

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10172

研究課題名(和文)皮膚バリア機能異常におけるIL-33の役割

研究課題名(英文)The role of IL-33 in the dysfunction of skin barrier

研究代表者

小宮根 真弓 (Komine, Mayumi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00282632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：インボルクリンプロモーター下にIL-33を発現させることで、IL-33を有棘層に発現したトランスジェニックマウスの作成を試みた。トランスジェニックマウスは発育が悪く4週目で死亡するため、3週目で臓器を回収し、組織学的、免疫組織学的に検討、あるいはRNAを抽出してDNAマイクロアレイを施行した。トランスジェニックマウスの大部分の皮膚は明らかな異常を示さなかったが、手足には強い炎症を生じ、手足は全体に腫脹していた。組織学的には、関節部に特に強い好中球やリンパ球の浸潤を認めた。皮膚、肺、リンパ節、脾臓を摘出して、それぞれ野生型との比較においてDNAマイクロアレイを施行した。現在結果を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-33はTh2タイプのサイトカインとして広く認識されているが、それ以外の働きについては不明な点が多い。IL-33は炎症性皮膚疾患では有棘層に強く発現するため、有棘層に発現するIL-33の役割を解明することにより、皮膚疾患の病態解明につながる。今回の結果は、有棘層に発現するIL-33が、外力の影響を受けやすい手足に非常に強い炎症を惹起することを示しており、乾癬などの炎症性皮膚疾患における有棘層ケラチノサイトのIL-33発現が、乾癬の病態に関与している可能性が示唆された。この結果は、炎症性皮膚疾患の治療開発において新たなステップとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Transgenic mice expressing IL-33 in the suprabasal layer of epidermal keratinocytes were generated, by utilizing involucrin promoter. Transgenic mice grew slower and small, and died in 4th week. Skin, lung, lymph node and spleen was harvested in 3rd week, and histologically, immunohistochemically studied. RNA was extracted from each sample, which was subjected to DNA microarray. IL-33Tg mice showed very strong inflammation in hands and feet, with extensive inflammatory cells in the joints. The results of microarray is now being analyzed.

研究分野：皮膚科学

キーワード：IL-33 有棘層 トランスジェニックマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IL-33 は、上皮細胞や、血管内皮細胞などに発現し、さまざまな刺激、特に危機的状況での刺激において細胞外へ放出されて、主に **Th2** タイプのサイトカインとして作用することがよく知られている。その生理的作用のため、**HMGB1** とともに **Alarmin** の一つとされている。**Th2** タイプのサイトカインとして、**T** ヘルパー 2 リンパ球やグループ 2 **Innate lymphoid cell** を刺激して、**IL-4**、**IL-5**、**IL-13** といった **Th2** タイプのサイトカイン産生を誘導し、肥満細胞に作用して、脱顆粒を誘導するなどの働きがある。それ以外にも、制御性 **T** 細胞を誘導する働きや、マクロファージに作用して **M2** マクロファージへの分化を誘導する働きが報告されている。さらに、核内因子として、**NFκB** の活性化を抑制して炎症を抑制することが報告されている。

乾癬やアトピー性皮膚炎では、炎症部位に表皮の肥厚を認めるが、肥厚した表皮の核内には **IL-33** の発現を認める。アトピー性皮膚炎のモデルとして、**IL-33** を表皮基底層に発現したマウスが報告されているが、肥厚した表皮の有棘層細胞の核内に発現する **IL-33** がどのような働きをしているのかは不明である。

2. 研究の目的

この研究では、有棘層に発現する **IL-33** が皮膚バリア機能に影響を与えている可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) トランスジェニックマウスの作成

トランスジェニックマウス作成は、ユニテック(株)に依頼した。インボルクリンプロモーターは、**Fiona Watt** 先生 (**Kings College, London**) より譲り受けたものを使用した。インボルクリンプロモーター下にマウス **IL-33** を挿入、クローニングして発現ベクターを得た。

まず、**Balb/c** マウスでの作成を試みたが、妊娠が確認されなかったため、**BL6** マウスにての作成に変更した。**BL6** マウスでは、**3** 頭の仔マウスが得られたが、すべて **4~6** 週までに死亡した。再度 **BL6** マウスにて作成を試み、**3** 頭の仔マウスを死亡する前の **3** 週で回収し、皮膚、リンパ節、脾臓、肺臓を摘出した。

それぞれのサンプルは、組織学的検討のためにホルマリン固定、および **RNA** 抽出のために **RNA Later** にて保存した。

2) ヘマトキシリン&エオジン染色

ホルマリン固定後、パラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリンとエオジンにて染色した。

3) 免疫組織学的検討

ホルマリン固定、パラフィン包埋サンプルを薄切し、抗 **IL-33** 抗体にて染色、**IL-33** の局在を確認した。

4) **RNA** の抽出

各々のサンプルをホモジェナイザーにて粉碎懸濁し、**Quiagen Total RNA tissue** キット

を用いて **Total RNA** を組織から抽出した。

5) DNA マイクロアレイ

Total RNA を **TAKARA** 遺伝子発現解析サービスに送付し、**Clariom S array** にて **DNA** マイクロアレイを施行した。

4. 研究成果

1) **IL-33** を有棘層に発現するトランスジェニックマウス

IL-33 トランスジェニックマウスを **BL6** マウスにて作成したが、早期に死亡してしまうため、死亡する前の **3** 週の個体においてしかサンプルが回収できなかった。個体が小さく体力もないため、皮膚バリアについて予定していた検討ができなかった。

3 週の時点で得られた **IL-33** トランスジェニックマウスは、野生型に比べて明らかに体重が軽く体の小さな個体であった。また、肉眼的に、手足に著明な発赤と腫脹を認めた。

2) 組織学的検討

背部皮膚、耳介皮膚および手足のサンプルより、ヘマトキシリン&エオジン染色を行った。

背部および耳介の皮膚においては、野生型と **IL-33** トランスジェニックマウスにて大きな差異は認められなかった。

手足については、**IL-33** トランスジェニックマウスにおいて、真皮及び皮下に著明な細胞浸潤を認めた。浸潤している細胞は、核が分葉していることから主に好中球と考えられた。これらの細胞は、骨髄内、関節内および関節周囲の皮下に膿瘍を形成していた。表皮および真皮浅層にも炎症細胞浸潤はわずかに認められたが、皮下の著明な炎症に比べるとほんの僅かであった。

3) **IL-33** の局在

得られた組織標本において、抗 **IL-33** 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、表皮の顆粒層において、**IL-33** を核内に発現する細胞が散見された。

4) DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイの結果は現在解析中である。

5) 考察

IL-33 を表皮基底層に発現するマウスはすでに報告があり、アトピー性皮膚炎様の慢性炎症性皮膚疾患を自然発症することが報告されている。今回、**IL-33** を顆粒層に高発現するトランスジェニックマウスの作成を試みたが、幼少期に死亡してしまうため、成マウスが得られなかった。

幼少期で死亡してしまう原因としては、仔マウスが **IL-33** トランスジェニックではコントロールと比較して小さく衰弱して死亡しているため、インボルクリンプロモーターが食道上皮粘膜でも活性化することにより、食道上皮に **IL-33** が発現して食道で炎症が生じ、食餌摂取が不能になる可能性を考えている。

得られた仔マウスでの解析により、**IL-33** は期待した通り皮膚の顆粒層に発現していた。仔マウスの皮膚の観察からは、背部皮膚では特記すべき変化はなく、組織学的にも野生型との差異は観察されなかった。手足の皮膚においては、著明な発赤腫脹を認め、組織学的に真皮深層

から脂肪織、筋層にかけて好中球を中心とする強い炎症を認めた。**IL-33** 発現と手足という外的刺激を受けやすい部位的な特徴から、外的刺激により **IL-33** が細胞外に放出されることによって強い炎症が惹起されたものと推測された。

今後 **DNA** アレイ結果を解析することにより、有棘層に **IL-33** が高発現することによる炎症が、手足に限局するものか、リンパ節や脾臓にも炎症が及ぶものか、またその炎症の内容について、詳細に検討を加える予定である。

今回の研究では、当初の目的であるバリア機能の解析には至らなかった。今後、成マウスで有棘層に **IL-33** を発現した個体を得るためには、誘導可能なトランスジェニックマウスモデルを構築する必要がある。今後の検討課題としたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) **Adachi A, Komine M, Tsuda H, Nakajima S, Kabashima K, Ohtsuki M.** **Differential expression of alarmins: IL-33 as a candidate marker for early diagnosis of toxic epidermal necrolysis.** *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019 Jan;7(1):325-327. doi: 10.1016/j.jaip.2018.05.037. 査読あり
- 2) **Jin M, Komine M, Tsuda H, Oshio T, Ohtsuki M.** **Interleukin-33 is expressed in the lesional epidermis in herpes virus infection but not in verruca vulgaris.** *J Dermatol.* 2018 Jul;45(7):855-857. doi: 10.1111/1346-8138.14334. Epub 2018 Apr 25. 査読あり
- 3) **Ueda Y, Komine M, Kamiya K, Tsuda H, Maekawa T, Murata S, Ohtsuki M.** **Generalized pustular psoriasis in a 92-year-old man with a homozygous nonsense mutation in IL36RN.** *J Dermatol.* 2018 Mar;45(3):326-328. doi: 10.1111/1346-8138.14132. 査読あり
- 4) **Tsuda H, Komine M, Tominaga SI, Ohtsuki M.** **Identification of the promoter region of human IL-33 responsive to induction by IFN γ .** *J Dermatol Sci.* 2017 Feb;85(2):137-140. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.11.002. 査読あり
- 5) **Oshio T, Komine M, Tsuda H, Tominaga SI, Saito H, Nakae S, Ohtsuki M.** **Nuclear expression of IL-33 in epidermal keratinocytes promotes wound healing in mice.** *J Dermatol Sci.* 2017 Feb;85(2):106-114. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.10.008. 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 金 美娟、小宮根真弓、大槻マミ太郎。表皮細胞におけるアプレミラストの作用についての検討。第 90 回日本皮膚科学会山梨地方会 2018 年 9 月 1 日
- 2) **Jin M, Komine M, Tsuda H, Ohtsuki M.** **Apremilast did not affect normal epidermal keratinocytes.** 3rd Inflammatory Skin Disease Summit, Autrtria. December 12-14, 2018
- 3) **Tsuda H, Komine M, Hioki T, Nakae S, Ohtsuki M.** **IL-33 determines the type of inflammation in psoriasis mice model.** Austria. December 12-14, 2018.
- 4) **Jin M, Komine M, Tsuda H, Ohtsuki M.** **Toll-like receptor 3 activation results in IL-33 promoter activation through IRF3 transcription factor depending on EGF receptor activation in normal human epidermal keratinocytes.** The 42nd annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Japan. December 15-17, 2017.

- 5) **Tsuda H, Oshio T, Komine M, Tominaga S, Ohtsuki M. Nuclear IL-33 promotes wound healing by sustaining cell division and motility through regulating actin filament re-construction. 76th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology. USA. April 26-28, 2017.**
- 6) **Tsuda H, Komine M, Ohtsuki M. STAT3 activation causes IL-33 expression in normal human epidermal keratinocyte. The 47th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research. Austria, September 27-30, 2017.**
- 7) **Tsuda H, Komine M, Nakae S, Ohtsuki M. Loss of IL-33 alters cytokine profile in imiquimod-induced psoriasis model. The 42nd Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology. Japan. December 15-17, 2017.**

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし。

(2)研究協力者

研究協力者氏名：金 美娟

ローマ字氏名：**Mejuan Jin**

研究協力者氏名：津田 英利

ローマ字氏名：**Hidetoshi Tsuda**