

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791207

研究課題名 (和文) 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

研究課題名 (英文) The role of dendritic cell-activating factor TSLP in allergic rhinitis

研究代表者

亀倉 隆太 (KAMEKURA RYUTA)

札幌医科大学医学部・研究員

研究者番号：70404697

研究成果の概要 (和文)：我々は今回、樹状細胞の機能調節に関与が知られ、アレルギー疾患の発症の起点になると考えられている IL-7 様サイトカインの Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) に焦点を当て検討を行い、アレルギー性鼻炎 (AR) 患者の鼻粘膜では、正常鼻粘膜と比較して、TSLP の発現が mRNA および蛋白レベルで亢進していること、炎症性サイトカインや Toll-like receptor リガンドの処置により鼻粘膜上皮細胞から TSLP の産生が誘導されること、TSLP 処理した培養鼻粘膜上皮細胞とマウス樹状細胞株 XS-52 では、タイト結合分子の発現が増加することを示した。

研究成果の概要 (英文)：Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is an IL-7-like cytokine that triggers dendritic cell (DC)-mediated T helper 2-type inflammatory responses. TSLP is a master molecule for allergic inflammation such as that in asthma and atopic dermatitis. In the present study, we first found high expression of TSLP in the epithelium of allergic rhinitis with recruitment and infiltration of DCs. In human nasal epithelial cells in vitro TSLP was significantly induced by treatment with the proinflammatory cytokines and a Toll-like receptor ligand. Treatment with TSLP also enhanced the barrier function of tight junctions of human nasal epithelial cells in vitro and mouse DC line XS52 together with an increase of tight junction proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：鼻粘膜上皮の機能と役割

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：アレルギー，病理学，タイト結合，樹状細胞，TSLP，鼻粘膜

## 1. 研究開始当初の背景

近年、インフルエンザや SARS をはじめと

する感染症の世界的な流行やアレルギー疾患の増加で、感染症やアレルギーの予防およ

び治療がますます重要になってきている。従って、感染症やアレルギー疾患の治療戦略において、外来病原体に対する生体防御の最前線に位置する上気道、特に鼻粘膜上皮の生体防御機構の解明が社会的に急務であると言える。

ヒト鼻粘膜上皮は、発達したタイト結合のバリア機能により細胞と細胞の間はしっかりとシールされ、感染および抗原物質の透過が厳しく制限されている。以前我々のグループは、アレルギー性鼻炎患者のヒト鼻粘膜上皮において抗原提示細胞である HLA-DR および CD11c 陽性樹状細胞に、上皮と同様にタイト結合蛋白である occludin と claudin-1 が発現し、タイト結合のバリア機能に影響を及ぼさずに樹状突起を上皮細胞間に延ばし、鼻腔内の抗原を受け取ることができる機構があることを報告した(Takano K. et al., J. Histochem. Cytochem, 53: 611-619, 2005)。しかし、アレルギー性鼻炎の発症に関与するヒト鼻粘膜上皮内の樹状細胞の調節機構についてはタイト結合蛋白の発現調節機構を含めて不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

最近、樹状細胞の機能調節に関与し上皮系細胞が主に産生する IL-7 様サイトカインの Thymic stromal lymphopoietin(TSLP) が、アレルギー発症の起点となっていることが報告された。この機構は、これまでの研究で、気管支喘息とアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の発症をもたらすことが知られているが、アレルギー性鼻炎での TSLP の関与については、不明な点が多い。

我々は、アレルギー性鼻炎において上皮産生の TSLP が樹状細胞を活性化させ、タイト結合の調節に影響を与えるのではないかという仮説をたて、アレルギー性鼻炎の鼻粘膜組織を用いて TSLP の発現と上皮内樹状細胞

の活性化との関係を検索し、培養ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて TSLP のタイト結合への影響を調べた。

さらに、アレルギー性鼻炎における TSLP の役割を解明することを目的として、培養ヒト鼻粘膜上皮細胞とマウス樹状細胞株を用いて、TSLP の鼻粘膜上皮細胞からの発現誘導のメカニズムおよび TSLP による樹状細胞のタイト結合の発現調節について検討した。

## 3. 研究の方法

対象として手術時に得られたヒト下甲介粘膜(アレルギー性鼻炎、非アレルギー性鼻炎)を用いた。TSLP の mRNA および蛋白レベルの発現をみるために、それぞれ RT-PCR および Western blot 法を用いて検討した。さらに樹状細胞のマーカーとして CD11c を用いて、TSLP との免疫染色を行ない、TSLP の発現と抗原提示細胞との関係を検討した。

次に TSLP の培養鼻粘膜上皮バリア機能への影響をみるために、テロメラーゼ遺伝子導入ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて TSLP 処理によるタイト結合蛋白(claudin-1, -4, -7, occludin, JAM-A)の発現変化を Western blot 法で、タイト結合のバリア機能については Transepithelial resistance (TER) を測定し検討を行なった。

鼻粘膜上皮からの TSLP の発現誘導のメカニズムの検討には、テロメラーゼ遺伝子導入ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて、各種炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ , oncostatin M) や TLR リガンド (P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>: TLR2 ligand; poly (I:C): TLR3 ligand; LPS: TLR4 ligand; CL097: TLR7/8 ligand; ssRNA40/LyoVec: TLR8 ligand; ODN2006: TLR9 ligand), 増殖因子(TGF- $\beta$ ) を処理後に、培養上清を回収し ELISA 法にて TSLP 産生量を測定した。

次に TSLP の樹状細胞のタイト結合蛋白

への影響をみるために、鼻粘膜上皮内の樹状細胞のモデルとしてマウス樹状細胞株 (XS-52)を用いた。XS-52 細胞におけるタイト結合分子の発現は RT-PCR 法を用いて確認し、TSLP 処理による XS-52 のタイト結合蛋白 (claudin-7) の発現変化を Western blot 法で検討した。

#### 4. 研究成果

(1) アレルギー性鼻炎の鼻粘膜では、正常鼻粘膜と比較して、TSLP の発現が mRNA および蛋白レベルで亢進していた(図1)。次に鼻粘膜上皮を TSLP 高発現群と低発現群に分け、免疫染色を行い、上皮内に存在する CD11c 陽性細胞数の計測を行なった。その結果、TSLP 高発現群では低発現群と比較して上皮内に CD11c 陽性細胞が多数認められた(図2)。そして、TSLP 処理した培養鼻粘膜上皮細胞では、濃度依存性にclaudin-1, 4, 7, occludin の発現の増加がみられ(図3), TER の増加も認められた(図4)。また、IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  および P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> 処置によりコントロール群と比較して優位に鼻粘膜上皮細胞から TSLP の産生が誘導された。一方、Poly(I:C), LPS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13 処理ではわずかに TSLP の産生が誘導された (図5)。

図 1

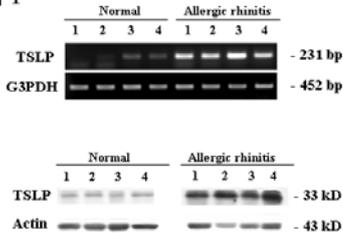


図 2

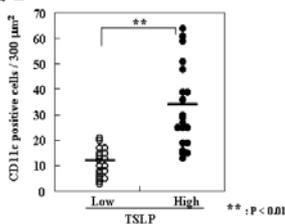


図 3

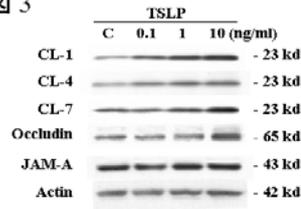


図 4

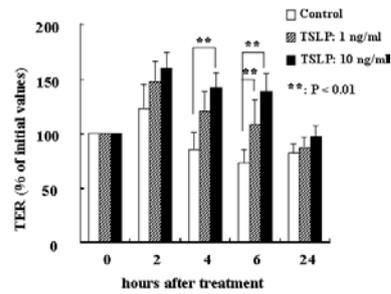
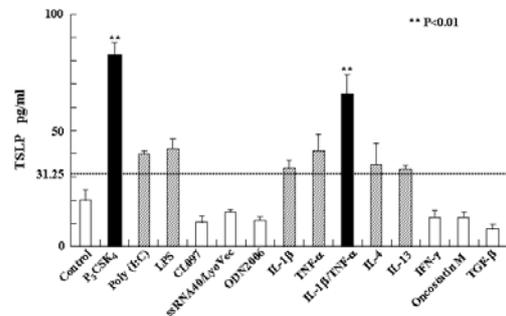


図 5



(2) XS-52 細胞におけるタイト結合分子の発現を検討したところ、claudin-1, -4, -6, -7, -8, occludin, tricellulin の発現を認めた (図6)。さらに XS-52 細胞に対して TSLP を処置したところ、位相差顕微鏡にてコントロールと比較して樹状突起の伸長と凝集する像が見られ (図7), claudin-7 蛋白の発現が増加した (図8)。

図 6

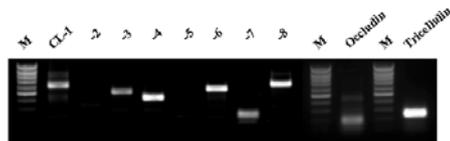


図 7

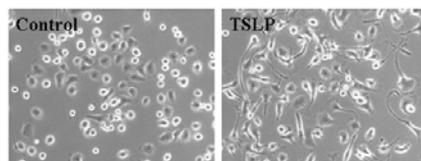
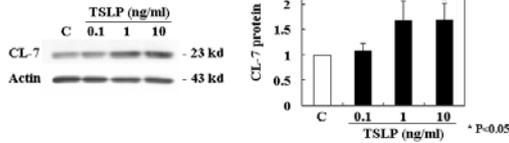


図 8



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 Kamekura R, Kojima T, Takashima A, Koizumi J, Ogasawara N, Go M, Takano K, Murata M, Tanaka S, Ichimiya S, Himi T, Sawada N.  
induces tight junction protein claudin-7 via NF-kappaB in dendritic cells. *Histochem Cell Biol*. 査読有, 133(3), 2010, 339-348
- ② Ogasawara N, Kojima T, Go M, Ohkuni T, Koizumi J, Kamekura R, Masaki T, Murata M, Tanaka S, Fuchimoto J, Himi T, Sawada N.  
barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells. *Pharmacol Res*. 査読有, 61(6), 2010, 489-498
- ③ Kamekura R, Kojima T, Koizumi J, Ogasawara N, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Himi T, Sawada N.  
enhances tight-junction barrier function of human nasal epithelial cells. *Cell Tissue Res*. 査読有, 338(2), 2009, 283-293
- ④ Ogasawara N, Kojima T, Go M, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi J, Ohkuni T, Masaki T, Murata M, Tanaka S, Ichimiya S, Himi T, Sawada N.  
during differentiation of human THP-1 dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 389(3), 2009, 543-549
- ⑤ 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*, 査読有, 52: 補1, 2009, 9-18
- ⑥ Kamekura R, Kojima T, Koizumi J, Ogasawara N, Kurose M, Takano K, Go M, Himi T, Sawada N. 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. *Inflammation and Regeneration*. 査読有, 28(3), 2008, 160-165

- ⑦ Takano K, Kojima T, Ogasawara N, Go M, Kikuchi S, Ninomiya T, Kurose M, Koizumi J, Kamekura R, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Himi T, Sawada N. Expression of tight junction proteins in epithelium including Ck20-positive M-like cells of human adenoids in vivo and in vitro. *J Mol Histol*. 査読有, 39(3), 2008, 265-273
- ⑧ Koizumi J, Kojima T, Ogasawara N, Kamekura R, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. Protein kinase C enhances tight junction barrier function of human nasal epithelial cells in primary culture by transcriptional regulation. *Mol Pharmacol*. 査読有, 74(2), 2008, 432-442
- ⑨ 郷 充, 小島 隆, 亀倉隆太, 小笠原徳子, 小泉純一, 黒瀬 誠, 高野賢一, 澤田典均, 氷見徹夫. 粘膜のバリアと抗原サンプリング—鼻粘膜を介した新しい治療戦略にむけて 耳鼻咽喉科展望, 査読有, 51: 補1, 2008, 32-38

[学会発表] (計 5 件)

- ① 亀倉 隆太 鼻粘膜上皮における IL-25 産生についての検討 第 28 回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2010. 2. 19 福井市
- ② 亀倉 隆太 鼻粘膜上皮における IL-25 産生についての検討 第 48 回 日本鼻科学会総会・学術講演会 2009. 10. 3 松江市
- ③ 亀倉 隆太 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. 5. 16 東京都
- ④ 亀倉 隆太 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 21 回 気道病態研究会 2009. 2. 7 東京都
- ⑤ 亀倉 隆太 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. 5. 15 金沢市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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0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

亀倉 隆太 (KAMEKURA RYUTA)  
札幌医科大学医学部・研究員  
研究者番号：70404697

### (2) 研究協力者

氷見 徹夫 (HIMI TETSUO)  
札幌医科大学医学部・教授  
研究者番号：90181114  
郷 充 (GO MITSURU)  
札幌医科大学医学部・講師  
研究者番号：80448604  
高野 賢一 (TAKANO KENICHI)  
札幌医科大学医学部・助教  
研究者番号：70404689  
澤田 典均 (SAWADA NORIMASA)  
札幌医科大学医学部・教授  
研究者番号：30154149  
小島 隆 (KOJIMA TAKASHI)  
札幌医科大学医学部・准教授  
研究者番号：30260764