

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 2 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22591899
 研究課題名 (和文) 上気道の難治病態における粘液分泌過多の機序の解明とその制御
 研究課題名 (英文) Elucidation and control of mechanisms of mucus hypersecretion in the intractable upper airway diseases

研究代表者

竹内 万彦 (TAKEUCHI KAZUHIKO)
 三重大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号： 50206942

研究成果の概要 (和文)：好酸球性副鼻腔炎では非好酸球性副鼻腔炎粘膜と比べて TGF- α 蛋白の発現が増加していた。ヒト上皮細胞株では TGF- α は ERK シグナリング経路を用いて TNF- α と相乗的に MUC5AC の発現を亢進させた。IL-31 および IL-31 受容体はアレルギー性鼻炎において発現が亢進しており、MUC5AC 遺伝子の発現を亢進させた。抗菌作用をもたない新規エリスロマイシン誘導体の EM900 は IL-1 β で惹起された MUC5AC ムチン遺伝子の発現亢進を有意に抑制した。この作用は EM900 が NF- κ B 活性化を抑制することによってもたらされた。

研究成果の概要 (英文)：TGF- α immunoreactivity was found markedly increased in the submucosal tissue in the eosinophilic chronic rhinosinusitis patient compared with that of a normal patient and with noneosinophilic chronic rhinosinusitis. TGF- α synergized with TNF- α to upregulate MUC5AC expression in human epithelial cells through the ERK signaling pathway. IL-31 and IL-31RA are upregulated in patients with allergic rhinitis, and induce MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells. These findings suggest that IL-31 plays an important role in mucus overproduction in nasal allergic inflammation. A new erythromycin derivative, EM900, does not have antibacterial action. EM900 suppressed induction of inflammatory cytokines and MUC5AC gene expression in cells derived from human airway epithelia, and our findings indicated that these effects may be mediated by the suppression of NF- κ B activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

(1) これまで、滲出性中耳炎や慢性副鼻腔炎における貯留液の物理化学的性質について報

告してきた。また、近年ではロイコトリエンがムチン遺伝子発現を亢進させる機序およびマクロライド系抗菌薬やロイコトリエン

受容体拮抗薬がムチン遺伝子発現に及ぼす影響を解明してきた。また、鼻茸においては細胞外マトリックスを分解する酵素の一つである matrix metalloproteinase-2 の発現が亢進していることも明らかにしてきた。

(2)近年難治性である好酸球性副鼻腔炎の成因や治療についての議論が高まっている。また、これに伴う鼻茸の成因についても依然不明な点が多い。鼻茸の患者では中鼻道よりブドウ球菌が検出される率が健常者に比べて高く、アスピリン喘息患者ではさらにその傾向が強いとされている。われわれの検討でも好酸球性副鼻腔炎患者の鼻腔からはブドウ球菌が33%と高率に検出され、非好酸球性副鼻腔炎の7%と比べると有意に高い。また、好酸球性副鼻腔炎に伴うことが多い鼻茸の約半数にブ菌のエンテロトキシンが検出され、58%の鼻茸でT細胞受容体のV β expansion がみられることからブドウ球菌のエンテロトキシンがスーパー抗原として病態に関与しているとしている報告がみられる。しかし、エンテロトキシンは毒素として粘液細胞に働いて粘液産生を促している可能性も考えられる。

(3)また、ムチン遺伝子MUC5ACの発現にシクロオキシゲナーゼやプロスタグランジンE₂が関与し、アスピリン喘息が好酸球性副鼻腔炎に深く関与していることからシクロオキシゲナーゼやプロスタグランジンE₂も病態に関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

(1)好酸球副鼻腔炎においては、IL-5、ロイコトリエン、TGF- α 、TGF- β 、TNF- α 、エンテロトキシンなどの多くの因子が粘液産生に関与している可能性がある。はじめに、これらの因子の好酸球性副鼻腔炎粘膜および鼻茸における発現を組織化学的に確認し、対照との比較においてこれらの因子が好酸球性副鼻腔炎で発現亢進がみられることを確認する。次に粘液を産生する培養細胞において、これらの因子が気道粘液の主要なムチン遺伝子であるMUC2、MUC5ACの発現を亢進させるか否かをレポーター遺伝子アッセイにて明らかにする。このとき、これらの因子を単独で加えるのみならず、いくつかの組み合わせで培養細胞を刺激し、相乗効果を見る。次に、粘液産生を亢進させる物質がいかなる細胞内シグナルを用いるかを各種阻害薬を使い、明らかにする。これまでブドウ球菌のエンテロトキシンの上皮細胞の機能に及ぼす影響は見過ごされてきた。好酸球性副鼻腔炎では粘調な粘液が産生されていることが予想され、ムチン遺伝子が活性化されていることは確実と思われ、これにはエンテロトキシンの毒素としての作用が関与して

いるものと思われる。ロイコトリエン、TGF- α 、TNF- α については異なる系において単独でムチン遺伝子発現を亢進させることが明らかにされているがこれらの組み合わせで相乗効果を示すことが予想される。相乗効果を示す因子の産生細胞を明らかにし、そのシグナル伝達機序を明らかにすることによりこれらの因子の作用を阻害する方法を提唱することが可能になり、好酸球性副鼻腔炎の粘液分泌過多を制御する方向性が見えてくるものと思われる。

(2)IL-31はアレルギー炎症に関与するヘルパーT細胞由来の新規サイトカインである。しかし、IL-31が鼻副鼻腔のアレルギー炎症のムチン産生に及ぼす影響は全く不明であるので、これを明らかにした。

(3)次に、リポポリサッカライドで誘発される粘液産生における14員環系マクロライドとグルココルチコイドの影響を評価するために動物モデルを作成した。

(4)マクロライド長期少量療法は慢性鼻副鼻腔炎はびまん性汎細気管支炎の有効な治療法である。しかし、マクロライドの長期投与により薬剤耐性を持つ細菌が生じる可能性がある。よって、抗菌作用をもたないマクロライドが望まれる。エリスロマイシンの新しい誘導体である(8R,9S)-8,9-dihydro-6,9-epoxy-8,9-anhydro-pseudoerythromycin A(EM900)は抗菌作用を持たない。

3. 研究の方法

(1)好酸球副鼻腔炎においてTGF- α の発現が亢進しているか否かを検討するために経口免疫組織化学の手法を用いた。TGF- α の役割を評価するために、ヒト上皮細胞株であるHM3-MUC5AC細胞とA549細胞においてルシフェラーゼアッセイを行い、MUC5AC遺伝子発現を検討した。

(2)IL-31とIL-31受容体の発現をアレルギー性鼻炎と非アレルギー性鼻炎の下鼻甲介粘膜において免疫組織化学の手法により明らかにした。また、IL-31により誘導されるMUC5AC遺伝子発現をレポーター遺伝子アッセイと定量的PCRにて明らかにした。

(3)ドナー側のラットの気管をレシピエント側のラットに4週間埋め込んだ。この期間のホモグラフトの有用性を検討した。

(4)EM900が抗炎症作用を有し、ムチン遺伝子発現を抑制するか否かを検証するために、IL-1 β によって惹起される炎症をEM900が

抑制するか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) TGF- α の発現は、非好酸性副鼻腔炎に比べて好酸性副鼻腔炎の粘膜下腺細胞で有意に増加していた (図 1)。

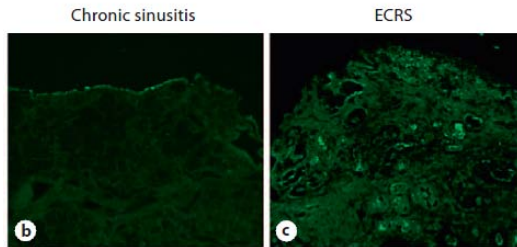


図 1

TGF- α 単独でムチン遺伝子である MUC5AC の発現を亢進させた (図 2) が、

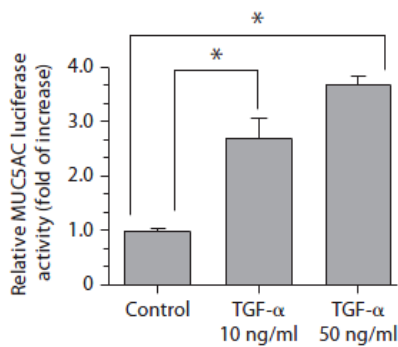


図 2

TGF- α は TNF- α と相乗的に、HM3-MUC5AC 細胞においても (図 3 a) A549 細胞においても (図 3 b)、MUC5AC の発現を亢進させた。

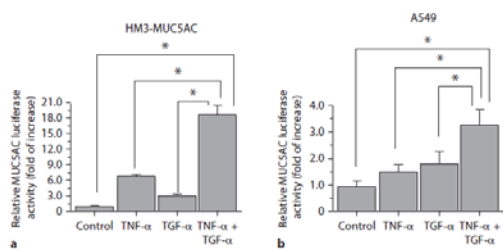


図 3

これらの相乗作用は、ERK シグナリング経路を介するものであった。

(2) IL-31 受容体の発現は主に粘膜下腺にみられ (図 4)、アレルギー性鼻炎によりその発現は亢進していた。IL-31 は MUC5AC 遺伝子発現を亢進させ、Th2 サイトカインは相乗的に働いた (図 5)。

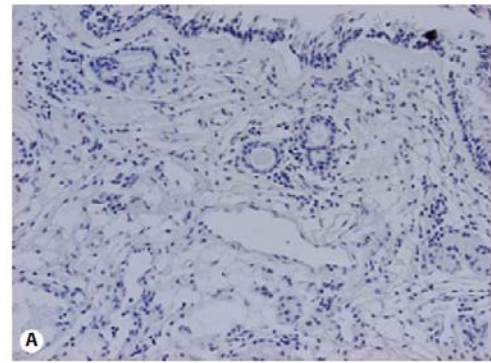


図 4

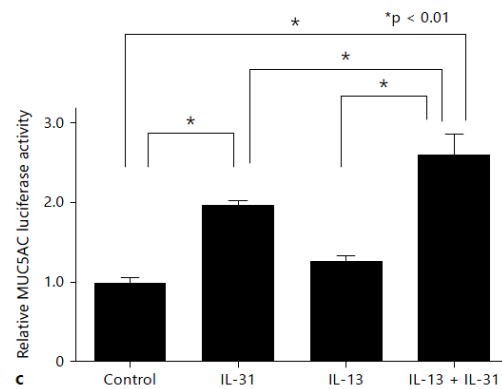


図 5

(3) クラリスロマイシンをレシピエントラットに 4 週間経口投与したところ、LPS 刺激を受けたホモグラフト気管の粘液産生は有意に減少した。デキサメサゾンも同様に LPS 刺激による粘液産生を抑制した。移植された気管粘膜は正常粘膜と組織学的に異なるところはなかった。1 μ g/ml LPS を移植気管の中に入れると粘液量と曳糸性は増加し、粘膜には杯細胞化生がみられた。

(4) A549 細胞において EM も EM900 も IL-1 β によって惹起される IL-8 の発現を抑制した (図 6)。

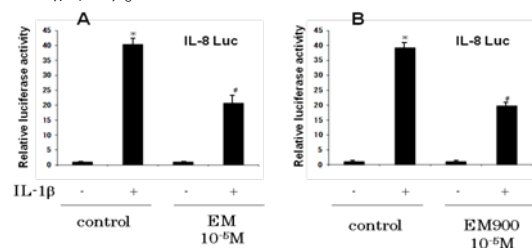


図 6

EM と EM900 は IL-1 β により惹起される IL-1 β と TNF- α の発現を抑制した (図 7)。

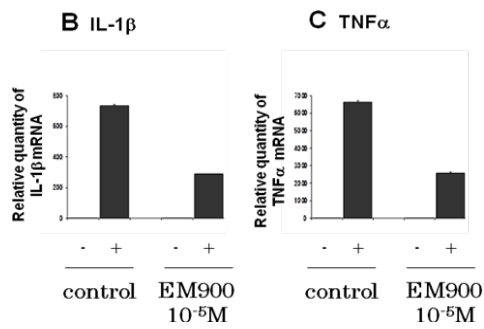


図 7

EM900 は IL-1β により惹起される MUC5AC の発現を抑制した (図 8)。

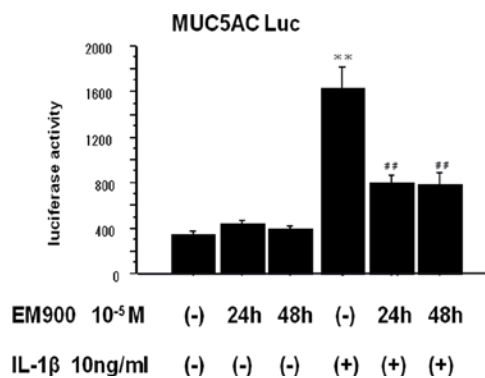


図 8

EM と EM900 は IL-1β により惹起される NF-κB の活性化を抑制した (図 9)。

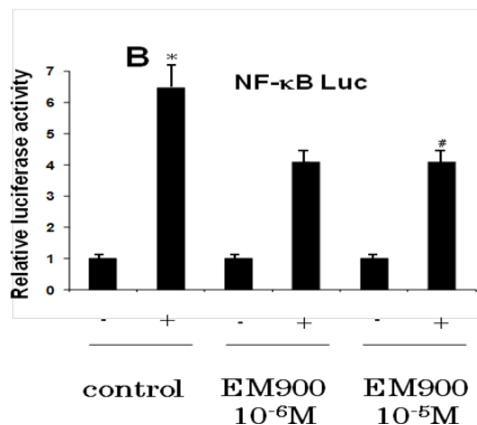


図 9

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 4 件)

①Shah SA, Ishinaga H, Hou B, Okano M, Takeuchi K. Effects of Interleukin-31 on

MUC5AC Gene Expression in Nasal Allergic Inflammation. Pharmacology. 査読有、91、2013、158-164.

②Otsu K, Ishinaga H, Suzuki S, Sugawara A, Sunazuka T, Omura S, Jono H, Takeuchi K. Effects of a novel nonantibiotic macrolide, EM900, on cytokine and mucin gene expression in a human airway epithelial cell line. Pharmacology. 査読有、88、2011、327-32.

doi: 10.1159/000334339.

③ Ishinaga H, Shah SA, Sakaida H, Takeuchi K. The role of transforming growth factor-α on mucin overproduction in eosinophilic chronic rhinosinusitis. Pharmacology. 査読有 88、2011、302-8. doi: 10.1159/000333794.

④ Kitano M, Ishinaga H, Shimizu T, Takeuchi K, Majima Y. Effects of clarithromycin and dexamethasone on mucus production in isografted rat trachea. Pharmacology. 査読有 87、2011、56-62.

doi: 10.1159/000322837

[学会発表] (計 7 件)

①石永 一, 竹内 万彦. ヒト気道上皮でのムチン遺伝子発現に対する IL-31 の影響 Source : 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2012 年 2 月 17 日、大津市

②Takeuchi K. Mucosal barrier function in allergic rhinitis. 30th international symposium on infection and allergy of the nose、2011 年 9 月 20 日、Tokyo

③Takeuchi K. Recent advances in primary ciliary dyskinesia. 30th international symposium on infection and allergy of the nose、2011 年 9 月 20 日、Tokyo

④ Sakaida H, Sakaida M, Shibata T, Ogawa S, Nakatani K, Takeuchi K. Two cases of Kartagener's syndrome. 30th international symposium on infection and allergy of the nose、2011 年 9 月 22 日、Tokyo

⑤ Ishinaga H, Otsu K, Sakaida H, Takeuchi K. Effects of EM900 on cytokine and mucin gene expression in a human airway epithelial cell line. 30th international symposium on infection and allergy of the nose、2011 年 9 月 21 日、Tokyo

⑥竹内万彦、難治性上気道疾患への取り組み、日本耳鼻咽喉科学会福井県地方部会、2011 年 6 月 18 日、福井市

⑦竹内万彦、小川覚、中谷中、細木興亜、藤澤隆夫、原発性線毛運動不全の一例、第 5 回日本小児耳鼻咽喉科学会、2010 年 6 月 27 日、札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 万彦 (TAKEUCHI KAZUHIKO)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 50206942

(2) 研究分担者

石永 一 (ISHINAGA HAJIME)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号： 50335121

坂井田 寛 (SAKAIDA HIROSHI)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号： 30378426