

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月19日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11187

研究課題名(和文)慢性中耳炎における制御性T細胞の免疫寛容化機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of mucosal tolerance by regulatory T cell in chronic otitis media

研究代表者

平野 隆 (Hirano, Takashi)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：20305056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脾臓由来の制御性T細胞およびhelper T細胞を分離し、インフルエンザ菌由来外膜蛋白を経鼻投与したマウスの鼻粘膜由来単核球を分離した細胞と24、72時間共培養を行った。対照は鼻粘膜由来単核球のみの培養とした。培養液中のサイトカイン産生と鼻粘膜由来B細胞活性化について解析を行った。制御性T細胞、helper T細胞共にIL-10産生が対照と比して明らかに亢進した。フローサイトメトリー解析では、対照と比して活性化B細胞比率自体に変化はないものの、T細胞活性化能には差を認め減弱していた。制御性およびhelper T細胞由来IL-10はT細胞活性化能を減弱し慢性持続感染に関与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス慢性中耳炎由来の制御性T細胞を用いた検討は試料サイズが少ないため、脾臓由来の制御性T細胞やhelper T細胞によるマウス鼻粘膜由来B細胞における影響について検討を行った。現在まで、上気道粘膜由来B細胞におけるT細胞の関与についてin vitroでの解析の報告は少なく、今回は慢性感染と制御性T細胞の関与が上気道においても起こりえる可能性が示唆され、制御性T細胞のB細胞における抗体産生能に与える直接的な抑制効果よりも、特にT-B細胞間の相互作用の抑制効果が上気道粘膜における免疫寛容に関わっていることが示唆された。制御性T細胞は、慢性気道感染における新しい治療標的になるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of regulatory T cell (Treg) on B cell immune responses against outer membrane protein (OMP) from NTHi in vitro. Mice were vaccinated intranasally with OMP, and mononuclear cells (MNCs) were collected from the nasal mucosa, Tregs and helper T cells (Th) were isolated from the spleens of those mice. Three different cell culture groups were allocated: MNCs co-cultured with Tregs, or with Th cells, and MNCs cultured alone, respectively. At 24 and 72 hours after cell culture, cytokine levels were determined by ELISA. CD69 or CD80 expressions on B2 cells were detected by flow cytometric analysis. IL-10 levels were significantly higher in Treg and Th groups than in the control group. The ratio of CD80+B220+ B2 cells was higher in the control group than in the Treg and Th groups during incubation. Tregs and Th cells may partially inhibit B cell functions, such as T cell activation. These inhibitory effects may be related to IL-10.

研究分野：上気道粘膜免疫

キーワード：制御性T細胞 粘膜免疫 免疫寛容 B細胞 鼻粘膜 脾臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は小児に好発するがたびたび遷延化し、慢性の経過をたどり治療に難渋する場合を認める。急性中耳炎の起炎菌において、肺炎球菌、インフルエンザ桿菌、モラキセラカタル菌が最も多く検出されている事はよく知られているが、過去においては無菌性中耳炎と考えられていた滲出性中耳炎においても、現在では慢性中耳炎症性疾患と見なされており、細菌のバイオフィーム形成や粘膜組織内寄生に伴い、通常の細菌検査では検出されない状態での慢性感染性炎症が持続している事が報告されている。今までの報告において、反復性滲出性中耳炎により、中耳粘膜下にリンパ球の集簇を認めることはすでにヒト小児の剖検例において証明されているが、どのような機序により慢性炎症が修飾され制御されているか不明である。今まで、in vivo における研究が行われており、細胞レベルでの解析の報告はない。

### 2. 研究の目的

炎症性疾患の発症・病態形成には、組織に遊走する炎症細胞や組織炎症巣に存在する活性化 T 細胞が大きな役割を担っており、T 細胞が産生するサイトカインはカスケードを形成し、さまざまな T 細胞が複雑に炎症像を修飾している。活性化 T 細胞のうち、CD4 陽性であるヘルパー T 細胞は、病原体の種類に応じて Th1、Th2、および Th17 細胞などのようなエフェクター T 細胞に分化し、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-17 といった多様なサイトカイン産生し、様々な免疫応答を誘導する。一方、免疫応答の抑制的な制御機能を有する CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞、つまり制御性 T 細胞は様々な免疫応答を抑制し、自己免疫疾患発症阻止能を有する重要な細胞であることはよく知られている。以前、当科において確立された耳管閉塞およびインフルエンザ菌による慢性中耳炎症マウスモデルを用いて、制御性 T 細胞が中耳慢性炎症病態に関与しており、慢性炎症を助長することについて報告している。今回は、制御性 T 細胞の粘膜免疫応答における役割について in vitro の解析により、慢性炎症性病態の治癒に向けた臨床応用への可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

SPF下にて飼育した、雄性、BALB/cマウス(5~6週齢)を用いた。免疫抗原として臨床分離株である無莢膜型インフルエンザ菌(strain76)から 外膜蛋白(OMP)を抽出乾燥し、OMP10 $\mu$ gと粘膜アジュバントとしてコレラトキシン1 $\mu$ gをリン酸緩衝液(PBS)に溶解しOMP溶液を調製し、マウスにOMP溶液を週1回計3回経鼻免疫を行い、免疫開始後21日目に鼻粘膜を採取し、コラゲナーゼ処理後に比重遠心分離により単核球(MNC)を採取した。

次に、ナイーブマウスとOMP経鼻免疫マウスから脾臓を採取し、細胞レベルにまで細碎し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec社)を用いてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞及びCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> helper T細胞を分離した。

これらの細胞を1)鼻粘膜由来単核球(MNC)のみ、2)鼻粘膜由来MNCとCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞、3)鼻粘膜由来MNCとCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> helper T細胞の3培養系を作成し、さらにOMP(10 $\mu$ g/well)添加の有無による培養系を作成し、24時間、72時間培養を行った。採取した培養上清をBio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Assays (Th1/Th2 panel)により、interleukin (IL)-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12p70、interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )、tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) といった8種類のサイトカイン濃度を測定している。データはBio-Plex™

Manager Software (Bio-Rad Laboratories) version 6.1.により解析を行った。統計はunpaired two-tailed Student's *t*-testにて $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

遠沈した細胞成分はPE 標識抗 B220 抗体 (Biolegend 社)、および FITC 標識抗 CD 69 抗体 (Biolegend 社)、FITC 標識抗 CD80 抗体 (Biolegend 社) を用いて細胞表面マーカーを染色し、BD LSRFortessa™X-20 フローサイトメーター (BD Biosciences) によるフローサイトメトリー解析を行い、B 細胞の活性化及び抗原提示能について解析した。フローサイトメトリーによる解析は 2 回施行している。

#### 4 . 研究成果

OMP無添加での培養系においてナイーブマウス及びOMP免疫マウス由来の制御性T細胞と鼻粘膜由来MNCとの共培養でのサイトカイン産生応答については、24時間培養において両群に差を認めており、未免疫のマウス由来の制御性T細胞の共培養上清中では抑制性のサイトカインであるIL-10をはじめ、IL-5が、72時間培養ではIL-2濃度が明らかに、OMP免疫のマウス由来群と比較して有意に増加したものの、全体的なサイトカイン産生量は低値であった。しかし、OMP添加により、ナイーブマウス及びOMP免疫マウス由来の制御性T細胞は共にサイトカイン産生は明らかに増加しており、24時間培養において、OMP免疫マウス由来の制御性T細胞の共培養上清ではナイーブマウス由来と比較して、抑制性のサイトカインであるIL-10をはじめ、GM-CSFが明らかに増加しており、さらに、72時間培養ではこれらのサイトカイン濃度のさらなる増加とIL-1及びIL-12の濃度の増加を認め、ナイーブマウス由来と比較して著明に増加していた。しかし、IL-2濃度は時間経過とともにナイーブ及びOMP免疫マウス由来共に減少しており、72時間経過後では逆にナイーブマウス由来においてIL-2濃度の高値を認めた (図 1)。

次に OMP 共培養 24 時間後の、ナイーブ及び OMP 免疫マウス由来の細胞での制御性 T 細胞、helper T 細胞、及び control として鼻粘膜単核球のみの 3 群で比較において、IL-2 濃度は helper T 細胞において増加しており、IL-10 においては制御性 T 細胞、helper T 細胞共に control と比較して増加していた。ナイーブ及び OMP 免疫マウス共に同様の反応であるものの、OMP 免疫マウス由来の方は反応の増強を認めた。OMP 共培養 72 時間後では、24 時間と同様の傾向であり、IL-2 濃度は helper T 細胞において著明に増加しており、IL-10 においては制御性 T 細胞、helper T 細胞共に control と比較して増加していた。ナイーブ及び OMP 免疫マウス共に同様の経過ではあったが、OMP 免疫マウスにおいて反応増強を認めた (図 2)。

フローサイトメトリーによる鼻粘膜由来 B 細胞機能の解析では、制御性 T 細胞、または helper T 細胞 との共培養において、活性化した CD69 陽性 B220 細胞の割合は、72 時間培養において、Control と比較してナイーブマウスおよび OMP 免疫マウス共に CD69 表出が高い傾向を認めた。B 細胞の T 細胞活性化能に関わる CD80 陽性 B220 細胞の割合は、24 時間培養においては各群における割合に差は認めないものの、72 時間培養において、CD80 陽性 B220 細胞の割合はナイーブマウスおよび OMP 免疫マウスは増加傾向を認めるものの、Control と比較して CD80 発現抑制を認める傾向が示された。

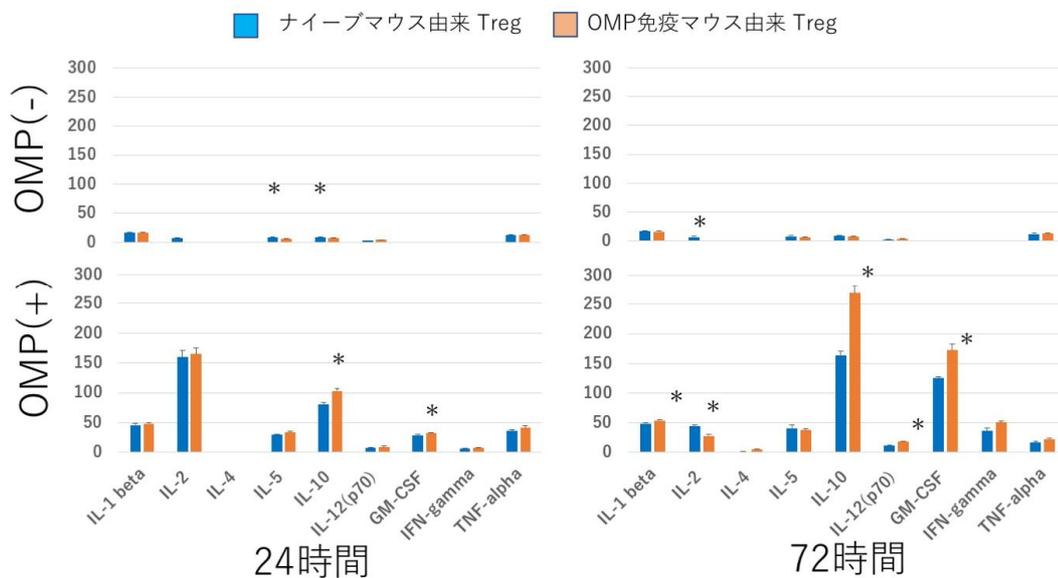


図1：OMP刺激の有無による制御性T細胞サイトカイン産生能への影響

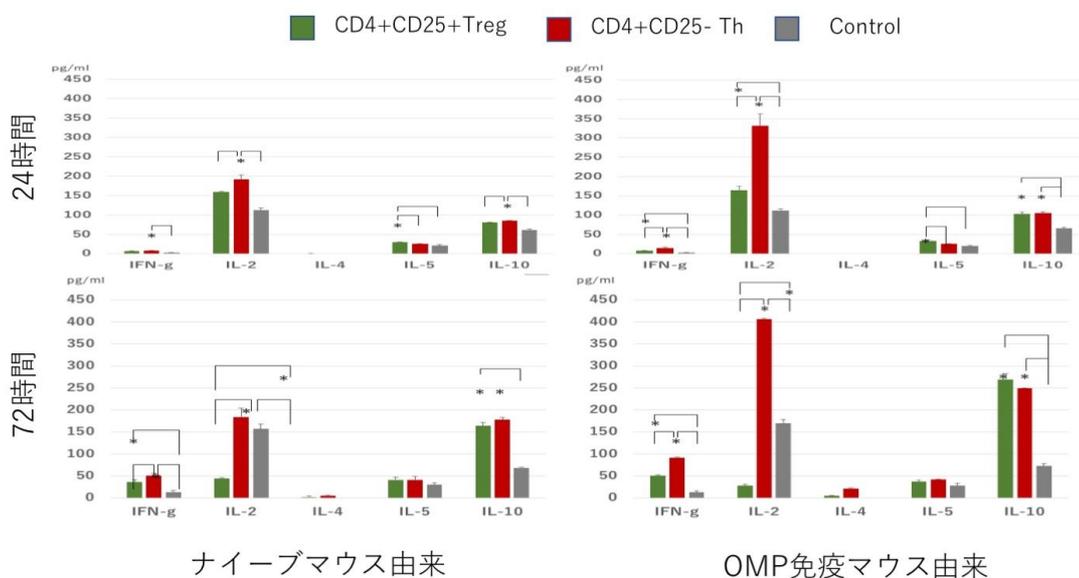


図2：制御性T細胞および helper T細胞との共培養によるサイトカイン産生能への影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計4件）

- 1) Hirano T, Kadowaki Y, Matsunaga T, et al. Interaction between regulatory T cells and antibody-producing B cells for immune responses at the upper respiratory mucosa against nontypeable *Haemophilus influenzae*: in Vitro assay model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2019 Jun;128(6 suppl):45S-51S. doi:10.1177/0003489419837994. 査読あり。
- 2) Moriyama M, Hirano T, Kawano T, et al. Toll-like receptor 4 plays an important role to enhance bacterial clearance from the nose in synergy with triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 expression on polymorphonuclear neutrophils. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2018 Sep;112:27-33. doi:10.1016/j.ijporl.2018.06.025. 査読あり。

3) 平野 隆、門脇嘉宣、川野利明、他. インフルエンザ菌 phosphorylcholine の表出と中耳ムチン MUC5AC および MUC 5 B 産生への影響. 耳鼻免疫アレルギー. 36(1): 7-13, 2018. 査読あり。

4) Iwasaki T, Hirano T, Kodama S, et al. Monophosphoryl lipid A enhances nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization. Int J Pediatr Otorhinolaryngol.2017 Jun;97:5-12. doi: 10.1016/j.ijporl.2017.03.018. 査読あり。

〔学会発表〕(計 9件)

1) 平野 隆、川野利明、松永崇志、鈴木正志. 粘膜アジュバント経鼻投与による自然リンパ球への影響. 第 37 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2019.2.7-9 大阪

2) 平野 隆、渡辺哲生、川野利明、森山宗仁、松永崇志、吉永和弘、鈴木正志. 中耳真珠腫の進展度と中耳炎症状態との関連. 第 28 回日本耳科学会総会 2018.10.3-6 大阪

3) 平野 隆、川野利明、松永崇志、門脇嘉宣、児玉 悟、鈴木正志. 経鼻粘膜免疫後の頸部リンパ節に対する制御性 T 細胞が与える影響. 第 36 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2018.2.22 下関

4) 平野 隆、川野利明、松永崇志、門脇嘉宣、児玉 悟、鈴木正志. 慢性中耳炎における制御性 T 細胞免疫寛容機序に対する in vitro での解析. 第 27 回日本耳科学会総会 2017.11.22-24 横浜

5) Kadowaki Y, Hirano T, Suzuki M. Phase variation of nontypeable *Haemophilus influenzae* affects mucosal immune responses in the middle ear. 19<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Otitis Media 2017.6.4-8. Gold Coast, Australia.

6) Suzuki M, Hirano T, Kadowaki K, Kodama S, Kawano T. Phase variation of nontypeable *Haemophilus influenzae* affect mucin production in the middle ear. 19<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Otitis Media 2017.6.4-8. Gold Coast, Australia.

7) 門脇嘉宣、平野 隆、鈴木正志. Phosphorylcholine の有無で比較した中耳貯留液と粘膜における無膜型インフルエンザ菌に対する免疫反応. 第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2017.4.13-15, 旭川市

8) 平野 隆、門脇嘉宣、児玉 悟、川野利明、鈴木正志. インフルエンザ菌 Phosphorylcholine の表出と中耳ムチン Muc5ac 産生への影響. 第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2017.4.13-15, 旭川市

9) 平野 隆、門脇嘉宣、児玉 悟、川野利明、鈴木正志. インフルエンザ菌 Phosphorylchoine の表出と中耳粘膜ムチン産生能への影響. 第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会, 2016.10.5-8, 長野市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
鈴木 正志 (SUZUKI MASASHI)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：60211314

川野 利明 (KAWANO TOSHIAKI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：30633424

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。