

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24年 5月15日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22791613

研究課題名（和文）：好酸球性副鼻腔炎における好酸球活性化機序の解明

研究課題名（英文）： Elucidation of the mechanism of eosinophil activation in eosinophilic sinusitis

研究代表者：吉福 孝介 (YOSHIFUKU KOUSUKE)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：70381168

研究成果の概要（和文）：

好酸球浸潤の多い鼻茸群では好酸球浸潤の少ない鼻茸群と比較して、LPS 刺激による線維芽細胞の VEGF 産生は有意に上昇していた。デキサメタゾン (10^{-6} mol) により VEGF 産生は有意に抑制された。VEGF の免疫染色において、線維芽細胞は好酸球浸潤の多い鼻茸群では有意に強く染まっていた。

好酸球浸潤の多い鼻茸群では好酸球浸潤の少ない鼻茸群と比較して VEGF 産生をする線維芽細胞数が多く、また LPS 刺激などの外因因子が作用することで VEGF 産生がより高い結果であった。VEGF 産生が高いことは鼻茸の発生の一因である可能性があると思われた。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism by which eosinophils are selectively recruited in nasal polyp remains to be clarified. The exact mechanisms by which glucocorticoids exert their beneficial effect on nasal polyp remain to be clearly defined. In the present study, the secreted levels of VEGF from the cultured fibroblasts and VEGF in the nasal secretion were determined. The level were compared between Enp and NEnp and the role of those chemokines in the pathogenesis of nasal polyp is discussed.

Tissues from nasal polyps obtained by biopsy was fixed in formarin and stained with hematoxylin and eosin, and the number of eosinophils was counted at $\times 400$ magnification under light-microscopy. Three fields were examined for each section and the average was considered the number of eosinophils infiltrating the sample.

Clinical features of Enp are complication with Asthma, bilateral nasal polyps and Ethmoidal sinus disease are often recognized in CT. These three items were examined, statistically significant difference in 40-60. So we classified samples having more than 60 eosinophils as Enp, having less than 40 eosinophils as Nenp in this study.

17 CRS with nasal polyp cases were included in the Nasal leakage study and 11 CRS with nasal polyp cases were included in the cultured fibroblast study. None of the subjects had taken oral steroids for more than year before the biopsy.

Fibroblasts isolated from nasal polyps were cultured. After dexamethasone(DEX)

pretreatment,stimulated with 10ng/ml of tumor necrosis factor- α (TNF- α)and interleukin-4(IL-4)for 24 hours or stimulated with 10 μ g/ml of LPS. After stimulation, culture supernatants were collected and concentration of VEGF were quantified by Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA).

Nasal secretions from nasal cavity were collected by JUHN TYM-TUP(Medtronic Xomed,Inc,Jacksonville,FL). Collected nasal secretions were diluted with 2 ml phosphate-buffered saline(PBS) and centrifuged at 350 \times g for 10 minutes. The supernatant was then harvested. VEGF levels in the supernatants were measured by ELISA.

VEGF were significantly lower in the DEX10⁻⁶DEX treated group compared to non-DEXtreated group.

Conclusions:

VEGF plays an important role in the selective recruitment of eosinophils in Enp. Dex may inhibit nasal polyp growth local reguration of decreased VEGF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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： 好酸球性副鼻腔炎 VEGF デキサメタゾン 鼻茸線維芽細胞 eotaxin

1. 研究開始当初の背景

20世紀末に導入された内視鏡下鼻内副鼻腔手術(ESS)による手術療法と14員環系マクロライドの少量長期投与療法との併用は、慢性副鼻腔炎の治療成績を著しく向上させている。しかし最近、副鼻腔粘膜及び鼻茸への著しい好酸球浸潤を認める難治例が問題となっている。副鼻腔粘膜及び鼻茸に好酸球が著明に浸潤した副鼻腔炎は、本邦では好酸球性副鼻腔炎と呼ばれている。臨床的には、本症に成人発症の感染型喘息を合併した例が多いことが大きな特徴の1つである。好酸

球性副鼻腔炎に対してはステロイド投与が有効であるが、これに代わる内服治療は現時点で存在せず、難治性の疾患である。以前われわれは、好酸球性副鼻腔炎のヒト鼻茸線維芽細胞が産生するeotaxinが好酸球の遊走活性に重要な役割を担っていることを明らかにした。気管支喘息患者ではVEGFは気道浮腫をきたす最も有力なサイトカインの1つとして考えられている。VEGFは、血管内皮細胞の増殖および、血管透過性の亢進という生理活性を有し、腫瘍細胞の低酸素下での成長に不可欠と考えられており、気管支喘息モデ

ルのマウスを用いた研究により、CysLT 受容体拮抗薬により VEGF の発現は抑制されるとの報告や、気管支喘息患者では、喀痰中の VEGF が増加しており、VEGF 産生量と気道閉塞は相関しているとされ、Pranlukast hydrate 内服中の気管支喘息患者では、喀痰中の VEGF 産生を減少させたとの報告がある。一方、ヒト鼻茸由来培養線維芽細胞を用いた研究では、低酸素下でのエンドトキシン刺激では VEGF の有意な産生の増加を認め、副鼻腔炎粘膜局所でも同様に、血管増生と炎症細胞の動員が行われている可能性があるという報告や、ヒト鼻茸由来培養線維芽細胞においてマクロライドが VEGF 産生を減少させたという報告もある。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は鼻茸において 毛細血管や基底膜の透過性を調節し、浮腫や鼻茸の増大に関与しているといわれている。線維芽細胞からの VEGF 産生は、低酸素刺激、エンドトキシンそして TNF- α 刺激により増加するといわれている。また、鼻汁は鼻粘膜の炎症状態を反映し、粘膜疾患の発生に関与しているとの報告もある。

2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎症例のヒト鼻茸の線維芽細胞を対象として好酸球の遊走、活性化についての検討を行い、そのメカニズムを明らかにすることで治療戦略となる因子を見出す。接着分子、ケモカイン、サイトカイン、好酸球のレセプターがその標的になると予想される。培養細胞を用いての薬物による接着分子、ケモカイン、サイトカインを標的とした抑制効果を測定し、好酸球性炎症におけるこれらの薬理作用を明らかにし、新たな薬理作用を見出し効果を証明する。

好酸球性浸潤の高い鼻茸と浸潤の低い鼻茸

における鼻茸線維芽細胞の産生する VEGF 濃度、免疫染色を施行し差異があるかにつき比較検討することを目的とした。

3. 研究の方法

当教室では、好酸球局所浸潤に関わる因子として、鼻粘膜血管内皮細胞が炎症刺激にて VCAM-1 の発現を増加させ、また鼻粘膜の線維芽細胞も VCAM-1 を発現することを報告し、また、好酸球浸潤の多い鼻茸と好酸球浸潤の少ない鼻茸における鼻茸から線維芽細胞を培養し、培養細胞に TNF- α 、IL-4 刺激を加えることで好酸球浸潤の多い鼻茸では、eotaxin の発現が有意に更新していることを報告した。このような当科にて確立された実験システムをもちいて研究を行う。

対象症例：研究を開始する 1 ヶ月前までに鼻噴霧用ステロイド、経口ステロイド、抗アレルギー薬などの、鼻茸における好酸球の動態に影響する薬物投与がなされている症例は除外する。

(1) 固有鼻腔に存在する鼻茸を生検し H-E 染色後、病理組織学的検討を行い、炎症細胞浸潤の最も強い部分を 200 倍で無作為に 5 箇所を顕鏡し、一視野 (0.785mm²) の平均好酸球数が 60 以上を Enp (Eosinophilic Nasal Polyp)、60 以下を NEnp (Non-Eosinophilic Nasal Polyp) と分類した。

(2) 患者 10 名の第 3 世代ヒト鼻茸由来線維芽細胞を使用した。48 時間培養後に DEX (10⁻⁶mol, 10⁻¹⁰mol) にて前処置を行い、その後、さらに 24 時間培養したのちに LPS 刺激を行い、その 24 時間後に上清を採取し ELISA にて測定した。

(3) VEGF の免疫染色を行い線維芽細胞の染色程度をスコア化し検討した。

4. 研究成果

Enp 群では NEnp 群と比較して、LPS 刺激による線維芽細胞の VEGF 産生は有意に上昇していた。DEX (10^{-6} mol) により VEGF 産生は有意に抑制された。VEGF の免疫染色において、線維芽細胞は Enp 群では NEnp 群と比較して有意に強く染まっていた。Enp は NEnp と比較して VEGF 産生をする線維芽細胞数が多く、また LPS 刺激などの外因因子が作用することで VEGF 産生がより高い結果であった。VEGF 産生が高いことは鼻茸の発生の一因である可能性があると思われた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①吉福孝介

第 112 回 日本耳鼻咽喉科学会総会

ヒト鼻茸線維芽細胞の eota xin 産生に対するステロイドの影響

(2011年5月20日 京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉福 孝介 (YOSHIFUKU KOUSUKE)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：70381168