

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 5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23791185

研究課題名（和文） 小児自己免疫疾患における粘膜免疫系の機能解明と
粘膜誘導型免疫寛容療法の開発研究課題名（英文） Clarification of the mucosal immune system and development of
mucosal immunotherapy in pediatric autoimmune diseases

研究代表者

瀧本 智仁 (TAKIMOTO TOMOHITO)

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：50599511

研究成果の概要（和文）：

TGF- β が免疫制御において中心的役割を果たすことはよく知られているが、その下流シグナル分子である Smad2 と Smad3 の機能的役割については十分に明らかではなかった。以前、我々はこの Smad2 と Smad3 が相補的に機能し、制御性 T 細胞のマスター遺伝子である Foxp3 の誘導など TGF- β を介した免疫抑制機能をもたらすことを明らかにした。

今回、我々は小児自己免疫疾患における TGF- β シグナル異常を検索するため、ルシフェラーゼ遺伝子上流に FOXP3 遺伝子のプロモーター領域と Smad 結合領域を含んだエンハンサー領域を組み込んだレポータープラスミドを作成した。本レポーター解析系がヒト T 細胞株で機能することを確認し、更に、上記エンハンサー領域に SMAD2 と SMAD3 のいずれのシグナル分子も結合しうることを ChIP 解析にて確認した。

研究成果の概要（英文）：

Transforming growth factor-beta (TGF- β) plays a pivotal role in immunoregulation, yet the role of its intracellular signaling molecules, known as the Smads, had not been established. Previously, we demonstrated that both Smad2 and Smad3 redundantly play essential roles in the immunosuppressive function of TGF- β , including the induction of Foxp3, the master regulator of regulatory T cells. We made a reporter assay system with the luciferase gene under the control of the FOXP3 promoter and enhancer containing Smad-binding element. We confirmed that this reporter assay system worked in Jurkat cells, human T cell line. Furthermore, we demonstrated that not only SMAD3 but also SMAD2 can bind to the enhancer region on FOXP3 gene by using the ChIP assay.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・7212

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学

1. 研究開始当初の背景

TGF-βが免疫制御において中心的役割を果たす抑制性サイトカインとしてよく知られているが、その下流シグナル分子である Smad2 と Smad3 の機能的役割については十分に明らかではなかった。

以前、我々はこの Smad2 と Smad3 が相補的に機能し、TGF-βを介した免疫抑制機能をもたらすこと明らかにした。我々が作成した Smad2/Smad3 欠損マウスは、高度の自己炎症・自己免疫病態を呈し、早期に死亡する。Smad2/Smad3 両欠損 T 細胞では、TGF-βによる制御性 T 細胞の誘導が認めなくなった。また、胸腺由来制御性 T 細胞の分化は Smad2/Smad3 欠損マウスにおいても確認出来たが、その絶対数は著減していた。in vitro の実験より TGF-β-Smad シグナルが Foxp3 発現の維持、即ち胸腺由来制御性 T 細胞の生体内での維持に重要であることが示唆された。更には、Smad 欠損 T 細胞では、TGF-βによる Th1 細胞や Th2 細胞の分化抑制効果もみられなかった。一方で、TGF-βがその分化促進に重要と考えられている IL-17 を高産生する Th17 細胞の分化には Smad シグナルは必須ではないことが明らかとなった。以上より、Smad シグナルは免疫抑制に特化した細胞内シグナルであり、ヒト免疫疾患の発症や増悪などの病態にも大きく関与すると推測される。

腸管はヒト最大の免疫組織であり、腸管粘膜免疫のみならず生体全体の免疫システム構築に寄与することが、germ-free マウスなどを用いた研究で明らかとなっている。また、腸管はTGF-βやIL-10などの抑制性サイトカインを豊富に含むリンパ組織としても知られており、本研究では TGF-βとヒト免疫疾患との関係を明らかにすると共に、TGF-βをはじめとした抑制性サイトカインを多く含む腸管を用いて、経口免疫寛容などの免疫寛容誘導療法の開発を最終目的としている。

2. 研究の目的

小児自己免疫疾患や自己炎症性疾患におけ

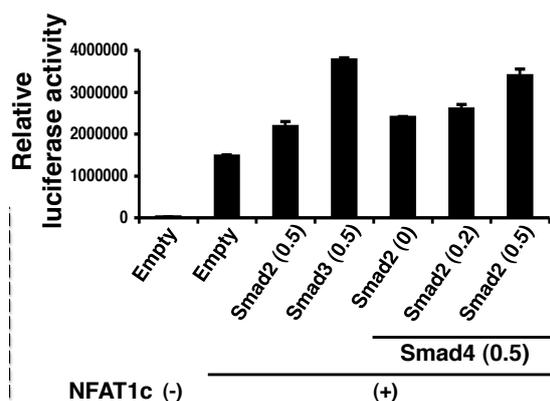
る TGF-βシグナルの異常(特に制御性 T 細胞の分化障害)を検索し、疾患の病態を明らかにすることで、TGF-βシグナル介した新たな治療戦略を提起する。

3. 研究の方法

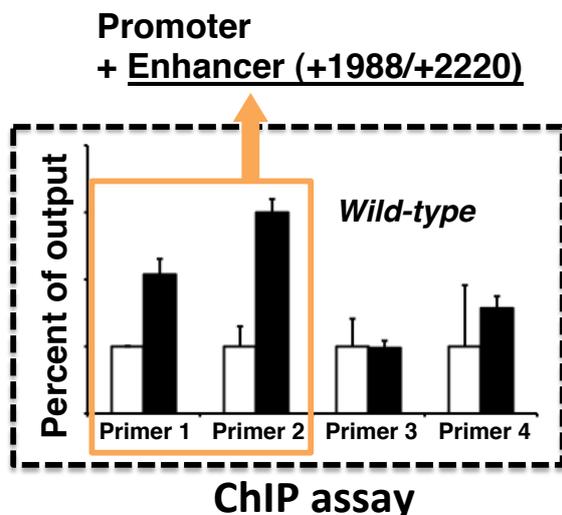
小児自己免疫疾患における TGF-βシグナル異常を検索するため、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に FOXP3 遺伝子のプロモーター領域と SMAD 結合領域を含んだエンハンサー領域を組み込んだレポータープラスミドを作成した。同レポーター解析法が SMAD2 と SMAD3 のいずれの分子を介したシグナルについて検証可能であるかを CHIP 法を用いて評価した。

4. 研究成果

ルシフェラーゼ遺伝子の上流に FOXP3 遺伝子のプロモーター領域と SMAD 結合領域を含んだエンハンサー領域を組み込んだレポータープラスミドを作成し、Jurkat 細胞を用いて、同レポーター解析が機能することを確認した。



更に、TGF-β刺激下に培養したプライマリーT細胞を用いて、ChIP解析を行い、FOXP3エンハンサー領域にはSMAD2とSMAD3のいずれも結合しうることを確認した。



これらの結果から、上記レポータ解析を用いることでSMAD2とSMAD3のいずれのシグナル異常も検出可能であり、TGF-βシグナル異常を検索する有用なツールとなることが確認出来た。今後は、本レポータ解析法を用いて、小児免疫疾患におけるTGF-βシグナル異常を検索し、新たな病態の解明や治療の発展に役立てたい。

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)

[学会発表] (計 6件)

瀧本 智仁、小野 宏彰、浦田 万起子、
綿貫 圭介、二宮 崇仁、石村 匡崇、
金城 唯宗、落合 正行、土居 岳彦、
森尾 友宏、高田 英俊、大賀 正一、
原 寿郎

X染色体不活化異常により発症したWiskott-Aldrich症候群の女児例

第3回九州地区免疫不全症研究会、2012年

瀧本 智仁、小野 宏彰、浦田 万起子、

綿貫 圭介、二宮 崇仁、石村 匡崇、
金城 唯宗、落合 正行、土居 岳彦、
森尾 友宏、高田 英俊、大賀 正一、
原 寿郎

X染色体不活化異常により発症したWiskott-Aldrich症候群の女児例

第2回日本血液学会九州地方会、2012年

小野 宏彰、瀧本 智仁、石村 匡崇、
高田 英俊、大賀 正一、原 寿郎

高IgE症候群に肺非結核性抗酸菌症を合併した2例の考察

第44回日本小児感染症学会総会・学術集会、2012年

Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Morio T,
Hara T

A Japanese female case of Wiskott-Aldrich syndrome with skewed X chromosome inactivation

第44回日本免疫学会総会・学術集会、2012年

瀧本 智仁、高田 英俊、石村 匡崇、
土居 岳彦、森尾 友宏、原 寿郎

X染色体不活化異常により発症したWiskott-Aldrich症候群の女児例

難治性疾患克服研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究班会議、2013年

瀧本 智仁、赤峰 哲、田中 裕子、
石村 匡崇、高田 英俊、原 寿郎

白血球・血小板減少と多発奇形を合併した複合免疫不全症の1例

第6回日本免疫不全症研究会、2013年

〔図書〕（計 2 件）
瀧本智仁、大賀正一：タイプⅡ血小板無力症
「日本臨床」血液症候群Ⅱ 第2版、2013年

瀧本智仁、古賀友紀、高田英俊：
移植関連検査
小児科診療 76 巻増刊号、小児検査法便覧、
2013年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧本 智仁 (TAKIMOTO TOMOHITO)
九州大学・大学病院・特任助教
研究者番号：50599511

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：