

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591471

研究課題名(和文) アレルギー性疾患における制御性T細胞の機能異常の分子機構

研究課題名(英文) Mechanisms of impaired function of CD4+CD25+FOXP3+ T cells in patients of asthma

研究代表者

根来 孝治 (NEGORO, TAKAHARU)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：70218270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：喘息は、アレルゲンやウイルス感染により発症・増悪し、慢性炎症病態を一つの特徴とする。炎症の遷延化の原因として、免疫細胞を負に制御する制御性T細胞(Treg)の減少や機能障害が報告されている。喘息患者においてTregが機能障害に陥る機構に関しては、まだ不明瞭である。本研究は、Tregの機能障害の指標としてT細胞受容体(TCR)刺激下におけるCa<sup>2+</sup>応答性が有用であることを証明した。また、Ca<sup>2+</sup>応答性が細胞内の足場たんぱく質であるRACK1分子の発現亢進により生じることを新たに解明した。一方、マイクロアレイ解析によりTregの機能障害に関する新たな知見も得られた。

研究成果の概要(英文)：One of the asthma pathologies is a persistent inflammation in airway caused by allergens and viruses. The impaired functions and decreased number of regulatory T cells (Tregs) is considered as the cause of persistent inflammation in local sites. The mechanisms of abnormal functions of Tregs are obscure. Therefore, the aim of this study was to analyze the functions of Tregs by using Ca<sup>2+</sup> response against T cell receptor stimulation, which can estimate the regulatory functions of Tregs, and to elucidate the mechanisms of abnormal functions of Tregs. The results showed that increasing Ca<sup>2+</sup> response in Tregs from patients with asthma was attributed to the increasing expression of scaffold protein, RACK1. In addition, the new data associated with the abnormal functions of Tregs was obtained from microarray analysis.

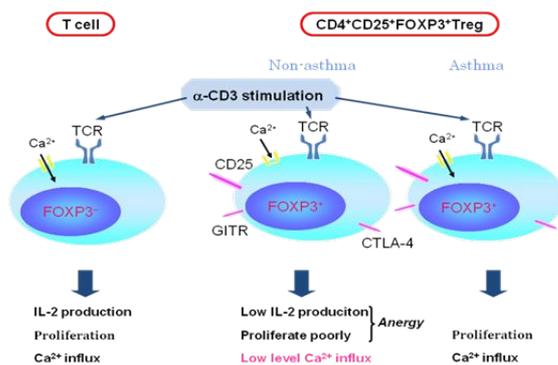
研究分野：アレルギー、分子生物学、免疫学

キーワード：制御性T細胞 カルシウム RACK1 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞(Treg)は、アレルギー性疾患や自己免疫性疾患など様々な免疫反応を負に制御する。喘息や食物アレルギーなどでは、Treg の活性が低下するため過剰なアレルギー反応をコントロールできず炎症が慢性化していると考えられている。癌組織では、癌細胞により naive T 細胞から Treg が誘導され癌細胞特異的免疫反応が負に制御されるため、癌細胞が増殖しやすい環境を作り上げる悪玉と考えられている。つまり、アレルギー疾患や自己免疫疾患では Treg 機能を正常化することを治療の位置づけとしており、癌では Treg 機能を損なうことを治療の目的としている。当研究室では、喘息患者末梢血 Treg の機能を新たな視点より評価する *in vitro* 測定系(細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の測定)を組み立て Treg 機能の解析を行ってきた。Treg の有する特徴である免疫反応抑制機能やアナジー (TCR 刺激時に IL-2 低産生、低増殖) は、特異的マーカーである転写因子 FOXP3 によりコントロールされており、喘息患者の Treg では FOXP3 タンパク質発現量が低下するため機能異常を示すという報告もある。しかし、我々の研究結果では、小児喘息患者由来・成人喘息患者由来  $CD4^+CD25^{high}$  Treg 中の FOXP3 発現量は、転写レベルやタンパク質発現レベルでも非喘息対照者と比べ変化が認められなかった。非喘息患者由来 Treg は、 $Ca^{2+}$ 依存性アナジーであるが、一部の喘息患者由来 Treg は、 $Ca^{2+}$ 応答性に变化しており抑制機能も低下していた(図1)。小児喘息では、Treg の  $Ca^{2+}$ 応答性と喘息の罹患期間や血清 IgE 高値と相関していた。また、一部の FOXP3 陽性 Treg は、IL-17 を産生しており、小児喘息の増悪に関わっている可能性も示唆された。以上より、Treg の機能異常 ( $Ca^{2+}$ 応答性と相関)を改善することが喘息などのアレルギー性疾患の治療に結びつくものと考えている。

図 1



2. 研究の目的

これまでに、Treg の免疫抑制機構と  $Ca^{2+}$ 応答性との関連を分子レベルで解析してきた。免疫抑制機能がなぜ  $Ca^{2+}$ 応答性と関連するのは現在のところまだ不明であるが、 $Ca^{2+}$ 応答性が Treg 自身の免疫抑制能力の指標となりえることを報告した。これまでに申請者

は、一部の喘息患者末梢血由来 Treg は、 $Ca^{2+}$ 依存性アナジー状態に異常をきたし免疫抑制機能も低下している事を報告している。申請者は、アナジー状態の異常の一端は、足場タンパク質である RACK1 の増加が原因であることを推測していた。本研究では、RACK1 タンパク質が Treg 中の  $Ca^{2+}$ チャネル(CRAC チャネル)の制御に関与していることを証明し、健常人及び喘息患者 Treg 様 Jurkat 細胞モデルに対しマイクロアレイ解析を行うことにより、 $Ca^{2+}$ チャネル制御機構に関与すると推測される遺伝子群を同定することを目的とした。喘息患者由来 Treg の  $Ca^{2+}$ 依存性アナジー状態の異常の原因とその分子機構が予測・解明できれば、アレルギー性疾患や自己免疫性疾患などにおける Treg をターゲットとした医薬品の開発に貢献できると考えている。

3. 研究の方法

(1)マイクロアレイ解析

東レの 3D-Gene 全遺伝子型 DNA チップを用い解析を行った。Human Oligo chip 25k を利用し、5G1 (コントロール細胞) Day-2 及び Day-5 と F2A9 (FOXP3 発現細胞) Day-2 (健常人 Treg 様)及び Day-5 (喘息患者 Treg 様)の合計 4 検体を 1 色法にてマイクロアレイを行った。データの一部を表 1 に示した。

(2)ERK のリン酸化の定量

ERK のリン酸化は、Alexa488-pERK (T202/Y204) (BD Biosciences 社)抗体を用いた BD Phosflow technology を利用して、EPICS XL フローサイトメーターにより解析した。

(3)mRNA 発現量の定量

TaqMan<sup>®</sup>法による Real-time PCR により定量した。各遺伝子に対する TaqMan Primer and Probe sets [PRDX2 (Hs00853603\_s1\_M), PRDX3 (Hs00428953\_g1\_M), PRDX4 (Hs01056076\_m1\_M), ACTB (Hs99999903\_m1)]は、Life Technology 社より購入した。Real-time PCR は、StepOne<sup>®</sup> Real-Time PCR System (Life Technology 社)を用い行った。

(4) $Ca^{2+}$ 応答性の測定

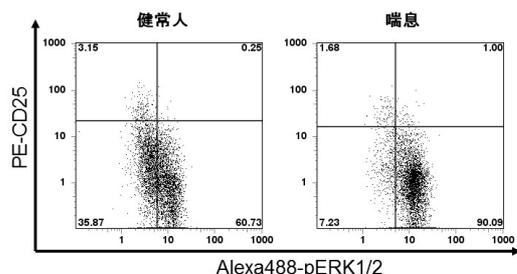
調製した Treg を 1,200 rpm で 10 min 遠心。上清を除去し、 $Ca^{2+}$ 蛍光指示薬である 1 mM Fura-2AM 2.5  $\mu$ L を含有する培地(5% AB serum, 100 U/mL Penicillin, 100  $\mu$ g/mL Streptomycin を含有した RPMI1640 培地) 500  $\mu$ L でサンプルを再懸濁した。24 well cell culture plate の 1 well に、あらかじめ 3 mm $\times$ 10 mm のガラスプレートを 2 枚ずつセットしておき、細胞懸濁液を加え、37 で 40 分間インキュベーションした(Fura-2 の細胞内ロード)。インキュベーション後、細胞内  $Ca^{2+}$ 測定用緩衝液 (2 mM  $Ca^{2+}$  HANKS buffer) 中ガラスプレートを 2 分以上静置した。顕微鏡上の灌流チャンバーにセットし、緩衝液をフローすることによりガラスプレ

ート上の細胞を洗浄（この操作で、ガラスプレート非吸着細胞は除去され、ガラス吸着性の強いマクロファージが残る）した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化は、340nm と 380nm の励起光を交互に照射し、生じた蛍光（510 nm）の強度を、蛍光画像解析システム Meta Flour（日本ローパー社）によって測定し、380 nm の励起光による蛍光強度に対する 340 nm の励起光による蛍光強度の比（340 nm/380 nm）で示した。

#### 4. 研究成果

これまでの研究より、喘息患者末梢血より精製した Treg の  $Ca^{2+}$  応答性には、高発現している RACK1 分子が関与していることを報告した<sup>(1)</sup>。RACK1 分子を介する Treg の  $Ca^{2+}$  応答性の異常機構は、現在のところ研究を進めているところである。また、本研究で構築した細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定系は、他の免疫系細胞であるマクロファージや好中球の活性化の指標として利用し応用することができた<sup>(2,3)</sup>。同様に膀胱の収縮機構や膵臓細胞のインクレチン刺激によるインスリン分泌機構の制御機構の解析にも利用した<sup>(4,5)</sup>。 $Ca^{2+}$  応答性は、細胞内シグナルとして普遍的に利用できる点特徴であり、他の研究に容易に応用できる点が有用であった。健常人及び喘息患者 Treg 様 Jurkat 細胞モデルを用いたマイクロアレイ解析により、 $Ca^{2+}$  関連遺伝子ばかりではなく、新たな有用な情報を得ることができた。

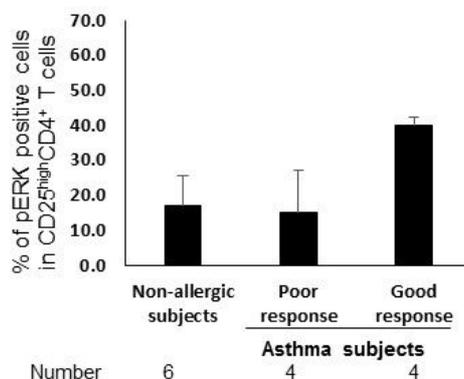
図 2



マイクロアレイデータより、予測していなかった Treg の酸化ストレス抵抗性に関するデータが得られたため喘息患者における Treg 機能異常の新たな一端を解明できるのではないかと考え研究を進めた。喘息患者の気道炎症局所では、酸化ストレスが亢進していることが報告されており、このような環境下で Treg が機能することを考え合わせると酸化ストレスに対する抵抗性を有していることが推測される。Treg の酸化ストレスの指標としては、酸化ストレス応答性分子としてよく利用されている細胞内シグナル分子である ERK のリン酸化を利用した。

図 2 に示したように健常人及び喘息患者末梢血より精製した単核球分画に酸化ストレス刺激として過酸化水素を添加し、フローサイトメーターにより解析した。Treg 分画として

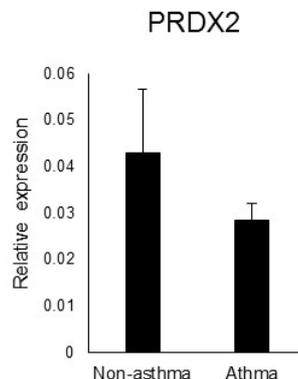
図 3



は、 $CD4^+CD25^{high}$  population を解析した。健常人由来 Treg は、酸化ストレス刺激時において ERK のリン酸化はわずかな細胞でしか認められなかった。対照的に Treg 以外の  $CD4^+$  細胞は約 60%位の細胞が用量依存的に ERK のリン酸化が認められた。一方、喘息患者由来 Treg では、ERK のリン酸化率に差が認められ、2 群に分類することができた。一群の喘息患者由来 Treg では、酸化ストレス刺激により健常人同様に ERK のリン酸化は、わずかな細胞にしか認められなかったが、図 3 に示すようにもう一方のグループの喘息患者由来 Treg は、酸化ストレス刺激により、ERK のリン酸化が亢進していた。

更に、ERK のリン酸化は既に(1)の論文で報告している  $Ca^{2+}$  応答性に相関が認められた。 $Ca^{2+}$  応答性が Poor response である細胞は、過酸化水素に対する ERK のリン酸化応答性は健常人由来 Treg と同程度であり、 $Ca^{2+}$  応答性が good response を示す細胞は、ERK のリン酸化率も 3 倍以上上昇していた。つまり、喘息患者由来 Treg は、T 細胞受容体からの刺激により  $Ca^{2+}$  流入が認められるだけではなく（健常人由来 Treg は、ほとんど認められない）、酸化ストレス暴露に感受性があることを示しており、異なる視点から観察しても機能異常を示すシグナルを出していることになる。その異常機能を示す機構は、単純ではないかもしれない。

図 4



Treg の酸化ストレス抵抗性を示す機構につ

いては、Mougiakakos D 等(Blood,2011)が Treg は、通常の CD4<sup>+</sup> T 細胞より、Thioredoxin-1 の分泌が亢進していることが関与していると報告している。本研究のマイクロアレイ解析結果においては Thioredoxin-1 の発現は、健康人 Treg 様細胞(F2A9 Day-2)では、対照細胞(5G1 Day-2)に比べ低下していた。そのため、他の酸化ストレス関連遺伝子群を解析したところ、表 1 に示すようにペルオキシレドキシン(PRDXs)群に差が認められた。特に、PRDX2,3,4 に関しては、健康人 Treg 様細胞では、対照細胞より発現が亢進しており、喘息患者 Treg 様細胞(F2A9 Day-5)では健康人 Treg 様細胞に比べ発現が低下しており有意な差が認められた(一部を図 4 に示す)。

表 1

Microarray analysis

Symbol	Control		FOXP3		Ratio
	Day-2	Day-5	Day-2	Day-5	
PRDX1	3861	3068	1303	1138	0.34
PRDX2	1972	1919	2378	1756	1.21
PRDX3	550	555	767	550	1.39
PRDX4	392	302	621	459	1.58
PRDX5	1571	1910	1529	1978	0.97

これらのペルオキシレドキシンは、細胞内に局在しており、細胞内の酸化ストレスを調節するタンパク質である。健康人 Treg で発現が亢進していることは、酸化ストレスに対する抵抗性を増加させるが、喘息患者 Treg ではこれらの遺伝子の発現が低下しているため、酸化ストレスに対し応答しやすくなっている可能性が推測された。現在、低発現ペルオキシレドキシン下における Treg の酸化ストレス刺激に対する影響を解析中である。本研究は、喘息患者の Treg 機能異常の機構の一端を形成しており、喘息患者の Treg の Ca<sup>2+</sup> 応答性機構とともに酸化ストレス応答性(容易に ERK がリン酸化されることを示す)機構を明確にすることは、喘息患者の慢性気道炎症をコントロールすべき Treg 機能を正常に戻すための一助になるのではないかと考えている。

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 5 件)

- 1) T. Negoro, S. Shimizu, M Narushima, AH Banham, H. Wakabayashi, R. Takayanagi, T. Hagiwara, G. Roncador, T. Osabe, T. Yanai, M. Kin, K. Ikeda, A. Endo, H. Akiyama and Y. Nakano  
Elevated receptor for activated C kinase 1 expression is involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> influx and potentially associated with

compromised regulatory T cell function in patients with asthma. (査読有)  
(Clin Exp Allergy 44(9): 1154-1169. 2014)  
doi: 10.1111/cea.12375

- 2) T. Negoro, M. Kin, A. Takuma, K Saito, S. Shimizu and Y. Nakano  
Potentiated macrophage activation by acid sensing under low adiponectin levels. (査読有)  
(Mol Immunol 57(2): 141-150. 2014)  
doi: 10.1016/j.molimm.2013.08.015
- 3) T. Hiroi, T. Wajima, T. Negoro, T. Ishii, Y. Nakano, Y. Kiuchi and S. Shimizu.  
Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. (査読有)  
(Cardiovasc Res 97: 271-281. 2013)  
DOI: 10.1093/cvr/cvs332
- 4) K. Nobe, A. Fujii, K. Saito, T. Negoro, Y. Ogawa, Y. Nakano, T. Hashimoto and K. Honda  
Adiponectin enhances calcium dependency of mouse bladder contraction mediated by protein kinase C $\alpha$  expression. (査読有)  
(J Pharmacol Exp Ther 345: 62-68. 2013)  
DOI: 10.1124/jpet.112.202028
- 5) K. Shinmura, T. Negoro, S. Shimizu, G. Roncador, T. Hirano and Y. Nakano  
Metformin modulates GLP-1- and GIP-mediated intracellular signaling under normoglycemic conditions. (査読有)  
(Open J Endocr and Metab Dis 3: 263-270. 2013)  
DOI: 10.4236/ojemd.2013.37036

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) Takaharu Negoro 他: Potentiated macrophage activation by acid sensing under low adiponectin levels.  
The 64th Fujihara Seminar; International Symposium on Adiponectin Biology and Medicine, August, 2012, Hokkaido, Japan
- 2) Kiyomi Saito 他: Effect of Lower adiponectin concentration exert a harmful influence.  
The 64th Fujihara Seminar; International Symposium on Adiponectin Biology and Medicine, August, 2012, Hokkaido, Japan
- 3) 新村京子 他: メトホルミンによる膵細胞のインクレチン刺激細胞内シグナル制御機構の検討  
第 56 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2013 年 5 月、熊本
- 4) Kyoko Shinmura 他: Modulation of incretin actions in pancreatic b-cells by metformin.  
49th Annual meeting of the European association for the study of diabetes, September, 2013, Barcelona, Spain

- 5) 谷岡利裕 他：アディポネクチンによる  
抗炎症作用の解析  
第 36 回 日本分子生物学会年会、2013  
年 12 月、神戸
- 6) 新村京子 他：メトホルミンによるインクレチン  
刺激細胞内シグナル制御機構の検討  
第 57 回 日本糖尿病学会年次学術集会、  
2014 年 5 月、大阪
- 7) Kyoko Shinmura 他： LKB1-dependent  
regulation of incretin actions in pancreatic  
 $\beta$ -cells by metformin and adiponectin.  
50th Annual meeting of the European  
association for the study of  
diabetes, September, 2014, Vienna, Austria

〔図書〕(計 1 件)

T. Negoro, Y. Yamamoto, S. Shimizu, AH  
Banham, G. Roncador, H. Wakabayashi, T. Osabe,  
T. Yanai, H. Akiyama, K. Itabashi and Y. Nakano  
Bronchial asthma-Emerging therapeutic  
strategies. Chapter 4; Immunomechanisms of  
childhood asthma(査読有)  
ISBN; 978-953-51-0140-6  
260 pages, February, 2012  
Publisher; InTech

〔その他〕

ホームページ等  
昭和大学薬学部

[http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/major/medinfo/rsch\\_achievement/](http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/major/medinfo/rsch_achievement/)

昭和大学学術業績リポジトリ

<http://meta.lititory.showa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

根来 孝治 (NEGORO TAKAHARU)  
昭和大学・薬学部・講師  
研究者番号： 70218270

(2)研究分担者

中野 泰子 (NAKANO YASUKO)  
昭和大学・薬学部・教授  
研究者番号： 20155790