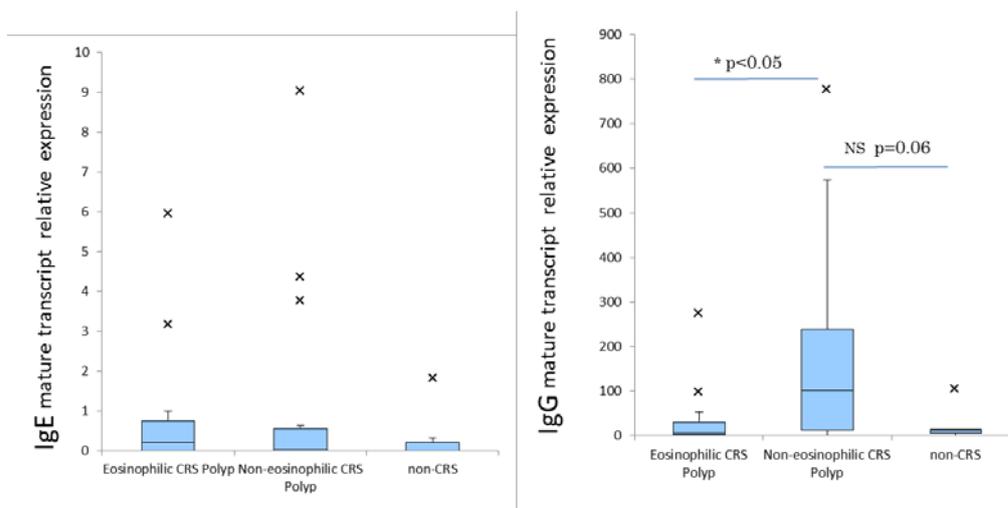


ϵ GLT のリアルタイム PCR による mRNA レベルの相対値

右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=14)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=13)、非副鼻腔炎コントロール群(n=7)。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75%値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(† $p < 0.005$, * $p < 0.05$, NS=not significant)

IgE mature transcript は B 細胞での IgE 産生の最後の段階での産生物であり、我々は mRNA を好酸球性副鼻腔炎群ポリープで 14 例中 10 例、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープで 13 例中 7 例、コントロール群では 7 例中 3 例検出された。また、IgG1 mature transcript の mRNA 定量 (E CRS : n=14, non-E CRS : n=13, control : n=7)においては非好酸球性副鼻腔炎群ポリープで好酸球性副鼻腔炎群ポリープと比較し有意に増加していた($p < .05$ 図 33)。

図 33



IgE mature transcript (左)、IgG1 mature transcript (右) のリアルタイム PCR による mRNA レベルの相対値

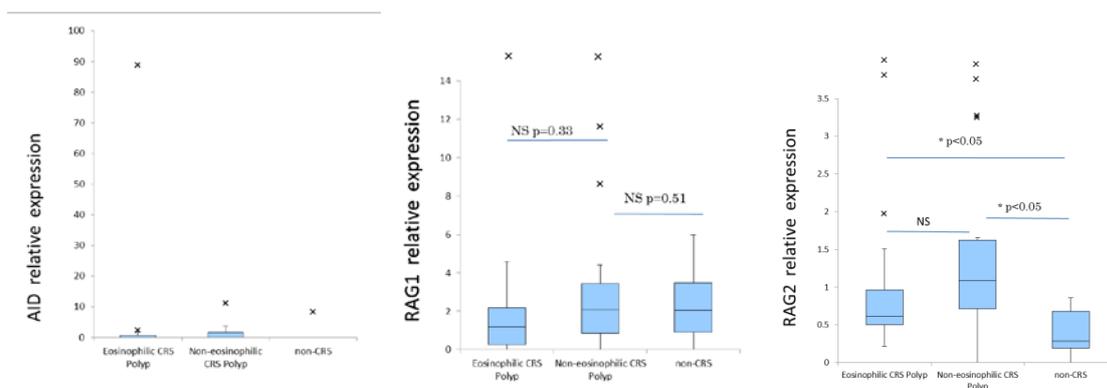
右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75%値、最大値、最小値が示されている。×は外れ値を示す。(* $p < 0.05$, NS=not significant)

我々は AID の mRNA を好酸球性副鼻腔炎群ポリープで 11 例中 3 例、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープで 15 例中 5 例、コントロール群では 5 例中 1 例検出された。mRNA 定量において各群で有意差を認めなかった (図 34 左)。

RAG2 mRNA 定量については好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=12)、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ(n=12)でコントロール群(n=6)と比較し有意に増加していた (p < .05 図 34 左)。

RAG1 (E CRS : n=13, non-E CRS : n=14, control : n=8)については各群で有意差を認めなかった (図 34 中央)。

図 34



AID (左)、RAG1 (中央)、RAG2 (右) のリアルタイム PCR による mRNA レベルの相対値

右より好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、非副鼻腔炎コントロール群。(*p < 0.05, NS=not significant)

3-2-9. 結果のまとめ

鼻粘膜の解析	好酸球性副鼻腔炎 群ポリープ 中央 値 (IQR)	非好酸球性副鼻 腔炎群ポリープ 中央値 (IQR)	コントロール 中央値 (IQR)	中 多重比較 P 値	好酸球 vs コントロール P値	好酸球 vs 非好酸球 P値	非好酸球 vs コントロール P値
タンパク濃度 (ELISA)							
IgE (IU/ml)	89.1 (0-153.4)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.028	0.036	0.046	0.386
炎症細胞数							
好酸球	127.6 (64.4-181.9)	3.3 (0.7-7.9)	0 (0-0.05)	<0.001	<0.001	<0.001	0.005
形質細胞	21.6 (15.2-26.0)	33.1 (20.2-51.2)	6.0 (4.1-6.2)	<0.001	<0.001	0.038	<0.001
B細胞(CD20)	54.0 (45.5-71.5)	94.6 (65.0-173.0)	3.3 (2.5-5.6)	<0.001	<0.001	0.02	<0.001
マスト細胞	10.2 (9.2-15.0)	12.6 (11.0-19.5)	11.2 (7.5-13.7)	0.18	0.97	0.08	0.23
T細胞(CD3)	45.6 (29.0-93.8)	75.0 (44.4-151.6)	50.4 (33.4-57.0)	0.19	0.75	0.13	0.14
CD4陽性細胞	3.4 (2.3-7.3)	16.4 (10.0-24.2)	13.3 (10.3-16.5)	0.0016	0.005	0.0014	0.42
CD8陽性細胞	36.6 (16.2-56.1)	63.2 (42.9-82.1)	34.4 (23.4-58.0)	0.029	0.67	0.022	0.038
IgE陽性細胞	14.8 (11.6-21.8)	3.8 (1.3-5.4)	0 (0-0.19)	<0.001	<0.001	<0.001	0.004
FcεR1陽性	7.0 (5.3-10.2)	5.8 (3.0-8.8)	1.0 (0.7-4.4)	<0.001	<0.001	0.21	0.002
ST2陽性細胞	46.2(28.2-88.6)	10.0(4.8-11.8)	0.8(0.35-1.6)	<0.001	0.0011	0.002	0.005
T細胞転写因子のmRNA発現							
Tbet	0.85 (0.5-1.4)	2.5 (1.2-113.2)	1.7 (1.1-2.7)	0.06	0.17	0.03	0.28
GATA3	0.56 (0.33-0.73)	1.2 (0.54-39.9)	1.0 (0.9-1.9)	0.018	0.003	0.0049	0.92
FOXP3	2.3 (1.9-3.2)	10.0 (6.2-30.8)	2.1 (1.0-4.5)	<0.001	1	<0.001	0.005
RORc	0.37 (0.096-0.49)	0.66 (0.48-10.9)	1.1 (0.91-1.56)	0.007	0.0025	0.0023	0.56
サイトカインとtranscriptのmRNA発現							
IFN-γ	0.77 (0.28-1.2)	5.2 (1.4-16.4)	1.4 (0.81-2.2)	0.003	0.25	0.0015	0.04
IL-5	68.1 (4.9-207.6)	0.11 (0-1.1)	0.2 (0.02-0.4)	<0.001	<0.001	<0.001	0.65
IL-13	11.4 (2.6-19.4)	0.3 (0.002-5.0)	0.2 (0-4.6)	0.002	0.025	0.002	0.96
IL-4	0.43 (0.19-1.1)	0.3 (0.13-0.95)	0.78 (0.22-1.6)	0.62	0.83	0.42	0.42
IL-4R	0.052 (0.036-0.88)	0.11 (0.067-0.27)	0.24 (0.11-0.67)	<0.001	<0.001	0.03	0.04
IL-33	1.5(0.22-2.0)	3.5(0.56-16.0)	1.7(1.4-6.8)	0.78	0.46	0.66	0.81
IL-10	5.3 (2.5-8.1)	8.9 (4.0-268.4)	1.0 (0.93-2.4)	0.005	0.04	0.13	0.002
TGF-β 1	2.9 (1.9-4.0)	6.1 (3.6-17.6)	2.4 (1.5-2.9)	0.007	0.28	0.02	0.005
IL-17	4.1 (1.3-12.3)	22.0 (8.3-4534.0)	4.0 (1.6-8.2)	0.042	0.92	0.03	0.03
FcεR1	0.78 (0.09-1.3)	0.3 (0.2-0.5)	0.6 (0.4-0.9)	0.59	0.88	0.51	0.22
CD23	0.19 (0.07-1.2)	0.1 (0.05-0.19)	0.4 (0.02-0.9)	0.7	0.95	0.43	0.53
ST2	13.0(8.5-18.3)	2.6(1.7-25.8)	1.0(0.5-2.8)	0.029	0.048	0.19	0.17
ε GLT	0.17 (0-1.4)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.0055	0.017	0.013	0.46
IgE mature transcript	0.22 (0.013-0.77)	0.055 (0-0.57)	0 (0-0.22)	0.54	0.28	0.54	0.57
IgG mature transcript	6.1 (2.0-29.7)	103.0 (13.8-239.4)	12.6 (6.0-14.8)	0.03	0.71	0.015	0.06
AID	0 (0-0.75)	0 (0-1.7)	0 (0-0)	0.8	0.55	0.86	0.55
RAG1	1.28 (0.33-3.12)	2.3 (0.97-10.9)	2.0 (0.9-3.5)	0.59	0.77	0.33	0.51
RAG2	0.83 (0.50-1.62)	1.35 (0.90-3.3)	0.28 (0.19-0.86)	0.049	0.039	0.36	0.031

太字は P<0.05 で有意差のある項目

各症例での εGLT, IgE mature transcript ,AID mRNA の鼻粘膜での分布

Markers	Patient no.														Total	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
ECRS																
ε GLT	●	●						●	●	●	●	●		●		8/14
IgE	●	●	●				●		●	●	●	●	●	●		10/14
AID					●				●	●	●					4/14
non-ECRS																
ε GLT		●													/	1/13
IgE	●	●				●		●		●				●	/	6/13
AID		●	●					●							/	3/13
non-CRS																
ε GLT								/	/	/	/	/	/	/	/	0/7
IgE		●			●	●		/	/	/	/	/	/	/	/	3/7
AID				●				/	/	/	/	/	/	/	/	1/7

●が陽性症例

4. 考察

4-1. 好酸球性副鼻腔炎の臨床像

好酸球性副鼻腔炎の典型例は成人発症の副鼻腔炎で、両側性かつ多発性の浮腫性鼻茸を示すことが特徴である[53]。好酸球性副鼻腔炎は組織学的に鼻茸や副鼻腔粘膜に好酸球優位な炎症細胞浸潤がみられ、また、上皮細胞の剥脱や分泌細胞の増加、基底膜の肥厚もみられ、病理学的には喘息に酷似する[54]。ニカワ状の粘稠な分泌物の貯留を認め、粘液内にも好酸球浸潤がみられる（好酸球性ムチン）。中鼻甲介付近（中鼻道、嗅裂）の病変が強いため、早期より嗅覚障害を訴える症例が多い[53]。嗅覚障害を反映するように、上顎洞に比べ篩骨洞病変が優位であるが、進行すると汎副鼻腔病変となる。また、鼻茸のサイズが大きくなるほど鼻閉を訴える。喘息を合併することが多く、特にアスピリン喘息を合併する場合は難治である。アレルギー性鼻炎の関与は少なく、IgE値はさまざまである[55]。

今回我々の検討では、性別は男性が6割程度と男性の方が多い傾向にあり、男性の方が20歳以下での発症数が多く、平均年齢は男性のほうが有意に若かった。血中好酸球値（%）は統計学的には男女差を認めなかったが、好酸球16%以上の重症例の比率を比較すると女性の方が高率であった。好酸球性副鼻腔炎

症例の主訴は男性では鼻閉を主訴に受診されるケースが 7 割近いのに対し、女性では嗅覚障害を主訴にする症例がより多い傾向にあった。しかし、実際に症状の有無を比較すると男女ともそれほど大きな傾向の差はなく、このことは女性の QOL に嗅覚が大変重要という点を反映している可能性が示唆された。

合併症についてアレルギー性鼻炎合併率は男女とも半数程度で有意差を認めなかったが、好酸球性中耳炎、喘息合併率は女性の方が高率であった。つまり、女性の方がより重症例が多いという結果であった。

受診時の末梢好酸球値と患者の自己申告による副鼻腔炎症状の発症年齢について、検討前には好酸球値の高い症例は発症年齢が低いという可能性を予想していたが、明らかな傾向は認められなかった。一方副鼻腔炎症状の発症年齢と喘息症状の発症年齢は明らかな正の相関があり、大多数の症例で発症はほぼ同時期であった。このことは両者の病態生理に密接な関係があることを示唆している。末梢血好酸球値と血中総 IgE 値の関係を検討したが明らかな相関は認められなかった。一般に小児喘息やアトピー性皮膚炎では血中 IgE の高い重症の患者で好酸球も高い傾向にあるが、好酸球性副鼻腔炎ではそのような傾向は認められず、病態生理に違いがあることが示唆された。

4-2. 好酸球性副鼻腔炎のサイトカイン動態

4-2-1. Th2 サイトカインの動態について

ポリープ形成を伴う慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) 患者の鼻粘膜組織中または洗浄液中には、好酸球の走化性、活性化、寿命延長に強く関与する[56]、IL-5が増加していることが数多くの研究で確認されている[23]。また、CRSwNP 症例の鼻粘膜中では IL-4,13 といった Th2 タイプのサイトカインの上昇、および Th2 細胞の誘導因子である GATA3 の発現上昇も報告[57,58]されており、局所では Th2 細胞優位となっていることが示唆される。本研究においても、IL-5,13 の上昇は mRNA レベルで確認できており、諸家の報告を裏付ける結果となった。また、IL-4、IL-13 の共通のレセプターである IL-4 レセプターについては mRNA レベルで好酸球性副鼻腔炎群ポリープではコントロールと比較し有意に発現減少しており、IL-13 増多によるレセプターのダウンレギュレーションが示唆された。

IL-33 は、Th2 型のアレルギー性炎症の誘導・増悪に関与することが知られている[10]。我々の検討では IL-33 についてはタンパクレベル、mRNA レベルとも各群で差は認めなかった。以前の報告では Th2 関連疾患であるアレルギー性鼻炎[18,59] や喘息[9,60,61] で上皮内での IL-33 上昇が報告されている。慢性副

鼻腔炎においてもポリープの培養上皮細胞において、治療抵抗性の症例は治療反応性の症例と比較して IL-33 が高発現しているという報告がある[19]。IL-33 は獲得免疫にはあまり影響せず、自然免疫を介した炎症の増幅に関与する可能性が示唆されている[9]。副鼻腔炎においても上皮や腺組織の炎症で IL-33 が高発現する可能性があり、本報告においても好酸球性、非好酸球性副鼻腔炎で IL-33 は上皮、腺組織で高発現していた(図 16)。各群で IL-33 がタンパクレベル、mRNA レベルで有意差がなかったのは、鼻粘膜局所の炎症を反映していた可能性が示唆された。

一方で、IL-33 のレセプターである ST2 については好酸球性副鼻腔炎症例のポリープでコントロールと比較してタンパク、mRNA とも有意に高発現していた。また、好酸球性副鼻腔炎群のポリープでは非好酸球性副鼻腔炎群ポリープと比較し、有意に ST2 陽性の好酸球が増多していた。この結果は好酸球性副鼻腔炎において、好酸球の ST2 発現が upregulate されており、ポリープ中の炎症細胞の中で好酸球が主な IL-33 の標的細胞となっていることが示唆される。同じようにアレルギー疾患での ST2 発現上昇はアレルギー性鼻炎[59]やアトピー性皮膚炎[62]でも報告されている。また ST2 陽性 T 細胞 (CD3 陽性細胞) は認めなかったことから、副鼻腔粘膜内では IL-33 は T 細胞に直接作用しないことが示唆される。

今回の結果では ST2 発現は好酸球性、非好酸球性副鼻腔炎の両群間で差を認めなかったが、これは ST2 が腺細胞に偏在しているため、好酸球での高発現が mRNA やタンパクレベルで反映されなかったからと考えられる。好酸球は IL-33 の標的細胞の一つであるとされ[63-65]、好酸球での ST2 発現も報告されている[63,64] が、好酸球での ST2 発現の様式については議論されている段階である。Wong らは Western blot 法で好酸球での ST2 タンパクの発現を証明している[66] が、Cherry らは末梢血から分離した好酸球では ST2 はタンパクレベルでは発現していないが、mRNA レベルでは発現していると報告されている[8]。好酸球での ST2 発現は細胞の置かれている環境で左右されると考えられており、好酸球を granulocyte macrophage colony-stimulating factor 存在下に培養すると細胞表面に ST2 が発現する[8]と報告されている。今回、非好酸球性副鼻腔炎の好酸球で免疫染色において ST2 発現を認めなかった理由として、ST2 発現レベルが低かったため、免疫染色で検出されなかった可能性もある。

IL-33 はアレルギー性鼻炎モデルマウス[18]、ヒトのアレルギー性鼻炎に[67] おいてアレルギーの刺激によって粘膜上皮よりの分泌増加が報告されている。副鼻腔炎においても、IL-33 分泌刺激因子の検討が必要であり、今後の課題となる。IL-33 は好酸球の遊走や生存延長を促進[64] し、好酸球からのサイトカイン分泌を促進させる[63]。ごく最近の報告では好酸球性肺炎において IL-33 は好酸

球の重要な遊走因子として働くことが報告されている[68]。以上より、IL-33 は好酸球性副鼻腔炎症例のポリープにおいて、好酸球上の ST2 発現を増強させ、好酸球の遊走、活性化因子となり副鼻腔炎症を増悪させる要因となっている可能性が示唆された。

4-2-2. サイトカインと IgE クラススイッチについて

欧米での諸家の報告では CRSwNP は局所での IgE 産生が病態の形成に関連しているとされており、Bachert ら [23] は鼻ポリープ内の IgE 濃度は、血清や非ポリープ粘膜と比較して優位に高く、IL-5、ECP、LTC4/D4/E4 と関連しており、IgE と好酸球性炎症は強く関連していると報告した[23]。また Bachert ら [23] は、アレルギー性鼻炎患者と比較してポリープ形成を伴う慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) 患者のポリープ内 IgE は skin prick test における抗原とは関連がなく、このことは IgE の局所産生を示唆するとした。

通常、季節性アレルギー性鼻炎患者において、鼻粘膜局所でアレルゲンに誘発されて IgE へのクラススイッチが起こり、IL-4、IgE heavy chain (Cε)、IgE heavy chain promoter (Iε)が mRNA レベルで上昇する[69,70]。IL-4 は IgE 産生に必要であるが、我々の報告と同様に Bachert ら [23]も鼻粘膜局所での IgE 増多を確認し

ているにもかかわらず、IL-4 の発現増多は認められなかったと報告している。

Simon ら[71]も同様に鼻ポリープでのIL-4の上昇は認めないことを報告しており、また、IgE 産生には高濃度のIL-5の存在下であれば、IL-4は少量のみ存在すればよく[72,73]、IL-13がIL-4に代わる役割を果たす可能性も報告されている[74]。

本研究では我が国における好酸球性副鼻腔炎群ポリープでは、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、コントロールと比較し、

- 1) IgEのタンパクレベルでの上昇及びIL-5のmRNAレベルでの上昇を認めた。
- 2) Mature IgE transcript mRNAの陽性率が有意に高かった。
- 3) IL-13およびεGLTのmRNAレベルでの有意な上昇を認めた。
- 4) RAG2のmRNAレベルでの上昇を認めた。

以上の結果より、好酸球性副鼻腔炎群のポリープ内のB細胞ではIgEへのクラススイッチおよび、局所でのIgE産生が行われていることが示唆される。

Bachert らの報告はベルギーをはじめとするヨーロッパの患者を対象とした報告であるが、Sejima ら[75]は日本で、Shi J ら[76]は中国のポリープ形成を伴う慢性副鼻腔炎(CRSwNP)症例で篩骨洞粘膜内のIgEが、ポリープを伴わない副鼻腔炎症例やコントロール粘膜と比較し、有意に増多していると報告した。

Sheahan ら [77]はポリープ形成を伴う慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) 群、ポリープを伴わない副鼻腔炎群、コントロールで、副鼻腔や下鼻甲介組織の総 IgE に有意差はないが、CRSwNP 症例の副鼻腔組織には全身的なアトピー素因がなくても、一般の多数の吸入抗原に対する IgE が陽性になっていることを報告した。ごく最近の報告では Gevaert ら [48] がヨーロッパのポリープ形成を伴う慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) 症例において、IL-4, ϵ GLT, ϵ -mRNA, IgE タンパクを証明することで、局所での IgE へのクラススイッチを証明した。

今回我々はポリープ形成を伴う慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) 症例において副鼻腔粘膜内の IgE 高値を証明し、先行研究での結果を裏付ける結果となった。我々の渉猟しえた範囲では、本研究はアジアの症例で初めて、鼻ポリープ内での IgE クラススイッチを証明する報告である。

ただし、今回の実験では局所での IgE クラススイッチの直接的な証明となる環状 DNA (I ϵ -C μ and I ϵ -C γ Circular Transcript)は繰り返し検出を試みたが、検出ができなかった。さらに、RAG1,2 の免疫染色も繰り返し染色を試みたができなかったため、この点に関しては更なる解析を要すると考えられる。

4-3. 好酸球性副鼻腔炎の細胞動態

4-3-1 T 細胞動態について

今回の報告において、Th2 細胞の誘導因子である GATA3 と Th17 細胞の誘導因子である RORc について、従来の報告と逆に好酸球性副鼻腔炎群ポリープで非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、コントロールと比較し mRNA レベルで発現低下を認めた。GATA3 は代表的な Th2 細胞の誘導因子であるが、現在 Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) や他の免疫細胞の誘導や活性化も司っていることが分かっている [78]。今回の研究で Th2 細胞の実数を計測できておらず、GATA3 mRNA 発現のみでは、Th2 細胞の数や活性を論じることはできない。さらに、Treg 細胞の誘導因子である FOXP3 と Th1 細胞の誘導因子である Tbet については非好酸球性副鼻腔炎群ポリープにおいて好酸球性副鼻腔炎群ポリープと比較し発現上昇を認めた。

IL-10 は炎症や免疫反応の調節に深くかかわっており、末梢の Treg 細胞の導入、免疫寛容に寄与している [79]。今回我々は、コントロールと比較し非好酸球性副鼻腔炎群ポリープにおいて IL-10 の mRNA レベルでの高発現を、一方で好酸球性副鼻腔炎群ポリープでの低発現を報告した。TGF- β と IL-10 はともに炎

症に対して抑制性のサイトカインであり、相補的に働いており、TGF- β は IL-10 に対して促進する働きをし、IL-10 も TGF- β の調節性を促進する[80]。本報告における好酸球性副鼻腔炎群ポリープ局所での IL-10 低発現および、TGF- β 1 のコントロールと有意差ない発現は、炎症における調節性の欠如を示しており、好酸球性副鼻腔炎における炎症の慢性化に寄与している可能性が示唆される。

本報告では、好酸球性副鼻腔炎群ポリープ局所において IL-5, 13 上昇を認め、Th2 優位の炎症と考えられたが、CD4 陽性細胞数および Th2 細胞転写因子である GATA3mRNA 発現は低下していた。この結果は従来 of 報告と異なるものであり、説明が難しい。もっとも単純な説明としては、Th2 細胞の減少による GATA3 低下である。しかし、遺伝子発現の調整は複雑で、GATA3 および Th2 サイトカインはおもに Th2 細胞が起源であると考えられるが、実際はほかの種類 of 細胞も GATA3 や Th2 サイトカインを発現している[78]。そのため、GATA3mRNA 発現のみでは、必ずしも Th2 活性や細胞数に直結しないと考えられる。

鼻ポリープ中の GATA3 mRNA 発現は、報告によりかなり異なっている。中国の報告では Li ら[81]は鼻ポリープ中での GATA3 mRNA 低発現を報告しているが、Zhang ら[82]は鼻ポリープの GATA3 発現はコントロールと比較し有意差がなかったと報告している。これに対し、Shi ら[76]は、同じく中国の副鼻腔

炎患者ポリープにおいて、GATA3 の高発現を報告している。欧米の報告では Van Bruaene ら[58]、Zhang ら[82]は 鼻ポリープ中の GATA3 の高発現を、Miljkovic ら[83]は低発現を報告している。我々の報告で、ポリープを伴う副鼻腔炎症例を好酸球性、非好酸球性に分類せず、一つの群 (n=20) として検討すると、GATA3 発現はコントロールと比較し有意差がない (p=0.11)。GATA3 発現については、上記のように人種や臨床症状の重症度によっても一定しておらず、むしろ患者群の選別方法で差が出るのかもしれないと考えられた。

鼻ポリープ中で Th2 サイトカイン上昇にもかかわらず GATA3 低下に対する一つの仮説として、Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s)の関与が示唆されている [83]。Innate lymphoid cells (ILCs)は自然免疫、粘膜表面のリモデリングに関与している細胞群であり、機能的にヘルパーT細胞と関連しておりヘルパーT細胞関連のサイトカイン産生をし、形態的にリンパ球に類似している。ILCsのサブセットとして group 2 ILCs (ILC2s)が定義されており、近年ヒト鼻粘膜で同定され[20,84]、Th2 型免疫反応を惹起し[85]、IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 のサイトカイン放出をすることが分かっている[84,85]。ごく最近、Miljkovic らは鼻ポリープ中で IL-5 と IL-13 mRNA の上昇と IL-25 と GATA3mRNA の減少、および ILC2 の増多を報告している[83]。さらに Klein Wolterink らはアレルギー性喘息モデルマウスにおいて ILC2 は古典的な Th2 細胞よりも驚くべきほど多く

の IL-5, 13 を産生していると報告しており [86]、ILC2 は Th2 型サイトカインの重要な産生細胞である。それ故、好酸球性副鼻腔炎群ポリープにおいて IL-5, 13 の主要産生細胞は Th2 細胞ではなく、ILC2 であることが示唆されるが、更なる検討が必要であると考えられる。

慢性副鼻腔炎において T 細胞の動態、好酸球やほかの炎症細胞の浸潤の程度にかかわらず、好酸球性、非好酸球性副鼻腔炎とも同じような形態のポリープを形成する。慢性副鼻腔炎はヘルパーT 細胞由来の炎症性疾患であるとされているが、その病態生理は単純ではなく、まだ同定されていないリモデリング傷害などの病態があることが示唆される。ポリープ形成の病態生理について更なる研究が必要であると考えられる。

4-3-2 IgE と細胞動態

我々はポリープ内の好酸球数及び IgE 濃度によって日本人のポリープ形成を伴う慢性副鼻腔炎 (CRSwNP) 症例には好酸球性群、非好酸球性群の 2 つのタイプがあることを示した。好酸球性副鼻腔炎症例ではポリープ内の IgE 濃度と好酸球浸潤の程度が関連しているのに対し、非好酸球性副鼻腔炎ではその傾向は認めなかった。

今回我々は好酸球性副鼻腔炎群ポリープの IgE 陽性細胞はマスト細胞が多くを占めることを示した。上皮下層の FcεR1 陽性細胞数と IgE 陽性細胞数の間には有意な正の相関関係を認めた。これらの結果は好酸球性副鼻腔炎群では IgE が結合したマスト細胞が脱顆粒することにより、ポリープ内に集積した IgE が病態の形成に寄与していることが示唆された。我々の報告と同時期に Cao ら[87] は中国の CRSwNP 症例について詳細な報告をしており、我が国と同様に中国でも、CRSwNP は好酸球性、非好酸球性群に分類できるとしている。好酸球性群は我が国の好酸球性副鼻腔炎群とほぼ同様のサイトカインや細胞動態を示しており、好酸球性副鼻腔炎症例において、鼻粘膜局所での Mast cell chymase 陽性である活性化マスト細胞は、局所 IgE レベル、eotaxin-1 レベル、好酸球数と関連があることを報告している[87]。このことは活性化したマスト細胞が脱顆粒することで好酸球炎症を増強させることを示唆する[87]。また、活性化マスト細胞はプロスタグランジン D2 のような様々なサイトカインやケモカインを放出し、それらが Th2 細胞や好酸球の活性化、組織の浮腫を誘発することとなる[88]。今後は、好酸球性副鼻腔炎の病態解明のため、マスト細胞の動態の更なる検討が必要であると考えられた。

また、IgE 陽性形質細胞は、好酸球性群、非好酸球性群共にポリープ中の浸潤数が少なかったが、浸潤細胞数は好酸球性副鼻腔炎群で有意に増多していた。

さらに、B 細胞 (CD20 陽性) と IgE の二重染色の実験では、二重陽性細胞が皆無であったため、IgE 産生細胞は形質細胞であると考えられた。

IgE 陽性細胞は好酸球性副鼻腔炎群ポリープにおいて、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープと比較し優位に増多しており、IgE 陽性細胞のほとんどはマスト細胞であった。マスト細胞は通常 IgE の高親和性レセプターである $Fc \epsilon RI$ を発現しているが、 $Fc \epsilon RI$ 陽性細胞数は、2 つの群で有意差を認めなかった。

この矛盾は、免疫染色の感度で説明できると考えられる。 $Fc \epsilon RI$ 陽性細胞において、免疫染色で陽性になるほど多くの IgE が結合していなければ、免疫染色で IgE 陽性細胞として特定することができない。好酸球性副鼻腔炎群のポリープ内では、形質細胞からの IgE 産生が増加していて IgE 濃度が高いため、positive feedback によりマスト細胞表面により多くの $Fc \epsilon RI$ が発現し、個々の $Fc \epsilon RI$ 陽性細胞表面にはより多くの IgE が結合することとなる。免疫染色では、多くの IgE が結合した細胞は、より陽性細胞として検出しやすくなるため、好酸球性副鼻腔炎群ではより多くの IgE 陽性細胞が検出できたことが示唆される。

また、好酸球性副鼻腔炎群ポリープにおいて IgE 陽性細胞および IgE タンパクの高値が示されたが、IgE mature transcript の mRNA 高発現を示すことはできなかった。PCR は遺伝子の発現増強を見る手段であり、免疫染色はその先のタンパク合成をみる手段である。遺伝子レベルでは IgE mature transcript は各群で同

様に発現しているが、その後の転写のレベルの調節が異なり、好酸球性副鼻腔炎群では IgE の転写およびタンパク合成のレベルで増強していることが示唆される。

さらに、IgE mature transcript は全ての群で検出され、mRNA レベルで発現量は各群で有意差を認めなかった。このメカニズムについてはっきりしたことは不明だが、非好酸球性副鼻腔炎群ポリープ、コントロール群においても免疫染色や ELISA で検出できない程度の微量な IgE が産生されている可能性がある。

Recombinase activating genes (RAG) は B 細胞のレセプターの再構築を司る遺伝子である。胚中心 B 細胞では centroblast 細胞で RAG1/RAG2 分子の発現が見られ、遺伝子再構成が起こっている[33]。RAG1、RAG2 は一般に receptor revision のマーカーとして使用されている。Receptor revision は抗原に対して多様な抗体を構築するとともに、自己抗体の構築を排除するプロセスでもある。その結果としてこれらの酵素は、リンパ球が分化している間には免疫寛容のプロモーターとなる[89]。原則的には一度 T 細胞や B 細胞が成熟すると RAG の発現は消失し、細胞は末梢へ放出される[89]。しかし、Gevaert ら [48] は CRSwNP 症例の鼻粘膜局所での receptor revision の存在を報告した。

局所での receptor revision は B 細胞、T 細胞、形質細胞で RAG1、RAG2 が

up regulate することが証明となる[33]。今回我々は、コントロール群と比較して好酸球性副鼻腔炎群および非好酸球性群ポリープでの RAG2 の mRNA レベルでの高発現を証明し、これはポリープ局所での receptor revision を示唆する所見であった。これは非好酸球性副鼻腔炎群では IgG へのクラススイッチを、好酸球性副鼻腔炎群では IgE へのクラススイッチを示唆する所見であると考えられた。

5. 結論

好酸球性副鼻腔炎の臨床像については男性の方がより若年発症が多く、女性では喘息、好酸球性中耳炎合併例が多かった。副鼻腔炎症状の発症年齢と喘息症状の発症年齢において正の相関があり、これは両者の病態生理に密接な関係があることを示唆していると考えられた。

好酸球性副鼻腔炎症例のポリープにおいて IL-5,13 の上昇及び IL-33 のレセプターである ST2 がタンパクレベル、mRNA レベルともに上昇しており、ST2 陽性好酸球も増多していた。この所見は IL-33 と ST2 が好酸球性副鼻腔炎の病態形成に重要な役割を果たしていることを示唆する。

好酸球性副鼻腔炎症例のポリープ局所での IgE へのクラススイッチを示唆する所見を得、IgE は主にマスト細胞に存在することが示された。また、好酸球性副鼻腔炎症例のポリープ局所での IgE 産生細胞は形質細胞であることが示唆された。一方で、非好酸球性副鼻腔炎ではポリープ内での IgG mature transcripts の増多が確認され、日本では欧米の慢性副鼻腔炎とは異なった病型があることが示唆された。鼻粘膜局所の IgE はマスト細胞に作用して脱顆粒を促進し、副鼻腔炎の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

6. 謝辞

本論文を作成するにあたり、終始適切なご助言を賜り丁寧なご指導ご鞭撻をいただいた東京大学大学院医学系研究科外科学専攻耳鼻咽喉科学教室、山岨達也教授に謹んで御礼申し上げます。

また東京大学耳鼻咽喉科、近藤健二講師には、好酸球性副鼻腔炎の研究の機会を与えて下さり、本研究の遂行にあたり詳細なご指導をいただき、論文のご指導を賜りました。心より感謝いたします。

帝京大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー学教室、鈴木真穂先生、大田健教授（現・独立行政法人国立病院機構東京病院）には、好酸球に関する基礎知識をご教示いただき、研究、論文の作成の詳細なご指導をいただきました。深く感謝いたします。

東京大学耳鼻咽喉科、牛尾宗貴先生、鈴木佳吾先生、江上直也先生、金谷佳織先生、平野真希子先生には本研究で用いた鼻粘膜検体収集、臨床データの収集、研究のご指導をしていただきました。心より感謝いたします。

帝京大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー学教室、五十嵐彩夏様にはELISA、PCRのご指導をいただきました。東京大学耳鼻咽喉科、露崎敦子様、三輪紀美子様には本研究で用いた組織標本の作製をしていただきました。東京

大学耳鼻咽喉科、藤本千里先生、妻・馬場美雪には実験手技のご指導をいただき、技術面でのサポートをしていただきました。深く感謝しております。

日本鼻科学会、耳鼻咽喉科・免疫アレルギー学会にて本研究においてターニングポイントとなる貴重なご意見をいただいた福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座、藤枝重治教授、横浜市立大学市民総合医療センター、石戸谷淳一教授に心より御礼申し上げます。

7. 本論文を構成する論文

査読付き英語論文

[1] Baba S, Kondo K, Kanaya K, Suzukawa K, Ushio M, Urata S, Asakage T, Kakigi A, Suzukawa M, Ohta K, et al.: Expression of IL-33 and its receptor ST2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope* 2014, 124:E115-122.

[2] Baba S, Kondo K, Toma-Hirano M, Kanaya K, Suzukawa K, Ushio M, Suzukawa M, Ohta K, Yamasoba T: Local increase in IgE and class switch recombination to IgE in nasal polyps in chronic rhinosinusitis. *Clinical & Experimental Allergy* 2014, 44:701-712.

[3] Baba S, Kagoya R, Kondo K, Suzukawa M, Ohta K, Yamasoba T: T-cell Phenotypes in Chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Japanese Patients. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2015, 11:33.

図 16-21 については上記論文[1]、表 1、図 14、26、28、29 については上記論文 [2]、図 22 については上記論文[3]において使用、発表している。

8. 引用文献

1. 市村 恵一: **【日常診療に使えるガイドライン特集 より良い診療を目指して】**
疾患編 感染症 副鼻腔炎診療の手引きに基づく診療. *総合臨床* 2010,
59:848-850.
2. Naumann WH: **[Orbital complications of sinusitis]**. *Z Laryngol Rhinol Otol* 1973,
52:321-325.
3. Messerklinger W: **[Pathological changes in the maxillary sinus fontanelle]**. *Arch
Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd* 1971, **199**:675-678.
4. Haruna S, Otori N, Yanagi K, Moriyama H: **[Eosinophilic sinusitis]**.
[Oto-Rhino-Laryngology, Tokyo] 2001, **44**:195- 201.
5. Fokkens W, Lund V, Mullol J: **EP3OS 2007: European position paper on
rhinosinusitis and nasal polyps 2007. A summary for otorhinolaryngologists.**
Rhinology 2007, **45**:97-101.
6. Ishitoya J, Sakuma Y, Tsukuda M: **Eosinophilic chronic rhinosinusitis in Japan.**
Allergol Int 2010, **59**:239-245.
7. Kimura N, Nishioka K, Nishizaki K, Ogawa T, Naitou Y, Masuda Y: **Clinical effect
of low-dose, long-term roxithromycin chemotherapy in patients with**

- chronic sinusitis.** *Acta Med Okayama* 1997, **51**:33-37.
8. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H: **A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils.** *J Allergy Clin Immunol* 2008, **121**:1484-1490.
9. Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H: **IL-33 and Airway Inflammation.** *Allergy Asthma Immunol Res* 2011, **3**:81-88.
10. Arend WP, Palmer G, Gabay C: **IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines.** *Immunol Rev* 2008, **223**:20-38.
11. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, et al.: **IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.** *Immunity* 2005, **23**:479-490.
12. Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU: **IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:18660-18665.
13. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G: **Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells.** *J Immunol* 2007, **179**:2051-2054.

14. Ho LH, Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Suto H, Iikura M, Okayama Y, Akira S, Saito H, Galli SJ, et al.: **IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals.** *J Leukoc Biol* 2007, **82**:1481-1490.
15. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S: **Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells.** *Nature* 2010, **463**:540-544.
16. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, et al.: **Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity.** *Nature* 2010, **464**:1367-1370.
17. Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisley CJ, Erle DJ, Locksley RM: **Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, **107**:11489-11494.
18. Haenueken Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, et al.: **A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis.** *J Allergy Clin Immunol* 2012.
19. Reh DD, Wang Y, Ramanathan M, Jr., Lane AP: **Treatment-recalcitrant chronic rhinosinusitis with polyps is associated with altered epithelial cell**

- expression of interleukin-33.** *Am J Rhinol Allergy* 2010, **24**:105-109.
20. Shaw JL, Fakhri S, Citardi MJ, Porter PC, Corry DB, Kheradmand F, Liu YJ, Luong A: **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.
21. Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, Bachert C: **Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators.** *Allergy* 2006, **61**:1280-1289.
22. Riechelmann H, Deutschle T, Rozsasi A, Keck T, Polzehl D, Burner H: **Nasal biomarker profiles in acute and chronic rhinosinusitis.** *Clin Exp Allergy* 2005, **35**:1186-1191.
23. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P: **Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2001, **107**:607-614.
24. Bachert C, Zhang N, Holtappels G, De Lobel L, van Cauwenberge P, Liu S, Lin P, Bousquet J, Van Steen K: **Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **126**:962-968, 968 e961-966.

25. Ramaswamy K, Hakimi J, Bell RG: **Evidence for an interleukin 4-inducible immunoglobulin E uptake and transport mechanism in the intestine.** *J Exp Med* 1994, **180**:1793-1803.
26. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A: **Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern.** *J Immunol* 1997, **158**:2406-2413.
27. 藤枝重治: *鼻粘膜局所IgE 産生 CLIENT21*, vol 18. 東京: 中山書店; 2001.
28. Jung S, Rajewsky K, Radbruch A: **Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element.** *Science* 1993, **259**:984-987.
29. Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, de Vries JE: **Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production.** *J Exp Med* 1990, **172**:463-473.
30. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, Smurthwaite L: **The biology of IGE and the basis of allergic disease.** *Annu Rev Immunol* 2003, **21**:579-628.
31. Fujieda S, Lin YQ, Saxon A, Zhang K: **Multiple types of chimeric germ-line Ig heavy chain transcripts in human B cells: evidence for trans-splicing of**

- human Ig RNA. *J Immunol* 1996, 157:3450-3459.**
32. Nemazee D: **Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance.**
Nat Rev Immunol 2006, **6**:728-740.
33. Gellert M: **V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation.**
Annu Rev Biochem 2002, **71**:101-132.
34. Fear DJ, McCloskey N, O'Connor B, Felsenfeld G, Gould HJ: **Transcription of Ig germline genes in single human B cells and the role of cytokines in isotype determination. *J Immunol* 2004, 173:4529-4538.**
35. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE: **Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:3730-3734.**
36. Zhou C, Saxon A, Zhang K: **Human activation-induced cytidine deaminase is induced by IL-4 and negatively regulated by CD45: implication of CD45 as a Janus kinase phosphatase in antibody diversification. *J Immunol* 2003, 170:1887-1893.**
37. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T: **Class switch recombination and hypermutation require activation-induced**

- cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000, **102**:553-563.
38. Sigman K, Ghibu F, Sommerville W, Toledano BJ, Bastein Y, Cameron L, Hamid QA, Mazer B: **Intravenous immunoglobulin inhibits IgE production in human B lymphocytes.** *J Allergy Clin Immunol* 1998, **102**:421-427.
39. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, Honjo T: **Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells.** *J Biol Chem* 1999, **274**:18470-18476.
40. Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Robinson DS, Kay AB, et al.: **IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **154**:1497-1504.
41. Humbert M, Durham SR, Kimmitt P, Powell N, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Kay AB, Corrigan CJ: **Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 1997, **99**:657-665.

42. Ying S, Humbert M, Meng Q, Pfister R, Menz G, Gould HJ, Kay AB, Durham SR:
Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001, **107**:686-692.
43. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G, Barkans J, Ying S, Kay AB: **High-affinity IgE receptor (FcepsilonRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **153**:1931-1937.
44. Ying S, Humbert M, Barkans J, Corrigan CJ, Pfister R, Menz G, Larche M, Robinson DS, Durham SR, Kay AB: **Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics.** *J Immunol* 1997, **158**:3539-3544.
45. Takhar P, Smurthwaite L, Coker HA, Fear DJ, Banfield GK, Carr VA, Durham SR, Gould HJ: **Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis.** *J Immunol* 2005, **174**:5024-5032.
46. Cameron L, Gounni AS, Frenkiel S, Lavigne F, Vercelli D, Hamid Q: **S epsilon S mu and S epsilon S gamma switch circles in human nasal mucosa following**

- ex vivo allergen challenge: evidence for direct as well as sequential class switch recombination.** *J Immunol* 2003, **171**:3816-3822.
47. Coker HA, Durham SR, Gould HJ: **Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients.** *J Immunol* 2003, **171**:5602-5610.
48. Gevaert P, Nouri-Aria KT, Wu H, Harper CE, Takhar P, Fear DJ, Acke F, De Ruyck N, Banfield G, Kariyawasam HH, et al.: **Local receptor revision and class switching to IgE in chronic rhinosinusitis with nasal polyps.** *Allergy* 2013, **68**:55-63.
49. Fokkens W, Lund V, Bachert C, Clement P, Hellings P, Holmstrom M, Jones N, Kalogjera L, Kennedy D, Kowalski M, et al.: **EAACI position paper on rhinosinusitis and nasal polyps executive summary.** *Allergy* 2005, **60**:583-601.
50. Kondo K, Suzukawa K, Sakamoto T, Watanabe K, Kanaya K, Ushio M, Yamaguchi T, Nibu K, Kaga K, Yamasoba T: **Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death.** *J Comp Neurol* 2010, **518**:1962-1975.
51. Mechtcheriakova D, Sobanov Y, Holtappels G, Bajna E, Svoboda M, Jaritz M,

- Bachert C, Jensen-Jarolim E: **Activation-induced cytidine deaminase (AID)-associated multigene signature to assess impact of AID in etiology of diseases with inflammatory component.** *PLoS One* 2011, **6**:e25611.
52. Leduc V, Legault V, Dea D, Poirier J: **Normalization of gene expression using SYBR green qPCR: a case for paraoxonase 1 and 2 in Alzheimer's disease brains.** *J Neurosci Methods* 2011, **200**:14-19.
53. 春名 眞一, 鴻 信義, 柳 清, 森山 寛: **好酸球性副鼻腔炎 (Eosinophilic Sinusitis).** *耳鼻咽喉科展望* 2001, **44**:195-201.
54. 岡野 光博: **好酸球性副鼻腔炎.** *鼻アレルギーフロンティア* 2010, **10**:142-147.
55. 山本 美紀, 岡野 光博, 滝下 照章, 菅田 裕二, 小川 晃弘, 西崎 和則: **好酸球浸潤を伴う慢性副鼻腔炎におけるアレルギー性鼻炎・アトピー・気管支喘息の関与.** *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* 2003, **21**:150-151.
56. Sanderson CJ: **The biological role of interleukin 5.** *Int J Cell Cloning* 1990, **8 Suppl 1**:147-153; discussion 153-144.
57. Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C: **Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens.** *Clin Exp Allergy* 2007, **37**:1840-1847.

58. Van Bruaene N, Perez-Novo CA, Basinski TM, Van Zele T, Holtappels G, De Ruyck N, Schmidt-Weber C, Akdis C, Van Cauwenberge P, Bachert C, et al.: **T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2008, **121**:1435-1441, 1441 e1431-1433.
59. Kamekura R, Kojima T, Takano K, Go M, Sawada N, Himi T: **The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis.** *Clin Exp Allergy* 2012, **42**:218-228.
60. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, et al.: **IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation.** *J Immunol* 2009, **183**:6469-6477.
61. Kakkar R, Lee RT: **The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker.** *Nat Rev Drug Discov* 2008, **7**:827-840.
62. Savinko T, Matikainen S, Saarialho-Kere U, Lehto M, Wang G, Lehtimäki S, Karisola P, Reunala T, Wolff H, Lauerma A, et al.: **IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors.** *J Invest Dermatol* 2012, **132**:1392-1400.
63. Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Xu D, Liew FY: **IL-33 exacerbates**

- eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol* 2010, **185**:3472-3480.**
64. Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H, Saito H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, et al.: **Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils.** *Lab Invest* 2008, **88**:1245-1253.
65. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA: **Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33.** *Blood* 2009, **113**:1526-1534.
66. Wong CK, Leung KM, Qiu HN, Chow JY, Choi AO, Lam CW: **Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in atopic dermatitis.** *PLoS One* 2012, **7**:e29815.
67. Asaka D, Yoshikawa M, Nakayama T, Yoshimura T, Moriyama H, Otori N: **Elevated levels of interleukin-33 in the nasal secretions of patients with allergic rhinitis.** *Int Arch Allergy Immunol* 2012, **158 Suppl 1**:47-50.
68. Wen T, Besse JA, Mingler MK, Fulkerson PC, Rothenberg ME: **Eosinophil adoptive transfer system to directly evaluate pulmonary eosinophil trafficking in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:6067-6072.

69. Cameron LA, Durham SR, Jacobson MR, Masuyama K, Juliusson S, Gould HJ, Lowhagen O, Minshall EM, Hamid QA: **Expression of IL-4, Cepsilon RNA, and Iepsilon RNA in the nasal mucosa of patients with seasonal rhinitis: effect of topical corticosteroids.** *J Allergy Clin Immunol* 1998, **101**:330-336.
70. Durham SR, Gould HJ, Thienes CP, Jacobson MR, Masuyama K, Rak S, Lowhagen O, Schotman E, Cameron L, Hamid QA: **Expression of epsilon germ-line gene transcripts and mRNA for the epsilon heavy chain of IgE in nasal B cells and the effects of topical corticosteroid.** *Eur J Immunol* 1997, **27**:2899-2906.
71. Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K: **Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia.** *J Immunol* 1997, **158**:3902-3908.
72. Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Wideman J, Bonnefoy JY, De Vries JE: **Interleukin 5 enhances interleukin 4-induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen.** *Eur J Immunol* 1988, **18**:929-935.
73. Pene J, Chretien I, Rousset F, Briere F, Bonnefoy JY, de Vries JE: **Modulation of IL-4-induced human IgE production in vitro by IFN-gamma and IL-5: the role of soluble CD23 (s-CD23).** *J Cell Biochem* 1989, **39**:253-264.

74. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C: **Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells.** *J Clin Invest* 1997, **99**:1492-1499.
75. Sejima T, Holtappels G, Kikuchi H, Imayoshi S, Ichimura K, Bachert C: **Cytokine profiles in Japanese patients with chronic rhinosinusitis.** *Allergol Int* 2012, **61**:115-122.
76. Shi J, Fan Y, Xu R, Zuo K, Cheng L, Xu G, Li H: **Characterizing T-cell phenotypes in nasal polyposis in Chinese patients.** *J Invest Allergol Clin Immunol* 2009, **19**:276-282.
77. Sheahan P, Ahn CN, Harvey RJ, Wise SK, Mulligan RM, Lathers DM, Schlosser RJ: **Local IgE production in nonatopic nasal polyposis.** *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2010, **39**:45-51.
78. Tindemans I, Serafini N, Di Santo JP, Hendriks RW: **GATA-3 function in innate and adaptive immunity.** *Immunity* 2014, **41**:191-206.
79. Larche M: **Regulatory T cells in allergy and asthma.** *Chest* 2007, **132**:1007-1014.
80. Fuss IJ, Boirivant M, Lacy B, Strober W: **The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis.** *J Immunol* 2002, **168**:900-908.

81. Li CW, Zhang KK, Li TY, Lin ZB, Li YY, Curotto de Lafaille MA, Shi L, Wang DY:
Expression profiles of regulatory and helper T-cell-associated genes in nasal polyposis. *Allergy* 2012, **67**:732-740.
82. Zhang N, Van Zele T, Perez-Novó C, Van Bruaene N, Holtappels G, DeRuyck N, Van Cauwenberge P, Bachert C: **Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2008, **122**:961-968.
83. Miljkovic D, Bassiouni A, Cooksley C, Ou J, Hauben E, Wormald PJ, Vreugde S:
Association between group 2 innate lymphoid cells enrichment, nasal polyps and allergy in chronic rhinosinusitis. *Allergy* 2014, **69**:1154-1161.
84. Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, Fokkens WJ, Cupedo T, Spits H: **Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR2 and CD161.** *Nat Immunol* 2011, **12**:1055-1062.
85. Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA: **TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells.** *Nat Immunol* 2013, **14**:536-542.
86. Klein Wolterink RG, Kleinjan A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, Levani Y, Hendriks RW: **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.
87. Cao PP, Zhang YN, Liao B, Ma J, Wang BF, Wang H, Zeng M, Liu WH, Schleimer RP, Liu Z: **Increased local IgE production induced by common aeroallergens and phenotypic alteration of mast cells in Chinese eosinophilic, but not non-eosinophilic, chronic rhinosinusitis with nasal polyps.** *Clin Exp Allergy* 2014, **44**:690-700.
88. Galli SJ, Tsai M: **IgE and mast cells in allergic disease.** *Nat Med* 2012, **18**:693-704.
89. Doster A, Ziegler S, Foermer S, Rieker RJ, Heeg K, Bekeredjian-Ding I: **Phosphorothioate-modified CpG oligodeoxynucleotides mimic autoantigens and reveal a potential role for Toll-like receptor 9 in receptor revision.** *Immunology* 2013, **139**:166-178.