

機関番号：32203

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592003

研究課題名 (和文) 鼻粘膜上皮の物理的バリア機能の動的解析

研究課題名 (英文) Dynamic analysis of physiological barrier function of nasal mucosal epithelia

研究代表者 三輪 正人 (MIWA MASATO)

獨協医科大学・耳鼻咽喉科・准教授

研究者番号：80247650

研究成果の概要 (和文)：気道粘膜上皮は、イオンや高分子物質の輸送機能だけではなく、バリア機能を持ち、生体の恒常性維持を担っている。従来、免疫学的バリア機能に重点がおかれがちであったが、原点に戻り、物理的バリア機能に焦点をあて、新しい視点からの鼻粘膜バリア機能の評価法について検討をおこなった。気道上皮バリア機能の評価するため、*in vitro*では、短絡電流、上皮膜抵抗の、*in vivo*では、鼻粘膜水分蒸散量、上皮間電位差の測定系を確立し、種々の検討を引き続きおこない、以下の結果を得た。

鼻粘膜だけではなく、ヒト咽頭粘膜でも、上皮間電位差が測定可能となった。また、酸ストレスにより咽頭上皮間電位差であらわされる電氣的バリア機能は低下し、中性塩化亜鉛で回復する傾向を示した。プロトンポンプインヒビターを内服することにより、塩化亜鉛局所処置による回復効果は増強する可能性が示唆された。

細菌感染およびウイルス感染のモデルとして、初代培養上皮細胞をリポポリサッカライド (LPS)、poly(I:C)でそれぞれ刺激したところ、上皮膜抵抗が減少し、電氣的バリア機能が低下したことが示唆され、感染時のバリア機能の低下を示す指標となると考えられた。

陽性荷電を有するキトサンなどのポリカチオンでは、上皮膜抵抗が減少したが、陰性荷電を有するヘパリンなどのポリアニオンでは変化を認めなかった。この結果は、ドラッグデリバリーシステムの観点からも重要な知見であると考えられた。

一方、LPS、poly(I:C)刺激後、ヘパリンを投与すると、上皮膜抵抗の減少は回復した。難治性気道疾患に対してヘパリン局所投与による治療が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The regulation of barrier function of nasal epithelium seems to be involved in the pathogenesis of allergic rhinitis. The measurement of transepidermal water loss has been proved to be an important non-invasive method for assessing the efficiency of the skin as a protective barrier. Although the nasal mucosal epithelium has such protective function as well as skin, the precise mechanism is still obscure. We examined the human nasal transepithelial water loss (TEWL) using our original adapter as well as the measurement of electrical potential differences (PD) of nasal mucosa. We observed that TEWL of the nose was decreased after topical application of hydrogen water rather than ascorbic acid.

We could also examine PD of the posterior wall of the human pharyngeal mucosa. After application of HCl, PD was decreased compared with the basal state. After application of ZnCl<sub>2</sub>, PD was significantly increased compared with basal state.

We could develop a new model to evaluate the effect of sheer stress on the electrical barrier function of nasal mucosal epithelium. We have shown in this study that our original model might be very useful for analyzing the effect of shear stress on the

airway epithelium. The data obtained from this model would contribute to understand the pathogenesis and therapy of the upper airway diseases with the rupture of the barrier function by pathological shear stresses.

We have evaluated the short term effect of polycations and polyanions on the transepithelial electrical resistance (TER) of air-interfaced cultured nasal and tracheal epithelial cells excised from guinea pig and to determine the route (transcellular or paracellular) that cause the alteration of TER. The reduction in TER of the primary cultured nasal epithelial cells by polycations might be caused via the transcellular route including ion channels as well as paracellular route like tight junction. Moreover, polyanion like heparin might recover the barrier function of airway mucosal epithelium after application of LPS and poly (I: C).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成22年度	566,650	210,000	776,650
総計	3,266,650	1,100,000	4,366,650

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：7309

キーワード：気道上皮、バリア機能、シアストレス、ドラッグデリバリーシステム(DDS)、イオンチャネル

#### 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎では炎症細胞の浸潤のない前駆期が存在することが報告されているが、その病態は、水分蒸散量の増加であることが認識されている。また、アトピー性皮膚炎、気管支喘息共にバリア機能が障害されることが発症のきっかけかつ病態の進行に重要である説が有力視されつつあるが、アレルギー性鼻炎など上気道粘膜疾患ではまだその点が不明確であった。一方、物理的バリアには、タイトジャンクションを介する paracellular barrier とイオンチャネルなどに影響される transcellular barrier の両者により形成されると考えられるが、両者に対する影響について、同時に検索した研究はほとんど報告されていない。

#### 2. 研究の目的

鼻粘膜などの耳鼻咽喉科領域の粘膜上皮バリア機能の物理的側面について、種々の方法を用いて解析をおこない、種々の疾患での上皮バリア機能障害の病態生理学的意義を検討し、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎や咽喉頭酸逆流症などの耳鼻咽喉科領域の疾患の病態の早期からの評価、難治化の機序の解析を

おこない、また新しい治療法を探求する。

#### 3. 研究の方法

鼻粘膜などの耳鼻咽喉科領域の粘膜上皮バリア機能を評価するため、in vitro では、初代培養気道上皮細胞を用い短絡電流、上皮膜抵抗を測定し、in vivo では、鼻粘膜水分蒸散量、鼻粘膜および咽頭粘膜の上皮間電位差の測定系を確立し、それらの方法を組み合わせて、鼻粘膜などの気道上皮の物理的バリア機能を解析し、種々の条件下での検討をおこなった。

#### 4. 研究成果

(1) 生理食塩水の点鼻あるいは噴霧により、ヒト鼻粘膜水分蒸散量が低下し、鼻粘膜バリア機能が up-regulate されることが示された。また、水素水の点鼻は、同じ抗酸化剤であるビタミンCより大きなバリア機能が up-regulate 作用のあることが証明された(図1)。

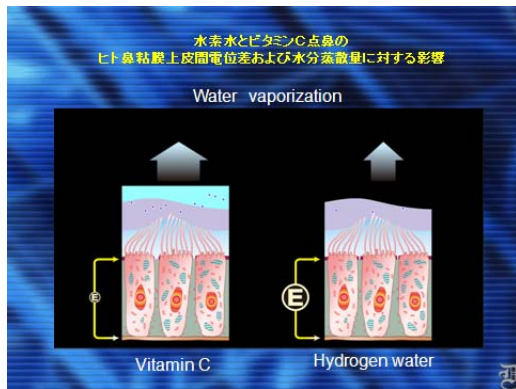


図1 水素水とビタミンC点鼻後のヒト鼻粘膜水分蒸散量と上皮間電位差の変化（模式図）

(2) 電荷性の上皮バリア機能に対する影響を検索するため、モルモット気管を用いた初代培養気道上皮細胞の上皮膜抵抗を測定したところ、陽性に荷電しているキトサンやポリ-1-グルタミン酸などのポリカチオンで低下、陰性に荷電しているヘパリンやポリ-1-グルタミン酸などのポリアニオンで増加する傾向が認められた。この知見はドラッグデリバリーシステムの観点からも重要であると考えられた。

(3) モルモット鼻粘膜を用いた初代培養気道上皮細胞の短絡電流のシアストレスによる変化を測定したが、流速、周波数を変えることにより、短絡電流が変化し、上皮細胞の電気的バリア機能が変化する可能性が示唆された。生理的なシアストレスと思われる範囲で最も、短絡電流が低下し、電気的バリア機能が安定していると思われた。

(4) 抗原鼻誘発検査前後での、鼻粘膜水分蒸散量、鼻粘膜上皮間電位差を測定したところ、誘発後に鼻粘膜水分蒸散量の上昇、鼻粘膜上皮間電位差の減少を確認し、アレルギー反応に伴い上皮バリア機能が down-regulate することを証明した（図2）。

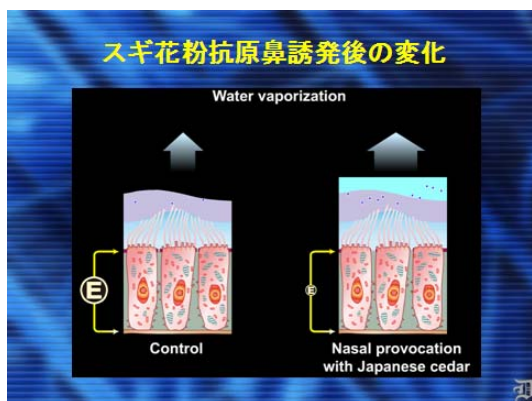


図2 スギ花粉抗原鼻誘発後のヒト鼻粘膜水分蒸

散量と上皮間電位差の変化（模式図）

(5) 鼻粘膜だけではなく、ヒト咽頭粘膜でも、上皮間電位差が測定可能となった。また、酸ストレスにより咽頭上皮間電位差であらわされる電気的バリア機能は低下し、中性塩化亜鉛で回復する傾向を示した。プロトンポンプインヒビターを内服することにより、塩化亜鉛局所処置による回復効果は増強する可能性が示唆された。プロトンポンプに作用する薬剤が、胃酸による食道外粘膜病変や「バリア機能病」といってもよい気道アレルギーひいては広義の気道の炎症性疾患の病態の改善に有効である可能性が示唆された。

(6) 細菌感染およびウイルス感染のモデルとして、初代培養上皮細胞をリポポリサッカライド (LPS)、poly (I:C) でそれぞれ刺激したところ、上皮膜抵抗が減少し、電気的バリア機能が低下したことが示唆され、感染時のバリア機能の低下を示す指標となると考えられた。この効果は、クロライドチャンネルブロッカーにより部分的に抑制され、transcellular barrier paracellular 双方に作用している可能性が示唆された。

一方、LPS、poly (I:C) 刺激後、ヘパリンを投与すると、上皮膜抵抗の減少は回復した。難治性気道疾患に対してヘパリン局所投与による治療が有用である可能性が示唆された（図3）。

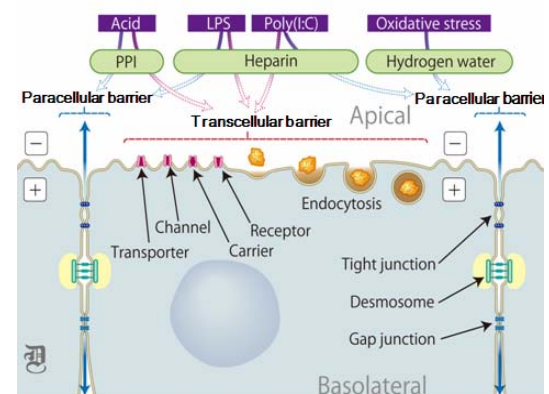


図3 プロトンポンプインヒビター(PPI)、ヘパリン、水素水の粘膜上皮バリア機能に対する影響-transcellular barrier および paracellular barrier に対する効果-（模式図）

## 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 10 件)

① Miwa M, Go M, Yamaguchi S, Miwa M: New Model for Analyzing the Flow Effect on Electrical Barrier of Tracheal Epithelium. Proceeding of Airway Secretion Research (査読 無) 13:23-27, 2011

② 高山賢哉, 三輪正人, 若山知薫, 高山明美, 池上岳, 相良博典, 渡辺建介: 気道粘膜上皮電気的バリアに対する酸の作用点についての検討 日本気管食道学会会報 (査読 有) 61: 493-497, 2010.

③ Miwa M, Kohyama K, Nakajima N, Kanoh N, Ohmori K, Fukuda K, Watanabe K: Alteration of transepithelial electrical resistance on primary cultured airway tracheal cells excised from guinea pig by polycations and polyanions. Proceeding of Airway Secretion Research (査読 無) 12:11-14, 2010.

④ Miwa M, Ohmori K, Fukuda K, Kohyama K, Kanoh N, Iwasaki Y, Nakajima N, Yamaguchi S, Ichiwata T, Nagao K, Miwa M, Watanabe K: Control of transepithelial electrical resistance on primary cultured airway tracheal cells excised from guinea pig Proceeding of Airway Secretion Research (査読 無) 11: 1-4, 2009.

⑤ 中島規幸, 三輪正人, 広瀬壮, 渡辺建介: ドライノーズスプレーによる鼻粘膜蒸散量と上皮間電位差の変化 (査読 有) アレルギー 58 (2): 119-123, 2009.

⑥ 三輪正人, 渡辺建介: 過酸素によるPC12細胞カリウムチャンネル活性の抑制 頭頸部自律神経 (査読 無) 23: 51-54, 2009.

⑦ 三輪正人, 狩野信和, 岩崎洋子, 中島規幸, 山口晋太郎, 広瀬壮, 阿部実恵子, 三輪真由美, 渡辺建介, 高山賢哉, 一和多俊男, 長尾光修: 初代培養気管上皮細胞の上皮膜抵抗に対する酸およびプロトンポンプインヒビターの効果 日本気管食道学会会報 (査読 有) 60 (3): 276-280, 2009.

⑧ Miwa M, Hirose T, Yamaguchi S, Nakajima N, Iwasaki Y, Murakami A, Ohmori K, Fukuda K, Miwa M, Watanabe K: Effects of typical corticosteroids on the transepithelial water loss in human nasal mucosa. Proceeding of Airway Secretion Research (査読 無) 10: 37-40, 2008.

⑨ 三輪正人, 山口晋太郎, 中島規幸, 村上敦史, 渡辺建介, 高山賢哉, 一和多俊男, 長尾光修: 気管の酸曝露モデル作成とプロトンポンプインヒビターの効果の検討 日本気管食道学会会報 (査読 有) 59: 401-405, 2008.

⑩ 三輪正人: 気道粘膜における水移動の病態-電気生理学的にみた治療法の選択- 日本鼻科学会誌 (査読 有) 47: 30-32, 2008.

〔学会発表〕(計 37 件)

1 三輪正人, 呉松晃, 小松陽, 蓮塚也, 廣瀬壮, 中島規幸, 山口晋太郎, 村上敦史, 狩野信和, 池田洋子, 阿部実恵子, 三輪真由美, 渡辺建介: 気道上皮のcharge barrierに対するLPSおよびpoly(1:C)の効果 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 11/25~27, 2010.

2 三輪正人, 蓮塚也, 呉松晃, 渡辺建介: LPSおよびpoly(I:C)刺激後の鼻粘膜上皮細胞の電気的バリア機能低下とヘパリンの改善効果 第49回日本鼻科学会総会・学術講演会 札幌市 8/26~28, 2010.

3 三輪正人, 渡辺建介: 気道粘膜上皮に対する波動の影響 第111回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 仙台市 5/20~22, 2010.

4 中島規幸, 三輪正人, 廣瀬壮, 狩野信和, 呉松晃, 蓮塚也, 山口晋太郎, 村上敦史, 岩崎洋子, 三輪真由美, 渡辺建介: 抗酸化剤点鼻が抗原鼻誘発反応に与える影響 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 京都市 5/8~9, 2010.

5 広瀬壮, 三輪正人, 中島規幸, 狩野信和, 山口晋太郎, 村上敦史, 阿部実恵子, 岩崎洋子, 蓮塚也, 呉松晃, 渡辺建介: 点鼻ステロイド薬の鼻粘膜バリア機能に対する効果 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 京都市 5/8~9, 2010.

6 三輪正人, 渡辺建介: ヒト咽頭粘膜の電気的特性 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 京都市 5/8~9, 2010.

7 狩野信和, 三輪正人, 中島規幸, 阿部実恵子, 蓮塚也, 山口晋太郎, 三輪真由美, 渡辺建介: ヒト粘膜上皮バリア機能に対するヒアルロン酸含有点鼻薬の効果 第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 福井市 2/18~20, 2010.

8 三輪正人, 渡辺建介: 気道上皮に対するシアストレスの影響 第28回日本耳鼻咽喉科

免疫アレルギー学会 福井市 2/18～20, 2010.

9 三輪正人, 渡辺建介: 咽喉頭酸逆流症における咽喉粘膜の電気的特性 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 福井市 2/18～20, 2010.

10 Miwa M, Go M, Kohyama K, Watanabe K, Sagara H, Natume H, Mayumi M: Effects of Polycations and Polyanions on Nasal Electrical Barrier アメリカ鼻科学会 ポストン 9/24～25, 2010.

11 Miwa M, Miwa M, Watanabe K: Chloride Ion Transport of the Nasal Ciliated Epithelial Cell アメリカ耳鼻咽喉科学会 ポストン 9/24～25, 2010.

12 Miwa M, Watanabe K: Measurement of electrical potential differences on human pharyngeal mucosa 第 7 回国際扁桃・粘膜免疫シンポジウム 旭川市 7/7～9, 2010.

13 三輪正人, 阿部実恵子, 中島規幸, 広瀬壮, 岩崎洋子, 山口晋太郎, 村上敦史, 蓮琢也, 呉松晃, 三輪真由美, 渡辺建介: 抗酸化剤点鼻によるヒト鼻粘膜上皮バリア機能の up-regulation 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 秋田 10/29-31, 2009.

14 狩野信和, 三輪正人, 阿部実恵子, 中島規幸, 広瀬壮, 狩野信和, 呉松晃, 蓮琢也, 山口晋太郎, 村上敦史, 三輪真由美, 渡辺建介: 保湿剤点鼻によるヒト鼻粘膜上皮バリア機能の変化とその持続時間 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 秋田 10/29-31, 2009.

15 三輪正人, 阿部実恵子, 広瀬壮, 中島規幸, 呉松晃, 蓮琢也, 三輪真由美, 渡辺建介: ビタミンCと水素水の鼻粘膜上皮バリア機能に対する効果 第 48 回日本鼻科学会 島根 10/1-3, 2009.

16 三輪正人, 岩崎洋子, 中島規幸, 狩野信和, 広瀬壮, 阿部実恵子, 渡辺建介: 耳鼻咽喉科局所処置の有用性についての電気生理学的考察 第 27 回頭頸部自律神経研究会 5/28-29, 2009.

17 三輪正人, 狩野信和, 中島規幸, 山口晋太郎, 広瀬壮, 岩崎洋子, 村上敦史, 阿部実恵子, 三輪真由美, 渡辺建介: 上気道におけるフィラグリンの発現 第 21 回日本アレル

ギー学会春季臨床大会 岐阜 6/4-6, 2009.

18 中島規幸, 三輪正人, 堤剛, 渡辺建介: 外来診療における器具の環境調査について 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 東京 5/14-16, 2009.

19 三輪正人, 阿部実恵子, 中島規幸, 広瀬壮, 岩崎洋子, 村上敦史, 山口晋太郎, 三輪真由美, 渡辺建介: 鼻疾患の局所療法についての生理学的検討 — 生理食塩水と局所ステロイド剤についての基礎的エビデンス— 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 東京 5/14-16, 2009.

20 中島規幸, 三輪正人, 阿部実恵子, 村上敦史, 平井博之, 永田欽也, 中村正孝, 渡辺建介: 抗原感作マウスの鼻粘膜血流および上皮間電位差に対するプロスタグランディンD2 受容体の関与 第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 千葉 2/12-14, 2009.

21 三輪正人, 狩野信和, 山口晋太郎, 岩崎洋子, 広瀬壮, 渡辺建介: ヒト鼻粘膜上皮におけるフィラグリンの局在 第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 千葉 2/12-14, 2009.

22 Abe M, Miwa M, Nakajima N, Hirose T, Yamaguchi S, Ikeda Y, Miwa M, Watanabe K: Measurement of transepithelial water loss of human nasal mucosa in various conditions 国際耳鼻咽喉科学会 Saopaul, Brazil 6/1-5, 2009.

23 Miwa M, Watanabe K: A new model for analyzing the flow effects on electrical barrier of nasal epithelium 国際鼻科学会 Philadelphia, USA 4/16-22, 2009.

24 中島規幸, 三輪正人, 渡辺建介: セビメリン塩酸塩水と物投与により改善した通年性後鼻漏 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会号 東京 11, 2008.

25 阿部実恵子, 三輪正人, 中島規幸, 広瀬壮, 渡辺建介: ドライノーズスプレー噴霧の鼻粘膜上皮バリア機能に対する効果 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会号 東京 11, 2008.

26 狩野信和, 三輪正人, 中島規幸, 渡辺建介: 気道上皮酸暴露モデルに対するチャンネルブロッカーの効果 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会号 東京 11, 2008.

27 三輪正人, 渡辺建介: 気道上皮におけるシ

アストレス解析装置の開発 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会号 東京 11, 2008.

28 三輪正人, 狩野信和, 中島規幸, 山口晋太郎, 岩崎洋子, 渡辺建介, 高山賢哉, 一和多俊男: 長尾光修初代培養気道上皮細胞のバリア機能に対する荷電性の影響 第 60 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会 熊本 11, 2008.

29 三輪正人: 鼻粘膜の電気的特性と PGD2 アレルギー性鼻炎治療研究会 東京 10, 2008.

30 中島規幸, 三輪正人, 廣瀬壯, 渡辺建介: 塩酸セビメリン水和物投与により改善した後鼻漏 日本鼻科学会 名古屋 9, 2008.

31 三輪正人, 岩崎洋子, 中島規幸, 廣瀬壯, 阿部実恵子, 狩野信和, 山口晋太郎, 三輪真弓, 渡辺建介: 生理食塩水の鼻洗浄による鼻粘膜上皮バリア機能の up-regulation 日本鼻科学会 名古屋 9, 2008.

32 三輪正人, 狩野信和, 山口晋太郎, 渡辺建介: 初代培養気道粘膜上皮の電気的バリア機能に対する酸および PPI の効果 第 9 回炎症と PPI 研究会 京都 8, 2008.

33 三輪正人, 渡辺建介: 過酸素による PC12 細胞カリウムチャンネル活性の抑制 第 26 回頭頸部自律神経研究会 大阪 8, 2008.

34 狩野信和, 三輪正人, 中島規幸, 岩崎洋子, 廣瀬壯, 渡辺建介, 高山賢哉, 一和多俊男, 長尾光修: フィラグリンの局在の臓器特異性 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京 6, 2008.

35 高山賢哉, 高山明美, 一和多俊男, 長尾光修, 三輪正人, 山口晋太郎, 狩野信和, 中島規幸, 渡辺建介: 気道粘膜上皮における電気的バリア機能の酸曝露後の変化 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京 6, 2008.

36 三輪正人, 山口晋太郎, 岩崎洋子, 中島規幸, 廣瀬壯, 村上敦史, 渡辺建介: 上皮の電気的バリア機能からみた咽喉頭酸逆流症の発症機序 日本耳鼻咽喉科学会 大阪 5, 2008.

37 Miwa M, Yamaguchi S, Hirose T, Watanabe K: Alterations of transepithelial water loss and electrical potential differences of human nasal mucosa after

nasal pollen challenge American Rhinologic Society's 54th Chicago 9, 2008.

[図書] (計 1 件)

三輪正人, 吉川敏一 (編): 道粘膜上皮の電気的バリア機能と酸およびプロトンポンプインヒビター 炎症免疫応答とプロトンポンプインヒビター 診断と治療社 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 特許権

発明者: 三輪正人

権利者: 三輪正人

種類: 特願

番号: 2009-198144

出願年月日: 平成 21 年 8 月 28 日

国内外の別: なし

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://harimazaka.net/iin/iin\\_2.htm](http://harimazaka.net/iin/iin_2.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪正人 ( MIWA MASATO )

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 80244650

(2) 研究分担者

山口晋太郎 ( YAMAGUCHI SHINTARO )

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70337403