

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791248

研究課題名 (和文)

インドメタシンによる鼻茸縮小機序の解明とラミニンの関与

研究課題名 (英文)

Relationship between mechanism of the reduction of the nasal polyp by the indomethacin and the laminin

研究代表者

宇高 毅 (UDAKA TSUYOSHI)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：10369069

研究成果の概要 (和文)：

鼻茸上皮では免疫組織学検査で基底膜付近に Laminin  $\gamma 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 2$  の陽性所見が認められ、特に  $\gamma 1$  に染色性が強かった。PCR 法でも Laminin  $\gamma 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 2$  の mRNA が検出された。以上より鼻茸形成・縮小の機序には、ラミニン、特にラミニン  $\gamma 1$  が関与している可能性が示唆されたものの、インドメタシンの鼻茸の形成、縮小に関する機序の解明には至らなかった。

研究成果の概要 (英文)：

Both the immunoreactivity and mRNA of alpha1, beta1, gamma1, and gamma2 subunit of laminin were significantly detected in the nasal polyps in comparison with control normal sinus mucosa. The localization of gamma1 subunit of laminin expression predominantly coincided with thickened basement membrane. These results suggest that the up-regulation of laminin, especially gamma1 subunit of laminin, in human nasal polyps might be one of the most important cause of the development of nasal polyp. However, we did not able to identify a mechanism of the reduction of nasal polyps by the indomethacin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	600,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻茸、ラミニン、細胞外マトリックス、基底膜、光顕免疫染色法、PCR、Western Blot

## 1. 研究開始当初の背景

鼻茸形成のメカニズムについてはこれまで様々な方面から研究が行われてきたが、十分解明されるには至っていない。近年、再生医療や、癌研究の分野において細胞外マトリックスが注目されている。細胞外マトリックスは、様々な増殖因子や分化誘導因子と同様に、細胞の増殖・分化の制御に直接かかわっていることが明らかにされている。鼻副鼻腔領域においても鼻茸の成因の一つとして注目されつつあり、細胞外マトリックスを融解する作用のあるマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) と鼻茸の関連については、2001年のLechapt-Zalcmanらの報告以来、比較的多く見られる。

一般的に鼻茸を有する患者に非ステロイド系消炎鎮痛剤 (NSAID) を使用することは禁忌とはいかないまでも、非常に慎重な対応が必要であることは言うまでもない。しかし一方で、1980年代に本邦において非ステロイド系消炎鎮痛剤 (NSAID) に分類される“インテバンSP (インドメタシン) が、アスピリン過敏性を有しない慢性副鼻腔炎患者の鼻茸治療に有効であった”との報告 (鳥居浩：インドメタシンと鼻茸. 耳鼻 34: 1081-1084, 1988) がなされている。実際、私自身も劇的に効果を認めた症例を数例経験している。その後、この治療法は保険適応外であることや、前述のように鼻茸がアスピリン喘息患者にしばしば合併する危険性などから、世間に浸透することなく衰退していった。このためその機序は不明であったが、その後明らかにされた、NSAID の作用機序から、インドメタシンによる鼻茸縮小効果は、本薬剤のもつ COX 阻害効果によって生じたものであることが推察された。しかし、その

後、(1) 同様の作用を有するアスピリンやリジン・アセチルサリチル酸でも鼻茸に対する間接的な治療効果が報告されているものの、その効果はアスピリン過敏性例に限定されていること、(2) 鼻茸粘膜上皮 (アスピリン過敏性の有無にかかわらず) と鼻茸を伴わない副鼻腔炎症性粘膜上皮の COX 発現量を比較した場合、COX-1 発現に大きな差は見られず、また COX-2 は逆に抑制傾向にあったことが明らかとなり、その鼻茸縮小効果は、COX 阻害作用よりも、インドメタシンが持つその他の作用による可能性高いことが推察された。その他の作用に関しては、2005年に石橋らが「インドメタシンは、COX 阻害作用と独立して、細胞が基底膜 (細胞外マトリックス) へ接着する際に重要な役割を演ずるラミニン  $\gamma$ 1 蛋白の発現を抑制する」ことを報告している。ラミニン蛋白はコラーゲンやヘパリン、プロテオグリカン、その他の成分と結合しあって基底膜を構成する高分子糖タンパク質で、その生理活性は細胞接着、伸展、細胞間信号伝達、正常細胞および癌細胞の増殖、細胞分化誘導、癌細胞転移など、多くの細胞機能に関与している。ラミニンは、3つの異なるサブユニット ( $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖、 $\gamma$  鎖) からなり、それらの組み合わせから、すでに 15 種類のラミニンが見出されている。また実際に、鼻茸と関係の深い喘息患者の血清においてラミニン  $\gamma$ 1 蛋白の生産が有意に上昇していたことが報告されている。我々は、これらの点に注目し、細胞外マトリックスの 1 種であるラミニン蛋白が鼻茸の成因に重要な役割を演じている可能性とインドメタシンの改良によってこれらの薬剤が将来的に鼻茸の治療に応用できる可能性に着目し研究構想に至った。

## 2. 研究の目的

鼻副鼻腔において、細胞外マトリックスに関する研究は嗅覚（嗅上皮）に対する研究が主であったが、最近では鼻茸に関する報告も増えつつある。しかし、これらのほとんどは鼻茸とMMPに関連した報告であり、鼻茸粘膜上皮ではMMP-9またはMMP-2の発現が亢進していることが既に報告されている。また一方で、ラミニン $\gamma$ 1蛋白が、MMP-9の分泌を亢進させることや、ラミニンが活性型MMP-2の産生を導くことによってプロテアーゼ活性を惹起することが報告されていることから、ラミニンのMMPを介した鼻茸との関連が推察されるが、現在の所、ラミニンと鼻茸生成の関連を検討した報告は皆無である。またNSAID（インドメタシン）と鼻茸に関しても、アスピリン喘息の発生機序に関連した報告がほとんどであり、鼻茸治療に応用を考えて検討している報告は少ない。特にアスピリン耐性患者の鼻茸に有効であったとの報告は、本邦での鳥居らの報告を除いては見出すことはできなかった。

本研究で、このような鼻茸とラミニン蛋白およびインドメタシンの関係を解明することは、鼻茸の成因や治療法を解明することのみならず、将来的には鼻副鼻腔炎の改善または予防を目指した分子標的治療への応用につながると予想される。また同時に、鼻茸を合併したアスピリン喘息患者の病態解明にも寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

次の（A）正常鼻粘膜群、（B）副鼻腔粘膜群（ポリープ無し）、（C）アスピリン耐性ポリープ群、（D）アスピリン過敏性ポリープ群の4群に分けて、それぞれの相違につ

いて検討する。

- （1） 光顕観察：4%パラフォルムアルデヒド(PFA)固定、OCTコンパウンドにて包埋（凍結標本）後、HE染色標本を作成。鼻茸組織（特に上皮および血管の基底膜）の観察を行った。
- （2） 光顕免疫組織化学：4%パラフォルムアルデヒド(PFA)固定、OCT compound に包埋し、クライオスタットにて7 $\mu$ 厚凍結切片作成。ラミニンおよびラミニン $\gamma$ 1蛋白の局在および発現について各組織間で比較検討を行った。また正常鼻粘膜と病的鼻粘膜におけるラミニン5などのその他の各サブユニットの発現についても検討を行った。
- （3） RT-PCR法を用いて、各組織のラミニン、ラミニン $\gamma$ 1のRNAレベルでの発現を比較検討を行った。またラミニン5などのその他の各サブユニットのRNAレベルでの発現を比較検討を行った。
- （4） Western blot法を用いて各組織間のラミニン、ラミニン $\gamma$ 1、ラミニン5などのその他の各サブユニットの蛋白レベルでの発現量を比較検討を行った。

## 4. 研究成果

鼻茸をともなった、（C）アスピリン耐性者の鼻茸粘膜、（D）アスピリン非耐性者の鼻茸粘膜群では、（A）正常鼻粘膜群と比較して基底膜の肥厚を伴った症例が多く観察された。一方、光顕免疫組織化学染色では、正常群と比較して鼻茸群でラミニン $\gamma$ 1の免疫陽性反応が強い症例が多く見られ、特に基

底膜周囲に強く染色している症例が数例見られた。

一方、PCR 法では各群のほとんどの症例で、laminin  $\gamma$  1 の RNA レベルでの存在が確認されたものの、ウェスタンブロット法では必ずしも鼻茸を形成している組織中の laminin  $\gamma$  1 タンパクが多いという結果は得られなかった。

また、その他のサブユニット ( $\alpha$  1、 $\beta$  1、 $\gamma$  2) においても鼻茸症例の方が強い染色性を認める傾向が見られた。鼻茸をともなった (C) アスピリン耐性者の鼻茸粘膜、(D) アスピリン非耐性者の鼻茸粘膜群では、(A) 正常鼻粘膜群と比較して基底膜付近に Laminin  $\beta$ -1 および Laminin  $\gamma$ -2、Laminin  $\alpha$ -1 が強く染色される症例が多かった。その他、Laminin-5 はどの群においても染色性が認められなかった。PCR 法では各群で、全サブユニットの RNA レベルでの存在が確認されたものの、ウェスタンブロット法では必ずしも正常に比して鼻茸組織中の Laminin 各サブユニットのタンパク量が多いという結果は得られなかった。

上記の結果より鼻茸の形成過程において、ラミニン  $\gamma$  1 が重要な役割を果たしていることが示唆されたものの、ラミニン  $\gamma$  1 の免疫染色性について一定した規則性は検出されなかった。つまり、鼻茸のなかでも染色性が強い症例や、全く染色しない症例が見られる。このため今後、さらに症例数を増やした検討が必要と思われた。

また、鼻茸の形成過程に、ラミニンのその他のサブユニットが何らかの役割を果たしていることが示唆されたものの、やはり一定の規則的な結果を得られることはできなかった。この結果は鼻茸形成には Laminin は関与しているものの、その他の蛋白が間接的、直接的に関与していることを示唆している結果かもしれない。今後は、他の方法を模索しながら Laminin の鼻茸形成における役割を

明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇高 毅 (UDAKA TSUYOSHI)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号: 1 0 3 6 9 0 6 9

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者