

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号 : 12501

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2011~2012

課題番号 : 23659496

研究課題名(和文) メモリーTh2 細胞プール縮小療法の開発研究

研究課題名(英文) Reduction of memory Th2 cell pool for the treatment of allergic diseases

研究代表者

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号 : 00322024

研究成果の概要(和文):

気管支喘息は人口の約 4%が罹患する重篤なアレルギー性呼吸器疾患であり、その病態にはアレルゲンに対するメモリーTh2 細胞が深く関与している。成人喘息は自然緩解することは稀であり、治療継続による社会的・経済的損失は計り知れない。患者の多くは吸入ステロイドを中心とした対症療法で治療されるが、5-10%が治療抵抗性の重症喘息であり、さらなる治療戦略の確立が急がれている。そこで本申請研究では、メモリーTh2 細胞に特異的に発現する細胞表面分子に対する抗体を用いたメモリーTh2 細胞プールの縮小法を開発し、アレルギー疾患に対する新規治療法の基盤構築を目指した。本研究では、シグナルシーケンストラップ法と DNA マイクロアレイ解析を組み合わせ、メモリーTh2 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の同定を目指したが、残念ながらメモリーTh2 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の同定には至らなかった。一方、スクリーニングに用いるメモリーTh2 細胞を探索する過程で、肺特異的に IL-25 を発現するマウスでは、肺血管周囲に Th2 型炎症が自然発症し、血管壁のリモデリングが認められることを見出した。さらに IL-25 による肺血管周囲の炎症は NKT 細胞依存的であることを見出した。

研究成果の概要(英文):

The characteristics of asthma are mainly mediated by antigen-specific memory Th2 cells and their cytokines including IL-4, IL-5, and IL-13. In this study, we tried to identify cell surface molecules specific for memory Th2 cells by using DNA microarray analysis and retrovirus-mediated signal sequence trap screening. However, unfortunately, we could not identify memory Th2 cell-specific molecules within this research period. On the other hand, we found that prolonged Th2-type immune inflammation in the lung induces the expression of IL-25 and pulmonary arterial remodeling (PAR). Injection of anti-IL-25 antibody inhibited antigen-induced PAR. Lung-specific IL-25 transgenic mice (CC10 IL-25 mice) but not CC10 IL-25 NKT<sup>-/-</sup> mice spontaneously developed PAR. These results suggest that prolonged expression of IL-25 in the lung induces PAR by NKT cell-dependent mechanisms.

交付決定額

(金額単位: 円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：メモリーTh2細胞、気管支喘息、肺血管リモデリング、IL-25

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は増加の一途をたどっており、その病態の解明に基づく有効な根本的治療法の確立が急務である。本研究者は、長年にわたりアレルギー性気道炎症の制御機構の解明に取り組み、マウス喘息モデルを確立し好酸球の組織浸潤におけるTh2細胞が産生するIL-5の重要性(Am Rev Respir Dis, 1992; J Exp Med, 1993)や好酸球やT細胞の選択的組織浸潤におけるVCAM-1/VLA-4結合の重要性(J Exp Med, 1994)を明らかにするなど、当該領域の病態解明に貢献してきた。

気管支喘息の長期寛解を期待できる唯一の治療法として抗原特異的免疫療法があるが、その有効性は不十分である。その原因としてアレルギー疾患患者の生体内にはメモリーTh2細胞のプールが既に形成されていることが考えられる。この問題点を克服し、抗原特異的免疫療法の有効性を高めるためには、メモリーTh2細胞のプールを縮小することが重要であるが、メモリーTh2細胞の除去に利用可能なメモリーTh2細胞に特異的に発現する細胞表面分子は同定されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、メモリーTh2細胞に特異的に発現する細胞表面分子を同定し、アレルギー性炎症におけるメモリーTh2細胞の局在と機能を明らかにするとともに、同分子に対する抗体を用いたメモリーTh2細胞プールの縮小法を確立することを目的とした。喘息の病態に中心的な役割を果たすメモリーTh2細胞を特異的に生体内から除去することは、寄生虫疾患の殆ど存在しない先進諸国においては、効率的かつ安全な治療法であり、幅広い応用が期待される。

## 3. 研究の方法

研究計画 1.メモリーTh2細胞特異的細

## 胞表面分子の同定

シグナルシーケンストラップ変法とDNAマイクロアレイ解析を組み合わせ、メモリーTh2細胞に特異的に発現する細胞表面分子の同定を行った。

A)シグナルシーケンストラップを用いたメモリーTh2細胞の細胞表面分子の同定

a) OVA 特異的 TCR Tg マウスである DO11.10 マウスの脾臓 CD4 陽性 T 細胞を *in vitro* で Th2 細胞に分化誘導する。同様の方法で調整した Th1 細胞と Th0 細胞をコントロールとする。

b) 上記細胞を BALB/c マウスに移入後、マウスに OVA を 3 日間連日で吸入投与する。

c) 吸入 90 日後の肺組織から、DO11.10 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞(KJI-26 陽性 CD4 陽性細胞) を FACS を用いて純化し(メモリーTh2細胞、メモリーTh1細胞、メモリーTh0細胞)、各メモリーT細胞から mRNA を調整し、cDNA を作製する。

d) メモリーTh2細胞から調整した cDNA をシグナルシーケンストラップ用レトロウイルスベクター(持続活性型 mpl との融合タンパク発現レトロウイルスベクター)(東大医科研 北村教授より供与)に組み込む。

e) レトロウイルスベクターを PLAT-E 細胞にトランスフェクトし、高力価レトロウイルスライブラリーを作製する。

f) レトロウイルスライブラリーを BAF/3 細胞に感染させ、培養液から IL-3 を除去することにより、mpl との融合タンパクを発現する細胞を選択する。

g) IL-3 非存在下で増殖した BAF/3 細胞から PCR にて insert を回収し、塩基配列を決定する(1000 クローン程度の塩基配列の解読)。

本方法により、メモリーTh2細胞に発現する細胞表面分子が同定される。

## B) DNA マイクロアレイを用いたメモリー Th2 細胞特異性の検証

a) A)-c)にて調整したメモリー Th2 細胞、メモリー Th1 細胞、メモリー Th0 細胞の mRNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行う。

b) A)-g)にて同定したメモリー Th2 細胞に発現する細胞表面分子が Th2 細胞特異的に発現しているか否かをアレイデータをもとに検証する。

c) アレイデータよりメモリー Th2 細胞特異的発現が確認された分子に関して、real-time PCR にてメモリー Th2 細胞特異的発現を確認する。

## 研究計画 2. 肺血管リモデリングにおける IL-25 の役割の解明

研究計画 1 のライブラリー作製に用いるメモリー Th2 細胞の機能を探索する過程で、肺特異的に IL-25 を発現するマウス (CC10 IL-25 マウス) では、肺血管周囲に Th2 型炎症が自然発症し、血管壁のリモデリングが認められることを見出した。そこで本研究では、研究計画 1 のスクリーニングに加え、下記の研究を行った。

### A) 慢性喘息モデルの肺血管リモデリングにおける IL-25 の役割の解明

OVA で感作したマウスに OVA を反復吸入投与し慢性アレルギー性炎症を惹起し、肺血管のリモデリングを評価する。一部のマウスには、OVA 吸入前に抗 IL-25 中和抗体を投与し、その作用を検討する。

### B) 肺特異的 IL-25 トランスジェニックマウスの解析

CC10 プロモーターの制御下で肺特異的に IL-25 を発現するマウス (CC10 IL-25 マウス) を C57BL/6 マウス (B6 マウス) に戻し交配する。CC10 IL-25 マウスを長期間飼育し、肺血管のリモデリングを評価する。

### C) 肺特異的 IL-25 トランスジェニック NKT 細胞欠損マウスの解析

CC10 IL-25 マウスと NKT 細胞欠損マウスを交配し、CC10 IL-25 NKT 細胞欠損マウス

を作製する。マウスを長期飼育し、肺血管のリモデリングを評価する。

## 4. 研究成果

### 研究 1.メモリー Th2 細胞特異的細胞表面分子の同定

シグナルシークエンストラップ変法と DNA マイクロアレイ解析を組み合わせて、メモリー Th2 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の同定を目指した。計 3 回のスクリーニングを行ったが、残念ながらメモリー Th2 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の同定には至らなかった。方法を改良し、現在、再スクリーニングを行っている。

### 研究 2. 肺血管リモデリングにおける IL-25 の役割の解明

IL-25 は抗原吸入により気道上皮細胞から産生され、NH 細胞、MMP 細胞、NKT 細胞、CD4 陽性 T 細胞などに作用し、IL-5、IL-4、IL-13、IL-9 の産生を誘導し、好酸球の活性化、Th2 細胞の分化や IgE 産生、平滑筋増生に関与していることが示されている。そこで OVA/Alum により感作した B6 マウスに OVA を反復吸入投与し、肺動脈周囲の平滑筋増生の有無、および肺組織における IL-25 の産生を検討した。その結果、OVA を反復吸入投与したマウスの肺組織では気道周囲の肺血管壁の肥厚や血管周囲の平滑筋増生などの肺血管リモデリングに特徴的な所見が認められた(図 1 左)。また、OVA を反復吸入投与したマウスの肺組織において IL-25 が発現しているか否かを定量的 RT-PCR 法により検討したところ、OVA を反復吸入投与したマウスでは IL-25 の発現亢進が認められた(図 1 右)。

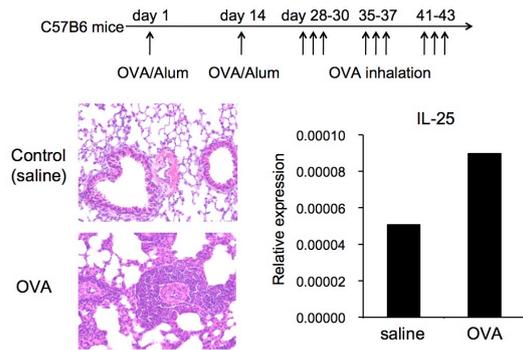


図 1: 慢性気道炎症モデルにおける IL-25 の発現

さらに IL-25 が抗原誘発性肺血管リモデリングに関与しているか否かを明らかにするため、OVA 吸入投与前に IL-25 に対する中和抗体を投与し肺血管リモデリングに対する作用を検討した。その結果、コントロール IgG 投与群では、肺血管壁の肥厚や平滑筋増殖が認められたが、抗 IL-25 抗体を投与したマウスには、肺血管壁の肥厚や平滑筋増殖が減弱した(図 2)。以上より、IL-25 が抗原誘発により誘導される肺血管の壁肥厚と肺血管周囲の平滑筋増生に関与していることが明らかとなった。

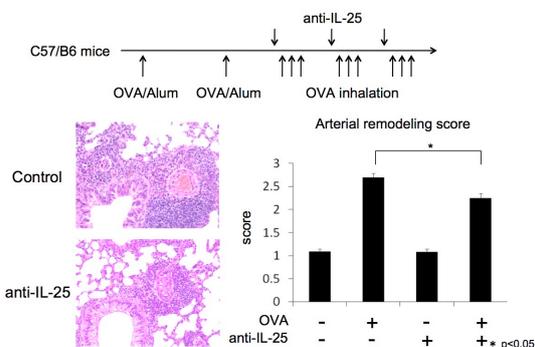


図 2: 肺血管リモデリングに対する IL-25 中和抗体の作用

次に IL-25 が肺血管リモデリングを直接誘導するか否かを明らかにするため、CC10 プロモーターを用いて肺特異的に IL-25 を過剰発現するトランスジェニックマウス(CC10-IL-25 マウス)における肺血管のリモデリングを検討した。その結果、CC10-IL-25 マウスは抗原の非投与下にお

いて肺血管の壁肥厚や平滑筋の増生を自然発症した(図 3)。これらの結果より、IL-25 は、抗原刺激非存在下においても肺血管に作用し、そのリモデリングを誘導することが示唆された。

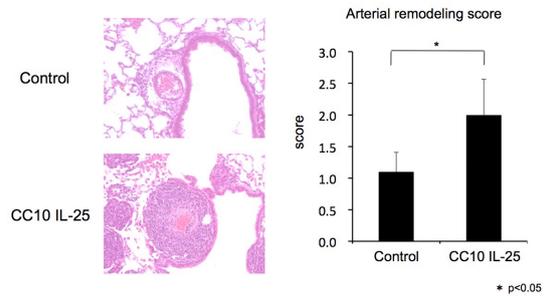


図 3: 肺特異的 IL-25 発現マウスにおける肺血管のリモデリング

近年、マクロファージや血管内皮細胞より産生される RELM $\alpha$  が低酸素暴露肺高血圧モデルに見られる肺血管リモデリングに関与していることが示された。そこで、抗原誘発性肺血管リモデリングや IL-25 の持続産生により誘導される肺血管リモデリングにおいても RELM $\alpha$  の発現が誘導されるか否かを検討した。その結果、抗原の反復投与により RELM $\alpha$  の発現が誘導され、抗 IL-25 抗体の投与はそれを抑制することが明らかとなった(図 4 左)。また、CC10-IL-25 マウスの肺組織においても RELM $\alpha$  の発現誘導が認められた(図 4 右)。

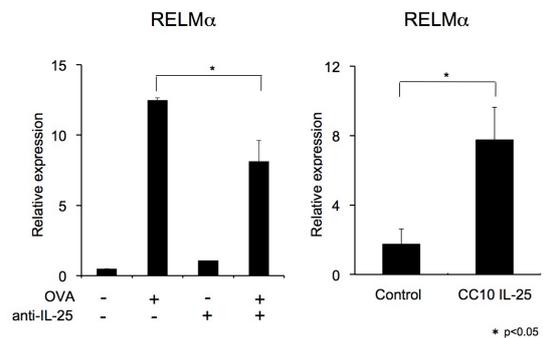


図 4: RELM $\alpha$  の発現における IL-25 の役割

次に IL-25 により誘導される肺血管リモデリングにおける NKT 細胞の役割を明ら

かにするため CC10-IL-25 マウスと NKT 細胞欠損マウスを交配し、CC10 IL-25 NKT 細胞欠損マウスを作製した。その結果、CC10 IL-25 NKT 細胞欠損マウスでは肺血管周囲への炎症細胞浸潤および、リモデリングスコアが減弱し(図 5)、肺血管の平滑筋増生と RELM $\alpha$ の発現が低下することが明らかとなった(図 6)。以上より、IL-25 による肺血管周囲への炎症細胞浸潤とリモデリングには NKT 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

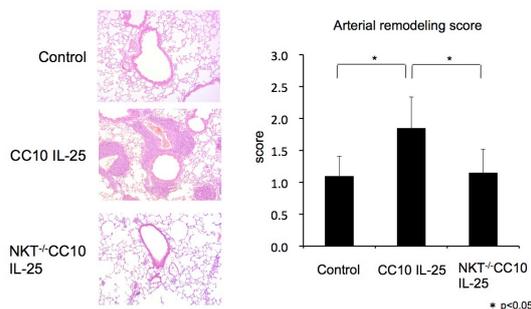


図 5 : CC10 IL-25 NKT 細胞欠損マウスにおける肺血管リモデリング

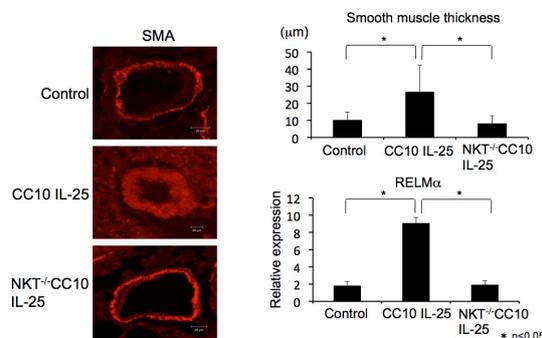


図 6 : CC10 IL-25 NKT 細胞欠損マウスにおける肺血管リモデリング

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Hosokawa J, Suzuki K, Nakagomi D, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Nakajima H. Roles of Ca<sup>2+</sup>-IKK2 signaling in mast cells. Int. Arch. Allergy Immunol. 2013, in press. 査読あり

2. Kawashima S, Hirose K, Takahashi T, Tamachi T, Ikeda K, Tokoyoda K, Nakayama T, Nakajima H. IL-25 induces pulmonary arterial remodeling by NKT cell-dependent mechanisms. Int. Arch. Allergy Immunol. 2013, in press. 査読あり

3. Tanaka S, Ikeda K, Uchiyama K, Iwamoto T, Sanayama Y, Okubo A, Nakagomi N, Takahashi K, Yokota M, Suto A, Suzuki K, Nakajima H. [18F] FDG uptake in proximal muscles assessed by PET/CT reflects both global and local muscular inflammation and provides useful information in the management of patients with polymyositis/dermatomyositis. Rheumatology (Oxford), 2013, in press. 査読あり

4. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takahashi K, Yamagata M, Takatori T, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Confirming the presence of synovitis with ultrasound improves the accuracy of 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 65(4):890-8, 2013. 査読あり

5. Iwata A, Ikeda K, Hirose K, Takatori H, Takahashi K, Suzuki Y, Tanaka S, Suto A, Nakajima H. Pre-dinner administration increases the efficacy of proton pump inhibitors on refractory GERD symptoms in connective tissue disease patients. Mod Rheumatol. 23:357-364, 2013. 査読あり

6. Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Kobayashi Y, Suto A, Takatori H, Watanabe N, Matsue H, Shimada S, Nakajima H. B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells inhibits contact hypersensitivity reaction. J Invest Dermatol.133:702-711, 2013. 査読あり

7. Kobayashi Y, Iwata A, Suzuki K, Suto A, Kawashima S, Saito Y, Owada T, Kobayashi M, Watanabe N, Nakajima H. B and T lymphocyte attenuator inhibits LPS-induced endotoxic shock by suppressing TLR4

signaling in innate immune cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110:5121-5126, 2013. 査読あり

8. Nakagomi D, Ikeda K, Kawashima H, Kobayashi Y, Suto A, Nakajima H. Bucillamine-induced yellow nail in Japanese patients with rheumatoid arthritis: two case reports and a review of 33 reported cases. Rheumatol Int. 33(3):793-797, 2013. 査読あり

9. Saito Y, Kagami S-I, Kawashima S, Takahashi K, Ikeda K, Hirose K, Oshitari T, Yamamoto S, Okamoto Y, Nakajima H. Roles of CRTH2+ CD4+ T cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement. Int. Arch. Allergy Immunol. 158:42-46, 2012. 査読あり

10. Kawashima S, Hirose K, Iwata A, Takahashi T, Ohkubo A, Tamachi T, Ikeda K, Kagami S, Nakajima H.  $\beta$ -glucan curdlan induces IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells and inhibits allergic airway inflammation. J Immunol. 189:5713-5721, 2012. 査読あり

11. Nakagomi D, Suzuki K, Nakajima H. Critical roles of IKK subunits in mast cell degranulation. Int. Arch. Allergy Immunol. 158:92-95, 2012. 査読あり

〔学会発表〕（計3件）

1. 川島沙紀、廣瀬晃一、玉地智宏、鈴木浩太郎、中島裕史。IL-25はNKT細胞を介して肺動脈炎、肺動脈平滑筋増生を誘発する 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 大阪 2012年11月29日

2. Yokota M, Suzuki K, Tokoyoda T, Nakagomi D, Nakayama N, Kohsaka H, Iwamoto I, Nakajima H. Crucial roles of mast cells in a murine model of polymyositis. 99th Annual meeting of the The American Association of Immunologists, Boston, U.S.A. 2012年5月6日

3. Takahashi K, Kawashima S, Niwa Y, Iwata A, Kobayashi Y, Kagami S, Suto A, Hirose K, Watanabe N, Nakayama T, Nakajima H.

IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. 99th Annual meeting of the The American Association of Immunologists, Boston, U.S.A. 2012年5月6日

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：Tヘルパー17細胞分化の抑制剤

発明者：中島裕史 他12名

権利者：千葉大学

種類：特許

番号：特願2012-168518号

出願年月日：平成24年7月30日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/allergy/kenkyugyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024

(2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：