

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17175

研究課題名（和文）肺線維症における病原性ヘルパーT細胞による病態形成の新規分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of pathogenesis by pathogenic helper T cells in pulmonary fibrosis

研究代表者

青木 亜美（Aoki, Ami）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60827674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺の線維症は予後不良の慢性疾患であり、その発症・増悪機序は未解明の部分が多い。本研究課題では、CD4陽性T細胞と肺胞上皮細胞に着目して、肺の炎症と修復・線維化誘導機構を解析した。結果、アスペルギルス抗原刺激で誘導されるCD4陽性T細胞は肺胞上皮細胞の分化に作用し、肺傷害時の修復を促進させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象にした難治性呼吸器疾患である肺の線維症は、生命予後が不良の疾患である。申請者は本研究において、これまで解明されていなかったCD4陽性T細胞と肺胞上皮細胞の関連と組織修復について検討した。本研究課題を遂行することで、肺胞上皮細胞を中心とした炎症と線維化の分子基盤を構築することができ、新たな病態解明や治療戦略開発に寄与することが可能である。

研究成果の概要（英文）：Lung fibrosis is a chronic disease with a poor long-term prognosis, and its pathogenesis and exacerbation mechanisms remain largely unknown. In this research, we focused on CD4-positive T cells and alveolar epithelial cells to analyze the mechanisms of lung inflammation, repair, and fibrosis. The result suggests that CD4-positive T cells promote the differentiation of alveolar epithelial cells and the repair of the lung after injury.

研究分野：呼吸器内科学、免疫学

キーワード：CD4陽性T細胞 肺胞上皮細胞 修復機構 線維化

1. 研究開始当初の背景

線維化とは細胞外マトリックスが過剰に臓器や組織に沈着し、正常の臓器機能が障害される病態である。線維症は肺や肝臓、心臓、皮膚等で認められ、臓器機能不全や死に至る重篤な慢性疾患であり、特に肺線維症は予後不良である。近年、抗線維化薬が多くの特発性肺線維症患者に使用されているがその効果は限定的である。そのため、新規治療法の開発が急務であり、未だ解明されていない線維症の発症機序を明らかにすることが必要である。

肺をはじめとする全身の臓器は、組織傷害や感染、自己免疫疾患、外因性異物、腫瘍、加齢、遺伝的要因等を契機とした慢性炎症の結果、不可逆的な線維化に至る (Wick G et al., *Annu Rev Immunol.* 2013)。慢性炎症の病態形成の中心を担う細胞は、CD4 陽性 T 細胞であり、線維化病態形成において CD4 陽性 T 細胞が担う役割は大きいと考えられている。申請者の研究室ではこれまでに、気管支喘息患者において IL-5 を高産生する病原性の高い CD4 陽性 T 細胞集団である“記憶型病原性 2 型 CD4 陽性 T 細胞”を同定した (Endo Y et. al., *Immunity* 2011)。さらに、Amphiregulin を産生する病原性ヘルパー T 細胞の亜集団である“線維化誘導-病原性ヘルパー T 細胞”が気管支喘息等の慢性炎症に伴う中枢気道領域の線維化の誘導に深く関わることを報告した (Morimoto Y et. al., *Immunity* 2018)。また“線維化誘導-病原性 CD4 陽性 T 細胞”が気道周囲に長期間に渡って常在すること、この“線維化誘導-病原性 CD4 陽性 T 細胞”によって誘導される組織線維化は、組織常在性の制御性 T 細胞によって制御されることを見出した (Ichikawa T et. al., *Nat Immunol.* 2019)。しかし、肺のさらに末梢に位置する肺泡領域における CD4 陽性 T 細胞関連組織線維化の病態形成機構はいまだに不明である。これまでの申請者らの研究結果を踏まえて、「肺末梢の肺泡領域における線維化は、線維化を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞によって形成され増悪する」という作業仮説を立て、本仮説を証明するための研究を計画した。

2. 研究の目的

肺は外界に通じる臓器であるため、外来抗原の刺激を常に受ける。このため、慢性過敏性肺臓炎、膠原病など様々な疾患に伴う線維化の発症機序に、特異的な抗原を認識する CD4 陽性 T 細胞が関与している可能性が示唆されるが、詳細な機序は不明である。

本研究では、肺の組織修復と線維化の病態を解明することを目的とし、CD4 陽性 T 細胞と肺泡上皮細胞に着目した解析を行う (図 1)。

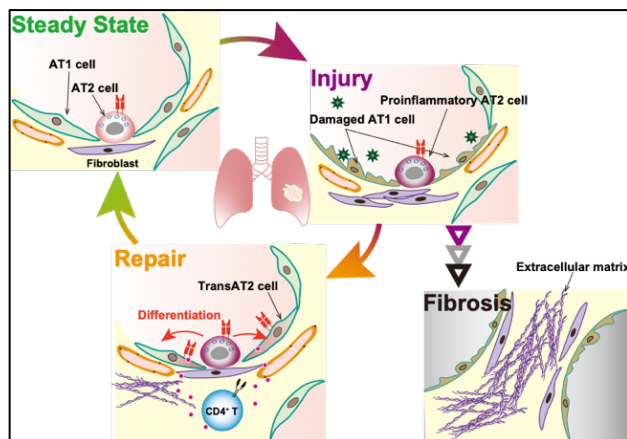


図 1. 肺の障害と組織修復のシエーマ

肺泡上皮細胞は肺傷害時に 2 型肺泡上皮細胞 (AT2 cell) から 1 型肺泡上皮細胞 (AT1 cell) に分化が促進される。

3. 研究の方法

(i) マウスモデルの作成

マウスに粉碎アスペルギルス抗原を反復性に経鼻投与した。

(ii) 肺胞上皮細胞と炎症細胞の時空間的解析

肺胞上皮細胞の分化と炎症細胞浸潤を肺組織の蛍光多重免疫染色と肺由来細胞のフローサイトメトリー解析で観察した。

(iii) 肺オルガノイド の 3D-培養系による肺胞上皮細胞と炎症性サイトカインの検討

マウス由来の肺胞上皮細胞と線維芽細胞を 3 次元培養し、肺オルガノイドを作成した(図 2)。肺オルガノイド培養系に様々な炎症性サイトカインを添加し、オルガノイドの変化を観察した。

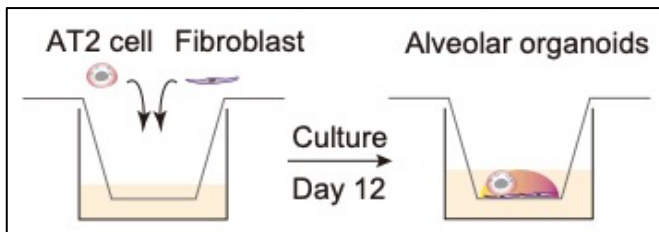


図 2. 肺オルガノイド 作成

2型肺胞上皮細胞 (AT2 cell) と線維芽細胞 (Fibroblast) を単離し、培地で培養する。

4. 研究成果

(i) マウスモデルの作成

マウスに粉碎アスペルギルス抗原を反復性に経鼻投与しマウスモデルを作成した。このマウスの肺では、CD4 陽性 T 細胞の浸潤を主体とする軽度の炎症と肺胞上皮細胞の分化・修復が観察された。このマウスにおける CD4 陽性 T 細胞の役割を明らかにするために、CD4 陽性 T 細胞除去マウスに抗原を反復投与したところ、炎症と線維化が増悪した。また、肺胞上皮細胞の分化が抑制されていた。本マウスモデルでは CD4 陽性 T 細胞が肺胞上皮細胞の分化に作用し、炎症と線維化の病態に寄与していることが示唆された。

(ii) 肺胞上皮細胞と炎症細胞の時空間的解析

前述のマウスモデルにおける免疫組織学的染色による検討で肺胞上皮細胞と炎症細胞浸潤の空間的位置を確認すると、炎症細胞浸潤が目立つ箇所では肺胞上皮細胞の分化が誘導されていることが分かった。また、アスペルギルス抗原の反復投与回数に比例して、肺胞上皮細胞の分化は促進されていた。以上より、本マウスモデルで誘導される炎症と肺胞上皮細胞の分化が深く関連していると考えられた。

(iii) 肺オルガノイド の 3D-培養系による肺胞上皮細胞と炎症性サイトカインの検討

本マウスモデルで誘導された CD4 陽性 T 細胞から産生されるサイトカインが肺胞上皮細胞に与える作用を検討するために、肺オルガノイド の 3D-培養系にサイトカインを添加した。添加するサイトカインによって肺胞上皮細胞の分化・増殖は変化することが明らかになった。

本研究期間では解析が終了しなかったが、今後、1 細胞 RNA シークエンスやエピジェネティクス解析を行い、肺胞上皮細胞-炎症関連機構のメカニズムをより詳細に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirahara Kiyoshi, Aoki Ami, Kiuchi Masahiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 -
2. 論文標題 Memory-type pathogenic TH2 cells and ILC2s in type 2 allergic inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical 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) 10.1016/j.jaci.2021.02.006	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, Aoki Ami, Nakayama Toshinori	4. 巻 70
2. 論文標題 Pathogenic helper T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 169 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2021.02.001	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 Aoki Ami, Hirahara Kiyoshi, Kiuchi Masahiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 70
2. 論文標題 Eosinophils: Cells known for over 140 years with broad and new functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 3 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.09.002	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 青木亜美、平原潔、中山俊憲	4. 巻 70(2)
2. 論文標題 病原性Th2細胞	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギー -	6. 最初と最後の頁 134-135
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 青木亜美、平原潔、中山俊憲	4. 巻 40(537)
2. 論文標題 病原性ヘルパ-T細胞とアレルギー-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギー-の臨床	6. 最初と最後の頁 31-34
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 青木亜美、平原潔、中山俊憲	4. 巻 73(6)
2. 論文標題 肺の組織線維化をひき起こす新たな細胞集団の同定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー-科	6. 最初と最後の頁 652-657
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 Katsuaki Asakawa, Ami Aoki, Toshinori Takada	4. 巻 39
2. 論文標題 Comparison of cytokine profiles between anti-ARS antibody-positive interstitial lung diseases and those with anti-MDA-5 antibodies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2171-2178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-020-04984-x.	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0件

〔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

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