

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 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：17K09996

研究課題名(和文) アレルギー性気道炎症におけるWnt11産生樹状細胞の役割の解明

研究課題名(英文) The role of Wnt11-expressing dendritic cells in allergic airway inflammation

研究代表者

岩田 有史 (Iwata, Arifumi)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90436353

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)：気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患は国民の約30%が罹患する国民病であるが、依然対症療法が治療の中心であり、根治療法の開発のための新たな病態解明が急務である。近年、発生・器官形成において重要な働きをすることが知られているWnt/FzdシグナルがT細胞分化に影響を及ぼすとの少数の報告があるが、未だ一定の見解は得られていない。そこでTh2細胞分化、アレルギー性気道炎症におけるWnt産生樹状細胞の役割を解明することを目的に本研究を行った。本研究により気管支喘息におけるWnt蛋白の重要性が明らかとなったため、さらなるメカニズムの解明と新規治療ターゲットとしての検討を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患における根治療法は存在せず、さらなる病態解明が望まれている。本研究では、発生・増殖を司るWnt蛋白のアレルギー疾患への関与を明らかにした点に学術的に意義がある。Wnt蛋白の作用は多岐の細胞にわたり、多面的な作用を及ぼすため、本研究の成果が臨床応用には直結しない。しかし、今後さらなるメカニズムの解明により特異的なシグナルカスケードを明らかにすることで、これまでのサイトカインによる免疫制御とは異なる観点からの治療戦略が生まれることから、従来の免疫抑制療法に抵抗性の難治性患者への新規治療に結び付く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bronchial asthma is a common allergic disease worldwide. Inhaled corticosteroids, bronchodilators, and biologic therapies significantly improve the exacerbations; however, these therapies could not achieve drug-free conditions. To elucidate the detailed mechanisms of the development of allergic airway inflammation is desirable. Recently, there have been a few reports that the Wnt signal affects T cell differentiation. However, the detailed mechanism is still unknown. Therefore, this study was conducted to elucidate the role of Wnt11-producing dendritic cells in allergic airway inflammation and T cell differentiation. We identified that the kinetics of Wnt11 expression in the asthmatic lung cells and that the roles of Wnt11 expressing dendritic cells in the T cell development in vitro. We will further elucidate the mechanism.

研究分野：気管支喘息

キーワード：アレルギー 樹状細胞

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、花粉症、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患は、国民の約 30%が罹患する国民病であり、その罹患率は未だ上昇傾向にある。また、難治性喘息やアナフィラキシーショック等、生命を脅かす状態に陥ることも稀ではない。近年、抗体医薬によるサイトカイン阻害療法の有効性が示され、一部臨床応用されたが、その効果は限定的であり、未だにステロイド、免疫抑制剤等による非特異的免疫抑制療法が治療の中心のため根治治療の開発が望まれている。

アレルギー疾患では抗原特異的 T_H2 細胞の分化・活性化と、その結果産生される T_H2 サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) によるアレルギー性炎症の惹起が主たる病態と考えられている。T 細胞の活性化と各ヘルパーT 細胞への分化には抗原提示細胞との接触による T 細胞受容体と副刺激分子からのシグナルに加え、各ヘルパーT 細胞へと分化させるサイトカインシグナルが必須である。プロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞は、 T_H1 細胞分化を誘導する IL-12、 T_H17 細胞分化を誘導する IL-6、IL-23 などを生産し、 T_H1/T_H17 細胞分化に寄与していることは既知であるが、樹状細胞は T_H2 細胞誘導因子である IL-4 を生産しないため、樹状細胞が T_H2 細胞分化を誘導する分子機構は不明である。好塩基球、NKT 細胞、肥満細胞、Th2 細胞等が生産する IL-4 の関与も示されているが、それらの細胞が存在しない環境下でも樹状細胞は T_H2 細胞分化を誘導可能なため、樹状細胞は IL-4 非依存的な Th2 細胞分化誘導機構を有すると推測される。

アレルギー性炎症における樹状細胞の重要性は、CD11c-DTR マウスを用いた CD11c 陽性細胞の除去により T_H2 型炎症が減弱することにより証明された(van Rijt et al, J Exp Med 2005)。さらに近年、骨髄由来 CD301b 陽性樹状細胞がアレルギー性炎症を誘導すること(Gao Y et al, Immunity 2013)、CD301b 抗体による CD301b 陽性細胞除去がアレルギー性炎症を減弱すること(Kumamoto et al, Immunity 2013)が報告され、CD301b 陽性樹状細胞がアレルギー性炎症の誘導に関与することが示された。一方、本研究者は米国留学中(Ken Murphy 研究室)に Klf4 依存的 CD11b 陽性 CD301b 陽性樹状細胞がアレルギー性炎症を誘導することを報告した(Tussiwand et al, Immunity 2015)。しかし、いずれの報告においても、CD301b 陽性樹状細胞が T_H2 型炎症を誘導する分子メカニズムには迫っていない。

一方、本研究者は Ken Murphy 研究室において各樹状細胞サブセットの分化と特異的機能発現の分子機構を研究し、樹状細胞サブセット特異的スーパーエンハンサー、及び標的細胞の分化/機能に重要なスーパーエンハンサー関連遺伝子を同定した(Grajales-Reyes GE et al, Nat Immunol 2015)。さらにその研究の過程で CD11b 陽性樹状細胞特異的スーパーエンハンサー関連遺伝子として Wnt ファミリーに属する Wnt11 を同定した(未発表データ)。

しかしながら、Th2 細胞分化とアレルギー性炎症における Wnt11 の役割は依然不明である。

2. 研究の目的

本申請研究では、Th2 細胞分化、及びアレルギー性気道炎症における Wnt11 の役割とその作用機構を解明するとともに、Wnt11 中和によるアレルギー性気道炎症抑制効果を検証し、アレルギー疾患に対する Wnt11 経路を応用した新規治療法開発の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

1) アレルギー性気道炎症モデルにおける Wnt 蛋白とその受容体の発現解析

C57BL/6 マウスの肺組織より各細胞分画(好酸球・T細胞・CD11b 陽性樹状細胞・気道上皮等)を FACS sorting により単離し、Wnt11 の発現を半定量的に解析する。経気道的にチリダニ(house dust mite, HDM)を繰り返し投与してアレルギー性気道炎症を惹起したのみ、同様の解析を行う。既存のデータベースにより各種細胞分画における Wnt 関連遺伝子の発現解析を行う。

2) Wnt11 発現骨髄由来樹状細胞によるヘルパーT細胞分化誘導の解析

骨髄由来樹状細胞(CD11c+ CD11b+ MHCII+ CD301b+細胞)にレトロウイルスを用いて Wnt11 を強制発現させ、OVA でパルスしたのちに、OVA 特異的 naive CD4 T細胞(OT-II)と共培養する。Wnt11 発現樹状細胞とコントロール樹状細胞による T細胞分化への影響を細胞内サイトカイン染色により比較解析する。また Wnt 阻害薬の T細胞分化への影響を検討する。

3) Wnt 阻害によるアレルギー性気道炎症への影響の解析

経気道的に HDM 喘息モデルにおいて、Wnt 阻害薬、もしくは vehicle を経気道的に投与し、アレルギー性気道炎症への影響を解析する。

4. 研究成果

1) アレルギー性気道炎症モデルにおける Wnt 蛋白とその受容体の発現解析

Wnt11 は心臓の発生にかかわる分子として報告されており、免疫細胞の発現する Wnt11 に関する報告はこれまでなかった。まず免疫系細胞の発現する Wnt11 について public database を用いて解析を行ったところ、縦郭リンパ節内樹状細胞、皮膚所属リンパ節内樹状細胞、脂肪組織内樹状細胞と好酸球からのみ Wnt11 が産生させることが明らかとなった(図 1)。

気管支喘息における Wnt11 の発現動態を調べるために、C57BL/6 マウスの気道へのハウスダストマイト(HDM)投与を繰り返し、アレルギー性気道炎症を惹起し、肺組織・縦隔リンパ節に誘導された CD4 陽性 T細胞、CD11b 陽性樹状細胞、CD64 陽性樹状細胞、気道上皮細胞、自然リンパ球を単離し、Wnt11 の発現を解析した。肺内樹状細胞による Wnt11 の産生はアレルギー性気道炎症により有意に減弱したが、リンパ節内樹状細胞からの Wnt11 産生は比較的維持されていた(図 2)。

Wnt11 の作用対象を同定するため、Sting(<https://string-db.org/>)を用いて Protein-protein interaction を解析したところ、Fzd1-7、Dvl1-3 との相互作用が検出された。そこで現在これらの分子の発現を解析中である。

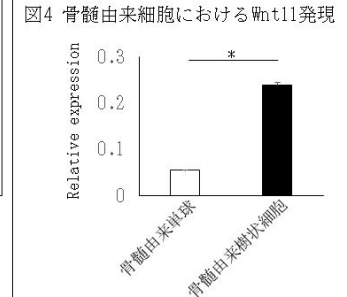
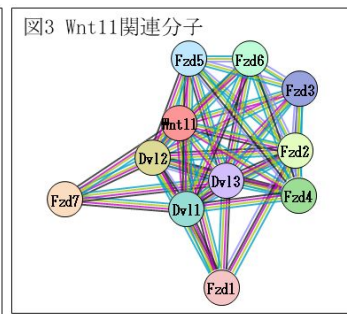
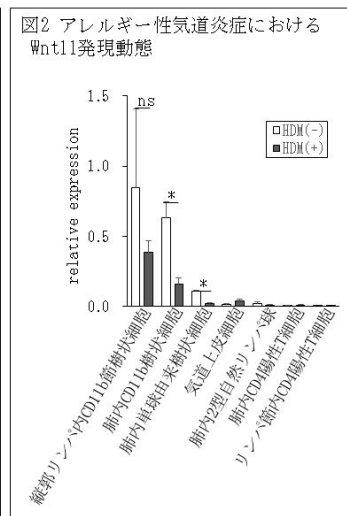
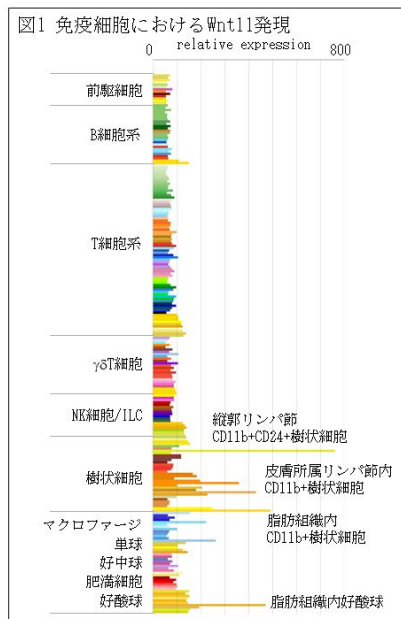
2) Wnt11 発現骨髄由来樹状細胞によるヘルパーT細胞分化誘導の解析

近年 GM-CSF により誘導した骨髄由来細胞は、単一細胞集団ではなく単球/マクロファージと単球由来樹状細胞が存在することが報告された。骨髄を GM-CSF 存在下で培養し、骨髄由来単球、骨髄由来樹状細胞をそれぞれ単離し、Wnt11 の発現を解析したところ骨髄由来樹状細胞において有意に高い Wnt11 発現を認めた(図 4)。OVA(卵白アルブミン)特異的 CD4T細胞(OT-II細胞)を OVA 蛋白の存在下で単離した骨髄由来単球、骨髄由来樹状細胞により刺激を行い、骨髄由来樹状細胞と共培養した OT-II細胞において誘導された T細胞分化のマスター転写因子とサイトカイ

ン産生を解析した。さらに樹状細胞の発現する Wnt11 の役割を検討するため、レトロウイルスベクターにより Wnt11 を強制発現させた骨髄由来単球、骨髄由来樹状細胞を用いて同様の実験を行い、OT-II 細胞からのサイトカイン産生誘導を解析している。さらに Wnt 阻害薬により OT-II 細胞からのサイトカイン産生能を検討している。今後 RNA-seq、Western blotting により Wnt11 によるシグナルカスケードを同定する予定である。

3) Wnt 阻害によるアレルギー性気道炎症への影響の解析

1)、2)より Wnt11 のアレルギー性気道炎症と Th2 細胞分化への関与が強く示唆されるため、さらなる検討を進めるため、現在樹状細胞特異的 Wnt11 欠損マウスの作成を行い、アレルギー性気道炎症における in vivo での働きを解明していく予定である。さらに治療対象としての可能性の探索のため、Wnt 阻害薬によるアレルギー性気道炎症の評価を行っているところである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Theisen Derek J, Ferris Stephen T, Briseno Carlos G, Kretzer Nicole, Iwata Arifumi, Murphy Kenneth M., Murphy Theresa L	4. 巻 7
2. 論文標題 BATF3-dependent genes control tumor rejection induced by dendritic cells independently of cross-presentation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 29-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-18-0138	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 該当する
1. 著者名 Durai Vivek, Bagadia Prachi, Briseno Carlos G., Theisen Derek J., Iwata Arifumi, Davidson Jesse T., Gargaro Marco, Fremont Daved H., Murphy Theresa L., Murphy Kenneth M.	4. 巻 215
2. 論文標題 Altered compensatory cytokine signaling underlies the discrepancy between Flt3 ^{-/-} and Flt3l ^{-/-} mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1417 ~ 1435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20171784	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 該当する
1. 著者名 Saku Aiko, Hirose Koichi, Ito Takashi, Iwata Arifumi, Sato Takashi, Kaji Hiroyuki, Tamachi Tomohiro, Suto Akira, Goto Yoshiyuki, Domino Steven E., Narimatsu Hisashi, Kiyono Hiroshi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 144
2. 論文標題 Fucosyltransferase 2 induces lung epithelial fucosylation and exacerbates house dust mite-induced airway inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 698 ~ 709.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2019.05.010	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 Bagadia Prachi, Huang Xiao, Liu Tian-Tian, Durai Vivek, Grajales-Reyes Gary E., Nitschke Maximilian, Modrusan Zora, Granja Jeffrey M., Satpathy Ansuman T., Briseno Carlos G., Gargaro Marco, Iwata Arifumi, Kim Sunkyung, Chang Howard Y., Shaw Andrey S., Murphy Theresa L., Murphy Kenneth M.	4. 巻 20
2. 論文標題 An Nfil3-Zeb2-Irf8 pathway imposes Irf8 enhancer switching during cDC1 development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1174 ~ 1185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-019-0449-3	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 該当する

1. 著者名 Durai V, Bagadia P, Granja JM, Satpathy AT, Kulkarni DH, Davidson JT 4th, Wu R, Patel SJ, Iwata A, Liu TT, Huang X, Briseno CG, Grajales-Reyes GE, Wohner M, Tagoh H, Kee BL, Newberry RD, Busslinger M, Chang HY, Murphy TL, Murphy KM.	4. 巻 20
2. 論文標題 Cryptic activation of an Irf8 enhancer governs cDC1 fate specification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1161 ~ 1173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-019-0450-x	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 該当する

1. 著者名 Suehiro Ken-Ichi, Suto Akira, Suga Kensuke, Furuya Hiroki, Iwata Arifumi, Iwamoto Taro, Tanaka Shigeru, Kageyama Takahiro, Suzuki Kotaro, Hirose Koichi, Lefebvre Veronique, Nakajima Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Sox12 enhances Fbw7-mediated ubiquitination and degradation of GATA3 in Th2 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-0384-0	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 玉地智宏 中村海人 策愛子 岩田有史 前澤裕子 廣瀬晃一 中島裕史 國井 直樹 新見 理恵 大久保 倫代
2. 発表標題 喉頭内視鏡検査で皮膚症状に乏しいアナフィラキシーをきたしフタラルの皮膚試験が診断に有用であった1例
3. 学会等名 第1回日本アレルギー学会関東地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田匡志、鈴木浩太郎、田中 繁、鈴木一正、岩田有史、古田俊介、玉地智宏、池田 啓、前澤裕子、須藤 明、中島裕史
2. 発表標題 ボドサイトに発現する suppressor of cytokine signaling 3(SOCS3)はイミキモド誘発性ループスにおける糸球体腎炎を抑制する
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原悠治, 玉地智宏, 策愛子, 影山貴弘, 岩田有史, 鈴木浩太郎, 廣瀬晃一, 中島裕史
2. 発表標題 コーヒー(green coffee bean GCB))焙煎によるI型アレルギーの1例
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山裕亮, 玉地智弘, 岩田有史, 前沢裕子, 目黒和行, 横田雅也, 高取宏昌, 須藤明, 鈴木浩太郎, 廣瀬晃一, 中島裕史
2. 発表標題 CD4陽性T細胞に発現するA20はTh2型アレルギー性気道炎症を抑制する
3. 学会等名 第66回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 amachi T, Yokoyama Y, Iwata A, Maezawa Y, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Honda H, Nakajima H.
2. 発表標題 A20 (Tnfaip3) expressed in T cells suppresses Th2 cell-mediated allergic airway inflammation in mice.
3. 学会等名 The 46th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology.
4. 発表年 2017年

〔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)	