

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790819

研究課題名(和文)急性肺障害におけるCTLA4を介したT細胞活性の重要性

研究課題名(英文)T cell pathways involving CTLA4 contribute to acute lung injury

研究代表者

中島 剛(Nakajima, Takeshi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70328277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：急性肺障害は重篤な呼吸不全を来すが、根本的な治療法がない。我々は獲得免疫の中心的役割を担うT細胞に着目し、免疫抑制分子であるCytotoxic T Lymphocyte Antigen 4(CTLA4)のシグナルを介したT細胞活性が急性肺障害の病態に関与していることを示した。制御性T細胞を誘導する免疫抑制剤、ラパマイシンを動物モデルに投与することでT細胞活性を介し、肺の炎症が抑制されることを示し、マウスのT細胞を用いたin vitroの実験においてCTLA4シグナル伝達経路の一部を解明した。CTLA4シグナル抑制が急性肺障害に有効であり、特にラパマイシンが治療応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acute lung injury (ALI) is a major cause of severe respiratory failure. The pathogenesis of ALI remains ill defined, and the treatment of ALI remains largely supportive. We showed that T cell pathways involving cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) may modulate the inflammation in ALI. We demonstrated that rapamycin, an immunosuppressant which inhibits T cell activation and induces regulatory T cells, ameliorates inflammation in ALI. We also determined a mechanism of the specific pathways by which CTLA4 are activated in ALI. The potential therapeutic impact of manipulating T cell pathways involving CTLA4 in ALI merits further investigation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：急性肺障害 T細胞 CTLA4

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性肺障害は肺の非特異的炎症に基づく透過性肺水腫であり、高度の低酸素血症と胸部レントゲン上の両側性浸潤影を特徴とする。急性肺障害の中でもより重症な急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome: ARDS) は重篤な呼吸不全を引き起こし、高い死亡率を示す。ARDS の発症機序はいまだ不明な点が多いため、根本的治療法は確立しておらず、対症療法に頼らざるを得ないのが現状である。急性肺障害を惹起する原因・基礎疾患は多岐に渡るが、主な原因として、肺炎や敗血症などの感染症が挙げられる。我々はグラム陰性桿菌の構成物質の一部であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) をマウスに気道内投与するモデル、すなわち、肺炎による直接肺障害モデルを用いて、その病態の解明を目指した。その基本病態は、主に好中球などの自然免疫細胞による肺泡毛細血管組織の傷害と考えられており、T 細胞の役割は明らかにされていない。自然免疫と T 細胞を中心とした獲得免疫の相互作用が重要であることは、喘息をはじめ様々な疾患で分かってきており、急性肺障害においても T 細胞がその病態に大きく関与している可能性がある。

(2) 我々は、LPS 気道投与動物モデルにおいて、急性肺障害誘発後に好中球だけでなく T 細胞が増加し活性化されることを示した。また、T 細胞及び B 細胞の欠如した RAG 欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、LPS 気道内投与後の肺泡洗浄液中の好中球数が有意に減弱することから、T 細胞が急性肺障害に重要な役割をもっていると考えられた。更に T 細胞に特異的に発現している蛋白分子である Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) に注目し、その発現が LPS 気道内投与後に増加し、そのシグナルを抗 CTLA4 抗体で阻害することで、急性肺障害の炎症が減少することを示した (T. Nakajima et al. JI. 2010)。

2. 研究の目的

我々の急性肺障害モデルにおいて、T 細胞活性をコントロールすることで肺の炎症が修飾されることが示唆された。その機序として抗 CTLA4 抗体により、CTLA4 シグナルを阻害することでエフェクター T 細胞と制御性 T 細胞 (Treg) の活性バランスが変化し、炎症が抑制されることが一因と考えられた。本研究では、確立された同モデルを用いて、Treg を誘導するとされる免疫抑制剤、ラパマイシン (mTOR 阻害剤) を投与し CTLA4 シグナル伝達を介した T 細胞活性の急性肺障害へ及ぼす病態生理学的意義を細胞レベル、動物実験レベルから総合的に検討した。

3. 研究の方法

(1) 急性肺障害マウスモデルを用いた検討

LPS 気道内投与動物モデルの腹腔内に、LPS

暴露前にあらかじめラパマイシンを投与し、肺の炎症性マーカー (気管支肺泡洗浄液における細胞数、アルブミン濃度、炎症性サイトカイン) を調べる。

T 細胞への影響を調べるために、ホモジナイズした肺組織を用いて T 細胞活性マーカーである CD69、CTLA4、及び制御性 T 細胞の特異的転写因子である Foxp3 の発現量をフローサイトメトリー法で測定する。

ラパマイシンを LPS 誘発前のみだけでなく、誘発後のタイミングで、また、腹腔内だけでなく気道内にも投与し比較する。

(2) マウスの T 細胞を用いた検討

マウスの T 細胞を LPS で刺激後、ラパマイシンを投与し、BrdU アッセイにより細胞増殖、マルチプレックスアッセイにてサイトカイン産生量を測定し、細胞機能への影響を調べる。その際に活性化されるシグナル伝達分子、転写因子 (NFκB、NFAT、CREB など) をウエスタンブロット、リアルタイム PCR で調べる。

cAMP アナログを用いてマウス T 細胞を刺激後、CTLA4 発現量をリアルタイム PCR で測定する。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにて CTLA4 プロモータ活性の機序を調べる。また、抗 CREB 抗体を用いて ChIP アッセイにて CTLA4 プロモータ活性に CREB が関与していることを確認する。

4. 研究成果

(1) 急性肺障害マウスモデルを用いた検討

LPS 気道内投与モデルにラパマイシンを腹腔内投与し、気管支肺泡洗浄液 (BAL) の細胞数が減弱することを示した。興味深いことに、同じ免疫抑制剤であるシクロスポリンには炎症減弱効果を認めなかった (図 1)。

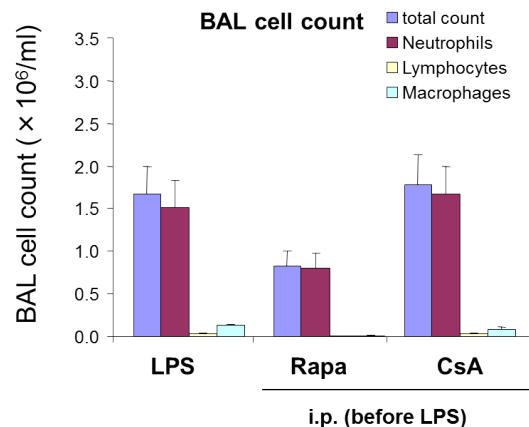


図 1 BAL 細胞数

ラパマイシン腹腔内投与により、BAL 細胞数のみならず、急性肺障害の炎症マーカーである、BAL アルブミン濃度、IL-6 をはじめとする各種サイトカインの低下も認められた (図 2)。急性肺障害に対するラパマイシンの炎症減弱効果が示唆された。

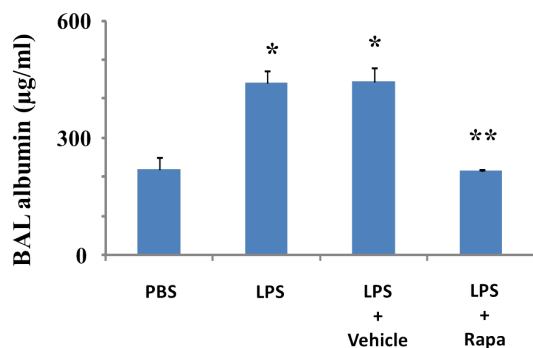


図2 BAL アルブミン濃度

ホモジナイズした肺組織においてT細胞活性化マーカーである、CD69、CTLA4をフローサイトメトリー法で調べたところ、ラパマイシン投与により、いずれも有意に減弱していた(図3)。このことより、ラパマイシンがT細胞活性を介して抗炎症作用を発揮していると考えられた。

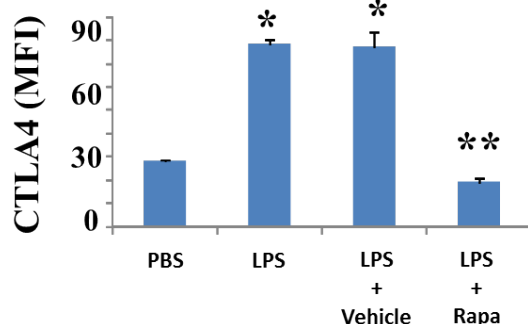


図3 CTLA4 発現量

ラパマイシンの治療への臨床応用の可能性を確認するため、LPS 誘発前だけでなく、LPS 暴露後にも投与し比較検討した。LPS 暴露後のラパマイシン投与においても有意に炎症を減弱した。また、腹腔内投与だけでなく、気管内投与においても炎症は減弱した(図4)。肺組織中のT細胞活性化マーカーである、CD69、CTLA4 発現量も同様に減弱した(図5)。気管内投与よりも腹腔内投与において炎症をより強く抑制した傾向にあった。LPS 気道内投与による気道局所の炎症であっても、急性肺障害においては全身性の炎症が同時に惹起されており、腹腔内投与によりラパマイシンを全身投与した方がより効果が高いことが考えられた。また、興味深いことに、腹腔内投与においてはより少量のラパマイシンが炎症減弱効果を示した。これは高濃度のラパマイシンではエフェクターT細胞のみならず、抗炎症作用のあるTregも抑制してしまうことが原因のひとつと考えられた。抗CTLA4抗体が急性肺障害の炎症抑制効果を示したのと同様に少量ラパマイシンがエフェクターT細胞とTregの活性バランスを変化させていることが示唆された。

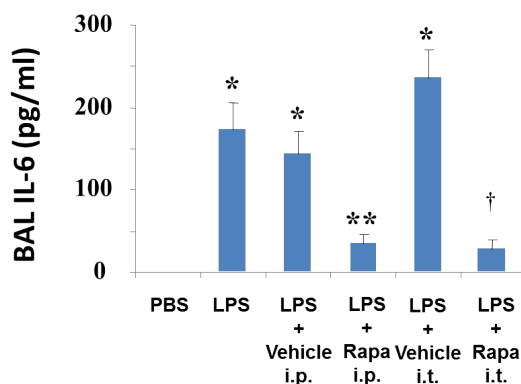


図4 BAL 中の IL-6 濃度

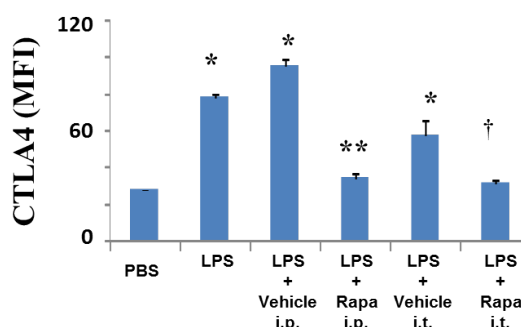


図5 CTLA4 発現量

(2) マウスのT細胞を用いた検討

LPS 気道内投与マウスモデルにおけるラパマイシンのT細胞活性への作用機序を解明するため、マウスのT細胞を用いて実験を行った。マウスのT細胞の増殖がLPS刺激により増加し、ラパマイシン投与下で抑制されることをBrdUアッセイで確認した(図6)。マルチプレックスアッセイにてLSP刺激で上昇したIL-6、IL-10産生量もラパマイシンで抑制された。

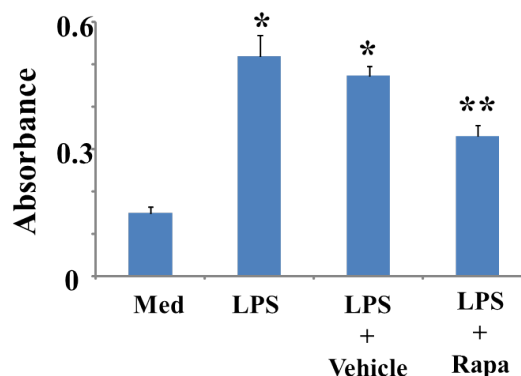


図6 細胞増殖

フローサイトメトリー解析では、ラパマイシン投与によりLPS刺激T細胞におけるCTLA4発現量、Foxp3発現量が低下していた(図7)。動物モデルと同様の結果が得られ、

ラパマイシンが CTLA4 活性を介して抗炎症作用を発揮している可能性が示唆された。

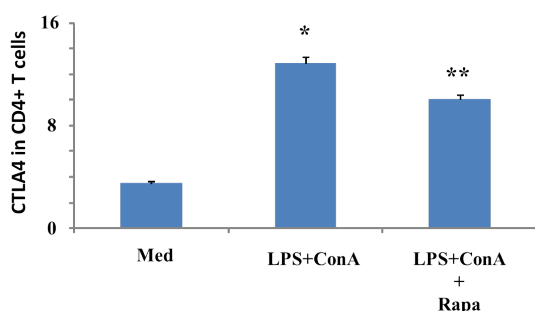


図7 CTLA4 発現

T 細胞活性のシグナル伝達の機序を解明するため、転写因子(NFκB、NFAT、CREB など)をウエスタンブロット、リアルタイム PCR で調べたところ、ラパマイシンにより CREB 発現が上昇することが分かった(図8)。他の転写因子の増加は見られなかった。CREB は cAMP シグナル伝達の下流分子であり、CTLA4 活性が cAMP と密接な関係があることから、ラパマイシンは cAMP/CREB を介し、CTLA4 発現に影響を与えていると考えられた。

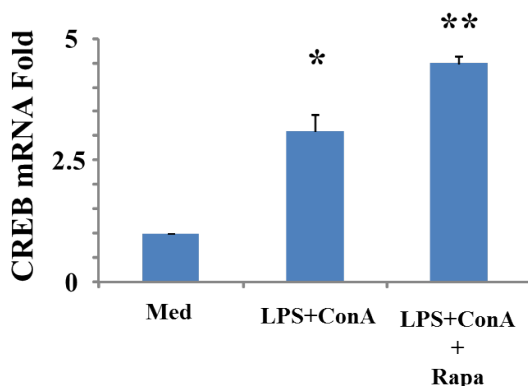


図8 CREB 発現量

リアルタイム PCR にて cAMP 刺激によりマウス T 細胞の CTLA4 発現が増加することを示した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより各種アゴニストを用いた cAMP 刺激による CTLA4 発現の増加は PKA を介して CTLA4 プロモーター活性が上がることに起因することを示した。また、ChIP アッセイにて cAMP 刺激により CREB が CTLA4 のプロモーター領域に結合し、活性化している可能性を示唆した。

(3)まとめ

LPS 気道内投与モデルにラパマイシンを腹腔内投与し、肺の炎症が減弱することを示した。T 細胞活性マーカーである CD69、CTLA4 発現量が減少したことにより、ラパマイシンが T 細胞活性を介して LPS 誘導炎症を減少すると

考えられた。この結果は、マウスの T 細胞を用いた in vitro の実験においても実証され、ラパマイシンが cAMP/CREB シグナルを介し、CTLA4 活性を減弱している可能性が示唆された。また、低用量ラパマイシンは Treg を誘導するとされ、移植免疫で期待されているが、急性肺障害においても有効である可能性が示唆された。LPS 暴露後の投与でもラパマイシンは有効であり、治療応用の可能性を示唆した。

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 1 件)

1. Takeshi Nakajima et al., T cells and Lung Injury: Impact of Rapamycin. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 (査読有、印刷中)
DOI: 10.1165/rcmb.2013-01710C

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 中島 剛、急性肺障害と制御性 T 細胞、日本呼吸器学会学術講演会、2013 年 4 月 19 日、東京国際フォーラム

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 剛(Nakajima Takeshi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 70328277