

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 12 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23791126

研究課題名（和文）血管内皮細胞由来 IL-33 による血管炎病態形成メカニズムの解析

研究課題名（英文）To study the mechanism by which endothelial cell derived IL-33 contributes to the development of vasculitis

研究代表者

海江田 信二郎（Shinjiro Kaieda）

久留米大学・医学部 ・助教

研究者番号：20330798

研究成果の概要（和文）：

ANCA 関連血管炎患者における血清中の IL-33 発現についての評価を行った。Human IL-33 ELISA Quantitation Kit (geneway) を用い ANCA 関連血管炎患者 6 名（Wegener 肉芽腫 1 名 顕微鏡的多発血管炎 3 名 チャーグ・スト劳斯症候群 2 名）について測定した。チャーグ・スト劳斯症候群 1 名で 2.254 pg/ml と血清中 IL-33 の上昇を認めたが、他の 5 名では感度以下であった。我々はマウス骨髄由来 mast cell を用い、*in vitro* にて recombinant IL-33 刺激によるその viability への影響についての検討を行った。Recombinant IL-33 刺激群で有意な cell viability の上昇を濃度依存性に認めた。CFSE dilution assay では細胞増殖を認めなかったため、apoptosis assay (Annexin V stain) を行い、IL-33 が mast cell の apoptosis を阻害し cell viability 上昇に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The levels of Interleukin (IL)-33 were not elevated in the serum obtained from patients with vasculitis including ANCA-associated vasculitis. The regulation of MC survival by cytokines such as IL-3, SCF, IL4, and IL-10 have been demonstrated in prior studies. Given the newly found importance of IL-33 in MC immune functions, including cytokine production and granule maturation, we examined its effect on MC survival. We analyzed the effects of IL-33 on MC proliferation, survival and apoptosis. We have demonstrated that IL-33 prevents apoptosis of mouse bone marrow derived MCs (mBMMCs) induced by growth factor deprivation *in vitro*. This effect could represent a new mechanism by which IL-33 producing cells, such as fibroblasts, support the maintenance of tissue mastocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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 : IL-33, mast cell, vasculitis, apoptosis

1. 研究開始当初の背景

IL-33はIL-1サイトカインファミリーの一つで2005年にST2 receptorのligandとして同定された。ST2 receptorはmast cell、Th2細胞、心筋細胞への発現が報告され、アレルギー、自己免疫性疾患、感染症の幅広い病態に関与することが報告されている。特にmast cellは休止状態において高発現しており、IL-33による刺激でIL-1b, IL-6, TNF-aなどの多彩な炎症性サイトカインを産生する(Moulin D et al. Cytokine 47:216-215, 2007)。さらに私はこれまで滑膜線維芽細胞由来のIL-33が関節炎増悪因子であるmast cell特異的tryptaseの発現を促進することを報告(業績1参照)してきた。Mast cell tryptaseは関節炎症部への好中球遊走を促し、炎症を促進することが報告されている(Shin K et al. J Immunol: 182:647-656 2010)。さらにIL-33は関節炎動物モデルにおいてmast cell活性化を介し関節炎増悪に作用することが報告されている(Xu D et al. Proc Natl Acad Sci USA. 105:10913-10918 2008 Xu D et al. J Immunol. 184:2620-2626 2010)。関節リウマチ患者の滑液中IL-33濃度は変形性関節炎患者サンプルに比し有意に上昇し、また疾患活動性との相関がみられている(Matsuyama Y et al. J Rheumatol. 37:18-25 2010)。さらに全身性エリテマトーゼス(SLE)でも疾患活動性に比例し血清中のIL-33が上昇していることが報告され(Mo Y Mok et al. Rheumatology. 49:520-527, 2010)、自己免疫疾患の病態に関与することが示唆される。

IL-33は組織障害によるnecrotic cell deathに伴い放出されることが報告され(Alexander U et al. Immunity. 31:84-98, 2009)ている。血管内皮細胞はIL-33を高発現しており(Carriere V et al. Proc Natl Acad Sci USA 104: 282-287 2007)、血管炎症候群における血管壁障害により血中に分泌されることが推測される。またST2 receptorを高発現しているMast cellは、一般に血管や内皮細胞の近くに位置し(Abraham A et al. Nat Rev Immunol. 10: 441, 2010)、ラットアジュバンド誘導血管炎モデルでは発症早期からのmast cell活性化が報告されており、血管炎症に促進的に作用すると示唆されている(Burns J et al. Am J Pathol 152:555-563, 1998)。

さらにmast cell tryptaseが血管内皮細胞にMCP-1やIL-8などの産生を促すことが報告されており(Kinoshita M et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25: 1858-1863 2005)、mast cell tryptaseが血管内皮細胞の活性化を介し、好中球、単球の遊走を促し、病態増悪へ関与す

る可能性も示唆される。これらの知見より、私は血管内皮細胞由来のIL-33に着目し、血管炎症候群におけるmast cellの活性化および顆粒成熟化(tryptase発現)を介した血管炎増悪への関与について検討を行う。また血管炎病態においてmast cellの数の増加が報告されている。我々はIL-33がmast cellの生存・増殖に影響するかについても検討を行った。

2. 研究の目的

本研究ではANCA関連血管炎(Wegener肉芽腫 アレルギー性肉芽腫性血管炎 顕微鏡的多発血管炎)を対象に当該疾患におけるIL-33の発現を評価する。またIL-33によるmast cellの活性化および顆粒成熟化を介した血管炎病態への関与について検討を行う。さらに、IL-33のmast cell生存・増殖に対する影響について検討する。

3. 研究の方法

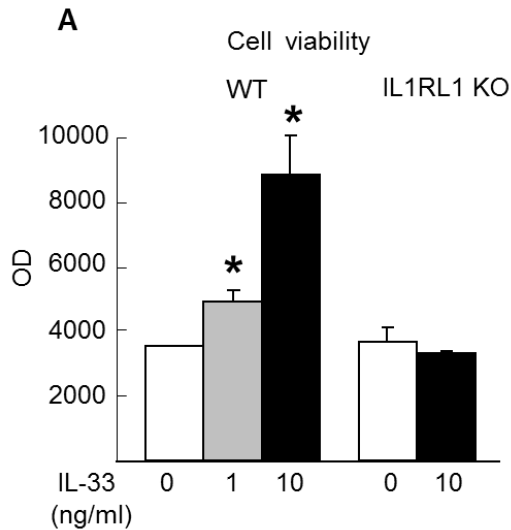
当院follow中のANCA関連血管炎患者における血清中IL-33を治療前、治療後にELISA法にて測定する。

IL-33のmast cell生存に対する影響に関しては、マウス骨髄由来mast cell(BMMC)を用いて検討を行った。BMMCをrecombinant IL-33で刺激し、生存活性についてはAlamar Blue dyeを用いて測定した。その増殖に関してはBMMCをIL-33で5日間刺激して、CFSE dilution assayをflowcytometry法を用いて行った。Apoptosisに関しては、BMMCを増殖因子のない状態にし、72hr後にAnnexin V染色を行い評価した。IL-33刺激・未刺激群の2群で評価した。

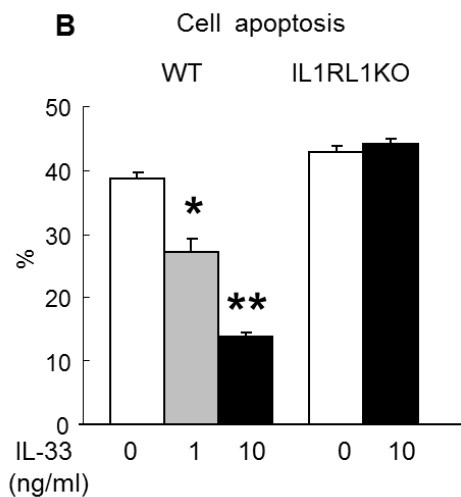
4. 研究成果

ANCA関連血管炎患者における血清中のIL-33発現についての評価を行った。Human IL-33 ELISA Quantitation Kit (geneway)を用いANCA関連血管炎患者6名(Wegener肉芽腫 1名顕微鏡的多発血管炎 3名 チャーグ・ストラウス症候群 2名)について測定した。チャーグ・ストラウス症候群1名で2.254 pg/mlと血清中IL-33の上昇を認めたが、他の5名では感度以下であった。以上より血清IL-33はANCA関連血管炎患者で有意な上昇を認めなかった。

IL-33のmast cell生存に関する検討を行った。Recombinant IL-33刺激濃度依存性に生存活性の有意な上昇を認める。この上昇効果はIL-33 receptor(IL1RL1)KO BMMCでは消失した。(図A)



IL-33 の mast cell apoptosis に関する検討を行った。Recombinant IL-33 刺激濃度依存性に有意な apoptosis 抑制効果を確認している。Apoptosis 抑制効果は IL-33 receptor (IL1RL1)KO BMMC では消失しており、IL-33 receptor を介した特異的な反応が示唆される。(図 B)



IL-33 の mast cell proliferation に関する検討を行った。BMMC は CFSE 染色後、mast cell の主要な増殖因子である stem cell factor (SCF)、および IL-33 で 5 日間刺激後に CFSE dilution assay を行った。SCF で認めた CFSE dilution は IL-33 刺激群で認めず、IL-33 は cell proliferation に関与しないことが明らかになった。以上より IL-33 は mast cell の apoptosis 阻害効果を介してその生存に寄与する可能性が示唆された。

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 6 件)

1. Kaieda S, Zaizen Y, Nomura Y, Okabe K, Kage M, Ida H, Hoshino T, Fukuda T. An autopsy case of refractory vasculo-Beçet's disease. *Mod Rheumatol.* (2013), in press. 査読有
2. Matsumoto M, Kaieda S, Honda S, Ida H, Hoshino T, Fukuda T. A Case of Late-onset Systemic Lupus Erythematosus with Severe Anemia. *Kurume Medical Journal.* (2013); in press. 査読有
3. Kaieda S, Wang J, Shnyder R, Fishgal N, Hei H, Lee RT, Stevens RL, Nigrovic PA. Interleukin-33 primes mast cells for activation by IgG immune complexes. *PLoS One.* (2012), in press. 査読有
4. Kaieda S, Kobayashi T, Moroki M, Honda S, Yuge K, Kawano H, Mitsuyama K, Sata M, Ida H, Hoshino T, Fukuda T. Successful treatment of rectal ulcers in a patient with systemic lupus erythematosus using corticosteroids and tacrolimus. *Mod Rheumatol.* (2012), in press. 査読有
5. 海江田信二郎 井田弘明. 血管炎症候群 内科 臨床雑誌 知っておきたい内科症候群 2012;109 (6) 1467. 査読無
6. 海江田信二郎. 免疫複合体による関節炎におけるマスト細胞の関与. 臨床免疫・アレルギー科 2012; 58: 486-9. 査読無

〔学会発表〕 (計 7 件)

1. Kaieda S, Wang J, Nigrovic P. IL-33 Promotes Mast Cell Survival Via Inhibition of Apoptosis Associated with Enhanced Expression of Bcl-XL. Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 2012.11.12 Washington DC, USA.
2. 海江田信二郎. マウス関節炎モデルにおける synovial fibroblast-mast cell の相互作用解析. 第 40 回日本臨床免疫学会総会 2012.9.28 東京都
3. Yoshiaki Zaizen, Shinjiro Kaieda, Kouki Okabe, Hitoshi Hamamura, Seiyo Honda, Tomoaki Hoshino, Hiroaki IdaTakaaki Fukuda. An autopsy case of refractory vascular Beçet disease. 15th International Conference on Beçet disease, Yokohama, Japan, July 13-15, 2012.
4. 海江田信二郎 井田弘明. 関節炎における synovial fibroblast-mast cell の相互作用解析. 第 33 回 日本炎症・再生医学会、福岡、2012 年 7 月 5-6 日.

5. Shinjiro Kaieda. Functional interaction between synovial mast cells and fibroblast-like synoviocytes via IL-33 and its receptor ST2. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術総会、東京、2012 年 4 月 26～28 日.

6. Shinjiro Kaieda, Junxia Wang, Ruslan Shnayder, Richard Lee, Richard Stevens, Peter Nigrovic. IL-33 mediates a mast cell-fibroblast amplification loop that primes mast cells for activation via immune complexes. 2011 Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Chicago, USA. Nov. 4-9, 2011

7. 海江田信二郎, Nigrovic Peter, 本多靖洋, 井田弘明. Synovial tissue derived IL-33 promotes joint inflammation. 第 39 回日本臨床免疫学会総会、東京、2011 年 9 月 15 日～17.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/imed1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海江田 信二郎 (Shinjiro Kaieda)
久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20330798

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし