

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790944

研究課題名（和文）気道過敏症における IL-17 ファミリーサイトカインの役割の解析

研究課題名（英文）Roles of IL-17 family cytokines in airway hyper responses

研究代表者 南部 あや (NAMBU AYA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：10456197

研究成果の概要（和文）：本研究では、IL-17A と IL-17F の機能だけでは説明しきれないアレルギー性喘息の発症および病態形成の分子機構について、IL-25（別名 IL-17E）と IL-17B の機能の解明を試みた。その結果、OVA 誘導のアレルギー性喘息モデルにおいて、上皮由来の IL-17E が好酸球を誘導することで局所における炎症誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした。この研究結果は、研究論文として成果を発表した。

研究成果の概要（英文）：In this study I had tried to understand the roles of IL-25 and IL17B in a airway hyper responses (AHR). In a mouse model of allergic AHR, IL-17E derived from epithelial cells has a critical role by recruiting eosinophils to local inflammation sites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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・アレルギー内科学

キーワード：免疫、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

IL-17 ファミリーサイトカインは、IL-17A から IL-17F の 6 つの分子で構成されている。マウスに IL-17A-D、F を投与すると好中球の浸潤が誘導される。一方、IL-25 (IL-17E の別称) を投与した場合は、主に好酸球の浸潤が誘導される。また、それらの受容体鎖も 5 つの分子 (IL-17RA-E) からなるファミリーを形成しており、複数からなるリガンドと受容体の組み合わせで生理作用を発揮する。獲得性免疫応答に主要な役割を持つヘルパー T 細胞の分類において、IFN- $\gamma$ +Th1 細胞と IL-4+Th2 細胞に加えて、最近、IL-17A や IL-17F

を産生する Th17 細胞が新しく同定された。この Th17 細胞が感染防御に重要な役割を持っている一方で、不適切/過剰な Th17 細胞の活性化が自己免疫やアレルギーなどの疾患の発症に関与していることが急速に明らかになったことにより、IL-17A や IL-17F 以外の IL-17 ファミリーサイトカインの役割についても現在、大きな注目が集まっている。

申請者らは、これまでに IL-17A 欠損マウスや IL-17F 欠損マウスを独自に作製し、マウスの接触型、遅延型および気道過敏症 (AHR) モデルを用いてアレルギー疾患における IL-17A と IL-17F の役割の解明に取り組

み、当該分野では世界をリードする著名な業績を上げている (1, 2)。本研究では、IL-17A と IL-17F の機能だけでは説明しきれないアレルギー性喘息の発症および病態形成の分子機構について、IL-25 と IL-17B の機能を明確にすることでその解明を試みることを目的とする。

アレルギー性喘息は、IgE の上昇を伴い Th2 サイトカイン型・好酸球優位な気道炎症を伴う「アトピー型」と、IgE 値は上昇せず、好中球優位な炎症像を呈する「非アトピー型」に分類される (3)。アトピー型喘息に対するマウスモデルは確立されており、汎用されている。一方で、非アトピー型喘息に対する動物モデルは、申請者の共同研究者である中江らによって確立され、Th17 細胞依存的な AHR であることが明らかにされている (4)。

アジュバンド (Alum) の存在下で卵白アルブミン (OVA) をアレルゲンとして感作することにより誘導する Th2 型、いわゆるアトピー型喘息のマウスモデルにおいて、申請者らは IL-17A、IL-17F、および IL-17A/IL-17F 欠損マウスでも野生型マウスと同程度の炎症が起きることを報告している (1, 2)。一方で、IL-17RA 欠損マウスでは同モデルの症状が抑制されるとの報告から、アトピー型 AHR の誘導には IL-17RA のリガンドのうち、IL-17A と IL-17F ではなく、IL-25 の重要性が示唆されていた。実際に、IL-25 の中和抗体の投与により、このアトピー型 AHR の抑制が見られる (5)。申請者らも、IL-25 欠損マウスを作製し、IL-17A/IL-17F 欠損マウスと異なり、IL-25 欠損マウスでは、アトピー型 AHR が抑制されることが明らかになった (未発表データ)。しかしながら、この抑制は部分的であり、完全に抑制されなかった。一方、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞を欠損するマウスではアトピー型 AHR が著名に抑制され、その際、IL-17RB を発現する NKT 細胞が重要であることが示されている (6, 7)。IL-17RB には IL-25 だけでなく、IL-17B が結合する。したがって、アトピー型 AHR の誘導には IL-25 だけでなく、IL-17RB を共有する IL-17B の相加相乗的関与があると考えている。

すでに 2 つの海外の研究グループから独立して IL-25 欠損マウスの作成が同時に報告され (8, 9)、寄生虫 (鞭虫やブラジル鉤虫) に対する感染防御 (8, 10) や脳脊髄炎 (11) の発症との関わりが明らかになっている。しかしながら、アトピー型 AHR における IL-25 の役割について、IL-25 欠損マウスを用いた解析は報告されていない。また、アトピー型 AHR における IL-17B の役割については情報が全くないに等しい。申請者は、既存のグループとは別に独自に、IL-25 欠損マウスの作製に成功し、現時点でもまもなく IL-17B 欠損マウスの作出に成功する見込みである。さらに、

IL-17RB 欠損マウスの作成も進行中である。そこで、本研究では、これら IL-17 関連遺伝子欠損マウスを用いて、アトピー型 AHR における IL-17RB シグナルの役割とその発症機序の分子機構を明確にすることを目的とする。

#### 引用文献

- (1) Nakae S et al., *Immunity*. 17, 375-87, 2002.
- (2) Ishigame H et al., *Immunity*. 30, 108-19, 2009.
- (3) Amin, K. et al., *Am J Respir Crit Care Med*. 162, 2295-301, 2000.
- (4) Nakae S et al., *Blood*. 109, 3640-8, 2007.
- (5) Ballantyne SJ et al., *J Allergy Clin Immunol*. 120, 1324-31, 2007.
- (6) Terashima A et al., *J Exp Med*. 205, 2727-33, 2008.
- (7) Stock P et al., *J Immunol*. 182, 5116-22, 2009.
- (8) Owyang AM et al. *J Exp Med*. 203, 843-9, 2006.
- (9) Nakae S et al., *Int Immunol*. 15, 251-60, 2003.
- (10) Fallon PG, et al., *J Exp Med*. 203, 1105-16, 2006

#### 2. 研究の目的

現在、自己免疫やアレルギー疾患の発症機構において IL-17 ファミリーサイトカイン (IL-17A-F) の役割が非常に注目を集めている。本研究では、IL-17A と IL-17F の機能だけでは説明しきれないアレルギー性喘息の発症および病態形成の分子機構について、IL-25 (別名 IL-17E) と IL-17B の機能を明確にすることでその解明を試みることを目的とし、今後も引き続き、当該分野で世界をリードする研究を行う。具体的には、IL-25 欠損マウス (作製済み)、IL-17B 欠損マウス (まもなく作製完了見込み)、および IL-17RB 欠損マウス (本申請で作製予定) にアトピー型 AHR を誘導し、アトピー型 AHR における IL-25、IL-17B および IL-17RB の役割とその作用機序について個体-細胞-分子レベルで明確にする。

#### 3. 研究の方法

本研究は 3 ヶ年計画で行われた。IL-25 欠損マウス (作成済み)、IL-17B 欠損マウス、および IL-17RB 欠損マウス (本申請で作成) に OVA を抗原とするアトピー型 AHR を誘導し、アトピー型 AHR における IL-25 および IL-17B の役割とその作用機序について個体-細胞-分子レベルで明確にすることを試みた。IL-25 欠損マウスと IL-17B 欠損マウスを用いて、IL-17B と IL-25 の機能差異の有無を解析した。IL-17RB 欠損マウスおよび IL-17B、IL-25 単独欠損マウスの解析に加え、IL-17B と IL-25 の相乗効果について機能を明らかにす

るべく、ダブル欠損マウスの作製を試みた。また、IL-25 および IL-17B による IL-17RB を介した Th 細胞の機能制御機構について評価を行った。

#### 4. 研究成果

IL-25 と IL-17B の役割を評価するにあたり、個体モデルで気道過敏症を解析する必要がある、既に存在する IL-25 欠損マウスを入手し、IL-17B については新しく欠損マウスの作製を試みた。IL-17B のタンパク質が発現しないようにターゲティングベクターを構築し、これを C57BL/6 背景の ES 細胞 (Bruce4) へ導入することにより相同組換え体を得た。組換えを確認できた ES 細胞を ICR 由来の 8 細胞期胚とアグリゲーションによりキメラを得ることに成功した。このキメラマウスを用いて次年度以降に IL-17B 欠損マウスを解析する。

気道過敏症における IL-25 の役割を明らかにするため、C57BL/6 背景の IL-25 欠損マウスにアトピー型 AHR を誘導した。その結果、IL-25 欠損マウスでは気道過敏症が優位に抑制されていた。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の浸潤細胞を評価した結果、IL-25 欠損マウスでは好酸球その他の細胞の浸潤が有意に抑制されていた。これらの結果から、IL-25 はアトピー型 AHR の発症に非常に重要な役割を果たしていることがわかった。また、BALF 中の IL-4, IL-5, IL-13 といった Th2 サイトカインおよび血清中の IgE 量も IL-25 欠損マウスでは有意に減少していた。つぎに、IL-25 が AHR の感作期および炎症誘導期のどの相で作用するのかを明らかにすべく、以下の解析を行った。まず、感作期における作用を明らかにすべく、感作後の樹状細胞の所属リンパ節への浸潤および T 細胞応答を評価した。その結果、野生型マウスおよび IL-25 欠損マウスは同程度の樹状細胞浸潤および T 細胞応答を示した。また、感作後の野生型および IL-25 欠損マウスからそれぞれ Th2 細胞を精製し、Rag2 欠損マウスに移植後 AHR を誘導し比較したところ、気道閉塞および細胞浸潤ともに有意な差は認められなかった。以上の結果から、IL-25 は感作期における Th2 の活性化には関与しない事が明らかとなった。つぎに、炎症誘導期における IL-25 の役割を明らかにすべく、野生型マウスから精製した感作後の Th2 細胞を Rag2 欠損マウスまたは IL-25/Rag2 二重欠損マウスに移植し、AHR を誘導した。その結果、IL-25/Rag2 二重欠損マウスに移植した群では気道閉塞および好酸球浸潤が有意に抑制された。これにより、IL-25 は AHR の炎症誘導期特異的に作用する事が明らかとなった。炎症誘導時の IL-25 産生細胞について、骨髄キメラを作製し解析したところ、T 細胞やマスト細胞といった造血幹細胞由来

の細胞からではない細胞から産生される IL-25 が重要であることを明らかにした。

#### 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 6 件)

1)Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Körner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S.

Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma.

J immunol., 189(7),2012, 3641-52

DOI: 10.4049/jimmunol.1200461

2)Shibui A, Shimura E, Nambu A, Yamaguchi S, Leonard WJ, Okumura K, Sugano S, Sudo K, Nakae S.

Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production.

Cytokine., 59(1), 2012, 108-14

DOI: 10.1016/j.cyto.2012.03.018

3)Shibui A, Nambu A, Shimura E, Yamaguchi S, Shiraishi C, Sato Y, Okumura K, Sugano S, Hozumi N, **Nakae S**.

Alteration of immune responses by N-acetylglucosaminyltransferase V during allergic airway inflammation.

Allergol Int., 60(3), 2011, 345-54.

DOI: 10.2332/allergolint.10-0A-0283

4)Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura E, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, **Nakae S**, Fischbein MP

Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion.

Circulation., 24(11 Suppl), 2011, S187-96.

DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.014852

5) Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S.

IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity.

Proc Natl Acad Sci U S A., 107(43), 2010, 18581-6

DOI: 10.1073/pnas.1003059107

6) Ishii A, Oboki K, Nambu A, Morita H, Ohno

T, Kajiwara N, Arae K, Sudo H, Okumura K,  
Saito H, Nakae S.

Development of IL-17-mediated  
delayed-type hypersensitivity is not  
affected by down-regulation of IL-25  
expression.

Allergol Int., 59(4)7, 2010, 399-408

DOI: 10.2332/allergolint.10-0A-0218

〔学会発表〕(計1件)

南部あや、角木基彦、中江進

Regulation and function of IL-16

第33回日本分子生物学会年会

2010年12月7日~10日 神戸

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 南部 あや (NAMBU AYA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：10456197