

「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域 領域活動・評価報告書
—平成25年度終了研究課題—

研究総括 高津 聖志

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生体防御反応であるにもかかわらず、炎症が慢性化することによって生体に悪影響を引き起こす現象の実体解明に向けた研究、すなわち、炎症の慢性化とその維持機構、および炎症の慢性化が疾患を惹起・進行・重症化する機構の時空間的な解明に挑戦する研究を対象とします。このような研究を推進することにより、炎症の慢性化が関与するさまざまな疾患や臓器不全の予防や治療、創薬につながる新たな医療基盤の創出を目指します。

具体的には、下記の視点をもった研究を推進します。

- 1) 分子や細胞の階層から迫る研究に加え、組織や臓器の階層から迫る視点
- 2) 細胞や組織、臓器間の相互作用、個体全体でのダイナミクスなど、慢性炎症を複雑系として捉える視点
- 3) エピジェネティクスや機能性非コード RNA など、他生命科学分野からの視点
- 4) 遺伝子産物、生理活性物質、細胞やそれらの動態を検出・測定する技術的な分野からの視点
- 5) 慢性炎症の制御による関連疾患を標的とした創薬などの医療応用を見据えた視点

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：9件(通常型)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域に設けた選考委員 11 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さがけ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryoku4.html>) に則ると共に、領域の課題達成に向け、3回の選考を通じて幅広い研究課題を採択するように努めた。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者 3 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			13件	内 訳	3年型	10件(1件)
対象数	286件	40件			5年型	3件(0件)

()内は大挑戦型としての採択数。

5. 研究実施期間

平成23年3月または4月～平成26年3月

6. 領域の活動状況

領域会議:6回

研究報告会:1回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:研究開始時に研究総括、技術参事、事務参事が研究者とその上司を訪問し、さがけ研究実施にあたっての協力を依頼した。研究総括からは、研究者にこれまでの研究歴などについてのインタビューを行った。さらに、研究室、研究設備等を確認し、研究環境の説明を受け、

研究実施に支障がないことを確認した。また、研究実施に必要な事務的な手続きについての説明も行った。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成25年12月	評価会開催
平成26年 2月	研究総括による中間評価
平成26年 3月	被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1) 研究計画書の目標と研究課題に対する達成度
- (2) 外部発表(学術論文、口頭発表など)やプレスリリースと特許などから見た研究成果と発信状況
- (3) 学術賞、学会招待講演、新聞記事など外部からの評価状況
- (4) 達成した研究成果の科学、技術、社会への貢献度

9. 評価結果

今年度で終了する研究課題では、エフェクター・調節性 T 細胞を中心とする獲得免疫系細胞の分化制御機構、自然免疫系を制御する分子や細胞の炎症における役割、炎症シグナル分子の同定と制御、低酸素シグナルや細胞老化に基づく炎症反応、炎症応答の細胞内調節機構の解明研究や炎症メディエーター分子の局在産生の可視化研究が実施された。それらを通じ、自己免疫疾患やアレルギー、心筋梗塞や心臓リモデリング、早産など多岐に渡る慢性炎症が関与する疾患の発症原因の究明や予防・治療法のヒントとなる様々な基礎的知見を得ることができた。領域会議などにおける領域アドバイザーからのアドバイスはもとより、研究者間での情報交換・共同研究も実施され、領域課題に沿ったそれぞれの研究の取り組み方の修正や顕著な成果につなげることができた。なお、今期の研究期間は諸般の事情により通常よりも半年間短かったため、期間内に対外発表に至らなかった成果も多く、今後の研究成果公開に期待している。研究者別にそれらの研究目的と結果および評価を以下に述べる。

1. 大洞 将嗣 研究者「イオンバランス破綻による自己免疫疾患の重症化機構の解明」

チャネル ORAI1 と制御分子 STIM1 と STIM2 によって制御されるストア作動性カルシウム流入が、胸腺において「アゴニスト選択」を受け一連の免疫抑制性の T 細胞(Foxp3 陽性の制御性 T 細胞、iNKT 細胞、CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 TCR $\alpha\beta$ 陽性の腸管上皮間リンパ球)の発生時における選択後の増殖や分化に必須であることをマウスで発見するとともに、その分子メカニズムを明らかにした。ストア作動性カルシウム流入の欠損は、抑制性 T 細胞の全喪失と自己反応性 T 細胞の不完全な除去を引き起こし、その結果 IL-4 を産生する濾胞ヘルパー T 細胞への分化亢進を惹起することによって自己免疫疾患を発症し、さらに IL-4 を産生する濾胞ヘルパー T 細胞への分化を亢進することで病態が進行・重症化することを示した。また、シェーグレン症候群患者の末梢血においても、疾患の重症化に伴い、STIM1 や STIM2 の発現が低下することを明らかにするなど、質の高い論文成果につなげたことは大いに評価できる。今後は、シェーグレン症候群などの自己免疫性の難治性疾患におけるストア作動性カルシウム流入を制御する分子の発現状況が疾患の発症や重症度のマーカーとなり得るのかを明確化すること、さらには疾患の予防や治療の標的分子を同定することが期待される。

2. 西城 忍 研究者「C型レクチンによる炎症反応制御機構の解明」

C 型レクチンファミリー分子である Dectin-1 と Dectin-2 が、それぞれ β グルカンと α マンナンの機能的レセプターであることを明らかにするとともに、細胞内へ取り込まれた病原真菌による炎症反応は Dectin-1 と Dectin-2 の2種類の分子によってほぼ完全に担われていることを見出した。また、これらの分子は IL-10 産生を介して炎症を負に制御していることも見だしており、国内外を通じてこの分野における先導的な研究を行っている点で、その成果のインパクトは大きいと評価される。しかしながら、これら C 型レクチンファミリー分子による炎症反応の制御が実験系によって一定しておらず、その機構についての解析も、まだ道半ばである。今後は、この複雑な制御機構の詳細解明を期待する。また、未発表の研究成果も多く、早期の論文発表が望まれる。

3. 澤 智裕 研究者「慢性炎症における活性酸素シグナル伝達制御の分子基盤」

活性酸素の2次シグナル分子である8-ニトロ cGMPによりS-グアニル化されるタンパク質としてミトコンドリア熱ショックタンパク質と細胞老化の制御に関わるH-Rasを同定し、それらのS-グアニル化タンパク質の機能解析を行うと共に、心筋梗塞モデルにおける炎症・細胞老化促進機構へのS-グアニル化H-Rasの関与を明らかにした。同時に同定した心臓内でほとんど発現しないニトロ cGMPの細胞内代謝・分解を行う2つの酵素が生成するイオウ代謝物(硫化水素)により8-ニトロ cGMPシグナルが収束することなどを明らかにする報告を行った。独創性・新規性の高い活性酸素シグナルの制御に関する成果と評価される。未発表データの論文文化も予定されており、今後さらに新しい炎症制御機構が明らかになることが期待できる。どのように慢性炎症の病因病態論へとつながっていくのか、今後の展開が大変楽しみである。

4. 杉浦 悠毅 研究者「質量分析イメージングによる炎症メディエーター分子の局在産生の可視化」

質量分析イメージングの手法を発展させ、これまで局在可視化の手段がなかった低濃度(ナノ～サブナノM)で存在する低分子炎症メディエーターなどの時空間的なイメージング法を確立した。それを達成するため、本研究ではメディエーター分子の死後分解を抑制する組織サンプル調製法の確立、飛躍的な検出感度向上のための切片上での化合物誘導体化(イオン化効率向上)法の開発、非特異的なノイズ低減のための多段階質量分析法の適用などの技術開発を行い、アセチルコリン、アラキドン酸カスケードやエネルギー代謝経路の一連の化合物、リポリン脂質類、アミノ酸類などの複数分子を同時に組織切片上において質量分析イメージングすることを達成した。これまでに、脊髄損傷、脳梗塞、心筋梗塞、ニューロパチー、がんなどのモデルに本手法を適用して成果を上げており、今後より広範な研究領域で汎用されることが期待できる画期的な技術であると評価できる。

5. 武田 弘資 研究者「ミトコンドリアのストレス受容・応答機構と炎症制御」

炎症反応は外的・内的環境要因に対する生体の防御反応であり、細胞ストレスに感受性の高いミトコンドリアが炎症反応を制御している可能性について、ミトコンドリアのストレス受容・応答に働く分子として見出したPGAM5の分子機能解析を中心とした挑戦的な研究がなされた。その結果、PGAM5はミトコンドリアの傷害や機能低下の程度を感知し、その程度に応じた細胞応答を促すためのシグナル伝達を担っており、ショウジョウバエを用いた個体レベルでの解析の結果、熱ショックによる神経細胞のアポトーシスを抑制する作用を示すのみならず、複眼特異的なPGAM5の過剰発現がアポトーシスを促進することから、PGAM5はcontext-dependentなアポトーシス制御因子であることを見出している。さらに、機能の低下したミトコンドリアがNLRP3インフラマソームを活性化することが知られているため、その過程におけるPGAM5の役割についても検討を加えている。以上、PGAM5の分子機能やNLRP3インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの関与について、レベルの高い解析を行い一定の成果が得られたことは評価されるが、本人も述べているように、PGAM5ノックアウトマウス個体を用いた病態モデルでの解析では期間内に十分な成果が得られるには至らなかった。炎症応答時におけるミトコンドリアの役割やPGAM5の関与は当初の仮説よりも複雑であると思われる、研究者が見出したPGAM5分子の研究の方向性について改めて吟味することも含めて、今後のさらなる成果を期待する。

6. 武田 憲彦 研究者「低酸素シグナルによる炎症制御の解明と循環器疾患治療への応用」

本研究では、炎症において組織に浸潤してくるマクロファージや間質の線維芽細胞などが、HIFが活性化しやすい炎症組織の低酸素状態にあって、どのように組織リモデリングに関与しているのか解析してきた。皮膚創傷治癒モデルでは、マクロファージ由来のHIF- α 標的因子であるVEGFの分泌促進が創傷治癒に促進的に働き、また自然発症腫瘍増殖モデルでは線維芽細胞におけるHIF-1 α 依存的な低酸素シグナルがマクロファージの腫瘍組織内への遊走を促進して腫瘍の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、体内最大臓器である皮膚のケラチノサイト特異的にHIF-1 α あるいはHIF-2 α を欠損したマウスにおいて、HIF-1 α 欠損では血圧が上昇して運動負荷時の血管拡張能が低下し、反対にHIF-2 α 欠損では血圧の低下が認められAngiotensin II投与による血圧上昇や心線維化の程度の軽減が認められ、皮膚ケラチノサイトにおけるHIF- α スイッチングが血圧調節を介して心臓リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることを確認し論文発表した。以上のように、低酸素シグナルによる炎症制御の解明に関し、研究は概ね順調に進捗していると評価できる。今後、心臓リモデリングの系での解析がさらに進めば、臨床応用に向けた基盤的知見が得られると期待できる。

7. 廣田 泰 研究者「マウス生殖モデルを用いた、老化が誘導する炎症メカニズムの解明」

独自に開発した子宮特異的 p53 欠損マウスを用いた早産モデルの解析から、母体側の子宮における Akt-mTORC1 経路の活性化を介した細胞老化-炎症が早産を引き起こし、また細菌感染に伴う子宮内におけるプロゲステロン濃度の低下(妊娠維持能力の低下)によりその早産がさらに促進されることを示し、治療の試みとして mTORC1 阻害剤投与とプロゲステロンの補充療法が有効であることを実験的に証明し論文報告した。当該臨床領域における基礎研究は必ずしも進んでおらず、本研究の質の高い成果は科学的に高く評価されると同時に、社会的にもインパクトがあるものと考ええる。今後は、本研究で見出した早産の原因となるメカニズムが、早産の発生において想定されるその他の母体側因子や環境因子でも働いているものなのかの追及・証明、さらには臨床応用に向けた研究の前進が大いに期待できる。

8. 山下 政克 研究者「T 細胞記憶のエピジェネティック調節による慢性炎症性御」

老化などによるヘルパーT細胞のエピジェネティックな変化に伴う免疫記憶の機能異常が炎症の慢性化に関わっているという仮説の元に研究が実施された。その結果、ヘルパーT細胞の終末分化や細胞老化といった炎症形質を誘発イベントに対する腫瘍抑制因子 Menin の抑制作用が、その下流で働く転写抑制因子 Bach2 遺伝子の活性化ヒストン修飾を行うことによる Bach2 発現の維持により達成されていること、また 2 型ヘルパーT細胞分化に対する TGF β の抑制作用に転写抑制因子 Sox4 の発現が関与していることを見出すと共に、この Sox4 の T 細胞における発現がマウス喘息モデルの病態形成を抑制すること、さらに IL-5 産生阻害薬 SH-2251 が IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングと IL-5 産生 2 型ヘルパーT細胞分化を選択的に抑制することを明らかにした。これらは何れも新規性・独創性が高く、優れた解析能力による成果であると評価できる。今後は、Menin-Bach2 経路や TGF β -Sox4 経路による T 細胞分化制御に基づく免疫制御メカニズムの異常が炎症の慢性化に関わることを明らかにし、疾患の制御に結びつくことを期待している。また、IL-5 産生阻害薬の創薬としての展開も、より実面的な面から大いに期待できる。

9. 渡会 浩志 研究者「ナチュラルキラーT細胞による炎症慢性化機構の解明と制御」

多様な作用を有する iNKT 細胞の本質的機能については、本細胞の発見からこれまで長らく捉え難かった。しかし、本研究において iNKT 細胞の発生・分化過程にまで遡る詳細な解析を行うことにより、これまでほぼ均質な細胞集団であると考えられていた iNKT 細胞が、実は異なる種類のサイトカインを分泌するが IL-17RB を発現しない従来タイプの iNKT1 細胞と、IL-17RB を発現する新たな iNKT2 細胞との亜集団に分類できることを明らかにした。また、新たに同定した iNKT2 細胞がウイルス感染による小児喘息の責任細胞であることの可能性をマウスモデルで示し、論文報告した。iNKT 細胞の有する多様な機能に対する研究者の疑問に解を与えたことは高く評価される。今後は、IL17RB 遺伝子座に見出したステロイド耐性小児喘息特異的な SNP とヒト疾患との関連性の追求や、iNKT 細胞活性化シグナルの解析などから新たな治療戦略の基盤構築につながる成果が期待できる。

10. 評価者

研究総括 高津 聖志 富山県薬事研究所 所長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成25年3月末現在)

烏山 一	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授
佐田 政隆	徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授
反町 典子	(独)国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト長
戸邊 一之	富山大学 医学部 第一内科 教授
長田 重一	京都大学 大学院医学研究科 教授
福井 宣規	九州大学 生体防御医学研究所 教授
古市 泰宏	ジーンケア研究所(株) 代表取締役会長
三浦 正幸	東京大学 大学院薬学系研究科 教授
宮坂 信之	東京医科歯科大学 名誉教授
宮園 浩平	東京大学大学院医学系研究科 教授
山村 隆	(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 部長

外部評価者(五十音順。所属、役職は平成23年3月末時点)

糸山 泰人 (独)国立精神・神経医療研究センター病院 院長
 今井 浩三 東京大学医科学研究所附属病院 病院長／教授
 岡田 弘晃 東京薬科大学薬学部 教授
 木梨 達雄 関西医科大学大学院医学研究科 教授
 澁谷 正史 上武大学 副学長
 鈴木 孝治 慶應義塾大学理工学部 教授
 高井 俊行 東北大学加齢医学研究所 教授
 竹縄 忠臣 神戸大学大学院医学研究科 特命教授
 竹屋 元裕 熊本大学大学院生命科学研究科 教授
 福森 義信 神戸学院大学薬学部 教授
 藤田 禎三 福島県立医科大学 教授
 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授
 前田 瑞夫 理化学研究所基幹研究所 主任研究員
 向田 直史 金沢大学がん進展制御研究所 教授
 村上 伸也 大阪大学大学院歯学系研究科 教授
 山本 雅 東京大学医科学研究所 教授
 義江 修 近畿大学大学院医学系研究科 教授
 吉開 泰信 九州大学生体防御医学研究所 教授

(参考)

件数はいずれも、平成26年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	16	90	106
口 頭	94	46	140
その他	4	0	4
合 計	114	136	250

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
0	2	2

(3)受賞等

・廣田 泰

第 12 回日本内分泌学会若手研究奨励賞(H23年4月23日)
 第 56 回日本生殖医学会学術奨励賞(H23年12月8日)
 平成 23 年度東京都医師会医学研究賞奨励賞(H24年1月27日)
 第 64 回日本産科婦人科学会優秀演題賞(H24年4月15日)
 第 65 回日本産科婦人科学会優秀演題賞(H25年5月12日)
 第 19 回日本炎症・再生医学会奨励賞(H25年7月2日)

(4)招待講演

国際 17件
 国内 29件

別紙

「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
大洞 将嗣 (兼任)	イオンバランス破綻による自己免疫疾患の重症化機構の解明 (九州大学生体防御医学研究所)	九州大学生体防御医学研究所 准教授 (東京医科歯科大学歯と骨のGCOE特任准教授)	40
西城 忍 (兼任)	C型レクチンによる炎症反応制御機構の解明 (千葉大学真菌医学研究センター)	千葉大学真菌医学研究センター 特任准教授 (同上)	39
澤 智裕 (兼任)	慢性炎症における活性酸素シグナル伝達制御の分子基盤 (東北大学大学院医学系研究科)	東北大学大学院医学系研究科 准教授 (熊本大学大学院生命科学研究部 准教授)	37
杉浦 悠毅 (専任)	質量分析イメージングによる炎症メディエーター分子の局在産生の可視化 (慶應義塾大学医学部)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (浜松医科大学分子イメージング先端研究センター 特別研究員)	43
武田 弘資 (兼任)	ミトコンドリアのストレス受容・応答機構と炎症制御 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授 (東京大学大学院薬学系研究科 准教授)	39
武田 憲彦 (兼任)	低酸素シグナルによる炎症制御の解明と循環器疾患治療への応用 (東京大学大学院医学系研究科)	東京大学大学院医学系研究科 特任助教 (同上)	39
廣田 泰 (兼任)	低酸素シグナルによる炎症制御の解明と循環器疾患治療への応用 (東京大学大学院医学系研究科)	東京大学大学院医学系研究科 登録研究医 (焼津市立総合病院 医長)	45
山下 政克 (兼任)	T細胞記憶のエピジェネティック調節による慢性炎症制御 (愛媛大学大学院医学系研究科)	愛媛大学大学院医学系研究科 教授 (「(財)かずさDNA研究所 室長」)	38
渡会 浩志 (兼任)	ナチュラルキラーT細胞による炎症慢性化機構の解明と制御 (東京大学医科学研究所)	東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 特任准教授 (「(独)理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター 上級研究員」)	38

研究報告書

「イオンバランス破綻による自己免疫疾患の重症化機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 大洞 将嗣

1. 研究のねらい

カルシウムやマグネシウムなどのイオンは、生体の機能や個体の正常な発生・分化に非常に重要である。生体内におけるイオン濃度は、様々なイオンチャネルやその制御分子によって厳密に制御されており、制御機構の破綻は自己免疫疾患など様々な重症疾患を惹起する。特に自己免疫疾患は、全身あるいは局所的な慢性炎症による組織破壊を伴う難治性疾患である。本研究課題は、細胞内シグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとしても機能し、末梢免疫寛容の成立に重要な役割を果たすことが知られているカルシウムイオンに焦点を当てた。

様々なカルシウム流入機構のうち、ストア作動性カルシウム流入は、リンパ球などの免疫細胞、平滑筋や骨格筋などで機能しており、チャネル ORAI1 と制御分子 STIM1 と STIM2 によって制御されている。先天的あるいは後天的にストア作動性カルシウム流入の機能が欠損する患者は、自己免疫疾患や筋形成不全などを発症する。一方、ストア作動性カルシウム流入の亢進が認められる例として、慢性炎症疾患である喘息における気道平滑筋の増殖を伴う気道リモデリングがある。しかしながら、ストア作動性カルシウム流入機構の異常が疾患を発症・重症化する詳細なメカニズムは未知な部分が多く残されている。そこで本研究課題は、特にストア作動性カルシウム流入機構の障害によって惹起される自己免疫疾患を疾患モデルとして用い、カルシウムイオンの制御を喪失した場合における自己免疫疾患の発症・重症化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

- スストア作動性カルシウム流入の欠損による自己免疫疾患発症メカニズムの解明

STIM1 と STIM2 を T 細胞特異的あるいは全免疫細胞で欠損するマウスを樹立し、T 細胞分化の解析を行った。その結果、自己を攻撃する有害な T 細胞を除去する「負の選択」には部分的な障害が認められた。さらに、免疫反応を抑制する Foxp3 陽性の制御性 T 細胞、iNKT 細胞、CD8 α 陽性 TCR α β 陽性の腸管上皮間リンパ球といった「アゴニスト選択」を受ける T 細胞分化の選択的な障害されていることを見いだした(発表論文1)。したがって、ストア作動性カルシウム流入の欠損では、免疫反応を抑制する T 細胞の喪失、自己反応性 T 細胞の不完全な除去が原因となり、自己免疫疾患を発症することが明らかとなった。

- シェーグレン症候群におけるストア作動性カルシウム流入の役割

本マウスはシェーグレン症候群を発症することを発見し、さらにシェーグレン症候群患者の末梢血においても、疾患の重症度が進行するにつれて、STIM1 や STIM2 の発現が低下することを明らかにした(発表論文2)。

- IL-4 産生細胞の同定とその制御機構および胚中心形成の分子機構の解明

IL-4 による自己免疫疾患が重症化する過程の解析を行った。まず、カルシウム流入欠損による自己免疫疾患マウスにおいて IL-4 をさらに欠損したマウスは、血清中の IgE 濃度の上昇や各組織における炎症が全て著しく軽減された。IL-4 レポーターマウスの解析から、このマウスでは全身性に IL-4 産生が亢進しているわけではなく、一部の免疫細胞（濾胞ヘルパー T 細胞と好塩基球）が IL-4 の産生を担っていることが判明した。この濾胞ヘルパー T 細胞の分化を障害することによって、やはり自己免疫疾患の病態がかなり軽減されることも明らかにした。

以上のことから、ストア作動性カルシウム流入の欠損による自己免疫疾患モデルでは、免疫反応を抑制する T 細胞の喪失と自己反応性 T 細胞の不完全な除去の2つの原因によって自己免疫疾患を発症し、IL-4 を産生する濾胞ヘルパー T 細胞への分化亢進を招くことによって、自己免疫疾患が進行・重症化することが明らかとなった。

(2) 詳細

● スストア作動性カルシウム流入の欠損による自己免疫疾患発症メカニズムの解明
ストア作動性カルシウム流入は、リンパ球などの免疫細胞における最大のカルシウム流入機構であり、チャネル ORAI1 と制御分子 STIM1 と STIM2 によって制御されている。先天的にストア作動性カルシウム流入を欠損する患者は、免疫不全症や自己免疫疾患を発症するが、その発症機序や病態の進行メカニズムは不明である。そこで、本項目では、モデル生物であるマウスを用いて、制御分子 STIM1 と STIM2 を欠損するマウスを樹立し、自己免疫疾患の発症メカニズムを解析した。HY 抗原特異的な T 細胞受容体(TCR)を発現するマウスの解析から、機能的な T 細胞を選別する「正の選択」には全く影響が認められなかった。この結果はヒトの末梢血で成熟 T 細胞が認められることと一致した。一方、HY-TCR マウスやスーパー抗原に対する反応性を解析した結果、自己を攻撃する有害な T 細胞を除去する「負の選択」には部分的な障害が認められた。驚くべきことに、免疫反応を抑制する Foxp3 陽性の制御性 T 細胞、iNKT 細胞、CD8 α 陽性 TCR $\alpha\beta$ 陽性の腸管上皮間リンパ球といった「アゴニスト選択」を受ける T 細胞分化が全て障害されていることを見いだした。この分化障害メカニズムの詳細な解析を行ったところ、アゴニスト選択を受けた直後の前駆細胞までの分化は正常に行われているが、選択後の増殖や分化が完全に障害されていた。この障害は、カルシウム依存性の転写因子 NFAT の標的分子 CD25、Foxp3、CTLA-4、Egr2、さらに Egr2 の標的分子である CD122 や PLZF の発現が十分に行われないうえであることを明らかにした(図1)(発表論文1)。これらの分子は、マスター転写因子であったり、選択後の増殖や機能に関与する分子である。したがって、ストア作動性カルシウム流入はこれらの発現を維持することによって、アゴニスト選択性 T 細胞の分化を制御していると考えられる。

以上の結果から、ストア作動性カルシウム流入の欠損によって、抑制性 T 細胞の全喪失と自己反応性 T 細胞の不完全な除去の2つの原因によって自己免疫疾患を発症すると考えられた。

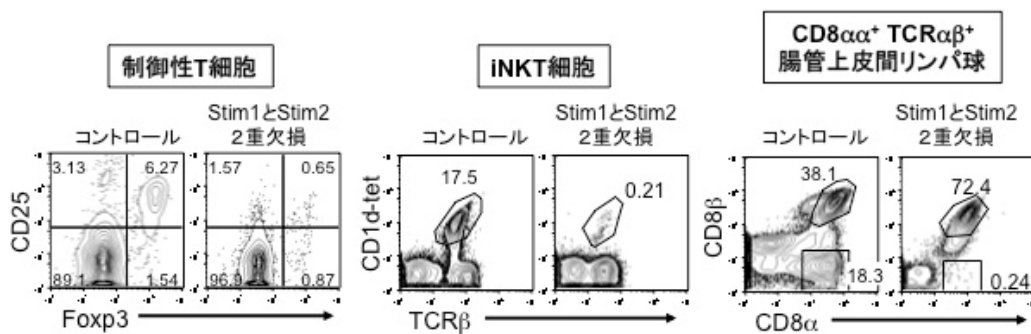


図1 アゴニスト選択性T細胞の消失

● シェーグレン症候群におけるストア作動性カルシウム流入の役割

米国 NIH の共同研究者とともに、STIM1 と STIM2 を欠損するマウスが、シェーグレン症候群様の表現系を示すことを見いだした。マウスの血清中において、シェーグレン症候群のマーカーである抗 SSA や抗 SSB を認め、顎下腺への異常なリンパ球浸潤による組織破壊と唾液の分泌低下を認めた。さらに、米国の原発性シェーグレン症候群患者の末梢血リンパ球では、疾患の進行・重症度に応じて STIM1 と STIM2 の発現レベルが低下し、重症患者では、STIM1 と STIM2 はほとんど発現していないことを明らかにした(発表論文2)。

● IL-4 産生細胞の同定とその制御機構および胚中心形成の分子機構の解明

STIM1 と STIM2 を欠損するマウスは、強い T_H2 型の炎症を伴って自己免疫疾患を発症する。そこで、この病態に IL-4 がどの程度関与しているのかを検討するために、IL-4 遺伝子座を GFP 遺伝子に置換したノックインマウス(G4)を用いて解析を行った。このマウスを使用する利点は、ヘテロではレポーターマウス、ホモマウスは IL-4 欠損マウスとして使用できる点である。STIM1 と STIM2、さらに IL-4 を欠損した3重欠損マウスでは、炎症や組織破壊がほとんど認められなかった。したがって、IL-4 が本病態において中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに G4 ヘテロマウスの解析から、IL-4 を産生している細胞は、濾胞ヘルパーT(T_{FH})細胞と好塩基球であることが明らかとなった。このストア作動性カルシウム流入の欠損による病態モデルでは、IL-4 産生 T_{FH} 細胞の分化は NFAT2 で制御されていることが明らかとなった。現時点で、 T_{FH} 細胞の分化に必須のリプレッサー分子 Bcl6 の発現が著明に減少することだけは判明しているが、NFAT2 による T_{FH} 細胞の詳細な分化メカニズムは不明であり、解析を継続中である。

以上の3項目の結果から、ストア作動性カルシウム流入の欠損による自己免疫疾患モデルでは、免疫反応を抑制するT細胞の喪失と自己反応性T細胞の不完全な除去の2つの原因によって自己免疫疾患を発症し、IL-4 を産生する濾胞ヘルパーT 細胞への分化亢進を惹起することによって、自己免疫疾患が進行・重症化すると考えられた(図2)。

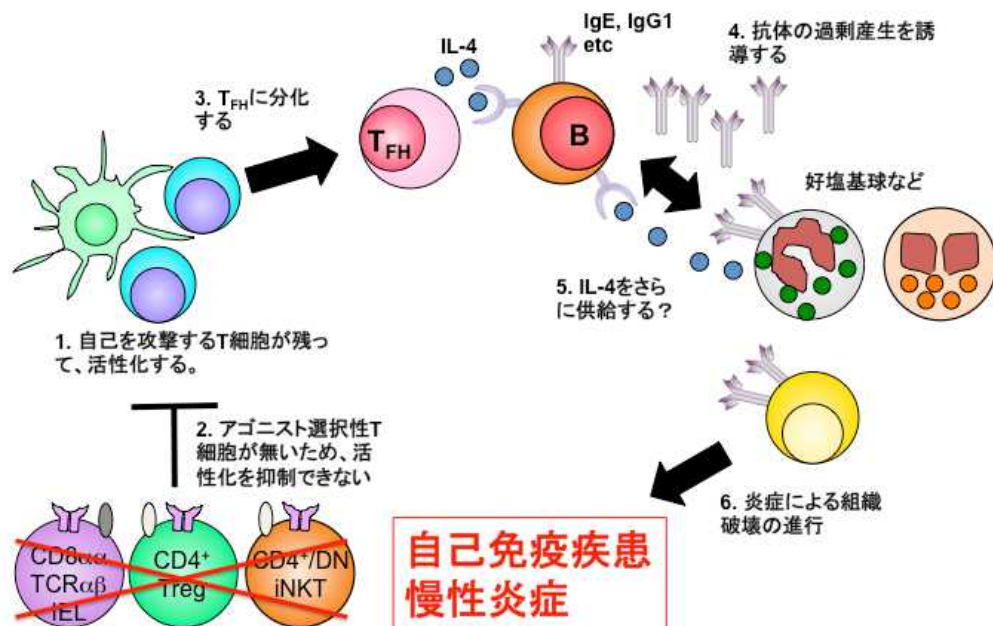


図2 本研究の成果から考えられるモデル

3. 今後の展開

本研究により、ストア作動性カルシウム流入の欠損によって自己免疫疾患を発症するメカニズムと進行・重症化するメカニズムを明らかにできた。特に、制御性T細胞をはじめ全ての抑制系T細胞の分化だけではなく、その抑制機能の獲得にも重要であることを示したことは、ヒト疾患における新規のマーカーあるいは治療法の開発につながると考えられる。実際に、共同研究によって、シェーグレン症候群患者の末梢血リンパ球におけるストア作動性カルシウム流入の機能不全が、疾患の重症度と共に認められることを明らかにできた成果は、今後の疾患マーカーへの応用を考える上で非常に有益な成果であった。

今後、STIM1、STIM2、ORAI1の発現制御機構を解明し、がんや自己免疫疾患など、疾患ごとにカルシウムイオンの恒常性の破綻が惹起する疾患のメカニズムを明らかにし、治療標的分子としての可能性を追求したいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

生体イオンのうち、カルシウム流入機構の破綻による自己免疫疾患の発症とその重症化機構の解明を目指した本研究課題は、概ね当初の計画通りに進んだ。特に、マウスモデルを用いて、「カルシウム流入の欠損が抑制機能を持つT細胞の分化や機能を一時的に制御する」という成果は、カルシウム流入の新たな機能を明らかにした点で注目に値する。しかし、シェーグレン症候群患者において、疾患の進行と共にSTIM1やSTIM2の発現が減少することを発見

することができた一方で、そのメカニズムを明らかにすることができなかった点は反省すべき点である。今後、転写領域の解析や適切な疾患モデルの選択によって、炎症がカルシウムイオンなどの恒常性を破綻させるメカニズムを解明に取り組む予定である。

(2) 研究総括評価(公開項目)

チャネル ORAI1 と制御分子 STIM1 と STIM2 によって制御されるストア作動性カルシウム流入が、胸腺において「アゴニスト選択」を受ける一連の免疫抑制性の T 細胞 (Foxp3 陽性の制御性 T 細胞、iNKT 細胞、CD8 α 陽性 TCR α β 陽性の腸管上皮間リンパ球) の発生時における選択後の増殖や分化に必須であることをマウスで発見するとともに、その分子メカニズムを明らかにした。ストア作動性カルシウム流入の欠損は、抑制性 T 細胞の全喪失と自己反応性 T 細胞の不完全な除去を引き起こし、その結果 IL-4 を産生する濾胞ヘルパー T 細胞への分化亢進を惹起することによって自己免疫疾患を発症し、さらに IL-4 を産生する濾胞ヘルパー T 細胞への分化を亢進することで病態が進行・重症化することを示した。また、シェーグレン症候群患者の末梢血においても、疾患の重症化に伴い、STIM1 や STIM2 の発現が低下することを明らかにするなど、質の高い論文成果につなげたことは大いに評価できる。今後は、シェーグレン症候群などの自己免疫性の難治性疾患におけるストア作動性カルシウム流入を制御する分子の発現状況が疾患の発症や重症度のマーカーとなり得るのかを明確化すること、さらには疾患の予防や治療の標的分子を同定することが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Oh-hora, M., Komatsu, N., Pishyraeh, M., Feske, S., Hori, S., Taniguchi, M., Rao, A. and Takayanagi, H. Agonist-selected T cell development requires strong T-cell receptor signaling and store-operated calcium entry. *Immunity* 38, 881-895 (2013)
2. Cheng, KT., Alevizos, I., Liu, X., Swaim, WD., Yin, H., Feske, S., Oh-hora, M. and Ambudkar, IS. STIM1 and STIM2 deficiency in T lymphocytes underlies development of exocrine gland autoimmune disease, Sjögren's Syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 14544-14549 (2012)
3. Li, T., Finch, EA., Graham, V., Zhang, ZS., Ding, JD., Burch, J., Oh-hora, M. and Rosenberg, P. STIM1-Ca²⁺ signaling is required for the hypertrophic growth of skeletal muscle in mice. *Mol Cell Biol* 32, 3009-3017 (2012)
4. Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-hora, M., Feng, JQ., Bonewald, LF., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, EF., Penninger, JM. and Takayanagi, H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17, 1231-1234 (2011)
5. Zeiger, W., Ito, D., Swetlik, C., Oh-hora, M., Villereal, ML. and Thinakaran, G. Stanninocalcin 2 is a negative modulator of store-operated calcium entry. *Mol Cell Biol* 31, 3710-3722 (2011)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(A)学会発表

1. Oh-hora, M., Komatsu, N., Rao, A. and Takayanagi, H. Store-operated calcium entry is crucial for the development of agonist-selected T cells. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka, Japan (2013/11/5)
2. Oh-hora, M., Komatsu, N., Rao, A. and Takayanagi, H. Store-operated calcium entry is crucial for the development of agonist-selected T cells. FASEB scientific research conference, Nassau, The Bahamas (2013/6/10)
3. 大洞将嗣、小松紀子、Anjana Rao、高柳広、T細胞分化とストア作動性カルシウム流入 第22回東京免疫フォーラム(東京)(2013年3月14日)
4. Oh-hora, M., Komatsu, N., Feske, S., Hori, S., Rao, A. and Takayanagi, H. Strong TCR/calcium signaling specifically controls the development of regulatory T cell subsets. Frontiers in Immunology and Inflammation, Tokyo, Japan (2013/2/12)
5. Oh-hora, M., Komatsu, N., Feske, S., Hori, S., Rao, A. and Takayanagi, H. Strong Agonist-selected T cell development requires strong TCR/calcium signaling. 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Kobe, Japan (2012/12/5)
6. 大洞将嗣、小胞体カルシウムセンサーSTIMによるT細胞の分化制御 第8回骨免疫ワークショップ(東京)(2012年11月2日)
7. 大洞将嗣、STIM依存性カルシウム流入によるT細胞の分化制御 第122回小児血液腫瘍懇話会(東京)(2012年11月2日)
8. 大洞将嗣、小松紀子、Anjana Rao、高柳広、Agonist-selected T cell development requires strong TCR/calcium signaling. 第22回 Kyoto T cell Conference(京都)(2012年7月6日)
9. 大洞将嗣、Lineage-specific requirement of store-operated calcium entry in T cell lineage development. 第21回 Kyoto T cell Conference(京都)(2011年6月10日)
10. 大洞将嗣、小松紀子、Anjana Rao、高柳広、STIM依存性カルシウム流入によるT系列細胞の分化制御、第7回 TRP チャンネル研究会(岡崎)(2011年6月2日)

(B)受賞

なし

(C)著作物

1. 大洞将嗣、高柳広、カルシウムシグナリング、シグナル伝達キーワード事典、87-89 (2012)
2. 大洞将嗣、黒崎知博、免疫(2)獲得免疫、シグナル伝達キーワード事典、239-249 (2012)

(D)プレスリリース

1. 大洞将嗣, 過剰な免疫反応にブレーキをかける T 細胞が作られる共通の仕組みを解明, JST と東京医科歯科大学による共同発表, <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130315/index.html> (2013)

研究報告書

「C 型レクチンによる炎症性疾患制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年3月～平成26年3月

研究者: 西城 忍

1. 研究のねらい

C 型レクチンは多様な生物活性を有する糖鎖結合性の分子群で、外来性あるいは内在性リガンドを認識し、サイトカインや活性酸素種 (ROS) などの炎症性メディエーターの産生を強力に誘導する分子や、逆に抑制性シグナルを伝え免疫系を負に調節する分子などが存在する。そのため、生体恒常性維持における寄与はきわめて大きなものであると予想されるが、未だリガンドや機能が不明な分子が存在し包括的な解析が待たれる。そこで本研究では、最終的に C 型レクチンによる炎症反応の制御機構を包括的に解明することを目的とし、1) 機能やリガンドが未知の C 型レクチンのノックアウト (KO) マウスを新たに作製するとともに、これまでに作製した複数の C 型レクチン、種々のサイトカイン KO マウスと組み合わせた解析を行い、機能未知の C 型レクチンの機能を解析すること、2) これらのマウスを用いて、アレルギーや自己免疫疾患の発症における役割を明らかにすること、3) C 型レクチン下流のシグナル伝達機構を解析し、炎症を惹起、あるいは終息させる分子機構を解明すること、を試みることにした。本研究により、C 型レクチンによる炎症反応の制御機構を正・負の両面から解明することができれば、将来的にこれらの分子を標的とした自己免疫疾患をはじめとする慢性炎症性疾患に対する新たな治療法の開発へとつながる可能性がある。

2. 研究成果

(1) 概要

樹状細胞 (DC) は、抗原提示細胞として外来異物を T 細胞に提示するとともに、サイトカインなどの液性因子の分泌や補助刺激分子の発現を介して T 細胞の運命を決定する。この一連の過程において、C 型レクチンは自然免疫機構と獲得免疫機構を仲介する重要な役割を担っている。私達は、これまで C 型レクチンを介したシグナルが活性酸素種 (ROS) の産生を介して真菌感染防御に重要な役割を果たしていること (Saijo et al., *Nat. Immunol.*, 2007)、サイトカイン産生を介してナイーブ T 細胞を Th17 細胞に分化させること (Saijo et al., *Immunity*, 2010)、あるいは細胞内に抑制性のシグナルを伝えることで免疫系を調整していること (Fujikado, Saijo et al., *Nat. Med.*, 2008) などを明らかにしてきた。また、Dectin-1 は β グルカン、Dectin-2 は α マンナンの機能的レセプターであることを見いだした。本研究では、Dectin-1 と Dectin-2 に collaboration 機構があり、Dectin-1 と Dectin-2 の二重欠損 (Dectin-1/-2 DKO) マウスでは、病原真菌 *Candida albicans* (*C. albicans*) によって誘導されるサイトカイン産生がほぼ完全に抑制されること、逆に Dectin-1/-2 DKO マウスでは誘導性炎症モデルでは症状が重症化することなどを見いだした。

(2) 詳細

1) 機能未知の C 型レクチンに関する研究

私達は、C 型レクチンファミリーの Dectin-1 と Dectin-2 が、それぞれ真菌細胞壁構成糖鎖である β グルカン、および α マンナンの機能的レセプターであること、Dectin-1 は *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) に対する感染防御、Dectin-2 は *Candida albicans* (*C. albicans*) に対する感染防御に重要な役割を担っていることなどを明らかにしてきたが、また、Dectin-1 が別の病原真菌である *A. fumigatus* の認識にも関与していること、Dectin-2 は真菌だけではなく寄生虫である *Schistosoma mansoni* の認識にも関与していることなどを見いだした(論文 1-3)。ところで、*C. albicans* は環境に応じ酵母型および菌糸型の二つの形態を示す二形性真菌であることが知られている。これまでの研究から、酵母型 *C. albicans* による骨髄由来樹状細胞(BMDC)からのサイトカイン産生は、Dectin-2 の欠損によりほぼ完全に抑制されるが、菌糸型 *C. albicans* では、Dectin-1 KO では阻害されず、Dectin-2 欠損による阻害も部分的であったことがわかっている。そのため、菌糸型 *C. albicans* は、Dectin-1 や Dectin-2 以外のサイトカイン誘導性のレセプターを持つことを予想した。ミエロイド系の細胞で、Dectin-1、Dectin-2 をはじめとする C 型レクチンは、Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を介して活性化シグナルを細胞内へ伝達するが、そのシグナル伝達系に必須なアダプター分子の CARD9 の KO マウスでは、菌糸型 *C. albicans* によるサイトカイン産生はほぼ完全に抑制されたことから、このレセプターは C 型レクチンである可能性が高いと考えていた。ところが、Dectin-1/-2 DKO マウスを作製したところ、予想に反してこのマウスでは菌糸型 *C. albicans* に対するサイトカイン産生もほぼ完全に抑制することが明らかとなった。さらに、Dectin-1 KO、Dectin-2 KO、Dectin-1/-2 DKO マウスを用いて感染実験を行ったところ、Dectin-1 KO マウスの生存率は野生型(WT)マウスと差を認められなかったのに対し、Dectin-1/-2 DKO マウスでは WT マウスとの比較だけではなく、Dectin-2 KO マウスと比較しても有意に生存率が低下することが明らかとなった。この結果から、Dectin-1 と Dectin-2 は共同してサイトカイン産生を誘導する機構があることが示された。

そこで、その collaboration 機構を明らかにする目的で、Dectin-1 と Dectin-2 の細胞内局在を検討したところ、Dectin-1 は細胞表面にも発現しているが、Dectin-2 の発現は細胞内により強く発現していることがわかった。さらに、Dectin-1/-2 DKO マウスの細胞でも、*C. albicans* は正常に細胞内へ取り込まれることが明らかとなった(図)。この結果から、*C. albicans* は、サイトカイン産生を誘導しない分子によって細胞内へ取り込まれることが示唆された。その後、細胞内で Dectin-1 と Dectin-2 によって認識されることでサイトカイン産生が誘導されることが予想される(論文投稿準備中)。

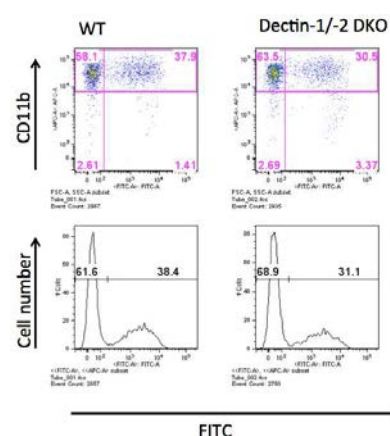


図 *C. albicans* は Dectin-1、Dectin-2 非依存的に宿主細胞に取り込まれる。

3. 今後の展開

本研究では、Dectin-1、Dectin-2 の2種類の C 型レクチンで病原真菌によるサイトカイン産生をほぼ完全に担っていることを明らかにした。より包括的な理解をすすめるために、今後は、

病原真菌による炎症反応の惹起と、そこから派生する Th17 細胞分化や好中球の遊走など、一連の炎症反応が、いつ、どの組織のどの細胞でおきるのか、などといった時空的制御機構について明らかにしていくことを目指したい。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、Dectin-1 と Dectin-2 による炎症反応を正に制御する機構に関しては一定の成果が得られたと考えている。当初、病原真菌は多種多様な C 型レクチンによって認識され、炎症性サイトカインの産生をはじめとする生物現象が誘導されると予想していたが、実際は細胞内へ取り込まれた病原真菌による炎症反応は Dectin-1 と Dectin-2 の2種類の分子によってほぼ完全に担われていることを見いだした。また、これらの分子は IL-10 産生を介して炎症を負に制御していることも見いだした。一方で、個々の現象をつないだ正の制御機構と負の制御機構の時空的制御機構については、不十分であると言わざるを得ない。今後は、より生理的な条件で炎症を誘導すること、レポーターマウスなどを取り入れて、解析を続けていきたい。本領域のアドバイザーおよび研究員との交流を通じて、研究計画に一定の進展があったことは非常に有意義であり、今後の研究に活かしていきたいと考えている。研究途上の成果については、早急に解析を進め、論文として発表していく予定である。

(2) 研究総括評価(公開項目)

C 型レクチンファミリー分子である Dectin-1 と Dectin-2 が、それぞれ β グルカンと α マンナンの機能的レセプターであることを明らかにするとともに、細胞内へ取り込まれた病原真菌による炎症反応は Dectin-1 と Dectin-2 の2種類の分子によってほぼ完全に担われていることを見出した。また、これらの分子は IL-10 産生を介して炎症を負に制御していることも見いだしており、国内外を通じてこの分野における先導的な研究を行っている点で、その成果のインパクトは大きいと評価される。しかしながら、これら C 型レクチンファミリー分子による炎症反応の制御が実験系によって一定しておらず、その機構についての解析も、まだ道半ばである。今後は、この複雑な制御機構の詳細解明を期待する。また、未発表の研究成果も多く、早期の論文文化が望まれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Saijo S, and Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol* 23: 467-472, 2011.
2. Rivera A, Hohl TM, Collins N, Leiner I, Gallegos A, Saijo S, Coward JW, Iwakura Y, and Pamer EG. Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation. *J Exp Med* 208(2): 369-381, 2011.
3. Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, and Brown GD. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol* 41: 276-281, 2011.
4. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, and Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34: 149-162, 2011.

5. Ahn J, Delia G, Saijo S, Barber GN, STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(47): 19386–19391. 2012

(2)特許出願

なし

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Saijo S. And Iwakura Y., The roles of Dectin-1 and Dectin-2 in the innate immune response. The 18th congress of ISHAM, Berlin, Germany, June 11–15, 2012.
2. Saijo S. C-type lectins : Their roles in innate and acquired immunity. JSICR-MMCB, Osaka Japan, May 25–27, 2011.

研究報告書

「慢性炎症における活性酸素シグナル伝達制御の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 澤 智裕

1. 研究のねらい

慢性炎症において過剰に生成する活性酸素や一酸化窒素は、遷延性、不可逆性の生体分子の修飾を介した酸化ストレスをもたらす、様々な病態形成に関わると考えられている。このため、活性酸素の消去剤を用いた抗酸化治療が試みられてきたが、慢性炎症疾患に対しては、未だ有効な成績が得られていないのが現状である。一方、活性酸素は、非特異的な酸化ストレスをもたらすだけでなく、厳密に制御されたシグナル伝達機能を有することが分かってきた。本研究では、活性酸素による遷延性、不可逆性の分子修飾そのものがシグナル伝達の制御に関わる可能性について検討し、その分子メカニズムの解明を目指した。またこのような活性酸素のシグナル経路が治療の標的として有効であるのかどうかの検証を行った。これにより、従来の活性酸素毒性説に基づく抗酸化治療とは全く異なる切り口から、新しい炎症・酸化ストレスの制御分子の発見と、それらを標的とした治療法、診断法の開発を目指した研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

活性酸素のシグナル伝達機構では、センサータンパク質と呼ばれる、分子内に酸化還元(レドックス)反応に感受性のシステイン残基をもち、このシステイン残基の化学修飾をスイッチとして、多彩なシグナル制御が行われる。本さがけ研究では、活性酸素の2次シグナル分子として、グアノシン環状ヌクレオチドである cGMP がニトロ化された 8-ニトロ cGMP に着目した。8-ニトロ cGMP は、センサータンパク質のシステイン残基と反応し、cGMP 構造を共有結合を介して付加するタンパク質 S-グアニル化をもたらす。本研究では、この 8-ニトロ cGMP/S-グアニル化シグナルに関わる新規標的タンパク質の探索、機能解析を行い、また、そのシグナルを負に制御する代謝経路の解明を目指した。さらに、この 8-ニトロ cGMP/S-グアニル化シグナルが慢性炎症の分子標的として有効であるかどうかを検証した。

2次元電気泳動と質量分析を組み合わせた S-グアニル化タンパク質の網羅的解析法(プロテオミクス法)を確立した。これにより、ミトコンドリアにおける S-グアニル化の標的タンパク質の同定に成功した。具合的には、炎症反応にともなって、ミトコンドリア熱ショックタンパク質が S-グアニル化されることを見出した。さらにこの熱ショックタンパク質の S-グアニル化が、ミトコンドリアからの活性酸素放出を増強し、その結果、8-ニトロ cGMP の生成が亢進するという、自己増幅的なメカニズムがあることを明らかにした。

もう一つの標的タンパク質として、低分子量 G タンパク質である H-Ras を同定した。心筋梗塞後の心不全発症における 8-ニトロ cGMP/S-グアニル化シグナルを解析した結果、心筋梗塞後に生成した 8-ニトロ cGMP が、H-Ras の持続的な活性化を介して心筋細胞の老化をもた

らしていることがわかった。さらに、siRNA スクリーニングにより、システイン代謝酵素であるシスタチオニンβ-シンターゼおよびシスタチオニンγ-リアーゼがイオウ代謝物の生成を介して、8-ニトロ cGMP を分解・代謝していることを明らかにした。そこで、心筋梗塞マウスモデルに、イオウ代謝物のモデル化合物として硫化水素ナトリウムを投与したところ、心機能の著しい改善が認められた。以上のことから、イオウ代謝物の制御に基づく新しい炎症性疾患の予防・治療法の可能性が示唆された。

(2) 詳細

「S-グアニル化タンパク質の網羅的解析法の確立とミトコンドリアタンパク質への応用」
S-グアニル化の標的タンパク質の探索を目的として、S-グアニル化タンパク質の網羅的解析法(プロテオミクス法)を確立した。具体的には、タンパク質試料を 2 次元電気泳動にて展開後、ひとつを S-グアニル化タンパク質に対する Western blotting、もう一つを銀染色した。Western blotting で発色したスポットに該当する部分を銀染色から切り出し、トリプシン処理した。得られたペプチド断片からタンパク質を同定した。本法を炎症反応によって亢進するミトコンドリアタンパク質の S-グアニル化の解析に応用した。その結果、内因性に S-グアニル化されるタンパク質として、ミトコンドリア熱ショックタンパク質である HSP60, stress-70 protein を同定した。近年、HSP60 がミトコンドリア内で膜タンパク質と複合体を形成し、ミトコンドリア膜の透過性を制御していることが明らかになってきた。そこで、8-ニトロ cGMP による HSP60 の S-グアニル化と膜透過性の関連について検討した。その結果、8-ニトロ cGMP は HSP60 の S-グアニル化と極めて良い相関を持ってミトコンドリアの膜透過性を亢進させることがわかった。また、これによりミトコンドリア内で生成した活性酸素の細胞質内への放出が促進されることがわかった。これまでの検討から、8-ニトロ cGMP の細胞内生成は、リポ多糖や炎症性サイトカインの刺激後、24-36 時間経過ののち、顕著になることがわかっていたが、そのような誘導期において、ミトコンドリア HSP60 の S-グアニル化を介して自己増幅的に活性酸素の放出が促進され、8-ニトロ cGMP が生成している可能性が示唆された。また、今回の結果は、これまでその分子実態が不明であった酸化ストレス依存性のミトコンドリア膜透過性亢進が HSP60 によって制御を受けている可能性を示す点で興味深い。過剰なミトコンドリア膜透過性亢進は、インフラマゾームの活性化など炎症反応の増悪に関与する可能性が示唆されている。HSP60 によるミトコンドリア膜透過性制御が炎症反応制御の標的となりうるかどうかについて今後の解析が課題である。

「8-ニトロ cGMP/S-グアニル化による H-Ras の活性化と心筋細胞老化」
心筋梗塞後の慢性心不全は世界的にも主要な死因である。これまでに心不全の進展において慢性炎症に基づく酸化ストレスの関与が示唆されているが、その分子基盤は不明な点が残されている。本研究において、西田基宏博士(岡崎統合バイオ)との共同研究により、心筋梗塞および圧負荷による心不全モデルマウスを作成して、心不全発症における 8-ニトロ cGMP/S-グアニル化シグナルについて解析した。心筋梗塞後 4 週間および圧負荷 6 週間の心臓組織を調べたところ、8-ニトロ cGMP の著明な蓄積が見られた。また、その心臓組織において、低分子量 G タンパク質である H-Ras が顕著に活性化されており、さらに H-Ras が 8-ニトロ cGMP によって S-グアニル化修飾されていることを見出した。組換えタンパク質や質

量分析、さらに細胞分画による解析の結果、H-Ras の 184 番目のシステイン残基が特異的に S-グアニル化され、それが H-Ras のラフト領域から非ラフト領域への局在を促進することで活性化に寄与していることが示唆された。心不全発症においてこれまで H-Ras の活性化を介した心筋細胞の老化が密接に関わることが示唆されている。そこで、8-ニトロ cGMP による心筋細胞および心線維芽細胞に対する老化誘導を解析した。その結果、8-ニトロ cGMP は H-Ras、特に 184 番目システイン残基の S-グアニル化に依存して、これら細胞の老化を誘導することが明らかとなった。以上の結果は、活性酸素による心筋老化促進機構として、8-ニトロ cGMP による H-Ras の活性化の関与を示唆したはじめての例である。そこでこの 8-ニトロ cGMP/S-グアニル化シグナルによる H-Ras の活性化を抑制が心不全発症を改善するかどうか、以下に検討を行った。

「8-ニトロ cGMP 代謝に関わるイオウ代謝酵素の同定：イオウ代謝に基づく心不全発症の予防」

8-ニトロ cGMP によるタンパク質 S-グアニル化を制御する機構は、活性酸素シグナルの制御に関わることが期待されるものの、その分子機構については不明であった。我々は、タンパク質 S-グアニル化に対する効果を指標とし、RNAi を用いたスクリーニングを行った結果、システイン代謝に関わるシスタチオニン β -シンターゼ (CBS) と、シスタチオニン γ -リアーゼ (CSE) という酵素をノックダウンするとタンパク質 S-グアニル化が著しく増強することを見出した。CBS、CSE による 8-ニトロ cGMP の制御機構を詳細に解析した結果、それら酵素から生成したイオウ代謝物である活性イオウ種が 8-ニトロ cGMP を 8-SH-cGMP へと変換し、さらに生成した 8-SH-cGMP が活性酸素によって cGMP へと変換されることで、8-ニトロ cGMP シグナルが収束していることが分かった。また、我々はごく最近、このような活性イオウ種として、システインチオール基にイオウ原子が付加したパースルフィド・ポリスルフィド分子を同定した (未発表データ)。心筋梗塞を起こした心臓では、このようなイオウ代謝物・活性イオウ分子による 8-ニトロ cGMP の代謝が十分に行われず、その結果、過剰な 8-ニトロ cGMP の蓄積が起こっていることが考えられた。そこで、心筋梗塞を起こしたマウスに、イオウ代謝物のモデル化合物として硫化水素ナトリウムを投与し、心機能がどのようになるかを調べた結果、硫化水素ナトリウムを投与したマウスでは、著しい心機能の改善が見られた。以上の結果は、活性酸素と活性イオウ種のクロストークを介したこれまでに知られていない新しい炎症反応の制御機構を示唆しており、活性イオウ種の生体内生成を標的とした炎症性疾患の治療法開発への展開が期待される。

3. 今後の展開

今回のさきがけ研究において、炎症反応による酸化ストレスの新しい抑制機構として、システイン代謝と関連したイオウ代謝物の重要性を発見した。今回実験に用いた硫化水素ナトリウムは、高濃度において毒性があることや、不安定で取り扱いにくいことなどから、ヒトへの治療へ応用するためには、今後、同様のはたらきがある安全で取り扱いの容易な治療剤の開発が期待される。このような治療剤として、現在我々は、パースルフィドという活性イオウ分子種に注目して研究を進めている。一方、生体内におけるイオウ代謝、特に活性イオウ分子種の生成について

は、これまでほとんど解析が進んでいない。ヒトではメチオニン、シスチンなどをイオウ源として食餌性に摂取し、体内で活性イオウ分子種へと変換される機構が考えられる。このようなイオウ代謝を切り口とした新しい炎症制御の可能性についても今後さらなる検討を進める必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究の目的であった活性酸素に依存して制御されるシグナル伝達経路として、網羅的解析(プロテオミクス)と機能からの解析という2つの異なるアプローチから、S-グアニル化の標的タンパク質としてミトコンドリア熱ショックタンパク質とH-Rasを同定できたことは、評価に値すると考えられる。ただ、細胞内のタンパク質の中から、なぜ特定のタンパク質にS-グアニル化が誘導されるのか、その選択性の発現機構については、明確な答えを得ることができていない。この点は、活性酸素のシグナル伝達がどのような選択性を持って厳密に制御されているかを明らかにする上で本質的な問題であると考えられる。今回のさきがけ研究を進める中で、8-ニトロ cGMP および S-グアニル化タンパク質の代謝機構が明らかになりつつあることから、今後はこれら代謝機構を阻害剤や siRNA などを駆使して変動させながら、S-グアニル化の選択性発現の解明に取り組むことが課題である。一方、イオウ代謝物による活性酸素シグナルの制御についてはこれまでほとんど報告がなく、酸化ストレスの新しい制御系として、今後、さらに炎症制御との観点から研究を展開できるようにしたい。

(2) 研究総括評価(公開項目)

活性酸素の2次シグナル分子である8-ニトロ cGMP によりS-グアニル化されるタンパク質としてミトコンドリア熱ショックタンパク質と細胞老化の制御に関わるH-Rasを同定し、それらのS-グアニル化タンパク質の機能解析を行うと共に、心筋梗塞モデルにおける炎症・細胞老化促進機構へのS-グアニル化H-Rasの関与を明らかにした。同時に同定した心臓内でほとんど発現しないニトロ cGMP の細胞内代謝・分解を行う2つの酵素が生成するイオウ代謝物(硫化水素)により8-ニトロ cGMP シグナルが収束することなどを明らかにする報告を行った。独創性・新規性の高い活性酸素シグナルの制御に関する成果と評価される。未発表データの論文化も予定されており、今後さらに新しい炎症制御機構が明らかになることが期待できる。どのように慢性炎症の病因病態論へとつながっていくのか、今後の展開が大変楽しみである。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishida, M.,* Sawa, T.,* Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H. van der Vliet, A., Freeman, B.A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y. and Akaike, T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophilic sulfhydration. **Nat. Chem. Biol.**, 8: 714-724 (2012). (* equal contribution)
2. Ahmed, K. A., Sawa, T., Ihara, H., Kasamatsu, S., Yoshitake, J., Rahaman, Md. M.,

Okamoto, T., Fujii, S. and Akaike, T. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *Biochem. J.*, 441: 719-730 (2012).

3. Rahaman, Md.M.,* Sawa, T.,* Ahmed, K.A., Khan, S., Inoue, H., Irie, A., Fujii, S. and Akaike, T. S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, (2102) in press. (* equal contribution)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【総説及びその他の共著論文】

1. Sawa, T., Ihara, H., Ida, T., Fujii, S., Nishida, M. and Akaike, T. Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide. *Nitric Oxide*, 34: 10-18 (2013).
2. Ito, C., Saito, Y., Nozawa, T., Fujii, S., Sawa, T., Inoue, H., Matsunaga, T., Khan, S., Akashi, S., Hashimoto, R., Aikawa, C., Takahashi, E., Sagara, H., Komatsu, M., Tanaka, K., Akaike, T., Nakagawa, I. and Arimoto, H. Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. *Mol. Cell* (2013) in press.
3. Karim, Md.F., Yoshizawa, T., Sato, Y., Sawa, T., Tomizawa, K., Akaike, T. and Yamagata, K. Inhibition of H3K18 deacetylation of Sirt7 by Myb-binding protein 1a (Mybbp1a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 441: 157-163 (2013).
4. Watanabe, K., Ishima, T., Akaike, T., Sawa, T., Kuroda, T., Ogawa, W., Watanabe, H., Suenaga, A., Kai, T., Otagiri, J. and Maruyama, T. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J.*, 27: 391-398 (2013)
5. Sato, Y., Hatta, M., Karim, Md.F., Sawa, T., Wei, F.Y., Sato, S., Magnuson, M.A., Gonzalez, F.J., Tomizawa, K., Akaike, T., Yoshizawa, T. and Yamagata, K. Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.*, 287: 23236-23245 (2012).

【和文著書・総説】

1. 西田基宏、澤 智裕. 心不全におけるGタンパク質の酸化修飾と活性酸素・親電子シグナル制御. *細胞工学*, 31: 150-154, 2012.
2. 澤 智裕、赤池孝章. 活性酸素のシグナル伝達系と分子標的. *日本臨床*(増刊号), 70: 273-276, 2012.
3. 澤 智裕、赤池孝章. ROS・親電子リガンドとガス状分子のシグナルネットワーク. *実験医学*(増刊), 30: 64-69, 2012.
4. 澤 智裕、赤池孝章. NO シグナリング研究の最前線. *Heart View*, 17: 88-92, 2013.
5. 西田基宏、澤 智裕. 硫化水素アニオンによるレドックス恒常性制御とその臨床応用. *生化学*, 印刷中.

6. 澤 智裕、赤池孝章. 活性酸素とガス状分子のシグナルネットワーク. **医学のあゆみ**, 印刷中.
7. 澤 智裕、居原 秀、赤池孝章. 細胞の酸化ストレスを量るー親電子化合物 8-nitro-cGMP の定量を例にー. 見つける、量る、可視化する！質量分析実験ガイド:**実験医学別冊**(杉浦悠毅、末松 誠 編)、羊土社、151-158, 2013.

【学会発表】

1. 澤 智裕、赤池孝章. 酸化ストレス応答のケミカルバイオロジー. 第 84 回日本生化学会大会(シンポジウム), 2011 年 9 月 23 日, 京都.
2. 澤 智裕、赤池孝章. 酸化ストレス応答のケミカルバイオロジー. 千里ライフサイエンスセミナー「ストレス応答の分子メカニズム」, 2011 年 11 月 14 日, 大阪.
3. 澤 智裕、赤池孝章. NO の多様性にケミカルバイオロジーで迫る！新薬理学セミナー(招待講演), 2012 年 6 月 30 日, 徳島.
4. Sawa, T., Rahaman, Md.M. and Akaike, T. Redox-based mitochondrial signaling regulated by a nitrated nucleotide via post-translational modification of mitochondrial heat shock proteins. JST-CREST International Symposium, Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease, Tokyo, February 12, 2013.
5. 澤 智裕. 新規活性イオウ分子システインパースルフィドの生成と酸化ストレス制御. 第 12 回生物化学若手研究者セミナー(招待講演), 2013 年 9 月 7 日, 仙台.

【プレスリリース、新聞報道など】

1. 「硫化水素が心不全を改善する仕組みを解明～心不全の治療薬開発に期待～」(2012 年 7 月) http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2012_file/release120704-4.pdf
2. 新聞報道「硫化水素で心機能改善:治療薬に期待」(熊本日日新聞、平成 24 年 7 月 5 日)

研究報告書

「質量分析イメージングによる炎症メディエーター分子の局在産生の可視化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 杉浦 悠毅

1. 研究のねらい

本さがけ研究では、新しい分子イメージングの手法、“質量分析イメージング”を発展させ応用することで、これまでに局在可視化の手段がなかった低分子炎症メディエーターのイメージング法として確立した。さらに、その慢性炎症疾患研究への応用を行った。

健常な炎症では、浸潤した免疫細胞(間質細胞)と臓器実質細胞が相互作用をし、炎症の惹起-維持-収束が限局された組織領域でのみ生じる。この様な局所における細胞間の相互作用を担う「低分子炎症メディエーター」は強力な生理活性ゆえに、時空間的に高度に偏在制御された産生/分泌/分解機構を有するオートコイドである(例えばプロスタグランジン)。それゆえ、正常な炎症プロセスが破綻した慢性炎症の病態進行において、このような炎症メディエーターの産生制御の破綻に端を発し慢性化が進行することは想像に難くない。従ってメディエーター分子の時空間的な偏在情報(when? where? How much?)は、可逆的炎症から慢性炎症への病態進行機序の解明と、また進行度評価に重要なものとなり得る。

ところが、既存の実験手法ではこれらの産生責任細胞や作用範囲を *in situ* で明確にイメージングすることは出来ない。すなわち、タンパク質因子(サイトカイン、ケモカイン)については、特異的な抗体を用いた免疫染色や転写物 *in situ* ハイブリダイゼーション等が分子イメージング法として存在する。反面、生理活性脂質を中心とする低分子には、現在に至るまで汎用的かつ有効な分子イメージング手法は存在しない(表1)。

炎症メディエーターの定量、定性-研究ツール

メディエーター分子	定量法	分子イメージング法
サイトカイン	ELISA	免疫染色法
ケモカイン	ELISA	免疫染色法
タンパク質分解酵素	ELISA	免疫染色法
生理活性脂質	ELISA/ 質量分析	質量分析イメージングへ

(表1) 低分子炎症メディエーター可視化法として質量分析イメージングの必要性

本研究では、この“技術のギャップ”を質量分析イメージングを発展させ埋めることを狙いとした。研究の結果、質量分析イメージングの汎用性、微量分析、多種分子の一斉検出という特性を利用することで、生理活性を持つ脂質、アミノ酸、アミンなど多岐に渡るシグナル分子群の局在イメージングを実現した。さらに、未達成であったナノM からピコM の低濃度メディエーター分子の局在情報の取得にも成功した。最適化した質量分析イメージングを駆使することで、炎症急性期-慢性期における生理活性脂質の産生機序の差異の知見を得るに至った。

2. 研究成果

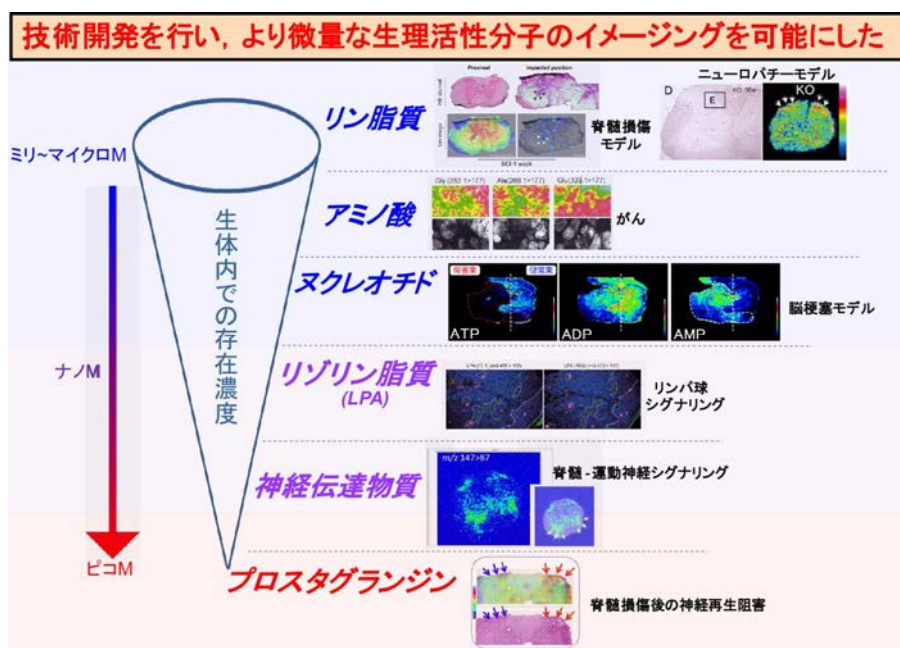
(1) 概要

① 高感度化を目的とした技術開発

本さがけ研究において、まず私は既存質量分析イメージングからの大幅な検出感度向上を目指した。何故なら、従来法では生体内濃度がミリ～マイクロ M の分子イメージングの報告に留まっており、私が目指す最も微量のメディエーター分子のイメージング達成には実に 10^6 オーダー以上の高感度化が必要であったからである。この困難な課題解決のために、メソロジーの包括的再構築を行なった。具体的にはメディエーター分子が動物組織中で保持されるサンプル調整法確立(I)にまで立ち返し、その後の各ステップごとに組織切片上での化合物誘導体化法の開発(II)、シグナル特異性を向上させる多段階質量分析法の適用(III)等の技術開発を行い、従来は検出することが出来なかった生理活性化合物群を、新たに数十種類イメージングする事に成功した(図1)。これらの中には、神経伝達物質や生理活性脂質など、低濃度(ナノ～サブナノ M)で受容体を介した生理活性を示すメディエーター分子群が含まれる。

② 炎症慢性化過程の分子イメージング

新たに開発したイメージング法を適用することで、従来実現できなかった『*in situ* で細胞間のメディエーター分子を介したシグナル伝達をイメージング』する事が可能となった。まず、正常なリンパ節組織において、特定の血管内皮細胞がリンパ球ホーミングに関与する生理活性脂質を特異的に産生することを実証した。次に様々な疾患モデルに本法を適用し、『*in situ* でどの細胞領域が炎症メディエーター分子を産生しているか』を検証した。その結果、特に脊髄損傷モデルでは、免疫細胞浸潤が見られる炎症急性期から、それらの消失を伴う慢性期へかけて産生される生理活性脂質の分子種が変化し、この内疼痛を惹起するリゾフォスファチジン酸(LPA)の産生細胞種が変化する(浸潤免疫細胞からリモデリングされた実質細胞へ)現象が観察された。



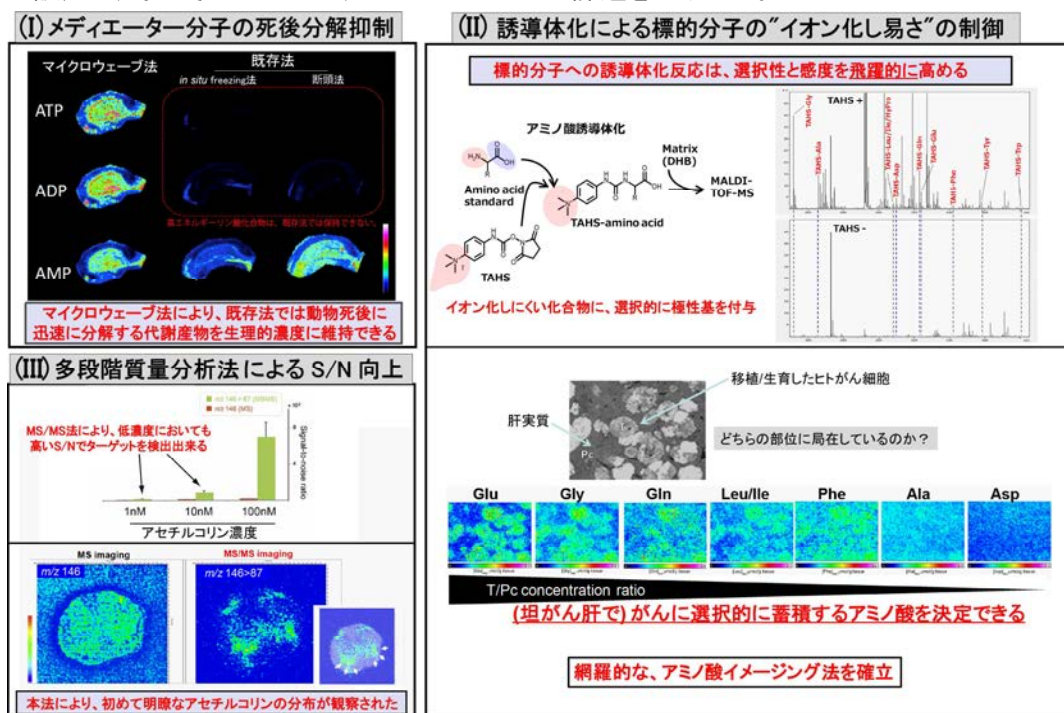
(図1) 技術開発を行い、従来は検出することが出来なかった生理活性化合物群を新たに数十種類イメージングする事に成功した

③ *in situ* での細胞エネルギー代謝の可視化

さらに上記の過程で、偶然に安定同位体標識化合物を用いた『*in situ*で細胞がどのようなエネルギー代謝経路を用いているか』をイメージングする技術を開発した。これにより当初想定していなかった、「炎症により活性化した免疫細胞の特異的なエネルギー代謝経路亢進」を定量する事が可能となり、また細胞(領域)の代謝経路変化を組織内でイメージングに成功した。

(2) 詳細

① 質量分析イメージングの高感度化に際しては、具体的には以下 3 点を主要技術課題として設定し、それぞれについて異なるアプローチで課題を達成した。



(図 2) 高感度化を達成するために、掲げた 3 つの技術課題を異なるアプローチで達成した。

(I) メディエーター分子の死後分解抑制 : 蛋白質と異なり、低分子化合物は動物臓器内において死後に非常に迅速に分解され(秒オーダー)、感度低減の一因となる。この分解抑制の為に、生体の酵素を一秒以内に不活性化する Microwave fixation 法を導入した。その結果、代謝産物死後分解をほぼ完全に抑制することができた。この成果により、動物個体の臓器採取から分析に至るまで、アーチファクトを排除した最適な試料調整法を確立した。

(II) 誘導体化による標的分子の“イオン化し易さ”の制御 : 質量分析イメージングでは対象分子をイオン化させる必要がある為、“標的分子のイオン化し易さ(イオン化効率)”が感度に大きく関わる。この効率を制御するため、生体分子を組織上で誘導体化し、高効率にイオン化及び高感度に検出する事に成功した。これは微量分子の検出感度を飛躍的に高める化学反応を生体組織上で促進させ、ナノ mol/cm³ 程度の微量分子のイメージングを可能とする技術である。図 2 ではアミノ酸の選択的誘導体化により、腫瘍に蓄積するアミノ酸を網羅

的にイメージングした例を示している。

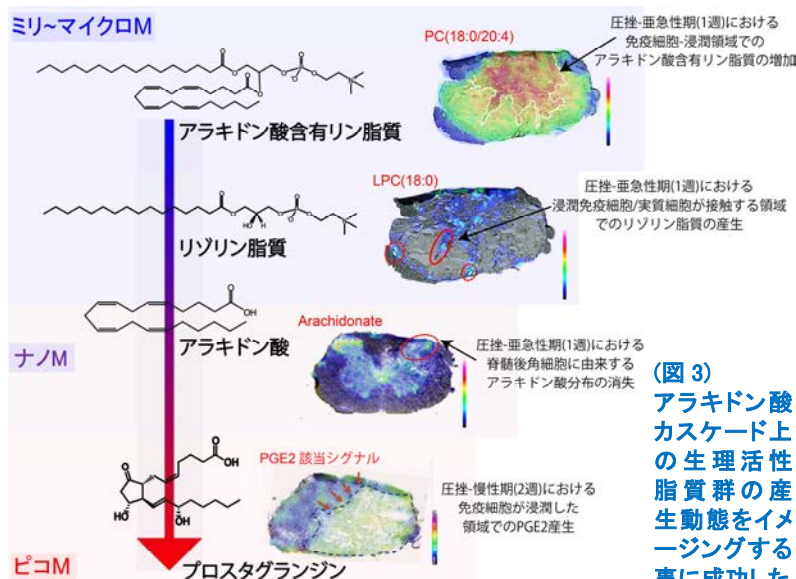
(III) 多段階質量分析法の導入による S/N 向上 : 一般に微量分子のイメージングを行う際には、シグナルに混入する非特異的な“ノイズ”低減の工夫が必須である。この課題を達成するために多段階質量分析法を導入した。具体的には、対象分子の質量電荷比のみでなく、対象分子固有の“フラグメント(断片)”イオンの質量電荷比の“二重のフィルター”を設定することで、非特異的なノイズ低減による大幅なシグナル S/N の向上を達成した。この結果、これまでは不可能であったアセチルコリンの局在イメージングに成功した。

② 新たに開発したイメージング法を、急性障害後に慢性炎症を伴って病態が持続・悪化する疾病モデル(脊髄損傷、脳梗塞、心筋梗塞)と、炎症とともに病態が慢性的に悪化する疾病モデル(ニューロパチー、がん)に適用した。紙面の都合でここでは代表的な例として、脊髄損傷モデルの例について報告する。

【脊髄損傷モデルラットにおける急性/慢性期で異なる炎症メディエーター分子産生実態】

圧挫による脊髄損傷モデルラットの脊髄では、位置と時期によって大きく異なる免疫細胞浸潤と実質細胞構成の変化が見られる。まず損傷中心部でニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは直達外力により挫滅損傷を受ける(一次損傷)。次に、炎症性細胞の浸潤により血液脊髄関門(BBB)が破壊された微小血管から白血球やマクロファージが浸潤し、炎症メディエーターの放出や貪食作用などにより周囲の細胞までが壊死やアポトーシスに陥る(炎症の周囲への波及=二次損傷)。このような脊髄損傷モデルラットにおいて、質量分析イメージングによりアラキドン酸カスケード最上流のアラキドン酸含有リン脂質から、最下流の生成物プロスタグランジンに至るまで、多様な生理活性脂質の産生動態をイメージングする事に成功し、それぞれの時空間的に特徴的な産生プロファイルを明らかにした(図 3)。

顕著な一例としては、急性期から慢性期における微量生理活性脂質-リゾフォスファチジン酸(LPA)分子種群のイメージングが挙げられる。イメージングの結果から、脊髄損傷組織における LPA 分子種の局在は、急性期には局所的な出血/免疫細胞浸潤領域で見られるのに対し、慢性期ではリモデリングが進んだ実質細胞の部位に収束することが分かった。LPA は脊髄損傷後の慢性疼痛に関与する事が知られているが、炎症が沈静化、血球細胞が消失した後、空洞化した損傷中心部および炎症の波及した範囲を取り囲むように、増殖した反応性アストロサイトが慢性期においては異常な量の LPA を産生していることが示唆された。本研究では、この例が示すように、可視化することで初めて分かる、急性/慢性期で異なる炎症メディエーター分子産生実態を明ら



かにした。

3. 今後の展開

第一に、本さがけ研究を通して、これまでには存在しなかった低分子炎症メディエーターのイメージング法を創出する事が出来た。低分子炎症メディエーター産生動態は、動物臓器における炎症の有用な「分子フェノタイプ」である。健常な炎症プロセスが慢性炎症に移行していく疾病モデル研究において、そのような生理活性分子の時空間的な偏在を検証できる本分子イメージングツールは基礎研究における広い浸透と運用が期待できる。既に、本技術を有効に用いた多くの慢性炎症の共同研究が展開している。

第二に、質量分析イメージングが提供する局在情報は、強力な生理活性を持つ炎症メディエーター分子が「炎症惹起組織のどの細胞(領域)が産生しているか」、という問いに対して重要な示唆を与える。上述の脊髄損傷モデルにおいては、実際に同一のメディエーター分子であっても、急性期/慢性期で産生細胞が変遷している知見が得られた。このように、すり潰した試料の解析のみでは得られない知見に拘り、中でも脊髄損傷モデルにおいて、浸潤免疫細胞ではなくリモデリングされた実質細胞によるメディエータ産生を介した炎症遷延化のスキームのを明らかにしたい。

第三に、紙面の都合で詳述できなかったが、本さがけ研究を行う過程で、当初想定していなかった『in situ で細胞がどのようなエネルギー代謝経路を用いているか』をイメージングする技術を開発するに至った。これは、「外因性の安定同位体で標識した化合物」をトレーサーとして用いた細胞/臓器の代謝経路フラックスの定量/イメージング法である。具体的には、 ^{13}C で標識したグルコースから代謝-生成された化合物は、 ^{13}C を含むため、質量分析では内因性化合物と区別して定量/イメージングすることができる。この為に、例えば ^{13}C 標識グルコースを投与し、 ^{13}C 含有乳酸を定量/イメージングすれば、特定の細胞で『好氣的-解糖がどの程度亢進したか?』『嫌氣的-解糖系はどの程度用いられたか?』といった問いに確定的な解を与える事が出来る。

一般に活性化した免疫細胞は、各々の免疫機能発現(例えば、急速な分化増殖、抗体産生、貪食能亢進 etc.)のために resting-state ととは明らかに異なるエネルギー代謝を行う。しかし、この事の *in vivo* (*in situ*) での実証はない為、今回開発した代謝フラックスイメージング法は、実際の炎症組織における、そのような特異的エネルギー代謝を理解するために必須のツールであると考え。プレリナリーなデータでは、脊髄損傷モデル-亜急性期の免疫細胞浸潤領域では、明らかに低酸素応答に類した細胞エネルギー代謝が亢進していた。一部の炎症が遷延化した組織領域の細胞は低酸素状態に置かれていることが知られているが、今後、このような低酸素症が単なる付随的事象ではなく、炎症遷延化に影響を及ぼす直接原因となり得ることを検証したい。すなわち、血管閉塞のような直接的な原因、または他の要因による組織のリモデリングのような間接的な原因により、炎症部位の実質/間質細胞が低酸素に曝され、このストレスによる代謝改変がさらに自身/周囲の細胞にフィードバックをかけることで炎症を持続、遷延化させるという仮説の検証を行いたい。

4. 評価

(1) 自己評価

新しい分子イメージングの手法、“質量分析イメージング”を発展させ応用することで、これまでに局在可視化の手段がなかった低分子炎症メディエーターのイメージング法として創出すること、さらに、その慢性炎症疾患研究への応用を行うことが私のさきがけ研究のテーマである。

「技術開発」の側面において、研究の結果、質量分析イメージングの汎用性、微量分析、多種分子の一斉検出という特性を利用することで、生理活性を持つ脂質、アミノ酸、アミンなど多岐に渡るシグナル分子群の局在イメージングを実現し、さらに、未達成であったナノMからピコMの低濃度メディエーター分子の局在情報の取得にも成功した。

また、さきがけ研究のスタート以降、私達自身が行った質量分析イメージングによる知見は免疫学(*J. Immunology.*, 2013)、生化学(*J. BioChem.*, 2011)、神経科学(*Neuroscience*, 2011)等の幅広い生物学の各分野でも認知され、技術の浸透は着実に進んでいる。

さらに研究開始当初は予定していなかったが、「外因性の安定同位体で標識した化合物」をレーザーとして用いた細胞/臓器の代謝経路フラックスの定量/イメージング法は、*in situ* で免疫細胞のエネルギー代謝を測定する新しい可能性を提供し、例えば、「炎症を惹起した生体局所における、免疫細胞活性化“維持”に必要な特異的なエネルギー代謝機構の解明」等が期待出来る、ユニークかつ発展性のある見込みのツールとなった。以上の技術開発の成果と、その浸透の早さは、私が研究開始当初考えていた予想を超えるものであり、一定の自己評価を与えて良いと考えている。

一方で、「炎症の慢性化機構の解明と制御」に直接貢献する「個別の疾患研究テーマ」に関しては、今後もさらに進展させていく必要がある。

最後に、3年間の研究実施期間において、申請時に掲げた、医学—分析化学—工学と一体になった取り組みを全力で行なう事が出来たと考えるが、それらの成果は、本さきがけ領域のアドバイザーの先生方、さきがけ研究者仲間との数多くの共同研究、議論によるところが大きく、このような研究機会を与えていただいた高津総括をはじめとするアドバイザーの先生方に深く感謝いたします。

(2) 研究総括評価(公開項目)

質量分析イメージングの手法を発展させ、これまで局在可視化の手段がなかった低濃度(ナノ～サブナノM)で存在する低分子炎症メディエーターなどの時空間的なイメージング法を確立した。それを達成するため、本研究ではメディエーター分子の死後分解を抑制する組織サンプル調製法の確立、飛躍的な検出感度向上のための切片上での化合物誘導体化(イオン化効率向上)法の開発、非特異的なノイズ低減のための多段階質量分析法の適用などの技術開発を行い、アセチルコリン、アラキドン酸カスケードやエネルギー代謝経路の一連の化合物、リゾリン脂質類、アミノ酸類などの複数分子を同時に組織切片上において質量分析イメージングすることを達成した。これまでに、脊髄損傷、脳梗塞、心筋梗塞、ニューロパチー、がんなどのモデルに本手法を適用して成果を上げており、今後より広範な研究領域で汎用されることが期待できる画期的な技術であると評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Toue S*, **Sugiura Y***, Kubo A, Ohmura M, Karakawa S, Mizukoshi T, Yoneda J, Miyano H, Noguchi Y, Kobayashi T, Kabe Y, and Suematsu M, "Microscopic imaging mass spectrometry assisted by on-tissue chemical derivatization for visualizing multiple amino acids in human colon cancer xenografts", *Proteomics*, in press, (2013) *; **equally contribution**
2. **Sugiura Y**, Honda K, Kajimura M and Suematsu M, Visualization and quantification of cerebral metabolic fluxes of glucose in the awake mice, *Proteomics*, in press, (2013)
3. **Sugiura Y**, Zaima N, Setou M, Ito S, Yao I. "Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry", *Anal Bioanal Chem* 403, 1851-61 (2012)
4. Hanada M*, **Sugiura Y***, Shinjo R, Imagama S, Ishiguro N, Matsuyama Y, Setou M. "Spatiotemporal alteration of phospholipids and prostaglandins in a rat model of spinal cord injury", *Anal Bioanal Chem* 403, 1873-84 (2012) *; **equally contribution**
5. Bai Z, Cai L, Umemoto E, Takeda A, Tohya K, Komai Y, Veeraveedu PT, Hata E, **Sugiura Y**, Kubo A, Suematsu M, Hayasaka H, Okudaira S, Aoki J, Tanaka T, Albers HM, Ovaa H, Miyasaka M. "Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis." *J Immunol.* 190, 2036-48 (2013)

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表, 受賞, 著作物, プレスリリース等)

著作物

* 杉浦 悠毅、末松誠 編、質量分析実験ガイド、実験医学別冊(羊土社)



質量分析は、生物学研究において重要な技術の核を成すものである。しかし技術革新のスピードは速く、これらを貪欲に取りこむことが今後はますます重要になるかと考え、そのような一助となるべく書籍『質量分析実験ガイド-見つける、量る、可視化する』という本を企画、編集、執筆した。

主要な招待講演

杉浦 悠毅 質量分析で代謝を視る(招待講演)

質量分析学会春季シンポジウム、発表日:2011-05-09

杉浦 悠毅

イメージングマスペクトロメリーによる脳の代謝の視覚化(招待講演)

第36 回日本医用マスペクトル学会年会、大阪、発表日:2011-09-16

Yuki Sugiura

An optimized organ fixation technique for imaging and quantitative mass spectrometry for high energy phosphate-metabolites,

60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 発表日:2012-05-24

Sugiura Y.

Visualization and quantification of brain metabolic fluxes of glucose in the awake mice by mass spectrometry.

4th AOMSC & 10th TSMS Annual Conference, 発表日:2013-07-12

杉浦 悠毅

グルコース代謝を可視化する -代謝”フラックス”の質量分析イメージング-

島津製作所セミナー『メタボロミクスを拓く』,東京, 発表日:2013-07-23,24

企画したシンポジウム

アウトリーチ活動の一環として、「質量分析技術のライフサイエンスへの応用」をテーマとし、以下2つのシンポジウムを自らが企画し、さらに講演を行なった。

シンポジウム名	シンポジウム「質量分析で何か出来るか?・生命科学研究での有用性-」
日時	2012 年 9 月 26 日
場所	医学部総合医科学研究棟ラウンジ
参加人数	100 名

概要	質量分析のアプリケーションを「見つける」「量る」「可視化する」と題し、各応用研究を紹介した。  
-----------	--

シンポジウム名	シンポジウム「先端メタボロミクスを駆使して展開する新しい代謝生物学」
日時	2013 年 9 月 18 日
場所	医学部総合医科学研究棟ラウンジ
参加人数	80 名

概要

昨年のシンポジウム「質量分析で何か出来るか？-生命科学研究での有用性-」の続編として、質量分析技術を用いた代謝生物学に焦点を当てた講演会を開催した。



研 究 報 告 書

「ミトコンドリアのストレス受容・応答機構と炎症制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年3月～平成26年3月

研 究 者: 武田 弘資

1. 研究のねらい

さまざまな外的環境要因や内的環境要因に対する生体の防御反応である炎症は、免疫系を中心とする多くの組織において機能する各種細胞によって精緻に制御されている。しかし精緻なシステムがゆえに、わずかな調節機構の狂いであっても的確な制御が失われ、炎症の慢性化に結びつく。そのため、炎症の制御に携わるすべての細胞が、外的・内的環境を常に感知してその変動に対応する機能を備えており、多段階での炎症応答のファインチューニングを可能にしていると考えられる。

本研究では、そのような外的・内的環境の細胞内感知システムとしてミトコンドリアに着目した。ミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生のものであるだけでなく、 Ca^{2+} のバッファーとして細胞内 Ca^{2+} シグナルに積極的に関わったり、細胞死の誘導に関わったりと多彩な機能をもつ。その一方で、さまざまなストレスに対して非常に感受性の高いオルガネラで、ストレスによるさまざまな障害を受け、内膜を隔てたプロトン勾配によって維持される膜電位の低下に至る。それに対してミトコンドリアには、自身の膜電位低下を感知し、その情報をミトコンドリアの品質管理マシナリーや他のオルガネラに向けてシグナルとして発信することで適切な細胞応答を誘導する機構が備わっていると考えられている。本研究では、そのようなミトコンドリアに加わったストレスに対する受容・応答機構が、細胞傷害性ストレスに対する防御に働くだけでなく、炎症の制御にも積極的に働くことを示すとともに、ミトコンドリアという一つのオルガネラが、炎症の制御にどのように関わっているかを解明することを目的とした。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、ミトコンドリアにおけるストレス受容に働く分子として、PGAM5 に着目した。この分子は、解糖系において機能するホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM)と高い相同性を示すものの、PGAM 活性は示さず、セリン／スレオニン特異的プロテインホスファターゼとして機能する。PGAM5 欠損ショウジョウバエの解析からは、PGAM5 がホスファターゼ活性依存的に個体レベルでの熱ショックストレス耐性に寄与していることが示された。一方で、PGAM5 がおもにミトコンドリアの内膜に局在し、ミトコンドリアの膜電位低下にともなって膜内切断を受けることが分かった。よって PGAM5 は、ミトコンドリアの損傷や機能低下の程度を感知し、その情報を他の分子にシグナルとして伝達する役割を担っていると考えられる。

この分子の炎症における役割を解析する上で、最近その制御にミトコンドリアが深く関わっていることが注目されている NLRP3 インフラマソームに着目した。NLRP3 インフラマソームは、さまざまな Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)や Damage-associated molecular pattern(DAMPs)に応答して形成される細胞内タンパク質複合体で、IL-1 β や IL-18

などの炎症性サイトカインの産生・分泌を担っている。PGAM5 ノックアウトマウス由来のマクロファージや樹状細胞を用いて解析を行ったところ、数多く知られている NLRP3 インフラマソームの活性化刺激のうち、ごく一部に対する応答にのみ PGAM5 が関与することを示唆する結果が得られた。それをふまえて、NLRP3 インフラマソームの各種活性化刺激に対するミトコンドリアの応答や、インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの機能の必要性を詳細に調べてみると、刺激の種類に応じて非常に多様なミトコンドリアの関わり方があったことが分かってきた。このような多様性から、ミトコンドリアの状態に応じてインフラマソームの活性化が質的あるいは量的に変わること、さらには炎症の慢性化機構にミトコンドリアが深く関わっていることが予想される。

(2) 詳細

1. PGAM5 の分子機能解析

以前我々は、PGAM5 がミトコンドリアに局在し、新しいタイプのセリン／スレオニン特異的プロテインホスファターゼとしてストレス応答性 MAP キナーゼ経路の制御に関わることを示していた。その後の解析により、さまざまな細胞傷害性ストレスに応答して PGAM5 が自身の N 末端側に存在する膜貫通ドメイン内で切断されることを見出したことから、本研究ではその機構の解析から進めた。

まず PGAM5 が、膜貫通ドメインを介してミトコンドリアの内膜に、酵素活性を担う PGAM ドメインを膜間腔側に向けて局在していることを明らかにした。また、切断型分子のみを特異的に認識する抗体を作製して解析を進めたところ、PGAM5 の膜内切断が、ミトコンドリアの内膜を隔てて維持されている膜電位の低下に依存していることが分かった。さらに、その切断を担う酵素として、PGAM5 と同じく内膜に局在するロンボイド型セリンプロテアーゼ PARL を同定した。興味深いことに PARL は、若年性パーキンソン病の原因遺伝子産物として知られている PINK1 というプロテインキナーゼの切断に働くことが最近報告され、PINK1 はマイトファジーと呼ばれるミトコンドリア選択的な分解・排除機構に働くことから、PARL-PINK1 系がミトコンドリアの品質管理に非常に重要な役割を担っていると考えられている。PINK1 との関連を検討したところ、PARL は定常状態では PINK1 を切断するのに対し、ミトコンドリアの膜電位低下に際しては基質を変えて PGAM5 の切断に働くことが明らかとなった (Sekine et al. J. Biol. Chem. 2012)。以上の結果から、PGAM5 は、ミトコンドリアの傷害や機能低下の程度を感知し、その程度に応じた適切な細胞応答を促すためのシグナル伝達を担っていると考えられる。

PGAM5 の生体における機能についてはショウジョウバエを用いて解析を進めた。PGAM5 欠損ショウジョウバエを作製し、さまざまなストレスに対する個体レベルでの応答を検討した結果、通常の飼育温度 25℃を 37℃に高めることで熱ショックを加えると、野生型個体と比較して早期に死亡することを見出した。さまざまな遺伝学的な解析の結果、キノコ体と呼ばれる昆虫の脳において高次機能を担う領域で、PGAM5 欠損個体では熱ショックによる神経細胞のアポトーシスが亢進しており、それが、PGAM5 欠損個体が熱ショックに対して脆弱になっている原因であることが分かった。すなわち、PGAM5 は、熱ショックによる神経細胞のアポトーシスを抑制する働きをもつことが明らかとなった (Ishida et al. PLoS ONE 2012)。逆に、ショウジョウバエの複眼に PGAM5 を過剰発現させると、ホスファターゼ活性依存的に rough eye と呼ばれ

る形態異常が誘導された。その際、幼虫期においてはアポトーシスが亢進していたことから、PGAM5 がアポトーシスを促進する活性も有することが分かった。以上の結果から、PGAM5 は、細胞の種類やストレスの種類、あるいはストレスを受ける状況などに応じてアポトーシスを促進も抑制もする、いわゆる context-dependent なアポトーシス制御因子ではないかと考えられる。

2. NLRP3 インフラマソームの制御におけるミトコンドリアの役割

ミトコンドリアにおいてストレスの受容・応答に働くPGAM5のような分子が、炎症にかかわる細胞においてどのような役割を担うかを明らかにすることが、炎症におけるミトコンドリアの機能を解明する一つの糸口になるのではないかと考えた。そこで注目したのが、NLRP3 インフラマソームである。これまでの多くの解析から、様々な NLRP3 インフラマソーム活性化刺激に対する共通の応答は、細胞外への K^+ の流出と考えられている。その下流では、機能の低下したミトコンドリアからの活性酸素種の産生や、ミトコンドリア DNA、とくに酸化されたミトコンドリア DNA の細胞質への放出が、NLRP3 インフラマソーム活性化の引き金となることが報告されている。つまり現在のモデルでは、機能の低下したミトコンドリアが NLRP3 インフラマソーム活性化の共通のメディエーターと考えられている。しかし、PGAM5 ノックアウトマウスの骨髄由来マクロファージや樹状細胞においては、数多く知られている NLRP3 インフラマソームの活性化刺激のうち、ごく一部の刺激による活性化のみが低下していることが分かり、ミトコンドリアの機能不全が NLRP3 インフラマソーム活性化の共通の機構として働くという現在のモデルよりは、刺激に応じて、インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの関わり方が異なると見なす方が妥当と考えられた。

そこで、実験的な NLRP3 インフラマソーム活性化刺激としてよく用いられる細胞外 ATP、細菌性毒素 Nigericin、抗ウイルス薬 R837、3つの刺激に対する細胞およびミトコンドリアの応答を検討した。その結果、IL-1 β 産生へのミトコンドリアの膜電位や電子伝達系の活性の必要性は刺激によって異なり、NLRP3 インフラマソームの活性化に際してミトコンドリアの機能が維持されている必要がある場合もあることが分かった。また、刺激依存的なミトコンドリアの膜電位や形態の変化も、刺激によって互いに異なっていた。さらに、どちらもインフラマソーム解析に汎用されている骨髄由来マクロファージとヒト単球由来 THP-1 細胞の間においても、同一の NLRP3 インフラマソーム活性化刺激に対してミトコンドリアの膜電位の必要性が全く異なる場合があることも分かった。よって、NLRP3 インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの関わり方は、細胞の違いや活性化刺激の違いによって大きく異なること、そして、機能を保持したミトコンドリアが NLRP3 インフラマソームの活性化に必要とされる状況があることが分かってきた。この結果は、ミトコンドリアの状態に応じて、インフラマソームの活性化程度や持続時間が変わることを示唆していることから、ミトコンドリアの機能とインフラマソーム活性化との関連を解明することが、炎症の慢性化機構を明らかにする上での一つの重要な課題であると考えられる。

3. 今後の展開

本研究により、NLRP3 インフラマソームの活性制御におけるミトコンドリアの関わり方が予想以上に多様であることが明らかとなった。とくに、これまでに提唱されているミトコンドリアの機

能低下によるインフラマソーム活性化機構に加えて、機能を保持したミトコンドリアによる活性化機構も存在するという事は、細胞応答として、可逆的にインフラマソームの活性を制御できる相と、不可逆的、すなわち持続的に活性化させる相とが存在することを示唆している。よって、正常なミトコンドリアの関わるインフラマソームの活性化において、ミトコンドリアのどのような機能がどのような理由で必要とされているかを明らかにし、新たな NLRP3 インフラマソーム活性化機構の解明を目指したい。

一方で、PGAM5 がミトコンドリアの傷害や機能低下の程度を感知する機構を介してインフラマソームの活性化に関わっているとすれば、その機構はインフラマソームの活性化を適正に保つ働きを担っている可能性がある。よってマクロファージ系細胞における PGAM5 の分子機能のさらなる解明も目指すことで、慢性炎症につながるインフラマソームの活性制御異常にミトコンドリアがどのように関わっているかも明らかにできるのではないかと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

ストレス応答分子としての PGAM5 の分子機能解析については一定の成果が得られた一方で、PGAM5 の炎症における役割については、とくにノックアウトマウス個体を用いた病態モデル解析が思うように進まず、十分な成果が得られるには至らなかった。しかし、1つの分子の機能解析にとどまらず、ミトコンドリアの炎症における役割の解明をめざすことが当初のねらいであったため、NLRP3 インフラマソームの活性制御への新たな多様なミトコンドリアの関わり方を見出せたことは、まだ端緒をつかんだだけではあるが、今後の研究につながる重要な基盤となった。これまでに報告されているインフラマソームとミトコンドリアの関連を示した論文の中には、ミトコンドリアの機能的あるいは生化学的な解析が十分ではないものも見受けられるため、本研究で確立した技術や領域会議等でいただいたアドバイスを活かして、これまでは注目されていなかった現象を見逃さずに、ミトコンドリアの本質的な役割を追求していきたい。

(2) 研究総括評価(公開項目)

炎症反応は外的・内的環境要因に対する生体の防御反応であり、細胞ストレスに感受性の高いミトコンドリアが炎症反応を制御している可能性について、ミトコンドリアのストレス受容・応答に働く分子として見出した PGAM5 の分子機能解析を中心とした挑戦的な研究がなされた。その結果、PGAM5 はミトコンドリアの傷害や機能低下の程度を感知し、その程度に応じた細胞応答を促すためのシグナル伝達を担っており、ショウジョウバエを用いた個体レベルでの解析の結果、熱ショックによる神経細胞のアポトーシスを抑制する作用を示すのみならず、複眼特異的な PGAM5 の過剰発現がアポトーシスを促進することから、PGAM5 は context-dependent なアポトーシス制御因子であることを見出している。さらに、機能の低下したミトコンドリアが NLRP3 インフラマソームを活性化することが知られているため、その過程における PGAM5 の役割についても検討を加えている。以上、PGAM5 の分子機能や NLRP3 インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの関与について、レベルの高い解析を行い一定の成果が得られたことは評価されるが、本人も述べているように、PGAM5 ノックアウトマウス個体を用いた病態モデルでの解析では期間内に十分な成果が得られるには至らなかった。炎症応答時におけるミトコンドリアの役割や PGAM5 の関与は当初の仮説よりも複雑であると思われ、研

研究者が見出した PGAM5 分子の研究の方向性について改めて吟味することも含めて、今後のさらなる成果を期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sekine, S., Kanamaru, Y., Koike, M., Nishihara, A., Okada, M., Kinoshita, H., Kamiyama, M., Maruyama, J., Uchiyama, Y., Ishihara, N., Takeda, K. and Ichijo, H. Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5. J. Biol. Chem. (2012) 287, 34635–34645.
2. Ishida, Y., Sekine, Y., Oguchi, H., Chihara, T., Miura, M., Ichijo, H. and Takeda, K. Prevention of apoptosis by mitochondrial phosphatase PGAM5 in the mushroom body is crucial for heat shock resistance in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE (2012) 7, e30265.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 武田弘資. ミトコンドリアのストレス受容・応答機構と炎症制御. 創薬シンポジウム: アカデミア創薬と探索医療. 長崎 2013/03/19
2. Sadatomi, D. and Takeda, K. Role of mitochondrial phosphatase PGAM5 in inflammation. 10th International Conference on Protein Phosphatases. Tokyo, 2013/02/08
3. Takeda, K. Regulation of cellular stress response by mitochondrial protein phosphatase PGAM5. 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Tokyo, 2013/02/01
4. Takeda, K. Role of mitochondrial phosphatase PGAM5 in inflammation. The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (IEIIS2012). Tokyo, 2012/10/24
5. 武田弘資. アティピカル・プロテインホスファターゼ PGAM5 によるストレス応答制御. 第 84 回日本生化学会大会. 京都 2011/9/23

総説

1. Sadatomi, D., Tanimura, S., Ozaki, K. and Takeda, K. Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling. Int. J. Mol. Sci. (2013) 14, 4596–4612.
2. Kanamaru, Y., Sekine, S., Ichijo, H. and Takeda, K. The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. J. Signal Transduct. (2012) 2012, 931215.

著作物

1. 武田弘資. がんと炎症. 「がん増殖と悪性化の分子機構」化学同人(2012) pp191-205

研 究 報 告 書

「低酸素シグナルによる炎症制御の解明と循環器疾患治療への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研 究 者: 武田 憲彦

1. 研究のねらい

最近の研究から心不全、心線維化症例では血中の炎症性サイトカイン濃度が上昇していることが明らかにされている。このような組織リモデリングの病態には $\text{TNF } \alpha$, $\text{IL-1 } \beta$, IL-6 などの炎症性サイトカインや inducible Nitric oxide synthase (iNOS) 由来の一酸化窒素(NO)を介した慢性的な炎症プロセスの活性化が重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子機序は未だに明らかにされていない。

本研究は組織リモデリング過程の組織が低酸素環境に陥っていることに着目し、低酸素シグナルの役割と言う切り口から慢性炎症による組織リモデリング機構を明らかにすることを目的としている。炎症局所は炎症細胞浸潤による酸素消費増大、未熟な血管網形成による酸素供給により特に低酸素環境に陥っていると考えられる。更に心不全組織では病態悪化に伴う頻脈が組織灌流を低下させるだけでなく、心拡大に伴う力学的負荷が心筋細胞の酸素需要を増大させている。

低酸素に対し、細胞や組織はそれぞれ固有の応答を示すが、その主要な反応は Hypoxia inducible factor(HIF)と呼ばれる一群の低酸素応答転写因子群により調節される。低酸素応答は細胞応答を制御するのみならず、炎症性サイトカイン、NO 放出を調節することで炎症自体を増悪、持続させる。主要な役割を果たす HIF として $\text{HIF-1 } \alpha$ と $\text{HIF-2 } \alpha$ が知られている。我々はこれまで、システムバイオロジーと実験的アプローチを用いて、 $\text{HIF-1 } \alpha$ と $\text{HIF-2 } \alpha$ のバランス(HIF スwitchング)が一酸化窒素(Nitric oxide, NO)産生を調節することを明らかにしてきた。特にマクロファージにおいては炎症惹起型(M1)および炎症抑制型(M2)マクロファージにおいてそれぞれ $\text{HIF-1 } \alpha$ 、 $\text{HIF-2 } \alpha$ が特異的に発現することで、炎症メディエーターである NO 産生の時空間的制御が行われていることを報告している(*Genes Dev.* 2010)。

本研究は(1)このような組織リモデリングにおいて炎症細胞、特にマクロファージが果たす役割について、心血管疾患モデルおよび、皮膚創傷治癒モデル、腫瘍増殖モデルなどを用いて明らかにし、(2)引き続き高血圧などにより引き起こされる心血管リモデリングにおける低酸素シグナルの役割を明らかにすることで、治療応用に向けた分子基盤を構築することを目的とする。

2. 研究成果

(1)概要

慢性的な炎症シグナルの活性化は過剰な組織リモデリングを誘導すると考えられるが、その詳細な分子機構は明らかにされていない。本研究では組織に浸潤するマクロファージに注

目し、その誘導機構および組織リモデリングにおいて果たしている役割につき解析を行った。

まず始めに、組織再構築過程につき種々の知見が得られている皮膚創傷治癒モデルおよび腫瘍増殖モデルを用いて、マクロファージ浸潤の分子機構およびその役割について解析を行った(研究テーマ A)。その結果、炎症組織に浸潤するマクロファージ由来の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)により、創傷治癒過程、血管新生が促進されると共に過剰な線維化が抑制されること、更に組織再構築過程におけるマクロファージ遊走において線維芽細胞の HIF-1 α シグナルが重要な役割を果たしていることを確認した。

次に心血管モデルにおける低酸素シグナルの役割につき、特に HIF- α スwitchングに着目して解析を行った(研究テーマ B)。我々はこれまで、HIF- α スwitchングが炎症シグナルのメディエーターの一つである Nitric oxide(NO) 産生の制御に関わることを明らかにしている。本研究では引き続き皮膚ケラチノサイトにおける HIF- α スwitchングが NO 産生の制御を介して血圧調節および引き続く心線維化において重要な役割を果たしていることを明らかにした。引き続き心臓リモデリング過程で心筋組織に集積するマクロファージ、低酸素シグナルの役割について解析を行っている。特に低酸素シグナルの役割に注目し、圧負荷後の心臓における心筋細胞傷害、マクロファージ浸潤、線維芽細胞活性化プロセスにつき経時的な解析を行っている。

(2) 詳細

研究テーマ A「組織リモデリングにおけるマクロファージの役割」

これまで我々はヒト心不全病理標本を用いた解析から、心不全組織にマクロファージが恒常的に浸潤していることを確認し、組織リモデリングにおいてマクロファージが重要な役割を果たしていると考えている。低酸素ストレスに晒されたマクロファージは血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)を強く分泌する。そこで組織リモデリングにおいてマクロファージ由来の VEGF が果たす役割について、まず皮膚創傷治癒モデルを用いて検討を行った。マウス皮膚に欠損を作成したところ、炎症期から線維芽細胞増殖期にかけて低酸素環境に陥っている創傷部位にマクロファージが浸潤し、HIF- α 標的因子である VEGF 分泌を促進していた。治癒過程においてマクロファージが分泌する VEGF の役割を解析するため、マクロファージ特異的に VEGF を欠損したマウスを作成し検討した。健常マウスでは欠損作成後 Day14 までに皮膚欠損部は修復されるが、VEGF 欠損マウスでは Day14 においても依然として創傷治癒過程が完了しないだけでなく、肉芽組織および SM- α -アクチン陽性筋線維芽細胞の増殖が亢進していることを確認し報告した(*J Invest Dermatology* 2011)。この知見より、マクロファージ由来の VEGF は創傷治癒過程を促進するだけでなく、筋線維芽細胞の活性化・増殖を制御する可能性があると考えられた。

ではこのようなリモデリング過程の組織へとマクロファージを遊走させるシグナルは何であろうか？ 我々は間質組織、特に線維芽細胞の低酸素シグナルが重要な役割を果たしているとの仮説を立て、線維芽細胞特異的 HIF-1 α 欠損マウスを作成し、腫瘍増殖モデルを用いた解析を行った。乳癌自然発症モデルマウスを用いて健常マウスおよび線維芽細胞特異的 HIF-1 α 欠損マウスと交配し、乳癌増殖過程を解析したところ、HIF-1 α 欠損マウスにおいては腫瘍

組織内へのマクロファージ遊走が有意に減弱していた。間質、特に線維芽細胞の低酸素シグナルが炎症細胞遊走に作用する事を確認し報告した(*Cancer Res.* 2012)。HIF-1 α 欠損マウスではマクロファージ遊走が減弱するだけでなく、健常マウスと比較して腫瘍内の血管が成熟化すると共に腫瘍の増大が認められた。

研究テーマ B「心血管疾患病態において低酸素シグナルが果たす役割の解析」

本研究では引き続き、HIF- α を介する低酸素シグナルが心血管リモデリングにおいて果たしている役割につき解析を行った。我々はこれまで HIF- α スwitchング、即ち HIF-1 α と HIF-2 α によりマクロファージ由来の Nitric oxide(NO)産生が制御されることを明らかにしてきた(*Genes Dev.* 2010)。NO は炎症誘導因子である一方、循環動態においては強い血管拡張作用を有することが知られている。血管収縮、血圧上昇による圧負荷は左心室への力学的ストレスを惹起し、心臓リモデリングの大きな原因となるため、その制御機構の解明は重要である。末梢組織、なかでも皮膚は体内で最大の臓器であり、抵抗血管の収縮性を制御することで血圧制御においても重要な役割を果たしていると考えられる。そこで我々は皮膚ケラチノサイト特異的に HIF-1 α および HIF-2 α を欠損したマウスを樹立し、血圧制御における役割を解析した。ケラチノサイト特異的 HIF-1 α 欠損マウスでは健常マウスと比較して血圧が上昇していた。運動負荷を与えると通常マウスは末梢血管の拡張を示したが、HIF-1 α 欠損マウスにおいては血管拡張能が低下していた。興味深い事にケラチノサイト特異的 HIF-2 α 欠損マウスでは HIF-1 α 欠損マウスと反対に血圧の低下が認められた。強い血管収縮能を有し、血圧を上昇させる作用を持つ Angiotensin II を投与すると、健常マウスでは著しい血圧上昇および心線維化が誘導された一方、HIF-2 α 欠損マウスでは血圧上昇および心線維化の程度がいずれも軽減していた。以上の知見から、皮膚ケラチノサイトにおける HIF- α スwitchングが血圧調節を介して心臓リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることを確認し報告した(*PNAS* 2013)。

現在、我々は引き続き心臓リモデリングにおけるマクロファージ浸潤および低酸素シグナルの役割について解析を行っている。マウスにおける心臓リモデリングモデルである横行大動脈縮尺術による圧負荷心不全モデルを施行し、浸潤するマクロファージの性状を経時的に観察すると共に、このプロセスにおいて低酸素シグナルが果たしている役割について解析を継続している。心臓リモデリング過程におけるマクロファージ遊走機構の解明と、マクロファージの役割につき解析を行うことで、慢性炎症としての心臓リモデリングの結果引き起こされる心線維化の分子機構の解明に迫りたいと考えている。

3. 今後の展開

組織リモデリングの一部は組織修復として合目的に作用する一方、過剰な線維化は臓器機能を低下させる原因となる。現在我々は、慢性的な炎症シグナルの活性化が過剰な線維化、組織の低酸素化を惹起し、更に炎症細胞の活性化を引き起こす可能性があると考えている。このような組織リモデリングを介する低酸素シグナル、炎症プロセス活性化と言うフィードバックループを慢性炎症の一つの機構と捉えると、今後実質細胞傷害、炎症細胞浸潤および線維芽細胞活性化制御の細胞間相互作用を明らかにする必要があると思われる。このような視点から、炎

症細胞の低酸素シグナルに着目し、線維芽細胞活性制御因子の同定を試みたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究において、特に組織リモデリング過程において間質細胞、特にマクロファージが果たしている役割について解析を行ってきた。皮膚創傷治癒モデル、腫瘍増殖モデルにおいてマクロファージ、線維芽細胞の低酸素シグナルおよびそれにより誘導される VEGF は組織リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることを確認し報告することができた。加えて循環器疾患モデルにおいても皮膚ケラチノサイトにおける HIF- α スwitchングが血圧制御を介して心線維化のプロセスに重要な役割を果たしていることを報告した。これらいくつかの知見を報告できた一方で、心臓リモデリングにおける低酸素シグナルの役割については本研究期間内に論文発表できなかったことは残念であった。現在その分子機構の解明を継続中であるが、その中で興味深い知見を得ており、できるだけ早く論文発表を行いたいと考えている。

(2) 研究総括評価(公開項目)

本研究では、炎症において組織に浸潤してくるマクロファージや間質の線維芽細胞などが、HIF が活性化しやすい炎症組織の低酸素状態にあって、どのように組織リモデリングに関与しているのか解析してきた。皮膚創傷治癒モデルでは、マクロファージ由来の HIF- α 標的因子である VEGF の分泌促進が創傷治癒に促進的に働き、また自然発症腫瘍増殖モデルでは線維芽細胞における HIF-1 α 依存的な低酸素シグナルがマクロファージの腫瘍組織内への遊走を促進して腫瘍の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、体内最大臓器である皮膚のケラチノサイト特異的に HIF-1 α あるいは HIF-2 α を欠損したマウスにおいて、HIF-1 α 欠損では血圧が上昇して運動負荷時の血管拡張能が低下し、反対に HIF-2 α 欠損では血圧の低下が認められ Angiotensin II 投与による血圧上昇や心線維化の程度の軽減が認められ、皮膚ケラチノサイトにおける HIF- α スwitchングが血圧調節を介して心臓リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることを確認し論文発表した。以上のように、低酸素シグナルによる炎症制御の解明に関し、研究は概ね順調に進捗していると評価できる。今後、心臓リモデリングの系での解析がさらに進めば、臨床応用に向けた基盤的知見が得られると期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Cowburn AS, Takeda N, Boutin AT, Kim JW, Sterling JC, Nakasaki M, Southwood M, Goldrath AW, Jamora C, Nizet V, Chilvers ER, Johnson RS. HIF isoforms in the skin differentially regulate systemic arterial pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(43):17570-5.
2. Saito T, Takeda N, Amiya E, Nakao T, Abe H, Semba H, Soma K, Koyama K, Hosoya Y, Imai Y, Isagawa T, Watanabe M, Manabe I, Komuro I, Nagai R, Maemura K. VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett*. 2013; 587(14):2179-85.

3. Kim JW, Evans C, Weidemann A, Takeda N, Lee YS, Stockmann C, Branco-Price C, Brandberg F, Leone G, Ostrowski MC, Johnson RS. Loss of fibroblast HIF-1 α accelerates tumorigenesis. *Cancer Res.* 2012; 72(13):3187-95.
4. Stockmann C, Kirmse S, Helfrich I, Weidemann A, Takeda N, Doedens A, Johnson RS. A wound size-dependent effect of myeloid cell-derived vascular endothelial growth factor on wound healing. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(3):797-801.
5. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, Asagiri M, Simon MC, Hoffmann A, Johnson RS. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 2010; 24(5):491-501.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

武田憲彦

酸素医学特別セミナー (東北大学医学部 2013 年 2 月 20 日)

HIF- α を介する炎症と低酸素シグナルの制御機構

武田憲彦

第 35 回 日本分子生物学会(福岡国際会議場、福岡、2012 年 12 月 12 日)

マクロファージ低酸素応答におけるエピジェネティック調節機構の役割

武田憲彦

第 36 回 日本分子生物学会(神戸国際会議場、神戸、2013 年 12 月 3 日)

細胞の低酸素センサーと代謝調節

武田憲彦

第 10 回 がんとハイポキシア研究会(横浜開港記念館、横浜、2012 年 12 月 6 日)

HIF を介する炎症と低酸素シグナルの制御

Abe H, Takeda N, Semba H, Soma K, Isagawa T, Manabe I, Nagai R and Komuro I.

Roles of Macrophage Hypoxia Signaling in Cardiac Remodeling.

AHA Scientific Session 2012

(Los Angeles convention center, Los Angeles, USA. 2012 年 11 月 6 日)

研究報告書

「マウス生殖モデルを用いた、老化が誘導する炎症メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 廣田 泰

1. 研究のねらい

新生児の死亡や後障害の原因となる早産は、世界で年 1500 万件、日本で年 6 万件が起こっており、医学が進歩した現代でも制御が困難である。早産の原因として細菌感染(主に腔内細菌)に伴う炎症、高年妊娠、子宮頸管の異常、遺伝体質、体外受精・胚移植の増加などの関与が示唆されており、早産はこれらの因子が複雑に絡み合った多因子疾患と考えられている。現在の治療法は子宮収縮抑制剤や抗生剤などの対症的なアプローチに限定されていて、新規療法を確立するためには早産に対する新たな視点からの基礎研究の展開が課題となっている。早産は妊娠時にのみ問題になるため「急性」炎症と考えられがちであるが、早産を研究するにあたり、加齢や体質、やせや喫煙、腔内の常在菌による感染・炎症などの因子が早産のリスクを高めていることや早産は反復しやすいことなど子宮における「慢性」的な疾患背景を有している点に着目する必要がある。本研究では、早産の病態を子宮の「慢性炎症」として捉え、本研究者が開発した子宮特異的 p53 欠損マウスを用いた自然早産モデルを用いて、細胞老化調節の鍵である p53 が子宮における慢性炎症の表現型である早産へ与える影響を観察し、細胞老化が誘導する炎症の分子メカニズムを検討することを目的とした。特に、p53 および p21 に着目し、それらの分子調節が PI3 kinase-Akt 経路や mTOR 経路などを介してどのように細胞老化を誘導するか、また細胞老化がどのように炎症を誘導するかについて検討した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究者はこれまでの研究によって、癌抑制遺伝子 p53 を子宮特異的に欠失したマウス (*Trp53^{loxP/loxP}Pgr^{Cre/+}*) において、妊娠初期から子宮内膜に細胞老化が起こり、妊娠の維持に重要な子宮内膜間質細胞の分化である脱落膜化が阻害されて脱落膜形成の異常が認められ、妊娠後期にはプロスタグランジン合成酵素 Cox2 および PGF2 α 上昇が起こり、早期の子宮収縮が誘発され約半数の個体が自然早産となりそれに伴って新生仔死亡をきたすことを見出した(Hirota Y, J Clin Invest 2010)。本研究では、この新しい自然発症の早産モデルを用いて早産の病態の詳細を検討した。妊娠初期の子宮内膜を用いたプロテオミクス解析によって、p53 欠損子宮内膜では抗酸化酵素とミトコンドリアの ATP 産生に関連する蛋白の発現が低下しており、酸化ストレスやミトコンドリア機能低下が子宮内膜の細胞老化の亢進に寄与している可能性が示唆された(成果(1)-3)。次にこの早産モデルにおいて、子宮の細胞老化の存在が子宮収縮や早産の原因になっている可能性を考えた。mTORC1 阻害剤ラパマイシンの投与と p53/p21 の 2 重欠損マウスを用いた検討から、p53 欠損子宮では mTORC1 活性化が起こり p21 を介して細胞老化が誘導され、Cox2 発現が上昇し最終的に子宮収縮が起こり早産に至っていることがわかった(成果(1)-1)。ヒト早産では細菌感染を合併することが多いこと

から、p53 欠損早産マウスに LPS を投与し、早産の発症率を検討したところ、コントロールマウスでは妊娠の障害にならない量(10 μ g)の LPS によって、p53 欠損マウスでは卵巣の黄体ホルモン(プロゲステロン)産生が低下し 100%早産をきたすことが明らかとなった(成果(1)–6)。この LPS 投与による p53 欠損マウスの早産に対して、プロゲステロンとラパマイシンとの同時投与によって、母体および胎仔に明らかな副作用なく早産とそれに伴う新生仔死亡を予防することができた。さらに、ヒト早産の臨床サンプルでも、子宮内膜の mTORC1 活性化や細胞老化が認められた。本研究により、早産マウスモデルで認められる細胞老化の経路がヒトの早産でも関わっていると考えられ、遺伝体質と細菌感染が相互的に作用し早産の発症を誘発している可能性が明らかになった。また、プロゲステロンと細胞老化の経路を抑制する薬剤による新しい早産予防法の可能性を見出すことができた。

本研究では細胞老化という視点で「慢性炎症」を捉えようと試みた。子宮の細胞老化の存在によって早期の子宮収縮が起こりやすくなり、細菌感染が重なることでさらに子宮収縮が促進されることが明らかとなった。この結果から、細胞老化が炎症の1つの発生母地になりうることが示された。

(2) 詳細

研究テーマ A「p53 欠損子宮の細胞老化の誘導に関わる因子についての検討」

p53 欠損子宮とコントロール子宮の子宮内膜(脱落膜)組織を用いてプロテオミクス解析を行い、細胞老化の調節に関与する可能性のある因子を抽出した。この検討により 183 個の候補因子を同定した。この候補因子の中で、抗酸化酵素のクラスターの低下とミトコンドリア ATP 産生に関する蛋白のクラスターの低下が認められたことから、p53 欠損組織での酸化ストレス増加およびミトコンドリア機能異常の存在が推測され、これらの異常が p53 欠損組織の細胞老化の促進に関わっている可能性が示唆された(図 1、成果(1)–3)。

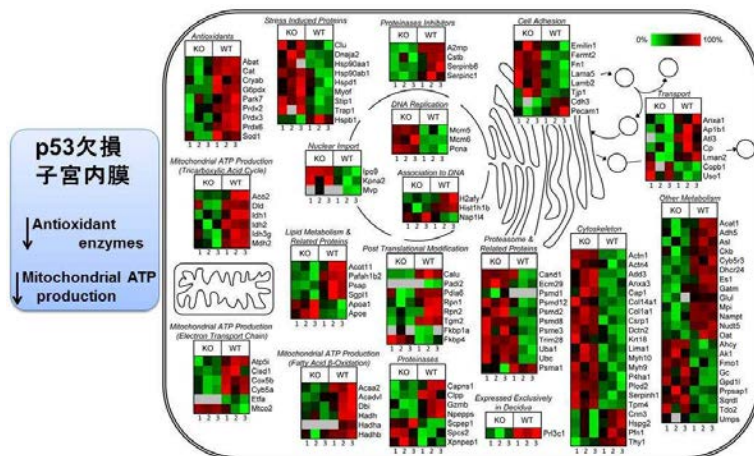


図1. 細胞老化が起きているp53欠損子宮内膜組織を用いたプロテオミクス解析
KO = p53欠損子宮内膜、WT = コントロール子宮内膜。緑が蛋白発現低下、赤が蛋白発現上昇

研究テーマ B「p53 欠損子宮における細胞老化の誘導に関わるシグナル経路の検討」

先行研究において、p53 欠損子宮における PI3 kinase-Akt 経路の活性化が示されている(Hirota Y, J Clin Invest 2010)。mammalian target of rapamycin(mTOR)経路は、Akt の下流のシグナル経路として知られているため、mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1)活性化の下流のシグナル因子である S6 リン酸化(pS6)を検討したところ、pS6 発現の亢進が認められ、p53 欠損子宮において mTORC1 の活性化が起きていると考えられた。このことが

ら、早産モデルの子宮における Akt-mTORC1 経路の活性化が推測された。近年 mTOR シグナルの細胞老化への関与が指摘され、mTORC1 活性の阻害剤であるラパマイシン投与が寿命の延長に寄与する可能性も報告されていることから、この早産モデルでの mTORC1-細胞老化の経路の活性化が推測された。p53 欠損子宮の Akt および S6 のリン酸化亢進は Akt-mTORC1 経路の活性化を示唆していることから、次に mTORC1 阻害剤ラパマイシンを妊娠初期～中期にかけて子宮の p53 欠損マウスに投与し分娩の表現型を検討した。その結果、ラパマイシン投与にて p53 欠損マウスの早産が完全に抑制されることが分かった(図 2、成果(1)-1)。また、ラパマイシン処理後の妊娠後期の子宮においては、細胞老化が抑制され、さらに p21 発現および COX2 発現が抑制されていることがわかった。さらに子宮の細胞老化が早産の誘因である可能性を示すために、子宮の p53 欠損マウスを用いた早産モデルを応用し、細胞老化の極めて重要な調節因子である p21 発現が p53 欠損子宮で上昇していることから、子宮の p53 欠損に加えて p21 欠損を伴うマウス(*Trp53^{loxP/loxP}Pgr^{Cre/+}Cdkn1a^{-/-}*)を作成し、p21 上昇に伴う子宮の細胞老化を抑制した場合に得られる分娩の表現型について解析した。興味深いことに、早産の表現型が p21 欠損によって改善され、p53/p21 の 2 重欠損マウスでは早産が完全に抑制された(成果(1)-1)。以上の結果から、p53 欠損マウスの子宮内膜(脱落膜)における

Akt-mTORC1-p21-細胞老化-COX2-PGF2 α という経路が早産発症に関わっていることが推測された。さらにはヒト早産の子宮内膜(脱落膜)組織においても、細胞老化および mTORC1 が子宮内膜で陽性となっており(成果(1)-6)、ヒト早産においてこれらの経路の活性化が起こっている可能性が示唆された。

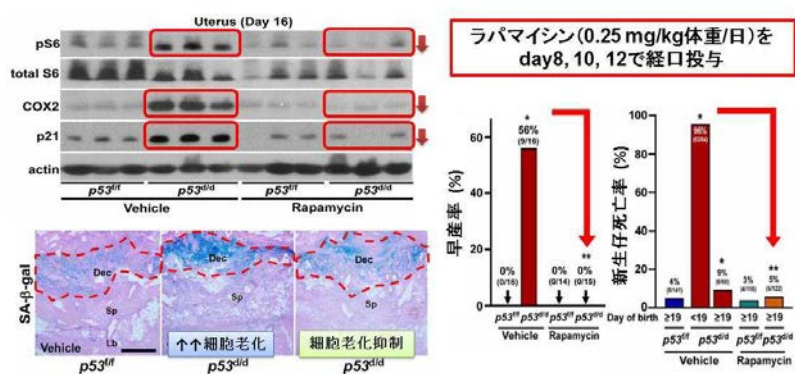


図2. p53欠損の自然早産マウスモデルに対するmTORC1阻害剤ラパマイシン投与効果
p53^{del/del} = p53欠損マウス、p53^{fl/fl} = コントロールマウス。
ラパマイシン投与により、p53欠損マウスの細胞老化と自然早産が抑制される。

研究テーマ C「子宮の p53 欠損マウス早産モデルにおける、LPS 誘導性炎症による早産への影響について」

ヒト早産では子宮内の細菌感染・炎症を合併することが多いことから、早産子宮における細菌感染に対する感受性の低下が示唆される。子宮における細胞老化の存在が、細菌感染による早産のリスクを高めているという仮説のもと、細菌感染のモデルとして LPS 投与実験を行った。その結果、コントロールでは妊娠の障害にならない量 10 μ g の LPS を腹腔内投与によって、子宮の p53 欠損マウスでは 100%早産をきたすことが明らかとなった(成果(1)-6)。LPS による早産発症促進のメカニズムとして、脱落膜形成不全を介した子宮内膜由来の卵巣保護因子分泌の低下によって卵巣の LPS 感受性が高まり、卵巣の黄体ホルモン(プロゲステロン)代謝酵素 20 α -HSD が上昇して血中のプロゲステロン濃度が低下し、最終的に子宮収縮に関わる子宮収縮関連蛋白群の発現が高まり、早産が促進されている可能性が考えられた(図

3. 成果(1)–(6)。

この研究結果は、感染などによる軽度の炎症が環境因子として存在した場合に、遺伝的異常をもつ個体は早産をきたしてしまう可能性を示している。本研究により、遺伝的因子と環境因子が協調して早産

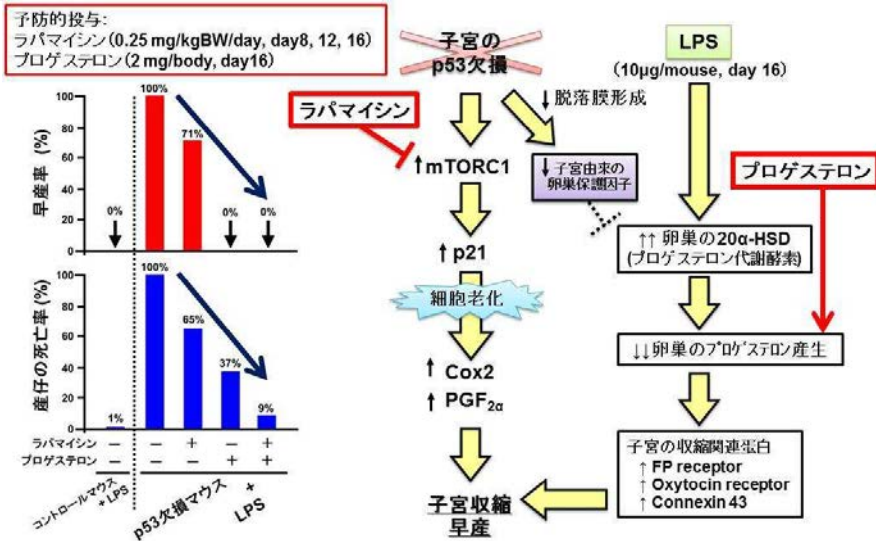


図3. p53欠損マウスへのLPS投与による早産モデルにおける早産の機構
ラパマイシンおよびプロゲステロンの同時投与により、p53欠損マウスの早産が抑制される。

が高率に発症する可能性を示すことができた。疫学的にはヒトの早産は反復しやすいこと知られているが、「遺伝－環境の相互作用の早産への寄与」という概念によって、この反復早産の原因の1つを説明できるのかもしれない。

さらに本研究では、LPS 投与による子宮の p53 欠損マウスの早産に対して、黄体ホルモンであるプロゲステロンと免疫抑制剤として知られる mTORC1 阻害剤ラパマイシンとの同時投与によって、母体および胎仔に明らかな副作用なくその早産を防止することができた(成果(1)–(6))。プロゲステロン投与は LPS による卵巣と子宮内膜におけるプロゲステロン代謝酵素 20α-HSD 誘導、局所および全身のプロゲステロン濃度低下を補うものであり、ラパマイシン投与は子宮内膜に作用し p53 欠損－mTORC1－細胞老化の経路を抑制した。さらには、ヒトの早産検体においても子宮内膜の細胞老化、mTORC1 活性の増加が認められ、ヒト子宮内膜細胞の初代培養系では、LPSによる炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 の分泌増加をプロゲステロンおよびラパマイシンが抑制することが示された。このように、プロゲステロンおよびラパマイシンの作用が協調的に早産を抑制する可能性が考えられた。早産既往や子宮頸管短縮などの早産のハイリスク女性に対する今後の早産の予防・治療法の確立に向けて、本研究の成果は有益な基礎的知見である。

3. 今後の展開

本研究は、細胞老化と炎症との関連性を示唆する研究結果である。老化細胞が炎症刺激に反応して炎症を増幅しやすい性質をもつことが明らかとなった(susceptibility to inflammation)。加齢が細胞老化を増加させることが知られており、老化細胞が炎症をおこすことで様々な疾患の病因・病態に関わっている可能性が明らかとなった。この老化細胞の性質については、癌や動脈硬化など、加齢によって増加する疾患の病因・病態との関連が考えられ、各分野での今後の研究の進展が期待される。

また、本研究によって早産が遺伝体質と環境の組み合わせによって起こっていることが証明できた。早産が多因子によって起こっていることが早産研究を難しくしている原因の1つであったが、今後早産関連の遺伝子などが最新の遺伝子解析などで判明してくれば、早産のハイリスク

群が遺伝学的に抽出することができるようになる。臨床的なハイリスク群と合わせて、それらのハイリスクの女性たちに対してプロゲステロン投与などによる環境因子の改善による早産の予防を進めることにより、臨床的に早産を減らすことが可能となる可能性が考えられる。また、早産の環境因子の改善方法としてプロゲステロンの存在が明らかとなったが、欧米では既にプロゲステロン製剤が積極的に早産の予防に使用されつつある。今後の日本での臨床試験によるデータ蓄積が期待される。

本研究の成果により、子宮の細胞老化が早産の発症に関わる可能性があることから、今後はその誘導経路を押さえる治療法の開発が期待される。本研究では、過去の動物実験の報告において胎児毒性が認められない低濃度のラパマイシンを使用しているとはいえ、高濃度の使用の場合の胎児毒性が報告されている。また妊娠中の薬物投与の胎児への影響を考慮すると、細胞老化をターゲットとした新規治療薬の開発・臨床応用は非常に難しい面がある。しかしながら、妊娠中に使用可能とされる、胎児毒性がないと考えられている既存の薬物を用いて細胞老化経路を押さえる治療法を見出すことができれば、今後の臨床応用が十分に期待できる。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では細胞老化という視点で「慢性炎症」を捉えようと試みた。その成果として、妊娠初期から存在する子宮の細胞老化の存在が、妊娠の最後に早産という形で炎症に促進的に関わっている可能性が明らかとなり、細胞老化が炎症の1つの発生母地になりうることを示すことができた。さらには、細胞老化経路をターゲットとした早産の新規予防法の可能性を示し、今後の臨床応用の可能性を見出すことができた。また本研究により、妊娠子宮という生理的に存在する細胞老化を観察できる生体モデルを確立し、細胞老化の発生から除去に至る一連の機構を解析することが可能となったが、今後このモデルを用いて老化細胞の除去機構の破綻と慢性炎症という新しい病態概念についての解析が可能になったという点は今後の発展性の期待できる成果といえる。今後も本研究の成果を生かして、細胞老化と炎症という観点から、臨床医学と基礎医科学の両者の発展に貢献できるように研究をさらに進めていきたいと考えている。

(2) 研究総括評価(公開項目)

独自に開発した子宮特異的 p53 欠損マウスを用いた早産モデルの解析から、母体側の子宮における Akt-mTORC1 経路の活性化を介した細胞老化-炎症が早産を引き起こし、また細菌感染に伴う子宮内におけるプロゲステロン濃度の低下(妊娠維持能力の低下)によりその早産がさらに促進されることを示し、治療の試みとして mTORC1 阻害剤投与とプロゲステロンの補充療法が有効であることを実験的に証明し論文報告した。当該臨床領域における基礎研究は必ずしも進んでおらず、本研究の質の高い成果は科学的に高く評価されると同時に、社会的にもインパクトがあるものとする。今後は、本研究で見出した早産の原因となるメカニズムが、早産の発生において想定されるその他の母体側因子や環境因子でも働いているものなのかの追及・証明、さらには臨床応用に向けた研究の前進が大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Hirota Y**, Cha J, Yoshie M, Daikoku T, Dey SK. Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011, 108(44), 18073–18078.
2. Daikoku T, Cha J, Sun X, Tranguch S, Xie H, Fujita T, **Hirota Y**, Lydon J, DeMayo F, Maxson R, Dey SK. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. **Dev Cell**. 2011, 21(6), 1014–1025.
3. *Burnum KE, ***Hirota Y**, *Baker ES, Yoshie M, Ibrahim YM, Monroe ME, Anderson GA, Smith RD, Daikoku T, Dey SK (*, **equal contribution**). Uterine deletion of Trp53 compromises antioxidant responses in the mouse decidua. **Endocrinology**. 2012, 153(9), 4568–4579.
4. Cha J, **Hirota Y**, Dey SK. Sensing senescence in preterm birth. **Cell Cycle**. 2012, 11(2), 205–206.
5. **Hirota Y**, Burnum KE, Acar N, Rabinovich GA, Daikoku T, Dey SK. Galectin-1 markedly reduces the incidence of resorptions in mice missing immunophilin FKBP52. **Endocrinology**. 2012, 153(5), 2486–2493.
6. Cha J, Bartos A, Egashira M, Haraguchi H, Saito-Fujita T, Leishman E, Bradshaw H, Dey SK, **Hirota Y**. Combinatory approaches prevent preterm birth profoundly exacerbated by gene-environment interactions. **J Clin Invest**. 2013, 98(4), 1583–1590.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. **廣田泰**. 子宮の p53 による分娩調節とその機序. 第 30 回内分泌代謝学サマーセミナー, 伊香保, 2012 年 7 月 13 日.
2. **Hirota Y**. Defective decidualization with cellular senescence and its outcome. **The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility**, Kobe, November 14, 2013.
3. **廣田泰**. 細胞老化シグナルを介した早産の発生機構に着目した新しい治療アプローチについての提案. 第 41 回日本臨床免疫学会, 下関, 2013 年 11 月 28 日.

受賞

1. 第 12 回日本内分泌学会若手研究奨励賞. 2011 年 4 月 23 日.
2. 第 56 回日本生殖医学会学術奨励賞. 2011 年 12 月 8 日.
3. 平成 23 年度東京都医師会医学研究賞奨励賞. 2012 年 1 月 27 日.
4. 第 64 回日本産科婦人科学会優秀演題賞. 2012 年 4 月 15 日.
5. 第 19 回日本炎症・再生医学会奨励賞. 2013 年 7 月 2 日.
6. 第 65 回日本産科婦人科学会優秀演題賞. 2013 年 5 月 12 日.

プレスリリース

1. 母体の体質と感染・炎症の相互作用で、早産が起きる仕組みを発見—新しい早産予防の糸口. <http://www.jst.go.jp/pr/info/info977/index.html>, 2013 年 8 月 28 日.

研 究 報 告 書

「T 細胞記憶のエピジェネティック調節による慢性炎症性御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年3月～平成26年3月

研 究 者: 山下 政克

1. 研究のねらい

生体内において特定の機能を獲得した細胞は、細胞分裂を経た後もその機能を正確に維持することで生体の恒常性を保っている。この生体の恒常性維持には、エピジェネティックな機構による多くの遺伝子の協調的な発現制御が重要であり、それは細胞記憶と呼ばれるシステムによって担われている。慢性炎症では、長期にわたるストレス応答のため恒常性維持のためのエピジェネティクス機構に異常が起こり、正常な細胞記憶システムが破綻する。その結果、組織や臓器機能に異常なリモデリングが起こり、その機能が維持できなくなることで慢性（難治性）炎症疾患が発症すると考えられる。

免疫担当細胞の中でも T 細胞は、細胞内外の環境変化に応じてダイナミックにその機能を変化させることで、生体防御において司令塔としての役割を担っている。私たちは、炎症の遷延・慢性化のトリガーは免疫細胞の司令塔である T 細胞機能の分化誘導と維持のシステム（T 細胞免疫記憶システム）のエピジェネティクス異常にあると想定している。そこで、T 細胞免疫記憶システムのエピジェネティックな分子機構を解明し、その調節法を確立する研究を通して、慢性炎症の制御のための新たな分子基盤の創出を目指す。特に本研究では、免疫反応の司令塔である CD4 陽性ヘルパー T (T_H) 細胞免疫老化・免疫記憶とアレルギー性気道炎症の慢性化をモデルに用い、最先端のゲノム解析技術を駆使して、エピジェネティックな側面から炎症の慢性化のメカニズムに迫りたいと考えている。

T 細胞免疫老化・免疫記憶システムの分子機構を解明し、その調節を目指す研究は、炎症制御のための新たな分子基盤の創出開発につながるだけでなく、効率の良いワクチン開発への突破口となると考えられる。このような流れを背景に、本研究では、T 細胞免疫老化・記憶システムと、その破綻によって引き起こされる難治性炎症疾患の分子病態を、“エピジェネティクス”を中心に解析することにより、慢性炎症の制御のための新たな分子基盤ならびに次世代型エピゲノム創薬の分子基盤を創出することを目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

加齢に伴った T 細胞免疫老化により、免疫記憶の形成をはじめとした抗原に対する正常な免疫反応が抑制されるとともに、遷延する炎症反応が誘導されやすくなることが知られていたが、その分子機構についてはほとんど分かっていなかった。私たちは、免疫反応の司令塔である CD4 T 細胞の老化に伴ったエピジェネティック変化により、CD4 T 細胞に炎症形質が付与されることが炎症の誘発と慢性化につながると仮説を立て研究をおこない、腫瘍抑制因子 Menin を CD4 T 老化制御因子として見いだした。Menin 欠損 T_H 細胞は、野生型 T_H 細胞に比べ、終末分化タイプのエフェクター T_H 細胞へと分化しやすく、senescence-associated

secretory phenotype (SASP) を伴った老化 T_H 細胞へと高頻度で分化する。また、Menin 欠損によって発現変動する遺伝子領域の多くで、ヒストン修飾状態の変化が検出されたことから、Menin 欠損に伴う遺伝子発現変動は、標的遺伝子領域のエピジェネティックな変化によって誘導されたと考えられた。さらに、個体レベルでの解析の結果、Menin 欠損 T_H 細胞では、メモリー T_H 細胞への分化が顕著に低下していることが明らかとなった。以上のことから、腫瘍抑制因子 Menin は、抗原刺激を受けた CD4 T 細胞において、メモリー T_H 細胞への分化を維持するとともに、 T_H 細胞の終末分化や細胞老化を抑制している可能性が示された。

次に、Menin 下流で、炎症反応の制御に関わる分子として、転写抑制因子 Bach2 を同定した。Bach2 遺伝子座の転写開始点付近には、Menin の結合が検出できるが、そのレベルは、老化 T_H 細胞において著しく低下していた。さらに、Bach2 欠損エフェクター T_H 細胞においても、Menin 欠損エフェクター T_H 細胞と同様の SASP 様形質、 T_H 細胞の終末分化の亢進が認められたことから、Menin は Bach2 の発現調節を介して CD4 T 細胞老化を制御していることが示された。

続いて、クロマチンリモデリング調節を介して炎症を制御できる可能性を持つ低分子化合物を検索し、SH-2251 を見いだした。SH-2251 は、Gfi-1 遺伝子の発現を活性化ヒストン修飾の阻害により抑制することで T_H 細胞からのサイトカイン産生パターン変化を誘導し、抗炎症作用を発揮する可能性が示された。

(2) 詳細

研究テーマ1「慢性炎症における T 細胞エピジェネティクス研究」

加齢に伴った免疫老化により、免疫記憶の形成をはじめとした正常な免疫反応が抑制されるとともに、遷延化する炎症反応が誘導されやすくなることが知られているが、その分子機構についてはほとんど分かっていない。そこで、免疫反応の司令塔である CD4 T 細胞の老化に伴い網羅的エピジェネティック変化が誘導され、それが CD4 T 細胞に炎症形質を付与し、炎症の誘発と慢性化引き起こすという仮説を立て研究をおこなった。

正常なエフェクター CD4 T 細胞と老化したエフェクター CD4 T 細胞の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイで比較していた過程で、変動遺伝子のパターンが腫瘍抑制因子 Menin 欠損 CD4 T 細胞での変化に極めて類似していることに気づき、T 細胞特異的 Menin 欠損マウスを用いた慢性炎症における CD4 T 細胞エピジェネティクス研究を開始した。

Menin 欠損 T_H 細胞は、*in vitro* で抗原刺激した場合、野生型 T_H 細胞に比べ、IL-2 産生能、CD62L/CD27 分子の発現が低下し、CTLA-4 や PD-1 の発現が上昇した終末分化タイプのエフェクター T_H 細胞へと分化しやすいことが分かった。また、Menin 欠損 T_H 細胞培養を長期間培養した場合、細胞死の亢進とともに、senescence-associated secretory phenotype (SASP) を伴った老化 T_H 細胞が高頻度で出現することも同時に見いだした。ChIP-シーケンス解析の結果、Menin 欠損によって発現変動する遺伝子領域の多くで、ヒストン H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3 修飾状態の変化が出されたことから、Menin 欠損に伴う遺伝子発現変動は、標的遺伝子領域のエピジェネティックな変化によって誘導されたと考えられた。さらに、個体レベルでの解析の結果、Menin 欠損 T_H 細胞では、メモリー T_H 細胞への分化が顕著に低下していることが分かった。以上のことから、腫瘍抑制因子 Menin は、抗原刺激を受けた CD4

T 細胞において、メモリーT_H細胞への分化を維持するとともに、炎症形質の誘導につながる T_H細胞の終末分化や細胞老化を抑制している可能性が示された(図1)。

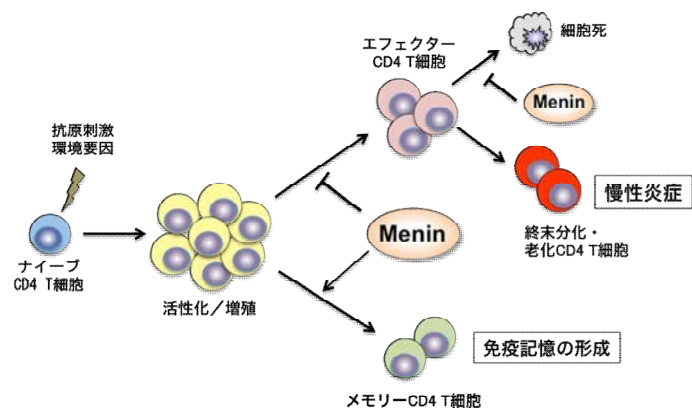


図1. 腫瘍抑制因子 Menin による CD4 T 細胞機能の制御

次に、Menin の下流に位置し T_H細胞の終末分化と老化、炎症誘発を制御している候補分子を同定するため、ChIP-シーケンス解析、DNA マイクロアレイ解析をおこない、転写抑制因子 Bach2 を見いだした。Menin 欠損エフェクターT_H細胞では、Bach2 遺伝子座の活性化ヒストン修飾が低下し、Bach2 の発現が減少した。Bach2 発現の低下は、人為的に細胞老化を誘導した T_H細胞でも確認された。また、Bach2 遺伝子座の転写開始点付近には、Menin の結合が検出できるが、そのレベルは、老化 T_H細胞において著しく低下していた。さらに、Menin 欠損エフェクターT_H細胞の SASP 様形質、T_H細胞の終末分化の亢進は、Menin 欠損エフェクターT_H細胞に Bach2 を遺伝子導入することで、正常レベルにまで回復した。Bach2 欠損エフェクターT_H細胞においても、Menin 欠損エフェクターT_H細胞と同様の SASP 様形質、T_H細胞の終末分化の亢進が認められたことから、Menin は Bach2 の発現調節を介して CD4 T 細胞老化を制御している可能性が示唆された。

研究テーマ2「T 細胞記憶形成のエピジェネティクス研究」

テーマ1の成果から、腫瘍抑制因子 Menin がメモリーT_H細胞の分化に必要であることが分かった。しかしながら、その分子機構の解析はまだ十分に進んでいない。また、慢性炎症に関与すると考えられる炎症性の T_H細胞記憶の維持にも Menin が関わっているのかについても、未だ明らかになっていない。現在、人為的に細胞老化を誘導した T_H細胞を移入し、炎症性メモリーT_H細胞を誘導した後、Menin を欠損する系を立ち上げ、Menin の炎症記憶維持における役割について解析中である。

研究テーマ3「クロマチンリモデリング調節による慢性炎症制御研究」

慢性アレルギー性気道炎症の病態には、好酸球による気道上皮細胞の損傷や杯細胞の過形成が深く関与している。気道上皮の損傷は、気道過敏症の発症を誘発することでアレルギー性気道炎症の慢性化を引き起こすことから、炎症部位への好酸球浸潤を調節する方法論を確立することは、アレルギー性炎症の慢性化を抑制する上で非常に重要である。好酸球分化や炎症部位への浸潤には T_H2 細胞などから分泌される IL-5 によって制御されている。そこ

で、IL-5 の産生を阻害する戦略を確立することで、アレルギー性気道炎症の慢性化を抑制できると考え、研究をおこなった。

ナイーブ CD4 T 細胞から IL-5 産生 T_H2 細胞への分化は、IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導を伴う。私たちは、CD4 T 細胞において IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングの誘導を抑制できる低分子化合物を検索し、石原産業(株)が IL-5 産生阻害薬として合成した SH-2251 が目的とする活性を有することを見いだした。SH-2251 は、*in vitro* では 100 nM の低濃度で IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングと IL-5 産生 T_H2 細胞分化を選択的に抑制した。さらに、*in vivo* において、SH-2251 は、OVA 誘発マウス気道炎症の発症を 10mg/Kg の経口投与により完全に抑制した。続いて、私たちは、SH-2251 の作用点の一つが転写抑制因子 Gfi-1 の発現抑制にあることを明らかにした。Gfi-1 欠損 CD4 T 細胞では、IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングが誘導(維持)されず、IL-5 産生 T_H2 細胞の分化が低下した。

以上の結果から、SH-2251 は、IL-5 遺伝子座クロマチンリモデリング調節を介してアレルギー性気道炎症の慢性化を阻害できる化合物であることが示された。

クロマチンリモデリング調節による慢性炎症制御のためのもう一つのアプローチとして、TGF- β 下流に位置して、 T_H2 細胞への分化をコントロールしている因子の同定をおこなった。TGF- β は、 T_H2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導を阻害することや、 T_H2 細胞分化を抑制することは良く知られているが、その分子機構の解明は十分に解明されていない。私たちは、TGF- β によって発現が誘導される転写調節因子 Sox4 が T_H2 細胞分化の抑制に関与していることを明らかにした。Sox4 欠損 CD4 T 細胞では、 T_H2 細胞分化の亢進が認められ、さらに、T 細胞特異的 Sox4 欠損マウスにおいても、OVA 誘発マウスアレルギー性気道炎症が増悪した。一方、T 細胞特異的 Sox4 Tg マウスでは、OVA 誘発マウスアレルギー性気道炎症の病態改善が確認できた。

さらに、Sox4 Tg CD4 T 細胞では、IL-4 存在下においても T_H1 細胞分化が亢進することが分

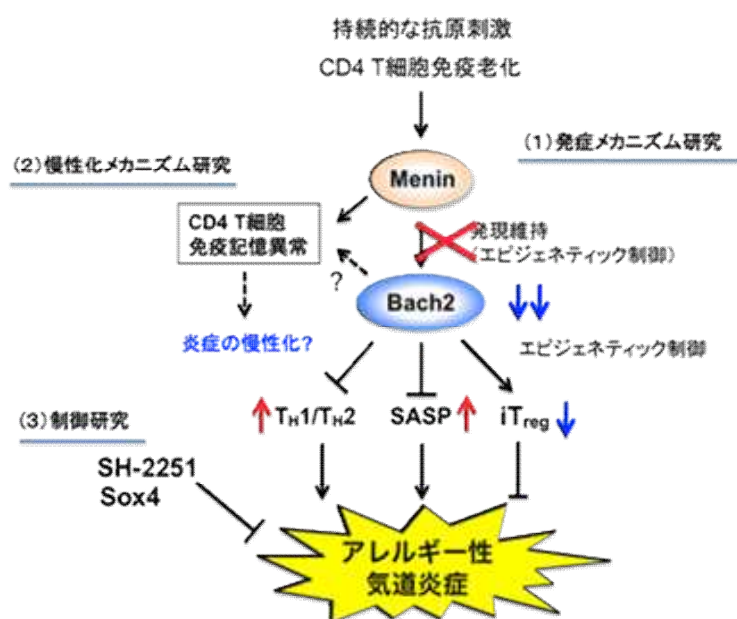


図 2. 本研究で得られた研究成果のまとめ

かった。そこで、 T_H1 分化における TGF- β の作用を詳しく検討したところ、IL-4/IFN- γ (IL-12) の両方が存在する場合、TGF- β は、 T_H1 分化誘導因子として作用することが明らかとなった。TGF- β /IL-4/IFN- γ で誘導される T_H1 細胞は、IL-12 によって *in vitro* で誘導される T_H1 細胞とは異なり、細胞表面に CD103 を高発現しており、IEL 様の形質を示すことを見いだして CD103 陽性 T_H1 として報告

した。これらの研究の結果から、Sox4 の発現をコントロールすることで、 T_H1/T_H2 細胞の分化（クロマチンリモデリング）バランスの調節を介した、炎症性御が可能になると考えられた。

3. 今後の展開

本計画研究により、CD4 T 細胞における転写抑制因子 Bach2 の発現低下が、炎症状態の形成に関与していることが明らかになった。また、Bach2 の発現維持には、腫瘍抑制因子 Menin による活性化ヒストン修飾の維持が必要であることも示された。当初、Bach2 は B 細胞特異的な転写抑制因子として見いだされ、免疫グロブリンのクラススイッチの誘導や形質細胞分化の抑制への関与が報告された。しかし、最近、T 細胞や肺胞マクロファージにおいても Bach2 は発現しており、それぞれの細胞において Bach2 が欠損することで、炎症性腸疾患や肺胞蛋白症が発症することも報告されている。さらに、GWAS 解析などにより、BACH2 の遺伝子多型がアレルギー性喘息、関節リウマチ、クローン病、セリアック病、尋常性白斑や多発性硬化症など、多くの慢性炎症疾患や自己免疫疾患と関連していることも指摘されている。このことは、Bach2 の発現や機能を制御することが、慢性炎症疾患の治療につながる可能性があることを意味している。私たちは、本計画研究の成果として Menin が Bach2 の発現維持に関与していること、CD4 T 細胞における Bach2 の発現は、免疫老化によって低下することを新たに見いだした。今後は、この成果を基盤として、Bach2 の発現・機能調節を介した慢性炎症制御戦略の提唱を目指した研究を展開したいと考えている。

また、SH-2251 によるクロマチンリモデリング調節を介した慢性炎症性御研究については、まず、SH-2251 の直接の標的分子の同定を試みる。それにより、SH-2251 の慢性炎症性御薬としての可能性を模索していく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

本さがけ研究期間では、T 細胞免疫老化に伴う炎症性形質獲得の分子機構の一端を世界に先駆けて明らかにできた。これは、CD4 T 細胞のエピジェネティックな機能変化を介した、炎症の発症の新たな機構を解明したものであり、当初の研究目的の一つを達成できたと考えている。しかし、これらの成果を記載した論文は、現在、リバイス中や投稿準備中であり、成果を外部に発信するという点では、当初計画より進捗が遅れている。今後、本研究を継続することにより、2～3年以内にさがけ研究の成果を世界に向けて発信する予定である。

また、クロマチンリモデリング調節による慢性炎症性御研究では、Gfi-1 の発現調節を介して IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングを制御し、OVA 誘発マウスアレルギー性気道炎症の発症を抑制する低分子化合物 SH-2251 を見いだした。この成果は、本領域研究の目的の一つである炎症の慢性化の制御に合致しており、十分な成果をあげたと考えている。

一方、炎症の慢性化に焦点を当てた、炎症性の T 細胞記憶の維持機構に関する研究は立ち後れており、当初の狙いが達成できたとは言い難い状況である。

(2) 研究総括評価（公開項目）

老化などによるヘルパーT 細胞のエピジェネティックな変化に伴う免疫記憶の機能異常が

炎症の慢性化に関わっているという仮説の元に研究が実施された。その結果、ヘルパーT細胞の終末分化や細胞老化といった炎症形質を誘発イベントに対する腫瘍抑制因子 Menin の抑制作用が、その下流で働く転写抑制因子 Bach2 遺伝子の活性化ヒストン修飾を行うことによる Bach2 発現の維持により達成されていること、また 2 型ヘルパーT細胞分化に対する TGF β の抑制作用に転写抑制因子 Sox4 の発現が関与していることを見出すと共に、この Sox4 の T細胞における発現がマウス喘息モデルの病態形成を抑制すること、さらに IL-5 産生阻害薬 SH-2251 が IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングと IL-5 産生 2 型ヘルパーT細胞分化を選択的に抑制することを明らかにした。これらは何れも新規性・独創性が高く、優れた解析能力による成果であると評価できる。今後は、Menin-Bach2 経路や TGF β -Sox4 経路による T細胞分化制御に基づく免疫制御メカニズムの異常が炎症の慢性化に関わることを明らかにし、疾患の制御に結びつくことを期待している。また、IL-5 産生阻害薬の創薬としての展開も、より実的な面から大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tofukuji, S., Kuwahara, M., Suzuki, J., Ohara, O., Nakayama, T., and **Yamashita, M.**: Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF β . *J. Immunol.* 188:4846-4857 (2012)
2. # Kuwahara, M., #**Yamashita, M.**, Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., Motohashi, S., Hosokawa, H., Tumes, D., Iwamura, C., Lefebvre, V., and Nakayama, T.: The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses T_H2 differentiation. *Nat. Immunol.* 13:778-786 (2012) #equal contribution
3. Suzuki, J., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Imamura, M., Kato, F., Nakayama, T., Ohara, O., and **Yamashita, M.**: A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the *Il5* gene locus. *PLoS ONE* 8:e61785 (2013)

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

Yamashita M. Menin-Bach2 pathway controls senescence-associated secretory phenotype (SASP) in CD4 T cells. JST-CREST International Symposium, Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease, Tokyo

Kuwahara M, Nakayama T, Yamashita M. Crucial role of Menin in the regulation of CD4 T cell terminal differentiation and senescence: 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (KTCC2013), Kyoto

山下 政克、東福寺 聡一、鈴木 淳平、桑原 誠 Th2 細胞分化・機能の調節を介した気道炎症制御 第 48 回日本小児アレルギー学会・第 16 回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会合同学術大会

プレスリリース

CREST 中山チームとの共同研究

アレルギーの新たな抑制経路の発見～慢性難治性アレルギー疾患の新規治療法確立に期待～ 2012 年 6 月 28 日

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/pdf/20120628.pdf>

研 究 報 告 書

「インバリアントナチュラルキラーT (iNKT) 細胞による炎症慢性化機構の解明と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年3月～平成26年3月

研 究 者: 渡会 浩志

1. 研究のねらい

外来微生物やウイルス感染に対する生体防御反応とそれによってもたらされる炎症制御機構を解明することは免疫学におけるもっとも本質的な課題の一つであり、またその破綻によって引き起こされる慢性炎症を人為的に制御する上でも重要である。炎症は外的あるいは内的環境要因に対する生体の防御反応であると認識されている。しかしながら近年、これら疾患の局所において炎症細胞の浸潤と慢性的な炎症が観察され、それが組織変性と疾患の重症化の重要な要因となっていることが明らかになってきた。ところが、炎症の慢性化がどのような機序で組織変性や疾患の重症化をひき起こすのか、なぜ、通常は終息するはずの炎症反応が持続し慢性化するのかについては不明な点が多いのが実状である。また、生体の高次機能は免疫系-神経系-内分泌系などのネットワークを介した複雑系により成り立っているため、これらの時空間的な調節と炎症の慢性化との関連性を解明することも重要である。

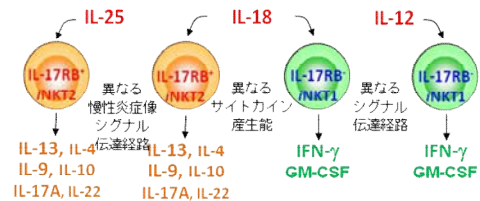
このような社会的要請の中、炎症のトリガーとなり得る自然リンパ球 (ILC: innate lymphoid cell) が脚光を浴びている。それは、その活性化によって即時的かつ大量のサイトカインを産生することで免疫系全体を支配し得るからである。本研究では ILC の中でも自然 Tリンパ球群に属する iNKT 細胞に着目した。iNKT 細胞は通常の T 細胞と異なり MHC クラス I 様抗原提示分子 CD1d に提示された糖脂質を認識する種を超えて進化的に保存されたユニークな免疫系を形成する T 細胞亜群で、限定された T 細胞抗原受容体 (TCR) を発現し、内源性糖脂質リガンドに常にさらされている状態にあるためメモリー化した状態にあり、反応の即時性ととも、種々のサイトカインやグランザイム、パーフォリンなどを産生する多機能性をも有することが知られている。これらの特徴から iNKT 細胞は自然免疫系と獲得免疫系の間に位置し(あるいは自然 Tリンパ球として獲得免疫系を調節することにより)、免疫系全体を制御・調節する役割を担っていると考えられている。したがって iNKT 細胞の異常な活性化や機能偏向は免疫系の異常や炎症の惹起をもたらすことが想定される。実際、Th1 型劇症肝炎や Th2 型アレルギー性喘息などにおいては iNKT 細胞がトリガーを担っているとの報告がある。

しかしながらこのような異なる免疫反応が iNKT 細胞によってどのようにしてもたらされるのかについては長い間不明であった。本さきがけ研究ではこれまで均一と考えられていた iNKT 細胞が機能的に異なる亜集団の集まりであることを見出し、各々の iNKT 細胞サブタイプの生体内での分化発生機構を明らかにするとともに、様々な炎症にどのように関与しているのかを明らかにすることで、慢性炎症病態形成メカニズム、特に細胞カスケードと分子機構について明確にする。そして、社会的要請の高い慢性炎症化機構の解明とその制御を目的として、iNKT 細胞によってもたらされる多彩な炎症惹起および終息反応に着目し、新たな治療戦略の方向づけの可能性を見出すことを主たる研究目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

研究者は iNKT 細胞が IL-12R と IL-25R を発現するキラー型 iNKT1 とヘルパー型 iNKT2 のサブタイプに大別できることを明らかにし、各々が胸腺内で別々の分化発生経路をたどって末梢に移行し、互いの可塑性を有さないことを明らかにした。両者は胸腺分化段階からケモカイン受容体の発現パターンが全く異なる(iNKT1: CXCR6 陽性、iNKT2: CCR4/7 陽性)ため、末梢組織局在性も大きく異なる(iNKT1: 肝臓、骨髄、脾臓、iNKT2: 肺、リンパ節、脾臓)。また iNKT1 と iNKT2 はそれぞれ IL-12 と IL-25 に反応し、iNKT1 からは IFN- γ や GM-CSF が、iNKT2 からは IL-13, IL-9, IL-10, IL-4, IL-17A, IL-22 が産生される。これらの知見をもとに、肺における iNKT2 の気道炎症の関与について確認したところ、OVA を疑似抗原としたアレルギー気道炎症モデルにおいて、IL-25 依存的な炎症反応が iNKT2 依存的にもたらされることを見出した。さらに、炎症性サイトカイン IL-18 が iNKT1、iNKT2 両方に反応性を有し、各々異なる炎症惹起反応を担うことを見出した。特に Respiratory Syncytial Virus (RSV) 感染においては、IL-18 依存的に iNKT2 が炎症のトリガーとなっていることを見出した。図に示すような試験管内で再現された両サブタイプの異なる機能発現メカニズムについて、シグナル伝達経路やエピゲノム状況を明らかにするだけでなく、特に新しく同定された iNKT2 にフォーカスして、生体内における機能、①アレルギー気道炎症モデル以外の病態との関連性とその発症機構の解明、②分化発生機構の解明、③GWAS 解析によるヒト疾患への関与の可能性などについて、事項に掲げるように詳細な解析を行い明らかとした。



(2) 詳細

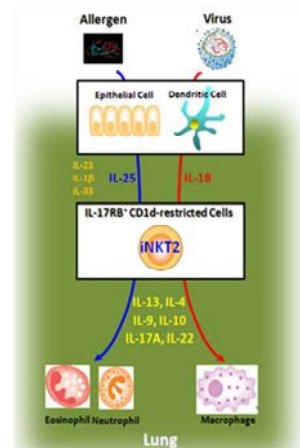
① iNKT2 細胞による RSV 感染気道炎症発症機構の解明

肺に局在が認められる iNKT2 は OVA を疑似抗原とした IL-25 誘発アレルギー性気道炎症惹起の中心を担う(さきがけ研究申請の契機)。他の非アレルギー喘息は、運動誘発性、アスピリン、大気汚染、ウイルス感染などその発症機構は複雑で、年齢によっても病態が異なるなど、多岐に渡るだけではなく、Th2 細胞を必要とせず、その大部分の発症機序は不明であった。しかしながら、1) センダイウイルスの感染によって引き起こされる喘息では、特に慢性化状態において、iNKT 細胞の活性化と肺胞マクロファージによる IL-13 産生の関与が重要であること(Nat Med 2008)、2) 大気汚染では、iNKT 細胞と好中球の活性化と IL-17 産生の関与が重要であること(J Exp Med 2008)、さらに、3) 重篤喘息患者やステロイド非感受性の患者においては、iNKT 細胞のリクルートとそれに続く好中球の活性化、IL-17 産生が指摘され(Nat Med 2009)、4) 慢性閉塞性肺疾患(COPD)においても iNKT 細胞の関与が疑われている(Nat Immunol 2010)など、非アレルギー喘息発症の重要な鍵を握っている細胞であると考えられる。

本研究では iNKT 細胞の中で新しく同定した iNKT2 が上記 1)~4) のモデルにおいて気道炎症のトリガーになり得るかを検証した結果、1) のウイルス感染モデルにおいて最も寄与が大きい結果を得た。さらに iNKT2 は週令が進むに伴って、肺あるいは脾臓に存在する数・割合ともが徐々に減少していくことを見出したため、小児喘息の起因ウイルスとして知

られる RSV をモデルとして、iNKT2 の気道炎症への関与を調べた。野生型 BALB/c マウス、*Il17rb* あるいは *Tra18*(iNKT 細胞)欠損マウスに RSV(10^6 pfu)を 10 日おきに計 4 回経鼻感染させ、最初の 3 回の経鼻感染 4 日後に組換え体可溶化型 G 蛋白質(recGs)を腹腔内に免疫した。最後の RSV 感染翌日に recGs を経鼻投与し、その翌日に肺の気道圧、浸潤細胞、肺胞洗浄液中のサイトカインを観察した。野生型マウスにおいては RSV 感染群においてメサコリン誘発性の気道圧上昇が濃度依存的に観察されたのに対して、*Il17rb* あるいは *Tra18*欠損マウスにおいては気道圧上昇は著しく低く、野生型 BALB/c マウスの RSV 非感染群のそれと同程度であった。浸潤細胞に関しては、RSV 感染野生群において全細胞数及び各細胞とも有意に多かったが、リンパ球・マクロファージが多く浸潤しているという結果が得られ、アレルギー性喘息で一般的に観察される好酸球・好中球浸潤とは異なる結果であった。肺胞洗浄液中のサイトカインに関しては IL-5 や IL-13 といった喘息で一般的に観察されるサイトカインの他に IL-9, 10, 17A, 22 といった炎症性サイトカインが RSV 感染野生群において有意に高かった。また、肺組織切片の H&E、PAS 染色の結果でも、RSV 感染野生群においてリンパ球浸潤と杯細胞からのムチン産生が観察された。さらに、*Tra18*欠損マウスに iNKT2 を移入することで、RSV 誘発性の気道圧上昇が移入細胞数依存的に観察されることから、RSV 誘発性の気道炎症発症にも iNKT2 が深く関与していることが示された。

次に RSV 誘発性の気道炎症発症が IL-25 依存的か否かを検証するために、抗 IL-25 抗体投与による気道炎症の抑制の有無を検証したが、その関与が否定される結果であった。一方で、*Myd88* 欠損マウスでは、*Il17rb* あるいは *Tra18* 欠損マウスと同様に気道圧上昇は著しく低く、iNKT2 を移入することで、RSV 誘発性の気道圧上昇が移入細胞数依存的に観察されることから、iNKT2 の MyD88 下流のシグナルが深く関与していることが示された。MyD88 は Toll 様受容体、IL-1 ファミリー受容体のアダプターと知られるため、iNKT2 に発現するこれら受容体を検索したところ、IL-18 受容体が高発現であることを認めた。iNKT1 が Th1 サイトカインを産生するのに対して、iNKT2 は IL-18 に反応して Th2/17 サイトカインを産生することを見出した。IL-18 は当初 IL-12 と協調的に働いて T 細胞からの IFN- γ 産生を誘導する因子として報告され、*P. acnes* と LPS によって誘発される IFN- γ 依存性劇症肝炎モデルの炎症誘発因子であることが示されたが、その後の研究で IL-18 は従来と全く異なるメカニズムにより自然型アトピーや IgE、気管支喘息の誘導を引き起こすことも明らかにされ、種々のアレルギー反応の誘導にも寄与する多彩な生物活性を有するサイトカインであることが知られるようになった。IL-18 による iNKT 細胞からの IL-4 産生能についても報告があるものの、細胞ごとに異なる機能発現様式についての明確な説明はできていない。これまでの報告と本研究での知見を鑑みると、劇症肝炎モデルにおいては iNKT1 が、RS ウイルス感染モデルにおいては iNKT2 が IL-18 による炎症誘発の中心を担っていると想起される。入手した *Il18* あるいは *Il1r5*(IL-18 受容体 α 鎖)欠損マウスや新たに樹立した *Il1r7*(IL-18 受容体 β 鎖)を用いて、詳細な解析を実施中である。

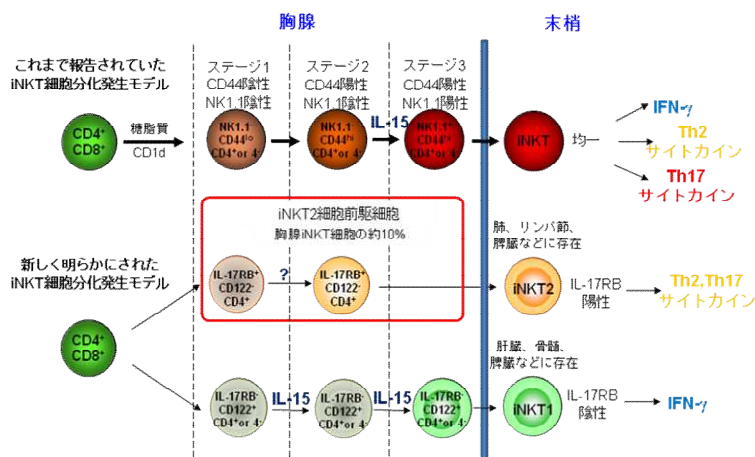


② iNKT サブタイプの分化発生機構の解明

iNKT 細胞は胸腺内で分化し、胸腺 CD4CD8 ダブルポジティブ (DP) から T 細胞決定系列と分岐し、CD44 陰性 NK1.1 陰性 (ステージ 1)、CD44 陽性 NK1.1 陰性 (ステージ 2)、CD44 陽性 NK1.1 陽性 (ステージ 3) へと分化し、末梢に移行することが知られている。ステージ 2 において IL-4 産生能獲得、ステージ 3 において IFN- γ 産生能を獲得し、ステージ 2 から 3 への細胞の拡大には IL-15 が重要な役割を果たしていることが報告されている。

我々は、既に C57BL/6 マウス胸腺内に iNKT2 のマーカーである IL-17RB 陽性 CD1d 拘束性細胞が約 10% 存在し、主にステージ 1 と 2 に局在することを見出した。すなわちステージ 1 及び 2 の 80% 前後が IL-17RB 陽性で、ステージ 3 においては、1-2% 程度が IL-17RB 陽性であった。また、*Il15* ミュータントマウスではステージ 3 の細胞が約 1/10 に激減しているのに対して、*Il17rb* 欠損マウスではステージ 3 は正常で、ステージ 1 及び 2 の細胞が約 1/5 に減じていた。さらに胸腺 IL-17RB 陽性 NKT 細胞は IL-15 受容体 β 鎖 CD122 が陰性で、iNKT1 のマーカーである CD122 は IL-17RB 陰性 NKT 細胞に発現が局在していた。CD4 と IL-17RB の発現を指標として iNKT ステージ 1 の細胞をソートし、胎児胸腺と組織培養を行うと、IL-17RB 陰性の iNKT 細胞はステージ 2 を経てステージ 3 へと IL-17RB 陰性 CD122 陽性 iNKT 細胞へと分化するのに対して、IL-17RB 陽性の iNKT 細胞はステージ 2 に分化しステージ 3 へは移行しないことが確認され、IL-17RB の発現も維持され、CD122 陰性であった。また、胸腺 iNKT 細胞 (iNKT1 および iNKT2 前駆細胞) の遺伝子発現様式及びサイトカイン反応性、サイトカイン産生能は、末梢 (脾臓) の iNKT1 および iNKT2 と一致する結果であり、iNKT2 細胞はこれまで知られていた iNKT1 の辿る細胞分化経路とは全く別に IL-15 非依存的に胸腺内で独自の経路で分化発生する、定常的に存在する可塑性のない細胞決定系列であることが示された。

今後、iNKT2 の分化発生様式に必須の分子群の同定、その細胞系列決定の解析や iNKT1 と iNKT2 の分岐点の解析を進めていく予定である。



③ GWAS 解析によるヒト疾患への関与の可能性

これまでの大規模なコンソーシアムベースの GWAS 解析の結果から、喘息に関連する複数の遺伝子が同定されている (*IL18R1*, *HLA-DQ*, *IL33*, *IL13*, *ORMDL3/GSDMB*, *IL2B*, *SMAD3*, *SLCA22A5*, *RORA* など)。しかしながら、iNKT2 のマーカーである *IL17RB* 遺伝子についてはこれまでのところ報告がなかった。そこでヒト *IL17RB* 遺伝子座に存在する一般的な 16 ヶ所の SNPs のうち 8 ヶ所について、対象をステロイド耐性小児喘息、ステロイド耐性成人喘息、アトピーと細分化し相互比較を行った。その結果、ヒト *IL17RB* 遺伝子座の 3' 非翻訳領域にステロイド耐性小児喘息特異的な SNP が一つ存在することを見出し

た。この SNP は対象患者において PPAR γ 結合部位に変換することから、翻訳調節に関わり得る可能性があり、現在転写制御解析を実施している。

④ 他の ILC (特にナチュラルヘルパー細胞に代表される ILC2) との相違

上記のように iNKT2 に関する新しい知見は本研究によって多くが見出された。しかしながら病態について俯瞰すると似て非なる他細胞 (特に ILC2) とどのような類似点、相違点があるのかを明確にすることが炎症制御機構を明らかにする上でも重要である。ここでは他の研究で明らかにされた知見もまとめて、iNKT2 が ILC2 と非依存的あるいは協調して Th2 型炎症惹起 (特に肺、幼少期) に関与し得ることを表にして示す。

	iNKT2細胞	ILC2細胞
出現時期	幼少期に多い	老齢期に多い
組織局在	肺、リンパ節	FALC ¹⁾
抗原特異性	糖脂質	なし
分化発生	胸腺、IL-7	骨髓?、IL-7
陽性表面抗原	CD45, Sca-1, Thy1, CD3, CD4, iNKT-TCR, CD44, CD25, CCR4, CCR7	CD45, c-Kit, Sca-1, Thy1, CD44, CD25
サイトカイン受容体	IL-7R, IL-18R1, IL-25R/IL-17RB	IL-7R, ST2/IL-33R, IL-25R/IL-17RB
サイトカイン反応性	IL-25 ²⁾ IL-18 ²⁾	IL-33 IL-25 ³⁾
サイトカイン産生能	IL-13, IL-9, IL-10, IL-4, IL-17A, IL-22	IL-13, IL-5, IL-6

両細胞間で共通するものを赤字で示す。

太字は大規模GWAS解析によって喘息関連遺伝子として報告がある。下線IL-25R/IL-17RBは健康小児とステロイド非感受性小児喘息患者で相違のあるSNPを見出した。

1) パパインやIL-33の投与、鉤虫感染によって肺にも出現。

2) TCR共刺激が必要。

3) IL-2との共刺激が必要。

3. 今後の展開

本さがけ研究成果において、小児喘息の起因ウイルスとして知られる RSV 感染によって惹起される炎症反応が iNKT2 によってもたらされることをマウスで明らかとし、ヒト GWAS 解析によって iNKT2 のバイオマーカーである IL-17RB が小児喘息患者で有意差のあるシングルポリモルフィズムを見出した。したがって、実際にヒトで iNKT2 が RSV 感染時の炎症惹起細胞として機能しているかを明確にすることが重要である。

また、多彩な機能を有するサイトカインとして知られていた IL-18 が、細胞ごとに応答性が異なることが明確にされた。すなわち、IL-18 応答性は MyD88 依存的であるものの、これまでとは異なる受容体を介し、異なるシグナル伝達経路あるいはエピゲノム状態の相違によって制御され得ることを見出した。「似て非なる」iNKT1 と iNKT2 を詳細に比較検証することで、これまで不明であった IL-18 依存的な炎症誘発機構を明確化しうる。

一方で、他の ILC (特にナチュラルヘルパー細胞に代表される ILC2) との機能や病態との関連性について明確化することも重要である。iNKT2 も ILC2 も気道炎症の惹起を担うことが各々別箇に示されたが、組織局在性やサイトカイン応答性など、いくつかの点で異なることが示された (詳細④参照)。今後は、さらなる詳細な解析や両者が共に関与し得る炎症における互いの役割について詳細な解析が必要である。

4. 評価

(1) 自己評価

RSV 感染症は主に乳児に重篤な細気管支炎や肺炎を発症することがあり、細気管支炎を

発症した児が、後に喘鳴を繰り返すことがある、ということが明らかとなっている。また、1歳までに入院を要する重症の RSV 下気道感染症に罹患した小児では、追跡調査により、7歳時に30%で気管支喘息を発症し明らかな喘息の発症を認めなくても68%の年長児に喘鳴を聴取したのに対して、RSV に罹患しなかった小児では、気管支喘息発症は3%に過ぎなかった、との報告もあることから、乳児期における RSV 感染が気管支喘息を発症するリスクとして指摘されている。RSV 感染による細気管支炎については、感染による気管支への直接的障害、感染の際に放出されるケミカルメディエーターなどの産生異常、免疫の異常反応などが考えられるが、その喘息発症の機序については詳細は不明のままであった。

本さがけ研究で、少なくともマウス RSV モデルにおいては、iNKT2 と IL-18 が責任細胞・分子の一端を担い得ることを示した。また iNKT2 のバイオマーカーである IL-17RB はヒト小児喘息の責任遺伝子であることを GWAS 解析で明らかにした。これらの結果を統合して、今後は小児喘息における上皮細胞による気道炎症機構の詳細な解析や、iNKT2 のヒトにおける分化発生機能獲得様式を明確にすることで、科学的で論理的な裏付けに基づいた治療戦略・個別医療への適応へと展開させることが重要である。

(2) 研究総括評価(公開項目)

多様な作用を有する iNKT 細胞の本質的機能については、本細胞の発見からこれまで長らく捉え難かった。しかし、本研究において iNKT 細胞の発生・分化過程にまで遡る詳細な解析を行うことにより、これまでほぼ均質な細胞集団であると考えられていた iNKT 細胞が、実は異なる種類のサイトカインを分泌するが IL-17RB を発現しない従来タイプの iNKT1 細胞と、IL-17RB を発現する新たな iNKT2 細胞との亜集団に分類できることを明らかにした。また、新たに同定した iNKT2 細胞がウイルス感染による小児喘息の責任細胞であることの可能性をマウスモデルで示し、論文報告した。iNKT 細胞の有する多様な機能に対する研究者の疑問に解を与えたことは高く評価される。今後は、IL17RB 遺伝子座に見出したステロイド耐性小児喘息特異的な SNP とヒト疾患との関連性の追求や、iNKT 細胞活性化シグナルの解析などから新たな治療戦略の基盤構築につながる成果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Angkasekwinai P, Chang SH, Thapa M, Watarai H, Dong C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nature Immunology* 2010, 11(3):250-256.
2. Watarai H, Fujii SI, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Shozaki Y, Sharif J, Matsuda M, Mochiduki S, Hasegawa T, Kitahara G, Endo T, Toyoda T, Ohara O, Harigaya KI, Koseki H, Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *Journal of Clinical Investigation* 2010, 120(7):2610-2618.
3. Motomura Y, Kitamura H, Hijikata A, Matsunaga Y, Matsumoto K, Inoue H, Atarashi K, Hori S, Watarai H, Zhu J, Taniguchi M, Kubo M. E4bp4, a mammalian basic leucine zipper transcriptional factor, is a critical regulator of IL-10 and IL-13 production by CD4 T cells.

Nature Immunology 2011, 12(5):450-459.

4. Watarai H, Sekine-Kondo E, Motomura H, Yasuda T, Yoshida H, Kubo M, Koseki H, Taniguchi M. Development and function of invariant natural killer T cells producing T_H2 - and T_H17 -cytokines. *PLOS Biology* 2012, 10(2):e1001255.

5. Tarumoto N, Kinjo Y, Kitano N, Sasai D, Ueno K, Okawara A, Izawa Y, Shinozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Takeyama H, Maesaki S, Shibuya K, Miyazaki S. Exacerbation of invasive *Candida albicans* infection by commensal bacteria or a glycolipid through $IFN\gamma$ produced in part by iNKT cells. *Journal of Infectious Disease* in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2件

1.

発明者: 渡会浩志、谷口克

発明の名称: 非アレルギー性気道炎症及び／又は非アレルギー性気道過敏症の治療薬

出願人: 理化学研究所

出願日: 2011/10/20

出願番号: US2011/321098

2.

発明者: 谷口克、渡会浩志、古関明彦、藤井眞一郎

発明の名称: iPS細胞由来αNKT細胞を用いた免疫療法およびそのためのNKT細胞由来iPS細胞および該iPS由来NKT細胞のバンキング

出願人: 理化学研究所

出願日: 2011/12/2

出願番号: US2011/419064

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 招待講演

1. 渡会浩志、「ナチュラルキラーT(NKT)細胞による気道過敏性発症と炎症慢性化機構」第3回小児気道アレルギーフォーラム、福岡、2011/5/21

2. Watarai H, Sekine-Kondo E, Taniguchi M. “Development and function of invariant natural killer T cells producing T_H2 - and T_H17 -cytokines.” 6th International Symposium on CD1 and NKT cells, Chicago, USA, 2011/9/26

3. 渡会浩志、「気道過敏性発症に関与する炎症性ナチュラルキラーT細胞の機能と分化」第48回日本小児アレルギー学会・第16回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会合同学術大会、福岡、2011/10/28

4. Watarai H. Role of invariant natural killer T cells in the induction of airway hyperactivity. 第41回日本免疫学会学術集会、神戸、2012/12/6

5. Watarai H. In vitro generation of iNKT cells with desired functions from iPSCs suitable for cancer immunotherapy. The Innovative Research Institute for Cell Therapy (IRICT) Spring Symposium, Seoul, Korea 2013/5/16

2. 著書

1. Taniguchi M, Fujii S, Nakayama T, Motohashi S, Dashtsoodol N, Watarai H. Mechanisms of NKT-cell-mediated adjuvant activity and function of iPS-derived NKT cells. *Natural Killer T cells* pp1-14 (2011).
2. Watarai H, Harada M, Tamari M, Taniguchi M. A role for natural killer T-cell subsets in the pathogenesis of various allergic disorders. *Inflammation and Allergy Drug Design* pp59-66 (2011).

3. プレスリリース

小児ぜんそくなどを引き起こす悪玉細胞の発生起源を解明 ―アレルギー・炎症性疾患治療への応用に期待― 2012 年 2 月 8 日 理化学研究所・科学技術振興機構