

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09656

研究課題名(和文)炎症細胞表面分子をターゲットにした劇症型急性肺炎の治療法の開発

研究課題名(英文)Exploration of therapeutic targets for fulminant acute lung injury

研究代表者

長谷川 明洋 (HASEGAWA, Akihiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80376376

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)：急性呼吸窮迫症候群は、激しい好中球浸潤と肺胞の広範な傷害を呈する病理像が特徴で、有効な治療法が確立されていない。本研究では新規に構築した劇症型急性肺炎モデルマウスと独自に開発したバイオイメージング技術を駆使して、急性肺炎誘導機構と劇症化メカニズムの解析を行った。また治療ターゲット分子の探索と新規治療法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は、体内への何らかの侵襲が引き金となって発症し、激しい好中球浸潤と肺胞の広範な傷害を呈する病理像が特徴で、有効な治療法が確立されていない。一方、現在世界的なパンデミックとなっている新型コロナウイルス感染症の主な死因はウイルスの増殖による直接的な影響よりも宿主側の過剰な免疫応答の結果として起こる劇症型のARDSであることがわかってきた。

そこで本研究では、ARDSの発症・劇症化メカニズムを明らかにするとともに、新規治療法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：We developed a color-coded real-time imaging model of cell migration into the lung in a mouse model of acute lung injury, and identify the cellular process required for the initiation of the acute lung injury phenotype. Accumulation of inflammatory cells in the lung was quantitatively imaged. Effect of in vivo treatment with monoclonal antibody was examined in order to explore the potential therapeutic target for acute lung injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺炎 好中球 炎症

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群(acute respiratory distress syndrome, ARDS)は、体内への何らかの侵襲が引き金となって発症し、激しい好中球浸潤と肺胞の広範な傷害(diffuse alveolar damage; DAD)を呈する病理像が特徴である。侵襲から発症までの期間は通常数日以内で、発症後の死亡率は40%を越えている。ARDSの発症にともない肺の毛細血管の内皮細胞や肺胞上皮細胞が傷害され、肺の浮腫や繊維化が誘導されて呼吸困難により死に至る。現在その治療は機械的人工換気のほかステロイド剤や好中球エラスターゼ阻害薬などの薬物療法が試みられているが、有効な治療法となり得ていない。またこれまでの研究からARDSの発症には浸潤した活性化好中球が産生する脂質メディエーターやIFNなどのサイトカインが関与していることなどが報告されているが、その詳細な発症メカニズムは明らかになっていない。一方、最近鳥インフルエンザ(H7N9, H5N1など)のヒトへの感染と世界的な流行の兆候がみられ30~60%に達する高い感染致死率を示しているが、主な死因はウイルスの増殖による直接的な影響よりも宿主側の過剰な免疫応答の結果として起こる劇症型のARDS(Fulminant ARDS; FARDS)であることがわかってきた。そのため、将来的なパンデミックに備えた治療法の確立が急務の課題となっている。

また研究代表者らは肺内の免疫細胞の挙動をリアルタイムでモニタリングするための*in vivo* ライブイメージングシステムを独自に開発し、このシステムを使って喘息誘導におけるリンパ球挙動解析やがん免疫の解析を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では新規に構築したFARDSモデルマウスと独自に開発したバイオイメージング技術を駆使してARDSの発症・劇症化メカニズムの解析を行う。また治療ターゲット分子の探索と新規治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 肺炎症部位での活性化マーカー分子等の発現細胞の解析

マウスでの劇症型急性肺炎モデルとして、 α -Galactosylceramideによる感作後にLPSを経鼻投与する系を用いた。野生型マウスで劇症型急性肺炎を誘導後、肺の組織切片を作製し免疫染色を行うことによって、肺の炎症部位に浸潤している細胞群のうち、実際に活性化している細胞を調べた。

(2) サイトカイン、ケモカインの発現レベルの検討

肺組織全体または肺胞洗浄液中に含まれる浸潤細胞からmRNAを抽出し、RT-PCR法により炎症性サイトカインやケモカインの発現レベルを調べた。肺炎誘導前後での発現レベルを比較検討した。

(3) 抗体投与実験による新規治療ターゲット分子の探索

劇症型急性肺炎に対する新規治療ターゲット分子を見つけることを目的に抗体投与実験を行った。様々なサイトカインやケモカイン、細胞接着分子に対する抗体を投与し、劇症型急性肺炎を誘導した際の生存率等を比較検討した。

(4) バイオイメージング技術を駆使した肺への細胞浸潤様式の解析

生体内免疫細胞バイオイメージング技術を駆使して、急性肺炎の誘導にともなう炎症細胞の浸潤様式に関する時空間的解析を行った。GFPやRFPなどの蛍光を発するトランスジェニックマウスからCD4T細胞、CD8T細胞、B細胞、マクロファージ、好中球、NKT細胞などを個別に単離して同系統の野生型に移入し、急性肺炎を誘導してタイムコースを追った実験を行い浸潤の動態を解析した。

4. 研究成果

(1) 肺炎症部位での活性化マーカー分子等の発現細胞の解析

マウスでの劇症型急性肺炎モデルとして、 α -Galactosylceramideによる感作後にLPSを経鼻投与する系を用いた。野生型マウスでは激しい肺の炎症性変化とともに、2~3日で死に至った。野生型マウスで劇症型急性肺炎を誘導後、肺の炎症部位に浸潤している細胞上の活性化マーカー分子の発現レベルを調べたところ、好中球の他マクロファージやT細胞などあらゆる浸潤細胞においてその発現レベルが大きく上昇していた。

(2) サイトカイン、ケモカインの発現レベルの検討

肺炎誘導前と誘導後の肺組織全体および肺胞洗浄液中の浸潤細胞からmRNAを抽出し、炎症性サイトカインやケモカインの発現レベルを検討し、急性肺炎の誘導や劇症化に関与するサイトカインやケモカインの候補分子を同定した。

(3) 抗体投与実験による新規治療ターゲット分子の検索

劇症型急性肺炎に対する新規治療ターゲット分子を見つけることを目的に抗体投与実験を行った。劇症型急性肺炎の発症にともなう肺組織内でのサイトカインやケモカインの発現解析結果も参考にしながら様々なサイトカインやケモカイン、細胞接着分子に対する抗体を投与し、劇症型急性肺炎を誘導した際の治療効果を比較検討した。その結果、いくつかの治療ターゲット候補分子が見つかった。

(4) 治療ターゲット分子の評価

見出した治療ターゲット分子について、抗体投与量や効果的な抗体投与時期に関するデータが得られた。

(5) バイオイメーキング技術を駆使した肺への細胞浸潤様式の解析

生体内免疫細胞バイオイメーキング技術を駆使して、急性肺炎の誘導にともなう炎症細胞の浸潤様式に関する時空間的解析を行ったところ、特に好中球の肺への集積は LPS 投与 48 時間後までに最高レベルに達することが明らかとなった。また LPS 投与後に誘導される好中球の集積が α -Galactosylceramide など他の刺激因子の作用によって飛躍的に増強されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokoyama, M., Kimura, M. Y., Ito, T., Hayashizaki, K., Endo, Y., Wang, Y., Yagi, R., Nakagawa, T., Kato, N., Matsubara, H. and Nakayama, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Myosin light chain 9/12 regulates the pathogenesis of inflammatory bowel disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 594297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki, A. S., Yagi, R., Kimura, M., Iwamura, C., Shinoda, K., Onodera, A., Hirahara, K., Tumes, D. J., Koyama-Nasu, R., Iismaa, S. E., Graham, R. M., Motohashi, S. and Nakayama, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential role for CD30-Transglutaminase 2 axis in memory Th1 and Th17 cell generation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichikawa, T.*, Hirahara, K.*, Kokubo, K.*, Kiuchi, M., Aoki, A., Morimoto, Y., Kumagai, J., Onodera, A., Mato, N., Tumes, D. J., Goto, Y., Hagiwara, K., Inagaki, Y., Sparwasser, T., Tobe, K., and Nakayama, T.	4. 巻 20
2. 論文標題 CD103hi Treg cells constrain lung fibrosis induced by CD103lo tissue-resident pathogenic CD4 T cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1469-1480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tumes, D., Hirahara, K., Papadopoulos, M., Shinoda, K., Onodera, A., Kumagai, J., Yip, K. H., Pant, H., Kokubo, K., Kiuchi, M., Aoki, A., Obata-Ninomiya, K., Tokoyoda, K., Endo, Y., Kimura, M. Y. and Nakayama, T.	4. 巻 144
2. 論文標題 Ezh2 controls development of natural killer T cells, which cause spontaneous asthma-like pathology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Allergy Clin. Immunol.	6. 最初と最後の頁 549-560.e10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura, M. Y., Koyama-Nasu, R., Yagi, R., and Nakayama, T.	4. 巻 41
2. 論文標題 A new therapeutic target: the CD69-MyD88 system in immune responses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Semin. Immunopathol.	6. 最初と最後の頁 349-358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirahara, K., Aoki, A., Morimoto, Y., Kiuchi, M., Okano, M. and Nakayama, T.	4. 巻 41
2. 論文標題 The immunopathology of lung fibrosis: amphiregulin-producing pathogenic memory T helper-2 cells control the airway fibrotic responses by inducing eosinophils to secrete osteopontin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Semin. Immunopathol.	6. 最初と最後の頁 339-348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Endo, Y., Onodera, A., Obata-Ninomiya, K., Koyama-Nasu, R., Asou, H. K., Ito, T., Yamamoto, T., Kanno, T., Nakajima, T., Ishiwata, K., Kanuka, H., Tumes, D. J. and Nakayama, T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Acc1 determines memory potential of individual CD4+ T cells by regulating de novo fatty acid biosynthesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Metab.	6. 最初と最後の頁 261-275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mita, Y., Kimura, M. Y., Hayashizaki, K., Koyama-Nasu, R., Ito, T., Motohashi, S., Okamoto, Y. and Nakayama, T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 559-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto, T., Endo, Y., Onodera, A., Hirahara, K., Asou, H. K., Nakajima, T., Kanno, T., Ouchi, Y., Uematsu, S., Nishimasu, H., Nureki, O., Tumes, D. J., Shimojo, N. and Nakayama, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 DUSP10 constrains IL-33-mediated cytokine production in ST2hi memory-type pathogenic Th2 cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 4231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Obata-Ninomiya, K., Ishiwata, K., Nakano, H., Endo, Y., Ichikawa, T., Onodera, A., Hirahara, K., Okamoto, Y., Kanuka, H. and Nakayama, T.	4. 巻 115
2. 論文標題 CXCR6+ST2+ memory Th2 cells induced the expression of major basic protein in eosinophils to reduce the fecundity of helminth.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 E9849-E9858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura, M. Y., Igi, A., Hayashizaki, K., Mita, Y., Shinzawa, M., Kadakia, T., Endo, Y., Ogawa, S., Yagi, R., Motohashi, S., Singer, A. and Nakayama, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 CD69 prevents PLZFhi innate precursors from prematurely exiting the thymus and aborting NKT2 cell differentiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 3749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto, Y., Hirahara, K., Kiuchi, M., Wada, T., Ichikawa, T., Kanno, T., Okano, M., Kokubo, K., Onodera, A., Sakurai, D., Okamoto, Y. and Nakayama, T.	4. 巻 49
2. 論文標題 Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper-2 cells instruct eosinophils to secrete Osteopontin and facilitate airway fibrosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 134-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onodera, A., Kiuchi, M., Kokubo, K., Kato, M., Ogino, T., Horiuchi, S., Kanai, U., Hirahara, K. and Nakayama, T.	4. 巻 199
2. 論文標題 Menin controls the memory Th2 cell function by maintaining the epigenetic integrity of Th2 cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1153-1162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura, M. Y., Hayashizaki, K., Tokoyoda, K., Takamura, S., Motohashi, S. and Nakayama, T.	4. 巻 278
2. 論文標題 Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-Myl9 system in the pathogenesis of airway inflammation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunol. Rev.	6. 最初と最後の頁 87-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tumes, D. J., Papadopoulos, M., Endo, Y., Onodera, A., Hirahara, K. and Nakayama, T.	4. 巻 278
2. 論文標題 Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunol. Rev.	6. 最初と最後の頁 8-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama, T., Hirahara, K., Onodera, A., Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K., Tumes, D. J. and Okamoto, Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Th2 Cells in Health and Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annu. Rev. Immunol.	6. 最初と最後の頁 53-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 荻野英賢、福本朱夏、田村一真、長谷川明洋
2. 発表標題 健康人および食品が保有するESBL産生菌の調査研究
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hasegawa, A., Ogino, H. and Nakayama, T.
2. 発表標題 Real-time cellular imaging of lung T-lymphocyte accumulation and focus formation in a mouse asthma model.
3. 学会等名 6th International Symposium on Bioimaging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oda, T., Kobayashi, D., Hasegawa, A., Nakayama, T. and Hashimoto, K.
2. 発表標題 Trace of Chromatin remodeling in phenotypic switching from Th17 to Th1.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川明洋、荻野英賢、中山俊憲
2. 発表標題 肺内での炎症誘導にともなうTリンパ球の浸潤様式の解析
3. 学会等名 第27回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi, D., Oda, T., Watanabe, M., Nakayama, T., Hasegawa, A. and Hashimoto, K.
2. 発表標題 Th17/Th1 balance is essential role for autoimmune diabetes NOD and IFN +IL-17+ double producing cells.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川明洋、荻野英賢、中山俊憲
2. 発表標題 劇症型急性肺炎（FARDS）モデルマウスにおける免疫炎症細胞浸潤のイメージング
3. 学会等名 第26回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 Composition for treating fulminant acute pneumonia including CD69 antagonist.	発明者 長谷川明洋、中山俊憲、荻野英賢	権利者 千葉大学、山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、US16/342992	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 CD11bアンタゴニストを含む劇症型急性肺炎治療用組成物	発明者 長谷川明洋、荻野英賢	権利者 山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-203850号	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 CD69アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎治療用組成物	発明者 長谷川明洋、荻野英賢、中山俊憲	権利者 千葉大学、山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、6570023	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

山口大学大学院医学系研究科 ゲノム・機能分子解析学講座
http://mb.med.yamaguchi-u.ac.jp/
山口大学大学院医学系研究科
www.med.yamaguchi-u.ac.jp

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
連携研究者	中山 俊憲 (NAKAYAMA Toshinori) (50237468)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------