

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09900

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 of sinusitis using nasal polyp-derived cells

研究代表者

本間 博友（Honma, Hirotomo）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90433771

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）：副鼻腔炎では多様な分子免疫応答が引き起こされるが、免疫エフェクター細胞とIL-17等のサイトカイン標的細胞との相互作用機序を病態ごとに詳細分類できれば治療戦略に大きく貢献できると考えられる。本研究では、副鼻腔ポリープ由来細胞を用いたin vitroでの簡便な評価系を開発し多様な副鼻腔炎における分子免疫機構に関する新規な病態評価・分類法を確立することを目的とした。具体的には、鼻ポリープ由来の多種多様な培養系細胞の確立、IL-17等の各種サイトカイン刺激による免疫物質の分泌応答の網羅的解析、病態別の免疫応答プロファイルが確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでヒト副鼻腔由来細胞の培養系の報告はあるが、安定的に評価するためには一週間以上の期間を要し各患者ごとの同一条件のプロファイリングには適していなかった。短期間で簡便に解析できるin vitro評価系を構築できれば患者の生体組織に類似した環境下での解析が可能となると考えられる。このような評価法を確立し多様な副鼻腔炎の分子免疫応答における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を病態ごとに詳細分類できれば、今後の個別化治療の戦略に大きく貢献できる意義深い研究である。

研究成果の概要（英文）：Sinusitis induces a variety of molecular immune responses, and detailed classification of the interaction mechanisms between immune effector cells and cytokine target cells such as IL-17 according to pathology would contribute greatly to treatment strategies. In this study, we aimed to develop a simple in vitro evaluation system using sinonasal polyp-derived cells and establish a new pathology evaluation and classification method for the molecular immune mechanisms in various sinusitis. Specifically, 1) we established a wide variety of cultured cells derived from nasal polyps, 2) we comprehensively analyzed the secretory response of immune substances to stimulation by various cytokines such as IL-17, and 3) we established immune response profiles according to pathology.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：副鼻腔炎 免疫エフェクター細胞 IL-17 副鼻腔ポリープ由来細胞 免疫応答プロファイル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。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。

2. 研究の目的

本研究では副鼻腔炎患者より摘出された鼻ポリープから線維芽細胞を採取し、術後短期間で解析できる簡易細胞培養法を確立、同時に得られた各免疫細胞から分泌するサイトカイン発現パターンやこれに対する線維芽細胞の応答性を解析し、病態ごとにプロファイリングすることにより多様な副鼻腔炎における分子免疫機構の病態評価・分類法を作製するという独創的な研究である。これまでヒト副鼻腔由来細胞の培養系の報告はあるが、安定的に評価するためには一週間以上の期間を要し、患者ごとの同一条件のプロファイリングには適していなかった。短期間で簡便に解析できる*in vitro*評価系を構築できれば患者の生体組織に類似した環境下での解析が可能となると考えられる。本研究では近年急速に精度が高まっている免疫磁気ビーズやBioPlexサスペンションアレイ等の簡便かつ効率的なアッセイシステムを用いることにより、従来よりも安価で多検体解析に適した評価法を確立できると考えられる。このような評価法を確立し、多様な副鼻腔炎の分子免疫応答における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を病態ごとに詳細分類できれば、今後の個別化治療の戦略に大きく貢献できる意義深い研究となり得る。

3. 研究の方法

さて、本研究は上記の目的を達成するために、次の4点の目標を設定する。

- (1) 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う。

- (2) 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う。
- (3) 免疫磁気ビーズDynabeads Untouched Human T Cells (DynaI)を用い鼻ポリープ由来浮遊細胞からの簡便なT細胞分離法を検証する。
- (4) 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）を用いて表面抗原から簡便な分類マーカ―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。

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する。

【鼻ポリープ由来細胞培養法の検証】

鼻ポリープおよびコントロール副鼻腔組織の摘出

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。

抗菌薬による処理・組織内末梢血の洗浄

抗菌薬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。

浮遊細胞の分離

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 μ m, BD Falcon）により浮遊細胞を分離し細胞培養液中で 37℃, 5%CO₂ 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。

鼻ポリープ由来線維芽細胞の分離・培養

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。解離酵素を用い処理時間・濃度による最適条件の検証を行う。

【鼻ポリープ由来浮遊細胞の分離および表面抗原のプロファイリング】

免疫磁気ビーズによる T 細胞のネガティブ分離

免疫磁気ビーズ Dynabeads Untouched Human T Cells (DynaI)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

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、発現タンパク質から簡便な分類マーカ―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。

【鼻ポリープ由来浮遊細胞の分泌サイトカインのプロファイリング】

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。

【鼻ポリープ由来線維芽細胞のサイトカイン応答能と細胞増殖能・増殖停止能測定の検証】

細胞増殖指示薬として簡便で効率的な WST-8 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。

【線維芽細胞分泌サイトカインの解析】

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。

4．研究成果

副鼻腔炎では多様な分子免疫応答が引き起こされるが、免疫エフェクター細胞と IL-17 等のサイトカイン標的細胞との相互作用機序を病態ごとに詳細分類できれば治療戦略に大きく貢献できると考えられる。本研究では、副鼻腔ポリープ由来細胞を用いた *in vitro* での簡便な評価系を開発し、多様な副鼻腔炎における分子免疫機構に関する新規な病態評価・分類法を確立することを目的とした。具体的には 鼻ポリープ由来の多種多様な培養系細胞の確立、IL-17 等の各種サイトカイン刺激による免疫物質の分泌応答の網羅的解析、病態別の免疫応答プロファイルが確立された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 賀屋 勝太、楠 威志、本間 博友、城所 淑信、荒井 慎平	4. 巻 1
2. 論文標題 鼻性頭蓋内合併症を疑い施行された鼻内視鏡手術により診断された未治療の下垂体腺腫の一例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会誌	6. 最初と最後の頁 111 ~ 115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24805/jiaio.1.2_111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hara Satoshi、Kusunoki Takeshi、Honma Hiroto、Kidokoro Yoshinobu、Ikeda Katsuhisa	4. 巻 41
2. 論文標題 Efficacy of the additional effect of hyperbaric oxygen therapy in combination of systemic steroid and prostaglandin E1 for idiopathic sudden sensorineural hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 102363 ~ 102363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.amjoto.2019.102363	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楠 威志、本間 博友、城所 淑信、小島 崇史、左京 愛莉、石川 数馬、久保 怜子
2. 発表標題 緊急手術を要したポリープ様声帯3症例の治療経験
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間 博友、城所 淑信、楠 威志
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎診断のための鼻茸生検とステロイド投与の影響
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間博友、楠威志
2. 発表標題 眼窩吹き抜け骨折にて視神経屈曲を来した1症例
3. 学会等名 第58回日本鼻科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間博友、楠威志
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎に合併した冠攣縮性狭心症の1例
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019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	楠 威志 (Kusunoki Takeshi) (30248025)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究 分担者	池田 勝久 (Ikeda Katsuhisa) (70159614)	順天堂大学・医学部・特任教授 (32620)	

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
---------	---------