

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461190

研究課題名(和文) 劇症型急性肺炎の発症メカニズムの解明と治療ターゲット分子の探索

研究課題名(英文) Molecular mechanisms in the pathogenesis of acute lung injury

研究代表者

長谷川 明洋 (HASEGAWA, Akihiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80376376

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)：急性呼吸促拍症候群は、激しい好中球浸潤と肺胞の広範な傷害を呈する病理像が特徴で、有効な治療法が確立されていない。本研究では新規に構築した劇症型急性肺炎モデルマウスと独自に開発したバイオイメージング技術を駆使して、急性炎症誘導機構と劇症化メカニズムの解析を行った。また治療ターゲット分子の探索と新規治療法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：We developed a color-coded real-time imaging model of cell migration into the lung in a mouse model of acute lung injury, and identify the cellular process required for the initiation of the acute lung injury phenotype. Accumulation of inflammatory cells in the lung was quantitatively imaged. Effect of in vivo treatment with monoclonal antibody was examined in order to explore the potential therapeutic target for acute lung injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺炎 好中球 炎症

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促拍症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) は、体内への何らかの侵襲が引き金となって発症し、激しい好中球浸潤と肺胞の広範な傷害 (diffuse alveolar damage; DAD) を呈する病理像が特徴である。侵襲から発症までの期間は通常数日以内で、発症後の死亡率は 40% を越えている。ARDS の発症にともない肺の毛細血管の内皮細胞や肺胞上皮細胞が傷害され、肺の浮腫や繊維化が誘導されて呼吸困難により死に至る。現在その治療は機械的人工換気のほかステロイド剤や好中球エステラーゼ阻害薬などの薬物療法が試みられているが、有効な治療法となり得ていない。またこれまでの研究から ARDS の発症には浸潤した活性化好中球が産生する脂質メディエーターや IFN などのサイトカインが関与していることなどが報告されているが、その詳細な発症メカニズムは明らかになっていない。一方、最近鳥インフルエンザ (H7N9, H5N1 など) のヒトへの感染と世界的な流行の兆候がみられ 30~60% に達する高い感染致死率を示しているが、主な死因はウイルスの増殖による直接的な影響よりも宿主側の過剰な免疫応答の結果として起こる劇症型の ARDS (Fulminant ARDS; FARDS) であることがわかってきた。そのため、将来的なパンデミックに備えた治療法の確立が急務の課題となっている。

また研究代表者らは肺内の免疫細胞の挙動をリアルタイムでモニタリングするための *in vivo* ライブイメージングシステムを独自に開発し、国際特許を取得するとともに、このシステムを使って喘息誘導におけるリンパ球挙動解析やがん免疫 (がん細胞の体内転移浸潤動態や抗腫瘍リンパ球の動態) の解析を行ってきた (Hasegawa et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010、Hayashi et al., *Anticancer Res.* 2011)。

2. 研究の目的

本研究では新規に構築した FARDS モデルマウスと独自に開発したバイオイメージング技術を駆使して ARDS の発症・劇症化メカニズムの解析を行う。また治療ターゲット分子の探索と新規治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 肺炎症部位での活性化マーカー分子等の発現細胞の解析

マウスでの劇症型急性肺炎モデルとして、 α -Galactosylceramide による感作後に LPS を経鼻投与する系を用いた。野生型マウスで劇症型急性肺炎を誘導後、肺の組織切片を作製し免疫染色を行うことによって、肺の炎症部位に浸潤している細胞群のうち、実際に活性化している細胞を調べた。

(2) サイトカイン、ケモカインの発現レベルの検討

肺組織全体または肺胞洗浄液中に含まれ

る浸潤細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法により炎症性サイトカインやケモカインの発現レベルを調べた。肺炎誘導前後での発現レベルを比較検討した。

(3) 抗体投与実験による新規治療ターゲット分子の検索

劇症型急性肺炎に対する新規治療ターゲット分子を見つけることを目的に抗体投与実験を行った。様々なサイトカインやケモカイン、細胞接着分子に対する抗体を投与し、劇症型急性肺炎を誘導した際の生存率等を比較検討した。

(4) バイオイメージング技術を駆使した肺への細胞浸潤様式の解析

生体内免疫細胞バイオイメージング技術を駆使して、急性肺炎の誘導にともなう炎症細胞の浸潤様式に関する時空間的解析を行った。GFP や RFP などの蛍光を発するトランスジェニックマウスから CD4T 細胞、CD8T 細胞、B 細胞、マクロファージ、好中球、NKT 細胞などを個別に単離して同系統の野生型に移入し、急性肺炎を誘導してタイムコースを追った実験を行い浸潤の動態を解析した。

4. 研究成果

(1) 肺炎症部位での活性化マーカー分子等の発現細胞の解析

マウスでの劇症型急性肺炎モデルとして、 α -Galactosylceramide による感作後に LPS を経鼻投与する系を用いた。野生型マウスでは激しい肺の炎症性変化とともに、2~3 日で死に至った。野生型マウスで劇症型急性肺炎を誘導後、肺の炎症部位に浸潤している細胞上の活性化マーカー分子の発現レベルを調べたところ、好中球の他マクロファージや T 細胞などあらゆる浸潤細胞においてその発現レベルが大きく上昇していた。

(2) サイトカイン、ケモカインの発現レベルの検討

肺炎誘導前と誘導後の肺組織全体および肺胞洗浄液中の浸潤細胞から mRNA を抽出し、炎症性サイトカインやケモカインの発現レベルを検討し、急性肺炎の誘導や劇症化に関与するサイトカインやケモカインの同定を行った。

(3) 抗体投与実験による新規治療ターゲット分子の検索

劇症型急性肺炎に対する新規治療ターゲット分子を見つけることを目的に抗体投与実験を行った。劇症型急性肺炎の発症にともなう肺組織内でのサイトカインやケモカインの発現解析結果も参考にしながら様々なサイトカインやケモカイン、細胞接着分子に対する抗体を投与し、劇症型急性肺炎を誘導した際の治療効果を比較検討した。その結果、いくつかの治療ターゲット候補分子が見つかった。

(4) バイオイメージング技術を駆使した肺への細胞浸潤様式の解析

生体内免疫細胞バイオイメージング技術を駆使して、急性肺炎の誘導にともなう炎症細胞の浸潤様式に関する時空間的解析を行ったところ、特に好中球の肺への集積はLPS投与48時間後までに最高レベルに達することが明らかとなった。

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20件)

Kimura, M. Y., Hayashizaki, K., Tokoyoda, K., Takamura, S., Motohashi, S., and Nakayama, T.: Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-Myl9 system in the pathogenesis of airway inflammation. *Immunol. Rev.* in press. (2017). (査読有)

Tumes, D. J., Papadopoulos, M., Endo, Y., Onodera, A., Hirahara, K., and Nakayama, T.: Epigenetic regulation of T helper cell differentiation, memory and plasticity in allergic asthma. *Immunol. Rev.* in press. (2017). (査読有)

Nakayama, T., Hirahara, K., Onodera, A., Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K., Tumes, D. J., and Okamoto, Y.: Th2 Cells in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 35:53-84 (2017). (査読有)

Takamura, S., Yagi, H., Hakata, Y., Motozono, C., McMaster, S. R., Masumoto, T., Fujisawa, M., Chikaishi, T., Komeda, J., Itoh, J., Umemura, M., Kyusai, A., Tomura, M., Nakayama, T., Woodland, D. L., Kohlmeler, J. E., and Miyazawa, M.: Specific niches for lung-resident memory CD8⁺ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. *J. Exp. Med.* 213:3057-3073 (2016). (査読有)

Angela, M.,* Endo, Y.,* Asou, H. K., Yamamoto, T., Tumes, D. J., Tokuyama, H., Yokote, K., and Nakayama, T.: Fatty acid metabolic reprogramming via mTOR-mediated induction of PPAR γ directs early activation of T cells. (*these authors contributed equally to this work) *Nat. Commun.* 7:13683 (2016). (査読有)

Kimura, M. Y., Thomas, J., Tai, X., Guinter, T. I., Shinzawa, M., Etzenperger, R., Li, Z., Love, P., Nakayama, T. and Singer, A.: Timing and duration of MHC I positive selection signals are adjusted in the thymus to prevent lineage errors. *Nat. Immunol.* 17:1415-1423 (2016). (査読有)

Kuwahara, M., Ise, W., Ochi, M., Suzuki, J., Kometani, K., Maruyama, S., Izumoto, M., Matsumoto, A., Takemori, N., Takemori, A., Shinoda, K., Nakayama, T.,

Ohara, O., Yasukawa, M., Sawasaki, T., Kurosaki, T., and Yamashita, M.: Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. *Nat. Commun.* 7:12596 (2016). (査読有)

Shinoda, K., Hirahara, K., Inuma, T., Ichikawa, T., Suzuki, A. S., Sugaya, K., Tumes, D. J., Yamamoto, H., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Okamoto, Y., and Nakayama, T.: Thyl⁺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:E2842-51 (2016). (査読有)

Hosokawa, H., Tanaka, T., Endo, Y., Kato, M., Shinoda, K., Suzuki, A., Motohashi, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., and Nakayama, T.: Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN γ in memory-type Th2 cells. *Nat. Commun.* 7:11289 (2016). (査読有)

Endo, Y., Asou, H. K., Matsugae, N., Hirahara, K., Shinoda, K., Tumes, D. J., Tokuyama, H., Yokote, K., and Nakayama, T.: Obesity drives Th17 cell differentiation by inducing the lipid metabolic kinase, ACC1. *Cell Rep.* 12:1042-1055 (2015). (査読有)

Hosokawa, H., Kato, M., Tohyama, H., Tamaki, Y., Endo, Y., Kimura, Y. M., Tumes, D. J., Motohashi, S., Matsumoto, M., Nakayama, I. K., Tanaka, T., and Nakayama, T.: Methylation of Gata3 at Arg-261 regulates transactivation of the *Ii5* gene in T helper 2 cells. *J. Biol. Chem.* 290:13095-13103 (2015). (査読有)

Hirahara, K., Onodera, A., Villario, A. V., Bonelli, M., Sciume, G., Laurence, A., Sun, H. W., Brooks, S. R., Vahedi, G., Shih, H. Y., Gtierrez-Cruz, G., Iwata, S., Suzuki, R., Mikami, Y., Okamoto, Y., Nakayama, T., Holland, S. M., Hunter, C. A., Kanno, Y., and O'Shea, J. J.: Asymmetric action of STAT transcription factors drives transcriptional outputs and cytokine specificity. *Immunity* 42:877-889 (2015). (査読有)

Onodera, A., and Nakayama, T.: Epigenetics of T cells regulated by Polycomb/Trithorax molecules. *Trends Mol. Med.* 21:330-340 (2015). (査読有)

Endo, Y., Hirahara, K., Inuma, T., Shinoda, K., Tumes, D. J., Asou, H. K., Matsugae, N., Obata-Ninomiya, K., Yamamoto, H., Motohashi, S., Oboki, K., Nakae, S., Saito, H., Okamoto, Y., and Nakayama, T.: The Interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in

the airway. *Immunity* 42:294-308 (2015). (査読有)

Tanaka, S., Suto, A., Iwamoto, T., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Suzuki, K., Takatori, H., Tamachi, T., Hirose, K., Onodera, A., Suzuki, J., Ohara, O., Yamashita, M., Nakayama, T. and Nakajima, H.: Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. *J. Exp. Med.* 211:1857-1874 (2014). (査読有)

Watanabe, Y., Onodera, A., Kanai, U., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kiuchi, M., Iwamura, C., Tumes, D. J., Shinoda, K., Yagi, R., Motohashi, S., Hirahara, K., and Nakayama, T.: Trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:12829-12834 (2014). (査読有)

Kuwahara, M., Suzuki, J., Tofukuji, S., Yamada, T., Kanoh, M., Matsumoto, A., Maruyama, S., Kometani, K., Kurosaki, T., Ohara, O., Nakayama, T. and Yamashita, M.: The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat. Commun.* 5:3555 (2014). (査読有)

Beaulieu, A. M., Zawislak, C. L., Nakayama, T. and Sun, J. C.: The transcription factor Zbtb32 controls the proliferative burst of virus-specific natural killer cells responding to infection. *Nat. Immunol.* 15:546-553 (2014). (査読有)

Yagi, R., Zhong, C., Northrup, D. L., Yu, F., Bouladoux, N., Spencer, S., Hu, G., Barron, L., Sharma, S., Nakayama, T., Belkaid, Y., Zhao, K., and Zhu, J.: The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7R α -expressing innate lymphoid cells. *Immunity* 40:378-388 (2014). (査読有)

Endo, Y., Hirahara, K., Yagi, R., Tumes, D. J., and Nakayama, T.: Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol.* 35:69-78 (2014). (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

長谷川明洋、荻野英賢、中山俊憲、白井睦訓 腸炎の発症における CD69 の役割 第 90 回日本細菌学会総会 2017 年 3 月 19-21 日、仙台国際センター(宮城)

Sawai, R., Osawa, H., Kamio, N., Fujikura, K., Hasegawa, A., Nakayama, T. and Hashimoto, K. The IgA production regulated by regulatory T cell and T follicular regulatory cells in acute colitis

mice. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年 12 月 5-7 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

Osawa, H., Sawai, R., Kamio, N., Takabayashi, D., Kotera, R., Hasegawa, A., Nakayama, T. and Hashimoto, K. The retinoic acid producing dendritic cells and IgA classswich in acute colitis mice. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年 12 月 5-7 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

Nakayama, T., Hirahara, K., Onodera, A., Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K., Tumes, D. J., Hayashizaki, K. and Kimura, Y. M. Pathogenic Th population disease induction model: Memory type pathogenic Th2 (Tpath2) cells in airway inflammation. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年 12 月 5-7 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

Nakayama, T. Generation and maintenance of pathogenic Th2 (Tpath2) cells in allergic airway inflammation. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年 12 月 5-7 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

荻野英賢、長谷川明洋、浅岡洋一、松谷峰之介、白井睦訓 環境中に存在する細菌の高温適応機構の解明 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会 2016 年 10 月 15-16 日、かがわ国際会議場(香川)

長谷川明洋、荻野英賢、中山俊憲 肺炎の誘導にともなう免疫炎症細胞集積のイメージング 第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会 2016 年 9 月 4 日-6 日、名古屋市立大学薬学部(愛知)

荻野英賢、長谷川明洋、松谷峰之介、松下一信、水上洋一、白井睦訓 Identification of gene that contribute to the temperature-resistance in acetic acid bacterium. 第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23-25 日、大阪国際交流センター(大阪)

長谷川明洋、荻野英賢、中山俊憲 劇症型急性肺炎(FARDS)モデルマウスにおける免疫炎症細胞浸潤のイメージング解析 第 24 回日本バイオイメージング学会学術集会 2015 年 9 月 26 日-28 日、東京理科大学葛飾キャンパス(東京)

長谷川明洋、荻野英賢、大津山賢一郎、中山俊憲、白井睦訓 CD69 ノックアウトマウスでみられた腸炎の抑制 第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 26-28 日、長良川国際会議場(岐阜)

長谷川明洋、荻野英賢、大津山賢一郎、中山俊憲、白井睦訓 CD69 ノックアウトマウスでみられた腸炎の抑制 第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 26-28

日、長良川国際会議場（岐阜）
Nakayama, T., Endo, Y., Tumes, D. J. and Hirahara, K. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日、国立京都国際会館（京都）
長谷川明洋、荻野英賢、大津山賢一郎、中山俊憲 アレルギー性炎症の誘導にともなうリンパ球浸潤に關与する分子の解析と細胞集積のイメージング 第23回日本バイオイメージング学会学術集会 2014年9月4日-6日、大阪大学銀杏会館（大阪）

〔産業財産権〕

出願状況（計5件）

1. 名称:肺炎球菌における発現プロモーター
発明者:荻野英賢、**長谷川明洋**
権利者:国立大学法人山口大学
種類:特許
番号:特願 2014-219147号
出願年月日:平成 26年 10月 28日
国内外の別:国内
2. 名称:肺炎球菌における発現プロモーター（特願 2014-219147号とは別領域のプロモーター）
発明者:荻野英賢、**長谷川明洋**
権利者:国立大学法人山口大学
種類:特許
番号:特願 2014-219149号
出願年月日:平成 26年 10月 28日
国内外の別:国内
3. 名称:A (H1N1) pdm09 インフルエンザウイルス感染による気管支喘息の予防又は改善剤
発明者:長谷川俊史、大賀正一、松重武志、岡田清吾、**長谷川明洋**
権利者:国立大学法人山口大学
種類:特許
番号:特願 2015-057538号
出願年月日:平成 27年 3月 20日
国内外の別:国内
4. 名称:CD69 アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎治療用組成物
発明者:**長谷川明洋**、荻野英賢、中山俊憲
権利者:国立大学法人山口大学、国立大学法人千葉大学
種類:特許
番号:特願 2016-207046号
出願年月日:平成 28年 10月 21日
国内外の別:国内

5. 名称:CD11b アンタゴニストを含む劇症型急性肺炎治療用組成物
発明者:**長谷川明洋**、荻野英賢
権利者:国立大学法人山口大学
種類:特許
番号:特願 2016-207067号
出願年月日:平成 28年 10月 21日
国内外の別:国内

取得状況（計1件）

1. 名称:CD69 アンタゴニストを含む肝炎治療用組成物
発明者:中山俊憲、**長谷川明洋**、白井睦訓
権利者:国立大学法人千葉大学、国立大学法人山口大学
種類:特許
番号:特許第 5938876号
取得年月日:平成 28年 5月 27日
国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ:

<http://mb.med.yamaguchi-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 明洋 (HASEGAWA, Akihiro)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 8 0 3 7 6 3 7 6

(2)研究分担者

(3)連携研究者

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: 5 0 2 3 7 4 6 8