

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791791

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎におけるロイコトリエン受容体変異と難治性に関する研究

研究課題名(英文)Leukotriene receptor variation and it's role in intractable eosinophilic rhino sinusitis.

研究代表者

大堀 純一郎(Ohori, Junichiro)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90507162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎におけるロイコトリエン2型受容体の役割を解明するため、上皮細胞におけるVEGF産生、好酸球におけるロイコトリエン受容体発現、さらに上皮細胞と好酸球の相互作用について検討を行った。その結果、上皮細胞ではVEGFのオートクライン効果が観察された。好酸球ではロイコトリエン2型受容体の発現が1型受容体より多いことが観察された。また、上皮細胞と好酸球の共培養によるVEGF産生の亢進も認められた。これらの病態が好酸球性副鼻腔炎の難治性の一因となっていることが推測された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the role of cysteinyl leukotriene receptor 2 (CysLT2R) in eosinophilic rhino sinusitis, the production of VEGF from Epithelial cells, the expression of CysLT2R on eosinophil, and the interaction between epithelial cells and eosinophil were examined. It was observed that the autocrine effect in VEGF production on the epithelial cell of nasal mucosa. The expression of CysLT2R was higher than that of CysLT1R on eosinophil. Further, the accentuation of VEGF production was observed in coculture of epithelial cells and eosinophils. These data suggested that CysLT2R and VEGF were one of the cause regarding the refractory pathology of eosinophilic rhino sinusitis.

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

キーワード：好酸球 上皮 VEGF ロイコトリエン

### 1. 研究開始当初の背景

副鼻腔炎の鼻茸中には、その鼻茸組織中に好酸球の著名な浸潤を認めるものが多い。これらの副鼻腔炎を、本邦では、好酸球性副鼻腔炎と呼ぶ。好酸球性副鼻腔炎は、難治性の副鼻腔炎としてよく知られており、アスピリン喘息も含めた気管支喘息に合併するものが多いとされる。好酸球性副鼻腔炎については、鼻茸中に血管内皮増殖因子 (VEGF) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF- $\beta$ 1) などの成長因子が多く含まれており、好酸球遊走にかかわる Eotaxin などの発現も亢進している。これまでに行った我々の鼻汁中 VEGF の測定では、好酸球性副鼻腔炎の鼻汁には VEGF が多く含まれており、VEGF は鼻茸形成において、血管新生と鼻茸の浮腫にかかわっていると推測している。

VEGF の調節因子の一つとしてロイコトリエンがある。ロイコトリエンの受容体には、ロイコトリエン 1 型受容体 (CysLT1R) とロイコトリエン 2 型受容体 (CysLT2R) がある。CysLT1R 拮抗薬はすでにアレルギー性鼻炎の治療薬として広く使われており、特に鼻閉に対する有効性が注目されている。さらに、以前我々は、「好酸球性副鼻腔炎において、CysLT1R 拮抗薬のプランスカストの鼻茸への好酸球浸潤に対する抑制効果を抗ヒスタミン受容体拮抗薬であるオロパタジンと比較し、プランスカスト投与により鼻茸の好酸球浸潤が優位に減少することを臨床検討にて証明した。」しかしながら、この検討では CysLT1R 拮抗薬のみでは好酸球性炎症におけるすべての好酸球浸潤を抑制することはできず、その抑制効果は部分的なものであると考えられた。

さらに、研究当初行っていた研究において、鼻茸の免疫染色を行うと、鼻茸上皮には CysLT1R はほとんど発現していないが、CysLT2R が強く発現する傾向にあった。この結果から鼻汁中 VEGF の産生は腺上皮細胞が主と考えられており、上皮の CysLT2R の強い発現はロイコトリエン刺激による上皮からの VEGF 産生にかかわっているのではないかと仮説を立てていた。

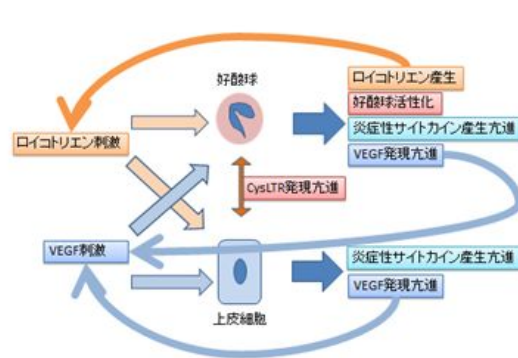
CysLT2R については好酸球性炎症に関する役割は不明であった。しかし、喘息患者では、好酸球に発現する CysLT2R の発現が、正常人と比較して多く、IFN- $\gamma$  の刺激にて、好酸球の CysLT2R 発現が増強することが知られていた。このことは、CysLT2R も好酸球性の炎症に何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。CysLT2R やその周囲の好酸球性炎症に対する機序を明らかにすることは、難治性である本疾患の新たな治療戦略につながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎にロイコトリエンが関与することが報告され、抗ロイコトリエン薬が使用されている。しかし、必ずしもその効

果は十分でなく、本疾患は CysLT1 受容体に加えて、CysLT2 受容体が関与するためと考えられる。本研究は、好酸球の発現するロイコトリエン 2 型受容体 (CysLT2R) に着目し、好酸球や鼻茸上皮などの鼻茸に発現する CysLT2R が、好酸球性炎症に関与しているのではないかという仮説のもとに、好酸球性炎症における CysLT2R の役割を解明し、好酸球性炎症の新たな治療戦略を見出すことを目的とする。

本研究の具体的な仮説として、下の図のような上皮細胞と好酸球の相互作用を考えており、これらの仮説を一つずつ解明することで、病態の解明に臨む。



鼻茸上皮に発現している CysLT2R は VEGF 産生を亢進し鼻汁中の VEGF の産生源となり、また好酸球に発現する CysLT2R もロイコトリエンによる好酸球の活性化につながっており、好酸球性副鼻腔炎の病態に重要な役割を果たしていると予測される。好酸球性副鼻腔炎に CysLT1R 拮抗薬のみでは効果が不十分な点が、このことにより明らかにされ、病態解明、さらには CysLT2R を介した新たな治療戦略につながることを期待される。

具体的には以下の事項を明らかにすることを目的とした。

- (1) 鼻茸中の CysLT1R と CysLT2R の発現の局在を病理学的に明らかにする。
- (2) 鼻茸由来上皮細胞における CysLT1R, CysLT2R の発現の有無を明らかにする。
- (3) 鼻茸由来上皮細胞におけるロイコトリエン、VEGF 等各種刺激に対する培養細胞の応答を明らかにする。
- (4) 好酸球における各種刺激に対する賠償細胞の応答を明らかにする。
- (5) 上皮細胞と好酸球を共培養した際に起こる反応について明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 鼻茸中の CysLT1R, CysLT2R の発現

手術で得られた鼻茸組織を免疫染色して、CysLT1R と CysLT2R の発現の局在を検討した。また、鼻茸の組織中に好酸球の浸潤数が多いものと少ないもので CysLT1R と CysLT2R の発

現の相違について検討をおこなった。免疫染色にはABC法を用い、染色後は顕微鏡にて写真を撮影し、炎症細胞や上皮細胞の染色細胞をカウントし発現の程度を検討した。

#### (2) 鼻茸由来上皮細胞、好酸球における CysLT1R と CysLT2R の発現

鼻茸由来の上皮細胞を培養し、培養した細胞から total RNA を採取した。採取した Total RNA は RT-PCR 法にて cDNA を作成し、real time PCR 法にて CysLT1R、CysLT2R の mRNA の発現の有無を検討した。プライマーは市販のキットを用い、real time PCR には Syber green キットを用いた。また培養上皮細胞に LPS、poly(IC) 刺激を加えて CysLT1R、CysLT2R の発現に対する影響を検討した。具体的には、培養細胞がコンフレントに達する直前に LPS、poly(IC) を培養メディウム上に添加し、8 時間後の細胞を採取し、細胞から mRNA を抽出して、CysLT1R、CysLT2R の mRNA の発現の有無を検討した。

好酸球についても好酸球の培養株である Eo1-1 から total mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて cDNA を作成し、real time PCR 法にて CysLT1R、CysLT2R の mRNA の発現の有無を検討した。また、好酸球表面のレセプター発現を検討するため、フローサイトメータを用いて、その発現を検討した。コントロールには IsoType コントロールを用いた。

#### (3) 鼻茸由来上皮細胞における VEGF 産生について

鼻茸由来培養細胞を培養し、繊維芽細胞に VEGF 刺激を加え 24 時間後の培養上清中の VEGF 濃度を ELISA 法で測定した。また刺激後 8 時間で培養細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて VEGF mRNA の発現を検討した。また、同様のサンプルにて VEGF 受容体 mRNA についても RT-PCR 法にて測定し、未刺激状態をコントロールとして比較検討を行った。

#### (4) 好酸球における VEGF、LTD4 の刺激に対する応答

ヒト末梢血好酸球と、好酸球培養株である Eo1-1 を用いてそれぞれの培養中にロイコトリエン D4、GM-CSF、IL-5 等を加え、24 時間後の培養上清中の VEGF、TGF- $\beta$ 1 を ELISA 法にて測定した。ま

#### (5) 上皮細胞と好酸球の共培養における反応の解析

上皮の培養株である Human Nasal Epithelial cell (HNEpC) と好酸球の培養株である Eo1-1 を共培養することにより、培養上清中の VEGF やロイコトリエンの発現がどのように変化するかを検討した。上皮細胞と好酸球の間接相互作用を検討するため 2 重の培養ウェルを用いた。下層に上皮細胞がコンフレントになるまで培養を行った後、上層に好酸球を培養し、培養液中の VEGF を測定し

た。時間経過とともに、好酸球の細胞数を変化させて検討を行った。得られた培養上清の VEGF 濃度を ELISA 法にて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 鼻茸中の CysLT1R、CysLT2R の発現

鼻茸中の CysLT1R と CysLT2R の発現は、上皮細胞や鼻茸内に浸潤した炎症細胞に陽性細胞を認めた。さらに鼻茸に好酸球浸潤が多いサンプルにおいて、CysLT2R の発現が強い傾向があった。このことより、上皮細胞において CysLT1R よりも CysLT2R の方が好酸球炎症によりかわりがあるのではないかと推測され、上皮細胞における CysLT2R の機能解明が好酸球性副鼻腔炎における新たな治療戦略の重要な因子であると考えられた。

##### (2) 鼻茸培養上皮細胞、好酸球における CysLT1R と CysLT2R の発現

鼻茸上皮培養細胞に発現する CysLT1R、CysLT2R の mRNA の発現を検討したが、培養上皮細胞には両者の mRNA の発現を認めなかった。また、培養細胞を LPS および Poly(IC) にて刺激したが、CysLT1R の発現は低下する傾向にあった。このことは、免疫染色で得られた上皮細胞における CysLT2R の発現と矛盾する結果となった。鼻茸の上皮細胞においては、すでに何らかの刺激が加わっているために CysLTR の発現が亢進している状態である可能性があり、これらの刺激を特定することが今後の研究課題となった。

また好酸球の培養株である Eo1-1 の CysLT1R、CysLT2R の発現を FACS を用いて検討したところ、Eo1-1 には両方の受容体が発現しているが、CysLT2R の発現のほうが、CysLT1R の発現よりも強いことが確認された。この結果から、抗ロイコトリエン薬は Eo1-1 に発現する CysLT2R を抑制することはできないため、好酸球炎症における抗ロイコトリエン薬の限定的な作用の原因と考えられた。しかしながら、Eo1-1 は、好酸球培養細胞株であるため、今後、実際のヒト好酸球、あるいは鼻茸に浸潤した好酸球についての CysLT1R、CysLT2R の発現を検討する必要がある。

##### (3) 鼻茸由来上皮細胞における VEGF 刺激に対する応答

鼻茸由来培養上皮細胞を VEGF にて刺激すると、VEGF の産生が亢進することが明らかとなった。また、上皮細胞には VEGF 受容体 1 と VEGF 受容体 2 が両方発現していることを確認した。鼻茸組織の免疫染色においては、VEGF 受容体 1 と VEGF 受容体 2 では、VEGF 受容体 1 のほうが上皮に発現が強かった。鼻茸由来の培養上皮細胞においてこれら 2 つの受容体が VEGF 刺激を受けることでどのように受容体が変化するかを確認したところ、VEGF 受容体 1 は、VEGF 刺激によって無刺激の状態から 4 倍程度発現が亢進したが、VEGF 受容体 2 についてはこのような効果は認めなかつ

た。また培養上皮細胞に VEGF 受容体 1、2 のアンタゴニストにて前処理して VEGF 産生に対する効果を確認したところ、VEGF 受容体 1 のアンタゴニストには VEGF 産生抑制効果が見られたのに対して、VEGF 受容体 2 にはこのような抑制効果は認めなかった。このことより、VEGF は鼻茸上皮細胞の VEGF 受容体 1 の発現を更新する作用を持ち、VEGF に対する感受性を高め、VEGF のオートクライン作用を持つと考えられた。

#### (4) 好酸球におけるロイコトリエン刺激に対する応答

Eol-1 にはロイコトリエンレセプターである CysLT1R と CysLT2R が発現しており、さらに CysLT2R の発現が強いことが確認されたためこれらの受容体に刺激を加えることで、好酸球が VEGF 産生にどのような影響を与えるかを検討した。CysLT1R, CysLT2R 両方のアゴニストであるロイコトリエン D4 で Eol-1 を刺激すると VEGF の産生は若干更新したが、統計学的に優位な上昇は認めなかった。そこで、ロイコトリエン D4 と GM-CSF の共刺激を行ったところ、ロイコトリエン D4、GM-CSF それぞれ単独では VEGF 産生更新を認めなかったのに対して、共刺激時には優位に VEGF 産生亢進を認めた。また、IL-5 による刺激でも VEGF の産生亢進を認めた。今後これらの刺激を抗ロイコトリエン 1 受容体のアンタゴニスト、抗ロイコトリエン 2 受容体のアンタゴニスト、両者のアンタゴニストにて刺激前に処理を行うことで、VEGF 産生にどのような影響をもたらすか検討し、VEGF 産生における、CysLT1R, CysLT2R の作用を検討する予定である。

#### (5) NHEpC と Eol-1 の共培養における VEGF の産生

NHEpC と Eol-1 を共培養し、その培養上清中の VEGF を測定したところ、培養上清中の VEGF 濃度は、共培養した Eol-1 の細胞数に比例して上昇した。好酸球を  $1 \times 10^6$  個共培養した際に最も高値となった。ただし、これらの VEGF の産生源として Eol-1 が無刺激の状態でも産生する VEGF が多くの部分を占めていることが明らかになり、Eol-1 は無刺激の状態でも VEGF 産生が活発であることが明らかとなった。そのためヒト末梢血の好酸球と Eol-1 の産生する VEGF 量を比較したところ、Eol-1 の産生する VEGF 量はヒト末梢血好酸球と比較して優位に高値を示した。このことより、ヒト末梢血好酸球では、Eol-1 のように恒常的な VEGF 産生は行われていないことが明らかとなった。逆に言うとこれらの末梢血好酸球は、組織内に浸潤することで活性化されるとも考えられる。現在、末梢血好酸球が活性化好酸球になるために、上皮細胞との細胞シグナルが必要なのではないかと仮説を立てており、今後、ヒト末梢血好酸球と人鼻茸上皮細胞での共培養をおこない、これらの

共培養において、どのような因子が好酸球を活性化させるのかについて検討を行っている予定である。

これらの結果より、好酸球性副鼻腔炎では、ロイコトリエン 2 型受容体が多く発現していることが明らかとなったが、ロイコトリエン受容体発現の調節因子やその役割まで解明するにはいたらなかった。ロイコトリエン 2 型受容体は、好酸球には認められたが、上皮細胞では免疫染色では陽性であったものの PCR 法では、あきらかな mRNA の発現を認めなかった。これら鼻茸組織中に発現するロイコトリエン 2 型受容体については、今後どのような働きがあり、好酸球性炎症にどのようにかわっていくか更なる検討が必要である。

一方 VEGF の産生に関しては、上皮細胞から産生される VEGF のメカニズムの一部を解明することができた。上皮細胞における VEGF 産生のオートクライン効果は、いったん増悪し始めた病態が収束しないことの一因となりうると考えられ、更なる好酸球の遊走により病態の悪循環が引き起こされるとも考えられる。VEGF 産生においては VEGF 受容体 1 が重要であることが本研究にて明らかになりその抑制については今後の研究課題である。

本研究で当初目的としていた、好酸球と、上皮細胞のロイコトリエンと VEGF を介した相互関係について、現在のところ好酸球側のロイコトリエンレセプター、上皮細胞側の VEGF レセプターを中心とした解析を行った。さらに、培養細胞株である NHEpC と Eol-1 での共培養の結果において、今後実際にヒト末梢血好酸球、ヒト鼻茸上皮細胞で検討を行う際の基礎的な結果を得られた。今後、ヒト培養上皮細胞とヒト末梢血好酸球、さらには、ヒト活性化好酸球を用いた検討を行うことにより、好酸球性副鼻腔炎の病態の更なる解明につながると考えられ、今後の研究の発展的な展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Junichiro Ohori, kousuke Yoshifuku, Kurono Yuichi. Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF) was produced from Nasal Polyp Epithelial Cells Stimulated with VEGF via upregulation of VEGF Receptor-1. 24th congress of European Rhinologic Society 31th International Symposium of Infection and Allergy of the nose. 2012年06月17日~2012年06月21日. トゥールーズ (フランス)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大堀 純一郎 (OHORI JUNICHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90507162