

氏 名	小 河 孝 夫
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 8 3 号
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 3 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	Heparin inhibits mucus hypersecretion in airway epithelial cells (へパリンは気道上皮の粘液過分泌を抑制する)
審 査 委 員	主査 教授 村 田 喜代史 副査 教授 後 藤 敏 副査 教授 辻 川 知 之

論文内容要旨

※整理番号	387	(ふりがな) 氏 名	おがわ たかお 小河 孝夫
学位論文題目	Heparin inhibits mucus hypersecretion in airway epithelial cells (ヘパリンは気道上皮の粘液過分泌を抑制する)		
<p style="text-align: center;">1. 背景・目的</p> <p>慢性副鼻腔炎, 特に好酸球性副鼻腔炎では凝固系が活性化され, 鼻汁中にトロンビンやフィブリンが多量に存在し, 鼻粘膜上皮細胞にはトロンビン受容体(PAR-1, protease-activated receptor-1)が発現している. 我々はトロンビンなどの凝固因子が, 鼻粘膜上皮細胞からの粘液産生や platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor 産生を介して, 鼻茸形成などの組織リモデリングに関わっていることを明らかにしてきた. 一方, ヘパリンは抗凝固薬として临床上広く使用されているが, 多くの生体内物質にヘパリン結合部位があり, 多彩な抗炎症作用を有していることが知られている. 下気道において, in vivo では, ヒツジ急性肺障害モデルで組織傷害を抑制したという報告や, ラット喘息モデルにおいて好酸球浸潤や MUC5AC の発現を抑制したという報告がある. さらに, 実際の臨床においても, ヘパリン吸入が喘息患者発作時の気管支収縮を抑制し, ステロイド抵抗性喘息患者にも奏功したという報告がある. 今回, 慢性副鼻腔炎, 特に好酸球性副鼻腔炎におけるヘパリンの局所療法の可能性を検討する目的で, 上気道炎症におけるヘパリンの抗炎症作用について in vivo, in vitro 両面から検討した.</p> <p style="text-align: center;">2. 方法</p> <p>In vivo でのラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルと, in vitro での培養上皮細胞における作用について検討した. ラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルは, LPS(lipopolysaccharide, 0.06-0.1mg/0.1ml)を3日間ラットに点鼻し, LPS 点鼻 30 分前に未分画ヘパリン(UFH, 100 IU/0.1ml), または低分子ヘパリン(LMWH, 1-100 IU/ml)を点鼻し, 生食点鼻群と比較した. 最終点鼻 24 時間後に検体を採取し, 鼻腔の冠状断切片を作成し, AB-PAS 染色後上皮内の粘液顆粒の占める面積を測定し, H-E 染色で上皮内に浸潤する好中球数も計測した. 培養上皮細胞での検討は, ヒト mucoepidermoid carcinoma の細胞株である NCI-H292 細胞を plastic dish 上で 24 時間培養し, TNF-α (10ng/ml) 刺激による粘液分泌と IL-8 分泌に対する未分画ヘパリン(0.01 IU/ml-10 IU/ml)と低分子ヘパリン(0.01 IU/ml -10 IU/ml)の影響を培養液を回収し検討した. また, 粘液分泌量はムチンのコア蛋白である MUC5AC に対する抗体を利用した ELISA 法で測定し, MUC5AC の mRNA の発現に対する影響は RT-PCR 法で測定した.</p>			

- (備考)1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

低分子ヘパリンは未分画ヘパリンと比較し、臨床上問題となる出血のリスクが少なく、また、半減期も長いので、局所療法として臨床応用しやすいと考えられ、両者について、その作用を検討した。

3. 結果

①ラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルにおけるヘパリンの作用

LPS の 3 日間投与により、ラット鼻粘膜上皮に著大な粘液産生・杯細胞化生と好中球浸潤が認められ、未分画ヘパリン(100 IU/0.1ml)点鼻により、これらの変化は有意に抑制された。低分子ヘパリン(1-100 IU/0.1ml)点鼻でも同程度の抑制効果を得た。

②培養上皮細胞における粘液分泌に対するヘパリンの作用

未分画ヘパリンは NCI-292 細胞からの TNF- α (10ng/ml)刺激による MUC5AC 産生、IL-8 産生を濃度依存性に抑制し、MUC5AC mRNA の発現も抑制した。低分子ヘパリンも未分画ヘパリンと同程度に、NCI-292 細胞からの TNF- α (10ng/ml)刺激による MUC5AC 産生、IL-8 産生を濃度依存性に抑制した。

4. 考察

ヘパリンの気道炎症に対する抗炎症作用については、急性肺障害や気管支喘息において、動物実験や小規模な臨床試験で報告されているが、多くが下気道炎症に対しての報告である。上気道である鼻腔に対するヘパリンの役割に関して、アレルギー性鼻炎に対する臨床試験の報告はあるが、動物鼻腔モデルにおける報告はなく、本検討は鼻粘膜における炎症性粘液過分泌に対するヘパリンの抑制作用を検討した初めての報告である。

ヘパリンが LPS 誘発粘液分泌を抑制する機序は十分わかっていないが、我々は、in vivo において未分画ヘパリン、低分子ヘパリン共に LPS 炎症による鼻中隔上皮への好中球浸潤を有意に抑制した。また、ヘパリンは陰性荷電しており、好中球エラスターゼを電荷的に中和するという報告がある。LPS による粘液分泌は部分的に好中球や好中球エラスターゼ依存性の反応であり、本実験において、in vivo での粘液分泌抑制効果は一部、好中球浸潤、好中球エラスターゼ阻害により発揮されたと考えられる。

気道上皮の粘液産生に対するヘパリンの直接作用を検討するため、われわれは気道上皮細胞株を使用し、in vitro での検討を行った。本研究において、UFH、LMWH ともに TNF- α 刺激による NCI-H292 細胞からの粘液産生を用量依存性に有意に抑制し、そして、UFH は MUC5AC mRNA 発現も有意に抑制した。これらの結果は in vivo におけるヘパリンの作用が気道上皮からの粘液産生を直接抑制したことを示している。

5. 結語

未分画ヘパリンは LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生と好中球浸潤を有意に抑制し、培養気道上皮細胞(NCI-H292 細胞)からの TNF- α 刺激による MU5AC 蛋白と MUC5AC mRNA、および IL-8 産生を濃度依存性に抑制した。低分子ヘパリンも LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生と好中球浸潤を濃度依存性に抑制し、培養気道上皮細胞(NCI-H292 細胞)からの、TNF- α 刺激による MU5AC 蛋白、IL-8 産生を濃度依存性に抑制した。低分子ヘパリンのこうした抑制作用は未分画ヘパリンとほぼ同等であった。以上の結果より、ヘパリンには抗凝固作用とともに、気道上皮細胞からの粘液産生や IL-8 産生を抑制して、鼻粘膜上皮の杯細胞化生や好中球浸潤を抑制する抗炎症作用があり、好酸球性副鼻腔炎をはじめとする難治性疾患に対する新たな局所治療薬としての可能性が考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	387	氏名	小河 孝夫
論文審査委員			
<p>（学位論文審査の結果の要旨）（明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。）</p> <p>慢性気道炎症における過剰な粘液分泌は炎症の慢性化・遷延化の要因となり、治療にはこうした病的な粘液分泌による炎症の悪循環を制御することが重要である。一方で、凝固因子であるトロンビンが気道炎症の病態形成に関わっていることが明らかになってきている。本研究は抗凝固因子であるヘパリンの作用を、in vivo ではエンドトキシンである LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルを使用し、in vitro ではヒト気道上皮細胞からの粘液分泌、IL-8 産生に対して検討し、以下の点を明らかにした。</p> <p>1) 未分画ヘパリンは LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生と好中球浸潤を有意に抑制し、培養気道上皮細胞からの TNF-α 刺激による MU5AC 蛋白と MUC5AC mRNA、および IL-8 産生を濃度依存性に抑制した。</p> <p>2) 低分子ヘパリンも LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生と好中球浸潤を濃度依存性に抑制し、培養気道上皮細胞からの TNF-α 刺激による MU5AC 蛋白、IL-8 産生を濃度依存性に抑制した。</p> <p>以上のように本論文は、ヘパリンの気道上皮に対する粘液過分泌抑制作用について明らかにし、臨床における難治性上気道炎症の新たな治療法の開発に進展することが期待されるものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士（医学）の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">（総字数 573 字）</p> <p style="text-align: right;">（平成 23 年 9 月 9 日）</p>			