

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09381

研究課題名(和文) ヒト小児咽頭扁桃における粘膜免疫誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of mucosal immune system in human pediatric pharyngeal tonsils

研究代表者

小笠原 徳子 (Ogasawara, Noriko)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00438061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間内に、初代培養小児咽頭扁桃上皮細胞を14例分離培養しライブラリを作成した。得られた初代上皮細胞についてGFP組換えRSVウイルスを用いて感染実験を行いGFP陽性を指標に細胞選別を行いRSVウイルス易感染細胞に発現する因子と自然免疫関連因子について解析を行った。また上皮細胞の機能解析として、submergeおよびALI条件で上皮細胞を培養しRSVウイルス感染後に肺炎球菌を感染させ、バリア機能の計測と上皮内潜り込みについて解析しsubmergeとALIでは上皮細胞の機能が異なることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器に感染する微生物は人類の生活環境に密接に関わり、小さなきっかけで大流行に至る潜在的脅威を持った病原体である。しかしながら多くの呼吸器感染性病原体は、予防・治療法が未確立である。本研究で示した呼吸器感染性病原体に対する生体の初期応答から防御に至る過程および組織・宿主特異的免疫反応の一部は将来的に、宿主独自の反応を示す作用点として、治療の標的となる可能性があり、新たな治療戦略確立に寄与する重要な意義がある。特に上皮細胞の状態が免疫応答に関わるとする成果は、咽頭扁桃焼灼・切除による免疫機能のリセットの可能性を示唆する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in isolating 14 primary cultured human pediatric nasopharyngeal tonsil epithelial cells (HNTE).

HNTEs were infected GFP recombinant respiratory syncytial virus (RSV). The GFP-negative and positive cells were collected and will be analyzed by RNA sequence. We are planning to analyze what factors are expressed in HNTEs susceptible to RSV. In addition, A549, BEAS-2B and HNTEs were cultured under submerge and air-liquid interface (ALI) conditions. Following RSV infection, we treated *Streptococcus pneumoniae* on upper chamber. After 96 hours RSV infection, we measured barrier function and the number of viable *S. pneumoniae* in epithelial cell. As a result, we found that in the ALI state, unlike the submerge state, RSV infection reduces the epithelial barrier function, and *S. pneumoniae* infection after RSV infection further reduces the barrier function. From the above results, it suggests that the functions of epithelial cells differed under submerge and ALI conditions.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：RSウイルス 小児咽頭扁桃 M細胞 上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中耳炎，副鼻腔炎は乳児から小児期に罹患する代表的な上気道炎症性疾患である．近年これらの上気道炎症性疾患の主な病原菌である肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対するワクチンが開発され，罹患率や菌型に大きな変遷が生じようとしている．そのためワクチンによる宿主免疫誘導が弱い群や反復，難治化群への対応が重要になってきている．上気道炎症性疾患の反復，難治化は小児期後期に気管支喘息などのアレルギー疾患の罹患率上昇をひきおこすことが知られている．このことは外来病原体，抗原に対する生体の初期応答から防御に至る過程および組織・宿主特異的免疫反応が生体に及ぼす長期的な影響について分子生物学的解析を行うことが極めて重要であることを示している．

2. 研究の目的

本研究の目的は，ヒト咽頭扁桃が上気道炎症性疾患における自然・獲得免疫構築にどのように関わっているかを詳細に解析し，上気道炎症性疾患の反復・難治化・続発するアレルギー疾患発症のメカニズムを明らかにし 新たな治療戦略を確立することである．本研究ではそのために小児期に最も発達を示す鼻咽腔粘膜関連リンパ組織 (nasal-associated lymphoid tissues NALT) の構成成分であるヒト咽頭扁桃組織を用いて，ヒト NALT の機能解析をおこなうことを目的に本研究を遂行した．

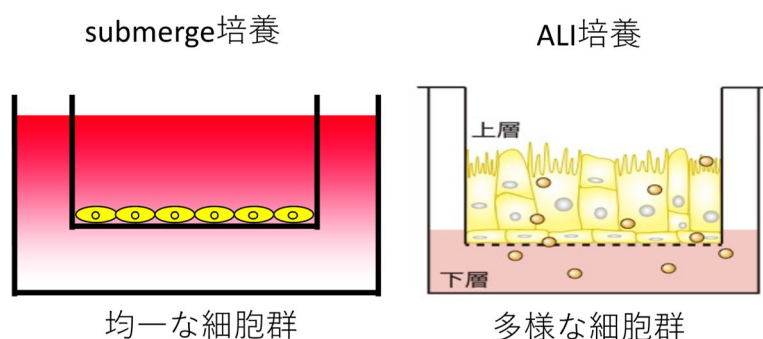
3. 研究の方法

院内倫理委員会から実験計画の承認を受け、手術を受ける患者さんあるいは代諾者から同意をえて取得された小児咽頭扁桃(アデノイド)組織を用いて、初代培養上皮細胞を確立しその過程で咽頭扁桃リンパ球を回収し-80度で細胞を保存しライブラリを作成する。

分離培養方法は、得られた組織を5mm大に細かく刻み、200 ug/ml Collagenase I と 30 ug/ml DNase 1 (Worthington Biochemical,)を入れた10%FBS含有RPMI1640培地とともに単細胞懸濁液調整用C tubeに入れ(Gentle MACS C tube; Miltenyi Biotec)4℃で一晩回転培養した。その後 Gentle MACS dissociator™(プログラム M_lung_02.01)を用いて組織から単細胞懸濁液を調整し、上皮培養を行った。培養は0.01% セルキャンパス (多木化学)でコーティングした皿を用い、BEGM™ BulletKit™ BEGM™ Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit™培地を用いて初代培養を行った。

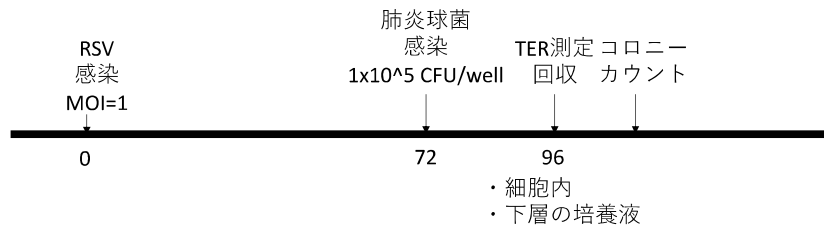
上皮細胞の機能解析として、A549, BEAS-2Bなどの気道上皮細胞株および初代培養咽頭扁桃上皮細胞をダブルチャンバー皿(トランスウェル; ポア径0.4 μm)を用いてsubmergeおよびair-liquid interface(ALI)条件(図1)で上皮を培養し、様々な条件で呼吸器感染性ウイルス(respiratory syncytial virus; RSV)や上咽頭常在菌である肺炎球菌を処理し、上皮細胞の機能解析を行った。タイムスケジュールを図2に示す。

図1 ダブルチャンバーを用いた上皮細胞培養系



上皮バリア機能は経上皮細胞抵抗値 (transepithelial electric resistance; TER) を EVOM (World Precision Instruments, Sarasota, FL) を用いて計測した。計算の際に抵抗値のブランクとして、細胞を培養していないウェルの抵抗値を各計測値から引いて抵抗値の計算を行った。

図2 機能解析のタイムコース



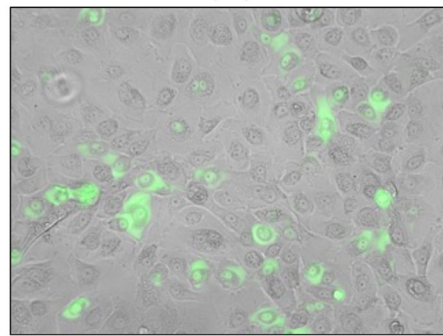
4. 研究成果

研究期間内に、初代培養小児咽頭扁桃上皮細胞を 14 例分離培養することに成功した。また咽頭扁桃由来リンパ球についても 6 例分離培養することに成功し、ライブラリを作成した。

得られた初代小児咽頭扁桃上皮細胞において、APC-conjugate OVA アルブミンを用いて色素を取り込むかどうか予備検討を行った。予備検討ではわずかの APC 陽性細胞を確認したが、非常に数が少なく、sorting の手法を用いて解析可能な収量を回収するのが困難であった。そのため多様な細胞群の characterization を別な指標

で行う必要が生じた。そこで大臣確認を取得し入手した GFP 組換え RSV(GFP-RSV)を用いて感染実験を行ったところ、多重感染度(multiplicity of infection; MOI)が 10 以上と極めて高濃度の RSV 処理にもかかわらず、小児咽頭扁桃上皮細胞では GFP 陽性と陰性細胞群が存在することを発見した (図 3)。この GFP の蛍光強度を指標に、FACS による sorting を行って、細胞選別と回収を行った。

図3 小児咽頭扁桃上皮細胞中の GFP-RSV感染細胞 (緑)と非感染細胞



現在のところ 5 例ずつ GFP 陰性細胞と陽性細胞の回収が終了しており、今後、数例を加えた後に、回収した GFP 陰性細胞と陽性細胞から total RNA 抽出を行い、RNA sequence による遺伝子発現解析を行う予定である。易感染細胞の構成予測には既報の single-cell RNA sequence から得られた細胞の特徴などの情報から RNA sequence の解析を行うことが可能となるように構築されたアルゴリズムを用いて解析を行い(Nature com, 2019)、RSV 易感染細胞にはどのような因子が発現しているのか解析を行っていく予定である。またいくつかの自然免疫関連因子について発現の違いを見出しており、作成した咽頭扁桃組織ライブラリを用いて copy number の違いを real-time PCR で確認する予定である。また上皮細胞の機能解析として、submerge および ALI 条件で A549 および初代培養咽頭扁桃上皮を培養し RSV を MOI=1 の条件で感染 72 時間後に肺炎球菌を 1×10^5 CFU/well で感染させ、RSV 感染 96 時間後にバリア機能の計測と上皮細胞内に潜り込んだ生菌数の測定を行った。その結果 ALI の状態では submerge の状態とは異なり、RSV 感染は上皮バリア機能を減少させ、RSV 感染後の肺炎球菌感染は上皮バリア機能をさらに減少させることを見出した。さらに RSV 感染後に肺炎球菌はより上皮内に潜り込んでいることを生菌数のカウントの違いから明らかにした。

以上の結果から submerge および ALI 条件では上皮細胞の機能が異なることが示唆され、慢性炎症での上皮細胞の機能は正常状態と大きく異なることが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 小笠原 徳子	4. 巻 74
2. 論文標題 TNFスーパーファミリーによるヒト2型自然リンパ球の活性化機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 234-240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Noriko Ogasawara, Julie A. Poposki, Aiko I. Klingler, Bruce K. Tan, Kathryn E. Hulse, PhD1; Whitney W. Stevens, MD, PhD1; Anju T. Peters, MD1; Robert P. Schleimer, Pejman Soroosh, Ken-ichi Takano, Tetsuo Himi, Robert C. Kern, Atsushi Kato
2. 発表標題 Role of receptor activator of NF- κ B ligand and group 2 Innate lymphoid cells in type 2 inflammation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps
3. 学会等名 第3回自然リンパ球国際会議（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小笠原 徳子
2. 発表標題 鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎における2型自然リンパ球制御機構の解明
3. 学会等名 第59回 日本鼻科学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究分担者	山本 聡 (YAMAMOTO Soh) (10588479)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	佐藤 豊孝 (SATO Toyotaka) (30756474)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

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