

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：20101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791915
 研究課題名（和文） ヒト鼻咽腔粘膜上皮におけるDDSを介する抗原提示細胞の機能解析および分化誘導
 研究課題名（英文） Functional analysis and differentiation induction of antigen presenting cells via DDS in human nasal epithelial cells
 研究代表者
 郷 充 (GO MITSURU)
 札幌医科大学・医学部・講師
 研究者番号：80448604

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。われわれは、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する研究をおこなった。

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.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

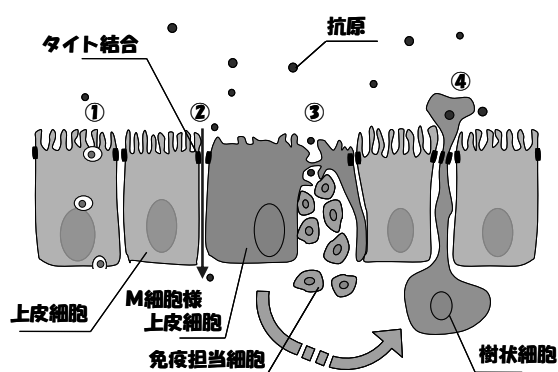
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：咽頭科学

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、鼻咽腔リンパ装置（NALT）同様、抗原提示細胞

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

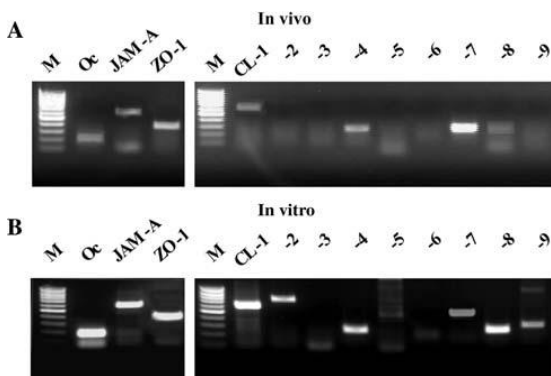
- (1) 咽頭扁桃の M 細胞を指標にして、鼻粘膜組織および培養鼻粘膜上皮細胞を用いて、鼻粘膜上皮の M 細胞の同定、分離および分化誘導を行う。
- (2) 鼻粘膜上皮の M 細胞の特異的タイト結合蛋白の発現を検索し、最終的にはヒト鼻粘膜上皮における抗原提示機構 (M 細胞, 樹状細胞) と上皮のバリア機能との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

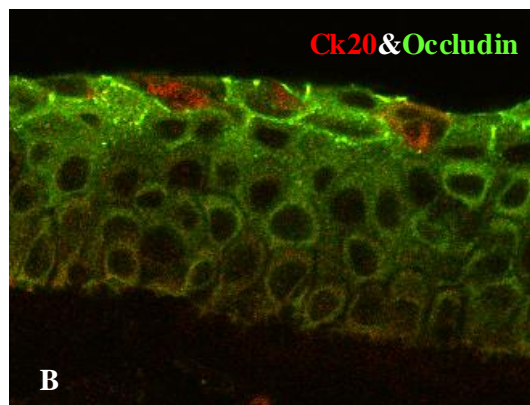
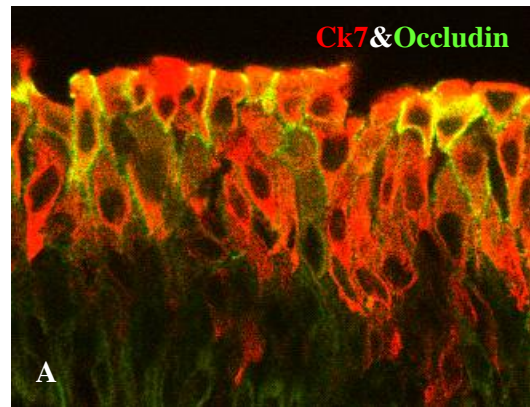
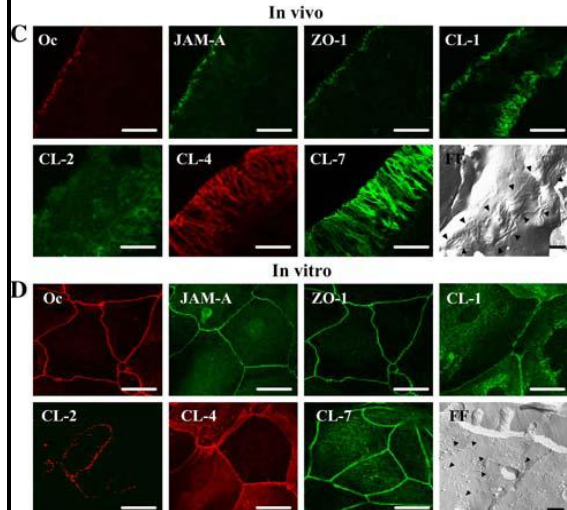
- (1) 正常およびアレルギー性鼻炎におけるヒト鼻粘膜組織における M 細胞の同定とタイト結合蛋白の発現解析
- (2) ヒト扁桃上皮を陽性対象として、正常ヒト鼻粘膜上皮における M 細胞を Ck20, UEA-1, Vimentin, Annexin-V, TLR2, TLR9 などの M 細胞特異抗体を用いて免疫染色, 免疫電顕を用いて同定し, アレルギー性鼻炎の鼻粘膜上皮と発現率を比較検討する。

4. 研究成果

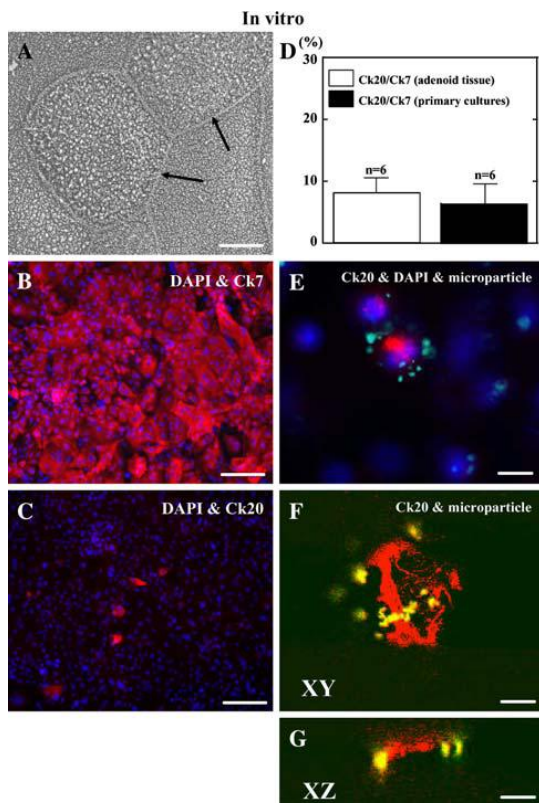
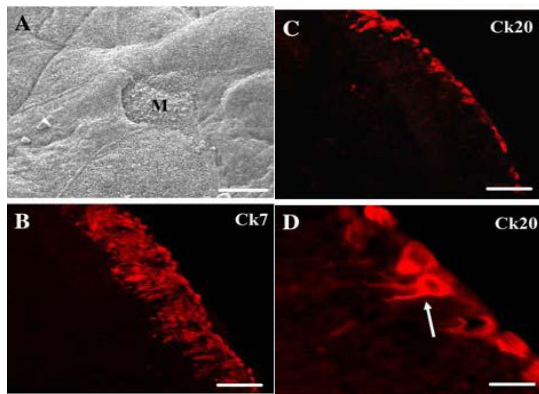
- 組織学的検討では, occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -4, -7, -8 の発現 (Fig. A) が認められ, vitro (初代培養) では occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -2, -4, -7, -8, -9 の発現が認められた。



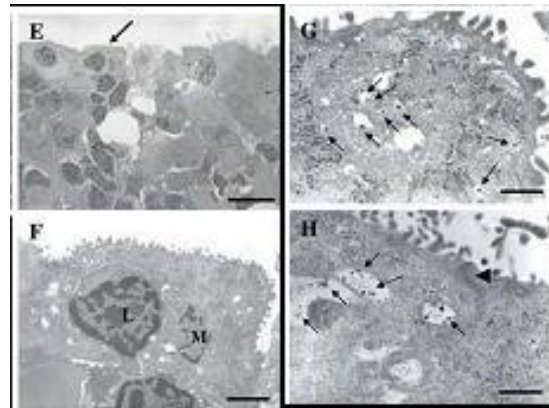
- 免疫染色においては培養咽頭扁桃細胞で occludin, JAM-A, ZO-1 の発現が最表層に認められ, Claudin-1 は表層から基底膜にかけて発現していたが claudin-2 は発現が認められなかった。一方で claudin-4, -7 は上皮全体に発現していた。 vitro においては occludin, JAM-A, ZO-1, claudin-1, -4, -7 は細胞間隙に発現していた。



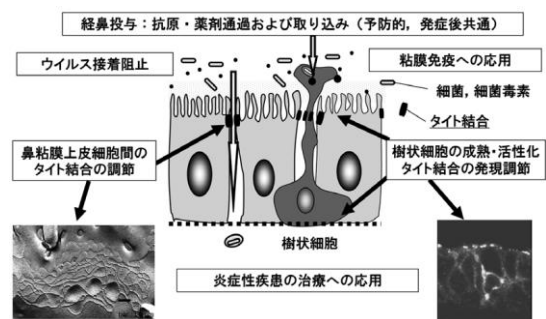
- 走査形電子顕微鏡ではM細胞は不規則な microvilli を有する。Ck7 および Ck20 の免疫染色においては Ck20 陽性細胞はポケット状の形態を有する。透過型電子顕微鏡のうち、抗 Ck20 抗体を用いた免疫電子顕微鏡では Ck20 陽性の金粒子が microvilli を有する細胞に取り込まれるのが確認される。走査形電子顕微鏡では組織学的検討と同様に不正な microvilli をもつ。Ck7 が多くの細胞で陽性なのに対し、Ck20 陽性細胞はわずかで、その割合は培養細胞で 6%、組織学的検討で 8%であった。さらに Ck20 陽性細胞は 0.5 μ m の蛍光粒子を取り込む像が認められた。



- タイト結合蛋白 occludin との二重染色にて Ck7 がほぼ全てのヒト鼻粘膜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。



- 本研究課題の成果、今後の展望
本研究では、鼻粘膜上皮は機械的バリアだけでなく、「粘膜免疫機構」という自然免疫・獲得免疫を成立させるための重要な「免疫臓器」であることを示した。特に、タイト結合と樹状細胞や M 細胞との関係は、上皮細胞の役割のうち古典的な抗原感知・移送という概念とは異なる新しい抗原サンプリング機構の存在を確認し、鼻粘膜を介した、すなわち、経鼻投与による炎症制御の可能性が示された。今後はさらに研究を進め、将来的な経鼻投与による感染予防や発症抑制機構の解明に寄与したい。(下図)



5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kojima T, Go M, Takano K, Kurose M, Ohkuni T, Koizumi J, Kamekura R,

Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Obata K, Hirakawa S, Nomura K, Keira T, Miyata R, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Regulation of tight junctions in upper airway epithelium. Biomed Res Int. 2013;2013. Epub 2012 Dec 29, 査読有.

- ② 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. Epub 2011 Aug 18, 査読有.

[学会発表] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者

郷 充 (GO MISTURU)

札幌医科大学医学部 講師

研究者番号：80448604

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし