

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24390207
 研究課題名(和文) 難治性喘息のTh17型気道炎症における気道上皮細胞および樹状細胞の役割の解明

 研究課題名(英文) Roles of epithelial cells and dendritic cells in Th17 cell-mediated airway inflammation

 研究代表者
 中島 裕史 (NAKAJIMA, HIROSHI)

 千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

 研究者番号：00322024

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、喘息の難治化機構の解明を目的に、1)難治性喘息モデルで認められるIL-23-Th17細胞経路の誘導におけるDectin-2の役割、2)Th17細胞分化におけるSOX5の役割を解析した。その結果、1)DCに発現するDectin-2がHDM誘導性喘息モデルの誘導に重要な役割を果たしていること、2)Sox5はc-Mafと協調的に作用しStat3の下流でROR γ tの発現を介し、Th17細胞の分化を誘導することを明らかにした。本研究成果は、難治性喘息の新たな治療戦略開発の基盤構築に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The fact that sensitization against fungi and Th17 cell induction are closely related to the severity of asthma suggests that immune systems recognizing fungi are involved in the pathogenesis of severe asthma. Our objectives were 1) to determine the roles of Dectin-2, a C-type lectin receptor functions as not only a pattern recognition receptor for fungi but also a receptor for some components of house dust mite (HDM) extract, in HDM-induced allergic airway inflammation and 2) to examine the roles of Sox5, a member of the SOX (SRY-related high-mobility-group (HMG)-box) family of transcription factors which is expressed in Th17 cells, in Th17 cell differentiation. We found 1) Dectin-2 expressed on CD11b+ DCs promotes HDM-induced Th2 and Th17 cell differentiation and allergic airway inflammation and 2) Sox5 along with c-Maf induces ROR γ t expression and subsequent Th17 cell differentiation as downstream targets of IL-6-Stat3 pathways.

研究分野：アレルギー

キーワード：気管支喘息 Dectin Th17細胞 Sox5

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息は人口の約 5%が罹患する重要なアレルギー性呼吸器疾患である。その多くは吸入ステロイドを中心とした既存治療でコントロール可能であるが、5-10%が治療抵抗性の難治性喘息であり、その病態の解明および治療戦略の確立が急務である。難治性喘息患者の気道では IL-17 産生の亢進と好中球性炎症がみられるなど、通常の好酸球性炎症による喘息とは異なる病態が関与していることが示されている。さらに気道における IL-17 産生と喘息重症度との間に正の相関があること、IL-17 は気道過敏性を惹起すること、Th17 細胞誘導性炎症はステロイド抵抗性であることも示されている。これらは、Th17 細胞型気道炎症が喘息の難治化に深く関与していることを示唆している。しかし、喘息の難治化における Th17 型気道炎症の誘導機構は不明である。

(2) 近年、新規ヘルパー T 細胞サブセットとして Th17 細胞が同定され、IL-23 が Th17 細胞の機能発現に重要な役割を果たすこと、IL-23-Th17 細胞経路が多くの慢性炎症性疾患の病態に関与していることが明らかにされた。本研究者は、アレルギー性気道炎症における IL-23-Th17 細胞経路の役割を解析し、①アレルギー性気道炎症の局所で IL-23 が産生されること、②IL-23 の中和は、好中球性炎症のみでなく、好酸球性炎症も抑制すること、③肺特異的 IL-23 発現マウスでは、抗原吸入による好中球性炎症と好酸球性炎症の両者の増強が認められ、難治性喘息の病態に類似すること、④抗原特異的 Th17 細胞の細胞移入は好中球性炎症の誘導に加え、Th2 細胞依存的な好酸球性炎症を増強することを明らかにするなど (Am J Respir Crit Care Med 2008)、アレルギー性気道炎症における IL-23-Th17 細胞経路の研究において先駆的な役割を果たしてきた。

(3) 近年、樹状細胞や組織構成細胞がヘルパー T 細胞の分化に重要な役割を演じていることが多く報告されている。そして最近、C 型レクチン Dectin-1 と Dectin-2 を介する樹状細胞の活性化が IL-23 産生を惹起し、Th17 細胞の分化を選択的に誘導することが報告された。Dectin-1 と Dectin-2 は真菌細胞壁成分である β -glucan と α -mannan のレセプターとして機能する。さらに喘息における主要アレルギーであるダニ抗原 (House dust mite:HDM) が Dectin-1 と Dectin-2 を活性化することも報告されている。しかし、Th17 細

胞依存的な気道炎症における Dectin の役割は不明である。

(4) 最近本研究者は Th17 細胞の分化機構を解析する過程で、SRY-related HMG box (SOX) ファミリーに属する SOX5 が Th17 細胞に特異的に発現していることを見出した。しかし、Th17 細胞分化における SOX5 の役割は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 難治性喘息モデルで認められる IL-23-Th17 細胞経路の誘導における Dectin-2 の役割、(2) Th17 細胞分化における SOX5 の役割を統合的に解析することにより、喘息の難治化機構を解明し、難治性喘息の新たな治療戦略開発のための基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

研究計画 1. チリダニ (house dust mite (HDM)) 誘導性喘息モデルにおける Dectin-2 の役割の解明

HDM で経気道感作した野生型 (WT) マウス、及び Dectin-2 欠損 (Clec4n^{-/-}) マウスに HDM を経気道的に再投与し、アレルギー性気道炎症を惹起する。好酸球と好中球の気道への浸潤の程度、肺胞洗浄液中のサイトカインレベル、杯細胞分化、縦隔リンパ節 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能、気道過敏性を評価し、肺における IL-23 産生、ならびに Th17 細胞型気道炎症における Dectin-2 の役割を明らかにする。

研究計画 2. Th17 細胞分化における SOX5 の役割の解明

本研究者は、Th17 細胞の遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイで解析し、転写因子 SOX5 が Th17 細胞に特異的に発現していること、IL-6-Stat3 シグナルが Sox5 の発現に必須であることを既に見出している。そこで本研究では、Th17 細胞分化における SOX5 の役割、及びその誘導機構の解明を行う。

(1) SOX5 コンディショナル欠損マウスにおける Th17 細胞分化の解析

SOX5 コンディショナル欠損マウス (CD4Cre-SOX5^{f1/f1} マウス) の CD4 陽性 T 細胞を TGF- β と IL-6 の存在下で TCR 刺激し、Th17 細胞の分化を細胞内サイトカイン染色法により評価する。

(2) SOX5 過剰発現による Th17 細胞分化誘導機構の解明

WT マウス、T 細胞特異的 Stat3 欠損マウス、ROR γ t 欠損マウスの CD4 陽性 T 細胞を TCR 刺激する際にバイシストロニックレトロウイ

ルスを用いて SOX5 を過剰発現させ、T 細胞特異的 Stat3 欠損マウス、及び ROR γ t 欠損マウスで認められる Th17 細胞の分化障害が SOX5 の発現によりレスキューされるか否かを検討する。

4. 研究成果

(1) HDM誘導性喘息モデルにおけるDectin-2の役割

① Dectin-2はアレルギー性気道炎症の惹起に重要な役割を果たしている。

HDM誘導性アレルギー性気道炎症におけるDectin-2の役割を明らかにするため、Dectin-2欠損(Clec4n $^{-/-}$)マウス及び野生型(WT)マウスにHDMを経気道的に投与し、両群における気道炎症の程度を評価した。その結果、Clec4n $^{-/-}$ マウスではWTマウスに比して好酸球及びCD4陽性T細胞の気道への浸潤(図1A)、肺の炎症細胞浸潤と杯細胞化(図1B)、HDM特異的IgG1の産生(図1C)、及び気道過敏性の亢進(図1D)が減弱していた。同様の実験系において、縦隔リンパ節から調整した細胞をHDMで再刺激した際のサイトカイン産生を比較したところ、Clec4n $^{-/-}$ マウスではWTマウスに比して上清中のIL-5、IL-13、IL-17Aレベルが低下していた(図2A)。細胞内サイトカイン染色法にてIL-13とIL-17Aの産生細胞数を検討したところ、やはりClec4n $^{-/-}$ マウスではWTマウスに比してIL-13産生細胞とIL-17A産生細胞が減少

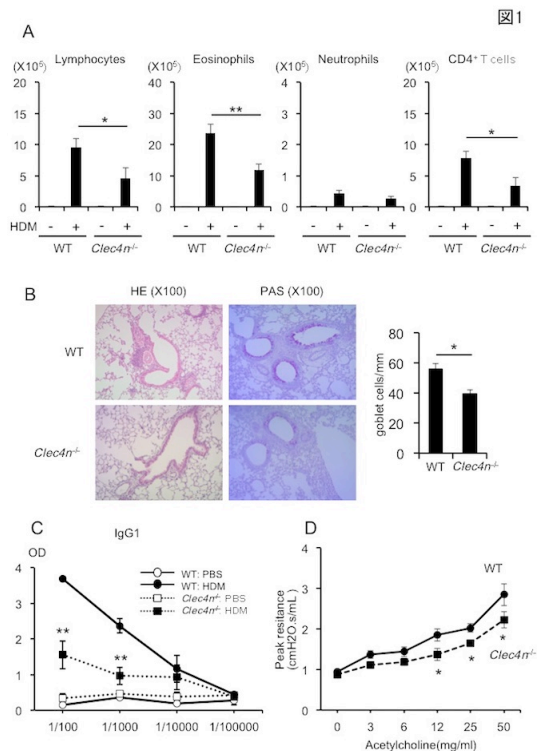
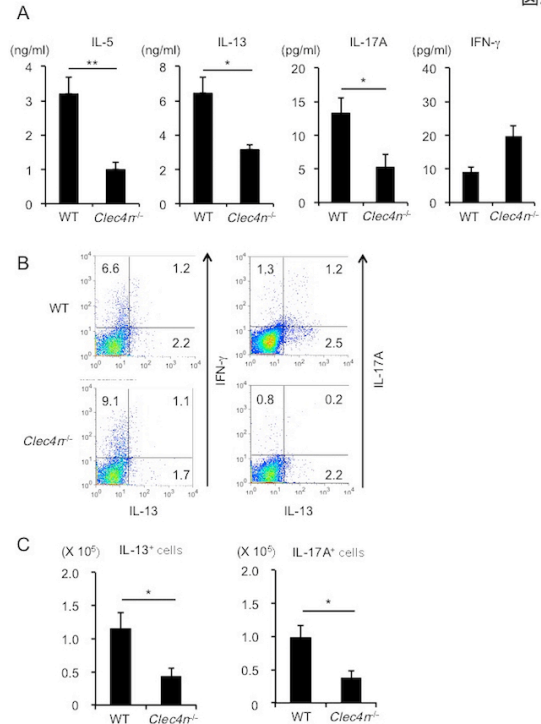


図1

していた(図2B, 2C)。これらの結果よりDectin-2はHDMによるTh2細胞及びTh17細胞の

誘導と気道炎症の誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

図2



② 樹状細胞(DC)に発現するDectin-2がHDM誘導性喘息モデルの惹起に重要な役割を果たしている。

HDM誘導性喘息モデルの肺局所で如何なる細胞がDectin-2を発現しているかを単離した細胞に対する定量PCR実験にて検討した。その結果、Dectin-2はCD11b陽性DC及び肺胞マクロファージに強く発現していることが明らかとなった(図3)。Dectin-2のシグナルを伝達するFc γ R鎖も同様にCD11b陽性DC及び肺胞マクロファージに強く発現していた(図3)。

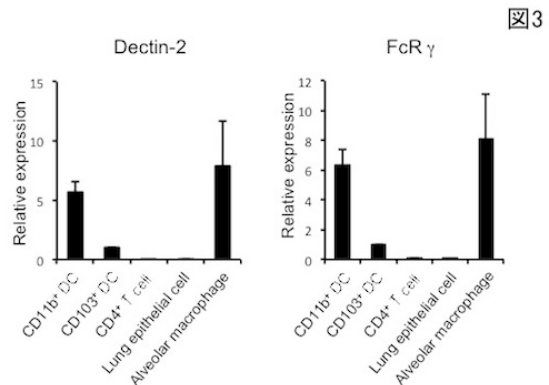
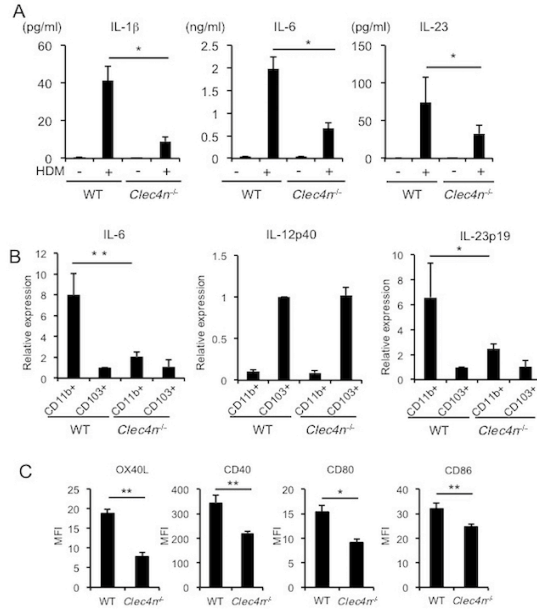


図3

次にHDM刺激がDectin-2依存的にDCの活性化を誘導するのか否かを骨髓由来樹状細胞(BMDC)をin vitroで刺激する実験(図4A)、及びHDMを経気道的に投与する実験(図4B, C)にて検討した。その結果、Clec4n $^{-/-}$ BMDCはWT

BMDCに比してIL-1 β , IL-6, IL-23の産生が低下していた(図4A)。HDM誘導性喘息モデルにおいてもClec4n^{-/-}マウスではWTマウスに比してCD11b陽性DCにおけるIL-6, IL-23 p19の発現が低下していた(図4B)。Clec4n^{-/-}マウスではCD11b陽性DCにおけるOX40, CD40, CD80, CD86の発現も低下していた(図4C)。以上より、Dectin-2はHDMによるDCの活性化に

図4



ることが示唆された。
次に DC に発現する Dectin-2 の役割を

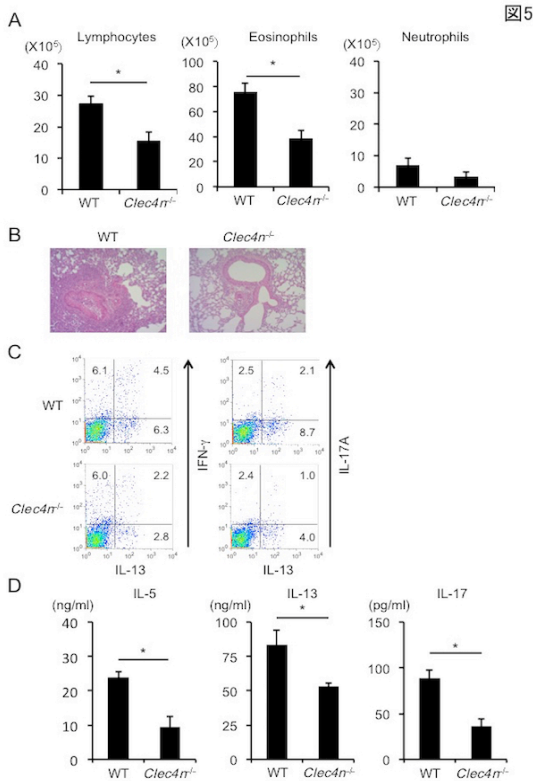


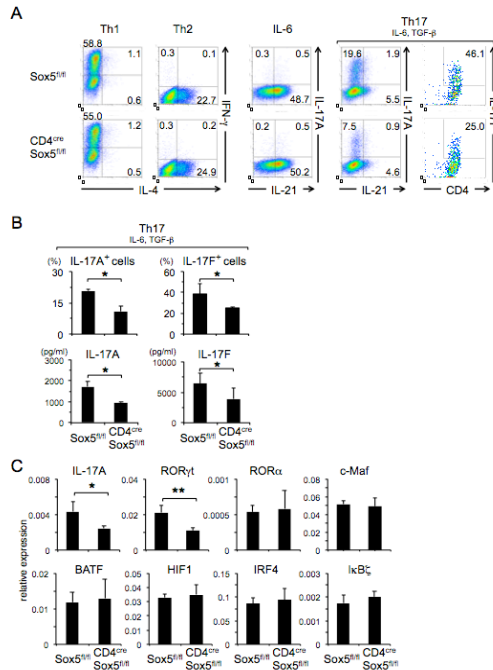
図5

かにするため、HDM で刺激した Clec4n^{-/-} BMDC 及び WT BMDC を経気道的に Clec4n^{-/-} マウスに移入し、その後、HDM を経気道投与し、アレルギー性気道炎症を惹起した。その結果、Clec4n^{-/-} BMDC を移入した群では WT BMDC を移入した群に比して、好酸球性の炎症(図 5A, B)、気道における IL-13, IL-5, 及び IL-17A の産生(図 5C, D)が低下した。以上より、DC に発現する Dectin-2 が HDM 誘導性喘息モデルの誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された(文献 1)。

(2) Th17細胞分化におけるSOX5の役割の解明
① Sox5はTh17細胞分化に重要な役割を果たしている。

T細胞分化におけるSox5の役割をT細胞特異的 Sox5 (CD4Cre-SOX5^{f1/f1}) マウスを用いて解析した。その結果、CD4Cre-SOX5^{f1/f1} マウスのCD4陽性T細胞は、Th17細胞誘導条件下におけるTh17細胞分化が障害されていた(図6A, B)。CD4Cre-SOX5^{f1/f1} マウスのCD4陽性T細胞ではTh17細胞関連遺伝子の発現も低下していた(図6C)。

図6



② Sox5は c Maf と協動的に作用してTh17細胞分化を誘導する。

Sox5によるTh17細胞の分化誘導機構を明らかにするためにSox5過剰発現のTh17細胞分化に対する影響を検討した。その結果、neutral条件下においてCD4陽性T細胞にSox5を発現させてもTh17細胞の分化は誘導されなかった(図7A)。一方、興味深いことにcMafとSox5をCD4陽性T細胞に共発現させるとneutral条件下においてもTh17細胞が分化誘導された(図7A)。cMaf

とSox5によるTh17細胞の分化誘導はIL-21欠損CD4陽性T細胞においても認められることより、内在性のIL-21産生は必須で無いことが明らかとなった(図7A)。他方、cMafとSox5の過剰発現は、Th1細胞とTh2細胞の分化には殆ど影響しなかった(図7B)。

図7

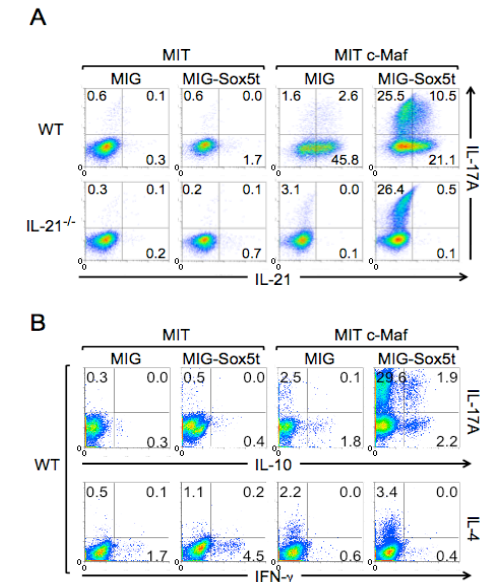
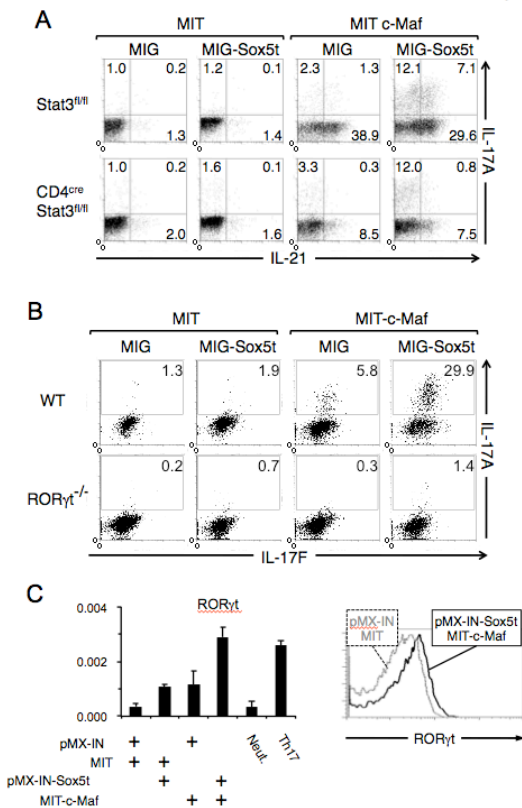


図8



③ Sox5とcMafはStat3の下流、RORytの上流でTh17細胞分化を誘導している。

cMaf と Sox5 による Th17 細胞の分化誘導が Stat3 の活性化を介しているのか否かを T 細胞特異的 Stat3 欠損マウスの CD4 陽性 T 細胞を用いて検討した。その結果、Stat3 欠損 T 細胞においても cMaf と Sox5 を共発現させると Th17 細胞の分化が誘導された(図 8A)。一方、RORyt 欠損マウス由来の CD4 陽性 T 細胞に cMaf と Sox5 を共発現させても Th17 細胞の分化は誘導されなかった(図 8B)。他方、cMaf と Sox5 の共発現は、RORyt の発現を誘導した(図 8C)。以上より Sox5 は cMaf と協調的に作用し Stat3 の下流で RORyt の発現を誘導し、Th17 細胞の分化を促進していることが示唆された(文献 2)。

<引用文献>

1) Norimoto A, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;51(2):201-9.

2) Tanaka S, et al. J Exp Med. 2014;211(9):1857-74.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件、すべて査読あり)

1. Nakagomi D, Suzuki K, Meguro K, Hosokawa J, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Matsue H, Ohara O, Nakayama T, Shimada S, Nakajima H. MMP12 is produced by M2 monocytes-macrophages and plays important roles in the development of contact hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol. 2015;135(5):1397-400. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.055.

2. Takatori H, Kawashima H, Matsuki A, Meguro K, Tanaka S, Iwamoto T, Sanayama Y, Nishikawa N, Tamachi T, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Kubo M, Hori S, Nakajima H. Helios enhances regulatory T cell function in cooperation with Foxp3. Arthritis Rheumatol, in press. doi: 10.1002/art.39091.

3. Iwata A, Kawashima S, Kobayashi M, Okubo A, Kawashima H, Suto A, Hirose K, Nakayama T, Nakajima H. Th2-type inflammation instructs inflammatory dendritic cells to induce airway hyperreactivity. Int Immunol. 2014;26(2):103-14. doi: 10.1093/intimm/dxt047.

4. Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich-interactive domain-containing protein 5A functions as a negative regulator of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ t-induced Th17 cell differentiation. Arthritis Rheumatol. 2014;66(5):1185-94. doi: 10.1002/art.38324.

5. Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D,

Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis – biomarkers identified by analyses of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(6):1421-31. doi: 10.1002/art.38400.

6. Iwamoto T, Suto A, Tanaka S, Takatori H, Suzuki K, Iwamoto I, Nakajima H. Interleukin-21-producing c-Maf-expressing CD4+ T cells induce effector CD8+ T cells and enhance autoimmune inflammation in scurfy mice. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(8):2079-90. doi: 10.1002/art.38658.

7. Norimoto A, Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Yokota M, Takahashi K, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(2):201-9. doi: 10.1165/rcmb.2013-0522OC.

8. Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kashiwakuma D, Kagami S, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. *J Exp Med*. 2014;211(9):1857-74. doi: 10.1084/jem.20130791.

9. Yokota M, Suzuki K, Tokoyoda K, Meguro K, Hosokawa J, Tanaka S, Ikeda K, Mikata T, Nakayama T, Kohsaka H, Nakajima H. Roles of mast cells in the pathogenesis of inflammatory myopathy. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):R72. doi: 10.1186/ar4512.

10. Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Kobayashi Y, Suto A, Takatori H, Watanabe N, Matsue H, Murphy TL, Murphy KM, Shimada S, Nakajima H. Therapeutic potential of B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells for contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):702-11. doi: 10.1038/jid.2012.396.

11. 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 Toll-like receptor 4 signaling in innate immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(13):5121-6. doi:

10.1073/pnas.1222093110.

12. Kawashima S, Hirose K, Takahashi K, Tamachi T, Ikeda K, Tokoyoda K, Nakayama T, Nakajima H. Interleukin-25 induces pulmonary arterial remodeling via natural killer T cell-dependent mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161 Suppl 2:118-24. doi: 10.1159/000350379.

13. Tanaka S, Suto A, Ikeda K, Sanayama Y, Nakagomi D, Iwamoto T, Suzuki K, Kambe N, Matsue H, Matsumura R, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Nakajima H. Alteration of circulating miRNAs in SSc: miR-30b regulates the expression of PDGF receptor β . *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(11):1963-72. doi: 10.1093/rheumatology/ket254.

14. Kawashima H, Takatori H, Suzuki K, Iwata A, Yokota M, Suto A, Minamino T, Hirose K, Nakajima H. Tumor suppressor p53 inhibits systemic autoimmune diseases by inducing regulatory T cells. *J Immunol*. 2013;191(7):3614-23. doi: 10.4049/jimmunol.1300509.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: Tヘルパー 1 7 細胞分化の抑制剤

発明者: 中島裕史 他

権利者: 千葉大学 他

種類: 特許

番号: 特願2012-168518号

出願年月日: 2012年7月30日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ: <http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/index.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

廣瀬 晃一 (Hirose, Koichi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 90400887

須藤 明 (Suto, Akira)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号: 50447306

鈴木 浩太郎 (Suzuki, Kotaro)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90554634

高取 宏昌 (Takatori, Hiroaki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30568225