

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 13日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791615

研究課題名（和文）粘膜上皮と上皮内樹状細胞の相互作用制御による抗原認識機構の調節

研究課題名（英文） Regulation mechanism of antigen recognition by controlling the interaction of dendritic cells and mucosal cells in the epithelium

研究代表者

黒瀬 誠（KUROSE MAKOTO）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60404696

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。我々は、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し、また粘膜上皮と樹状細胞の相互作用についての研究を行った。

研究成果の概要（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. In addition, we made a research on the interaction of dendritic cells and mucosal epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：特異的免疫療法、樹状細胞、テロメラゼ遺伝子導入培養ヒト粘膜上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

鼻腔・口腔粘膜上皮は、自然免疫、粘膜免疫、獲得免疫の最前線で抗原の感知センサーの役割を持っている。この役割のほかに、ケモカインの産生・誘導、上皮間リンパ球との相互作用、IgA, IgG, IgM の運搬なども重要な役目である。炎症調節における免疫応答誘導あるいは免疫寛容には抗原の認識・提示が重要で、このためには上皮細胞と樹状細胞の連携が不可欠である。この上皮と樹状細胞のクロストーク機構は重要なテーマであり当教室ではこの点を鼻咽腔粘膜について検討してきた。われわれは、鼻咽腔での抗原のサンプリング段階で、樹状細胞がタイト結合を発現しながらバリアを超え鼻腔内に突起を伸ばし抗原を捕らえることを初めて報告した。

(Takano K, et al. J Histochem Cytochem, 2005)。さらに、抗原取り込み細胞である M 細胞がヒト咽頭扁桃に存在するが、M 細胞を cytokeratin 20 をマーカーとして抗原取り込み機能について検討した (Takano K, et al. J Mol Histol, 2008)。以上より新たな抗原移送の概念を鼻咽腔についてすでにわれわれは確認している。

## 2. 研究の目的

近年の花粉症に対する舌下免疫療法では、口腔粘膜の抗原認識と樹状細胞を主とする抗原提示細胞の機能が重要である。効率的に免疫寛容を誘導するためには、まず抗原を認識することが重要であり、当然口腔の上皮・樹

状細胞関連を基礎的に検討することが必須となる。そこで、鼻腔や扁桃での研究を進展させ、口腔での上皮・樹状細胞相互作用についての類似点・相違点について検討することを計画した。すなわち、粘膜上皮と樹状細胞の関係を特徴づけることで、感染防御機構や病巣扁桃炎の機所解明など炎症調節機構の解明だけでなく、アレルギーの免疫療法や舌下免疫療法の免疫寛容とのかかわりを解明する。さらに、この研究はワクチンの口腔を介した DDS 基礎理論への応用が期待できる。

## 3. 研究の方法

閉塞性睡眠時無呼吸症候群の症状改善目的にアデノイド切除術を施行した 2~7 歳のアデノイド組織および組織から作成したアデノイド初代培養上皮細胞を材料に検討を行った。方法は RT-PCR 法、免疫組織化学染色法、金コロイドを用いた免疫透過電顕法および 0.5  $\mu\text{m}$  の蛍光微小粒子を用いた抗原取り込み機能の解析を行った。

## 4. 研究成果

ヒトアデノイド組織では M 細胞は不規則な微絨毛を持っていることが走査電子顕微鏡像によって観察されている。アデノイド上皮における Ck20 陽性細胞は上皮に不規則に点在しており、ポケット様の構造をもっているものも観察される。アデノイド上皮組織では Ck20 陽性、陰性両方の細胞で occludin, ZO-1, claudin-1,7 が確認された。

そこで、Ck20 陽性細胞が M 細胞の特徴を

有しているか、免疫透過電顕法によって確認した。走査電子顕微鏡で観察されたアデノイド上皮 M 細胞と同様に透過電子顕微鏡にて細胞表面に不規則な微絨毛を持つものが認められる。さらに 1 次抗体に抗 Ck20 抗体を用い、金コロイド粒子で標識したところ、そのような不規則な微絨毛を有し形態学的に M 細胞と考えられた細胞に Ck20 と結合している金コロイド粒子の取り込みが認められた。

続いて Ck20 陽性細胞が M 細胞として抗原取り込み機能を有しているか、アデノイド初代培養上皮細胞を用いて検討した。走査電子顕微鏡像では、組織と同様に短い微絨毛のみられる M 様細胞が認められた。組織と同様、上皮マーカーである Ck7 に対する Ck20 陽性細胞が同様の割合で認められ、蛍光微小粒子（径 0.5  $\mu\text{m}$ ）と共培養したところ、Ck20 陽性細胞はこの微小粒子を細胞内に取り込んでいることがレーザー顕微鏡による XY と XZ 軸の観察から明らかとなった。その結果 Ck20 陽性細胞には抗原取り込み能力があることが示された。

次に Ck20 陽性細胞が周囲の上皮細胞同様、タイト結合タンパクを発現しているかどうか、Ck20 とタイト結合との二重染色によって検討した。その結果、上皮組織内の Ck20 陽性細胞は occludin, ZO-1, claudin-1, -7 を発現し、培養上皮細胞でも、組織同様にタイト結合タンパクを細胞境界に発現していた。

このことは、Ck20 陽性 M 細胞は上皮にあって隣接する上皮細胞と連続する上皮バリアを維持しながら抗原を取り込む能力があ

ることを示している。

アデノイドを含む扁桃は上気道と消化管の入り口として侵入抗原に対して防御する大事な役割を果たしているリンパ上皮共生の構造を兼ねて組織されている。この機能は末梢での抗原物質の取り込み、プロセッシング、提示において非常に特化した役割を果たす抗原提示細胞である樹状細胞の存在を必要とする。

Rescigno は直接病原体をサンプルするために上皮間と上皮の外に突起を出してタイト結合を開く樹状細胞によって粘膜における病原体の取り込みのための新しいメカニズムを発見した。アデノイド上皮組織は鼻粘膜と同様に HLA-DR, CD11c 陽性の樹状細胞がタイト結合分子の occludin を同時に発現して、上皮バリア機能の透過性の増加を必要最小限にとどめ、さらに最頂部に存在する occludin を超えて突起を伸長しているのが観察されている。

さらにアデノイド上皮には鼻粘膜と同様にウイルス由来の dsRNA を認識し自然免疫応答を誘導する TLR3 をはじめとする TLR が発現していることが明らかとなっている。

TLR3 のリガンドである polyI:C 処置をヒト初代培養アデノイド上皮細胞に行うことによって IL-8 や TNF $\alpha$  だけでなく TSLP の産生も上皮細胞から誘導され、アデノイド上皮から産生された TSLP を含む種々のサイトカインが上皮そのものや樹状細胞の活性化に影響を与え、炎症性疾患に対する重要な役割を示しうることが示唆された。

M 細胞であることの証明は、形態学的な特

徴，すなわち短く疎な微絨毛をもち，免疫担当細胞を抱え込むためのポケット状構造を発達させていることである．これまでマウスではレクチンである UEA-1 がマーカーとして頻用されてきた．しかし，この UEA-1 は杯細胞 (goblet cell) にも結合してしまうという欠点があり，さらに，UEA-1 はヒトの M 細胞には特異的に結合しないためヒトでの M 細胞の検討をより困難にしている．

アデノイドを含む上気道粘膜関連リンパ組織における M 細胞は，パイエル板や腸管リンパ濾胞における M 細胞と構造的にも類似し，抗原を取り込む機能においても同様の機能を果たすとされている．われわれの検討から，アデノイドにおける Ck20 陽性細胞は，免疫電顕法にて形態学的に M 細胞の特徴を有し，培養細胞における微粒子取り込み実験にて，抗原を取り込む機能を有していることが示された．さらに，アデノイド上皮および初代培養細胞における Ck7 陽性上皮細胞に対する Ck20 陽性細胞の割合は，それぞれ 8% および 6% であった．ヒトアデノイド上皮における M 細胞の割合は 5% であると言われており，これらの結果から Ck20 は，ヒトアデノイド M 細胞に対するマーカーとして使用できる可能性が示された．

Ck20 の他に，現時点で検討されている M 細胞のマーカーとして以下に述べる．Nochi らは，従来用いられて来た UEA-1 陽性細胞をラットに免疫し，M 細胞に特異的なモノクローナル抗体である NKM16-2-4 を樹立した．この抗体は， $\alpha$  (1, 2) fucose を含む糖鎖複合体を認識し，パイエル板 M 細胞のみならず，NALT

に存在する M 細胞にも反応している．

この NKM16-2-4 陽性 M 細胞の解析により，パイエル板 M 細胞に特異的に発現する遺伝子のひとつとして，glycoprotein 2 (GP2) が同定された．この GP2 はヒトの M 細胞にも発現しており，GP2 は M 細胞において管腔側により強く発現し，かつ一部がエンドソームにも発現が認められることから，トランスサイトシス受容体としての機能が考えられている．さらに，GP2 は細菌の 1 型線毛を構成する FimH 抗原と結合することが分かり，GP2 と細菌の結合がパイエル板における特異的免疫応答の誘導に重要であることが示された．また，補体成分である C5a の受容体 (C5aR) が，M 細胞頂部に GP2 と共に認められ，ヒト M 様細胞およびマウス M 細胞に発現し，粘膜ワクチンの標的となる可能性も報告されている．

糖タンパクのひとつである clusterin も Ck20 と同じく M 細胞のマーカーとなる可能性が報告されているが，この clusterin はヒト扁桃やアデノイドのほか，腸管 M 細胞や樹状細胞にも発現しており，特異性についてさらなる検討が必要と思われる．

こうした M 細胞に対するマーカーを複数組み合わせることで，M 細胞を特異的に認識できれば，将来的に M 細胞の起源の解明や新たな粘膜ワクチンの開発に結びつく可能性が高いと推察された．

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 Himi T, Takano K, Ogasawara N, Go M, Kurose M, Koizumi J, Kamekura R, Kondo A, Ohkuni T, Masaki T, Kojima T, Sawada N, Tsutsumi H. Mucosal immune barrier and antigen-presenting system in human nasal epithelial cells. Adv Otorhinolaryngol. 2011; 72:28-30. 査読有

② Ogasawara N, Kojima T, 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. 査読有

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒瀬 誠 (KUROSE MAKOTO)

札幌医科大学医学部 助教

研究者番号: 60404696