



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	<a href="https://doi.org/10.18910/91875">https://doi.org/10.18910/91875</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# 学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻  
療護歯科保健学講座（障害者歯科治療部）

赤松 由佳子

本論文の要旨の一部は、第 19 回 日本再生医療学会総会 (2020 年 5 月 18 日-29 日, 8 月 27 日-9 月 10 日, online), 第 43 回 日本分子生物学会年会 (2020 年 12 月 2 日-4 日, online), 第 63 回 歯科基礎医学会学術大会 (2021 年 10 月 9 日-11 日, online), 第 64 回 歯科基礎医学会学術大会 (2022 年 9 月 17 日-19 日, 徳島), 第 75 回 日本細菌学会関西支部総会 (2022 年 11 月 19 日, 京都) において発表した.

## 要約

近年、ヒト細胞を用いた三次元組織化培養技術の進歩により、ヒト生体を模倣した様々な組織体が構築されている。ヒト生体組織の構造と機能を再現した三次元組織体は、基礎研究から再生医療や創薬研究まで、幅広い研究ツールとして利用されている。これまでの感染症研究では、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異種の細胞間相互作用を反映した宿主応答を十分に再現できておらず、ヒト三次元生体組織モデルの活用が望まれている。

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。本研究ではLbL細胞コート法を使用し、三次元肺組織モデルの構築を行った。構築した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。また作製した三次元肺組織モデルは、上皮細胞間接着部位に細胞間接着分子のマーカーであるE-カドヘリンおよびZO-1の局在を認め、上皮極性を有する組織であることを確認した。

次に、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した。肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) を感染させた場合、三次元肺組織モデルの経上皮電気抵抗 transepithelial electrical resistance (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

発現部位への菌体の局在を認めた。また、*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 $\beta$ 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。これらの結果から、上皮組織に侵入した *S. pneumoniae* は IL-1 $\beta$ の産生を誘導し、炎症応答を惹起することが示唆された。

本研究では、上皮極性を示しヒトの組織形態を模倣する三次元肺組織モデルを構築した。構築した肺組織モデルは *S. pneumoniae* の感染に対し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。

## はじめに

ヒト生体組織は、同種および異種の細胞と細胞外マトリックス成分から構成される三次元組織体である。細胞-細胞間や細胞-細胞外マトリックス成分間の相互作用は、細胞形態や機能の発現に関与し、組織や器官の形成に寄与する<sup>1,2</sup>。従来の感染症研究や創薬研究では、二次元細胞培養モデルや動物実験モデルが一般的に用いられる。しかしながら、二次元培養細胞モデルは異種の細胞が含まれておらず、三次元の組織構造を示さない。また、動物モデルは病原体の宿主特異性が問題となることから、従来のモデルではヒトの生体内で起こる現象を正確に反映できていない。

近年、三次元培養技術を用いた様々な三次元生体組織モデルが作製され、二次元モデルと比較してより生体に類似する複雑な構造を有し、高い生体応答や機能を発現することが報告されている<sup>3</sup>。ヒト細胞を用いた三次元生体組織は、移植などの再生医療分野や動物実験の代替モデルに使用されているほかに、癌などの疾患モデルへの応用も進められており、従来の解析方法では限界があった生体メカニズムの解明が期待される。

呼吸器感染症研究においても、*in vitro* で構築した三次元肺組織を用いた感染症モデルの検討が行われている。細胞凝集体であるスフェロイド培養法は三次元培養技術の代表的な方法であるが<sup>3,4</sup>、組織内部に壊死が生じるだけでなく、上皮極性を示さないため、上皮頂端面からの微生物の感染を再現できない。またコラーゲンゲル<sup>5</sup>やスキャホールド<sup>6</sup>を用いたモデルにおいては、ゲルの収縮によって均一組織を得ることは難しいことや、組織内に足場が残存するという問題もある。その他、三次元培養技術により構築された三次元肺組織モデルには、細胞シート法<sup>7</sup>や3Dプリンター<sup>8</sup>、脱細胞化技術<sup>9</sup>を用いた肺モデルやiPS細胞を使用した肺オルガノイド<sup>10</sup>などが挙げられるが、煩雑な細胞操作や細胞の入手が困難であること、さらには長期間の培養維持が問題に挙げられる。

交互積層 (Layer-by-Layer; LbL) 細胞コート法は、細胞外マトリックス成分のフィブロネクチンが細胞膜上のインテグリン $\alpha_5\beta_1$ 、ならびにコラーゲンに対する結合ドメインを有することに着目した三次元培養技術である<sup>11,12</sup>。細胞に対して、フィブロネクチンおよびコラーゲンの変性体であるゼラチンを交互に積層させることにより、細胞表面にナノ薄膜が形成される。このナノ薄膜が細胞の足場の役割を果たすことで細胞間接着が誘起され、短期間に三次元の細胞積層体の構築が可能となる<sup>13,14</sup>。LbL細胞コート法は、血管網を有する皮膚モデル<sup>15,16</sup>や口腔粘膜モデル<sup>17</sup>、心筋モデル<sup>18</sup>など様々な三次元組織構築に応用されてきた。また本手法を用いて、肺の正常線維芽細胞もしくは肺線維症由来線維芽細胞に対し、フィブロネクチンおよびゼラチンによる細胞コーティングを行った三次元肺線維芽積層体の構築が報告されているが<sup>19</sup>、上皮細胞を伴う肺組織モデルに関する報告はない。

本研究では、LbL細胞コート法を用いて、ヒトの肺線維芽細胞と気管支上皮細胞株から構成される上皮極性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に肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) を感染させ、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、感染症研究における三次元肺組織モデルの有用性を評価した。

## 材料と方法

### 1. 使用細胞および培養方法

細胞は、ヒト正常肺線維芽細胞 Human Pulmonary Fibroblast Cell (HPF) (PromoCell, Heidelberg, Germany) およびヒト気管支上皮細胞株 (Calu-3) (American Type Culture Collection, No. HTB-55, Manassas, VA, USA) を使用した。HPF の培養には線維芽細胞用培地 Fibroblast Growth Medium 2 (FGM2) (PromoCell) を使用し、Calu-3 細胞の培養にはダルベッコ改変イーグル培地 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ナカライテスク, 京都) に 10% (v/v) 仔牛胎児血清 Fetal bovine serum (FBS), 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ゲンタマイシンあるいは抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (100 unit/mL ペニシリン G ナトリウム, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン硫酸塩, および 250 ng/mL アムホテリシン B) (ナカライテスク) を添加したものを使用した。これらの細胞は 5%  $\text{CO}_2$  気相下, 37°C 培養を行った。細胞の継代においては、培養培地を除去した後に、ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (日水製薬, 東京) にて細胞を洗浄した。0.05% (v/v) トリプシンおよび 0.02% (w/v) エチレンジアミン四酢酸 ( $\text{EDTA}\cdot 4\text{Na}$ ) を添加した D-PBS 溶液を使用し、培養フラスコから細胞を剥離した。剥離した細胞は FBS を添加した新鮮な培地で懸濁し、遠心 (160 g, 3 分間, 25°C) 後、細胞を回収し、新たな細胞培養フラスコに播種した。

### 2. 使用菌株および培養方法

肺炎患者由来の肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae* D39 (血清型 2) を感染実験に使用した。*S. pneumoniae* の培養には、0.2% (w/v) Yeast Extract (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を添加した Todd-Hewitt (Becton Dickinson and Company) 液体培地 (THY 液体培地), または 1.5% (w/v) 寒天 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む

THY 寒天平板培地を使用した。

### 3. LbL 細胞コート法を用いた三次元肺組織モデルおよび二次元肺組織モデルの構築

交互積層 (layer-by-layer; LbL) 細胞コート法を用いて、HPF に細胞外マトリックス成分であるフィブロネクチンおよびゼラチンをコートした<sup>14</sup>。すなわち、 $2 \times 10^7$  cells の HPF に対して、0.04 mg/mL フィブロネクチン (Sigma-Aldrich) および 0.04 mg/mL ゼラチン溶液 (富士フイルム和光純薬, 大阪) を 1 mL を加え、懸濁した。室温で 1 分間インキュベートした後、2 mL の D-PBS を加え、遠心分離 (800 g, 1 分間, 25°C) した後、上清を除去した。この工程を 9 サイクル (フィブロネクチン:5 回, ゼラチン:4 回) 交互に繰り返すことにより、フィブロネクチンとゼラチンから構成されるナノ薄膜を細胞表層に形成させた。

細胞コーティングを行った HPF を 25  $\mu$ g/mL L-アスコルビン酸 (富士フイルム和光純薬) を含む DMEM と FGM2 の等量混合培地 (調整培地) に懸濁し、0.2 mg/mL のフィブロネクチン溶液で前処理を行った Transwell カルチャーインサート (底面積; 0.33 cm<sup>2</sup>, ポリエステルメンブレンポアサイズ; 0.4  $\mu$ m) (Corning, NY, USA) 内へ  $1 \times 10^6$  cells となるように播種した。調整培地をカルチャーインサート外に 1 mL 加え、CO<sub>2</sub> 気相下にて 37°C で 2 時間静置後、さらに 1 mL 調整培地を加え、CO<sub>2</sub> 気相下にて 37°C で培養した。1 日後、HPF から構成される積層体の上に D-PBS で 0.04 mg/mL に調製した Collagen IV 溶液 (Sigma-Aldrich) を 100  $\mu$ L 添加し、CO<sub>2</sub> 気相下にて 37°C で 1 時間培養した後、調整培地で懸濁した Calu-3 細胞を  $2 \times 10^5$  cells となるように積層させ、三次元肺組織モデルを構築した (図 1)。

二次元肺組織モデルは、Calu-3 細胞を  $2 \times 10^5$  cells となるようにカルチャーインサート内へ播種し、10% FBS 含有 DMEM を用いて培養した。

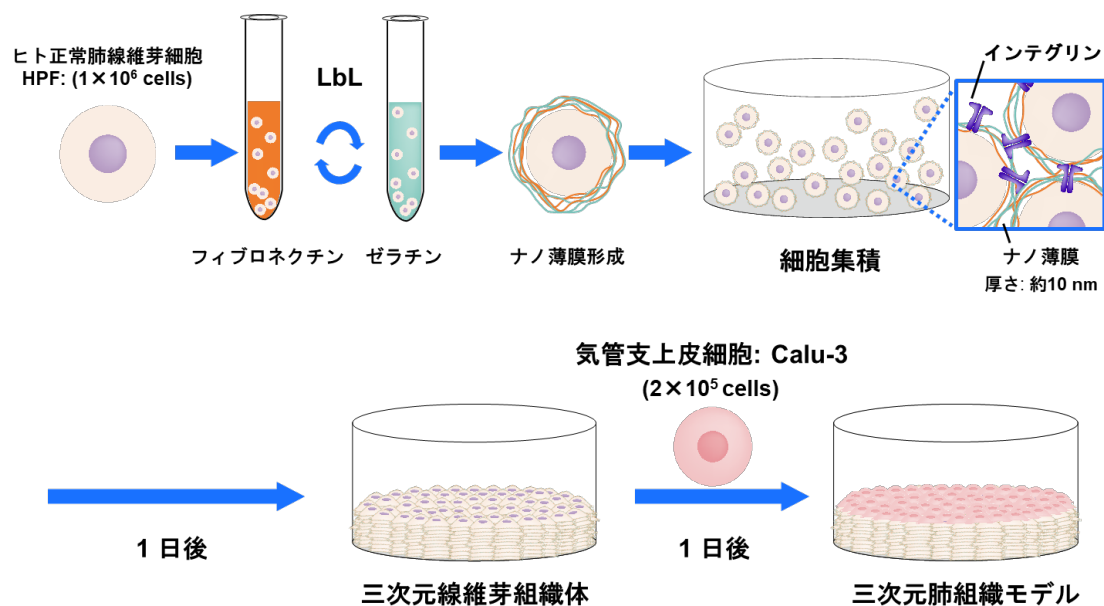


図1. 交互積層細胞コート法を用いた三次元肺組織モデルの構築

細胞をフィブロネクチンおよびゼラチン溶液に交互に浸漬することにより，細胞周囲にナノ薄膜が形成される．ナノ薄膜を介して細胞間接着が誘起され，短期間に三次元線維芽組織体の構築が可能になる．ヒト正常肺線維芽細胞（HPF）周囲に，LbL細胞コートを行うことにより，三次元肺線維芽組織体を構築した．HPFを播種した翌日，Calu-3細胞を三次元肺線維芽積層体上に播種し，三次元肺組織モデルを構築した．

#### 4. 二次元培養モデルおよび三次元培養モデルへの感染実験

培養2日目の二次元肺組織モデルおよび三次元肺組織モデルをD-PBSで2回洗浄した後，各組織培養培地をカルチャーインサートの外に1 mL，インサートの内に200  $\mu$ L加えた．培養3日目に二次元肺組織モデルおよび三次元肺組織モデルのカルチャーインサート内の培地をすべて吸引した後，37°Cで対数増殖期後期 ( $OD_{600} = 0.7$ ) まで培養した *S. pneumoniae* を各組織培養培地に懸濁し，頂端面側より100  $\mu$ Lの菌懸濁液 ( $2 \times 10^6$  コロニー形成単位; Colony forming unit, CFU) を感染させた．感染から2時間経過後，各組織をD-PBSで3回洗浄した．インサート内外に新鮮な培地を添加し，感染24時間後まで培養した．

## 5. ヘマトキシリン-エオジン染色および蛍光免疫染色

作製した肺組織モデルおよび感染組織モデルは、4% パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液 (ナカライテスク) に浸漬させ、室温で 30 分間固定した後、パラフィン包埋を行った。パラフィン包埋サンプルは 4  $\mu\text{m}$  の厚みで組織切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色は脱パラフィン処理後、ヘマトキシリン染色液とエオジン染色液で染色し、エタノールで脱水した後、マリノール液 (武藤化学株式会社, 東京) を用いてスライドガラスに封入した。組織切片は EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) もしくは EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific) で観察した。

蛍光免疫染色は、脱パラフィン処理および水洗後、Tris-EDTA buffer (pH 9.0) [1 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.1 mM EDTA-4Na] を用いて、121°Cで 10 分間賦活化処理を行った。1% ウシ血清アルブミン Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) を用いて、4°Cで一晩ブロッッキング処理を行った。一次抗体として、マウス抗ヒトサイトケラチン 7 抗体 (1:1000, Abcam, Cambridge, UK), マウス抗ヒトラミニン  $\alpha_5$ / LAMA5 抗体 (1:500, Abcam), マウス抗ヒト MUC5AC 抗体 (1:100, Thermo Fisher Scientific), マウス抗ヒト E-カドヘリン抗体 (1:100, Thermo Fisher Scientific), マウス抗ヒト ZO-1 抗体 (1:80, Thermo Fisher Scientific), もしくは、ウサギ抗ヒトコラーゲン I 抗体 (1:1000, Abcam) を使用した。4°Cで一晩反応させた後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体として、Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:200, Thermo Fisher Scientific), もしくは Alexa Fluor 594 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:200, Thermo Fisher Scientific) を反応させた。Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Thermo Fisher Scientific) にて、細胞の核の染色とスライドガラス上での封入を行った。

非感染および感染三次元肺組織モデルの組織体は、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、0.2% Triton X-100 を加え、20 分間浸透化処理を行った。3% BSA 溶液にて

4°Cで一晩ブロッキングした後，一次抗体として，マウス抗ヒト E-カドヘリン抗体 (1:500, Thermo Fisher Scientific) およびウサギ抗 *S. pneumoniae* (血清型 2) 莢膜抗体 (1:1000, デンカ生検, 東京) を使用した．二次抗体として，Alexa Fluor 594 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:500, Thermo Fisher Scientific) および Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:500, Thermo Fisher Scientific) を使用した．PBS で洗浄した後，10 µg/mL に調製した 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) を添加し，30 分間反応させた．PBS 洗浄後，スライドガラスで封入し，共焦点レーザー顕微鏡 (FV10) (Olympus, 東京) により観察した．

## 6. TUNEL 染色

*In situ* apoptosis detection kit (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を使用し，初期の細胞死を検出した．パラフィン組織切片を脱パラフィン処理および水洗後，20 µg/mL proteinase K (富士フイルム和光純薬) を用いて室温で 15 分間賦活化処理を行った．洗浄後，3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて室温で 5 分間，内因性ペルオキシダーゼのブロッキング処理を行った．Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) と Fluorescein isothiocyanate (FITC) を標識した dUTP の混合液を 60 分間反応させ，洗浄した．House radish peroxidase (HRP) を標識したウサギ抗 FITC 抗体を 37°C で 30 分間反応させ，3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 基質キット (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用いて発色させた．洗浄後，3% メチルグリーンにて対比染色を行い，脱水および透徹後，マリノール液を用いてスライドガラスに封入した．TUNEL 陽性細胞数の測定は，撮影視野 (2048 × 1536 pixel) あたりの陽性細胞数を計測した．

## 7. 経上皮電気抵抗値の測定

上皮バリア機能の評価として，経上皮電気抵抗 (transepithelial electrical resistance)

(TEER) 値 ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ) を Millicell ERS-2 (Millipore Co. Ltd., Darmstadt, Germany) を用いて測定した<sup>20,21</sup>。TEER 値は各サンプルにつき 3 回測定し、平均値を算出した。

## 8. 炎症性サイトカイン量の測定

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて、非感染および感染 24 時間後の線維芽細胞積層体、二次元、および三次元培養モデルのカルチャーインサート内の培養上清中の IL-1 $\beta$  (R&D system, Minneapolis, MN, USA) と IL-6 (R&D system) 量を測定した。96 well プレートにマウス抗ヒト IL-1 $\beta$  抗体もしくはマウス抗ヒト IL-6 抗体を室温で一晩吸着させた。0.05% Tween 20 溶液でウェルを 3 回洗浄後、1% BSA 溶液を 300  $\mu\text{L}$  添加し室温で 1 時間反応させた。洗浄後、所定濃度に希釈した培養上清サンプルおよび標準溶液を 100  $\mu\text{L}$  ずつ各ウェルに添加し室温で 2 時間反応させた。ウェル洗浄後、ビオチン標識したヤギ抗ヒト IL-1 $\beta$  抗体もしくはビオチン標識したヤギ抗ヒト IL-6 抗体を 100  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、室温で 2 時間反応させ、洗浄後、HRP を標識したストレプトアビジンを 100  $\mu\text{L}$  添加し室温で 20 分間反応させた。HRP 基質溶液であるテトラメチルベンジジン (MOSS Bio, Pasadena, MD, USA) を 20 分間室温で反応させた後、0.5N HCl 溶液を 100  $\mu\text{L}$  の添加により反応を停止し、波長 450 nm における吸光度を測定した。

## 9. 統計学的解析

組織の厚み、E-カドヘリンの蛍光強度、および ZO-1 発現シグナルの測定には、ImageJ 2.1.0/1.53g; Java 1.8.0\_172 (ImageJ Software, Bethesda, Maryland, USA) を使用した。組織の厚みは、撮影視野 (2048  $\times$  1536 pixel) あたり 5 点計測し平均したものをサンプルの厚みとし、各日 5 サンプルずつ計測した。E-カドヘリンの蛍光強度、および ZO-1 発現シグナルの測定は、撮影視野 (427  $\times$  427 pixel) あたりの Calu-3 細胞層に発現する E-カドヘリンの平均蛍光強度および ZO-1 の発現数を計測した。統計処理には、GraphPad Prism

Version 9.4.1. (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用い, one-way ANOVA/ Turkey-Kramer 検定, Student  $t$  検定を用い, 各サンプル群間の有意差を検定した.  $p < 0.05$  をもって有意差ありとした.

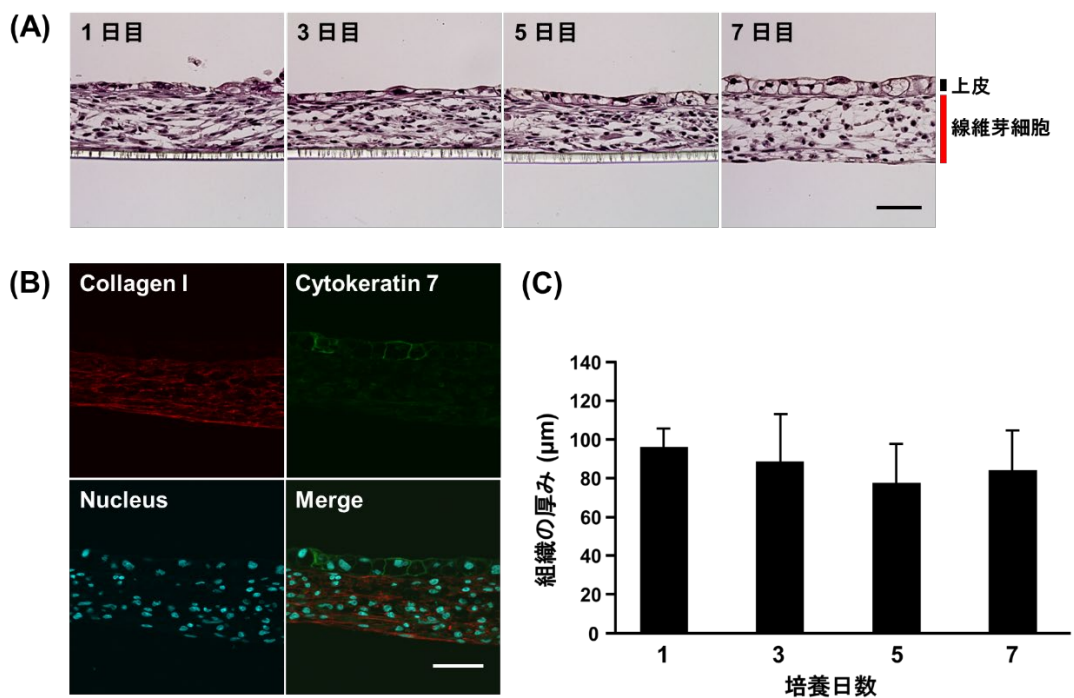
## 10. 実験承認

本研究は, 病原体等取扱安全管理委員会 [病原体所持承認番号, 23 (歯学研究科)-7] の承認を得て行った.

# 結果

## 1. 三次元肺組織モデルの形態学的評価

LbL 細胞コート法を用いて、三次元肺組織モデルの構築を行った。構築した組織に対し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色および上皮マーカーであるサイトケラチン 7 と線維芽細胞マーカーであるコラーゲン I を用いた蛍光免疫組織染色にて組織体の評価を行った。組織作製から培養 1 日目から 7 日目まで、Calu-3 細胞が線維芽細胞層の上に積層する組織体を示した (図 2 A, B)。培養 7 日目の三次元肺組織モデルでは、線維芽細胞の変性を認めた。二次元培養による Calu-3 細胞は扁平な上皮細胞であるが、本手法で構築した三次元組織モデルは立方上皮形態となり、ヒトの肺における呼吸細気管支に類似した構造であった<sup>22</sup>。また、構築した肺組織モデルの組織構造を定量的に解析するため、ImageJ Software にて組織の厚みを算出したところ、培養 1 日目から 7 日間まで、均一な厚みを示した (図 2 C)。



## 図 2. LbL 細胞コート法を用いて作製した三次元肺組織モデルにおける組織形態の評価

(A) 培養 1 日目から 7 日目までの三次元肺組織をパラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後にヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行った。スケールバー, 50  $\mu\text{m}$ 。(B) 培養 7 日目の三次元肺組織切片を蛍光免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。線維芽細胞層 (赤) は、ウサギ抗ヒトコラーゲン I 抗体と Alexa Fluor 594 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体で標識した。Calu-3 上皮細胞 (緑) は、マウス抗ヒトサイトケラチン 7 抗体と Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体で標識した。細胞の核は、DAPI で染色した。スケールバー, 50  $\mu\text{m}$ 。(C) 三次元肺組織の HE 染色像から ImageJ を用いて組織の厚みを測定した。サンプル数 = 5。

## 2. 三次元肺組織モデルにおけるタンパク質発現の評価

肺組織は上皮と間質から構成され、上皮と間質との間には基底膜が存在し、上皮細胞間には細胞間接着を担うアドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションが形成されている。基底膜は、ラミニンやコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分から構成され、上皮細胞層と結合組織を隔てるシート状の構造体である<sup>23</sup>。基底膜タンパク質の 1 つであるラミニン  $\alpha_5$  (LAMA5) は成人肺で高い発現が認められ<sup>24</sup>、肺の組織発達に関与する<sup>25</sup>。アドヘレンスジャンクションは E-カドヘリンやカテニンから構成され、組織の再生や発達において組織構造の維持に働く<sup>26,27</sup>。タイトジャンクションはクローディンやオクルディン, JAM1, ZO-1, ZO-2, ZO-3 タンパク質から構成され、アドヘレンスジャンクションより頂端面に形成される<sup>28</sup>。また、気道上皮は粘液産生細胞が産生するムチンによって覆われ、ムチンは細胞の保護や病原微生物に対し物理バリアとして働く<sup>29</sup>。

構築した肺組織モデルにおける LAMA5, MUC5AC, E-カドヘリン, および ZO-1 の蛍光免疫組織染色を行い、各種タンパク質の発現を評価した。蛍光免疫染色の結果、基底膜タンパク質分子である LAMA5 は、上皮と線維芽細胞層間に発現を認めた (図 3A)。

本モデルにおいて、気管支上皮細胞が産生するムチン MUC5AC は上皮頂端面側に局在した (図 3B)。Calu-3 細胞株はムチンを産生することがこれまでに報告されている<sup>30</sup>。さらに、細胞間接着に関与する E-カドヘリンは上皮細胞間に特異的に発現するとともに (図 3C)、タイトジャンクション構成タンパク質である ZO-1 は上皮細胞間の頂端面側に発現を認めた (図 3D)。

細胞間接着分子 E-カドヘリン発現量の経日変化は ImageJ にて解析した。その結果、上皮播種 1 日後より、E-カドヘリンの発現を認め、経日的にその蛍光強度は増加した。タイトジャンクション構成タンパク質である ZO-1 は、撮影視野あたりの上皮細胞間に発現する蛍光シグナルを計測した。ZO-1 の蛍光シグナルの数は、培養 3 日目に最多であった (図 4A, B)。

### 3. 構築した三次元肺組織モデルの上皮バリア機能の評価

肺組織モデルの上皮バリア機能を測定するため、培養 1, 3, 5, 7 日目における TEER 値を測定した (図 5)。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とから、培養 3 日目の組織を感染実験に使用した。

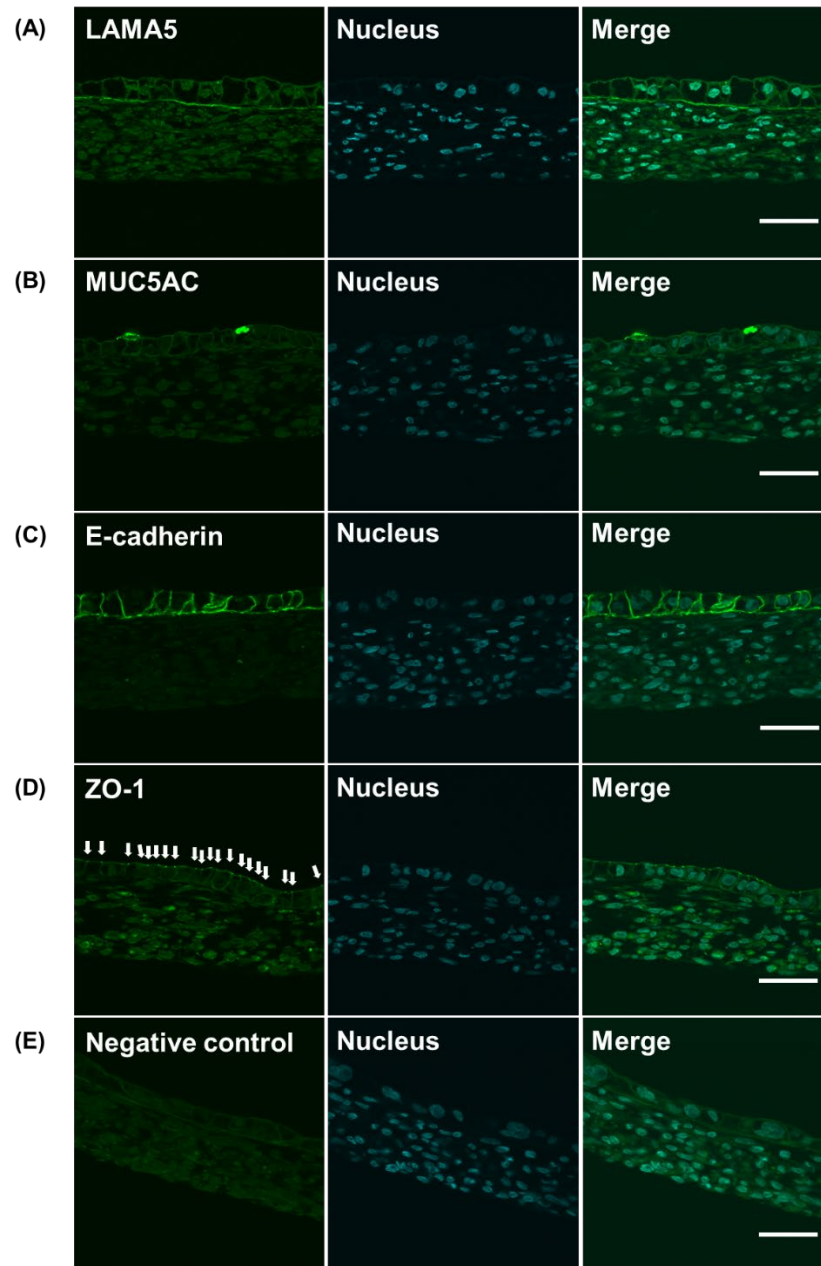


図 3. 三次元肺組織モデルにおけるタンパク質発現の評価

培養 7 日目の三次元肺組織切片を蛍光免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。基底膜タンパク質 (緑) は、マウス抗ヒトラミニン  $\alpha_5$ /LAMA5 抗体と Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (A)、ムチン (緑) はマウス抗ヒト MUC5AC 抗体と Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (B)、E-カドヘリン (緑) はマウス抗ヒト E-カドヘリン抗体と Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (C)、ZO-1 (緑) はマウス抗ヒト ZO-1 抗体と Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (D) を用いて染色した。白矢印は ZO-1 発現部位を示す。陰性対照は、1% BSA と Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (E) を用いて染色した。核は DAPI で染色した。スケールバー、50  $\mu\text{m}$ 。

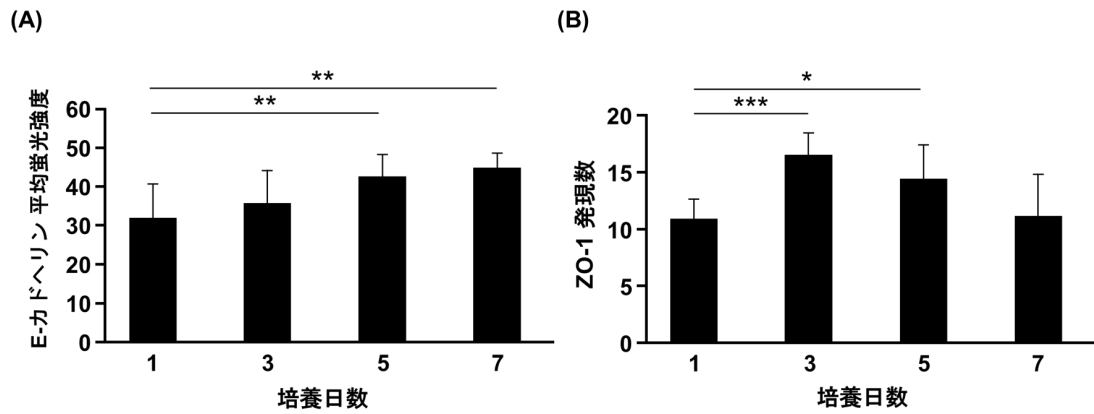


図4. 三次元肺組織モデルのE-カドヘリンおよびZO-1発現量の経日的評価

培養1日目から7日間の三次元肺組織切片を蛍光免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ImageJを用いて、撮影視野あたりのCalu-3細胞層に発現するE-カドヘリンの平均蛍光強度およびZO-1の発現数を解析した。グラフの縦棒は平均値を、誤差バーは標準誤差を示す。サンプル数 = 3-4。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

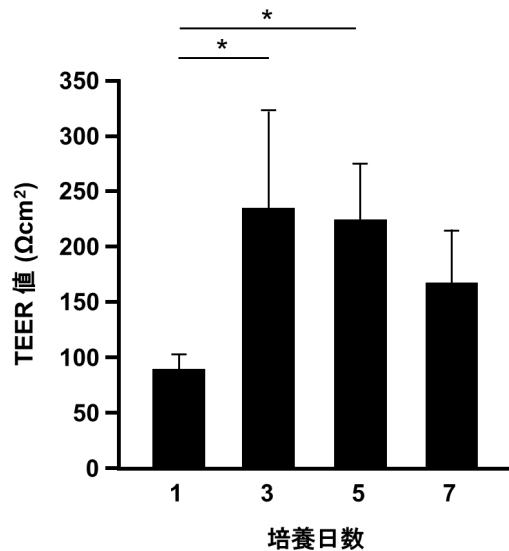


図5. 三次元肺組織モデルの上皮バリア機能の評価

培養1日目から7日間の三次元肺組織モデルのTEER値を測定した。グラフの縦棒は平均値を、誤差バーは標準誤差を示す。サンプル数 = 5-6。\* $p < 0.01$ 。

#### 4. *S. pneumoniae* 感染による二次元モデルおよび三次元モデルの上皮バリアへの影響

培養 3 日目の二次元および三次元肺組織モデルの頂端面側より, *S. pneumoniae* D39 株を感染させ, 24 時間経過後の TEER 値を測定した. 二次元培養モデルにおいて, 感染モデルと非感染モデルの間で TEER 値に有意な差は認められなかった (図 6A). 一方, 感染 24 時間後の三次元肺組織モデルでは, 非感染モデルと比較して, 感染に伴い TEER 値が低下した (図 6B).

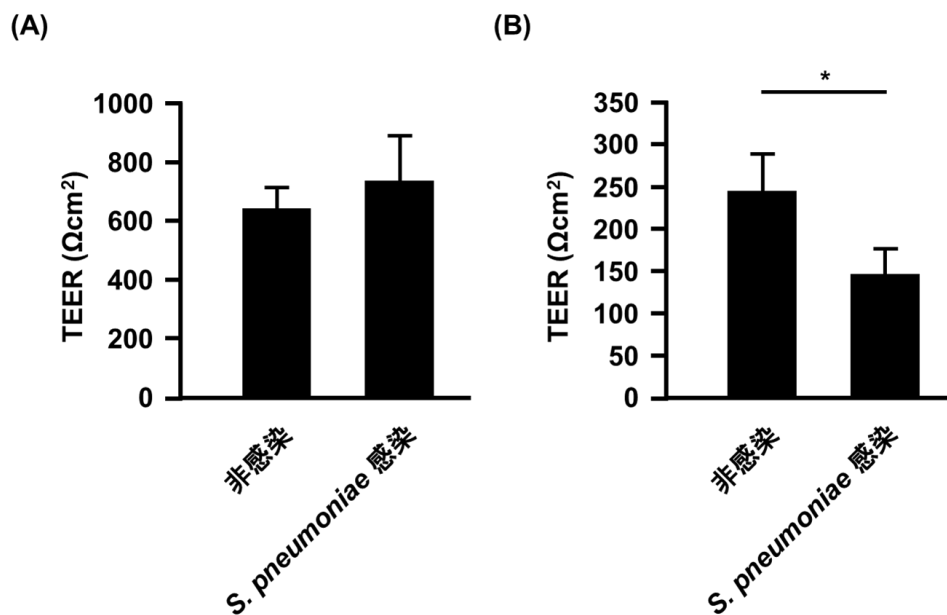


図 6. *S. pneumoniae* 感染による二次元モデルおよび三次元モデルの上皮バリアへの影響

二次元肺組織モデル (A) もしくは三次元肺組織モデル (B) に *S. pneumoniae* を感染させ, 24 時間後の各モデルにおける TEER 値を測定した. グラフの縦棒は平均値を, 誤差バーは標準誤差を示す. サンプル数 = 7-8. \* $p < 0.001$ .

## 5. *S. pneumoniae* 感染が三次元肺組織モデルの組織構造に及ぼす影響

*S. pneumoniae* の感染による上皮極性の傷害および組織の構造変化を検討するため、非感染および感染 24 時間後の三次元肺組織モデルについて、HE 染色、TUNEL 染色、および E-カドヘリンと *S. pneumoniae* の莢膜 (血清型 2) に対する蛍光免疫染色により評価した。非感染組織と感染組織の HE 染色像から、両モデルともに著しい組織構造の変化は認められなかった (図 7A)。一方で、非感染モデルと比較して、感染モデルにおける TUNEL 陽性細胞の有意な増加を認め、*S. pneumoniae* 感染によって線維芽細胞の細胞死が誘導されることが示唆された (図 7B,C)。組織切片の蛍光免疫染色結果から、*S. pneumoniae* を感染させた三次元肺組織モデルでは、非感染モデルと比較し、上皮頂端部位の E-カドヘリンの染色性の低下を認めた (図 7D)。また、組織の三次元立体構築像から、感染群では、E-カドヘリン発現部位への菌体の局在を認め、菌体の線維芽層への侵入を認めた (図 7E)。

## 6. *S. pneumoniae* の感染に伴う炎症性サイトカイン量の測定

*S. pneumoniae* の感染に伴う組織モデルから産生される炎症性サイトカイン量を検討するため、二次元肺組織モデル、三次元肺組織モデル、および三次元線維芽細胞層 (HPF) の頂端部から *S. pneumoniae* を感染させ、24 時間後の培養上清中のサイトカイン IL-1 $\beta$  および IL-6 を ELISA により定量した。*S. pneumoniae* を感染させた三次元肺組織モデルからの IL-1 $\beta$  産生量は、非感染モデルや感染二次元モデル、感染線維芽細胞層と比較して有意に増加した (図 8A)。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 (図 8B)。一方で、*S. pneumoniae* を感染させた線維芽細胞層からの IL-6 の産生は、非感染群と比較し、有意に増加した。

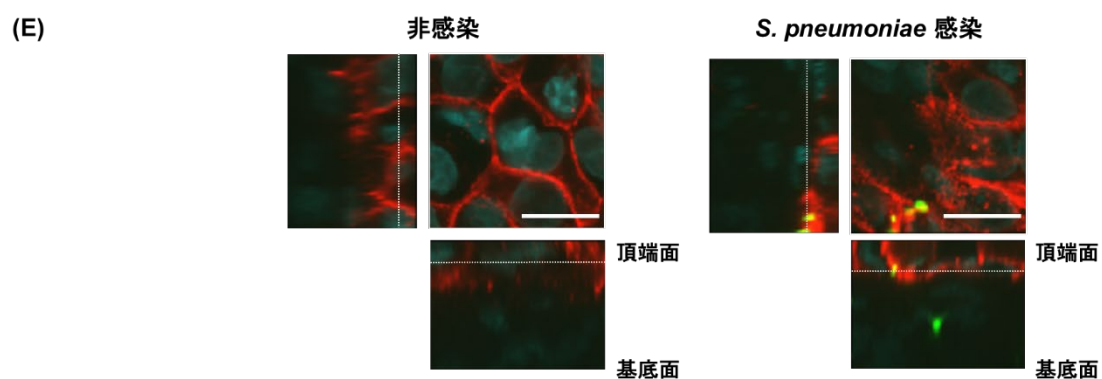
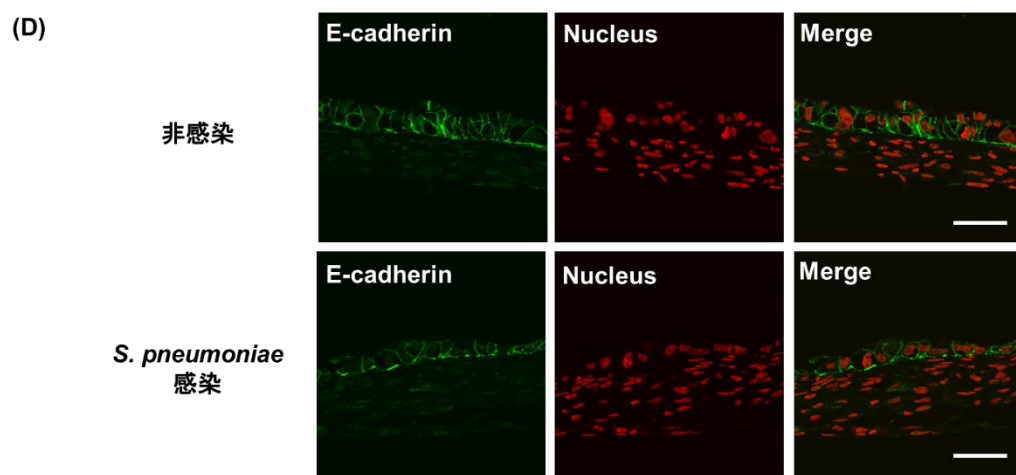
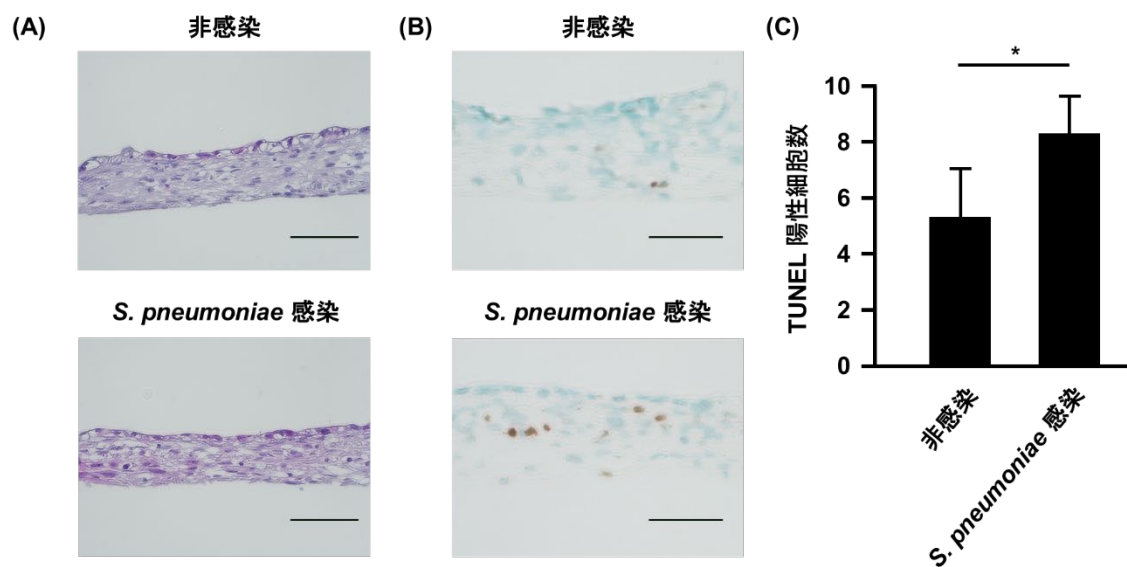


図 7. *S. pneumoniae* 感染が三次元肺組織モデルの組織構造に及ぼす影響

(A) 非感染および感染 24 時間後の三次元肺組織をパラフィン包埋後、薄切切片を作製し、HE 染色を行った。スケールバー、75  $\mu\text{m}$ 。(B) 薄切切片に TUNEL 染色を行い、DAB 基質にて発色を行った。スケールバー、50  $\mu\text{m}$ 。(C) 非感染および感染 24 時間後の三次元肺組織モデルの撮影視野あたりの TUNEL 陽性細胞数を解析した。サンプル数 = 4。\* $p < 0.05$ 。(D) 三次元肺組織モデルの薄切切片に蛍光免疫組織染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。E-カドヘリン (緑) は、マウス抗ヒト E-カドヘリン抗体と Alexa Fluor488 ヤギ抗マウス IgG 抗体で標識した。細胞の核 (赤) は、DAPI で染色した。スケールバー、50  $\mu\text{m}$ 。(E) 非感染および感染 24 時間後の三次元肺組織に対し、0.2% Triton X-100 で処理後、蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で撮影し三次元構築画像を取得した。菌体 (緑) は、ウサギ抗 *S. pneumoniae* (血清型 2) 莖膜抗体および Alexa Fluor488 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体で標識した。E-カドヘリン (赤) は、マウス抗ヒト E-カドヘリン抗体および Alexa Fluor 594 ヤギ抗マウス IgG 抗体で標識した。細胞の核 (青) は、DAPI で染色した。スケールバー、20  $\mu\text{m}$ 。

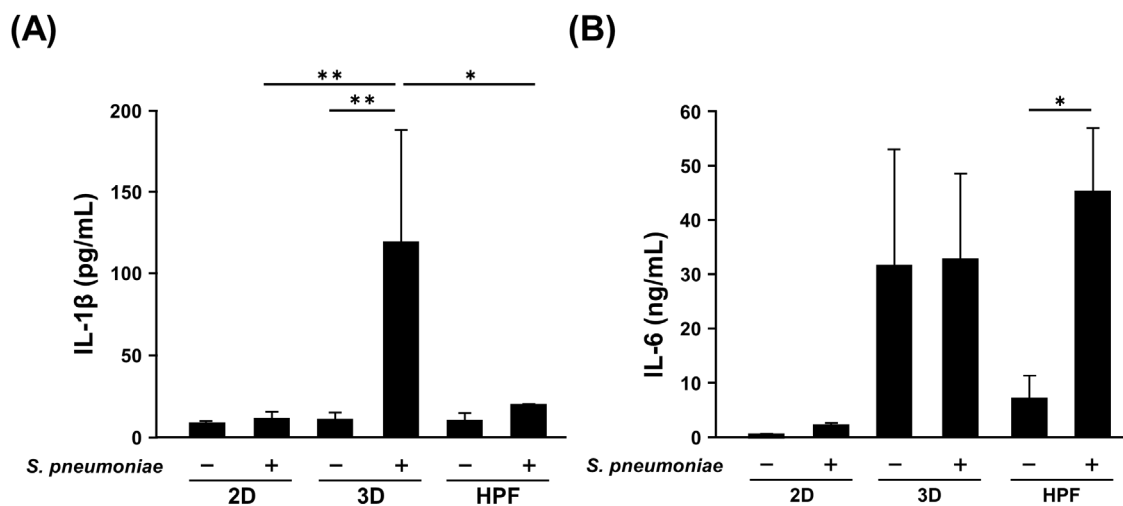


図 8. 組織モデルから産生される炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  および IL-6 量の測定

非感染群もしくは感染 24 時間後の二次元肺組織モデル、三次元肺組織モデル、および線維芽細胞層の培養上清中の炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  (A) および IL-6 (B) 量を ELISA により測定した。グラフの縦棒は平均値を、誤差バーは標準誤差を示す。2D および 3D のサンプル数 = 7-8。HPF のサンプル数 = 2-3。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$ 。2D, 二次元肺組織モデル。3D, 三次元肺組織モデル。HPF, 三次元線維芽細胞層。

## 考察

LbL 細胞コート法は、細胞外マトリックス成分であるフィブロネクチンが細胞膜上のインテグリン $\alpha_5\beta_1$  とコラーゲンに結合し、細胞間接着を誘起させることで三次元組織構築を可能にする<sup>13,14</sup>。多種多様な細胞に応用が可能であり、これまでに、皮膚線維芽細胞層に表皮角化細胞を積層させた皮膚モデルや口腔粘膜由来線維芽細胞層に口腔粘膜上皮細胞を積層させた口腔粘膜モデルなど種々の三次元組織モデルの構築が報告されている<sup>15-19</sup>。久能らは、正常肺線維芽細胞や疾患患者より単離した肺線維芽細胞に LbL 細胞コーティングを行い、特発性肺線維症モデルを構築した<sup>19</sup>。本研究では、皮膚モデルや口腔粘膜モデルと同様に、LbL 細胞コート法を用いて構築した肺線維芽細胞層に上皮細胞を積層した三次元肺組織モデルの構築を試みた。構築した肺組織モデルは、久能らが報告した正常肺線維芽積層体の組織厚みと比較し、厚い組織体を示した。久能らは培地として DMEM のみをモデルの構築に使用していたが、本モデルでは、DMEM と FGM2 を等量混合し、L-アスコルビン酸を添加した培地を使用した。線維芽細胞用の培地に添加されている線維芽成長因子 fibroblast growth factor (FGF) やインスリンは、細胞分化の維持に関与している。また、L-アスコルビン酸はビタミン C としても知られており、酸化ストレスによる傷害から細胞を保護する<sup>31</sup>。本研究では、上皮と線維芽細胞との細胞間相互作用を誘起し、培地成分に改良を加えることにより、均一な厚みを 7 日間保持した肺組織モデルの構築に成功した。

生体組織は、単に細胞が集積した三次元的な構造ではなく、複数の細胞が規則的に配列し、組織構造を示す。三次元生体組織の構築において、生体と類似する構造形態や機能の再現は重要な課題である。本研究で構築したモデルは、タイトジャンクション構成タンパク質である ZO-1 とアドヘレンスジャンクション構成タンパク質である E-カドヘリンが上皮細胞間に発現し、上皮-線維芽細胞間に局在する基底膜を認め、上皮極性を

有することを確認した。これまでに報告されている肺スフェロイドを用いた感染実験では、上皮極性が認められていない<sup>3,4</sup>。上皮極性を有する本モデルでは、頂端側もしくは基底側からの薬物投与や感染の影響を検討することができる。組織の形態や細胞の生存率、機能の発現には、上皮と間質における相互作用だけでなく、組織の弾性率が深く関与することが報告されている<sup>32</sup>。組織弾性の決定には、コラーゲンやエラスチンといった間質の線維成分が関連する。二次元培養では細胞が扁平に引き延ばされ、肺胞上皮と線維芽細胞の相互作用が存在しないため、完全な基底膜の構成が不十分である<sup>33</sup>。上皮を線維芽細胞層に積層することは、ヒト組織構造だけでなく弾性率を含む生体組織の周囲環境を模倣することが可能である。加えて、線維芽細胞はコラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリックス成分を産生する主要な細胞であることから、構築した三次元肺組織モデルでは、Calu-3細胞がヒト肺組織における呼吸細気管支上皮と類似する単層立方上皮形態を示し、上皮-線維芽細胞間に局在する基底膜が認められたと考えられる。さらに、三次元肺組織モデルのTEER値が二次元培養モデルと比較して低値を示すことも、細胞外マトリックス成分を豊富に含む線維芽細胞層が与える組織弾性が関与していると推察された。

肺炎と誤嚥性肺炎は、2021年の厚生労働省による人口動態調査によると、死因の第5位と第6位を占めており、特に70歳以上の高齢者では死亡率が著しく増加する<sup>34,35</sup>。健常者では、鼻咽腔から侵入する病原体は気道細胞の繊毛運動や上皮から産生されるムチンによって排除されるが<sup>29</sup>、物理的および化学的バリアから逃れた場合、細気管支や肺胞へと到達する。高齢者では脳血管障害や認知症などの基礎疾患による嚥下障害や咳反射の低下により不顕性誤嚥が生じやすい<sup>36</sup>。*S. pneumoniae*は約3-5%の高齢者の鼻咽頭に常在し、195か国を対象とした1990年から2016年の下気道感染症の統計分析では、70歳以上の高齢者肺炎における死亡原因微生物の1位であった<sup>37</sup>。これまでの三次元肺組織モデルは、iPS細胞<sup>10</sup>やヒトの気管や肺組織から細胞を単離したモデルが多く<sup>38</sup>、

煩雑な細胞操作や細胞の維持培養が困難であった。また、繊毛細胞を有する上気道や気管細胞を用いた報告が多く<sup>39,40</sup>、下気道末端を模倣する肺組織モデルに関する報告は少ない<sup>4,5</sup>。本研究では、呼吸細気管支を模倣する三次元肺組織モデルを構築した。さらに、三次元肺組織モデルの頂端側から *S. pneumoniae* を感染させ、感染に伴う上皮バリア傷害および感染組織から産生される炎症応答について解析し、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を示した。

*S. pneumoniae* は気道上皮細胞に存在する表面受容体を介して細胞に定着する。これまでに、*S. pneumoniae* は菌体表層に発現するコリン結合タンパク質である Choline-binding protein A (CbpA) とヒトの高分子免疫グロブリン受容体との結合や、Choline-binding protein E (CbpE) と血小板活性化因子受容体との結合を介して、宿主細胞に定着することが報告されている<sup>41</sup>。*S. pneumoniae* を感染させた三次元肺組織モデルでは、感染二次元モデルと比較し、TEER 値の低下を認めた。また、非感染三次元モデルと比較して、感染三次元モデルは上皮の頂端面側に発現する E-カドヘリンの染色性の低下、ならびに、E-カドヘリン発現部位への菌体の局在を認めた。*Streptococcus pyogenes* の溶血毒素ストレプトリジン S がカルシウムイオン依存性のシステインプロテアーゼであるカルパインを活性化し、上皮細胞間の接着分子である E-カドヘリンやオクルディンを分解することにより、*S. pyogenes* が細胞間隙経路から上皮バリアを突破することが明らかになっている<sup>20,21</sup>。*S. pneumoniae* が産生する孔形成毒素ニューモライシンにおいても、細胞外のカルシウムイオンを細胞質内に流入させることが報告されており、ニューモライシンによりバリア機能が傷害された可能性がある<sup>42</sup>。Pneumococcal surface adhesin A (PsaA) はカルシウムイオン依存的に E-カドヘリンと結合することが報告されている<sup>43</sup>。したがって、本研究では三次元肺組織モデルにおいて、PsaA を介した E-カドヘリンへの結合とニューモライシンによる上皮バリアの傷害により、*S. pneumoniae* が細胞間隙経路を介して組織深部に侵入することが示唆された。

三次元肺組織モデルに *S. pneumoniae* を感染させたところ、IL-1 $\beta$ の産生量は、非感染モデルや二次元モデル、線維芽細胞層と比較して有意に増加した。したがって、細胞間隙経路から線維芽細胞内に侵入した *S. pneumoniae* は、上皮および線維芽細胞の細胞間相互作用によってIL-1 $\beta$ の産生を誘導することが示唆された。IL-1 $\beta$ は、主に免疫細胞から産生され、MAPK 経路およびNF- $\kappa$ B 経路を介して炎症応答を活性させるとともに<sup>44</sup>、タイトジャンクションの透過性を亢進させることが報告されている<sup>45</sup>。IL-1 $\beta$ の産生によって、バリア機能を担うタイトジャンクションの透過性が亢進し、TEER 値が低下したと推察される。また、非感染三次元モデルと比較して、感染三次元モデルにおいて細胞死の有意な増加を認めた。*S. pneumoniae* 感染において、IL-1 $\beta$ の産生が主にアポトーシス経路依存的である報告にも一致している<sup>46</sup>。IL-6 は、非感染および感染三次元肺組織モデルともに培養上清中から検出したが、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。一方で、*S. pneumoniae* を感染させた線維芽細胞層からのIL-6の産生は非感染群と比較し、有意に増加した。IL-6は感染応答だけでなく、癌細胞の分化増殖にも関与する<sup>47</sup>。過去には、癌細胞の上皮間葉転換研究において、ヒト正常皮膚線維芽細胞と下咽頭癌細胞を共培養した場合のIL-6産生量は、下咽頭癌細胞のみの培養の約10倍、線維芽細胞のみの培養の約25倍の量まで増加することが報告されている<sup>48</sup>。また、肺胞上皮癌細胞の培養上清で処理した正常肺線維芽細胞から産生されるIL-6は、未処理と比較して約3倍程度増加するという報告もある<sup>49</sup>。癌細胞培地に含まれるTGF- $\beta$ が正常肺線維芽細胞を活性化させ、線維芽細胞が産生するIL-6量が増加したと考察されている。本研究では、上皮に肺上皮腺がん由来のCalu-3細胞を使用していることから、肺腺がん細胞と正常線維芽細胞間で生じる細胞間相互作用によって、非感染および感染三次元モデルから産生されるIL-6量に有意な差が認められなかったと推察した。

呼吸器病原体が産生する病原因子や感染に伴う炎症応答が宿主の肺組織を傷害し、上皮-血管内皮透過性を亢進させることにより、肺水腫など重症肺炎の病態が形成される。

構築した三次元肺組織モデルでは、*S. pneumoniae* が上皮バリアを傷害し、線維芽細胞から炎症性サイトカインが産生することを再現した。肺組織は、上皮と間質からのみ構築されるわけではなく、血管やリンパ管、免疫細胞を有することで、多様で複雑な組織応答が生じる。*Haemophilus influenzae* 感染においては線維芽細胞が CD4 陽性 T 細胞を活性化させると報告がある<sup>50</sup>。LbL 法を用いたモデルでは、血管網やリンパ管を含有する生体モデルの構築が報告されている<sup>15-19</sup>。*S. pneumoniae* 感染による肺炎病態の形成機序の解明には、血管や免疫細胞を有する肺組織モデルを用いて感染応答を解析することが重要であり、今後検討を加える必要があると考える。

本研究で構築した三次元肺組織モデルは、上皮極性を示し、組織形態を模倣するモデルであった。また、*S. pneumoniae* の感染に対し高い感受性を示したことから、生体機能を模倣し、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。本モデルは、感染症の基礎研究をはじめ、動物モデルでは評価が困難であるシグナル経路の解析や上皮と線維芽細胞の細胞間相互作用を反映した医薬品の毒性試験や創薬研究への応用が期待される。

## 謝辞

本研究を行う機会を与えていただき、終始ご懇意なるご指導とご鞭撻を賜りました口腔分子感染制御学講座 川端 重忠 教授に深甚なる感謝の意を表します。本研究を遂行するにあたり、直接のご指導とご鞭撻ならびに多くのご教示賜りました口腔分子感染制御学講座 住友 倫子 講師に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。ご支援を賜りました障害者歯科治療部 秋山 茂久 准教授に心より感謝申し上げます。また、様々なご助言とご高閲を賜りましたバイオインフォマティクスユニット 山口 雅也 准教授、口腔分子感染制御学講座 広瀬 雄二郎 助教に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、終始多大なるご指導、ご協力いただきました大阪大学大学院生命機能研究科 明石 満 特任教授、赤木 隆美 特任准教授に拝謝申し上げます。また、ご指導下さいました鹿児島大学 発生発達生育学講座 中田 匡宣 教授に心より感謝申し上げます。病理組織診断についてご助言を下さいました顎口腔病因病態学講座 宇佐美 悠 講師に感謝申し上げます。ご支援下さいました障害者歯科治療部 村上 旬平 講師に感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うに際し、ご理解とご協力を賜りました口腔分子感染制御学講座、障害者歯科治療部、明石研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Mui KL, Chen CS, Assoian RK (2016) The mechanical regulation of integrin–cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J. Cell Sci.* **129**: 1093-1100.
2. Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P (2019) Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**: 457-473.
3. Huber JM, Amann A, Koeck S, Lorenz E, Kelm JM, Obexer P, Zwierzina H, Gamerith G (2016) Evaluation of assays for drug efficacy in a three-dimensional model of the lung. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**: 1955-1966.
4. Campos CL, Gomes LR, Covarrubias AE, Kato EE, Souza GG, Vasconcellos SA, Heinemann MB, Martins EAL, Ho PL, Da Costa RMA, Da Silva JB (2022) A three-dimensional lung cell model to *Leptospira* virulence investigations. *Curr. Microbiol.* **79**: 57.
5. Correll KA, Edeen KE, Zemans RL, Redente EF, Serban KA, Curran-Everett D, Edelman BL, Mikels-Vigdal A, Mason RJ (2019) Transitional human alveolar type II epithelial cells suppress extracellular matrix and growth factor gene expression in lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **317**: 283-294.
6. Bhowmick R, Derakhshan T, Liang Y, Ritchey J, Liu L, Gappa-Fahlenkamp H (2018) A three-dimensional human tissue-engineered lung model to study Influenza A infection. *Tissue Eng. Part A.* **24**: 1468-1480.
7. Kanzaki M, Sekine H, Takagi R, Yamato M (2020) Bioartificial pleura using allogenic cell sheet for closing of lung air leakage. *JTCVS Techniques.* **4**: 336-340.
8. Ng WL, Ayi TC, Liu Y-C, Sing SL, Yeong WY, Tan B-H (2021) Fabrication and characterization of 3D bioprinted triple-layered human alveolar lung models. *Int. J. Bioprint.* **7**: 53-67.
9. Mishra DK, Sakamoto JH, Thrall MJ, Baird BN, Blackmon SH, Ferrari M, Kurie JM, Kim MP (2012) Human lung cancer cells grown in an *ex vivo* 3D lung model produce matrix metalloproteinases not produced in 2D culture. *PLoS One.* **7**: e45308.
10. Dye BR, Hill DR, Ferguson MAH, Tsai Y-H, Nagy MS, Dyal R, Wells JM, Mayhew CN, Nattiv R, Klein OD, White ES, Deutsch GH, Spence JR (2015) *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *eLife.* **4**: e05098.
11. Akashi M, Akagi T (2021) Composite materials by building block chemistry using weak interaction. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **94**: 1903-1921.
12. Zhang S, Xing M, Li B (2018) Biomimetic Layer-by-Layer self-assembly of nanofilms, nanocoatings, and 3D scaffolds for tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 1641-1660.
13. Matsusaki M, Kadowaki K, Nakahara Y, Akashi M (2007) Fabrication of cellular multilayers

- with nanometer-sized extracellular matrix films. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**: 4689-4692.
14. Nishiguchi A, Yoshida H, Matsusaki M, Akashi M (2011) Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube networks by the cell-accumulation technique. *Adv. Mater.* **23**: 3506-3510.
  15. Matsusaki M, Fujimoto K, Shirakata Y, Hirakawa S, Hashimoto K, Akashi M (2015) Development of full-thickness human skin equivalents with blood and lymph-like capillary networks by cell coating technology. *J. Biomed. Mater. Res.* **103A**: 3386-3396.
  16. Akagi T, Nagura M, Hiura A, Kojima H, Akashi M (2017) Construction of three-dimensional dermo-epidermal skin equivalents using cell coating technology and their utilization as alternative skin for permeation studies and skin irritation tests. *Tissue Eng. Part A.* **23**: 481-490.
  17. Nishiyama K, Akagi T, Iwai S, Akashi M (2019) Construction of vascularized oral mucosa equivalents using a layer-by-layer cell coating technology. *Tissue Eng. Part C Methods.* **25**: 262-275.
  18. Amano Y, Nishiguchi A, Matsusaki M, Iseoka H, Miyagawa S, Sawa Y, Seo M, Yamaguchi T, Akashi M (2016) Development of vascularized iPSC derived 3D-cardiomyocyte tissues by filtration layer-by-layer technique and their application for pharmaceutical assays. *Acta Biomater.* **33**: 110-121.
  19. Kuno H, Akagi T, Fukui E, Yamato H, Akashi M, Shintani Y (2021) Three-dimensional idiopathic pulmonary fibrosis model using a layer-by-layer cell coating technique. *Tissue Eng. Part C Methods.* **27**: 378-390.
  20. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Jin Y, Terao Y, Fujinaga Y, Kawabata S (2011) Streptolysin S Contributes to Group A Streptococcal Translocation across an Epithelial Barrier. *J. Biol. Chem.* **286**: 2750-2761.
  21. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Yamaguchi M, Kawabata S (2016) Group A Streptococcus exploits human plasminogen for bacterial translocation across epithelial barrier via tricellular tight junctions. *Sci. Rep.* **6**: 20069.
  22. Hogan BLM, Barkauskas CE, Chapman HA, Epstein JA, Jain R, Hsia CCW, Niklason L, Calle E, Le A, Randell SH, Rock J, Snitow M, Krummel M, Stripp BR, Vu T, White ES, Whitsett JA, Morrissey EE (2014) Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell.* **15**: 123-138.
  23. Yurchenco PD (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect.* **3**: a004911.
  24. Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, Copeland NG, Sanes JR (1997) The laminin  $\alpha$  chains: expression, developmental transitions, and chromosomal

- locations of  $\alpha$ 1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel  $\alpha$ 3 isoform. *J. Cell Biol.* **137**: 685-701.
25. Pierce RA, Griffin GL, Miner JH (2000) Expression patterns of laminin  $\alpha$ <sub>1</sub> and  $\alpha$ <sub>5</sub> in human lung during development. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**: 742-747.
  26. Harris TJC, Tepass U (2010) Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Molecular Cell Biol.* **11**: 502-514.
  27. Nawijn MC, Hackett TL, Postma DS, Oosterhout AJM van, Heijink IH (2011) E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends Immunol.* **32**: 248-255.
  28. Otani T, Furuse M (2020) Tight junction structure and function revisited. *Trends Cell Biol.* **30**: 805-817.
  29. Ganesan S, Comstock AT, Sajjan US (2013) Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers.* **1**: e24997.
  30. Kreda SM, Okada SF, Heusden CA van, O'Neal W, Gabriel S, Abdullah L, Davis CW, Boucher RC, Lazarowski ER (2007) Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells. *J. Physiol.* **584**: 245-259.
  31. Yao T, Asayama Y (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.* **16**: 99-117.
  32. Caracena T, Blomberg R, Hewawasam RS, Fry ZE, Riches DWH, Magin CM (2022) Alveolar epithelial cells and microenvironmental stiffness synergistically drive fibroblast activation in three-dimensional hydrogel lung models. *Biomater. Sci.* **10**: 7133-7148.
  33. Furuyama A, Kimata K, Mochitate K (1997) Assembly of basement membrane *in vitro* by cooperation between alveolar epithelial cells and pulmonary fibroblasts. *Cell Struct. Funct.* **22**: 603-614.
  34. GBD 2019 diseases and injuries collaborators (2020) Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet.* **396**: 1135-1159.
  35. Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, Menéndez R, Chalmers JD, Wunderink RG, Poll T van der (2021) Pneumonia. *Nat. Rev.* **7**: 1-28.
  36. Mandell LA, Niederman MS (2019) Aspiration Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **380**: 651-663.
  37. GBD 2016 lower respiratory infections collaborators (2018) Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* **18**: 1191-1210.
  38. Weinheimer VK, Becher A, Tönnies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Szymanski K, Temmesfeld-Wollbrueck B, Gruber AD, Bannert N,

- Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T, Hocke AC (2012) Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *J. Infect. Dis.* **206**: 1685-1694.
39. Rajan A, Weaver AM, Aloisio GM, Jelinski J, Johnson HL, Venable SF, McBride T, Aideyan L, Piedra FA, Ye X, Melicoff-Portillo E, Yerramilli MRK, Zeng XL, Mancini MA, Stossi F, Maresso AW, Kotkar SA, Estes MK, Blutt S, Avadhanula V, Piedra PA (2022) The human nose organoid respiratory virus model: an *ex vivo* human challenge model to study respiratory syncytial virus (RSV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pathogenesis and evaluate therapeutics. *mBio.* **13**: e03511-21.
40. Karwelat D, Schmeck B, Ringel M, Benedikter BJ, Hübner K, Beinborn I, Maisner A, Schulte LN, Vollmeister E (2020) Influenza virus-mediated suppression of bronchial Chitinase-3-like 1 secretion promotes secondary pneumococcal infection. *FASEB J.* **34**:16432-16448.
41. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC (2018) *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**: 355-367.
42. Lucas R, Czikora I, Sridhar S, Zemskov E, Gorshkov B, Siddaramappa U, Oseghale A, Lawson J, Verin A, Rick FG, Block NL, Pillich H, Romero M, Leustik M, Schally AV, Chakraborty T (2013) Mini-review: Novel therapeutic strategies to blunt actions of pneumolysin in the lungs. *Toxins.* **5**: 1244-1260.
43. Anderton JM, Rajama G, Romero-Steinera S, Summer S, Kowalczyk AP, Carlonea GM, Sampson JS, Ades EW (2007) E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial. Pathogenesis* **42**: 225-236.
44. Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010) Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci. Signal.* **3**: cm1.
45. Al-Sadi RM, Ma TY (2007) IL-1 $\beta$  causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* **178**: 4641-4649.
46. Surabhi S, Jachmann LH, Shumba P, Burchhardt G, Hammerschmidt S, Siemens N (2022) Hydrogen peroxide is crucial for NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production and cell death in pneumococcal infections of bronchial epithelial cells. *J. Innate Immun.* **14**: 192-206.
47. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect.* **6**: a016295.
48. Kolář M, Szabo P, Dvořánková B, Lacina L, Gabius H-J, Strnad H, Šáchová J, Vlček Č, Plzák J, Chovanec M, Čada Z, Betka J, Fík Z, Pačes J, Kovářová H, Motlík J, Jarkovská K, Smetana Jr K (2012) Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells *in vitro*: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol. Cell.* **104**: 738-751.
49. Shintani Y, Fujiwara A, Kimura T, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Okumura M (2016)

- IL-6 secreted from cancer-associated fibroblasts mediates chemoresistance in NSCLC by increasing epithelial-mesenchymal transition signaling. *J. Thorac. Oncol.* **11**: 1482-1492.
50. Hutton AJ, Polak ME, Spalluto CM, Wallington JC, Pickard C, Staples KJ, Warner JA, Wilkinson TMA (2017) Human lung fibroblasts present bacterial antigens to autologous lung Th cells. *J. Immunol.* **198**: 110-118.