

機関番号：20101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791626

研究課題名 (和文) ヒト鼻粘膜上皮M細胞の機能解析および分化誘導：鼻粘膜 DDS を介する新しい治療戦略

研究課題名 (英文) Functional analysis and differentiation induction of M cell in human nasal epithelial cells: a new treatment strategy via DDS in nasal mucosa

研究代表者

郷 充 (GO MITSURU)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80448604

研究成果の概要 (和文)：鼻咽腔・鼻粘膜は，外来病原体に対する生体防御の最前線に位置し，その粘膜は，自然免疫，獲得免疫において重要な役割を担っている．われわれは，感染アレルギーの免疫機構解明のため，ヒト鼻咽腔粘膜上皮・鼻粘膜上皮における抗原提示機構と上皮バリア機能を解析する研究をおこなった．

成果の概要 (英文)：Nasopharynx and nasal mucosa are located at the forefront of the host defense against foreign pathogens, which plays an important role in acquired immunity and innate immunity. To elucidate the immune system of allergy infection, we analyzed the mechanism of epithelial barrier function and antigen presentation in the nasal epithelium of human nasopharyngeal epithelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：耳鼻咽喉学、アレルギー、鼻粘膜

## 1. 研究開始当初の背景

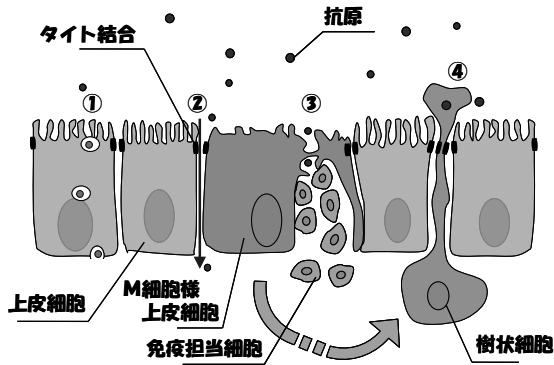
- (1) 日本国民の 4 人に 1 人が花粉症を発症し，また世界的にもインフルエンザや S A R S をはじめとする感染の流行などで，感染アレルギーの予防および治療はますます重要になってくるものと考えられる．上気道特に鼻粘膜上皮の生体防御機構の解明と，より有効な治療法の確立が社会的に急務となってきた。
- (2) 鼻腔，咽頭を含めた上気道は，外来病原体に対する生体防御の最前線に位置し，その粘膜は，自然免疫，獲得免疫において重要な役割を担っている．ヒト鼻粘膜上皮は，発達したタイト結合による上皮

バリア機能を有し，抗原取り込み機構については，鼻咽腔リンパ装置 (NALT) 同様，抗原提示細胞である樹状細胞および M 細胞の関与が考えられている．

## 2. 研究の目的

- (1) アレルギーや感染症の発症後早期での抗原の取り込みにおいては，粘膜の樹状細胞や M 細胞 (microfold cell) がそれらの主役を担っていると考えられている．ここでは咽頭扁桃の M 細胞を指標にして，鼻粘膜組織および培養鼻粘膜上皮細胞を用いて，鼻粘膜上皮の M 細胞の同定，分離および分化誘導を行う。

- (2) 鼻粘膜上皮のM細胞の特異的タイト結合蛋白の発現を検索し、最終的にはヒト鼻粘膜上皮における抗原提示機構(M細胞, 樹状細胞)と上皮のバリア機能との関係を明らかにする。



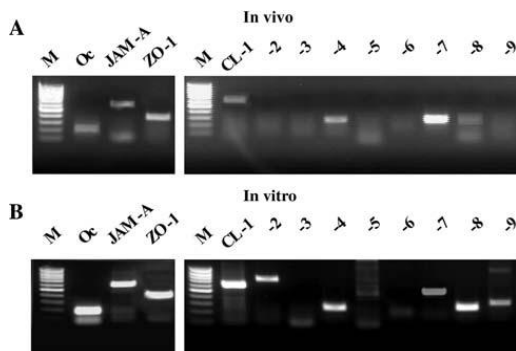
- (3) 鼻粘膜の機能と炎症時の病態を詳細に検討し、その中から粘膜自体を治療のターゲットとする可能性を見出す。

### 3. 研究の方法

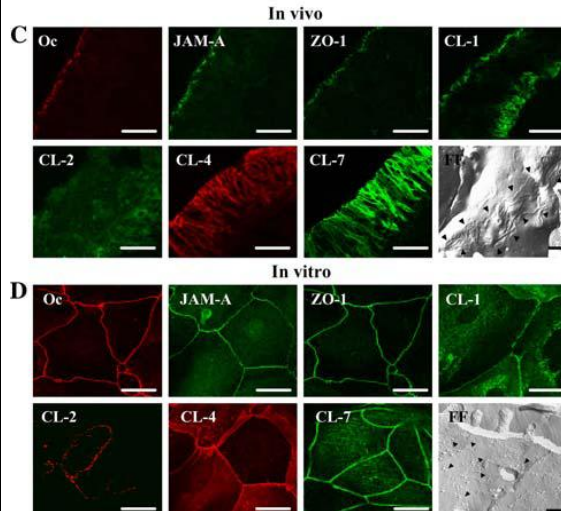
- (1) 正常およびアレルギー性鼻炎におけるヒト鼻粘膜組織におけるM細胞の同定とタイト結合蛋白の発現解析
- (2) ヒト扁桃上皮を陽性対象として、正常ヒト鼻粘膜上皮におけるM細胞をCk20, UEA-1, Vimentin, Annexin-V, TLR2, TLR9などのM細胞特異抗体を用いて免疫染色, 免疫電顕を用いて同定し, アレルギー性鼻炎の鼻粘膜上皮と発現率を比較検討する。
- (3) M細胞のマーカーとしてサイトケラチン20(Ck20)を用いた免疫電子顕微鏡を用いた検討をおこなう。

### 4. 研究成果

- (1) ヒト咽頭扁桃上皮におけるタイト結合蛋白 mRNA の発現  
組織学的検討では, occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -4, -7, -8 の発現 (Fig. A) が認められ, vitro (初代培養) では occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -2, -4, -7, -8, -9 の発現が認められた (Fig. B)。

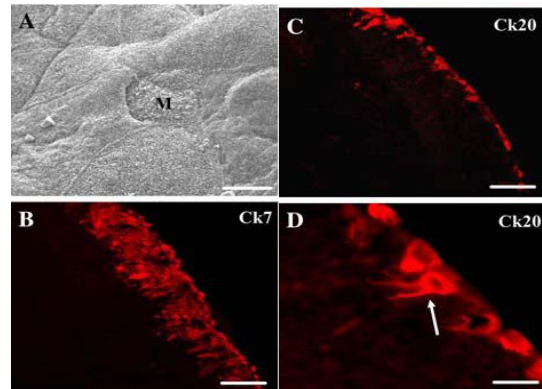


免疫染色においては培養咽頭扁桃細胞で occludin, JAM-A, ZO-1 の発現が最表層に認められ, Claudin-1 は表層から基底膜にかけて発現していたが claudin-2 は発現が認められなかった。一方で claudin-4, -7 は上皮全体に発現していた (Fig. C)。 vitro においては occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -4, -7 は細胞間隙に発現していた (Fig. D)。

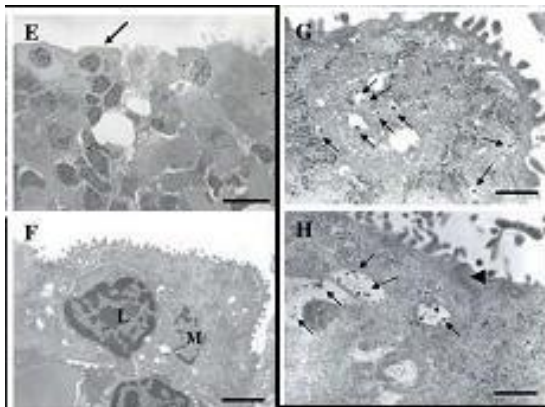


- (2) ヒト咽頭扁桃組織における Ck-20 陽性細胞の発現

走査形電子顕微鏡ではM細胞は不規則な microvilli を有する (A)。 Ck7 (B) および Ck20 (C, D) の免疫染色においては Ck20 陽性細胞はポケット状の形態を有する。



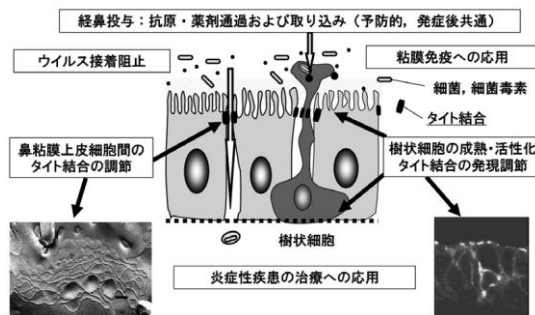
加えて、透過型電子顕微鏡 (E-H)のうち、抗 Ck20 抗体を用いた免疫電子顕微鏡では Ck20 陽性の金粒子が microvilli を有する細胞に取り込まれるのが確認される (G, H)。



矢印; 金コロイド (12nm), 太矢印; 細胞間接着構造, L; リンパ球, M; M 細胞

(3) 本研究課題の成果, 今後の展望

本研究では, 鼻粘膜上皮は機械的バリアだけでなく, 「粘膜免疫機構」という自然免疫・獲得免疫を成立させるための重要な「免疫臓器」であることを示した。特に, タイト結合と樹状細胞や M 細胞との関係は, 上皮細胞の役割のうち古典的な抗原感知・移送という概念とは異なる新しい抗原サンプリング機構の存在を確認し, 鼻粘膜を介した, すなわち, 経鼻投与による炎症制御の可能性が示された。今後はさらに研究を進め, 将来的な経鼻投与による感染予防や発症抑制機構の解明に寄与したい。(下図)



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 9 件)

① Kondoh A, Takano KI, Kojima T, Ohkuni T, Kamekura R, Ogasawara N, Go M, Sawada N, Himi T. Altered expression of claudin-1, claudin-7, and tricellulin regardless of human

papilloma virus infection in human tonsillar squamous cell carcinoma. Acta Otolaryngol. Epub 2011 Apr 11, 査読有.

② Ogasawara N, Kojima T, Go M, Takano K, Kamekura R, Ohkuni T, Koizumi J, Masaki T, Fuchimoto J, Obata K, Kurose M, Shintani T, Sawada N, Himi T. Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human adenoids. Acta Otolaryngol. 2011 Feb;131(2):116-23. Epub 2010 Nov 9, 査読有.

③ 小笠原徳子, 郷 充, 高野賢一, 氷見徹夫: 扁桃の免疫機能と病態 抗原提示経路としての扁桃上皮の役割. 小児耳鼻咽喉科 31 卷 3 号 Page244-247, 2010, 査読有.

④ Ogasawara N, Kojima T, Go M, Ohkuni T, Koizumi JI, Kamekura R, Masaki T, Murata M, Tanaka S, Fuchimoto J, Himi T, Sawada N. PPARgamma agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells. Pharmacol Res. 61 (2010) 489-498, 査読有.

⑤ Kamekura R, Kojima T, Takashima A, Koizumi J, Ogasawara N, Go M, Takano K, Murata M, Tanaka S, Ichimiya S, Himi T, Sawada N. Thymic stromal lymphopoietin induces tight junction protein claudin-7 via NF-kappaB in dendritic cells. Histochem Cell Biol. 2010 Mar;133(3):339-48, 査読有.

⑥ Kamekura R, Kojima T, Koizumi JI, Ogasawara N, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Himi T, Sawada N. Thymic stromal lymphopoietin enhances tight-junction barrier function of human nasal epithelial cells. Cell Tissue Res. 2009 Nov; 338(2):283-93. Epub 2009 Sep 9, 査読有.

⑦ Ogasawara N, Kojima T, Go M, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi JI, Ohkuni T, Masaki T, Murata M, Tanaka S, Ichimiya S, Himi T, Sawada N. Induction of JAM-A during differentiation of human THP-1 dendritic cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Nov 20;389(3):543-9. Epub 2009 Sep 11, 査読有.

⑧ Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Ninomiya T, Kikuchi S, Go M, Takano K, Himi T, Sawada N. Expression and localization of tricellulin in human nasal epithelial cells in vivo

and in vitro. Med Mol Morphol. 2009 Dec;42(4):204-11. Epub 2009 Dec 24, 査読有.

- ⑨ 氷見徹夫, 郷 充, 近藤敦, 高野賢一, 正木智之, 小泉純一, 亀倉隆太, 大國毅, 小笠原徳子, 小島隆, 澤田典均: ヒト鼻粘膜の機能解析から見えてくること. 耳鼻咽喉科展望 52(補1) 9-18, 2009, 査読有.

[学会発表] (計2件)

- ① Go M, Kojima T, Takano KI, Kurose M, Ohkuni T, Masaki T, Kamekura R, Kondo A, Ogasawara N, Himi T, Sawada N. EXPRESSION AND FUNCTION OF TIGHT JUNCTIONS IN THE CRYPT EPITHELIUM OF HUMAN PALATINE TONSILS. 7th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways. July 7-9, 2010. Asahikawa, JAPAN
- ② 小笠原徳子, 小島 隆, 郷 充, 亀倉隆太, 高野賢一, 大國 毅, 正木智之, 澤田典均, 氷見徹夫. 核内受容体 PPAR $\gamma$  を介したヒト鼻粘膜上皮細胞, 樹状細胞のタイト結合の調節機構: アレルギー性鼻炎の予防・治療のための基礎研究. 第27回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2009年2月12日, 千葉県

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

郷 充 (GO MISTURU)  
札幌医科大学医学部 助教  
研究者番号: 80448604

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし