

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08769

研究課題名(和文) 組織炎症と繊維化に対するT細胞由来のプロテオグリカンの解析

研究課題名(英文) Analysis of T cell-derived proteoglycans in tissue inflammation and fibrosis

研究代表者

岩村 千秋 (Iwamura, Chiaki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：10513062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロテオグリカンの1つであるセルグリシンの炎症反応における役割を検証するために、セルグリシンノックアウト(KO)マウスを作成した。アレルギー性気道炎症反応などはセルグリシンKOマウスで低下したことから、セルグリシンが炎症反応の誘導に重要であることがわかった。CD4+T細胞特異的にセルグリシンを欠損させても炎症反応は低下しなかった。このことは別の免疫細胞が放出するセルグリシンが炎症の惹起に関与することを示している。また好酸球性副鼻腔炎のポリープに浸潤している細胞や、重症COVID-19患者の末梢血単核球中にも高い発現が認められたことから、ヒトの炎症性疾患にも関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性疾患や自己免疫疾患などの慢性炎症性疾患は、その根治が難しく、また炎症が遷延化するほど、組織線維化などの臓器の機能障害を引き起こすことがある。炎症を引き起こす機序として、これまで様々な炎症性細胞やそれらが産生するサイトカインについて解析がなされてきた。本研究では炎症性細胞が出すプロテオグリカン(セルグリシン)が炎症の誘導に関与することを明らかにしている。すなわち、慢性炎症性疾患に対し、これまでとは異なる治療アプローチの開発に寄与する可能性があり、本研究成果は社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of Serglycin in inflammatory responses, which is a proteoglycan, we generated Serglycin knockout (KO) mice. Inflammatory responses, such as allergic airway inflammation, were attenuated in Serglycin KO mice as compared to wild type mice, indicating that Serglycin is important for induction of inflammatory responses. However, CD4+ T cell specific Serglycin KO mice did not show the reduction of airway inflammation, suggesting that Serglycin released by another immune cell is involved in the induction of inflammation. The high expressions of Serglycin were observed in the infiltrating cells of nasal polyps taken from the patients with eosinophilic sinusitis and in the peripheral blood mononuclear cells of patients with severe COVID-19. Thus, Serglycin is involved in human inflammatory diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：プロテオグリカン セルグリシン COVID-19 炎症性肺疾患

## 1. 研究開始当初の背景

炎症反応は、病原体の感染や創傷などの組織異常に対応する生体防御機構の一端として有益な免疫応答である。一方で、持続する炎症刺激は細胞外マトリックスの構成成分を産生する線維芽細胞を活性化し続け、膠原線維や弾性線維が過剰分泌され集積した線維化組織は組織恒常性を損失し機能破綻する。そのメカニズムの詳細は不明で、不可逆的な組織破綻は治療が困難であり、早期の疾患制御や予防法の開発が望まれている。細胞外マトリックスは、生体組織の細胞間隙に存在し、コラーゲンやプロテオグリカンなど糖タンパク質からなる複集合体で、臓器の構造を支持する間質系基質を総じて指す。細胞の分化や増殖などの細胞発生の制御に加え、接着や浸潤など運動機能も制御するなど、多岐に及び細胞機能の制御に寄与していることから、近年、人為的に操作した細胞外マトリックス成分を調整利用して細胞機能の制御を試みるマトリックス工学の発達応用が注目されている。

細胞外マトリックスを構成する成分に、無定形基質であるプロテオグリカンがある。プロテオグリカンは、二糖単位の繰り返し構造を持つ直鎖状多糖体(グリコサミノグリカン:GAG)がコアタンパク質に結合した糖タンパク質化合物である。なかでも、コアタンパク質の1つでセリン-グリシンの繰り返し配列を持つセルグリシンは、マスト細胞や血小板、好中球、好酸球など一部の血球系細胞に発現がみられ、細胞の活性化に伴い細胞内顆粒から分泌される。顆粒内でセルグリシンは成長因子やサイトカインなどと複合体を形成し、ひとたび細胞が活性化され細胞外に放出された後は、それぞれの輸送や受容体との結合を補助するなど、炎症伝達物質の伝搬に貢献する。しかしながら、分泌型プロテオグリカンとして機能するセルグリシンが、慢性炎症および組織線維化の進行にどのような生理的役割を担うのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

炎症発生部位では、炎症刺激により産生分泌されたタンパク分解酵素が周辺の細胞外マトリックスを分解し支持構造が破壊され組織再構築の礎となるが、一方でマトリックス分子やこれらの分解産物は炎症性細胞の活性化を誘起し炎症反応を修飾すると考える。そこで本研究は、免疫細胞から産生されるセルグリシンの炎症反応における役割を明らかにすることで、免疫細胞による細胞外マトリックスを介在した炎症への関与の意義について考察する。セルグリシンが病原性指向を示し慢性炎症の病態増悪に加担する場合には、その分子機序をタンパク質レベル、生体レベルで解明する。最終的には、プロテオグリカンの炎症誘導機能を失活させる阻害抗体や機能調整低分子化合物を作成し、これを利用して炎症性免疫細胞の制御や組織での炎症反応を制御しうるか臨床応用への可能性を模索する。

## 3. 研究の方法

### (i)炎症局所におけるセルグリシンの局在と産生細胞の同定

セルグリシンは分泌性のプロテオグリカンであることから、炎症を起こした肺組織に沈着しているのか、またその局在について検証する。野生型マウスにダニ抗原長期曝露によりアレルギー性気道炎症、LPSの経気道投与による急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、またはブレオマイシンの経気道投与による肺線維症を誘導し、免疫組織染色法により炎症組織におけるセルグリシンの局在を明らかにする。また共染色やsingle cell RNA-Seqにより、その産生細胞を同定する。

### (ii) T細胞におけるプロテオグリカンの局在とその機能に関する検討

代表的なGAG鎖であるコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸は、複数の硫酸基を持つことから電氣的に負に帯電しており、正の電荷を帯びるパートナー分子と結合し複合体を形成する。したがって、ペプチドグリカンの増加がIL-4やアンフィレグリンなど正に帯電しているサイトカイン滞留、輸送や受容体との結合を補助していると考えている。このことを明らかにするために、Th2細胞においてセルグリシンがサイトカインと複合体を形成し同じ局在様式を示すか、高解像度顕微鏡により検討する。

### (iii) セルグリシン欠損マウスの作成と炎症性肺疾患の評価

セルグリシンが病原性指向を示すのか明らかにする目的で、セルグリシンノックアウト(KO)

マウスならびにセルグリシンコンディショナル KO マウスを作成する。これらのマウスにダニ抗原長期曝露によりアレルギー性気道炎症、LPS の経気道投与による急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)、またはブレオマイシンの経気道投与による肺線維症を誘導し、肺における炎症や線維化の程度を野生型マウスと病理学的に比較する。またレトロウイルスによりセルグリシンを過剰発現した OVA 抗原特異的 T 細胞を *in vitro* で作成する。これを野生型マウスに移入し、OVA 抗原を経鼻投与した時の喘息症状をコントロール Th2 細胞移入群と比較する。Th2 細胞がセルグリシン依存的な気道炎症の増悪に関与しているか検討する。

#### (iv) COVID-19 患者におけるプロテオグリカンの発現

ヒトの炎症性疾患において、セルグリシンの発現を検証する。COVID-19 は SARS-CoV-2 感染によって引き起こされる肺炎を伴う疾患である。そこで COVID-19 患者の末梢血単核球を採取し、single cell RNA-Seq による解析を行う。

#### 4. 研究成果

(i) 野生型のナイーブマウスまたは長期にダニ抗原を経鼻投与されたマウスの肺から CD45+細胞を回収し、single cell RNA-seq を行い、セルグリシンの発現細胞を調べた。ナイーブマウスにおいても肺内の免疫細胞はセルグリシンを発現しており、ダニ抗原を投与されると Th2 細胞での発現が上昇した。また免疫染色法により肺内のセルグリシンの発現を見たところ、ナイーブマウスの肺ではほとんど観察されないのに対し、ダニ抗原投与によるアレルギー性気道炎症が誘導された場合には、主に iBALT (inducible Bronchus-associated lymphoid tissue) の内部にその発現が認められた。

(ii) T 細胞内におけるセルグリシンの局在とその役割を明らかにする目的で、Th2 細胞細胞を *in vitro* で作成し、セルグリシンの免疫染色を行なった。T 細胞受容体 (TCR) を介した刺激をすると、セルグリシンのタンパク質レベルでの発現上昇が認められた。また TCR 刺激後に正に帯電しているサイトカインである IL-4 との共染色を行うと、ほとんどのセルグリシンは IL-4 と共局在していなかった。またセルグリシン KO Th2 細胞では IL-4 が野生型 Th2 細胞と同程度に細胞内で観察された。この結果からセルグリシンは IL-4 を細胞内に留めておくためには必須ではないことがわかった。またセルグリシンが T 細胞内のどこに局在しているのか、ゴルジ体など細胞小器官との共染色を試みたが、いずれにおいても共局在を示すデータは得られていない。すなわち、セルグリシンが T 細胞内においてどこに存在しているのかは未だ不明である。

(iii) セルグリシン KO マウスにダニ抗原長期曝露によりアレルギー性気道炎症を誘導すると、肺の炎症は野生型マウスと比較して顕著に減少した。LPS 投与による ARDS やブレオマイシン投与による肺線維症においても同様の結果を得た。このことからセルグリシンは炎症の誘導に重要な分子であることがわかった。

そこで、レトロウイルスによりセルグリシンを過剰発現させた OVA 抗原特異的な Th2 細胞をマウスに移入し、OVA の経鼻投与によるアレルギー性気道炎症反応を誘導したところ、セルグリシンの Th2 細胞における過剰発現は肺の炎症を悪化させることがわかった。これに対し、CD4T 細胞特異的にセルグリシンを欠損したコンディショナル KO マウスにダニ抗原長期曝露によるアレルギー性気道炎症を誘導すると、炎症の低下は認められなかった。これらの結果は CD4T 細胞の産生するセルグリシンはアレルギー性気道炎症反応の病態悪化に関与しているが、別の免疫細胞が産生するセルグリシン病態の発症に関与していることが示唆された。

(iv) COVID-19 の重症化メカニズムを明らかにする目的で、COVID-19 患者から末梢血単核球を回収し、軽症者と重症者における遺伝子発現の違いを調べた。その結果、重症者の末梢血単核球において血小板活性化関連遺伝子群の中でセルグリシンの発現が顕著に上昇していることがわかった。ヒトの末梢血単核球のなかではセルグリシンはユビキタスに発現しているが、重症者においては non-canonical monocytes におけるセルグリシンの発現上昇が最も顕著であった。セルグリシンは血小板の凝集に必須であることが過去に報告されており (Woulfe D et al., *Blood*, 2008)、また重症 COVID-19 患者では血栓形成が病態の悪化に関わることが知られている (Ackermann M et al., *NEJM*, 2020)。したがって、non-canonical monocytes によるセルグリシンの発現上昇は COVID-19 患者における血小板凝集を促進し、血栓形成を促すことで病態を悪化させる可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6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 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 Iwamura Chiaki., 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 Wakai Ken, Azuma Kazuhiko, Iwamura Chiaki, Maimaiti Maihulan, Mikami Kosuke, Yoneda Kei, Sakamoto Shinichi, Ikehara Sanae, Yamaguchi Takashi, Hirahara Kiyoshi, Ichikawa Tomohiko, Nakayama Toshinori, Ikehara Yuzuru	4. 巻 12
2. 論文標題 The new preparation method for paraffin-embedded samples applying scanning electron microscopy revealed characteristic features in asthma-induced mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12666-8	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 岩村千秋、平原潔、中山俊憲	4. 巻 79
2. 論文標題 新型コロナウイルス感染症の新規重症化マーカー、MyI9 (ミルナイン) の同定	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 317-324
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 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 岩村 千秋、中山 俊憲	4. 巻 70
2. 論文標題 病原性記憶Th2細胞による慢性気道炎症と肺線維化の病態制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギー	6. 最初と最後の頁 1358 ~ 1362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15036/arerugi.70.1358	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 Suzuki Akane S., Yagi Ryoji, Kimura Motoko Y., Iwamura Chiaki, Shinoda Kenta, Onodera Atsushi, Hirahara Kiyoshi, Tumes Damon J., Koyama-Nasu Ryo, Iismaa Siiri E., Graham Robert M., Motohashi Shinichiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential Role for CD30-Transglutaminase 2 Axis in Memory Th1 and Th17 Cell Generation	5. 発行年 2020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.2020.01536	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 岩村千秋、中山俊憲	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 病原性記憶T細胞による慢性炎症の制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 19-24
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 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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩村 千秋
2. 発表標題 Elevated MyI9 reflects the MyI9-containing microthrombi in SARS-CoV-2 induced lung exudative vasculitis and predicts COVID-19 severity
3. 学会等名 日本免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩村 千秋
2. 発表標題 Single cell-RNA sequencingを用いたCOVID-19重症化メカニズムの解明と重症化マーカーの同定
3. 学会等名 10X ユーザーミーティング (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩村 千秋
2. 発表標題 Tgm2 regulates memory Th cell generation through CD30 signaling
3. 学会等名 第23回トランスグルタミナーゼ研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩村 千秋
2. 発表標題 Microbiota sensing by NOD1 in bone marrow mesenchymal cells regulates hematopoietic homeostasis
3. 学会等名 日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 COVID-19に罹患しているか、もしくはCOVID-19に罹患しているリスクがあるかを検出するための方法、又は重症化を判定するための方法	発明者 中山俊憲、平原潔、 木村元子、岩村千秋	権利者 千葉大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-098843	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 肺高血圧症の検出方法及び肺高血圧症の治療薬若しくは予防薬	発明者 中山俊憲、木村元子、平原潔、岩村千秋、栗山祥子	権利者 千葉大学、順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-165838	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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

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1件

国際研究集会 Critical cooperation at the interface between infection and immunity	開催年 2022年～2022年
--	--------------------

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