

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23844

研究課題名（和文）腸管線維化におけるIL-38の機能解析

研究課題名（英文）Role of IL-38 in the intestinal fibrosis

研究代表者

大野 将司（Ohno, Masashi）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80845488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：インターロイキン(IL)-38は潰瘍性大腸炎活動期の大腸粘膜でその発現が強く亢進していた。In vivoおよびin vitroの検討から、IL-38はIL-36シグナルを遮断することにより、大腸上皮細胞において好中球遊走因子の発現が低下し、結果として好中球遊走にブレーキをかける役割を果たしているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における潰瘍性大腸炎患者数は増加の一途を辿っており、特定疾患の中で最も患者数が多くなっており、その病態解明及び治療法の開発は急務である。IL-38そのものなど、IL-36シグナルを遮断する生物学的製剤の開発できれば、潰瘍性大腸炎治療に応用できうと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The expression of IL-38 was strongly upregulated in the colonic mucosa during the active phase of ulcerative colitis. In vivo and in vitro studies suggest that IL-38 may play a role in blocking IL-36 signaling, thereby reducing the expression of neutrophil migration factor in colon epithelial cells and consequently braking neutrophil migration.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 IL-38 IL-36シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

IL-36 及び IL-38 は IL-1 ファミリーに属する比較的最近に発見されたサイトカインである。申請者の研究室では、活動性の炎症性腸疾患 (IBD) 患者で interleukin (IL)-36 及び の発現が亢進していることを報告している (Nishida et al. *Inflamm Bowel Dis* 2016)。また近年、IL-36 受容体は腸管においては腸管上皮細胞及び筋線維芽細胞に発現しており、IL-36 シグナルは上皮細胞において炎症性サイトカインの発現亢進、筋線維芽細胞から collagen type VI の産生を促進し、マウス慢性腸炎モデルで腸管線維化を促進することが報告されている (Sheibe et al. *Gastroenterology* 2019)。

一方で、IL-38 は IL-36 受容体のアンタゴニストとして働くことが示されている (Veerdonk et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012)。IL-38 は皮膚、扁桃などの免疫が盛んな臓器で発現しているとされているが、IBD の病態における IL-38 の関与や腸管炎症時に IL-38 が発現しているか、IL-36 シグナルを遮断することにより腸管線維化を抑制するか、など腸管免疫における IL-38 の役割は不明である。

## 2. 研究の目的

腸管における IL-38 の機能の解析と、IL-36/IL-38 のバランスが線維化に与える影響を調べ、腸管線維化の新規予防法及びバイオマーカーの確立を目的とする。本研究では、「IL-36 受容体に対するアゴニスト/アンタゴニストである IL-36/IL-38 のバランスの乱れにより腸管線維化が引き起こされる」という新しい着想に基づいて、新規サイトカイン IL-38 の腸管線維化に対する影響を明らかにする。腸管線維化の機序の解明により、線維化高リスク群の抽出や、腸管狭窄・瘻孔といった合併症の予防法の確立が見込まれる。

## 3. 研究の方法

### (A) IBD の大腸粘膜における IL-38 mRNA の発現の検討。

十分なインフォームドコンセントを行ったうえで同意が得られた IBD 患者および健康人に対して大腸生検検体から mRNA を抽出し、IL-38 の発現を検討した。また、生検検体の FFPE 処理したスライドを用いて免疫蛍光染色を用いてその発現および局在を検討した。

### (B) 大腸上皮細胞株における IL-38 の IL-36 シグナル遮断効果の検討

大腸上皮細胞株 HT-29 および T84 を用いて、IL-36 および IL-38 で刺激した。我々の以前の報告では、HT-29 に IL-36 刺激を加えると、特に好中球遊走因子 CXCL1, CXCL2, CXCL8 や acute phase protein の発現が亢進することをマイクロアレイ解析により報告している (Nishida et al. *Inflamm Bowel Dis* 2016)。

そこで、好中球遊走因子 CXCL1, CXCL2, CXCL8 の発現を検討したところ、IL-38 は IL-36 が誘導するこれらの発現を濃度依存的に抑制した。また、IL-36 は MAPK や NF- $\kappa$ B を活性化させるが、IL-38 はこれらの活性化を濃度依存的に抑制していた。

### (C) マウス DSS 誘発大腸炎における IL-38 の役割の検討。

Wild-type マウス及び IL-38KO マウスに DSS を投与して大腸炎を誘発させ、大腸炎の程度を比較検討した。

検討内容は、体重減少率、組織学的な炎症スコア、腸管長をまず検討した。さらに、サイトカインプロファイルを検討するために、腸管から RNA 抽出して qPCR を行い、さらにフローサイトメトリーで lamina propria に浸潤した白血球分画を検討した。

## 4. 研究成果

まず、大腸生検粘膜における IL-38 mRNA の発現を検討した。Preliminary な検討では、潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者ともに活動期で IL-38 の発現が亢進している結果であったが、検体数を増やして検討したところ、クローン病では有意差が消失し、潰瘍性大腸炎活動期でのみ、その mRNA の発現は亢進していた。また、蛍光免疫染色でも IL-38 のタンパク発現は活動期潰瘍性大腸炎で強く発現していた。

この結果から IL-38 はクローン病よりも潰瘍性大腸炎の病態に強く関与していることが示唆された。我々が以前に報告している IL-36 および IL-36 の mRNA の発現も、潰瘍性大腸炎の活動期でより強く発現しており (Nishida et al. *Inflamm Bowel Dis* 2016)、これらの結果から IL-36 シグナルは潰瘍性大腸炎における大腸炎と強く関連していると結論付けた。一般に、潰瘍性大腸炎は、クローン病よりも狭窄などの腸管線維化をきたすことが少なく、今回は線維化よりも大腸炎での IL-38 の役割について検討することとした。

WT マウスと IL-38KO マウスに DSS を投与して腸炎を誘発させ、大腸炎の程度を比較すること

とした。3%DSS を 4 日間投与した場合、IL-38KO マウスでは有意に生存率が低下した。このことから IL-38 は大腸炎に保護的に働いているものと考えられた。

さらに、2%DSS を 4 日間投与した場合、IL-38KO マウスでは回復期において体重減少率が有意に高く、組織学的にも炎症スコアの悪化が見られ、腸管長も短縮していた。IL-38 は腸炎の回復期にその発現が亢進していた。

フローサイトメトリーを行ったところ、IL-38KO では炎症初期から好中球分画に有意な増加が見られ、上皮細胞において CXCL1, CXCL2 の発現増加が見られた。

これらのことから、IL-38 は腸管炎症時において、IL-36 が産生する好中球遊走因子の産生を抑制し、腸管炎症にブレーキをかける働きをしていると考えられた。

最後に、ヒト生検検体を用いて、蛍光免疫染色法で IL-38 産生細胞を検討したところ、CD20 陽性 B 細胞に発現していることが考えられた。これは既報で、ヒト扁桃では B 細胞が IL-38 をよく発現していることが示されていることと合致した結果であった。

今後、B 細胞の IL-38 産生メカニズムについても検討を加えていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野将司
2. 発表標題 インターロイキン38は好中球遊走因子の産生を抑制して腸炎に対して防御的に働く
3. 学会等名 第17回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野将司
2. 発表標題 インターロイキン38は好中球遊走因子の産生を抑制して腸炎に対して防御的に働く
3. 学会等名 第11回日本炎症性腸疾患学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------