

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09648

研究課題名(和文) アレルギー性気道炎症下のバリア機能維持におけるTcf21の役割の解明

研究課題名(英文) Role of Tcf21 in antigen-induced allergic airway inflammation

研究代表者

前澤 裕子 (Maewaza, Yuko)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00724923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Transcription factor 21(Tcf21)は臓器発生を司る転写因子であるが、成熟臓器での役割は不明な点が多い。そこで、チリダニ(HDM)抗原を用いた喘息モデルマウスを用いてアレルギー性気道炎症におけるTcf21の役割を検討した。その結果、Tcf21の成熟肺の定常状態での発現、気道炎症の時間的推移での変化、気道上皮・好酸球など炎症に直接関与する細胞での発現が判明した。さらに、遺伝子改変による細胞種特異的Tcf21欠損マウスの作成を行い、気道炎症におけるTcf21の役割を解析し、遺伝子発現データおよびpublic databaseを用いてTcf21関連遺伝子の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息の治療の進歩により吸入ステロイドなどの非特異的な対症療法に加え、重症例に対するIgEやTh2サイトカインをターゲットとした抗体療法が普及しつつあるが、喘息の病態解明は未だ不十分であり、科学的知見に基づくさらなる治療法の開発が求められている。そこで、胎生組織発生に重要な役割を果たす転写因子Tcf21に着目し、成熟肺組織での役割について野生型喘息モデルマウスおよびTcf21遺伝子改変マウスを用いて検討するとともに、喘息患者におけるTcf21・Tcf21関連分子の発現について検討を行った。今後さらなる検討を行い気管支喘息の新規治療開発の基盤となり得る知見を得たいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor 21 (Tcf21) has important roles in fetal organ development. Involvement of Tcf21 has also been reported in developed organs in some disease status, however, its roles in mature lung are not fully clarified. To elucidate the roles of Tcf21 in antigen-induced allergic airway inflammation, we employed house dust mite (HDM)-induced murine asthma model and analyzed the expression patterns of Tcf21 in the inflamed airways. We next established inflammatory cell-specific Tcf21 knockout mice and analyzed the phenotypes of HDM-induced airway inflammation in those mice. We also analyzed the expression of Tcf21 and Tcf21 signaling-related molecules in the tissues of mouse asthma model and human asthma patients.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー性気道炎症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の有病率は国内外ともに増加傾向にあるが、吸入ステロイドをはじめとする非特異的な対症療法が未だ治療の中心であり、病態の解明に基づく新たな治療法の開発が求められている。気管支喘息は幾つかの病型に分類され、その中で最も有病率の高いアレルギー性喘息ではアレルゲン刺激に対するアレルギー性気道炎症が特徴的であり、その成立には Th2 細胞を中心とする T 細胞、B 細胞、好酸球、肥満細胞などの血球系細胞に加え、気道上皮細胞、血管内皮細胞など多くの細胞が関与することが判明している。また、近年では Th17 細胞、制御性 T 細胞、自然リンパ球などの気道アレルギーの病態形成に関与するリンパ球系細胞に関する研究が進む一方で、生体防御の最前線として存在する気道上皮細胞の役割にも注目が集まっている。

気道上皮細胞は gap junction、tight junction といった細胞接着装置により密に結合して物理的なバリアを形成すると同時に、defensin、protease inhibitor 等のメディエーターを含む粘液を産生することで抗原やウイルスといった外部刺激から化学的に生体を防御している。上皮の恒常性維持には TGF- $\beta$ 、epidermal growth factor (EGF) といった成長因子が重要であり、上皮細胞が障害され脱落するとこれらの成長因子に反応して上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)が誘導され隣接上皮から速やかな修復が行われることが報告された(Gony ST, Clin Exp Allergy 2016)。喘息では経気道的にアレルゲンに反復暴露されることで炎症が惹起され、バリア機能が破綻してアレルゲンのさらなる透過性亢進がおこるが、一方で同様な刺激によっても発症しない健常者が大多数であることから、喘息患者では気道上皮バリアの恒常性を維持する機構に何らかの脆弱性が存在することが示唆される。また、喘息患者の気道上皮では TGF- $\beta$  に対し過剰な EMT が起こり、気道の線維化やリモデリングの一因となることも示されている(Davies DE, Annals ATS 2014)。

Transcription factor 21 (Tcf21) は 1998 年に同定された basic helix-loop-helix 型転写因子であり、腎糸球体 podocyte、肺、脾臓、心臓などに高発現し、それらの臓器の正常発生に寄与する(Quaggin SE et al, Mech Dev. 1998, Quaggin SE et al, Development 1999)。Tcf21 は TGF- $\beta$  シグナル伝達への関与が報告されているが、その標的遺伝子やその作用機構については依然不明な点が多い。近年、虚血後心筋リモデリングや高血圧症などの疾患病態形成への Tcf21 の関与が報告され、成熟個体における Tcf21 の重要性が注目されている(Miller CL et al, PLoS Genet. 2013, Fujimaki T et al, Biomed Rep. 2015)。本研究者らも糸球体上皮細胞特異的 Tcf21 欠損マウスを作成し、Tcf21 が糸球体上皮における蛋白透過性の制御を含めた恒常性維持に寄与することを報告した(J Am Soc Nephrol. 2014)。Tcf21 は成熟肺においても気道上皮細胞のほか、血管内皮細胞、肺泡マクロファージなどでそのパートナー蛋白の一つである Tcf12 と共に高発現していることが示されている(Su AI et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2004, Lattin JE et al, Immunome Res. 2008)。しかし、Tcf21 の成熟肺における機能の詳細や他のパートナー分子の存在の可能性については依然不明な部分が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、アレルギー性気道炎症における Tcf21 の役割について、炎症局所における Tcf21 の発現パターンや発現細胞種の検討、細胞種特異的 Tcf21 欠損マウスにおけるアレルギー性気道炎症の解析、喘息患者の気道局所における Tcf21 の発現と病態指標との関連の解析により、Tcf21 あるいはその関連分子を応用した喘息の新規治療の基盤となる知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗原誘発性気道炎症における Tcf21 発現細胞の解析

a) 野生型 BALB/c マウスにチリダニ (house dust mite, HDM) 抗原を経気道的に反復投与し気道炎症を惹起した後、肺組織およびその細胞分画を分離し Tcf21 発現について解析を行う。また、既存のデータベースを活用し成熟肺組織・各種細胞分画及び疾患モデルマウス等における Tcf21 の発現を検討する。

#### (2) Tcf21 遺伝子改変マウスの樹立と Tcf21 のアレルギー性気道炎症への影響の解析

気道上皮細胞、肺泡マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞における Tcf21 の役割を検討するため、気道上皮特異的 Tcf21 欠損マウス (CCSP-Cre/Tcf21 floxed mice)、マクロファージ特異的 Tcf21 欠損マウス (LyzM-Cre/Tcf21 floxed mice)、T 細胞特異的 Tcf21 欠損マウス (CD4-Cre/Tcf21 floxed mice)、気道上皮特異的 Tcf21 トランスジェニック (Tg) マウス (CC10-Tcf21 Tg mice)、及び気道上皮特異的テトラサイクリン誘導システム (Tet-on/CCSP-Cre) を応用した気道上皮特異的誘導性 Tcf21 欠損マウス (Tet-on/CCSP-Cre/Tcf21 floxed/ mice) の作成を行い、HDM 誘発性アレルギー性気道炎症における気道炎症強度、炎症細胞フェノタイプ、サイトカイン産生、気道過敏性、気道上皮透過性等のバリア機能につき野生型マウスと比較する。

#### (3) 喘息患者における Tcf21 および関連分子の発現の解析

喘息患者および健常者の肺組織における Tcf21 及び関連分子の発現について検討を行い、喘息重症度など臨床症状との比較を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 気道における Tcf21 発現の解析

Tcf21 は胎生組織において、上皮-間葉間相互作用が起こる場所の fibroblast など間葉細胞に発現し、臓器発生を司る。肺においても例外ではなく、Systemic Tcf21 欠損マウスでは肺の低形成 (肺泡領域、気管支分枝不全) により周産期致死となる (Quaggin S., Development 1999)。しかしながら、マウス成熟肺では胎生肺と同等以上の RNA レベルにおける発現が見られ、ヒト肺でも腎組織と比し高レベルでの発現が確認されている (図 1-A)。また、蛋白レベルでは肺においては気道上皮細胞、血管内皮細胞、肺泡マクロファージ等で発現が確認され、リンパ節でも non-germinal center mononuclear cells での発現が確認されている (図 1-B)。これらから、Tcf21 はヒト正常肺の恒常性の維持や肺を主座とした疾患においても何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

図 1-A

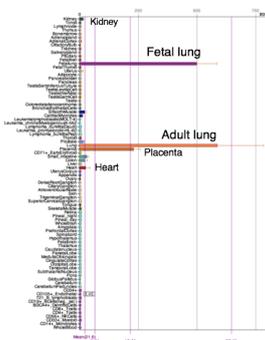


図 1-B

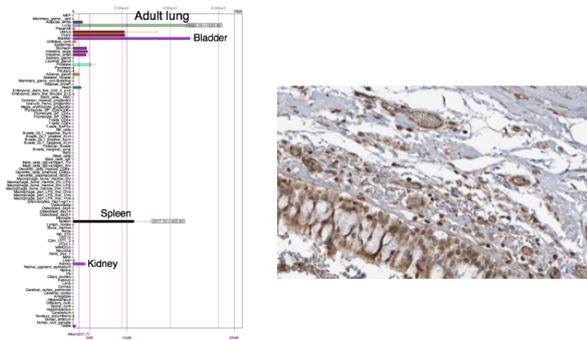


図 1-A 正常組織における Tcf21 RNA 発現 (左: マウス、右: ヒト、BioGPS より引用)、  
図 1-B ヒト正常肺組織 Tcf21 発現 (免疫染色、The Human Protein Atlas Project より引用)

そこで、野生型マウス (C57BL/6) に対し HDM 抗原を感作後、day14, day15, day16 の 3 回吸入チャレンジを行い、最終チャレンジ後 48 時間の気道慢性炎症相において気道上皮細胞のみ

を FACS sorting し Tcf21 発現を解析したところ、気道チャレンジを行った群では Tcf21 発現の抑制を認めた (図 2-A)。一方、一回吸入チャレンジのみを行った群では正常組織と同等の Tcf21 発現が見られた (図 2-B)。これらから、Tcf21 は炎症下の気道上皮において何らかの機能を有する可能性、例えば気道炎症に対し負の制御を及ぼしている可能性などが示唆された。

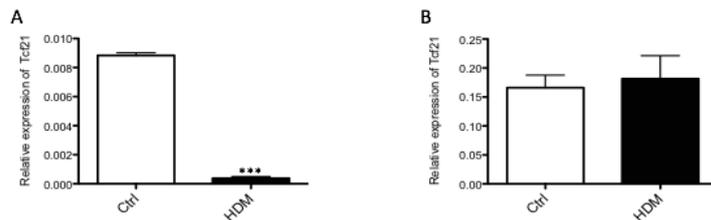


図 2 HDM 誘発性気道炎症における (A) HDM 2 回感作 + 3 回チャレンジ後 48 時間 (B) HDM 1 回チャレンジ後 8 時間での気道上皮 Tcf21 発現。(n=3、\*\*\*p<0.005)

さらに public database(GEO DataSets, NCBI)を用いて Tcf21 発現を検討したところ、Ovalbumin(OVA)誘発性マウス気道炎症から単離した好酸球においても OVA チャレンジ後の Tcf21 低下が認められることが判明した(図 3)。このことから、アレルギー性炎症における好酸球機能においても Tcf21 が関与する可能性が示唆された。

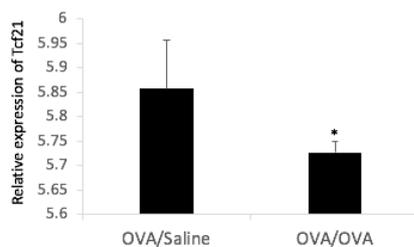


図 3 OVA 気道炎症における好酸球 Tcf21 発現。(n=4、\*p<0.05, GDS5289)。

(2)(1)の結果より、Tcf21 のマウス気道炎症における関与が示唆された。そこで、Tcf21 発現細胞と機能の詳細を検討するため、気道上皮特異的 Tcf21 欠損マウス、気道上皮特異的 Tcf21 トランスジェニック(Tg)マウス、及び気道上皮特異的テトラサイクリン誘導システムを応用した気道上皮特異的誘導性 Tcf21 欠損マウスの作成を行い、それらを用いた HDM 誘発性気道炎症の解析を施行した (研究継続中)。

(3)マウス気道炎症モデルとヒト喘息患者の Tcf21 発現には乖離の可能性がある。そこでヒト喘息患者組織における Tcf21 の発現、および関連遺伝子について public database を用いて解析を行った。その結果、Tcf21 発現についてはマウス喘息モデル同様に気道炎症による発現低下を認めたが、気道におけるパートナー分子として既報に挙げられている Tcf12 については患者-健康者間で発現差を認めなかった (図 4)。

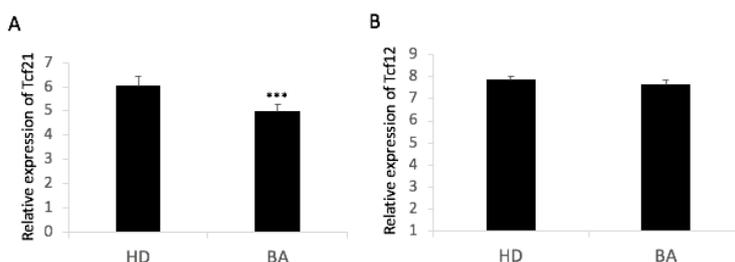


図 4 健康者および喘息患者気道生検組織における (A)Tcf21(B)Tcf12 発現。(n=4、\*\*\*p<0.005 GDS4418)

また、既報にて示唆されたパートナー分子候補(HDAC2, Ctbp2, Pbx1 等)についてはヒト気道炎症下で Tcf21 と連動の見られる分子は認められなかった。一方、マウス HDM 気道炎症モデルの肺組織においては、自験結果と同様に気道炎症による Tcf21 発現減弱と Tcf12 の減弱が見られ (図 5-A, B)、さらに転写調節関連分子 histone deacetylase 7(HDAC7)の発現低下傾向を認めた(図 5-C)。また、細胞周期制御に関与する Cell division cycle 20(Cdc20)については HDM 抗原曝露による発現上昇を認め、IL-13 欠損マウスにおいてはさらに上昇が顕著であった (図 5-D)。HDAC7、Cdc20、およびそれらの関連分子に関して今後さらに検討を進めると同時に、他の Tcf21 関連分子についても探索を行う予定である。

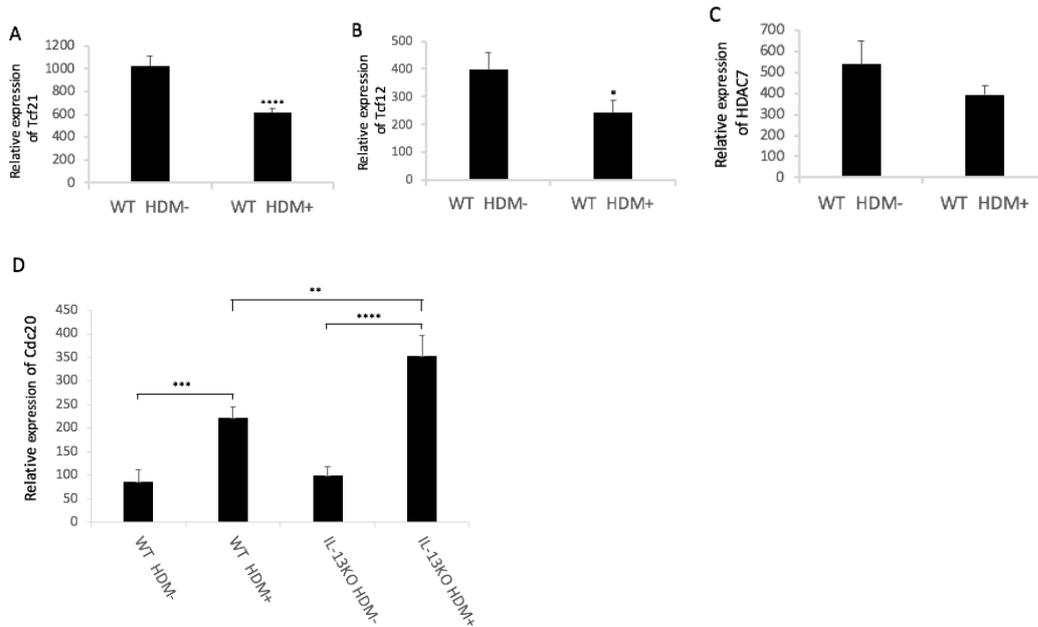


図5 HDM 誘発性気道炎症肺組織における (A)Tcf21 (B)Tcf12 (C)HDAC7 (D)Cdc20 発現。(n=3、\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.0001, GDS958)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中島 裕史  (Nakajima Hiroshi)  (00322024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授    (12501)	
研究分担者	高取 宏昌  (Hiroaki Takatori)  (30568225)	千葉大学・大学院医学研究院・特任講師    (12501)	