

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791770

研究課題名(和文) 難治性上気道炎症性疾患に対する新規治療薬の開発にむけたヘパリンの抗炎症作用の解析

研究課題名(英文) The inhibitory effects of heparin on the upper airway inflammation

研究代表者

小河 孝夫 (OGAWA, Takao)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90549908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパリンは臨床で抗凝固薬として広く使用されているが、多様な作用を有することが知られている。我々は上気道炎症に対するヘパリンの作用を検討した。ラットにおいて、エンドトキシン点鼻による鼻腔炎症や、卵白アルブミンによるアレルギー性鼻腔炎症による鼻腔の杯細胞化生と粘液産生、好中球・好酸球浸潤はヘパリン点鼻投与により抑制された。培養気道上皮細胞を用いた検討では、ヘパリンは、TNF- α 刺激や好酸球性細胞の作用による気道上皮細胞からの炎症性サイトカインやムチン分泌を抑制した。好酸球性副鼻腔炎などの難治性上気道炎症に対する新たな治療手段として抗凝固因子であるヘパリンを利用した局所療法の有効性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Heparin 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. 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 heparin 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). Heparin significantly inhibited TNF- α -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.

研究分野：鼻科学

キーワード：ヘパリン 上気道 気道炎症 好酸球性副鼻腔炎 ラット 局所療法

1. 研究開始当初の背景

トロンピ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、明らかになってきた。私たちはこれまで、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ピンやトロンピン-アンチトロンピン複合体が存在し、鼻粘膜上皮細胞にトロンピン受容体が発現していることを報告した。また、トロンピンが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。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、トロンピ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。

一方、ヘパリンは生体内では結合組織型肥満細胞の分泌顆粒に存在するグリコサミノグリカンで、強い陰性荷電と雑多な分子構造を持ち、サイトカインや成長因子など多くの生体内物質にヘパリン結合部位があり、多彩な作用をもつことが知られている。ヘパリンは臨床現場で抗凝固薬として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ピンに結合し相互作用する性質を利用したものである。さらに、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。

2. 研究の目的

本研究の目的は、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することである。つまり、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、ヘパリンが難治性上気道炎症に対する新たな局所療法になる可能性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 培養気道上皮細胞での検討

ヒト気道上皮の細胞株である NCI-H292 細胞の 24 時間培養により、TNF- α (10 ng/ml) 刺激または IL-1 β 刺激による IL-8、TGF- β 1、粘液分泌に対する未分画ヘパリン、低分子ヘパリンの影響 ELISA 法、RT-PCR 法で検討した。

NCI-H292 細胞とヒト好酸球由来の細胞株である EoL-1 細胞を共培養することで産生されるサイトカインや粘液に対する未分画ヘパリン、低分子ヘパリンの影響を ELISA 法、RT-PCR 法で検討した。

(2) ラット鼻腔炎症モデルでの検討

LPS(0.06 mg/0.1ml)を 3 日間点鼻して LPS 刺激によるラット鼻粘膜の炎症モデルを作成した。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 3 日間点鼻した。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 μ g/0.5ml)と水酸化アルミニウムゲル(Alum; 5mg/0.5ml)を腹腔内感作させた後、OVA(10mg/0.1ml)を 3 日間ラットに点鼻して作成し、OVA 点鼻 30 分前に低分子ヘパリン(LMWH、1-100 IU/ml)を 3 日間点鼻した。

最終点鼻終了 24 時間後、ラットを安楽死させ、組織を採取した。ホルマリン固定し、Incisive pallipa のレベルでラット鼻腔の冠状断切片を作成し、鼻中隔粘膜における杯細胞化生・粘液産生と組織内への好酸球・好中球浸潤について検討した。粘液産生は AB-PAS 染色で、鼻中隔粘膜上皮内の粘液顆粒を染色し、画像解析ソフトで鼻粘

膜上皮の面積と鼻粘膜上皮内の粘液顆粒の面積を計測し、その割合で評価した。好中球・好酸球浸潤はH E染色で鼻中隔粘膜上皮内の好中球数と鼻中隔粘膜内の好酸球をカウントした。

4. 研究成果

(1)培養気道上皮細胞での検討

TNF- (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。低分子ヘパリンも同様に NCI-H292 細胞からの TNF- (10ng/ml)刺激による IL-8 産生, ムチン分泌を濃度依存性に抑制した(図 1)。

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)分泌や VEGF 産生が, 添加した EoL-1 細胞の数に依存して著明に増加し, 未分画ヘパリンまたは低分子ヘパリンにより抑制された。NCI-H292 細胞を IL-1 で刺激し分泌される MUC5AC や TGF-1 も未分画または低分子ヘパリンで抑制された。

(2)ラット鼻腔炎症モデルでの検討

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(図 2、図 3)。低分子ヘパリンは未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。

図 1 培養気道上皮細胞への TNF- 刺激による粘液産生に対する低分子ヘパリンの作用

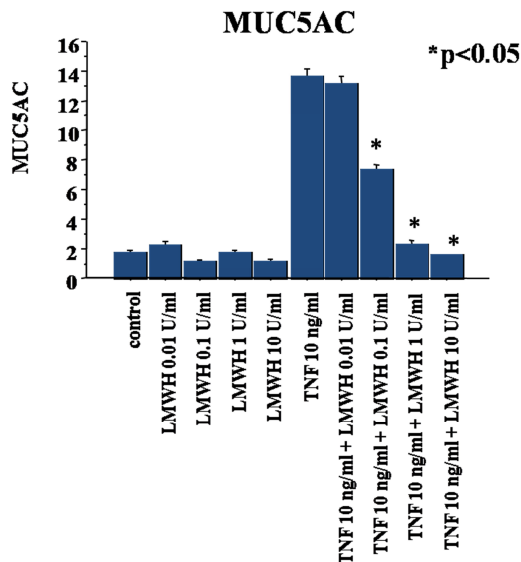
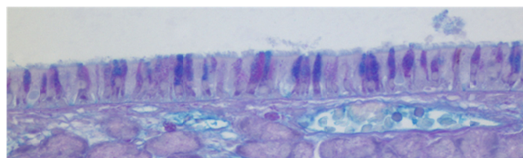
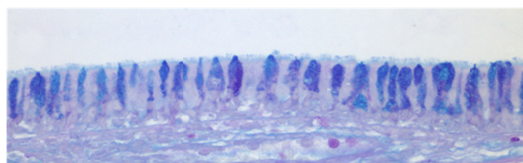


図 2 AB-PAS 染色 (鼻中隔粘膜上皮)

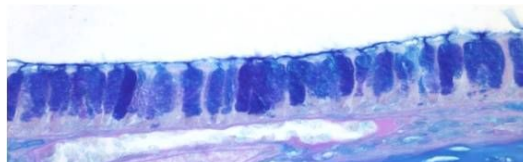
生食点鼻



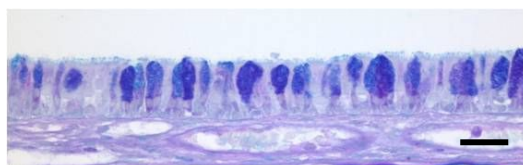
未分画ヘパリン点鼻



LPS 点鼻

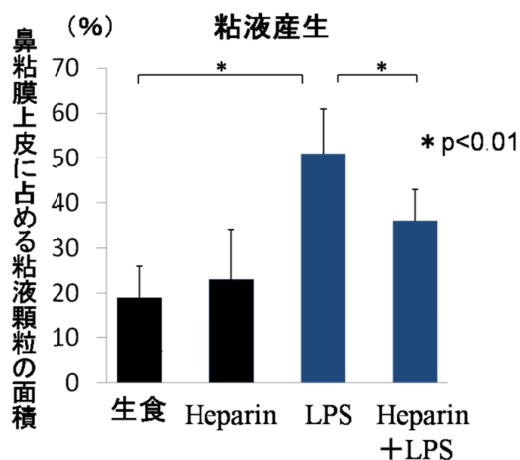


LPS 点鼻+未分画ヘパリン点鼻



(Scale Bar = 30 μ m)

図3 粘液分泌の定量的計測



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/0.1ml)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/0.1ml)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。

ヘパリンは抗凝固薬として臨床現場で広く使用されている薬物であるが,上気道炎症に対して抗炎症作用を有することが証明できた。従来の治療に抵抗する再発性の慢性副鼻腔炎やステロイド薬以外に有効な治療薬がない好酸球性副鼻腔炎・中耳炎に対する新規治療薬となる可能性を示した。

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)

Tojima I, Shimizu S, Ogawa T, Kouzaki H, Omura S, Sunazuka T, Shimizu T.

Anti-inflammatory effects of a novel non-antibiotic macrolide, EM900, on mucus secretion of airway epithelium.

Auris Nasus Larynx. 2015 Mar 10. pii: S0385-8146(15)00027-9. doi:

10.1016/j.anl.2015.02.003. 査読有

Shimizu S, Kouzaki H, Ogawa T, Takezawa K, Tojima I, Shimizu T. Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling. Am J Rhinol Allergy. 2014 Mar-Apr;28(2):103-9. doi:

10.2500/ajra.2014.28.4018. 査読有

Ogawa T, Shimizu S, Shimizu T. The effect of heparin on antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats.

Allergol Int. 2013 Mar; 62(1): 77-83.

doi: 10.2332/allergolint.12-0A-0438.

査読有

Ogawa T, Shimizu S, Tojima I, Kouzaki H, Shimizu T. Heparin inhibits mucus hypersecretion in airway epithelial cells. Am J Rhinol Allergy. 2011 Mar-Apr;25(2):69-74. doi:10.2500/ajra.2011.25.3562. 査読有

Shimizu S, Gabazza EC, Ogawa T, Tojima I, Hoshi E, Kouzaki H, Shimizu T.

Role of thrombin in chronic rhinosinusitis-associated tissue remodeling. Am J Rhinol Allergy. 2011 Jan-Feb;25(1):7-11. doi:10.2500/ajra.2011.25.3535. 査読有

小河 孝夫, 清水 志乃, 戸嶋 一郎, 神前 英明, 清水 猛史 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。

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (0913-0691)29 巻 3号 Page221-227(2011.09) . 査読有

[学会発表](計 2 件)

Takao Ogawa, Shino Shimizu, Hideaki Kouzaki, Takeshi Shimizu: Heparin Inhibits Mucus Hypersecretion In Nasal

Epithelium of the Sensitized Rats

15th Asian Research Symposium In Rhinology. Beyond Headlines to Clinical Solutions: Acute Bacterial Sinusitis Management.(第15回鼻科学研究会議), 2012 .

小河孝夫,清水志乃,清水猛史:難治性上気道炎症に対する局所治療薬としてのヘパリンの可能性.第31回滋賀臨床耳鼻咽喉科セミナー,,2012 .

〔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:
出願年月日:
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

研究代表者

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