

平成30年6月20日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870378

研究課題名(和文) 自然リンパ球を標的とした好酸球性食道炎の病態機序の解明

研究課題名(英文) Essential role of interleukin-33-induced innate lymphoid cells in development of eosinophilic esophagitis in mice

研究代表者

大嶋 直樹(Oshima, Naoki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10403461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性食道炎は消化器系のアレルギー疾患として知られており、食道粘膜に好酸球が多数浸潤し慢性炎症を起こす病態であるが、その発生機序には未だ不明な点も多い。本研究ではIL-33、自然リンパ球(ILC2)に着目し、EoEの病態解明を行った。外来抗原の刺激により食道上皮細胞からIL-33が産生され、さらにTh2細胞よりIL-13、IL-5などのTh2系サイトカインが誘導されることが明らかになった。加えて、IL-33依存性にILC2が誘導され、食道粘膜に好酸球の浸潤を来たことが示された。今回の研究によって、EoEの病態形成にIL-33、さらにはILC2が重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Eosinophilic esophagitis (EoE) is a chronic inflammatory disorder of the esophagus characterized by mucosal infiltration of eosinophils. Interleukin (IL)-33 is a member of the IL-1 cytokine family that is constitutively expressed in epithelial cells. Epithelial-derived IL-33 induces innate lymphoid cell group 2 (ILC2) activities in various organs, which subsequently activates Th2 cytokines and leads to development of eosinophil-related allergic diseases. However, little is known regarding the roles of IL-33 and ILC2 activity induced by it in the pathogenesis of EoE. In the present study, several experimental protocols were designed to clarify these issues. Our results clearly show that IL-33-induced ILC2 cell activity leads to infiltration of esophageal mucosa by eosinophils via production of Th2- and allergy-related cytokines, which may play an important role in EoE development.

研究分野：消化器内科学

キーワード：好酸球性食道炎 アレルギー IL-33 ILC2

1. 研究開始当初の背景

消化管に多種の好酸球が浸潤し炎症を起こし、粘膜障害、運動異常などが起こる病態を好酸球性消化管障害 (eosinophilic gastrointestinal disorders: EGID) と呼び、食道のみに病変が存在するものを好酸球性食道炎 (eosinophilic oesophagitis: EoE) と分類している。以前より欧米では発症率が高く、EoE 患者が増加しているが、本邦では未だその疾患概念そのものの認知も低く、その実態と病態についてはほとんど明らかになっていない。

これまでの解析から食物抗原などの何らかのアレルゲンが誘因となり、Th2 細胞や肥満細胞の活性化が生じ、IL-5 や IL-13、IL-15 などの Th2 系サイトカインが分泌され、粘膜上皮内への活性化好酸球浸潤が誘導されることが示唆されているが、その病態は不明な点が多い。

我々は本邦における EGID の多施設共同の前向き調査を行い、本邦においても急激に EoE が増加していることを報告してきた。さらに、EoE の全国疫学調査の登録症例における血中サイトカインの発現を測定した所、血中 IL-15 は健康成人と比較して疾患群で有意な上昇があり、末梢血好酸球数との間に相関を認め、また、EoE 患者の食道粘膜組織の mRNA のマイクロアレイ解析を行い、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、eotaxin-3、IL-5、IL-13、IL-15 などの Th2 系の免疫反応が関与していることを報告してきた (Digestion 2012, J. Gastroenterol 2012)。

以上の結果から、EoE の病態機序には炎症誘導性の Th2 系サイトカインが深く関与していることが推測される。

一方、近年、自然免疫系において獲得免疫系の helper T 細胞セットに対応したサイトカイン産生を示す自然リンパ球が次々と明らかになってきている。その中でも主に腸管膜の脂肪組織内に存在し、Group 2 innate lymphoid cell (ILC2) の一つである NH 細胞は、免疫担当細胞や上皮細胞から産生される IL-33 の刺激により、IL-5 や IL-13 などの Th2 系サイトカインを強く誘導し、寄生虫感染やアレルギー疾患の病態形成に重要な働きを担う自然リンパ球として注目を浴びている。

さらに、ILC2 において Th2 系サイトカインを誘導する IL-33 は IL-1 ファミリーに属するサイトカインであり、アレルギー性炎症における中心的な調節性サイトカインと考えられている。また、マウスを用いた解析から、過剰な IL-33 の作用は喘息やアトピー性皮膚炎の発症および病態の悪化に関わることが明らかになっており、一塩基多型を用いたゲノムワイド連鎖解析によって、ヒトにおいても喘息や花粉症などのアレルギー疾患の発症と IL-33 遺伝子の関連が示唆されている。

2. 研究の目的

EoE の病態形成における IL-33、ILC2 の関与を明確にする。

3. 研究の方法

(1) EoE モデルマウスにおける IL-33 の動態

野生型 BALB/c マウスにおける EoE モデルを作成し、食道粘膜局所における IL-33 の発現を確認した。具体的には卵白アルブミン (OVA) の腹腔内投与によって感作を行い、OVA を含んだ吸入での抗原刺激することによって作成した。同モデルにおいて IL-33 を含んだ Th2 系サイトカインの動態をフローサイトメトリー、Real-Time PCR で評価した。

(2) 食道上皮細胞における IL-33 の産生

ヒト食道扁平上皮細胞である Het1A を用いて、TNF α などの各種サイトカインで刺激し IL-33 の発現をフローサイトメトリー、Real-Time PCR で評価した。

(3) マウスへの IL-33 全身投与による消化管への影響

野生型 BALB/c マウスに対して recombinant IL-33 蛋白の腹腔内投与を行い、食道を含めた消化管、さらには全身への影響を解析した。続いて同マウスの食道粘膜におけるアレルギー関連の遺伝子発現を確認するために PCR アレイを行った。

(4) EoE モデルマウスにおける ILC2 発現

最後に EoE の病態形成における ILC2 の発現を確認するために、IL-33 全身投与マウスでの ILC2 の動態をフローサイトメトリーで確認した。

4. 研究成果

(1) OVA 抗原の経鼻投与によって、既報通り肺気管支周囲に著明な好酸球の浸潤を認めた。また、食道粘膜内にも好酸球浸潤が確認可能であり、IL-5、IL-13 等の Th2 系サイトカインの発現亢進を認めた。さらに、RT-PCR、フローサイトメトリーにて食道粘膜において IL-33 の発現が亢進していることを確認した。

(2) ヒト食道扁平上皮細胞である Het1A に対して TNF α などの刺激により、IL-33 発現の亢進を認めた。

(3) 野生型マウスに IL-33 蛋白を腹腔内投与することによって、著明な脾腫、末梢血における好酸球上昇などの全身における反応を認めた。さらに、食道粘膜局所に著明な好酸球の誘導を認めた (図 1)。また、フローサイ

トメトリーにおいて CD11b(+)Siglec-F(+)の好酸球が増加していることを認めた。加えて、Real-Time PCR 法において IL-5 等の Th2 系サイトカインの発現亢進を確認した。さらに、PCR アレイにて Ear11、Ccl11、Ccl5 などのアレルギー疾患の病態形成に重要な関連を示す遺伝子の増幅を認めた。

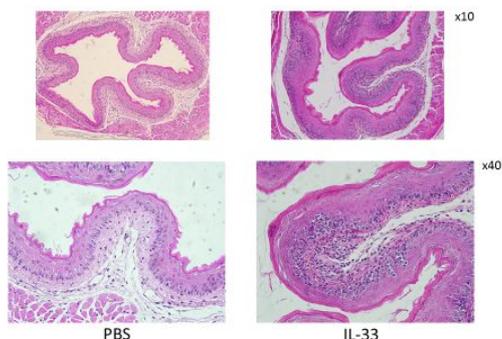


図1: IL-33投与により食道粘膜内に著明な好酸球浸潤を認める

(4)これまでの実験結果を基に野生型マウスに対して recombinant IL-33 蛋白の腹腔内投与を行い、実験を継続した。その結果、同モデルの食道粘膜局所において IL-33 のレセプターである ST2 の増加を認め、さらにフローサイトメトリーでの解析によって Lineage(-)ST2(+)CD25(+)CD127(+)の表現型を持つ細胞集団が誘導されることを確認した。これらはいわゆる Group2 innate lymphoid cell (ILC2)であり、NH細胞が IL33 依存性に食道粘膜に増加することを示唆する結果であった(図2)。

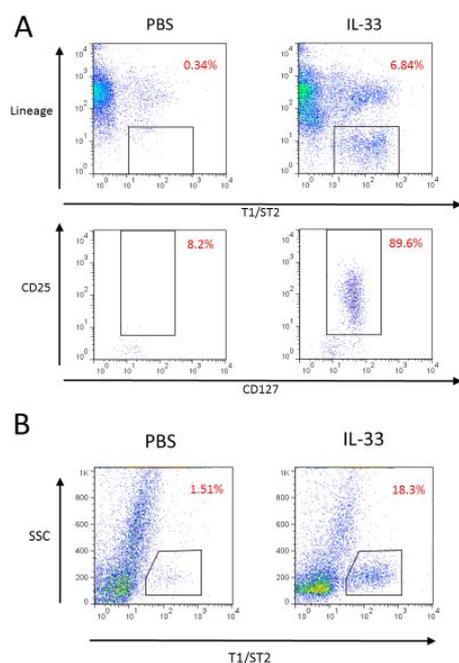


図2: IL-33依存性に食道粘膜内においてILC2、ST2の発現亢進を認める(A: ILC2、B: ST2)

(5)結果のまとめ

以上の結果より OVA などの外来抗原刺激によって食道上皮細胞から IL-33 が分泌され、さらに Th2 細胞より IL-13、IL-5 などの Th2 系サイトカインが誘導されることが明らかになった。加えて、IL-33 依存性に ILC2 が誘導され、食道粘膜に好酸球の浸潤を来たすことが示された。今回の研究によって、EoE の病態形成に IL-33、さらには ILC2 が深く関与してい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 10 件)

1. Epidermal differentiation complex protein involucrin is down-regulated in eosinophilic esophagitis. Oshima N, Ishihara S. (他 4 名、1 番目). *Esophagus*. 2017;14(3):171-177. (査読有)
DOI: 10.1007/s10388-016-0568-y
2. Esophageal triamcinolone acetamide-filling method: a novel procedure to prevent stenosis after extensive esophageal endoscopic submucosal dissection (with videos). Shibagaki K, Oshima N, Ishihara S. (他 10 名、3 番目). *Gastrointest Endosc*. 2017 Aug 24. (査読有)
DOI: 10.1016/j.gie.2017.08.016
3. Mucosal breaks show same circumferential distribution in majority of patients with recurrent reflux esophagitis. Fukuda N, Oshima N. (他 10 名、9 番目). *Endosc Int Open*. 2017 Mar;5(3):E2. (査読有)
DOI: 10.1055/s-0043-102401
4. Similarities and differences among eosinophilic esophagitis, proton-pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia, and reflux esophagitis: comparisons of clinical, endoscopic, and histopathological findings in Japanese patients. Jiao D, Oshima N, Ishihara S. (他 10 名、6 番). *J Gastroenterol*. 2017 Feb;52(2):203-210. (査読有)
DOI: 10.1007/s00535-016-1213-1
5. Specific locations of linear furrows in patients with esophageal eosinophilia. Okimoto E, Oshima N, Ishihara S. (他 10 名、9 番目). *Dig Endosc*. 2017 Jan;29(1):49-56. (査読有)
DOI: 10.1111/den.12706
6. Towards the development of a non-biopic diagnostic technique for eosinophilic esophagitis using Raman

- spectroscopy. Noothalapatia H, Oshima N, Kinoshita Y. (他 4 名、3 番目). *Vibrational Spectroscopy*. 2016; 85:7-10. (査読有)
7. Recent Progress in the Research of Eosinophilic Esophagitis and Gastroenteritis. Kinoshita Y, Oshima N, Ishihara S. (他 4 名、3 番目). *Digestion*. 2016; 93(1):7-12. (査読有) DOI: 10.1159/000441668
 8. Systematic review: Eosinophilic esophagitis in Asian countries. Kinoshita Y, Oshima N, Ishihara S. (他 1 名、3 番目). *World J Gastroenterol*. 2015; 21(27):8433-40. (査読有) DOI: 10.3748/wjg.v21.i27.8433
 9. Clinical features of eosinophilic esophagitis: differences between Asian and Western populations. Ishimura N, Oshima N, Ishihara S. (他 7 名、8 番目). *J Gastroenterol Hepatol*. 2015; 30 1:71-7. (査読有) DOI: 10.1111/jgh.12746
 10. Prevalence of gastroesophageal reflux disease in children, adults, and elderly in the same community. Okimoto E, Oshima N, Ishihara S. (他 11 名、9 番目). *J Gastroenterol Hepatol*. 2015; 30(7):1140-6. (査読有) DOI: 10.1111/jgh.12899

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 大嶋直樹、石村典久、木下芳一：IL-33 を標的とした好酸球性食道炎の病態機序の解明、第 100 回日本消化器病学会総会、2014.04.25、東京
2. 大嶋直樹、石原俊治、木下芳一：好酸球性食道炎の病態形成に IL-33 は関与するのか?、第 51 回日本消化器免疫学会総会、2014.07.11、京都
3. 園山浩紀、大嶋直樹、石原俊治、山下詔嗣、多田育賢、岡明彦、福庭暢彦、森山一郎、結城崇史、川島耕作、木下芳一：腸管炎症における IL-33 の役割、第 11 回日本消化管学会総会学術集会、2015.02.13、東京
4. 大嶋直樹、石村典久、木下芳一：ワークショップ：内視鏡を用いた分子生物学的手法による病態解明 好酸球を可視化する～ラマン分光法を用いた好酸球性食道炎の診断～、第 89 回日本消化器内視鏡学会総会、2015.05.29、名古屋
5. 三島義之、石原俊治、園山浩紀、片岡祐俊、山下詔嗣、大嶋直樹、森山一郎、川島耕作、木下芳一：潰瘍性大腸炎において IL-33 が腸炎増悪をきたすメカニズムの検討、第 54 回日本消化器免疫学会総会、2017.10.28、東京
6. Naoki Oshima, Shunji Ishihara,

Kousaku Kawashima, Hiroki Sonoyama, Noritsugu Yamashita, Nobuhiko Fukuba, Yoshiyuki Mishima, Norihisa Ishimura, Ichiro Moriyama, Yoshikazu Kinoshita : Essential role of interleukin-33-induced innate lymphoid cells in development of eosinophilic esophagitis in mice, UEG Week 2017, Barcelona, Spain, 2017.11.01.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 直樹 (Naoki Oshima)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10403461

(2) 研究協力者

木下 芳一 (Yoshikazu Kinoshita)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30243306