

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20754

研究課題名（和文）酸化ストレス制御機構によるMemory Th2細胞形成を介した喘息悪化の機序解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of asthma exacerbation via memory Th2 cell formation by oxidative stress regulation

研究代表者

小久保 幸太（KOKUBO, Kota）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20907711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：喘息をはじめとするアレルギー性疾患の患者数は先進国、発展途上国を問わず増加の一途をたどっている。アレルギー性疾患の発症・悪化には、抗原と反応したeffector Th2細胞からのmemory Th2細胞形成が主要な役割を果たしている。我々は本研究において、酸化ストレス除去機構の制御因子であるTxnipがmemory Th2細胞形成を介して喘息病態の悪化に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は本研究において、酸化ストレス除去機構の制御因子であるTxnipがmemory Th2細胞形成を介して喘息病態の悪化に働くことを明らかにした。本研究は、これまで未解明であった「喘息の病態形成における酸化ストレス量制御の役割」に迫るものである。また、Txnipが気道炎症病態に影響することは新たな発見であり、酸化ストレス量の制御機構を標的としたアレルギー性疾患の新規治療法開発につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The number of patients with asthma and other allergic diseases continues to increase in both developed and developing countries. The formation of memory Th2 cells from effector Th2 cells that react to antigens plays a major role in the onset and exacerbation of allergic diseases. In this study, we showed that Txnip, a regulator of the oxidative stress removal mechanism, acted on the exacerbation of asthma pathology through memory Th2 cell formation.

研究分野：免疫学

キーワード：Memory Th2細胞 酸化ストレス Txnip アレルギー性疾患 喘息

1. 研究開始当初の背景

喘息は根本的な治療法のない疾患であり、対症療法のみが行われている。患者数の増加に伴い、喘息の年間医療費は日本で3,500億円にも昇り (The Global Asthma Report, 2014)、わが国の医療経済を圧迫する一因となっている。喘息などのアレルギー性疾患の病態形成には、抗原による effector Th2 細胞の活性化と、その後の memory Th2 細胞形成が重要である。Th2 細胞分化の過程においては、エネルギー産生に伴う酸化ストレスが細胞内に発生するため、酸化ストレス量の抑制が、effector Th2 細胞の活性化やアポトーシスの抑制に重要である (Mak T W *et al. Immunity*, 2017)。一方、memory Th2 細胞の形成に対する酸化ストレス量制御の役割については依然不明なままであった。そこで、我々は本研究を通じて、喘息の病態形成に重要である memory Th2 細胞形成に対する酸化ストレス量制御の役割を解明すること、さらには新規喘息治療法の開発基盤を構築することを目標とした。

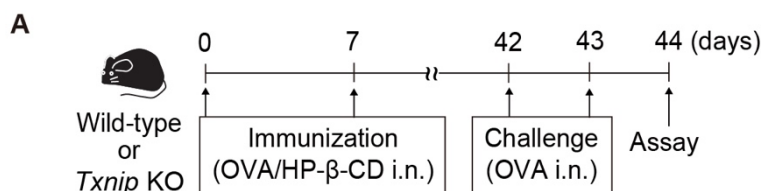
2. 研究の目的

本研究は、*Txnip* を研究対象として用いることで、これまで未解明であった「喘息の病態形成における酸化ストレス量制御の役割」を明らかにすることを目的とした。これまでの研究により我々は、*Txnip* を欠損した Th2 細胞では、酸化ストレス量が上昇し、アポトーシスが亢進することを発見していた。また、*Txnip* 欠損 Th2 細胞から形成される memory Th2 細胞の数は、野生型と比較して減少することも確認していた。そこで、本補助事業期間においては、下記の内容の検討を行った。①マウス気道炎症モデルを用いた際に、T 細胞特異的な *Txnip* 欠損マウスでは、肺中の memory CD4 T 細胞数が減少し、気道への炎症細胞浸潤が減弱するのか。② *Txnip* 過剰発現 Th2 細胞を移入したマウスにおいては、反対に気道炎症病態の悪化が観察されるのか。つまり、Th2 細胞中の *Txnip* が memory Th2 細胞形成の促進を介して、気道炎症病態を悪化させる可能性について検討を行った。

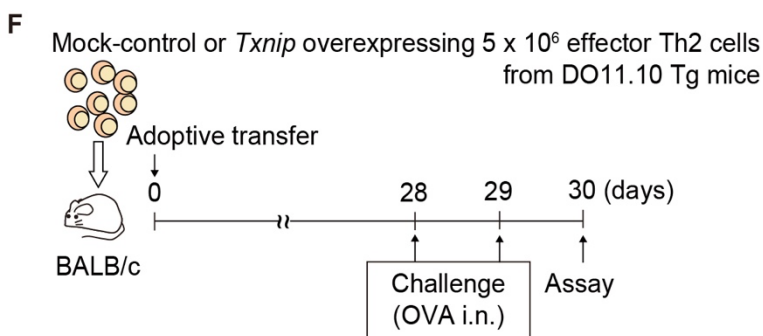
3. 研究の方法

まず「①マウス気道炎症モデルを用いた際に、T 細胞特異的な *Txnip* 欠損マウスでは、肺中の memory CD4 T 細胞数が減少し、気道への炎症細胞浸潤が減弱するのか」を検討するために図 A の実験を行った。

この実験系においては、野生型または T 細胞特異的な *Txnip* 欠損 C57BL/6 マウスに、卵白アルブミン (OVA) と HP- β -CD アジュバントを 0, 7 日目に経鼻投与した。続いて、OVA を抗原として認識し活性化した CD4 T 細胞から memory T 細胞が形成されたと考えられる 42, 43 日目に OVA を再度経鼻投与した。そして、翌日 44 日目に気道炎症病態を評価した。



次に「② *Txnip* 過剰発現 Th2 細胞を移入したマウスにおいては、反対に気道炎症病態の悪化が観察されるのか」を検討するために図 F の実験を行った。この実験系においては、Mock コントロールまたは *Txnip* を過剰発現させた OVA 特異的 effector Th2 細胞を野生型 BALB/c マウスへと移入した。そして、移入した effector Th2 細胞から memory Th2 細胞が形成されたと考えられる 28, 29 日目に OVA を経鼻投与し、翌日 30 日目に気道炎症病態を評価した。



上記の2つの実験系より、Th2 細胞中の *Txnip* が memory Th2 細胞形成の促進を介して、気道炎症病態を悪化させる可能性について検討を行った。

4. 研究成果

図 A の実験系において、まずは肺の memory T 細胞 ($CD4^+CD44^{high}$) の細胞数を調査した。実験には、OVA を投与しない野生型 (Wild-type) または *Txnip* 欠損 (*Txnip* KO) マウスと、OVA を投与した Wild-type または *Txnip* KO マウスの 4 群を用いた。その結果、*Txnip* 欠損はメモリー T 細胞数を減少させることがわかった (図 B)。また、肺胞への炎症細胞浸潤を観察した。マクロファージ (Mac.)、リンパ球 (Lym.)、好中球 (Neut.)、好酸球 (Eos.)、総細胞 (Total) の細胞数を測定した所、*Txnip* 欠損が肺胞洗浄液 (BALF) 中の好酸球と総浸潤細胞数を減少させることが明らかになった (図 C)。また、BALF 中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA で測定した所、気道炎症に伴って誘導される Th2 由来の炎症性サイトカインが、*Txnip* KO マウスでは減少していることが観察された (図 D)。さらに、肺組織に対して H&E 染色を行うことで、炎症細胞浸潤を観察した所、*Txnip* KO マウスでは気管支周囲への炎症細胞浸潤が減少していることが観察された (図 E)。

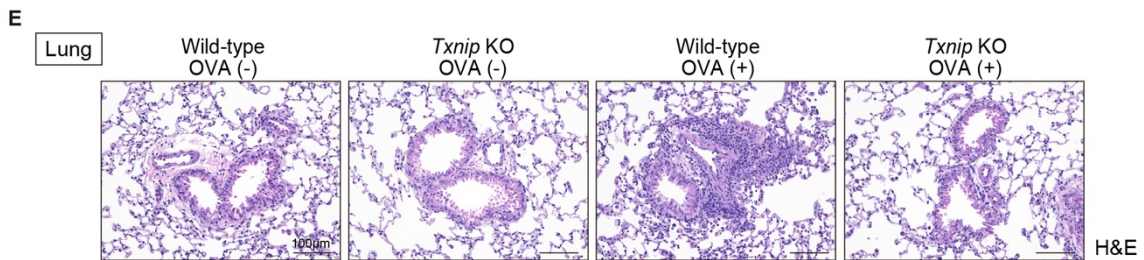
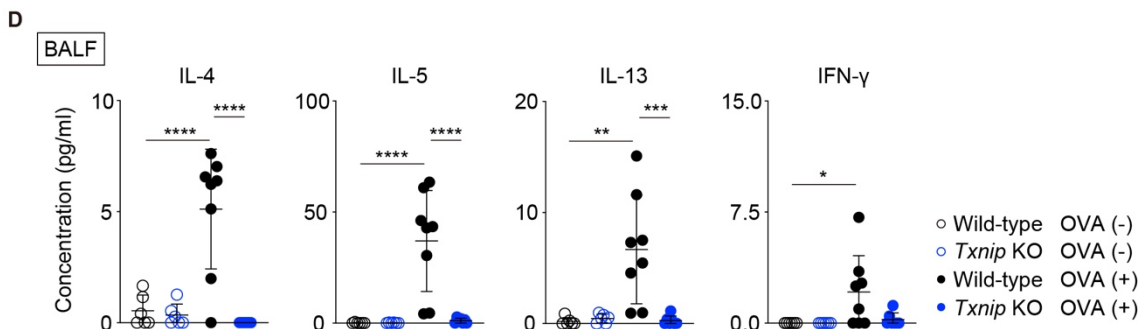
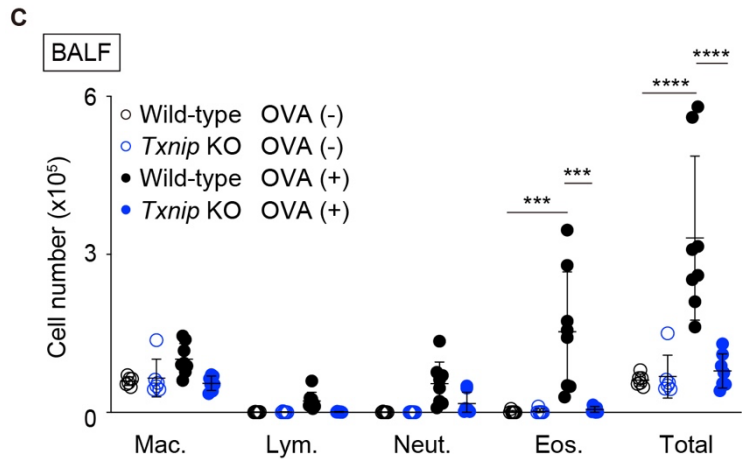
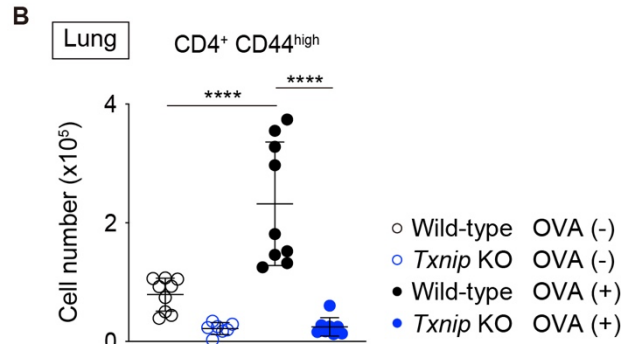
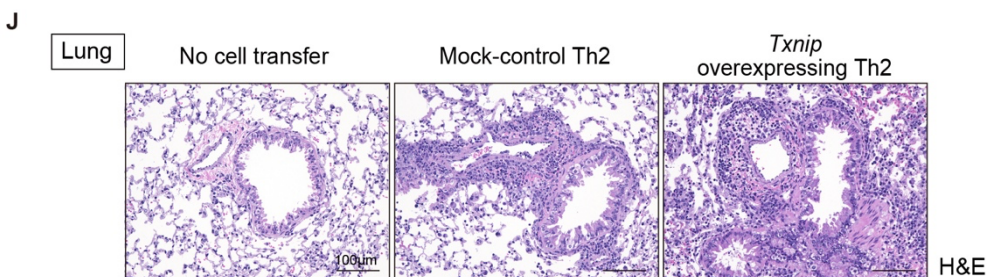
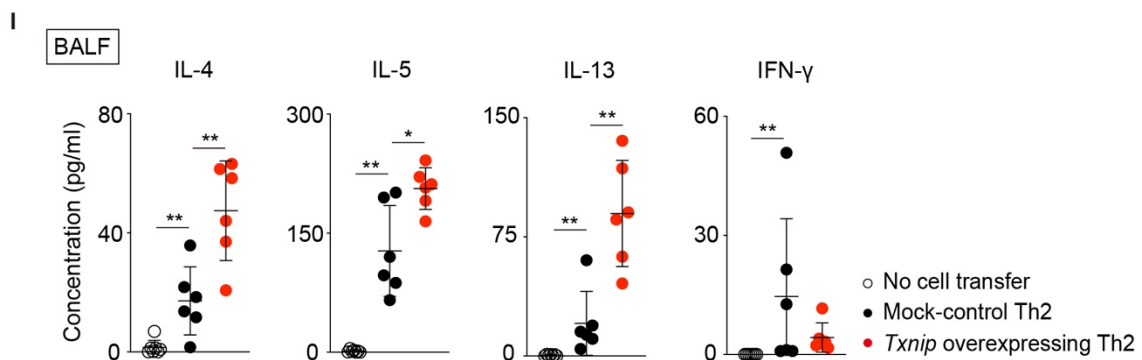
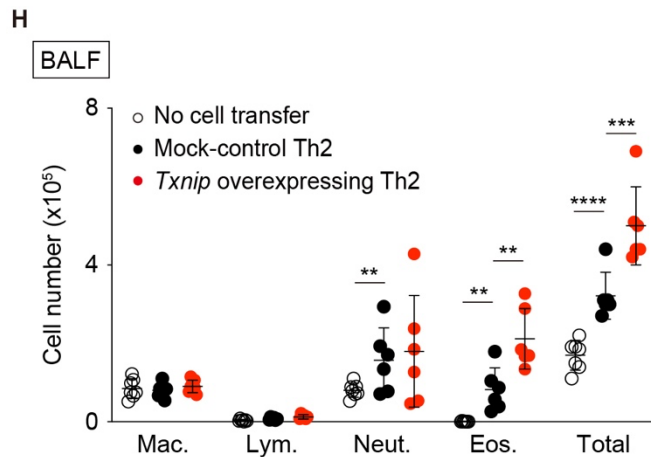
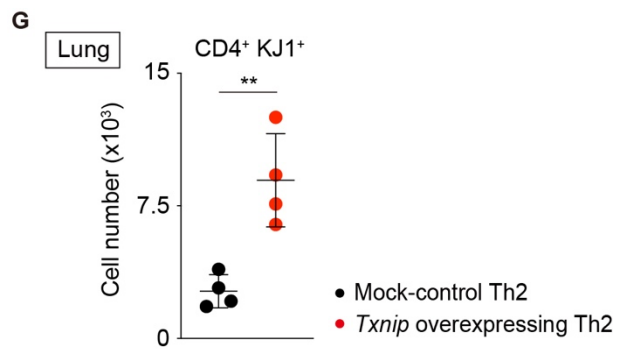


図 F の実験系において、まずは肺中の memory Th2 細胞 (CD4⁺KJ1⁺) の細胞数を調査した。Mock コントロールを過剰発現させた effector Th2 細胞を移入したマウスよりも、*Txnip* を過剰発現させた effector Th2 細胞を移入したマウスの方で有意に多い memory Th2 細胞が観察された。つまり、*Txnip* 過剰発現はメモリーTh2 細胞数を増加させることがわかった (図 G)。続いて、肺胞への炎症細胞浸潤を観察した。マクロファージ (Mac.)、リンパ球 (Lym.)、好中球 (Neut.)、好酸球 (Eos.)、総細胞 (Total) の細胞数を測定した所、*Txnip* を過剰発現させた effector Th2 細胞を移入したマウスでは、BALF 中の好酸球と総浸潤細胞数が有意に増加していた (図 H)。また、BALF 中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA で測定した所、気道炎症に伴って誘導される Th2 由来の炎症性サイトカインが、*Txnip* を過剰発現させた effector Th2 細胞を移入したマウスでは増加していることが観察された (図 I)。さらに、肺組織に対して H&E 染色を行うことで、炎症細胞浸潤を観察した所、*Txnip* を過剰発現させた effector Th2 細胞を移入したマウスでは、気管支周囲への炎症細胞浸潤が増加していることが観察された (図 J)。



上記の結果より、Th2 細胞中の *Txnip* が memory Th2 細胞の形成を介して、気道炎症病態の悪化に寄与することが明らかとなった。*Txnip* が気道炎症病態に影響することは新たな発見であり、酸化ストレス量の制御機構を標的としたアレルギー性疾患の新規治療法開発につながる可能性があると考えられる。

<引用文献>

1. **Kota Kokubo**, Kiyoshi Hirahara, Masahiro Kiuchi, Kaori Tsuji, Yuki Shimada, Yuri Sonobe, Rie Shinmi, Takahisa Hishiya, Chiaki Iwamura, Atsushi Onodera, and Toshinori Nakayama. "Thioredoxin-interacting protein is essential for memory T cell formation via the regulation of the redox metabolism". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Kokubo Kota, Hirahara Kiyoshi, Kiuchi Masahiro, Tsuji Kaori, Shimada Yuki, Sonobe Yuri, Shinmi Rie, Hishiya Takahisa, Iwamura Chiaki, Onodera Atsushi, Nakayama Toshinori	4. 巻 120
2. 論文標題 Thioredoxin-interacting protein is essential for memory T cell formation via the regulation of the redox metabolism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2218345120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2218345120	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 Tsuji Kaori, Aoki Ami, Onodera Atsushi, Kiuchi Masahiro, Kokubo Kota, Morimoto Yuki, Iinuma Tomohisa, Hanazawa Toyoyuki, Nakayama Toshinori, Hirahara Kiyoshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Characterization of eosinophils and natural killer cells in nasal polyps and peripheral blood in eosinophilic chronic rhinosinusitis patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 335 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.11.009	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 Okano Mikiko, Hirahara Kiyoshi, Kiuchi Masahiro, Onoue Miki, Iwamura Chiaki, Kokubo Kota, Hishiya Takahisa, Morimoto Yuki, Ikehara Yuzuru, Murakami Akira, Ebihara Nobuyuki, Nakayama Toshinori	4. 巻 55
2. 論文標題 Interleukin-33-activated neuropeptide CGRP-producing memory Th2 cells cooperate with somatosensory neurons to induce conjunctival itch	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 2352 ~ 2368.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2022.09.016	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 Iinuma Tomohisa, Kiuchi Masahiro, Hirahara Kiyoshi, Kurita Junya, Kokubo Kota, Yagyu Hiroyuki, Yoneda Riyo, Arai Tomoyuki, Sonobe Yuri, Fukuyo Masaki, Kaneda Atsushi, Yonekura Syuji, Nakayama Toshinori, Okamoto Yoshitaka, Hanazawa Toyoyuki	4. 巻 150
2. 論文標題 Single-cell immunoprofiling after immunotherapy for allergic rhinitis reveals functional suppression of pathogenic TH2 cells and clonal conversion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 850 ~ 860.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2022.06.024	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 Iwamura Chiaki, Hirahara Kiyoshi, Kiuchi Masahiro, Ikehara Sanae, Azuma Kazuhiko, Shimada Tadanaga, Kuriyama Sachiko, Ohki Syota, Yamamoto Emiri, Inaba Yosuke, Shiko Yuki, Aoki Ami, Kokubo Kota, et al.	4. 巻 119
2. 論文標題 Elevated MyI9 reflects the MyI9-containing microthrombi in SARS-CoV-2-induced lung exudative vasculitis and predicts COVID-19 severity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2203437119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2203437119	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 Kokubo Kota, Onodera Atsushi, Kiuchi Masahiro, Tsuji Kaori, Hirahara Kiyoshi, Nakayama Toshinori	4. 巻 13
2. 論文標題 Conventional and pathogenic Th2 cells in inflammation, tissue repair, and fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 945063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.945063	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 平原潔, 小久保幸太, 中山俊憲	4. 巻 283
2. 論文標題 CD4陽性T細胞と肺の線維化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 4-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 小久保幸太, 平原潔	4. 巻 78
2. 論文標題 局所免疫応答における組織常在性メモリーT細胞	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 438-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Shinoda Kenta, Choe Andrea, Hirahara Kiyoshi, Kiuchi Masahiro, Kokubo Kota, Ichikawa Tomomi, Hoki Jason S., Suzuki Akane S., Bose Neelanjana, Appleton Judith A., Aroian Raffi V., Schroeder Frank C., Sternberg Paul W., Nakayama Toshinori	4. 巻 119(1)
2. 論文標題 Nematode ascarosides attenuate mammalian type 2 inflammatory responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2108686119	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 該当する

1. 著者名 Onodera Atsushi, Kiuchi Masahiro, Kokubo Kota, Nakayama Toshinori	4. 巻 305(1)
2. 論文標題 Epigenetic regulation of inflammation by CxxC domain containing proteins*	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 137 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.13056	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 Nakayama Toshinori, Hirahara Kiyoshi, Kimura Motoko Y, Iwamura Chiaki, Kiuchi Masahiro, Kokubo Kota, Onodera Atsushi, Hashimoto Kahoko, Motohashi Shinichiro	4. 巻 33(12)
2. 論文標題 CD4+ T cells in inflammatory diseases: pathogenic T-helper cells and the CD69-MyI9 system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 699 ~ 704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab053	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 Hirahara Kiyoshi, Kokubo Kota, Aoki Ami, Kiuchi Masahiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 12(6)
2. 論文標題 The Role of CD4+ Resident Memory T Cells in Local Immunity in the Mucosal Tissue - Protection Versus Pathology -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in 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) 10.3389/fimmu.2021.616309	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 Kiuchi Masahiro, Onodera Atsushi, Kokubo Kota, Ichikawa Tomomi, Morimoto Yuki, Kawakami Eiryō, Takayama Naoya, Eto Koji, Koseki Haruhiko, Hirahara Kiyoshi, Nakayama Toshinori	4. 巻 218(4)
2. 論文標題 The Cxxc1 subunit of the Trithorax complex directs epigenetic licensing of CD4+ T cell differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	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) 10.1084/jem.20201690	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kota Kokubo, Kiyoshi Hirahara, Masahiro Kiuchi, Kaori Tsuji, Yuki Shimada, Yuri Sonobe, Rie Shinmi, Takahisa Hishiya, Chiaki Iwamura, Atsushi Onodera, and Toshinori Nakayama
2. 発表標題 Thioredoxin-interacting protein is essential for memory T cell formation via the regulation of the redox metabolism
3. 学会等名 cSIMVa symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山 俊憲、市川 智巳、小久保 幸太、木内 政宏、青木 亜美、平原 潔
2. 発表標題 病原性Th2細胞による難治性アレルギー - 気道炎症の病態制御
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木 亜美、辻 香織、小久保 幸太、木内 政宏、平原 潔、中山 俊憲
2. 発表標題 ベンラリズマブによる好酸球性炎症組織局所での抗体依存性細胞傷害活性についての検討
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院 免疫発生物学HP
<https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/jisseki/index.html>

千葉大学大学院医学研究院 免疫発生物学HP
<https://www.m.chiba-u.jp/dept/meneki/>

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
---------	---------