

機関番号：82508

研究種目：基盤C

研究期間：2008～2010

課題番号：20590485

研究課題名（和文）アレルギー反応を制御するメモリーTh2 幹細胞の同定

研究課題名（英文）Identification of memory Th2 stem cells that control allergic reactions

研究代表者 山下 政克（YAMASHITA MASAKATSU）

財団法人かずさDNA研究所 ゲノム医学研究室 室長

研究者番号：00311605

研究成果の概要（和文）：

接着分子 CD62L とケモカイン受容体 CXCR3 発現を指標にメモリーTh2 細胞を4つのサブセットに分画し、その性質と分化機構の違いについて検討した。その結果、Th2 細胞から分泌されるアレルギー性炎症において好酸球の増加と遊走に重要である IL-5 は、メモリーTh2 細胞の中でも CD62L-low/CXCR3-low のサブセットから主に産生されることを明らかにした。また、CD62L-low/CXCR3-low メモリーTh2 細胞サブセットの遺伝子発現をDNAマイクロアレイで解析したところ、オステオポンチンや IL-10、IL-6 などの炎症性サイトカインを大量に産生することが分かった。そこで、このサブセットの制御がアレルギー炎症の新規治療法の提唱につながることを考え、低分子化合物のスクリーニングをおこない、石原産業が IL-5 産生阻害剤として合成したチオアミド系化合物 SH-2251 を見出した。SH-2251 は、IL-5 のみならずオステオポンチンや IL-10 の産生誘導を抑えることが分かった。これらの結果は、SH-2251 により CD62L-low/CXCR3-low メモリーTh2 細胞サブセットの機能を抑制することで、アレルギー性炎症の治療が行える可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We show that memory Th2 cells are subdivided into at least four subpopulations by CD62L and CXCR3 expression. All four subpopulations produced IL-4 and IL-13 upon TCR-mediated re-stimulation, while only CD62L-low/CXCR3-low population produced IL-5. We performed a DNA microarray analysis and found that CD62L-low/CXCR3-low subpopulation expressed osteopontin, IL-6, and IL-10. We speculate that CD62L-low/CXCR3-low memory Th2 cells may be a therapeutic target for allergic disorders. We screened low molecular weight compounds and found that synthetic thioamide-related compound SH-2251 inhibited the generation of IL-5 producing memory Th2 cells as well as IL-5 production. Furthermore, SH-2251 also inhibited osteopontin, IL-6, and IL-10 expression. These results indicate that SH-2251 may modulate CD62L-low/CXCR3-low memory Th2 cell functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：免疫

科研費の分科・細目：

キーワード：アレルギー、Th2 細胞、免疫記憶、メモリーT 細胞、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

免疫系で知られている代表的な細胞記憶に免疫記憶がある。免疫記憶は獲得免疫の特徴の一つであり、主にT細胞とB細胞によって担われている。この免疫記憶のシステムは、感染防御やワクチン療法において必須の役割を担うとともに、慢性疾患の病態にも深く関わっている。しかしながら、免疫記憶がどのようにして長期間維持されるのかについては未だ不明な点が多く残されている。なかでも、メモリー幹細胞の存在の有無に関する研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、Th2 細胞記憶（メモリーTh2 細胞）をモデルに用い、アレルギー疾患の病態に深く関与していることが予想されるメモリーTh2 幹細胞の存在を証明することを目的とする。また、メモリーTh2 幹細胞を同定し、その分化・維持に関わるマスター遺伝子を同定することで、Th2 細胞免疫記憶の人為的な制御を可能とし、将来的に難治性アレルギー疾患の治療法開発につなげる。

3. 研究の方法

卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR トランスジェニックマウスから CD4 T 細胞を調製後、*in vitro* で OVA ペプチド刺激し、Th2 細胞分化を誘導した。分化した Th2 細胞は、サイトカイン非存在下で 24 時間培養後、T 細胞欠損マウスまたは正常マウスに移入した。移入後、30 日以上経過したマウスの脾臓より、移入細胞を回収し、メモリーTh2 細胞として用いた。

この細胞をさらにセルソーターを用いて細分化後、解析をおこなった。

4. 研究成果

メモリーTh2 細胞は、CD62L と CXCR3 の発現によって 4 つの分画に分けられた (図 1)。IL-5 は、メモリーTh2 細胞の中でも CD62L-low/CXCR3-low のサブセットから主に産生された。また、CD62L-low/CXCR3-low メモリーTh2 細胞サブセットの遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析したところ、オステオポンチンや IL-10、IL-6 などの炎症性サイトカインを大量に産生することが分かった。そこで、このサブセットを除去することでマウスアレルギー性気道炎症モデルの病態が改善されるのかを検討したところ、CD62L-low/CXCR3-low メモリーTh2 細胞サブセットの除去により、アレルギー性気道炎症の発症が優位に抑制された。

次に、このサブセットの制御がアレルギー炎症の新規治療法の提唱につながると考え、低分子化合物のスクリーニングをおこない、

石原産業が IL-5 産生阻害剤として合成したチオアミド系化合物 SH-2251 を見出した。SH-2251 は、ナイーブ CD4 T 細胞から IL-5 産生 Th2 細胞への分化を抑制するとともに、IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングの誘導も阻害した (図 2)。SH-2251 は、IL-5 のみならずオステオポンチンや IL-10 の産生誘導を抑制した。

これらの結果から、CD62L-low/CXCR3-low メモリーTh2 細胞サブセットの機能を SH-2251 等により抑制することで、アレルギー疾患の治療が行える可能性を示唆している。

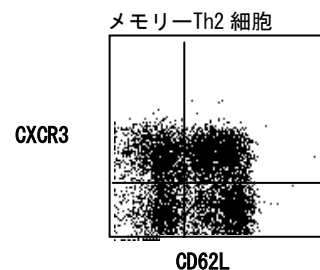


図 1 メモリーTh2 サブセット

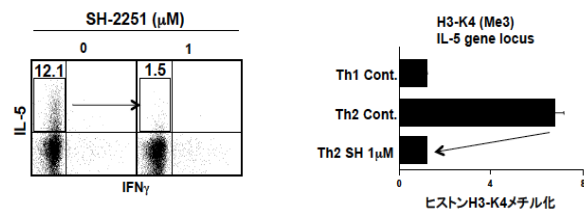


図 2 SH-2251 による IL-5 産生 Th2 細胞分化と IL-5 遺伝子座クロマチンリモデリングの阻害

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 12 件)

Onodera A., Yamashita M., Endo Y., Kuwahara M., Tofukuji S., Hosokawa H., Kanai A., Suzuki Y., Nakayama T. STAT6-mediated displacement of polycomb by trithorax complex establishes long-term maintenance of GATA3 expression in T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 207, 2493-2596 (2010)

Suzuki A., Iwamura C., Shinoda K., Tumes JD., Kimura YM., Hosokawa H., Endo Y., Horiuchi S., Tokoyoda K., Koseki H., Yamashita M., Nakayama T. *Polycomb* group gene product Ring1B regulates Th2-driven airway inflammation through the

inhibition of Bim-mediated apoptosis of effector Th2 cells in the lung. *J. Immunol.* 184, 4510-4520 (2010)

Nakayama T, Yamashita M. The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation. *Semin. Immunol.* 22, 303-309 (2010)

Miki HT., Hasegawa A., Iwamura C., Shinoda K., Tofukuji S., Watanabe Y., Hosokawa H., Motohashi S., Hashimoto K., Shirai M., Yamashita M., Nakayama T. CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183, 8203-8215 (2009)

Kitajima M., Iwamura C., Miki HT., Shinoda K., Endo Y. Watanabe Y., Shinnakasu R., Hosokawa H., Hashimoto K., Motohashi S., Koseki H., Ohara O., Yamashita M., Nakayama T. Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in *Zfp35*-deficient mice. *J. Immunol.* 183, 5388-5396 (2009)

Nakayama T., Yamashita M. Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin. Immunol.* 21, 78-83 (2009)

Shinnakasu R., Yamashita M*., Kuwahara M., Hosokawa H., Hasegawa A., Motohashi S., Nakayama, T. Gfil-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 283, 28216-28335 (2008)

Hirahara K., Yamashita M., Iwamura C., Shinoda K., Hasegawa A., Yoshizawa H., Koseki H., Gejyo F., Nakayama T. ROG, repressor of GATA, regulates Th2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 512-520e11 (2008)

Hossain MB., Hosokawa H., Hasegawa A., Watarai H., Taniguchi M., Yamashita M., Nakayama T. Lymphoid enhancer factor (LEF1) interacts with GATA3 and controls its function in T helper type 2 cells. *Immunology* 125, 377-386 (2008)

Ito T., Hasegawa A., Hosokawa H., Yamashita M., Motohashi S., Naka T., Okamoto Y., Fujita, Y., Ishii Y., Taniguchi M., Yano I., Nakayama T. Human Th1

differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172. *Int. Immunol.* 20, 849-860 (2008)

Yamashita M., Kuwahara M., Suzuki A., Hirahara K., Shinnakasu R., Hosokawa H., Hasegawa A., Motohashi S., Iwama A., Nakayama T. Bmil regulates memory CD4 T cell survival via repression of the *Noxa* gene. *J. Exp. Med.* 205, 1109-1120 (2008)

Nakayama T., Yamashita M. Initiation and maintenance of Th2 cell identity. Truncated title: Regulation of Th2 responses. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 265-271 (2008)

[学会発表] (計8件)

東福寺聡一、桑原誠、鈴木淳平、小原收、中山俊憲、山下政克
Sox4によるTh1細胞分化制御の解析
BMB2010
2010年12月9日(神戸)

鈴木淳平、東福寺聡一、桑原誠、今村匡志、中山俊憲、小原收、加藤文法、山下政克
新規チオアミド系化合物SH-2251はTh2細胞分化に伴うIL-5遺伝子座のクロマチンリモデリングを阻害する
BMB2010
2010年12月9日(神戸)

東福寺聡一、中山俊憲、山下政克
TGFβ存在下においてIL-4はTh1細胞分化を増強する
第60回日本アレルギー学会秋期学術大会
2010年11月25日(東京)

桑原誠、山下政克、東福寺聡一、鈴木淳平、篠田健太、中山俊憲
Sox4はTGFβ刺激で誘導され、GATA3機能の阻害を介してTh2細胞分化を抑制する 第20回 Kyoto T Cell Conference
2010年6月5日(京都)

小野寺淳、山下政克、遠藤裕介、桑原誠、東福寺聡一、細川裕之、堀内周、渡邊友紀子、金井明教、鈴木謙、中山俊憲
STAT6によって誘導されるポリコムとトライソラックスの置換反応
第20回 Kyoto T Cell Conference
2010年6月5日(京都)

山下政克、桑原誠、東福寺聡一、中山俊憲
Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4

第 32 回日本分子生物学会年会
2009 年 12 月 12 日 (横浜)

Hosokawa H., Kitajima M., Ito T., Horiuchi S., Sasaki T., Nishimura T., Yamashita M., Nakayama T.

Transcription factor MLL regulates IL-4-mediated anti-tumor response by tumor specific memory Th2 cells 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会
2009 年 12 月 3 日 (大阪)

Kuwahara M., Yamashita M., Tofukuji S., Shinoda K., Onodera A., Suzuki J., Iwamura C., Nakayama T.

Sox4 regulates GATA3-induced Th2 cell differentiation and Th2-dependent inflammatory responses 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会
2009 年 12 月 3 日 (大阪)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kazusa.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 政克 (YAMASHITA MASAKATSU)

財団法人かずさDNA研究所

ゲノム医学研究室長

研究者番号：00311605

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし