

アレルギー性鼻炎モデルマウス鼻粘膜における 一酸化窒素合成酵素 (NOS) の局在

與田 茂利

川崎医科大学耳鼻咽喉科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 一酸化窒素 (nitric oxide : NO) は, L-アルギニンを基質として, 一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase : NOS) により産生される. NOS には3種類のアイソフォーム (NOS1, NOS2, NOS3) が存在する. 気管支喘息患者では, 健常人と比べ呼気中 NO 濃度が上昇しており, 気管支喘息の病態には NOS2が関与している可能性が動物モデルで示されている. また, アレルギー性鼻炎でも鼻腔内 NO 濃度が上昇し, アレルギー性鼻炎モデル動物を用いた研究で NOS2がコントロール群と比べ有意に上昇していたと報告されているが, 鼻粘膜における NOS の局在を示す報告はない. 本研究では, アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて, 鼻粘膜における NOS アイソフォーム (NOS1, NOS2, NOS3) の同定および局在, 遺伝子発現量の変化について調べた. BALB/c 系雄性マウスに Cry j 1とアジュバンドの混濁液を day 0 (初回免疫日), day 3および day7の3回, 腹腔内投与した (1次免疫). さらに, day13から day26まで連日, Cry j 1を鼻腔内投与した (2次免疫). コントロール群のマウスには1次免疫も2次免疫も実施しなかった. 免疫組織化学とリアルタイム PCR を用いて鼻粘膜における NOS1, NOS2, NOS3の発現を調べた. 免疫組織化学的では, NOS1免疫陽性反応はアレルギー感作群, コントロール群ともに嗅上皮, 嗅神経に認めた. NOS2免疫陽性反応はアレルギー感作群では嗅上皮, 呼吸上皮, 嗅神経, 血管内皮細胞, 鼻腺導管で, コントロール群では嗅神経, 血管内皮細胞, 鼻腺導管で認めた. NOS3免疫陽性反応は両群とも血管内皮細胞に認めた.

リアルタイム PCR を用いて mRNA の発現量を検討したところ, コントロール群で NOS1, NOS2, NOS3の遺伝子発現を認めた. また, アレルギー感作群はコントロール群と比べ NOS1は有意に発現量の低下, NOS2, NOS3は有意に発現量の増加を認めた ($p<0.05$). NOS2は誘導型 NOS であるが, 嗅神経, 血管内皮細胞, 鼻腺導管で恒常的に発現していることが明白になった. NOS2はアレルギー感作群で有意な遺伝子発現量の増加が認められ, コントロール群で認められなかった呼吸上皮および嗅上皮に NOS2の発現が認められた. アレルギー感作群はコントロール群と比べ, NOS1は有意な遺伝子発現量の減少, NOS3は有意な遺伝子発現量の増加を認めた. アレルギー性鼻炎の病態に NOS2だけでなく NOS1, NOS3も関与していると考えられた.

(平成20年11月13日受理)

キーワード: アレルギー性鼻炎, 鼻粘膜, 一酸化窒素合成酵素

別刷請求先
與田茂利
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学耳鼻咽喉科学

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (464) 1197
Eメール: syoda@med.kawasaki-m.ac.jp

緒言

一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO) は、1987年に Palmer¹⁾ と Ignarro ら²⁾ のグループによってアセチルコリンによる血管拡張作用における内皮由来血管弛緩因子の本体として同定された。その後、神経伝達因子、感染防御の制御あるいは免疫などとして生体内で重要かつ多彩な役割が注目されている生理活性を有する物質であり、各種病態の発現にも関与していると言われている³⁾。NO は L-アルギニンを基質として NO 合成酵素 (Nitric Oxide Synthase : NOS) の働きにより合成され、同時に L-シトルリンを生じる。NOS には NOS1 (neuronal NOS : nNOS), NOS2 (inducible NOS : iNOS), NOS3 (endothelial NOS : eNOS) の 3 種類のアイソフォームが存在し⁴⁻⁹⁾、その活性機構、発現様式、および細胞内局在が明らかにされつつある。

気管支喘息患者では、健常人と比べ呼気中 NO は上昇しており¹⁰⁻¹²⁾、治療により低下¹³⁻¹⁵⁾、その産生細胞は気管上皮細胞およびマクロファージや好中球などの炎症細胞であると報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。また、喘息の気道リモデリングにおいて NOS2由来の NO が関与しているとの報告もある¹⁹⁾。

健常人での呼気中 NO の大部分は鼻腔または副鼻腔から産生されており²⁰⁾、この NO が下気道に供給され、肺胞の換気血流比の改善や線毛運動機能の賦活作用を介して、気道の生理的恒常性の維持に貢献していると考えられている²¹⁾。また、アレルギー性鼻炎患者の鼻腔内 NO は健常人と比べ有意に上昇していると言われている²²⁾。アレルギー性鼻炎モデルモルモットを用いたウェスタンブロット法で鼻粘膜の NOS2 がコントロール群と比べアレルギー群で有意に上昇していたとする報告²³⁾ や、アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いた免疫組織化学ではアレルギー群で鼻粘膜上皮に NOS2 が有意に染色されたとする報告がある²⁴⁾。しかし、鼻粘膜のどの細胞が NO を産生しているかを明確にした報告はなく、NOS1, NOS3 についてもアレルギー性鼻炎に関与しているのかどうか不明である。

今回の研究で、アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて、鼻粘膜における NOS アイソフォーム (NOS1, NOS2, NOS3) の同定および局在、遺伝子発現量の変化について調べた。

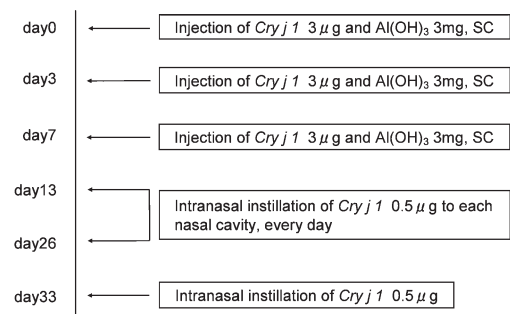
材料および方法

実験動物

6 週齢の BALB/c 系雄性マウス 22 匹を日本チャールス・リバー株式会社より購入し、2 日間の予備飼育後実験に使用した。マウスは予備飼育期間および実験期間を通して室温 23 ± 3℃、湿度 30~90%、照明時間 7 時~21 時のクリーンエリア飼育室で飼育し、固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業) と水を自由に摂取させた。本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.08-041)、川崎医科大学動物実験指針に基づき実施した。

アレルギー性鼻炎モデルの作製

感作対照群のマウスに、1 次免疫として、30 μg/300 μL の精製スギ花粉抗原溶液 (*Cryj 1*, 林原生物化学研究所) と水酸化アルミニウムゲル (Al(OH)₃, 和光純薬工業株式会社) を混合して作製した懸濁液を、初回 1 次免疫日 (0 日目) と 4 日後と 8 日後の 3 回、腹腔内に投与した。さらに 14 日目から、2 次免疫として 14 日間連日、1 日 1 回、0.5 μg/5 μL の精製スギ花粉抗原溶液をマウスの鼻腔内に注入して経鼻感作を行った。最後の経鼻投与から 1 週間後に、



Cryj 1 (*Cryptomeria japonica 1*) : Japanese cedar pollen

図1 感作スケジュール

マウスの鼻腔内に精製スギ花粉抗原溶液を注入して鼻症状を誘発後、安楽死させてサンプルを採取した(図1)。なお、コントロール群のマウスには1次免疫も2次免疫も実施しなかった。

血清総IgEの測定

市販のマウスIgE測定キット(森永生化学研究所)を用い、ELISA法で測定した。

スギ花粉Cryj1特異的IgE抗体の測定

イムノプレートにphosphate buffered saline (PBS)で希釈した10 μ g/mLの抗Cryj1モノクローナル抗体(林原生物化学研究所)を加え25 $^{\circ}$ C 3時間静置して固相化を行い、0.05% Tween20含有PBS (PBS-Tween)で洗浄後、0.1% bovine serum albumin (BSA) (タカラバイオ株式会社)含有PBSで4 $^{\circ}$ C 一晚ブロックした。0.1% BSA-PBSで希釈した血清とCryj1標準溶液を加え25 $^{\circ}$ C 2時間静置した。PBS-Tweenで洗浄後、0.1% BSA-PBSで希釈した0.25 μ g/mLのペルオキシダーゼ標識Cryj1モノクローナル抗体(林原生物化学研究所)を加え25 $^{\circ}$ C 3時間静置した。PBS-Tweenで洗浄後、フェニレンジアミンを加え、25 $^{\circ}$ C 20分静置し、2N硫酸を加え30分以内に490 nmの吸光度を測定した。

鼻症状

鼻腔内暴露試験として、鼻腔感作(2次免疫)の1週間後に、マウスの鼻腔に精製スギ花粉抗原溶液(Cryj1)を注入し、鼻症状を誘発した。入船²⁵⁾の鼻症状をスコア化した重症度判定表を一部用いて、10分間の鼻掻き行動とくしゃみの回数を測定した。

免疫組織化学

過剰ネブタールを腹腔内投与後に開心して、PBSにて全身灌流した後、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)にて灌流固定した。頭部を摘出して皮膚と筋を除去し、0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)にて5日間脱灰した後、パラフィン

包埋し、クリオスタットで6 μ m厚の前頭断連続切片の薄切スライド標本を作製した。キシレンにて脱パラフィンし、エタノール系列中で親水化を行い、0.03%過酸化水素水によって内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を行った。各種一次抗体を使用し、4 $^{\circ}$ C 一晚インキュベーションした。以後、ENVISION/HRP kit (DAKO)を用いてデキストランポリマー法で染色した。対比染色はヘマトキシリンにて行った。

一次抗体には、NOS1 (nNOS, Millipore Corp.), NOS2 (iNOS, 和光純薬工業株式会社), NOS3 (eNOS, Alpha Diagnostic International, Inc.)を使用した。なお、これらの抗体は、NOS1は1,000倍、NOS2は500倍、NOS3は1,000倍に希釈して使用した。

RNAの抽出とcDNAの合成

過剰ネブタールを腹腔内投与後、断頭し、鼻中隔から鼻腔天蓋、鼻腔外側の粘膜を全周的に採取した。鼻粘膜からtotal-RNAを抽出するためにISOGEN(株式会社ニッポンジーン)を使用した。サンプルにISOGEN 0.6 mLを添加しホモジナイズし、クロロホルム 0.2 mLを添加、3分間室温にて静置した。その後、4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm、15分間遠心し、水層・中間層・有機層に分かれた水層のみを新しいエッペンチューブに移した。移した水層部に水層量と等量のイソプロパノールを添加、5分間静置した後、4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、15分間遠心した。上清を破棄した後、70%エタノール 1 mLを添加し、4 $^{\circ}$ C、7,500 rpm、5分間遠心洗浄し再度ペレットを作製した。遠心後上清を捨て乾燥させた後、diethyl pirocarbonate (DEPC) 処理水を加えた。RNA濃度は分光光度計で測定し、1,500 ng/ μ Lになるように調整した。次に、cDNA合成にはTaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)を使用した。total-RNA 20 μ L、10 \times TaqMan RT Buffer 4 μ L、MgCl₂ 4.4 μ L、dNTP mix 4 μ L、Random Hexamers 1 μ L、RNase inhibitor 0.4 μ L、逆転写酵素 0.5 μ L、DEPC 処理水5.7 μ Lを混合し、25 $^{\circ}$ C 10分間、

48℃ 30分間, 95℃ 5分間の条件で反応させた。

マウス鼻粘膜の Real-time PCR 解析

SYBR Green による Real-time PCR 法を用いた。プライマーは GenBank の nucleotides からダウンロードした mRNA sequence に基づき Primer Express で設計し、blast を用いてプライマーの相同性について確認した。PCR は、Real-time PCR 機器である ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) により、反応検出試薬 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を指定の方法で用いて行った (DNA 含有試料 0.5 μ L, primer 溶液 1 μ L, 反応溶液総量 10 μ L)。PCR 条件は、50℃ 2分間, 95℃ 10分間で反応させ、95℃ 15秒間, 60℃ 1分間を 50 サイクル行った。全ての実験において Dissociation curve 分析を行い解離温度の確認を行い、PCR products をアガロースゲルで電気泳動し目的の産物が増幅されているか確認した。遺伝子発現量の定量化のため、18S ribosomal RNA を内部標準遺伝子とし、比較 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct) を用いて相対的定量化で解析した。

解析

全ての値は平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差比較検討は、Welch の t 検定を用いて解析した。p<0.05 を有意差とした。

結果

アレルギー感作成立の確認

アレルギー感作群はコントロール群と比べ、鼻掻き行動、くしゃみの回数ともに有意に増加していた (図 2)。アレルギー感作群での感作前と感作後の血清総 IgE、Cryj1 特異的 IgE 抗体濃度を測定し (図 3)、感作後はともに有意に上昇しておりアレルギー感作の成立を確認した。

免疫組織化学的变化

NOS1 免疫陽性反応はアレルギー感作群、コントロール群ともに嗅上皮、嗅神経に認め

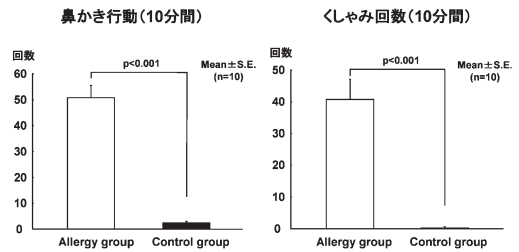


図 2 Cryj1 による誘発直後の鼻症状
アレルギー感作群はコントロール群と比べ、鼻掻き行動、くしゃみの回数ともに有意に増加していた。

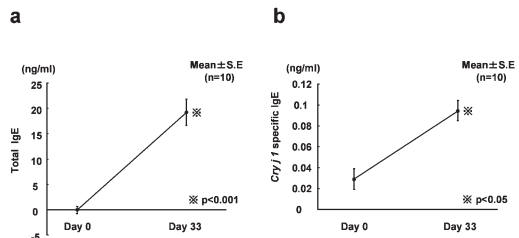


図 3 アレルギー感作群の血清総 IgE 抗体濃度 (a) と Cryj1 特異的 IgE 抗体濃度 (b) (n=10)
精製スギ花粉抗原の誘発により、感作前と比べ血清総 IgE 抗体、Cryj1 特異的 IgE 抗体濃度ともに有意な増加を認めた。

た (図 4)。

NOS2 免疫陽性反応は、アレルギー感作群では、嗅上皮 (嗅細胞, 支持細胞, 基底細胞), 嗅神経, 血管内皮細胞, 呼吸上皮, 鼻腺導管に、コントロール群では嗅神経, 血管内皮細胞, 鼻腺導管に認めた (図 5)。

NOS3 免疫陽性反応はアレルギー群、コントロール群ともに血管内皮細胞にのみ認めた (図 6)。

マウス鼻粘膜における Real-time PCR による遺伝子発現の検討

コントロール群で NOS1, NOS2, NOS3 の遺伝子発現を認めた。また、アレルギー感作群はコントロール群と比べ NOS1 は有意に遺伝子発現量の低下, NOS2, NOS3 は有意に遺伝子発現量の増加を認めた (図 7)。

考察

NO は L-アルギニンを基質として NOS の

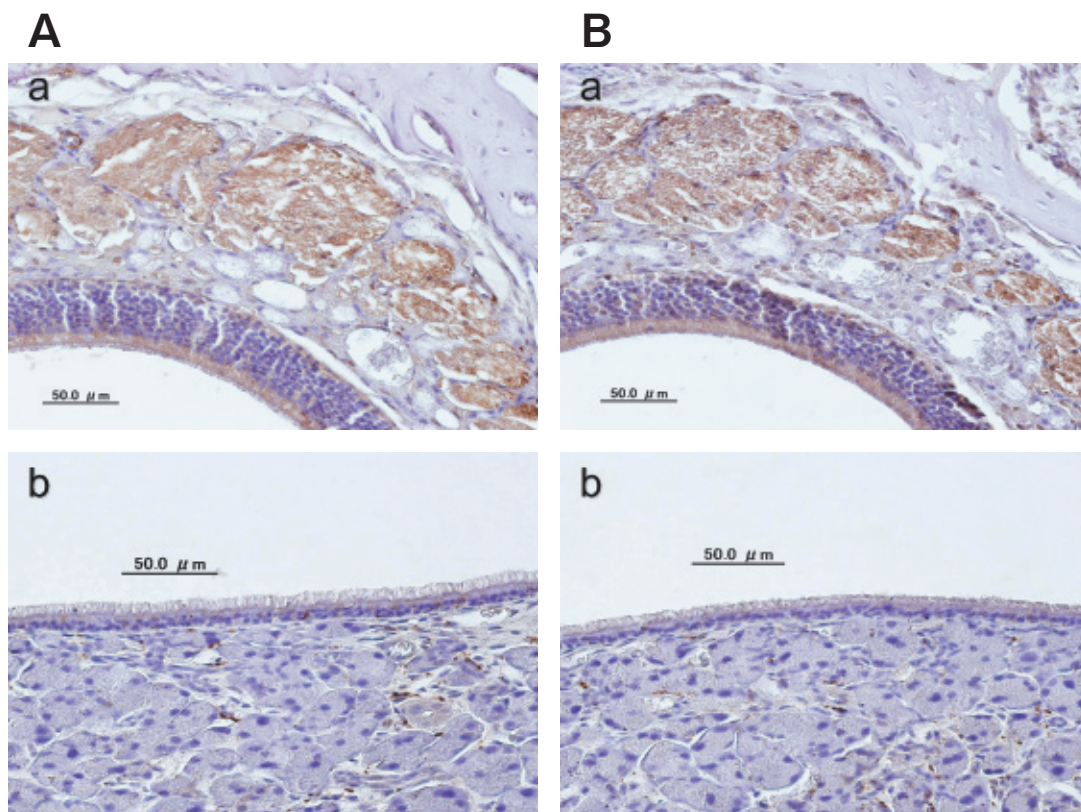


図4 NOS1の免疫組織化学
 (A) アレルギー感作群, (B) コントロール群, (a) 嗅粘膜部, (b) 呼吸粘膜部
 アレルギー群, コントロール群ともに嗅上皮, 嗅神経でNOS1の免疫染色が陽性であった(×400).

働きにより産生される。NOSにはNOS1, NOS2, NOS3の3種類のアイソフォームが存在する。NOS1, NOS3は構成型NOS (constitutive NOS: cNOS) と呼ばれ, 細胞内に常時存在している。主にNOS1は神経細胞, 骨格筋細胞に, NOS3は血管内皮細胞に発現している。そのため, cNOSの活性によるNO産生は, 酵素発現量レベルでの調節ではなく, 酵素活性レベルで調節を受けている。酵素活性の発現には, レセプターアゴニスト (アセチルコリン, プラジキニン, ヒスタミンなど) による細胞外からの刺激により細胞内のCa²⁺濃度が上昇することが必要である。細胞内Ca²⁺濃度が上昇するとカルモジュリンがNOSに結合し, 補酵素として酵素の活性化に働く。一方, NOS2は誘導型NOS (inducible NOS: iNOS) と呼ばれ, 炎

症性サイトカインやエンドトキシンなどによる刺激を受けてはじめてmRNAが発現される。NOS2はカルモジュリンとの親和性が高いため, 細胞内Ca²⁺濃度が低い場合でもカルモジュリンが結合しているため, 酵素活性がCa²⁺濃度に依存しない。すなわち, NOS2は転写レベルの制御を受けており, いったん酵素が合成されると, Ca²⁺濃度に依存しないため, cNOSに比べ長時間, 大量にNOを産生する。

気管支喘息患者では, 健常人と比べ呼気中NOは上昇しており¹⁰⁻¹²⁾, 治療により低下したと報告されている¹³⁻¹⁵⁾。そのNOは気道内の主として気管上皮細胞およびマクロファージや好中球などの炎症細胞より大量に産生され¹⁶⁻¹⁸⁾ている。喘息気道上皮にNOS2が発現しているが健常人では発現していないとする報告¹⁰⁾や,

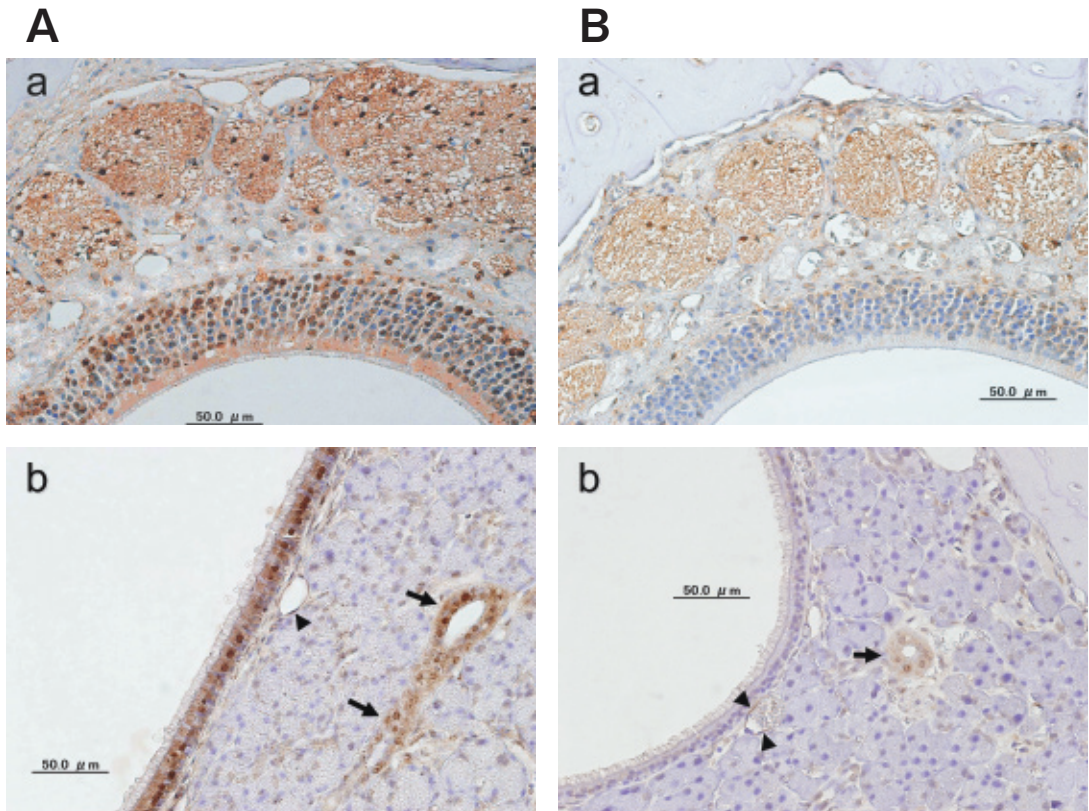


図5 NOS2の免疫組織化学

(A) アレルギー感作群, (B) コントロール群, (a) 嗅粘膜部, (b) 呼吸粘膜部

アレルギー感作群では, 嗅上皮 (嗅細胞, 支持細胞, 基底細胞), 嗅神経, 呼吸上皮, 血管内皮細胞 (矢頭), 鼻腺導管 (矢印) に, コントロール群では嗅神経, 血管内皮細胞 (矢頭), 鼻腺導管 (矢印) で NOS2 の免疫染色が陽性であった ($\times 400$).

気管支喘息の NOS2 の発現がグルココルチコイドで抑制されることから NO 上昇は NOS2 に依存している事が示されている²⁶⁾.

また, 健康人での呼気中 NO の大部分は鼻腔または副鼻腔から産生されており²⁰⁾, この NO が下気道に供給され, 肺胞の換気血流比の改善や線毛運動機能の賦活作用を介して, 気道の生理的恒常性の維持を行っていると考えられている²¹⁾. さらに, アレルギー性鼻炎患者の鼻腔内 NO は健康人と比べ有意に上昇していると言われている²²⁾. Chiba ら²³⁾ はアレルギー性鼻炎モデルモルモットの鼻粘膜を用いてウェスタンブロット法を行い, NOS2 はコントロール群の鼻粘膜でも発現し, アレルギー感作群では有意な増加を認めたが, NOS1, NOS3 は 2 群間で有意

差がなかったと報告している. しかし, 彼らはその局在は検討していない. また, Oh ら²⁴⁾ はアレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻粘膜での免疫組織化学的検討を行い, NOS2 はアレルギー群で鼻粘膜上皮に発現していたと報告しているが, 詳細な細胞レベルでの検討はなされていない. 今回の研究では, Real-time PCR を用いた検討でコントロール群に NOS2 の遺伝子発現を認めた. これは Chiba ら²³⁾ の報告と同様の結果を得た. 本研究ではさらに, 免疫組織化学で嗅神経, 血管内皮細胞, 鼻腺導管に誘導型 NOS である NOS2 が恒常的に発現していることを明白にした. すなわち, 健康人の鼻腔内における高濃度 NO 産生の原因として, cNOS に加え, 今回発現を認めた嗅神経, 血管内皮細胞, 鼻腺

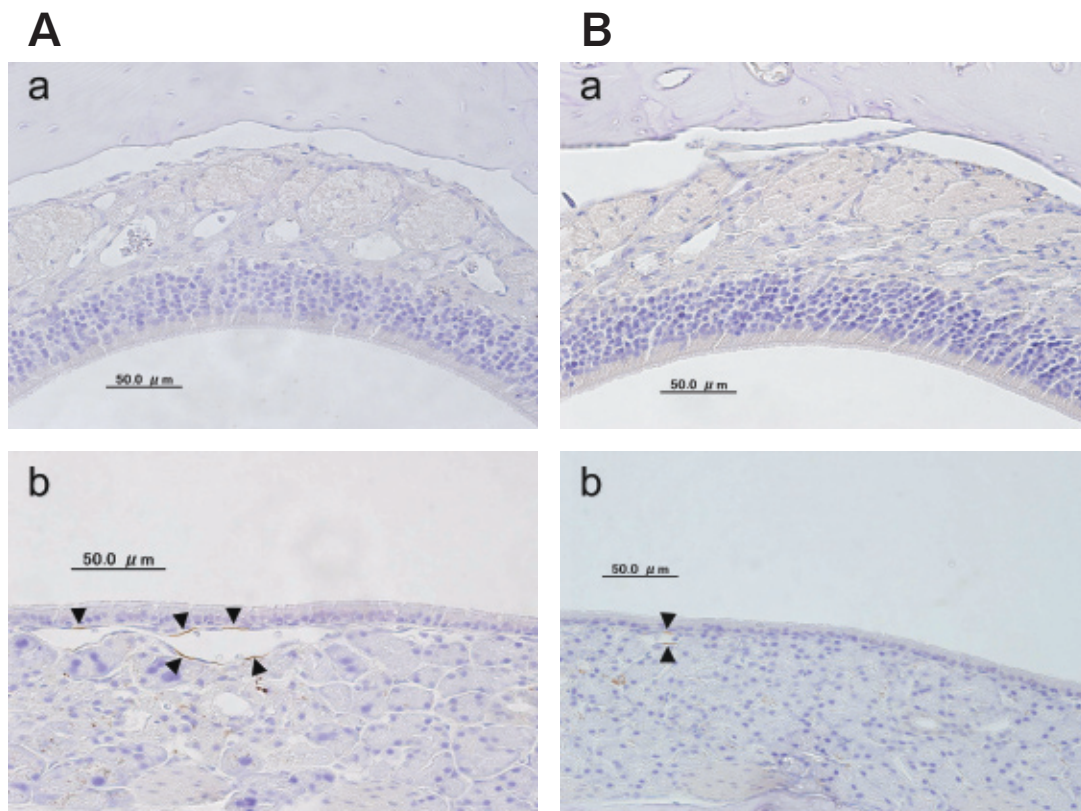


図6 NOS3の免疫組織化学
 (A) アレルギー感作群, (B) コントロール群, (a) 嗅粘膜部, (b) 呼吸粘膜部
 アレルギー群, コントロール群ともに血管内皮細胞(矢頭)でNOS3の免疫染色が陽性であった(×400).

導管でのNOS2も関与しているものと考えられる。また、NOS2はアレルギー感作群でコントロール群と比べ有意な発現量の増加を認めた。さらに、免疫組織化学で、NOS2はコントロール群では発現が認められなかった呼吸上皮、嗅上皮に、アレルギー感作群では初めて発現を明確にした。これらの上皮でのNOS2はアレルギー感作によるサイトカイン刺激により、新たに誘導されたものと考えられる。NOS2はいったん酵素が合成されると、cNOSに比べ長時間、大量にNOを産生することが知られていることから、アレルギー性鼻炎の鼻腔内NO産生増加の原因は、呼吸上皮、嗅上皮のNOS2の増加であると考えられる。NOS2由来のNOは、そのNO自体の細胞障害性はもとより、炎症部位で同時に生成される O_2^- と反応し、より細胞障害の強い

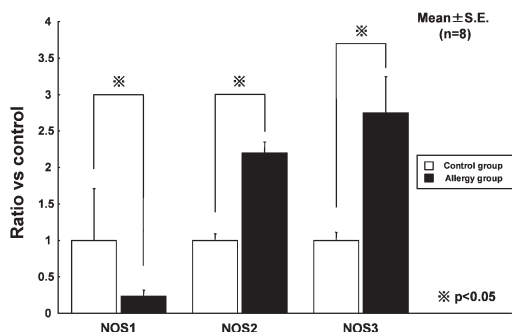


図7 アレルギー感作群とコントロール群のNOSアイソフォームの遺伝子発現量の相違(n=8)
 コントロール群でNOS1, NOS2, NOS3の遺伝子発現を認めた。
 アレルギー感作群はコントロール群と比べNOS1は有意に遺伝子発現量の低下, NOS2, NOS3は有意に遺伝子発現量の増加を認めた。

パーオキシナイトライト (ONOO⁻) を産生する²⁷⁾ ことで、アレルギー性鼻炎症状の増悪に関与していると考えられる。今回の結果から、呼吸上皮に加え嗅上皮での NO 産生も示唆され、NOS2由来の NO は、後述するアレルギー性鼻炎に伴う鼻閉、嗅覚低下に大きく関与しているものと考えられる。

敗血症性ショックではエンドトキシンの刺激により種々なサイトカインが産生される。これらのサイトカインにより NOS2由来の NO の過剰産生が持続すると顕著な末梢血管抵抗の低下がもたらされ、敗血症性ショックが引き起こされると考えられている²⁸⁾。ショックの初期には NOS3活性化による NO が血行動態の変化に関与しているが、後期には持続的 NOS2が誘導され、難治性の低血圧、内皮細胞障害、心筋収縮抑制などが惹起され多臓器不全に陥る。つまり、NOS3からの NO により血管拡張がおり、NOS2からの NO により血管透過性の亢進が引き起こされていると考えられている。アレルギー性鼻炎に伴う鼻閉は血管拡張及び血管透過性の亢進が原因であることが知られている。今回の結果では、NOS3はコントロール群、アレルギー感作群ともに血管内皮細胞で発現を認め、アレルギー感作群で有意な遺伝子発現量の増加を認めた。これまでにアレルギー性鼻炎に NOS3 の関与を示した報告はないが、Imai ら²⁹⁾ の報告ではアレルギー性鼻炎モデルモルモットに NOS 阻害薬を前処置すると鼻閉は抑制されたが、選択的 NOS2阻害薬を前処置しても鼻閉の改善が認められなかったことから鼻閉は cNOS が関与していると結論付けている。つまり、これまでに関与が報告されている NOS2だけでなく NOS3もアレルギー性鼻炎の病態、特に鼻閉に影響を及ぼしているものと考えられた。

また、鼻茸は耳鼻咽喉科臨床においてきわめて一般的な病態で、慢性副鼻腔炎やアレルギー性鼻炎でしばしば観察される。鼻茸の成因について血管透過性の亢進による浮腫説³⁰⁾、粘膜固有層脱出説³¹⁾、細胞外マトリックスの蓄積³²⁾ 等さまざまな成因が考えられる。さらに、種々

のサイトカインや増殖因子との関連も報告されている。増殖因子としては、血管内皮増殖因子³³⁾ や血小板由来増殖因子³⁴⁾ と鼻茸との関連が報告されている。Namba ら³⁵⁾ はラット後肢虚血モデルを用いて血管細胞における血管内皮増殖因子の合成に対する NO の効果を検討している。その結果、NO が血管内皮増殖因子の制御に関与し、NOS3遺伝子の導入により血管内皮増殖因子産生が増幅され血管新生が誘導されると報告している。今回の研究でもアレルギー感作群で NOS3 の増加を認めたことから、アレルギー性鼻炎に伴う鼻茸形成は血管内皮増殖因子の発現により血管新生を誘導するのに重要な役割を演じている可能性があると考えられる。

NOS1 は神経系に恒常的に存在していることが知られている。今回の研究でも他の臓器同様に、コントロール群、アレルギー感作群ともに嗅上皮、嗅神経で発現を認めた。また、コントロール群と比較しアレルギー感作群で NOS1 の有意な遺伝子発現の減少を認めた。これまでに NOS1 とアレルギー性鼻炎との関与は報告されていないが、今回の結果からアレルギー炎症にともなう鼻粘膜腫脹、嗅粘膜への炎症細胞浸潤、NOS2からの NO 産生による細胞障害などによる嗅覚低下に伴う嗅神経の活性低下に関与しているのかもしれない。

気管支喘息の治療は吸入ステロイドを中心とした抗炎症療法であることから、診断及び治療効果の判定として気道炎症の評価が有用であるが、気道炎症を証明する一般に普及した方法はない。確実なのは気管支鏡による生検であるが、侵襲が大きく危険をとまなう。喀痰中好酸球検査も有用であるが、自然痰として回収できることが少なく、気管支肺胞洗浄による採取が必要となることが多いが侵襲をとまなう。最近の報告では、気管支喘息患者の呼気中 NO 測定は、1 秒量、気道過敏性試験、喀痰中好酸球数とよく相関し、未治療の気管支喘息の診断に有用と考えられている³⁶⁻³⁸⁾。また、非侵襲的に気道炎症を評価できるバイオマーカーとして、簡便性、簡易性、再現性を備えた実用的な方法であると

示唆され³⁹⁾、治療における吸入副腎皮質ステロイドの維持用量を有意に減少することができることも示されている^{40, 41)}。鼻、副鼻腔疾患においては、慢性副鼻腔炎では健常人と比べ鼻腔内 NO 濃度は低値であり^{21, 42, 43)}、アレルギー性鼻炎患者の鼻腔内 NO 濃度は健常人と比べ有意に高値であった言われている²²⁾。今後、呼気中 NO と同様、アレルギー性鼻炎の炎症マーカーとして鼻腔 NO が位置づけられるか検討が必要であろう。

本研究から、誘導型 NOS である NOS2 が、正常鼻粘膜では嗅神経、血管内皮細胞、鼻腺導管で恒常的に発現していることが明白になった。さらに、アレルギー性鼻炎の鼻粘膜では NOS2 の有意な遺伝子発現の増加を認め、コントロール群で認められなかった呼吸上皮および嗅上皮にも発現していることが明らかになった。また、今まで報告のない NOS1, NOS3 もアレルギー性鼻炎に関与している可能性が示唆され、NOS はアレルギー性鼻炎の病態に関与する因子の一つとして考えられる。

結 語

今回、アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて鼻粘膜における NOS1, 2, 3 の局在、遺伝子発現量についてコントロール群と比較検討した。その結果、

- 1) NOS2 は誘導型 NOS であるが、正常マウスの鼻粘膜では、嗅神経、血管内皮細胞、鼻腺導管で恒常的に発現していることが明白になった。
- 2) NOS2 はアレルギー感作群で有意な遺伝子発現量の増加が認められ、コントロール群で認められなかった呼吸上皮および嗅上皮に NOS2 の発現が認められた。アレルギー性鼻炎の鼻腔内 NO 産生増加の原因は、呼吸上皮、嗅上皮の NOS2 の増加であると考えられた。
- 3) アレルギー感作群はコントロール群と比べ、NOS1 は有意な遺伝子発現量の減少、NOS3 は有意な遺伝子発現量の増加を認めた。ア

レルギー性鼻炎の病態に NOS2 だけでなく NOS1, NOS3 も関与していると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室原田保教授に深甚なる謝意を表します。また、リアルタイム PCR 法の御指導をいただきました川崎医科大学内科学（糖尿病・内分泌）教室中島弘二先生、高木史子女史に感謝申し上げます。なお、本論文の要旨は 2008 American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation holds annual meeting and OTO EXPO (2008年9月21日～24日, Chicago) において発表した。

引用文献

- 1) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524-526, 1987
- 2) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G : Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 : 9265-9269, 1987
- 3) Schmidt HH, Walter U : NO at work. *Cell* 78 : 919-925, 1994
- 4) Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY : Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375 : 408-411, 1995
- 5) Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T : Endothelial nitric oxide synthase : molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 : 6348-6352, 1992
- 6) Harrison DG : Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100 : 2153-2157, 1997
- 7) Christopherson KS, Brecht DS : Nitric oxide in excitable tissues : physiological roles and disease. *J Clin Invest* 100 : 2424-2429, 1997
- 8) Mayer B, Hemmens B : Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22 : 477-481, 1997
- 9) Nathan C : Inducible nitric oxide synthase : what difference does it make? *J Clin Invest* 100 : 2417-2423,

- 1997
- 10) Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM : Inducation of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 342 : 1510-1513, 1993
 - 11) Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ : Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343 : 133-135, 1994
 - 12) Persson MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE : Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 343 : 146-147, 1994
 - 13) Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ : Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 153 : 454-457, 1996
 - 14) Nelson BV, Sears S, Woods J, Ling CY, Hunt J, Clapper LM, Gaston B : Expired nitric oxide as a marker for childhood asthma. *J Pediatr* 130 : 423-427, 1997
 - 15) Baraldi E, Azzolin NM, Zanconato S, Dario C, Zacchello F : Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *J Pediatr* 131 : 381-385, 1997
 - 16) Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS : Nitric oxide synthase in human and rat lung : immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9 : 371-377, 1993
 - 17) Robbins RA, Barnes PJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Geller DA, Polak JM : Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 203 : 209-218, 1994
 - 18) del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andrés B, Cárđaba B, López-Farré A, Gallardo S, Cortegano I, Vidarte L, Jurado A, Sastre J, et al. : Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 158 : 859-864, 1997
 - 19) Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF : Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35 : 457-465, 2006
 - 20) Kimberly B, Nejadnik B, Giraud GD, Holden WE : Nasal contribution to exhaled nitric oxide at rest and during breathholding in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 153 : 829-836, 1996
 - 21) Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggård A, Hökfelt T, Lundberg JM, Alving K : High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med* 1 : 370-373, 1995
 - 22) Kharitonov SA, Rajakulasingam K, O'Connor B, Durham SR, Barnes PJ : Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 99 : 58-64, 1997
 - 23) Chiba Y, Matsuo K, Sakai H, Abe K, Misawa M : Increased expression of inducible nitric oxide synthase in nasal mucosae of guinea pigs with induced allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 20 : 336-341, 2006
 - 24) Oh SJ, Min YG, Kim JW, Lee SJ, Jarin PR : Expression of nitric oxide synthases in nasal mucosa from a mouse model of allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112 : 899-903, 2003
 - 25) 入船盛弘 : アレルギー性鼻炎の実験動物モデル 治療法の検討について. *耳鼻咽喉科臨床補冊* 41 : 208-217, 1991
 - 26) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S : Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 : 10043-10047, 1990
 - 27) Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A : Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391 : 393-397, 1998
 - 28) Titheradge MA : Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1411 : 437-455, 1999
 - 29) Imai A, Nabe T, Mizutani N, Sakurai H, Takenaka H, Kohno S : Involvement of nitric oxide in pollen-induced biphasic nasal blockage in sensitised guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 423 : 63-70, 2001
 - 30) Kakoi H, Hiraide F : A histological study of formation and growth of nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 103 : 137-144, 1987
 - 31) Tos M, Mogensen C : Pathogenesis of nasal polyps. *Rhinology* 15 : 87-95, 1977
 - 32) Lechapt-Zalcman E, Coste A, d'Ortho MP, Frisdal E, Harf A, Lafuma C, Escudier E : Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in nasal polyps. *J Pathol* 193

- : 233-41, 2001
- 33) Wittekindt C, Hess A, Bloch W, Sultanie S, Michel O : Immunohistochemical expression of VEGF and VEGF receptors in nasal polyps as compared to normal turbinate mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 259 : 294-298, 2002
- 34) Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Woolley K, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M, Tamura G, et al. : Eosinophils as a potential source of platelet-derived growth factor B-chain (PDGF-B) in nasal polyposis and bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13 : 639-647, 1995
- 35) Namba T, Koike H, Murakami K, Aoki M, Makino H, Hashiya N, Oghara T, Kaneda Y, Kohno M, Morishita R : Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation* 108 : 2250-2257, 2003
- 36) Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ : Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 53 : 91-95, 1998
- 37) Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID : The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation : an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy* 35 : 1175-1179, 2005
- 38) Kharitonov SA, Barnes PJ : Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163 : 1693-1722, 2001
- 39) Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, Taylor DR : Diagnosing asthma : comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 169 : 473-478, 2004
- 40) Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ : Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 153 : 454-457, 1996
- 41) Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR : Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 352 : 2163-2173, 2005
- 42) Schedin U, Frostell C, Persson MG, Jakobsson J, Andersson G, Gustafsson LE : Contribution from upper and lower airways to exhaled endogenous nitric oxide in humans. *Acta Anaesthesiol Scand* 39 : 327-332, 1995
- 43) Lindberg S, Cervin A, Runer T : Nitric oxide (NO) production in the upper airways is decreased in chronic sinusitis. *Acta Otolaryngol* 117 : 113-117, 1997

Localization of nitric oxide synthase in nasal mucosa of mice with induced allergic rhinitis

Shigetoshi YODA

Department of Otolaryngology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT Nitric oxide (NO) is generated from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS), which is classified into neural NOS (NOS1), inducible NOS (NOS2) and endothelial NOS (NOS3). In patients with asthma, NO levels in exhaled air are high during immediate asthmatic responses. Several studies have reported expression of NOS2 within the epithelial cells of the trachea in asthmatic patients and asthmatic model animals. In patients with allergic rhinitis, NO levels in nasal air are high. NOS2 has been reported to increase in allergic rhinitis compared with controls. However, localization of NOS in the nasal mucosa of allergic rhinitis has not been examined. This research clarified the expression and localization of NOS (NOS1,

NOS2, NOS3) in the nasal mucosa of allergic rhinitis using allergic model mice.

Allergic rhinitis was induced in male mice at six weeks of age using purified Japanese cedar pollen allergen (*Cry j 1*). *Cry j 1* was injected three times into the abdomen (days 0, 4, 8) and administered intranasally for 14 consecutive days (day 13-26). Control mice were not done first and second immunology. On day 34, the expression and localization of NOS in the nasal mucosa of both the allergic model mice and the control mice were examined by immunohistochemistry and Real-time PCR.

In the control mice, the expression of NOS2 was localized in the olfactory nerve, the nasal gland beneath the respiratory epithelium and vascular endothelial cells. In the allergic rhinitis group, the expression of NOS2 was not only localized in the olfactory nerve, nasal gland and vascular endothelial cells but also in the olfactory epithelium and respiratory epithelium. The real time-PCR showed that the expression of NOS2 and NOS3 in the allergic rhinitis significantly increased group compared with that in the control mice ($p < 0.05$).

NOS2 localization was proven in the control group. In the allergic group, the expression of NOS2 increased especially in the olfactory epithelium and respiratory epithelium. The results of this study suggested that NOS2 and NOS3 have some relation to allergic rhinitis.

(Accepted on November 13, 2008)

Key words : Nitric oxide synthase, Allergic rhinitis, Nasal mucosa

Corresponding author

Shigetoshi Yoda

Department of Otolaryngology, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1197

E-mail : syoda@med.kawasaki-m.ac.jp