

令和 5 年 6 月 6 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：20K08798

研究課題名（和文）Fizzled受容体シグナルによるアレルギー性気道炎症の誘導機構の解明とその制御

研究課題名（英文）The role of Frizzled Receptor Signaling in allergic airway inflammation

研究代表者

岩田 有史 (Arifumi, Iwata)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90436353

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）：近年、発生・器官形成において重要な働きをすることが知られているWnt/FzdシグナルがT細胞分化に影響を及ぼすとの少数の報告があるが、未だ一定の見解は得られていない。そこで本研究ではTh2細胞分化におけるcanonical Wnt経路とnon-canonical Wnt経路の役割を、Wntの受容体であるFrizzled受容体に着目して明らかにし、その制御法を開発することを目的とした。Th2細胞に特異的に発現するFrizzled受容体の欠損CD4T細胞は、in vivo喘息環境下においてもTh2細胞分化が障害され、同受容体シグナルがTh2細胞分化に重要な役割を担っていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Th2細胞分化誘導機構については、IL-4を中心としたautocrineな経路が中心的な役割を果たすことはよく知られているが、生体内でTh2細胞の誘導機構はいまだ不明である。本研究では、Wnt関連蛋白のTh2細胞特異的な受容体刺激により、WntシグナルがTh2細胞分化に深く関係することを明らかとなった。これまでのサイトカインによる免疫制御とは異なる観点からの治療戦略が生まれることから、従来の免疫抑制療法に抵抗性の難治性患者への新規治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recently, several reports have suggested that the Wnt/Fzd signaling pathway, known for its crucial roles in development and organ formation, can influence T cell differentiation. However, a consensus has not yet been reached on this matter. Therefore, the aim of this study was to investigate the roles of the canonical and non-canonical Wnt pathways, focusing on the Frizzled receptors, in Th2 cell differentiation and to develop methods for their control. We demonstrated that CD4T cells lacking Frizzled receptors specifically expressed in Th2 cells exhibited impaired Th2 cell differentiation even in an in vivo asthma environment, thus highlighting the critical role of Frizzled receptor signaling in Th2 cell differentiation.

研究分野：臨床免疫

キーワード：アレルギー性疾患 気管支喘息 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は患者数が約 800 万人と推定される最も有病率が高いアレルギー性呼吸器疾患である。その本態は好酸球とリンパ球の気道への浸潤、粘液過剰産生により特徴づけられる慢性アレルギー性気道炎症と、引き続き起こる気管支平滑筋の増生や繊維化による気道リモデリングと考えられている。吸入ステロイド薬に加え、IgE、IL-5、IL-4/IL-13を標的とした分子標的治療薬が開発・臨床応用され、治療の選択肢は増えたが、未だに治療困難な症例が多数存在し、さらなる病態の解明に基づく新たな治療戦略の確立が望まれている。

Wnt ファミリー蛋白は発生、器官・形態形成、細胞増殖に重要な働きを持つ分子群であり、ヒトでは 19 種類の Wnt 蛋白が存在する。Wnt ファミリー蛋白は 10 種の Fizzled 受容体(Fzd 受容体)と 5 つの共役受容体からなる受容体に結合し、 $\beta$ -catenin を介する canonical 経路、 $\beta$ -catenin を介さない 2 種類の non-canonical 経路(Ca<sup>2+</sup>経路, PCP 経路)の計 3 経路によりシグナルを伝達する。各 Wnt と各 Fzd 受容体間の対応関係はまだ確立されておらず、さらにその下流のシグナル伝達、転写調節に至るまでの経路も未だ不明な点が多く残されている。

近年、喘息患者の気管支擦過検体、肺生検検体、気管支平滑筋のトランスクリプトーム解析により、Type2 炎症優位型喘息患者において、non-canonical Wnt 蛋白や Fzd 受容体の発現が亢進していることが報告された。さらに、アレルギー性気道炎症の誘導や Th2 細胞分化と Wnt シグナルの関連に関しては、アレルギー性気道炎症や Th2 細胞分化を抑制するという報告と、促進するという相反する報告がそれぞれ少数存在し、結論は得られていない。

本申請研究では、アレルギー性気道炎症・気道リモデリングにおける Wnt/Fzd シグナルの役割を解明するとともに、その分子メカニズムを明らかとし、その制御法の開発を目指す。本研究により、難治性喘息や気道リモデリングにおける新たな治療基盤を確立されることが期待できる。

## 2. 研究の目的

本申請研究ではアレルギー性気道炎症における canonical Wnt 経路と non-canonical Wnt 経路の役割を、CD4<sup>+</sup>T 細胞と上皮細胞に発現する Fzd 受容体に着目して明らかにすることにより、Fzd 受容体を標的とした喘息の新規治療法開発のための基盤を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず T 細胞分化における Wnt シグナルの役割を解析し(成果 1, 2, 5)、アレルギー性気道炎症における同シグナルの役割を解析する(成果 3, 4)。

## 4. 研究成果

### 成果 1. T細胞培養条件での Wnt 関連蛋白の発現解析

<方法> 野生型 8 週齢 C57BL/6 マウスの脾臓より naive CD4T 細胞を採取し、Th1 分化条件/Th2 分化条件下で培養し、経時的な Wnt 受容体、共役受容体の発現を realtime-PCR 法を用いて検討した。

<結果> 定常状態では、Fzd5, LRP6 の発現認められた。Th2 細胞条件下では non-canonical 経路を誘導する Fzd7 受容体と Ryk の発現亢進した。canonical 経路を誘導することが知られている

Fzd4, Fzd9 の発現は Th1, Th2 条件共に発現が低かった。また他の Fzd 受容体の発現は検出できなかった。

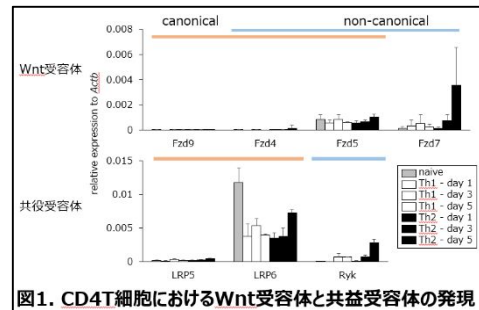


図1. CD4T細胞におけるWnt受容体と共役受容体の発現

### 結果 2. T細胞培養条件での Wnt 阻害薬の作用

<方法> Wnt 阻害薬の存在下で Th1 分化条件、Th2 分化条件で naive CD4T 細胞を培養し、Th 分化に対する Wnt シグナルの作用を検討した。

<結果> Th1 条件では Wnt 阻害薬による IFN- $\gamma$  産生は阻害されなかったが、Th2 条件では IL-4 産生が著明に抑制された。

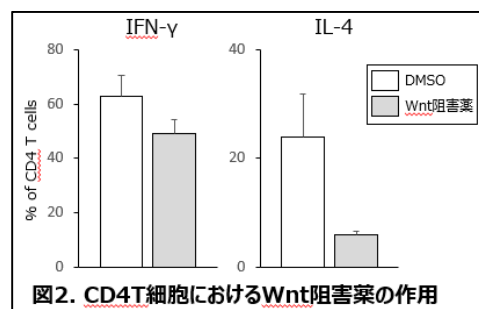


図2. CD4T細胞におけるWnt阻害薬の作用

### 結果 3. アレルギー性気道炎症における Wnt 関連蛋白の発現解析

<方法>野生型マウスに経気道的にチリダニ抽出物(HDM)を反復投与することにより HDM 誘導性アレルギー性気道炎症モデルを誘導し、肺 CD4 陽性 T 細胞、気道上皮細胞における Wnt 受容体と共役受容体の発現解析を行った。

<結果> 肺内 CD4 陽性 T 細胞では Fzd4, Lrp5, Lrp6 等、canonical Wnt 関連受容体はアレルギー性気道炎症の進展とともにその発現は低下した。一方 Fzd7, Ryk 等の non-canonical Wnt 関連受容体の発現低下は認められなかったが、結果 1 で示した Th2 分化条件で強力に誘導される Fzd7 の発現亢進は認められなかった。気道上皮細胞においては Fzd2, Fzd8 の発現抑制を除き、Wnt 受容体の発現変動は大きくは認められなかった。

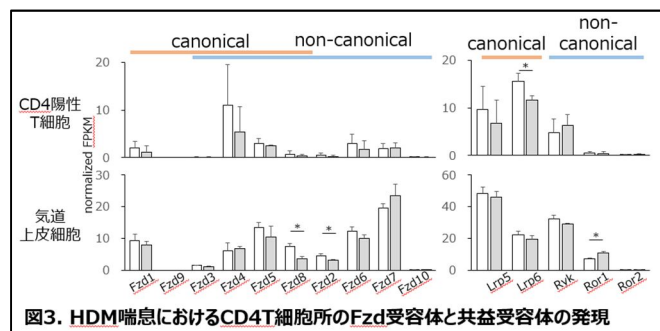


図3. HDM喘息におけるCD4T細胞所のFzd受容体と共役受容体の発現

### 結果 4. アレルギー性気道炎症における Wnt 阻害薬の作用

<方法> HDM 誘導性アレルギー性気道炎症において、Wnt 阻害薬の経気道投与を行い、気管支肺胞洗浄液を解析することで、好酸球性炎症に対する Wnt 阻害薬の作用を検討した。

<結果> Wnt 阻害薬により好酸球性炎症、好

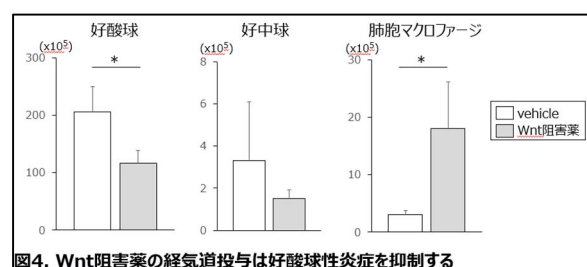


図4. Wnt阻害薬の経気道投与は好酸球性炎症を抑制する

中球性炎症共に減弱した。

### 結果 5. アレルギー性気道炎症における Fzd7 の役割

<方法> Fzd7 の T 細胞における機能を解析するため、Cas9 発現マウスの骨髄に Fzd7-gRNA を遺伝子導入し、放射線照射した野生型マウスに移入することで、血球系の一部細胞で Fzd7 を欠損するマウスを作成した。HDM 誘導性アレルギー性気道炎症を惹起し、肺内 CD4 陽性 CD44 陽性 Thy1.1 陽性(gRNA マーカー)活性化 T 細胞を採取し、網羅的トランスクリプトーム解析を行った。

<結果> 気道炎症による影響は変わらない条件下に置いて、Fzd7 欠損により IL-4 の著明な抑制と IL-17a 産生誘導が見られた。Fzd7 シグナルはアレルギー性気道炎症下の CD4 陽性 T 細胞の機能に大きく寄与していることが明らかとなった。

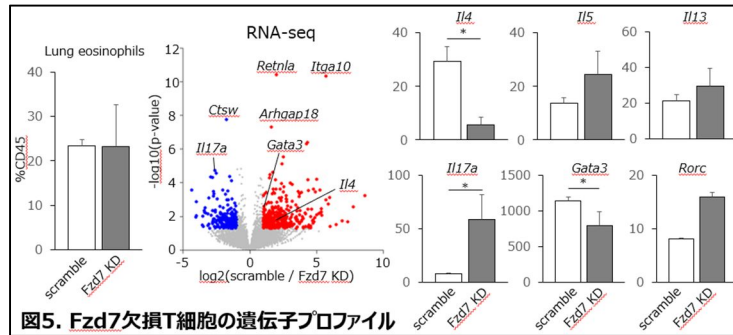


図5. Fzd7欠損T細胞の遺伝子プロファイル

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Suzuki K, Suzuki K, Yabe Y, Iida K, Ishikawa J, Makita S, Kageyama T, Iwamoto T, Tanaka S, Yokota M, Iwata A, Suto A, Nakajima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 NF- B1 Contributes to Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation by Inducing V 4+V 4+ T17 Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	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.2021.11.004	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 Kubota A, Suto A, Suga K, Iwata A, Tanaka S, Suzuki K, Kobayashi Y, Nakajima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of Interleukin-21 prolongs the survival through the promotion of wound healing after myocardial infarction.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol.	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.yjmcc.2021.06.006.	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 Kato M, Ikeda K, Sugiyama T, Tanaka S, Iida K, Suga K, Nishimura N, Mimura N, Kasuya T, Kumagai T, Furuya H, Iwamoto T, Iwata A, Furuta S, Suto A, Suzuki K, Kawakami E, Nakajima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Associations of ultrasound-based inflammation patterns with peripheral innate lymphoid cell populations, serum cytokines/chemokines, and treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	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） 10.1371/journal.pone.0252116.	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 Fukuta M, Suzuki K, Kojima S, Yabe Y, Suzuki K, Iida K, Yamada H, Makino S, Iwata A, Tanaka S, Iwamoto T, Suto A, Nakagomi D, Wakashin H, Maezawa Y, Maezawa Y, Takemoto M, Asanuma K, Nakajima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) expressed in podocytes attenuates glomerulonephritis and suppresses autoantibody production in an imiquimod-induced lupus model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lupus Sci Med	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) 10.1136/lupus-2020-000426.	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 Furuya H, Nakajima M, Ikeda K, Nakamura K, Ohbe H, Aso S, Kumazawa R, Iwamoto T, Iwata A, Furuta S, Matsui H, Fushimi K, Yasunaga H, Nakajima H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Prognosis and Treatment of Myositis-Associated Severe Interstitial Lung Disease: A Descriptive Study Using a Nationwide Inpatient Database in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis Care Res	6. 最初と最後の頁 478-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acr.24646.	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 Suehiro KI, Suto A, Suga K, Furuya H, Iwata A, Iwamoto T, Tanaka S, Kageyama T, Suzuki K, Hirose K, Lefebvre V, Nakajima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sox12 enhances Fbw7-mediated ubiquitination and degradation of GATA3 in Th2 cells. Suehiro KI, Suto A, Suga K, Furuya H, Iwata A, Iwamoto T, Tanaka S, Kageyama T, Suzuki K, Hirose K, Lefebvre V, Nakajima H.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Mol Immunol	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) 10.1038/s41423-020-0384-0.	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 Makita S, Takatori H, Iwata A, Tanaka S, Furuta S, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Ramos SBV, Nakajima H.	4. 巻 11
2. 論文標題 RNA-Binding Protein ZFP36L2 Downregulates Helios Expression and Suppresses the Function of Regulatory T Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 1291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.01291.	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 Kim S, Bagadia P, Anderson DA 3rd, Liu TT, Huang X, Theisen DJ, O'Connor KW, Ohara RA, Iwata A, Murphy TL, Murphy KM.	4. 巻 53
2. 論文標題 High Amount of Transcription Factor IRF8 Engages AP1-IRF Composite Elements in Enhancers to Direct Type 1 Conventional Dendritic Cell Identity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 759-774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2020.07.018.	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 該当する

1. 著者名 nflammation in Mice. Makita S, Takatori H, Matsuki A, Kawashima H, Iwata A, Tanaka S, Nakagomi D, Oya Y, Matsumura R, Tamachi T, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Nakajima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 T-bet and STAT6 Coordinately Suppress the Development of IL-9-Mediated Atopic Dermatitis-Like Skin Inflammation in Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	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.2020.08.029.	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 Kasuya T, Tanaka S, Tamura J, Etori K, Shoda J, Hattori K, Endo Y, Kitajima M, Kageyama T, Iwamoto T, Yokota M, Iwata A, Suto A, Suzuki K, Suzuki H, Ziegler SF, Nakajima H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Epithelial cell-derived cytokine TSLP activates regulatory T cells by enhancing fatty acid uptake.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28987-1.	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 Iwata A, Toda Y, Furuya H, Nakajima H.	4. 巻 72
2. 論文標題 Group 2 innate lymphoid cells in human asthma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 194-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.12.001. Epub 2022 Dec 29.	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 Yokoyama Y, Tamachi T, Iwata A, Maezawa Y, Meguro K, Yokota M, Takatori H, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Yamaguchi N, Honda H, Nakajima H.	4. 巻 629
2. 論文標題 A20 (Tnfaip3) expressed in CD4+ T cells suppresses Th2 cell-mediated allergic airway inflammation in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 47-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.097. Epub 2022 Sep 6.	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 Nishimura N, Yokota M, Kurihara S, Iwata A, Kageyama T, Ito T, Saku A, Maezawa Y, Hirose K, Nakajima H.	4. 巻 71
2. 論文標題 Airway epithelial STAT3 inhibits allergic inflammation via upregulation of stearyl-CoA desaturase 1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 520-527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.05.002. Epub 2022 Jun 2.	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 該当する

1. 著者名 戸田陽介, 岩田有史, 中島裕史	4. 巻 80
2. 論文標題 喘息病態における2型自然リンパ球	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 185-190
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 須賀謙介、須藤明、影山貴弘、田中繁、岩本太郎、岩田有史、池田啓、鈴木浩太郎、中島 裕史
2. 発表標題 転写因子Tp63はFoxp3発現を抑制し、関節リウマチの病態形成に寄与する
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 須賀謙介、岩田有史、前澤裕子、中島 裕史
2. 発表標題 納豆・アニサキスによる重複アレルギーの一例
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 岩田有史、前澤 裕子、玉地 智宏、中島 裕史
2. 発表標題 皮膚試験にて非典型的な即時型反応を呈した局所麻酔薬アレルギーの2例
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前澤裕子、林佑紀、岩田有史、井田友明、高山明日香、影山貴弘、田中繁、岩本太郎、横田雅也、池田啓、須藤明、中島裕史
2. 発表標題 新型コロナウイルスワクチン接種を契機に発症しアナフィラキシー様症状を呈した声帯機能不全症の一例
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田陽介、古矢裕樹、岩田有史、金井瑞希、影山貴弘、田中繁、須藤明、中島裕史
2. 発表標題 ILC2特異的スーパーエンハンサー領域のILC2分化における役割の解明
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junichi Ishikawa, Akira Suto, Takahiro Kageyama, Kazuyuki Meguro, Shigeru Tanaka, Taro Iwamoto, Arifumi Iwata, Shunsuke Furuta, Kei Ikeda, Kotaro Suzuki, Hiroshi Nakajima
2. 発表標題 Role of IL-21 receptor in IL-17-producing T cells in the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis
3. 学会等名 第51回日本免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuma Iida, Kotaro Suzuki, Takahiro Kageyama, Kazuyuki Meguro, Shigeru Tanaka, Arifumi Iwata, Akira Suto, Hiroshi Nakajima
2. 発表標題 A role of Achaete-scute complex homolog 2 in T follicular regulatory cell development
3. 学会等名 第51回日本免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunjiro Kurihara, Masaya Yokota, Kotaro Suzuki, Takahiro Kageyama, Kazuyuki Meguro, Shigeru Tanaka, Arifumi Iwata, Akira Suto, Hiroshi Nakajima
2. 発表標題 A role of eosinophils in oral tolerance for food allergy
3. 学会等名 第51回日本免疫学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	須藤 明	千葉大学・大学院医学研究院・准教授	
	(Akira Suto)		
	(50447306)	(12501)	

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	横田 雅也  (Masaya Yokota)  (70721950)	千葉大学・医学部附属病院・特任助教     (12501)	

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