

令和元年5月28日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26221305

研究課題名(和文) Pathogenicな免疫記憶の形成と維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic immune memory formation and maintenance

研究代表者

中山 俊憲 (Nakayama, Toshinori)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50237468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 153,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫学領域で残されている一大テーマである免疫記憶の形成と維持の分子機構に関するプリンシプルを明らかにする研究を行った。特に「生体にとって有害な免疫記憶T細胞が分化し長期間維持される分子機構」をクロマチンレベルおよび生体レベルで解明した。IL-5高産生で好酸球性炎症の誘導する記憶型病原性Th2細胞の形成機構の同定、線維化誘導記憶型病原性Th2細胞の同定と作動機構に関して、エピジェネティックな分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「免疫記憶」という免疫分野での大きなテーマに関して、その本質を分子レベル・クロマチンレベルで明らかにしようとする研究であると同時に、生体レベルでの病態制御も視野に入れた研究であり、学術的意義は大きい。また、「生体にとって有害な免疫記憶T細胞が分化し長期間維持される分子機構」をクロマチンレベルおよび生体レベル、ヒトの細胞での解析を行っており、Human Immunologyに視点を置いた研究といえる。この研究成果をもとに、新規ワクチンが開発されればその社会貢献上のインパクトは甚大である。

研究成果の概要(英文)：The study aims to clarify the molecular mechanisms how pathogenic immunological memory T cells, which are harmful to organism, are differentiated and maintained for a long time. We have (1) explored the epigenetic regulation mechanism responsible for transcriptional memory using "Pathogenic Memory Th2 cell", which causes allergic airway inflammation; (2) identified fibrosis-inducing pathogenic Th2 cells; (3) analyzed functional conversion and maintenance mechanism of memory T cell by polycomb and trithorax group gene products; and (4) elucidated the environmental factors to develop the control methods for allergic inflammation. In this study, we used human samples and got a proof of concept that was obtained using mouse models of allergic airway inflammation. Thus, we provide a significant insight into Human Immunology and Pathophysiology of intractable inflammatory diseases in patients.

研究分野：免疫学、アレルギー学

キーワード：アレルギー・ぜんそく 気道リモデリング 繊維化 好酸球 難治性喘息 EGF受容体阻害薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

CD4 陽性のヘルパーT 細胞は、産生するサイトカインによって少なくとも 3 種類、Th1 細胞 (IFN- γ 産生)、Th2 細胞 (IL-4, IL-5, IL-13 産生)、Th17 細胞 (IL-17 産生) に分類される。これらの細胞は、それぞれ違った局面で免疫反応を制御している。さらに、Th1/Th2/Th17 細胞のバランスが様々な免疫関連病態と密接な関係を持っており、Th2 優位の状態は I 型アレルギーの発症、臓器特異的的自己免疫疾患では Th1 や Th17 優位の状態になる、と考えられてきた。

しかし、私たちは、このバランスの考え方は間違いで、むしろ「生体内では、それぞれの Th 細胞分画に Pathogenic 記憶 Th 細胞が生まれて炎症を引き起こす」という考え方を提唱している (Endo et al. *Trends Immunol.* 2014)。特に慢性化した炎症病態ではこの Pathogenic 記憶 Th 細胞の制御無くしては根治治療は難しいと考えられる。アレルギーや自己免疫疾患は多因子疾患であり、遺伝的要因と環境要因が作用することで特定のクロマチン領域にエピジェネティックな変化が誘導され、その結果、複数の遺伝子発現変動が起こることで発症すると考えられている。また、免疫が関与する難治性疾患である成人喘息、アトピー性皮膚炎、自己免疫疾患、がんなどの病態形成には CD45RO 陽性の記憶型 Th 細胞の関与が報告されており、治療法の開発には免疫記憶細胞の形成・維持の分子機構の理解が必須であるが、現在のところ分子機構についてはほとんど不明のままである。

申請者は、これまでに、

- (1) 記憶 Th2 細胞によるアレルギー性疾患病態形成について、アレルギー性気道炎症のモデルを用いた生体レベルでの解析を多く行ってきた。記憶 Th2 細胞のなかで IL-5 を高産生し好酸球性の気道炎症を誘導する“Pathogenic 記憶 Th2 細胞”をマウス及びヒトで同定し (Endo et al. *Immunity* 2011)、そのサイトカイン産生制御機構に Eomesodermin が関与していることを明らかにした。この“Pathogenic 記憶 Th2 細胞”は、炎症の慢性化に関わる IL-33 の受容体 ST2 強陽性である。
- (2) 記憶 Th1/Th2 細胞の分化と機能維持を担う分子機構に関するエピジェネティック解析を行い、転写記憶(transcriptional memory)に関与すると言われるポリコムやトライソラックス遺伝子産物による作用機序 (Tumes et al. *Immunity* 2013) や、Th2 細胞分化のマスター転写因子である GATA3 を含むクロマチンリモデリング複合体や GATA3 が起こす“正と負の転写機能調節”を担う異なる複合体を同定してきた (Yamashita et al. *Immunity* 2006, Nakayama et al. *Sem. Immunol.* 2009, Onodera et al. *J. Exp. Med.* 2010, Hosokawa et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013)。
- (3) 炎症巣にある環境側の組織細胞のほとんどが産生する TGF β によって誘導される Th2 細胞の機能転換 (抑制) を担うターゲット分子 Sox4 を同定した (Kawahara et al. *Nat. Immunol.* 2012)。
- (4) 他の細胞群 (NKT 細胞等) による記憶 Th1/Th2 細胞の生体内プールサイズの維持機構について、気道炎症のモデル等で解析してきた (Iwamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, Iwamura & Nakayama *Curr. Opin. Immunol.* 2010)。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、記憶 Th1/Th2 細胞の分化およびアレルギー性気道炎症 (喘息) を制御する分子機構に関して、主に転写因子の役割に着目し、分子レベル、遺伝子レベル、クロマチンレベルでの研究を一貫して行ってきた。本申請研究では、免疫学領域で残されている一大テーマである免疫記憶 (immunological memory) の形成と維持の分子機構に関するプリンシプルを明らかにすることを目的とした。特に「生体にとって有害な免疫記憶 T 細胞が分化し長期間維持される分子機構」をクロマチンレベルおよび生体レベルで解明する。

実際には、(1) アレルギー性気道炎症を起こす“Pathogenic 記憶 Th2 細胞”をモデル細胞にして、マスター転写因子やサイトカイン遺伝子の転写記憶 (transcriptional memory) を担うエピジェネティック制御機構を解明する。(2) また、ポリコム及びトライソラックス分子群による記憶 T 細胞の機能変換・維持機構に関する解析を行う。(3) 環境因子 (場) の解明と制御法の開発を目指す。(1)~(3)を、ヒト (患者) の細胞で最先端解析技術を用いて解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 点の研究を行った。

- (1)我々が同定した、アレルギー性気道炎症を起こす“Pathogenic 記憶 Th2 細胞”をモデル細

胞として、機能維持や可塑性 (Plasticity) に関して ChIP-Seq 解析や RNA-Seq 解析などを用いたエピジェネティック解析。IL-33 による Pathogenicity 誘導機構を解析するとともに、慢性副鼻腔炎患者でのポリープ中の記憶 T 細胞を用いてヒトの病巣の細胞で検証 (Proof of Concept; POC)。

- (2) ポリコーム及びトライソラックス分子群による記憶 T 細胞の機能変換・維持機構に関する解析では、EZH2 と Menin による記憶 Th1、Th2、Th17 細胞のサイトカイン産生機能発現と機能維持に関して、エピジェネティック解析。
- (3) 記憶 Th 細胞の形成と維持を担う環境因子 (場) の解明に関しては、記憶 Th2 細胞が集積し、その数の維持に必須であることが分かった iBALT 中の IL-7 産生ストローマ細胞に焦点を当て、多光子顕微鏡を用いた組織学的解析と共に、網羅的解析を組み合わせて記憶 Th2 細胞の形成と維持を担う機能分子の同定。

4. 研究成果

以下の(1)~(3)は研究計画調書に記載した研究目的である。(4)は研究推進過程で新たな重要課題として浮上し取り組んだものである。

(1) アレルギー性気道炎症を起こす“Pathogenic 記憶 Th2 細胞”の機能維持機構の研究：

① アレルギー性気道炎症を起こす“Pathogenic記憶Th2細胞”のPathogenicityを担う新規機能候補分子を網羅的遺伝子発現解析の結果から複数同定した。それらのなかでも、Epidermal growth factorファミリーのAmphiregulinに特に注目し解析を行った。Amphiregulinの生体内における病原性誘導機構の解析を行った。組織線維化を伴った好酸球性気道炎症において、1) IL-33存在下でAmphiregulinを特異的に産生する記憶型Th2細胞が出現すること、2) 同細胞から産生されるAmphiregulinは、好酸球に発現するEpidermal Growth Factor (EGF)受容体を介して、好酸球を活性化すること、3) Amphiregulin刺激を受けた好酸球は、細胞外マトリックスの構成成分として重要なOsteopontinを産生し、気道周囲の線維化を誘導することを明らかにした。さらに、4) ヒト慢性好酸球性炎症疾患である好酸球性副鼻腔炎患者由来のポリープ中にAmphiregulin産生記憶型CD4 T細胞およびOsteopontin産生好酸球が、多数認められ組織線維化の病態形成に寄与することを明らかにした。さらに興味深いことに上記の線維化誘導カスケードによって引き起こされる気道周囲の線維化は、EGF受容体阻害薬で抑制されることを明らかにした。今回新たに明らかにした線維化誘導カスケードは、気道周囲の線維化のみならず好酸球で誘導される様々な慢性炎症性疾患の線維化に深く関与している可能性が高く、慢性炎症疾患の有効な治療ターゲットになることが期待される (Morimoto et al. *Immunity* 2018)。以上のことからヒトの慢性好酸球性炎症疾患における組織線維化の病態形成においても

“IL-33-Amphiregulin-EGFR-Osteopontin axis”が深く寄与している可能性が示唆された。その後、プレスリリースで社会への発信を行い、NHKなどで報道され注目を浴びた。

② IL-33/ST2による記憶Th2細胞のPathogenicity誘導に関する解析: 我々は、IL-33が記憶Th2細胞においてST2発現を増強し、Pathogenic 記憶Th2細胞を誘導すること、IL-33の下流シグナルとしてp38-MAPKが重要であることを同定した (Endo et al. *Immunity* 2015)

(2) ポリコーム及びトライソラックス分子群による記憶 Th 細胞の機能変換・維持機構に関する解析：

ES 細胞、B 細胞、ナイーブ T 細胞、エフェクターT 細胞を用いた ChIP-Seq 法によって T 細胞の機能発揮に重要な Bivalent な調整を受けている遺伝子群を同定した (Onodera et al, *Front Immunol.* 2018)。ポリコーム及びトライソラックス分子群による記憶 Th 細胞の機能変換・機能維持に関する解析: ES 細胞、B 細胞、ナイーブ T 細胞、エフェクターT 細胞を用いた ChIP-Seq 法による解析によって T 細胞の機能発現に重要な遺伝子群を同定した。

さらに、T 細胞における Ezh2 およびトライソラックス分子 Menin のゲノムワイドな働きについて解析をすすめ、T 細胞特異的な遺伝子発現制御機構を明らかにした (Onodera et al, *Mol Cell Biol.* 2015, Onodera et al, *Trends Mol. Med.* 2015)。

(3) 記憶 Th 細胞の形成と維持を担う環境因子 (場) の解明：

iBALT 中での記憶 Th 細胞の維持に IL-7 産生リンパ管内皮細胞が必須であること、このリンパ管内皮細胞の新規マーカーとして Thy1 がマウスおよびヒトで有用であることを明らかに

した。多重染色法と共焦点レーザー顕微鏡を用いて iBALT 形成における作動メカニズムの観点から記憶 Th 細胞微小環境の組織学的解析を行い、記憶型 Tpath2 細胞の炎症局所における維持に、iBALT 構造が必須であることを明らかにした (Shinoda et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016)。

また、ヒトの好酸球性副鼻腔炎患者のポリープ中にこの iBALT 様構造があることを明らかにした。この概念は、*Ann. Rev. Immunol.* と *Immunological Reviews* 誌に 2017 年に紹介した。

(4) CD69 リガンドの同定と CD69-Myl9/12 システムの炎症組織での役割に関する研究：

(この研究は申請時当初の計画にはなかったが、研究推進過程で新たな重要課題として浮上し取り組んだものである)

炎症局所への炎症細胞浸潤に重要な役割を果たす CD69 分子のリガンドが不明であったため、骨髄の血管内皮細胞の溶出タンパク質を用いて、リコンビナント CD69 によるプルダウン法とプロテオミクス解析で検索を行った。

その結果、CD69 リガンド分子であるミオシン軽鎖 9/12 (Myl9/12) の同定に成功した (Hayashizaki et al. *Science Immunology* 2016)。Myl9/12 は、肺などの炎症組織の血管の内側でネット様構造を形作り (Myl9 nets)、CD69 を発現した病原性免疫細胞を炎症組織内へ誘導するプラットフォームとして働くと考えられる (CD69-Myl9/12 システムと命名)。

この CD69-Myl9/12 システムは、病原性免疫細胞が炎症組織へ集まる際の新規メカニズムであり、慢性炎症疾患の有効な治療ターゲットになることが期待される。なお、本研究内容は、NHK 朝のニュースに取り上げられるとともに、全国紙の新聞報道にも取り上げられた。

これまでの研究成果をまとめて、「慢性の Th1/Th2 病と呼ばれる病態は、Th1/Th2 細胞のアンバランスで起こるのではなく、免疫記憶細胞が生体内でできる際に特別な環境下で出現する記憶型 Pathogenic Th1/2/17 細胞に因る」という新たなコンセプトを提唱した (Nakayama et al. *Ann. Rev. Immunol.* 2017)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 63 件) 全て査読有り

- ① Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, Wada T, Ichikawa T, Kanno T, Okano M, Kokubo K, Onodera A, Sakurai D, Okamoto Y, Nakayama T. Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper-2 cells instruct eosinophils to secrete osteopontin and facilitate airway fibrosis. *Immunity* 49(1):134-150 (2018). doi: /10.1016/j.immuni.2018.04.023
- ② Nakayama T. Introduction to "allergic inflammation". *Immunolo. Rev.* 278:5-7 (2017). doi: 10.1111/imr.12566
- ③ Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, Endo Y, Hosokawa H, Shinoda K, Tumes DJ, Okamoto Y. Th2 Cells in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 35:53-84 (2017). doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052350
- ④ Hayashizaki K, Kimura MY, Tokoyoda K, Hosokawa H, Shinoda K, Hirahara K, Ichikawa T, Onodera A, Hanazawa A, Iwamura C, Kakuta J, Muramoto, K, Motohashi S, Tumes DJ, Iinuma T, Yamamoto H, Ikehara Y, Okamoto Y, Nakayama T. Myosin light chains 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. *Sci. Immunol.* 1(3): eaaf9254 (2016). doi: 10.1126/sciimmunol.aaf9154
- ⑤ Shinoda K, Hirahara K, Iinuma T, Ichikawa T, Suzuki A, Sugaya K, Tumes DJ, Yamamoto H, Hara T, Tani-ichi S, Ikuta K, Okamoto Y, Nakayama T. Thy1+IL-7+ lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113:(20)E2842-2852 (2016). doi: 10.1073/pnas.1512600113
- ⑥ Endo Y, Hirahara K, Iinuma T, Shinoda K, Tumes DJ, Asou KH, Matsugae N, Obata-Ninomiya K, Yamamoto H, Motohashi S, Oboki K, Nakae S, Saito H, Okamoto Y, Nakayama T. The Interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity* 42(2):294-308 (2015). doi: /10.1016/j.immuni.2015.01.016

[学会発表] (計 75 件)

- ① Nakayama T. Pathogenic Th2 (Tpath2) cells in airway inflammation: Fibrosis inducing Tpath2 cells. 32nd Symposium of the Collegium Internationale Allergologium, 9/30-10/5/2018, Mallorca, Spain

- ② Nakayama T. Pathogenic Th2 (Tpath2) cells in airway inflammation: Fibrosis inducing Tpath2 cells. シンポジウム Immunochimistry and Immunobiology Gordon Research Conference, 6/10-15/2018, Mount Snow, USA
- ③ Nakayama T. Pathogenic memory type Th2 cells and innate cytokines in allergic inflammation. XXIV World Allergy Congress, 10/14-17/2015, Seoul, Korea

[図書] (計 3 件)

- ① Onodera A, Kokubo K, Nakayama T. The interplay between transcription factors and epigenetic modifications in Th2 cells. *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells -Transcription from General Aspects*. Edited by Uchiumi F. 191-211 (2018). doi: 10.5772/intechopen.73027
- ② Endo Y, Hirahara K, Shinoda K, Inuma T, Yamamoto H, Motohashi S, Okamoto Y, Nakayama T. Human and mouse memory-type pathogenic Th2 (Tpath2) cells in airway inflammation. *Chronic Inflammation Mechanisms and Regulation*. Edited by Miyasaka M, Takatsu K. 401-415 (2016). doi: 10.1007/978-4-431-56068-5_31
- ③ Onodera A, Tumes DJ, Nakayama T. Epigenetic control of immune T cell memory. *Transcriptional and Epigenetic Mechanisms Regulating Normal and Aberrant Blood Cell Development*. Edited by Bonifer C, Cockerill P. 367-382 (2014). doi: 10.1007/978-3-642-45198-0

[産業財産権]

○出願状況 (計 8 件)

名称: 抗 My19 抗体

発明者: 中山俊憲、木村元子、林崎浩史、平山敏文、角太淳吾

権利者: 国立大学法人千葉大学、エーザイ・R&D (株)

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/000605

出願年: 2016

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 7 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、常世田好司、林崎浩史、鈴木茜

権利者: 国立大学法人千葉大学

種類: 特許

番号: US 10100107 (米国分割特許)

取得年: 2018

国内外の別: 国外

[その他]

報道関係情報 (計 8 件)

- (1) 「ぜんそくの重症化に有効な治療法の鍵を発見」(プレスリリース、2018年6月25日)
 - ① TV報道: 千葉テレビ「NEWS チバ600」6月28日放映、NHK総合「おはよう日本」6月27日放映、
 - ② 記事掲載新聞: 読売新聞(7月10日)、朝日新聞(7月5日)
- (2) 「ぜんそくなどの重症アレルギー疾患のメカニズムを解明:抗体の開発で革新的治療法に期待」(プレスリリース、2016年9月12日)
 - ① TV報道: NHK World「Science View」11月16日放映、NHK総合「おはよう日本」9月17日放映
 - ② 記事掲載新聞: 日本経済新聞(9月23日)、朝日新聞(9月17日)、毎日新聞(9月17日)、読売新聞(9月17日)、他3社

ホームページ等

千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

- ①研究協力者氏名：平原 潔
ローマ字氏名：(HIRAHARA, kiyoshi)
- ②研究協力者氏名：木村 元子
ローマ字氏名：(KIMURA, motoko)
- ③研究協力者氏名：小野寺 淳
ローマ字氏名：(ONODERA, atsushi)
- ④研究協力者氏名：木内 政宏
ローマ字氏名：(KIUCHI, masahiro)
- ⑤研究協力者氏名：細川 裕之
ローマ字氏名：(HOSOKAWA, hiroyuki)
- ⑥研究協力者氏名：篠田 健太
ローマ字氏名：(SHINODA, kenta)
- ⑦研究協力者氏名：遠藤 裕介
ローマ字氏名：(ENDO, yusuke)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。