

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790583
研究課題名(和文) 喘息の難治性評価におけるメモリーT細胞の糖鎖性ホーミング分子測定の意義
研究課題名(英文) Quantitation of carbohydrate homing-receptor molecules on helper memory T cells for evaluation of severity of bronchial asthma.
研究代表者
佐久間 圭一郎 (SAKUMA KEIICHIRO)
愛知県がんセンター (研究所)・分子病態学部・主任研究員
研究者番号：90402891

研究成果の概要(和文)：

ヘルパーT細胞(Th細胞)は気管支喘息の病態に大きく関与する。我々は、Th細胞が特徴的な「糖鎖分子」を用いて肺にホーミングすることを過去に見出した。本研究では、喘息患者と健常者から採血を行い、Th細胞の糖鎖分子の量を測定した。その結果、患者では糖鎖分子の発現量が有意に増加していることを見出した。気管支喘息と病態が類似するアトピー性皮膚炎でも同じ傾向が見られ、臨床的重症度と相関する傾向を認めた。以上の結果から、Th細胞の糖鎖分子測定が、これらの疾患の難治性評価に有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

Helper T (Th) cells are involved in pathogenesis of bronchial asthma. We previously reported that pulmonary homing of Th cells are mediated by a specific carbohydrate adhesion molecule. In this study, we quantitated the expression levels of the molecule on peripheral Th cells in asthmatic patients and normal controls. The levels in patients were significantly increased. The levels were also elevated in patients of atopic dermatitis, the pathogenesis of which is similar to bronchial asthma. These results suggest potential utility of quantitation of the carbohydrate molecule for evaluation of severity of the diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：喘息、ホーミング、メモリーT細胞、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

| 気管支喘息は患者数が非常に多い疾患であ

り、頻繁に繰り返す呼吸困難や咳のため、生活の質や生産性におよぼす影響が極めて大きい。吸入薬をはじめとする薬剤の開発により治療効果は改善されてきているものの、治療反応性が不良な重症患者も依然多く存在し、そのような難治性喘息に対する新たな治療法の開発が求められている。

喘息は慢性の気道炎症疾患であり、その病態には肺にホーミングするTヘルパー2(Th2)細胞が大きく関与している。この肺ホーミング性のヘルパーメモリーT細胞はさらに、専ら肺にホーミングするエフェクター・ヘルパーメモリーT細胞と、リンパ節と肺との間を随時往復するセントラル・ヘルパーメモリーT細胞とに分けられる。特にセントラル・ヘルパーメモリーT細胞のホーミング異常は、難治性喘息の病態に深く関与することが予想される。現時点で喘息の長期管理薬として最も重要である吸入ステロイド剤は、エフェクター・ヘルパーメモリーT細胞をある程度抑制するが、リンパ節に待機するセントラル・ヘルパーメモリーT細胞はほとんど抑制せず、このことが難治性喘息の一因になる可能性が考えられるからである。

リンパ球ホーミングは、リンパ球表面の接着分子と血管内皮細胞の接着分子の接着を介して行われる。この細胞接着には、糖鎖を介した接着が非常に多く観察される。申請者の研究室ではそのような糖鎖性ホーミング分子を研究しており、近年ではヘルパーT細胞の肺ホーミングを特異的に媒介する糖鎖性ホーミング分子を世界に先駆けて同定した。この分子は特徴的な硫酸基を持つ糖鎖(硫酸化糖鎖性リガンド)であり、ヘルパーメモリーT細胞の中ではCCR4陽性のサブセットに特異的に発現する。我々はこの硫酸化糖鎖性リガンドに対する抗体を樹立し、T細胞表面での発現量をフローサイトメーターで簡便に測定することが可能となった。本研究ではその抗体を用いて、喘息患者の末梢血ヘルパーメモリーT細胞の硫酸化糖鎖性リガンドの発現量を測定し、健常者との比較ならびに重症度との相関について検証を行う。また、糖鎖性ホーミング分子の中には硫酸化を受けていない分子(非硫酸化糖鎖性リガンド)も存在する。非硫酸化糖鎖性リガンドは炎症との関与が従来からよく知られており、本課題でも測定する。

さらに、本課題では硫酸化糖鎖性リガンドの発現制御機構についても研究を行う。喘息の発症の原因になっている肺・皮膚ホーミング型のヘルパーメモリーT細胞はTh2細胞であり、Th2細胞特異的転写因子GATA-3が強く

働き、Th1細胞特異的転写因子T-betは抑制されていると考えられる。実際に我々は、糖鎖性ホーミング分子の合成に関与する一部の遺伝子の転写がGATA-3およびT-betによって調節されていることを報告した。この研究を進展させることで、最終的には、喘息患者のヘルパーメモリーT細胞における糖鎖性ホーミング分子の異常発現機序を明らかにすると共に、新たな治療標的分子を同定することが期待できる。

2. 研究の目的

(1)喘息患者の末梢血ヘルパーメモリーT細胞の糖鎖性ホーミング分子発現量を測定し、健常者との比較や重症度との相関解析を通して、診断や重症度判定に貢献できる可能性を検証する。

(2)ヘルパーメモリーT細胞の硫酸化糖鎖性リガンド合成に関与する糖鎖合成遺伝子の転写調節機構を解明する。硫酸化糖鎖性リガンドの特徴である硫酸基の合成には6-硫酸基転移酵素が必須である。従って、本研究課題では、6-硫酸基転移酵素の転写調節機構を解明する。

3. 研究の方法

(1)糖鎖性ホーミング分子の測定

喘息患者および健常者の末梢血を2ml採血し、下記の4重染色を行い、ヘルパーメモリーT細胞の糖鎖性ホーミング分子発現量をフローサイトメーターで測定した。採血は倫理委員会の承認を得て説明と同意のもとで行い、個人情報保護に十分注意した。また、喘息と同様に肺ホーミング性のリンパ球サブセットが病態に関与すると言われるアトピー性皮膚炎についても、同様に測定を行った。

【4重染色の内容】

- 1) 抗硫酸化糖鎖性リガンド抗体または抗非硫酸化糖鎖性リガンド抗体 + FITC標識抗マウスIg抗体
- 2) PE標識抗CCR4抗体またはPE標識抗CCR7抗体
- 3) PerCP/Cy5.5標識抗CD4抗体
- 4) APC標識抗CD45RO抗体

(2)ヒト末梢血のヘルパーT細胞に発現する主要な6-硫酸基転移酵素を同定した。同定した6-硫酸基転移酵素遺伝子の転写調節機構を、ヘルパーT細胞の株化細胞であるJurkat細胞などを用いて、

レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法などによって解明した。

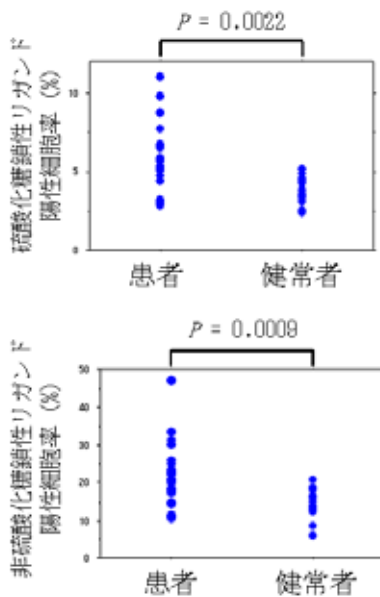
4. 研究成果

(1) 患者末梢血の糖鎖性ホーミング分子測定

健常者との比較

喘息患者は健常者と比べて、ヘルパーメモリーT細胞の肺ホーミングサブセット(CCR4陽性)およびセントラルサブセット(CCR7陽性)の両方で、硫酸化糖鎖性リガンドならびに非硫酸化糖鎖性リガンドの発現亢進を認めた。また、アトピー性皮膚炎の患者でも同様の傾向が見られた。この結果から、末梢血ヘルパーメモリーT細胞の糖鎖性ホーミング分子測定が、喘息やアトピー性皮膚炎の診断の一助となる可能性が示された。また、糖鎖性接着分子の発現異常が、病態形成に關与している可能性が示唆された。

末梢血ヘルパーメモリーT細胞肺ホーミングサブセットの測定結果



重症度との相関

アトピー性皮膚炎の重症度評価に頻繁に使用される血清TARC値、VAS(Visual Analogue Scale)、SCORAD(Severity Scoring of Atopic Dermatitis)と糖鎖性ホーミング分子の測定値の間で相関解析を行った(スピアマン法)。非硫酸化糖鎖性リガンド発現量と血清TARC値が有意な正の相関を示した($P = 0.01$)。他にも相関傾向を示す組み合わせが存在し、引き続き症例を集積中である。以上

の結果から、末梢血ヘルパーメモリーT細胞の糖鎖性ホーミング分子測定が、アトピー性皮膚炎の難治性評価に有用である可能性が示された。

(2) 硫酸基転移酵素の転写調節機構

ヒト末梢血ヘルパーナイーブT細胞を磁気細胞分離法で分離し、*in vitro*でTh1とTh2細胞に分化誘導し、6-硫酸基転移酵素遺伝子の発現をRT-PCR法で解析した。GlcNAc6ST-1は主にTh2細胞に発現し、HEC-GlcNAc6STはTh1細胞とTh2細胞に同程度の発現を認めた。喘息やアトピー性皮膚炎の病態に關与するのは主にTh2細胞である。従って、本課題ではTh2細胞に発現を認めた両方の6-硫酸基転移酵素について、それぞれ転写調節機構を研究した。

GlcNAc6ST-1

Jurkat細胞を用いた検討で、GlcNAc6ST-1はTNF- α によって発現が誘導された。また、GATA-3によっても発現が誘導された。免疫沈降法にてGATA-3はNF- κ Bと転写因子複合体を形成し、これらの転写因子が協調することで、相乗的にGlcNAc6ST-1の転写が促進することを見出した。以上の成果を論文で報告した。

HEC-GlcNAc6ST

5'-RACE法によって転写開始点を同定した。転写調節領域にはT-betとSp1の結合部位が存在し、いずれによっても転写が促進した。GATA-3に関しては転写調節領域に結合予測部位は存在しなかったが、GATA-3のドミナントネガティブ体であるKRRの導入によって転写が抑制されたこと、抗GATA-3抗体によるクロマチン免疫沈降法にてHEC-GlcNAc6STの転写調節領域が検出されたことから、GATA-3も他の転写因子を介して間接的にHEC-GlcNAc6STの転写調節を促進するものと思われる。

今後は、以上の結果を発展することで、喘息やアトピー性皮膚炎において硫酸化糖鎖性リガンドの発現が亢進する機序を解明したいと考えている。

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2件)

(1) Guo-Yun Chen, Sakuma K, Kannagi R.

Significance of NF- B/GATA Axis in Tumor Necrosis Factor- induced Expression of 6-Sulfated Cell Recognition Glycans in Human T-lymphocytes. Journal of Biological Chemistry. 査読あり. 283: 34563-34570,2008

(2) Kannagi R, Sakuma K, et al. Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: Clues in the ongoing search for new tumormarkers. Cancer Science. 査読あり. 101(3):586-593,2010

〔学会発表〕(計2件)

(1) 佐久間圭一郎. ヘルパーT細胞における6-硫酸基転移酵素遺伝子の発現調節機構. 日本免疫学会学術集会, 2008.12.1, 京都

(2) 佐久間圭一郎. Th2疾患における6-硫酸化糖鎖の異常発現に対するGATA-3関与の可能性. 日本免疫学会学術集会, 2009.12.2, 大阪

〔図書〕(計1件)

神奈木玲児, 陳国云, 佐久間圭一郎, 大森勝之. 共立出版. 蛋白質・核酸・酵素「セレクチンと相互作用する糖鎖の機能と発現調節」2008:1525-1532

〔その他〕

愛知県がんセンター(研究所) 分子病態学部
ホームページ

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-07.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 圭一郎 (SAKUMA KEIICHIRO)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・主任研究員

研究者番号: 90402891

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号: