

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16910

研究課題名(和文) PFAPA症候群患児における扁桃上皮の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of tonsil epithelial cells in children with PFAPA syndrome

研究代表者

原 真理子 (Hara, Mariko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：30744552

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)：PFAPA症候群の扁桃上皮において、炎症時に誘導される遺伝子やタンパクの発現を解析し、発熱に関連する自然免疫関連因子を検討した。transcriptome解析より、本疾患の発熱時にはPRRsの活性化とinterferon signalingの関連が推測された。in vitro刺激試験より、細胞内RNAセンサー遺伝子の発現増強とinterferon-stimulated genes関連タンパクの産生増強、さらにはJAM-1の発現減弱が示された。以上より、本疾患ではdsRNA刺激がトリガーとなって炎症応答が引き起こされ、また上皮バリア機能にも影響を与えている可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PFAPA症候群は、扁桃炎を高率に随伴し、口蓋扁桃摘出術が著効する特徴をもち、本疾患の炎症惹起には口蓋扁桃が深く関連していると推測されている。外来刺激に対する扁桃の免疫応答は、主に上皮細胞を介して行われるが、本疾患の扁桃上皮でどのような免疫応答が誘導されるかは分かっていない。本研究は、扁桃上皮における機能解析を行った研究であり、これまでに報告されていない内容である。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression of genes and proteins induced in tonsillar epithelial cells during fever episodes of PFAPA syndrome and investigated what innate immunity-related factors are involved in fever. Transcriptome analysis showed altered expression of genes associated with PRRs and interferon signaling during fever episodes. In vitro stimulation of tonsillar epithelial cells indicated activation of pathways mediated by cytoplasmic RNA sensors. In addition, altered expression of CLDN5 and JAM-1 was observed by intracellular dsRNA stimuli. Our data suggested that intracellular dsRNA might cause inflammation and affect the barrier function of tonsillar epithelial cells in PFAPA syndrome.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：PFAPA症候群 扁桃上皮

1. 研究開始当初の背景

Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome (PFAPA 症候群) は、周期性発熱を主症状とする autoinflammatory diseases (AIDs) の一つであり、小児で発症する AIDs の中では最も頻度が高い。他の AIDs 同様に、本疾患の症状発現にも inflammasome や自然免疫応答の異常活性化が関与していると推測されている。何らかの微生物曝露や抗原非特異的な刺激による自然免疫系の活性化がトリガーとなり、それに引き続く獲得免疫系の活性化が重要な役割を演じていると考えられているが、詳細な病因・病態は未解明である。

本疾患の臨床的特徴は、周期性の発熱と無症状の間欠期を繰り返すこと、発熱と同時に扁桃炎、アフタ性口内炎、頸部リンパ節炎を随伴しやすいことが挙げられる。なかでも扁桃炎を随伴することが多い。治療法について確立された方法はないが、最も有効とされているのは口蓋扁桃摘出術である。RCT や最新の literature review でも高い有効率が示されている。このように、扁桃炎を高率に随伴し、口蓋扁桃摘出術が著効する特徴は、口蓋扁桃における炎症が本疾患の病態形成に深く関連している可能性を強く示唆するものである。しかし、口蓋扁桃について病態解析を行った報告は非常に少ない。

口蓋扁桃は咽頭の入り口に位置しており、多くの外来抗原に曝露されやすい環境下にある。さらに、口蓋扁桃は二次リンパ組織であるが、輸入リンパ管を持たず、外来抗原の侵入は口蓋扁桃の上皮細胞を介して行われる。つまり、口蓋扁桃における免疫応答の誘導には、免疫細胞のみならず、上皮細胞が重要な役割を担い、外来抗原認識/取り込みの制御を行っていると言える。このような口蓋扁桃に特異的な抗原認識機能を考慮すると、本疾患の発症原因となる抗原非特異的な自然免疫系の刺激の認識/取り込みは、扁桃上皮を介して行われている可能性が高いと推測される。

2. 研究の目的

本研究では、PFAPA 症候群の扁桃上皮における自然免疫関連受容体の発現とこれを介する免疫応答、細胞間 tight junction の発現を解析した。これにより、どのような抗原認識の機能異常が背景にあるかを検討し、発症原因となる外来刺激や、誘導される自然免疫の異常応答を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

PFAPA 症候群について、摘出時期から発熱の直前群、発熱の直後群、間欠期の中間群に分類し、コントロール群には生理肥大群、反復性扁桃炎群を用いた。手術により摘出した扁桃組織から上皮細胞を分離した。

はじめに、収集した扁桃上皮から mRNA を抽出し、microarray により網羅的な遺伝子発現解析を行った。さらに、transcriptome 解析により、疾患特異的な遺伝子群から pathway や upstream regulator を予測した。次に、transcriptome 解析の結果から、本疾患の発熱に関連していることが推測された各遺伝子について qPCR で mRNA を測定した。また、候補となった upstream regulator について in vitro で刺激培養を行い、誘導される遺伝子発現やサイトカイン産生を測定した。

4. 研究成果

Transcriptome 解析を行った結果、PFAPA 症候群では、発熱の前後で interferon signaling に関連する遺伝子群の発現変化が起きていることが示された。また、発熱時の upstream regulator として pattern recognition receptors (PRRs) の活性化が推測された。コントロール群との比較においても、PFAPA 症候群では自然免疫関連する炎症性変化が生じている病態が示唆された。

次に、上流因子の候補となった PRRs について qPCR により mRNA 発現を測定し結果、PFAPA 症候群では、RIG-I-like receptors (RLRs) が transcriptome 解析の結果と同様の発現パターンを示すことが分かった。また、各 PRRs について ligand を用いた刺激培養を行った結果、PFAPA 症候群では、RLRs の mRNA 発現が有意に増強し、interferon-stimulated genes 関連タンパクも有意に産生増強することが示された。他の PRRs に対する ligand 刺激では、mRNA 発現やサイトカイン産生について、コントロール群との有意な差は認めなかった。

Tight junction に関しては、transcriptome 解析により発熱前後で CLDN4, CLDN5 の発現変化が認められた。qPCR では JAM-1 の発現量が摘出時期によって変化する傾向がみられ、さらには interferon 刺激によって有意に発現が減弱することが示された。

以上の結果から、PFAPA 症候群では、dsRNA 刺激がトリガーとなり、細胞内 RNA センサーを介した pathway が活性化され、発熱を誘導する炎症応答が引き起こされる可能性が推測された。また、これに関連した炎症応答によって、細胞間 tight junction の発現にも変化

が及び、上皮バリア機能にも影響を与えている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Hara Mariko, Morimoto Noriko, Suzuki Noriomi, Tsuchihashi Nana, Komori Manabu, Yoshihama Keisuke, Fujii Kae, Yamaguchi Sota, Tsunoda Mayumi, Tomisato Syuta, Takahashi Nozomi, Oyake Koichiro, Okuba Yuzuru, Fujieda Mikiya, Matsumoto Kenji	4. 巻 76
2. 論文標題 Transcriptome analysis reveals two distinct endotypes and putative immune pathways in tonsils from children with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 359 ~ 363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.14477	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原真理子
2. 発表標題 PFAPA患児における口蓋扁桃摘出術の有効性に関連する臨床因子の検討
3. 学会等名 第15回日本小児耳鼻咽喉科学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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