

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860122

研究課題名(和文)核内受容体PXRの免疫応答における役割の解明

研究課題名(英文)The roles of PXR in immune responses

研究代表者

佐伯 真弓(SAEKI, Mayumi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：00462771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体のひとつであるPXRがT細胞の分化、維持においてどのような役割を果たしているかを検討した。マウスのCD4陽性T細胞においては、いずれのサブセットにおいてもPXRの発現は確認できなかった。一方、ヒトT細胞株であるJurkatでは刺激によりPXRの発現が上昇し、刺激時にヒトPXRのリガンドであるリファンピシンを加えると、IL-2の発現が誘導された。

研究成果の概要(英文)：PXR, a member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in immune cells, but the role of PXR in T lymphocyte remains unknown. Thus, we determined the roles of PXR in T lymphocyte. The combination of PMA and ionomycin induced PXR expression in human T cell acute leukemia Jurkat cells. Rifampicin, one of selective activators of PXR, increased PMA/ionomycin-mediated IL-2 expression, while expression of IL-4 and IL17A were nearly unchanged.

研究分野：アレルギー学

キーワード：PXR T細胞

1. 研究開始当初の背景

我々の生体内に備わっている免疫応答は、自己、非自己を識別し、細菌やウイルスなどの病原体による感染症から体を守っている。しかし、免疫応答が過剰になると、正常な細胞や組織も攻撃するようになり、自己免疫疾患やアレルギーなどを引き起こすことから、活性化と抑制のバランスを保つことが非常に重要である。

T細胞サブセットのバランス異常は自己免疫疾患、感染症、がん、アレルギーなど様々な疾患の発症に関わっている。即ち、各T細胞サブセットの人為的なバランス改変が可能となれば、それら疾患の治療に結びつくものと考えられた。

T細胞サブセットはin vitroでnaïve T細胞から培養できるが、ダイオキシンレセプターとして知られているAhRはリガンド特異的な方法でTreg細胞とTh17細胞の分化を制御することなど、核内受容体がT細胞の分化に深く関与することを示す研究が多数報告されてきた。

核内受容体のひとつであるPXRは様々な薬物をリガンドとし、チトクロムP450(CYP)3A4やP糖タンパクなどを誘導するが、研究開始当初に、PXRは免疫細胞においても発現していることが確認された。

2. 研究の目的

PXRの免疫応答やT細胞の分化、維持における役割に着目してそのメカニズムを探索し、免疫調節因子としての生物学的意義を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)OVA特異的T細胞レセプターを強制的に発現し、遺伝子再構成活性化遺伝子2を欠損しているDO11.10 Rag2^{-/-}マウスの脾臓からCD4陽性細胞と抗原提示細胞をMACS(磁気ビーズ)を用いて精製し、抗原ペプチド、各種サイトカインと共にin vitroで刺激培養することにより抗原特異的Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞を得た。細胞の分化状態は、リアルタイムPCR、細胞内サイトカインのFACS解析にて確認した。これらの細胞を正常マウスに尾静脈より移入し、OVAを3日間連続で気管内投与した。アレルギー病態を評価する為に、抗原暴露から二日後にメサコリンに対する気道過敏性亢進(BHR)をフレキシベントを用いて測定すると共に、肺胞洗浄液(BALF)を採取し、その中の炎症細胞数の計測を行った。

(2) Jurkat細胞をPMAとイオノマイシンで刺激し、その6時間後に細胞を回収した。

Isogenを用いてmRNAを抽出後、cDNAを合成し、このcDNAをテンプレートとして、real time PCRを行った。

4. 研究成果

(1)アレルギー性炎症の評価系構築

まず、全身モデルでPXRの免疫応答における役割を解析する為のアレルギーモデルマウスを作製した。OVA中の主要エпитープであるOVA323-339に反応するTCRを発現するトランスジェニックマウスであるDO11.10を、抗原ペプチド、各種サイトカイン、および非動化した抗原提示細胞の存在下で刺激培養することにより抗原特異的Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞を得た。これらの細胞を正常マウスに移入後、OVAを3回気管内投与することにより、気管支肺泡領域に強い炎症が生じ、気道上皮の肥厚および各種免疫細胞の浸潤が観察されたほか、気道過敏性亢進がみられた(図1)。

以上のことから、いずれのThサブセットを移入しても、気管支喘息の病態を発症させることが可能となった。

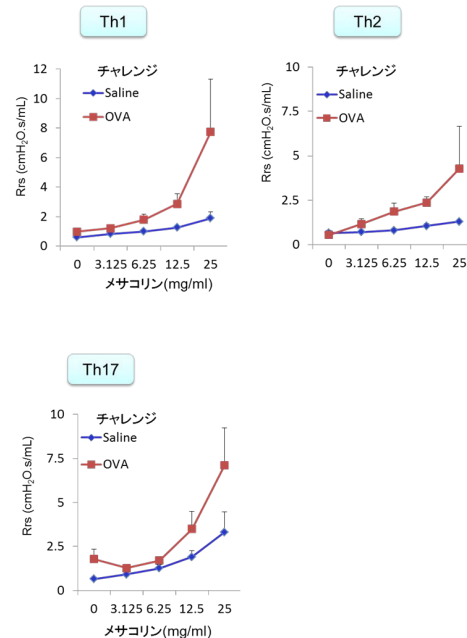


図1. 各種T細胞サブセット移入によるアレルギーモデル系の作製

(2)マウス抗原特異的T細胞におけるPXRの発現

DO11.10 Rag2^{-/-}マウスの脾臓、リンパ節からCD4陽性T細胞と抗原提示細胞をMACS(磁気ビーズ)を用いて精製した。CD4

陽性 T 細胞を抗原で刺激培養する際に、既知の Maus PXR リガンドである PCN を加えた。分化培養後に、分化した細胞の比率を、細胞内サイトカインをフローサイトメトリーで比較することにより解析した。その結果、PCN を加えることによりわずかに IL-4 産生細胞の誘導能が低下した(図 2)。

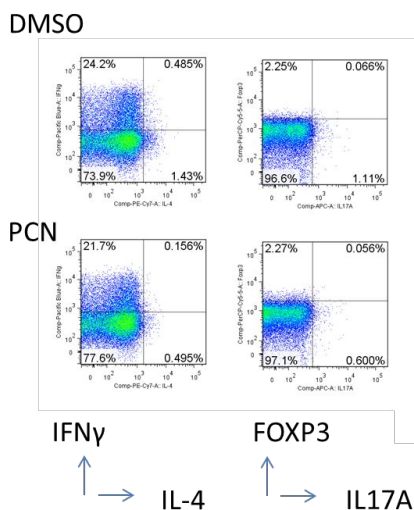


図 2. Maus PXR リガンドである PCN が naive T 細胞の分化状態に与える影響

そこで、抗原や各種サブセットの培養に必要なサイトカインと共に in vitro で CD4 陽性 T 細胞を培養した。Th1、Th2、Th17、Treg 細胞等に分化後、PXR 発現量をリアルタイム PCR にて測定したが、いずれの細胞においても PXR の発現は確認できなかった。P-糖タンパク質 (P-gp) をコードする遺伝子である MDR1 は PXR により発現が誘導されること、T 細胞に発現していることの両方が知られていることから、これらの細胞を PCN で処理して MDR1 の発現誘導を測定した。しかしながら、MDR1 は誘導されなかったことから、次に、PXR の発現を誘導すること、T 細胞に作用することが知られているデキサメタゾンでこれらの細胞の処理を行った。デキサメタゾン処理により各 T 細胞に特徴的なサイトカインは有意に抑制されたが、PXR の発現誘導はみられなかった。

(3) ヒト T 細胞株における PXR の発現

Maus T 細胞を用いた検討において、大きな影響が認められなかったことから、次にヒト T 細胞株 Jurkat を用いて検討を行うこととした。Jurkat 細胞を PMA/イオノマイシンを用いて刺激し、6 時間後の遺伝子発現を調べると、PMA/イオノマイシン刺激により PXR の発現誘導が確認された(図 3A)。そこで PMA/イオノマイシン存在下で、ヒト

PXR のリガンドであるリファンピシン (Rif) を加え、サイトカインの発現誘導を調べると、IL-2 の発現が誘導された(図 3B)。一方、IL-4、IL12A、IL-17A などの発現には影響を及ぼさなかった。

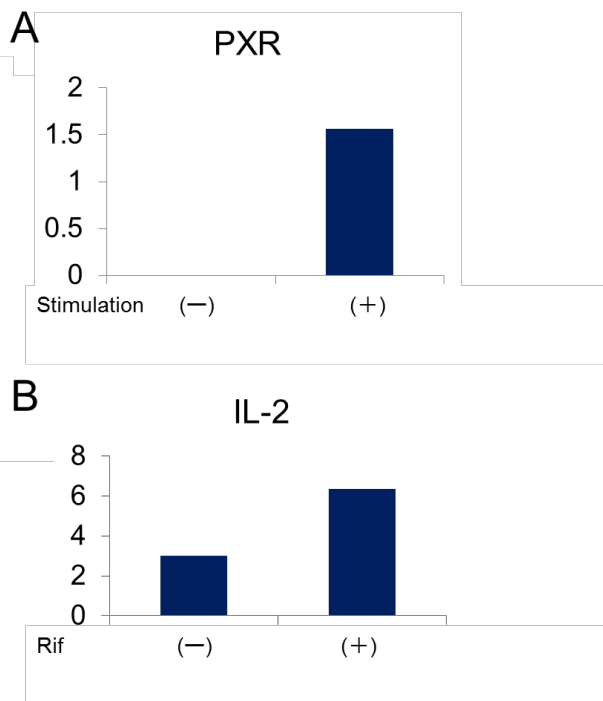


図 3. Jurkat 細胞における各種遺伝子発現

今後、IL-2 の他に発現が変化する遺伝子の探索、ならびに各種 PXR リガンドによる発現変動の違いを明らかとし、T 細胞の分化誘導が制御可能か更に検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Saeki M, Kaminuma O, Nishimura T, Kitamura N, Mori A and Hiroi T. Th9 cells induce steroid-resistant bronchial hyperresponsiveness in mice. *Allergol Int.* 66S:S35-S40 (2017). (査読有)
doi: 10.1016/j.alit.2017.07.001.
2. Saeki M, Kaminuma O, Nishimura T, Kitamura N, Mori A and Hiroi T.

Th9 cells elicit eosinophil-independent bronchial hyperresponsiveness in mice. *Allergol Int*, 65 Suppl:S24-9 (2016). (査読有)
doi.org/10.1016/j.alit.2016.05.003.

〔学会発表〕(計5件)

1. Mayumi Saeki, Osamu Kaminuma, Tomoe Nishimura, Noriko Kitamura, Akio Mori, and Takachika Hiroi. Th2 and Th9 cells induce airway eosinophilic inflammation by distinct mechanisms. International Cytokine & Interferon Society 2017 (Cytokines 2017) (20171031 Ishikawa)
2. 佐伯真弓, 西村友枝, 北村紀子, 森晶夫, 神沼修, 廣井隆親. Th9 細胞依存的アレルギー性気道炎症における副刺激分子の役割 アレルギー好酸球研究会 2017 (20171011 東京)
3. 佐伯真弓, 西村友枝, 北村紀子, 森晶夫, 神沼修, 廣井隆親. Th9 細胞移入マウスの気道過敏性亢進における Abatacept の効果 第 66 回日本アレルギー学会 (20170617 東京)
4. 佐伯真弓, 西村友枝, 北村紀子, 森晶夫, 神沼修, 廣井隆親. Th9 細胞による気道過敏性亢進に対する薬剤応答性 第 65 回日本アレルギー学会学術大会 (20160618 東京)
5. 佐伯真弓, 西村友枝, 渡邊伸昌, 森晶夫, 神沼修, 廣井隆親. Th2 および Th9 細胞による気道過敏性亢進発症機構の相違 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 ミニシンポジウム 07「免疫担当細胞」(20150526 東京)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/allergy.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 真弓 (SAEKI, Mayumi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員
研究者番号：00462771