

## 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

小河 孝夫<sup>1</sup>, 清水 志乃<sup>1</sup>, 戸嶋 一郎<sup>1</sup>, 神前 英明<sup>1</sup>, 清水 猛史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>滋賀医科大学耳鼻咽喉科学教室

近年、好酸球性副鼻腔炎などの難治性上気道炎症の病態形成に凝固線溶系が深く関与していることが明らかになり、凝固線溶因子を標的とした治療法の開発が注目されている。一方、ヘパリンは抗凝固作用を有し、臨床でも血栓症治療などに古くから使用されてきたが、同時に抗炎症作用も有することが知られている。ヘパリンは陰性荷電とその特異な分子構造により炎症過程における多くの生理活性物質と結合することが作用機序として考えられている。実際の臨床においても、気管支喘息、炎症性腸疾患、熱傷などで有効性が報告され、様々な疾患モデル動物においてもヘパリンの抗炎症作用が報告されているが、鼻副鼻腔疾患に対する検討はほとんどない。筆者らはヘパリンの持つ抗凝固作用と抗炎症作用の両者に期待して、難治性上気道炎症に対する治療薬としての可能性を検討している。

ラット鼻粘膜炎症モデルを使用した未分画ヘパリンや低分子ヘパリンの点鼻投与の検討では、LPS 刺激やアレルギー性炎症により生じたラット鼻粘膜の杯細胞化生や粘液分泌、炎症細胞浸潤はヘパリン投与により有意に抑制された。培養気道上皮細胞を用いた検討でも、TNF- $\alpha$  刺激や好酸球性細胞株との共培養によるムチンや IL-8 分泌を有意に抑制した。これらの結果より、ヘパリンは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などの難治性上気道炎に対する新たな局所治療薬としての可能性が期待できる。

キーワード：ヘパリン，鼻，抗炎症作用，上気道炎症，粘液分泌

略語：Mac-1, macrophage-1 antigen; VLA-4, very late antigen-4; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1; MBP, major basic protein; ECP, eosinophil cationic protein; IP3, Inositol triphosphate; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; EPCR, endothelial cell protein C receptor; PDGF, platelet-derived growth factor; LPS, lipopolysaccharide; OVA, ovalbumin; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor; UFH, unfractionated heparin; LMWH, low molecular weight heparin

### はじめに

ヘパリンは生体内では結合組織型肥満細胞の分泌顆粒のみ存在しており、グルクロン酸とグルコサミンの2糖単位の繰り返し構造より成るグリコサミノグリカンの1種である。それぞれの糖鎖に硫酸基が結合するため、強い陰性荷電と比較的複雑な分子構造を持つ。サイトカイン、ケモカイン、成長因子などの多数の生理活性物質にはヘパリン結合部位があり、ヘパリンが結合することによりその活性を調節している可能性がある<sup>1)</sup>。ヘパリンは現在臨床で、抗凝固薬として静脈血栓症や肺塞栓症予防、急性心筋梗塞における動脈塞栓管理などに広く使用されているが、これ

はヘパリンが血液凝固系の調節因子であるアンチトロンビンに結合し相互作用する性質を利用したものである。近年、抗凝固作用以外にヘパリンの持つ抗炎症作用が注目されており、気道炎症においても特に喘息などの下気道炎症に対するヘパリンの有用性が多く報告されている<sup>2-4)</sup>。本稿では、初めに気道炎症に対するヘパリンの抗炎症作用について概説した後、筆者らが最近注目している好酸球性副鼻腔炎などの難治性上気道炎症における新たな局所治療薬としての可能性について紹介したい。

### ヘパリンの抗炎症作用

ヘパリンの抗炎症作用についての研究報告は多く、ヘパリンは炎症反応に重要な役割を担う蛋白質の多くと結合することで炎症を調節している可能性が考えられている<sup>1,5)</sup> (表1)。急性炎症では、血液中に循環する白血球が rolling, firm adhesion, transmigration の過程を経て組織内に浸潤し、組織傷害性蛋白を放出して血管や組織に傷害を与えるが、

2011年8月1日受稿  
別冊請求先：小河孝夫  
〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町  
滋賀医科大学耳鼻咽喉科  
TEL: 077-548-2261, FAX: 077-548-2783  
E-mail: takao971@belle.shiga-med.ac.jp

表1 ヘパリン結合蛋白

接着分子	MAC-1, P-セレクチン, L-セレクチンなど
ケモカイン	RANTES, IL-8, MIP1, MCP1, Eotaxin, PF4 など
成長因子	PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ , FGF2 など
酵素	Heparanase, MMPs, Elastase, Cathepsin など
細胞傷害性メディエーター	ECP, MBP など

文献 1) より改変して引用

この過程で重要な役割を持つ細胞接着因子のうち Rolling に関与する P-セレクチン, L-セレクチン<sup>6,7)</sup>, firm adhesion に関与する Mac-1<sup>8)</sup>, VLA-4<sup>9)</sup>, さらに transmigration に関与する PECAM-1<sup>10)</sup> にヘパリンが直接結合し, 白血球の血管接着や組織浸潤を阻害することが報告されている。また, ヘパリンには, 多数の硫酸基が結合しており, その高い陰性荷電によって陽性荷電を有する組織傷害性蛋白である MBP<sup>1)</sup>, ECP<sup>11)</sup>, 好中球エラスターゼ<sup>12)</sup>, 活性酸素<sup>13)</sup> などを中和し組織傷害を軽減する。アレルギー性炎症における肥満細胞からのヒスタミン遊離には, 細胞内カルシウム貯蔵部位におけるイノシトール三リン酸 (IP3) 受容体の活性化が重要な役割を果たしているが, ヘパリンは IP3 受容体拮抗作用を介して, ヒスタミン遊離を抑制する事も知られている<sup>14)</sup>。さらに, NF- $\kappa$ B は炎症性サイトカインや接着分子遺伝子の転写に関わっているが, ヘパリンは *in vitro* において血管内皮細胞<sup>15)</sup> や T 細胞<sup>16)</sup> における NF- $\kappa$ B 転写を阻害し, *in vivo* ではラットの虚血再灌流モデルにおいて NF- $\kappa$ B 活性を阻害することが報告<sup>17)</sup> されている。ヘパリンは容易に血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞, 心筋細胞などの細胞質内に吸収されることが知られており, 細胞質内に吸収されたヘパリンが NF- $\kappa$ B を阻害し, 分子レベルで炎症を制御している可能性が考えられる<sup>5)</sup>。

### 気道炎症に対するヘパリンの臨床試験

ヘパリンは気管支喘息, 炎症性腸疾患, 熱傷, 間質性膀胱炎, 慢性関節リウマチなど様々な炎症性疾患において既に臨床上的有用性が報告され<sup>1)</sup>, 出血などの重大な副作用はどの臨床試験においてもみられていない。気道炎症においては, 気管支喘息患者における抗原誘発後の気管支平滑筋収縮が, 未分画ヘパリン吸入により抑制されること<sup>4)</sup> や, 運動刺激<sup>3)</sup> やメサコリン刺激で誘発される気道過敏性が, 未分画ヘパリン吸入により抑制される<sup>18)</sup> ことが臨床試験で示されている。しかし, いずれの研究もヘパリンは誘発前に投与されていること, 投与量が比較的多いこと, 10 人程度の小規模試験であるという問題点がある。その他に, ステロイド治療に抵抗する気管支喘息患者の発作時にヘパリン吸入が奏功したとする 2 症例の報告がある<sup>19)</sup>。上気道においてはアレルギー性鼻炎患者に対する臨床試験が報告されている。Zeng ら<sup>20)</sup> はアレルギー性鼻炎患者にアデノシン一リン酸で誘発試験を行い, 未分画ヘパリンの誘発前

吸入投与により鼻汁中に放出されるヒスタミン, トリプターゼが減少し, くしゃみの回数が抑制されたと報告し, Vancheri ら<sup>21)</sup> はアレルギー性鼻炎患者に対して抗原誘発試験を行い, 未分画ヘパリンの噴霧投与により, 抗原誘発後の鼻汁好酸球数や ECP 濃度, 症状スコアが抑制されたと報告している。本邦においても, 好酸球性中耳炎に対するヘパリン局所療法の有用性が報告されており<sup>22)</sup>, allergic fungal sinusitis の術後にヘパリン鼻洗浄が有効であったという症例報告<sup>23)</sup> もある。しかし一方で, 春名らは好酸球性副鼻腔炎患者 22 例に対して, 術後のヘパリン鼻洗浄の効果を比較検討し, 中鼻道表層粘膜の ECP 濃度は減少したものの, 有意な臨床効果は得られなかったと報告している<sup>24)</sup>。

### 凝固線溶系因子と気道炎症

トロンビンをはじめとする血液凝固因子には多彩な生理作用があり, 気道炎症の病態形成に直接関わっていることが近年明らかになってきた<sup>25-27)</sup>。筆者らはアレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎患者, 特に好酸球性副鼻腔炎患者の鼻汁中には高濃度のトロンビンやトロンビン-アンチトロンビン複合体が存在し, 鼻粘膜上皮細胞にトロンビン受容体が発現していることを報告した<sup>28)</sup>。また, トロンビンが気道上皮細胞からの PDGF や VEGF 産生, ムチン産生などを介して, PDGF による線維芽細胞の増殖・細胞外マトリックスの産生, VEGF による血管新生・血管透過性の亢進などを促して杯細胞化生や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培養細胞や動物モデルを利用して明らかにしてきた<sup>29)</sup>。さらに, 抗凝固因子である活性化プロテイン C に抗炎症作用があり, *in vitro* では鼻粘膜上皮細胞の EPCR 受容体を介して PDGF, IL-8 などのサイトカイン産生やムチン産生を抑制すること, *in vivo* でもブレオマイシン刺激によるマウスの肺線維症を抑制し<sup>30)</sup>, トロンビン刺激によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生や粘液産生を抑制することを報告した<sup>29)</sup>。このように鼻副鼻腔炎においても凝固線溶系が活性化されていて, トロンビンなどの凝固・抗凝固因子が好酸球性副鼻腔炎や好酸球性中耳炎といった難治性上気道炎の病態形成において重要であると考えられる。そこで, 筆者らはトロンビン拮抗作用のあるヘパリンに注目し, 上気道炎症に対するヘパリンの作用をラット鼻粘膜の炎症モデルと培養気道上皮細胞を用いて検討した<sup>31)</sup>。

ラット鼻粘膜炎症モデルにおける  
ヘパリンの抗炎症作用

気管支喘息に対するヘパリンの有効性はラット<sup>32)</sup>, モルモット<sup>33-35)</sup>, ラビット<sup>36)</sup>, ヒツジ<sup>14,37)</sup> など様々な動物モデルで検討され, PAF 刺激や抗原誘発による気管支収縮反応の抑制<sup>14,36,37)</sup>, 気管支洗浄液および組織内への好酸球浸潤の抑制<sup>36,37)</sup>, 粘液分泌<sup>33)</sup> やムチンのコア蛋白である Muc5ac の mRNA 発現抑制<sup>32)</sup> などの作用が報告されている。さらに, 分子量の異なるヘパリンの比較検討により, 超低分子ヘパリン (分子量 2355) により高い気道過敏性抑制効果を認めたという報告<sup>37,38)</sup> や, 従来のヘパリンから抗凝固能を除去した脱硫酸化ヘパリンにおいても同様に好酸球浸潤や気管支収縮反応を抑制したことから, ヘパリンの抗炎症

作用には抗凝固能とは独立した機序が関与しているとする報告がある<sup>35,39)</sup>。しかし, これまで鼻腔の炎症モデルにおけるヘパリンの作用を検討した報告はない。筆者らは LPS 刺激やアレルギー性炎症によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生や粘液産生と, 好中球・好酸球浸潤について検討した。

LPS 刺激によるラット鼻粘膜の炎症モデルは LPS (0.06 mg/0.1 ml) を 3 日間点鼻して作成した<sup>40)</sup>。LPS 点鼻 30 分前に未分画ヘパリン (UFH, 100 IU/0.1 ml), または低分子ヘパリン (LMWH, 1-100 IU/ml) を点鼻し, ヘパリンの作用を組織学的に検討した。LPS 点鼻投与によりラット鼻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が, 未分画ヘパリンや低分子ヘパリンの点鼻投与は, こうした杯細胞化生と粘液産生, 好中球浸潤を濃度依存性に有意に抑制した<sup>31)</sup> (図 1, 2)。低分子ヘパリンは未

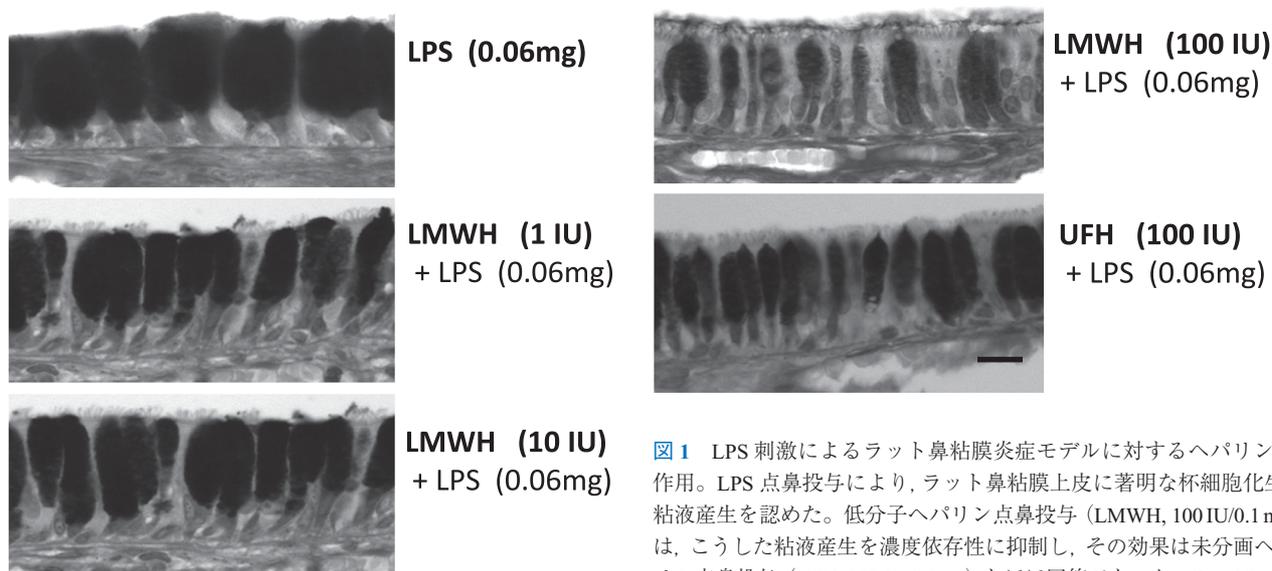


図 1 LPS 刺激によるラット鼻粘膜炎症モデルに対するヘパリンの作用。LPS 点鼻投与により, ラット鼻粘膜上皮に著明な杯細胞化生, 粘液産生を認めた。低分子ヘパリン点鼻投与 (LMWH, 100 IU/0.1 ml) は, こうした粘液産生を濃度依存性に抑制し, その効果は未分画ヘパリン点鼻投与 (UFH, 100 IU/0.1 ml) とほぼ同等であった。Bar=10 μm。

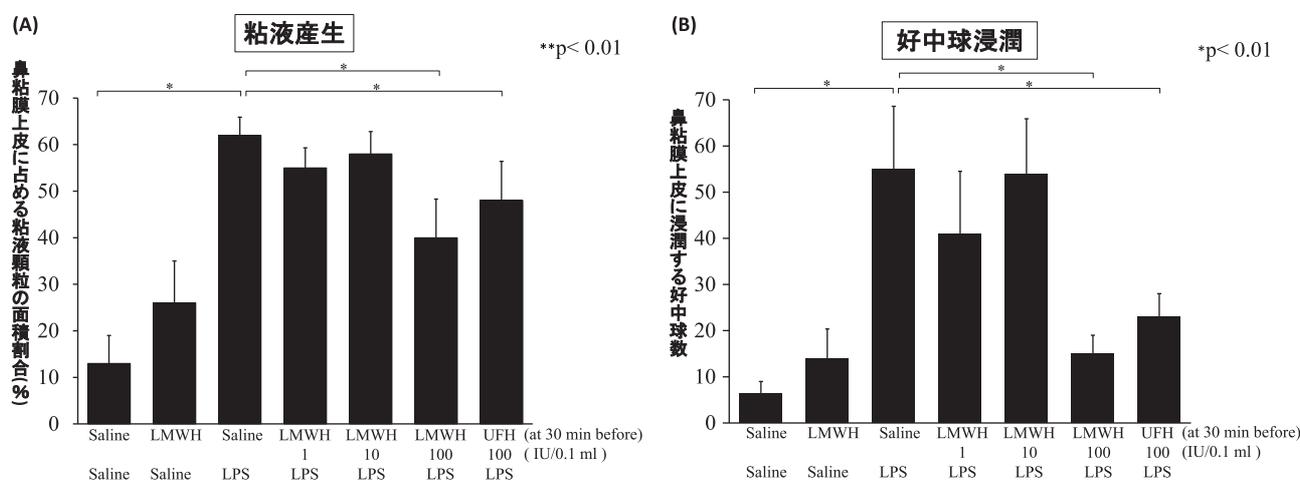


図 2 LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生と好中球浸潤に対するヘパリンの作用。低分子ヘパリン (LMWH, 1-100 IU/0.1 ml) は, LPS 刺激による粘液産生や好中球浸潤を有意に抑制し, こうした作用は未分画ヘパリン (UFH, 100 IU/0.1 ml) とほぼ同等であった。

分画ヘパリンに比べて高価であるが、血漿蛋白や内皮細胞との結合や血小板との相互作用が少ないため、半減期が長く、出血などの副作用も少なく臨床応用しやすい利点がある。今回の検討では低分子ヘパリンと未分画ヘパリンはほぼ同等の作用が認められた。

アレルギー性炎症のラット鼻粘膜モデルは、卵白アルブミン (OVA; 200 µg/0.5 ml) と水酸化アルミニウムゲル (Alum; 5 mg/0.5 ml) を腹腔内感作させた後、OVA (10 mg/0.1 ml) を3日間ラットに点鼻して作成した<sup>4)</sup>。OVA 点鼻により、ラット鼻粘膜上皮に著明な杯細胞化生と粘液産生が認められ、鼻粘膜に著明な好中球・好酸球浸潤が観察される。低分子ヘパリン (1-100 IU/0.1 ml) の点鼻投与により、こうした鼻粘膜への好中球・好酸球浸潤は濃度依存性に抑制されたが、杯細胞化生や粘液産生は抑制されなかった。そこで、より高濃度である低分子ヘパリン (1000 IU/0.1 ml) を

点鼻投与したところ、OVA 刺激によるラット鼻粘膜の杯細胞化生、粘液産生、好酸球・好中球浸潤はいずれも有意に抑制された。

### 培養気道上皮細胞におけるヘパリンの作用

筆者らは、培養気道上皮細胞に対するヘパリンの直接作用を、ヒト mucoepidermoid carcinoma の細胞株である NCI-H292 細胞を用いて検討した。TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激により NCI-H292 細胞から IL-8 産生やムチン分泌、MUC5AC mRNA の発現亢進が認められるが、未分画ヘパリンは NCI-H292 細胞からの、IL-8 産生やムチン分泌を濃度依存性に抑制し、MUC5AC mRNA の発現も抑制した (図 3)。低分子ヘパリンも同様に NCI-H292 細胞からの TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激による IL-8 産生、ムチン分泌を濃度依存

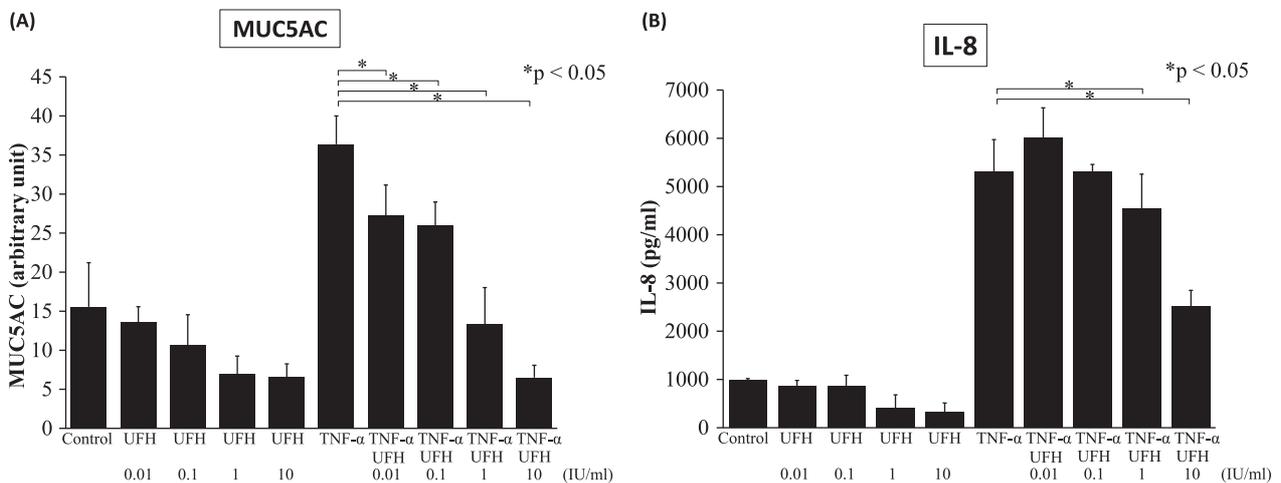


図 3 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激による NCI-H292 細胞からの IL-8 産生やムチン分泌に対する未分画ヘパリンの作用。未分画ヘパリン (UFH) は濃度依存性に NCI-H292 細胞からの IL-8・MUC5AC 分泌を抑制した。

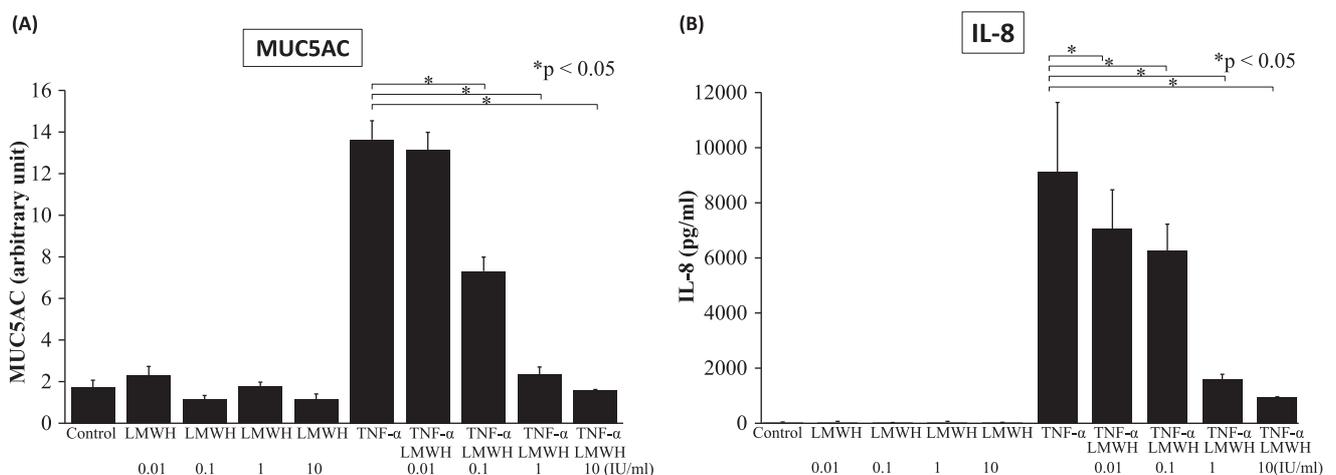


図 4 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激による NCI-H292 細胞からの IL-8 産生やムチン分泌に対する低分子ヘパリンの作用。低分子ヘパリン (LMWH) は濃度依存性に NCI-H292 細胞からの IL-8・MUC5AC 分泌を抑制した。

性に抑制した (図4)。これらの結果は *in vivo* におけるヘパリンの作用に、気道上皮からの IL-8 産生抑制や粘液産生抑制を介した機序が関わっていることを示している。

さらに、筆者らは、気道上皮細胞と好酸球の相互作用を検討する目的で、ヒト mucoepidermoid carcinoma の細胞株である NCI-H292 細胞とヒト好酸球由来の細胞株である EoL-1 細胞を共培養し、ムチン (MUC5AC, MUC5B) 分泌やサイトカイン (PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ , IL-8) 産生が、添加した EoL-1 細胞の数に依存して著明に増加した。これらの結果より、好酸球性副鼻腔炎や好酸球性中耳炎の病態形成には、好酸球と上皮細胞の相互作用による炎症の増悪が関わっていると考えられる。筆者らは、低分子ヘパリン (0.1–10 IU/ml) により、こうした気道上皮細胞と好酸球の相互作用によるムチン分泌やサイトカイン産生が有意に抑制される事を確認しており、難治性上気道炎症である好酸球性副鼻腔炎・中耳炎の制御に役立つと考えられる。

### 難治性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

いわゆる好酸球性副鼻腔炎は難治性で再発傾向の強い多発性の鼻茸形成に加えて、極めて粘稠なニカワ様鼻汁が特徴的である。筆者らは以前から、フィブリン形成などの凝固系の活性化がニカワ様鼻汁の本態であり、凝固系因子が粘液産生や鼻茸形成などの組織リモデリングに深く関わっている事を報告してきた<sup>25,27)</sup>。実際に好酸球性副鼻腔炎のニカワ様鼻汁の凍結切片を作成して免疫染色を行うと多数の好酸球やムチンのコア蛋白である MUC5AC の存在とともにフィブリン・フィブリノーゲンが豊富に認められる。

近年、トロンピンをはじめとする凝固線溶系因子に、血液凝固や止血血栓の形成以外に多様な生理作用があり、様々な組織の恒常性維持や多くの疾患の病態形成に関わっている事がわかってきた。このように、気道炎症における凝固線溶系因子の新たな役割が明らかになるとともに、凝固線溶系をターゲットとした新たな治療戦略の可能性が検討されている。抗凝固因子であるヘパリンは、多彩な抗炎症作用を有しており、前述したように、*in vitro* での気道上皮細胞からの粘液産生・IL-8 産生抑制作用や、*in vivo* でのラット鼻粘膜上皮の粘液産生や好中球・好酸球浸潤抑制作用があり、気道炎症の組織リモデリングを抑制すると考えられる。

好酸球性副鼻腔炎・中耳炎などの難治性上気道炎症では、ステロイド以外に有効な薬物療法が確立されていないのが現状であり、新たな治療手段の開発が期待されている。鼻副鼻腔や中耳腔は点鼻・点耳などにより容易に高濃度の薬剤を局所投与することが可能であり、ヘパリンの点鼻・点耳はこうした難治性上気道炎症に対する新たな局所療法になりうる可能性がある。

### 文 献

- 1) Lever R, Page CP. Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1(2): 140–8.
- 2) Diamant Z, Timmers MC, et al. Effect of inhaled heparin on allergen-induced early and late asthmatic responses in patients with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153(6): 1790–5.
- 3) Ahmed T, Garrigo J, et al. Preventing bronchoconstriction in exercise-induced asthma with inhaled heparin. *N Eng J Med.* 1993; 329: 90–95.
- 4) Bowler SD, Smith SM, et al. Heparin inhibits the immediate response to antigen in the skin and lungs of allergic subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 147(1): 160–3.
- 5) Young E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. *Thrombosis Research.* 2008; 122: 743–52.
- 6) Nelson RM, Cecconi O, et al. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood.* 1993; 82: 3253–58.
- 7) Koenig A, Norgard-Sumnicht K, et al. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest.* 1998; 101: 877–89.
- 8) Diamond MS, Alon R, et al. Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD1). *J Cell Biol.* 1995; 130: 1473–82.
- 9) Fritzsche J, Simonis D, et al. Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin *in vitro*: suggestion of VLA-4 as a novel target for anti-metastatic approaches. *Thromb Haemost.* 2008; 100(6): 1166–75.
- 10) Watt SM, Williamson J, et al. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood.* 1993; 82(9): 2649–63.
- 11) Fredens K, Dahl R, et al. *In vitro* studies of the interaction between heparin and eosinophil cationic protein. *Allergy.* 1991; 46: 27–9.
- 12) Volpi N. Inhibition of human leukocyte elastase activity by heparins: influence of charge density. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1290(3): 299–307.
- 13) Hiebert L, Liu JM. Protective action of polyelectrolytes on endothelium. *Semin Thromb Hemost.* 1991; 17 Suppl 1: 42–6.
- 14) Ahmed T, Syriste T, et al. Heparin prevents antigen-induced airway hyperresponsiveness: interference with IP3-mediated mast cell degranulation? *J Appl Physiol.* 1994; 76: 893–901.
- 15) Manduteanu I, Voinea M, et al. Effect of enoxaparin on high glucose-induced activation of endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2003; 477: 269–76.
- 16) Hecht I, Hershkoviz R, et al. Heparin-disaccharide affects T cells: inhibition of NF-kappaB activation, cell migration, and modulation of intracellular signaling. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(6): 1139–46.
- 17) Thourani VH, Brar SS, et al. Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278(6): 2084–93.
- 18) Ceyhan BB, Celikel T. Effect of inhaled low molecular weight heparin on methacholine-induced bronchoconstriction. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000; 38(9): 446–51.
- 19) Bendstrup KE, Jensen JI. Inhaled heparin is effective in exacerbations of asthma. *Respir Med* 2000; 94: 174–5.

- 20) Zeng D, Prosperini G, et al. Heparin attenuates symptoms and mast cell degranulation induced by AMP nasal provocation. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(2): 316–20.
- 21) Vancheri C, Mastruzzo C, et al. Intranasal heparin reduces eosinophil recruitment after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: 703–8.
- 22) 松原 篤, 黒田令子, 他. 好酸球性中耳炎に対するヘパリンの局所療法. *Otol Jpn* 2000; 10(4): 359.
- 23) 浅香大也, 松脇由典, 他. Allergic gungal sinusitis の 2 症例. *日鼻誌* 2004; 43(2): 188–193.
- 24) 春名眞一, 森山 寛. 好酸球性副鼻腔炎に対するヘパリン療法の効果について. *耳鼻咽喉科展望* 2004; 47(3): 210–13.
- 25) 清水志乃. 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. *日鼻誌* 2010; 49(1): 1–7.
- 26) Kouzaki H, O'Grady SM, et al. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol.* 2009; 183(2): 1427–34.
- 27) 清水猛史. 凝固線溶系因子と鼻副鼻腔リモデリング 好酸球性副鼻腔炎のニカワ様鼻汁の本態は何か? *耳鼻展望* 2010; 53(4): 218–227.
- 28) Shimizu S, Gabazza EC, et al. Role of thrombin in chronic rhinosinusitis-associated tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy.* 2011; 25: 7–11.
- 29) Shimizu S, Shimizu T, et al. Role of the coagulation system in allergic inflammation in the upper airways. *Clin Immunol.* 2008; 129: 365–371.
- 30) Shimizu S, Gabazza EC, et al. Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167(10): 1416–26.
- 31) Ogawa T, Shimizu S, et al. Heparin inhibits mucus hypersecretion in airway epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy.* 2011; 25(2): 69–74.
- 32) Suchankova J, Mata M, et al. Effects of bemiparin on airway responses to antigen in sensitized Brown-Norway rats. *Eur J Pharmacol.* 2005; 507(1–3): 261–71.
- 33) 中田潤子, 玉置 淳, 他. 抗原吸入による気道杯細胞分泌亢進とヘパリンによる分泌抑制機構. *日本呼吸器学会雑誌* 1998; 36(10): 845–50.
- 34) 前田 均, 八幡知之, 他. モルモット喘息モデルにおける低分子ヘパリンの抗原暴露後気道収縮反応に対する抑制作用. *アレルギー* 1995; 44(11): 1282–89.
- 35) Seeds EA, Page CP. Heparin inhibits allergen-induced eosinophil infiltration into guinea-pig lung via a mechanism unrelated to its anticoagulant activity. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001; 14(2): 111–9.
- 36) Sasaki M, Herd CM, et al. Effect of heparin and a low-molecular weight heparinoid on PAF-induced airway responses in neonatally immunized rabbits. *Br J Pharmacol.* 1993; 110(1): 107–12.
- 37) Ahmed T, Ungo J, et al. Inhibition of allergic late airway responses by inhaled heparin-derived oligosaccharides. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 1721–9.
- 38) Molinari JF, Campo C, et al. Inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness by ultralow molecular-weight heparin. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157(3): 887–93.
- 39) Fryer A, Huang YC, et al. Selective O-desulfation produces nonanticoagulant heparin that retains pharmacological activity in the lung. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 282(1): 208–19.
- 40) Shimizu T, Takahashi Y, et al. Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 1412–8.
- 41) Shimizu T, Hirano H, et al. A mechanism of antigen-induced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats. A comparison with lipopolysaccharide-induced mucus production. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1648–54.

## The inhibitory effects of heparin on the upper airway inflammation

Takao Ogawa<sup>1</sup>, Shino Shimizu<sup>1</sup>, Ichiro Tojima<sup>1</sup>, Hideaki Kouzaki<sup>1</sup>, Takeshi Shimizu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, Shiga University of Medical Science

### ABSTRACT

Heparin is a member of a family of polyanionic polysaccharides called glycosaminoglycans, and is one of the most important anticoagulant drugs. Heparin also has a variety of anti-inflammatory functions, and is clinically used as an anti-inflammatory drug. In the lower airways, it has been reported that heparin attenuated eosinophil infiltration and Muc5ac mRNA expression in rat model of asthma, and inhaled heparin is effective for the treatment of patients with asthma. However, little is known about the regulatory effects of heparin on the upper airway inflammation.

We have examined the *in vivo* and *in vitro* effects of heparin on mucus hypersecretion in airway epithelial cells. Intranasal instillation with low-molecular-weight heparin (LMWH) or unfractionated heparin (UFH) significantly inhibited lipopolysaccharides (LPS)-induced and antigen-induced mucus hypersecretion in rat nasal epithelium. Mucosal infiltration of neutrophils and eosinophils were also significantly attenuated. The *in vitro* effects of heparin on secretion of mucin and cytokines were examined using cultured airway epithelial cells (NCI-H292). LMWH and UFH significantly inhibited TNF- $\alpha$ -induced secretion of mucin (MUC5AC) and IL-8. These results indicated that local administration with heparin may provide a new therapeutic strategy for upper airway inflammation.

**Key words:** heparin, mucus hypersecretion, lipopolysaccharides, ovalbumin, rat nasal epithelium