

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592509

研究課題名(和文)好酸球と鼻粘膜構成細胞の相互作用からみた好酸球性鼻副鼻腔炎の病態と新治療法の開発

研究課題名(英文) Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性鼻副鼻腔炎の組織リモデリングにおける好酸球の役割を検討した。好酸球と上皮細胞の共培養により、MUC5ACムチンとPDGF、VEGF、TGF-beta、IL-8の分泌が、加えた好酸球数に依存して著しく増加し、好酸球と上皮細胞の相互作用が粘液産生やサイトカイン産生を引き起こすと考えられた。こうした共培養による粘液・サイトカイン分泌は、EGF受容体阻害薬で抑制され、EGF受容体のリガンドであるamphiregulinやTGF-alphaの中和抗体やmetalloprotease阻害薬でも抑制されたことから、EGF受容体のtransactivationを介していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of eosinophils in tissue remodeling of chronic rhinosinusitis, eosinophil-epithelial interactions were examined by the co-culture of airway epithelial (NCI-H292) cells with the eosinophilic cell line EoL-1 or with human blood eosinophils. Eosinophil-epithelial interactions stimulated the secretion of MUC5AC, PDGF, VEGF, TGF-beta and IL-8 in culture supernatants. The EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibited the co-culture-induced secretion of MUC5AC, PDGF, VEGF, and IL-8. Neutralizing antibodies directed against TGF-alpha or amphiregulin and pan-metalloprotease inhibitor GM6001 inhibited the co-culture-induced secretion of MUC5AC and amphiregulin from the co-cultured NCI-H292 cells. These results indicate that eosinophil-epithelial interactions stimulate tissue remodeling induced by MUC5AC mucin, PDGF and VEGF, probably mediated by metalloprotease-dependent EGFR transactivation via amphiregulin and TGF-alpha released from the epithelial cells.

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 鼻副鼻腔炎 粘液産生 鼻茸 上皮細胞 組織リモデリング EGF受容体 MUC5AC

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。

これまでに好酸球性鼻副鼻腔炎症例では、臨床検体を利用した検討から、組織中に好酸球の遊走や活性化に關与する IL-5 や Eotaxin、RANTES が増加し、好酸球性炎症の結果として好酸球由来酵素である ECP や MBP、そのほかシステニルロイコトリエンなどが増加することが報告されている。しかし、いずれの報告も好酸球浸潤に伴う現象を追認しているだけで、好酸球が実際の炎症病態でどのような役割を果たしているかについては不明のままである。

病態の解明のためには、好酸球と鼻粘膜構成細胞との間の相互作用を解明することが重要であり、本研究では好酸球と上皮細胞を共培養する独創的な手法で、好酸球性鼻副鼻腔炎における好酸球の役割を明らかにしようとするものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、好酸球性鼻副鼻腔炎などの難治性上気道好酸球性炎症において、鼻茸形成やニカワ状分泌液産生などの組織リモデリングにおける好酸球の役割を、共培養法を利用して鼻粘膜構成細胞との相互作用の面から明らかにし、この相互作用を新たなターゲットとして、ステロイド以外に適切な薬物療法がない難治性疾患に対する新たな治療手段を開発することにある。

3. 研究の方法

ヒト mucoepidermoid carcinoma の上皮細胞株 NCI-H292 細胞とヒト好酸球性細胞株 EoL-1 細胞を 24 時間共培養し、分泌型 gel-forming ムチンである MUC5AC と VEGF、PDGF-AB、TGF-beta1、IL-8 などのサイトカインの産生と、それぞれの細胞における mRNA の発現について、ELISA 法とリアルタイム PCR 法で検討した。また、共培養によって著明に亢進したムチン産生の機序について、MUC5AC の発現調節に關わることが知られている EGF 受容体とそのリガンドの役割を中心に検討した。さらに、ヒト末梢血から分離した好酸球を用いて、NCI-H292 細胞との相互作用について検討した。

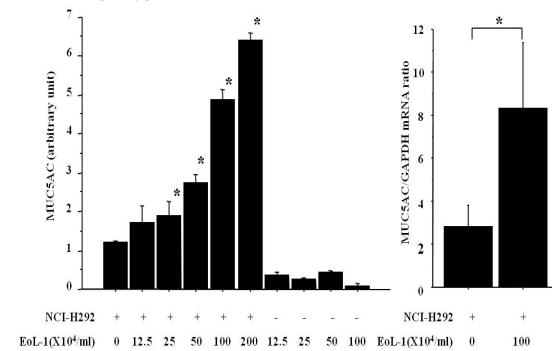
4. 研究成果

好酸球と気道上皮細胞の相互作用による粘液・サイトカイン分泌について、共培養法を利用して明らかにし、その機序についてさらに検討した。

(1) NCI-H292 細胞と EoL-1 細胞の共培養の

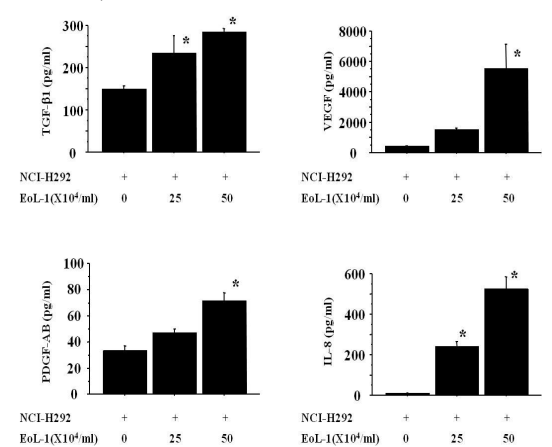
上清中には添加した EoL-1 細胞の細胞数に依存して MUC5AC ムチンの産生が増加し、上皮細胞における MUC5AC mRNA の発現も有意に亢進した(図1)。

図1 共培養による MUC5AC 産生と MUC5AC mRNA の発現



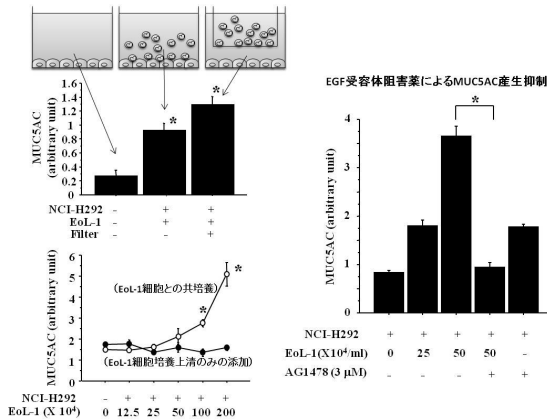
(2) 共培養の上清中には添加した EoL-1 細胞の細胞数に依存して profibrotic cytokine である VEGF、PDGF-AB、TGF-beta と好中球遊走因子である IL-8 濃度の上昇を認めた(図2)。

図2 共培養による VEGF、PDGF-AB、TGF-beta、IL-8 の産生



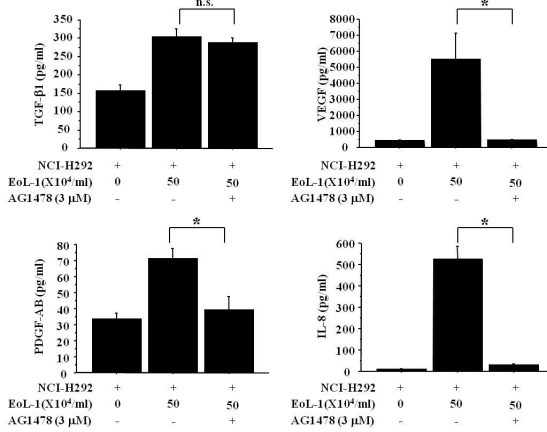
(3) 共培養による MUC5AC ムチン産生機序について検討した。共培養によるムチン産生は、フィルターにより上皮細胞と EoL-1 細胞の接着を阻害しても促進されたが、上皮細胞に EoL-1 細胞単独の培養上清を添加したのでは促進されなかった。このことから、共培養によるムチン産生には細胞接着に頼らない細胞間相互作用が関わっていると考えられた(図3)。次に、ムチン産生刺激作用を有する IL-1beta、TNF-alpha、IL-13 の役割について検討したが、共培養の上清でのこうしたサイトカイン産生は認められず、それぞれの中和抗体の投与でも共培養によるムチン産生は抑制されなかった。一方、EGF 受容体阻害薬 AG1478 は共培養によるムチン産生を有意に抑制した。このことから、共培養によるムチン産生には EGF 受容体が関与していると考えられた(図3)。

図3 MUC5AC 産生に対する作用(フィルターによる細胞接着阻害作用、EoL-1 単独培養上清の作用、EGF 受容体阻害薬の作用)



(4) EGF 受容体阻害薬 AG1478 は、共培養による VEGF、PDGF-AB、IL-8 の産生も有意に抑制したが、TGF-beta 産生には影響を与えなかった(図4)。このことから、共培養による VEGF、PDGF-AB、IL-8 産生にも EGF 受容体が関与しているが、TGF-beta 産生は異なる機序で生じていると考えられた。

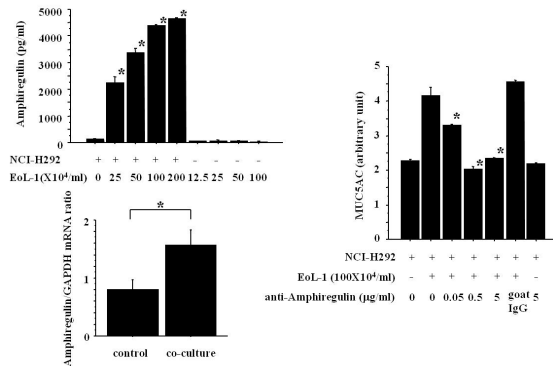
図4 共培養による VEGF、PDGF-AB、IL-8、TGF-beta 産生に対する EGF 受容体阻害薬 AG1478 の効果



(5) そこで、共培養による MUC5AC ムチン産生について、EGF 受容体の transactivation が関わっている可能性を考え、EGF 受容体のリガンドである、amphiregulin の関わりについて検討した。

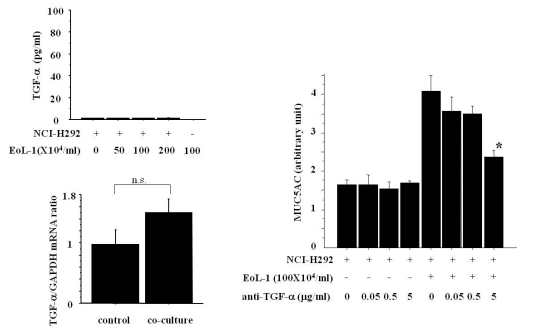
共培養により培養上清中の amphiregulin 濃度は、加えた EoL-1 細胞の数に依存して増加し、上皮細胞における amphiregulin mRNA の発現も有意に増強した。さらに、amphiregulin の中和抗体は、共培養による MUC5AC ムチン産生を濃度依存性に抑制した(図5)。このことから、共培養による EGF 受容体の transactivation に amphiregulin が関わっていると考えられた。

図5 共培養による MUC5AC ムチン産生における amphiregulin の関与(上清中の amphiregulin 濃度、amphiregulin mRNA の発現、amphiregulin 中和抗体の作用)



(6) 次に、EGF 受容体のリガンドである TGF-alpha についても検討した。共培養により培養上清中には TGF-alpha は検出されなかったが、上皮細胞における TGF-alpha mRNA の発現は有意に増強し、TGF-alpha の中和抗体は、共培養による MUC5AC ムチン産生を濃度依存性に抑制した(図6)。このことから、共培養による EGF 受容体の transactivation に膜結合型の TGF-alpha が関わっていることが考えられた。

図6 共培養による MUC5AC ムチン産生における TGF-alpha の関与(上清中の TGF-alpha 濃度、TGF-alpha mRNA の発現、TGF-alpha 中和抗体の作用)

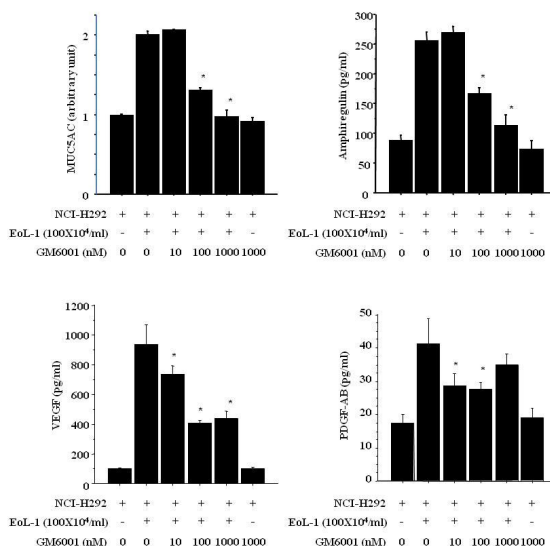


(7) EGF 受容体の transactivation は、細胞膜に結合した metalloprotease (a disintegrin and metalloprotease, ADAM) が膜に結合している EGF 受容体リガンドの amphiregulin、TGF-alpha を切断して、これらが EGF 受容体に結合して生じると考えられる。そこで Pan-metalloprotease 阻害薬の GM6001 を加えたところ、共培養による Muc5AC ムチン産生、amphiregulin、VEGF、PDGF-AB 産生はいずれも有意に抑制された(図7)。したがって、ADAM の活性化による膜結合型 EGF リガンドの切断が、共培養による EGF 受容体の transactivation に関わっていると考えられた。

しかし、共培養によってどのようにして ADAM の活性化が生じるのかについては、今後の

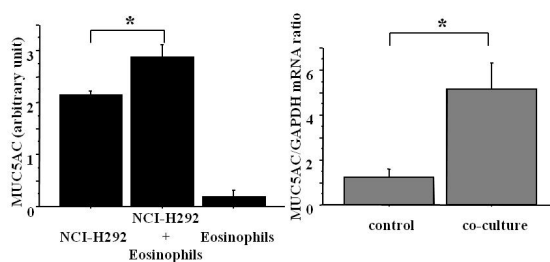
検討課題である。

図7 共培養における MUC5AC ムチン産生、amphiregulin、VEGF、PDGF-AB 産生に対する Pan-metalloprotease 阻害薬 GM6001 の抑制作用



(8)最後に、正常人の末梢血から分離した好酸球を気道上皮細胞 (NCI-H292) と共培養して、MUC5AC 産生と MUC5AC mRNA 発現への影響を検討した。末梢血好酸球は気道上皮細胞との共培養により、上皮細胞からの MUC5AC 産生と MUC5AC mRNA 発現が有意に亢進した (図8)。

図8 末梢血から分離した好酸球と気道上皮細胞 (NCI-H292) の共培養による MUC5AC 産生と MUC5AC mRNA 発現への影響



以上の結果から、上皮細胞と好酸球の相互作用により、MUC5AC ムチンや profibrotic cytokine である VEGF、PDGF-AB、TGF-beta と好中球遊走因子である IL-8 の産生が著しく促進され、粘液産生や炎症の増悪が生じるとともに、VEGF、PDGF-AB、TGF-beta の作用により鼻茸形成などの組織リモデリングが引き起こされると考えられた。

この機序に上皮細胞における EGF 受容体の transactivation が関わっており、EGF 受容体をターゲットとした新たな治療手段の開発が期待できる。

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 2 件)

Shimizu S, Kouzaki H, Ogawa T, Takezaka K, Tojima I, Shimizu T: Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy* 28:103-109,2014 査読有
清水猛史: 好酸球性副鼻腔炎の疑問 - ニカワ様鼻汁の本態は何か? 好酸球は何をしているのか? - *耳鼻臨床* 105: 803-812,2012 査読無

[学会発表](計 7 件)

Shimizu T, Shimizu S: Symposium, Up-to-date Research in CRS: Role of eosinophils in tissue remodeling of chronic rhinosinusitis. 16th Asian Research Symposium in Rhinology 2013年8月29-31日 (Tokyo)
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. International Symposium on Recent Advances in Rhinosinusitis and Nasal Polyposis 2013年10月4-6日 (Matsue)
Shimizu T, Shimizu S: Role of eosinophils in tissue remodeling of chronic rhinosinusitis. The 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2013年12月5-7日 (Taipei)
清水志乃, 神前英明, 清水猛史: 気道上皮細胞と好酸球の相互作用による粘液・サイトカイン分泌. 第30回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2012年2月16-18日 (大津市)
清水志乃, 神前英明, 清水猛史: 粘液・サイトカイン分泌における好酸球と上皮細胞の相互作用. 第31回気道分泌研究会 2012年4月7日 (東京)
Shimizu S, Kouzaki H, Shimizu T: Eosinophil-epithelial cell interaction enhances mucin production and tissue remodeling. The 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery 2012年4月12-14日 (Kyoto)
清水志乃, 清水猛史: 粘液・サイトカイン分泌における好酸球と上皮細胞の相互作用. アレルギー・好酸球研究会 2012年6月23日 (東京)

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

(2)研究分担者

清水 志乃 (SHIMIZU SHINO)
滋賀医科大学・医学部・医員
研究者番号：50505592

(2)研究分担者

小河 孝夫 (OGAWA TAKAO)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90549908

(2)研究分担者

戸嶋 一郎 (TOJIMA ICHIRO)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80567347