

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10788

研究課題名(和文) ヒト鼻粘膜上皮におけるtricellular junctionの形態・機能解析

研究課題名(英文) Analyses of morphology and function for tricellular junction in human nasal epithelial cells

研究代表者

大國 毅 (Okuni, Tsuyoshi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40464490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、病原体の侵入防御システムをもつヒト鼻粘膜上皮で、tricellular junctionの微細構造の形態・機能を解析し、上皮バリアへの影響を調べた。ヒト鼻粘膜組織ではトリセルリン、LSRが上皮細胞最頂部に局在、またASPP familyに関連する上皮極性分子PAR3の発現を認めた。ヒト鼻粘膜上皮細胞ではトリセルリン、LSR、ASPP2、PAR3の発現低下で上皮バリア機能が低下した。Capcisinを処置により、LSRの局在変化を認めた。以上より、tricellular junctionに発現するトリセルリン、LSRは、様々なタイト結合関連分子と相互作用し上皮バリアを調節していた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the roles of epithelial barrier at tricellular contact of human nasal epithelium by analyses of morphology and function for tricellular junctions. In normal human nasal mucosa tissues, tricellulin and LSR regulated the tricellulin and tricellular contact, expressed at the apicalmost of nasal epithelium. In PCR analysis, not only tricellulin and LSR but also ASPP2 family ASPP1 and ASPP2 interacted with LSR, and PAR3 bind ASPP2 were observed in normal human nasal mucosa tissues. Knockdown of tricellulin or LSR by the siRNAs decrease the epithelial barrier function. When the nasal epithelial cells were treated with Capcisin, Capcisin induced the localization change of LSR from bicellular region to tricellular region. Taken together, tricellular tight junction molecules tricellulin and LSR formed tricellular junctions may play crucial roles of human nasal epithelial barrier via the interactions with various tight junction-related molecules.

研究分野：鼻科学

キーワード：human nasal epithelium epithelial barrier tricellulin LSR Capcisin

1. 研究開始当初の背景

病原体の侵入防御システムを持つヒト鼻粘膜上皮は、細胞間接着装置であるタイト結合が一部上皮バリアを担っている。鼻粘膜上皮細胞をはじめとして、上皮シートには、2細胞間タイト結合と中心にcentral tubeを有する3細胞間タイト結合が存在するが、ヒト鼻粘膜上皮細胞の3細胞間タイト結合の構造・機能については、報告が少なくよく分かっていない点が多い。さらに最近LSRは、tricellulinの局在を調節するだけでなく、apoptosis stimulating proteins of p53 (ASPP) familyであるASPP2と相互作用をもち、そのASPP2は極性分子であるPAR3との結合もみられている。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト鼻粘膜上皮におけるtricellular junctionの形態・機能解析を行い3細胞間隙の上皮バリアの役割を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 手術で得られたヒト鼻粘膜組織のtricellulin, LSR, ASPP2, PAR3の発現・局在を免疫染色で、mRNAの発現をPCRで解析する。さらにCD11c陽性樹状細胞と上皮細胞の3細胞間タイト結合分子との関係も調べる。

2) 手術で得られたヒト鼻粘膜組織より分離・培養した培養ヒト鼻粘膜上皮細胞のtricellulin, LSR, ASPP2, PAR3の発現・局在を免疫染色で調べる。

3) 培養ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて、siRNAによりtricellulin, LSR, ASPP2, PAR3の発現を低下した時の上皮バリアの変化および他のタイト結合分子の変化を解析する。

4) 培養ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて、LSRの機能阻害作用をもつAngubindin-1を処置して、上皮バリアの変化およびタイト結合分子の変化を解析する。

5) 培養ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて、上皮バリア機能の低下を起こすことが知られているCapcisinおよびSodium Caprateを処置してtricellulin, LSR, ASPP2, PAR3の発現・局在変化を調べる。

6) LSRを標識するmKate2-LSRの遺伝子ベクターを作製し培養ヒト鼻粘膜上皮細胞に導入し、LSRがlive imageが可能な鼻粘膜上皮細胞を確立する。

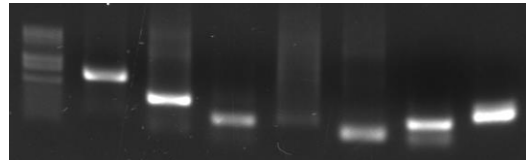
4. 研究成果

1) 正常ヒト鼻粘膜組織において、免疫染色によりtricellulin, LSR, ASPP2, PAR3が、上皮細胞の最頂部にみられた。一部の

CD11c陽性樹状細胞の樹状突起が、tricellulinおよびLSRを越えてみられた。PCRにおいても、正常ヒト鼻粘膜組織にtricellulin, LSR, ASPP2, PAR3のmRNAの発現が認められた。

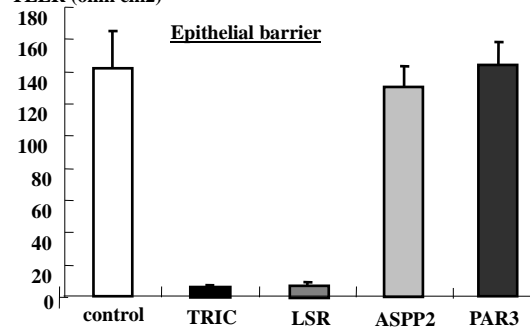
PCR

M G3PDE ASPP1 ASPP2 iASPP2 PAR3 LSR



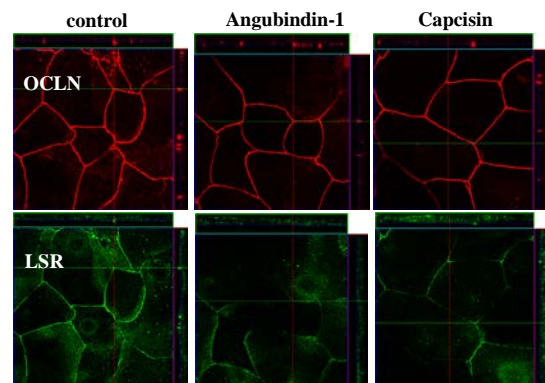
2) 培養正常ヒト鼻粘膜上皮細胞においては、tricellulin, LSR, ASPP2およびPAR3の発現が3細胞間だけでなく2細胞間にもみられた。培養正常ヒト鼻粘膜上皮細胞にsiRNAを用いて、tricellulin, LSR, ASPP2, PAR3の発現をそれぞれ低下させた結果、tricellulinおよびLSRの発現低下により上皮バリア機能の低下が認められた。さらにLSRの発現低下は2細胞間のタイト結合分子claudin-1, -4の発現亢進を誘導した。

TEER (ohm cm2)



3) LSRの機能阻害作用をもつAngubindin-1を処置した結果、LSRの発現低下および上皮バリア機能の低下がみられた。

4) 鼻粘膜上皮バリア機能の低下を起こすことが知られているCapcisinおよびSodium Caprateを処置した結果、Capcisin処置において、LSRの2細胞間から3細胞間への移行がみられた。



以上のことは、tricellular junctionを形成する3細胞間タイト結合分子tricellulinおよびLSRは、ヒト鼻粘膜上皮バリアにおいて様々なタイト結合関連分子と相互作用により重要な役割を担っていることが分かった。ヒト鼻粘膜上皮のtricellular junctionを調節することは、鼻粘膜上皮を介したDrug delivery systemに繋がると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kaneko Y, Kohno T, Kakuki T, Takano KI, Ogasawara N, Miyata R, Kikuchi S, Konno T, Ohkuni T, Yajima R, Kakiuchi A, Yokota SI, Himi T, Kojima T. The role of transcriptional factor p63 in regulation of epithelial barrier and ciliogenesis of human nasal epithelial cells. Sci Rep. 2017 7:10935 (査読あり)
2. Miyata R, Kakuki T, Nomura K, Ohkuni T, Ogasawara N, Takano K, Konno T, Kohno T, Sawada N, Himi T, Kojima T. Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells. Eur J Pharmacol. 2015 761:375-382. (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

1. 小島隆、金子躍人、金野匠、角木拓也、高野賢一、菊池真、矢島諒人、大國毅、氷見徹夫、幸野貴之 ヒト鼻粘膜上皮バリアにおけるp63の役割 2017年生命科学系学会合同年次大会 12月6-9日 2017年
2. 山本圭祐、小笠原徳子、大國毅、高野賢一、堤裕幸、氷見徹夫 ウイルス感染症での鼻粘膜上皮における細気管支炎・喘鳴の発症予測因子としての鼻汁microRNAの可能性 第118回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会 5月17-20日

2017年

3. 大國毅、白崎英明、近藤敦、黒瀬誠、高野賢一、亀倉隆太、伊藤史恵、氷見徹夫 唾液腺原発悪性リンパ腫症例の検討 第30回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会 9月7-8日 2017年
4. 金子躍人、角木拓也、高野賢一、大國毅、菊池真、幸野貴之、氷見徹夫、小島隆 p63によるヒト鼻粘膜上皮バリアの調節機構 第35回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 4月13-15日 2017年
5. 大國毅、白崎英明、高野賢一、野村一顕、山本圭祐、氷見徹夫 当科における鼻副鼻腔乳頭腫症例の検討 第55回日本鼻科学会総会・学術講演会 10月13-15日 2016年
6. 高野賢一、金子躍人、角木拓也、野村一顕、大國毅、氷見徹夫 鼻粘膜上皮細胞におけるp63の新たな役割の検討 第54回日本鼻科学会総会・学術講演会 10月1-3日 2015年
7. 大國毅、野村一顕、才川悦子、高野賢一、関伸彦、氷見徹夫 前頭洞を占拠する鼻副鼻腔乳頭腫症例の検討 第54回日本鼻科学会総会・学術講演会 10月1-3日 2015年

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

(1) 研究代表者

大國 毅 (OKUNI TSYOSHI)
札幌医科大学・耳鼻咽喉科学講座・助教
研究者番号：40464490

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：