

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15484

研究課題名（和文）喘息悪化を誘導するTxnipの新たな酸化ストレス除去機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the novel oxidative stress scavenging mechanism of Txnip that induces asthma exacerbation

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） 3,500,000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細胞形成を介して気道炎症病態を悪化させることを明らかにした。さらには、Txnipがmemory Th2細胞形成を促進する分子メカニズムを明らかにすることで、アレルギー性疾患および喘息の新規治療法開発への分子基盤の構築を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息は根本的な治療法のない疾患であるため、患者数が増加し続けており、年間医療費は日本国内で3,500億円にも達する。喘息などのアレルギー性疾患の病態形成に重要なeffector 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、抗酸化物質を介した酸化ストレス制御機構が活性化やアポトーシスの抑制に重要である。一方、その後のmemory Th2細胞の形成過程における酸化ストレス制御機構は依然不明なままである。本研究を通じ、memory Th2細胞の形成過程における酸化ストレス量の制御機構を解明することは、新規喘息治療法の開発に繋がると期待される。

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 found that Txnip, a regulator of the oxidative stress scavenging mechanism, exacerbated airway inflammation via memory Th2 cell formation. Furthermore, we aimed to elucidate the molecular mechanism by which Txnip promoted memory Th2 cell formation, and to establish a molecular basis for the development of novel therapies for allergic diseases and asthma.

研究分野：免疫学

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

## 1. 研究開始当初の背景

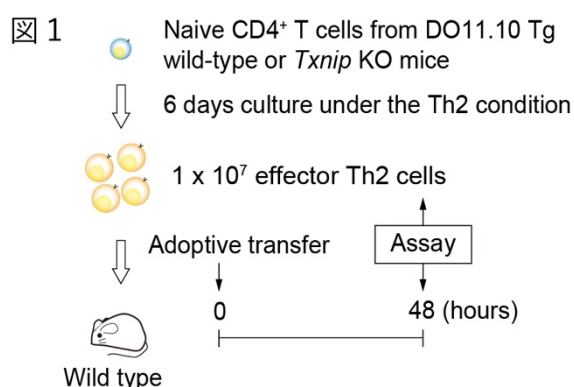
喘息は根本的な治療法のない疾患であるため、患者数が増加し続けており、年間医療費は日本国内で3,500億円にも達する (The Global Asthma Report, 2014)。喘息などのアレルギー性疾患の病態形成には、抗原による effector Th2 細胞の活性化と、その後の memory Th2 細胞形成が重要である。Th2 細胞分化の過程においては、エネルギー産生に伴う酸化ストレスが細胞内に発生するため、抗酸化物質であるグルタチオンを介した酸化ストレス制御機構が、effector Th2 細胞の活性化やアポトーシスの抑制に重要である (Mak T W *et al. Immunity*, 2017)。一方、memory Th2 細胞の形成過程における酸化ストレス制御機構は依然不明なままである。そこで我々は本研究を通じ、喘息の病態形成に重要である memory Th2 細胞の形成過程における酸化ストレス量の制御機構を解明すること、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、酸化ストレス除去機構の制御因子である 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。さらに、memory Th2 細胞形成を促進する Txnip の酸化ストレス除去が、これまで報告されていた分子メカニズムを介さないことを明らかにしていた。そこで、本補助事業期間においては、下記の検討を行った。①Single cell RNA-Seq, ATAC-Seq を用いた Txnip の機能解析、②遺伝子過剰発現系を用いた新規の酸化ストレス除去機構の同定。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ための分子メカニズムについて検討を行った。

## 3. 研究の方法

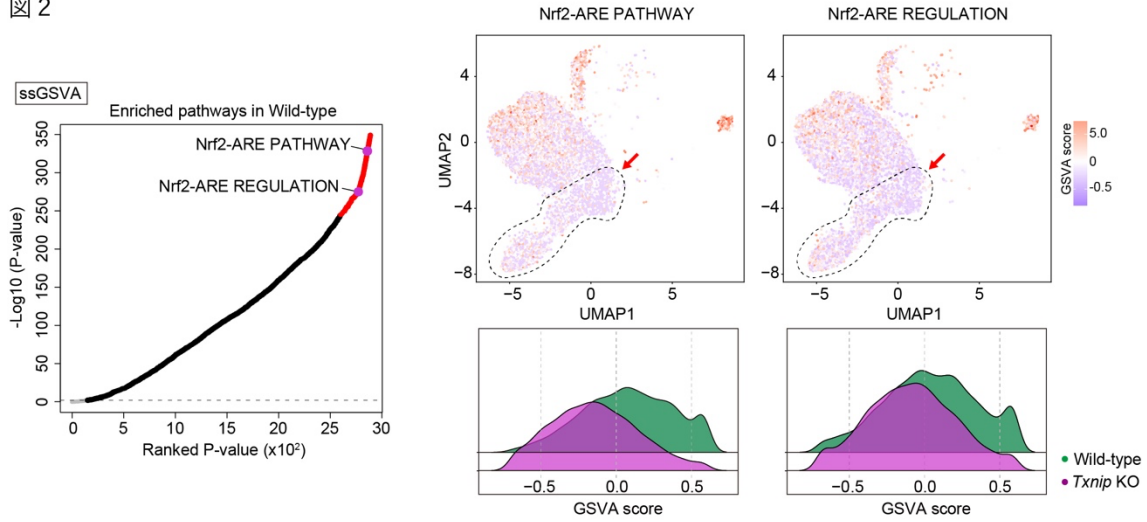
野生型または Txnip 欠損の DO11.10 OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスからの脾臓ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞 (CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>) を Effector Th2 細胞に分化させた後に BALB/c レシピエントマウスに静脈内移入した。移入 48 時間後の収縮期にある移入 Th2 細胞を脾臓から回収し、各アッセイに用いることで Txnip 下流の分子メカニズムについて解析を行った (図 1)。



## 4. 研究成果

移植 Th2 細胞における Txnip による活性酸素消去の基盤となる分子メカニズムを探るために、細胞移植後 48 時間で回収した野生型または Txnip 欠損 Th2 細胞を用いて scRNA-seq 解析を実施した。ssGSVA 解析の結果、Txnip 欠損の移植 Th2 細胞と比較して、野生型では「Nrf2-ARE PATHWAY」と「Nrf2-ARE REGULATION」を含む Nrf2 下流のパスウェイが濃縮されていた (図 2 左)。Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2) は、酸化ストレスの消去を制御する転写因子である。また、どちらのパスウェイにおいても、Txnip 欠損移植 Th2 細胞は野生型移植 Th2 細胞と比較して GSVA スコアが減少していた (図 2 右)。これらの結果は、Txnip が移植 Th2 細胞において Nrf2 下流遺伝子を活性化し、細胞内の活性酸素を消去している可能性を示唆している。

図 2



次に、野生型マウスと *Txnip* KO マウスの移植 Th2 細胞を用いて通常の RNA-Seq 解析を行い、Nrf2 下流遺伝子を決定した。その結果、*Txnip* 欠損の移植 Th2 細胞では、Nrf2 の下流遺伝子である還元酵素である Biliverdin reductase B (*Blvrb*) の発現が減少していた (図 3 左)。*Blvrb* はビリベルジンからビリルビンへの還元を仲介し、活性酸素を消去することで強力な抗酸化剤として機能する (図 3 右)。また、移植された Th2 細胞を用いた ATAC-Seq (図 4) により、*Blvrb* 遺伝子座における *Txnip* 依存性のクロマチン制御が明らかになった。

図 3 transferred Th2 (48 h)

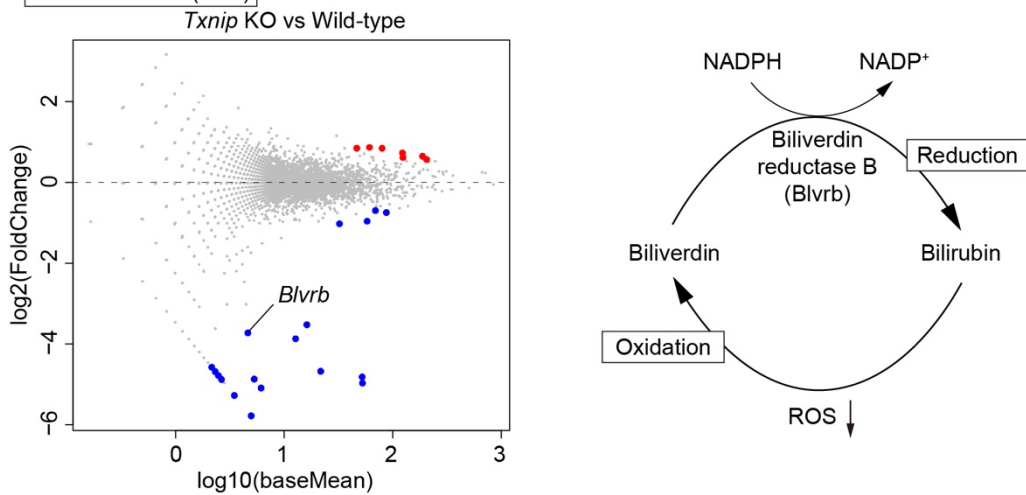
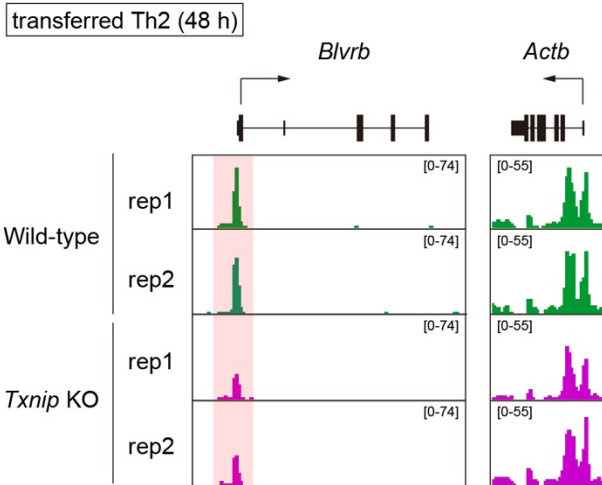


図 4



最後に、Nrf2 をコードする *Nfe2l2* 遺伝子を過剰発現させると、*Txnip* 欠損の移入 Th2 細胞において *Blvrb* の発現が有意に回復することを見出した (図 5)。さらに、*Nfe2l2* の過剰発現により、*Txnip* 欠損の移入 Th2 細胞において酸化ストレス量 (ROS) が減少し、アポトーシスが減少した (図 6)。また、同様の酸化ストレス量とアポトーシスの減少は *Blvrb* 遺伝子を過剰発現させた

場合においても観察された (図7)。これらの結果は、Txnip が Nrf2-Blvrb 経路を制御し、Th2 細胞の細胞内 ROS レベルとアポトーシス細胞死を制御していることを示している。

図 5

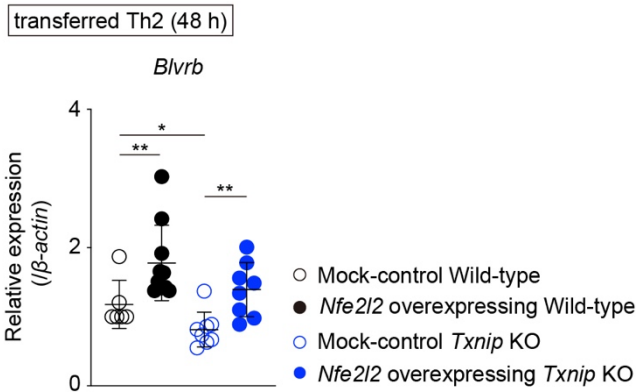


図 6

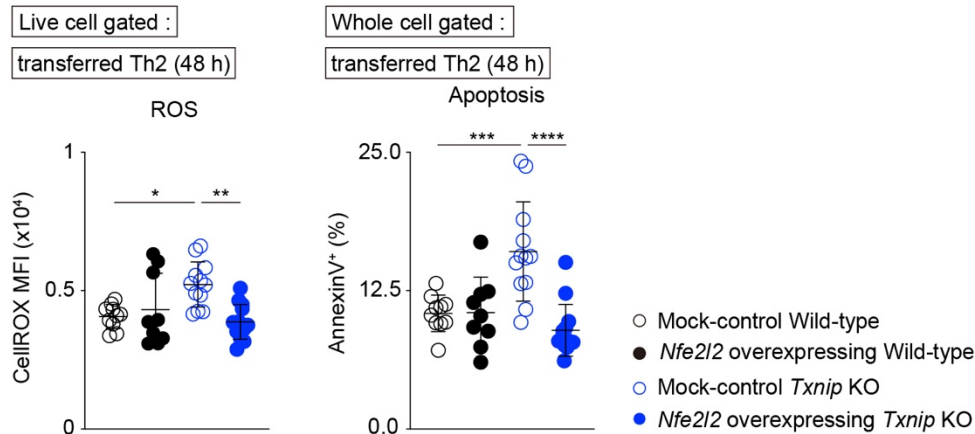
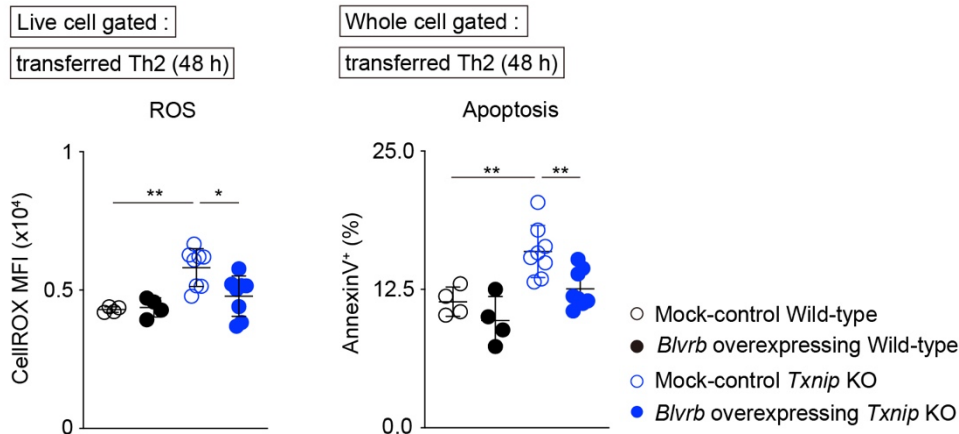


図 7



上記の結果より、Th2 細胞中の Txnip が Nrf2-Blvrb 経路を介して、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 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tanaka Shigeru, Yamamoto Takuya, Iwata Arifumi, Kiuchi Masahiro, Kokubo Kota, Iinuma Tomohisa, Sugiyama Takahiro, Hanazawa Toyoyuki, Hirahara Kiyoshi, Ikeda Kei, Nakajima Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing of submandibular gland reveals collagen type XV-positive fibroblasts as a disease-characterizing cell population of IgG4-related disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	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) 10.1186/s13075-024-03289-7	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 Kumagai Jin, Kiuchi Masahiro, Kokubo Kota, Yagyu Hiroyuki, Nemoto Masahiro, Tsuji Kaori, Nagahata Ken, Sasaki Atsushi, Hishiya Takahisa, Onoue Miki, Shinmi Rie, Sonobe Yuri, Iinuma Tomohisa, Yonekura Syuji, Shinga Jun, Hanazawa Toyoyuki, Koseki Haruhiko, Nakayama Toshinori, Yokote Koutaro, Hirahara Kiyoshi	4. 巻 120
2. 論文標題 The USP7-STAT3-granzyme-Par-1 axis regulates allergic inflammation by promoting differentiation of IL-5-producing Th2 cells	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 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2302903120	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 Onodera Atsushi, Kokubo Kota, Okano Mikiko, Onoue Miki, Kiuchi Masahiro, Iwamura Chiaki, Iinuma Tomohisa, Kimura Motoko Y., Ebihara Nobuyuki, Hanazawa Toyoyuki, Nakayama Toshinori, Hirahara Kiyoshi	4. 巻 247
2. 論文標題 Pathogenic helper T cells as the novel therapeutic targets for immune-mediated intractable diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108445 ~ 108445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2023.108445	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 Suga Kensuke, Kiuchi Masahiro, Kageyama Takahiro, Kokubo Kota, Tanaka Shigeru, Iwata Arifumi, Suzuki Kotaro, Hirahara Kiyoshi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing of peripheral blood mononuclear cells from Kimura disease patient successfully treated with dupilumab	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 610 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2023.06.002	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 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 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 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 Myl9 reflects the Myl9-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 Iinuma Tomohisa, Kiuchi Masahiro, Hirahara Kiyoshi, Kurita Junya, Kokubo Kota, Yagyū 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 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 Tsuji Kaori, Aoki Ami, Onodera Atsushi, Kiuchi Masahiro, Kokubo Kota, Morimoto Yuki, Inuma 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 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 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 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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kota Kokubo
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 第52回 日本免疫学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2024年

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

〔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 免疫発生学HP  
<https://www.m.chiba-u.jp/dept/meneki/research/achievement-1/>



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