

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591475

研究課題名(和文)リンパ組織におけるIL-33発現細胞と発現制御機構の解析

研究課題名(英文)IL-33 expression in lymphoid tissues

研究代表者

大保木 啓介(OBOKI, Keisuke)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：80415108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：IL-33発現細胞やIL-33の発現制御機構同定はアレルギー疾患分子標的を呈示できる可能性が高い。過年度報告のように、PicheryらがIL-33レポーターマウス系を報告した。これを受けて本研究では方針変更を余儀なくされたが、共同研究である記憶Th2細胞におけるIL-33機能解析の成果(Immunity 2015)があった。さらにはGWASから得られたもう一方の喘息関連重要因子TSLPについて、その阻害抗体による無作為化比較試験でその有効性が報告されたこと(NEJM, 2014)を鑑みると、同じく喘息関連重要因子IL-33やIL-33受容体の阻害抗体も、喘息治療薬としての期待が高い。

研究成果の概要(英文)：Clarification of IL-33-expressing cells and the regulatory mechanisms of IL-33 expression have a potential for identification of a new drug for asthma. Recently, another research reported IL-33 reporter mice on Journal of Immunology, 2012. Thus, we have attempted to study by another approach. Besides, a collaborative study which reported IL-33 function in memory Th2 cells has been published (Immunity 2015). Furthermore, given that Gauvreau et al.(2014) reported that anti-TSLP Ab treatment would be a promising drug for asthma (TSLP is one of the asthma-related genes reported from GWAS studies), it is also expected that inhibition of IL-33 or of IL-33-IL-33R pathway will show the possibility of success as a novel promising drug-target for asthma (IL-33 and IL-33R are also asthma-related genes reported from GWAS studies).

研究分野：分子生物学

キーワード：IL-33

1. 研究開始当初の背景

IL-33 は種々の免疫細胞と組織構成細胞に作用して、アレルギー性炎症を誘導すると考えられている。大規模ゲノムワイド関連研究およびメタ解析によって、喘息に関連する遺伝子 (SNPs) が立て続けに報告されている (Nat Genet 2009;41:342, N Engl J Med 2010;363:1211, Nat Genet 2011;43:887, Nat Genet 2011;43:893, Lancet 2011;378:1006)。これらの報告を総合すると、喘息リスクを高める遺伝因子はサイトカインである IL-33 と TSLP および IL-33 受容体が担うと考える妥当性は高い。とりわけ、IL-33 と IL-33 受容体がセットで見出されていることは、喘息の病態に IL-33 と IL-33 受容体が重要な役割を有することを示唆している。IL-33 の *in vivo* での役割については、我々が世界に先駆けて IL-33 欠損マウスを作成し、実際に喘息モデルでの好酸球浸潤と気道過敏性獲得に内在性の IL-33 が必須である事を明らかにした (PNAS 2010;107:18581)。大規模ゲノムワイド関連研究とノックアウトマウスの結果は、いずれも IL-33 が喘息病態に必須であることを強く示唆していて、関節リウマチ等の他の疾患でも IL-33 の関与が示唆されることもあって IL-33 は注目度が高く、特に IL-33 の作用の下流部分にあたる研究は盛んに行われている (Allergol Int 2010;59:143)。さらに、慶應大学小安教授や海外のグループによる IL-33 応答性の自然型リンパ球 Natural helper cell (Nuocyte, MPPtype2) の発見により、アレルギー疾患に関連する細胞メカニズム研究は大きな変換期を迎えている。

IL-33 は他の IL-1 ファミリー分子と同様にコンベンショナルな小胞輸送のためのシグナル配列を持たない。IL-33 はネクローシス後に受動的に細胞外放出されること、アポトーシスは逆に IL-33 を分解すること、IL-33 放出にインフラマソーム構成成分の

Caspase-1 が不要であることが我々を含めた複数のグループにより明らかにされたが (Immunity 2009;31:84, J Immunol 2009;183:7890, Biochem Biophys Res Commun 2010;391:1512)。一方で、IL-33 を恒常的に発現する細胞についてはいくつか報告があるものの、論文間で結果が一致しないなど証左は定かで無い。より上流に当たる IL-33 発現制御機構についての研究は、申請者の知る限りでは皆無である。IL-33 発現細胞の同定や IL-33 の発現制御メカニズムはアレルギー疾患分子標的を呈示できる可能性が高い。

ここでウプサラ大学 (スウェーデン) が Web 公開しているヒト組織でのタンパク質発現データベース (The Human Protein Atlas) を引用する。ここにはヒトの各種正常組織での IL-33 の免疫染色データが閲覧できる。正常組織において確かに恒常的な IL-33 の発現が認められ、気管支気道上皮、鼻咽頭上皮、胃粘膜組織、子宮粘膜組織、皮膚表皮が高発現組織である。IL-33 を発現する細胞種は上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞である。上皮は外部環境に面した組織であり、IL-33 が danger signal あるいは alarmin として働くという仮説 (PLoS One 2008;3:e3331) とも良く一致する。マウスでも IL-33 は恒常的に肺胞上皮や血管内皮に発現が認められる (申請者未発表データ)。IL-33 は上皮組織由来のサイトカインであるという広く受け入れられている考え方 (Immunol Rev 2008;226:172, Nat Rev Rheumatol 2011;7:321) は妥当なものに思われる。だが他の組織を注意深く検索すると、ヒトリンパ組織 (リンパ節、脾臓) の中でも IL-33 の発現が認められる。リンパ組織に認められる IL-33 陽性細胞は B 細胞中心の胚中心には存在せず、いわゆる T 細胞領域と呼ばれる領域に多数同定できる。マウス肺所属リンパ節でも同様の染色パターンが確認でき

ることから（申請者未発表データ）、マウスモデル実験の外挿妥当性も高い。これらは現在のところほとんど注目されていない興味深い事実である。もちろんリンパ組織での IL-33 発現細胞種は不明であり、リンパ組織における IL-33 がいかなる役割を担うのかは、まだ何も明らかではない。

ここまで IL-33 は恒常的に発現しているものとして話を進めたが、他のサイトカインと同様、IL-33 遺伝子にも「恒常的」発現機構のほかに、「誘導性」の発現機構が報告されている。IL-33 遺伝子は「DVS27」として同定され、最初に報告された（*J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1279）。この報告では mRNA differential display 法によって、発現変動のある遺伝子を探索していたところ、くも膜下出血後の反応（大動脈攣縮）を起こしたイヌ脳動脈で、正常と比較して DSV27（IL-33）の発現が大きく上昇していたという。さらに *in vitro* では、幾つかのサイトカインに曝露された場合、IL-33 の発現が亢進することが示されている（IL-1, TNF（*Immunity* 2005;23:479）、IFN- γ , PDGF-BB（*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G821））。これらから、IL-33 遺伝子には恒常的な発現のほかにも炎症などの周辺環境の変化によって駆動される誘導性の遺伝子発現調節メカニズムが存在することが強く示唆される。

一方で、IL-33 分子の局在に関わる興味深い報告が最近なされている。IL-33 は N 末端にホメオボックス転写因子に見られる helix-turn-helix モチーフを有しており、この領域が核移行シグナルであり DNA 結合能も有する。免疫組織染色や培養細胞でも実際に核内に強いシグナルが認められる。さらに、ヒストン H2A・H2B 二量体に対して結合能を有しており、*in vitro* では転写の不活性なヘテロクロマチン領域に局在することが示されている（*PNAS* 2007;104:282）。そもそ

も IL-33 は発見当初は核内因子であると考えられていて、ST2 のリガンドとして機能することが報告されてから、その局在する場によって機能がそれぞれ異なると考えられることから、分子機能の二面性が指摘されてきた（*Science STKE* 2007;2007:pe31）。ごく最近になり、IL-33 分子は IL-33 受容体（ST2）を介して NF- κ B を活性化する機能のほかに、核内因子として機能する場合には、逆に NF- κ B に結合して炎症性の転写活性化を抑制することが *in vitro* の IL-33 強制発現系で示された（*J Immunol* 2011;187:1609）。しかしながら、強制発現系はアーチファクトも出やすく、IL-33 を遺伝的に欠損する細胞での確認が必須である。さらに、このような核内 IL-33 のフィードバック機能があるとするなら、IL-33 欠損マウスでの炎症増悪化に繋がるのかどうかは大変興味深い。

2. 研究の目的

大規模なゲノムワイド関連研究から喘息の原因遺伝子として IL-33 とその受容体が報告され、続く複数の報告でも IL-33 とその受容体が報告され続けている。これまで IL-33 を発現する細胞や、より上流に当たる IL-33 発現制御機構についての体系だった研究は行われていない。本研究では申請者が開発中の IL-33 レポーターマウスを用いて、リンパ組織における IL-33 発現細胞の同定を行う。さらにこのレポーターマウス由来の細胞を用いて、IL-33 の発現制御メカニズムの探索を行う。さらには、IL-33 欠損マウスを用いた、核内 IL-33 機能の検討を行う。本研究では有力なアレルギー疾患分子標的である IL-33 についての学術的基盤形成を目指す。

3. 研究の方法

リンパ組織における IL-33 発現細胞の同定と IL-33 発現制御機構の解析を行うために、ヒトへの外挿妥当性、実行可能性の高いマウ

スモデルでの検討を行う。計画の主軸となるのは IL-33 GFP レポーターマウスを用いた実験である。リンパ組織における IL-33 発現細胞を GFP と蛍光標識抗体による各種の細胞表面抗原によって同定・単離し、IL-33 発現細胞の性状を明らかにする。単離された IL-33 発現細胞については、該当細胞の mRNA マイクロアレイ解析によって遺伝子発現の特徴を抽出するとともに、細胞固有あるいは特異的機能を見出すためにサイトカイン刺激等を加えてリンパ組織 IL-33 発現細胞の機能を探索する。さらに誘導性の IL-33 遺伝子発現メカニズム、炎症性シグナルに対する核内 IL-33 機能についての探索を IL-33 GFP レポーターマウス由来の細胞を用いて、in vitro 実験にて検討を加える。

4 . 研究成果

IL-33 発現細胞や IL-33 の発現制御メカニズム同定はアレルギー疾患分子標的を呈示できる可能性が高い。過年度報告のように、Pichery らが IL-33 レポーターマウスで IL-33 の発現を報告した(J Immunol. 2012)。これを受けて本研究では方針変更を余儀なくされたが、共同研究である記憶 Th2 細胞における IL-33 機能解析の成果(Immunity 2015)があった。さらには GWAS から得られたもう一方の喘息重要因子である TSLP 阻害抗体についての無作為化比較試験 (NEJM. 2014) で有効性が証明され、医薬品としての IL-33 阻害抗体の開発の期待も高まっている。

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 8 件)

1. Gocho Y, Kiyokawa N, Ichikawa H, Nakabayashi K, Osumi T, Ishibashi T, Ueno H, Terada K, Oboki K, Sakamoto H, Shioda Y, Imai M, Noguchi Y, Arakawa Y, Kojima Y, Toyama D, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kato M, Fukushima T, Koh K, Manabe A, Ohara A. A novel recurrent EP300-ZNF384 gene fusion in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. doi: 10.1038/leu.2015.111. [Epub ahead of print] 【査読有】
2. Endo Y, Hirahara K, Iinuma T, Shinoda K, Tumes DJ, Asou HK, Matsugae N, Obata-Ninomiya K, Yamamoto H, Motohashi S, Oboki K, Nakae S, Saito H, Okamoto Y, Nakayama T. The Interleukin-33-p38 Kinase Axis Confers Memory T Helper 2 Cell Pathogenicity in the Airway. *Immunity*. 2015;42(2):294-308. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.016. 【査読有】
3. Kobayashi K, Mitsui K, Ichikawa H, Nakabayashi K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Iijima K, Ootsubo K, Oboki K, Okita H, Yasuda K, Sakamoto H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Ohara A. ATF7IP as a novel PDGFRB fusion partner in acute lymphoblastic leukaemia in children. *Br J Haematol*. 2014; 165(6):836-41. doi: 10.1111/bjh.12834. 【査読有】
4. E. Inage, K. Kasakura, T. Yashiro, R. Suzuki, Y. Baba, M. Hara, K. Oboki, K. Matsumoto, H. Saito, F. Niyonsaba, Y. Ohtsuka, H. Ogawa, K. Okumura, T. Shimizu, and C. Nishiyama. Critical roles for PU.1, GATA1 and GATA2 in the expression of human FcεRI on mast cells: PU.1 and GATA1 transactivate FCER1A, and GATA2 transactivates FCER1A and MS4A2. *J Immunol*. 2014;192(8):3936-46. doi: 10.4049/jimmunol.1302366. 【査読有】
5. Masuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, Shioda Y, Iijima K, Tomita O, Nakabayashi K,

Oboki K, Yasuda K, Sakamoto H, Ichikawa H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Mori T. Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript. Eur J Haematol. 2014;92(3):263-7. doi: 10.1111/ejh.12234.

【査読有】

6. Kamijo S, Takeda H, Tokura T, Suzuki M, Inui K, Hara M, Matsuda H, Matsuda A, Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S, Sudo K, Suto H, Ichikawa S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. IL-33-Mediated Innate Response and Adaptive Immune Cells Contribute to Maximum Responses of Protease Allergen-Induced Allergic Airway Inflammation. J Immunol. 2013;190(9):4489-99. doi:10.4049/jimmunol.1201212. 【査読有】
7. 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. 2012;189(7):3641-52. doi: 10.4049/jimmunol.1200461 【査読有】
8. Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. ST2 Requires Th2-, but Not Th17-, Type Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen- Sensitized Mice. Allergol Int. 2012;61(2):265-73. doi: 10.2332/allergolint.11-OA-0379. 【査読有】

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大保木 啓介 (OBOKI, Keisuke)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員
研究者番号：80415108