

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461486

研究課題名(和文) アレルギー性気道炎症における FOXP3 陽性制御性自然免疫細胞の役割の解明

研究課題名(英文) The role of Foxp3+ CD3- innate cells 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新規制御性自然免疫細胞(Ireg)の同定し、アレルギー性炎症疾患の新規治療法の開発に向けた基盤を構築することを目的とした。その結果、a) hCD2-Foxp3レポーターマウスの脾臓内にはCD45.2+ B220+ IAIE+ CCR6int hCD2+ CD3- 細胞が存在していた。b) hCD2-Foxp3レポーターマウスにpapain誘導性気道炎症を惹起したところ健常マウスと比して肺内のIAIE+ Foxp3+ CD3- 細胞(Ireg)の割合が増加していた。これらの結果からマウスの肺ではFoxp3+ CD3- 細胞が存在し、自然型気道炎症を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of Foxp3+ CD3- innate cells and the new mechanism to regulate allergic inflammation.

a) B220, MHC classII, and CCR6 were expressed on Foxp3+ CD3- cells from spleen of hCD2-Foxp3 reporter mice. b) IAIE+ Foxp3+ CD3- cells in the lungs of hCD2-Foxp3 reporter mice were increased after intranasally papain administration. Those results suggest that Foxp3+ CD3- cells were induced in the lungs to regulate allergic airway inflammation without anti-inflammatory cytokine secretion.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー性気道炎症 自然リンパ球

1. 研究開始当初の背景

近年、リンパ球様の形態を呈し、特有のサイトカインを産生する自然免疫細胞が複数同定され、innate lymphoid cell (ILC)と総称されている (Spits et al., Nat Rev Immunol, 2013)。特に、IL-5/IL-13 などのTh2 サイトカインを産生する細胞群はILC2 と定義され、マウスの肺や腸管に存在し、IL-25/IL-33 に応答し好酸球性炎症の誘導に関与することが示された (Halim et al., Immunity, 2012, Walterlink et al., Curr Asthma Rep, 2013)。一方、IL-17A/IL-22 などの炎症性サイトカインを産生するROR γ 陽性の自然免疫細胞はILC3と定義され、二次リンパ組織の形成誘導、及び消化管粘膜における生体防御に重要な役割を果たしていることが示された (Takatori

et al, J Exp Med, 2009, Mebius et al, Immunity, 2007, Sonnenberg et al., Immunity, 2011)。さらに最近、Hepworthらは、ILC3が腸管粘膜においてCD4 $^{+}$ 陽性T細胞の反応をMHCII依存的に制御していることを報告したが (Nature, 2013)、免疫寛容の誘導やアレルギー性炎症などの炎症性疾患の制御にILC が関与しているか否かは未だ明らかではない。

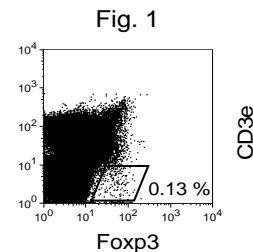
制御性T細胞 (regulatory T cell; Treg) は、免疫抑制能を有するCD4 $^{+}$ 陽性T細胞のサブセットであり、マスター転写因子であるFoxp3の発現がTregの発生及び抑制能の獲得に重要である。Foxp3の発現を先天的に欠損するヒト (IPEX 症候群) 及びマウス (Scurfyマウス) では、Treg欠損の結果、免疫寛容の破綻を来し、全身性の炎症性疾患が発症することが明らかになっている (Brunkow et al., Nat Genet, 2001, Wildin et al., Nat Genet, 2001, Hori et al., Science, 2003)。一方、近年、マウスにおいてTregとは異なる制御性免疫細胞の存在が示されている。すなわち、CD1d hi CD5 $^{+}$ CD19 $^{+}$ B細胞 (Breg) が実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑制すること (Yoshizaki et al., Nature, 2012)、肺CD11b $^{+}$ 樹状細胞 (DCreg) が抑制性サイトカインIL-10を大量に産生し、Treg分化を誘導して好酸球性気道炎症の増悪を抑制すること (Li et al., Eur J Immunol, 2008)、CD27 $^{+}$ c-kit $^{+}$ CD11b lo NKp46 $^{+}$ NK細胞 (NKreg) が樹状細胞の成熟を阻害し、メラノーマの増殖・播種を誘導すること (Desbois et al., Front Immunol, 2012) などが報告されている。

他方、Tregに特異的に発現していると考えられていたFoxp3が、他の細胞種にも発現していることが報告されている。すなわち、Changらは、胸腺上皮細胞にFoxp3が発現し胸腺細胞の成熟に関与していることを示し (J Exp Med, 2005)、Zuoらは、乳がん細胞やメラノーマ

細胞などの腫瘍細胞にFoxp3が発現し、Skp2やHER-2/ErbB2など癌遺伝子の発現を抑制していることを報告した (J Clin Invest, 2007, Cell, 2007)。

一方、本研究者は、マウスの脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板、肺内にFoxp3陽性lineage陰性の免疫細胞が存在することを発見した (Fig. 1)。

しかし、この細胞が免疫寛容の誘導や炎症性疾患の制御にどのような役割を果たしているかは依然不明である。



2. 研究の目的

従って、本研究ではFoxp3陽性制御性自然免疫細胞 (仮称 regulatory innate cell; Ireg) を同定し、Iregの発生・分化機構、免疫寛容の誘導や炎症性疾患の制御における役割を明らかにすることにより、Iregを応用したアレルギー性炎症疾患の新たな治療法を開発するための基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、マウスの脾臓、肺、腸間膜リンパ節、パイエル板にFoxp3陽性CD3陰性細胞が存在するという本研究者の未発表データを基に、マウス各組織における新規制御性自然免疫細胞 (Ireg) を同定し、免疫寛容の誘導、及びアレルギー性気道炎症モデルにおけるIregの役割を解明する。また、シグナルシークエンスストラップ法とRNAシークエンスを組み合わせ、Iregの特異的細胞表面分子を同定し、その機能を解析する。さらに、喘息患者の末梢血と肺組織におけるIregについても解析し、マウスを用いた研究とヒト臨床研究の相乗効果を目指す。

4. 研究成果

(1) Foxp3 $^{+}$ CD3 $^{-}$ 自然免疫細胞 (Ireg細胞) の同定と機能

hCD2-Foxp3レポーターマウスより脾臓、腸管リンパ節、パイエル板を摘出し、hCD2 $^{+}$ CD3 $^{-}$ 細胞の割合をFACSで解析したところ、脾臓内のhCD2 $^{+}$ CD3 $^{-}$ 細胞の割合が一番大きかった (Fig. 2)。

さらに脾臓内のhCD2 $^{+}$ CD3 $^{-}$ 細胞の表面抗原の発現をFACSで解析したところ、CD45.2 $^{+}$ B220 $^{-}$ MHCII (IAIE) $^{+}$ CCR6 int CD44 $^{+/-}$ CD19 $^{+/-}$ cKit $^{-}$ CD4 $^{-}$ CD8 α^{-} CXCR5 $^{-}$ IL-7R α^{-} ICOS $^{-}$ $\gamma\delta$ TCR $^{-}$ CD25 $^{-}$ Fc ϵ R1 $^{-}$ であった。

野生型 (WT) マウスの脾臓を24時間、IL-21とPMA+Ionomycinで刺激した後、Foxp3 $^{+}$ CD3 $^{-}$ 細胞における抑制性サイトカインの産生を

FACSで解析した。しかしながらFoxp3⁺ CD3⁻ 細胞の分画においてIL-10の産生や、IL-35のコンポーネントであるEBI3, p35などの産生は確認されなかった。

(2) アレルギー性炎症におけるFoxp3⁺ CD3⁻ 自然免疫細胞の役割の解析

hCD2-Foxp3レポーターマウスにプロテアーゼアレルゲンであるpapainを点鼻投与し、自然型アレルギー性気道炎症を惹起した後、IAIE⁺ CD3⁻ 細胞分画におけるFoxp3発現細胞の割合をFACSで解析したところ、脾臓内はコントロールの健常マウスと差がなかったが、肺内ではわずかにpapain投与により、IAIE⁺ Foxp3⁺ CD3⁻ 細胞が増加していた (Fig.3)。

一方、WTマウスにダニ抗原 (house dust mite (HDM))-誘導性気道炎症を惹起し、肺内のFoxp3⁺ CD3⁻ 細胞の割合をFACSで解析したが、コントロールの健常マウスと比して、有意な差を認めなかった。

さらに、2週間にわたってWTマウスにHDMを反復頻回気管内吸入投与を行い、慢性気道炎症を惹起し、肺、及び縦隔リンパ組織におけるFoxp3⁺ CD3⁻ 細胞割合をFACSで解析したが、コントロールの健常マウスと比して、有意な差を認めなかった。

(3) 自然型アレルギー性炎症におけるT-betの役割の解明

ILC3細胞を先天的に欠損することが報告されているT-bet欠損マウスにpapainを点鼻投与し、自然型アレルギー性気道炎症を惹起した後、肺内の好酸球の割合を解析したところ、T-bet欠損マウスではWTマウスと比して有意な好酸球増加を認めた (Fig. 4)が、Foxp3⁺ CD3⁻ 細胞の出現は同程度であった (文献1)。

(4) ヒト末梢血におけるFoxp3⁺ CD3⁻ 自然免疫細胞の同定

健常人と喘息患者の末梢血から末梢血単核球 (PBMC) を分離し、Foxp3⁺ CD3⁻ 細胞の割合をFACSで解析したがほとんどこれらの細胞群の存在は認められなかった。

これらの研究成果により、マウスの肺では獲得免疫系が関与する気道炎症ではなく、自然型アレルギー性気道炎症を制御するためにFoxp3⁺ CD3⁻ 自然免疫細胞が増加している可能性があること、また、Foxp3⁺ CD3⁻ 自然免疫細胞による炎症の抑制は、Tregによる抑制とは異なる機構を介していること、さらにT-betはFoxp3⁺ CD3⁻ 自然免疫細胞の機能には影響せず自然型アレルギー性気道炎症を抑制する可能性があることが示唆された。

<引用文献>

(1) [Takatori H](#), Matsuki A et al, *J Allergy Clin Immunol*, 2017; 139(4):1355-1367.e6.

Fig. 2

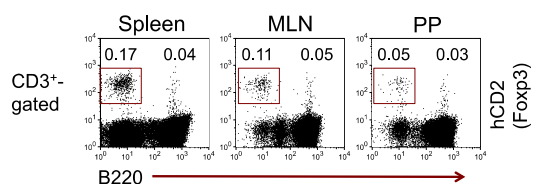


Fig. 3

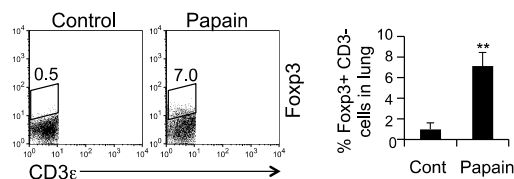
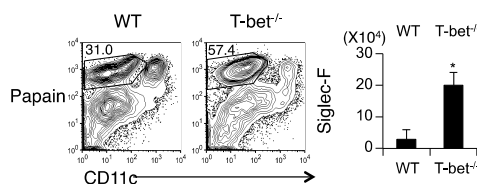


Fig. 4



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 11件、すべて査読あり)

1. [Takatori H](#)*, Matsuki A*, Makita S, Yokota M, [Tamachi T](#), Suto A, Suzuki K, [Hirose K](#), Nakajima H. T-bet inhibits innate lymphoid cell-mediated eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-9 production. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):1355-1367.e6.
2. Yokoyama Y, Furuta S, Ikeda K, [Hirose K](#), Nakajima H. Corticosteroid-sparing effect of tacrolimus in the initial treatment of dermatomyositis and polymyositis. *Mod Rheumatol*. 2015;25(6):888-92.
3. Meguro K, Suzuki K, Hosokawa J, Sanayama Y, Tanaka S, Furuta S, Ikeda K, [Takatori H](#), Suto A, Sakamoto A, Ohara O, Nakajima H. Role of Bcl-3 in the development of follicular helper T cells and in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:2651-60.
4. [Takatori H](#), Kawashima H, Matsuki A, Meguro K, Tanaka S, Iwamoto T, Sanayama Y, Nishikawa N, [Tamachi T](#), Ikeda K, Suto A,

Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Kubo M, Hori S, Nakajima H. Helios enhances Treg cell function in cooperation with FoxP3. **Arthritis Rheumatol.** 2015; 67:1491-502.

5. Nakagomi D, Suzuki K, Meguro K, Hosokawa J, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Matsue H, Ohara O, Nakayama T, Shimada S, Nakajima H. Matrix metalloproteinase 12 is produced by M2 macrophages and plays important roles in the development of contact hypersensitivity. **J Allergy Clin Immunol.** 2015;135:1397-400.

6. Takatori H, Kawashima H, Suzuki K, Nakajima H. Role of p53 in systemic autoimmune diseases. **Crit Rev Immunol.** 2014;34:509-16.

7. 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, Nakajima H. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. **J Exp Med.** 2014;211:1857-74.

8. Iwamoto T, Suto A, Tanaka S, Takatori H, Suzuki K, Iwamoto I, Nakajima H. Interleukin-21-producing c-Maf-expressing CD4⁺ T cells induce effector CD8⁺ T cells and enhance autoimmune inflammation in scurfy mice. **Arthritis Rheumatol.** 2014;66:2079-90.

9. Norimoto A, Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Yokota M, Takahashi K, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2014;51(2):201-9.

10. Iwata A, Kawashima S, Kobayashi M, Okubo A, Kawashima H, Suto A, Hirose K, Nakayama T, Nakajima H. Th2-type inflammation instructs inflammatory dendritic cells to induce airway hyperreactivity. **Int Immunol.** 2014;26(2):103-14.

11. Iwamoto T, Ikeda K, Hosokawa J, Yamagata M, Tanaka S, Norimoto A, Sanayama Y, Nakagomi D, Takahashi K, Hirose K, Sugiyama T, Sueishi M, Nakajima H. Prediction of relapse after discontinuation of biologic agents by ultrasonographic assessment in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission: high predictive values of total gray-scale and power Doppler scores that represent residual synovial inflammation before discontinuation. **Arthritis Care Res (Hoboken).** 2014;66(10):1576-81.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 松木彩子,高取宏昌,牧田荘平,玉地智宏,廣瀬晃一,中島裕史 (2016年6月17-19日), T-betはILC2によるIL-9産生を抑制し, IL-33誘導性気道炎症を制御する, 第65回日本アレルギー学会総会・学術集会 (東京国際フォーラム, 東京都千代田区)
2. 高取宏昌,川島広捻,中島裕史 (2016年9月8-9日) 制御性T細胞におけるIkarosファミリー分子Heliosの発現機構とその役割, 第44回日本臨床免疫学会総会 (京王プラザホテル, 東京都新宿区)
3. Matsuki A, Takatori H, Makita S, Yokota M, Tamachi T, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Nakajima (2016年8月21-26日), T-bet regulates IL-33-induced airway inflammation by suppressing IL-9 production from innate lymphoid cells, The International Congress of Immunology (Melbourne, Australia)
4. 高取宏昌, 川島広捻, 中島裕史 (2015年7月17-18日), HeliosはFoxp3と協調して制御性T細胞の機能を増強する, 第80回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 (東京工業大学大岡山キャンパス蔵前会館蔵前ホール, 東京都目黒区)
5. 策愛子,末廣健一,牧田荘平,山形美絵子,岩本太郎,古田俊介,池田啓,廣瀬晃一,中島裕史 (2015年5月26-28日), 加療中の好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における喘息発作と血管炎再発の関連性, 第64回日本アレルギー学会学術集会 (グランドプリンスホテル新高輪, 東京都港区)
6. 横山裕亮,古田俊介,池田啓,廣瀬晃一,中島裕史 (2015年4月23-25日) 新規発症の皮膚筋炎・多発筋炎におけるタクロリムスの効果 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 (名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市)
7. 策愛子,末廣健一,牧田荘平,山形美絵子,古田俊介,池田啓,廣瀬晃一,中島裕史 (2015年4月23-25日) 好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における免疫抑制剤の再発予防効果 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 (名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市)
8. Ito T, Norimoto A, Hirose K, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H (2015年11月18-20日), Dectin-1 expressed on CD11b⁺ dendritic cells promotes house dust mite-induced allergic airway

inflammation in mice, 第44回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市)

9. Meguro K, Suzuki K, Hosokawa J, Sanayama Y, Tanaka S, Furuta S, Ikeda K, Takatori H, Suto A, Ohara O, Nakajima H (2015年6月10-13日), Roles of B Cell Leukemia/Lymphoma 3 in the Development of T Follicular Helper Cells and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, Annual Congress of the European League against Rheumatism (Roma, Italy)

10. 高取宏昌, 川島広捻, 眞山快枝, 池田啓, 中島裕史 (2014年4月24-26日), ヒトCD4+T細胞のサイトカイン発現制御におけるHeliosの役割, 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会 (グランドプリンスホテル新高輪, 東京都港区)

11. 影山貴弘, 古田俊介, 横山裕亮, 伊藤崇, 玉地智宏, 池田啓, 廣瀬晃一, 中島裕史 (2014年5月9-11日), 好酸球性心内膜性心筋炎を合併した好酸球性多発血管炎性肉芽腫症の一例, 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 (国立京都国際会館, 京都府京都市)

12. 岩本太郎, 須藤明, 田中繁, 高取宏昌, 鈴木浩太郎, 中島裕史 (2014年5月9-11日), IL-21産生c-Maf陽性CD4陽性T細胞はCD8陽性T細胞の増殖を誘導しScurfyマウスの自己免疫性炎症を増悪させる, 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 (国立京都国際会館, 京都府京都市)

13. 岩本太郎, 池田啓, 細川淳一, 山形美絵子, 田中繁, 乗本綾子, 眞山快枝, 中込大樹, 高橋健太郎, 廣瀬晃一, 杉山隆夫, 末石眞, 中島裕史 (2014年4月24-26日), 臨床的寛解を達成した関節リウマチ患者での生物学的製剤中止後の再発予測における間接超音波検査の有用性, 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会 (グランドプリンスホテル新高輪, 東京都港区)

14. MEGURO K, SUZUKI K, HOSOKAWA J, YOKOTA M, TAKATORI H, NAKAJIMA H (2014年12月10-12日), Role of tumor suppressor p53 in Tc17 differentiation, 第43回日本免疫学会総会・学術集会 (国立京都国際会館, 京都府京都市)

15. 玉地智宏, 古田俊介, 大久保綾子, 岩本太郎, 眞山快枝, 高取宏昌, 池田啓, 廣瀬晃

二, 渡邊紀彦, 中島裕史 (2014年4月11-13日), 膠原病症例の骨粗鬆症を対象としたマンスリービスフォスフォネート(BP)製剤への切り替え効果 第111回日本内科学会総会 (東京国際フォーラム, 東京都千代田区)

16. Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H (2014年12月10-12日), Sox5 and c-Maf Cooperatively Induce Th17 Cell Differentiation via ROR γ t Induction as Downstream Targets of Stat3, 第43回日本免疫学会総会・学術集会 (国立京都国際会館, 京都府京都市)

17. Iwamoto T, Suto A, Tanaka S, Takatori H, Suzuki K, Nakajima H (2014年12月10-12日), IL-21-producing c-Maf-expressing CD4+Tcells induce CD8+T cells and exacerbate autoimmune inflammation in scurfy mice, 第43回日本免疫学会総会・学術集会 (国立京都国際会館, 京都府京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ: <http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/index.html>

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: 30568225

(2) 研究分担者

玉地 智宏 (TAMACHI, Tomohiro)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 20456015

廣瀬 晃一 (HIROSE, Koichi)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 90400887