

「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域 領域活動・評価報告書

ー平成26年度中間評価実施研究課題ー

研究総括 高津 聖志

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生体防御反応であるにもかかわらず、炎症が慢性化することによって生体に悪影響を引き起こす現象の実体解明に向けた研究、すなわち、炎症の慢性化とその維持機構、および炎症の慢性化が疾患を惹起・進行・重症化する機構の時空間的な解明に挑戦する研究を対象とします。このような研究を推進することにより、炎症の慢性化が関与するさまざまな疾患や臓器不全の予防や治療、創薬につながる新たな医療基盤の創出を目指します。

具体的には、下記の視点をもった研究を推進します。

- 1) 分子や細胞の階層から迫る研究に加え、組織や臓器の階層から迫る視点
- 2) 細胞や組織、臓器間の相互作用、個体全体でのダイナミクスなど、慢性炎症を複雑系として捉える視点
- 3) エピジェネティクスや機能性非コード RNA など、他生命科学分野からの視点
- 4) 遺伝子産物、生理活性物質、細胞やそれらの動態を検出・測定する技術的な分野からの視点
- 5) 慢性炎症の制御による関連疾患を標的とした創薬などの医療応用を見据えた視点

2. 中間評価対象の研究課題・研究者名

件数： 4件(うち、大挑戦型1件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 研究実施期間

平成23年 10 月～平成27年 3 月(※平成29年 3 月終了予定)

4. 中間評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(中間評価の流れ)

平成26年12月	評価会開催
平成27年 1月	研究総括による中間評価
平成27年 2月	被評価者への結果通知

5. 中間評価項目

- (1) 研究課題等の目的達成に向けた研究の進捗状況及び今後の見込み
- (2) 研究課題等の目的達成に向けた研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 大挑戦型については、さらに、大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展についても評価項目とした。

6. 評価結果

当研究領域では、炎症の慢性化が関与するがん、生活習慣病、自己免疫疾患、アレルギーなど、さまざまな疾患を対象にし、最新のバイオサイエンスの技術を総動員し、さらには新たな技術開発を行いながら、それらの予防や治療、創薬につながる新規医療基盤の創出を目指している。今回中間評価の対象となった4課題のうち3題は、脳・神経疾患、大腸炎、癌といった具体的な疾患における慢性的な炎症性反応の機序の解明や臨床応用のための基盤創出を企図して研究が進められてきた。その結果これまでに、1) 脳組織における炎症反応を誘導する内因性因子 Peroxiredoxin の同定、2) 炎症性大腸炎の抑制機構の解明とそれに関与するIL-33とマスト細胞の重要性の確認、3) がんの転移前に転移予想局所で見られる炎症性反応に基づく血管透過性亢進の分子機構の解明、ヒト組織における同様の転移予想が考えられる部位の発見など、今後の臨床応用につながる可能性がある成果が得られている。また、新たな生体イメージング法の確立に向けた技術開発に向けて新しい試みが進展すると共に、特定部位にホーミングする制御性 T 細胞を欠損させることにより自己免疫疾患の新たな病態モデルを創出できる可能性が示されている。何れの課題も、領域における研究者間やアドバイザーとの交流を深め、さらなる発展的な展開を希望する。

1. 岡田 峰陽 研究者「免疫・炎症研究におけるオプトジェネティクスの創生」

リンパ濾胞にホーミングする制御性T細胞(Treg)を選択的に消失する遺伝子改変マウスを独自に作出した。そのマウスは、生後6週齢以降に活性化T細胞による脾腫と骨髄炎を発症、自己抗体産生を伴う血球細胞の減少と致死性の疾患が見られること、それが赤血球前駆細胞の激減によることを見出した。発症したマウスの解析から、その病態形成に、増加したある種のエフェクターT細胞が関与することを突き止めている。また、免疫・炎症研究に利用可能な光活性化型 Cre 系の構築については、様々な検討・工夫を試み、培養細胞系において従来の報告よりも1.5倍程度高い効率で光依存的遺伝子組換えを示す条件を見出している。さらに、生体内においても特に増殖中の細胞で効率的に光による遺伝子組換えが誘導できるところまで確認した。以上は、何れもチャレンジングな研究課題であるが、今後、自己免疫疾患の新たな病態モデルの確立や極めて有用な生体イメージング法の確立に向けて基盤が出来つつあると思われ大いに期待したい。

2. 七田 崇 研究者「脳組織傷害後の慢性炎症における免疫制御機構の解明」

脳梗塞モデルである脳虚血誘導時における脳組織壊死巣拡大に関与するDAMPsとして、脳虚血誘導24時間をピークに強発現する Peroxiredoxin(Prx)を同定した。Prx は、細胞死に伴って細胞外に放出され周囲に浸潤したマクロファージをTLR2/TLR4を介して活性化し、IL-23やIL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させて、脳内炎症を引き起こすことを初めて示した。また、Prx ファミリー分子に共通の α 3-helix構造がDAMPsとして作用するのに重要であることを突き止めた。さらに、抗Prx中和抗体の投与による壊死巣拡大の抑制が脳梗塞発症後12時間まで有効であることを示し、Prxが脳梗塞における新たな治療標的となりえることを発表した。今後、Prxの作用制御など、神経疾患における炎症の収束を早めることにより慢性化を阻止し、組織修復を促進するような新規治療法の開発へとつながる研究への進展が大いに期待できる。

3. 中江 進 研究者「炎症誘導因子による炎症抑制機構の解明と慢性炎症制御技術基盤の確立」

マウス炎症性大腸炎を悪化させる因子と考えられていたIL-33の役割について、IL-33欠損マウスにヒト大腸炎と近似する複数のT細胞依存性の大腸炎を誘導した。IL-33欠損マウスは野生型マウスに比し自己免疫様大腸炎を早く発症し、重症化することを見出している。IL-33がT細胞依存性の自己免疫様大腸炎の発症や病態を抑制すると解釈できる。研究者はその機構を細胞レベルで解析し、腸内細菌により活性化された常在マクロファージがIL-33とケモカインを産生し、その結果として遊走してくるマスト細胞が大腸炎の発症を抑制する可能性を示唆する結果を得ている。今後、各種の遺伝子改変マウスやそれらの交配マウスを利用して、IL-33とマスト細胞による大腸炎抑制機構の詳細を分子細胞学レベルで明らかにすることにより、この新規知見の慢性炎症抑制機構の解明に向けた更なる展開が期待できる。

4. 平塚(中村) 佐千枝 研究者「癌の転移前診断の確立と治療をめざして」(大挑戦型)

転移性の癌を移植したマウスにおいて、転移の前に転移予定臓器において血管透過性の亢進が見られることを見出し、転移予定局所における環境の変化と炎症反応を解析した。その結果、移植した癌組織より分泌されたCCL2が、将来転移予定部位である肺血管組織において高発現するCCR2を刺激してS100A8やSAA3発現させ、それらがTLR4/MD-2複合体に作用して血管透過性を亢進させ、転移を促進することを突き止めた。担癌マウスモデルにおいては血管透過性亢進が起きCCR2が高発現している部位ではフィブリノーゲンの発現がみられるが、ヒト癌患者の肺組織においても、フィブリノーゲンの発現と一致してCCR2とS100A8が発現亢進している部位を見出し発表した。本研究は大挑戦型課題であり、癌転移の予防のための転移前診断を目標としているが、今後、ヒト組織を用いたより詳細な分子疫学的な検討が予定されており、転移前診断のマーカーの同定なども含め、研究の更なる進展が期待できる。

7. 評価者

研究総括 高津 聖志 富山県薬事研究所 所長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成27年1月末現在)

烏山 一	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授
佐田 政隆	徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授
反町 典子	(独)国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト長
戸邊 一之	富山大学 医学部 第一内科 教授
長田 重一	京都大学 大学院医学研究科 教授

福井 宣規	九州大学 生体防御医学研究所 教授
古市 泰宏	(株)ジーンケア研究所 取締役会長
三浦 正幸	東京大学 大学院薬学系研究科 教授
宮坂 信之	東京医科歯科大学 名誉教授
宮園 浩平	東京大学 大学院医学系研究科 教授
山村 隆	(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 部長

(参考)

件数はいずれも、平成26年9月末現在。

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	9	35	44
口 頭	23	26	49
出版物	0	1	1
合 計	32	62	94

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
0	0	0

(3)受賞等

・七田 崇

第7回日本免疫学会研究奨励賞(平成24年)

日本インターフェロン・サイトカイン学会第10回奨励賞(平成25年)

平成25年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞(平成25年)

日本脳卒中学会 草野賞(平成25)

循環器学研究振興基金賞 内田賞(平成26年)

・中江 進

第21回 アボットジャパン・アレルギー学術奨励賞(公益財団法人日本アレルギー協会)(平成23年)

Highly Cited Researchers(トムソン・ロイター)(平成26年)

(4)招待講演

国際 20件

国内 10件

別紙

「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域 中間評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研 究 課 題 名 (研究実施場所)	現 職(平成27年1月末現在) (応募時所属)	研究費(3年間) (百万円)
岡田 峰陽 (兼任)	免疫・炎症研究におけるオプトジェネティクスの創生 ((独)理化学研究所 統合生命医科学研究センター)	(独)理化学研究所 統合生命医科学研究センター チームリーダー ((独)理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター ユニットリーダー)	65
七田 崇 (兼任)	脳組織傷害後の慢性炎症における免疫制御機構の解明 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学 医学部 助教 (同上)	50
中江 進 (兼任)	炎症誘導因子による炎症抑制機構の解明と慢性炎症制御技術基盤の確立 (東京大学医科学研究所)	東京大学医科学研究所 システム疾患モデル研究センター 准教授 (同上)	71
平塚(中村) 佐千枝 (兼任)	癌の転移前診断の確立と治療をめざして (東京女子医科大学医学部)	東京女子医科大学医学部 准教授 (同上)	65

研究報告書

「免疫・炎症研究におけるオプトジェネティクスの創生」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 岡田 峰陽

1. 研究のねらい

免疫応答の異常は多種多様な炎症性疾患の原因となる。例えば、自己の身体の組織や細胞を構成する分子(自己抗原)や、生活環境に存在する無害な物質(環境抗原)を標的とする抗体が異常に産生されると、自己免疫性疾患や、アレルギー性疾患の発症につながる事が知られている。しかしこのような免疫疾患の発症が、どこで開始し、どのように進行するかについては、詳細が分かっていない場合が多い。これを理解するためには、疾患の原因となる免疫細胞の臓器間移動を追跡することが重要となるが、この追跡を可能にする手段がないのが現状である。

一方、制御性 T 細胞と呼ばれる T 細胞の亜集団には、自己抗原や環境抗原に対する免疫応答を抑制する重要な働きがある。遺伝子変異によって、制御性 T 細胞に必須の転写因子である FoxP3 の機能が損なわれると、皮膚、脾臓、肝臓、肺、腸などの様々な臓器に重篤な炎症が起こり、死に至ることが知られている。制御性 T 細胞は FoxP3 に加えて様々な別の転写因子を発現し、これらの転写因子の種類によって、抑制する炎症の種類や場所が異なると言われている。しかしその実態やメカニズムについては、まだ不明な部分が多い。

近年、抗体産生応答に深く関わる事が知られている転写因子が、制御性 T 細胞の一部にも発現していることが明らかとなってきた。本研究では、この転写因子を発現する制御性 T 細胞の自己免疫疾患の発症抑制における役割を明らかにしたい。また増殖する免疫細胞を、光を用いて特定の場所で永続標識する方法を構築し、自己応答性の免疫細胞の臓器間移動を追跡することで自己免疫疾患の開始点と進行機序を理解することを狙う。

2. 研究成果

(1) 概要

抗体産生応答に深く関わる事が知られている転写因子を、制御性 T 細胞において選択的に欠損させたマウスを作成して解析した。その結果、このマウスは生後9週前後から致死性の疾患を発症することが明らかとなった。解析を進めていくと、少なくとも一部のマウスにおいては、ある血球細胞に結合する自己抗体が産生されていることが分かった。また驚いたことに、活性化した T 細胞が脾臓および骨髄で異常に増殖し、骨髄で血球前駆細胞を破壊している可能性が示唆された。この活性化 T 細胞の増殖は脾臓でまず起こり、それに続いて骨髄で起こっているようであった。これらの結果から、脾臓においては血球細胞由来の自己抗原に対する免疫応答が、上記の転写因子を発現した制御性 T 細胞によって抑制されており、この抑制機構に異常をきたすと血球細胞抗原に対して応答性を持つ T 細胞や B 細胞が活性化され、自己抗体産生や骨髄炎が引き起こされると考えられた。この仮説を検証するためにさらに研究を進めているが、脾臓で活性化し増殖した T 細胞が、骨髄へ移動して炎症を引き起こ

すという仮説を直接的に検証するために、光によって細胞に改変を加える方法(オプトジェネティクス)を実験系に導入することを試みている。植物由来の光反応性タンパク質と融合させた Cre recombinase 断片をリンパ球に発現させ、生きたマウスに光照射を行うことによって、特定のリンパ節において増殖している B 細胞の永続標識が可能となった。

(2) 詳細

・ 新規の自己免疫性炎症疾患モデルの確立

制御性 T 細胞のホールマーク転写因子 FoxP3 の遺伝子座に Cre 遺伝子を挿入したマウスと、抗体産生応答において重要なことが知られている転写因子の遺伝子に loxP を導入したマウスを交配することにより、制御性 T 細胞で選択的にこの転写因子を欠損するマウスを作成した。このマウスの脾臓等の細胞を解析したところ、制御性 T 細胞の総数はほとんど野生型と変わりなかったが、B 細胞濾胞にホーミングするタイプの制御性 T 細胞が、期待通り消失していた。このマウスは、生後6週齢以降に致死性の疾患を発症する事が分かった。各臓器の病理切片解析を行ったところ、殆どの組織においては異常が観られなかったが、脾腫と骨髓炎が顕著に起こっていることが分かった。またある血球細胞のみが激減しており、これが死因であることが示唆された。この血球細胞に対する自己抗体の産生が検出されたマウスも見出され、病態形成メカニズムの一部は自己抗体産生による血球細胞の傷害であることが示唆された。しかしながら半数以上のマウスは、自己抗体が検出されないにも関わらず死んでしまうことが分かり、それ以外のメカニズムも病態形成に関わっていることが示唆された。これについて調べるために、免疫グロブリン μ 重鎖遺伝子欠損マウスと交配することにより、このコンディショナル遺伝子欠損マウスから殆どの B 細胞を欠損させたところ、発症の若干の遅れと生存期間の延長が見られたが、最終的には同様の病態を形成してしまうことが明らかとなった。つまり、やはり B 細胞や抗体に依存しない病態形成メカニズムがあることが強く示唆された。そこで次に、損傷される血球細胞の形成の場である骨髓において、様々な分化段階の前駆細胞をコロニー形成アッセイ等により解析し、どの分化段階において損傷を受けているか特定することが出来た。骨髓と脾臓の炎症細胞を詳細に解析したところ、発症したマウスではある種のエフェクター T 細胞が特に増加していることが明らかとなった。さらに発症する前のマウスの脾臓でもこのエフェクター T 細胞の増加は見られたが、骨髓では顕著ではなかった。このエフェクター T 細胞に対する中和抗体を生後3~4週齢のマウスに投与し続けると、発症がほぼ完全に抑制されることが分かり、このエフェクター T 細胞が病態形成において重要な役割を果たしている事が示唆された。これらの結果から、脾臓において血球細胞に対する自己免疫応答が開始され、ある種の血球細胞の抗原に特異的な自己抗体の産生やエフェクター T 細胞の活性化が起こり、この血球細胞やその前駆細胞を傷害するという病態形成メカニズムが示唆された。

・ 光を用いた組織選択的な遺伝子組換え法の確立

光活性化型 Cre(シロイヌナズナの光感受性タンパク質 CRY2 と、その光依存的結合相手のタンパク質 CIB の断片を、分割した Cre 断片に融合させたタンパク質)について、これまで報告されたものに、スパーサーや核移行シグナル配列の挿入など

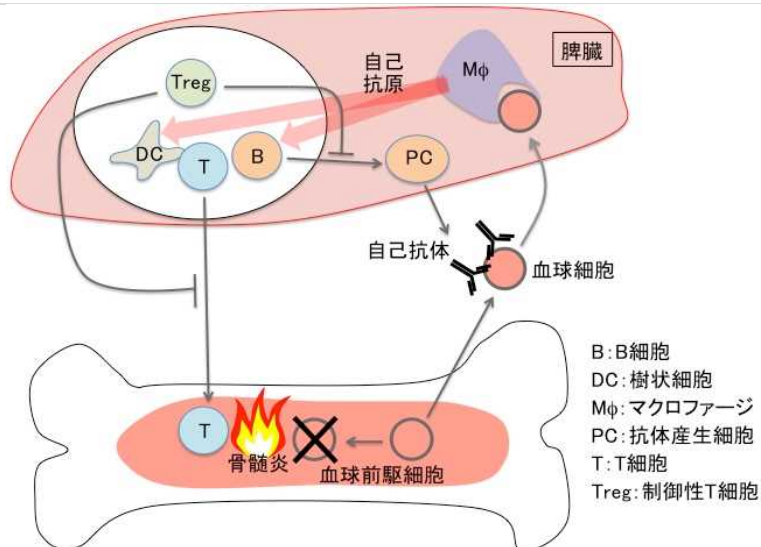


図1. 脾臓の制御性T細胞による自己免疫性炎症の制御

様々な改変を試み、培養細胞における発現系で試験した。その結果、SV40 由来の核移行シグナル配列を N 末に核移行配列を挿入したものが、これまで報告されていたものに比べて、1.5 倍程度高い効率で光依存的遺伝子組換えを示した。この光活性化型 Cre の遺伝子を、Rosa-flox-stop-tdTomato マウスの骨髄細胞にレトロウイルスによって導入し、γ線照射したコンジェニックマウスに移植することで骨髄キメラを作成した。得られた骨髄キメラマウスに皮下免疫をして、10 日後に皮下リンパ節を露出させて光照射を行い、縫合して2日後にイメージングおよびフローサイトメトリーを行ったところ、胚中心 B 細胞において約5%の細胞が光刺激依存的に tdTomato を発現していた。一方、胚中心 B 細胞に比べると、ナイーブリンパ球での光刺激依存的な tdTomato 発現率は低かった。このことから光活性化型 Cre を強く発現させれば、増殖中の細胞においては、遺伝子組換えが in vivo においても光によって誘導できることが分かった。

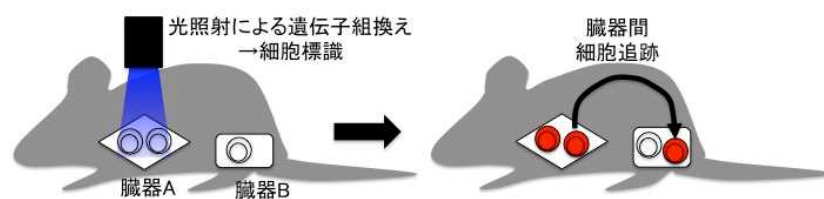


図2. 光による遺伝子組換え誘導を用いた細胞追跡

3. 今後の展開

これまでの研究で確立してきた自己免疫疾患マウスの免疫細胞に、光活性化型 Cre 遺伝子を導入し、脾臓への光照射および、脾臓から骨髄への細胞移動の解析を行う。これまでのように骨髄キメラを作成して光照射を行うだけでなく、光活性化型 Cre を発現する遺伝子改変マウスを作成と実験系への導入も引き続き進めて行く。

血球前駆細胞をエフェクターT 細胞が損傷するメカニズムを調べる。そのためにこれらの細胞の共培養する in vitro の実験系の構築や、骨髄の in vivo イメージングを行っていく。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

一部の制御性 T 細胞は抗体産生応答に重要な転写因子を発現しているが、これらの制御性 T 細胞は自己抗体産生を抑制しているだけでなく、抗体非依存的な病態形成も抑制していることを明らかにすることができた。この病態は、ヒトで知られている稀少疾患に非常に類似しており、この疾患の良いモデルマウスがこれまで存在しないことから、非常に重要な成果であると考えている。しかし、この病態形成メカニズムは、予想外な種類のエフェクター T 細胞の関与などもあり、非常に複雑であることが明らかになるにつれ、その解析に当初の想定よりも多くの時間が必要となった。また、光誘導遺伝子組換の効率を向上させるための in vitro の試験に時間を費やしすぎた事が反省点である。難航している光活性化型 Cre を高発現する遺伝子改変マウスの作成や、疾患モデルマウスへの応用を急ぎたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

リンパ濾胞にホーミングする制御性 T 細胞(Treg)を選択的に消失する遺伝子改変マウスを独自に作出した。そのマウスは、生後6週齢以降に活性化T細胞による脾腫と骨髄炎を発症、自己抗体産生を伴う血球細胞の減少と致死性の疾患が見られること、それが赤血球前駆細胞の激減によることを見出した。発症したマウスの解析から、その病態形成に、増加したある種のエフェクター T 細胞が関与することを突き止めている。また、免疫・炎症研究に利用可能な光活性化型 Cre 系の構築については、様々な検討・工夫を試み、培養細胞系において従来の報告よりも 1.5 倍程度高い効率で光依存的遺伝子組換えを示す条件を見出している。さらに、生体内においても特に増殖中の細胞で効率的に光による遺伝子組換えが誘導できるところまで確認した。以上は、何れもチャレンジングな研究課題であるが、今後、自己免疫疾患の新たな病態モデルの確立や極めて有用な生体イメージング法の確立に向けて基盤が出来つつあると思われ大いに期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng LG, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, and Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol.* 15: 1064–9, 2014.
2. Ise W, Inoue T, McLachlan JB, Kometani K, Kubo M, Okada T, and Kurosaki T. Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11792–7, 2014.
3. Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K,

Okada T, Hattori M, and Fagarasan S. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41: 152–65, 2014.

4. Moriyama S, Takahashi N, Green JA, Hori S, Kubo M, Cyster JG, and Okada T. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *J Exp Med* 211: 1297–305, 2014.

5. Okada T, Moriyama S, and Kitano M. Differentiation of germinal center B cells and follicular helper T cells as viewed by tracking Bcl6 expression dynamics. *Immunol Rev* 247: 120–32, 2012.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

日本免疫学会総会・学術集会、日本分子生物学会年会、日本アレルギー学会学術大会、International Congress of Histochemistry and Cytochemistry、Annual Mouse Molecular Genetics Conference、Gordon Research Conference: T follicular helper cells、RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology、Naito Conference: Bioimaging—a paradigm shift for the life sciences 等、11件。

著作物

1. Kitano M, Okada T. Four-dimensional tracking of lymphocyte migration and interactions in lymph nodes by two-photon microscopy. *Methods Enzymol* 506:437–54, 2012.
2. 岡田峰陽、免疫学 Update:分子病態の解明と治療への展開(編集:審良静男、熊ノ郷敦、竹田潔):第 19 章 ライブイメージングによる免疫動態の解明、南山堂
3. 岡田峰陽、標準免疫学 第 3 版(監修:谷口克、編集:宮坂昌之、小安重夫):第 8 章 外来性抗原に対する反応:D 免疫細胞の動態免疫細胞の動態、医学書院

プレスリリース

抗体を産生する免疫応答に重要な T 細胞の動きを制御する仕組みを解明

—脂質メディエーターの受容体(S1PR2)による T 細胞の局在(2014 年 6 月 9 日)

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140609_1/

日経バイオテク

研究報告書

「脳組織傷害後の慢性炎症における免疫制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成29年3月

研究者: 七田 崇

1. 研究のねらい

アルツハイマー病、多発性硬化症、脳卒中などの神経疾患において炎症の慢性化が病態と密接に関係する。炎症に伴って脳内に浸潤した免疫細胞（マクロファージやT細胞）は、何らかの脳内因子によって修飾を受けて炎症に寄与すると考えられる。本研究では、免疫細胞を活性化させて炎症促進に働く脳内因子として、Peroxisome oxidoreductin (Prx) を新たに同定した。Prxのマクロファージ活性化機構を解明し、さらにPrxを中和除去することで慢性炎症の悪循環を断ち切る治療法を開発する。一方で炎症の慢性期には、免疫細胞の一部はむしろ組織修復に働くと考えられているが、その分化メカニズムや機能は明らかになっていない。本研究ではこのような修復性の免疫細胞と脳内因子に着目して詳細な免疫学的・分子生物学的解析を行うと共に、組織修復に働く機能を解明する。本研究では脳内の免疫細胞が、脳内因子によって制御されることによって炎症を促進し、そして収束に至るという仮説を検証し、炎症が関与する神経疾患の新たな治療法を見出す。

2. 研究成果

(1) 概要

様々な神経疾患の病態に炎症が関与することが明らかとなっている。脳は無菌的な臓器であり、体内の免疫系を活性化する外敵（細菌やウイルスなど）が存在しない。したがって脳組織に存在する内因性分子が炎症を惹起する可能性がある。最近、これらの分子群は Danger-associated molecular patterns (DAMPs) として注目されている。

まず、脳組織に存在する DAMPs のスクリーニングを行った。脳抽出液を樹状細胞に添加すると炎症性サイトカインが産生されることから、抽出液中に DAMPs が含まれるものと考えられた。脳抽出液から活性のある画分を抽出し、質量分析によって得られた候補タンパクの中から Peroxisome oxidoreductin (Prx) を DAMPs として見出した。Prx family タンパクには Prx1～6 が含まれ、脳組織には Prx1、2、5、6 が多く含まれることが判明した。

Prx に対する抗体を作製して脳虚血モデルに投与し、得られる脳保護効果について検討を行った。Prx は脳虚血誘導 24 時間後に、虚血壊死に陥った脳組織中に多く含まれていた。Prx は脳内に浸潤したマクロファージを TLR2、TLR4 依存的に活性化し IL-23 や IL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させていた。このうち IL-1 β は直接的に神経細胞を傷害するが、IL-23 は IL-17 産生性 T 細胞を脳内に誘導することにより炎症を慢性化させる。Prx 抗体は脳梗塞体積を有意に縮小、神経症状を改善した。Prx タンパクの構造から、Prx family に共通の α 3-helix 構造が DAMPs としての機能に重要であることが判明した。

以上のように Prx を治療標的として、神経疾患における炎症を制御できる可能性が示唆さ

れた。Prx が脳組織に存在し続けると炎症を慢性化させる可能性があるが、Prx は脳虚血誘導 4 日後には脳組織から概ね排除されている。この時点が脳組織の炎症が鎮静化に向かう転換期であり、やはり何らかの脳内因子が作用している可能性が高い。現在、炎症を鎮静化させる脳内因子の検索から、神経組織における炎症の慢性化を制御するメカニズムの解明を試みている。

(2) 詳細

脳卒中、Alzheimer 病、Parkinson 病、多発性硬化症などの神経疾患は高齢化社会に伴って増加傾向にある。これらの神経疾患は人間の高次脳機能、運動・感覚に支障をきたして慢性的に症状が持続することから、社会生活に深刻な影響を及ぼしている。最近、種々の神経疾患において炎症が病態と密接に関連することが明らかとなっている。しかし脳は無菌的な臓器であって細菌やウイルスなどの外敵が存在しないため、脳内で起こる炎症を制御するのは脳そのもの（自己由来の脳内因子）ということになる。本研究では脳内因子と免疫細胞の視点から、神経炎症の制御メカニズムを解明する。

自己組織由来の炎症惹起因子は DAMPs として最近注目されている。脳組織のホモジネート（脳抽出液）を作製して培養樹状細胞に添加することにより産生される炎症性サイトカインの解析から、脳組織中の DAMPs として Peroxiredoxin (Prx) の同定に成功した。脳梗塞後の炎症の惹起と遷延化に Prx が中心的な役割を持つことを明らかにすることができた。

1. 脳抽出液の強力な炎症惹起因子 (DAMPs) は Prx family タンパクである。

脳組織のホモジネート（脳抽出液）を培養樹状細胞に添加すると、IL-23、TNF α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインの産生を誘導した。脳抽出液を熱処理、タンパク分解酵素処理すると、この活性が消失することから、活性物質はタンパク質であると考えられた。さらに脳抽出液を分画し、最終的にショ糖濃度勾配によって分子量でふるい分けたところ、およそ 15~25kDa の分画に活性が認められた。この分画の質量分析の結果から得られた候補タンパクについてリコンビナントタンパクを作製し、樹状細胞に添加した。その結果、peroxiredoxin (Prx) family タンパクが強力に炎症性サイトカインの産生を誘導することが明らかとなった。Prx family タンパクには Prx1~6 があり、特に Prx1、2、5、6 は脳に多く含まれていた。

2. Prx は Toll 様受容体 (TLR2、TLR4) を介して浸潤マクロファージを活性化する。

Prx は TLR2/TLR4 の両方を欠損した培養樹状細胞には炎症性サイトカインの産生を誘導しなかった。TLR2 や TLR4 を欠損したマウスを用いて脳虚血モデルを作製すると、野生型に比較して脳内での炎症性サイトカインの産生が有意に減少していた。さらに IL-23 によって虚血脳内で誘導される IL-17 産生性 T 細胞（主に $\gamma\delta$ T 細胞）も減少しており、TLR2、TLR4 は脳虚血後炎症の遷延化にも寄与しているものと考えられた。したがって、脳虚血モデルを用いて Prx の役割を詳細に検討することとした。

3. Prx は脳梗塞発症 24 時間後に虚血脳内で産生され、浸潤マクロファージを活性化する。

Prx は本来、細胞内で抗酸化作用を持つタンパクであり、様々な酸化ストレスに対して細胞保護効果を持つことが知られていた。脳梗塞組織における Prx 発現の経時変化を検

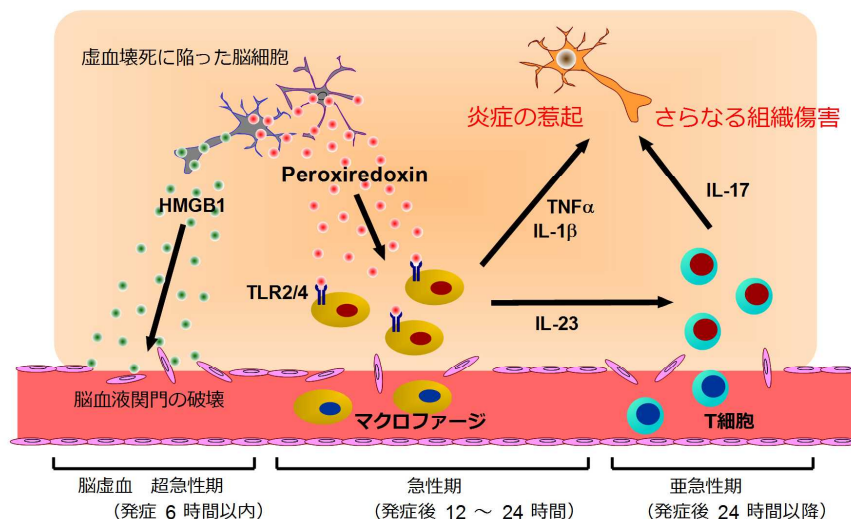
討すると、Prx は虚血壊死に陥った組織で脳虚血誘導 24 時間をピークに強く発現していた。虚血周辺部では Prx を細胞内で強く発現する細胞が細胞死を起こしていると考えられ、細胞外に存在する Prx が脳に浸潤したマクロファージと接触する様子が多数観察された。以上のことから、虚血ストレスに伴って脳細胞内で産生された Prx は、細胞死(主にネクローシス)に伴って細胞外に放出され、周囲に浸潤したマクロファージを活性化するものと考えられた。

4. Prx の α 3-helix が DAMPs としての機能に重要である。

Prx タンパクの変異体を様々に作製することによって DAMPs としての機能を解析した。Prx が抗酸化作用を持つ部位(2ヶ所の cystein 残基)は DAMPs としての機能とは関係しなかった。そこで C 末端からアミノ酸を削る deletion mutant の解析を行ったところ、Prx の α 3-helix 構造が DAMPs としての機能に中心的な部位であることを発見した。

5. Prx 抗体投与による脳保護効果の検討

Prx1、2、5、6 に対する抗体を作製し、脳虚血モデルマウスに投与して得られる脳保護効果につき検討を行った。Prx 抗体は有意に脳梗塞体積を縮小、神経症状を改善し、神経保護効果を示した。Prx 抗体投与の therapeutic time window を検討したところ、脳梗塞発症後 12 時間まで有意な神経保護効果が得られた。この結果は脳梗塞組織における Prx 発現の経時変化からみて妥当であり、Prx が脳梗塞における新たな治療標的となりえることを示唆している。



3. 今後の展開

本研究によって明らかになった DAMPs による神経炎症の惹起メカニズムは、脳内因子によって病態が制御されることを示唆している。炎症惹起のメカニズムはこれまでに様々な炎症性疾患で解明が進んだものの、炎症がどのように鎮静化するかは明らかになっていない。現在、脳内因子と免疫細胞の観点から、炎症の収束・組織修復に至る過程を明らかにしようとしている。様々な神経疾患における炎症の収束を早め、組織修復を促進するような新規治療法の開発へとつながりたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

炎症を惹起する脳内因子と神経炎症における病的意義を証明できており、本研究目標の半分を達成した。今後は炎症の収束をもたらす脳内因子、細胞集団を同定することによって本研究を完成させる予定である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

脳梗塞モデルである脳虚血誘導時における脳組織壊死巣拡大に関与する DAMPs として、脳虚血誘導 24 時間をピークに強発現する Peroxiredoxin (Prx) を同定した。Prx は、細胞死に伴って細胞外に放出され周囲に浸潤したマクロファージを TLR2/TLR4 を介して活性化し、IL-23 や IL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させて、脳内炎症を引き起こすことを初めて示した。また、Prx ファミリー分子に共通の α 3-helix 構造が DAMPs として作用するのに重要であることを突き止めた。さらに、抗 Prx 中和抗体の投与による壊死巣拡大の抑制が脳梗塞発症後 12 時間まで有効であることを示し、Prx が脳梗塞における新たな治療標的となりえることを発表した。今後、Prx の作用制御など、神経疾患における炎症の収束を早めることにより慢性化を阻止し、組織修復を促進するような新規治療法の開発へとつながる研究への進展が大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

原著論文

1. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Miyake K, Akira S, Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. **Nat Med.** 18(6): 911-917 (2012)

総説

1. Shichita T, Ito M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. **Front Cell Neurosci.** 8: 319 (2014)

2. Shichita T, Sakaguchi R, Ito M, Kondo T, Yoshimura A. Peroxiredoxin triggers cerebral post-ischemic inflammation. **Inflammation and Regeneration.** 33(3):150-155 (2013)

3. Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after

stroke. **J Neurochem.** 123 Suppl2:29-38 (2012)

4. Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation in the brain. **Front Immun.** 3:132 (2012)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(受賞)

循環器学研究振興基金賞 内田賞

日本インターフェロン・サイトカイン学会第 10 回奨励賞

平成 25 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞

日本脳卒中学会 草野賞

第 7 回日本免疫学会研究奨励賞

(プレスリリース)

日本経済新聞 (2012 年 5 月 22 日)「脳梗塞悪化の仕組み発見 慶大教授ら、新治療に道」

毎日新聞 (2012 年 6 月 19 日)「脳梗塞：悪化防げる 炎症起こすたんぱく質特定」

日刊工業新聞 (2012 年 5 月 21 日)「慶大、脳梗塞で患部の脳細胞壊死一原因たんぱく質解明」

医療介護 CB ニュース (2012 年 5 月 22 日)「脳梗塞悪化させるタンパク質を発見ー治療法開発につながる可能性」

研 究 報 告 書

「炎症誘導因子による炎症抑制機構の解明と慢性炎症制御技術基盤の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年 10 月～平成29年3月

研 究 者: 中江 進

1. 研究のねらい

「炎症」は病原体からの生体防御に必要な免疫応答であるが、アレルギー疾患や自己免疫疾患はいうまでもなく、癌や糖尿病等の疾病の発症や慢性化においても「炎症」が関与する。したがって、「炎症誘導因子」の同定と機能解析は、その因子の機能阻害が炎症抑制剤の開発への可能性をもつことから、難治性慢性炎症疾患の治療法の確立にとって重要な位置を占める。事実、その研究成果から抗体医薬等の治療薬が生まれ、各種疾患の治療への有効性が示されている(ただし、後述するが万能ではなく副作用が問題視されている)。しかしながら、本申請では、そのような「炎症誘導因子」による炎症誘導作用に焦点をあてた難治性疾患の発症機構の解明、いわば、正攻法的な戦略ではなく、「炎症誘導因子」による「炎症の“鎮静・抑制化”」という従来の概念とは正反対の視点にたった、難治性慢性炎症疾患の炎症誘導制御機構の解明計画を提案する。

「炎症誘導因子」による「炎症の鎮静・抑制化」に注視する意義は何か？正常な個体では、炎症が起きた組織では、免疫細胞によってその炎症を惹起した原因が取り除かれ、その後、自然に炎症が消失する(「自然に(副作用なく)」ということが重要である)。その自然に炎症を鎮静・抑制化させるためには、「炎症誘導因子」自体が必要であることを、申請者らは証明した (Nat Immunol, 8, 1095, 2007)。つまり、ある種の「炎症誘導因子」は、炎症誘導(アクセル)と鎮静化(ブレーキ)の両特質を併せ持つ。そこで、本研究では、マウス大腸炎モデルを用いて、炎症誘導因子である IL-33 による炎症の沈静・抑制化機構について個体・細胞・分子レベルでの解明を目的とする。炎症誘導因子による炎症誘導(アクセル)と鎮静化(ブレーキ)のスイッチは、どのようにして切り替わるのか、その分子機構を明確にすることより、「炎症誘導因子」による炎症を鎮静化するブレーキスイッチを選択的に作動させる事で、副作用のない、より自然な炎症抑制方法をデザインすることが可能となることが期待され、難治性慢性炎症疾患に対する新しい治療法の開発基盤の確立に寄与できることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性大腸炎は国内に約 15 万人の患者がおり、厚生労働省より特定疾患に指定される原因不明の慢性炎症疾患である。治療法としてステロイドや免疫抑制剤が有用であるが根治に至らないことが多い。

IL-33 をマウスに投与した場合、肺と腸管に炎症が誘導される。クローン病や潰瘍性大腸

炎の患者の標本では、健常者の標本と比較して、IL-33 や IL-33 受容体の発現が高いことが知られている。また、海外では、クローン病や潰瘍性大腸炎の患者の IL-33 や IL-33 受容体遺伝子に多型 (SNP) があることが報告されており、その SNP の有無と大腸炎の重症度の間に相関があることが報告されている。したがって、IL-33 は、大腸炎の発症に関わり、症状の悪化を引き起こすサイトカインであることが推測された。しかしながら、大腸炎の発症および病態の形成における IL-33 の役割については不明であったため、マウスの大腸炎モデルを用いて、大腸炎の発症機序における IL-33 の機能解析を行った。

マウス大腸炎には、飲料水にデキストランを混ぜて摂取させることにより誘導するデキストラン大腸炎、トリニトロベンゼンスルホン酸やオキサゾロンなどの化学物質を用いたハプテン誘導性大腸炎、IL-10 欠損マウスなどの遺伝子改変マウスで見られる自然発症型大腸炎、T 細胞が存在しないマウス (scid や Rag 欠損マウス) へのナイーブ ($CD4^+CD45RB^{hi}$) T 細胞の移植による大腸炎 ($CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎) などが知られている。デキストラン大腸炎とハプテン大腸炎は、T 細胞が存在しない Rag 欠損マウスでも発症する。一方で、ヒトの慢性大腸炎では、炎症局所に T 細胞の浸潤が認められるため、本研究では、T 細胞依存的に発症する $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を採用した。

Rag 欠損マウスと IL-33 欠損 Rag 欠損マウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導したところ、IL-33 欠損 Rag 欠損マウスでは Rag 欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。したがって、IL-33 は大腸炎を誘導するのではなく、むしろ、抑制する働きがあることが明らかになった。現在、IL-33 は、これまでに知られていない免疫機構によって、大腸炎の抑制に関わることが明らかになりつつある。

(2) 詳細

1. 自己免疫様大腸炎と IL-33

正常の Rag 欠損マウスの大腸と比較して、 $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した Rag 欠損マウスの大腸では、IL-33 mRNA の発現レベルの増強が認められた。免疫染色解析により、大腸病変部で IL-33 を発現している細胞は主に、マクロファージの一部とマスト細胞であることが明らかになった。これらの結果より、 $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎の発症に、IL-33 が何らかの関わりがある可能性が示唆された。

そこで、Rag 欠損マウスと IL-33 欠損 Rag 欠損マウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導したところ、IL-33 欠損 Rag 欠損マウスでは Rag 欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。Rag 欠損マウスと比較して IL-33 欠損 Rag 欠損マウスの大腸組織では、炎症細胞の浸潤が多く認められ、病理学的な評価においても重症化していることが明らかになった。これに相関して、大腸組織における炎症誘導因子 IL-1 β 、IL-6 や IFN- γ mRNA 発現も亢進していた。以上より、IL-33 は、T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症及び病態の形成を抑制する働きがあることが明らかになった。

2. 自己免疫様大腸炎とマスト細胞

1 の結果より、IL-33 は、T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症を抑制することが明らかになり、その際、IL-33 は大腸のマクロファージとマスト細胞で発現していることが明らかにな

っている。

マクロファージは腸内細菌構成成分である LPS の刺激によって IL-33 を発現し、マスト細胞は IL-33 の刺激により、IL-33 を発現することが知られている。正常の大腸では、常在マクロファージは存在するが、マスト細胞はほとんど見られないため、最初に腸内細菌構成成分 LPS の刺激によってマクロファージが活性化して IL-33 を発現することが予期された。LPS によって活性化されたマクロファージは、IL-33 と同時に、マスト細胞遊走因子を産生して、大腸の炎症部位にマスト細胞を引き寄せ、引き続き、マクロファージからの IL-33 によってマスト細胞が刺激されることにより、マスト細胞が大腸炎の抑制に関わるという可能性が考えられた。しかしながら、T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症におけるマスト細胞の関与については現時点で報告がなされていない。そこで、マスト細胞が T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症に関与するかどうかを明らかにするため、Rag 欠損マウスとマスト細胞欠損 ($Kit^{W-sh/W-sh}$) Rag 欠損マウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した。その結果、IL-33 欠損 Rag 欠損マウスと同様に、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスでは Rag 欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。Rag 欠損マウスと比較して、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスの大腸病変部位では、炎症細胞の浸潤増強、炎症誘導因子 RNA の発現増強が認められた。

3. 自然発症型大腸炎モデルと IL-33 およびマスト細胞

IL-33 とマスト細胞は $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎の抑制に関わることが明らかになったが、この作用は、この $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎モデルでのみ見られる現象である可能性も否定できない。そこで、 $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎モデル以外に、T 細胞依存的な大腸炎モデルとして IL-10 欠損マウスで自然発症する大腸炎における IL-33 とマスト細胞の関わりについて評価を行った。IL-10 欠損マウスと比較して、IL-33 欠損 IL-10 欠損マウスおよびマスト細胞欠損 ($Kit^{W-sh/W-sh}$) IL-10 欠損マウスでは、早くから大腸炎を発症し、重篤化することが明らかになった。したがって、2つの T 細胞依存的な大腸炎モデルにおいて、IL-33 とマスト細胞は大腸炎の発症を抑制する働きがあることが確認された。

3. 今後の展開

IL-33 とマスト細胞による大腸炎抑制機序の解析

IL-33 はマスト細胞を刺激することにより大腸炎の抑制に関わるのかどうか、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスに ST2 欠損マウスのマスト細胞を移植したマウスに大腸炎を誘導して確認を行う。

マクロファージ以外に、マスト細胞が産生する IL-33 が大腸炎の抑制に関わるのかどうか、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスに IL-33 欠損マウスのマスト細胞を移植したマウスに大腸炎を誘導して確認を行う。

マスト細胞はどのような機序により大腸炎を抑制するのか？マスト細胞は炎症誘導因子ばかりではなく、炎症を抑制する因子を産生することも知られている。そのような炎症を抑制する因子が大腸炎の抑制に関わっていると仮説を立て、その因子の欠損マウスのマスト細胞を用いて大腸炎の発症抑制との関わりを明確にする。

2. マスト細胞の性状決定

既に回収してある6種類のマスト細胞の細胞膜、細胞質、核画分を質量分析解析にかけ、6種類のマスト細胞のタンパク質発現プロファイルを比較する。いくつかの分子に対して既存の抗体が市販されているようであれば、それを用いて、大腸炎局所に浸潤しているマスト細胞に発現があるかどうか、確認を行う。発現があるタイプ、ないタイプに区別できるかどうか？できるのであれば、炎症を誘導するタイプと炎症を抑制するタイプという機能的に異なるかどうか、評価を行う。評価方法としては、T細胞と共培養を行い、Th細胞とTreg細胞の誘導能の比較を行う。

また、質量分析解析の結果、Treg細胞の誘導に関わる可能性のあるマスト細胞由来の分子の候補の遺伝子欠損マウスの作製を進める。

本課題は残りの2カ年で進め、より詳細な解析はさきがけ終了後も継続して行うことを予定している。

3. ST2 結合分子の同定

ST2に結合する候補分子、約20について、IL-33の阻害活性があるかどうか評価を行う。マスト細胞をIL-33で刺激を行うと培養上清中にIL-6やIL-13などのサイトカインが検出できるが、その際、候補分子を添加することによって、IL-6やIL-13などのサイトカインレベルが抑制されるかどうか、評価を行う。この結果、アンタゴニスト活性が見られたものがあれば、その分子に対する抗体の作製、遺伝子欠損マウスの作製を行い、個体・細胞レベルでのその分子の機能解析を進めて行く。本課題は残りの2カ年で進め、抗体や遺伝子欠損マウスを利用した解析はさきがけ終了後も継続して行うことを予定している。

すべての候補分子において、アンタゴニスト活性が見られない場合、ST2に結合する分子の探索のやり直しを残りの2カ年で行う。

4. 自己免疫様大腸炎とIL-1RaとIL-33

GFP(=IL-1Ra)陽性T細胞と他のT細胞サブセット(Th1、Th2、Th17、Tregなど)との比較を行う。具体的には遺伝子発現をmicroarrayにて、表面マーカーやサイトカイン、転写因子の発現をFACSにて評価を行う。また、IL-1RaノックインーノックアウトマウスのCD4⁺CD45RB^{hi}T細胞をRag欠損マウスに移入して大腸炎の発症との関わりについて明らかにする。

上記実験は4年目に終了させ、5年目初頭には論文投稿を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

これまでIL-33やマスト細胞はアレルギー疾患などでは、症状の悪化に関わる炎症誘導因子および免疫細胞と認識されていたが、T細胞の活性化異常によって発症する自己免疫性大腸炎ではIL-33やマスト細胞は炎症を誘導するのではなく、むしろ、炎症を抑制する働きがあることが本研究を通して明らかになった。IL-33とマスト細胞はそれぞれが異なる機構で大腸炎の抑制に関わっているのではなく、両者の間の相互作用による新規の機序によって炎症を抑制することが現在、明らかになりつつある。現在、研究の進捗は概ね計画通りであり、引き続き、

本研究を進めることで、大腸炎抑制機序の全容の解明に貢献できると考えている。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

マウス炎症性大腸炎を悪化させる因子と考えられていた IL-33 の役割について、IL-33 欠損マウスにヒト大腸炎と近似する複数の T 細胞依存性の大腸炎を誘導した。IL-33 欠損マウスは野生型マウスに比し自己免疫様大腸炎を早く発症し、重症化することを見出している。IL-33 が T細胞依存性の自己免疫様大腸炎の発症や病態を抑制すると解釈できる。研究者はその機構を細胞レベルで解析し、腸内細菌により活性化された常在マクロファージが IL-33 とケモカインを産生し、その結果として遊走してくるマスト細胞が大腸炎の発症を抑制する可能性を示唆する結果を得ている。今後、各種の遺伝子改変マウスやそれらの交配マウスを利用して、IL-33 とマスト細胞による大腸炎抑制機構の詳細を分子細胞学レベルで明らかにすることにより、この新規知見の慢性炎症抑制機構の解明に向けた更なる展開が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. ST2 requires Th2-, but not Th17-, type airway inflammation in epicutaneously antigen- sensitized mice. Allergol Int, 2012, 61; 265-73.
2. Shibui A, Shimura E, Nambu A, Yamaguchi S, Leonard WJ, Okumura K, Sugano S, Sudo K, Nakae S. Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production. Cytokine 2012, 59; 108-14.
3. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Korner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. J Immunol 2012, 189; 3641-52.
4. Nakanishi W, Yamaguchi S, Matsuda A, Suzukawa M, Shibui A, Nambu A, Kondo K, Suto H, Saito H, Matsumoto K, Yamasoba T, Nakae S. IL-33, but not IL-25, is crucial for the development of house dust mite antigen-induced allergic rhinitis. PLoS One 2013, 8; e78099

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演・学会発表等

1. Nakae S. "IL-17 family cytokines in allergy." The Centre for Allergy Research Seminar: this year's PhARF awardees, Karolinska Institute, Sweden. Oct 20, 2011

2. Nakae S. "IL-33 in allergy." Uppsala University, Sweden. Oct 21, 2011
3. 中江 進、IL-33 とアレルギー、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2011 年 11 月 10 日
4. Nakae S. "Role of IL-33 in allergy." 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Chiba. Nov 29, 2011
5. Nakae S. "Role of IL-33 in allergy." The 22nd World Allergy Congress, Cancun, Mexico. Dec 5, 2011
6. 中江 進、IL-33 と気管支喘息、第 77 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、神戸、2012 年 6 月 21 日
7. Nakae S. "Role of IL-33 in allergy." The 29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, Jeju, Korea. Oct 17, 2012.
8. Nakae S. "IL-33 in Inflammation." The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting, Tokyo. Oct 24, 2012.
9. 中江 進、関節炎と IL-17 ファミリーサイトカイン: マウスモデルからの知見、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋、2012 年 10 月 26 日
10. 中江 進、IL-33 と気道炎症、第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会、横浜、2013 年 5 月 11 日
11. Nakae S. "Role of mast cells in natural helper cell-mediated innate-type allergic inflammation." 2013 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Chiba. Dec 11, 2013
12. Nakae S. "Role of IL-33 in innate-type immune cells in allergy." WAO Symposium on Immunology & Biologics, Chicago. Dec 14, 2013.

受賞

1. 2011 年 11 月 第 21 回 アボットジャパン・アレルギー学術奨励賞(公益財団法人日本アレルギー協会)
2. 2014 年 9 月 Highly Cited Researchers(トムソン・ロイター)

著作物

(英文総説)

1. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy* 2012, 67; 1203-14.
2. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int* 2013, 62; 13-20.

(英文著書)

1. Ishigame H, Nakae S. "The Roles of IL-17A and IL-17F in Infection and Inflammatory Disorders." In *Cytokine Frontiers* (Springer), Yoshimoto Y & Yoshimoto Y Eds, 2014; 79-101.

(日本語総説)

1. 南部あや、中江 進: (トピックス) M2 マクロファージの分化機構の発見。実験医学、2011 年、第 29 巻第 16 号、2657-2658 頁。
2. 中江 進: インターロイキン 17: 肺及び皮膚免疫における役割。表面、2011 年、第 49 巻第 3 月号、96-109 頁。
3. 中江 進: Th17 細胞依存的なアレルギー疾患の発症機構の解明。アレルギー、2011 年、第 40 巻、83-86 頁。
4. 大野建州、東 みゆき、中江 進: IL-33 と慢性アレルギー炎症。実験医学、2012 年、第 30 巻第 6 号、918-925 頁。
5. 南部あや、中江 進: IL-31 と疾患。細胞工学、2012 年、第 31 巻第 7 号、787-791 頁。
6. 志村絵理、中江 進: 接触皮膚炎と IL-17。日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会雑誌、2012 年、第 6 巻第 5 号、417-426 頁。
7. 新江 賢、大野建州、森田英明、松本健治、中江 進: IL-33 によるマスト細胞の活性化。臨床免疫・アレルギー科、2012 年、第 57 巻第 6 号、625-633 頁。
8. 森田英明、新江賢、大野建州、松本健治、中江 進: IL-33 によるマスト細胞・好塩基球の活性化とアレルギー疾患。炎症と免疫、2012 年、第 20 巻第 4 号、340-350 頁。
9. 大野建州、森田英明、新江賢、松本健治、中江 進: IL-33 とアレルギー。IgE practice in asthma、2012 年、第 6 巻第 2 号、11-17 頁。
10. 大野建州、森田英明、新江賢、松本健治、中江 進: IL-33 による慢性アレルギー炎症。アレルギーの臨床、2012 年、第 32 巻第 10 号、918-923 頁。
11. 大野建州、東 みゆき、中江 進: IL-25、IL-33 と自然リンパ球～感染防御、アレルギー疾患へのかかわり～。実験医学、2012 年、第 30 巻第 19 号、3062-3071 頁。
12. 大野建州、森田英明、新江 賢、東 みゆき、中江 進: マクロファージからの IL-33 産生誘導の機序。臨床免疫・アレルギー科、2013 年、第 59 巻第 3 号、309-317 頁。
13. 新江 賢、森田英明、大野建州、松本健治、中江 進: IL-33 とアレルギー。最新医学、2013 年、第 68 巻第 3 号、552-567 頁。
14. 森田英明、海野浩寿、新江 賢、大野建州、斎藤博久、松本健治、中江 進: 新規サイトカインとアレルギー。アレルギー(日本アレルギー学会誌)、2013 年、第 62 巻第 8 号、924-935 頁。
15. 斎藤博久、森田英明、松本健治、中江 進: 慢性アレルギー炎症のメカニズム—好酸球性症を導くメカニズムの最新知見。実験医学増刊、2013 年、第 31 巻第 17 号、20-26 頁。
16. 海野浩寿、森田英明、新江 賢、大野建州、斎藤博久、松本健治、中江 進: 細胞死によるアレルギー疾患への影響—IL-33、HMGB-1 などの DAMPs による免疫応答。実験医学増刊、2013 年、第 31 巻第 17 号、105-112 頁。
17. 新江 賢、海野浩寿、森田英明、松本健治、中江 進: DAMP とアレルギー疾患。Bio Clinia、2014 年、第 29 巻第 4 号、18-24 頁。
18. 鈴川真穂、中江 進: IL-17。Respiratory Medical Research vol.2, no.3, 158-163, 2014.

プレスリリース等
該当なし

研究報告書

「癌の転移前診断の確立と治療をめざして」

研究タイプ: 大挑戦型

研究期間: 平成23年10月～平成29年3月

研究者: 平塚(中村) 佐千枝

1. 研究のねらい

がんは、昭和56(1981)年から我が国の死亡原因の第1位である。がんの統計(財団法人がん研究振興財団)によると男性、女性ともに、おおよそ2人に1人が一生のうちにがんと診断され、男性ではおおよそ4人に1人、女性ではおおよそ6人に1人ががんで死亡すると言われている。がんは、発生した場所(原発巣)に留まっているならば比較的治療しやすいが、悪性化した癌は、原発巣から離れて、血管を通して他の組織へ転移する特徴があり、これが癌治療を難しくしている。現在は、転移してしまった癌そのものに対する治療が中心である。

癌細胞が転移するにあたって、転移しやすい臓器があることは古くから知られた現象である。しかし、癌細胞は転移先をどのように選ぶのかについてはよく分かっていない。古典的に主な原因は、解剖学的な血行動態によるものと考えられてきた。近年、癌が転移する前に、すでに遠隔の臓器に転移に有利な土壌を作成することが明らかになってきた。原発癌よりのサイトカイン、ケモカインなどの液性蛋白の分泌、低酸素誘導蛋白、エクソソーム、核酸によって、肺、肝臓、リンパ節などにおいて炎症類似反応が引き起こされ、転移前に転移予定先に、転移に有利な土壌を作り出す現象-転移前土壌が形成される。この血中の液性因子は、転移予定臓器の血管を網羅的に流れて、刺激することが予想されるが、実際の癌の転移は、1つの臓器の中でも数個にとどまり、数えきれないほどびまん性(diffuse)な転移形式をとらない。このことより、転移前の臓器では、1つの臓器の中でも転移しやすい局所部位(focal area)があり、それは転移する前に決定されていることをマウス担癌モデルを用いて最近発見した。さらに、focal areaでは透過性が亢進しており、炎症様である。この部位の炎症反応関連遺伝子を同定して抑制し、focal areaを消失させることが転移の抑制につながることをマウスを用いた動物レベルでめざす。また大挑戦型として、ヒトのレベルでの本現象の解明を最終目標としている。癌を有する患者さんにおいて、転移前あるいは微小転移の段階で、マウスと同様に肺に炎症類似反応が認められるか、限局性なのか、検出する為の指標を何にするのか、転移前に制御可能なのかを含めた、転移前診断、治療をめざす。

2. 研究成果

(1) 概要

癌が転移する前の時点で、離れた他の臓器の局所に、転移するのに有利な“転移予定地”を形成することが、マウスを用いた研究で明らかになってきている。しかしマウスの実験レベルでも、癌の転移がなぜ臓器の特定の局所におきるのか、そのメカニズムの詳細は不明であった。さらにこれまで、そのような“転移予定地”が形成される現象がヒト

において確認されたことはなかった。

現在までに我々は、担癌マウス(皮下や乳腺組織などに癌を実験的に移植して定着させたマウス)に青色の色素を静脈内投与すると、局所の血管から血管内の青色色素が漏れ出す現象(血管透過性の亢進)が起き、転移前の肺の局所に濃い青色のスポットが形成され、その部位に転移が起こることを見出している。今回この現象がどのような分子メカニズムにより生じているのか確かめるため、スポット形成した部位とそうでない部位より、RNA をそれぞれ抽出して網羅的に遺伝子発現を比較した。発現に差があった遺伝子の中で、血管透過性の亢進による炎症様反応に関係すると考えられる受容体 CCR2 という分子に着目した。CCR2 と、CCR2 に結合するリガンドである CCL2、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて担癌マウスを作製し、血管透過性の上昇をみたところ、両方の遺伝子欠損マウスの肺では、スポット状の濃い青色となった部位は殆ど見られなかった。次に、血管透過性の亢進と癌の転移に関係があるかを調べた。野生型(遺伝子の正常な型)の担癌マウスに、蛍光色素で標識した癌細胞を静脈から入れると、肺の血管透過性が亢進している局所に一致して癌細胞が集まるのが観察されたが、そのような現象は CCL2 や CCR2 の遺伝子欠損した担癌マウスでは認められず、結果として癌の転移は抑制された。そして S100A8 と SAA3 が CCL2-CCR2 システムの調節を受けていることを見だし、このカスケードの最下流で、自然免疫反応で中心的な役割を果たしている TLR4/MD-2 複合体の MD-2 遺伝子が欠損した担癌マウスでも、血管透過性の亢進抑制に伴い、癌細胞の転移抑制が認められた。さらに、転移を伴う悪性の癌で亡くなった患者さんの肺の転移のない部分に、担癌マウスでみられた“転移予定地”と大変良く似た炎症性反応が起きている局所が存在する可能性を見いだした。今後、ヒトにおいて、癌転移の予測や予防的な治療の可能性につながることが示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A (マウスレベル)

1. CCL2-CCR2 システムは転移前の肺に透過性亢進部位をつくりだす

担癌マウスに青色の色素(EB:エバンスブルー)を静脈内投与すると、転移が起きる前の肺の局所に、血管透過性亢進部位である青色のスポットが形成される。今回その現象がどのような分子メカニズムにより生じているのか確かめるため、スポット形成した部位とそうでない部位より、RNA をそれぞれ抽出して網羅的に遺伝子発現を比較した。そして、発現に差があった遺伝子の中で、血管透過性の亢進に関与している可能性の高い炎症反応に関係すると考えられる受容体分子である CCR2 に着目した。そしてこの CCR2 と、CCR2 のリガンドである CCL2 それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて担癌マウスを作製した。そして、それらの担癌マウスの静脈内に青い色素を注射し血管透過性を見たところ、野生型(遺伝子の正常な型)では局所性の血管透過性亢進部位を認めたが、CCL2 と CCR2 遺伝子欠損担癌マウスの肺では、透過性スポットはほとんど認められなかった。

2. CCL2-CCR2 システムによりコントロールされている透過性亢進部位に癌細胞は好んで集まりやすい

血管透過性亢進部位と、癌細胞の転移に関係があるかを調べた。野生型の担癌マウスに、蛍光色素で標識したがん細胞を静脈から入れると、肺の血管透過性が上昇している局所に一致してがん細胞が集まるのが観察された。しかし、この現象は CCL2 や CCR2 の遺伝子欠損担癌マウスでは認められず、結果として癌の転移は抑制された。

3. 透過性亢進部位を作り出すのは、S100A8 と SAA3 である

以前、私たちは炎症に関わる S100A8、SAA3 という蛋白が転移前の肺全体において上昇していることを明らかにしてきた。この分子の蛋白発現が透過性亢進部位においてどうなっているかを調べたところ、いずれの分子も透過性亢進部位で発現上昇していた。また S100A8 SAA3 と CCL2-CCR2 との関わりを見る為に、担癌マウスにした CCL2 遺伝子欠損マウスの肺を調べたところ、これらのマウスにおいて SAA3 の発現は抑えられていた。このことより、CCL2-CCR2 によって SAA3 の発現調整が行われていることが分かった。次に透過性亢進部位を実際に作成しうる分子の特定を行った。哺乳類の細胞からの蛋白を用いて腹腔、および肺における透過性を測定した。まずアッセイ系として確立され、見やすい腹腔透過性亢進実験を行うと、ポジティブコントロールである血管内皮細胞増殖因子(VEGF)と同様以上に S100A8、SAA3 により血管透過性誘導を認めた。一方 CCL2 では強い誘導を認めなかった。このことより、CCL2-CCR2-S100A8-SAA3 の一連の反応の中で、血管透過性を強く誘導したのは S100A8-SAA3 であることが示され、S100A8 と SAA3 は肺に透過性亢進を誘導できることが示された。

4. S100A8-SAA3-MD-2 カスケードは透過性亢進と転移に関与する

このカスケードの下流の SAA3 の受容体である TLR4/MD-2 複合体についても調べた。S100A8 や SAA3 の受容体である TLR4/MD-2 は自然免疫反応で中心的な役割を果たしていることが知られている。SAA3 による透過性誘導に関しては、腹腔透過性システムを用いて調べると、腹腔内 EB の透過は MD-2 欠損マウスで減弱した。担癌にした MD-2 欠損マウスは、野生型と比べて肺の血管透過性の亢進は抑制され肺では肉眼的にも青色のスポットは認められなかった。最終的に、担癌 MD2-/-マウスでは静注した癌細胞の肺への集積が抑制された。

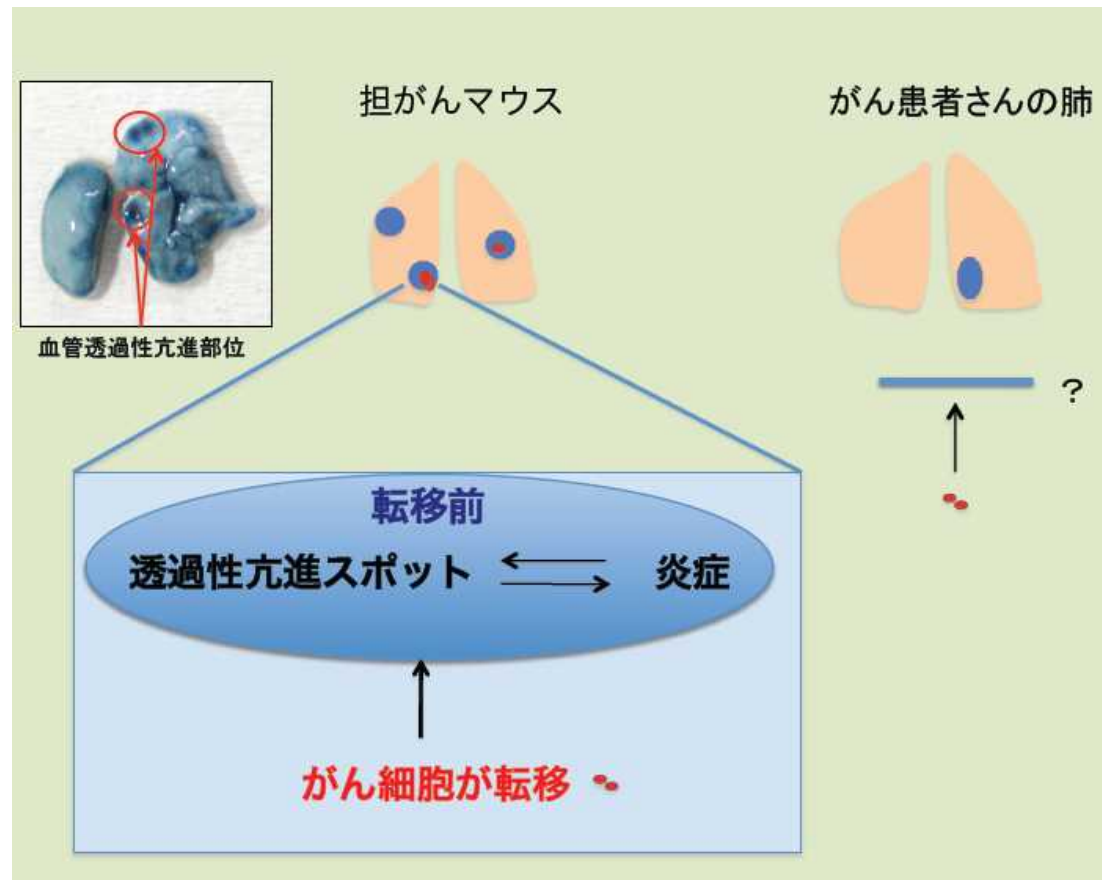
以上のことから、原発癌による CCL2 が血液を介して”転移予定地”で局所的に発現する CCR2 に作用し、その刺激によって産生された S100A8 や SAA3 が TLR4/MD-2 複合体に作用して、血管内皮細胞の血管透過性を局所的に上昇させ、癌の転移を促進するというメカニズムが明らかになった。

研究テーマ B (ヒトレベル)

5. 担癌の患者さんにおいて、転移前の肺の透過性亢進部位が存在する可能性

マウスの肺の血管透過性の亢進部位では CCR2 の高い発現が認められるが、同時にフィブリノーゲンが検出される。フィブリノーゲンは炎症反応に伴う血管透過性が亢進した部位で産生されることが知られている。そこで、転移を伴う癌で亡くなった患者さんの肺を調べたところ(13人)、明らかな転移を認めていない肺の局所においても、フィブリノ

ーゲンの発現が認められた血管に一致して、CCR2 と S100A8 の発現が上昇していることを確認した。なお、この臨床材料を用いた研究は、事前に研究倫理審査委員会の承認を受け実施した。



3. 今後の展開

本研究は大挑戦型研究課題であり、最終目標は癌転移の予防である。今回のマウスを用いた研究で、原発癌は自然免疫に関係する因子の力を使用して、離れた場所にある転移前の肺にスポット状の血管透過性の亢進部位を作り出し、この部分に積極的に転移することが分かった。転移を伴う悪性のがんで亡くなった患者さんの転移のない部分に、担癌マウスでみられた“転移予定地”と大変良く似た炎症性反応が起きている局所が存在する可能性を見いだした。そのため、さらにヒトにおいて詳細な分子疫学的な研究を行うことにより、本研究が将来には患者さんにおけるがん転移の予測や、ごく早期の転移の検査を可能とするような、予防的な治療に発展することが期待される。

具体的には fibrinogen を指標として、癌の患者さんの肺において上昇している遺伝子をスクリーニングし、感度の良いマーカーとして使用できる分子、生物学的機能を有して治療効果を期待できる分子を検索する。また転移前炎症をおこしている部位の検出方法についても検討する予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

マウスにおいて転移前土壌の存在を世界で初めて論文として発表してから12年がたち、マウスにおけるメカニズムは少しずつ明らかになり、国際的にも癌の転移前のステージはマウスレベルで存在することが近年コンセンサスとしてようやく認められ始めた。転移前の肺における局所の透過性亢進部位が、ヒトにおいても存在する可能性を示した論文は(さきがけの3年間の研究期間)、今回世界で初めてである。癌の患者さんの肺を調べることは難しいことではあるが、患者さんへの還元があってこそその研究であり、未だ途上である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

転移性の癌を移植したマウスにおいて、転移の前に転移予定臓器において血管透過性の亢進が見られることを見出し、転移予定局所における環境の変化と炎症反応を解析した。その結果、移植した癌組織より分泌された CCL2 が、将来転移予定部位である肺血管組織において高発現する CCR2 を刺激して S100A8 や SAA3 を発現させ、それらが TLR4/MD-2 複合体に作用して血管透過性を亢進させ、転移を促進することを突き止めた。担癌マウスモデルにおいては血管透過性亢進が起き CCR2 が高発現している部位ではフィブリノーゲンの発現がみられるが、ヒト癌患者の肺組織においても、フィブリノーゲンの発現と一致して CCR2 と S100A8 が発現亢進している部位を見出し発表した。本研究は大挑戦型課題であり、癌転移の予防のための転移前診断を目標としているが、今後、ヒト組織を用いたより詳細な分子疫学的な検討が予定されており、転移前診断のマーカーの同定なども含め、研究の更なる進展が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hiratsuka S, Ishibashi S, Tomita T, Watanabe A, Akashi-Takamura S, Murakami M, Kijima H, Miyake K, Aburatani H, Maru Y. Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci.
Nature Communications (2013) 4, Article number: 1853 doi:10.1038/ncomms2856

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Hiratsuka S. “Innate immune system mediates focal metastasis” (Brisbane) シンポジウム

September, 2012.

2. 平塚 佐千枝、自然免疫シグナルによる転移予定臓器における転移前土壌の形成、第 73 回日本癌学会学術総会シンポジウム 2014

3. 平塚 佐千枝、転移前の肺における局所透過性亢進部位の解析、第 22 回日本がん転移学会学術集会総会シンポジウム 2013.

著作物

平塚 佐千枝 丸義朗 2014 転移予定臓器の転移前の土壌. がん転移の機構 メディカル・サイエンス・ダイジェスト(佐谷 秀行監修)ニュー・サイエンス社

新聞発表

日本経済新聞 がん肺への転移解明 2013.5.15

読売新聞 がん細胞血管に穴あけ転移 2013.5.17