

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19390121
研究課題名(和文) 新規サイトカイン(IL-27, IL-33)による寄生虫感染防御機構の解析
研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of the host defense against parasite infection by new cytokines (IL-27, IL-33)
研究代表者
善本 知広 (YOSHIMOTO TOMOHIRO)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60241171

**研究成果の概要：**IL-27 の生体内投与は、宿主の Th1 反応を増強し Th2 反応を抑制する結果、細胞内寄生原虫 *Leishmania. major* に対する生体防御機能を誘導する。一方 IL-33 の生体内投与は、獲得系免疫細胞の関与なしに IL-13 産生を誘導し、腸管杯細胞の活性化とムチン産生を誘導する結果、腸管寄生線虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)の排虫を促進する。今回の研究結果から、新規サイトカイン(IL-27, IL-33)はそれぞれ、住血鞭毛原虫や腸管寄生線虫に対する、新規抗寄生虫薬の開発に結びつくものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫

キーワード：原虫感染, 蠕虫感染, 生体防御, IL-27, IL-33

### 1. 研究開始当初の背景

研究開始時、研究代表者は、IL-12 に構造的・機能的に類似する新しい IL-12 ファミリーとしてクローニングされた IL-27 を *in vitro* で Th1 細胞を分化誘導する系に IL-18 と共に添加すると、通常の Th1 細胞に比べ約 20 倍 IFN- $\gamma$  産生を増強することを見いだした。逆に、Th2 細胞を分化誘導する系に IL-27 を添加すると、それ単独で Th2 細胞の分化を抑制することを発見した (IL-27 による Th1 反応の増強と Th2 反応の抑制)。Th1 反応の増強は細胞内寄生性原虫に対して、感染防御作用を発揮する。実際、申請者は IL-27 を *Leishmania majori* (*L. major*) 易感染性の BALB/c マウス

に感染後 1 週間生体内投与すると、foot-pad swelling を抑制 (感染抵抗性) することを既に見いだしている。

さらに研究代表者は、IL-18 と同様に caspase-1 によって活性化型となって産生され、IL-1R ファミリーの受容体である ST2 のリガンドとして 2005 年クローニングされた IL-33 を *in vitro* で好塩基球・マスト細胞または Th2 細胞に添加すると、Th2 サイトカイン産生を著明に増強し、逆に Th1 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を抑制することを見いだした (IL-33 による Th1 反応の抑制と Th2 反応の増強)。IL-33 による Th2 反応の増強は、Th2 サイトカインによって誘導される小腸粘膜の杯細胞

からのムチン産生増強、または小腸粘膜特異的 MMC を活性化することで、腸管寄生線虫の排虫を促進し、感染防御作用を発揮することが期待された。

## 2. 研究の目的

新規サイトカイン(IL-27, IL-33)を用いた寄生虫(原虫、蠕虫)感染防御作用を明らかにする。特に、IL-27 による細胞内寄生原虫 *L. major* に対する細胞性免疫(Th1 反応)の増強と、IL-33 による腸管寄生線虫 (*Nippostrongylus brasiliensis* : Nb)に対する Th2 反応の増強による感染防御作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

平成19年度は、まず *in vitro* の実験系で、IL-27 と IL-33 の生理的機能と標的細胞を解析した。

(1) IL-27 による Th1 細胞からの IFN- $\gamma$  産生増強/Th2 細胞からの IL-4 産生抑制のメカニズムの解明:

- ①. 卵白アルブミン(OVA)特異的 TCR トランスジェニックマウス(DO11.10)由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を APC と OVA 存在下に Th1 condition (IL-12+anti-IL-4) 又は、Th2 condition (IL-4+anti-IL-12+anti-IFN- $\gamma$ )にて2週間培養し、Th1 細胞と Th2 細胞を作製する。Th1 condition に IL-27 を添加し、Th2 condition に IL-27 を添加し、誘導されるサイトカイン産生を ELISA 法またはフローサイトメトリーを用いた細胞内 IFN- $\gamma$ ・IL-4 染色法で測定した。
- ②. Th1 細胞の分化と維持に必須の核内因子 T-bet の発現に対する IL-27 の影響を検討した。
- ③. Th2 細胞の分化と維持に必須の核内因子 GATA-3 の発現に対する IL-27 の影響を検討した。

(2) IL-33 による Th2 サイトカイン産生増強のメカニズムの解明:

- ①. 上記 Th2 condition に IL-33 を添加または Th2 細胞に分化した細胞に IL-33 を添加して、Th2 サイトカイン産生を ELISA にて測定した。
- ②. 抗 CD3 抗体非存在下に NKT 細胞を IL-33 で刺激して Th2 サイトカイン産生を ELISA にて解析した。
- ③. 骨髄細胞由来好塩基球・マスト細胞に IL-33 を添加して、Th2 サイトカイン産生を ELISA にて測定した。

平成20年度は、IL-27 または IL-33 の *in vivo* 投与による寄生虫感染防御作用を検討した。

(1) IL-27 の生体内投与による *L. major* 感染抵抗性の誘導:

- ①. BALB/c マウスの footpad に *L. major* を感染させた後、1週間 IL-27 (1  $\mu$ g/day)単独または PBS (コントロール群)を腹腔内投与し、経時的に footpad の腫脹を計測した。
- ②. 感染後7週目の膝下リンパ節細胞を採取し、*L. major* 抗原(*L. major* promastigotes の冷凍凍結を繰り返して作成した抽出抗原)で刺激して Th1/Th2 サイトカイン産生を測定した。
- ③. リンパ節細胞をシュナイダー培養液で2週間培養し、細胞当たりの parasite burden を測定した。  
(2) IL-33 の生体内投与による *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) 排虫促進作用:
  - ①. IL-33 投与後、経時的に小腸粘膜の杯細胞からのムチン産生亢進を組織学的に検討した。
  - ②. IL-33 の標的細胞を検討する目的で T 細胞、B 細胞を欠損する RagKO マウスに IL-33 を投与し、ムチン産生亢進を組織学的に検討した。
  - ③. IL-33 の投与によって、IL-13 産生を介して杯細胞からのムチン産生が亢進していることを明らかにする目的で、IL-13KO マウスに IL-33 を投与し、ムチン産生を検討した。
  - ④. IL-33 投与後ムチン産生の亢進時に Nb 成虫を外科的に十二指腸に移入し、16時間後の小腸粘膜に侵入定着している Nb 数を測定した。
  - ⑤. Nb 第3期幼虫を感染させたマウスに IL-33 を投与し非投与群と排虫の程度を比較した。

## 4. 研究成果

*in vitro* の実験系

(1) IL-27 による Th1 細胞からの IFN- $\gamma$  産生増強/Th2 細胞からの IL-4 産生抑制のメカニズムの解明:

- ①. 卵白アルブミン(OVA)特異的 TCR トランスジェニックマウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞に IL-12 を用いて Th1 細胞に誘導する系に IL-27 のみを添加しても影響を及ぼさないが、IL-27 と共に IL-12 ファミリーの1つである IL-23 と IL-18 を添加すると IL-12 で誘導される Th1 細胞の約10倍もの IFN- $\gamma$  産生が誘導されることが明らかになった。
- ②. IL-4 を用いて Th2 細胞に分化誘導する系に IL-27 を添加すると、IL-27 濃度依存的に Th2 サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13)産生を抑制する。更に一度 Th2 細胞に分化した細胞に IL-27 を添加すると Th2 細胞からの IL-5, IL-13 産生を著明に抑制するが、IL-4 産生には影響を及ぼさないことが明らかとなった。
- ③. IL-27 は Th2 細胞の分化と維持に必須の

核内因子GATA-3の発現を抑制することで、Th2サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。

(2) IL-33 による Th2 サイトカイン産生増強のメカニズムの解明：

- ①. IL-33 の標的細胞を明らかにする目的で IL-33R 発現細胞を検討した結果、Th2 細胞、マスト細胞及び好塩基球が IL-33R を発現していた。一方、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞は IL-33R を発現していなかった。
- ②. Th2 細胞に分化した細胞に IL-33 を添加すると、IL-33 濃度依存的に IL-5, IL-13 産生を増強するが、IL-4 産生には影響を及ぼさなかった。
- ③. 好塩基球・マスト細胞に IL-3 と共に IL-33 を添加すると、好塩基球はマスト細胞に比較してより強く Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) 産生を誘導することが明らかとなった。

in vivo の実験系

(1) IL-27 の生体内投与による *L. major* 感染抵抗性の誘導：

- ①. BALB/c マウスの footpad に *L. major* を感染後、1 週間 IL-27 (1 µg/day) 単独または PBS (コントロール群) を腹腔内投与し、経時的な footpad の腫脹の計測とリンパ節内の細胞当たりの parasite burden を測定した結果、IL-27 投与群では感染の進行が阻止された。
- ②. その作用機序を解析した結果、IL-27 投与群では *L. major* 感染で誘導される Th2 反応が阻止されていた。

(2) IL-33 の生体内投与による *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) 排虫促進作用：

- ①. 正常マウスに IL-33 を腹腔内投与すると、腸管の IL-13 mRNA 発現が上昇し、杯細胞は増加・肥大化して大量のムチンを産生した。
- ②. IL-33 による上記のムチン産生誘導は、T 細胞を欠損するマウス (RAG2 欠損マウス) でも認められることから、IL-33 は多様な細胞を標的とし、Th2 細胞非依存的に線虫感染防御能を有することが示唆された。
- ③. Nb を外科的にマウス十二指腸に移入し、20 時間後の小腸粘膜に侵入定着している Nb 数を測定した結果、IL-33 投与群では Nb 数が著しく減少していた。
- ④. この排虫は IL-13 依存的であった。
- ⑤. Nb 第 3 期幼虫を感染させたマウスに IL-33 を投与すると、腸管に生着している成虫数が有意に減少し、排虫を促進した。
- ⑥. この IL-33 による Nb 排虫促進は、T 細胞非依存的であった。以上の結果から、寄生線虫の排虫機構には IL-33 を介した獲

得免疫非依存的な排虫機構も存在することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

### 欧文原著

1. Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, and Nakanishi K. Contribution of basophils to Th2/IgE response *in vivo* by production of IL-4 and presentation of MHC class II/peptide complex to CD4<sup>+</sup>T cells. **Nature Immunol.**, *in press*. (査読有)
2. Sakishita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Ohkubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura Y, Yasuda K, Nakanishi K, and Tamari M. Association of IL-33 level and IL-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. **Clinical & Exp Allergy**, 38: 1875-1881, 2008.(査読有)
3. Kondo Y\*, Yoshimoto T\*, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N, Hoshino T, Fujimoto J, and Nakanishi K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. **Int. Immunol.**, 20: 791-800, 2008. (\* These authors contributed equally to this work) (査読有)
4. Kosaka H\*, Yoshimoto, T\*, Yoshimoto T, Fujimoto J, and Nakanishi, K. Interferon-γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. **Nature Med.**, 14: 437-441, 2008. (\* These authors contributed equally to this work) (査読有)
5. Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, and Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. **J. Immunol.**, 179: 4415-4423, 2007. (査読有)
6. Hayashi N, Yoshimoto T, Izuhara K, Matsui K, Tanaka T, and Nakanishi K. T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN-γ and IL-13 production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 104: 14765-14770, 2007. (査読有)

## 和文総説

7. 安田好文、善本知広、中西憲司. 感染症—ウイルス・細菌・寄生虫の感染戦略：寄生虫感染時のサイトカイン動態. 実験医学、27:1665-1671, 2009. (査読無)
8. 善本知広、中西憲司. 腸管寄生虫感染と宿主応答—IL-18 の線虫感染防御作用. 蛋白 核酸 酵素、54:1066-1072, 2009. (査読無)
9. 善本知広. IL-18, IL-33 と好塩基球. アレルギー・免疫、16: 34-42, 2009. (査読無)
10. 松葉沙織、近藤祐一、善本知広、中西憲司. IL-33 とアレルギー. 臨床免疫・アレルギー科、50: 323-332, 2008. (査読無)
11. 善本知広. アレルギーの発症と IL-17. 臨床免疫・アレルギー科、50: 196-203, 2008. (査読無)
12. 善本知広、中西憲司. IL-18 と気管支喘息. 喘息、20: 44-50, 2007. (査読無)
13. 善本知広. IL-18 による免疫制御—IL-18 と Super Th1 細胞. 医学のあゆみ、220: 198-199, 2007. (査読無)
14. 善本知広. Th1 細胞とアレルギー性炎症—IL-18 と Super Th1 細胞. 医学のあゆみ、220: 944-948, 2007. (査読無)
15. 善本知広. 蠕虫感染防御とマスト細胞. 臨床免疫・アレルギー科、47: 217-225, 2007. (査読無)
16. 善本知広. IL-18 による Th1 型喘息の発症機序. The 14<sup>th</sup> Symposium of Asthma in Tokyo, 26-32, 2007. (査読無)

〔学会発表〕(計 51 件)

## 招待講演

1. 善本知広. IL-18 とアレルギー性炎症—IL-18 による自然型アレルギーと獲得型アレルギー、(特別講演) 第 17 回大分アレルギー講習会、大分、2009. 3. 7.
2. 善本知広. IL-33 とアレルギー炎症、(招待講演) 第 4 回日本免疫学会/理研免疫アレルギー研究センター免疫ワークショップ、甲府、2008. 5. 20.

## シンポジウム、ワークショップ

3. 安田好文、佐々木由紀、松本真琴、善本知広、中西憲司. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. (シンポジウム) 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京、2009.3.27-28.
4. 松葉沙織、善本知広、三村 治、中西憲司. 実験的アレルギー性結膜炎モデルにおける IL-33 の病因論的役割の解明. (シンポジウム) 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終) 公開シンポジウム、東京、2008.12.15.
5. 善本知広、小坂 久、大橋浩一郎、中西憲司. 好塩基球は IL-4 産生能と抗原提示能の両機能を持ち生体内で Th2 応答を誘導、維持、増強する. (シンポジウム) 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終) 公開シンポジウム、東京、2008.12.15.
6. Yoshimoto T, Kosaka H, Fujimoto J, and Nakanishi K. IFN- $\gamma$  is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. (シンポジウム) 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2008.12.1-3.
7. Kondou Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Fujimoto, J, and Nakanishi K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adoptive immune system. (ワークショップ) 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2008.12.1-3.
8. 中西憲司、善本知広. IL-1 ファミリーサイトカインと自然型アトピー性炎症、(シンポジウム) 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2008.11.27-29.
9. 善本知広、中西憲司. 気道炎症疾患と自然免疫：IL-18/IL-33 による自然型気管支喘息の誘導、(シンポジウム) 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2008.11.27-29.
10. 善本知広、中西憲司. T 細胞の異常とアレルギー：IL-18 による Super Th1 細胞の誘導と IL-33 による Th2 細胞増強作用、(特別シンポジウム) 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2008.11.27-29.
11. 善本知広. IL-33 は獲得免疫応答の関与なしに自然型気管支喘息を誘導する、(シンポジウム) 第 73 回日本インター

フェロン・サイトカイン学会学術集会、札幌、2008.7.10-12.

12. 善本知広. IL-18 を標的とした Th1 型アレルギー性炎症の治療、(シンポジウム) 第 72 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007.7.5-6.
13. 善本知広. IL-18 を標的とした Th1 型アレルギー性炎症の治療的戦略、(シンポジウム) 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会、横浜、2007.11.1-3.
14. 善本知広、安田公好文、中西憲司. IL-27 suppresses Th2 cell development as well as Th2 cytokines production from polarized Th2 cells; a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. (ワークショップ) 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、2007.10.19-20.
15. 松葉沙織、善本知広、安田好文、池田誠宏、三村 治、中西憲司. 実験的アレルギー性結膜炎モデルマウスを用いたアレルギー性結膜炎に対する IL-33 の病因的役割の解析、(ワークショップ) 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、2007.10.19-20.
16. 小坂 久、善本知広、藤元治朗、中西憲司. NKT 細胞由来の IFN- $\gamma$  を中心とした術後癒着形成に関わる免疫学的要因の解析、(ワークショップ) 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、2007.10.19-20.
17. 今井康友、安田好文、林 伸樹、松本真琴、善本知広、水谷 仁、中西憲司. ナイーブマウスに移入された 抗原と Alum でパルスされた DC は Th2 細胞を Caspase-1 非依存性に誘導する、(ワークショップ) 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、2007.10.19-20.
18. 松葉沙織、善本知広、安田好文、池田誠宏、三村 治、中西憲司. 花粉で惹起される実験的アレルギー性結膜炎は IL-33 で増悪する、(ワークショップ) 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007.11.20-22.
19. Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, Mizoguchi J, and Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development as well as Th2 cytokines production from polarized Th2 cells; a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. (ワークショップ) 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007.11.20-22.
20. 松葉沙織、善本知広、安田好文、池田誠宏、

三村 治、中西憲司. 花粉で惹起される実験的アレルギー性結膜炎は IL-33 で増悪する、(ワークショップ) 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007.11.20-22.

21. 安田好文、佐々木由紀、松本真琴、善本知広、中西憲司. IL-33 は正常マウスに杯細胞を誘導し、*Nippostrongylus brasiliensis* 排虫作用を誘導できる、(ワークショップ) 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007.11.20-22.

## 国際学会

22. Kosaka H, Yoshimoto T, Nakanishi K, and Fujimoto J. Brand-new prevention method of postoperative adhesion formation used by HGF. (Symposium) Academic Surgical Congress, Fort Myers, Florida, 2009.4.6-10.
23. Yasuda K, Sasaki Y, Kondo Y, Matsumoto M, Yoshimoto T, and Nakanishi K. In vivo administration of IL-33 induces goblet cells capable of expelling *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan, 2008. 9.7-11.
24. Kosaka H, Yoshimoto T, Nakanishi K, and Fujimoto, J. Role of NKT cell-driven IFN- $\gamma$  in postoperative adhesion formation. Digestive Disease Week and the 109th Annual Meeting of the AGA Institute DDW (2008), San Diego, U.S.A. (Gastro enterology, 134(Suppl. 1), A-520), 2008.5.17-22.
25. Yoshimoto T. and Nakanishi K. Lipopolysaccharide induction of IgE by innate type 2 basophils. 2007 Keystone Symposia Conference. Colorado, U.S.A, 2007.1.20-24.
26. Kosaka H, Yoshimoto T, Nakanishi K, and Fujimoto J. Establishment of experimental surgical adhesion model and analysis of immunological mechanism underlying organ adhesion. 42nd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR). Rotterdam, The Netherlands, 2007.5.23-26.

## 一般講演

計 25 件

〔図書〕(計1件)

1. 善本知広、自己免疫疾患とアレルギー.  
免疫学コア講義 (木本雅夫、坂口薫雄、山下優毅 編集)、改訂第2版、127-135(総9ページ)、南山堂、2007.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

1. 特許名称: Th2細胞誘導用組成物およびTh2型疾患の治療組成物, ならびにこれらの利用.

発明者: 善本知広、中西憲司

権利者: 同上

出願番号: 特願2008-281930

出願日: 2008年10月31日

国内特許

公開番号: 未公開、公告: 審査未請求

2. 特許名称: 実験動物の腸管癒着を形成する方法、腸管癒着実験動物の製造方法、腸管癒着抑制剤のスクリーニング方法及び腸管癒着抑制剤

発明者: 善本知広、中西憲司、藤元治朗

権利者: 同上

国際出願番号: PCT/JP2008/05229

出願日: 2008年2月14日

国際特許

公開番号: WO2008/099829 (公開日 2008年8月21日) 2009年4月9日国際予備報告受領

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

善本 知広 (YOSHIMOTO TOMOHIRO)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60241171

### (2) 研究分担者

中西 憲司 (NAKANISHI KENJI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60172350

### (3) 連携研究者

なし