

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791218  
 研究課題名 (和文) ヒト鼻粘膜上皮の M 細胞の同定と分化誘導：DDS の新しい標的として  
 研究課題名 (英文) Identification and differentiation induction of M cell in human nasal epithelial cells: a unique and new target for DDS  
 研究代表者  
 郷 充 (GO MITSURU)  
 札幌医科大学 医学部 助教  
 研究者番号：80448604

研究成果の概要：ヒト咽頭扁桃 (adenoid) 上皮は、発達したタイト結合による上皮バリア機能を有し、外来病原体に対する生体防御の役割を担っていることが考えられる。そこで、我々は cytokeratin 20 (Ck20) をマーカーとして、ヒト咽頭扁桃 (adenoid) における M 細胞の同定をし、in vivo および in vitro でのタイト結合蛋白の発現を調べた。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費 | 合計        |
|---------|-----------|------|-----------|
| 2007 年度 | 2,000,000 | 0    | 2,000,000 |
| 2008 年度 | 1,300,000 | 0    | 1,300,000 |
| 年度      |           |      |           |
| 年度      |           |      |           |
| 年度      |           |      |           |
| 総計      | 3,300,000 | 0    | 3,300,000 |

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：耳鼻咽喉学

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 現在、日本国民の 4 人に 1 人が花粉症を発症し、また世界的にもインフルエンザや SARS をはじめとする感染の流行などで、感染アレルギーの予防および治療はますます重要になってくるものと考えられる。上気道特に鼻粘膜上皮の生体防御機構の解明と、より有効な治療法の確立が社会的に急務となってきている。
- (2) 鼻咽喉腔は、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。ヒト鼻粘膜上皮は、発達したタイト結合による上皮バリア機能を有し、抗原取り込み機構については、鼻咽喉腔リンパ装置 (NALT) 同様、抗原提示細

胞である樹状細胞および M 細胞の関与が考えられている

## 2. 研究の目的

- (1) 咽頭扁桃の M 細胞を指標にして、鼻粘膜組織および培養鼻粘膜上皮細胞を用いて、鼻粘膜上皮の M 細胞の同定、分離および分化誘導を行う。
- (2) 鼻粘膜上皮の M 細胞の特異的タイト結合蛋白の発現を検索し、最終的にはヒト鼻粘膜上皮における抗原提示機構 (M 細胞、樹状細胞) と上皮のバリア機能との関係を明らかにする。

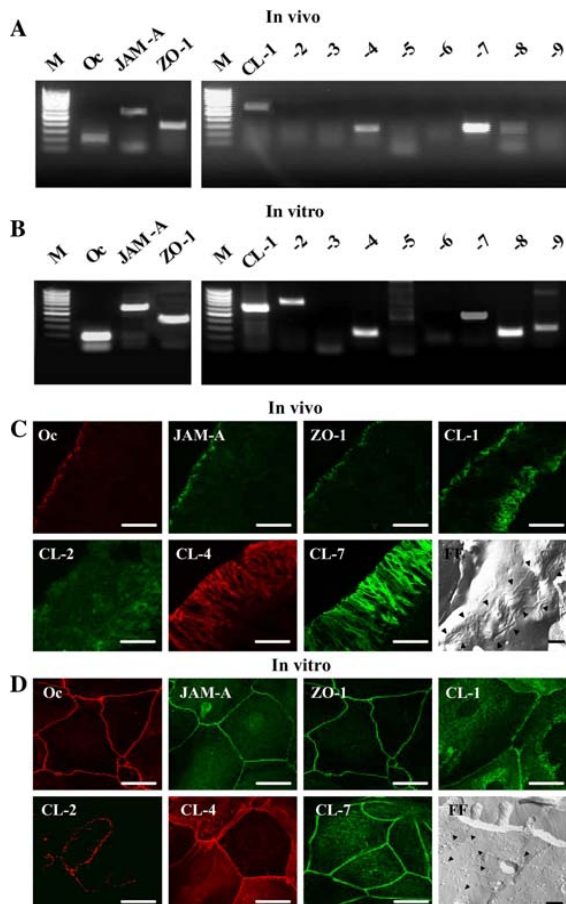
## 3. 研究の方法

- (1) 正常およびアレルギー性鼻炎におけるヒト鼻粘膜組織における M 細胞の同定とタイト結合蛋白の発現解析

- (2) ヒト扁桃上皮を陽性対象として、正常ヒト鼻粘膜上皮におけるM細胞をCk20, UEA-1, Vimentin, Annexin-V, TLR2, TLR9などのM細胞特異抗体を用いて免疫染色, 免疫電顕を用いて同定し, アレルギー性鼻炎の鼻粘膜上皮と発現率を比較検討する。

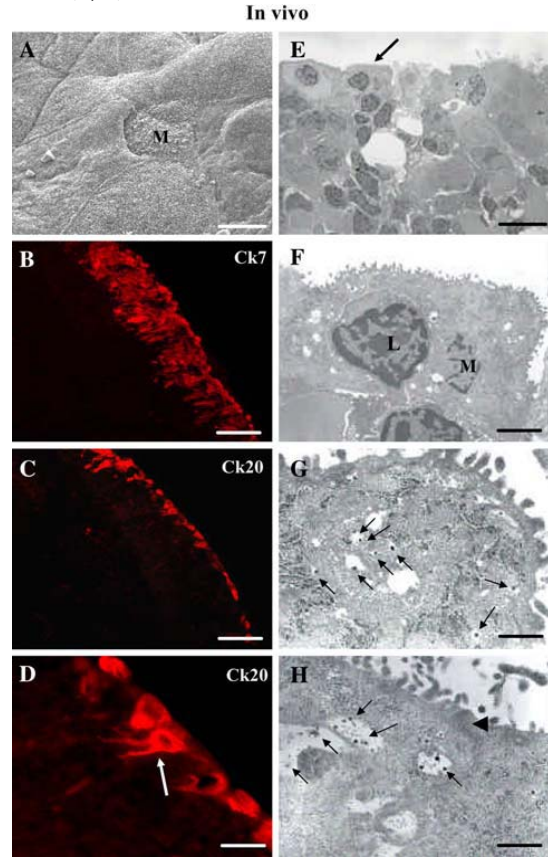
#### 4. 研究成果

- (1) ヒト咽頭扁桃上皮におけるタイト結合蛋白 mRNA の発現  
組織学的検討では, occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -4, -7, -8 の発現 (Fig. A) が認められ, vitro (初代培養) では occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -2, -4, -7, -8, -9 の発現が認められた (Fig. B)。免疫染色においては培養咽頭扁桃細胞で occludin, JAM-A, ZO-1 の発現が最表層に認められ, Claudin-1 は表層から基底膜にかけて発現していたが claudin-2 は発現が認められなかった。一方で claudin-4, -7 は上皮全体に発現していた (Fig. C)。 vitro においては occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -4, -7 は細胞間隙に発現していた (Fig. D)。

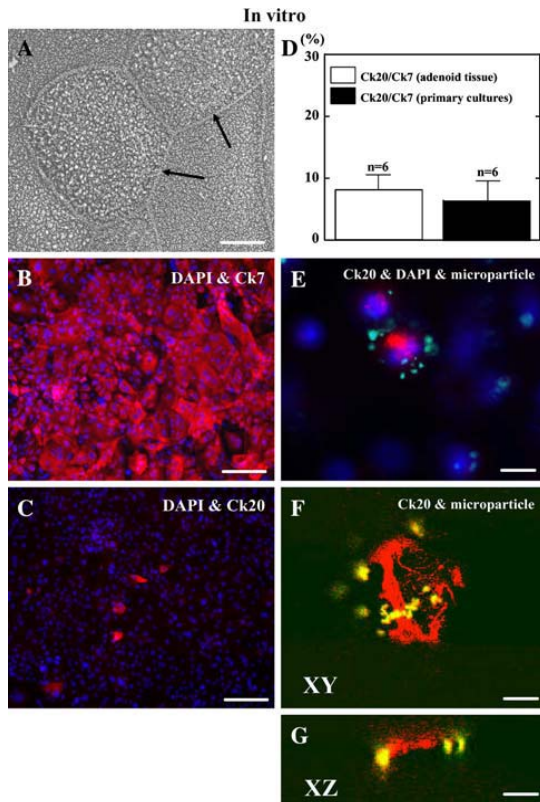


- (2) ヒト咽頭扁桃組織における Ck-20 陽性細胞の発現  
走査形電子顕微鏡では M 細胞は不規則な microvilli を有する (A)。 Ck7 (B) およ

び Ck20 (C, D) の免疫染色においては Ck20 陽性細胞はポケット状の形態を有する。透過型電子顕微鏡 (E-H) のうち, 抗 Ck20 抗体を用いた免疫電子顕微鏡では Ck20 陽性の金粒子が microvilli を有する細胞に取り込まれるのが確認される (G, H)。

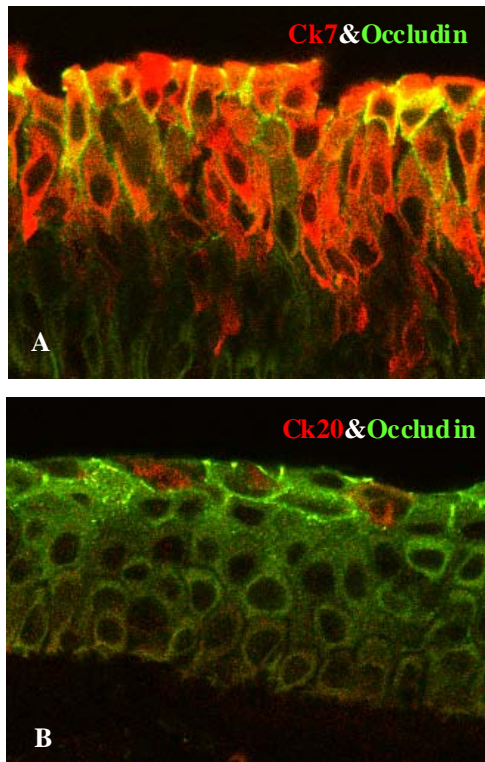


- (3) ヒト培養咽頭扁桃初代培養細胞における Ck-20 陽性細胞  
走査形電子顕微鏡では組織学的検討と同様に不正な microvilli をもつ (Fig. A)。 Ck7 が多くの細胞で陽性なのに対し, Ck20 陽性細胞はわずかで (Fig. B, C) その割合は培養細胞で 6%, 組織学的検討で 8% であった (Fig. D)。 さらに Ck20 陽性細胞は  $0.5 \mu\text{m}$  の蛍光粒子を取り込む像が認められた (Fig. E, F, G)。



(4) ヒト鼻粘膜上皮における Ck20 陽性細胞の発現

タイト結合蛋白 occludin との二重染色にて Ck7 がほぼ全ての上皮に陽性に対して (A), Ck20 陽性 M 細胞が, 一部の鼻粘膜上皮中に明らかにみられ, タイト結合蛋白 occludin の発現もみられた (B)



5. 主な発表論文等  
(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 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: 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 鼻粘膜を介した新たな治療戦略にむけて. 耳鼻咽喉科展望 51(補 1) 32-38, 2008, 査読有.
- ② Koizumi J, Kojima T, Ogasawara N, Kamekura R, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. PKC enhances tight junction barrier function of human nasal epithelial cells in primary culture by transcriptional regulation. 2008 Aug;74(2):432-42. Epub 2008 May 13, 査読有.
- ③ 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. 2008 Jun;39(3):265-73. Epub 2008 Feb 2, 査読有.
- ④ 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. 2008; 28(3):160-165, 査読有.
- ⑤ 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: 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. 臨床免疫・アレルギー科 47(4):427-433, 2007, 査読有.
- ⑥ 氷見徹夫, 郷 充, 高野賢一, 黒瀬誠, 小泉純一, 亀倉隆太, 小笠原徳子,

小島隆, 澤田典均: 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. アレルギーの臨床 27(13):1038-1043, 2007, 査読有.

- ⑦ 小泉純一, 小島隆, 播摩谷敦, 今野信宏, 黒瀬誠, 高野賢一, 亀倉隆太, 郷 充, 澤田典均, 氷見徹夫: ヒト鼻粘膜上皮における自然免疫に関与するタイト結合の調節機構. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 25(2)65-66, 2007, 査読無.
- ⑧ 亀倉隆太, 小島隆, 黒瀬誠, 小泉純一, 高野賢一, 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 Thymic stromal lymphopoietin(TSLP)の発現と上皮バリア機能への影響. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 25(2)63-64, 2007, 査読無.

[学会発表] (計2件)

- ① 郷 充, 小島 隆, 黒瀬 誠, 亀倉隆太, 澤田典均, 氷見徹夫: 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. (シンポジウム) 第31回日本医用エアロゾル研究会, 2009年9月21-22日 旭川市
- ② 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. 核内受容体PPAR-gammaを介したヒト鼻粘膜上皮細胞および樹状細胞のタイト結合の発現調節機構 (ミニシンポジウム) 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

郷 充 (GO MISTURU)  
札幌医科大学医学部 助教  
研究者番号: 80448604

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし