

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790460

研究課題名(和文)ステロイド抵抗性喘息に関わるメモリーTh17細胞の形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of mechanisms controlling memory Th17 cell generation in steroid-resistant asthma

研究代表者

鈴木 茜 (SUZUKI, Akane)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：90586603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：将来メモリー細胞になるエフェクター細胞集団のcDNAマイクロアレイ解析およびメモリー細胞形成に必要なシグナルを用いた遺伝子発現変動の結果から、2個のメモリーTh17細胞形成制御候補分子を同定した。現在進行中のこれらの分子によるメモリーTh17細胞形成制御機構の解明を行うことで、好中球浸潤を伴うステロイド抵抗性のTh17依存性喘息治療確立に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：We identified the two candidate genes regulating memory Th17 cell generation by cDNA microarray analysis of effector cells that become memory cells. To clarify the mechanism that control memory Th17 cell generation by the candidate molecules is important for establishment of a basis for the treatment of neutrophilic and steroid-resistant Th17 dependent asthma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：メモリーTh17細胞 ステロイド抵抗性喘息

1. 研究開始当初の背景

免疫応答の司令塔であるヘルパーCD4 T (Th) 細胞は産生するサイトカインによって少なくとも 3 つのサブセットがあり、IFN- γ を産生する Th1 細胞、IL-4 を産生する Th2 細胞、さらに近年新たに同定された IL-17A を産生する Th17 細胞に分けられる。これらのサブセットの活性化は、炎症反応やアレルギー性疾患などの誘導に関与することが知られている。抗原提示を受けていないナイーブ CD4 T 細胞は抗原刺激により活性化し、エフェクターTh 細胞となって一部の細胞のみが長期間生存可能なメモリーTh 細胞となる。このメモリーTh 細胞は、ナイーブ CD4 T 細胞と比べて短時間でサイトカインを産生でき、機能を維持したまま長期生存が可能である。さらに、慢性気管支喘息などの患者で機能する Th 細胞は CD45RO⁺ のメモリーTh 細胞であることがわかっており、アレルギー性疾患の治療を考える上でメモリーTh 細胞の形成制御機構を理解することは非常に大切である。

これまでに、申請者らは喘息疾患治療の基礎研究として、エフェクターTh2 細胞分化およびメモリーTh2 細胞形成の制御機構を明らかにしてきた (Yamashita et al. *Immunity* 2006, Kimura, Suzuki et al. *J Immunol.* 2007, Suzuki et al. *J Immunol.* 2010)。また、近年申請者らは好酸球浸潤を伴う Th2 依存性喘息だけでなく、好中球浸潤を伴いステロイド抵抗性の Th17 依存性喘息の発症機構の解明にも取り組んでいる。

CD30 は Tumor necrosis factor receptor (TNFR) ファミリーの一つであり、腫瘍細胞や活性化エフェクターT 細胞、B 細胞に発現している。CD30 は活性化に伴い発現が認められ、エフェクターTh 細胞のサイトカイン産生能に重要であることが知られている。さらに、CD30 欠損マウスではメモリーCD4 および CD8 T 細胞形成能の低下が報告されている。しかしながら、メモリーTh 細胞形成過程において、いつ、どのように CD30 が関わっているのかはよくわかっていない。

本研究を計画的に進めていくにあたり、申請者は以下の研究方法を確立し、予備的実験結果を得ている。

- (1)メモリーTh17 細胞作製法の確立(in vitro で分化したエフェクター細胞をマウスに移入する系)。
- (2)CD30 発現レベルとメモリーTh17 細胞数の相関がみられた。
- (3)CD30 発現細胞由来のメモリーTh17 細胞は、非発現細胞由来のものに比べて 3~5 倍の細胞数が認められた。この現象は、他のサブセットである Th1 細胞でも確認された。
- (4)(3)で得られた CD30 発現細胞由来のメモ

リーTh17 細胞では、非発現細胞由来のものに比べて顕著に IL-17A 産生能が亢進していた。

- (5)CD30 発現エフェクターTh17 細胞では、非発現細胞と比較してアポトーシス促進因子である Bim や FasL の発現が mRNA レベルで著しく低下していた。
- (6)エフェクターTh17 細胞分化において、CD30 発現が TGF- β によって抑制または IL-1 β によって亢進していた。

2. 研究の目的

最近、申請者は細胞の活性化および生死を制御する細胞表面分子 CD30 がメモリーTh17 細胞の形成に重要であることを見いだした。本研究は、好中球浸潤を伴うステロイド抵抗性の Th17 依存性喘息治療の基盤となる、メモリーTh17 細胞形成制御機構を明らかにするものである。

具体的な研究項目は、(1)メモリーTh17 細胞形成に CD30 シグナルが必要となる時期の同定、(2)アポトーシス促進因子 Bim 欠損によるメモリーTh17 細胞形成の解析、(3)cDNA マイクロアレイを用いたメモリーTh17 細胞形成制御因子の探索、(4)CD30 シグナルによる Bim および(3)で得られた候補分子の発現制御機構の解明、(5)Th17 依存性喘息における CD30 の役割、(6)CD30 発現制御機構の解明、の 6 つである。

3. 研究の方法

メモリーTh17 細胞形成機構における CD30 の役割およびその CD30 発現制御機構を明らかにするため、本研究では、以下の 6 つの研究を行った。

- (1)メモリーTh17 細胞形成に CD30 シグナルが必要となる時期の同定
- (2)アポトーシス促進因子 Bim 欠損によるメモリーTh17 細胞形成の解析
- (3)cDNA マイクロアレイを用いたメモリーTh17 細胞形成制御因子の探索
- (4)CD30 シグナルによる Bim および(3)で得られた候補分子の発現制御機構の解明
- (5)Th17 依存性喘息における CD30 の役割
- (6)CD30 発現制御機構の解明

申請者らの予備実験により、CD30 発現細胞を含むエフェクターTh17 細胞由来のメモリーTh17 細胞は CD30 非発現細胞のものに比べて細胞数が多く、CD30 がメモリーTh17 細胞形成に重要であることが示唆された。

- (1)メモリーTh17 細胞形成に CD30 シグナルが必要となる時期の同定

CD30 シグナルがエフェクター細胞からメモリー細胞になる際 (退縮期~メモリー期) に必要なかを調べるために、レシピエントで

ある野生型マウスまたは CD30 リガンド欠損マウスにエフェクターTh17 細胞を移入し、メモリー細胞の細胞数に違いがあるか解析した。

(2)アポトーシス促進因子 Bim 欠損によるメモリーTh17 細胞形成の解析

CD30 発現エフェクターTh17 細胞において、アポトーシス促進因子 Bim の発現低下が認められた。そこで、Bim の低発現がメモリーTh17 細胞形成制御に重要であるか調べるため、Bim の発現が高い CD30 非発現エフェクターTh17 細胞のメモリー細胞形成能を、野生型および Bim 欠損マウスを用いて解析した。

(3)cDNA マイクロアレイを用いたメモリーTh17 細胞形成制御因子の探索

メモリーTh17 細胞形成制御因子を同定するため、(2)と平行して cDNA マイクロアレイを行い、CD30 発現/非発現細胞エフェクターTh17 細胞で mRNA 発現量に差のある候補分子を選定した。得られた候補分子をレトロウイルスによりノックダウンまたは過剰発現させ、メモリーTh17 細胞が増加するか検討した。

(4)CD30 シグナルによる Bim および(3)で得られた候補分子の発現制御機構の解明

メモリーTh17 細胞形成制御の候補分子として得られた Bim および(3)の分子の発現が CD30 シグナルによって制御されているか調べるため、CD30 リガンドによる CD30 シグナル刺激を行い、候補分子発現量を解析した。

(5)Th17 依存性喘息における CD30 の役割

Th17 依存性喘息におけるメモリーTh17 細胞と CD30 の役割を明らかにするため、CD30 発現細胞を含むエフェクターTh17 細胞を移入したメモリーTh17 マウスと CD30 非発現細胞のエフェクターTh17 細胞を移入したメモリーTh17 マウスに喘息を誘導し、メサコリンによる気道抵抗値を測定して喘息の増悪を検討した。

(6)CD30 発現制御機構の解明

メモリーTh17 細胞形成に重要である CD30 を発現する細胞としない細胞の決定に分化培養中に含まれるいずれのサイトカインが関わっているかを明らかにするため、サイトカイン濃度を振って培養上清中に添加し、CD30 発現レベルの変化を調べた。

4. 研究成果

レシピエントに CD30 リガンド欠損マウスを用いてエフェクターTh17 細胞を移入し、メモリー細胞数を検討した結果、野生型マウスと比べて差が認められなかったことから、メモリーTh17 細胞形成における CD30 シグナルが必要となる時期は、細胞が活性化するエフ

ェクター期であることがわかった。そこで、エフェクター期において将来メモリーTh17 細胞になる CD30 発現細胞、なりにくい CD30 非発現細胞に分けて cDNA マイクロアレイ解析を行い、10 個のメモリーTh17 細胞形成制御候補分子を同定した。CD30 リガンド添加による CD30 シグナル活性化を行ったところ、10 個中 2 つの候補分子が発現変動していた。この結果から、この 2 つの分子がメモリーTh17 細胞形成制御因子である可能性が高いことが示唆された。アポトーシス促進因子 Bim は候補分子ほどの顕著な差が認められなかった。一方、ステロイド抵抗性の Th17 依存性喘息における CD30 の役割を調べるため、CD30 発現細胞を含む Th17 細胞(Th17)または CD30 非発現 Th17 細胞(pTh17)をそれぞれマウスに移入したメモリーTh17 マウスを作製し、抗原感作による気道炎症を誘導した。その結果、CD30 発現細胞由来のメモリーTh17 マウスで喘息の悪化が認められた(図 1)。このことから、CD30 が Th17 依存性喘息発症に重要であることが明らかとなった。

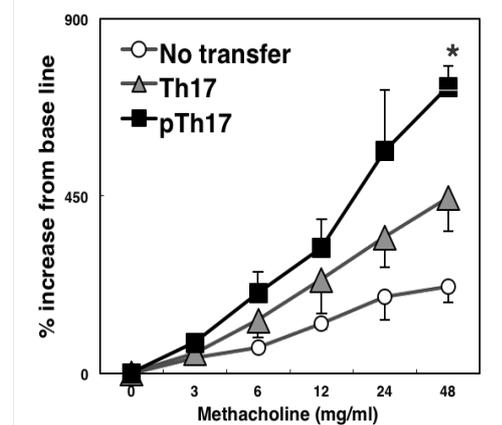


図 1. 喘息を誘導したメモリーTh17 マウスとメモリーpTh17 マウスの気道抵抗値。pTh17 マウスで値が高く、喘息が増悪化していることがわかる。

さらに、メモリー細胞になりやすい CD30 発現 Th17 細胞への誘導を制御するサイトカインを検討した結果、TGF- β による抑制、IL-6 と IL-23 による誘導が認められた。この結果から、IL-6 と IL-23 レセプター下流の STAT3 が誘導に重要であることが示唆された。また、CD30 下流シグナルである NF κ B が候補分子の遺伝子座に結合することが報告されていることから、このシグナル経路がメモリーTh17 細胞形成に重要であることが示唆された。今後、得られた 2 つのメモリー細胞形成制御候補因子を解析することで、メモリーTh17 細胞形成制御機構を解明し、ステロイド抵抗性 Th17 依存性喘息治療の基盤確立に貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tumes, D. J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T.: The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4⁺ T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity*, 査読有, 39(5): 819-832, 2013
DOI:10.1016/j.immuni.2013.09.012

[学会発表] (計 4 件)

- ① Ito, T., Hirahara, K., Suzuki, A., Shinoda, K., Hayashizaki, K., Wada, T., Yano, I., and Nakayama, T.: Induction of anti-tumor effect of BCG-LM through activation of eosinophils and effector memory Th2 cells. 第 42 回日本免疫学会総会学術集会、2013 年 12 月 11 日、幕張メッセ (千葉県千葉市)
- ② Tumes, D., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: The histone methyltransferase Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4 T helper cells. AAI Annual Meeting、2013 年 5 月 6 日、Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii, USA)
- ③ Iwamura, C., Endo, Y., Onodera, A., Watanabe, Y., Suzuki, A., Kinjo, Y., and Nakayama, T.: Regulation of memory CD4 T cell pool size and function by NKT cells in vivo. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ④ 細川裕之、田中知明、加藤美紀、遠山裕之、鈴木茜、中山俊憲 GATA3/Ruvbl2 複合体による Cdkn2c (p18, Ink4c) の転写制御を介した Th2 細胞増殖制御メカニズムの解析 第 22 回 Kyoto T cell Conference、2012 年 7 月 7 日、和順会館 (京都府京都市)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)

名称: 抗ミオシン調節軽鎖ポリペプチド抗体を含む炎症疾患治療用組成物

発明者: 中山俊憲、細川裕之 (国立大学法人千葉大学)、常世田好司 (ドイツリュウマチ研究センター)、林崎浩史、鈴木茜 (国立大学法人千葉大学)

権利者: 国立大学法人千葉大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-114388 号

出願年月日: 25 年 5 月 30 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 茜 (SUZUKI, Akane)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号: 90586603