



Title	交互積層細胞コート法を用いた三次元肺組織モデルの構築と感染モデルへの応用
Author(s)	赤松, 由佳子
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91875
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (赤松 由佳子)

論文題名 交互積層細胞コート法を用いた三次元肺組織モデルの構築と感染モデルへの応用

論文内容の要旨

【研究目的】

超高齢社会を迎えた日本において、肺炎と誤嚥性肺炎は死因の第5位と第6位を占め、特に高齢者では高い死亡率を示す重篤な疾病である。気道上皮は生体防御の最前線に位置し、病原体による気道上皮バリアの破綻や宿主の炎症応答は肺炎の病態形成に深く関連する。したがって、病原体とヒト肺組織の相互作用を解明することは、肺炎の病態形成機構を理解する上で重要である。感染症研究では動物モデルや二次元細胞培養モデルが用いられてきたが、ヒトと動物間で生じる生体応答の差異や細胞間相互作用を反映した宿主応答を再現できないという問題があった。

細胞外マトリックスは、生体組織における細胞形態と機能の制御に不可欠である。特に、細胞膜上に存在するインテグリン分子と細胞外マトリックスとの相互作用は、細胞骨格や分化、増殖を制御し、組織や器官の形成に寄与する。交互積層 (Layer-by-Layer; LbL) 細胞コート法は、細胞表面に細胞外マトリックス成分であるフィブロネクチンとゼラチンを交互に積層させることにより、細胞周囲にナノ薄膜が形成され、細胞間接着を誘起し、短期間に多種多様なヒト組織モデルを構築することができる画期的な三次元培養技術である。LbL 細胞コート法は、高い細胞生存率を維持し、複数の細胞の配置を制御できるため、皮膚モデルや口腔粘膜モデル、癌浸潤モデルに応用されている。

本研究では、LbL 細胞コート法により、バリア機能を有する三次元肺組織モデルを構築した。作製した三次元モデルを感染系に応用し、感染に伴う上皮バリアの傷害ならびに炎症応答を従来の二次元培養モデルと比較することにより、三次元肺組織モデルの感染モデルとしての有用性を評価した。

【材料および方法】

1. 三次元肺組織モデルと二次元培養モデルの構築と評価

LbL 細胞コート法により、ヒト正常肺線維芽細胞にフィブロネクチンとゼラチンのコーティングを行い、Transwell メンブレンインサート内に 1×10^6 cells で播種した。播種翌日、気管支上皮細胞 (Calu-3) 細胞を 2×10^5 cells で積層し、三次元肺組織モデルを構築した。また、Calu-3 細胞を Transwell メンブレンインサート内に 2×10^5 cells で播種し、二次元培養モデルとして使用した。

組織構造は、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と気道粘液成分であるムチン、基底膜タンパク質であるラミニン、細胞間接着分子である E-カドヘリンと ZO-1 に対する抗体を用いた蛍光免疫染色により評価した。上皮バリアの機能は、経皮的電気抵抗 (TEER) 値により検討した。

2. *Streptococcus pneumoniae* の感染に伴うバリア傷害と炎症応答の解析

肺炎患者由来の *S. pneumoniae* D39 株 (血清型2) を対数増殖期後期まで培養した。組織培養 3 日目の三次元肺組織モデルもしくは二次元培養モデルの頂端部位から *S. pneumoniae* を 2×10^6 CFU で感染させた。

感染 24 時間後における組織構造と上皮バリアの機能は、上記 1 と同様の方法で評価した。また、感染細胞から産生される炎症性サイトカイン IL1- β と IL-6 は ELISA で定量した。

【結果および考察】

1. 三次元肺組織モデルと二次元培養モデルの構築と評価

三次元肺組織モデルは上皮細胞を播種した後、7 日間継続して、線維芽細胞層の上に単層上皮が積層した構造を示し、安定した厚みを保持した。蛍光免疫染色法により、上皮-線維芽細胞間に基底膜タンパク質であるラミニンと上皮頂端にムチンの局在を確認した。また、上皮細胞間接着部位に E-カドヘリンおよび ZO-1 の局在を認めた。さらに、ZO-1 の発現を示す蛍光シグナルの数と TEER 値は、培養 3 日目においてともに最大の値を示した。これらの結果から、構築した三次元肺組織モデルは上皮極性と高いバリア機能を有する組織であることが示唆された。

2. *S. pneumoniae* の感染に伴うバリア傷害と炎症応答の解析

上記 1 で得られた結果をもとに、最も高いバリア機能を示した上皮播種 3 日後の三次元肺組織モデルを感染実験に応用した。*S. pneumoniae* を感染させた三次元肺組織モデルの TEER 値は、非感染モデルと比較して、有意に低下したが、二次元培養モデルでは感染に伴う TEER 値の低下は認められなかった。また、感染三次元肺組織モデルでは、非感染モデルと比較して、上皮頂端側における E-カドヘリンの染色性の低下と E-カドヘリンへの菌体の局在を認めた。これらの結果から、*S. pneumoniae* は細胞間接着分子を傷害することにより、細胞間隙経路から上皮下組織に侵入することが示唆された。

S. pneumoniae を感染させた三次元肺組織モデルの培養上清における IL-1 β の産生量は、非感染モデルや二次元モデルと比較して有意に増加した。また、非感染および感染三次元肺組織モデルともに培養上清への IL-6 の遊離を確認したが、非感染群と感染群における有意な差は認められなかった。これらの結果から、上皮下組織に侵入した *S. pneumoniae* は IL-1 β の産生を誘導し、炎症応答を惹起することが示唆された。

【結論】

LbL 細胞コート法により、上皮極性およびバリア機能を有する三次元肺組織モデルを構築した。三次元肺組織モデルは、二次元培養モデルと比較して、*S. pneumoniae* 感染に対する高い感受性と炎症応答を示したことから、ヒトの肺炎病態を反映するモデルとして有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (赤 松 由 佳 子)	
論文審査担当者	(職) 氏 名 主 査 教授 川端 重忠
	副 査 教授 豊澤 悟
	副 査 准教授 伊藤 祥作
	副 査 講師 村上 旬平

論文審査の結果の要旨

本研究は、交互積層細胞コート法を用いて構築した三次元肺組織モデルに対し、肺炎の起因菌である *Streptococcus pneumoniae* を感染させることにより、ヒトの肺炎病態モデルとしての有用性を評価したものである。

構築した三次元肺組織モデルは線維芽細胞層の上に単層上皮が積層した構造を示し、蛍光免疫染色により、上皮-線維芽細胞間に基底膜タンパク質であるラミニンや上皮細胞間接着部位にE-カドヘリンおよびZO-1の局在を認めたことから、上皮極性を有する組織であることを確認した。構築した三次元肺組織モデルに *S. pneumoniae* を感染させた場合、感染二次元培養モデルと比較して、上皮バリア機能を示す経上皮電気抵抗値が有意に低下した。また、感染三次元肺組織モデルでは、非感染モデルと比較して、上皮頂端側におけるE-カドヘリンの染色性の低下とE-カドヘリン発現部位への菌体の局在を認めた。さらに、感染三次元肺組織モデルの培養上清におけるIL-1 β 量は、非感染モデルや二次元モデルと比較して有意に増加した。三次元肺組織モデルを用いた解析により、*S. pneumoniae* が上皮バリアを傷害し、線維芽細胞からの炎症性サイトカインの産生が誘導されることが示唆された。

以上より、本研究は博士（歯学）の学位に値するものと認める。