

平成 29 年 6 月 29 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：26462582

研究課題名(和文)好酸球性鼻副鼻腔炎の発症・悪化に関わる環境抗原由来のプロテアーゼの役割

研究課題名(英文) Endogenous protease inhibitor in airway epithelial cells contribute to eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

神前 英明 (Kouzaki, Hideaki)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：10402710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎の鼻管では内因性プロテアーゼインヒビターが低下しており、抗原に誘導される上皮由来サイトカイン産生に影響を与えていた。また、複数抗原の長期点鼻マウスモデルでは、内因性プロテアーゼインヒビターの発現減少がみられた。内因性プロテアーゼインヒビターを点鼻投与することで、鼻汁好酸球数、Th2サイトカイン産生抑制がみられ、鼻粘膜のポリープ様の変化も抑制された。この論文は、抗原に含まれるプロテアーゼが、内因性プロテアーゼの機能低下を引き起こすことで、上皮バリア機能の破綻、免疫反応の異常を引き起こし、好酸球性副鼻腔炎の病態形成につながっていることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Cystatin A and SPINK5 are endogenous protease inhibitors (EPIs) that may play key roles in epithelial barrier function. The purpose of this study was to investigate the roles of EPIs in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis (CRS). Thw patients with eosinophilic CRS showed lower protein and mRNA expression of cystatin A and SPINK5 in the nasal epithelium. Allergen-induced production of IL-25, IL-33, and TSLP in normal human bronchial epithelial cells was mediated by treatment with recombinant cystatin A or SPINK5. Chronic MAA exposure induced epithelial disruption in mouse nasal epithelium and decreased the tissue expression and nasal lavage levels of cystatin A and SPINK5. Intranasal instillations of recombinant EPIs attenuated this MAA-induced pathology. Cystatin A and SPINK5 play an important role in protecting the airway epithelium from exogenous proteases. The preservation of EPIs may have a therapeutic benefit in intractable airway inflammation such as eosinophilic CRS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：プロテアーゼ サイトカイン 好酸球性副鼻腔炎 上皮細胞 内因性プロテアーゼインヒビター

1. 研究開始当初の背景

近年、気道の構成細胞、特に気道上皮細胞のアレルギー疾患における発症や増悪における役割が注目されてきている。気道上皮は外界に開かれており、様々な環境外来因子の侵入を防ぐための防御ラインとしての役割を果たしているとともに、様々なサイトカイン、ケモカインを産生し、免疫反応において重要な役割を担っている。好酸球炎症性疾患においては、起点としての役割を担っている。気道上皮細胞由来のTSLP、IL-25、IL-33はTh2サイトカイン依存的な免疫応答の調節や発達を行うサイトカインであり好酸球炎症性疾患の病態に関与していると推測されている。我々は今までに、気道上皮細胞におけるTSLP産生のメカニズム (Kouzaki H, et al, J Immunol 2009)、IL-33産生のメカニズム (Kouzaki H, et al, J Immunol 2011)、IL-25産生のメカニズム (Kouzaki H et al, Am J Respir Cell Mol Biol 2013)を調査し、抗原における作用部位、その作用部位に対する上皮細胞における受容体を特定してきた。

また、耳鼻咽喉科領域の難治性副鼻腔炎として知られる好酸球性副鼻腔炎の上皮細胞にこれらサイトカインの発現が高いことも分かっている。好酸球性副鼻腔炎発症の要因として真菌、黄色ブドウ球菌のスパーアンチゲン、環境因子に対する免疫反応の機能不全、バリア機能の破綻、自然免疫機能の破綻など挙げられており、いずれの説も上皮細胞による反応が起点となっている。そこで、サイトカイン放出や産生にどのような因子が必要か、抑制する因子としてどのような分子が必要か検討することが好酸球性副鼻腔炎をはじめとする好酸球炎症性疾患の病態の解明と治療戦略にも必要であると考えられる。

2. 研究の目的

鼻粘膜上皮細胞で産生されるサイトカインである TSLP, IL-25, IL-33 に注目し、好酸球性副鼻腔炎の病態における病因や制御因子について上皮細胞の役割を明らかにし、新たな治療法の可能性を検討することである。

3. 研究の方法

- 1) 手術時に採取した鼻茸、下鼻甲介粘膜を利用して、上皮細胞を培養し、様々な刺激 (TLR リガンド、各種抗原、プロテアーゼ [パパイン、トリプシン]、ブ

ドウ球菌由来プロテアーゼ)のもと TSLP, IL-25, IL-33 の産生について検討する。

- 2) 正常上皮細胞と比較して好酸球性副鼻腔炎の上皮細胞で様々な刺激での上皮由来サイトカイン産生についての変化を検討する。
- 3) 鼻粘膜上皮細胞を利用して、内因性プロテアーゼ阻害因子の発現について調査した。
- 4) 上皮由来サイトカイン産生に対する内因性プロテアーゼ阻害因子の影響を調べた。
- 5) 慢性好酸球性炎症のマウスモデルを利用して、鼻粘膜上皮の内因性プロテアーゼ阻害因子の産生・発現に及ぼす影響を調べた。
- 6) 慢性好酸球性炎症のマウスモデルを利用して、内因性プロテアーゼ阻害因子を点鼻投与し、好酸球性炎症制御の可能性について検討した。

4. 研究成果

- 1) 鼻粘膜上皮細胞では、各種抗原 (ダニ抗原、アルテナリア、ブドウ球菌由来プロテアーゼ) やプロテアーゼ (トリプシン、パパイン) の刺激で上皮由来サイトカイン産生 (TSLP, IL-25, IL-33) が誘導された。
- 2) 好酸球性副鼻腔炎由来の鼻茸上皮細胞では、非好酸球性副鼻腔炎や正常コントロールの上皮細胞と比べて、上皮由来サイトカイン産生が亢進していた。
- 3) 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸上皮では、非好酸球性副鼻腔炎や正常コントロールの上皮細胞と比べて、免疫染色では内因性プロテアーゼインヒビターである cystatin A と SPINK5 の発現が低下していた。また、mRNA、細胞内タンパクでもともに cystatin A, SPINK5 の発現の低下が認められた。
- 4) 正常気管上皮細胞における抗原刺激による TSLP, IL-25, IL-33 産生は recombinant Cystatin A, SPINK5 で抑制され、またセリン、システインプロテアーゼにそれぞれ特異的に抑制効果が認められた。siRNA でこれら内因性プロテアーゼインヒビターを欠損させる

と、逆に、抗原刺激による上皮由来サイトカイン産生は増強した。

5) 抗原複合物の1回点鼻では刺激後6時間で肺組織中の上皮由来サイトカイン産生の増加が認められた。また、抗原複合物点鼻4週後をピークとして、鼻洗浄液(NL)中の好酸球数が増加し、鼻粘膜組織(NT)中にIL-5、IL-13産生が認められた。血清IgE、NTのIL-33、NL中のVEGFは抗原複合物点鼻16週後まで増加がみられた。点鼻16週後には、鼻粘膜のポリープ様変化、同部位でのSPINK5、Cystatin Aの発現低下がみられ、NL中のCystatin A、SPINK5量も減少した。

6) 抗原複合物点鼻前に、recombinant Cystatin A、SPINK5の点鼻投与することで、鼻洗浄液(NL)中の好酸球数が減少し、鼻粘膜組織(NT)中にIL-5、IL-13産生の低下、血清IgE、NTのIL-33、NL中のVEGFの低下がみられた。点鼻16週後には、鼻粘膜のポリープ様変化も制御され、同部位でのSPINK5、Cystatin Aの発現低下もみられなかった。

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 6件)

- 1, Kouzaki H, Matsumoto K, Kikuoka H, Kato T, Tojima I, Shimizu S, Kita H, Shimizu T. Endogenous Protease Inhibitors in Airway Epithelial Cells Contribute to Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. Am J Respir Crit Care Med. 査読有り 195:737-747, 2017.
- 2, 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. 査読有り 31:13-18, 2017.
- 3, Kato T, Kouzaki H, Matsumoto K, Hosoi J, Shimizu T. The effect of calprotectin on TSLP and IL-25 production from airway

epithelial cells. Allergol Int. 査読有り 66: 281-289, 2016.

4, Tojima I, Kouzaki H, Shimizu S, Ogawa T, Arikata M, Kita H, Shimizu T. Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. Clin Immunol. 査読有り 170:1-8, 2016.

5, Shimizu S, Kouzaki H, Kato T, Tojima I, Shimizu T. HMGB1-TLR4 signaling contributes to the secretion of interleukin 6 and interleukin 8 by nasal epithelial cells. Am J Rhinol Allergy. 査読有り 30:167-72, 2016.

6, Kouzaki H, Matsumoto K, Kato T, Tojima I, Shimizu S, Shimizu T. Epithelial Cell-Derived Cytokines Contribute to the Pathophysiology of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. J Interferon Cytokine Res. 査読有り 36:169-79, 2016.

[学会発表](計 3件)

- 1, 神前英明、長期抗原刺激マウスにおける内因性プロテアーゼインヒビターの役割、日本アレルギー学会、2016年6月17日、東京
- 2, 神前英明、好酸球性副鼻腔炎における内因性プロテアーゼインヒビターの役割、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2016年2月5日、三重
- 3, 神前英明、好酸球性副鼻腔炎における内因性プロテアーゼインヒビターの役割、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2015年5月27日、東京

[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

神前 英明 (KOUZAKI HIDEAKI)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：10402710

(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

()