

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791794

研究課題名(和文) 粘膜上皮と上皮内樹状細胞およびM細胞の相互作用制御による抗原認識機構の調節

研究課題名(英文) Regulation mechanism of antigen recognition by the interaction control of M cells and intraepithelial dendritic cells and mucosal epithelium

研究代表者

黒瀬 誠 (KUROSE, MAKOTO)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60404696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

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。我々は、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した。舌下免疫療法の免疫機序と効果的な免疫反応に重要な役割を持つ口腔粘膜上皮、樹状細胞、M細胞相互作用についての研究を行った。

研究成果の概要(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. In addition, we made a research on the interaction of the oral mucosal epithelium and dendritic cells and M cells with an important role in the immune response and effective immune mechanisms of sublingual immunotherapy.

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：舌下免疫療法 テロメラーゼ遺伝子導入 樹状細胞 M細胞 抗原取り込み機構

1. 研究開始当初の背景

ヒト鼻咽腔・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、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。炎症調節における免疫応答誘導あるいは免疫寛容には抗原の認識・提示が重要で、このためには上皮細胞と樹状細胞の連携が不可欠である。この上皮と樹状細胞のクロストーク機構は重要なテーマであり当教室ではこの点を鼻咽腔粘膜について検討してきた。われわれは、鼻咽腔での抗原のサンプリング段階で、抗原提示細胞であるCD11c陽性樹状細胞がタイト結合を発現しながらバリアを超え鼻腔内に突起を伸ばし抗原を捕らえることを初めて報告した。(Takano K, et al. J Histochem Cytochem, 2005)。さらに、抗原取り込み細胞であるM細胞がヒト咽頭扁桃に存在するが、M細胞をcytokeratin 20 (CK20)をマーカーとして抗原取り込み機能について検討した(Takano K, et al. J Mol Histol, 2008)。さらに、自然免疫としての抗原取り込みに重要な鼻粘膜バリア機構の調節についての新たな知見を次々に報告した(Ogasawara, Ohkuni 2011)。しかし、舌下免疫のターゲットである口腔粘膜についての検討は行っておらず、粘膜形態の違いから異なった抗原認識機構を持っている可能性がある。

2. 研究の目的

舌下免疫療法の免疫機序と効果的な免疫反応に重要な役割を持つ口腔粘膜上皮・樹状細胞、M細胞相互作用について検討することを目的とする。生体防御の最前線である口腔・咽頭粘膜では、免疫応答誘導あるいは免疫寛容のための抗原の認識・提示が行われ、この機構には上皮細胞と樹状細胞の相互作用と連携が不可欠である。特に、樹状細胞の活性化や上皮内への突起の伸長、M細胞機能、

粘膜上皮細胞のバリア機構の変化は抗原認識に重要な点であろう。今回の研究の特徴は、申請者が開発したテロメラーゼ遺伝子導入培養ヒト粘膜上皮細胞を用い、単に免疫療法の機序解明だけでなく、抗原認識機構の調節により獲得免疫の賦活化に結びつけるという将来性のある研究を目指している。

近年の花粉症に対する舌下免疫療法では、口腔粘膜の抗原認識と樹状細胞、M細胞を主とする抗原提示細胞の機能が重要である。効率的に免疫寛容を誘導するためには、まず抗原を認識することが重要であり、当然口腔の上皮・樹状細胞・M細胞関連を基礎的に検討することが必須となる。そこで、鼻腔や扁桃での研究を進展させ、口腔での上皮内樹状細胞、M細胞相互作用についての類似点・相違点について検討することを計画した。すなわち、粘膜上皮と樹状細胞、M細胞の関係を特徴づけることで、感染防御機構や病巣扁桃炎の機序解明など炎症調節機構の解明だけでなく、アレルギーの免疫療法や舌下免疫療法の免疫寛容とのかかわりを解明できる。さらに、この研究はワクチンの口腔を介したDDS基礎理論への応用が期待できる。

3. 研究の方法

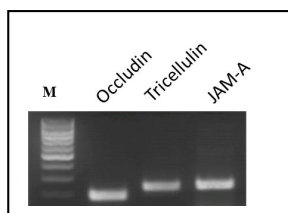
本研究では、ヒト口腔咽頭粘膜上皮の機能と抗原提示細胞、特に樹状細胞、M細胞の解析を実施する。今回の研究の特徴は、申請者が開発したテロメラーゼ遺伝子導入培養ヒト粘膜上皮細胞を用い、主たる解析方法として用いて *in vitro* での限りなくヒトの生体内での現象に近い実験系を用いることである。さらに、この系に共培養システムという方法論を追加することで、2種類の細胞、すなわち樹状細胞とヒト鼻粘膜上皮細胞の相互関係の解析ができる。また、口腔粘膜の樹状細胞、M細胞の分離が可能となれば、より病態に近づくことができる。

口腔粘膜、扁桃、アデノイドの遺伝子導入

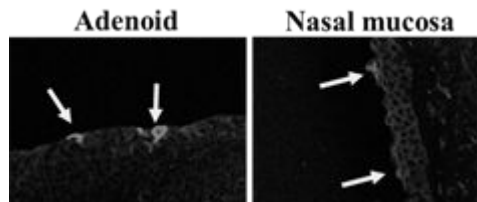
培養上皮細胞の安定した系を確立する。一方、樹状細胞については、樹状突起の伸長や活性化によるタイト結合の変化を見ることにより、間接的に上皮内への進入と、外部からの抗原の取り込みの調節機構を検討する。また、抗原提示細胞である M 細胞に着目し、口腔粘膜の M 細胞の同定および誘導を行い、抗原提示機構と上皮のバリア機能との関係を明らかにする。さらに、非特異的な抗原取り込み能と種々の抗原についてのサンプリング機構もタイト結合の解析手法を用いて検討する。

4. 研究成果

正常口腔粘膜・扁桃上皮に発現しているタイト結合関連蛋白および細胞接着蛋白を免疫染色、Western blot、RT-PCR などの手法を用いて、蛋白および mRNA レベルで発現を検索した。2 重染色および共焦点レーザー顕微鏡を用いて、上皮での局在を詳細に観察した。さらに蛍光色素の染み込み実験により、口腔粘膜のバリア機能を検索した。同様に新規タイト結合 (tricellulin) についても検討を加えた。正常口腔粘膜上皮における、タイト結合関連蛋白である occludin, ZO-1, claudin-1,7 の存在が確認された。また以下に示すように、新規タイト結合である tricellulin などの発現も確認できた。

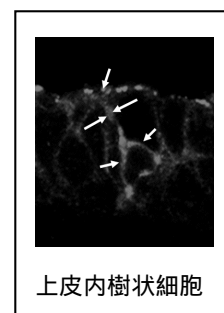


これまで、CK20 をヒト M 細胞の指標としたが、杯細胞を非特異的に認識することが欠点であった。最近 GP2 がより特異度の高い指標として報告されたため、我々も咽頭扁桃、鼻粘膜上皮での検討をおこなった。以下に示すとおり、咽頭扁桃、鼻粘膜上皮での GP2 陽性細胞すなわち M 細胞の存在を確認することができた。

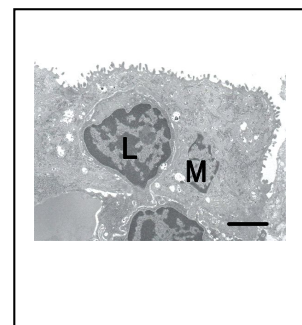


樹状細胞と上皮のバリア機能との関係を検索するために、抗原提示細胞の様々なマーカーとタイト結合関連蛋白の 2 重染色により共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察した。さらに、粘膜下の樹状細胞との性状の違いを組織学的に検討した。

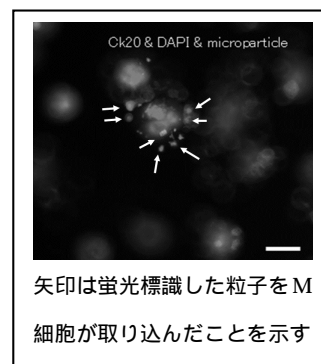
図の如く、上皮内樹状細胞が 3 細胞接点で特異的に発現するタイト結合蛋白 (トリセルリン) を発現しながら管腔内へ伸長する様子が観察された。



また、M 細胞 (M) が単核球 (L) を補足する様子が、電子顕微鏡下に観察された。



口腔粘膜上皮細胞系のバリア機能調節機構の解析を行った。テロメラーゼ活性化により初代培養ヒト口腔粘膜上皮細胞を不死化させ正常ヒト口腔粘膜上皮細胞株を樹立した。この系を用いて、種々の刺激条件での細胞接着因子とバリア機能の関連性を解析した。非特異的蛍光物



質や分子量別の取り込みなどを検討し免疫療法の補助手段としての有用性を検討した。

以上、口腔・鼻咽頭の上皮・樹状細胞・M細胞関連を基礎的に検討した。解析を続けることで、将来的には、感染防御機構や病巣扁桃炎の機序解明など炎症調節機構の解明、アレルギーの免疫療法や舌下免疫療法の免疫寛容とのかかわり、さらには新たな粘膜ワクチンの開発に結びつく可能性が高いと推察された。

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 3 件)

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: 947072. 査読有
DOI: 10.1155/2013/947072.

黒瀬誠、氷見徹夫： 当科における上咽頭癌症例の検討 .耳展 56 補(2):172-173. 2013 査読無

黒瀬誠、氷見徹夫： 当科における上顎扁平上皮癌症例の検討 .耳展 56 補(2): 132-133. 2013 査読無

[学会発表](計 4 件)

黒瀬誠、近藤敦、氷見徹夫：頭頸部扁平上皮癌浸潤・転移における S100A7(psoriasin)、タイト結合分子 JAM-A の意義 . 頭頸部癌学会総会、2013

年 6 月 13 日-14 日、東京

Obata K, Kurose M. A novel role of tight junction protein JAM-A in invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. Third Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology, 2013 年 3 月 20-22 日、フィリピン

Nomura K, Kurose M. Negative regulator S100A7 in tumor progression of head and neck squamous carcinoma. Third Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology, 2013 年 3 月 20-22 日、フィリピン

黒瀬誠、近藤敦、氷見徹夫：頭頸部扁平上皮癌におけるタイト結合分子・転写因子の発現 . 頭頸部外科学会総会、2013 年 1 月 24 日-25 日、鹿児島

[図書](計 1 件)

黒瀬誠：アイワード札幌、上気道炎症における鼻粘膜の役割、2012.pp42-48, pp135-140

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒瀬 誠 (KUROSE MAKOTO)
札幌医科大学 医学部 講師
研究者番号：60404696