

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 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890224

研究課題名（和文） 上皮細胞によるアレルギー疾患の誘導機序の解明

研究課題名（英文）

The study on epithelial cells-mediated development of allergic diseases

研究代表者

松下 一史 (MATSUSHITA KAZUFUMI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：20581549

研究成果の概要（和文）：

IL-33はIL-1ファミリーに属する新規サイトカインであり、肥満細胞、樹状細胞もしくはT細胞を刺激しTh2応答を増強し、アレルギー疾患の増悪に関与する。最近の研究により、その切断された成熟型のみならず全長のプレ型のIL-33にも生理活性があることが明らかにされた。したがって、IL-33の発現上昇自体がアレルギー疾患の発症ならびに増悪に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、IL-33の発現誘導機構は未だに良く分かっていない。本研究で我々はIL-33のタンパク質ならびにmRNAの発現制御機構をRagweed pollenによるアレルギー性鼻炎ならびに喘息モデルマウスを用いて検討した。さらに、IL-33 mRNAの発現誘導機構をより詳細に検討するために、我々はRagweed pollenもしくはRMA+Ionomycin誘導性のIL-33発現機構の検討をヒト気道上皮細胞株BEAS-2Bを用いて行った。

研究成果の概要（英文）：

IL-33 is a newly identified IL-1 family cytokine, which stimulates basophile, mast cell, dendritic cell or T cell to augment Th2 response and exacerbate allergic diseases. Recent studies have revealed not only cleaved, so called “mature-form”, but also full length, so called “pre-form”, IL-33 has its biological activity suggesting the importance of IL-33 up-regulation itself in the initiation or exacerbation of allergic diseases. However, the mechanisms for IL-33 induction are yet to be fully uncovered. Here, we studied the regulatory mechanisms of IL-33 protein and mRNA expression in Ragweed pollen induced allergic rhinitis and asthma mouse model. Further more, to gain insight into the precise regulatory mechanisms for IL-33 mRNA expression in the epithelial cells, we investigated Ragweed pollen and PMA and ionomycin induced IL-33 mRNA expression in human bronchial epithelial cell line, BEAS-2B.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2012年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー・ぜんそく

1. 研究開始当初の背景

I 型アレルギー疾患はこれまでに多くの研究がなされてきたにもかかわらず、未だにその根本的な治療法の確立には至っていない。近年、上皮細胞由来の IL-33 がアレルギー疾患の発症に重要な役割を果たしていることが判明し、アレルギー疾患の新たな治療ターゲットとして注目を集めている。

IL-33 は IL-1 ファミリーに属するサイトカインであり、好塩基球、肥満細胞、樹状細胞及び T 細胞に作用することで Th2 応答を誘導もしくは増強し、アレルギー性疾患の誘導において重要な役割を果たしている。これまで IL-33 は核内に局在しており、既に存在している IL-33 が Caspase により切断されることによりその分泌が誘導されると考えられてきた。しかしながら、最近の研究により切断を受けていない IL-33 にも生理活性があり、ネクロシスにより分泌される全長の IL-33 が生体内において重要である可能性が示され、IL-33 遺伝子の発現上昇自体もアレルギー疾患の発症において重要であることが示唆されている。実際に我々の研究室ではアレルギー性鼻炎患者において *IL33* 遺伝子領域 (イントロン 3) に花粉症と相関のある新規の遺伝子多型が存在することを明らかにしており、このことは IL-33 遺伝子の転写制御がアレルギー疾患の発症において重要であることを示唆している。したがって、細胞内に存在していた IL-33 が分泌されるだけでなく、mRNA の転写を介した IL-33 の新規合成がアップレギュレートされることがアレルギー疾患の発症ならびに増悪に重要であることを示している。

2. 研究の目的

I 型アレルギー疾患はこれまでに多くの研究がなされてきたにもかかわらず、未だにその根本的な治療法の確立には至っていない。我々は、近年そのアレルギー疾患の発症に重要であることが知られてきている上皮細胞由来の pro-allergic cytokine、特に IL-33 に着目し、花粉暴露によって惹起される(1)アレルギー性鼻炎および喘息における上皮細胞由来 IL-33 の関与、(2)花粉粒子による上皮細胞からの IL-33 産生誘導機序の解明を行い、新規アレルギー治療の確立を目的とした基礎的な知見の集積を行った。

3. 研究の方法

in vitro において IL-33 産生誘導機構を解析するために、ヒト気道上皮細胞株 Beas-2B 細胞を用いて種々の刺激による IL-33 mRNA 発現誘導機構の検討を行った。in vivo での IL-33 産生誘導機構を検討するためにブタクサ花粉誘導性の鼻炎ならびに喘息モデルでの検討を行った。鼻炎マウスモデルとして、マウスに水酸化アルミニウムゲルでブタクサ花粉を免疫し、二週間後に花粉を 4 日間連続点鼻し鼻炎を誘導した。また、麻酔下においてブタクサ花粉を週二回、二週間、計四回点鼻することにより、喘息症状を誘導することができた。これらマウスモデルにおいて上皮細胞での IL-33 mRNA ならびに IL-33 タンパク質の発現、さらには鼻汁中または肺洗浄液中への IL-33 分泌を検討した。

4. 研究成果

ブタクサ花粉誘導性鼻炎モデルおよび喘息モデルにおいて、鼻粘膜上皮細胞または肺胞上皮細胞において IL-33 mRNA ならびに核

内でのタンパク質の発現が著しく亢進することが明らかとなった。また、鼻炎モデルにおいては鼻汁中に IL-33 が分泌されていることを明らかにした。これら IL-33 の発現は MyD88 KOマウスもしくはFcR γ KOマウスでも正常であり花粉粒子を認識し IL-33 を産生するためにはこれらのシグナル分子は必須でないことが明らかとなった。

In vitro において IL-33 産生誘導機構の詳細を検討するために BEAS-2B 細胞を用いて検討を行った。PMA および Ionomycin で刺激すると 3 時間後から IL-33 mRNA の発現が見られ 6 時間後にピークをむかえた。一方で、ブタクサ花粉で刺激した場合、IL-33 mRNA は誘導されなかった。PMA および Ionomycin 誘導性の IL-33 mRNA の発現は翻訳阻害剤である Cycloheximide を加えることで消失することが明らかとなった。

今回、我々の検討により鼻炎および喘息のモデルにおいて炎症局所での IL-33 の発現が mRNA およびタンパク質レベルで著しく上昇していることが明らかとなった。マウス鼻炎モデルでは IL-33 KO マウスにおいて鼻炎症状が顕著に抑制されていたことから、炎症局所から産生される IL-33 がアレルギー疾患の誘導ならびに増悪に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方で、上皮細胞が花粉粒子によって IL-33 を産生するためには MyD88 や FcR γ は必要なくその花粉の認識ならびに IL-33 産生誘導機構は更なる検討が必要である。

In vitro で BEAS-2B 細胞をブタクサ花粉で刺激したところ IL-33 mRNA の発現は誘導されず、もしかすると花粉の認識には上皮細胞だけでなく樹状細胞などの免疫細胞なども必須であり上皮細胞以外の細胞から産生される分子により IL-33 mRNA の発現誘導が起きているのかもしれない。BEAS-2B 細胞を

PMA および Ionomycin で刺激した場合は IL-33 mRNA の発現が誘導されるが、これは翻訳阻害剤である Cycloheximide により消失することが明らかとなった。したがって、IL-33 mRNA は PMA+Ionomycin 刺激によって直接誘導されるのではなく、何らかの転写因子の誘導を介して制御されていることが示唆された。今後、この IL-33 mRNA の発現に必須であるマスターレギュレーターを同定すればアレルギー疾患治療における重要な標的となりうると考えられる。

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 6 件)

①, Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. **J. Allergy Clin. Immunol.** 査読有, in press 2012.

②, Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 査読有, 109: 3451-3456, 2012.

③, Iwasaki H, Takeuchi O, Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, Kuniyoshi K, Satoh T, Saitoh T, Matsushita M, Standley DM and Akira S. The I κ B kinase complex regulates TLR-IL-1R induced cytokine mRNA stability by controlling Regnase-1

degradation. **Nat. Immunol.** 査読有, 12:
1167-1175, 2011.

④, Miyake T, Satoh T, Kato H, Matsushita K, Kumagai Y, Vandenbon A, Tani T, Muta T, Akira S and Takeuchi O. IkappaBzeta is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 査読有, 107: 17680-17685, 2010.

⑤, Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K and Akira S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. **Nat. Immunol.** 査読有, 11: 926-44 2010.

⑥, Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S and Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.** 査読有, 107: 1512-1517, 2010.

[学会発表] (計1件)

①, Matsushita K, Takeuchi O, Iwasaki H, Akira S. A novel TLR-inducible RNase Zc3h12a mediated regulation of T and B cell activation. International Congress of Immunology. Kobe, Japan, August 25th 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 一史 (MATSUSHITA KAZUFUMI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：20581549

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
善本 知広 (YOSHIMOTO TOMOHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：60241171