「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

中山　俊憲

千葉大学大学院医学研究院・教授

気道炎症の慢性化機構の解明と病態制御治療戦略の基盤構築

§1. 研究実施体制

(1)「中山」グループ

①研究代表者:中山　俊憲 （千葉大学大学院医学研究院、教授）

②研究項目

- 慢性気道炎症モデルにおける記憶 Th1/Th2/Th17 細胞の形成・機能転換の分子機構の解明
- 慢性気道炎症組織での記憶 Th 細胞微小環境の解析と浸潤炎症細胞のダイナミクス
- 気道炎症の慢性化に関わる機能分子を標的にした慢性炎症制御法の開発
- ヒト難治性慢性気道炎症疾患での解析

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3－1)に対応する)

2-1慢性気道炎症モデルにおける記憶Th1/Th2/Th17細胞の形成・機能転換の分子機構の解明

・記憶Th2細胞の機能転換のエピジェネティクス解析(中山・遠藤)

平成23年度までに、メモリーTh1/Th2/Th17マウス(Nakayama et al. ***Semin. Immunol*** 2009)の実験系を用いて、IL-5を大量産生し好酸球性炎症を強く誘導する特殊な記憶Th2細胞分画についてエピジェネティクス解析を行い、IL-5を大量産生するPathogenic記憶Th2細胞の同定に関する研究をまとめ、学会および論文発表(Endo et al. ***Immunity*** 2011)を行った。平成24年度は、この分画の解析を進めた結果、選択的に高発現する機能型レセプター分子を同定した。サイトカイン産生という観点で記憶Th2細胞の機能修飾や可塑性に関してエピジェネティクス解析を行った。今後は、この機能レセプター分子の下流のシグナル伝達や転写因子の発現制御機構を解明し、慢性炎症の病態維持のメカニズムを解明する研究を行う。また、記憶Th2細胞の機能転換にTGF-βが関与することが分かっていたが、平成24年度にTh2細胞分化を抑制し炎症を制御できるTGF-β下流ターゲット分子Sox4が明らかになった。論文発表やプレスリリースを行った。(Kuwahara et al. ***Nature Innunology*** 2012, **3-1-9**)。

・活性化NKT細胞による記憶Th1/Th2細胞機能転換(岩村・遠藤)

アレルギー性気道炎症の慢性化には種々のウイルスやカビなどの感染の関与が示唆されている。自然免疫系に属す NKT 細胞は、リンパ節などのリンパ組織よりも肺や肝臓などの組織に多く存在し、病原微生物由来の糖脂質に反応し活性化すると様々なサイトカインを産生することで末梢組織での免疫反応を修飾することが知られている。NKT 細胞が特異的リガンド(外来性のリガンド αGalCer やスフィンゴモナスの成分の GSL-1)で活性化された場合、特に記憶 Th2 細胞が強く増殖し好酸球性ではなく好中球性の慢性炎症を起こすことが分かった。これは、ヒトでの皮膚や上気道の慢性炎症（タイプ 1 とタイプ 2 の混合型炎症）でもみられる。この活性化 NKT 細胞誘導性の記憶 Th2 細胞の増殖と機能修飾に関わる分子機構を解明し、論文発表を行った(Iwamura et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, **3-1-11**)。今後は、NKT 細胞による記憶 Th2 細胞の機能転換に関する転写因子に関する研究を進め、慢性炎症の病態維持のメカニズムを解明する研究を行う。

・記憶 Th17 細胞のエピジェネティクス解析・気道炎症巣での炎症誘導の機能分子同定

(中山・小野寺)

Ring1B や Bmi1 などのポリコームグループ(PcG)分子は記憶 Th1/Th2 細胞の形成に必要でトライソラックスグループ(TrxG)の MLL/Menin 複合体は記憶 Th2 細胞の機能(サイトカイン産生)の維持を担う(Onodera et al. ***J. Exp. Med.*** 2010)。平成 24 年度は、Menin のコンディショナル欠損マウス(CD4-Cre)の T 細胞を用いて Th17 細胞を誘導し、さらに Th17 の機能の維持に関する実験を行った。この Th17 細胞依存性の炎症はステロイド抵抗性で好中球優位であることから、ヒトでの慢性難治性の炎症の形成や病態維持の一端を反映していると考えている。今後は、研究成果をまとめて論文発表したい。

2-2 慢性気道炎症組織での記憶 Th 細胞微小環境の解析と浸潤炎症細胞のダイナミクス

・慢性気道炎症組織での記憶 Th 細胞微小環境の解析(常世田・篠田)

記憶 Th 細胞が接着している細胞群(ストローマ細胞)を多重染色法と共焦点レーザー顕

微鏡を用いて同定を試みている。慢性気道炎症組織では記憶 Th 細胞が浸潤しその場に留まっており、「炎症ニッシェ」とでも言うべき、液性因子や接着分子等で統御された細胞集積構造が存在する可能性が高い。平成 24 年度は、骨髄記憶 Th 細胞ニッシェで機能している分子群(CD69, CD49b, ICAM1, VCAM1, IL-7, IL-33 等)に焦点をあてて組織学的解析をおこなった。また、iBALT と言われている誘導性の肺内リンパ組織様の構造も同定でき、iBALT 形成の観点から必要な機能分子の同定を試みている。

・記憶 Th 細胞の気道炎症巣ストローマ細胞の同定と網羅的遺伝子発現解析（常世田・篠田）

慢性気道炎症巣で記憶 Th 細胞が接着しているストローマ細胞が同定できれば、網羅的解析を行い、炎症の遷延化や回復過程に関与する機能分子群を同定することができる。平成 24 年度に分離に使用できるマーカーが見つかり、実際に分離方法などを検討している。今後は、このストローマ細胞分画を用いて実際に網羅的解析を行う。

・CD69 リガンドの同定と機能解析（常世田）

リコンビナントCD69によるプルダウン法とプロテオミクス解析でCD69リガンドの解析を進めている。いくつかの新規候補分子について、リガンドであるかどうかなどの解析を進めている。

2-3気道炎症の慢性化に関わる機能分子を標的にした慢性炎症制御法の開発

・新規候補分子の疾患モデルマウスを用いた解析（中山）

CD69 のリガンドの新規候補分子に対する抗体を作成した。これらの抗体をマウス気道炎症モデルを用いて阻害活性があるかどうか検討している。

2-4 ヒト難治性慢性気道炎症疾患での解析

・慢性鼻炎患者炎症組織での解析・検証（岡本・中山）

慢性型のアレルギー性鼻炎や好酸球浸潤型鼻・副鼻腔炎の炎症巣の機能分子の多重染色組織解析等を行うために、組織サンプルや末梢血サンプルを集めている。CD69、CD49b分子、IL-33レセプターなどの組織学的解析を進める。今後は、患者から引き続きサンプル収集を行うと共に、さらなる組織学的解析を行う。

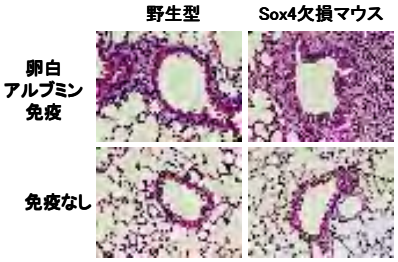

図1　Sox4欠損マウスでは、気道炎症が増悪
Th2依存性の炎症を抑制するTGFβの下流ターゲット分子であるSox4が欠損すると、抑制がかからなくなり細気管支周囲への炎症細胞浸潤が顕著に増加

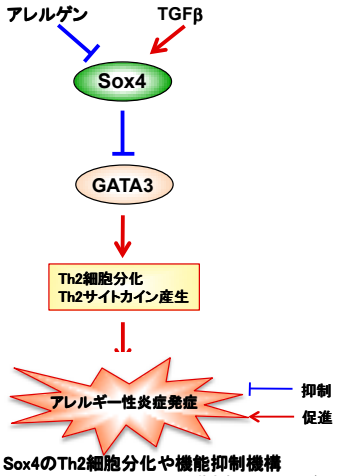

図2　Sox4のTh2細胞分化や機能抑制機構
Sox4の発現はTGFβによって誘導され、アレルゲン（抗原）刺激によって低下する。Sox4は、Th2細胞分化のマスター転写因子GATA3の機能を阻害することで、アレルギーの発症を抑えることが分かった。

§3. 成果発表等

（3－1） 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Kuwahara, M., Yamashita, M., Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., Motohashi, S., Hosokawa, H., Tumes, D., Iwamura, C., Lefebvre, V., and Nakayama, T.: The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF-β and suppresses T_H2 differentiation. ***Nat. Immunol.*** 13(8):778-786 (2012). (DOI: 10.1038/ni.2362)
2. Nagato, K., Motohashi, S., Ishibashi, F., Okita, K., Yamasaki, K., Moriya, Y., Hoshino, H., Yoshida, S., Hanaoka, H., Fuji, S., Taniguchi, M., Yoshino, I., and Nakayama, T.: Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after β-Galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. ***J. Clin. Immunol.*** 32(5):1071-1081 (2012). (DOI: 10.1007/s10875-012-9697-9)
3. Iwamura, C., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Tumes, J. D., Motohashi, S., Kawahara, K., Kinjo, Y., and Nakayama, T.: Regulation of memory CD4 T-cell pool size and function by natural killer T cells in vivo. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 109(42):16992-16997 (2012). (DOI: 10.1073/pnas.1203494109)
4. Mucida, D., Husain, M. M., Muroi, S., van Wijk, F., Shinnakasu, R., Naoe, Y., Reis, S. B., Huang, Y., Lambolez, F., Docherty, M., Attinger, A., Shui, J.-W., Kim, G., Lena, J. C., Sakaguchi, S., Miyamoto, C., Wang, P., Atarashi, K., Park, Y., Nakayama, T. Honda, K., Ellmeier, W., Kronenberg, M., Taniuchi, I., and Cheroutre, H.: Transcriptional reprogramming of mature $CD4^+$ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocyets. ***Nat. Immunol.*** 14(3):281-289 (2013). (DOI: 10.1038/ni.2523)
5. Hosokawa, H., Tanaka, T., Suzuki, Y., Iwamura, C., Ohkubo, S., Endoh, K., Kato, M., Endo, Y., Onodera, A., Tumes, J. D., Kanai, A., Sugano, S., and Nakayama, T.: Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish Th2 cell identity. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 110(12):4691-4696(2013). (DOI: 10.1073/pnas.1220865110)

（3－2） 知財出願

① 平成 24 年度特許出願件数（国内 1 件）

② CREST 研究期間累積件数（国内 1 件）