

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790688  
 研究課題名（和文）  
 IL-25によるアレルギー性気道炎症誘導の分子基盤の解明  
 研究課題名（英文）  
 The molecular mechanism of IL-25-mediated allergic airway inflammation  
 研究代表者  
 池田 啓（IKEDA KEI）  
 千葉大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：10456014

## 研究成果の概要（和文）：

本研究者は、マウス喘息モデルの気道では抗原暴露により IL-25 の発現が認められること、ならびに可溶化 IL-25R Fc 融合タンパクにより IL-25 を中和するとマウス喘息モデルにおける好酸球性炎症が抑制されることを明らかにした。また本研究者は可溶性 IL-25 Fc 融合タンパクを用いた細胞内 IL-25 染色法を確立し、IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞のサイトカインプロファイルが Th2 細胞とは必ずしも一致しないことを見出している。さらには肺特異的な IL-25 トランスジェニックマウスでは気道炎症の増悪に加え、肺動脈周囲の炎症と血管壁の著明なリモデリングが誘導され得ることを発見し現在解析中である。

## 研究成果の概要（英文）：

We showed that IL-25 expression is increased in the airway of experimental mouse model of asthma and that neutralization of IL-25 by soluble IL-25 receptor-Fc fusion protein suppresses eosinophilic inflammation in experimental mouse model of asthma. We also established intracellular IL-25 staining method using soluble IL-25 receptor-Fc fusion protein and has found that the cytokine profile of IL-25 producing CD4+T cells is not identical to that of Th2 cells. Furthermore, we found that the lung-specific IL-25 expression not only exacerbates allergic airway inflammation, but also induces pulmonary arteriolitis and marked remodeling of vascular wall, which is now under detailed investigation.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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・感染症内科学

キーワード：IL-25, 気管支喘息, アレルギー性炎症, ヘルパーT細胞分化, 肺血管リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は気道を場とした慢性アレルギー性炎症であり、その病態形成には Th2 細胞が産生する IL-4, IL-5, IL-13 などのサイトカインが重要な役割を果たしている。IL-4 と IL-13 は、Th2 細胞分化、IgE 産生、血管内皮細胞上の接着分子の発現及び杯細胞の分化に必須であり、IL-5 は、好酸球の分化及び活性化に必須である。

一方、2001 年、新たな Th2 細胞性サイトカインとして IL-17 ファミリーに属する IL-25 が発見された。IL-25 は、IL-17A と約 20% の相同性を有し活性化 Th2 細胞により産生されるが、その生物活性は IL-17A とは異なり、IL-25 をマウスに投与すると IL-4, IL-5, IL-13 等の Th2 サイトカインが産生され、その結果、好酸球増多や IgE 産生が惹起されることが示された。

IL-25 によるアレルギー性気道炎症誘導機構には、大きな不明点が二点残されている。第一の不明点は、アレルギー性気道炎症における IL-25 の産生細胞である。Th2 細胞、肥満細胞、好酸球、好塩基球、マクロファージ等、多くの細胞が IL-25 を産生することが *in vitro* の実験系で示されているが、アレルギー性気道炎症の局所で IL-25 を産生している細胞は依然不明である。第二の不明点は、アレルギー性炎症の局所で IL-25 に反応し Th2 サイトカインを産生するエフェクター細胞 (IL-25 responder) である。T 細胞と B 細胞を欠く Rag-2 欠損マウスにおいても IL-25 投与による好酸球増多が認められることより (Hurst et al. J Immunol 2002)、IL-25 responder は、非 T 非 B 細胞であることが示唆されているがその詳細は依然不明である。

## 2. 研究の目的

したがって本研究では、1) アレルギー性気道炎症における IL-25 産生細胞の同定と IL-25 産生制御機構の解明、2) アレルギー性気道炎症において IL-25 に反応し Th2 サイトカインを産生する IL-25 responder の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 研究計画 1. 喘息モデルマウスにおける IL-25

### 産生細胞の同定

本研究では、単細胞レベルで IL-25 産生細胞を同定する細胞内染色法を確立し、喘息モデルマウスにおける IL-25 産生細胞を同定する。

#### 1) 可溶化 IL-25 レセプターを用いた細胞内 IL-25 染色法の確立

IL-25 発現レトロウイルス

(pMX-IL-25-IRES-GFP) を感染させた BAF3 細胞を陽性コントロールとして、可溶化 IL-25R Fc 融合蛋白 (sIL-25R-Fc) と抗 Fc 抗体を用いた細胞内 IL-25 染色法を確立する。

#### 2) 細胞内 IL-25 染色法による IL-25 産生細胞の同定

BALB/c マウスを卵白アルブミン (OVA) で腹腔内感作し、その後 OVA を吸入投与し、アレルギー性気道炎症を惹起する。気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織、所属リンパ節より血球系細胞分画を回収し、細胞内 IL-25 染色法と細胞表面抗原のマルチカラー FACS 解析により IL-25 産生細胞の表面抗原を同定する。

### 研究計画 2. 喘息モデルマウスにおける IL-25 responder の同定

本研究では、免疫二重染色法、或は *in vivo* サイトカインキャプチャー法を用いることにより IL-25 刺激により Th2 サイトカインを産生する細胞を同定する。細胞表面抗原のみではなく、形態学的評価及び遺伝子発現プロファイルにより IL-25 responder の特徴を明らかにする。

#### 1) 肺特異的 IL-25 発現マウスにおける IL-5 産生細胞の同定

本研究では CC10 promoter の制御下に肺特異的に IL-25 を発現するトランスジェニックマウス (CC10-IL-25 マウス) では、IL-5 の産生とアレルギー性気道炎症が著明に増強されることを見出した (J Allergy Clin Immunol. 2006)。本研究では抗原吸入した CC10-IL-25 マウスの肺組織で IL-5 を産生している細胞を免疫二重染色により同定する。

#### 2) *in vivo* サイトカインキャプチャー法による IL-5 産生細胞の同定

抗 IL-5 抗体と抗 CD45 抗体のハイブリッド抗体は、抗 CD45 抗体により血球系細胞表面に結合し、産生された IL-5 を補足する (Miltenyi 社)。OVA で感作した CC10-IL-25

マウスに抗 IL-5 ハイブリッド抗体を静脈内投与し、その後 OVA を吸入投与する。OVA 投与 2 日後に、BALF 細胞にビオチン化抗 IL-5 抗体、さらにストレプトアビジン magnetic beads を結合させ、MACS を用いて in vivo で IL-5 を産生している細胞を純化する。純化した細胞の形態学的解析、及び細胞表面抗原の FACS 解析によりその細胞腫を同定する。

### 3) IL-25 レセプター (IL-25R) 陽性細胞分画における IL-5 産生細胞の同定

抗原吸入した CC10-IL-25 マウスの BALF 細胞から IL-25R 発現細胞を抗 IL-25R 抗体を用いて純化する。純化した細胞を IL-25 で刺激し、細胞内 IL-5 染色と細胞表面抗原のマルチカラー解析にて IL-5 産生細胞を同定する。

## 研究計画 3. IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞の分化制御機構の解明

Th2 細胞が IL-25 を発現することが報告されているが、単細胞レベルで Th2 細胞と IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞の同一性は検討されていない。本研究では研究計画 1-1) で確立する細胞内 IL-25 染色法を用い、CD4 陽性 T 細胞における IL-25 産生機構を明らかにする。

### 1) CD4 陽性 T 細胞における IL-25 産生機構の解析

CD4 陽性 T 細胞を各種サイトカイン、及び各種抗サイトカイン抗体の存在下で抗 CD3 抗体にて刺激し、細胞内 IL-25 染色法を用いて、IL-25 産生誘導の至適条件を明らかにする。

### 2) IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞のサイトカインプロファイルの解析

上記 1) にて決定した IL-25 産生誘導の至適条件下で培養した CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカインプロファイルを Cytometric Bead Array System により検討する。さらに IL-25 と他のサイトカイン (IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17) の細胞内二重染色を行ない、IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞が同時に産生するサイトカインを明らかにする。

### 3) IL-25 産生誘導における T-bet, GATA3, 及び ROR $\gamma$ t の役割の解析

純化した CD4 陽性 T 細胞に抗 CD3 抗体刺激下で、バイシストロニックレトロウイルスを用いて Th1 細胞の master regulator である T-bet, Th2 細胞の master regulator である GATA3, 或は Th17 細胞の master regulator である ROR $\gamma$ t を GFP とともに発現させる。細胞内 IL-25 染色を用いて GFP 陽性細胞分画にお

ける IL-25 産生を検討する。

## 研究計画 4. IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞分化の master regulator の同定

### 1) retrovirus-mediated mammalian one hybrid 法による IL-25 産生誘導分子の同定

a) IL-25 遺伝子の 5' 制御領域 (2.5 Kbp) を GFP 遺伝子の 5' 上流に配置したレポーターコンストラクト (IL-25P GFP) を作製し、BAF3 細胞にトランスフェクトし、定常状態では GFP 陰性である細胞をクローン化する (IL-25P GFP BAF3 細胞)。

b) 研究計画 3) で至適化した IL-25 産生誘導条件で培養した CD4 陽性 T 細胞から cDNA を調整し、レトロウイルスベクター pMX に組み込み、PlatE 細胞を用いて高力価レトロウイルスライブラリーを作製する。

c) 上記レトロウイルスライブラリーを IL-25P GFP BAF3 細胞に感染させ、GFP が陽性化した細胞を FACS にて純化する。

d) 純化した GFP 陽性細胞から PCR を用いて導入された cDNA を回収し、再び pMX に組み込んだ後、c) と同様の方法を用いて二次スクリーニングを行う。GFP の陽性化が確認された cDNA の塩基配列を決定する。

e) 同定された候補遺伝子をレトロウイルスを用いて CD4 陽性 T 細胞に発現させ、細胞内 IL-25 染色を用いて IL-25 産生能を確認する。

### 2) master regulator 候補遺伝子の遺伝子改変マウスの作製と表現型の解析

研究計画 4-1) にて CD4 陽性 T 細胞における IL-25 産生誘導能が確認された遺伝子に対して、定法に基づき遺伝子欠損マウスを作製し (既に作製されていれば入手し)、1) IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞の分化が正常か否か、2) 抗原誘発性アレルギー性気道炎症が抑制されるか否かを解析する。

### 3) 気管支喘息患者 CD4 陽性 T 細胞における master regulator 候補遺伝子の発現レベルの検討

ホモロジーサーチにより master regulator 候補遺伝子のヒトホモログを同定する。気管支喘息患者および健康ボランティアの末梢血から CD4 陽性 T 細胞を調整し、候補遺伝子の発現レベルを real-time PCR を用いて検討し、喘息の有無、及び疾患重症度との相関を解析する。

## 4. 研究成果

### 研究計画 1. 喘息モデルマウスにおける IL-25

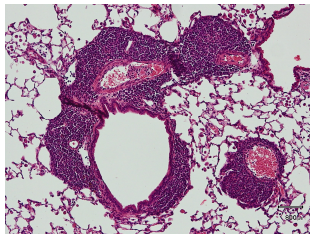
## 産生細胞の同定

IL-25 発現レトロウイルスを感染させた Ba/F3 細胞 (Ba/F3-IL-25-GFP) を陽性コントロールとして、可溶化 IL-25R Fc 融合蛋白 (sIL-25R Fc) と抗 Fc 抗体を用いた細胞内 IL-25 染色法を行った。その結果本法は抗 IL-25 抗体 (R&D System 社) を用いた方法より、特異度および感度が高いことを見出した。現在この可溶化 IL-25R を用い、BALB/c マウスにおける OVA を用いたアレルギー性気道炎症モデルにおいて、BALF、肺組織、所属リンパ節より血球系細胞分画を回収し、細胞内 IL-25 染色法と細胞表面抗原のマルチカラー FACS 解析により IL-25 産生細胞の表面抗原を同定中である。

## 研究計画 2. 喘息モデルマウスにおける IL-25 responder の同定

### 1) 肺特異的 IL-25 発現マウスにおける IL-5 産生細胞の同定

本研究者らは CC10 promoter の制御下に肺特異的に IL-25 を発現するトランスジェニックマウス (CC10-IL-25 マウス) では、IL-5 の産生とアレルギー性気道炎症が著明に増強されることを見出した (J Allergy Clin Immunol. 2006)。しかしながら本研究における CC10-IL-25 マウスの解析では、IL-5 の免疫染色およびサイトカインキャプチャー法での IL-5 産生細胞の同定、ならびに IL-25R 発現細胞純化のいずれの方法においても一定した結果が得られず、現在セットアップを継続中である。一方肺の標本組織解析の過程において、C57BL/6 バックグラウンドの CC10-IL-25 マウスでは、肺動脈周囲の炎症と血管壁の著明なリモデリングが誘導されることを発見した (写真)。



現在 IL-25 による肺動脈病変誘導機構につき解析中である。

## 研究計画 3. IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞の分化制御機構の解明

### 1. CD4陽性T細胞におけるIL-25産生機構の解析、およびIL-25産生CD4陽性T細胞のサイト

## カインプロファイルの解析

様々な条件下で培養したCD4陽性T細胞におけるサイトカインプロファイルを研究計画 1-1で確立した細胞内IL-25染色法を用いて検討したところ、Th2細胞とIL-25産生細胞は必ずしも一致しないことを見出した。現在、IL-25産生細胞の詳細なサイトカインプロファイルを解析中である。

## 研究計画 4. IL-25 産生 CD4 陽性 T 細胞分化の master regulator の同定

### 1) retrovirus-mediated mammalian one hybrid法によるIL-25産生誘導分子の同定

a) IL-25遺伝子の5'制御領域 (2.5 Kbp) をGFP遺伝子の5'上流に配置したレポーターコンストラクト (IL-25P GFP) を作製し、BAF3細胞にトランスフェクトし、定常状態ではGFP陰性である細胞をクローン化した (IL-25P GFP BAF3細胞)。現在、このクローン、および研究計画3で得られるIL-25産生CD4陽性T細胞由来のcDNAライブラリーを用いてIL-25産生CD4陽性T細胞分化のmaster regulatorを同定中である。

### 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 7 件)

1. Kanari H, Kagami S, Kashiwakuma D, Oya Y, Furuta S, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Watanabe N, Okamoto Y, Yamamoto S, Iwamoto I, Nakajima H. Role of Th2 cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 2010;152:s47-53. 査読有
2. Hiramatsu Y, Suto A, Kashiwakuma D, Kanari H, Kagami SI, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Grusby MJ, Iwamoto I, Nakajima H. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF- $\beta$  inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. **J. Leukoc. Biol.** 2010;87:703-12. 査読有
3. Iwata A, Watanabe N, Oya Y, Owada T, Ikeda K, Suto A, Kagami S, Hirose K, Kanari H, Kawashima S, Nakayama T, Taniguchi M, Iwamoto I, Nakajima H. Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated experimental hepatitis. **J. Immunol.** 2010;184:127-33. 査読有

4. Kagami S, Owada T, Kanari H, Saito Y, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H. Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. **Int. Immunol.** 2009;21:679-89. 査読有
5. Furuta S, Kagami S-I, Tamachi T, Ikeda K, Fujiwara M, Suto A, Hirose K, Watanabe N, Saito Y, Iwamoto I, Nakajima H. Overlapping and distinct roles of STAT4 and T-bet in the regulation of T cell differentiation and allergic airway inflammation. **J. Immunol.** 2008;180:6656-62. 査読有
6. Kagami S-i, Kanari H, Suto A, Fujiwara M, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits proinflammatory cytokine production from murine mast cells. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 2008;146:61-6. 査読有
7. Hirose K, Wakashin H, Oki M, Kagami S-I, Suto A, Ikeda K, Watanabe N, Iwamoto I, Furuichi Y, Nakajima H. GS143, an IκB ubiquitination inhibitor, inhibits allergic airway inflammation in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2008;374:507-11. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 池田 啓、若新英史、大矢佳寛、中島裕史 (2009) 当院で治療したアレルギー性肉芽腫性血管炎の臨床的解析 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 30 日 秋田ビューホテル
2. 横田雅也、加々美新一郎、池田 啓、岩田有史、大矢佳寛、須藤明、廣瀬晃一、渡邊紀彦、中村洋介、山本修一、岡本美孝、中島裕史 (2009) 当院で経験した IgG4 関連疾患 7 例の検討 第 106 回日本内科学会総会・講演会 2009 年 4 月 10 日 東京国際フォーラム
3. 若新英史、廣瀬晃一、池田 啓、須藤明、渡邊紀彦、加々美新一郎、岩本逸夫、中島裕史 (2008) 抗原誘発性気道炎症における IL-23/Th17 細胞経路の役割 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008 年 11 月 27 日 東京国際フォーラム

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/publication.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 啓 (Ikeda Kei)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10456014

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし