

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390255

研究課題名（和文）重症喘息における T 細胞サブセットの役割の解明と新規免疫療法開発に関する研究

研究課題名（英文）Analysis of helper T cell subset in severe asthma for the development of new immunotherapy

研究代表者

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024

研究成果の概要（和文）：

本研究では、重症喘息の病態に焦点を当て、喘息の重症化を規定する因子の同定とそれに基づく新規治療法開発の基盤構築を目的とした。特に近年、自己免疫疾患で重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある Th17 細胞に着目し、Th17 細胞が産生する主要なサイトカインである IL-22 のアレルギー性気道炎症における役割を解析した。その結果、1) 喘息モデルマウスの気道で IL-22 が産生されること、2) IL-22 産生細胞は主に CD4 陽性 T 細胞であり、その多くは IL-17 非産生細胞であること、3) 抗 IL-22 抗体を腹腔内投与し IL-22 を中和すると抗原誘発性気道炎症が増悪すること、4) リコンビナント IL-22 を経鼻投与すると抗原誘発性気道炎症は減弱すること、5) IL-22 の標的細胞は気道上皮細胞であり、IL-22 は気道上皮細胞による IL-25 の産生を抑制することを見出した。

さらに本研究者は IgE 産生抑制作用を示す IL-21 の産生制御機構を解析した。その結果、1) c-Maf は、CD4 陽性 T 細胞において STAT3 依存的に発現が誘導されること、2) c-Maf は直接 IL-21 プロモーターや CNS-2 エンハンサーに結合し、IL-21 の転写を促進していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Asthma is chronic airway inflammation characterized by eosinophil infiltration, mucus hypersecretion, and airway hyperresponsiveness (AHR) to a variety of stimuli. These characteristics are mainly mediated by antigen-specific Th2 cells and their cytokines including IL-4, IL-5, and IL-13. Moreover, we and others have shown that Th17 cells induce neutrophilic airway inflammation in part through the production of IL-17A. More recently, IL-22, one of Th17 cell-derived cytokines with both proinflammatory and anti-inflammatory properties, has been shown to be detected in the airways in a murine model of asthma. However, the role of IL-22 in the regulation of allergic airway inflammation remains largely unknown.

In this study, we found that IL-22 was produced by CD4⁺ T cells infiltrating in the airways upon antigen challenge, that the neutralization of IL-22 by anti-IL-22 antibody in the effector phase enhanced antigen-induced eosinophil recruitment into the airways, and that intranasal administration of recombinant IL-22 inhibited antigen-induced eosinophil recruitment into the airways. We also found that anti-IL-22 antibody enhanced antigen-induced IL-25 production in the airways, which is known to enhance Th2-type immune responses in the airways, and indeed co-injection of anti-IL-25 antibody reversed the enhancing effect of anti-IL-22 antibody on

antigen-induced eosinophil recruitment into the airways. Finally, we found that IL-22 inhibited IL-13-mediated enhancement of IL-25 expression in LPS-stimulated lung epithelial cell line MLE-15 cells. Our results suggest that IL-22 attenuates antigen-induced airway inflammation in part by inhibiting the expression of IL-25 in lung epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：閉塞性肺疾患

キーワード：喘息、IL-22、IL-21、c-Maf、T細胞、免疫療法

1. 研究開始当初の背景

近年、Th1細胞/Th2細胞とは異なるT細胞サブセットとしてIL-17産生CD4陽性T細胞(Th17細胞)が同定され、IL-23がTh17細胞の生存維持及び機能発現に重要な役割を果たすこと、IL-23-Th17細胞経路が多くの慢性炎症性疾患の病態に関与していることが明らかにされた。一方、本研究者らは、アレルギー性気道炎症におけるIL-23の役割にいち早く着目し、①アレルギー性気道炎症の局所でIL-23の産生が認められること、②IL-23の中和は、好中球性炎症のみでなく、好酸球性炎症も抑制すること、③肺特異的IL-23発現マウス(CC10 IL-23マウス)では、抗原吸入による好中球性炎症と好酸球性炎症の増強が認められ、重症喘息の病態と類似すること、④抗原特異的Th17細胞の細胞移入はTh2細胞依存的な好酸球性炎症を増強すること(Am J Respir Crit Care Med 2008)を明らかにするなど、アレルギー性気道炎症におけるIL-23-Th17細胞経路の研究において先駆的な役割を果たしてきた。

さらに最近、本研究者は、アレルギー疾患に対する唯一の根治療法である抗原特異的免疫療法の改良に結びつく可能性が高い二つの研究成果を得た。第一の成果は、ナイーブCD4陽性T細胞をIL-6の存在下で抗原刺激するとIL-21を大量に産生する細胞(誘導性IL-21産生T細胞)を誘導できることを見出したことである(J Exp Med 2008)。IL-21

はIgE産生を特異的に抑制すること(Blood 2002)、誘導性IL-21産生T細胞はリンパ濾胞におけるB細胞分化に重要な役割を果たす濾胞BヘルパーT(T_{FH})細胞と類似した形質を有することより、抗原特異的な誘導性IL-21産生T細胞を用いることでIgE産生を特異的に抑制できることが期待される。

第二の成果は、アレルギー性気道炎症の局所でIL-22を産生するT細胞が存在することを見出したことである。IL-22は、外界に接する腸管や気道における免疫応答に重要な役割を果たすことが示唆されており、アレルギー性気道炎症におけるIL-22の役割を解明することにより、抗原特異的免疫療法の開発に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

従って本研究では、1) T細胞におけるIL-21産生制御の分子メカニズムを明らかにすること、2)アレルギー性気道炎症におけるIL-22の役割を明らかにすることにより重症喘息に対する新規免疫療法の開発基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IL-21産生の分子メカニズムの解明

1) レトロウイルス発現系を用いてT細胞におけるIL-21産生制御機構を検討した。

2) IL-21の発現制御領域を同定し、レポーター法を用いてIL-21発現制御の分子メカニズムを検討した。

(2) アレルギー性気道炎症におけるIL-22の

役割の解明

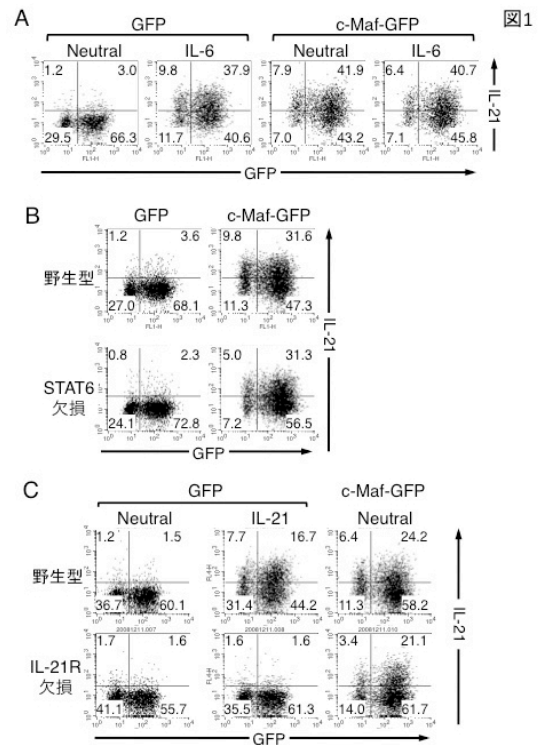
- 1) アレルギー性気道炎症における IL-22 産生細胞の詳細を FACS および免疫染色を用いて検討した。
- 2) アレルギー性気道炎症における IL-22 の役割を対する抗 IL-22 抗体を用いて検討した。
- 3) 喘息モデルマウスを用いて IL-22 の作用メカニズムを検討した。
4. 研究成果

(1) IL-21 産生の分子メカニズムの解明

1) IL-21 産生における cMaf の役割の解析

IL-21 の産生は、Th17 細胞や T_{FH} 細胞以外にも Th2 細胞で報告されている。そして Th2 細胞では NFATc2 が IL-21 のプロモーター領域に結合し IL-21 の転写を促進すること、Th1 細胞では T-bet が NFATc2 の IL-21 プロモーターへの結合を阻害することにより転写を抑制していることが示されている。一方、Th17 細胞における IL-21 の産生には、IL-6/IL-21 による STAT3 の活性化は必須だが、ROR γ t の発現は必須でないことが示されている。さらに最近、これまで Th2 細胞特異的転写因子と考えられていた c-Maf の遺伝子欠損マウスでは、T_{FH} 細胞の分化が抑制されることが報告された。IL-21 産生能を有する Th2 細胞、Th17 細胞、T_{FH} 細胞のすべてに c-Maf が発現していることも報告されており、IL-21 産生における c-Maf の関与が示唆される。

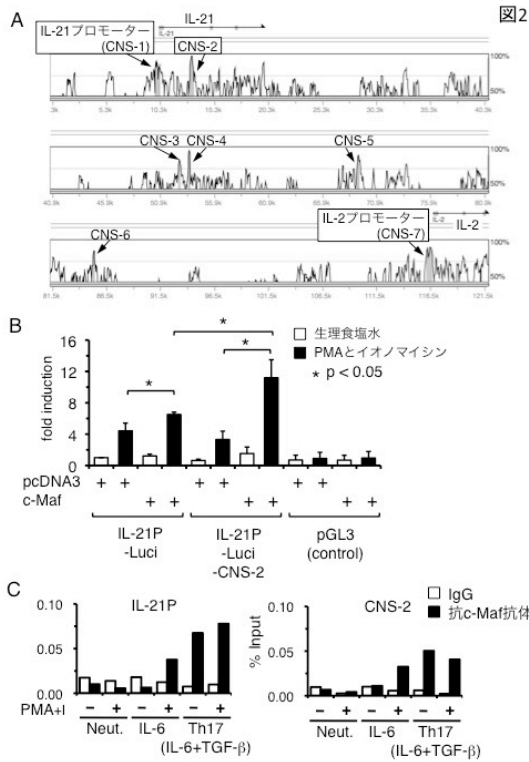
そこで本研究では、c-Maf による IL-21 の産生誘導機構を検討した(発表論文 6)。その結果、レトロウイルスを用いて c-Maf を発現させた CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激すると、IL-21 産生細胞の分化が強く誘導された(図 1A)。c-Maf が IL-4 産生を誘導し、Th2 細胞による IL-21 産生を亢進させている可能性を考慮し、STAT6 欠損マウスを用いて同様の検討を行ったが、STAT6 欠損マウスにおいても c-Maf による IL-21 産生誘導は野生型マウスと同等に認められた(図 1B)。すなわち、c-Maf は IL-4-STAT6 経路非依存的に IL-21 の産生を誘導していることが示唆される。IL-21 は IL-21 産生 T 細胞の自己増殖因子として機能するため、IL-21 受容体欠損マウスの CD4 陽性 T 細胞においても同様の検討を行ったが、c-Maf による IL-21 産生誘導は野生型マウスと同等に認められた(図 1C)。以上より、c-Maf は IL-21 の産生を直接誘導していることが示唆された。



2) c-Maf による IL-21 産生誘導機構の解析

IL-21 遺伝子はマウスでは3番染色体、ヒトでは4番染色体上に IL-2 遺伝子と近接して存在する。そしてマウスとヒトの IL-21-IL-2 遺伝子座の相同性を検索したところ、保存された非コーディング領域 (conserved non-coding sequence, CNS) が7個存在することが明らかとなった(図 2A)。これらの CNS で Maf 認識配列 (Maf responsive element, MARE) を検索したところ、IL-21 遺伝子のプロモーター領域に相当する CNS-1 に2カ所の MARE が、IL-21 遺伝子のイントロン2に存在する CNS-2 に2カ所の MARE が予測された。そこで c-Maf が IL-21 プロモーター(IL-21P)と CNS-2 の活性化を誘導するか否かをレポーター法を用いて解析した(図 2B)。その結果、IL-21 プロモーターは PMA+ionomycin(PMA+I)刺激により活性化され、c-Maf は PMA+I による IL-21 プロモーターの活性化を有意に増強した。さらに IL-21 プロモーターの下流に CNS-2 を挿入したレポーターベクターでは、c-Maf による活性化がより強く促進された(図 2B)。さらに CD4 陽性 T 細胞において c-Maf が IL-21 プロモーターや CNS-2 エンハンサーに結合しているか否かをクロマチン免疫沈降法を用いて検討したところ、c-Maf は、IL-6 刺激下で IL-21 プロモーターや CNS-2 エンハンサーに結合していることが明らかとなった(図 2C)。以上より、c-Maf は、CD4 陽性 T 細胞において直接 IL-21 プロモーターや

CNS-2 エンハンサーに結合し、IL-21 の転写を促進していることが明らかとなった。



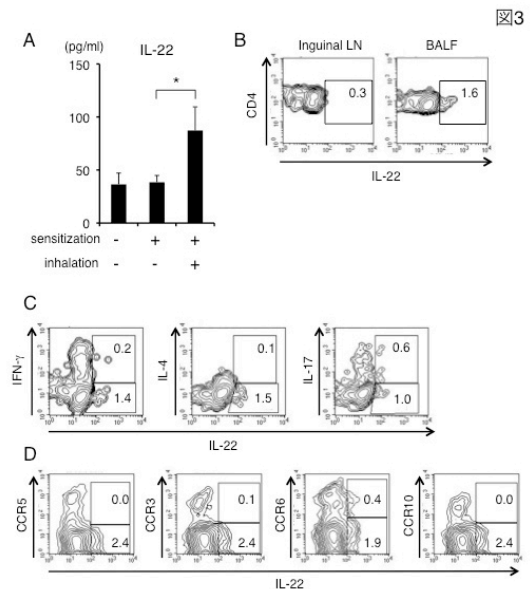
(2) アレルギー性気道炎症における IL-22 の役割の解明

これまで IL-22 は Th17 細胞のみが産生すると考えられてきたが、近年の解析により LTi 様細胞、皮膚に存在する CCR10 陽性細胞、NKp46+NK 細胞なども IL-22 を産生することが報告された。さらに、IL-22 は乾癬などの皮膚の炎症性疾患に対しては促進的に作用するが、炎症性腸疾患などにおいては抑制的に作用することが示されている。しかし、アレルギー性気道炎症における IL-22 の役割は不明であり、本研究ではその解明を目的とした。

1) アレルギー性気道炎症における IL-22 産生細胞の同定

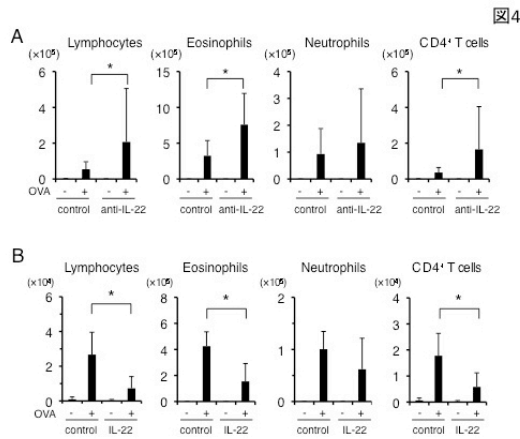
OVA/alum により腹腔内感作した BALB/c マウスに OVA を吸入し、アレルギー性気道炎症を惹起した。マウスの肺胞洗浄液(BALF)中の IL-22 を ELISA 法により測定したところ、OVA で感作したマウスに OVA を吸入投与することにより IL-22 が検出された(図 3A)(発表論文 12)。次にいかなる細胞が IL-22 を産生しているのかを明らかにするため、細胞内サイトカイン染色法と免疫染色により IL-22 産生細胞を検討した。その結果、BALF 中の CD4 陽性 T 細胞が IL-22 を産生していることが明らかとなった(図 3B)。

次に IL-22 産生 CD4 陽性 T 細胞は既存の Th 細胞サブセットと同一か否かを検討した。その結果、一部の IL-22 産生細胞は IL-17A を同時に産生するものの、IL-22 産生細胞の大部分は、IL-17A, IL-4, IFN- γ を産生しないことが明らかとなった(図 3C)。ケモカインレセプターと IL-22 の二重染色の解析からも IL-22 産生細胞の大部分は Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞とは異なる細胞分画であることが示唆された(図 3D)。



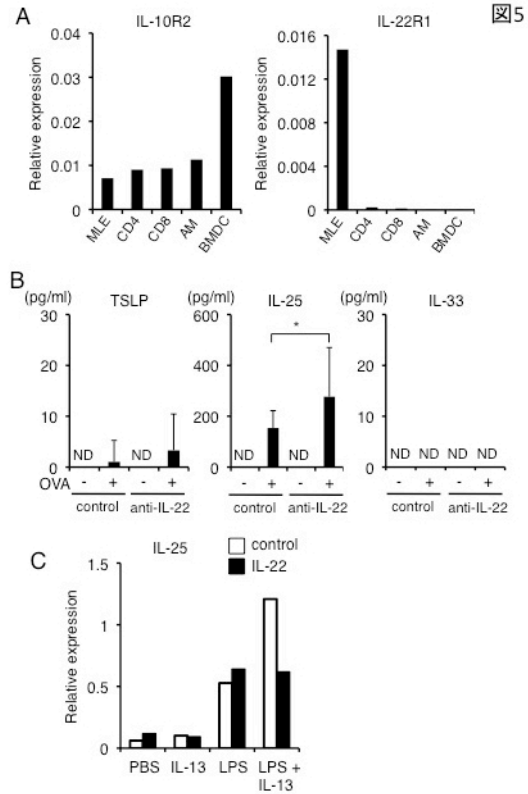
2) アレルギー性気道炎症における IL-22 の役割の解明

次に喘息モデルマウスを用いて内因性の IL-22 を抗体により中和する実験、および外因性にリコンビナント IL-22 を投与する実験を行いアレルギー性気道炎症における IL-22 の役割を検討した。OVA で感作した BALB/c マウスに抗 IL-22 抗体を投与した後にアレルギー性気道炎症を惹起したところ、リンパ球と好酸球の BALF 中への浸潤が有意に増強された(図 4A)。抗 IL-22 抗体の投与は BALF 中の IL-13 と IL-17 の産生レベルも有意に増強した。Goblet 細胞の過形成、および気道過敏性も抗 IL-22 抗体の投与により増強された。一方、リコンビナント IL-22 の投与は、リンパ球と好酸球の浸潤を有意に抑制した(図 4B)。以上の結果から、IL-22 はアレルギー性気道炎症に対し、抑制的に機能していることが明らかとなった。



3) IL-22 の作用メカニズムの解明

次に IL-22 が如何にしてアレルギー性気道炎症を抑制するのかを明らかにするため、IL-22 受容体を発現する標的細胞について検討を行った。IL-22 受容体は IL-22 受容体に特異的な IL-22R1 と、IL-10 受容体と共有される IL-10R2 のヘテロダイマーより構成されるため、アレルギー性炎症への関与が推定される種々の細胞における IL-22R と IL-10R2 の発現を定量的 PCR 法により検討した。その結果、IL-22R は血球系細胞には発現しておらず、肺胞上皮細胞より樹立された細胞株 MLE 細胞に高発現していた(図 5A)。一方、IL-10R は血球系細胞にも MLE 細胞にも発現が認められた(図 5A)。以上の結果から、肺においては気道上皮細胞が IL-22 の標的細胞であることが示唆された。そこで喘息モデルマウスの実験系において気道上皮細胞由来のサイトカイン(TSLP、IL-25、IL-33)の産生が抗 IL-22 抗体の投与により影響を受けるか否かを検討した。その結果、抗 IL-22 抗体を投与したマウスの BALF では IL-25 が有意に上昇することが明らかとなった(図 5B)。一方、TSLP と IL-33 はほとんどのマウスで検出感度以下であった(図 5B)。さらに IL-22 が気道上皮細胞に直接作用して IL-25 産生を制御しているか否かを明らかにするため、MLE 細胞を用いて IL-22 の IL-25 産生に対する作用を検討した。その結果、IL-22 は LPS と IL-13 の存在下で誘導される IL-25 の発現を有意に抑制した(図 5C)。以上の結果より、IL-22 はアレルギー性気道炎症の局所で CD4 陽性 T 細胞により産生され、気道上皮細胞に作用し IL-25 産生を抑制することによりアレルギー性気道炎症を抑制していることが示唆された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件、すべて査読あり)

1. Suzuki K, Murphy SH, Xia Y, Yokota M, Nakagomi D, Liu F, Verma IM, Nakajima H. Tumor suppressor p53 functions as a negative regulator in IgE-mediated mast cell activation. *PLoS One*. 6:e25412, 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0025412
2. Takahashi K, Hirose K, Kawashima S, Niwa Y, Wakashin H, Iwata A, Tokoyoda K, Renaud JC, Iwamoto I, Nakayama T, Nakajima H. IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128:1067-76, 2011, DOI: 10.1016/j.jaci.2011.06.018
3. Iida K, Suzuki K, Yokota M, Nakagomi D, Wakashin H, Iwata A, Kawashima H, Takatori H, Nakajima H. STAT4 is required for IFN- β -induced MCP-1 mRNA expression in murine mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 155:s71-76, 2011, DOI: 10.1159/000327300
4. Oki M, Watanabe N, Owada T, Oya Y, Ikeda K, Saito Y, Matsumura R, Seto Y, Iwamoto I, Nakajima H. A functional polymorphism in B and T lymphocyte attenuator is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin. Dev. Immunol.* 305656, 2011, DOI: 10.1155/2011/305656

5. Oya Y, Watanabe N, Owada T, Oki M, Ikeda K, Suto A, Kagami S-I, Hirose K, Kishimoto T, Nakajima H. Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-*lpr/lpr* mice. *Int. Immunol.* 23:335-44, 2011,
DOI: 10.1093/intimm/dxr017

6. Kashiwakuma D, Suto A, Hiramatsu Y, Ikeda K, Takatori H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H. B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular helper T cells and subsequent humoral immune responses. *J. Immunol.* 185:2730-2736, 2010,
DOI: 10.4049/jimmunol.0903839

7. Kanari H, Kagami S, Kashiwakuma D, Oya Y, Furuta S, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Watanabe N, Okamoto Y, Yamamoto S, Iwamoto I, Nakajima H. Role of Th2 cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152:s47-53, 2010,
DOI: 10.1159/000312125

8. Hiramatsu Y, Suto A, Kashiwakuma D, Kanari H, Kagami S, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Grusby MJ, Iwamoto I, Nakajima H. c-Maf activates the promoter and enhancer of IL-21 gene while TGF- β inhibits c-Maf-induced IL-21 expression in CD4⁺ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 87:703-712, 2010,
DOI: 10.1189/jlb.0909639

9. Owada T, Watanabe N, Oki M, Oya Y, Saito Y, Saito T, Iwamoto I, Murphy TL, Murphy KM, Nakajima H. Activation-induced accumulation of B and T lymphocyte attenuator at the immunological synapse in CD4⁺ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 87:425-432, 2010,
DOI: 10.1189/jlb.0309138

10. Hasegawa A, Hayashi K, Kishimoto H, Yang M, Tofukuji S, Suzuki K, Nakajima H, Hoffman RM, Shirai M, Nakayama T. Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:461-468, 2010,
DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.016

11. Iwata A, Watanabe N, Oya Y, Owada T, Ikeda K, Suto A, Kagami S, Hirose K, Kanari H, Kawashima S, Nakayama T, Taniguchi M, Iwamoto I, Nakajima H. Protective roles of B and T lymphocyte attenuator (BTLA) in NKT cell-mediated experimental hepatitis. *J. Immunol.* 184:127-133, 2010,
DOI: 10.4049/jimmunol.0900389

12. Tamachi T, Takatori H, Fujiwara M, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H. STAT6 Inhibits

T-bet-independent Th1 cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382:751-755, 2009,
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.03.101

13. Kagami S, Owada T, Kanari H, Saito Y, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H. Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 21:679-689, 2009,
DOI: 10.1093/intimm/dxp037

〔学会発表〕(計1件)

中島裕史 胚中心反応と濾胞ヘルパーT細胞に関する最近の話題 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012年11月10日 東京

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 関節リウマチに対する抗IL-6受容体抗体療法の有効性の予測方法
発明者: 中島裕史、池田 啓、加々美新一郎、鈴木快枝、中山俊憲、岩本逸夫、古田俊介、小原 収、野中 謙、山下政克、的場 亮

権利者: 千葉大学

番号: 特願2011-156921

出願年月日: 2011年7月15日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ: <http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 00322024

(2) 研究分担者

加々美 新一郎 (KAGAMI SHIN-ICHIRO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30375654

(H21→H23)

廣瀬 晃一 (HIROSE KOICHI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90400887

(H21→H23)

渡辺 紀彦 (WATANABE NORIHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 20375653

(H21→H22)

須藤 明 (SUTO AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 50447306

(H21→H22)

(3) 連携研究者

該当無し