

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 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791093

研究課題名（和文）炎症性皮膚疾患における IL-33 の免疫学的解析

研究課題名（英文）Analysis of IL-33 in inflammatory skin disease

研究代表者

今井 康友（IMAI YASUTOMO）

兵庫医大・医学部・助教

研究者番号：10529514

研究成果の概要（和文）：

インターロイキン 33 (IL-33) は IL-18 と同じ IL-1 ファミリーのサイトカインで、IL-18 と同様にアトピーなどのアレルギーへの関与が指摘されている。そこでまず、ヒトならびにマウスの血中 IL-33 値の ELISA を用いた測定系ならびに共焦点レーザー顕微鏡を用いた IL-33 の免疫染色の実験系を確立した。IL-33 は正常ケラチノサイトの核内に認められ、ブタクサによるアレルギー性結膜炎モデルマウスやハプテン頻回塗布による接触皮膚炎モデルマウスでは、IL-33 が蛋白レベルで増加していた。さらに、DNFB をハプテンとする即時型接触過敏反応を検討したところ、野生型で観察される耳介腫脹が IL-33 受容体ノックアウトマウスでは有意に低下していた。これらの結果は、IL-33 が即時型接触過敏反応において重要であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

IL-33 has been cloned recently as the ligand of ST2. As with IL-1 β or IL-18, IL-33 is a member of the IL-1 cytokine family. Effect of IL-33 is dependent on ST2 binding, and its signal is transduced via MyD88, as with IL-1 β or IL-18. We examined the role of IL-33 in an immediate type contact hypersensitivity of skin by challenging BALB/c mice with DNFB repeatedly. Wild-type BALB/c mice or ST2-deficient mice were sensitized on shaved back skin with DNFB, and repeatedly challenged with DNFB on the left ear once a week. The ear thickness was measured before and after each challenge. The reactions were hapten specific. Wild-type BALB/c mice showed both immediate and delayed-type reactions, whereas ST2 KO mice did not show any immediate reaction. These results suggest that IL-33 may have an important role in the mechanism of immediate contact hypersensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：インターロイキン 33 (IL-33)、接触過敏反応、アレルギー

1. 研究開始当初の背景

IL-18 は研究代表者の所属する兵庫医科大学で発見されたサイトカインであり、我々のグループは、このような IL-1 ファミリーに属するサイトカインの研究を一貫して行ってきた。IL-33 の受容体である ST2 は富永によって 1989 年に発見されていたが、長年そのリガンドは不明であった。2005 年に Schmitz らは ST2 のリガンドとして IL-33 を報告し、IL-33 が IL-1 β や IL-18 と同様に IL-1 ファミリーに属するサイトカインであることが明らかとなった。IL-33 受容体は IL-33 との結合分子である IL-33R α 鎖とシグナル伝達に関与する IL-33R β 鎖で構成されており、IL-33R α 鎖が ST2 であり、IL-33R β 鎖は IL-1 β と同様に IL-1RAcP である。また、IL-18 と同様に、IL-33 の細胞内シグナル伝達経路は Myd88 を介するものである。IL-1 β ならびに IL-18 は、活性の無い前駆体で産生され、caspase-1 によって切断され活性化型の蛋白に convert されて初めて生理活性を持つ。したがって、以前は同じ IL-1 ファミリーである IL-33 も同様に caspase-1 によって切断され活性化型になると考えられていた。しかし、IL-1 β ならびに IL-18 とは違い、IL-33 は全長 (33KDa) のままで生理活性があり、caspase-1 によって切断されると逆に活性を失うことが報告された。IL-33 は角化細胞で mRNA の発現が確認されているサイトカインである。IL-33 受容体 α 鎖(IL-33R; ST2 蛋白)は肥満細胞、好塩基球、好酸球、Th2 細胞などに発現しており、*in vitro* で IL-33 は Th2 サイトカインを誘導する。しかし、IL-33 が Th2 サブセットを生体内でどのような機序で誘導するのかは明らかになっていない。また、皮膚炎の病態形成における IL-33 の役割については、マウスモデルにおいても、ヒトにおいても、これまでに報告は無い。IL-18 においては、既にヒト抗 IL-18 抗体の効果が確認されるなど臨床応用への研究がなされており、類似のサイトカインである IL-33 も同様に治療標的となり得ることが予想される。

2. 研究の目的

抗 IL-33 抗体の作製と検出系を確立するとともに、IL-33 受容体ノックアウトマウスを用いて、皮膚炎などのアレルギー疾患の病態における IL-33 の役割を *in vivo* で解析する。

3. 研究の方法

(1) IL-33 に関する実験系の確立

抗体はラットに免疫して制作した独自のポリクローナル抗体またはこれと市販のモノクローナル抗体(Nessy-1)の組み合わせを、実験系に応じて使用した。ポリクローナル抗体は rmIL-33 (抗原) カラムで精製した。これら抗 IL-33 抗体を様々な条件下で用いて容量・プロトコルを最適化することで、ヒト、マウス IL-33 を高感度に検出する ELISA や免疫染色などの実験系を作製した。そして、各種皮膚炎モデルマウスや、実際のヒトの乾癬やアトピーと行った皮膚炎患者の血清 IL-33 値などについても検討した。ヒトのサンプルを用いる実験に関しては、兵庫医科大学倫理委員会の了承を得た上で、文章でのインフォームドコンセントを得たうえで実施した。また、マウスの組織切片に対して抗 IL-33 抗体を用いた免疫組織染色あるいは蛍光抗体法を行い、光学顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡を用いて IL-33 の局在と発現を観察した。

(2) マウス皮膚炎モデルにおける IL-33 の *in vivo* での役割

野生型または IL-33 受容体ノックアウトマウスに対して、ハプテンである 0.5% DNFB をマウス背部に塗布して感作し、それから毎週 1 回、0.2% DNFB を耳介に塗布してチャレンジし耳介浮腫を検討した。対照群としては vehicle のみ (アセトン・オリブ油) を外用したものと比較した。

4. 研究成果

(1) IL-33 に関する実験系の確立

抗 IL-33 ポリクローナル抗体を用いてヒト、マウス IL-33 を高感度に検出する ELISA や免疫染色の実験系を作製した。また、ヒトならびにマウス皮膚における IL-33 の発現と活性化の状態を、抗 IL-33 抗体を用いた蛍光抗体法で検討する系を確立した。市販の ELISA ではヒトの血清で感度が悪く測定限界以下になってしまう血清であっても、独自に作成した高感度 ELISA では測定することが可能であった。この系でアトピー性皮膚炎ならびに乾癬患者の血清 IL-33 値を測定し健康人と比較したところ、有意差は認められなかった。また、乾癬患者の血清 IL-33 値を種々のサイトカインや YKL-40, CRP, 白血球数といった炎症性皮膚疾患のマーカーとの相関について検討を行ったが、特に相関を認めるサイトカインや炎症性マーカーは発見できなかった。

次に、Balb/c マウスをブタクサ花粉で免疫しブタクサ花粉を点眼するアレルギー性結膜炎モデルにおいて、研究代表者は高感度マウス IL-33ELISA 法を開発し、眼瞼結膜中の組織破碎液中の IL-33 を測定したところ、正常マウスに比べてこのモデルのアレルギー性結膜炎マウスでは、IL-33 が蛋白レベルで増加していることを見いだした。以上の結果から、ブタクサ花粉の点眼により、眼瞼における表皮ケラチノサイトの発現する IL-33 蛋白は増加することが分かった。また、DNFB 頻回塗布によるマウス接触皮膚炎モデルにおいて、皮膚炎部分の皮膚においては、正常部位に比べ IL-33 が増加することも見いだした。しかし、このような条件下であっても、マウスの血清中の IL-33 値の上昇を捉えることはできなかった。続いて、IL-33 の免疫染色の実験系を確立した。マウス眼瞼結膜を免疫染色にて検討すると、IL-33 は正常結膜上皮細胞の核内に存在していた。皮膚においても同様で、IL-33 は正常ケラチノサイトの核内に認められた。

(2) マウス皮膚炎モデルにおける IL-33 の *in vivo* での役割

IL-33 受容体ノックアウトマウスを用いて、DNFB をハプテンとする接触過敏反応を検討したが、野生型との差は見られなかった。しかし、即時型接触過敏反応においては、IL-33 受容体ノックアウトマウスでは野生型で観察される耳介腫脹が有意に低下していた。この即時型接触過敏反応ではトルイジンブルー染色でマスト細胞の増加が観察できる。そこで、IL-33 を耳介局所に直接投与すると、それだけでマスト細胞が増加することが判明した。すなわち、即時型接触過敏に IL-33 が関与している可能性があることが示唆された。成果一部の内容は the XXII World Allergy Congress において口頭発表に選ばれており、国外においても高いインパクトがあることが示唆された。

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 7 件)

1. Otani N, Yamanishi K, Sakaguchi Y, Imai Y, Shima M, Okuno T, Varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity in subjects with herpes zoster. J Immunol Methods. 377:53-5. 2012

2. Nakagawa N, Yamamoto M, Imai Y, Sakaguchi Y, Takizawa T, Ohta N, Yagi N, Hatta I, Hitomi K, Takizawa T, Takeda J, Tsuda T, Matsuki M, Yamanishi K, Knocking-in the R142C mutation in transglutaminase 1 disrupts the stratum corneum barrier and postnatal survival of mice. J Dermatol Sci., 65:196-206,2012

3. Takei-Taniguchi R, Imai Y, Ishikawa C, Sakaguchi Y, Nakagawa N, Tsuda T, Hollenberg MD, Yamanishi K, Interleukin-17- and protease-activated receptor 2-mediated production of CXCL1 and CXCL8 modulated by cyclosporine A, vitamin D(3) and glucocorticoids in human keratinocytes, J Dermatol. 2011 Dec 29. doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01462.x.

4. Imai Y, Tsuda T, Aochi S, Futatsugi-Yumikura S, Sakaguchi Y, Nakagawa N, Iwatsuki K, Yamanishi K, YKL-40 (chitinase 3-like-1) as a biomarker for psoriasis vulgaris and pustular psoriasis. J Dermatol Sci., 64, 75-77, 2011

5. Yamamoto M*, Imai Y*, Yamanishi K, Lichen planus-like dermatosis distributed along the lines of Blaschko, J Dermatol, J Dermatol, 38, 190-191, 2011
(*equally contribution)

6. Kitagawa H, Yamanaka K, Kakeda M, Inada H, Imai Y, Gabazza EC, Kurokawa I, Mizutani H, Propionibacterium acnes vaccination induces regulatory T cells and Th1 immune responses and improves mouse atopic dermatitis. Exp Dermatol. 20,157-8, 2011

7. Kuroda-Morimoto M, Tanaka H, Hayashi N, Nakahira M, Imai Y, Imamura M, Yasuda K, Yumikura-Futatsugi S, Matsui K, Nakashima T, Sugimura K, Tsutsui H, Sano H, Nakanishi K, Contribution of IL-18 to eosinophilic airway inflammation induced by immunization and challenge with Staphylococcus aureus proteins, Int Immunol., 22.561-70, 2010

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Imai Y, Yoshimoto T, Yamanishi K, Nakanishi K, and Yoshimoto T, IL-27 inhibits CD8-positive IL-17-producing T cell (Tc17 cell) differentiation: A novel therapeutic way for dermatitis, The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (36JSID), December 9(Fri.)-11(Sun.), 2011, Kyoto International Conference Center, JAPAN

2. Imai Y, Yasuda Y, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K, Contribution of IL-33 and Nuocyte to Experimental Allergic Dermatitis, the XXII World Allergy Congress (WAC 2011), 4-8 December Cancún, México, 2011

3. Imai Y, Yamanishi K, Serum cytokine and chemokine profiles and correlation of disease severity in pustular psoriasis , World Congress of Dermatology (WCD 2011), 2011.5.24, COEX Convention Center, Seoul, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 康友 (IMAI YASUTOMO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：10529514