

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390436

研究課題名（和文） 鼻咽腔上皮細胞と樹状細胞のクロストークによる炎症調節機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of relationship in immune barrier function between human nasal epithelial cell and dendritic cell.

研究代表者 氷見 徹夫（HIMI TETSUO）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90181114

研究成果の概要（和文）：

ヒト鼻粘膜の免疫学的バリア機能の検討に手術的に得られたヒトの初代培養細胞を用いることは、上気道での炎症調節機構を解析するための重要な方法論である。タイト結合は、粘膜からの物質の透過性や抗原の取り込み調節に重要な働きをしている。粘膜にも抗原提示のための樹状細胞がある。近年、上皮細胞は疾患の発症に重要であることが分かってきた。すなわち、抗原提示細胞である上皮内の樹状細胞との相互作用を検討することは上気道でのアレルギー性炎症や感染症の病態を解明するために重要であり、この研究からその基礎的意義が解析できた。

研究成果の概要（英文）：

Analysis of a immune barrier function with primary culture system of human nasal mucosa epithelium is important to establish a methodology of inflammation control by trans-nasal administration. Tight junction is one of an important factor contributing to permeability of a material, and it is important to study a factor regulating this function. Furthermore, examination of immunocompetent cell about an antigen sampling such as dendritic cell contributes to establish the mechanism of immune therapy for allergic rhinitis or upper respiratory infection by trans-nasal administration.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 6,800,000  | 2,040,000 | 8,840,000  |
| 2008年度 | 2,800,000  | 840,000   | 3,640,000  |
| 2009年度 | 2,800,000  | 840,000   | 3,640,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 12,400,000 | 3,720,000 | 16,120,000 |

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：鼻粘膜，上皮細胞，タイト結合，樹状細胞，抗原提示細胞，サイトカイン，アレルギー性鼻炎

## 1. 研究開始当初の背景

鼻粘膜上皮は気道防御機構の最前線に位置し、外来抗原や病原体に常に暴露されている。特に、ヒト上皮系細胞を用いた研究は種々の治療戦略と関連性があり、臨床応用への近道となる方法論である。

### (1) テロメラゼ遺伝子導入培養ヒト鼻粘膜上皮細胞系の確立

この延命化に成功した初代培養ヒト鼻粘膜上皮細胞の実験系を確立したことは非常に重要である。それは、生体内の病態に近いという点ではヒト初代培養細胞に勝るものはないからである。気道上皮における生体防御機構の研究では、初代培養細胞と細胞株でのデータに違いがある。それゆえに、上皮細胞を用いた病態・治療評価の可能性を検討するには細胞株の検討だけでは不十分と思われる。

(2) 鼻粘膜における自然・獲得免疫機構  
一方、自然免疫系では「抗原のサンプリング」「樹状細胞とのクロストーク」の解析は鼻粘膜における自然免疫の解析にとどまらず、感染症やアレルギーについての発症機序を解析でき、治療戦略への応用が可能となる。アレルギー発症に重要な「上皮特有のサイトカイン」TSLPの分析は、上皮細胞がアレルギー発症に重要であり、単なるバリア機能だけではない。そこで、この培養細胞系をアレルギー性鼻炎の発症抑制の評価に結び付けることを考えた。

## 2. 研究の目的

上皮は単なる機械的バリアを維持するにとどまらず、樹状細胞とのクロストークがナイーブT細胞に作用してTh2応答誘導を引き起こすことが次々と明らかになっている。この機能は、獲得免疫の中で粘膜上皮細胞の免疫機能が、従来の概念よりさらに重要な機能を持っていることを意味する。この研究では、新たに上皮細胞と樹状細胞との相互作用について検討する。まず、アレルギー性鼻炎にて鼻粘膜上皮で発現亢進を認めたサイトカイン(TSLP)の機能をさらに解析するため、樹状細胞とタイト結合への役割を解析する。マウスの樹状細胞株を用いたが、Claudin7が樹状細胞に発現し、TSLPがこのタイト結合タンパクの発現調節を担っているかどうかを確認した。さらに、シグナル伝達についてPKCシグナルがタイト結

合調節に重要であることを確認したため、アレルギー性鼻炎に関与する他の因子としてPPAR $\gamma$ とタイト結合についても解析を進めた。鼻粘膜上皮機能と樹状細胞の関係を探ることは、感染防御機構などの広い範囲の炎症調節機構の解明につながると考えている。

## 3. 研究の方法

ヒト鼻咽腔粘膜上皮の機能と抗原提示細胞、特に樹状細胞の解析を実施する。テロメラゼ活性化により初代培養ヒト鼻粘膜上皮細胞を延命化させた正常ヒト鼻粘膜上皮細胞株を主たる解析方法として用いた。アレルギー発症に重要なサイトカインであるTSLPを中心に解析し、種々の免疫組織学的、分子生物学的手法を用いて解析した。さらに、シグナル伝達機構についても各種の阻害薬を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 鼻咽腔粘膜初代培養系と樹状細胞との関係解析方法の確立：手術的に得られたヒト鼻粘膜から樹状細胞を分離して、不死化鼻粘膜培養系を用い樹状細胞との相互作用を解析できた。(Kurose M, et al. Cell Tissue Res 2007)

<培養ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いた上皮細胞の抗原サンプリング機能調整>抗原の透過性を規制するもののひとつがタイト結合であるため、タイト結合やバリア機能を調節する因子を見つけることも炎症制御に結びつく。パターン認識受容体、サイトカイン、シグナル伝達機構、核内受容体への作用物質によりタイト結合蛋白の誘導・抑制、バリア機能の制御が可能であることを見出した(Koizumi JI et al Mol Pharmacol 2008, Kamekura R et al. Cell Tissue Res. 2009, Kurose et al., Cell Tissue Res, 2007)。

(2) 培養ヒト鼻粘膜上皮とタイト結合、さらにアレルギー性鼻炎病態とのかかわり<鼻粘膜上皮産生サイトカイン(TSLP)と樹状細胞の関連>TSLPのアレルギー性鼻炎での機能をさらに解析するため、マウスの樹状細胞株を用いて、タイト結合発現調節機構をClaudin7を中心に解析を進めた。

<PPAR $\gamma$ の鼻粘膜上皮のタイト結合への影響>PPAR $\gamma$ は核内受容体であり、アレルギー性炎症を抑制することが知られている。そこで、このアゴニストを用いて上皮のタイト結

合調節を解析した。(Ogasawara N et al. Biochem Biophys Res Commun. 2009) これらの成果から、アレルギー疾患の発症機序の上皮から見たメカニズムの解析がなされたとともに、新たな Drug delivery system の開発の基礎的研究となった。

#### 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 22 件)

1. Thymic stromal lymphopoietin enhances tight-junction barrier function of human nasal epithelial cells. Kamekura R, Kojima T, Koizumi JI, Himi T, Sawada N Cell Tissue Res. 2009 338(2):283-93. 査読有
2. Induction of JAM-A during differentiation of human THP-1 dendritic cells Ogasawara N, Kojima T, Himi T, Sawada N. Biochem Biophys Res Commun. 2009 389(3):543-9. 査読有
3. Immunohistochemical localization of the bradykinin B1 and B2 receptors in human nasal mucosa. Shirasaki H, Kanaizumi E, Himi T. Mediators Inflamm. 2009; 2009:102406. 査読有
4. Accumulation of CRTH2-positive leukocytes in human allergic nasal mucosa. Shirasaki H, Kikuchi M, Kanaizumi E, Himi T. Ann Allergy Asthma Immunol. 2009 102(2):110-5. 査読あり
5. ヒト鼻粘膜の機能解析から見えてくること:氷見徹夫, 郷充, 高野賢一ほか 耳展 52: 補 1:9-18 2009 査読無
6. Preliminary study of proinflammatory cytokines and chemokines in the middle ear of acute otitis media due to Alloiococcus otitidis. Harimaya A, Fujii N, Himi T. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2009 73(5):677-80. 査読有
7. Protein kinase c enhances tight junction barrier function of human nasal epithelial cells in primary culture by transcriptional regulation. Koizumi J, Kojima T, Himi T, Sawada N. Mol Pharmacol, 74(2): 432-442 2008 査読有
8. 粘膜のバリアと抗原サンプリングー鼻粘膜を介した新たな治療戦略にむけてー郷充, 小島隆, 高野賢一, 澤田典均, 氷見徹夫. 耳展 51: 補 1: 32-38. 2008 査読無
9. Expression of tight junction proteins in epithelium including Ck20-positive

- M-like cells of human adenoids in vivo and in vitro. Takano K, Kojima T, Ogasawara N, Go M, Himi T, Sawada N. J Mol Histol, 39(3): 265-273. 2008 査読有
10. Expression of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic rhinitis : Induction of tight junction proteins in nasal epithelial cells and dendritic cells by epithelial-derived TSLP. Kamekura R, Kojima T, Go M, Himi T, Sawada N. Inflammation and Regeneration, 28(3): 160-165. 2008 査読有
  11. Platelet-activating factor (PAF) increases NO production in human endothelial cells-real-time monitoring by DAR-4M AM. Kikuchi M, Shirasaki H, Himi T. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 78(4-5): 305-309. 2008 査読有
  12. Transforming growth factor- $\beta$  induces epithelial to mesenchymal transition by down-regulation of claudin-1 expression and the fence function in adult rat hepatocytes. Kojima T, Takano K, Himi T, Sawada N. Liver Int, 28(4): 534-545 2008 査読有
  13. Detection of specific IgE antibodies in sera of Japanese birch-allergic patients using recombinant allergens Bet v 1, Bet v 2 and Bet v 4 Shirasaki H, Himi T. Allergol Int, 57(1): 93-96. 2008 査読有
  14. Tonsillar crypt epithelium of palmoplantar pustulosis secretes interleukin-6 to support B-cell development via p63/p73 transcription factors. Koshiha S, Himi T, Sato N. J Pathol, 214(1): 75-84. 2008 査読有
  15. アレルギー性鼻炎における鼻粘膜上皮バリアと免疫調節機構. 氷見徹夫, 郷充, 高野賢一, 他. アレルギーの臨床, 27(13): 1038-1043. 2007 査読無
  16. Induction of claudins in passaged hTERT-transfected human nasal epithelial cells with an extended life span. Kurose M, Kojima T, Himi T, Sawada N. Cell Tissue Res, 330(1): 63-74. 2007 査読有
  17. Agonist- and T(H)2 cytokine-induced up-regulation of cysteinyl leukotriene receptor messenger RNA in human monocytes. Shirasaki H, Seki N, Fujita M, Kikuchi M, Kanaizumi E, Watanabe K, Himi T. Ann Allergy Asthma Immunol, 99(4): 340-347.

2007 査読有

18. Interleukin-8 induction via NF-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways in human peripheral blood mononuclear cells by *Alloicoccus otitidis* Harimaya A, Koizumi J, Fujii N, Himi T. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 71(9): 1465-1470. 2007 査読有

19. Changes of gap and tight junctions during differentiation of human nasal epithelial cells using primary human nasal epithelial cells and primary human nasal fibroblast cells in a noncontact coculture system. Koizumi J, Kojima T, Kamekura R, Kurose M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. *J Membr Biol*, 218 (1-3) : 1-7. 2007 査読有

20. High prevalence of erythromycin resistance and macrolide-resistance genes, *mefA* and *ermB*, in *Streptococcus pneumoniae* isolates from the upper respiratory tracts of children in the Sapporo district, Japan. Harimaya A, Yokota S, Sato K, Yamazaki N, Himi T, Fujii N. *J Infect Chemother*, 13(4): 219-223. 2007 査読有

21. Capsaicin induces the production of IL-6 in human upper respiratory epithelial cells. Seki N, Shirasaki H, Kikuchi M, Himi T. *Life Sci*, 80(17): 1592-1597. 2007 査読有

22. アレルギー性鼻炎における鼻粘膜上皮バリアと抗原認識・提示機構. 氷見徹夫, 郷 充, 高野賢一, 黒瀬誠, 小泉純一, 亀倉隆太, 小島隆, 澤田典均. *臨床免疫・アレルギー科*, 47(4): 427-433. 2007 査読無

[学会発表] (計 17 件)

1. 白崎英明, 才川悦子, 氷見徹夫: 鼻アレルギー局所における GATA-3, T-bet, ROR $\gamma$  陽性細胞に関する免疫組織学的検討. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009 年 10 月 29-31 日, 秋田

2. 氷見徹夫 イントロダクション 鼻副鼻腔粘膜の病態解明と制御 —TLR を中心に— 第 45 回鼻科学基礎問題研究会 2009 年 10 月 1 日 松江

3. 正木智之, 小島 隆, 大國 毅, 小笠原徳子, 岡林環樹, 藤井暢弘, 堤 裕幸, 澤田典均, 氷見徹夫: ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いた RS ウイルス感染モデルの確立と上皮タイト結合への影響. 第 48 回日本鼻科学会.

2009 年 10 月 1-3 日, 島根

4. 亀倉隆太, 小島 隆, 高野賢一, 郷 充, 澤田典均, 氷見徹夫: 鼻粘膜上皮における IL-25 産生についての検討. 第 48 回日本鼻科学会. 2009 年 10 月 1-3 日, 島根

5. 白崎英明, 才川悦子, 氷見徹夫: 鼻アレルギー局所における GATA-3、T-bet 陽性細胞に関する検討. 第 48 回日本鼻科学会. 2009 年 10 月 1-3 日, 島根

6. 亀倉隆太, 小島 隆, 小笠原徳子, 大國 毅, 高野賢一, 郷 充, 澤田典均, 氷見徹夫: ヒト鼻粘膜上皮細胞と樹状細胞のタイト結合蛋白は thymic stromal lymphopoietin によって誘導される. 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2009 年 5 月 14-16 日、東京

7. 小笠原徳子, 小島 隆, 郷 充, 大國 毅, 正木智之, 村田雅樹, 田中 敏, 千葉英樹, 氷見徹夫, 澤田典均: 核内受容体 PPAR $\gamma$  を介したヒト鼻粘膜におけるタイト結合の発現調節機構. 第 98 回日本病理学会総会. 2009 年 5 月 1 日-3 日 京都

8. 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調節機構～アレルギー性鼻炎予防・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 12-14 日, 千葉

9. 小笠原徳子, 小島 隆, 郷 充, 亀倉隆太, 高野賢一, 大國 毅, 澤田典均, 氷見徹夫: ヒト鼻粘膜上皮細胞における PPAR- $\gamma$  を介したアレルギー性鼻炎の予防・治療のための基礎研究. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2008 年 11 月 27-29 日 東京都

10. 大國 毅, 小島 隆, 亀倉隆太, 小笠原徳子, 菊池 真, 二宮孝文, 氷見徹夫, 澤田典均: ヒト鼻粘膜におけるタイト結合蛋白 tricellulin の発現調節. 第 40 回日本臨床分子形態学会. 2008 年 10 月 3-4 日 福岡市

11. 小笠原徳子, 小島 隆, 郷 充, 黒瀬誠, 亀倉隆太, 氷見徹夫, 澤田典均: 核内受容体 PPAR $\gamma$  を介したアレルギー性鼻炎の予防・治療のための基礎研究. 第 29 回日本炎症・再生医学会. 2008 年 7 月 8-10 日 東京都

12. 亀倉隆太, 小島 隆, 小笠原徳子, 村田雅樹, 田中 敏, 千葉英樹, 氷見徹夫, 澤田典均: アレルギー性鼻炎における Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の役割. 第

97 回 日本病理学会総会. 2008 年 5 月 15  
～17 日 金沢市

13. 亀倉隆太, 小島 隆, 小泉純一, 小笠  
原徳子, 今野信宏, 播摩谷敦, 郷 充, 澤田  
典均, 氷見徹夫: アレルギー性鼻炎における  
樹状細胞活性化因子 TSLP の役割. 第 26 回  
日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2008 年  
2 月 21-23 日 大阪市

14. 小泉 純一, 小島 隆, 黒瀬 誠, 亀倉  
隆太, 小笠原 徳子, 今野 信宏, 郷 充,  
澤田 典均, 氷見 徹夫: ヒト鼻粘膜上皮バリア  
における PKC シグナルを介したタイト結合  
の調節機構. 第 46 回日本鼻科学会総会  
2007 年 9 月 27 日～9 月 29 日 宇都宮市

15. 郷 充: Drug Delivery System (DDS)  
としてのエアロゾルの将来性-鼻粘膜を介した  
新たな治療戦略の開発と応用- 粘膜のバ  
リアと抗原サンプリング. 第 31 回日本医  
用エアロゾル研究会, 2007 年 9 月 21-22 日  
旭川市

16. 亀倉隆太, 小島 隆, 黒瀬 誠, 小泉  
純一, 小笠原徳子, 氷見徹夫, 澤田典均: ア  
レルギー性鼻炎における Thymic stromal  
lymphopoietin(TSLP) の役割. 第 28 回  
日本炎症・再生医学会 2007 年 8 月 2～3  
日 東京都

17. 亀倉隆太, 黒瀬 誠, 今野信宏, 播摩  
谷敦, 郷 充, 氷見徹夫: アレルギー性鼻炎  
における Thymic stromal lymphopoietin  
(TSLP) の発現誘導と上皮バリア機能への影  
響. 第 19 回 日本アレルギー学会春季臨床  
大会 2007 年 6 月 10～12 日 横浜市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

氷見 徹夫 (HIMI TETSUO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90181114

### (2) 研究分担者

小島 隆 (KOJIMA TAKASHI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30260764

郷 充 (GO MITSURU)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80448604

一宮 慎吾 (ICHIMIYA SHINGO)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30305221

高野 賢一 (TAKANO KEN-ICHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70404689

(H21 より)