

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10779

研究課題名(和文) Mechanism of production and release of tissue plasminogen activator in airway epithelial cells

研究課題名(英文) Mechanism of production and release of tissue plasminogen activator in airway epithelial cells

研究代表者

坂下 雅文 (Sakashita, Masafumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：40555455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、好酸球性副鼻腔炎が増加している。その病態には、フィブリン沈着が鼻ポリープを形成しており、フィブリンを分解するtissue plasminogen activator(t-PA)産生が鼻粘膜上皮において低下している。本研究は、気道上皮におけるt-PA産生のメカニズムの解明を目的としている。レチノイン酸(RA)によりt-PAの遺伝子発現が10倍増加し、産生されたt-PAのおよそ80%が上清中に放出された。アスピリン喘息患者の鼻ポリープ中ではRAの濃度は優位に低かった。鼻ポリープ産生の病態としてポリープ中のRAが少ないことが考えられ、RAを投与することで、ポリープの縮小する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)： We have evaluated patients with AERD had even lower levels of RA in their nasal polyp tissue compared with CRSwNP. It is tempting to speculate that RA might be necessary for basic production and secretion of t-PA and may regulate fibrin deposition in normal tissue. We have studied the regulation of t-PA production in airway epithelial cells by cytokines and retinoic acid, a topic not researched ever. Retinoic acid, an active metabolite of vitamin A, induced a dose dependent increase of t-PA expression by NHBE cells; most t-PA produced was released into the supernatant. We confirmed the previous finding that IL-13 suppresses t-PA expression and have also shown that RA can restore t-PA expression in IL-13-treated cells. Finally, our results suggest that supplementation of polyposis patients with retinoids might shrink polyps or prevent recurrence of polyps after surgery by inducing t-PA and promoting degradation of fibrin deposited within polyps.

研究分野：鼻・副鼻腔疾患

キーワード：鼻ポリープ t-PA レチノイン酸

1. 研究開始当初の背景

近年、難治性慢性副鼻腔炎が本邦において増加している。従来の慢性副鼻腔炎と比べて、薬剤治療に抵抗性があり、ステロイドの内服が著効する、手術後に鼻ポリープ再発を来しやすいという特徴がある。近年、鼻ポリープはフィブリンの沈着により形成されているという仮説が提唱され、フィブリンを融解する tissue plasminogen activator (t-PA) 産生が上皮細胞において低下していることが原因と報告された。t-PA はすでに脳梗塞や心筋梗塞による血管の塞栓を融解する治療法として実際の臨床に応用されている。血中への産生は血管内皮細胞が主であるが、気道上皮細胞からの産生メカニズムは報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、気道上皮における t-PA 産生のメカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 気道上皮細胞における 23 種の刺激を用いた t-PA 発現実験血管内皮細胞等で知られる 30 種類以上の t-PA 産生関連刺激のうち、23 種類の刺激を選出した。刺激による反応は Normal Human Bronchial Epithelial cells (NHBE) を用いる。この細胞は気道上皮における *in vivo* 実験において広く用いられている primary culture cell である。刺激は下記の 23 種を用いる。最適濃度を決定するため、すべての刺激において 5 段階の異なる濃度で刺激し、real-time PCR において t-PA 発現を解析する。その結果から決定した濃度により細胞培養上清中の t-PA 産生を ELISA にて測定する。

23 種の刺激

Hormones (retinoic acid, dexamethasone, estrogen, Vitamin D3), Protein kinase C activator (phorbol ester/PMA), cyclic AMP inducers (forskolin), inflammatory cytokine (TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, IFN γ , IL-17a), Toll like receptor agonist (LPS, poly I:C), Histone deacetylase CoA inhibitors (butyrate, trichostatin A), Statins (fluvastatin, simvastatin), Growth factors (VEGF, bFGF, TGF β , EGF) を用いる。

(2) t-PA 産生促進刺激を用いた気道上皮細胞において実験貯蔵、放出調整メカニズムの有無の確認血管内皮細胞における t-PA 産生、放出の特徴は貯蔵とその放出調整である。Histamine, forskolin は血管内皮細胞内の貯蔵 t-PA を短時間に放出することが知られている。このことを利用して、これらの放出刺激後 30 分間に培養細胞上清中に放出された t-PA タンパクを測定した実験では、タンパク合成阻害剤 (cycloheximide) による処理後も上清中に t-PA が放出された (Huber D et al.

Blood, 99:3637, 2002)。これにより、放出された t-PA は新規に合成されたものではなく、貯蔵されたものであることを示している。同じ現象は星状細胞においても確認されている (Thrombosis and

Haemostasis, 6:1796, 2008)。この実験系を用いて、気道上皮細胞における貯蔵、放出調整メカニズムの有無を確認する。まず、(1) の実験で選出した刺激により NHBE を刺激し、24 時間後の細胞上清と細胞とを別々に回収する。両者の t-PA を測定し、上清中に放出されている t-PA と細胞内に貯蔵されている割合を計算することができる。その後、上述の実験系を用いて細胞内の t-PA が放出刺激に反応して放出されるかを確認する。

t-PA 産生促進刺激による t-PA 産生の回復実験 (reversibility) t-PA 産生促進刺激を鼻ポリープ上皮に作用して t-PA 産生を回復できるかどうかは臨床応用への基礎データとして重要である。気道上皮細胞では Th2 サイトカインの IL-4, IL-13 環境下で t-PA の発現、産生が抑制されるため、これらと同時に t-PA 産生促進刺激を加えることで、その抑制を上回る t-PA 産生が生じるかどうかを検討する。

4. 研究成果

慢性副鼻腔炎における t-PA の調節：組織培養と鼻粘膜上皮における t-PA 産生

これまでの報告から、組織中の t-PA タンパク抽出物はコントロールの上皮細胞において高く、CRSwNP において低かった。そして、コントロールの上皮細胞では t-PA に対して強い染色が見られた。このことから、上皮細胞は t-PA の発現には重要であることが示唆されている。しかし、疑問点としては、t-PA が上皮細胞から分泌されるかどうかということである。さらに調べるために、患者から得られた組織を *ex-vivo* で培養し、上声中の t-PA を測定した。これまでの報告に反して、CRSwNP の UT からの t-PA 産生はコントロールからの組織と比べて同じであった。(Fig.1) このことから、鼻粘膜上皮は t-PA 産生の潜在力は失っていないと考えられる。粘膜上皮細胞からの t-PA 産生を評価するために、コントロールと CRSwNP の UT から擦過した細胞を培養し、増殖させた。これまでの結果からは、*in vivo* での CRSwNP UT からの t-PA の発現はコントロール UT に比べて抑制されていた。Fig.1A の結果からは、二つの異なったタイプの *ex-vivo* により培養された細胞は同等の t-PA 発現を示した。(Fig.1B) これらの結果からは、CRSwNP は内因性の t-PA 発現を失っていないことが示唆された。まさに、Fig. C で示すように、両者の細胞からは同僚の t-PA が産生されていた。このことを説明するには、ポリープ中で高くなっている 2 型のサイトカイン環境により t-PA が抑制される可能性がある。または、t-PA 産生性の物質が粘膜上皮細胞に不足しており、鼻茸中の t-PA 産生に影

響している可能性がある。

In vitro における t-PA の調節 ; t-PA 発現を種々の刺激で測定した

多くの t-PA に関する研究において、血管内皮細胞や星状細胞やその他の細胞において多くの刺激が試され、t-PA の産生について結果が示されている。しかし、t-PA 産生の反応は、これらの刺激と細胞によって違いがある。そして粘膜上皮細胞における研究はほとんどなされていない。この研究の二つ目の目的は、上皮細胞での t-PA の貯蔵と放出のメカニズムを明らかにすることである。そのためには、qPCR を種々の刺激を用いて行った。

NHBE 細胞における t-PA 産生の上昇

T-PA の値をそれぞれの刺激で解析したところ、RA, Butyrate, IFN- γ , IL-6, IL-17, PMA は t-PA を増加させた。(Fig. 2A-G) 一方で、IL-4, IL-13 や TGF- β は t-PA 発現を低下させた。(Fig. 3A-C) その他のものは NHBE における t-PA 発現は中間値であった。(データは示さず)

産生された t-PA はそのほとんどが上清中に放出されていた

これらの mRNA 発現の結果と同様に、t-PA を増加させる刺激はそのタンパクも増加させ、減少させる刺激である IL-13 はタンパクを減少させた。(Fig. 4A, 4B) T-PA については、血管内皮細胞や星状細胞では貯蔵されることが知られている。しかし、いずれの刺激でも、上清中の t-PA は産生されたすべての t-PA の約 80%であった。(Fig. 4C) これにより、これらの刺激は t-PA 産生を変化させるが、t-PA の放出は変化させなかったことになる。次の実験には RA を選択したが、その理由としては RA が用量依存的な増加を示したからである。IFN- γ を除外したのは、鼻茸中では増加していないからである。抑制刺激としては IL-13 を選択したが、用量依存的に減少を示したからである。この IL-13 は鼻茸中で増加している。

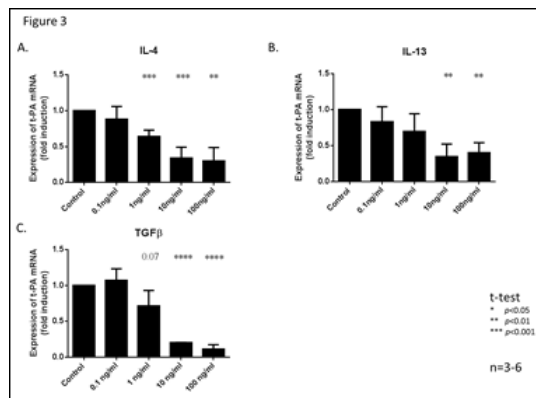
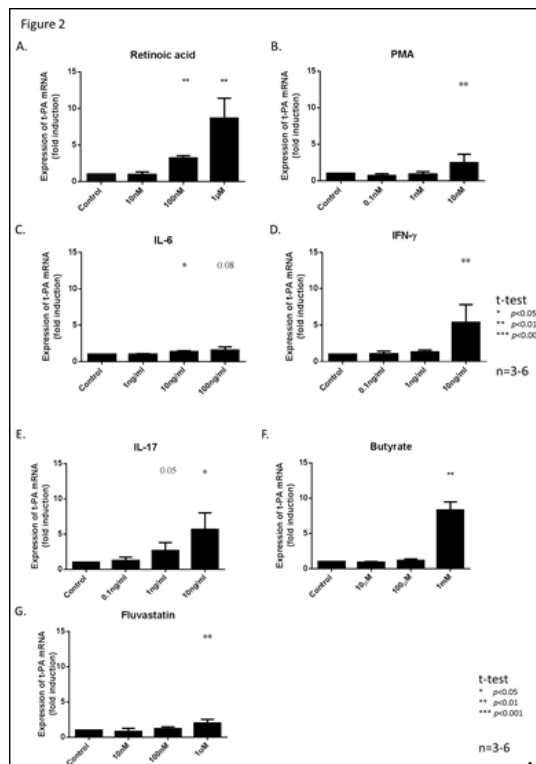
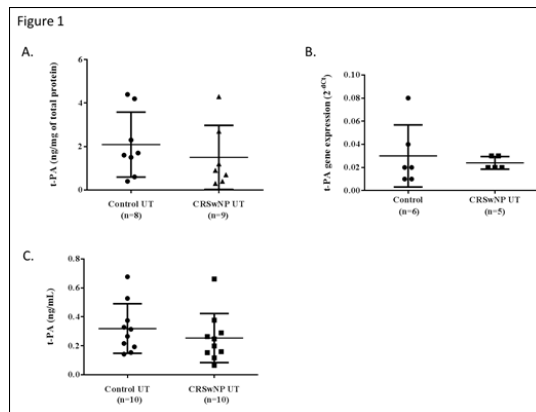
RA は IL-13 の抑制下に t-PA 発現を回復した

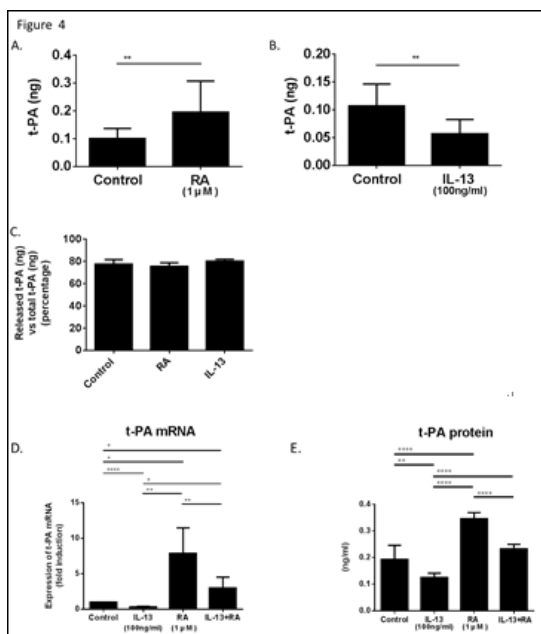
次に、t-PA 誘導刺激である RA が IL-13 による抑制下に t-PA 発現を回復できるかどうかということを実験した。T-PA mRNA は RA 単独刺激よりも少なかったが、RA はコントロール刺激や IL-13 単独刺激と比べて t-PA 産生を増加させた。(Fig. 4D) 同様の結果は、上清中の t-PA タンパク発現においても見られた。

まとめ

この研究において、CRSwNP は内因性の t-PA 産生を失っていないことを示した。この研究では、NHBE 細胞における t-PA 産生のプロファイルを最初に報告した。レチノイン酸はビタミン A の活性型の代謝物であるが、NHBE において用量依存的に t-PA の増加

を示した。また、産生されたほとんどの t-PA は上清中に恒常的に放出されていた。また、IL-13 による抑制下にも RA は t-PA 発現を回復させた。このことから、RA またはビタミン A を投与することにより、鼻粘膜上皮からの t-PA 産生を増加させて鼻茸治療につながるのではないかと考えている。





5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

- 1) Homma T, Kato A, Sakashita M, Takabayashi T, Norton JE, Suh LA, Carter RG, Harris KE, Peters AT, Grammer LC, Min JY, Shintani-Smith S, Tan BK, Welch K, Conley DB, Kern RC, Schleimer RP. Potential Involvement of the Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Epiregulin and Matrix Metalloproteinase-1 in Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017 Sep;57(3):334-345. 、査読あり
- 2) Takabayashi T, Imoto Y, Sakashita M, Kato Y, Tokunaga T, Yoshida K, Narita N, Ishizuka T, Fujieda S. Nattokinase, profibrinolytic enzyme, effectively shrinks the nasal polyp tissue and decreases viscosity of mucus. *Allergol Int*. 2017 Oct;66(4):594-602. 、査読あり
- 3) Tokunaga T, Ninomiya T, Kato Y, Imoto Y, Sakashita M, Takabayashi T, Noguchi E, Fujieda S. The significant expression of TRPV3 in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int*. 2017 Oct;66(4):610-616. 、査読あり
- 4) Masuyama K, Goto M, Takeno S, Ohta N, Okano M, Kamijo A, Suzuki M, Terada T, Sakurai D, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Sakashita M, Yuta A, Fuchiwaki T, Miyahara I, Nakayama

T, Okamoto Y, Fujieda S. Guiding principles of sublingual immunotherapy for allergic rhinitis in Japanese patients. *Auris Nasus Larynx*. 2016 Feb;43(1):1-9. 、査読あり

- 5) Fujieda S, Sakashita M, Tokunaga T, Okano M, Haruna Y, Yoshikawa M, Kou N, Asaka D, Haruna S, Nakayama T, Ishidoya J. [Practice guideline for eosinophilic rhinosinusitis]. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 総説・レビュー - 118(6):728-35. 2015、査読あり
- 6) Sakashita M, Yamada T, Imoto Y, Hirota T, Tamari M, Ito Y, Kubo S, Osawa Y, Takahashi N, Fujieda S. Long-term sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis and the levels of IL-17A and complement components 3a and 5a. *Cytokine*. 75(1):181-5. 2015 査読あり
- 7) Stevens WW, Ocampo CJ, Berdnikovs S, Sakashita M, Mahdavinia M, Suh L, Takabayashi T, Norton JE, Hulse KE, Conley DB, Chandra RK, Tan BK, Peters AT, Grammer LC 3rd, Kato A, Harris KE, Carter RG, Fujieda S, Kern RC, Schleimer RP. Cytokines in Chronic Rhinosinusitis. Role in Eosinophilia and Aspirin-exacerbated Respiratory Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15;192(6):682-94. 2015、査読あり
- 8) Homma T, Kato A, Sakashita M, Norton JE, Suh LA, Carter RG, Schleimer RP. Involvement of Toll-like receptor 2 and epidermal growth factor receptor signaling in epithelial expression of airway remodeling factors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 52(4):471-81. 2015、査読あり

[学会発表](計 7 件)

- 1) 坂下雅文、二之宮貴裕、早坂孝宏、正木紀隆、瀬藤光利、藤枝重治、イメージングマススペクトロメトリーを用いた慢性副鼻腔炎組織の脂肪酸解析、第35回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2017年
- 2) Masafumi Sakashita MD, PhD, Tetsuji Takabayashi MD, PhD, Tetsuya Homma, Atsushi Kato PhD, David B. Conley MD, Bruce K. Tan MD, Robert C. Kern, MD, and Robert P. Schleimer PhD, Shigeharu Fujieda MD, Retinoids Activate the Production of Tissue Plasminogen Activator in Human Epithelial Cells, IFOS 2017
- 3) 坂下雅文、高林哲司、徳永貴広、扇和弘、意元義政、山田武千代、藤枝重治、鼻粘膜上皮における線溶系分子 tissue plasminogen activator の産生メカニズ

△ 第34回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2016

- 4) M. Sakashita, T. Takabayashi, T. Tokunaga, Y. Kato, K. Ogi, T. Yamada, S. Fujieda, Fibrinolytic mechanism might be involved in polyps with chronic rhinosinusitis, 13th Japan Korea joint meeting of OHNS, 2016
- 5) 坂下雅文、藤枝重治、アレルギー性鼻炎治療効果に相関するバイオマーカー、第65回日本アレルギー学会、2016年
- 6) 坂下雅文、好酸球性副鼻腔炎のリモデリング仮説：慢性副鼻腔炎のトランスレショナルリサーチ、第54回日本鼻科学会2015年
- 7) M. Sakashita, T. Takabayashi, T. Tokunaga, Y. Kato, K. Ogi, R. Umeki, M. Kumagai, T. Yamada, S. Fujieda, Retinoids Activate The Production of Tissue Plasminogen Activator in Human Epithelial Cells, 2015 13th Japan Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2015年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂下雅文 (SAKASHITA, Masafumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：40555455

(2) 研究分担者

高林哲司 (TAKABAYASHI, Tetsuji)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：70397272