

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08657

研究課題名(和文) Tリンパ球由来マイクロパーティクルによる呼吸器関連アレルギー疾患の新規病態評価法

研究課題名(英文) Induction and maintenance of Th2 immune responses by T-lymphocyte-derived microparticle

研究代表者

野村 昌作 (NOMURA, Shosaku)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20218358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Tリンパ球由来MP (TLMP) の大部分は、ホスファチジルセリンを含むが、ごく少数のみがリンパ球機能抗原-1を有した。TLMPは、IL-5、IL-9、IL-13の産生を増加し、ナイーブT細胞からのTSLP-DCもしくはOX40LによるTh2応答とCRT+・CD4+・Th2メモリエルのTh2機能特性を増強した。またTLMPは、アレルギー疾患の主要な開始点であるTSLP-DC-OX40L軸のポジティブな監査機関として機能し、Th2応答を持続的に刺激した。これらの結果は、TLMPがアレルギー性障害に対する新規治療戦略のターゲットとなる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-dendritic cell (DC)-OX40L axis is the principal pathway in the inflammatory cascades in allergic diseases. Microparticles (MPs) are small membrane vesicles released from many different cell types by exocytotic budding of the plasma membrane in response to cellular activation or apoptosis. We focused on the ability of T-lymphocyte-derived MPs (TLMPs) to promote OX40L-mediated Th2 responses. Although most TLMPs contain PS, few express LFA-1. TLMP remarkably enhanced TSLP-DC-driven or OX40L-driven Th2 responses from naive T cells and the Th2 functional attributes of CRT+ CD4+ Th2 memory cells by the increased production of IL-5, IL-9 and IL-13. TLMP functions as a positive regulator of the TSLP-DC-OX40L axis that initiates and maintains Th2 cell-mediated inflammatory responses, and therefore, it might be a new therapeutic target for the treatment of allergic disorders.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Tリンパ球由来マイクロパーティクル OX40L Th2 反応性 TSLP 樹状細胞

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性免疫応答において、上皮細胞が産生するサイトカインである TSLP、IL-25、IL-33 が重要な役割を果たしていることが報告されている。なかでも、この免疫応答の鍵となっているのが TSLP であり、このサイトカインは Th2 細胞分化誘導のトリガーである OX40L をミエロイド系樹状細胞(mDC)上に発現させる上において重要な役割を担っている。また、OX40L を発現した mDC は CD4 陽性ナイーブ T 細胞を Th2 細胞へと分化させる能力を有していることも判明している。このように TSLP-mDC-OX40L 免疫軸はアトピー性皮膚炎や気管支喘息などのアレルギー性疾患の免疫応答において主要な経路であると考えられる。

### 2. 研究の目的

我々は、これまでに細胞が活性化された際に生成されるマイクロパーティクル(MP)とよばれる凝固促進物質の構造と機能について明らかにしてきた。本研究では、主に活性化された T リンパ球から生成される数種類の MP(TLMP)の機能を多角的に解析することによって、TSLP-DC-OX40L 免疫軸に関連する Th2 誘導の分子メカニズムにおける TLMP の役割を明らかにし、TLMP を主軸とした新しいアレルギー性疾患の新規病態評価法の確立と新規治療戦略の開発を目的とするものである。

### 3. 研究の方法

- (1) TLMP の構造上の特徴解析: T リンパ球上の抗原に対するモノクローナル抗体を使用し、FACS で解析する。
- (2) アレルギー性疾患における TLMP の標的細胞の研究: PS・26SPA・LFA-1 を個々に発現した TLMP を作成し、標的細胞のシグナリングを解析する。標的細胞は、正常白血球、細胞株、血管内皮細胞を用いる。細胞表面接着分子の発現と各種キナーゼの活性を測定する。アポトーシス誘導後の Caspase-rich の TLMP を FACS にて解析する。
- (3) TLMP の DC 免疫誘導に関する検討: 純化した 2 種類のヒト DC 亜群と TLMP を組み合わせ、それぞれを培養する。刺激活性化物質を加えた後に DC 表面マーカー、活性化シグナル分子および誘導サイトカインについての解析を行う。
- (4) 各種アレルギー患者における TLMP 測定と新規病態評価法の開発: 症例における TLMP・サイトカイン・可溶性接着分子の測定を行い、発症頻度の差や新規

治療法の有効性を検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) TLMP の構造的特徴

大部分の TLMP において PS の発現が認められたが、LFA-1 発現は低値群・高値群の 2 群に分類された。標的細胞への影響は、接着分子 ICAM-1 の発現が誘導された。Western blotting と kinase activity の検出により、プロテインキナーゼ C(PKC)活性化が検出された。isozyme を解析する。MAP キナーゼ(MAPK)は、p42/p44 MAPK、p38 MAPK、および JNK が immunoblotting 法で検出された。以上より、TLMP は標的細胞の単球と血管内皮細胞の ICAM-1 の発現を亢進し、そのメカニズムに PKC と MAPK の関与が示唆された。

#### (2) サイトカイン誘導効果

TLMP は、OX40L によって媒介される Th2 反応を促進することが予想されたために、まず浄化されたナイーブまたはメモリー CD4+ T 細胞に対する TLMP の影響を検討した(図 1)。組み換え型 OX40L または TLMP 投与をうけている DCs (TSLP-DCs) を検討した結果、T 細胞によるサイトカイン産生誘導の大部分の TLMP は、フォスファチジルセリンを含むが、リンパ球機能分子抗原の発現はごく軽度であった。TLMP は、IL-5、IL-9、IL-13 のさらなる産生を誘導し(図 2)、ナイーブ T 細胞からの TSLP-DC あるいは OX40L による Th2 誘導と CRT 陽性 CD4 陽性 Th2 メモリー細胞の Th2 機能保持を強力に維持した(図 3-5)。以上より、TLMP はそれが開始する TSLP-DC-OX40L 軸のポジティブな監視機構として機能して、細胞媒介 Th2 を持続的に刺激することが判明した。このことから、これらの反応を制御することがアレルギー性障害に対する新しい治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

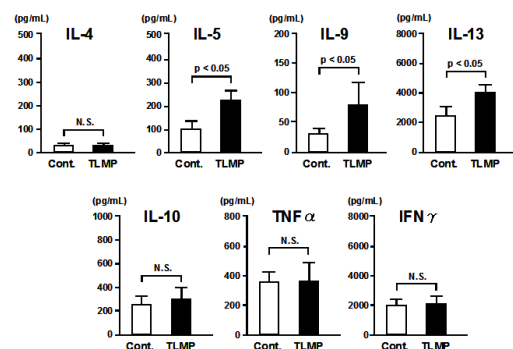


図 1 ナイーブ Th 細胞分化における TLMP の影響

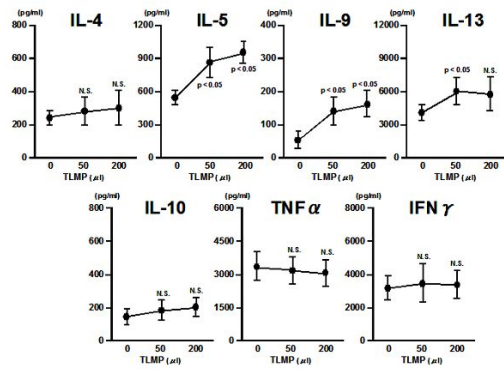


図2 TSLP-DC 関連 Th2 応答における TLMP の影響

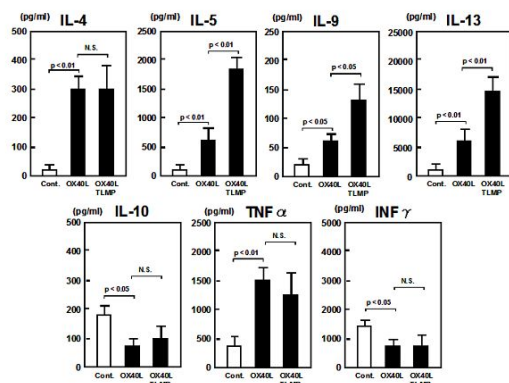


図3 OX40L を介した Th2 応答における TLMP の影響

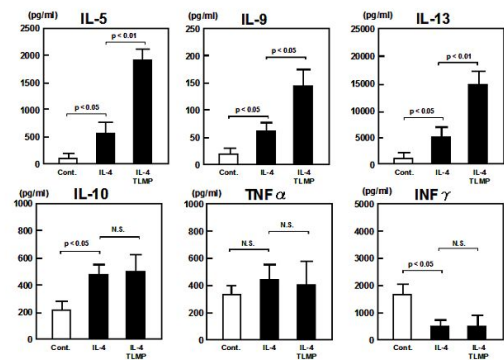


図4 IL-4 を介した Th2 応答における TLMP の影響

### (3) 考察

MP は、ほとんどすべての細胞から発生するが、循環血液においては、血小板・赤血球・白血球・内皮細胞を含む様々な血液および脈管を構成する細胞に由来する。すべての MP は外膜リーフレットで負に荷電するリン脂質（例えばホスファチジルセリン）を含み、凝固促進物質としての機能に大きく貢献している。TLMP も、迅速なリリース・メカニズムによって、生理的状況の下で形成され、他の MP 同様ホメオスタシスに関与している。

また MP のもうひとつの重要な機能は、mRNA と miRNA 種の伝達システムであり、TLMP では T 細胞増殖または Th1/Th2 分化にも関与している。

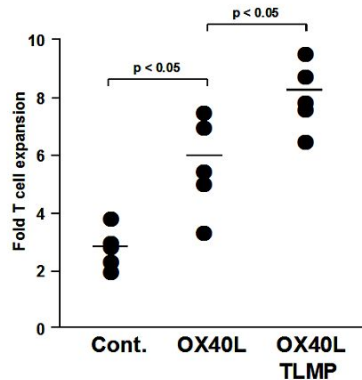


図5 メモリー-Th2 応答における TLMP の影響

TLMP は、TSLP-DC-OX40L 免疫軸に関連する Th2 誘導の分子メカニズムに関与していることが、今回の検討で判明し、関与することが明らかとなった。TLMP は IL-5 を強化し、IL13 産生から OX40L の仲介を経て、naïve T 細胞ならびにメモリー-Th2 細胞のメンテナンス・分化に関与している。OX40L は Th2 応答を経て、炎症性サイトカイン TNF 産生に基づくアレルギー性炎症を引き起こすという重要な機能を持っている。しかし今回の我々の検討では、TNF 産生に影響を及ぼすことなく OX40L による Th2 細胞分化とメンテナンスから IL-5 と IL-13 の産生を促進することによって、TLMP が Th2 免疫反応の一因となるかもしれないことを暗示している。

Th2 に関連したアレルギー反応において、TLMP は IL-15 と IL-13 産生を誘導して、間接的に病原性状況の発症に関与している可能性が否定できない。すなわち、メモリー細胞の TSLP-DCs か OX40L によって誘導される Th2 細胞を発達させる際に、TLMP は IL-9 の産生を強化しているようである。Th2 細胞が Th2 分化の初期の段階に IL-4 と IL-9 をほぼ同程度に誘導することから、Th9 細胞は Th2 細胞と密接に関係していると考えられる。そして、IL-4 (Th2 サイトカイン) は重要なシグナルを Th9 誘導に提供している。さらに、OX40L は naïve CD4+ T 細胞から、Th9 分化を強力に誘導している。このように、TLMP は IL-9 の産生と一致して Th2 が介在するアレルギー性炎症にも関係していると思われる。そして、それは肥満細胞成長のような異なる細胞型と炎症誘発性サイトカインの IL-18・IL-6

を IL-5、IL-13 とともに誘導する。さらにまた、STAT3 の起動を通して TGF-β1 と連携した Th17 細胞の分化のための重要な分子であることも示唆される。

我々の研究は TLMP によって誘発される反応の様々な可能性を想定した。そして、それは OX40L による炎症性 Th2 免疫反応と IL-4 医薬用古典的な Th2 細胞分化を病態生理学的に拡大する可能性を秘めている。TLMP がどのようなメカニズムを介して TSLP-DC-OX40L 軸のポジティブな監査機関として機能するかという点は、残念ながら明確ではない。今回の検討で、LFA 抗体が TLMP の Th2-分極化を妨げたので、TLMP の上の CD11a の役割が TSLP-DC-OX40L 軸のポジティブな監査機関であることが想定された。抗原提示細胞上に発現した LFA-1 は、迅速に ICAMs と結合し、内皮細胞上で炎症の誘導に積極的に関与する。すなわち、TSLP-DC-OX40L 軸によって誘発される免疫反応で、LFA-1 関連のシグナリングが重要な役割を演ずることを強く示唆している。今後、LFA-1 関連の機能がどのように TLMP に影響を及ぼすかという命題を明らかにすることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Aya Nakaya, Shinya Fujita, Atsushi Satake, Takahisa Nakanishi, Yoshiko Azuma, Yukie Tsubokura, Akiko Konishi, Masaaki Hotta, Hideaki Yoshimura, Kazuyoshi Ishii, Tomoki Ito, Shosaku Nomura, Human T-cell leukemia virus type I associated with an increased risk of primary malignant neoplasm, *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, vol.10, no.1, 2018, e2018024(査読あり).  
Doi: 10.4084/MJHID.2018.024

Shosaku Nomura, Tomoki Ito, Hideaki Yoshimura, Masaaki Hotta, Takahisa Nakanishi, Shinya Fujita, Aya Nakaya, Atsushi Satake, Kazuyoshi Ishii, Evaluation of thrombosis-related biomarkers before and after therapy in patients with multiple myeloma. *Journal of Blood Medicine*, vol. 9, 2018, 1-7(査読あり).  
doi: 10.2147/JBM.S147743. eCollection

2018.

Aya Nakaya, Yoshiko Azuma, Shinya Fujita, Atsushi Satake, Takahisa Nakanishi, Yukie Tsubokura, Akiko Konishi, Masaaki Hotta, Hideaki Yoshimura, Kazuyoshi Ishii, Tomoki Ito, Shosaku Nomura, Dasatinib-induced hemorrhagic colitis complicated with cytomegalovirus infection, vol.9, no.4, 2017, 7415(査読あり).

doi: 10.4081/hr.2017.7415. eCollection 2017 Dec 22.

Yuki Takeyasu, Atsushi Satake, Yoshiko Azuma, Yukie Tsubokura, Hideaki Yoshimura, Masaaki Hotta, Takahisa Nakanishi, Shinya Fujita, Aya Nakaya, Tomoki Ito, Shosaku Nomura, Tyrosine kinase inhibitor and rituximab-CHOP treatment for concurrent chronic myeloid leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a case report, *Clinical Case Reports*, vol.5, no.12, 2017, 2047-2050(査読あり).

doi: 10.1002/ccr3.1253.

Aya Nakaya, Takayasu Kurata, Takashi Yokoi, Yuki Takeyasu, Maiko Niki, Kayoko Kibata, Naoko Satsutani, Yoshitaro Torii, Yuichi Kibata, Makoto Ogata, Takayuki Miyara, Shosaku Nomura, Retrospective analysis of single-agent nab-paclitaxel in patients with platinum-resistant non-small cell lung cancer, *Molecular and Clinical Oncology*, vol.7, No.5, 2017, 803-807(査読あり).

doi: 10.3892/mco.2017.1392.

Shosaku Nomura, Takashi Yokoi, Takayasu Kurata, Platelet-related indices in patients with lung cancer with nivolumab, *Platelets*, vol.29, no.2, 2018, 207-208(査読あり).

doi: 10.1080/09537104.2017.1356454.

Aya Nakaya, Shinya Fujita, Atsushi Satake, Takahisa Nakanishi, Yoshiko Azuma, Yukie Tsubokura, Akiko Konishi, Masaaki Hotta, Hideaki Yoshimura, Kazuyoshi Ishii, Tomoki Ito, Shosaku Nomura, Transplant-ineligible symptomatic but indolent multiple myeloma shows better prognosis with conventional agents, *Case Reports in Oncology*, vol.10, no.3, 2017, 871-875(査読あり).

doi: 10.1159/000481166. eCollection 2017 Sep-Dev.

Maiko Niki, Takashi Yokoi, Takayasu Kurata, Shosaku Nomura, New

prognostic biomarkers and therapeutic effect of bevacizumab for patients with non-small-cell lung cancer, Lung Cancer: Targets and Therapy, vol.8, 2017, 91-99(査読あり).

doi: 10.2147/LCTT.S138887

Shosaku Nomura, Kazuyoshi Ishii, Shinya Fujita, Aya Nakaya, Atsushi Satake, Tomoki Ito, Association between acute GVHD-related biomarkers and endothelial cell activation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Transplant Immunology, vol.43-44, 2017, 27-32(査読あり).

doi: 10.1016/j.trim.2017.16.004.

Shosaku Nomura, Extracellular vesicles and blood diseases, International Journal of Hematology, vol.105, No.4, 2017, 392-405(査読あり).  
Doi. 10.1007/s12185-017-2180-x

〔学会発表〕(計3件)

Tomoki Ito, Kayoko Kibata, Muneo Inaba, Yoshiko Azuma, Yukie Tsubokura, Hideaki Yoshimura, Masaaki Hotta, Takahisa Nakanishi, Shinya Fujita, Aya Nakaya, Atsushi Satake, Kazuyoshi Ishii, Shosaku Nomura, Lenalidomide acts as a positive immunomodulator through modulating the functions of human plasmacytoid dendritic cells, 第59回アメリカ血液学会, 2017年12月2日、アトラクタ

伊藤量基, 中谷綾, 坪倉幸恵, 東由子, 吉村英晃, 堀田雅章, 中西孝尚, 藤田真也, 佐竹敦志, 石井一慶, 野村昌作, 慢性骨髄性白血 Lenalidomide increases serum CCL17 - therapeutic effect and drug rash are inseparably related -, 第79回日本血液学会学術集会, 2017年10月21日、東京国際フォーラム(東京)

佐竹敦志, 小西晶子, 堀田雅章, 中西孝尚, 中谷綾, 藤田真也, 伊藤量基, 野村昌作, Clinical impact of mogamulizumab against ATL: a single-center retrospective analysis, 第79回日本血液学会学術集会, 2017年10月21日、東京国際フォーラム(東京)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者: 野村昌作 (NOMURA, Shosaku)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20218358

(2)研究分担者: 伊藤量基 (ITO, Tomoki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 70434826