

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20280

研究課題名(和文) 鼻ポリープ由来細胞を用いた副鼻腔炎のin vitro評価系の確立

研究課題名(英文) Establishment of in-vitro evaluation system in rhinosinusitis using nasal polyp-derived cells

研究代表者

本間 博友 (HONMA, HIROTOMO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90433771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞培養系を確立後は浮遊細胞からの細胞分離を簡便かつ効率的に行うことができる免疫磁気ビーズを用いてT細胞を分離後CD4、CD8、IL-23R等の細胞表面抗原の比率をフローサイトメトリーにより解析、さらに浮遊細胞の培養上清由来の分泌サイトカインをBioPlexサスペンションアレイ測定にて網羅的に解析し各病態ごとのプロファイリングによる分類評価を行った。線維芽細胞培養系ではIL-17等の各種サイトカインへの応答能(増殖能・増殖抑制能)を評価しこのプロファイリングにより病態ごとの分類を行った。上記のデータを総合的に評価し、副鼻腔炎の各病態における分子免疫機構の新規分類法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Chronic rhinosinusitis (CRS) is defined as persistent inflammation of the nasal and paranasal cavity mucosa lasting  $\geq$  3 months. In the present study, we examined the level of cytokine and chemokine release from the nasal polyp fibroblasts and its effect on IL-17A in order to clarify the functional role of fibroblasts in chronic inflammatory responses in the upper airway. Even without inflammatory stimulation, the secretions of MCP-1 were 33.3-fold and 22.2-fold higher in the eosinophilic group and non-eosinophilic group, respectively, compared to the control group. There was a marked release of IL-6 from nasal polyp fibroblasts of the eosinophilic group, which was significantly greater than those of the control and non-eosinophilic groups. However, there was no difference in IL-6 secretion between the control and non-eosinophilic groups. Thus, the cytokines and chemokines released from the nasal polyp fibroblasts may be related to local airway inflammation.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻ポリープ 副鼻腔炎 培養系細胞の確立 サイトカイン 分泌応答 網羅的解析 免疫応答プロファイリング

## 1. 研究開始当初の背景

副鼻腔炎での免疫応答において近年特に注目されているインターロイキン 17 (IL-17) はマウスの T 細胞ハイブリドーマからクローニングされ、1995 年に新しいサイトカインとして IL-17(IL-17A)と命名された。IL-17(A)の発見後、IL-17(A)に類似性を示す 5 つの遺伝子が発見され、現在 IL-17 ファミリーは A から F までの 6 つの遺伝子から構成されている。IL-17(A) は T 細胞特異的なサイトカインであり、上皮細胞、内皮細胞や線維芽細胞などに作用して IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 、G-CSF などの炎症性サイトカインや IL-8 などのケモカインの産生を誘導し、炎症反応において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。2003 年に IL-17(A)を産生する T 細胞が従来から知られていた Th1、Th2、Treg 細胞といった T 細胞サブセットではなく、新たな細胞亜集団から産生されることがわかり、Th17 細胞という概念が 2005 年ごろより提唱されるようになってきた。IL-17(A)は主として活性化 CD4+細胞から産生され炎症の成立に関与すると考えられており、我々のこれまでの研究では IL-17(A)が慢性副鼻腔炎における好酸球動員を引き起こすが実証されている (*Int Arch Allergy Immunol.* 2010 151(1):8-16)。近年、副鼻腔粘膜に多数の好酸球浸潤を伴い、難治性かつ再発性の鼻ポリープを伴う副鼻腔炎が注目されている。副鼻腔病変とアレルギーの有無の関連性および、osteo meatal complex を閉塞する病変と上顎洞に粘膜病変の関連性について我々はこれまでに報告している (Ono, Honma et al. *Acta Otolaryngol* 2011 131:1193-7)。しかしながら、未だに明確な作用機序は解明されていない。好酸球性副鼻腔炎は Th2 ヘルパー細胞の関与が指摘されているが、IgE の上昇は必ずしも伴わ

ず、Th2 型反応とは異なる病態が推察されている。このような好酸球性副鼻腔炎や他の副鼻腔炎病態の発症機序を分子レベルで評価・分類するためには免疫エフェクター細胞とサイトカイン標的細胞との相互作用機序に焦点を当てた *in vitro* での評価系が有効と考えられる。我々の研究グループでは世界で最初にヒト鼻腺細胞の純化培養に成功しており (*Am J Physiol* 271:L593-L600, 1996)、神経伝達、炎症性起因物質による分泌応答の機序の解明を行ってきた。本研究では上記の手法を応用し、より簡便に培養できる線維芽細胞と炎症性細胞に着目して鼻ポリープ摘出後短時間で分子病態を解析できる簡便な *in vitro* 評価法を確立することを目的とした。

## 2. 研究の目的

副鼻腔炎での免疫応答において近年特に注目されているインターロイキン 17 (IL-17) はマウスの T 細胞ハイブリドーマからクローニングされ、1995 年に新しいサイトカインとして IL-17(IL-17A)と命名された。IL-17(A)の発見後、IL-17(A)に類似性を示す 5 つの遺伝子が発見され、現在 IL-17 ファミリーは A から F までの 6 つの遺伝子から構成されている。IL-17(A) は T 細胞特異的なサイトカインであり、上皮細胞、内皮細胞や線維芽細胞などに作用して IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 、G-CSF などの炎症性サイトカインや IL-8 などのケモカインの産生を誘導し、炎症反応において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。2003 年に IL-17(A)を産生する T 細胞が従来から知られていた Th1、Th2、Treg 細胞といった T 細胞サブセットではなく、新たな細胞亜集団から産生されることがわかり、Th17 細胞という概念が 2005 年ごろより提唱されるようになってきた。IL-17(A)は主として活性化 CD4+細胞から産生され炎症の成立に関与すると

考えられており、我々のこれまでの研究では IL-17(A)が慢性副鼻腔炎における好酸球動員を引き起こすが実証されている

(*Int Arch Allergy Immunol.* 2010

151(1):8-16)。近年、副鼻腔粘膜に多数の好酸球浸潤を伴い、難治性かつ再発性の鼻ポリープを伴う副鼻腔炎が注目されている。副鼻腔病変とアレルギーの有無の関連性および、osteomeatal complex を閉塞する病変と上顎洞に粘膜病変の関連性について我々はこれまでに報告している (Ono, Honma et al. *Acta Otolaryngol* 2011

131:1193-7)。しかしながら、未だに明確な作用機序は解明されていない。好酸球性副鼻腔炎は Th2 ヘルパー細胞の関与が指摘されているが、IgE の上昇は必ずしも伴わず、Th2 型反応とは異なる病態が推察されている。このような好酸球性副鼻腔炎や他の副鼻腔炎病態の発症機序を分子レベルで評価・分類するためには免疫エフェクター細胞とサイトカイン標的細胞との相互作用機序に焦点を当てた *in vitro* での評価系が有効と考えられる。我々の研究グループでは世界で最初にヒト鼻腺細胞の純化培養に成功しており (*Am J Physiol* 271:L593-L600, 1996) 神経伝達、炎症性起因为物質による分泌応答の機序の解明を行ってきた。本研究では上記の手法を応用し、より簡便に培養できる線維芽細胞と炎症性細胞に着目して鼻ポリープ摘出後短期間で分子病態を解析できる簡便な *in vitro* 評価法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

鼻ポリープおよびコントロール副鼻腔組織の摘出、つまり好酸球性副鼻腔炎患者および他の副鼻腔炎患者の鼻ポリープ、およびコントロール群として下垂体手術時に採取した正常の蝶形骨洞粘膜組織を検体として用いる。抗生物質による処理・組織内末梢血の洗浄としてペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン含有バッファー

による殺菌処理、同時に組織内末梢血の洗浄。細胞培養液 (10%FBS 含有 D-MEM) 中で組織を 1mm 四方程度に切断しピペッティングおよびシリンジ内筒での頻回圧迫により攪拌。セルストレイナー (100 $\mu$ m, BD Falcon) により浮遊細胞を分離し細胞培養液中で 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 下で培養。フローサイトメトリー分析または培養上清中分泌サイトカインの解析に適した培養時間を検証。上記処理により浮遊細胞を除去した鼻ポリープ組織片を酵素処理により分離。解離酵素として Accutase, Accumax, Trypsin/EDTA 等を用い処理時間・濃度による最適条件の検証を行う。免疫磁気ビーズによる T 細胞のネガティブ分離には、免疫磁気ビーズ Dynabeads Untouched Human T Cells (Dyna)

を用い鼻ポリープ由来浮遊細胞からの簡便な T 細胞分離法を検証。フローサイトメーターによる表面抗原解析として、上記で得られた T 細胞および分離前の浮遊細胞を当施設所有の 3ch フローサイトメーター (FACS Aria, BD Bioscience) を用いて表面抗原 {CD4, CD8, IL23R, IL-17R, CD134 等} 発現タンパク質 {ホルマリン固定サンプリル IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF $\beta$  (Th1), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 (Th2)} から簡便な分類マーカーを選択する。この解析によりヘルパー T 細胞の Th1, Th2, Th17 および細胞障害性 T 細胞の細胞比率および表面抗原の発現比率を解析。病態による細胞比率、表面抗原比率の分類・パターン化を検証する。浮遊細胞の培養上清中の分泌サイトカインを BioPlex サスペンション アレイ測定にて網羅的に解析し各病態ごとのプロファイリングによる分類評価を行う。当施設で所有する BioPlex サスペンションアレイ

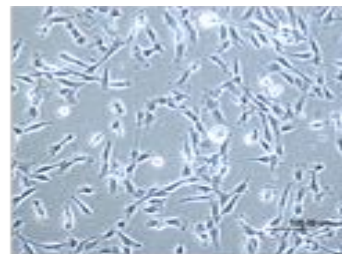
(Bio-Rad) は培養上清中に分泌されたサイトカインを多項目 (IL-1 ~ 17, Eotaxin, TNF $\alpha$  等) 同時に検出することができる安価で簡便なアッセイシステムである。同システムにより鼻ポリープ由来浮遊細胞を用いた効率的なサイトカイン発現プロファイリング法を検証する。線維芽細胞の増殖と活性化は炎症細胞や、その産生するケミカルメディエーターにより直接的あるいは間接的に影響を受けている。本研究では細胞増殖指示薬として簡便で効率的な WST-8 (Dojindo) を用い、IL-17 を中心とした副

鼻腔炎関連サイトカインに対する反応として細胞増殖能および増殖停止能の測定を検証する。線維芽細胞はIL-1, IL-6, IL-8, TNF等のサイトカインを放出し炎症反応をコントロールすることが知られている。本研究では無刺激の培養上清中の分泌サイトカインとIL-17等により惹起されるサイトカイン分泌パターンを上記のBioPlexアッセイ系にて比較分析することにより、各病態による細胞応答性の変化を解析する。上記解析により得られた各病態に対する表面抗原・細胞内タンパク質発現パターン、サイトカイン分泌パターン（浮遊細胞、線維芽細胞）線維芽細胞のサイトカイン応答性の結果を総合的に様々なクラス分け（例：線維芽細胞IL-17応答性、非応答性、弱応答性、Th1優位、Th2優位、Th17優位等）を行い臨床データとともにデータベース化する。このデータベースをこれまでの我々の報告における病理データ（研究業績原著論文2）・検体由来患者の臨床所見との比較検証を行う。このin vitro評価法にて同定された分子免疫機構を臨床データと照合することにより、個々の症例に適した効果的治療戦略を選択することが可能となると考えられる。

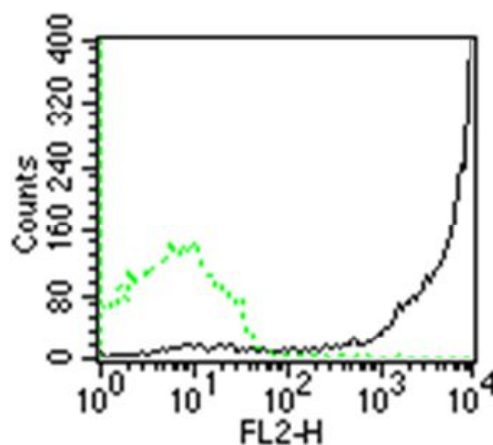
#### 4. 研究成果

本研究では好酸球性副鼻腔炎患者および他の副鼻腔炎患者の鼻ポリープ、およびコントロール群として下垂体手術時に採取した正常の蝶形骨洞粘膜組織を検体として用いることとした。術後短期間で解析できる分離培養系を確立することにより、より個々の患者の生体組織に近いin vitro評価系の確立を目指した。我々の予備検証においては、前述の鼻ポリープ組織より末梢血細胞を除去後、リンパ球を含む浮遊細胞、およびサイトカインの標的となる線維芽細胞を3日ほどで簡便に分離・培養することに成功しており、同手法により得られた線維芽細胞は数回の継代および凍結保存に耐えることを確認してした。同手法を改良し、術後より短期間で安定的に浮遊細胞および線維芽細胞接着培養系が得られる条件

を検証し、同一条件下でその後の解析を行うことができる細胞培養系を確立する。 ) 細胞培養系を確立後は浮遊細胞からの細胞分離を簡便かつ効率的に行うことができる免疫磁気ビーズを用いてT細胞を分離後CD4、CD8、IL-23R等の細胞表面抗原の比率をフローサイトメトリーにより解析、さらに浮遊細胞の培養上清由来の分泌サイトカインをBioPlexサスペンションアレイ測定にて網羅的に解析し各病態ごとのプロファイリングによる分類評価を行った。 ) 線維芽細胞培養系ではIL-17等の各種サイトカインへの応答能(増殖能・増殖抑制能)を評価しこのプロファイリングにより病態ごとの分類を行った。 ) 上記のデータを総合的に評価し、副鼻腔炎の各病態における分子免疫機構の新規分類法を確立した。



鼻ポリープより分離した線維芽細胞培養系。増殖能の高い均一な細胞群が得られる



培養した鼻ポリープ由来線維芽細胞のCD90によるフローサイトメトリー分析。同細胞が均一なCD90陽性細胞群(右側ピーク)である

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 5 件 )

Shiozawa, A., Miwa, M., Ono, N., Homma, H.,  
Hirotsu, M., and Ikeda, K. Comparative analysis  
of cytokine release from epithelial cell cultures of  
the upper airway. Rhinology 2015 53, 135-141  
査読有

Misato Kasai, Akira Minekawa, Hiroto  
Homma, Asami Nakzawa, Takashi Iizuka, Ayako  
Inoshita and Katsuhisa Ikeda. Nasal Surgery  
improves Continuous Positive Airway Pressure  
compliance and Daytime Sleepiness in  
Obstructive Sleep Apnea Syndrome. J Otol  
Rhinol 2015 S1, 26-29 査読有

Ono N, Ito S, Homma H, Okada H, Murata J,  
Ikeda K. Endoscopic endonasal management of  
recurrent maxillary mucoceles using biliary  
T-tube stenting. Ear Nose Throat J. 2017  
Dec;96(12):469-476 査読有

Ikeda K, Ito S, Homma H, Ono N, Okada H,  
Kidokoro Y, Shiozawa A, Kusunoki T. Orbital  
Injury in Endoscopic Sinus Surgery for Sinonasal  
Inflammatory Disorders: Juntendo's Ten-Year  
Experience. International Journal of  
Otolaryngology and Head & Neck Surgery 2017,  
6, 65-70 査読有

Ikeda K, Ito S, Homma H, Ono N, Okada H,  
Kidokoro Y, Shiozawa A, Kusunoki T.  
Endonasal Endoscopic Anterior Skull Base  
Surgery for Sinonasal Malignancies: Juntendo's  
Experience. Juntendo Medical Journal 2017.  
63(4)279-284 査読有

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

本間 博友 ( HONMA, Hiroto )

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 90433771