

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07544

研究課題名（和文）IL-22を標的とした高齢者喘息に対する治療技術の創出

研究課題名（英文）The protective role of "super Th1 cells"-derived IL-22 in Th1-type airway inflammation

研究代表者

中平 雅清（Nakahira, Masakiyo）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60454758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：抗原+IL-18で刺激されたTh1細胞（super Th1細胞）は、IFN- γ とIL-13を産生することでTh1型気道炎症を惹起する。本研究で、同細胞はIL-22も産生すること、IL-22はTh1型気道炎症に伴う肺組織の破壊に対して保護作用を発揮することが明らかになった。すなわち、Th1型気道炎症の病態がこれらのサイトカインのバランスで制御されると考えられた。

また本研究で、加齢に伴い血中IL-18値が上昇し、高齢マウスでは高値を示すIL-18の作用でTh1型気道炎症が誘導されることも明らかになった。このことから、加齢に伴うIL-18産生の増大が高齢者喘息の要因の1つとなりうると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者喘息ではTh17応答が関与する好中球性炎症が多く見られるが、重症化しやすい好酸球+好中球性の混合顆粒球増加型も存在する。本研究で、マウスでは加齢に伴いsuper Th1細胞誘導因子IL-18の産生が増大すること、高齢マウスのIL-18は好酸球+好中球浸潤を特徴とするTh1型気道炎症を惹起可能であることが示された。この結果は、混合顆粒球増加型高齢者喘息の中にsuper Th1細胞によるものが含まれ、故にIL-18が高齢者喘息の治療標的となりうる可能性を示唆する。また、Th1型気道炎症でのIL-22の肺組織保護作用も明らかになったことから、IL-22が治療手段となりうる可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：When stimulated with antigen+IL-18, Th1 cells produce IFN- γ and IL-13 (Th1 cells which acquired capability to produce IL-13 are referred to as "super Th1 cells"). Simultaneous production of IFN- γ and IL-13 by super Th1 cells induces Th1-type airway inflammation. The present study revealed that super Th1 cells produced IL-22, which contributed to the repair and maintenance of lung tissue in Th1-type airway inflammation. These results suggest that the severity of Th1-type airway inflammation appears to be regulated by the balance of the cytokines produced by super Th1 cells.

In addition, the present study also revealed that serum level of IL-18 was greater in aged mice compared to young mice and that Th1-type airway inflammation was emerged in aged mice carrying antigen-specific Th1 cells without intranasal IL-18 administration. These results indicate that IL-18 production increasing with age contributes to the development of Th1-type airway inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：IL-18 IL-22 Th1細胞 気道炎症 高齢者喘息

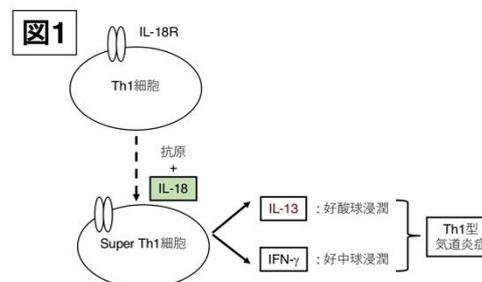
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 喘息の基礎的病態である気道炎症は従来、アレルゲン特異的 T helper (Th) 2 細胞やアレルゲン/IgE で活性化された好酸球や肥満細胞を特徴とする Th2 応答優位の反応であると考えられてきた。しかし近年、Th17 応答の存在を示唆する好中球性炎症の存在も報告されており、これは難治性を示すことが多い。高齢者喘息では若年者のものに比べて好中球性炎症が見られる割合が高く、これが難治化要因の 1 つになっている。特に、好中球と好酸球の比率がともに増加している混合顆粒球増加型の高齢者喘息は重症喘息になりやすいことが知られている。しかしながら、高齢者喘息に特徴的な気道炎症の病態形成の分子機構は不明である。

(2) 加齢に伴って基礎的炎症活性化 (inflammaging) が見られ、この原因の 1 つとしてインフラマソームの活性化が知られている。インフラマソーム形成に伴う caspase-1 活性化は Interleukin (IL) -18 の分泌に必要である。ヒトでは *IL18* 遺伝子の functional polymorphism と成人喘息患者の重症度が相関することや喘息発作時に血清 IL-18 値が上昇することが報告されていることから、高齢者喘息の病態形成への IL-18 の関与が考えられる。

(3) 抗原+IL-18 で Th1 細胞を刺激すると、super Th1 細胞が誘導される。super Th1 細胞は IFN- γ と IL-13 を産生し、産生された IFN- γ が好中球の、IL-13 が好酸球の気道浸潤を誘導することで Th1 型気道炎症が惹起される (図 1)。Th1 型気道炎症が混合顆粒球増加型の特徴を示すことから、高齢者喘息の中には Th17 細胞だけでなく super Th1 細胞によるものも含まれる可能性があると考えられる。



2. 研究の目的

(1) 発現遺伝子の網羅的解析によって super Th1 細胞では *IL22* 遺伝子が強く発現していることを発見したが、Th1 型気道炎症における IL-22 の役割は不明であった。そこで、Th1 型気道炎症のマウスモデルを用いて IL-22 の役割を明らかにするとともに、難治性高齢者喘息に対する治療手段としての IL-22 の可能性を検討する。

(2) 高齢者喘息の病態形成への inflammaging や IL-18 の関与を想定し、加齢が IL-18 産生や Th1 型気道炎症の誘導におよぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* Th 細胞分化: マウスからナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、抗 CD3/28 抗体、IL-2、IL-12、抗 IL-4 抗体の存在下で分化誘導した。OVA 特異的 Th1 細胞については、OT- マウスから単離したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、抗原ペプチド、抗原提示細胞、IL-2、IL-12、抗 IL-4 抗体の存在下で分化誘導した。

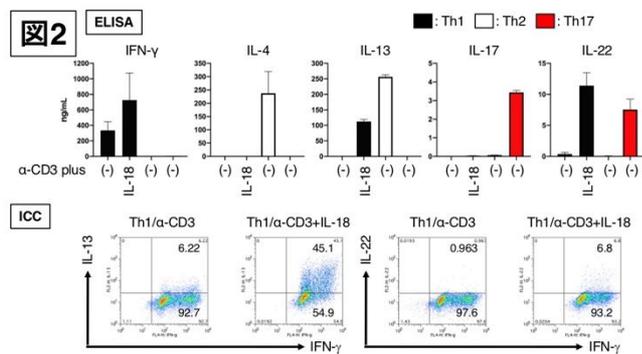
(2) Th1 応答が優位なマウス (Th1 マウス) の作製と Th1 型気道炎症の誘導: モデル抗原である卵白アルブミン (OVA) と完全フロイントアジュバント (CFA) の均一なエマルジョンをマウスに腹腔内投与する方法 (能動免疫) と OVA 特異的な Th1 細胞をマウスに移入する方法 (受動免疫) の 2 種類の方法で Th1 マウスを作製した。深麻酔下にある Th1 マウスに OVA もしくは OVA+IL-18 の点鼻刺激を行い、惹起された気道炎症の性状や程度を気管支肺胞洗浄 (BAL) や肺組織標本の解析によって検討した。

(3) Th1 型気道炎症の誘導に対する加齢の影響の評価: 受動免疫の系を用いて若齢と高齢の Th1 マウスを作製し、(2) と同様の点鼻刺激によって Th1 型気道炎症を誘導し、炎症の程度を比較した。

4. 研究成果

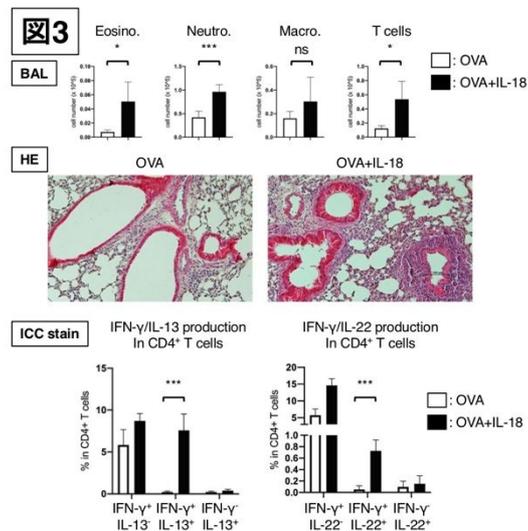
(1) IL-18 の IL-22 産生誘導作用

発現遺伝子の網羅的解析によって、super Th1 細胞が IL-22 を産生することが示唆された。そこで、C57BL/6 マウス由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞から Th 細胞を *in vitro* で分化誘導し、再刺激後のサイトカイン産生を ELISA 法と細胞内サイトカイン染色で検討した (図2)。抗 CD3 抗体 +IL-18 で再刺激した Th1 細胞 (super Th1 細胞) は IFN- γ 、IL-13 産生の他に、IL-22 産生も示した。IL-22 の産生量は Th17 細胞からの産生量に匹敵するレベルであったものの、IL-22 と同じ Th17 サイトカインである IL-17 の産生は見られなかった。細胞内サイトカイン染色では、IFN- γ /IL-22 同時産生細胞の存在も確認された。すなわち、IL-18 は Th1 細胞に作用して、IL-13 産生だけでなく IL-22 産生も誘導する能力を有していることが明らかになった。



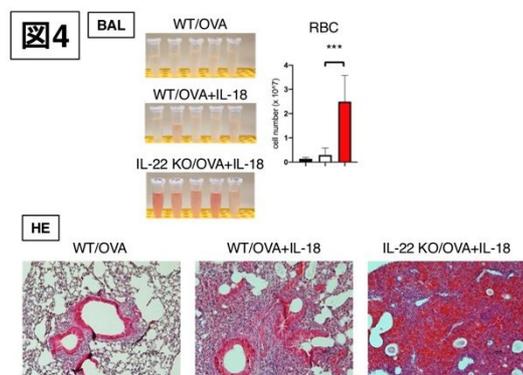
(2) super Th1 細胞からの IL-22 産生

Super Th1 細胞からの IL-22 産生が *in vivo* においても見られるかどうか、能動免疫を用いた Th1 型気道炎症モデルで検討した。OVA+CFA による能動免疫を行なった C57BL/6 マウスでは免疫処置を行っていないマウスに比べて、IFN- γ の増加は確認されなかったことから、本実験計画で用いた能動免疫処置によって主として Th1 細胞分化が誘導されていると考えられた。能動免疫した野生型 C57BL/6 マウスに OVA+IL-18 の点鼻刺激を行うと、OVA 単独刺激時に比し、BAL では好酸球、好中球数の増加、肺 HE 染色では気管支周囲への細胞浸潤の亢進が観察された (図3)。また、OVA+IL-18 の点鼻刺激を行ったマウスの縦隔リンパ節細胞を抗 CD3/28 抗体で刺激すると、OVA の単独点鼻刺激を行ったマウス由来の細胞に比べて、IFN- γ /IL-13 の同時産生を示す CD4 陽性 T 細胞とともに、IFN- γ /IL-22 の同時産生を示す CD4 陽性 T 細胞の割合も増加していた (図3)。すなわち、*in vivo* においても、抗原+IL-18 刺激によって Th1 細胞から super Th1 細胞が誘導され、IFN- γ 、IL-13 とともに IL-22 も産生されることが示された。



(3) Th1 型気道炎症における IL-22 の肺組織保護作用

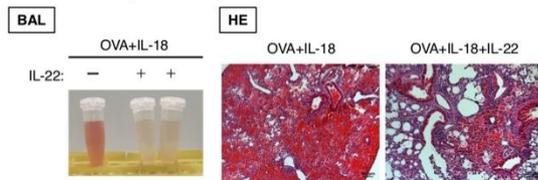
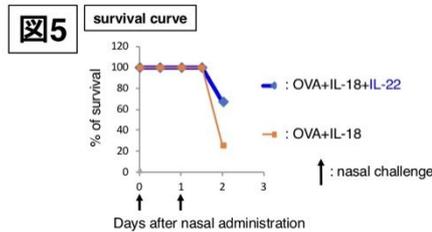
IL-22 欠損マウスを用いて、Th1 型気道炎症における IL-22 の役割を検討した。OVA+IL-18 の点鼻刺激後の生存率を比較すると、能動免疫した IL-22 欠損マウスは野生型マウスに比べ生存率が低下していた。IL-22 欠損マウスの BAL は野生型に比し強い血性を呈し、大量の赤血球が含まれていたことから (図4)、この生存率の低下は肺出血に起因するものと考えられた。実際、IL-22 欠損マウスの肺組織の HE 染色では、深刻な肺出血像が確認された (図4)。また、この IL-22 欠損マウスで確認されたものと同様の結果は、能動免疫された野生型マウスへの抗 IL-22 中和抗体投与によっても観察された。これらのことから、Th1 型気道炎症に起因する肺組織の損傷に対して IL-22 は保護作用を示すと考えられた。



(4) Th1 型気道炎症の重症度規定因子としての炎症誘導サイトカイン (IFN- γ 、IL-13) と肺組織保護サイトカイン(IL-22)

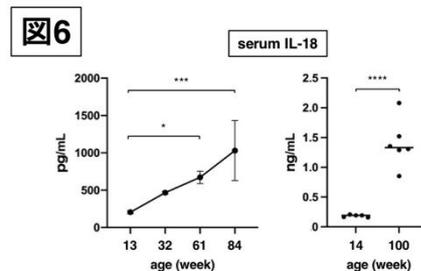
治療手段としての IL-22 の有用性を検討するために、(3) で観察された IL-22 欠損マウスにおける生存率の低下や肺出血がリコンビナント IL-22 の投与によって改善されるか検討した。予想された通り、IL-22 欠損マウスの OVA+IL-18 点鼻時にリコンビナント IL-22 の投与を行うと、生存率や肺出血の程度の改善が確認された (図5)。

以上、(1)~(4) の結果から、IL-18 は Th1 細胞から IL-13 だけでなく IL-22 産生も誘導すること、そして super Th1 細胞によって惹起される Th1 型気道炎症の重症度が、炎症誘導サイトカインである IFN- γ 、IL-13 と組織保護作用を有するサイトカインである IL-22 とのバランスで制御されていると考えられた。



(5) 加齢による IL-18 産生の増大

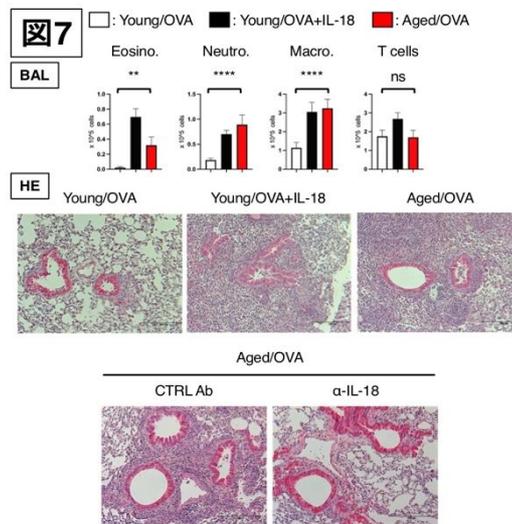
加齢に伴う inflammaging によって IL-18 産生が増加するか検討した。様々な週齢のマウスから血清を採取し ELISA 法にて IL-18 値を測定したところ、血清 IL-18 値は加齢に伴い上昇すること、高齢マウスは非常に高い血清 IL-18 値を示すことが確認された (図6)。



(6) 高齢マウスで産生増加した IL-18 の Th1 型気道炎症惹起作用

高齢マウスで高値を示した血清 IL-18 が Th1 型気道炎症を惹起しうるポテンシャルを有するかどうか検討した。OVA 特異的 Th1 細胞を移入した若齢マウスに OVA+IL-18 の点鼻刺激を行なうと、OVA 単独刺激時に比し、気道内への好酸球、好中球浸潤の増加が見られ、肺組織の HE 染色でも気管支周囲への細胞浸潤の亢進が確認された (図7)。OVA 特異的 Th1 細胞を移入した高齢マウスでは、OVA 刺激単独でも好酸球、好中球の気道浸潤、肺組織の炎症像の亢進が観察された。また、この高齢マウスで見られた肺の炎症所見は、抗 IL-18 抗体の投与による血中 IL-18 の中和によって改善された。

以上、(5)、(6) の結果から、加齢に伴って産生増加した IL-18 の作用で super Th1 細胞が誘導され、この結果、好酸球、好中球性浸潤を特徴とする Th1 型気道炎症が惹起されると考えられた。



[得られた成果の位置付けとインパクト、今後の展望]

高齢化の著しい進行に伴い、高齢者の気管支喘息も増加している。高齢者喘息は難治性で重症化しやすく、喘息死亡の 9 割を 65 歳以上の高齢者が占める。高齢者喘息については、呼吸機能の変容に関する報告は数多く集積されているのに対し、その基礎的病態である気道炎症の発症メカニズムに関する研究はまだ少ない。本研究で、高齢者喘息のうち重症化しやすいことが知られている混合顆粒球増加型と同タイプの気道炎症が、加齢に伴い産生が増加した IL-18 と Th1 細胞によって惹起されることが明らかになった。この発見は、まだ不明なところが多い高齢者喘息の気道炎症発症メカニズムの解明に対して新たな一歩となり、そして IL-18 が高齢者喘息の治療標的となりうる可能性を示唆している。また、本研究では、この IL-18/super Th1 細胞によって誘導される Th1 型気道炎症の重症度が、super Th1 細胞から産生される炎症誘導サイトカインと組織保護サイトカインとのバランスによって制御されていることも明らかになった。このことは、IL-22 が高齢者喘息の治療手段となりうる可能性を示唆している。

本研究は当初、IL-18 受容体が他の Th 細胞に比べて Th1 細胞で強く発現していること、すなわち IL-18 に対する反応性を有する Th 細胞としての Th1 細胞の特異性に着目して発想されたものであった。しかしながら、本計画の研究過程で、頻回刺激によって細胞表面上の IL-18 受容体発現が上昇することで Th17 細胞も IL-18 反応性を獲得することを発見した。IL-18 に対する反応

性を獲得した Th17 細胞は、super Th1 細胞と同様に混合顆粒球増加型の気道炎症を惹起した。そこで今後は、高齢者喘息の発症メカニズムについて、IL-18/Th17 細胞にも着目して研究を行っていくことを計画している。

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 Masakiyo Nakahira, Etsushi Kuroda
2. 発表標題 The protective role of “super Th1 cells” -derived IL-22 in Th1-type lung inflammation
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masakiyo Nakahira, Etsushi Kuroda
2. 発表標題 Aging process augments Th17-type airway inflammation by IL-18
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------