

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462581

研究課題名(和文)好酸球性鼻副鼻腔炎における組織リモデリングとその対策

研究課題名(英文)Tissue remodeling of eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

清水 猛史 (SHIMIZU, TAKESHI)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00206202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎における組織リモデリングに、プロテアーゼ受容体を介したトロンピンなどの凝固系因子の刺激による上皮細胞・線維芽細胞からの粘液・サイトカイン産生や、好酸球と上皮細胞あるいは線維芽細胞との相互作用による粘液・サイトカイン産生が重要であること、その機序にいずれもEGF受容体のtransactivationが関わっていることを明らかにした。そこで、EGF受容体阻害薬の新たな治療薬としての可能性を検討したところ、EGF受容体阻害薬AG1478の腹腔内投与や局所点鼻投与により、LPS刺激やアレルギー性炎症におけるラット鼻粘膜上皮の粘液産生や好中球・好酸球浸潤が著明に抑制された。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanism of tissue remodeling in the pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis. Coagulation factors such as thrombin and FXa stimulate the secretion of profibrotic cytokines and MUC5AC mucin from nasal epithelial cells or fibroblasts. Eosinophil-epithelial cell and eosinophil-fibroblast interactions also stimulate the secretion of cytokines and MUC5AC mucin. EGF receptor inhibitor AG1478 significantly inhibited these secretion of cytokines and MUC5AC mucin induced by thrombin and by eosinophil-epithelial cell or eosinophil-fibroblast interactions, and EGFR transactivation plays a crucial role. Intraperitoneal injection or intranasal instillation of EGFR inhibitor AG1478 significantly inhibited LPS-induced or antigen-induced goblet cell metaplasia, mucus production and eosinophil/neutrophil infiltration in rat nasal epithelium. Intranasal instillation of EGFR inhibitor may be a new therapeutic approach for the treatment of eosinophilic chronic rhinosinusitis.

研究分野：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 EGF受容体阻害薬 組織リモデリング 鼻茸形成 ラット鼻粘膜 鼻粘膜上皮細胞 線維芽細胞 サイトカイン

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、多発性の鼻茸形成を特徴とする難治性疾患である。喘息を伴うことが多いが伴わない場合もあり、近年その罹患率が上昇している。手術を行っても鼻茸が再発しやすく、ステロイドの点鼻・内服以外に有効な治療手段がない。

われわれは、これまでに好酸球性鼻副鼻腔炎における鼻茸形成や杯細胞化生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)、MUC5AC ムチンなどの過剰産生や、凝固系の活性化に伴うトロンピン産生やフィブリン形成が関わっていることを明らかにしてきた。

また、1) トロンピンは上皮細胞の PAR-1 受容体を介して PDGF, VEGF, MUC5AC ムチン産生を促進すること、2) 浸潤した好酸球は鼻粘膜上皮細胞との相互作用によって、上皮細胞からの PDGF や VEGF, MUC5AC ムチン、TGF-beta 産生などが著しく促進することを確認した。

さらに、好酸球と上皮細胞の相互作用に上皮細胞における上皮成長因子 (EGF) 受容体の transactivation が関わっている可能性が考えられている。

2. 研究の目的

好酸球と上皮細胞の相互作用によるサイトカイン・粘液産生の機序の詳細を明らかにするとともに、トロンピン刺激による PAR-1 受容体を介した上皮細胞や線維芽細胞からのサイトカイン・粘液産生機序や、さらに LPS 刺激や TNF- α 刺激による上皮細胞からのサイトカイン・粘液産生機序について検討し、EGF 受容体を新たなターゲットに加えて、ステロイド以外に適切な薬物療法がない難治性の好酸球性鼻副鼻腔炎に対する新たな治療手段の開発を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) 好酸球由来の細胞株である EoL-1 細胞と気道上皮由来の細胞株である NCI-H292 細胞を共培養し、組織リモデリングに関わる PDGF や VEGF, TGF-beta, IL-8, MUC5AC ムチン産生と、上皮細胞における EGF 受容体の transactivation の詳細な機序について検討した。

2) LPS 刺激や TNF- α 刺激による NCI-H292 細胞からの IL-8 (好中球遊走因子) や MUC5AC ムチン産生における EGF 受容体の役割について、EGF 受容体阻害薬 AG1478 を用いて検討した。

さらに、LPS の3日間点鼻で作成した、ラット鼻粘膜炎症モデルを利用して、杯細胞化生や粘液産生、好中球浸潤に対する AG1478 の経口投与と点鼻投与の効果を検討した。

3) 好酸球性炎症について、好酸球遊走因子

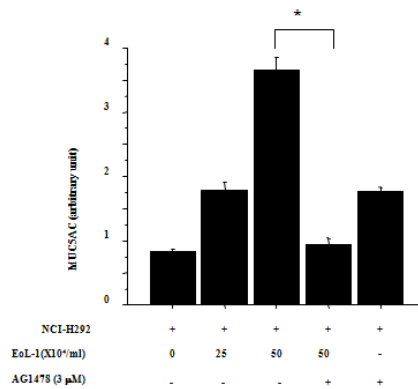
である、GM-CSF や Eotaxin-1, RANTES に注目して、トロンピン刺激による培養ヒト鼻粘膜上皮細胞からの GM-CSF 産生や、トロンピン刺激による培養ヒト鼻粘膜線維芽細胞からの Eotaxin-1 や RANTES 産生における EGF 受容体の役割について、EGF 受容体阻害薬 AG1478 を用いて検討した。

さらに卵白アルブミン (OVA) の腹腔内感染と3日間点鼻で作成したアレルギー性炎症のラット鼻粘膜炎症モデルを使用して、杯細胞化生や粘液産生、好酸球・好中球浸潤に対する AG1478 の腹腔内投与と点鼻投与の効果を検討した。

4. 研究成果

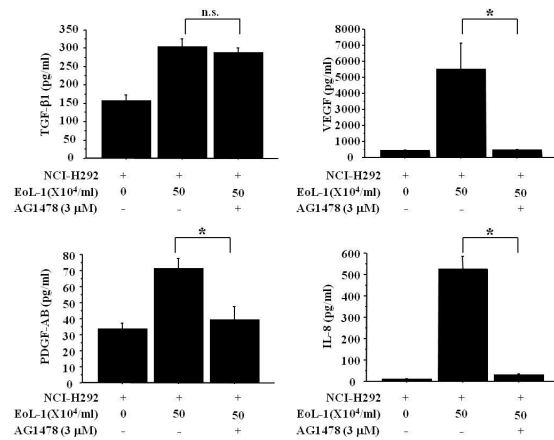
1) 好酸球 (EoL-1 細胞) と気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) との相互作用 (共培養) により、加えた好酸球数に比例して、上皮細胞からの MUC5AC ムチン産生が著明に亢進したが、EGF 受容体阻害薬 AG1478 はこうした作用を抑制した。(図1)

図1 共培養による MUC5AC ムチン産生と AG1478 の抑制作用



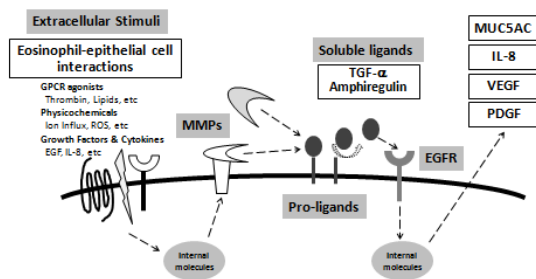
好酸球と上皮細胞の相互作用によって、TGF-beta, VEGF, PDGF-AB, IL-8 産生も著明に促進され、EGF 受容体阻害薬 AG1478 はこのうち VEGF, PDGF-AB, IL-8 産生促進作用を抑制した。(図2)

図2 共培養による TGF-beta, VEGF, PDGF-AB, IL-8 産生と AG1478 の抑制作用



さらに、好酸球 (EoL-1 細胞) と気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) との相互作用 (共培養) による MUC5AC ムチン産生機序について、EGF 受容体のリガンドである TGF- α や amphiregulin の役割、さらに膜結合型リガンドを切り出す matrix metalloproteinases (MMPs) の作用を中心に検討した。その結果、共培養によって amphiregulin 産生が生じること、amphiregulin の中和抗体や、TGF- α の中和抗体、さらに metalloproteinase 阻害薬で MUC5AC ムチン産生が抑制されること、などから、相互作用によって活性化された metalloproteinase が膜結合型リガンドである amphiregulin や TGF- α を切り出して、これが EGF 受容体に作用して、EGF 受容体の活性化が生じていると考えられた。(図 3)

図 3 EGF 受容体の transactivation 機序



2) LPS (10microM/ml) 刺激や TNF-alpha (10nM/ml) 刺激によって、培養気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) から、MUC5AC ムチンと好中球遊走因子である IL-8 産生が促進されるが、EGF 受容体阻害薬 AG1478 は濃度依存性 (1-1000nM) に、MUC5AC ムチン・IL-8 の産生と mRNA 発現を抑制した。(図 4、図 5)

図 4 LPS 刺激による培養気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) からの MUC5AC ムチン産生 (A, B) と IL-8 産生 (C, D) と、AG1478 の抑制作用。蛋白 (A, C) mRNA (B, D)

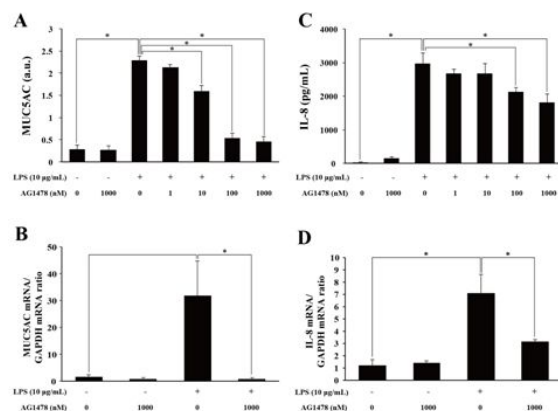
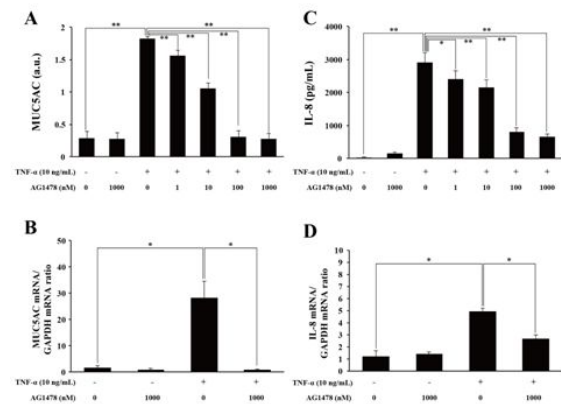


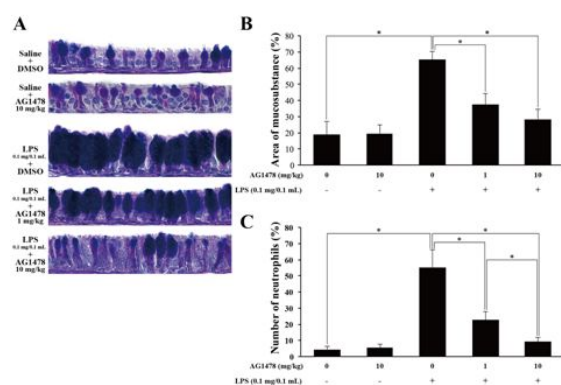
図 5 TNF-alpha 刺激による培養気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) からの MUC5AC ムチン産生 (A, B) と IL-8 産生 (C, D) と、AG1478 の抑制作用。蛋白 (A, C) mRNA (B, D)



次に、LPS (0.1mg/0.1ml) を 3 日間点鼻して作成したラット鼻粘膜上皮の炎症モデルで、鼻中隔粘膜上皮における杯細胞化生と粘液産生、好中球浸潤に対する EGF 受容体阻害薬 AG1478 (1-10mg/kg) の腹腔内投与と点鼻投与 (LPS 点鼻 1 時間後に投与) の効果を検討した。

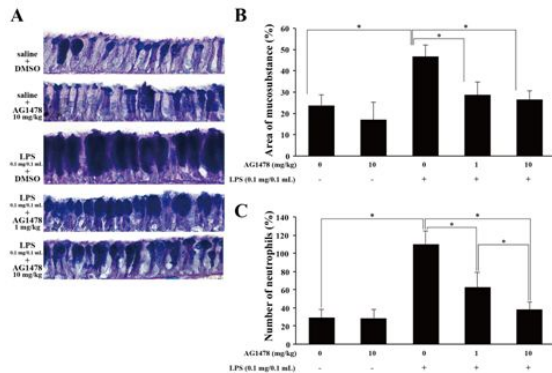
LPS の 3 日間点鼻によって、ラット鼻中隔粘膜上皮に著明な杯細胞化生と粘液産生、好中球浸潤が認められる。AG1478 (1-10mg/kg) の腹腔内投与はこうした LPS 刺激による杯細胞化生、粘液産生、好中球浸潤を濃度依存性に抑制した。(図 6)

図 6 LPS 点鼻によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生 (A) 粘液産生 (B)、好中球浸潤 (C) に対する AG1478 腹腔内投与の効果



さらに、EGF 受容体阻害薬 AG1478 (1-10mg/kg) の点鼻投与 (LPS 点鼻 1 時間後) の効果についても同様に検討したところ、点鼻投与でも、濃度依存性に腹腔内投与と同等の抑制作用が認められた。(図 7)

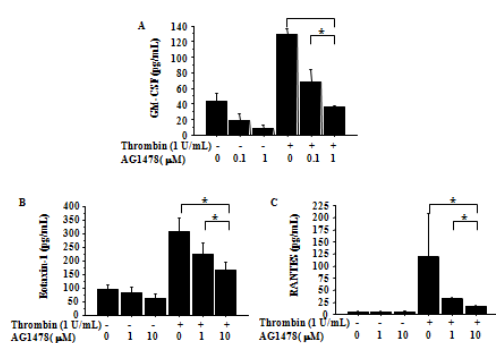
図7 LPS点鼻によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生(A) 粘液産生(B) 好中球浸潤(C)に対するAG1478点鼻投与の効果



3) 最後に好酸球性炎症に対するEGF受容体阻害薬AG1478の作用を検討する目的で、鼻粘膜上皮細胞や線維芽細胞から産生される好酸球遊走因子(GM-CSF, Eotaxin-1, RANTES)について検討した。

トロンピン(1U/ml)は鼻茸由来の培養ヒト鼻粘膜上皮細胞からのGM-CSF産生を促進し、培養ヒト線維芽細胞からのEotaxin-1, RANTES産生を促進したが、EGF受容体阻害薬AG1478は濃度依存性(1-10μM)にトロンピンによるGM-CSF, Eotaxin-1, RANTES産生を抑制した。(図8)

図8 トロンピン刺激による鼻粘膜上皮細胞からのGM-CSF産生(A) 鼻粘膜線維芽細胞からのEotaxin-1産生(B) RANTES産生(C)とAG1478の抑制作用

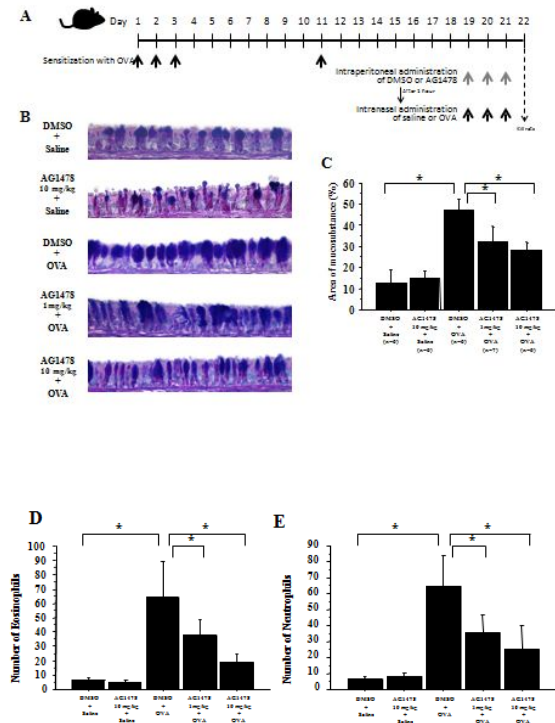


次に、OVA(0.2mg)を1, 2, 3, 11日目に腹腔内感作し、19日目から3日間OVA(5mg/0.1ml)を点鼻して作成したアレルギー性炎症のラット鼻粘膜上皮モデルで、鼻中隔粘膜上皮における杯細胞化生と粘液産生、好酸球・好中球浸潤に対するEGF受容体阻害薬AG1478(1-10mg/kg)の腹腔内投与と点鼻投与(OVA点鼻1時間後に投与)の効果を検討した。

OVAの腹腔内感作と3日間点鼻によって、ラット鼻中隔粘膜上皮に著明な杯細胞化生と粘液産生、好酸球・好中球浸潤が認められる。AG1478(1-10mg/kg)の腹腔内投与は

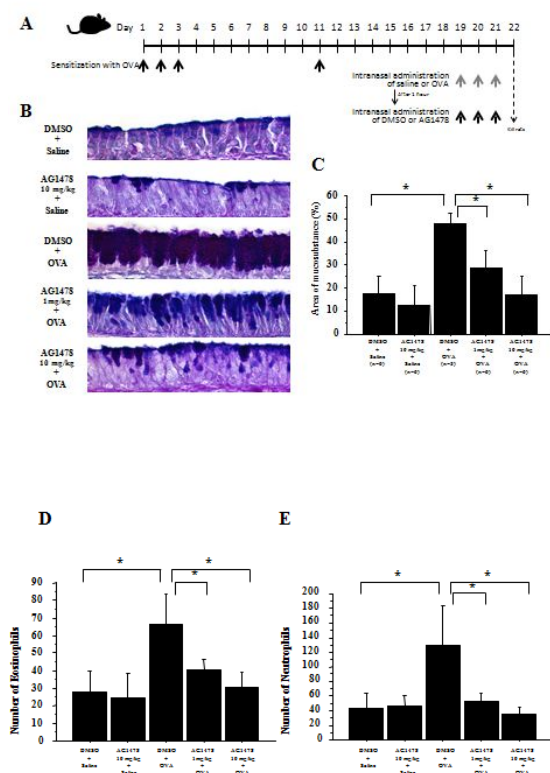
こうしたアレルギー性炎症による杯細胞化生、粘液産生、好酸球・好中球浸潤を濃度依存性に抑制した。(図9)

図9 OVAによる腹腔内感作と点鼻によるラット鼻粘膜上皮のアレルギー性炎症モデル(A)と杯細胞化生(B) 粘液産生(C) 好酸球浸潤(D) 好中球浸潤(E)に対するAG1478腹腔内投与の効果



さらに、EGF受容体阻害薬AG1478(1-10mg/kg)の点鼻投与(OVA点鼻1時間後)の効果についても同様に検討したところ、点鼻投与でも、濃度依存性に腹腔内投与と同等の抑制作用が認められた。(図10)

図10 OVAによる腹腔内感作と点鼻によるラット鼻粘膜上皮のアレルギー性炎症モデル(A)と杯細胞化生(B)、粘液産生(C)、好酸球浸潤(D)、好中球浸潤(E)に対するAG1478点鼻投与の効果。



以上の結果、好酸球と上皮細胞の相互作用以外に、LPS 刺激や TNF-alpha 刺激、トロンピン刺激などによるサイトカイン産生や粘液産生にも EGF 受容体の transactivation が関わっていて、EGF 受容体阻害薬の局所点鼻投与は、好酸球性鼻副鼻腔炎などの難治性上気道炎症に対する新たな治療手段になる可能性が考えられた。

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 4 件)

- 1) Shimizu S, Kouzaki H, Ogawa T, Takezawa K, Tojima I, Shimizu T: Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy* 28:103-109, 2014. 査読有
- 2) Takezawa K, Ogawa T, Shimizu S, Shimizu T: Epidermal growth factor receptor inhibitor AG1478 inhibits mucus hypersecretion in airway epithelium. *Am J Rhinol Allergy* 30:1-6,

2016 査読有

- 3) Shimizu S, Tojima I, Takezawa K, Matsumoto K, Kouzaki H, Shimizu T: Thrombin and activated coagulation factor X stimulate the release of cytokines and fibronectin from nasal polyp fibroblasts via protease-activated receptors. *Am J Rhinol Allergy* 31:13-18, 2017. 査読有
- 4) 竹澤公美子, 小河孝夫, 清水志乃, 清水猛史: 難治性上気道炎症に対する新たな局所治療薬としての Epidermal growth factor (EGF) 受容体阻害薬の可能性. *耳鼻免疫アレルギー* 34:1-7, 2016. 査読有

[学会発表](計 6 件)

- 1) Shimizu T, Takezawa K, Tojima I, Kouzaki H, Shimizu S: Role of eosinophils in tissue remodeling of chronic rhinosinusitis. *ERS2014 (25th Congress of European Rhinologic Society)* (2014.6.22-26) アムステルダム
- 2) 竹澤公美子, 小河孝夫, 清水志乃, 清水猛史: 難治性上気道炎症に対する新たな局所治療薬としての Epidermal growth factor (EGF) 受容体阻害薬の可能性. 第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (2015. 2.26-28) 東京
- 3) Shimizu T: Role of eosinophils in tissue remodeling of chronic rhinosinusitis. *17th Asian Research Symposium in Rhinology* (2015.4.9-11) 北京
- 4) Shimizu T, Shimizu S: Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines through the transactivation of epidermal growth factor receptor in airway epithelial cells. *16th World Congress of Rhinology* (2015. 4.30-5.2) サンパウロ
- 5) Shimizu T: Role of EGFR in upper airway inflammation. *2nd Rhinology Research Forum in Asia* (2016.12.2-3) シンガポール
- 6) Takezawa K, Ogawa T, Shimizu S, Shimizu T: Epidermal growth receptor inhibitor AG1478 inhibits mucus hypersecretion and neutrophil infiltration in airway epithelium. *35th Congress of International Society of Inflammation and Allergy of the Nose*. (2016.7.3-7) スtockホルム

[図書](計 1 件)

- 1) Shimizu T, Shimizu S, Ogawa T, Takezawa K, Kouzaki H: Role of coagulation factors and eosinophils in the pathogenesis of mucus hypersecretion in eosinophil-associated

chronic rhinosinusitis. In Recent advances in rhinosinusitis and nasal polyposis. Ed by Kawauchi H.pp. 111-116 Kugler Publications, Amsterdam, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 なし

取得状況 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 猛史 (SHIMIZU TAKESHI)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00206202

(2)研究分担者

神前 英明 (KOUZAKI HIDEAKI)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：10402710

清水 志乃 (SHIMIZU SHINO)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：50505592

小河 孝夫 (OGAWA TAKAO)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90549908

戸嶋 一郎 (TOJIMA ICHIRO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80567347