

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591187

研究課題名（和文） 新規抗体を用いたマウス IL-25 レセプター発現細胞の同定・純化

研究課題名（英文） Identification of mouse IL-25 receptor expressing cells

研究代表者

有信 洋二郎（ARINOBU YOJIRO）

九州大学・大学病院・遺伝子細胞療法部

研究者番号：90467928

研究成果の概要（和文）：IL-25 は、アレルギー性炎症において重要な役割を果たす上皮細胞由来サイトカインであるが、そのレセプター（IL-25R）を発現し、シグナルを受け作用を発揮する細胞は、長い間不明であった。今回我々は、全マウス造血細胞における IL-25R の発現を解析し、唯一、好酸球前駆細胞（EoP）にのみ、その発現を認めることを明らかにした。IL-25 は EoP の生存・増殖因子として作用している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）： Interleukin-25 (IL-25) is one of the epithelial cell-derived cytokines which play critical roles in allergic inflammations, while it still remained unclear which cell populations express IL-25 receptor (IL-25R) and mediate its biological activities. In this study, we analyzed the expression level of IL-25R on all mouse hematopoietic cells and clarified that IL-25R is preferentially expressed on eosinophil progenitors (EoP). It was also suggested that IL-25 may act as a survival/ proliferation factor for EoP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1700000	510000	2210000
2009年度	1000000	300000	1300000
2010年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
総計	3700000	1110000	4810000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病アレルギー内科学

キーワード：IL-25、IL-25 receptor、好酸球前駆細胞

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性疾患の病態の中心に位置するのは、Th2 細胞と抗原特異的 IgE である (Th2 cell paradigm)。この考えをもとに抗 IgE 抗体が創薬され、抗 Th2 型サイトカイン療法の開発治験がすすんでいる。しかし一方、Th2 cell paradigm のみでは説明できない現象（非アトピー性喘息、ウイルス感染による喘息の悪化）も知られており、Th2 細胞に依存しないアレルギー性炎症経路の

存在も予想されていた。近年、アレルゲンの侵入に応答して直接上皮から産生されるサイトカイン (epithelial cell-derived cytokine) の存在が明らかになり、このサイトカインがアレルギー性炎症形成において重要な役割を果たしているのではないかと注目されている。

IL-25 は、epithelial cell-derived cytokine の一つであり、in vivo での投与実験や中和実験、更には IL-25 transgenic

mouse の解析から、やはり強いアレルギー性炎症惹起作用があることが明らかになった。IL-25 に反応してその作用を発揮する IL-25 receptor (IL-25R) 発現細胞は長い間不明であったが、最近、非リンパ球系の c-Kit 陽性細胞がこれにあると報告された。この表現型は、骨髄球系前駆細胞などの未分化な血液細胞の表面マーカーと同一である。ここに着目し我々は、骨髄球系の未分化細胞を最も多く含むマウス骨髄中に IL-25R 発現細胞が存在するのではないかと考え、この同定を試みた。

## 2. 研究の目的

マウス骨髄細胞中に IL-25R 発現細胞を同定し、その機能を明らかにする。

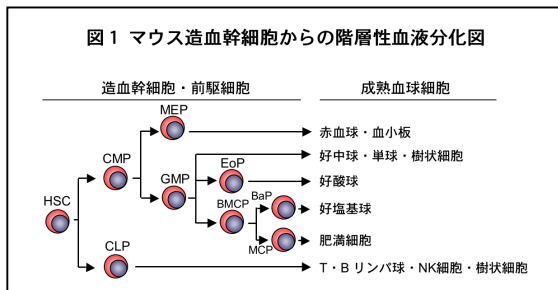
## 3. 研究の方法

- (1) マウス骨髄細胞を全系統、各分化段階に分画し、IL-25R の発現細胞を探索する。
- (2) (1) で同定した IL-25R 発現細胞を、マルチカラーセルソーターを用いて純化し、IL-25 が IL-25R 発現細胞に与える生物活性を明らかにする。

## 4. 研究成果

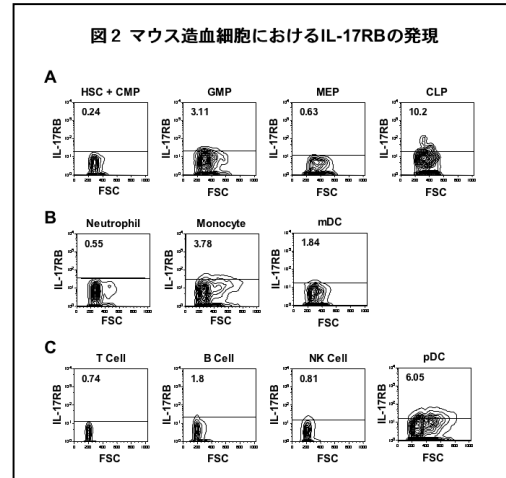
### (1) マウス造血細胞における IL-25R の発現

マウス造血幹細胞 (hematopoietic stem cell; HSC) はまず、骨髄球系の共通前駆細胞である common myeloid progenitor (CMP) とリンパ球系共通前駆細胞である common lymphoid progenitor (CLP) に分化する。CMP は更に、顆粒球・単球系前駆細胞である granulocyte/monocyte progenitor (GMP) と巨核球・赤芽球系前駆細胞である megakaryocyte/erythrocyte progenitor (MEP) へと分化し、その後、最終的な成熟細胞へと分化する (図 1)。



これら前駆細胞、成熟細胞での IL-25R の発現を解析した。まず IL-25R の主な component である IL-17RB の発現を評価した。HSC, CMP, GMP, MEP, CLP のいずれの前駆

細胞にも IL-17RB の発現は認めなかった (図 2 A)。さらにこれらの前駆細胞が成熟した好中球、単球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞にも IL-17RB の発現は認めなかつ

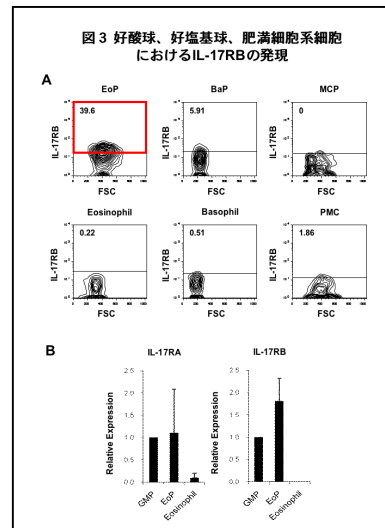


た (図 2 B,C)。

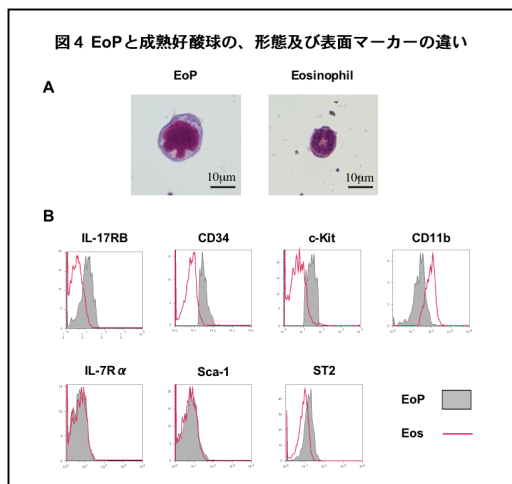
### (2) 好酸球、好塩基球、肥満細胞系細胞における IL-25R の発現

次に我々は、アレルギー性炎症において effector 細胞として機能する好酸球、好塩基球、肥満細胞の前駆細胞及び成熟細胞における IL-25R の発現を解析した。各系統の成熟細胞及び好塩基球前駆細胞 (basophil progenitor; BaP)、肥満細胞前駆細胞 (mast cell progenitor; MCP) には IL-17RB の発現をほとんど認めなかったが、好酸球前駆細胞 (eosinophil progenitor; EoP) には IL-17RB の発現を認めた (図 3 A)。EoP の分化元である GMP や、EoP が分化を終えた成熟好酸球には IL-17RB の発現を認めないことから、IL-17RB は EoP stage 特異的に発現していると考えられる。

IL-17RB は IL-17RA と heterodimer を形成し IL-25R として機能する。そこで EoP における IL-17RA mRNA の発現を解析したところ、この発現を認めた (図 3 B)。EoP は機能型 IL-25R を発現すると考えられた。



EoP は顕微鏡的に未熟な形態を呈し、細胞表面マーカーも成熟好酸球とは異なる (図 4 A, B)。EoP は CD34, c-Kit といった未分化マーカー陽性だが、成熟顆粒球に発現する CD11b は発現しない。Epithelial cell-derived cytokine の一つである IL-33 の receptor component である ST2 を、EoP が発現していることも興味深い (図 4 B)。また最近、幾つかの他のグループから IL-25 反応細胞が報告されたが、これらの細胞と EoP での、IL-7Ra や Sca-1 の発現 pattern は異なるため (図 4 B)、EoP は新たな IL-25R 発現細胞であると考えられる。



### (3) IL-25, IL-33 が EoP に与える生物活性

IL-33 は、IL-25 と同じ epithelial cell-derived cytokine の一つであるが、アレルギー性炎症においては IL-25 と協調してその生物活性を発揮するのではないかと最近報告された。EoP は、IL-33 の receptor component である ST2 も発現することから、IL-25 や IL-33 が EoP にどのような生物活性を与えるかを解析した。

まず、IL-25 や IL-33 が EoP の増殖や生存に与える影響を解析した。細胞増殖関連蛋白質である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の発現は、IL-25 によって約 1.5 倍、IL-33 によって約 2 倍に促進された (図 5 A)。抗アポトーシス蛋白質である Bcl-2 の発現は、IL-25 によって約 2 倍、IL-33 によって約 1.5 倍に促進された (図 5 B)。IL-25 や IL-33 は、EoP の生存増殖因子として機能する可能性が示唆された。

次に、IL-25, IL-33 刺激により、EoP から Th2 型サイトカインが産生されるかどうかを検証した。IL-33 は EoP からの IL-4, IL-13 の産生を誘導したが、IL-25 にはこの様な

作用は認められなかった (図 6)。

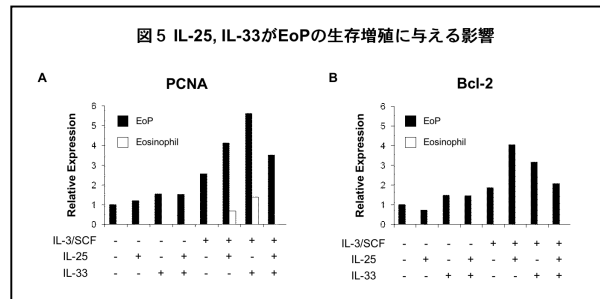
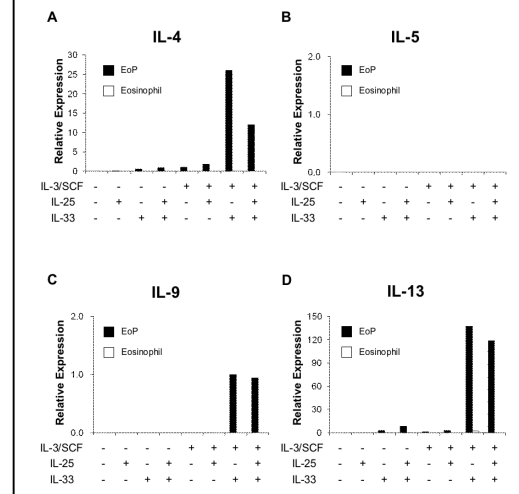


図 6 IL-25, IL-33 が EoP の Th2 型サイトカイン産生能に与える影響



### (4) 終わりに

今回我々は、好酸球前駆細胞特異的に IL-25R が発現していることを明らかにした。好酸球前駆細胞は同時に IL-33R も発現しており、IL-25 と IL-33 両方のシグナルを受けることがわかった。IL-25, IL-33 は、好酸球前駆細胞の生存増殖因子として作用し、更に IL-33 は好酸球前駆細胞からの Th2 型サイトカインの産生も誘導した。好酸球性炎症の形成において、IL-25, IL-33 は重要な役割を果たすと考えらる。

## 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 11 件)

1. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niuro H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. **Rheumatology**. 査読有, 50: 944-952, 2011
2. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. **Cell Stem Cell**. 査読有, 7: 708-717, 2010
3. Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y, Nakano K, Akashi K, Sugiyama D. Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/Kit signaling in embryonic mouse. **Development**. 査読有, 137: 3941-3952, 2010
4. Katsuta H, Akashi T, Katsuta R, Nagaya M, Kim D, Arinobu Y, Hara M, Bonner-Weir S, Sharma AJ, Akashi K, Weir GC. Single pancreatic beta cells co-express multiple islet hormone genes in mice. **Diabetologia**. 査読有, 53: 128-138, 2010
5. 有信 洋二郎, 赤司 浩一 好塩基球と肥満細胞の発達 **炎症と免疫**、査読無、18: 3-8, 2010
6. Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K. Origin of basophils and mast cells. **Allergol Int**. 査読有, 58: 21-28, 2009
7. Kalaszczynska I, Geng Y, Iino T, Mizuno S, Choi Y, Kondratiuk I, Silver DP, Wolgemuth DJ, Akashi K, Sicinski P. Cyclin A is redundant in fibroblasts but essential in hematopoietic and embryonic stem cells. **Cell**. 査読有, 138: 352-365, 2009
8. Tabrizi SJ, Niuro H, Masui M, Yoshimoto G, Iino T, Kikushige Y, Wakasaki T, Baba E, Shimoda S, Miyamoto T, Hara T, Akashi K. T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naïve and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. **J Immunol**. 査読有, 182: 1490-1499, 2009
9. 有信 洋二郎, 岩崎 浩己、赤司 浩一 好塩基球の発生・分化 **アレルギー・免疫**、査読無、16: 12-17, 2009
10. Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibiashi H, Kikuchi K, Kita H, Niuro H, Arinobu Y, Ono N, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. **J Autoimmun**, 査読有, 31: 110-115, 2008
11. Cantor AB, Iwasaki H, Arinobu Y, Moran TB, Shigematsu H, Sullivan MR, Akashi K, Orkin SH. Antagonism of FOG-1 and GATA factors in fate choice for the mast cell lineage, **J Exp Med**. 査読有, 17: 611-624, 2008

[学会発表] (計 2 件)

1. 赤司 浩一 造血幹細胞からの骨髄球系細胞の分化 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 25 日-27 日、東京
2. 有信 洋二郎 IL-25 (IL-17E)レセプターは、骨髄球系前駆細胞に発現する 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2010 年 4 月 22 日-25 日、神戸

[その他]

ホームページ; <http://www.idenshi.co.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

有信 洋二郎 (ARINOBU YOJIRO)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：90467928

### (2)研究分担者

赤司 浩一 (AKASHI KOICHI)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：80380385