様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　6 年　　6 月 16 日現在

機関番号：16301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K08205

研究課題名（和文）T細胞機能の異常が誘発する肺の恒常性破綻の分子機構とその制御機構の解明

研究課題名（英文）Role of T cell on lung homeostasis and dieseases

研究代表者
桑原　誠（Kuwahara, Makoto）

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00568214

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺CD4 T細胞のBach2発現の著しい低下や欠失は、Th2細胞のIL-7-mTORシグナルを活性化して、IL-33R+ Th2細胞の分化を誘導することがわかった。IL-33R+ Th2 細胞は肺環境のIL-7/IL-33依存的にTh2 自然免疫応答を遷延させ、慢性アレルギー性気道炎症を誘発させることが明らかになった。また、肺のTreg細胞やCD8 T細胞でBach2の発現が低下しないと、肺胞蛋白症様の病態を形成することがわかった。以上の結果から、 T細胞のBach2発現レベルが適切に維持されることで、肺の恒常性が維持されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
T 細胞における Bach2 の発現不全が 不適切な免疫応答を誘導し、それにより肺の恒常性が破綻することで様々な呼吸器疾患が発症するという新規概念の提唱を目指す本申請研究は、学術的な独自性が極めて高い。また、本研究の進展によって得られた成果により、呼吸器疾患発症の新規メカニズムを提唱できるだけでなく、Bach2 下流分子を標的とした新規治療法の開発研究に発展する可能性が高い。つまり本申請研究は、「T 細胞による肺恒常性維持という新規概念の提唱」、「呼吸器疾患の発症機構の統合的理解」、「呼吸器疾患の新規治療戦略の提唱」という３つの側面を持つ創造性の高い研究である。

研究成果の概要（英文）：A reduction in Bach2 expression in lung CD4 T cells was found to activate IL-7-mTOR signalling in Th2 cells, leading to the differentiation of IL-33R+ Th2 cells. These IL-33R + Th2 cells then prolonged Th2 innate immune responses in the lung environment in an IL-7/IL-33-dependent manner, ultimately leading to the development of chronic allergic airway inflammation. Interestingly, the absence of reduced Bach2 expression in Treg and CD8 T cells in the lungs led to the formation of an alveolar proteinosis-like pathology. These findings highlight the complex interplay between Bach2 expression and the maintenance of lung homeostasis.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞自然免疫応答　Bach2

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景
転写調節因子 Bach2 は、T 細胞、B 細胞、肥満細胞、NK 細胞で主に発現している。Bach2 は AP-1 結合配列に結合し、AP-1 複合体や Nrf2/Maf 複合体の結合を阻害し、それらの転写活性を負に制御している分子である。ヒト BACH2 の一塩基多型は様々な臓器特異的免疫疾患と関連することが報告されている。申請者は、これまで Bach2 による T 細胞の分化・機能発現の制御について研究してきた。しかし、T 細胞に発現する Bach2 が臓器の恒常性維持に重要であり、その発現不全が臓器特異的免疫疾患の発症を誘発するのかについては未だ明らかになっていない。そこで本申請研究では、「T 細胞における Bach2 の適切な発現調節が肺の恒常性維持に重要であり、その破綻が呼吸器疾患を誘発する」という学術的問いを立て、これを実証するための研究を計画・立案するに至った。
Bach2 は、抗原やサイトカインなどの刺激（環境）に応じてその発現量が調節され、その発現は T 細胞の分化や機能に大きな影響を与える。申請者らは、Bach2 が転写因子 Batf と複合体を形成して 、AP-1 依存的な転写活性を抑制していることを明らかにしてきた (Kuwahara, Nat. Commun., 2016)。AP-1 複合体の活性化は、エフェクター T 細胞の分化促進を介して炎症を誘発するのに対し、活性の低下はアナジーや疲弊など免疫不全や免疫寛容につながる。したがって、Bach2 の適切な発現調節が、正常な T 細胞免疫応答に必須であると予想される。申請者らは、Bach2 欠損 (Bach2 KO) CD4 T 細胞では Th2 細胞分化が亢進し、Bach2 TG CD4 T 細胞では Treg 分化が亢進するなど、Bach2 の発現の制御不全が、Th 細胞分化を極端にシフトさせてしまうことを確認している。さらに、T 細胞特異的 Bach2 KO マウスの肺では IL-33R+ Th2 細胞が増加し、アレルギー性気道炎症が自然発症する一方で、T 細胞特異的 Bach2 TG マウスの肺では PD-1+ Treg が増加するとともに、致死性の肺胞蛋白症が自然発症することを新たに見出している 。これらの結果は、T 細胞で Bach2 の発現が大きく変動するだけで肺の恒常性が破綻し、呼吸器疾患が発症することを示している。しかし、Bach2 による IL-33R+ Th2 細胞分化制御および PD-1+ Treg 分化制御の分子機構や、それらの細胞による気道炎症、肺胞蛋白症の発症機序は十分に解明されていない。そこで、本申請研究では Bach2 による T 細胞分化・機能の調節を介した呼吸器疾患制御の全体像を明らかにする研究を遂行することで、冒頭の学術的問いにアプローチする。

２．研究の目的
本申請研究の最終目的は、Bach2 による T 細胞機能の調節を介した肺恒常性維持を証明することである。具体的には、(1) Bach2 欠損による慢性アレルギー性気道炎症の制御と治療方法の解析、(2) 本来 Bach2 が低下する状況において、Bach2 の発現が維持されている場合の呼吸疾患の制御、について解析を行った。

３．研究の方法
T 細胞特異的 Bach2 欠損マウス (Bach2flox/flox x CD4-Cre Tg mice, Bach2 KO mice)、T 細胞特異的 Bach2 KI マウス (Rosa-stop-Bach2 KI x CD4-Cre Tg mice, Bach2 KI mice)、Bach2-tdRFP レポーターマウスを用いて、T 細胞における Bach2 発現量と呼吸器疾患の制御機構を解析した。

４．研究成果
(1) Bach2 によるアレルギー性気道炎症の制御機構の解明
T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスの肺では、CD44+ IL-33R+ CD4 T 細胞が増加し、この細胞は IL-5、IL-13 を産生する Th2 細胞であり、気道炎症を増悪させる病原性 Th2 細胞であることがわかった。IL-33R+ Th2 細胞の特徴は、肺環境の IL-33 に反応して、IL-5、IL-13、Areg を産生し、抗原刺激非依存性に、サイトカイン依存的に Th2 免疫応答 (Th2 細胞自然免疫応答) を遷延させることである。このことから、Bach2 の発現低下によって、抗原特異的 Th2 免疫応答と Th2 自然免疫によって、アレルギー性気道炎症が発症することが考えられる。先述の通り、私たちは、Bach2 は AP-1 依存的な Th2 サイトカイン産生を抑制し、抗原特異的 Th2 免疫応答を制御していることを明らかにしている。そこで、Bach2 による Th2 自然免疫応答の制御機構について解析を実施した。
①Bach2 による Th2 細胞の IL-7 シグナル制御
In vitro で誘導した Th2 細胞は IL-7 依存的に IL-33R の発現が上昇し、IL-7 と IL-33 のコンビネーションで IL-33R 発現が増大することがわかった。Bach2 KO Th 細胞では、IL-7R の発現が増加し、Bach2 KI Th2 細胞では IL-7R の発現が低下した。Bach2 の ChIP-seq. 解析から、Bach2 は *Il7ra* 遺伝子座に結合していたことから、Bach2 は Th2 細胞の IL-7Ra の発現を抑制していることが明らかになった。終末分化した Th2 細胞 (IL-5 産生細胞) では Bach2 の発現が著しく低下する。したがって、このような終末分化 Th2 細胞では、IL-7R の発現が上昇し、IL-33R+ Th2 細胞が誘導されることがわっかた。IL-7 下流のシグナルを解析したところ、

mTOR シグナルが活性化すること、Rapamycin 処理で、IL-33R の発現が抑制されたことから、IL-7-mTOR シグナルの活性化が IL-33R の発現誘導を制御していることが明らかになった。また、IL-7-mTOR シグナルによる解糖系の活性化が IL-33R+ Th2 細胞の分化を誘導することが明らかになった。

②IL-7-mTOR 経路による IL-33R+ Th2 細胞の誘導機構

IL-7 刺激した Th2 細胞では、Gfi1 の発現が誘導され、その発現は Rapamycin で抑制されたことから、IL-7-mTOR シグナルの下流分子の一つとして、Gfi1 を同定した。Gfi1 欠損 Th2 細胞では、IL-33R の発現が抑制された。また、Th2 細胞の IL-7 による解糖系の活性化が Gfi1 欠損により低下したことから、IL-7-mTOR-Gfi1 経路を介した解糖系の活性化が IL-33R+ Th2 細胞の分化を誘導することがわかった。

③低分子化合物による IL-33R+ Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症の抑制

私たちは、チオアミド低分子化合物 SH-2251 が Gfi1 の機能を抑制し、Th2 細胞の IL-5 産生を阻害することを報告している（Suzuki. PLoS One, 2013)。そこで、IL-33R+ Th2 細胞における SH-2251 の効果を解析した。In vitro の解析から、SH-2251 処理 Th2 細胞では、IL-33R+ Th2 細胞の分化が抑制された。次に、T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスに SH-2251 を経口投与したところ、気道肺胞洗浄液に浸潤する好酸球の低下、肺の IL-33R+ Th2 細胞の減少が明らかになった。これらの結果は、Gfi1 が IL-33R+ Th2 細胞依存的な慢性アレルギー性気道炎症の治療標的分子の一つであり、SH-2251 が気道炎症治療薬のシーズ化合物となる可能性を示唆するものであった。

以上の結果から、Bach2 は IL-7-mTOR-Gfi1 経路を制御し、IL-33R+ Th2 細胞の誘導を制御していること、Gfi1 の機能を抑制する SH-2251 が IL-33R+ Th2 細胞依存的なアレルギー性気道炎症の治療薬のシーズ化合物となる可能性が明らかになった（図１）

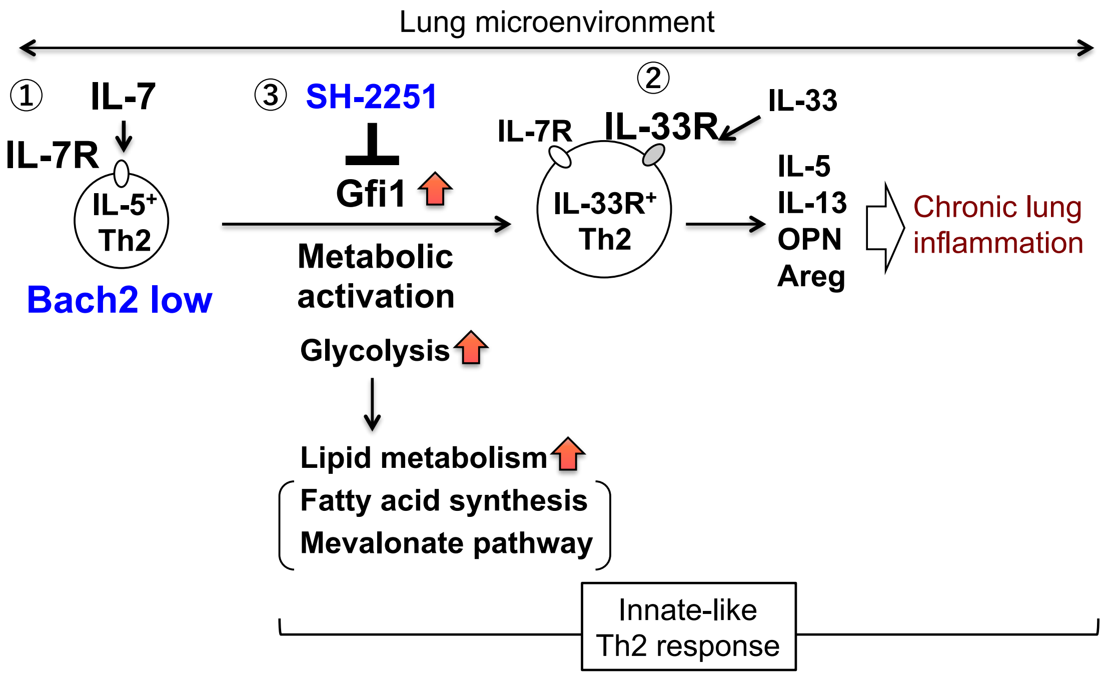

図1. IL-7-mTOR-Gfi1 経路による IL-33R+ Th2 細胞分化制御

①Bach2 は IL-7R の発現を抑制する

②IL-7-mTOR-Gfi1 経路が IL-33R+ Th2 細胞を誘導する

③SH-2251 が IL-33R+ Th2 細胞分化と T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスの IL-33R+ Th2 細胞依存的な慢性アレルギー性気道炎症を抑制する

(2) Bach2 発現が維持された場合の呼吸器疾患制御の解析

前途の通り、T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスの解析から、T 細胞の Bach2 発現が著しく低下すると、IL-33R+ Th2 細胞による慢性アレルギー性気道炎症が発症する。一方で、T 細胞特的 Bach2 KI マウス（Bach2 の強制発現マウス）では、T 細胞の機能不全により、肺胞蛋白症様の病態が形成されることがわかった。Bach2 KI マウスの肺では PD-1 Treg 細胞/CD8 T 細胞が増加し、CD4 T 細胞がすること、また、単球由来のマクロファージが肺胞マクロファージに置き換わることが特徴的であり、Treg 細胞と CD8 T 細胞の増加が肺疾患の誘導に重要であることがわかった。現在、Bach2 KI で Treg 細胞と CD8 T 細胞が増加するメカニズムを解析しているところである。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 Naoki Ikeda, Hiroaki Kubota, Risa Suzuki, Mitsuki Morita, Ayana Yoshimura, Yuya Osada, Keigo Kishida, Daiki Kitamura, Ayaka Iwata, Satoshi Yotsumoto, Masato Tanaka, Kenichi Asano	４．巻 42
２．論文標題 The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Cell Reports	６．最初と最後の頁 112165～112165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Okamoto Michiko、Omori-Miyake Miyuki、Kuwahara Makoto、Okabe Masataka、Eguchi Mariko、Yamashita Masakatsu	４．巻 -
２．論文標題 The Inhibition of Glycolysis in T Cells by a Jak Inhibitor Ameliorates the Pathogenesis of Allergic Contact Dermatitis in Mice	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	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） 10.1016/j.jid.2023.03.1667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Noda Haruna、Suzuki Junpei、Matsuoka Yuko、Matsumoto Akira、Kuwahara Makoto、Kamei Yoshiaki、Takada Yasutsugu、Yamashita Masakatsu	４．巻 -
２．論文標題 The histone demethylase Utx controls <scp>CD8</scp> ⁺ T‐cell‐dependent antitumor immunity via epigenetic regulation of the effector function	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Cancer Science	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） 10.1111/cas.15814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Inoue Takashi、Omori-Miyake Miyuki、Maruyama Saho、Okabe Masataka、Kuwahara Makoto、Honda Hiroaki、Miura Hiromasa、Yamashita Masakatsu	４．巻 207
２．論文標題 The Loss of H3K27 Histone Demethylase Utx in T Cells Aggravates Allergic Contact Dermatitis	５．発行年 2021年
３．雑誌名 The Journal of Immunology	６．最初と最後の頁 2223～2234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2001160	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 Konishi Amane、Suzuki Junpei、Kuwahara Makoto、Matsumoto Akira、Nomura Shunsuke、Soga Tomoyoshi、Yorozuya Toshihiro、Yamashita Masakatsu	4．巻 588
2．論文標題 Glucocorticoid imprints a low glucose metabolism onto CD8 T cells and induces the persistent suppression of the immune response	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6．最初と最後の頁 34～40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 Kuwahara Makoto, Suzuki Junpei, Maruyama Saho, Nakamura Yukihiro, Hamaguchi Naohiko, Yamaguchi Osamu, Yamashita Masakatsu
2．発表標題 A thioamide-related small compound SH-2251, an inhibitor of transcriptional repressor Gfi1 expression, inhibits IL-7/IL-33-dependent innate Th2 response and Th2-type chronic lung inflammation
3．学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大
4．発表年 2022年

1．発表者名 桑原 誠、山下 政克
2．発表標題 Transcriptional repressor Gfi1 induces IL-7/IL-33-dependent innate-like Th2 responses by activating cellular metabolism
3．学会等名 第70回日本アレルギー学会
4．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学大学院医学系研究科免疫学・感染防御学
https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/immunology/
愛媛大学免疫学感染防御学
https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/immunology/

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

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