

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20200

研究課題名(和文)好酸球と線維芽細胞の相互作用に注目した好酸球性鼻副鼻腔炎の病態解明

研究課題名(英文)The pathology of eosinophilic chronic rhinosinusitis focused on eosinophil-fibroblast interactions.

研究代表者

安岡 公美子 (Takezawa-Yasuoka, Kumiko)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80711837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎は鼻粘膜への好酸球浸潤とニカワ状鼻汁，鼻茸形成を特徴とする難治性疾患で，その病態は不明な点が多い。

本研究では，好酸球と線維芽細胞との相互作用が好中球や好酸球などの炎症細胞浸潤を促進していると考えられた。また，好酸球に発現する組織因子を起点として凝固系が活性化され，凝固因子が鼻粘膜のプロテアーゼ活性型受容体(PARs)を介して鼻粘膜の線維芽細胞に作用すると，細胞外マトリックスの沈着や好酸球の浸潤をさらに誘発することがわかった。さらに，好酸球性炎症のラット鼻炎モデルにEGF受容体阻害薬の投与を行うと鼻粘膜への好酸球浸潤や杯細胞化生が抑制され，新しい治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) is a refractory upper airway disease, characterized by significant eosinophil infiltration, glue-like rhinorrhea and recurrent nasal polyposis.

In the present study, we found that eosinophil-fibroblast interactions promoted infiltration of inflammatory cell such as neutrophil and eosinophil. We also elucidated that tissue factor expression by eosinophil activated coagulation cascade, and coagulation factors stimulated nasal mucosa fibroblasts via protease-activated receptors (PARs). As a result, deposition of extracellular matrix and eosinophil infiltration induced. Intranasal instillation of EGFR tyrosine kinase suppressed eosinophil infiltration and goblet cell metaplasia in ovalbumin (OVA)-induced allergic inflammation of rat nose. The results indicate that local administration of EGFR inhibitor may provide a new therapeutic potential for the treatment of intractable airway diseases such as ECRS.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 線維芽細胞 好酸球 凝固因子 EGF受容体阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

好酸球性鼻副鼻腔炎は、鼻汁や組織内への多数の好酸球浸潤とニカワ様鼻汁、多発性の鼻茸形成(組織リモデリング)を特徴とする難治性疾患である。手術を行っても鼻茸が再発しやすく、マクロライド療法も効果がなく、現在のところステロイドの点鼻・内服以外に有効な治療手段がない。

われわれ滋賀医科大学医学部耳鼻咽喉科講座では、これまでに鼻茸形成などの組織リモデリングに血小板由来成長因子(PDGF)や血管内皮成長因子(VEGF)、TGF- $\beta$ などが関わっていること(Kouzaki H, Am J Rhinol Allergy 2009, Shimizu S, Am J Rhinol Allergy 2011)、凝固線溶系の活性化によりフィブリンが形成され、局所で産生されたトロンビンによって上皮細胞からのムチン分泌やPDGF、VEGF産生が生じること(Shimizu S, Clin Immunol 2008)、抗凝固因子であるヘパリンには多彩な抗炎症作用があり、フィブリン形成とともに組織リモデリングも抑制すること(Ogawa T, Am J Rhinol Allergy 2011, Ogawa T, Allergol Int 2013)、アスピリン喘息でみられるアラキドン酸代謝の不均衡が好酸球性鼻副鼻腔炎の病態形成に関わっていること(Shimizu S, Ann Otol Rhinol Laryngol, 2013)などを明らかにした。

また、好酸球と上皮細胞を共培養する独創的な方法で、細胞間の相互作用によって、好酸球が上皮細胞からのムチン分泌やPDGF、VEGF、TGF- $\beta$ などのサイトカイン分泌を著しく促進し、鼻茸形成などの組織リモデリングの原因になることを明らかにした(Shimizu S, Takezawa K, Am J Rhinol Allergy 2014)。さらに、こうした相互作用の機序に上皮細胞におけるEGF受容体のtransactivationが重要であり、EGF受容体阻害薬の局所投与が新たな治療薬になる可能性をin vitroの培養細胞とin vivoのラットの鼻粘膜炎症モデルで確認している(Takezawa K, Ogawa T, Am J Rhinol Allergy 2016)。

本研究では、好酸球と線維芽細胞を共培養して、好酸球性鼻副鼻腔炎における組織リモデリングの病態を好酸球と線維芽細胞の相互作用の面から明らかにし、相互作用のメカニズムを解明することで、ステロイド以外に適切な薬物療法がない難治性疾患に対する新たな治療手段の開発を目指している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、著明な好酸球浸潤とニカワ様鼻汁、鼻茸形成や杯細胞化生などの組織リモデリングを特徴とする好酸球性鼻副鼻腔炎の病態を、好酸球と線維芽細胞の共培養法により、好酸球と線維芽細胞の相互作用の面から明らかにし、新たな治療手段の開発を目指すことにある。

## 3. 研究の方法

共培養法を利用して好酸球と鼻粘膜線維芽細胞の相互作用の面から、好酸球性鼻副鼻腔炎の組織リモデリングの病態を明らかにする。

1) 好酸球と線維芽細胞を共培養して、細胞間の相互作用を検討する。

- 好酸球由来の細胞株であるEoL-1細胞と気道線維芽細胞の細胞株であるWI-38細胞を共培養し、好酸球が線維芽細胞の増殖に与える作用を検討する。また、浮腫や鼻茸形成などに関わると考えられるサイトカイン(PDGF、VEGF、TGF- $\beta$ 、IL-8など)産生や細胞外マトリックス(フィブロネクチン、I型コラーゲン、III型コラーゲン、MMPsなど)産生に対する影響をELISA法で検討する。
- 共培養後、浮遊している好酸球と線維芽細胞を分離し、mRNA発現を比較することでサイトカイン・細胞外マトリックスの産生細胞を同定する。
- 鼻茸より分離した線維芽細胞と末梢血あるいは鼻茸から分離した好酸球を用いて相互作用を確認する。

2) 好酸球と線維芽細胞の相互作用のメカニズムを明らかにする。

- 相互作用が細胞接着を介するものか、メディエーターを介するものか、線維芽細胞と好酸球が直接接触する場合とフィルターで接触を阻害する場合と比較し、線維芽細胞の増殖や上清中のサイトカインおよび細胞外マトリックス産生に対する影響を検討する。
- 相互作用に関係するメディエーターを同定する。線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックス産生には、TGF- $\beta$ 、PDGFなどが関わっていることが知られているが、培養液中の各メディエーターの濃度をELISA法で測定し、それぞれの中和抗体や受容体拮抗薬の線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックス産生に対する影響を検討する。

3) 共培養から得られた相互作用のメカニズムについて、実際の臨床検体(鼻汁や鼻粘膜)で主要なメディエーターの重要性を、ELISA法やmRNAの測定、免疫組織化学などで確認する。

4) 相互作用のメカニズムの解明から、新たな治療手段のターゲットを決定し、培養細胞やラット鼻粘膜の炎症モデル(Shimizu T, Am J Respir Crit Care Med, 1996 and 2000)での有効性を検討する。

#### 4. 研究成果

- 1) 好酸球と線維芽細胞を共培養して、細胞間の相互作用を検討する。
  - a) 鼻茸線維芽細胞と EoL-1 細胞の共培養では、添加する EoL-1 細胞の数に依存して VEGF 濃度が上昇した。
  - b) また、鼻茸線維芽細胞と末梢血好酸球との共培養では、IL-6、IL-8、Eotaxin-1、RANTES 濃度がそれぞれ上昇した。好酸球は鼻茸線維芽細胞からの VEGF 産生により血管透過性の亢進や血管新生を促進させ、IL-6、IL-8、Eotaxin-1、RANTES 産生によって鼻粘膜局所に好酸球や好中球といった炎症細胞の浸潤を促進させていると考えられた。
- 2) 好酸球と線維芽細胞の相互作用のメカニズムを明らかにする。
- 3) 共培養から得られた相互作用のメカニズムについて、実際の臨床検体(鼻汁や鼻粘膜)で主要なメディエーターの重要性を、ELISA 法や mRNA の測定、免疫組織化学などで確認する。

好酸球性副鼻腔炎に浸潤する好酸球は凝固系の開始蛋白である組織因子が豊富に発現し、鼻茸には凝固系の最終産物であるフィブリンの沈着を認めた。さらに鼻茸線維芽細胞には、トロンピンや活性化第 X 因子の受容体である protease-activated receptors (PARs) が PAR-1 ~ 4 まで発現していた。鼻茸線維芽細胞をトロンピン・活性化第 X 因子で刺激したところ、フィブロネクチンと IL-6、IL-8、Eotaxin-1、RANTES、TGF- $\beta$ 1 濃度が有意に上昇した。このことから、鼻粘膜に浸潤する好酸球を起点とした凝固系の活性化は、PARs を介して粘膜の線維芽細胞に作用し、細胞外マトリックスの沈着や好酸球の浸潤をさらに誘発することが示唆された。さらに鼻茸上皮細胞を用いた検討では、好酸球の分化・生存に重要な GM-CSF が活性化凝固因子の刺激で産生されることが分かった。

- 4) 相互作用のメカニズムの解明から、新たな治療手段のターゲットを決定し、培養細胞やラット鼻粘膜の炎症モデル (Shimizu T, Am J Respir Crit Care Med, 1996 and 2000) での有効性を検討する。

EGF 受容体インヒビターは、線維芽細胞からトロンピン刺激で産生される eotaxin-1 と RANTES、鼻茸上皮細胞からトロンピン刺激で産生される GM-CSF をそれぞれ抑制した。さらに好酸球性炎症のラット鼻炎モデルに、EGF 受容体インヒビターの全身または鼻腔局所投与を行う

と、鼻腔粘膜への好酸球浸潤や杯細胞化生が抑制されることが明らかとなった。

## 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 1 件)

Shimizu Shino, Takezawa-Yasuoka Kumiko, et. al. The epidermal growth factor receptor inhibitor AG1478 inhibits eosinophilic inflammation in upper airways. Clin Immunol 188: 1-6, 2018.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

安岡 公美子 (Takezawa-Yasuoka Kumiko)  
滋賀医科大学医学部 非常勤講師  
研究者番号：80711837

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

清水 志乃 (Shimizu Shino)