様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２１年５月７日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：２００６～２００８
課題番号：１８５９１８９９
研究課題名（和文）
上皮細胞のタイト結合と細胞増殖因子からみた鼻茸形成のメカニズム

研究課題名（英文）
Mechanism of the formation of the nasal polyp in the light of epithelial tight junction and growth factors

研究代表者
鈴木　秀明（SUZUKI HIDEAKI）
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：２０１８７７５１

研究成果の概要：
鼻茸上皮では上皮細胞間隙の破断と上皮細胞増殖因子受容体 erbB1、erbB2、erbB3 の陽性所見が認められた。リアルタイム PCR 法では erbB1、erbB2、erbB3、の mRNA が検出された。またこれらの活性化型であるリン酸化 erbB1 とリン酸化 erbB2 の発現も認められた。以上より鼻茸形成の機序には、鼻茸上皮細胞間が破断して上皮細胞増殖因子受容体である erbB1 と erbB2、特に erbB1 が活性化する機序が関与している可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００６年度	1,000,000	0	1,000,000
２００７年度	900,000	270,000	1,170,000
２００８年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総　計	2,800,000	540,000	3,340,000

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：鼻茸、タイト結合、細胞増殖因子、EGF、リアルタイム PCR、erbB、超微形態、蛍光免疫法、免疫電子顕微鏡法、トレーサー透過試験

１．研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎の臨床的、病理組織学的特徴は1)著しい好中球浸潤、2)粘性～粘膿性分泌液の増加、3)鼻茸形成を含む粘膜の浮腫、の３点に集約される。この中で鼻茸の形成は保存的治療の有効性を著しく低下させ、これにより病態が遷延・増悪し手術を余儀なくされる症例がしばしば見られる。特に喘息合併例では手術後も鼻茸再発の傾向が強く、治療に

難渋する。鼻茸形成のメカニズムについてはこれまで主に血管透過性亢進による浮腫、炎症細胞浸潤、サイトカイン、炎症性メディエーターなどの面から研究が行われてきたが、十分解明されるには至っていない。こうした観点からだけでは、突出するように増大してくる鼻茸形成という現象を説明し難いし、アレルギー性鼻炎では血管透過性亢進、多数の炎症細胞の浸潤、サイトカイン・炎症性メディエーターの放出が起こるにもかかわらず鼻茸の形成は比較的少ない。また気管支喘息を有する患者では、アトピー素因の有無にかかわらず鼻茸が発生する傾向がきわめて強い。

鼻茸形成の際には、粘膜下層の浮腫と共に上皮細胞の増生が起こり、体積と表面積の著しい増大がもたらされるが、気道上皮細胞の増生は上皮細胞間のタイト結合の障害と関連していることが示唆されている。気道上皮細胞の細胞膜上には erbB などの増殖因子受容体およびこれに対するリガンドが存在する(Polosa R, et al: Expression of c-erbB receptors and ligands in the bronchial epithelium of asthmatic subjects. J Allergy Clin Immunol 109: 75-81, 2002)。通常この二者はタイト結合により上皮細胞底側面と頂面とに分離されているが、タイト結合が破断した場合、両者が混じり合い結合して細胞増殖が誘導されることが近年明らかとなってきた (Vermeer PD, et al: Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. Nature 422: 322-326, 2003)。タイト結合の障害は実際に副鼻腔炎粘膜上皮において観察されている。

２．研究の目的

本研究計画は、「鼻茸上皮細胞間のタイト結合の破断がerbBを介して上皮細胞の増殖を引き起こす」という仮説を検証することを目的とする。すなわち手術時に採取した鼻茸を用い、a）上皮細胞間のタイト結合の破断の検証（電気抵抗値の測定、トレーサーの透過実験、密着結合蛋白発現様式の観察）、b）増殖因子受容体およびそのリガンドの検索、c）リン酸化（活性型）増殖因子受容体の検索、さらにｄ）サイトカインや炎症性メディエーターの刺激による上皮細胞増殖能の変化の観察、を行う。

培養上皮細胞ではその増殖のメカニズムが明らかになってきているが、実際の鼻副鼻腔粘膜にそれが当てはまるかどうかは不明である。また鼻副鼻腔粘膜において、これまでにタイト結合の障害が観察されているが、この現象と上皮細胞の増殖を結び付ける研究はこれまでに行われていない。

鼻茸形成のメカニズムに関する従来の研究は、血管透過性、炎症細胞浸潤、炎症性メディエーターなどの観点からのものであるのに対し、本研究は上皮細胞間のタイト結合という全く新しい観点に立っている。また培養上皮細胞を用いた従来の研究が結果的に in vivo での現象を十分に説明できなかったのに対し、本研究では実際のヒトの鼻茸組織をそのまま用いて細胞の微細構造のレベルでの探索を目指している。これにより in vitro と in vivo の現象を架橋し、鼻茸形成の現象を直接的にしかも細胞レベルで探求しようとするものであり、きわめて独創的・画期的である。

上述したように鼻茸形成のメカニズムは未だ明らかではなく、手術以外の有効な治療法も確立されていない。本研究によりそのメカニズムの一端が明らかになれば、学術的に重要な価値があると同時に、タイト結合を標的にした慢性副鼻腔炎の新しい治療戦略の糸口が開かれるものと考えられる。この２点から本研究が鼻茸形成のメカニズム解明に向けて画期的な突破口を開くことが期待で

きる。

３．研究の方法

慢性副鼻腔炎患者から手術時に採取した鼻茸を用い、上皮細胞間のタイト結合の破断が認められるかどうかを以下の方法で検討した。

(1)Ussing chamber法による上皮層の電気抵抗値の測定
採取した鼻茸から上皮層を薄切してレンズ状の組織を切り出し、これをUssing chamber内に設置し、組織の両側を緩衝液で満たし、0.5～2mV程度のパルス電圧をかけて電気抵抗を測定した。この実験では、生組織をchamberに設置し緩衝液を灌流しながら電気抵抗値を測定するので、経時的変化を捉えることが可能となる。

(2)トレーサー透過試験
鼻茸表面にトレーサー（塩化ランタン）を負荷し、これがタイト結合を通過して底側面～上皮細胞間隙に移動するかどうかを超微形態学的に観察した。すなわち、採取した鼻茸を2%塩化ランタン＋2.5％グルタールアルデヒド／0.1Mカコジル酸酸緩衝液に2時間浸した後、エポキシ樹脂に包埋して超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡下に観察した。

(3)タイト結合蛋白の観察
特異抗体を用い、claudin, occludin, ZO-1などのタイト結合蛋白の発現様式を免疫電子顕微鏡法により観察した。

(4)増殖因子受容体、リガンドの検索
採取した鼻茸組織中の増殖因子受容体、erbB1、erbB 2、erbB 3、erbB 4 およびerbBのリガンド(heregulin, amphiregulin, epiregulin, betacellulin, EGF, TGF)をリアルタイムPCR法とWestern blot法により、mRNAレベルと蛋白レベルで検索した。さらに特異抗体を用い、これらの増殖因子受容体とリガンドの発現を蛍光免疫法により検索した。
次にリン酸化erbB1、erbB 2、erbB 3、erbB 4の特異抗体を用いて、蛍光免疫法によりその発現を検索した。
さらに採取した鼻茸組織をhomogenizeし、その中に含まれるerbBのリガンド(heregulin, amphiregulin, epiregulin, betacellulin, EGF, TGF)をELISAによって測定した。

(5)上皮細胞増殖能の検討
鼻茸組織をTNFα、IL-1β、IFNγ、好中球elastase、lipopolysaccharideで刺激した後、bromodeoxyuridineを負荷し、その細胞内への取り込みを、ペルオキシダーゼ法による免疫組織化学法で検索した。発色にはDABを使用した。

(6)ヒト鼻粘膜および鼻茸粘膜の電気抵抗の測定
ヒト鼻粘膜および鼻茸粘膜の電気抵抗を、短絡電流測定器 CEZ-9100 (Nihon Kohden)を用いてin vivoの状態で測定した。

(7)対照群として、上顎嚢胞や鼻中隔湾曲症の患者から採取した下鼻甲介粘膜、鼻中隔粘膜を用い、上記(1)～(5)と同様の実験を行った。

４．研究成果

(1)Ussing chamber法による鼻茸上皮層の電気抵抗の測定
割断した鼻茸の電気抵抗値は15～40Ω・cm^2であった。これに対し、上顎嚢胞や鼻中隔弯

曲症の患者から採取した下鼻甲介粘膜や鼻中隔粘膜では70～100Ω・cm^2、稠密に並んだ単層の培養鼻粘膜上皮細胞では100～200Ω・cm^2であった。以上より鼻茸上皮ではタイト結合が障害されている可能性が示唆された。

(2)トレーサー透過試験

ランタンは上皮細胞頂面に付着していたのに加え、側面の細胞間隙にも存在していた。粘膜下層にはランタンは認められず、ランタンは深層から侵入したものではなく上皮層頂面側から漏洩したものと推定された。これに対し下鼻甲介粘膜や鼻中隔粘膜ではランタンの漏洩は認められなかった。これにより鼻茸上皮ではタイト結合が障害されていることが強く示唆された。

(3)タイト結合蛋白の観察

免疫電子顕微鏡法によりタイト結合蛋白の発現を観察したところ、鼻茸上皮間ではclaudin, occludin, ZO-1の著しい不整が認められた。

(4)増殖因子受容体、リガンドの検索の検索

鼻茸組織、下鼻甲介粘膜、鼻中隔粘膜いずれにおいても、蛍光免疫法で、上皮層と鼻腺細胞に erbB1、erbB2、erbB3 の陽性所見が認められた。下鼻甲介粘膜と鼻中隔粘膜では底側面に強い陽性所見が見られたが、鼻茸組織では上皮層全域において陽性のものが多かった。リアルタイム PCR 法では erbB1、erbB2、erbB3 の mRNA が検出された。定量的に比較すると、erbB1 mRNA の量が最も多く、erbB2、erbB3 mRNA はこれに比べて少量であった。これに対して erbB4 は蛍光免疫法、リアルタイム PCR 法のどちらでも検出されなかった。

蛍光免疫法によるリン酸化 erbB の検索では、リン酸化 erbB1 とリン酸化 erbB2 の発現が上皮層に認められた。リン酸化 erbB3 とリン酸化 erbB4 の発現は見られなかった。

さらに Western blot 法により erbB1、erbB 2、erbB 3、erbB 4 蛋白の検出を試みたが検出することができず、絶対量が少ないか、抽出操作が適切ではない可能性が考えられた。

erbB のリガンド(heregulin, EGF, TGF amphiregulin, epiregulin, betacellulin,)については、免疫組織法、リアルタイム PCR 法、Western blot 法、ELISA 法のいずれによっても検出できなかった。

(5)上皮細胞の増殖能の観察

鼻茸組織を TNFα、IL-1β、IFNγ、好中球 elastase、lipopolysaccharide で刺激し、bromodeoxyuridine の取り込みにより上皮細胞の増殖について検討したが、刺激前と比べて有意な取り込みの上昇は認められなかった。下鼻甲介粘膜でも同様の実験を行ったが、取り込みの有意な上昇は認められなかった。

(6)ヒト鼻粘膜および鼻茸粘膜の電気抵抗の測定

下鼻甲介粘膜では 80～150Ω・cm^2であったのに対し、鼻茸粘膜では 50～100Ω・cm^2であり、鼻茸粘膜で低い傾向がみられたが統計学的有意差までには至らなかった。切離して in vitroで測定した結果では鼻茸粘膜で電気抵抗が有意に低値であったが、この乖離の理由としては切除時や切除後のartifactや粘膜下組織の電気抵抗の影響が考えられた。

(7)以上より鼻茸形成の機序には、鼻茸上皮細胞間のタイト結合が破断して上皮細胞増殖因子受容体である erbB1 と erbB2、特に erbB1 が活性化する機序が関与している可能性が示された。

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　０件）

〔学会発表〕（計　０件）

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕

６．研究組織

(1)研究代表者
鈴木　秀明（SUZUKI HIDEAKI）
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：２０１８７７５１

(2)研究分担者
宇高　毅（UDAKA TSUYOSHI）
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：１０３６９０６９
塩盛　輝夫（SHIOMORI TERUO）
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：５０３４１５０８
柴田　美雅（SHIBATA MINORI）
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：９０５１２１８７
永谷　群司（NAGATANI GUNJI）
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：８０３４３７１３
橋田　光一（HASHIDA KOICHI）
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：９０３８９４６１
平木　信明（HIRAKI NOBUAKI）
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：８０４６５７５７
若杉　哲郎（WAKASUGI TETSURO）
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：２０４６１５６９

(3)連携研究者
なし。