

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04828

研究課題名(和文)「気道上皮 免疫バリア」という観点からの喘息の病態解明

研究課題名(英文) Analyses of epithelial-immune barrier functions in the pathogenesis of asthma

研究代表者

中島 裕史 (Nakajima, Hiroshi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではIL-22がアレルギー性気道炎症を抑制する分子機構を解析した。肺においてIL-22により発現誘導される遺伝子をRNAシーケンス法により網羅的に探索したところ、抗菌ペプチドとして知られるReg3gが含まれていた。Reg3gの中和により好酸球とCD4陽性T細胞のBALF中への浸潤が有意に増強された。リコンビナントReg3gの投与は、好酸球浸潤、TSLPとIL-33の産生、ILC2の肺集積を抑制した。以上より、IL-22は気道上皮細胞によるReg3g産生を誘導し、IL-33とTSLPの産生・放出、及び肺ILC2の集積を抑制することにより、アレルギー性気道炎症を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of IL-22 in regulating allergic airway inflammation. We show that allergic airway inflammation and Th2 and Th17 cytokine production upon intratracheal administration of house dust mite extract (HDM) were exacerbated in IL-22-deficient mice. We also found that IL-22 induces Reg3g production from lung epithelial cells through STAT3 activation and that neutralization of Reg3g significantly exacerbates HDM-induced eosinophilic airway inflammation and Th2 cytokine induction. Moreover, EXTL3, a functional Reg3g binding protein, is expressed in lung epithelial cells, and intratracheal administration of recombinant Reg3g suppresses HDM-induced TSLP and IL-33 expression and accumulation of type 2 innate lymphoid cells in the lung. Taken together, these results suggest that IL-22 induces Reg3g production from lung epithelial cells and inhibits the development of HDM-induced allergic airway inflammation possibly by inhibiting cytokine production from lung epithelial cells.

研究分野：アレルギー

キーワード：喘息 IL-22 Reg3g 気道上皮

1. 研究開始当初の背景

近年、気道上皮細胞が物理的・化学的バリアとして生体防御に機能するだけでなく、外界からの様々な刺激に対してサイトカイン・ケモカインなどを産生し、自然免疫および獲得免疫の始動に重要な役割を果たすことが明らかとなった。Th2 型免疫応答の誘導においても、アレルゲンや感染性微生物の刺激により気道上皮細胞から産生・放出される TSLP、IL-25、IL-33 等のサイトカインが重要な役割を果たしていることが喘息モデルマウスの解析より明らかとなっている。TSLP、IL-25、IL-33 による Th2 型免疫応答の誘導機構の解明も進み、1) TSLP は主に樹状細胞に作用して Th2 細胞の分化を誘導すること、2) IL-25 と IL-33 は、Th2 細胞、NKT 細胞などの獲得免疫系の細胞に加え、2 型自然リンパ球 (ILC2) に作用し、IL-5、IL-13 などの産生を誘導することが明らかとなった。喘息における TSLP の重要性は臨床試験においても証明されている (Corren et al., N Engl J Med 2017)。一方、本研究者は、アレルギー性気道炎症の局所において CD4 陽性 T 細胞が気道上皮細胞によるサイトカイン産生を制御していることを明らかにした (Takahashi et al. J Allergy Clin Immunol 2011)。さらに近年、樹状細胞が気道上皮細胞のバリア機能の維持に重要な役割を果たしていることが示されている (Lambrecht et al., J Allergy Clin Immunol 2014)。すなわち、気道上皮細胞は外界からの刺激に応答し免疫系を始動する一方で、免疫細胞によりその機能が制御されており、その相互作用がアレルギー性気道炎症の病態に関与していることが推測されるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、本研究者が確立した気道上皮細胞の高純度単離法と RNA シークエンス、及び気道上皮特異的な遺伝子改変マウスを用いて、アレルゲン刺激に際し気道上皮細胞が発現する遺伝子を網羅的に解析し、その機能を解明するとともに、リンパ球、樹状細胞等の免疫細胞が気道上皮細胞の機能、特に気道上皮-免疫バリアを維持・障害する分子機構を解明することにより、喘息における気道上皮-免疫バリアの相互作用を総合的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

研究計画1.アレルゲン刺激により気道上皮細胞で発現変化する遺伝子の網羅的探索とその機能解析

(1) 本研究グループが確立したマウス気道上皮細胞の高純度単離法を用いてアレルゲン (house dust mite(HDM))刺激前、及び刺激8時間後に気道上皮細胞を採取し、RNAシーケンスにより刺激後に発現が変化する遺伝子を網羅的に解析する。

(2) HDM刺激で発現変化した遺伝子の機能を気道上皮細胞株、及び単離したマウス気道上皮細胞のAir-Liquid Interface (ALI)培養を用いた過剰発現実験、及びノックダウン実験により解析する。

(3)上記研究によりアレルギー性気道炎症における機能が想定される分子に関しては、同遺伝子の遺伝子欠損マウスを入手或は作成し、HDM誘導性喘息モデルの実験系を用いて、①アレルギー性気道炎症の強度とその性状、②樹状細胞、CD4陽性T細胞、2型自然リンパ球(ILC2)をはじめとする免疫細胞の機能と動態、③気道過敏性の誘導、における役割を解析する。

(4) 気道上皮細胞で発現変化する遺伝子のうち、特に①サイトカイン・ケモカイン等の炎症の惹起に関与する分子、②NF- κ B等のシグナル伝達に関与する分子に注目し、研究を進める。

研究計画2.リンパ球との相互作用により気道上皮細胞で発現変化する遺伝子の網羅的探索とその機能解析

以下の計画2(1)~計画2(3)にて、CD4陽性T細胞、及びILC2との相互作用により気道上皮細胞で発現変化する遺伝子を探索する。

計画2 (1)HDM誘導性喘息を誘導したマウスの肺からCD4陽性T細胞を単離する。コントロールとして、未処置の野生型マウスの脾臓から単離したCD4陽性T細胞を用いる。

(2A) 未処置の野生型マウスに上記CD4陽性T細胞を細胞移入し、その後、気道上皮細胞を単離する。RNAシーケンスにより遺伝子発現を網羅的に解析し、HDM誘導性喘息のCD4陽性T細胞の移入により気道上皮細胞で発現変化する遺伝子を抽出する。

(2B) 未処置の野生型マウスより気道上皮細胞を単離し、上記CD4陽性T細胞と短時間共培養する。上皮細胞を純化し、RNAシーケ

ンスにより遺伝子発現を網羅的に解析し、発現変化したものを抽出する。

(3) (2)で発現変動した遺伝子に関しては、研究計画1と同様にALI培養を用いた解析、及び気道上皮細胞特異的に候補遺伝子を欠損するマウスを用いた解析により、その機能を解析する。

4. 研究成果

(1) 研究計画1の研究成果

① HDM 刺激を受けた気道上皮細胞で発現が4倍以上増強する遺伝子を複数同定した。その中のいくつかの遺伝子については、qPCR法にて発現変化を確認しており、さらにその中で11 β -hydroxy-steroid dehydrogenase type 2(11 β -HSD2)に関しては、気道上皮細胞を用いた研究に着手している。

② NF- κ B 関連分子である I κ BNS が気道上皮細胞に発現していることを見出し、その機能を解析した。その結果、I κ BNS は杯細胞の分化に重要な役割を果たしていることを見出した(Yokota et al., Allergy 2017)。

(2) 研究計画2の研究成果

CD4陽性細胞により産生されるIL-22が気道上皮細胞に作用し、気道炎症を抑制する機構を明らかにした。

① HDM誘導性喘息モデルにおけるIL-22の役割の解析

IL-22は2000年にT細胞由来新規サイトカインとして同定され、IL-10と高い相同性を持つことからIL-10-related T cell inducible factor(IL-TIF)と命名された。IL-22受容体はIL-22R1とIL-10R2から構成される。IL-22R1は皮膚、腸管、肺などの上皮細胞、肝臓、膵臓などに発現しているが、血球系細胞には発現していない。そのためIL-22は血球系細胞への直接的作用は持たず、皮膚、肺、腸管などの上皮細胞や肝細胞などに作用し組織の炎症制御や恒常性の維持に関与すると考えられている。ヒトにおいてもIL-22は乾癬、アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、肺炎、気管支喘息など、皮膚、腸管、肺における慢性炎症性疾患への関与が示唆されている。

興味深いことに、IL-22は炎症促進作用と抗炎症作用を共に持ち、臓器によりその作用を

異にする。すなわち皮膚では乾癬やアトピー性皮膚炎の発症に促進的に作用するが、肺や腸管においては炎症に対して抑制的に作用する。近年さらに多岐にわたるIL-22の作用が報告され、IL-22はそれぞれの臓器においても正と負の両者の作用を持ち合わせることが示された。アレルギー性気道炎症におけるIL-22の役割に関しても先行研究はあるが、相反する結果が示されており、明確な結論は得られていない。

そこで本研究では、喘息におけるIL-22の役割、及びその作用メカニズムを、チリダニ(HDM)誘導性アレルギー性気道炎症の実験系を用いて解析した。まず、HDM誘導性アレルギー性気道炎症を惹起した肺におけるIL-22産生細胞を解析した。その結果、肺におけるIL-22産生細胞の多くがCD3陽性、 α BTCR陽性、CD4陽性細胞であった(図1)。少数ではあるがCD8陽性T細胞、 γ δ T細胞もIL-22を産生した(図1)。一方、Lineage陰性Thy1.2陽性のILCによるIL-22産生は検出されなかった。IL-22産生CD4T細胞はIFN- γ 、IL-5、IL-13、IL-17Aを産生しておらず(図1)、T-bet、GATA-3、ROR γ tのいずれも陰性であり、既存のTh1、Th2、Th17細胞とは異なるサブセットと考えられた。

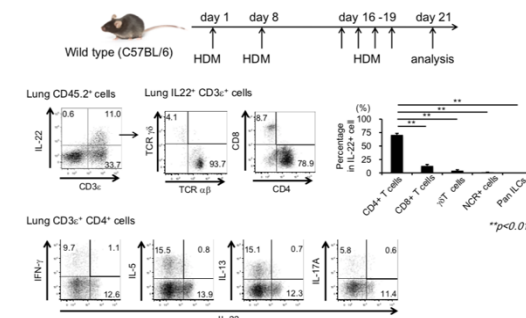


図1. IL-22 is mainly produced by CD4⁺ T cells in the lung

次にHDM誘導性アレルギー性気道炎症におけるIL-22の役割をIL-22欠損マウスを用いて解析した。その結果、IL-22欠損マウスでは野生型マウスに比べ気管支肺胞洗浄液中(BALF)の好酸球、好中球、CD4陽性T細胞の絶対数が増加していた(図2)。

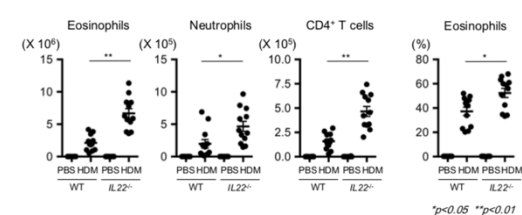


図2 HDM-induced allergic airway inflammation is exacerbated in IL22^{-/-} mice

IL-22 欠損マウスでは野生型マウスに比べ肺及び所属リンパ節での IL-5, IL-13, IL-17 の産生亢進も観察された。IL-22 欠損マウスは野生型マウスに比べ、気管支・血管周囲の炎症細胞浸潤の増強、杯細胞過形成の増強が認められた(図 3)。

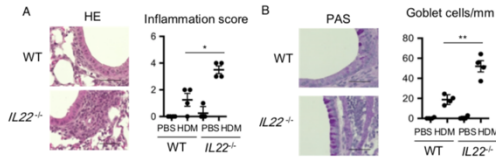


図3. HDM-induced allergic airway inflammation is exacerbated in *IL22*^{-/-} mice

メサコリンに対する気道過敏性も IL-22 欠損マウスで増悪していた。これらの結果から IL-22 は HDM 誘導性アレルギー性気道炎症に対して抑制的に作用していることが明らかとなった。

② IL-22 によるアレルギー性気道炎症の抑制機構の解析

IL-22 によるアレルギー性気道炎症の抑制機構を明らかにするために、IL-22 の気道投与により肺で発現誘導される遺伝子を RNA sequence 法により網羅的に解析した。IL-22 により有意に発現誘導される遺伝子として 18 遺伝子が同定され、その中に抗菌ペプチドとしてしられる *Reg3γ* が含まれていた(図 4)。

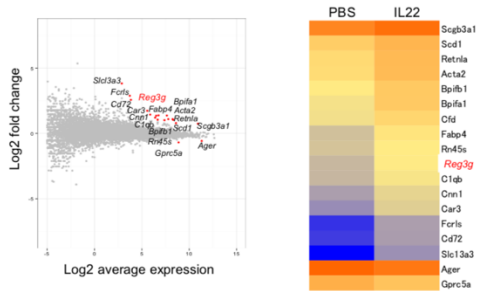


図4. IL-22 induces *Reg3γ* expression in the lung

野生型マウスおよび IL-22 欠損マウスに HDM 誘導性喘息を惹起し、肺における遺伝子発現を網羅的に解析したところ、IL-22 欠損マウスにおいて有意に発現が低下する遺伝子として 13 遺伝子が同定され、その中でも *Reg3γ* が含まれていた(図 5)。

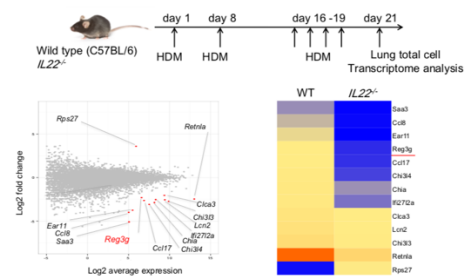


図5. *Reg3γ* expression in the lung is reduced in *IL-22*^{-/-} mice

近年、*Reg* タンパクは抗菌ペプチドとして機能するだけでなく、炎症の調節因子として働くことが示されているため、アレルギー性気道炎症における *Reg3* ファミリーの役割の解明を目指した。まず、コントロールマウス、および HDM 誘導性アレルギー性気道炎症を惹起したマウスの肺から気道上皮細胞を FACS により単離し、*Reg3* ファミリー分子の発現を qPCR 法により検討した。その結果、*Reg3* ファミリーの中では *Reg3γ* が最も高い発現レベルを示し、さらにアレルギー性気道炎症の誘導によりその発現レベルが上昇した。免疫染色により *Reg3γ* 蛋白の発現を検討したところ *Reg3γ* は気道上皮細胞に特異的に発現し、IL-22 欠損マウスではその発現が减弱していた(図 6A)。BALF の *Reg3γ* 濃度を ELISA にて測定したところ、免疫染色の結果に一致し、HDM 投与により増加し、IL-22 欠損マウスではそのレベルが减弱していた(図 6B)。IL-22 は気道上皮細胞において STAT3 を活性化することが知られていることから、*Reg3γ* 発現における STAT3 の働きを気道上皮細胞特異的 STAT3 欠損マウスを用いて解析したところ、*Reg3γ* の発現誘導は気道上皮細胞特異的 STAT3 欠損マウスでは减弱していた(図 6C)。以上の結果より、HDM 誘導性アレルギー性気道炎症において、*Reg3γ* は IL-22-STAT3 経路を介して気道上皮に発現誘導されることが示唆された。

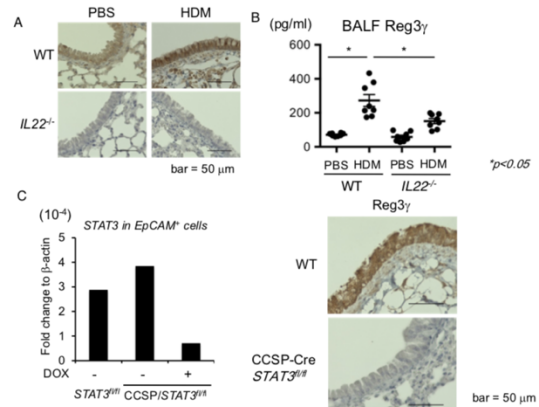


図6. *Reg3γ* expression is regulated by IL-22-STAT3 pathways

次に Reg3 γ のアレルギー性気道炎症における役割を明らかにするため、抗 Reg3 γ 抗体を投与し、Reg3 γ の機能を中和した際の影響を検討した。その結果、抗 Reg3 γ 抗体投与群ではコントロール抗体投与群に比べ BALF 中の好酸球数と CD4 陽性 T 細胞数が上昇した(図 7A)。抗 Reg3 γ 抗体投与群では杯細胞過形成の亢進(図 7B)、メサコリンに対する気道過敏性の亢進、IL-5、IL-13 の産生亢進も認められた(図 7C)。一方、抗 Reg3 γ 抗体の投与は IL-22 産生には影響しなかった。

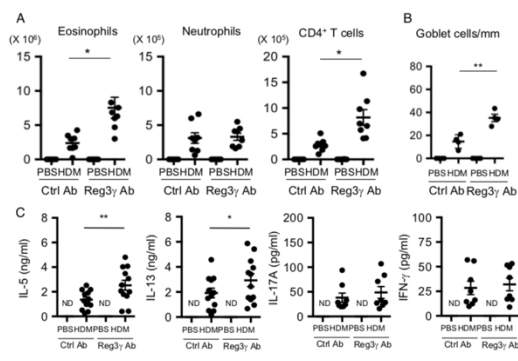


図7 HDM-induced allergic airway inflammation is enhanced by the neutralization of Reg3 γ

さらにリコンビナント Reg3 γ 経気道投与の HDM 誘発性アレルギー性気道炎症に対する効果を検討したところ、リコンビナント Reg3 γ は野生型マウスのみならず、IL-22 欠損マウスにおいても好酸球性炎症を有意に抑制した(図 8)。以上の結果より CD4 陽性 T 細胞より産生された IL-22 は気道上皮に作用し、STAT3 を介して Reg3 γ 産生を誘導し、産生された Reg3 γ は好酸球性炎症に対して抑制的に作用することが明らかとなった。

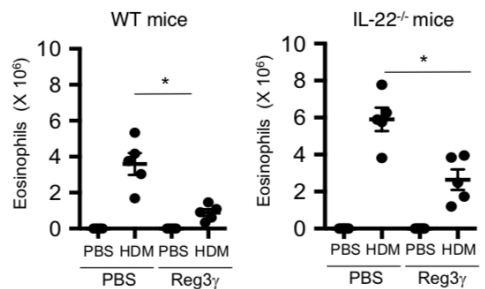


図8 HDM-induced eosinophil recruitment is suppressed by recombinant Reg3 γ

③ Reg3 γ によるアレルギー性気道炎症抑制機構の解析

Reg3 γ が好酸球性炎症を抑制する分子機構を明らかにするため、Reg3 ファミリー分子の受容体として機能することが示されている EXTL3 の肺における発現を解析した。気道上皮細胞、および肺に存在する各血球系細胞に

おける EXTL3 の発現を qPCR 法で確認したところ、EXTL3 は上皮細胞に発現し、樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞等の血球系細胞には発現しないことが明らかとなった。さらに上皮での EXTL3 発現は HDM 投与で増強した。以上より気道上皮細胞が Reg3 γ の標的と考えられるため、次にリコンビナント Reg3 γ 投与が気道上皮サイトカインの産生に与える影響を検討した。その結果、Reg3 γ は HDM 投与による TSLP および IL-33 の産生を有意に抑制した(図 9A)。これに一致し、Reg3 γ 投与群ではコントロール群に比較して肺内 ILC2 数が低下した(図 9B)。

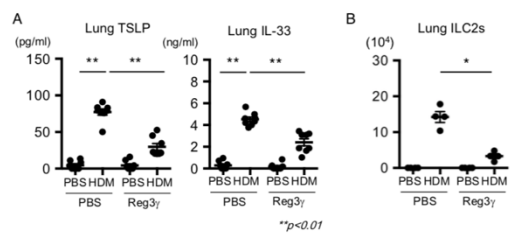


図9 Reg3 γ inhibits HDM-induced TSLP and IL-33 expression in the lung

以上の結果より、CD4 細胞が産生する IL-22 は気道上皮細胞に Reg3 γ の産生を誘導し、Reg3 γ が気道上皮に作用して上皮細胞サイトカイン-ILC2 経路を抑制することにより、負のフィードバックをかけていることが示唆された。

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. Matsuki A, Takatori H, Makita S, Yokota M, Tamachi T, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Nakajima H. T-bet inhibits innate lymphoid cell-mediated eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-9 production. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(4): 1355-1367.e6. (査読有り)
2. Yokota M, Tamachi T, Yokoyama Y, Maezawa Y, Takatori H, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Takeda K, Nakajima H. IκBNS induces Muc5ac expression in epithelial cells and causes airway hyper-responsiveness in murine asthma models. *Allergy.* 2017;72(7): 1043-1053. (査読有り)
3. Ito T, Hirose K, Saku A, Kono K, Takatori H, Tamachi T, Goto Y, Renauld JC, Kiyono H, Nakajima H. IL-22 induces Reg3 γ and inhibits allergic inflammation in house dust

mite-induced asthma models. J Exp Med. 2017;214(10): 3037-3050. (査読有り)

4. Hirose K, Ito T, Nakajima H. Role of Dectin-1 in allergic airway inflammation. Crit Rev Immunol. 2017;37(1):15-21. (査読有り)

5. Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Nakajima H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. Immunol Rev. 2017;278(1): 145-161. (査読有り)

6. Meguro K, Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Fukuta T, Yokota M, Maezawa Y, Suto A, Nakajima H. SOCS3 expressed in M2 macrophages attenuates contact hypersensitivity by suppressing MMP12 production. J Invest Dermatol. 2016;136(3): 649-57. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1. Tomohiro Tamachi, Yusuke Yokoyama, Arifumi Iwata, Yuko Maezawa, Akira Suto, Kotaro Suzuki, Koichi Hirose, Hiroaki Honda, Hiroshi Nakajima (2017) A20 (Tnfaip3) expressed in T cells suppresses Th2 cell-mediated allergic airway inflammation in mice. 第 46 回日本免疫学会学術集会

2. SAKU Aiko, HIROSE Koichi, ITO Takashi, SATO Takashi, GOTO Yoshiyuki, KIYONO Hiroshi, NAKAJIMA Hiroshi (2017) Lung epithelial fucosylation promotes the development of house dust mite (HDM)-induced allergic airway inflammation. 第 46 回日本免疫学会学術集会

3. 横山裕亮、玉地智弘、岩田有史、前沢裕子、目黒和行、横田雅也、高取宏昌、須藤明、鈴木浩太郎、廣瀬晃一、中島裕史 (2017) CD4 陽性 T 細胞に発現する A20 は Th2 型アレルギー性気道炎症を抑制する 第 66 回日本アレルギー学会学術大会

4. 松木彩子、高取宏昌、牧田荘平、玉地智宏、廣瀬晃一、中島裕史 (2016) T-bet は ILC2 による IL-9 産生を抑制し、IL-33 誘導性気道炎症を制御する 第 65 回日本アレルギー学会総会・学術集会

5. 玉地智宏、横田雅也、横山裕亮、前沢裕子、須藤明、鈴木浩太郎、廣瀬晃一、中島裕史 (2016) 気道上皮細胞に発現する IkBNS

のアレルギー性気道炎症における役割
第 65 回日本アレルギー学会総会・学術集会

6. ITO Takashi, HIROSE Koichi, GOTO Yoshiyuki, KIYONO Hiroshi, NAKAJIMA Hiroshi (2016) IL-22 inhibits house dust mite (HDM)-induced allergic airway inflammation through Reg3 γ induction. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 裕史 (NAKAJIMA, Hiroshi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：00322024

(2) 研究分担者

玉地 智宏 (TAMACHI, Tomohiro)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20456015

須藤 明 (SUTO, Akira)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50447306

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

廣瀬 晃一 (HIROSE, Koichi)

伊藤 崇 (ITO, Takashi)