

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32103

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11352

研究課題名（和文）フローラを含むヒト鼻腔粘膜上皮環境モデルの構築と新規アレルギー制御特性の探索

研究課題名（英文）The construction of the human nasal epithelium environment model and search of novel allergic regulation

研究代表者

齋藤 慎二（Saito, Shinji）

常磐大学・人間科学部・教授

研究者番号：50195989

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：鼻腔上皮細胞株を用いた単純化した鼻腔粘膜モデルを確立した。さらに、鼻腔上皮初代培養細胞を用いた気相液相界面培養系の構築を行った。気相液相界面培養系ではシート形成の確立の割合が低く、条件の再検討が必要となり培養パラメーターの見直しを行った。一方、予備的な調査計画として、鼻腔正常細菌叢形成菌株の収集を計画し、アレルギー疾患、症状、病態との相関について検討した。スーパー抗原活性を有する黄色ブドウ球菌腸管毒B(SEB)は、アレルギー疾患との関連が疑われているが、それを裏付ける結果は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻腔上皮細胞株を用いた単純化した鼻腔粘膜モデルの確立ができれば、生きたフローラを含む系の特性を検討する方法、再構成アプローチの有効性を具体化することができる。また、さまざまな単純化した器官モデル構築への応用も期待される。これにより様々な医学病態研究分野のみならず、環境科学分野での応用、上気道に対する大気汚染物質等の影響を評価する研究にも模倣生体器官実験モデルの1つとして応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have established a simplified nasal mucosa model using nasal epithelial cell lines. Furthermore, an air-liquid interface culture system was constructed using primary cultured cells of the nasal epithelium. In the air-liquid interface culture system, the rate of establishment of sheet formation was low, and it was necessary to reexamine the conditions, and the culture parameters were reviewed. On the other hand, as a preliminary investigation, we planned to collect normal nasal flora-forming strains and examined the correlation with allergic diseases, symptoms, and pathological conditions. Staphylococcal enterotoxin B (SEB), which has super antigen activity, is suspected to be associated with allergic diseases, but no supporting results have been obtained from our results.

研究分野：感染免疫学

キーワード：鼻腔上皮細胞 鼻腔粘膜上皮モデル 鼻腔細菌叢

1. 研究開始当初の背景

近年、人体の上皮環境に構成されるフローラの乱れが生体リズムに影響を与え、疾患の発症や病態の進行などに影響を与えると考えられている。鼻腔に形成されるフローラの中では、黄色ブドウ球菌の定着とアレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎などの上気道炎症疾患との関連が長いこと議論されている(J. Allergy Clin. Immunol. 105:449-454,2000)。

申請者らは、常在細菌群の定着・共生に関わる分子メカニズムについて、ヒト鼻腔上皮細胞株 RPMI 2650 細胞を用いて解析を行ってきた。これまでの観察結果から、

- ・ 鼻腔上皮細胞は、TLR 等の菌体を認識する細胞外受容体を発現しないこと。
- ・ 黄色ブドウ球菌を細胞内で認識し、ある特定のキナーゼ活性の亢進など限られた細胞内応答のみが見られること。
- ・ 主要な炎症性サイトカイン産生や Th1/Th17 炎症を惹起する応答など自然免疫による定着菌排除につながる応答の増強は認めないこと (図) を確認した。

これらの事実がフローラ共存を許す一因と考えている。

しかし、フローラが宿主に及ぼす特性は、宿主細胞系とフローラ構成菌の機能の単純な和ではなく、複雑多様な相互作用があってはじめて現れる可能性が高い。

たとえば、

- ・ インフルエンザウイルスに感染した鼻腔上皮は I 型インターフェロンを誘導する。その結果、肺炎球菌の定着を容易にしてヒト鼻腔フローラの構成を変化させる (Microbiome, 3:74, 2015)。
- ・ フローラ構成細菌の中には、我々が行っている混合培養系 (宿主細胞を含まない) で増殖維持ができない細菌も含まれている。これは、フローラ構成菌以外に、なんらかの鼻腔環境 (たとえば宿主が分泌する蛋白質など) が重要であることを強く示唆している。

よって、宿主細胞系とフローラが安定に、または動的な平衡を保ちつつ共存する場合、*in vivo* 環境を用い統一的に評価・理解することが理想である。しかしながら、ヒトでの *in vivo* モデルの構築は不可能である。そこで、新たに「フローラを含むヒト鼻腔粘膜上皮環境」を *in vitro* で扱う実験モデルを確立し、その特性を明らかにすることを計画するに至った。

2. 研究の目的

これまで、アレルギー性鼻炎や喘息の発症、病態進行に関わる要因などは、宿主細胞や常在細菌それぞれの解析では理解することが出来なかった。鼻腔粘膜上皮とフローラが一体となって示す鼻腔粘膜環境の複雑な特性にその鍵を見いだす。

研究期間には、以下の項目を段階的に達成する。

- ・ 持続的安定化した *in vitro* の鼻腔粘膜上皮モデルを構築する。

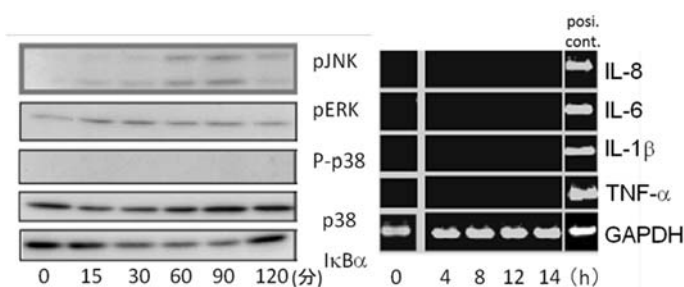


図 鼻腔上皮細胞は黄色ブドウ球菌を認識し JNK のリン酸化を誘導するが、炎症性サイトカインの発現には至らない。(未発表)

- ・ 鼻腔常在細菌群よりフローラを調整し、鼻腔粘膜上皮モデルに定着させる。
- ・ 系の安定化を謀り、**in vitro** 鼻腔粘膜上皮環境モデルを完成させる。
- ・ 様々な条件下、鼻腔粘膜上皮環境から発信される特性を解析する。
- ・ 特に花粉症などアレルギー発症、病態進行に関与する特性の探索に発展させる。

3. 研究の方法

本研究計画では、①ヒト鼻腔上皮細胞を用いて**気相液相界面培養系**、および**3次元重層培養系**により **in vitro** 鼻腔粘膜上皮モデルを作成する。②疑似鼻腔粘膜培地を用いた鼻腔常在細菌群混合培養により**鼻腔フローラ**を調整する。③**鼻腔フローラ**を**鼻腔粘膜上皮モデル**上に展開・再構成し、長期安定化した **in vitro** 鼻腔粘膜上皮環境モデルの作製を試みる。④鼻腔粘膜上皮環境モデルを構成する上皮細胞から**新たに発信される特性**を解析する。その後、⑤免疫細胞系との相互応答、アレルギー応答調節機構の存在の可能性や病原体を排除する特性の評価などを検証する。

4. 研究成果

これまでにヒト鼻腔上皮細胞株 RPMI2650 細胞を用いた単純化した鼻腔粘膜モデルを確立している。RPMI2650 細胞はヒト正常鼻腔細胞と酷似しているが、正常鼻腔上皮細胞に劣っている点も多いが気相液相培養により、より正常組織の構造・機能に近づいた。(図2)

さらに、**in vitro** の鼻腔粘膜モデルの作成を目指し、ヒト鼻腔上皮初代培養細胞を用いた気相液相界面培養系の構築を行った。PromoCells社より購入した鼻腔上皮初代培養細胞を用いた気相液相界面培養系での単層細胞層の形成では継続培養時にスフェロイド状に増殖し(図3)、単層状のシート形成の確立の割合が低く、条件の再検討が必要となった。

培養パラメーターの見直しと細胞ロット間の適応差を考慮し、複数ロットを導入し比較検討を行った。RPMI 2650 細胞についてもより高度にタイトジャンクションを形成する培養条件が見いだされつつあったが中断を余儀なくされている。

一方、予備的な調査計画として、ヒト鼻腔正常細菌叢形成菌株を収集する計画を策定し、鼻腔内での黄色ブドウ球菌保菌とアレルギー性鼻炎の既往との関連について検討した。学生ボランティア 321 名に対し調査した(表)。黄色ブドウ球菌鼻腔内保菌者のアレルギー性鼻炎既往率と非保菌者のアレルギー性鼻炎既往率はそれぞれ 49.0%(47/96)、44.0%(99/225)であり、相対危険度は 1.11 となった。逆にアレルギー性鼻炎既往者の黄色ブドウ球菌保菌率と既往無し者の保菌率は、32.2%(47/146)、28.0%(49/175)であり、相対危険度は 1.15 であり、黄色ブドウ球菌の保菌とアレルギー性鼻炎の既往の間に有意な関連は見られなかった。

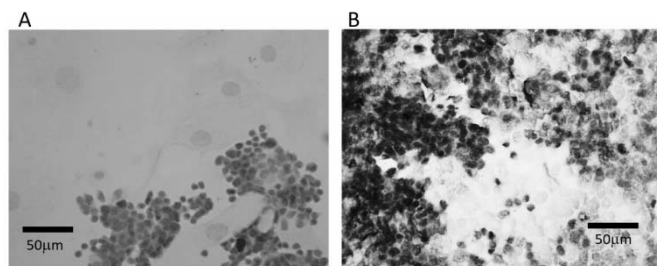


図2 Alcian Blue Stein (counter stain; kernechtrot)

- A. HNEpC Liquid culture(primary cell)
 - B. RPMI2650 Air-Liquid Interface culture
- Acidic mucosubstances; carboxylated and sulfatic proteoglycans, acidic glycoproteins が染色。

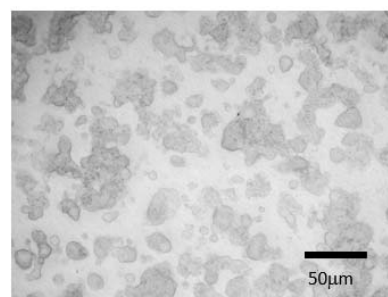


図3 HNEpC Liquid culture(primary cell) Air-Liquid Interface culture

表 鼻腔内黄色ブドウ球菌保菌とアレルギー性鼻炎既往との相関

		アレルギー性鼻炎の既往		
		あり	なし	合計
鼻腔内の 黄色ブドウ球菌	保菌あり	47	49	96
	保菌なし	99	126	225
	合計	146	175	321

被験者より採取された全黄色ブドウ球菌、全 96 株について病原遺伝子プロファイル解析としてブドウ球菌腸管毒素 (SEA, SEB, SEC, SED, SEG)、毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) 遺伝子保有について検索を行った。アレルギー性鼻炎有症者、無症者間での各病原因子遺伝子保有についての差は見られなかった。また、スーパー抗原活性を有する黄色ブドウ球菌腸管毒のうち特に B(SEB)は、アレルギー疾患増悪との関連が疑われているが、それを裏付ける結果は得られなかった。

構築した鼻腔上皮粘膜モデルを用いて、鼻腔内常在細菌との相互応答の解析を行っていく計画であったが、研究期間途中での研究代表者の所属機関の異動により、研究組織の再編成、研究環境設備の悪化、試料保存用フリーザーの破損による試料喪失といったアクシデント、さらにコロナウイルス感染症拡大による研究組織の解体、研究試料・機材調達の遅延などの影響により計画の変更や遂行に多大な支障が生じることとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda Yutaka, Shoji Kazuhiro, Feliciano Chitho P., Saito Shinji, Nagasaki Yukio	4. 巻 15
2. 論文標題 Antioxidative Nanoparticles Significantly Enhance Therapeutic Efficacy of an Antibacterial Therapy against <i>Listeria monocytogenes</i> Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1126 ~ 1132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nguyen Le Thuy Thi, Takemura Aya J., Ohniwa Ryosuke L., Saito Shinji, Morikawa Kazuya	4. 巻 75
2. 論文標題 Sodium Polyanethol Sulfonate Modulates Natural Transformation of SigH-Expressing <i>Staphylococcus aureus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 499 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00284-017-1409-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田 豊、庄司 和弘、Chitho Feliciano、齋藤 慎二、長崎 幸夫
2. 発表標題 抗酸化ナノメディシンの感染症治療への展開
3. 学会等名 第70回 日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池田 豊、庄司 和弘、Chitho Feliciano、齋藤 慎二、長崎 幸夫
2. 発表標題 抗酸化作用を持つナノメディシンの重度感染症治療への応用
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池田 豊、庄司 和弘、Chitho Feliciano、齋藤 慎二、長崎 幸夫
2. 発表標題 抗酸化ナノメディシンを用いた重度感染治療法の開発
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	大庭 良介 (Ohniwa Ryosuke) (30447883)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------