

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592580

研究課題名(和文) ヒト鼻粘膜上皮バリア機能の分子的基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism of barrier function in human nasal mucosal epithelia

研究代表者

三輪 正人 (Miwa, Masato)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80247650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：乾燥性鼻炎(ドライノーズ)の疾患概念、天然保湿因子であるフィラグリンの鼻における動態はほとんど知られていない。本研究において、鼻粘膜バリア機能におけるフィラグリンの意義について検討をおこなった。in vivoでは、スギ花粉症患者に対して、抗ヒスタミン薬の季節前投与(初期療法)をおこなうと、季節後投与群に比し、フィラグリンの発現がより増加することが示された。in vitroでは、ヒト鼻粘膜初代培養細胞において、細菌およびウイルス感染のモデルであるLPSあるいはpoly I:C投与により、フィラグリンの発現が減少した。一方、TNF $\alpha$ 投与により、フィラグリンの発現は増加する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Filaggrin (FLG) has been known as a natural moisturizing factor and barrier related protein.

We have demonstrated the expression of FLG through real time RT-PCR in human nasal mucosa excised from inferior turbinate by a noninvasive method using cotton swab. Preseasonal treatment of Japanese cedar pollinosis with antihistamine increased FLG expression in human nasal mucosa compared with postseasonal treatment. Additionally, we are investigating the alteration of FLG expression in primary cultured human nasal epithelial cells through various stimulations. After stimulation of lipopolysaccharide (LPS), poly I:C, FLG expression was diminished. On the other hand, TNF $\alpha$  increases FLG expression in primary cultured cells. Taken together recent reports and our original results, FLG might be a key molecule connecting innate immunity with acquired immunity in the upper airway. Further study would be expected to fix the epithelial barrier to treat and prevent AR as a barrier disorder.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：バリア機能 フィラグリン アレルギー性鼻炎 花粉症 鼻粘膜上皮 ドライノーズ 花粉症の初期治療 アレルギーの先制医療

## 1. 研究開始当初の背景

ドライノーズは、ドライスキン、ドライアイなどと異なりその疾患概念はまだ不明確である。アトピー性皮膚炎の前段階としてドライスキンが存在することが知られているが、この病態の本質は天然保湿因子であるフィラグリンタンパクの発現異常に起因する表皮バリア機能障害であることが最近、明らかとなってきた。

アトピー性皮膚炎や気管支喘息の発症は、上皮バリア機能の破綻により起因するとの説が有力となっている。また、細菌やウイルス感染によりおこる上皮バリア機能の変調がアレルギーの発症に影響について気管支喘息などで指摘されはじめています。一方、アレルギーの原因物質であるアレルゲンそのものに含まれる物質が、IgE に依存せずにバリア機能を攪乱し、Th2 応答を誘導するという広義の Th2 アジュバントとして作用することが明らかになっており上皮バリア機能と自然免疫、アレルゲンそのものの上皮バリアに対する作用がより重要視されてきている。

研究代表者は気道上皮バリア機能およびその表裏一体の関係にある分泌・輸送機能に対する種々の生理学的研究法を既に確立しており、包括的な解析をおこなえる状況にある。一例として、表皮バリア機能の非侵襲的評価法のゴールドスタンダードであった水分蒸散量の測定を、我々は初めて鼻粘膜に適用した(Miwa et al. Am. J. Rhinol. 2006)。これらの方法を用い、鼻粘膜上皮バリア機能の加齢、アレルゲン鼻誘発による down-regulation、抗酸化剤点鼻による up-regulation を既に証明している。

天然保湿因子でかつバリア機能関連タンパクであるフィラグリンの異常は、欧米人口の9%に、本邦のアトピー性皮膚炎26%にみられアトピー性皮膚炎の原因となることが報告されているが、気道上皮での意義は全く不明である。

## 2. 研究の目的

天然保湿因子でありなおかつバリア機能関連タンパクであるフィラグリンのヒト鼻粘膜における発現を分子生物学的に証明し、フィラグリンのヒト鼻粘膜上皮バリア機能における意義を分子生理学的に明らかにする。具体的には、以下の2点をおこなう。

1) スギヒノキ花粉症患者において、季節前投与を行った群と季節後投与をおこなった群での下鼻甲介粘膜上皮擦過細胞のフィラグリンの発現を分子生物学的に検討する。

2) ヒト鼻粘膜におけるフィラグリンの免

疫組織学的染色およびリアルタイム RT-PCR をおこない、ケラチノサイトおよび気管支上皮細胞と比較する。

3) 細菌毒素、ウイルスに対する鼻粘膜上皮バリアの応答の *in vitro* でフィラグリンの発現の変化により検索し、それらの持つ鼻粘膜上皮バリア機能タンパクに対する影響を証明する。

## 3. 研究の方法

### *in vivo* の研究

材料：順天堂医院耳鼻咽喉科アレルギー外来にて採取したヒト鼻粘膜組織を用いた。

方法：季節前および季節後に第2世代抗ヒスタミン薬の内服を主体とする治療をおこなったスギ花粉症患者に対して下鼻甲介粘膜を綿棒にて擦過することにより得られた細胞について、SV Total RNA Isolation System(Promega) により RNA を抽出し、Super Script First-strand Synthesis System for RT-PCR(invitrogen) により逆転写反応を行った後、フィラグリンのリアルタイム PCR をおこなった。

### *in vitro* の研究

#### 免疫組織学的検討

摘出ヒト鼻粘膜組織を4%緩衝ホルマリン溶液にて固定した後、30%スクロース/0.1M PBS で平衡化し、凍結切片を作成した。2%BSA で前処理後、一次抗体としてウサギ抗フィラグリン・ポリクローナル抗体(ab24584, abcam)を、二次抗体としてCy3/Redを使用した。また、核染色にはDAPIを用いた。対象陰性として一次抗体を用いない標本を用意した。正常ヒトケラチノサイト、正常ヒト気管粘膜細胞の初代培養細胞についてもおこない比較した。

#### 分子生物学的検討

正常ヒト鼻粘膜上皮細胞 (PromoCell) を Airway Epithelial Cell Growth Medium を用いて培養し、subconfluent を認めるところで RNA を Glass Fiber Filter 法を用い精製し、ReverTra Ace® qPCR RT Kit にて逆転写反応を行い鋳型 cDNA を作製した。これを用いてリアルタイム PCR を行い、Relative Quantification 法にて定量解析を行った。

細菌感染のモデルとしてリポポリサッカライド(LPS)、ウイルス感染のモデルとして poly(I:C) および TNF 投与前後のフィラグリンの発現の変化を検討した。

#### 4. 研究成果

初期療法後、鼻粘膜上皮内のフィラグリンの発現が増加する傾向がみられた。また、有効例でよりフィラグリンの発現の増加を認めた。早期介入により、フィラグリンの増量を介して、アレルギー性炎症を制御できる可能性が示唆された。

ヒト鼻粘膜でのフィラグリンの発現は免疫染色、リアルタイムPCRで認められた。ケラチノサイトではより多く認めたが、気管支上皮細胞ではほとんどみられなかった。

細菌感染およびウイルス感染のモデルであるLPSあるいはpoly I:C投与により、フィラグリンの発現が減少した。一方、TNF投与により、フィラグリンの発現は増加する結果を得た。LPS、poly(I:C)刺激後それぞれ用量依存性に上皮膜抵抗が低下することも見だしているが、この結果をあわせて考えると、細菌やウイルス感染により鼻粘膜上皮バリア機能が低下し、その現象の一翼をフィラグリンの発現低下が寄与している可能性が推察された。

Th2環境下において、フィラグリンの発現は抑制されることが過去に報告されている。本研究によりフィラグリンは、自然免疫と獲得免疫を結ぶキーとなる物質である可能性が示された。

本研究により、鼻粘膜の病態発症および遷延化にバリア機能関連タンパクであるフィラグリンの異常が関与していることが明らかとなれば、ドライノーズ、アレルギー性鼻炎の発症要因としてあるいは広く鼻副鼻腔疾患の難治化因子としてのフィラグリン異常に着目した全く新しい治療法が生まれる可能性がある。

アレルギー性疾患の先制医療を考える意味でも、気道粘膜におけるフィラグリンの発現について今後さらに詳細に検討する必要があると思われる。

#### 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8件)

1 三輪正人、三輪真由美、獲得免疫、JOHNS、査読無、29、2013、293-296。

2 三輪正人、高井敏朗、神谷和作、塩沢晃人、鼻粘膜上皮バリア機能からみた花粉抗原の特性、順天堂医学、査読無、58、2013、466。

3 Miwa M、Hirose T、Nakajima N、Abe M、Miwa M、Ikeda K、Effect of pilocarpine hydrochloride on human nasal epithelial mucosa. Proc Airway Sec Res, 査読無、14、2013、5-9。

4 Ono M、Kusunoki T、Miwa M、Hirotsu M、Shiozawa A、Ikeda K。Reduction in superoxide dismutase expression in the epithelial mucosa of eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Int Arch All Immunol, 査読有、2、2013、173-180、10.1159/000353122。

5 Hirotsu M、Shiozawa A、Ono N、Miwa M、Kikuchi K、Ikeda K。Fungal extracts detected in eosinophilic chronic rhinosinusitis induced cytotoxins from the nasal polyp cells. Laryngoscope, 査読有、24、2014、1010-1012、24615892。

6 Miwa M、Ono N、Hirotsu M、Shiozawa A、Hanao M、Hirose T、Miwa M、Ikeda K。The usefulness of nasal exhaled breath condensate in patients with Japanese cedar pollinosis. Proc Airway Sec Res, 査読無、15、2014、27-29。

7 塩沢晃人、三輪正人、池田勝久、スギ花粉症の発症と初期治療-スギ花粉症患者に対する初期治療前後の生理学的評価、臨床免疫・アレルギー科、査読無、6、2013、633-636。

8 Shiozawa A、Miwa M、Ono N、Honma H、Hirotsu M、Ikeda K。Comparative analysis of cytokine release from epithelial cell culture of upper airway. Rhinology, 査読有、53、2015、in press。

[学会発表](計16件)

1 三輪正人、花尾麻美、塩沢晃人、廣津幹夫、小野倫嗣、池田勝久、原むつ子、高井敏朗、奥村 康、スギヒノキ花粉症患者鼻粘膜擦過細胞におけるフィラグリンの発現、日本アレルギー学会、2012.11.10-12、東京

2 三輪正人 バリア機能とアレルギーマ  
ーチからみた花粉症の側面 平成25年栃  
木耳鼻咽喉科臨床セミナー(招待講演)  
2013.1.17、宇都宮

3 塩沢晃人、三輪正人、池田勝久、鼻噴霧  
用ステロイドによるスギ花粉鼻誘発前後の  
ヒト鼻粘膜バリア機能の変化 日本耳鼻咽  
喉科免疫アレルギー学会 2013.2.22-23、倉敷

4 Miwa M. Allergic Rhinitis-From Bench to Clinic. Allergic Rhinitis as a barrier disorder disease. 16<sup>th</sup> Asian Research Symposium in Rhinology. (招待講演) 2013.8.29-31, Tokyo.

5 三輪正人、塩沢晃人、池田勝久、早期介入により鼻粘膜バリア機能関連タンパクの発現は増強するか 日本耳鼻咽喉科学会、2013.5.17-19, 札幌

6 三輪正人、Point-of-Care Researchの視点 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会 (招待講演) 2014.8.24、大阪

7 三輪正人、小野倫嗣、塩沢晃人、三輪真由美、池田勝久、ドライノーズの成因に関する実験的研究 低湿度環境下での健康成人の鼻粘膜の変化 日本鼻科学会、2013.9.28-30, 福井

8 塩沢晃人、三輪正人、池田勝久、アレルギー性鼻炎患者初代培養鼻粘膜上皮細胞のIL-17A刺激による各種サイトカインの網羅的解析 日本鼻科学会、2013.9.28-30, 福井

9 三輪正人、小野倫嗣、塩沢晃人、三輪真由美、池田勝久、低湿度環境下における鼻粘膜・表皮機能の生理学的評価 日本生気象学会 2013.11.1-2, 米子

10 三輪正人 Point of Care Researchからみた耳鼻咽喉科外来診療 東京都耳鼻咽喉科医会学術講演会(招待講演)2014.12.14, 東京

11 三輪正人、バリア機能からみた花粉症治療-Tough noseをいかにつくるか-、第120回札幌市耳鼻咽喉科医会講演会(招待講演)2014.3.8、札幌

12 三輪正人 小児アレルギー性鼻炎診療の新しい視点、宮城県小児科医会学術講演会(招待講演)2014.3.27、仙台

13 三輪正人 Tough noseをいかにつくるか 鼻粘膜バリア機能をup-regulateするための戦略 耳鼻咽喉科臨床学会 (招待講演) 2014.6.26-27, 盛岡

14 佐々木大輔、三輪正人、池田勝久、スギ花粉症患者における呼気凝集液を用いた客観的指標の有用性についての検討 日本鼻科学会 2014.9.25-27, 大阪

15 塩沢晃人、三輪正人、池田勝久、鼻粘膜および鼻茸初代培養上皮細胞のIL-17A刺激による各種サイトカインの網羅的解析

日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会  
2014.2.6-8, 徳島

16 中村真浩、牛尾博子、三輪正人、奥村康、小川秀興、池田勝久、鼻粘膜におけるフィラグリンの発現、第33回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2015.2.26-28, 東京

〔図書〕(計2件)

1 三輪正人、池田勝久、岩岡愛美、花粉症予防の食事とは? スマート栄養管理術、2013、79-82、医歯薬出版、東京

2 三輪正人 健康食品の有効性のエビデンスは? EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 2015-2016、(池田勝久、武田憲昭、香取幸夫、原淵保明、丹生健一 編) 2015、201-204.

〔産業財産権〕  
出願状況(計1件)

名称: アレルギー性鼻炎の判定方法  
発明者: 三輪正人  
権利者: 三輪正人  
種類: 特許  
番号: 2012-225008  
出願年月日: 2012.10.11  
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
Blog: <http://dry.nose.main.jp>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
三輪正人 (MIWA, Masato)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80247650

(2) 研究分担者  
神谷和作 (KAMIYA, Kazusaku)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10374159

池田勝久 (IKEDA, Katsuhisa)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：70159614

(3) 連携研究者

高井敏朗 (TAKAI, Toshiro)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：70338375