

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670161

研究課題名(和文)新規リンパ球機能制御による喘息治療へのアプローチ

研究課題名(英文) A new approach to the treatment of asthma by the regulation of a novel subset of lymphocytes

研究代表者

早川 裕子 (Hayakawa, Hiroko)

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80626929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： ナチュラルヘルパー細胞(NH細胞、別名：2型自然リンパ球、ILC2)は、インターロイキン-33(IL-33)刺激により活性化され、喘息の発症に関与することが示唆されている。IL-33とIL-33受容体の結合を阻害する分泌型ST2は、その特性から、NH細胞が関連するアレルギー反応を防ぐ作用があるものと考えられた。本研究では、単離したマウス肺NH細胞だけでなく、喘息モデルマウスの肺のNH細胞に対しても、IL-33の働きを制御してアレルギー反応を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Natural Helper (NH) cells, referred to as type 2 innate lymphoid cells, were recently discovered as a novel target of IL-33. NH cells produce Th2 cytokines in response to IL-33 and may contribute to asthma. Soluble ST2 (sST2) consists of extracellular domain of ST2L, interleukin (IL)-33 receptor, and directly binds to IL-33 as a decoy receptor. Here, we investigated the suppressive effect of sST2 on the IL-33 function. Pretreatment of sST2 reduced effectively IL-33-induced responses in lung NH cells. In asthma model mice, intranasal administration of sST2 attenuated airway inflammation. These results indicate that sST2 suppresses the IL-33-induced allergic reaction via lung NH cells in vitro and in vivo.

研究分野：生化学

キーワード：気管支喘息 IL-33 分泌型ST2

## 1. 研究開始当初の背景

インターロイキン-33 (IL-33) は、アレルギー亢進作用を持つサイトカインであり、IL-1 ファミリーに属する。新規リンパ球・ナチュラルヘルパー細胞 (NH 細胞、別名: 2 型自然リンパ球、ILC2) は、IL-33 刺激により活性化され、喘息の発症に関与することが示唆されている。申請者は、以前の研究において、IL-33 と IL-33 受容体 ST2L の結合を阻害する抑制因子・分泌型 ST2 を見出した (Hayakawa, H. et al., J. Biol. Chem. 282: 26369-26380, 2007)。その特性から、分泌型 ST2 には、NH 細胞に関連するアレルギー反応を防ぐ作用を有することが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は、マウスから単離した肺 NH 細胞および喘息モデルマウスを用いて、分泌型 ST2 のアレルギー反応抑制作用を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 分泌型 ST2 の発現と精製

分泌型 ST2 は、His タグおよび V5 タグを付加したリコンビナントタンパク質 ST2-V5 として HEK293T 細胞に発現させ、培養上清よりアフィニティーカラムを用いて精製した。また、ST2-V5 を 100°C で加熱処理することにより、不活化タンパク質 (In-ST2-V5) を調製した。

### (2) 肺 NH 細胞を用いた分泌型 ST2 のアレルギー反応抑制作用の検討

① IL-33 と IL-33 受容体 ST2L は、モル比 1:1 の割合にて結合することが報告されている (*Structure*, 17: 1398-1410, 2009)。そこで、マウス胸腺腫由来細胞 EL-4 で作製した ST2L 発現細胞を用いて、IL-33 の刺激を十分に抑制可能な ST2-V5 の添加量を検討した。IL-33 は、市販のリコンビナントタンパク質を用いた。抑制の効果は、IL-33 シグナル伝達経路における MAP キナーゼのリン酸化をウェスタンブロット法で検出することにより評価した。

② NH 細胞は、BALB/c マウスの肺からセルソーターを用いて単離した。NH 細胞は、細胞増殖を観察するための蛍光色素 (CFSE) で事前に標識した。CFSE 標識した肺 NH 細胞に ST2-V5 または In-ST2-V5 を添加し、その後、IL-33 を添加した。IL-33 刺激後の NH 細胞と培養上清を回収し、以下の項目について検討した。細胞の形態と増殖、細胞表面抗原の発現、およびサイトカインの発現を、細胞染色法、フローサイトメーター法、ELISA 法により調べた。

### (3) 喘息モデルマウスを用いた分泌型 ST2 のアレルギー反応抑制作用の検討

喘息マウスを用いた実験では、分泌型 ST2 を投与する治療的な実験を行った。喘息モデルは、BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) を腹腔内投与して感作後、点鼻により OVA を曝露して作製した。ST2-V5 または PBS (対照群) の投与は、OVA 点鼻投与の 30 分前に点鼻により行った。OVA 点鼻投与から 24 時間後に、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、血清、肺を採取し、炎症性細胞の細胞数、サイトカインの発現、肺 NH 細胞における細胞表面抗原の発現などを、ELISA 法、フローサイトメーター法、組織染色法により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 分泌型 ST2 の発現と精製

リコンビナントタンパク質として発現精製した ST2-V5 について、SDS-PAGE によりタンパク質を展開した後、ゲルを銀染色し、精製度を確認した (図 1)。精製した ST2-V5 は、糖鎖が付加され、55-65 kDa のブロードなバンドとして検出された。N-glycosidase によって糖鎖切断した ST2-V5 は、アミノ酸配列から予測された 37 kDa のシャープなバンドとして検出された。

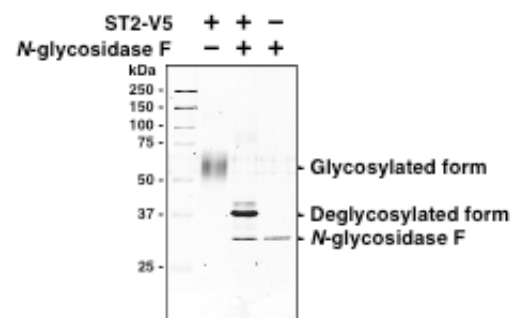


図 1. 銀染色法によるリコンビナント分泌型 ST2 の確認

### (2) 肺 NH 細胞を用いた分泌型 ST2 のアレルギー反応抑制作用の検討

① ST2L 発現細胞における MAP キナーゼのリン酸化は、IL-33 と ST2-V5 をモル比 1:5 の割合で添加することにより、完全に抑制された。この結果から、マウスから単離した肺 NH 細胞においても、IL-33 と ST2-V5 の添加は、モル比 1:5 の割合に決定した。

② ST2-V5 を IL-33 刺激前に添加した NH 細胞では、IL-33 単独刺激に比べて、細胞の巨大化と増殖が抑えられた (図 2)。また、細胞表面抗原 CD25、Sca-1、ST2L の発現増加も抑えられた (図 3)。さらに、培養上清中のサイトカイン IL-5 と IL-13 の産生低下も認められた (図 4)。一方、不活化した In-ST2-V5 には IL-33 刺激に対する抑制効果が認められ

なかった。

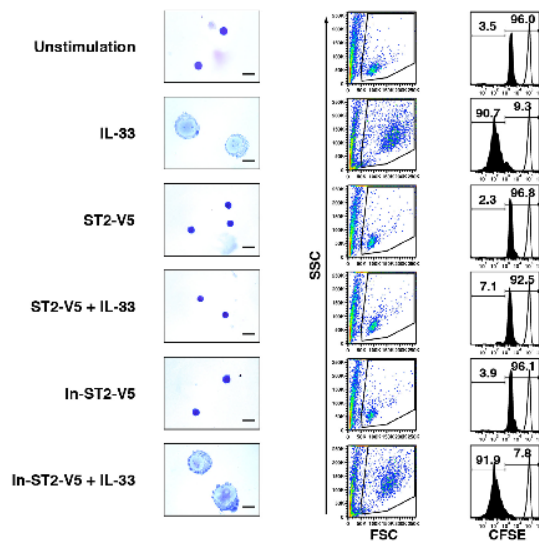


図 2. 顕微鏡による細胞形態の観察とフローサイトメトリーによる細胞増殖の確認

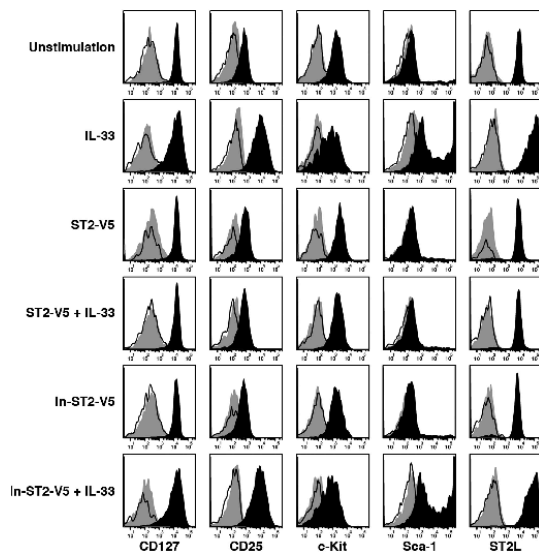


図 3. フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の発現の検出

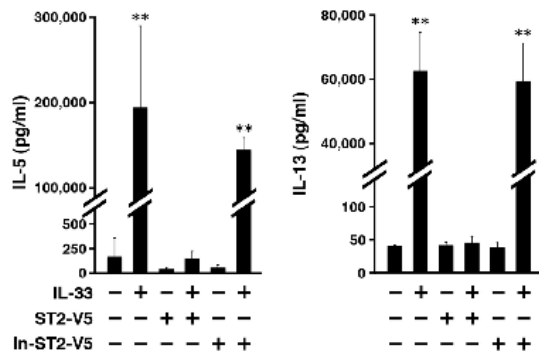


図 4. ELISA 法による培養上清中の IL-5 と IL-13 の検出

### (3) 喘息モデルマウスを用いた分泌型 ST2 のアレルギー反応抑制作用の検討

喘息モデルマウスでは、ST2-V5 の投与群と PBS の点鼻投与群を比較した。ST2-V5 投与群では、肺組織に浸潤した好酸球数が少なく、また気管支における粘液産生も抑えられていた。好酸球数の減少は、BALF においても認められた。また、BALF 中の IL-5 および IL-13 の濃度も低下していた。さらに、フローサイトメトリーにより、肺リンパ球画分から NH 細胞を検出し、細胞内サイトカインと細胞表面抗原の発現を調べたところ、ST2-V5 投与群の肺 NH 細胞では、IL-5 と IL-13 の発現増加、および CD25、Sca-1、ST2L の発現増加が抑制されていた。

以上の結果から、分泌型 ST2 は、マウスから単離した肺 NH 細胞だけでなく、喘息モデルマウスにおいても、IL-33 の働きを抑えて NH 細胞の活性化を抑制することが明らかになった。さらに、本研究の成果は、分泌型 ST2 を用いた喘息の新たな治療戦略へと展開できる可能性を示した。

### 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 1 件)

- ① Hayakawa, H., Hayakawa, M., and Tominaga, S.: Soluble ST2 suppresses the effect of interleukin-33 on lung type 2 innate lymphoid cells. *Biochem Biophys Rep*, **5**:401-407, 2016. (DOI 10.1016/j.bbrep.2016.02.002) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Hayakawa, M., Hayakawa, H., Nakae S., Tominaga S.: Role of interleukin-33 in acute inflammation. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), (演題番号 3P-0660, 同会プログラム p. 365)
- ② Hayakawa, H., Hayakawa, M., Tominaga S.: Suppression of airway inflammation by binding of soluble ST2 with interleukin-33. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), (演題番号 2P-0620, 同会プログラム p. 282)
- ③ Hayakawa, M., Hayakawa, H., Ohmori, T., Tominaga S.: Soluble ST2 attenuates skin inflammation in atopic dermatitis. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), (演題番号 3T 特-04, 3P-1128, 同会プログラム p. 219, p. 569)

- ④ **Hayakawa, H.**, Hayakawa, M., Tominaga S.: Effect of soluble ST2 on activation of type 2 innate lymphoid cells in a murine model of asthma. CYT02015, 30<sup>th</sup> Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, June 27-30, 2015, Scottish Exhibition and Conference Centre (Glasgow), (168/B37) Poster and oral presentations (June 27, 28, and 30).
- ⑤ **Hayakawa, H.**, Hayakawa, M., Tominaga S.: Soluble ST2 suppresses the effect of IL-33 on type 2 innate lymphoid cells. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), (演題番号 1P-0729, 同会プログラム p.68)
- ⑥ 早川盛禎, **早川裕子**, 富永眞一: Interleukin-33はTGF- $\beta$ /Smadシグナル伝達経路の活性化を制御する. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月15日~18日, 国立京都国際会館(京都府京都市), (演題番号 4P-286, 同会プログラム p.178)

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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.jichi.ac.jp/biochem/byotai/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 早川裕子 (HAYAKAWA, Hiroko)  
 自治医科大学・医学部・客員研究員  
 研究者番号: 80626929

(2) 研究分担者