

低酸素下 LPS 刺激による鼻茸線維芽細胞の VEGF とケモカイン

松 根 彰 志 宮之原 郁 代 大 城 浩

牛 飼 雅 人 黒 野 祐 一

鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室

松 尾 克 彦

東亜合成(株) バイオサイエンス研究部

Vascular Endothelial Growth Factor and Chemokines from Nasal Fibroblasts by Stimulation of Hypoxia and Lipopolysaccharide

Shoji MATSUNE, Ikuyo MIYANOHARA, Hiroshi OHSHIRO, Masato USHIKAI, Yuichi KURONO

Department of Otolaryngology Kagoshima University, Faculty of Medicine

Katsuhiko MATSUO

Toagosei, Tsukuba Research Laboratory

Hypoxia and bacterial components in the effusion in sinus cavities have been thought to be important etiological factors of chronic sinusitis. This experimental study by cultured fibroblasts from human nasal polyps revealed that hypoxic condition significantly induced hyperproduction of vascular endothelial growth factor (VEGF), and that additional stimulation by lipopolysaccharide (LPS) significantly increased the production of RANTES and IL-8. These results suggest the mechanism of recruitment of leukocytes after increased neovascularization and vascular permeability in sinus mucosa under hypoxic condition.

はじめに

副鼻腔炎の発症と遷延化には、副鼻腔自然孔の狭小化、閉鎖¹⁾による副鼻腔の低酸素状態や貯留液中のエンドトキシンが深く関与していると考えられる^{2,3)}。そこで、今回、炎症時の粘膜における血管増殖や細胞遊走に深く関与していると考えられる血管内皮増殖因子 (VEGF)⁴⁾やケモカインの低酸素下、LPS 刺激下における

動態を検討するために当科で確立しているヒト鼻茸由来培養線維芽細胞を用いて検討を行ったので報告する。

対象と方法

当科で既に継代培養確立されているヒト鼻茸由来線維芽細胞を低酸素状態、LPS 刺激にて培養を行った。線維芽細胞を Gas Pak Pouch Anaerobic System (Becton Dickinson and

Company, Maryland USA) にて (a) 低酸素下に培養した。さらに, (b) 低酸素下に *H. Influenzae* nontapable LPS 5 μ g/ml で刺激を加え培養した。 (a), (b)ともに培養開始後, 9 時間後, 36 時間後に培養上清を採取し, VEGF, Eotaxin, RANTES, IL-8 の定量を行った。 VEGF は, chemiluminescence Enzyme Immunoassay 法 (東亜合成)⁵⁾により測定された。また, Eotaxin, RANTES, IL-8 は, 各々 BioSource International, Inc USA, Chemicon International, Inc USA, R&D Systems, Inc USA の ELISA キットを用いて測定を行った。

結 果

低酸素下では, VEGF のみが有意な上昇が見られた (Fig. 1)。低酸素下に LPS 刺激を加えることにより, RANTES, IL-8 が有意に上昇した。しかし, 低酸素下に有意に上昇した

VEGF は LPS 追加刺激の有無では有意な差を認めなかった (Fig. 2)。Eotaxin は測定可能値以下であった。

考 察

副鼻腔炎手術例における術中の上顎洞内酸素分圧の測定より, 副鼻腔炎例では副鼻腔内に 30 から 80mmHg 程度の幅をもって低酸素が存在することをこれまでに報告してきた。また, 副鼻腔内貯留液の検討より, 菌検査の結果に関係なく高率に LPS が検出されることも報告してきた。一方, 炎症巣の粘膜では, 病理組織学的に種々の白血球の浸潤, 遊走などの所見を認め, 各種ケモカインの関与があると考えられる。

そこで今回, 低酸素下に LPS が, 血管増殖や炎症細胞の局所への動員にいかに関与しているかを検討するために, ヒト鼻茸由来の培養線維芽細胞を用いて検討を行った。まず, 低酸素

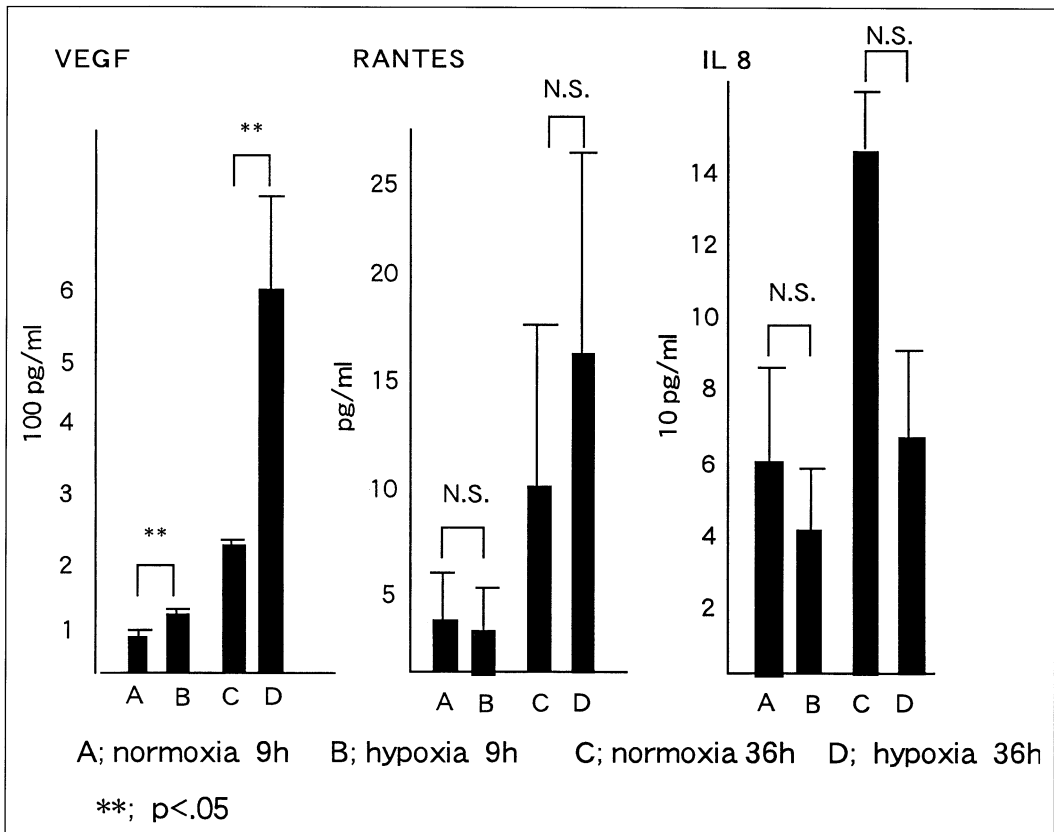


Fig. 1 Influence of Hypoxia

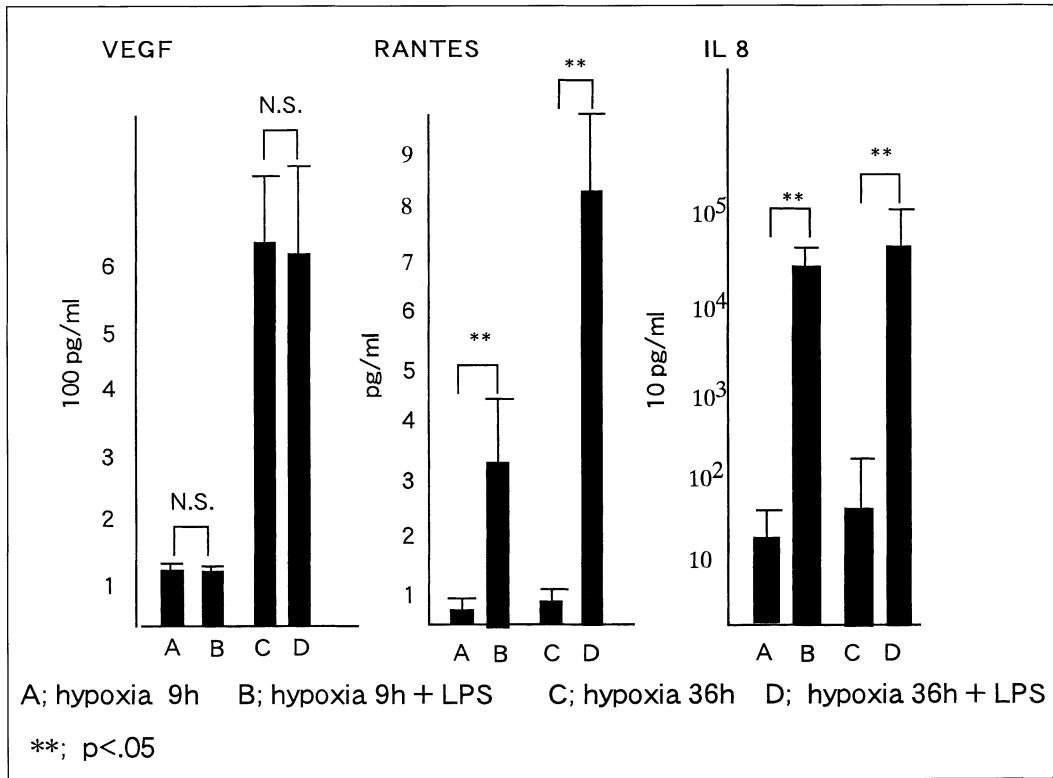


Fig. 2 Influence of Hypoxia and LPS

刺激は、ケモカインの産生増加よりも VEGF の産生増加に関与し、局所粘膜での血管増生や透過性亢進をひき起していると考えられた。次に低酸素下での LPS 刺激は、単球、T 細胞、好塩基球、好酸球の遊走に関与した CC ケモカインの 1 種である RANTES[®] や、好中球、T 細胞の遊走に関与した CXC ケモカインの 1 種である IL-8⁷⁾ の産生増加を促進した。しかし、RANTES と同じ CC ケモカインの 1 種で、好酸球の遊走に関与した Eotaxin[®] の産生は本実験系では認められず、LPS 刺激による変化も見られなかった。

以上より、副鼻腔内は自然孔の狭小化、閉塞により低酸素状態となり、VEGF の産生増加による血管増生と透過性の亢進がおり、炎症細胞の局所への動員にとって有利な条件ができると考えられる。そこへ感染を契機に生菌そのものによる症状のみならず、菌体除去後も長く

停留する LPS などの菌体成分により、ケモカインの産生亢進が促され炎症細胞の本格的な局所への動員がなされると考えられる。

今後はさらに、LPS 単独刺激では NF- κ B の活性化を経て IL-8 の産生がなされることが既に報告されているが⁷⁾、低酸素、LPS の各因子が異なる細胞内情報伝達系を活性化する可能性について検討し、各々の細胞レベルでの制御を解明する必要がある。

ま と め

副鼻腔炎の発症と遷延化には、副鼻腔内での低酸素、菌体成分の滞留による影響が考えられ、ヒト鼻茸由来培養線維芽細胞を用いて検討したところ、低酸素下での VEGF 産生亢進、LPS 刺激下での RANTES、IL-8 の産生亢進が認められた。これらの結果は、実際に副鼻腔炎症粘膜でおこっている血管増生や透過性の亢進とそれに続く白血球の動員のメカニズムを示唆する

ものと考えられた。

参 考 文 献

- 1) Maeyama T : A study of experimental sinusitis in rabbits. *Auris Nasus Larynx* (Tokyo) 8 : 87-98, 1981.
- 2) 前山拓夫, 大山 勝 : 感染症の実験モデルと化学療法. 抗生物質からの化学療法の領域. 1 : 85-3-861, 1985.
- 3) 松根彰志 : 家兔副鼻腔自然孔の機能形態学的研究 — 三次元的微小血管構築の観察と病態組織化学的検索を中心に —. *耳鼻臨床* (補 26) : 48-63, 1988.
- 4) 松根彰志, 井手章子, 松尾克彦 他. 鼻副鼻腔炎症性疾患における血管内皮細胞増殖因子に関する予備的研究. *耳鼻免疫アレルギー* 17 (1) : 12-16, 1999.
- 5) Hanatani M, Tanaka Y, Kondo S et al. Sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human serum. *Biosci Biotech Biochem* 59 : 1958-9, 1995.
- 6) Schall TJ, Bacon K, Toy KJ et al. Selective attraction of monocytes and T lymphocyte of the memory phenotype by the cytokine RANTES. *Nature* 347 : 669-671, 1990.
- 7) Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y et al. Molecular mechanism of interleukin 8 gene expression. *J Leukoc Biol* 56 : 554-558, 1994.
- 8) Ponath PD, Qin S, Ringler DJ et al. Mackay. Cloning of human eosinophil chemoattractant, eotaxin. *J Clin Invest* 97 : 604-612, 1996.

質 疑 応 答

質問 山中 昇 (和歌山県立医大)

副鼻腔では実際にどの程度の Hypoxia になるのか。

応答 松根彰志 (鹿児島大)

一番低い例では, 30~40mmHg 程度です。

正常例では 150~160 mmHg で, 中間程度の別鼻腔炎例もあります。

連絡先: 松根 彰志
〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1
TEL 099-275-5410 (直通)