

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462659

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌、常在細菌群のアレルギー性鼻炎病態に及ぼす影響、その基礎的検討

研究課題名(英文) The pathophysiologic influence of Staphylococcus aureus and other flora on allergic rhinitis.

研究代表者

齋藤 慎二 (Saito, Shinji)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50195989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：「黄色ブドウ球菌の定着・共生を発端に定着菌-鼻腔上皮細胞間で展開されるコミュニケーション応答により鼻腔環境でのアレルギー応答に変調をもたらす」という仮説の検証を行うため、その基礎的研究モデルの構築を試みた。ヒト鼻腔上皮細胞株を長期気相液相界面培養することで分化を誘導された。タイトジャンクション構成タンパク質の発現・分布を調べたところ、トリセルリンの細胞境界への局在が確認され、液相培養下では見られなかったタイトジャンクション形成が観察された。長期液相気相界面培養により、よりヒト正常鼻腔上皮組織細胞に近い *in vitro* 鼻腔上皮モデルの構築の可能性が高まった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesize that the interaction between host nasal cavity epithelium cell and the habitual Staphylococcus aureus influence the pathophysiologic condition of allergic rhinitis. To elucidate this, we tried construction of *in vitro* nasal epithelium model. A long-term air-liquid interface culture induces the differentiation of human nasal epithelial cell line. After long-term air-liquid interface culture but not normal liquid culture, tricellulin, one of tight junction proteins, is localized at the cell to cell junction. It is expected that a long-term air-liquid interface culture of human nasal epithelial cell line becomes a useful *in vitro* model of normal human nasal epithelium.

研究分野：感染免疫

キーワード：黄色ブドウ球菌 鼻腔上皮細胞 アレルギー性鼻炎 常在細菌叢

1. 研究開始当初の背景

鼻腔粘膜上皮組織は吸入によって曝される多種多様な外来異物に対し物理的、生理的なバリアーとして機能している。上皮組織は、サイトカイン、ケモカイン、その他の炎症性メディエーターの主要な産生組織であり、自然免疫や適応免疫系にも影響を及ぼし細菌などの外来異物の排除に働く。一方、鼻腔粘膜上皮では、暴露された細菌種の中のいくつかは、排除されることなく定着し、ブドウ球菌属、コリネバクテリウム属に代表される鼻腔常在細菌叢を形成する。これらの常在細菌の中でも特に黄色ブドウ球菌の定着とアレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎などの上気道炎症疾患との関連は長いこと議論されている。しかし、その多くはこれら患者からの黄色ブドウ球菌の検出頻度が健常人に比べて高値を示すなど疫学的検証が先行し、実際にこれら細菌の定着がどのようにアレルギーの病態と関わるかについては明らかではない。最近では、黄色ブドウ球菌の産生するスーパー抗原毒素に焦点をあてた報告もあるがその詳細なメカニズムについては不明である。申請者らは、鼻腔環境中での常在細菌群の定着・共生に関わる分子メカニズムについてヒト鼻腔上皮細胞株 RPMI 2650 細胞を用いて解析を行ってきた。これまでの観察結果では、RPMI 2650 細胞は、黄色ブドウ球菌などの菌体刺激に対して、ある特定のキナーゼ活性の亢進などの限られた細胞内応答はみられるが主要な炎症性サイトカイン産生など Th1/Th17 炎症を惹起する応答や、自然免疫による定着菌排除応答の増強は認められなかった。また、TLR リガンドによる刺激に対しては、先のキナーゼ活性の亢進も観察されず、TLR シグナルの伝達系が遮断されていることが示唆された。このような鼻腔上皮細胞の炎症惹起応答の低さが多くの常在細菌群の鼻腔環境への定着・共生に寄与することが考えられる。外界と直結する鼻腔環境では、常時、上皮細胞は様々な細菌群に暴露されており、これらに対して炎症誘導せず寛容であることは恒常性を維持するには合理的である。鼻腔定着菌と上皮細胞相互応答に存在する何らかの特性により、鼻腔粘膜組織下での Th2 応答の優性が保持・強化され、アレルギー性鼻炎などの病態に影響を及ぼすのでは、との着想に至った。

2. 研究の目的

鼻腔粘膜上皮は吸気中に含まれる様々な病原微生物やアレルゲンを排除する一方、一部の細菌群を常在細菌叢として共存させるユニークな器官である。本研究では、鼻腔粘膜上皮への黄色ブドウ球菌など常在細菌群の定着を許容するメカニズムに Th1/Th17 炎症応答を抑制する機構が存在すると想定し、この応答が鼻腔上皮組織下

での Th2 応答の優位性を増強しアレルギー性鼻炎などの病態に影響すると仮設し、その検証を試みる。同時に炎症制御の分子標的としての応用の可能性へつなぐことを目的とする。炎症応答抑制に細菌側の因子が関与する可能性、常在する細菌群も多彩で細菌間での相互応答の影響も考慮する必要があり、黄色ブドウ球菌の多様な臨床分離株、鼻腔に常在する代表的細菌種については収集し、常在細菌環境の再構成も検討している。常在細菌(群) - 上皮細胞間応答によるアレルギー調節機構が明らかになれば、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の新たな治療法の開発や、炎症応答調節に関わる分子応答として、敗血症などの細菌感染の病態コントロール、慢性炎症性疾患などの治療法の開発など臨床応用への分子標的の基盤となる可能性、発展性も期待できる。

3. 研究の方法

(1) in vitro の鼻腔粘膜モデルの作成

通常の液相下培養に加え、気相液相界面培養(多列線毛円柱上皮モデル)、さらにその発展系として樹脂メンブラン支持体を用いた3次元重層培養(重層扁平上皮モデル)を構築し、定着細菌-上皮間相互応答解析のモデルとしての有用性を検証する。各鼻腔上皮細胞培養系について TLR や NOD など PRR、tight junction 構成タンパク質等の発現様式をウエスタンブロット、共焦点レーザー顕微鏡、FACS を用いた解析により精査し、モデルとして最適な培養系を選択する。

(2) 定着細菌との相互作用により誘導される応答

構築した鼻腔粘膜モデルにより、黄色ブドウ球菌 MW2 株の定着により誘導/抑制される遺伝子を解析する。特に炎症応答や免疫応答、アレルギー応答調節に関わる変化を重点的に検索する。

4. 研究成果

(1) 通常行われる液相下培養下の RPMI 2650 細胞が、LPS などの TLR リガンドに対する反応性を示さない。TLR の mRNA レベルでの発現解析の結果から、TLR2 や TLR4 はマクロファージ様細胞と同程度の発現が認められたが TLR2 と 2 量体を形成する TLR1 や TLR6、TLR4 のアクセサリ分子である MD2 の mRNA 発現は非常に低く、TLR2、TLR4 の細胞表層への発現低下が疑われた。フローサイトメトリー解析の結果、この培養条件下では細胞表層での TLR2、TLR4 などの対応する受容体の発現が欠損、もしくは抑制されていることが明らかになった(図1)。また、黄色ブドウ球菌の認識にはエンドサイトーシスによる菌体の細胞内への取り込みが必要であり、JNK のリン酸化応答の程度は、細胞表層に接着する菌量お

よび、細胞内に取り込まれる菌量と相関することが明らかになった(図 2)。このことから菌体が細胞内に取り込まれることが RPMI 2650 細胞の菌体認識に強く関与することが示唆された。しかし、対応する受容体については解析を継続している。

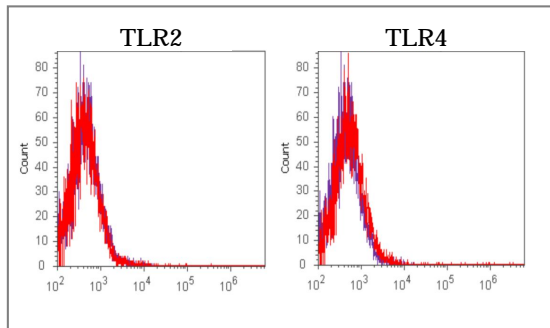


図 1. RPMI2650 の TLR2, 4 の発現
菌体認識関わりとされる TLR の mRNA 発現は、TLR2、4、9 の発現はマクロファージ様細胞株である U937 と同程度に検出されたが(data not shown)、細胞表面での発現をフローサイトメトリーで解析したところ、TLR2、4 の発現は確認できなかった。

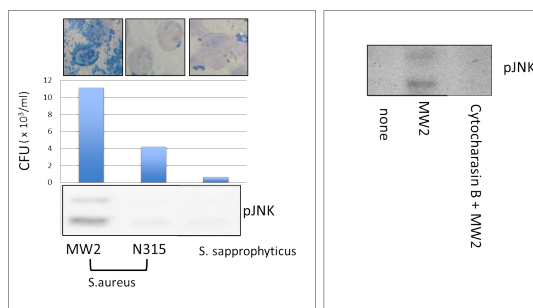


図 2. 菌体の取り込みと認識
MW2 は、N315, 腐生ブドウ球菌と比較して、多くの菌が細胞内に取り込まれた。細胞に多く付着し、細胞内へ多く取り込まれる菌で強いシグナルが見られた。エンドサイトーシス阻害剤であるサイトカラシン B 存在下では、MW2 による JNK のリン酸化は抑制された。

(2) ヒト鼻腔上皮由来細胞株 RPMI 2650 細胞を一定期間、気相液相界面培養を行い、tight junction 形成タンパク質である claudin-1 や tricellulin の局在変化を検討したところ、tricellulin の細胞結合部への特異的局在変化を認め(図 3)。これは、細胞間 tight junction が形成され、本細胞株の欠点であった細胞極性の欠損が回復されたことを示しており、本細胞株の in vitro モデル培養系構築への有用性が裏付けられた。しかし、同時に RPMI2650 の気相液相界面培養系による鼻腔粘膜上皮モデルは、再現性や安定性の低さから、フローラを含む鼻腔粘膜上皮環境モデルの作成にはさらに、市販のヒト鼻腔上皮初代培養細胞の使用等の改善が必要とされた。3 次元重層培養については、

本細胞がクラスター化し増殖することにより適正な単層培養が困難であることから実現していない。他の 3 次元培養方などを検討し打開を試みている。

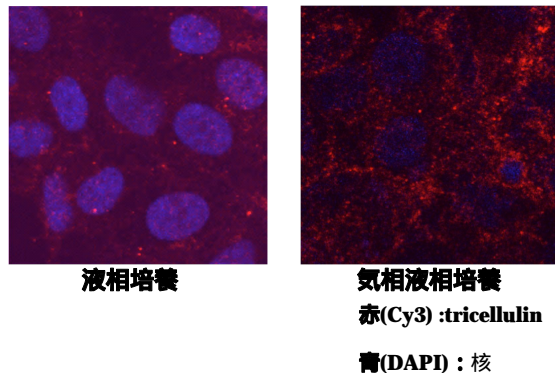


図 3. Tricellulin の局在

(3) RPMI 2650 の液相下培養、および気相液相界面培養での応答を比較し、気相液相界面培養下での応答性変化が観察された。mRNA 発現解析では、液相培養下で恒常的発現した遺伝子に長期気相液相界面培養後、発現の低下、消失するもの、各種リガンド刺激後、発現量変化する遺伝子が観察された。長期液相気相界面培養により、RPMI 2650 に分化誘導されたことを裏付ける結果であり、正常ヒト鼻腔上皮初代培養細胞との性状比較を進めている。発現量変化した遺伝子には、走化性因子やアレルギー応答関連を疑うサイトカインも含まれ、黄色ブドウ球菌菌体刺激と PRR リガンドで相反する遺伝子発現も観察され今後詳細な解析が期待される。

(4) RPMI 2650 は、professional 貪食細胞と異なり、細胞表面に付着した菌体を極めて低効率に取り込むことしか出来ない。上皮細胞発信性のシグナル送出には菌体の細胞表面への接着特性が重要となる。また、鼻腔上皮に定着する菌体は長期の乾燥状態にさらされる。乾燥暴露された黄色ブドウ球菌はより乾燥耐性になり消毒薬抵抗性など表現型の変化と同時に上皮細胞への接着特性も変化することが明らかになった。接着特性と細胞刺激能の変化の解析を続けている。

(5) 主要な鼻腔常在細菌を網羅する 25 菌種を取りそろえ、これらの混合培養系を構築した。また、混合培養系において市中感染型 MRSA(MW2 株)の生菌数を減少させることを見出し、「全体」を再構成することでこれまでにない知見を得ることができた。このフローラ混合培養のノウハウと宿主鼻腔上皮培養細胞系を組み合わせ、上気道環境の再構成に取り組むことで、さらなる研究の発展につなげたい。

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 2 件)

Maudsdotter L, Imai S, Ohniwa RL, Saito S, Morikawa K. *Staphylococcus aureus* dry stress survivors have a heritable fitness advantage in subsequent dry exposure. *Microlobes Infection*, 2015; 17: 456-461. 査読あり

Ushijima Y, Ohniwa RL, Maruyama A, Saito S, Tanaka Y, Morikawa K. Nucleoid compaction by MrgA Asp56Ala/Glu60Ala does not contribute to staphylococcal cell survival against oxidative stress and phagocytic killing by macrophage. *FEMS Microbiol Lett.* 2014; 360: 144-151. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

Lisa Maudsdotter, 今井沙紀、大庭良介、齋藤慎二、森川一也. 日本細菌学会総会、長良川国際会議場、岐阜市、2015.

〔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 0 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

齋藤 慎二 (SAITO Shinji)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：50195989

(2) 研究分担者

大庭 良介 (OHNIWA Ryosuke)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30447883

(3) 連携研究者

横田 伸一 (YOKOTA Shinichi)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：10325863

(4) 研究協力者

築瀬 晴香 (YANASE Haruka)
筑波大学・人間総合科学研究科・フロンティア医科学専攻・大学院生