

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592179

研究課題名（和文） 神経反発因子セマフォリ 3A を用いた斬新で画期的なアレルギー性鼻炎治療の研究

研究課題名（英文） A study of a novel allergic rhinitis treatment using nerve repulsion factor semaphorin 3A (Sema3A)

研究代表者

横井 秀格 (YOKOI HIDENORI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：80317487

研究成果の概要（和文）：神経反発因子である Sema3A がヒト鼻粘膜にてアレルギー炎症に特異的に関与する分子ではなく、慢性炎症（鼻粘膜過敏症の病態）における神経の役割に関与するものと示唆された。

研究成果の概要（英文）：Semaphorin 3A (Sema3A), a nerve repulsion factor, has been reported to be specifically associated with a role in chronic inflammation of the nerves (i. e., in cases of nasal mucosal hypersensitivity), but not in allergic inflammation in the human nasal mucosa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医学

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：神経反発因子，セマフォリ 3A，アレルギー性鼻炎，鼻粘膜過敏症

1. 研究開始当初の背景

鼻アレルギー（AR）においてスギ花粉などを原因物質として誘導される抗原・抗体反応は、肥満細胞を活性化し、その結果遊離されたヒスタミンなどを介した刺激が知覚神経を介して向上性に中枢神経や副交感神経に伝達され、粘膜下腺を刺激してくしゃみ、鼻汁を惹起する。一方、刺激を伝達する過程において、末梢神経（三叉神経）から遊離されたサブスタンス P（SP）は中枢神経を介さず直接局所の腺細胞などを刺激する反応もおこす（軸索反射）。すなわち刺激の一部が下降して分枝する末梢神経終末から SP を放出

させて、神経原性炎症を誘導し鼻汁を生じさせる。現在の治療薬の中心は抗ヒスタミン剤を中心にロイコトリエン拮抗剤やステロイドの鼻内噴霧剤がよく用いられている。しかし、これら AR 治療薬を使用しても AR 患者の症状を完全に解消できないことも多いのが現状である。この原因の一つに、神経伸長因子（NGF, amphiregulin, gelatinase など）による鼻粘膜内神経線維密度の増加が示唆される。

一方、これまで神経反発因子と AR 病態との関連性については全く研究されてこなかった。最近、表皮ケラチノサイトが神経反

発因子 Sema3A を発現しており、健常者と比較し、AD 患者の病変部では Sema3A の発現量が減少していることを明らかとなった。そこで健常者と比較し、AR 患者の病変部では Sema3A の発現量が減少している事が予想される。従って、鼻粘膜内でのこれら軸索ガイダンス分子の量的バランスが鼻粘膜神経密度を抑制することが示唆されるため、鼻粘膜への Sema3A の投与、あるいは鼻粘膜に Sema3A を発現誘導させる薬剤を作用させることで AR 患者の鼻粘膜内神経線維を退縮させ、AR の症状を寛解することが期待される。

さらに、Sema3A にはもう一つ注目すべき機能がある。それは Sema3A レセプターの neuropilin-1 が血管新生を促進する VEGF (vascular endothelial growth factor) のレセプターでもあるため、Sema3A が VEGF に対し拮抗作用を持つことである (Miao et al., J Cell Biol. 1999; 146: 233-42)。一般に VEGF は血管透過性の亢進と血管内皮細胞の増殖という 2 つの特性を持つ。AR においても鼻粘膜内での血管拡張はよく知られているところである。このような血管新生と AR との相関性からも示唆されるように、Sema3A は神経線維の伸長抑制だけではなく、血管透過性の亢進と血管内皮細胞の増殖を抑制し、その結果、リンパ球、肥満細胞といった炎症性炎症性細胞浸潤を抑制することでも、鼻閉症状を含めて改善すると共にこれら炎症性細胞により惹起される神経線維の活性化により生じる AR 症状を抑制することが期待される。

細胞浸潤を抑制することでも AR の病態を改善すると共にこれら炎症性細胞により惹起される神経線維の活性化により生じる AR 症状を抑制することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では AR の斬新な治療薬の開発を目指し、AR のモデルマウスを用いて 1) 知覚神経線維の発現密度 2) 神経伸長因子 (NGF, amphiregulin など) と神経反発因子 (Sema3A) の発現と発現細胞の同定を正常マウスとの比較において検討する。3) Sema3A 鼻腔粘膜内投与による鼻粘膜内神経線維伸長および血管新生の抑制効果 4) Sema3A 鼻腔粘膜内投与による AR の症状改善効果 5) Sema3A の AR 治療効果と既存の抗ヒスタミン剤、ステロイド鼻内噴霧剤にての効果の比較について検討する。

また、ヒト AR と感染性鼻炎の粘膜を用いても 1) 知覚神経線維の発現密度 2) 神経伸長因子 (NGF, amphiregulin など) と神経反発因子 (Sema3A) の発現と発現細胞の同定を比較検討する。

3. 研究の方法

①. AR および非 AR の患者の下甲介粘膜における知覚神経線維、神経伸長因子、神経反発因子および血管の組織学的解析

下甲介粘膜肥厚により鼻閉をとまう AR 患者および非 AR 患者 (コントロール) より手術にて得られた下鼻甲介粘膜における知覚神経線維、神経伸長因子、神経反発因子および血管の分布を抗 PGP9.5 抗体、抗 NGF 抗体、抗 amphiregulin 抗体、抗 Semaphorin 抗体および CD34 抗体を用いた免疫染色法にて有意差を比較解析する。

②. AR モデルマウスと正常マウスの鼻粘膜における知覚神経線維、神経伸長因子、神経反発因子および血管の組織学的解析

AR モデルマウスを作成する (Hiromura Y et al., J Immunol)。すなわち BALB/c mice ♂ を Ovalbumin にて感作し、AR を発症させる。一方で感作なしのマウスも用いて、両者にて鼻粘膜における知覚神経線維、神経伸長因子、神経反発因子および血管の分布を抗 PGP9.5 抗体、抗 NGF 抗体、抗 amphiregulin 抗体、抗 Semaphorin 抗体および CD34 抗体を用いた免疫染色法にて有意差を比較解析する。

③. リコンビナント Sema3A (rSema3A) の AR マウス鼻粘膜内投与による AR 症状改善効果の検討

AR モデルマウスの鼻粘膜内に rSema3A を一日一回、計 5 日間投与し、投与終了 3, 5, 7 日後の AR 症状をビデオカメラで 30 分間撮影する。コントロール群には、生理食塩水を投与し、rSema3A 投与群と同様に AR 症状を撮影する。その後、両群にて鼻掻き回数、くしゃみ回数を計測し、AR の鼻汁、くしゃみに対する Sema3A の効果を検討する。

④. rSema3A 投与による鼻粘膜内神経線維伸長、血管新生の抑制効果と鼻腔容積の増大の有無から鼻閉症状改善効果の検討

rSema3A 投与終了 3, 5, 7 日後のマウスから鼻粘膜を採取し、これら鼻粘膜における神経線維と血管の分布を抗 PGP 抗体および抗 CD34 抗体を用いた免疫染色により解析する。また、rSema3A 投与群での基底膜の肥厚、炎症性細胞浸潤の程度についても組織学的検討を行う。他に鼻腔容積の増大の有無も組織学的に検討する。さらに、これらの検討をコントロール群においても同様に、rSema3A 投与群の結果と比較検討する。

⑤. Sema3A インヒビターの AR モデルマウス鼻粘膜内投与による AR 症状誘発の検討

Sema3A インヒビターを AR モデルマウスの鼻粘膜内に投与し、鼻掻き回数、くしゃみ回数程度を観察、また組織学的に血管分布、

鼻腔容積、神経線維密度をコントロール (Sema3A インヒビター投与なしの群) と比較検討する。

⑥. これまでの AR 治療薬との比較

rSema3A 投与による AR 治療の効果と既存の治療法である抗ヒスタミン剤、ステロイド鼻内噴霧剤の治療効果を鼻掻き回数、くしゃみ回数、組織学的に鼻腔容積、鼻粘膜内神経繊維、血管 分布を指標とし、比較検討する。

4. 研究成果

まず、今回の研究においてマウスを用いた vivo の実験は、何回か試みたが、マウスが実験中に死亡したり、うまく OVA に感作されず、もしくは発症しないこともあり、実験方法そのものにうまくいかないことがあり、結果を出せなかった。今後の実験の参考としたい。一方でヒト鼻粘膜を用いた研究を施行した。結果：鼻アレルギーの症状発現には鼻粘膜知覚神経の関与が重要であることが知られている。本研究では、鼻アレルギー (AR) における神経反発因子 Sema3A の AR への関与の有無とその治療効果の検討を目的とする。

アレルギー鼻炎 (+) 10 例、アレルギー (-) 10 例の下甲介粘膜を採取し、パラフィン切片ブロック、凍結切片用ブロック、また Western Block, RT-PCR 用凍結粘膜を用いた。

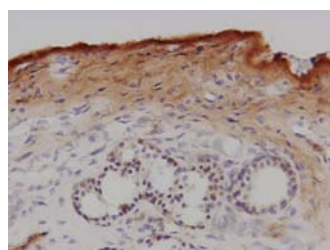
神経反発因子 Sema3A と Sema3A のレセプターの neuropilin-1 が血管新生を促進する VEGF (vascular endothelial growth factor) のレセプターでもあるため、Sema3A が VEGF に対し拮抗作用を持つことから、Semaphorin 3A、neurophirin-1、VEGFR-1, 2 の発現を免疫組織染色にて同定した。Sema3A、neurophirin-1 の発現は、それぞれ上皮細胞間領域、腺細胞間領域に認め、VEGFR-1, 2 の発現は主に腺細胞に認めた。アレルギー (+) 群と (-) 群とでの発現量の比較をおこなったが、現在 Sema3A は、アレルギー群に多く発現している傾向を認めたが統計学的有意差は認めなかった。

次にメッセンジャーレベルでの解析を上記検体、分子を用いて RTPCR 法にて解析した。遺伝子レベルにてもそれぞれの分子にてアレルギー (+) 群と (-) 群とでの発現量の比較をおこなったが、統計学的有意差は認めなかった。また、アレルギー (+) 群の中で Sema3A とそのレセプターである neurophirin-1、VEGFR-1, 2 との発現量の相関性を解析したが統計学的有意な相関はなかった。

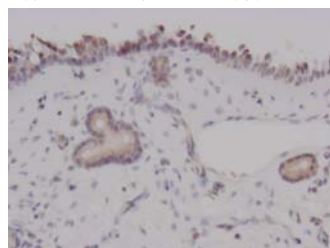
マウスにおける同様の研究が、昨年他施設より施行され発表され、アトピー性皮膚炎と同様の結果でありアレルギー性鼻炎モデルマウスにて有意に神経反発因子 Sema3A の発現量の低下を認めた結果であった。

しかし、我々のヒト鼻粘膜を用いた研究では両者に有意差はなかった。アレルギー (-) 群となった検体もアレルギー以外の炎症があることが示唆され、ヒト鼻粘膜を用いた研究にて Sema3A がアレルギー炎症のみならず鼻粘膜過敏症における神経の役割に関与していることが示唆される。神経反発因子である Sema3A がヒト鼻粘膜にてアレルギー炎症に特異的に関与する分子ではなく、慢性炎症における神経の役割に関与するものと示唆される。

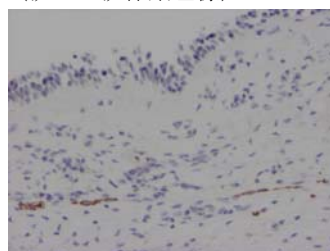
そこで本年度は各検体の免疫染色における神経の上皮内への分布量と Sema3A のメッセンジャーレベル、タンパクレベルでの発現量の相関関係を解析した。結果、統計学的有意差は認めないが、相関関係がある傾向にあった。



(抗 Sema3A 抗体染色像)



(抗 NGF 抗体染色像)



(抗 PGP9.5 抗体染色像)

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 15 件)

- ① Sato D, Suzuki Y, Kano T, Suzuki H, Matsuoka J, Yokoi H, Horikoshi S, Ikeda K, Tomino Y. Tonsillar TLR9 expression and efficacy of tonsillectomy with steroid pulse therapy in IgA nephropathy

- patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 ; 27:1 1090-1097.
- ② Kawano K, Kusunoki T, Ono N, Yao T, Saito T, Yokoi H, Ikeda K. Heme oxygenase-1 expression in chronic rhinosinusitis with eosinophilic infiltration. *Auris Nasus Larynx.* 2011; 39: 387-392.
- ③ Yokoi H, Arakawa A, Kuribayashi K, Inoshita A, Haruyama T, Ikeda K. An immunohistochemical study of sinonasal hemangiopericytoma. *Auris Nasus Larynx.* 2011; 38: 743-6.
- ④ Yokoi H, Yoshikawa H, Matsumoto T, Kawano K, Ikeda K. An inflammatory calcified nodule in the buccal subcutis-A case report. *B-ENT.* 2011;7(3):215-8.
- ⑤ Ikeda K, Yokoi H, Kusunoki T, Saitoh T, Yao T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kawano K. Bacteriology of recurrent exacerbation of postoperative course in chronic rhinosinusitis in relation to asthma. *Auris Nasus Larynx.* 2011; 38: 469-73.
- ⑥ Ikeda K, Yokoi H, Kusunoki T, Saito T, Yao T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kawano K. Relationship between olfactory acuity and peak expiratory flow during postoperative follow-up in chronic rhinosinusitis associated with asthma. *Ann Oto Rhinol Laryngol.* 2010; 119:749-754.
- ⑦ Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Tominaga M, Takamori K, Kajiwaru N, Saito H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol.* 2010;184:3526-34.
- ⑧ Inoshita A, Yokoi H, Matsumoto F, Yao T, Kawano K, Furukawa M, Ikeda K. A randomized prospective study of oral levofloxacin vs intravenous flomoxef prophylaxis in postoperative infection after endoscopic sinus surgery. *Am J Otolaryngol.* 2009; 31: 360-363.
- ⑨ Ikeda K, Sakai Y, Haruyama T, Misawa N, Misawa N, Hori S, Kusunoki T, Furukawa M, Yokoi H, Yokoi N, Ichihari Y, Kawano K, Matsumoto F, Hayashi C, Narui Y, Iizuka T, Ito S, Inoshita A, Kasai M, Saito T, Minekawa A, Oba S, Cho Y. Bacterial contamination of Multiple-use atomizers commonly used in Japan. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 61: 193-6.
- ⑩ Saitoh T, Kusunoki T, Yao T, Kawano K, Kojima Y, Miyahara K, Onoda J, Yokoi H, Ikeda K. Relationship between epithelial damage or basement membrane thickness and eosinophilic infiltration in nasal polyps with chronic rhinosinusitis. *Rhinology.* 2009; 47: 275-9.
- ⑪ Saitoh T, Kusunoki T, Yao T, Kawano K, Kojima Y, Miyahara K, Onoda J, Yokoi H, Ikeda K. Role of interleukin-17A in the eosinophil accumulation and mucosal remodeling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps associated with asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 151: 8-16.
- ⑫ Ikeda K, Yokoi H, Saito T, Kawano K, Yao T, Furukawa M, Kusunoki T: Prevention of ultrasonic coagulator-mediated mucoperiosteal flap injury and defects by using a clip manipulation in the resection of the posterior nasal nerve. *Rhinology.* 2009; 47: 45-7.
- ⑬ Yao T, Kojima Y, Koyanagi A, Yokoi H, Saito T, Kawano K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K : Eotaxin-1, -2 and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. *Laryngoscope.* 2009; 119: 1053-1059.
- ⑭ Kase K, Hua J, Yokoi H, Ikeda K, Nagaoka I : Inhibitory action of roxithromycin on histamine release and prostaglandin D2 production from beta-defensin 2-stimulated mast cells. *Int J Mol Med.* 2009. 23: 337-40.
- ⑮ Matsumoto F, Itoh S, Ohba S, Yokoi H, Furukawa M, Ikeda K : Biopsy of cervical lymph node. *Auris Nasus Larynx.* 2009; 36: 71-74.

[学会発表] (計 15 件)

① Hidenori Yokoi, Ryouta Yoshii, Satoshi Tsutsumi, Naoyuki Kohno. Schwannoma of the nasal septum associated with multiple central nerve system tumors which was totally resected endoscopically. XIV IRS & XXX ISIAN September 20-23, 2011 , 他

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 秀格 (YOKOI HIDENORI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：80317487

(2)研究分担者

吉武 洋 (YOSHITAKE HIROSHI)

順天堂大学 医学部・助教

研究者番号：00396574

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：