

平成 30 年 9 月 8 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20260

研究課題名(和文) 鼻咽腔粘膜における好中球機能とTLR4およびTREM-1の協調的作用について

研究課題名(英文) TLR4 plays an important role to enhance bacterial clearance from the nose in synergy with TREM-1 expression on polymorphonuclear neutrophils.

研究代表者

森山 宗仁 (Moriyama, Munehito)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60769834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：鼻咽腔にインフルエンザ菌を感作させることにより好中球のTREM-1の発現を誘導し、TREM-1の発現は、鼻汁の細菌クリアランスおよび好中球の活性化に関連すると考えられた。また、TLR4は炎症の初期段階で蛋白・RNAレベルでTREM-1の発現を活性化させると考えられた。従って、鼻咽腔においてTLR4は好中球上のTREM-1と協調的に作用することにより自然免疫応答を増強し中耳炎を含む上気道感染に対する防御能の一面を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bacterial counts of NTHi from the nose in WT mice showed significantly lower since 12 hours than that in TLR4-mutant mice, and the bacterial counts were almost negligible at 72 hours after injection. The kinetics of inflammatory cell infiltration showed the same tendency in the nasal cavity. The expression of TREM-1 on Ly-6G (+) PMNs in protein enhanced more in WT mice than TLR4-mutant mice from 6hr to 24hr. TREM-1 mRNA expression showed same tendency.

TREM-1 on PMNs may play an important role in relation to TLR4 for PMNs function to nasopharyngeal clearance with NTHi. These intended to enhance the innate immune response, including phagocytosis and chemotaxis of neutrophils in inflammation early. Further study will need to clarify the innate immune responses of PMNs via TLR4 to prevent NTHi infection.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：TREM-1 TLR4 好中球 インフルエンザ菌 鼻副鼻腔炎

1. 研究開始当初の背景

当講座においては、中耳炎を中心とした上気道感染の免疫応答につき伝統的に研究を行っている。上気道感染は小児において発生頻度が極めて高い感染の1つである。起炎菌は *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌)、*Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌) が主であり、鼻咽腔からの検出菌と急性中耳炎の中耳貯留液と同一の細菌が検出され、上気道感染と中耳炎発症には密接な関与が既に知られている。当講座では、今までインフルエンザ菌を代表としたグラム陰性菌における病原認識および自然免疫機構について検討を行っているが、特にTLR4が上気道における細菌の貪食能を含めた細胞性免疫応答促進や細菌特異的抗体産生能を含めた獲得免疫系の賦活化を促進するなど、自然免疫応答が多面に重要な役割を持つこと今までの当科での検討で判明している。これまで私達が報告を行った研究成果について述べると、

(1) インフルエンザ菌を代表としたグラム陰性菌における病原認識および自然免疫機構における重要な因子である TLR4 に着目し、インフルエンザ菌性中耳炎マウスモデルにより、TLR4 欠損マウスにおける好中球機能の低下と中耳炎の遷延化を認め、TLR4 による認識機構が好中球を主体とした自然免疫防御機構が、中耳からの細菌クリアランスに深く関与している事を解明した。(FEMS Immunol Med Microbiol,2007)

(2) インフルエンザ菌由来外膜蛋白の経鼻投与による獲得免疫能が TLR4 により増強され、その機序として鼻粘膜関連リンパ組織などの樹状細胞活性化が関与する可能性について報告した。(Int J Pediat Otol, 2009)

(3) TLR4 アゴニストを用いた自然免疫応答賦活化による、好中球を中心とした生態防護機構の増強を誘導し、インフルエンザ菌のみならずモラキセラ菌といったグラム陰性菌に対する鼻咽腔クリアランスの増強について提示した。(FEMS Immunol Med Microbiol,2011)

(4) 鼻咽腔におけるインフルエンザ菌に対する自然免疫応答につき、TLR4 wild typeおよびmutantマウスを用いて、TREM-1の発現を検討したところ、炎症の初期段階で蛋白レベルでTLR4はTREM-1の発現を活性化させている可能性が示唆された(図2)

。(7th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, 2014)

上記に示すように、マウスにおける中耳内、鼻腔内の上気道感染マウスモデルにおいて、TLR4が上気道粘膜免疫応答の活性化に重要な役割を担っていることを証明しているが、その詳細な機序については不明である。近年、自然免疫の中心的役割を担う好中球におけるTREM-1発現とTLR4が協調的に働くことにより自然免疫応答の増強に関与している事が報告されており、上気道粘膜における免疫応答においても非常に興味もたれる。

今回、当科で確立しているマウスの鼻咽腔インフルエンザ菌感染モデルを作成しTLR4群とTLR4mutant群において、TREM-1の発現の測定、TLR4との協調的作用を確認し、炎症性サイトカインの測定により粘膜免疫応答が増強されていることを立証し、またマウスの脾臓より好中球を分離し、TLR4 agonistであるMonophosphoryl lipid A(MPL),およびLipopolysaccharide(LPS)にて刺激することによりTREM-1の活性化を測定し、TLR4刺激によるTREM-1の活性化機序について詳細な検討を行う。

2. 研究の目的

インフルエンザ菌感染マウスを用い、上気道に遊走した好中球における TREM-1 の発現を分析し、TREM-1 と TLR4 の相互作用を検証することを目的とする。目的を達成するために以下の事を行う。好中球上 TREM-1 の発現強度について解析を行う。

TREM-1 と TLR4 の協調的作用を細胞分子生物学的手法を用いて明らかにする。サイトカインの産生を測定し免疫応答が増強されることを立証する。

3. 研究の方法

TREM-1 の発現の測定：急性炎症期のフローサイトメトリーと RT-PCR を実施し測定する。

a) インフルエンザ菌のクリアランス測定

balb/cマウスを用い、インフルエンザ菌経鼻投与によるマウス急性上気道炎モデルを作成し、経時的に6、12、24、72時間においてマウス鼻咽腔洗浄液中のインフルエンザ菌生菌数を計測する。

b) フローサイトメトリーによる好中球数とTREM-1の測定

鼻咽腔に遊走して来た炎症細胞数および細胞分画を計測し、好中球を測定した後に、Ly-6G(好中球のマーカー) TREM-1及びTLR4陽性細胞の発現頻度を解析し、鼻咽腔細菌クリアランスとの関連につき検証する。

c) ウエスタンブロット法によるTR

EM-1の測定

鼻咽腔に遊出した好中球を中心とした炎症細胞より蛋白を抽出したのちに、SDS-pageによる蛋白電気泳動を行い、ウエスタンブロット法によるTREM-1の発現およびTLR4の発現につき検証する。

d) RT-PCRを用いた遺伝子レベルでのTREM-1の表出

炎症細胞からRNAを抽出し、TREM-1およびTLR4 mRNAに対する定量的RT-PCR法を用いて中耳局所における好中球主体の自然免疫応答における協調的作用につき検討する。

TREM-1 と TLR4 の協調的作用を作用を確認

(1) in vivo系によるTREM-1とTLR4の協調的作用の確認

a) インフルエンザ菌のクリアランス測定
C3H/HeNマウス、およびC3H/HeJマウスを用い、インフルエンザ菌経鼻投与によるマウス急性上気道炎モデルを作成し、経時的に6、12、24、72時間においてマウス鼻咽腔洗浄液中のインフルエンザ菌生菌数を計測・比較する。

b) フローサイトメトリーによる好中球数とTREM-1の測定

鼻咽腔に遊走して来た炎症細胞数および細胞分画を計測し、Ly-6G陽性好中球におけるTREM-1及びTLR4陽性細胞の発現強度を解析し、鼻咽腔細菌クリアランスとの関連につき検証する。

c) ウエスタンブロット法によるTREM-1の測定

鼻咽腔に遊出した好中球を中心とした炎症細胞より蛋白を抽出したのちに、SDS-pageによる蛋白電気泳動を行い、ウエスタンブロット法によるTREM-1の発現およびTLR4の発現につき検証する。

d) RT-PCRを用いた遺伝子レベルでのTREM-1の表出

炎症細胞からRNAを抽出し、TREM-1およびTLR4 mRNAに対する定量的RT-PCR法を用いて中耳局所における好中球主体の自然免疫応答における協調的作用につき検討する。

(2) in vitro系によるTREM-1とTLR4の協調的作用の確認

TLR4 wild type である C3H/HeN マウス、および TLR4 mutant C3H/HeJ マウスより脾臓から MACS 磁気細胞分離により好中球 (Ly-6G 陽性細胞) を分離し採取し、インフルエンザ菌、MPL、LPS などの TLR4 agonist と共培養を行い、TREM-1 および TLR4 の発現強度をフローサイトメトリーにて解析し、TREM-1 および TLR4 mRNA に対する定量的 RT-PCR 法を用い

て好中球における活性化について遺伝子レベルにおいても検討し、それぞれの agonist による免疫応答の差異についても検証する。活性化した細胞内のシグナル伝達について PCRarray による解析を行い、TREM-1 と TLR4 による炎症性カスケードの協調的作用についても解析する。

上記データの解析を行い、TLR4の有無でTREM-1の発現に有意差が出ることを証明することにより、TREM-1とTLR4の協調的作用を確認する。

TREM-1 による免疫応答増強の立証：

- 鼻咽腔洗浄液中のTNF-alpha、IL-1beta、IL-6等の炎症性サイトカインおよびIL-10、TGF-betaなどの抑制性サイトカイン濃度をELISA Kitにて測定し、鼻咽腔における炎症レベルについて客観的計測を行う。
- in vitroでの共培養上清においても各サイトカイン濃度をELISA Kitにて測定した。

4. 研究成果

鼻咽腔にインフルエンザ菌を感作させることにより好中球の TREM-1 の発現を誘導し、TREM-1 の発現は、鼻汁の細菌クリアランスおよび好中球の活性化に関連すると考えられた。また、TLR4 は炎症の初期段階で蛋白・RNA レベルで TREM-1 の発現を活性化させると考えられた。従って、鼻咽腔において TLR4 は好中球上の TREM-1 と協調的に作用することにより自然免疫応答を増強し中耳炎を含む上気道感染に対する防御能の一面を担っていると考えられた。

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 1 件)Munehito Moriyama, Takashi Hirano, Toshiaki Kawano, Yoshinori Kadowaki, Satoru Kodama, Masashi Suzuki*

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

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 112(2018)27-33
査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 宗仁 (Moriyama Munehito)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：60769834

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()