

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09350

研究課題名(和文) ヒト鼻粘膜におけるp63を介した新規抗原・感染防御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the novel defense mechanism against antigens and infections in the human nasal epithelium

研究代表者

大國 毅 (Okuni, Tsuyoshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40464490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：p63はp53がん抑制遺伝子ファミリーの一つで、細胞増殖・アポトーシスの制御に関連し、鼻粘膜上皮においてはアレルギー性鼻炎患者など気道の慢性炎症で発現亢進を認めるが、その役割は不明な点が多い。本研究の目的はヒト鼻粘膜上皮におけるp63の役割および発現調節の解明である。正常ヒト鼻粘膜上皮細胞においてp63はタイト結合、微絨毛発現に対し負の調節機構に関連していた。またアレルギー性鼻炎患者の血中、鼻汁中で増加する転写因子HMBG1は、p63、タイト結合分子LSRの発現に関与していた。これはTGF- β シグナル経路を介した反応であり、TGF- β 、p63はアレルギー性鼻炎の治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性鼻炎や好酸球性副鼻腔炎といった上気道の難治性慢性炎症性疾患は、本邦のみならず世界的に増加傾向にある。現在、これらの疾患に対する根治的な治療法はなく、新規治療薬の開発が望まれる。われわれはアレルギー性鼻炎患者で発現亢進する転写因子p63に着目し、正常ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて鼻粘膜におけるp63の役割および発現調節について検討した。結果p63は鼻粘膜上皮細胞のタイト結合、微絨毛発現に対し抑制的に働いていた。また、転写因子HMBG1は、TGF- β シグナルを介し鼻粘膜上皮バリア機能の低下に関わっていた。将来的に、TGF- β 1受容体阻害が上気道慢性炎症の治療に結びつくことが期待された。

研究成果の概要(英文)：Transcriptional factor p63 is a member of the p53 family related to the regulation of cell proliferation and apoptosis. Although the expression of p63 is increased in chronic airway inflammation such as in patients with allergic rhinitis, its role remains unclear. In the present study, our aim is to elucidate the role and regulation of p63 expression in the human nasal mucosal epithelium. In the normal human nasal epithelial cells, p63 was associated with the negative adjustment mechanism of the expression of the tight junction and the microvilli. And, HMBG1, which is the transcription factor increasing in blood and nasal discharge of patients with allergic rhinitis, was likely to be association with the expression of p63 and the tight-junction protein LSR via the TGF-beta signaling pathway. In the future, it was suggested that p63 and TGF-beta could be the therapeutic targets for allergic rhinitis

研究分野：鼻科学

キーワード：ヒト鼻粘膜上皮 上皮バリア 上気道慢性炎症 HMBG1 p63

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

p63 は、p53 がん抑制遺伝子ファミリーの 1 つで、2 つの転写開始点を持ち TA 型と Δ N 型の発現をする上に、選択的スプライシングにより α 、 β 、 γ のアイソフォームを生じる。配列の保存性や機能の面から、p63 は p53 の祖先分子と推定されている重要な分子である。この p63 は、p53 同様に細胞周期中の細胞増殖と DNA 損傷や低酸素のような環境刺激に反応してアポトーシスを制御する転写因子として機能するだけでなく、多種の上皮の基底細胞の核に発現し、p53 とは異なり特定の組織で特別な働きを有していることが、最近分かってきている。特に皮膚において、TAp63 および Δ Np63 とともに発現がみられ、表皮の分化に密接な関係を持っている。

ヒトの鼻粘膜上皮においては、上皮バリア機能に異常がみられる鼻茸(nasal polyp)およびアレルギー性鼻炎において、p63 の発現の亢進が報告されている。現在のところ TAp63 あるいは Δ Np63 のヒトの鼻粘膜上皮における詳細な役割および調節機構についてはよく分かっていないが、ヒトの鼻粘膜上皮の重要な役割である抗原および感染の防御機構(上皮バリア、線毛形成、リモデリング)に非常に関係していると考えられる。

一方、Rho-kinase inhibitor Y27632 は、iPS 細胞に代表される conditional reprogramming culture において重要な因子であり、細胞骨格、細胞間接着および細胞-細胞基質に影響を与え、呼吸器上皮においても p63 陽性細胞の airway progenitor clone formation を亢進すると考えられている。この変化は、呼吸器上皮再生に重要な現象である。実際我々が手術材料から分離培養して確立した hTERT 遺伝子導入ヒト鼻粘膜上皮細胞において、Y27632 処置により p63 の亢進、細胞間コミュニケーション能の亢進、アクチン骨格の変化、代謝酵素の亢進を示す airway progenitor clone formation の亢進が認められた。さらに、鼻茸およびアレルギー性鼻炎でヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の亢進が報告され、この HDAC に対する阻害剤においては、p63 の発現低下作用も知られている。

2. 研究の目的

現在のところ p63 のヒトの鼻粘膜上皮における詳細な役割およびその調節機構についてはよく分かっていないが、抗原および感染に対する上皮バリアによる防御機構に密接に関与していると考えられる。本研究においては、ヒト鼻粘膜による抗原・感染防御のための p63 を介した新規上皮バリア調節機構を解明する。

3. 研究の方法

鼻茸(nasal polyp)およびアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜における TAp63、 Δ Np63 およびヒストン脱アセチル化酵素(アイソフォームを含む)の発現とタイト結合分子の発現変化とを比較検討する。さらに、確立した正常ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて、TAp63、 Δ Np63、ヒストン脱アセチル化酵素の発現を解析し、TAp63 および Δ Np63 の siRNA、様々なヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、RS ウイルス処置などにより p63 を介した上皮バリア機能、絨毛形成、リモデリングの影響を解析する。

(1) 鼻茸(nasal polyp)およびアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜パラフィン切片を用いて、TAp63、 Δ Np63 およびヒストン脱アセチル化酵素(アイソフォームを含む)の発現と上皮バリア機能を担うタイト結合分子の発現変化とを比較検討する。

(2) 確立した hTERT 遺伝子導入正常ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて、TAp63、 Δ Np63 およびヒス

トン脱アセチル化酵素(アインゾームを含む)の発現および局在を染色、蛋白、mRNA レベルで調べる。上皮バリアへの影響をみるために上皮バリア機能測定およびタイト結合分子の発現局在の解析を、繊毛形成への影響をみるために primary cilia および cilia の染色および構成蛋白の発現解析、走査電顕(SEM)解析、リモデリングをみるために wound healing assay を行う。さらに鼻茸(nasal polyp)患者の鼻粘膜上皮細胞も培養し同様の検討を行う。

(3) p63 の鼻粘膜上皮バリアへの影響をみるために、siRNA を用いて TAp63 および Δ Np63n の発現を低下させ、タイト結合分子の局在発現およびバリア機能測定の変化を解析する。メカニズム解析のために、siRNA を用いて TAp63 の発現を低下させた細胞の DNA マイクロアレーを行い無処置細胞と比較検討する。

(4) 様々なヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を正常ヒト鼻粘膜上皮細胞に処置して、TAp63 および Δ Np63 の発現・局在の変化をそれぞれの siRNA を処置した変化と比較検討する。予備実験において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である Trichostatin A 処置による TAp63 の発現低下および上皮バリア機能の亢進を伴ったタイト結合分子 (claudin-4) の増加が認められている。

(5) p63 の鼻粘膜上皮の繊毛形成への影響をみるために、siRNA を用いて TAp63 および Δ Np63 の発現を低下させ、primary cilia および multicilia の発現変化を染色および走査電顕 (SEM) で解析するとともに、繊毛形成に関与がみられる蛋白および遺伝子の変化を解析する。さらに p63 の発現に変化のみられたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を処置して、繊毛形成に関する同様の検討を行う。

(6) p63 の鼻粘膜上皮のリモデリングへの影響をみるために、siRNA を用いて TAp63 および Δ Np63 を発現低下させ wound healing assay を行うとともに、リモデリングに関与がみられる蛋白および遺伝子の変化を解析する。さらに p63 の発現に変化のみられたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を処置して、同様の検討を行う。

(7) 呼吸ウイルスによる p63 を介したヒト鼻粘膜上皮への影響をみるために、以前我々が確立した In vitro ウイルス感染モデル (Masaki et al., 2011; Obata et al., 2013)を用いて、小児に重篤な症状を示す RS ウイルスを処置して、p63 を介した上皮バリア、繊毛形成、リモデリングへの影響を調べる。**現在までに RS ウイルス感染細胞の TAp63 の発現低下およびタイト結合分子の亢進がみられている。**

(8) 抗原による p63 を介したヒト鼻粘膜上皮への影響をみるために、我々が以前報告した (Ohkuni et al., 2011; Miyata et al., 2015b)自然免疫に関与のみられる TLR の ligands (TLR3 ligand: polyI:C, TLR4 ligand: LPS)を処置して p63 を介した上皮バリア、繊毛形成、リモデリングへの影響を調べる。

4. 研究成果

ヒト鼻粘膜上皮バリアにおいて、転写制御因子 p63 は負の調節機構に関与していることが示唆された

正常ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて、p63 の発現変化における細胞間接着装置であるタイト結合分子及び線毛形成による上皮バリアへの影響を検討した。p63 を発現低下させると、転写因子 Sp1 の活性を介したタイト結合分子の増加及び上皮バリア機能亢進を認めた。更に細胞表面に微絨毛の増加及び線毛様構造物の出現も認めた。ウイルス感染の p63 を介した上皮バリアへの影響をみるために RS ウイルスを処置した結果、p63 の発現低下を伴ったタイト結合分子の亢進を認めた。更にヒストン脱アセチル化阻害剤を処置により p63 の発現低下、タイト結合分子の増加を伴うバリア機能の亢進及び微絨毛の増加を認めた。これらの変化、p38 MAPK/NF- κ B シグナルを介して調節されていた。以上のことより、p63 は上皮バリアにおいて負の調節機構に関与し、p63 の発現制御は抗原・感染の防御に有用と考えられた。

慢性炎症性疾患のヒト鼻粘膜上皮における実験系の確立-Rhoキナーゼ阻害剤Y27632を用いたヒト鼻粘膜上皮前駆細胞を作成した。

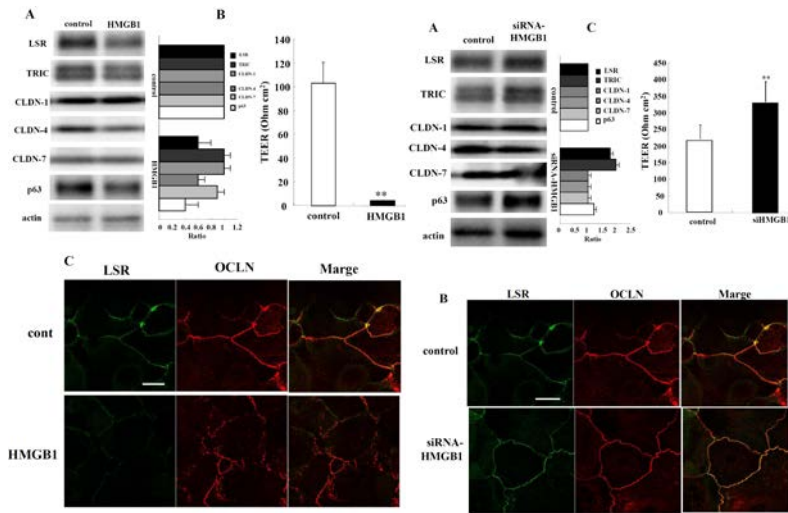
我々は、正常ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて、前駆細胞および幹細胞維持に重要なRhoキナーゼ阻害剤Y27632を長期処置によりヒト鼻粘膜上皮前駆細胞系を確立した。この細胞の特徴は、アレルギー性鼻炎患者でみられるp63の発現亢進、ギャップ結合の発現亢進、タイト結合の低下、細胞骨格の変化などが認められ、呼吸器ウイルスおよびアレルギー性鼻炎の新規治療薬を開発する良いモデルと考えられる。具体的には、Y27632処置ヒト鼻粘膜上皮前駆細胞においては、2細胞間タイト結合分子claudin-4およびclaudin-7の発現低下、ギャップ結合分子Cx30およびCx43の発現亢進、薬剤代謝酵素分子の亢進がみられた。

HMGB1 をターゲットとした鼻副鼻腔疾患の病態解明と新規治療薬の開発

アレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎といった鼻副鼻腔疾患は、現在多くの患者が罹患しており、アレルギー性鼻炎において国内有病率は40%といわれている。現在、鼻副鼻腔疾患において様々な新規治療が検討されているが、未だ増加傾向である。

HMGB1 (high mobility group box 1) は、p53 や NF- κ B などの転写因子の機能発現に重要な核 DNA 結合タンパク質として知られる炎症性メディエーターである。また、活性化された樹状細胞やマクロファージ、そして壊死細胞から細胞外に放出され、周辺の細胞に発現している RAGE (receptor for advanced glycation end products) や TLR (toll-like receptor) と結合することにより、細胞障害性シグナルを誘導するとされている。近年アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎、呼吸器ウイルス感染において鼻汁中や血清中 HMGB1 が増加していると報告されているが、HMGB1 のヒト鼻粘膜上皮細胞におけるこれらの疾患の役割については未だ不明な点が多い。そこで今回、我々が以前に樹立したヒト鼻粘膜上皮細胞系を用いて、HMGB1 とタイト結合分子の発現や上皮バリア機能への影響に焦点を当て、新規病態の解明を目的として研究を行った。まずヒト鼻粘膜上皮細胞に HMGB1 を処置し、タイト結合分子などについて検討を行った。結果、ヒト鼻粘膜上皮細胞においてバリア機能を有する 3 細胞間タイト結合分子である angulin-1/LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor) および p63 の発現低下がみられた。また、蛍光免疫染色にて膜上の LSR の発現低下と 2 細胞間タイト結合分子である Occludin の発現の乱れを認めた。また TEER 測定によりバリア機能の低下を認めた (図 1)。また、siRNA を用いて HMGB1 の発現を低下させたところ、angulin-1/LSR および p63 の発現の亢進とバリア機能の亢進がみられた (図 2)。ヒト鼻粘膜上皮細胞において HMGB1 は angulin-1/LSR の発現を低下させることに

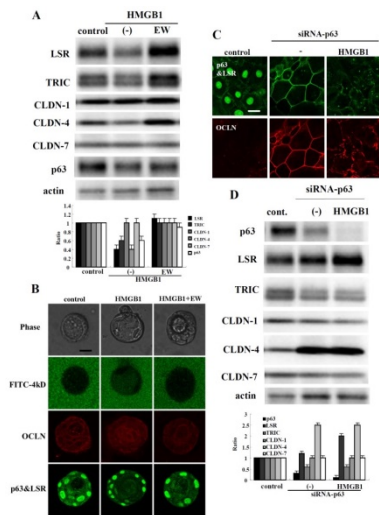
より、上皮バリア機能を低下させると考えられた。



(図 1)

(図 2)

さらに、HMGB1 処置にて TGF- β 受容体阻害剤 EW-7197 を処置したところ、p63 および angulin-1/LSR の発現およびバリア機能の回復がみられた (図 3)。



(図 3)

以上のことより、HMGB1 が TGF- β シグナルを介して鼻副鼻腔疾患のバリア機能の低下に関与している可能性が考えられた。そして、TGF- β 1 受容体阻害剤 EW-7197 が鼻副鼻腔疾患における新規治療薬のターゲットとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaneko Y, Konno T, Kakuki T, Miyata R, Ohkuni T, Kakiuchi A, Yajima R, Ohwada K, Kurose M, Himi T, Takano K, Kojima T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Induction of airway progenitor cells via p63 and KLF11 by Rho-kinase inhibitor Y27632 in hTERT-human nasal epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Transl Res	6. 最初と最後の頁 599, 611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------