

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591999

研究課題名（和文） 上気道炎症の制御因子としてのリポキシンの役割

研究課題名（英文） Role of lipoxin as an inhibitory mediator in upper airway inflammation

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

研究成果の概要（和文）：

上気道炎症における制御因子としてのリポキシンの役割を明らかにする目的で、鼻汁や組織中のリポキシシン A4 の濃度や ALX/FPRL-1 受容体の局在を検討した。鼻汁中には高濃度のリポキシシン A4 が存在し、アレルギー性鼻炎や好酸球性副鼻腔炎患者で高かった。鼻粘膜の上皮細胞や粘膜下腺細胞、浸潤細胞に ALX/FPRL-1 受容体が存在し、特に鼻茸粘膜で高発現していた。培養ヒト正常気管支上皮細胞における TNF- $\alpha$  刺激による IL-8 分泌はリポキシシン A4 によって抑制され、この抑制作用は受容体のアンタゴニストで阻害されたことから、ALX/FPRL-1 受容体を介するものと考えられた。以上の結果から、鼻副鼻腔炎などの上気道炎症においても、リポキシシン A4 が炎症の制御因子として働いていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the inhibitory role of lipoxin A4 in upper airway inflammation, we examined the concentration of lipoxin A4 in nasal secretion, and tissue localization of ALX/FPRL-1 receptor in nasal mucosa. *In vitro* effects of lipoxin A4 on IL-8 secretion from cultured human airway epithelial cells were also examined.

Significant concentrations of lipoxin A4 were found in nasal secretion from patients with allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis. ALX/FPRL-1 receptor was detected in epithelial cells, submucosal gland cells and infiltrating cells in nasal mucosa. Increased expression of ALX/FPRL-1 receptor mRNA was found in nasal polyp, compared with nasal mucosa of inferior turbinate. Lipoxin A4 significantly inhibited TNF- $\alpha$ -induced IL-8 secretion from cultured human normal bronchial epithelial cells.

These results indicate that lipoxin A4 may be an important inhibitory mediator in the pathogenesis of upper airway inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000円	750,000円	3,250,000円
2009年度	600,000円	180,000円	780,000円
2010年度	500,000円	150,000円	650,000円
年度			
年度			
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

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： 鼻科学

## 1. 研究開始当初の背景

リポキシン(Lipoxins, LXs)には、ロイコトリエン類における炎症制御因子としての役割が近年注目され、LXA<sub>4</sub>とその異性体であるLXB<sub>4</sub>などに様々な抗炎症作用があることが知られている。特に、LXA<sub>4</sub>にはALX/FPRL-1受容体が存在し、LXA<sub>4</sub>-ALX/FPRL-1受容体には好中球を中心とした白血球の遊走、接着、脱顆粒、IL-8産生などを抑制し、線維芽細胞の増殖抑制、炎症における血管透過性亢進の抑制、喘息における気道収縮の抑制などの作用があることが*in vitro*の実験系とともに*in vivo*の経口投与(マウス)でも確認されている(Chiang N, Brit J Pharmacol 2003, Wu S-H, Am J Respir Cell Mol Biol 2006)。

下気道においては、喘息患者の気管支肺胞洗浄液中に高濃度のLXA<sub>4</sub>が存在し、アスピリン喘息患者の末梢白血球ではLXA<sub>4</sub>産生能が低下していて、局所でのLXA<sub>4</sub>産生能の低下がアスピリン喘息の病態と発症に関わっていることも推測されている(Bonnans C, Am J Respir Crit Care Med 2002)。

さらに、アスピリンはCOX2の酵素活性を変化させ、アラキドン酸からの15-epi-LXA<sub>4</sub>の産生を誘導することも明らかになり、15-epi-LXA<sub>4</sub>の抗炎症作用についても注目されている(Bannenberg G, Brit J Pharmacol 2004)。

このようにリポキシンにはロイコトリエン類における炎症制御因子としての役割が考えられるが、鼻副鼻腔炎などの上気道炎症におけるリポキシンの役割は検討されていない。また、下気道上皮にALX/FPRL-1受容体が存在することは報告されているが、リポキシンの気道上皮細胞に対する作用もよく解っていない。

私たちは、プロスタノイドにおけるプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)の炎症制御因子としての役割に注目し、PGE<sub>2</sub>のアゴニストが培養鼻粘膜上皮細胞からのIL-8や粘液分泌を抑制し、アレルギー性炎症やLPS刺激時のラット鼻粘膜における炎症細胞浸潤や杯細胞化生を抑制する可能性を検討してきた。

## 2. 研究の目的

今回の研究の目的は、上気道炎症における制御因子として、プロスタノイド類の中でプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)が重要な役割を果たしていることに加えて、ロイコトリエン類の中ではリポキシンに炎症制御因子としての役割があることを明らかにすることである。

(1) 鼻汁中にリポキシンA<sub>4</sub>が存在すること

や、鼻粘膜におけるリポキシン受容体の存在を明らかにする。

(2) 鼻粘膜におけるリポキシン産生などのアラキドン酸代謝に関わる酵素の発現を検討する。

(3) 慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎などの疾患特異的な変化や、鼻茸と下鼻甲介粘膜での違いを検討する。

(4) 培養気道上皮細胞に対するリポキシンA<sub>4</sub>の作用を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 鼻汁や手術時に採取した鼻茸、鼻副鼻腔粘膜を利用して、リポキシン(LXA<sub>4</sub>)の濃度やALX/FPRL-1受容体の組織学的な局在を検討し、慢性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎などにおける疾患特異的な変化を検討する。

(2) リポキシンのALX/FPRL-1受容体の鼻粘膜におけるmRNA発現を検討し、疾患特異的な変化も検討する

(3) リポキシン産生などのアラキドン酸代謝に関わる酵素の鼻粘膜におけるmRNA発現を検討する。

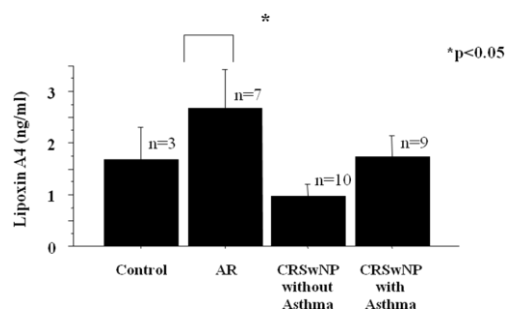
(4) 培養気道上皮細胞を利用してリポキシン(LXA<sub>4</sub>)の上皮細胞からの粘液分泌やサイトカイン(IL-6, IL-8)分泌に対する作用を明らかにする。

## 4. 研究成果

上気道炎症における制御因子としてのリポキシン(LXA<sub>4</sub>)の役割を検討した。

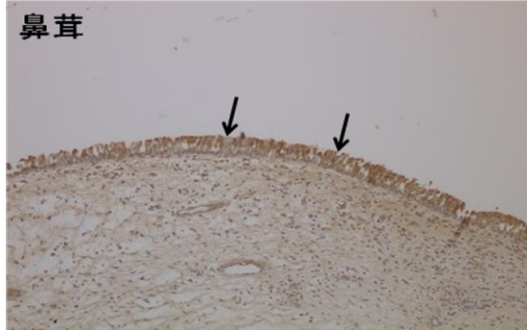
(1) コントロールの鼻汁も含めて29検体の鼻汁中のリポキシンA<sub>4</sub>濃度をELISA法で定量した。鼻汁中にはリポキシンA<sub>4</sub>が存在することを初めて確認した。アレルギー性鼻炎患者に高く慢性副鼻腔炎患者で低く、慢性副鼻腔炎患者では特に好酸球性副鼻腔炎患者に高い傾向が認められた(図1)。

図1 鼻汁中のリポキシンA<sub>4</sub>の濃度



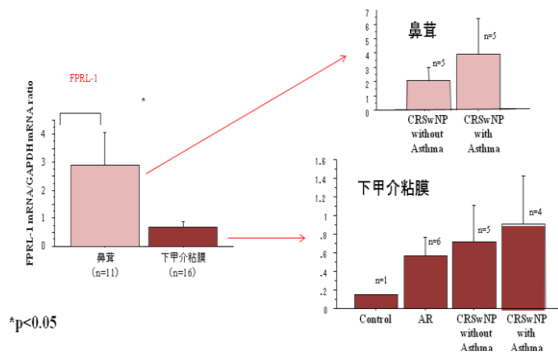
(2) 免疫組織学的に、リポキシン受容体 ALX/FPRL-1 が慢性副鼻腔炎患者の鼻茸と下甲介の上皮細胞と粘膜下腺細胞、浸潤細胞に存在することを確認した。(図2)

図2 リポキシン受容体 ALX/FPRL-1 の鼻茸における免疫染色



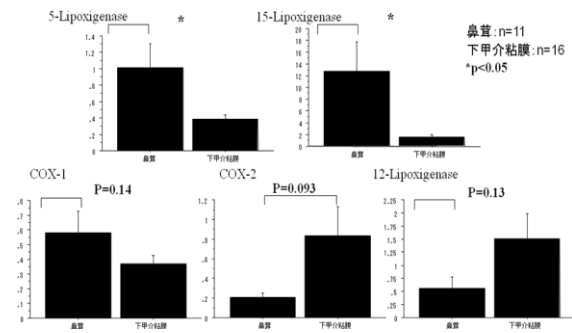
(3) 慢性副鼻腔炎手術時に採取した鼻粘膜組織 27 検体でのリポキシン受容体 mRNA の発現を Real time PCR 法で検討した。mRNA の発現は下甲介粘膜に比べて鼻茸で有意に高かった。疾患別には、鼻茸・下甲介粘膜とも好酸球性副鼻腔炎患者で高かった(図3)。

図3 リポキシン受容体 mRNA の鼻粘膜での発現



(4) リポキシン産生などのアラキドン酸代謝に関わる酵素の mRNA 発現を、同じ鼻粘膜組織 27 検体で検討したところ、5-Lipoxygenase (L0) と 15-L0 の mRNA 発現が下甲介粘膜に比べて鼻茸で有意に高く、Cyclooxygenase (COX-2) と 12-L0 の mRNA 発現は逆に鼻茸で低かった(図4)。

図4 鼻粘膜におけるアラキドン酸代謝酵素の発現



(5) 培養細胞を用いた検討で、リポキシン A4 はヒト正常気管支上皮細胞における TNF-alpha 刺激時の IL-8 産生を抑制した。(図5) この抑制作用はリポキシン受容体 ALX/FPRL-1 のアンタゴニスト boc-2 で阻害された(図6) ことから、リポキシン受容体を介するものと考えられた。

図5 ヒト正常気管支上皮細胞からの TNF-alpha 刺激による IL-8 分泌に対するリポキシン A4 の作用

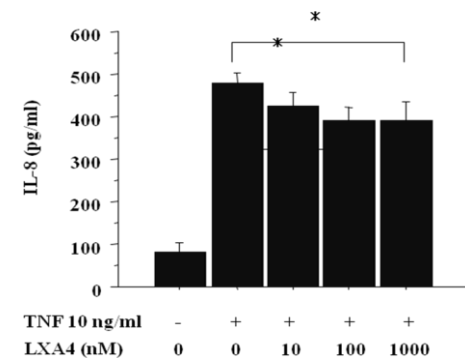
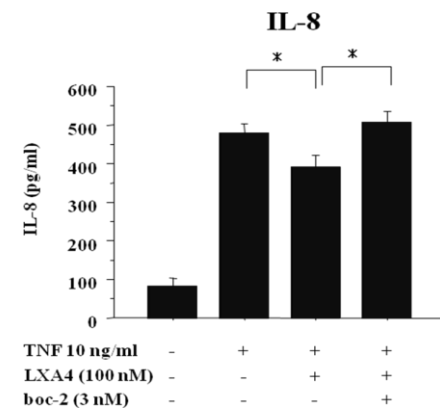


図6 リポキシン A4 による IL-8 分泌抑制はリポキシン受容体のアンタゴニスト boc-2 で抑制された。



以上の結果から鼻副鼻腔炎症においてもリポキシン A4 が産生され、気道上皮細胞の ALX/FPRL-1 受容体を介して気道炎症の制御に関わり、特に好酸球性副鼻腔炎における鼻茸形成などの病態に深く関わっていると考えられた。

これまでに鼻副鼻腔炎症におけるリポキシン A4 の役割を検討した報告は全くない。リポキシンのような炎症の制御性メディエータの観点から気道の炎症病態を明らかにする試みは独創的であり、今後はリポキシンのアナログや ALX/FPRL-1 受容体をターゲットとした、新たな消炎治療薬の可能性について、培養上皮細胞や動物モデルを用いた検討を発展させる予定である。

#### 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 3 件)

- ① 清水志乃、星恵理子、神前英明、清水猛史：上気道炎症におけるリポキシンの役割 耳鼻免疫アレルギー (JJIAO) 印刷中 査読無
- ② Hattori R, Shimizu S, Majima Y, Shimizu T: Prostaglandin E2 receptor EP2, EP3, and EP4 agonists inhibits antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 118:536-541, 2009. 査読有
- ③ Hattori R, Shimizu S, Majima Y, Shimizu T: EP4 agonist inhibits lipopolysaccharide-induced mucus secretion in airway epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 117:51-58, 2008. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 清水志乃、星恵理子、神前英明、清水猛史：上気道炎症におけるリポキシンの役割 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 平成 23 年 2 月 11 日 (大分市)
- ② Shimizu T, Hattori R, Shimizu S, Majima Y: Prostaglandin E2 receptor agonists inhibit antigen-induced mucus production and eosinophil infiltration in rat nasal epithelium. 27<sup>th</sup> International Symposium of Infection & Allergy of the Nose 平成 20 年 6 月 17 日 (Crete, Greece)
- ③ Shimizu T, Hattori R, Shimizu S, Majima Y: Role of Prostaglandin E2 as a protective mediator for airway inflammation. 13<sup>th</sup> Asian Research Symposium in Rhinology 平成 20 年 11 月 20 日 (Bangkok, Thailand)

#### 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

瀬野 悟史 (SENO SATOSHI)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90378464

柴山 将之 (SHIBAYAMA MASAYUKI)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20402711

星 恵理子 (HOSHI ERIKO)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20467385