

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03697

研究課題名(和文) エピゲノム解析による自己免疫性間質性肺炎発症機構の解明と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis of autoimmune-mediated interstitial lung disease based on epigenomic analysis

研究代表者

岡村 僚久 (OKAMURA, Tomohisa)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10528996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自己免疫性間質性肺炎の病態解明を行うことを目的とし、線維芽細胞に対するTGF- β 1を介したサイトカインシグナルによる制御機構を明らかにした。また、間質性肺炎患者の肺胞洗浄液からTGFB1を高発現する新規エフェクターCD4メモリー陽性細胞サブセットを同定し、同新規細胞サブセットの網羅的オープンクロマチン領域解析により、epigeneticなTGFB1制御機構までを明らかにした。本知見は、自己免疫性間質性肺炎の病態解明のみならず、新規創薬ターゲット同定の可能性を内包している。今後は、同細胞サブセットの分化誘導メカニズム解明などを行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性肺炎は、肺胞以外の肺を支える間質部分を中心とした炎症および激しい線維化を来す疾患であり、代表的自己免疫疾患であるリウマチ・膠原病疾患の予後を規定する。本課題では、自己免疫性疾患患者の間質性肺炎の肺胞洗浄液より、線維化促進性のサイトカインを高発現する新規T細胞を同定し、その線維化促進メカニズムを明らかとした。本解析結果は、間質性肺炎治療の新規創薬ターゲット同定に繋がる可能性を内包している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanisms of progressive fibrosis in connective tissue disease (CTD)-associated interstitial lung diseases (ILD). First, we confirmed the synergistic effects of cytokines including TGF- β 1 on fibroblast activation. Second, we identified a novel effector memory CD4+ T cell subset that highly expresses TGFB1 in the bronchoalveolar lavage fluid in ILD. ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) revealed the epigenetic mechanisms that regulate the expression of TGFB1 on the CD4+ T cell subset. These findings indicate that the pro-fibrotic CD4+ T cell subset might play a pivotal role in the progression of lung fibrosis via TGFB1 production. Further detailed analysis of the pro-fibrotic CD4+ T cell induction mechanisms will provide a novel therapeutic target for CTD-associated ILD.

研究分野：免疫学、機能ゲノム学、膠原病

キーワード：間質性肺炎 自己免疫性疾患 T細胞 TGF- β 1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性の自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス、多発性筋炎/皮膚筋炎、強皮症は代表的膠原病として広く知られている。副腎皮質ステロイド等の導入によりその予後は劇的に改善しているが、その予後を決定する間質性肺炎はこれらの疾患に合併を認め治療抵抗性となることが多く、呼吸不全から死に至ることもあり克服すべき大きな課題となっている。TGF- β 1は慢性腎障害、慢性肝障害、間質性肺炎など線維化病態へ強く関与し、線維化を主病態とするSScにおいても免疫、血管、線維化の各面で病態形成に関与しており¹、線維化において中心的役割を果たしている最も代表的なサイトカインである。申請者らは、LPS(Lipopolysaccharide)刺激B細胞がTGF- β 1、IL-10単独では抗体産生を増強するが、両者が同時に加わることで抑制性機能に転化する「Inhibitory Cytokine Synergy (ICS)」という概念を提唱している²。生体内においては複数のサイトカインが線維化病態に関与していることが想定されるものの、これまで線維芽細胞に対するICS効果を確認した報告はない。また、線維化亢進において中心的役割を果たすリンパ球についても、その亜分画に関する知見が不足しており、病態理解の大きな障害となっている。肺線維症には、“Soil”となる肺組織側、“Seed”となる浸潤炎症細胞、またその環境要因が関与しており、その病態解明には、両者およびこれを繋ぐTGF- β 1の役割を解明することが必要である。

2. 研究の目的

間質性肺炎は、肺胞以外の肺を支える間質部分を中心とした炎症および激しい線維化を来す疾患であり、代表的自己免疫疾患であるリウマチ・膠原病疾患の予後を規定する。本課題では、間質性肺炎病態形成の中心を担う免疫担当細胞を用い、エピゲノム解析も含めたマルチオミックス解析から、自己免疫性間質性肺炎の病態解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

自己免疫性間質性肺炎は、肺血管障害、線維化、炎症という3つの病態が関与しており、T細胞、B細胞、マクロファージの3種の免疫担当細胞と、肺組織の線維芽細胞がその病態形成の中心的役割を担っていると考えられている。本研究課題においては、向線維化サイトカインであるTGF- β 1に着目し、線維芽細胞およびT細胞に関する詳細な検討を行った。

(1)線維芽細胞におけるCytokine Synergyに関する検討

線維芽細胞に対するTGF- β 1と複数の炎症性サイトカインの協調作用を、様々な刺激条件下において*in vitro*で検証を行った。刺激培養後の細胞は、フローサイトメーターを用いて生細胞を分取し、total RNAを抽出後、qRT-PCRにより定量的に遺伝子発現量を評価した。また、培養上清中のサイトカインはELISAを用いて評価した。これらの手法を用いて、線維芽細胞におけるサイトカインシナジー効果とTGF- β 1の重要性を検証した。

(2)自己免疫性疾患の間質性肺炎合併症例におけるTGF β 1産生T細胞に関する検討

自己免疫性疾患患者の肺胞洗浄液のフローサイトメトリーによる各種免疫担当細胞の細胞表面マーカーの検討および、シングルセル解析を行った。シングルセル解析は、Tn5トランスポゼースを用いオープンクロマチン領域の切断とアダプター配列付加を同時に行うsingle cell ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing)を使用した。本手法により、間質性肺炎の炎症局に浸潤する免疫担当細胞をunbiasedに解析し、病態形成に関わるサブセットの同定および、epigeneticなTGF- β 1産生制御機構に関する解析を行った。

(3)自己免疫性間質性肺炎の患者層別化バイオマーカーの同定

上記検討により、同定した線維化に関わるCD4陽性T細胞サブセットの分化誘導において中心的役割を果たすことが想定される遺伝子につき、Cre-loxPシステムを用いてT細胞特異的コンディショナルノックアウト(CKO)マウスを作製、*in vivo*における解析基盤を構築した(後述)。

4. 研究成果

肺組織側の要因として、線維芽細胞に対するTGF- β 1と複数の炎症性サイトカインの協調作用を、様々な刺激条件下において*in vitro*で検証を行い、線維芽細胞におけるサイトカインシナジー効果におけるTGF- β 1の重要性を明らかにした。浸潤炎症細胞側の要因としては、TGF- β 1遺伝子の特異的に高発現する新規エフェクターメモリーCD4陽性T細胞サブセットを同定し、さらに同サブセットの特異的細胞表面マーカーが特定のGタンパク質共役受容体(GPCR)であることの同定にも成功した(論文投稿予定)。同サブセットはTGF β 1を高発現し、自己免疫性筋炎症例に合併した間質性肺炎における肺胞洗浄液中において著増していた。さらに、同サブセットは他

の浸潤 CD4 陽性 T 細胞よりも TGF- β 1 の活性化に必要な LTBP (latent TGF- β binding protein) family プロモーター領域のクロマチンアクセシビリティが高まっていた。更に、これらの解析から同細胞のマスター制御遺伝子として複数の候補転写因子遺伝子を同定し、候補遺伝子の floxed マウスと CD4 Cre マウスとの交配により T 細胞特異的な CKO マウスの作製まで行い、マウスモデルにおける研究基盤の構築を行った。

本研究においては、ヒト間質性肺炎発症に関わる線維芽細胞におけるサイトカインシナジーによる制御機構および、向線維化サイトカイン TGFB1 を高発現する新規エフェクター CD4 陽性細胞サブセットの同定および、網羅的オープンクロマチン領域解析を通じた同新規細胞サブセットにおける epigenetic な TGFB1 の制御機構までを明らかとし、同サブセットの機能評価を行うマウスモデルの構築まで行い、当初の目標を達成した。

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 1件）

1. 著者名 Takeshima Yusuke, Iwasaki Yukiko, Nakano Masahiro, Narushima Yuta, Ota Mineto, Nagafuchi Yasuo, Sumitomo Shuji, Okamura Tomohisa, Elkon Keith, Ishigaki Kazuyoshi, Suzuki Akari, Kochi Yuta, Yamamoto Kazuhiko, Fujio Keishi	4. 巻 81
2. 論文標題 Immune cell multiomics analysis reveals contribution of oxidative phosphorylation to B-cell functions and organ damage of lupus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 845 ~ 853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2021-221464	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 Yanaoka Haruyuki, Nagafuchi Yasuo, Hanata Norio, Takeshima Yusuke, Ota Mineto, Suwa Yuichi, Shirai Harumi, Sugimori Yusuke, Okubo Mai, Kobayashi Satomi, Hatano Hiroaki, Yamada Saeko, Tsuchida Yumi, Iwasaki Yukiko, Sumitomo Shuji, Shoda Hirofumi, Okada Masato, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko, Fujio Keishi	4. 巻 119
2. 論文標題 Identifying the most influential gene expression profile in distinguishing ANCA-associated vasculitis from healthy controls	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102617 ~ 102617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2021.102617	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 Kobayashi Satomi, Nagafuchi Yasuo, Okubo Mai, Sugimori Yusuke, Hatano Hiroaki, Yamada Saeko, Nakano Masahiro, Yoshida Ryochi, Takeshima Yusuke, Ota Mineto, Tsuchida Yumi, Iwasaki Yukiko, Setoguchi Keigo, Kubo Kanae, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko, Shoda Hirofumi, Fujio Keishi	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Dysregulation of the gene signature of effector regulatory T cells in the early phase of systemic sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keac031	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 Kobayashi S, Nagafuchi Y, Okubo M, Sugimori Y, Shirai H, Hatano H, Junko M, Yanaoka H, Takeshima Y, Ota M, Iwasaki Y, Sumitomo S, Okamura T, Yamamoto K, Shoda H, Fujio K.	4. 巻 116
2. 論文標題 Integrated bulk and single-cell RNA-sequencing identified disease-relevant monocytes and a gene network module underlying systemic sclerosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Autoimmun	6. 最初と最後の頁 102547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2020.102547.	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 46.Kato R, Sumitomo S, Tsuchida Y, Tsuchiya H, Nakachi S, Sakurai K, Hanata N, Nagafuchi Y, Kubo K, Tateishi S, Kanda H, Okamura T, Yamamoto K, Fujio K.	4. 巻 10
2. 論文標題 CD4+CD25+LAG3+ T Cells With a Feature of Th17 Cells Associated With Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01619. eCollection 2019.	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15件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西脇 彩, 駒井 俊彦, 岡村 僚久, 吉田 良知, 波多野 裕明, 大久保 麻衣, 小林 聖未, 杉森 祐介, 中野 正博, 竹島 雄介, 太田 峰人, 土屋 遥香, 永淵 泰雄, 岩崎由希子, 住友秀次, 庄田 宏文, 山本 一彦, 藤尾 圭志
2. 発表標題 IgG4関連疾患におけるトランスクリプトーム解析とBCRレパトア解析
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 中野正博、岩崎由希子、竹島雄介、太田峰人、永淵泰雄、岡村僚久、藤尾圭志
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスの免疫細胞種網羅的遺伝子発現データに基づく患者層別化解析
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 Masahiro Nakano, Yukiko Iwasaki, Yusuke Takeshima, Mineto Ota1, Hiroaki Hatano, Kazuyoshi Ishigaki, Yasuo Nagafuchi, Kazuhiko Yamamoto, Tomohisa Okamura, Keishi Fujio
2. 発表標題 Comprehensive transcriptome analysis of systemic lupus erythematosus reveals immune cell type-specific disease relevant signatures for patient stratification
3. 学会等名 日本リウマチ学会国際育成セミナー2021 (JCR International School 2021)
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名	Aya Nishiwaki, Toshihiko Komai, Yasuo Nagafuchi, Mineto Ota, Ryochi Yoshida, Hiroaki Hatano, Haruka Tsuchiya, Saeko Yamada, Masahiro Nakano, Mai Okubo, Satomi Kobayashi, Yusuke Sugimori, Yusuke Takeshima, Yukiko Iwasaki, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Kazuhiko Yamamoto, Tomohisa Okamura, and Keishi Fujio
2. 発表標題	Analysis of class-switching to IgG4 in memory B cell subsets of IgG4-Related Disease
3. 学会等名	第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年	2021年～2022年

1. 発表者名	楠田 岳, 駒井 俊彦, 岡村 僚久, 藤尾 圭志
2. 発表標題	CASTOR1の液性免疫における役割の同定
3. 学会等名	第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年	2021年～2022年

1. 発表者名	岡村僚久
2. 発表標題	自己免疫疾患の炎症局所における遺伝子発現制御機構解明に向けた解析基盤の構築
3. 学会等名	第7回Japanese College of Radiologyベーシックリサーチカンファレンス（日本リウマチ学会主催）（招待講演）
4. 発表年	2020年～2021年

1. 発表者名	Aya Nishiwaki, Toshihiko Komai, Tomohisa Okamura, Ryochi Yoshida, Hiroaki Hatano, Mineto Ota, Yasuo Nagafuchi, Haruka Tsuchiya, Saeko Yamada, Masahiro Nakano, Mai Okubo, Satomi Kobayashi, Yusuke Sugimori, Yusuke Takeshima, Yukiko Iwasaki, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Kazuhiko Yamamoto, Keishi Fujio
2. 発表標題	Immunophenotypic analysis of peripheral blood mononuclear cells in IgG4-Related Disease
3. 学会等名	22th Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress（国際学会）
4. 発表年	2020年～2021年

1. 発表者名 西脇 彩, 駒井 俊彦, 岡村 僚久, 吉田 良知, 波多野 裕明, 太田 峰人, 永淵 泰雄, 土屋 遥香, 山田 紗依子, 中野 正博, 大久保 麻衣, 小林 聖未, 杉森 祐介, 竹島 雄介, 岩崎 由希子, 住友 秀次, 庄田 宏文, 山本 一彦, 藤尾 圭志
2. 発表標題 IgG4関連疾患における末梢血免疫担当細胞のサブセットの検討
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Toshihiko Komai, Tomohisa Okamura, Ryochi Yoshida, Kazuhiko Yamamoto, Keishi Fujio
2. 発表標題 Protective roles of TGF- 3 in interstitial pneumonia with autoimmune features
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡村僚久
2. 発表標題 LAG3陽性制御性T細胞による免疫制御
3. 学会等名 第5回 Academy of Clinical Immunology (招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Toshihiko Komai, Tomohisa Okamura, Mariko Inoue, Morita Kaoru, Yukiko Iwasaki, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Kazuhiko Yamamoto, and Keishi Fujio
2. 発表標題 Inhibitory cytokine synergy of IL-10 and TGF- 3 contributes to humoral immune tolerance mediated by metabolic reprogramming
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Masanori Kono, Tomohisa Okamura ¹ , Mariko Inoue, Toshihiko Komai, Yukiko Iwasaki, Yusuke Takeshima, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Kazuhiko Yamamoto, and Keishi Fujio
2. 発表標題 The role of Jazf1 in the production of IL-10 in Tr1 cells
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 駒井俊彦, 岡村 僚久, 井上眞璃子, 岩崎由希子, 住友秀次, 庄田宏文, 山本一彦, 藤尾圭志
2. 発表標題 抑制性サイトカイン協調によるB細胞の免疫代謝リプログラミング
3. 学会等名 第68回アレルギー学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 河野正憲, 岡村僚久, 駒井俊彦, 井上眞璃子, 岩崎由希子, 住友秀次, 庄田宏文, 山本一彦, 藤尾圭志
2. 発表標題 Jazf1遺伝子はTr1細胞におけるIL-10産生を制御する
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 河野正憲, 岡村僚久, 駒井俊彦, 井上眞璃子, 岩崎由希子, 住友秀次, 庄田宏文, 山本一彦, 藤尾圭志
2. 発表標題 Jazf1遺伝子はLAG3+ TregからのIL-10産生を負に制御する
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 岡村僚久	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ 制御性T細胞研究の現在 268巻13号 「LAG3陽性 制御性T細胞による免疫制御機構」	

1. 著者名 河野正憲、岡村僚久、藤尾圭志	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ サイトカインのすべて 271巻5号 「IL-10ファミリーによる免疫制御機構」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科 ホームページ http://ryumachi.umin.jp/about/research.html</p>

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
研究 分担者	藤尾 圭志 (FUJIO Keish) (70401114)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	駒井 俊彦 (KOMAI Toshihiko) (50803938)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	2020年度、2021年度のみ
研究分担者	住友 秀次 (SUMITOMO Shuji) (20392996)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	2019年度のみ 現職位：地方独立行政法人神戸市民病院機構神戸市立医療センター中央市民病院 医長（2020年度より）

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