

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 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：24790989

研究課題名(和文) 気管支喘息における Ikarosファミリー分子 Aiolos の役割の解明

研究課題名(英文) The role of Aiolos in allergic airway inflammation

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウスCD4+T細胞においてIL-4がStat6依存的にAiolosの発現を誘導することを発見した。しかし、Aiolosの発現はTh2細胞分化には関与していなかった。また、OVA誘導性アレルギー性気道炎症を惹起したマウスの肺においてAiolosの発現が増加することも明らかになった。さらに、我々はヒトCD4+T細胞において、Aiolos遺伝子の発現量、TNFRSF4 (OX40)やTNFRSF18 (GITR)などの遺伝子の発現と相関していることを見出した。これらの結果より、AiolosはOX40はGITRの発現を調節することでCD4+T細胞の機能を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that Aiolos is a transcription factor whose expression is restricted to hemopoietic cells. However, the regulatory mechanisms of Aiolos expression in CD4+ T cells and its roles in allergic inflammation remain largely unknown. In this study, we found that IL-4 induced Aiolos expression in murine CD4+ T cells through a Stat6-dependent manner, whereas Aiolos expression did not affect Th2 cytokine production in CD4+ T cells. We also found that the expression of Aiolos in the lung was up-regulated in OVA-induced allergic airway inflammation but not in papain-induced airway inflammation in mice. In addition, we found that gene expression of Aiolos strongly correlated with those of TNFRSF4 (OX40) and TNFRSF18 (GITR) in human CD4+ T cells. These results suggest that Aiolos may control the function of CD4+ T cells by regulating the expression of OX40 or GITR in CD4+ T cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー性気道炎症 ヘルパーT細胞分化

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は人口の約 5% が罹患する重要なアレルギー疾患である。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、5-8% が治療抵抗性の重症喘息であり、その病態の解明および治療戦略の確立が急務である。

気管支喘息の基本病態はアレルギー性気道炎症であり、その発症には IL-4、IL-5、IL-13 などを生産する Th2 細胞が中心的な役割を果たしている。本研究室では喘息重症化の分子機構を解析し、アレルギー性気道炎症の局所で産生される IL-23 が、Th17 細胞の分化と好中球性気道炎症の誘導に加え、Th2 細胞誘導性の好酸球性気道炎症の増悪に関与することを明らかにした (Wakashin, *Am J Respir Crit Care Med*, 2008)。さらに近年、Th17 細胞が産生するサイトカインに加え、気道上皮細胞が産生する TSLP、IL-25、IL-33 や myeloid 系細胞が産生する炎症性サイトカインが、肥満細胞、好塩基球、NKT 細胞、自然型リンパ球 (ILCs) などの自然免疫系細胞に作用して、喘息の重症化や気道感染時の増悪に関与していることが報告されている (Kim, *Nat Immunol*, 2010)。

他方、本研究者は、Th17 細胞と類似のサイトカイン産生能を有する CD4 陽性 lineage 陰性 lymphoid tissue inducer-like (LTi 様) 細胞 (Takatori, *J Exp Med*, 2009) のアレルギー性気道炎症における役割を解析する過程で、慢性アレルギー性気道炎症モデルでは、気管支及び血管の周囲に異所性の三次リンパ組織 (iBALT) が形成され、LTi 様細胞、濾胞ヘルパー T 細胞 (T_{FH} 細胞)、胚中心 B 細胞など、二次リンパ組織 (SLOs) の形成に重要な役割を果たす細胞が著明に増加することを見出した (未発表データ)。しかし、アレルギー性気道炎症における iBALT の形成機構、及びその役割は依然不明である。

さらに近年、本研究者は Solexa シークエンステクノロジーを用いたゲノムワイドな Th2 細胞分化誘導機構の解析の過程で、STAT6 が直接発現を誘導する遺伝子の一つとして Ikaros ファミリーに属する転写因子

Aiolos を同定した (Wei, Takatori, *Immunity*, 2010)。マウス Th2 細胞で Aiolos の発現が高いことも既に確認している (未発表データ)。Ikaros ファミリーは Ikzf1 (Ikaros)、Ikzf2 (Helios)、Ikzf3 (Aiolos)、Ikzf4 (Eos)、Ikzf5 (Pegasus) の 5 つの分子で構成され (McCarty, *Mol Cell*, 2003)、血球系細胞の分化や増殖に重要な役割を果たしていることが示されている (John, *Mol Immunol*, 2011)。T 細胞における Ikaros ファミリー分子の役割に関しても、Ikaros は胸腺における T 細胞の分化 (Wang, *Immunity*, 1996)、及び末梢における Th2 細胞の分化 (Quirion, *J Immunol*, 2009) に必須であること、Helios は制御性 T 細胞に高発現していること (Thornton, *J Immunol*, 2010)、Eos は制御性 T 細胞における Foxp3 依存的な転写抑制に関与していること (Pan, *Science*, 2009) などが明らかにされている。Aiolos についても少数の先行する研究があり、Aiolos 欠損マウスでは SLOs において胚中心が自然に形成され、血清中の免疫グロブリンが高値になることが報告されている (Wang, *Immunity*, 1998)。ヒト喘息患者における解析でも、幼少時発症喘息と Aiolos の遺伝子多型が相関することが示されている (Bouzigon, *N Engl J Med*, 2008)。以上より、Aiolos が喘息をはじめとするアレルギー疾患の病態に関与していることが推測されるが、ヘルパー T 細胞の分化、及びアレルギー性気道炎症における Aiolos の役割は未だ不明である。

2. 研究の目的

従って、本研究では Th2 細胞分化、及びアレルギー性気道炎症における Aiolos の役割を解明すること、さらに $CD4^+$ T 細胞における Aiolos の標的分子を同定することを目的とする。本研究により、Aiolos、或はその標的分子をターゲットとしたアレルギー疾患の新規治療法開発の基盤が構築されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ヘルパー T 細胞分化における Aiolos の

役割の解析

野生型 (WT) マウスの脾臓からナイーブ CD4⁺ T 細胞を単離し、抗 CD3/CD28 抗体による TCR 刺激とともに、IL-12、IL-4、IL-6、TGF-βなどの様々なサイトカインの存在下で同細胞を 48 時間培養した。その後、各ヘルパー T 細胞 (Th) 細胞から cDNA を合成し、Aiolos の mRNA 発現を qPCR 法により解析した。

WT マウス及び、Stat6 欠損マウスの脾臓からナイーブ CD4⁺ T 細胞を単離し、実験 A-1)と同様に同細胞を 72 時間刺激した。その後、各 Th 細胞を固定後、細胞内染色法により Aiolos 蛋白の発現に対する Stat6 欠損の影響を FACS で解析した。また、様々な濃度の IL-4 を同時に添加し、Aiolos 蛋白の発現に対する影響を FACS で解析した。

WT マウス及び、Stat6 欠損マウスの脾臓からナイーブ CD4⁺ T 細胞を単離し、TCR 刺激とともに IL-4 の存在/非存在下で同細胞を培養した。これらの細胞を PMA/Iono で 4 時間再刺激後、Aiolos と IL-13 を共染色し、Aiolos 発現細胞における IL-13 産生を FACS で解析した。

(2) アレルギー性気道炎症における Aiolos 発現の解析

WT マウスに、卵白アルブミン (OVA) を腹腔内感作後、OVA を 2 回吸入させて、アレルギー性気道炎症を誘導した。その後、肺より免疫細胞を単離し、cDNA を合成後、Aiolos の mRNA 発現を qPCR 法で解析した。

WT マウスに Papain を 3 回連続点鼻投与し、自然型アレルギー性気道炎症を誘導した。その後、肺内の ILCs における Aiolos の発現を FACS で解析した。さらに、肺より単離した免疫細胞を PMA/Iono で 4 時間刺激後、Aiolos と IL-5 を共染色し、ILC2 における Aiolos の発現を FACS で解析した。

(3) 健常人の末梢血 CD4⁺ T 細胞における Aiolos 発現の解析

健常人の末梢血単核球より CD4⁺ T 細胞を単離し、DNA マイクロアレイ法により、Aiolos 遺伝子の発現と、他の遺伝子発現との相関を解析した。

4. 研究成果

(1)- IL-4 の存在下でマウス CD4⁺ T 細胞を刺激することで、非存在下あるいは他のサイトカイン存在下と比して Aiolos mRNA の発現が亢進した。

(1)- マウス CD4⁺ T 細胞において、IL-4 添加による Aiolos 蛋白の発現誘導は Stat6 の存在に依存していた。また、IL-4 は濃度依存的に Aiolos 蛋白の発現を増強した。

(1)- Aiolos 発現 CD4⁺ T 細胞では IL-13 産生は亢進していなかった。

以上の実験より、CD4⁺ T 細胞において IL-4 は Stat6 依存的に Aiolos の発現を誘導するが、Th2 サイトカイン産生の増強には関与していないことが示唆された。

(2)- OVA 誘導性アレルギー気道炎症を惹起したマウスの肺由来の免疫細胞では、Aiolos mRNA の発現がコントロールマウスと比して亢進していた。

(2)- Papain 誘導性自然型アレルギー気道炎症を惹起したマウスの肺内で、T 細胞、ILCs における Aiolos 蛋白の発現はコントロールマウスと同程度であった。また、Aiolos 発現 ILCs において IL-5 産生の亢進は認めなかった。

以上の実験より、Th2 細胞依存的な OVA 喘息モデルマウスの肺では Aiolos の発現が亢進するが、自然型アレルギー性気道炎症モデルマウスの肺内 ILC2 では Aiolos 発現が増強しないことが示唆された。また、ILC2 における Aiolos の発現は Th2 サイトカイン産生の亢進に影響していないことが示唆された。

(3)- 健常人の末梢血由来の CD4⁺ T 細胞において、Aiolos 遺伝子の発現レベルは TNFRSF4 (OX40) 遺伝子や TNFRSF18

(GITR)遺伝子の発現レベルと正の相関を認めた。

上記の実験より、Aiolos の発現は、OX40 や GITR の発現に関与し、CD4⁺ T 細胞の機能を調節している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Takatori H*, Kawashima 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 Oct 1;191(7):3614-23. (*equally contributed). 査読有.

2. Hosokawa J, Suzuki K, Nakagomi D, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Nakajima H. Role of calcium ionophore A23187-induced activation of IkappaB kinase 2 in mast cells. Int Arch Allergy Immunol. 2013;161 Suppl 2:37-43. 査読有.

3. Uchida F, Uzawa K, Kasamatsu A, Takatori H, Sakamoto Y, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Tanzawa H. Overexpression of CDCA2 in human squamous cell carcinoma: correlation with prevention of G1 phase arrest and apoptosis. PLoS One. 2013;8(2):e56381. 査読有.

4. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takahashi K, Yamagata M, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasound can improve the accuracy of the 2010 American College of Rheumatology/European League against rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis to predict the requirement for methotrexate treatment. Arthritis Rheum. 2013 Apr;65(4):890-8. 査読有.

5. 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 Mar;133(3):702-11. 査読有.

6. Iwata A, Ikeda K, Hirose K, Takatori H, Takahashi K, Sanayama Y, Tanaka S, Suto A, Nakajima H. Pre-dinner administration increases the efficacy of proton pump inhibitors on refractory GERD symptoms in connective tissue disease patients. Mod Rheumatol. 2013 Mar;23(2):357-64. 査読有.

7. Uchida F, Uzawa K, Kasamatsu A, Takatori H, Sakamoto Y, Ogawara K, Shiiba M, Tanzawa H, Bukawa H. Overexpression of cell cycle regulator CDCA3 promotes oral cancer progression by enhancing cell proliferation with prevention of G1 phase arrest. BMC Cancer.

2012 Jul 28;12:321. 査読有.

8. Shimizu T, Kasamatsu A, Yamamoto A, Koike K, Ishige S, Takatori H, Sakamoto Y, Ogawara K, Shiiba M, Tanzawa H, Uzawa K. Annexin A10 in human oral cancer: biomarker for tumoral growth via G1/S transition by targeting MAPK signaling pathways. PLoS One. 2012;7(9):e45510. 査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 川島広稔、高取宏昌、鈴木浩太郎、岩田有史、横田雅也、須藤明、南野徹、廣瀬晃一、中島裕史. Tumor suppressor p53 inhibits systemic autoimmune diseases by inducing regulatory T cells. 第 42 回日本免疫学会学術集会. 2013 年 12 月 11 日-12 月 13 日

2. 高取宏昌、細川淳一、石坂透、中島裕史. FDG-PET/CT が病勢診断に有用であった炎症性大動脈瘤の 1 例. 第 25 回アレルギー学会春期臨床大会. 2013 年 5 月 11 日-5 月 12 日

〔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〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高取 宏昌 (TAKATORI HIROAKI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 3 0 5 6 8 2 2 5

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: