

平成21年 6月 19日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590501

研究課題名（和文） 気管支喘息におけるインターロイキン33の役割についての研究

研究課題名（英文） The role of interleukin-33 on the murine model of experimental asthma

研究代表者

松本 真琴（MATSUMOTO MAKOTO）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40380521

研究成果の概要：

インターロイキン33の点鼻投与によりマウスに喘息様症状を惹起させることが出来た。T細胞、B細胞等の獲得免疫系細胞を有さないマウスにおいてもインターロイキン33は喘息様症状を惹起させた。この結果はインターロイキン33の点鼻投与は自然免疫型喘息のモデルとなり得ることを示している。一方、試験管内においてインターロイキン33は好塩基球に働き、2型ヘルパーT細胞の分化に必須であるインターロイキン4の産生を促すことが分かった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー・喘息、免疫学、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

従来、気管支喘息はアレルギー特異的なIgEが作用して誘発される疾患と考えられてきた。しかし、血中IgEが低い個体における症例が多数報告されるようになり、またマウスを用いて、ヘルパーT（CD4 T）細胞をサイトカインと抗原で活性化することにより、IgEを介さずに実験的喘息を誘発させることが出来るようになった。この実験的喘息モデルにおいては種々のサイトカインが喘息誘発に対して正負の役割を果たしていることが推察されていた。中でも私たちはIL-18に

注目し、抗原特異的メモリーT細胞を移入したマウスに抗原およびIL-18を点鼻投与することで気管支喘息を誘発すること、抗原なしでもIL-2およびIL-18を両方投与すると気管支喘息を誘発し得ることを報告し、自然免疫型の気管支喘息という疾患概念を提唱してきた。

2. 研究の目的

2005年に発見されたIL-33はIL-18に高い相同性を有するサイトカインであり、CD4 T細胞からIL-4, 5, 13を産生させ、気道上皮

細胞にムチンを蓄積させる働きがある。以上の報告から IL-33 は気管支喘息誘発に正の働きを有していることが示唆されていたので、私たちがそのことを証明することが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄を IL-3 存在下で培養することにより肥満細胞と好塩基球を誘導し、セルソーターにより両者を分離した。その後、IL-33 レセプターの発現、IL-33 に対する反応を検討した。

(2) IL-33 の信号伝達機構を解析するために野生型マウス、IL-33 レセプターである ST2 の欠損マウス、IL-33 レセプター類縁分子の信号伝達アダプターである MyD88 欠損マウス、MyD88 のファミリー分子である TRIF 欠損マウスそれぞれの骨髄から好塩基球を分化誘導した後、IL-33 で刺激して反応性を見た。

(3) マウス脾臓から採取したナイーブ CD4 T 細胞およびナイーブ CD4 T 細胞から培養によって分化させた Th2 細胞の IL-33 に対する反応を解析した。

(4) 生体内においても IL-33 が ST2/MyD88 依存的に機能しているかを肺における杯細胞のムチン産生を指標に検討した。ST2、MyD88 欠損マウスに IL-33 (4 μ g) を4日間連続腹腔内投与した後、肺をホルマリン固定し、PAS 染色を行った。また杯細胞のムチン産生が IL-13 に依存しているかを IL-13 欠損マウス、STAT6 欠損マウスを用いて検討した。

(5) 生体内において IL-33 に反応して IL-13 を分泌する細胞、すなわち IL-33 の標的細胞を同定するために T 細胞、B 細胞の両者を欠く RAG-2 欠損マウス、肥満細胞を欠く W/W^v マウス、asialoGM1 投与により NK 細胞を消失させたマウス、Fc epsilon レセプター抗体投与により好塩基球を消失させたマウスに対して IL-33 (1 μ g) を4日間連続点鼻投与した後、肺をホルマリン固定し、PAS 染色を行った。

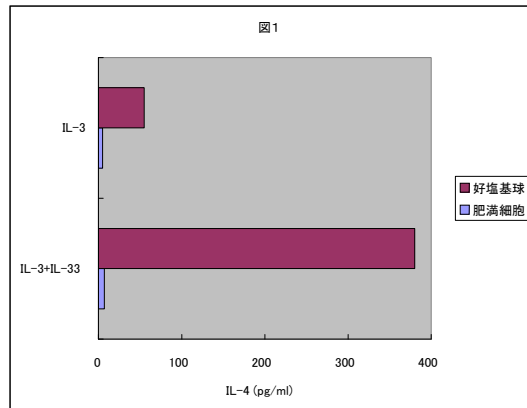
(6) 野生型マウスおよび RAG-2 欠損マウスに IL-33 を4日間連続点鼻投与した後にアセチルコリンを吸入させることにより実験的喘息が誘発されるか、を検討した。平行して気管支肺胞洗浄を行い、肺胞腔への好酸球の出現を定量した。また、IL-33 点鼻投与後の肺を継時的に採取し、IL-4, IL-5, IL-13mRNA の誘導を見た。

4. 研究成果

(1) 肥満細胞と好塩基球は発現量に違いはあるにせよ、両方とも IL-33 のレセプターである ST2 と IL-33R \cdot β 鎖を発現していることが分かった。ところが、図1にあるように好塩基球だけが IL-33 による刺激に反応して IL-4 を産生することが明らかになった。

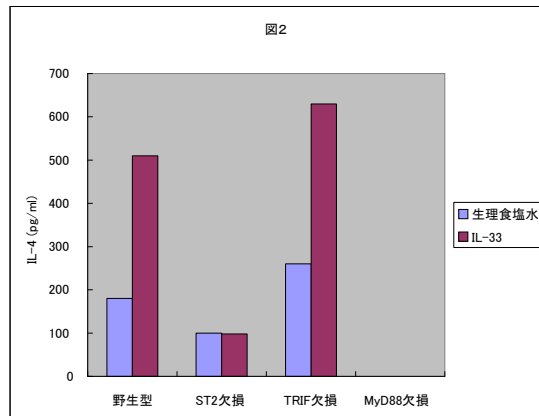
IL-33 刺激を受けた好塩基球は IL-4 以外にも Th2 サイトカインである IL-6, IL-13, IL-9 や、ケモカインである RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 を IL-33 の濃度依存的に産生した。しかし、好塩基球は IL-5, IL-17, IFN- γ を産生することはなかった。一方、肥満細胞は IL-33 に反応して IL-6, IL-13, MIP-1 α , MIP-1 β を低いレベルでしか産生せず、RANTES と MCP-1 だけは好塩基球と同程度に産生した。IL-33 に対する肥満細胞と好塩基球の反応性が違う理由については不明のままである。

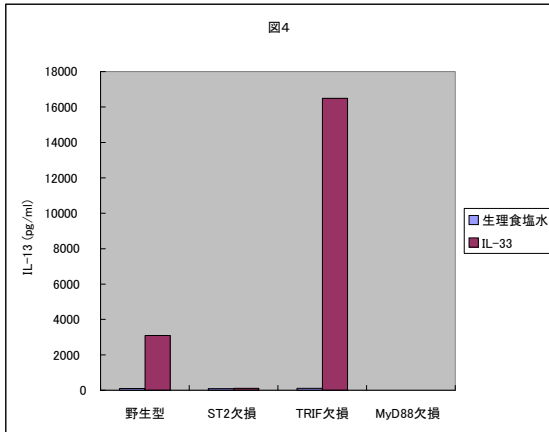
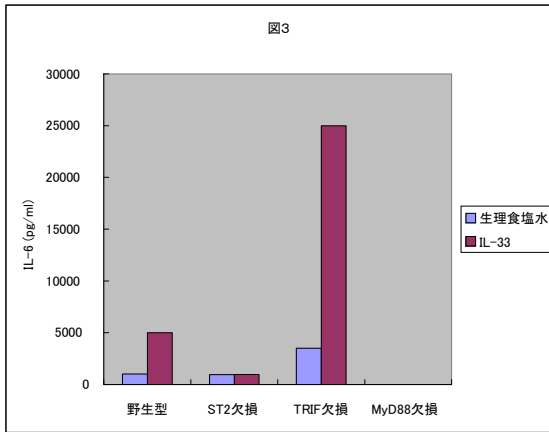
(2) IL-33 の信号伝達は ST2/MyD88 依存的であった。図2、3、4にあるように、ST2



欠損および MyD88 欠損マウス由来好塩基球は IL-33 投与に反応して IL-4, IL-6, IL-13 を産生することはなかった。TRIF 欠損マウス由来好塩基球は野生型マウス由来好塩基球より IL-6, IL-13 を多く産生した (図2、3)。このことは IL-33 レセプターの downstream MyD88 と TRIF がクロストークしていることを示唆した。

(3) ナイーブ CD4 T 細胞は IL-33 に全く反応しなかった。一方、Th2 細胞は IL-33 に反応して IL-5, IL-13 の産生を増強させた。この結果は、ナイーブ CD4 T 細胞が ST2 をほとんど発現していないのに対して、Th2 細胞の 60%以上が ST2 を発現していることを反映していた。



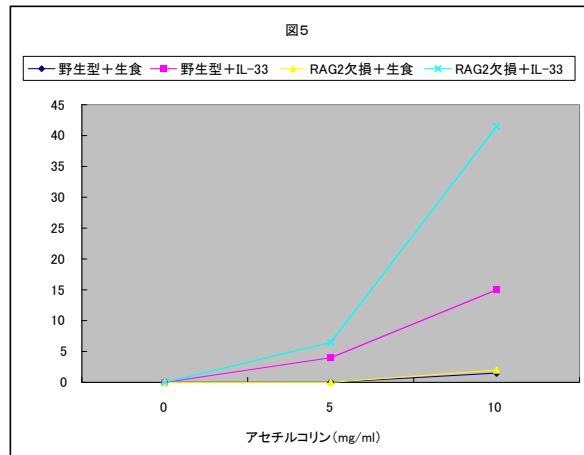


(4) ST2、MyD88 欠損マウスは IL-33 に反応せず、杯細胞のムチン産生は起こらなかった。また IL-13 欠損マウス、STAT6 欠損マウスも杯細胞のムチン産生を起こさなかったことから IL-13 は IL-33 の下流で機能していることが分かった。

(5) 生体内における IL-33 の標的細胞は T 細胞、B 細胞、NK 細胞、肥満細胞、好塩基球以外の細胞であることが分かった。しかし、本研究で生体内において IL-33 に反応して IL-13 を分泌する細胞は分からず仕舞となった。ここでは IL-33 は T 細胞、B 細胞などの獲得免疫系の細胞以外に働くということを強調しておきたい。真の標的細胞の同定については更に解析を継続していくことが必要である。

(6) IL-33 を点鼻投与した野生型マウスおよび RAG-2 欠損マウスにおいて、図 5 に示すように、アセチルコリンの濃度依存的に気道抵抗の上昇を認めた。上昇程度は RAG-2 欠損マウスの方が野生型マウスより大きかった。この結果は T 細胞に制御的効果があることを示唆している。また IL-33 の点鼻投与により肺胞腔内に好酸球が遊走してくることが確認された。これらの結果より IL-33 の点鼻投与はマウスに喘息様症状を惹起すること、およびこの効果は獲得免疫系に依存しないことを示すことが出来た。また、肺において点鼻後 3 時間以内に IL-4、IL-5、IL-13mRNA の誘導が認められ、IL-33 の効果は生体内にお

いても速やかに発揮されていることが確認された。



(7) IL-18 と IL-33 の違いについて
試験管内でナイーブ CD4 T 細胞を IL-18+IL-2 で刺激すると IL-4 を分泌させ、マウスに IL-18+IL-2 を点鼻投与すると気管支喘息様症状を惹起することが出来る。この IL-18 の作用は CD4 T 細胞依存性である。一方、IL-33 はナイーブ CD4 T 細胞には全く働かず、好塩基球に作用し、IL-4 を分泌させる。マウスに IL-33 を単独で点鼻投与するだけで気管支喘息様症状を惹起させるが、この作用は T 細胞、B 細胞などの獲得系免疫細胞に依存しない。

(8) 本研究による新たな発見のまとめ
① IL-33 が好塩基球に作用して IL-4 を分泌させる機能を有すること、② ①の作用は ST2/MyD88 を信号伝達経路として使うこと、③マウスに IL-33 を点鼻投与すると気管支喘息様症状を惹起させること、④ ③の作用は IL-13/STAT6 に依存するが、IL-13 を分泌する細胞は獲得免疫系の細胞ではないこと、①-④の全ては本研究により初めて証明された。③、④を持って新たな自然免疫型喘息モデルを確立したと言える。

(9) 残された課題
① 生体に IL-33 を投与した時の標的細胞、すなわち IL-33 に反応して IL-13 を分泌する細胞が不明なままである。私たちは T 細胞+B 細胞、NK 細胞、肥満細胞、好塩基球をそれぞれ単独あるいは 2 種類同時に消失させて標的細胞の同定を試みたが果たせなかった。これらの細胞種の内一種類でも残っていれば代償的に機能し得る可能性がある。あるいは上記のような骨髄由来細胞ではなく、上皮細胞、中皮細胞、支持組織の繊維芽細胞などが標的細胞である可能性があり、更なる検討が必要である。② 本研究においては試験管内の好塩基球に IL-33 を加える、マウスに IL-33 を点鼻するなど、外から IL-33 を投与する実験が主で、内因性の IL-33 の作用を記述するところまでは進まなかった。ここまでも、抗原非依存的なサイトカイン誘導型気管支喘息モデル (自然免疫型気管支喘息モデル

ル)の確立という意義付けは可能である。今後はアレルギー誘導性の喘息モデルや喘息以外のアレルギー疾患モデルにおいて内因性のIL-33が果たしている役割についてST2欠損マウス、IL-33欠損マウスを用いて解析していくことが必要と考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yuichi Kondo, Tomohiro Yoshimoto, Koubun Yasuda, Shizue Futatsugi-Yumikura, Mai Morimoto, Nobuki Hayashi, Tomoaki Hoshino, Jiro Fujimoto and Kenji Nakanishi
Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system.
International Immunology, vol. 20, pp. 791-800. 2008, 査読有
- ② Nobuki Hayashi, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Izuhara, Kiyoshi Matsui, Toshio Tanaka and Kenji Nakanishi
T helper1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induces airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN- γ and IL-13 production.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. vol. 104, pp. 14765-14770. 2007, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

中西 憲司、アレルギー疾患の複数病因論とTh2細胞の誘導機序の多彩さ、第58回日本アレルギー学会秋期学術大会、2008年1月27日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 真琴 (MATSUMOTO MAKOTO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40380521

(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