

「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22年度採択研究代表者

H23 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科、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

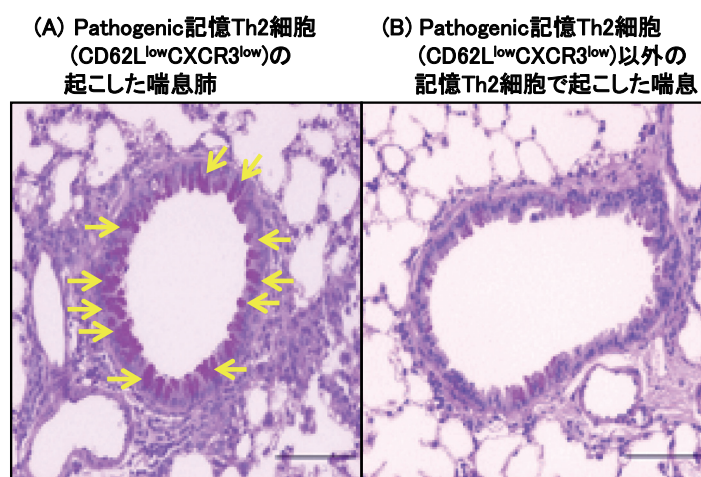
§2. 研究実施内容

(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)

メモリーTh1/Th2/Th17マウス(Nakayama et al. Semin. Immunol2009)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った。この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(Endo et al. Immunity2011)3-1-4番号で発表した。図(写真)は、Pathogenic記憶Th2細胞の起こした喘息マウスでの粘液過剰産生をPAS染色で検出した実験結果である。Pathogenic記憶Th2細胞を除いた記憶Th2細胞では喘息を起こすことが出来ず、PAS染色陽性に染まる気道上皮細胞がほとんど無いことが分かる。今後、この分画の特異的マーカーを同定し、さらにこの分画の慢性気道炎症における役割を詳細に解析したい。



PAS染色で気道上皮細胞からの粘液過剰産生を検出した実験(B)は、今回同定したPathogenic記憶Th2細胞が存在しない実験群で、粘液(たん)の過剰産生細胞(矢印)がほとんどいない。この記憶Th2細胞のPathogenicityが良くわかる。

- ・ 活性化NKT細胞による記憶Th1/Th2細胞機能転換(岩村)
活性化NKT細胞誘導性の記憶Th2細胞の機能修飾に関わる分子機構の解析を行った。今後、比較的早い段階で研究成果を論文として発表したい。
- ・ 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)
ポリコームやトライソラックスのコンディショナル欠損マウス(CD4-Cre)の T 細胞を用いてメモリー Th17 マウスを作製し、形成される記憶 Th 細胞の数(生存)と機能の二つの観点で解析を行うための実験系を作製した。今後、この実験系を用いて、分子機構について解析したい

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)
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解析を行った。多重染色に使用できる抗体などの同定を行った。今後、これらの抗体を用いて組織学的解析を行いたい。
- ・ 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)
この解析にどの細胞が使用出来るか？分離方法などを検討し、DNA マイクロアレイ解析を始めた。今後、これらの解析結果を用いて機能分子の同定を行う。
- ・ 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リガンドを探索した。1つの候補分子について解析を始めた。今後、この分子を中心に解析を進める。

3-3 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

- ・ 既知候補分子の疾患モデルマウスを用いた治療効果、作用メカニズム解析(中山)
機能分子を同定するために、既知候補分子(CD69, CD49b 等)の新規抗体作製と阻害実験を開始した。
- ・ 新規候補分子の疾患モデルマウスを用いた解析(中山)
CD69ノックアウトマウスについて気道炎症モデルで解析を進めている。

3-4 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。
今後は、まずCD69, CD49b分子の組織学的解析を進める。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Takahashi, K., Hirose, K., Kawashima, S., Niwa, Y., Wakashin, H., Iwata, A., Tokoyoda, K., Renauld, J.C., Iwamoto, I., Nakayama, T. and Nakajima, H.: IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *J.Allergy Clin. Immunol.* 128:1067-1076 (2011) (DOI:10.1016/j.jaci.2011.06.018).
2. Tsuyusaki, J., Kuroda, F., Kasuya, Y., Ishizaki, I., Yamauchi, K., Sugimoto, H., Kono, T., Iwamura, C., Nakayama, T. and Tatsumi, K.: Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is attenuated in CD69-deficient mice. *J. Recept. Sig. Transduct. Res.* 31:434-439 (2011) (DOI:10.3109/10799893.2011.631929).
3. Endo, Y., Iwamura, C., Kuwahara, M., Suzuki, A., Sugaya, K., Tumes, J. D., Tokoyoda, K., Hosokawa, H., Yamashita, M. and Nakayama, T.: Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3. *Immunity* 35:733-745 (2011)(DOI:10.1016/j.immuni.2011.08.017).
4. Satoh, M., Andoh, Y., Clingan, S. C., Ogura, H., Fujii, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Hirata, N., Ishimori, N., Tsutsui, H., Onoe, K. and Iwabuchi, K.: Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS ONE*7(2):e30568(2012).(DOI:10.1371/journal.pone.0030568)
5. Inamine, A., Sakurai, D., Horiguchi, S., Yonekura, S., Hanazawa, T., Hosokawa, H., Matuura-Suzuki, A., Nakayama, T. and Okamoto, Y.: Sublingual administration of *Lactobacillus paracasei* KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on dendritic cells. *Clin. Immunol.* 143:170-179 (2012).(DOI:10.1016/j.clim.2012.01.008)
6. Ishizaki S, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Yamauchi K, Mastsunaga H, Iwamura C, Nakayama T, Tatsumi K:Role of CD69 in acute lung injury.*Life Sciences*. In press(DOI:10.1016/j.lfs.2012.03.018)
7. Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Zehentmeier, S., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, J. D., Radbruch, A. and Nakayama, T.: Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*In press(DOI:10.1073/pnas.1118539109)
8. Tofukuji, S., Kuwahara, M., Suzuki, J., Ohara, O., Nakayama, T. and Yamashita, M. :Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGFβ. *J. Immunol.*In press(DOI:10.4049/jimmunol.1103799)