

【4】

氏 名	あくつ まこと 阿久津 誠
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第769号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (耳鼻咽喉・頭頸部外科学)
学位論文題目	Matrix metalloproteinase-8-positive neutrophils in nasal polyps are involved in the disease progression of eosinophilic chronic rhinosinusitis : a clinico-pathological study (鼻腔ポリープ中のMMP-8陽性好中球は、好酸球性副鼻腔炎の病態進行に 関与している)
論文審査委員	(主査) 教授 井 川 健 (副査) 教授 上 田 秀 一 教授 仁 保 誠 治

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis : ECRS) は慢性副鼻腔炎に含まれる難治性サブタイプで、著明な好酸球浸潤を伴う鼻腔ポリープの充満を認め、進行性の嗅覚障害、鼻閉、粘稠性鼻漏を伴う。ECRSと気管支喘息は病理組織学的に類似しており、両疾患は併発し同時に増悪することが知られている。

鼻腔ポリープの形成には組織リモデリング、細胞外マトリックスの破壊や基底膜障害などが関与しており、特にリモデリングについてはMatrix metalloproteinases (MMPs) が密接に関与している。重症喘息では下気道に好中球が多く存在していると報告されており、我々はECRS症例のポリープ中の好中球浸潤に関心を持ち、好中球から主に産生されるMMP-8に着目して検討を行うこととした。

【目 的】

ECRSの病態におけるMMP-8陽性好中球の関与を、非ECRSと比較することで解明することを目的としている。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学病院臨床研究審査委員会で承認を得て、患者・家族からインフォームド・コンセントを取得した上で施行した。対象は2017年4月から2019年12月に当科で内視鏡下鼻副鼻腔手術を施行した入院患者で、術中に鼻腔ポリープを採取し検討を行った。対象症例はJapanese

epidemiological survey of refractory eosinophilic chronic rhinosinusitis study (JESREC study) に基づき ECRS 群 50 例、非 ECRS 群 32 例の 2 群に分類した。

好中球は Alexa488 で標識した好中球エラストーゼを染色して同定、そして Alexa555 で標識した MMP-8 を染色、二重陽性の細胞を「MMP-8 陽性好中球」として認識し 200 倍 5 視野でカウント、好中球の MMP-8 陽性率を算出した。また ELISA 法を用いて、ポリープ中の MMP-8 の定量をおこなった。HE 染色、Al-PAS 染色、Elastica-Goldner 染色を用いて、組織リモデリングと間質線維化の評価をおこない、それぞれ MMP-8 陽性好中球との関連について検討した。組織リモデリングは過去の文献を参考にスコアを作成し、間質線維化は WinROOF 画像処理ソフトを用いて線維化面積を算出した。

臨床検査データと MMP-8 陽性好中球との関連について、末梢血中白血球とその分画（好中球、好酸球）、内視鏡下鼻腔ポリープスコア、Lund-Mackay CT スコア、T&T オルファクトメーターを用いて検討した。

ECRS 群、非 ECRS 群の 2 群間、そしてサブグループ間の比較は Kruskal-Wallis 検定にて行い、post hoc test には Bonferroni 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結 果】

MMP-8 陽性好中球は ECRS 群において有意差をもって高率に認められた。また MMP-8 定量値についても、ECRS 群で高値であった（有意差なし）。

組織リモデリングと間質線維化と MMP-8 陽性好中球との関連について、組織リモデリングスコアの上昇に伴って好中球の MMP-8 陽性率が低下する傾向をみとめた ($r = -0.425$, $p < 0.05$)。組織線維化については有意な関連はみられなかった。

臨床検査データと MMP-8 陽性好中球との関連について、Lund-Mackay CT スコアで軽度の相関を認め ($r = 0.369$, $p < 0.05$)、T&T オルファクトメーターについても軽度の正の相関をみとめた ($r = 0.321$, $p < 0.05$)。特に、Lund-Mackay CT スコアについては軽症-中等症、軽症-重症のサブグループ間で有意差を認める結果となった。末梢血白血球とその分画、内視鏡ポリープスコアと MMP-8 陽性好中球については、有意な関連はみられなかった。

【考 察】

蛍光免疫染色を行った結果、鼻腔ポリープ中に浸潤した好中球を正確に同定することができ、そして MMP-8 陽性好中球が ECRS 群で高率に認められることが分かった。また MMP-8 陽性好中球は、間質だけでなく上皮内にも認められた。MMP-8 は細胞外マトリックスのうち、基底膜の主要構成成分である I 型コラーゲンの分解に関与している。MMP-8 は気管支喘息患者の気道粘膜リモデリングに重要な役割を果たしていると報告されており、ECRS においても間質に存在する好中球が MMP-8 を分泌し、細胞外マトリックスや基底膜を破壊することで、上皮内に好中球や好酸球が浸潤する可能性が示唆された。気管支喘息の研究では血液中の好中球と好酸球が、増悪と気道過敏性に関与していると考えられているが、本検討では MMP-8 陽性好中球と末梢血に関連が示されなかったことから、MMP-8 陽性好中球は鼻粘膜局所でのみリモデリングに作用していると推測した。

組織リモデリングと間質線維化については ECRS 群で高いスコアであり、また内視鏡下鼻腔ポリ-

プスコアやCTスコアなどの臨床所見についてもECRS群で高値であった。ポリープ形成は組織リモデリングの最終産物と考えられており、この結果はECRSの重症度を反映しているものと推測された。ただ予想に反し、鼻腔ポリープ中のMMP-8陽性好中球の割合は、組織リモデリングスコアと逆相関の傾向であった。ECRSの鼻腔ポリープ中の炎症性メディエーターを解析した報告で、軽症例においてIL-8 mRNAの発現が高かったとされており、また間質線維化はTGF- β によって、慢性副鼻腔炎の初期に開始されると報告されている。この事からMMP-8陽性好中球についても、ECRSの病初期における組織リモデリングに関与している可能性が示唆された。

臨床検査データのうちCTスコアと嗅覚障害について、ECRS群で軽度の相関を認め、特にCTスコアではサブグループ間で統計学的に有意差を認めた。他のMMPsを用いた研究で、MMP-1, 2, 9はその遺伝子発現とCTスコアには相関が認められていなかったが、本研究ではMMP-8陽性好中球は有意差を認めており、病態の重症度との関連が示唆された。嗅覚障害についてもMMP-8陽性好中球が関与している可能性が示唆されたが、嗅粘膜上皮障害や嗅神経障害など多彩な原因を有することから、嗅粘膜を用いたMMP-8陽性好中球の評価を要すると考えられた。

【結 論】

本研究によりMMP-8陽性好中球がECRSの進行・重症度に関与している可能性が示唆され、ECRSの難治性の原因となっている可能性が示唆された。またMMP-8陽性好中球は、罹病初期の組織リモデリングに関与している可能性が示された。ECRSにおける治療ターゲットとして、MMP-8陽性好中球の有意性を確立させるため、今後は嗅覚障害との関連、さらに副鼻腔粘膜のリモデリングとMMPsの関連について、更に詳細な病理組織学的検討を要すると考えている。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

好酸球性副鼻腔炎 (eosinophilic chronic rhinosinusitis : ECRS) の鼻腔ポリープ中には、高度の好酸球浸潤のほか好中球も少なからず存在しており、好中球がその病態に関与しているのではないかと考えている。組織障害を中心とする組織リモデリングには、マトリックスメタロプロテナーゼ (Matrix Metaroproteinases : MMPs) が密接に関与していることが知られている。そこで好中球で主に産生されるMMP-8に着目し、その発現と組織リモデリングの状態・臨床検査データとの関連について検討した。

当科で内視鏡下鼻副鼻腔手術を施行した慢性副鼻腔炎患者を対象とし、JESREC studyに準じてECRS群 (50例)、non-ECRS群 (32例) の2群に分類した。蛍光免疫染色にて「MMP-8陽性好中球」を同定し、好中球におけるMMP-8陽性率を算出した。またHE染色、Al-PAS染色、elastica-Goldner染色を用いて組織リモデリングの評価をおこない、そして臨床検査データ (末梢血中白血球とその分画、鼻腔ポリープスコア、Lund-Mackay CTスコア、T&Tオルファクトメーター (基準嗅力検査)) を用い、MMP-8陽性好中球との関連を検討した。

その結果、MMP-8陽性好中球はECRS群で有意に高率に認められることが判明した。そしてこの

MMP-8陽性好中球の比率とLund-Mackay CTスコア、T&Tオルファクトメーターの間には正の相関が、組織リモデリングスコアとの間には負の相関が示された。間質線維化、末梢血中白血球・分画、鼻腔ポリープスコアとMMP-8陽性好中球の間には、有意な関連は指摘できなかった。

MMP-8は細胞外マトリックスのうちI型コラーゲンの分解に関与していることが分かっており、本研究より好中球で産生・分泌されたMMP-8によって組織構造が破綻する事で、上皮内に好中球や好酸球が浸潤すると考えられた。そしてMMP-8によって組織リモデリングが助長されることで鼻粘膜浮腫やポリープ形成がおこり、CTスコアの上昇や嗅覚障害の増悪に至ったものと推測された。また組織リモデリングとMMP-8陽性好中球の間には負の相関が示されており、MMP-8はECRSの病初期における組織リモデリングに関与しているのではないかと推測された。

本研究で得られた結果より、MMP-8陽性好中球はECRSの進行・重症化に関与している可能性が示唆され、ECRSの難治性の原因となっている可能性が示された。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、当大学臨床研究審査委員会の承認を得た上で、本邦での大規模疫学研究であるJESREC studyによって作成された診断基準に基づき、適切な群分けを行っている。そして標準的な実験方法である一般・特殊染色、そして蛍光免疫染色法を用いて、適切な病理組織学的な評価をおこなっている。また安全性に配慮しながら臨床データの収集と統計解析をおこなっている。そこから導き出された結論は論理的に矛盾するものではなく、本研究は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

ECRSに関する病理組織学的な報告は過去にも認められる。好酸球浸潤が病態の中心であると考えられており、多くの報告は好酸球に着目した研究である。ECRSにおける好中球、特にMMP-8に着目し、病態との関わりについて病理組織学的に検討をおこなったのは、申請論文が初めての報告である。その結果、鼻腔ポリープ中に浸潤した好中球も、ECRSの病態の一因を成している可能性が示唆されたと結論づけている。この点において本研究は新規性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、本邦における大規模疫学研究であるJESREC studyによって作成された診断基準に基づき、確実にECRSの診断をした上で、適切な群分けと臨床データの収集を行っている。また確立された実験手技と統計解析を用いており、導かれた結果から新規の知見となり、既存の研究も踏まえて結論として妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では鼻腔ポリープ中に浸潤する好中球に着目し、ECRSの病態の一因を成している可能性を示した。

ECRSは術後に再発をきたす症例が多いことが知られており、また病態の全貌解明には至っていないのが現状である。この研究結果は今後のECRS治療の発展・病態解明の一助となる、大変有意義な研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は鼻科学やアレルギー学の理論を学び実践した上で作業仮説をたて、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し貴重な知見を得ている。この研究結果は本学の医学雑誌に掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Dokkyo Journal of Medical Sciences

(47 : 125-136, 2020)