

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 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791591

研究課題名（和文） 好酸球性副鼻腔炎・中耳炎に対する抗凝固因子に注目した
新たな局所治療薬の開発

研究課題名（英文） Role of coagulation factors in the eosinophilic inflammation
of upper airways

研究代表者

清水 志乃（SHIMIZU SHINO）

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：50505592

研究成果の概要（和文）：患者鼻汁、患者組織、培養気道上皮細胞を用いた検討から、組織因子やトロンビンといった凝固因子が上気道炎症の病態形成、特に過剰な粘液産生や鼻茸の形成に関与することを示した。また、培養気道上皮細胞とラット鼻炎モデルを用いた検討から、抗凝固剤ヘパリンの局所投与によって粘液産生や炎症細胞浸潤が抑制されることを示した。

研究成果の概要（英文）：We have shown that coagulation factors may be involved in the pathogenesis of excessive mucus secretion and nasal polyposis. Moreover, it was shown that mucus production and infiltration of inflammatory cells are attenuated by nasal administration of anticoagulant heparin in rat models of rhinitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：好酸球性副鼻腔炎、鼻茸、トロンビン、ヘパリン、組織因子、凝固因子、杯細胞化生、好酸球

1. 研究開始当初の背景

好酸球性中耳炎・好酸球性副鼻腔炎は、成人発症の気管支喘息やアスピリン喘息に合併することが多い難治性疾患で、著明な鼻茸・耳茸形成と好酸球浸潤、ニカワ状の極めて粘度の高い分泌液が特徴的である。手術を行っても再発しやすいために治療に難渋し、ステロイドの全身・局所投与以外に効果的な薬物療法がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性の好酸球性副鼻腔炎・好酸球性中耳炎などの上気道炎症病態における凝固・抗凝固因子の新たな役割を明らかにし、抗凝固因子に注目した新たな局所治療薬の開発を目指すことにある。

3. 研究の方法

(1) アレルギー性鼻炎と慢性副鼻腔炎患者の鼻汁や粘膜組織を採取して、トロンビン、トロンビン-アンチトロンビン III 複合体、組織因子経路インヒビター濃度

を測定した。鼻茸や下甲介粘膜の組織因子、フィブリン、ムチン、トロンビン受容体などの発現を免疫組織学的に検討した。

- (2) 気道上皮細胞の細胞株である NCI-H292 細胞、正常ヒト気管支上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞を用いて、トロンビン刺激によるサイトカイン(PDGF, VEGF, IL-8 など) 分泌や粘液分泌に対する影響を ELISA 法と RT-PCR 法で検討し、抗凝固剤であるヘパリンによる作用について検討した。
- (3) トロンビンそのものをラットに点鼻投与してその作用を検討するとともに、LPS 刺激とアレルギー性炎症のラット鼻炎モデルを利用して、抗凝固剤であるヘパリンの点鼻投与の効果について検討した。

4. 研究成果

- (1) 鼻汁中の凝固の活性化を示すトロンビン活性やトロンビン - アンチトロンビン III 複合体濃度は正常者に比べてアレルギー性鼻炎患者、慢性副鼻腔炎患者で高く、特に好酸球性副鼻腔炎で高値であった (図 1、図 2)。外因系凝固の制御因子である組織因子経路インヒビターの濃度はトロンビン活性やトロンビン - アンチトロンビン III 複合体と正の相関を認めた。免疫染色ではフィブリンが鼻汁や粘膜下固有層に染色され、上皮細胞や好酸球に外因系凝固の開始蛋白である組織因子が染色された。上皮細胞にはトロンビン受容体が存在した。好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮には特に強くムチン (MUC5AC) が染色された。

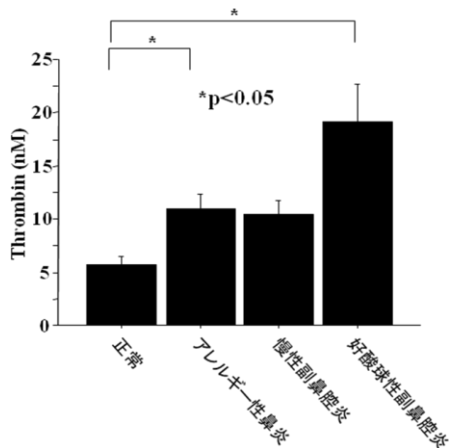


図 1. 鼻汁中のトロンビン濃度

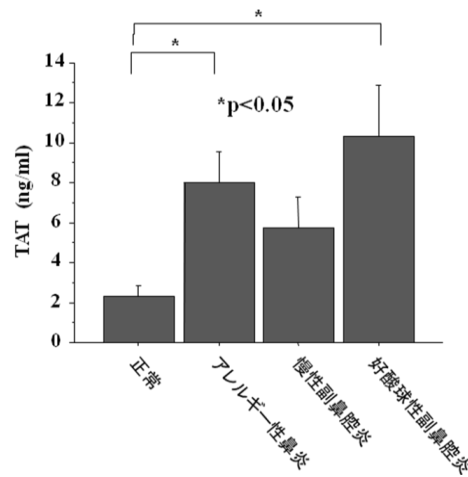


図 2. 鼻汁中のトロンビン - アンチトロンビン III 複合体 (TAT) 濃度

- (2) 用いた培養気道上皮細胞は全てトロンビン受容体を発現していた。トロンビンあるいはトロンビン受容体アゴニストによる刺激で上皮細胞の PDGF、VEGF、TGF- β 、IL-8、MUC5AC 産生は亢進した。組織因子経路インヒビターの濃度もトロンビン刺激によって亢進した。ヘパリンを用いた検討では、未分画ヘパリン、低分子ヘパリン共に TNF- α 刺激で亢進した VEGF、IL-8、MUC5AC 産生を抑制した (図 3、4)。

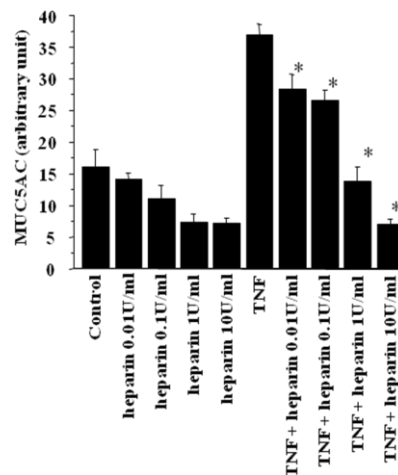


図 3. 未分画ヘパリンは TNF- α 刺激によって増加した NCI-H292 細胞からの MUC5AC 産生を濃度依存性に抑制した。
* <0.05

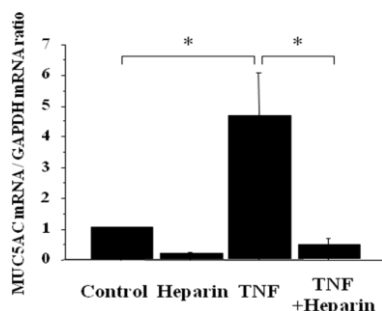


図4. 未分画ヘパリンはTNF- α 刺激によって増加したNCI-H292細胞のMUC5AC mRNAを有意に抑制した。
* <0.05

- (3) ラットにトロンビンを点鼻投与すると、鼻粘膜に杯細胞化生を生じた。ラットLPS鼻炎モデルにヘパリンを局所投与すると鼻粘膜上皮の杯細胞化生と好中球浸潤を有意に抑制した。また、ラットアレルギーモデルにおいてもヘパリンの局所投与は杯細胞化生と好酸球・好中球浸潤を有意に抑制した。

ヘパリンの上気道炎症における抗炎症作用の検討については、第29回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会において若手研究者奨励賞を受賞した。The 14th ASIAN Research Symposium in Rhinologyにおいても奨励賞を受賞した。

ステロイド以外に有効な薬物療法のない好酸球性副鼻腔炎に対し、ヘパリンの局所投与が有効である可能性を示すことができた。上気道炎症の病態の中で鼻茸形成や杯細胞化生などの組織リモデリングに凝固系因子が深くかかわっており、今後は活性化プロテインCやトロンボモジュリンといったヘパリン以外の抗炎症作用を有する抗凝固因子の有効性についても検討したい。

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5件)

- ① Ogawa T, Shimizu S, Shimizu T. The effect of heparin on antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Allergol Int* 62(1):77-83, 2013, doi: 10.2332/allergolint. (査読あり)
- ② Ogawa T, Shimizu S, Tojima I, Kouzaki H, Shimizu T. Heparin inhibits mucus hypersecretion in airway epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy* 25:69-74, 2011, doi: 10.2500/ajra.2011.25.3562. (査読あり)

- ③ Shimizu S, Gabazza EC, Ogawa T, Tojima I, Hoshi E, Kouzaki H, Shimizu T. Role of thrombin in chronic rhinosinusitis-associated tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy* 25:7-11, 2011, doi: 10.2500/ajra.2011.25.3535. (査読あり)
- ④ 小河孝夫、清水志乃、戸嶋一郎、神前英明、清水猛史：上気道炎症に対する新たな局所治療薬としてのヘパリンの可能性. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* 29:221-227, 2011, <http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=ch6menek&ye=2011&vo=29&nu=3&st=221> (査読なし)
- ⑤ 清水志乃：(総説) 気道炎症における凝固系因子と protease-activated receptors を介した炎症応答 *日本鼻科学会誌* 49(1):1-7, 2010, doi.org/10.7248/jjrhi.49.1 (査読なし)

[学会発表] (計13件)

- ① 清水志乃、神前英明、清水猛史：鼻副鼻腔における Tissue factor と Tissue factor pathway inhibitor. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2013年2月7-9日、岡山
- ② 清水志乃、神前英明、清水猛史：鼻副鼻腔における組織因子と組織因子経路インヒビター. 第62回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会秋季学術大会、2012年11月29日~12月1日、大阪
- ③ Takeshi Shimizu, Shino Shimizu, Takao Ogawa, Ichiro Tojima, Hideaki Kouzaki: Role of Coagulation System in Tissue Remodeling of Sinonasal Inflammation. *IRS & ISIAN 2011*, 2011年9月20-22日、東京
- ④ 小河孝夫、清水志乃、戸嶋一郎、神前英明、清水猛史：アレルギー性炎症によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生と好酸球・好中球浸潤に対するヘパリンの抑制作用. 第29回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2011年2月10-12日、大分
- ⑤ 清水志乃：凝固系因子と鼻副鼻腔リモデリング. 第14回滋賀県耳鼻咽喉科オープンセミナー、2011年1月13日、滋賀
- ⑥ Shino Shimizu, Takao Ogawa, Ichiro Tojima, Takeshi Shimizu: In Vivo and in Vitro Effects of Heparin on Mucus Secretion in Airway Epithelial Cells. The 13th Korea Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, September 9-11, 2010, Korea
- ⑦ Shino Shimizu, Takao Ogawa, Ichiro Tojima, Takeshi Shimizu: In vivo and in vitro effects

of heparin on mucus secretion in airway epithelial cells. ERS&ISIAN, 2010, June 20-24, 2010, Geneva

- ⑧ 小河孝夫、清水志乃、戸嶋一郎、柴山将之、瀬野悟史、清水猛史：上気道炎症に対するヘパリンの抗炎症作用の検討。第111回日本耳鼻咽喉科学会、2010年5月20-22日、仙台
- ⑨ 小河孝夫、清水志乃、戸嶋一郎、柴山将之、瀬野悟史、星 恵理子、清水猛史：気道炎症に対するヘパリンの抗炎症作用について。第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2010年2月18-20日、福井

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 志乃 (SHIMIZU SHINO)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：50505592