

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790942

研究課題名（和文） 接触型過敏症応答における IL-17 ファミリーサイトカイン IL-25 の役割

研究課題名（英文） Role of IL-25 in contact hypersensitivity

研究代表者

中江 進 (Nakae Susumu)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：60450409

研究成果の概要（和文）：

アクセサリーや化粧品などに含まれる金属や化学物質との接触によって起きる接触型過敏症の発症には、様々な炎症誘導因子が関与する。本研究では、炎症誘導因子であるインターロイキン 25 (IL-25) に注目し、接触型過敏症における IL-25 の役割の解明を目的とした。このために作製した IL-25 遺伝子を破壊したマウス (IL-25 欠損マウス) では接触型過敏症が顕著に抑制されたため、IL-25 の阻害剤は接触型過敏症の抑制に寄与すると期待された。

研究成果の概要（英文）：

We generated IL-25-deficient mice to elucidate the role of IL-25 in the pathogenesis of contact hypersensitivity. The development of contact hypersensitivity was significantly suppressed in IL-25-deficient mice, suggesting that the neutralization of IL-25 may provide a potential target for therapeutic treatment for contact hypersensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー学

1. 研究開始当初の背景

IL-25 は、2001 年に同定され、その産生細胞には、盲腸近傍リンパ器官の T 細胞、マスト細胞、好酸球および好塩基球が知られている。マウスに IL-25 を投与すると、IL-4、IL-5 や IL-13 といった Th2 サイトカインの産生が誘導され、それに相関して、血中 IgE や IgG1 産生の増強、肺や腸に好酸球の浸潤が誘導される。したがって、IL-25 は、Th2 タイプの免疫応答の誘導に関与することが想定される。実際に、

IL-25 は、IL-4 を誘導することで Th2 細胞の分化に関わり、IL-25 の中和抗体の投与は、マウスの喘息を抑制することが報告されている。IL-4 欠損マウスでは、接触型過敏症が抑制されることが報告されており、IL-25 は Th2 細胞の活性化を介して接触型過敏症の誘導に関わっていることが予期されるものの、接触型過敏症における IL-25 の関与については全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

予備検討として、接触型過敏症を誘導したマウスの皮膚の炎症局所で IL-25 mRNA の発現が上昇していることを観察した。この結果は、接触型過敏症の発症に IL-25 が何らかの関与をもっている可能性を示唆する。そこで、本研究では、IL-25 欠損マウスを用いて、接触型過敏症の発症機構における IL-25 の役割を個体レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 接触型過敏症の誘導

マウスの背中全体の毛をバリカンでよく剃り、剃毛から二日後に、剃毛部分に 2.0% FITC 懸濁液あるいは 0.5% DNFB 溶液を塗布した。5 日後、マウスをイソフルラン吸入麻酔下で、耳介の厚さをダイヤルゲージノギスで測定し (basal level)、引き続き、左側の耳介皮膚の外側および内側にそれぞれ 20 μL ずつ (総量 40 μL) の 0.5% FITC 溶液あるいは 0.25% DNFB 溶液を、右側の耳介皮膚の外側および内側にそれぞれ 20 μL ずつ (総量 40 μL) の溶媒を塗布した。耳介に試薬を塗布した後、経時的に耳介の厚さを測定した。接触型過敏症の評価は、耳介に試薬を塗布する前と後の耳介の厚さの差分で評価を行った。

(2) 表皮ランゲルハンス細胞の遊走能測定
マウスの左側の耳介の皮膚に 20 μL の 2.0% FITC 懸濁液を、右側には同量の溶媒のみを塗布した (両耳とも外側の皮膚のみ)。24 時間後、FITC を塗布した左側と溶媒のみを塗布した右側の顎下リンパ節をそれぞれ分けて回収した。回収したリンパ節からリンパ細胞を FACS バッファー (2% ウシ胎児血清 (FBS) を含む HBSS) で懸濁した。そのリンパ節浮遊液に、anti-mouse CD16/CD32 mAb を加え、氷上で 15 分間静置した。引き続き、PE anti-mouse CD11c mAb と APC anti-mouse MHC class II mAb を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、未反応の抗体をのぞくために、その細胞を FACS バッファーで洗浄し、200 μL の FACS バッファーで再懸濁した。さらに、等量の 2% 7-aminoactinomycin D 溶液を加えたあと、FACS Calibure で、7-aminoactinomycin D-negative MHC class II^{hi} CD11c⁺ 細胞中の FITC 陽性細胞の割合を評価した。

(3) ハプテン特異的なリンパ節細胞の増殖応答試験およびサイトカイン産生

マウスの両方の耳介の皮膚に 20 μL の 2.0% FITC 懸濁液を塗布した。5 日後、両側の顎下リンパ節を回収し、リンパ節細胞浮遊液を 10% FBS を含む RPMI1640 培地に 2×10^6 /mL になるように懸濁した。96 well flat-bottom plate の 1 ウェルあたり、100 μL の 2×10^6 /

mL のリンパ節細胞をまいた後 (2×10^5 cells/well)、100 μL の 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FITC (最終濃度、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) あるいは培地のみを加え、72 時間培養を行った。培養後、上清中のサイトカインレベルを測定するために、1 ウェルあたり 100 μL の培養上清を回収し、 -20°C で保存した。上清を回収した後、細胞には、20 μL の 0.25 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [3H]-チミジンを加え、さらに 6 時間の培養を行った。その後、細胞内の DNA に取り込まれた [3H]-チミジン量を定量するために、セルハーベスターを用いて、グラスフィルター上に細胞 DNA を吸着させ、放射活性をマイクロベーターシンチレーションカウンターで測定した。回収した FITC 特異的なリンパ節細胞の増殖応答試験の際の培養上清中のサイトカインのレベルを ELISA キットを用いて測定した。測定方法はキット付属のプロトコールに準じておこなった。

(4) ミエロペルオキシダーゼ活性測定

耳介皮膚に FITC を塗布してから 24 時間後、耳介を回収し、耳介を解剖用はさみで適当な大きさに裁断した後、500 μL の 0.5% cetyltrimethylammonium chloride 水溶液中に入れた。ホモジナイザーで耳介組織を破碎し、その溶液を 1.5 mL のマイクロチューブへ移した。10,000 x g で遠心分離機にかけ、上清を回収し、組織ホモジネートとした。組織ホモジネート中の全タンパク質量を Bio-RAD DC protein assay kit で、キットのプロトコールに従い測定した。組織ホモジネート中のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を下記のように測定した。96 well flat-bottom plate に 1 ウェルあたり 10 μL の精製 MPO あるいは組織ホモジネートを加え、さらに、100 μL の OPD 基質溶液を加えた。その後、室温で 10-30 分間反応させ、25 μL の 1N HCl を加えて反応を停止し、分光光度計で 490 nm の吸光度を測定した。組織ホモジネート中の MPO 活性は精製 MPO の標準曲線から算出し、その値を組織ホモジネート全タンパク質量で割った値として表した。

(5) マスト細胞の再構築

野生型および IL-25 欠損マウスの大腿骨から骨髓細胞を回収した。骨髓細胞を 10 ng/ml rmIL-3 の存在下で 6 週間、培養し、マスト細胞を作製した。このマスト細胞をマスト細胞欠損 *Kit^{fl-sh/fl-sh}* マウスの両方の耳介皮内に移入した (1×10^6 cells/耳介)。

4. 研究成果

(1) 接触型過敏症の誘導における IL-25 の寄与について

FITCによる接触型過敏症の誘導に IL-25 が関与しているかどうかを明らかにするために、IL-25 欠損マウスを用いて評価を行った。接触型過敏症はマウスの背景 (C57BL/6 と BALB/c 背景) によって応答性が異なる。そこで、C57BL/6 と BALB/c 背景の IL-25 欠損マウスを利用した。その結果、C57BL/6 背景の IL-25 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、FITC による接触型過敏症は顕著に抑制された。一方、BALB/c 背景の IL-25 欠損マウスでは、抑制効果は C57BL/6 背景に比べてわずかであった。DNFB による接触型過敏症の誘導に IL-25 が関与しているかどうかを明らかにするために、C57BL/6 と BALB/c 背景の IL-25 欠損マウスを用いて評価を行った。その結果、FITC による接触型過敏症と同様に、C57BL/6 背景の IL-25 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、DNFB による接触型過敏症は顕著に抑制された。一方、BALB/c 背景の IL-25 欠損マウスでは、野生型マウスとの間に顕著な差は認められなかった。したがって、IL-25 は FITC および DNFB による接触型過敏症の誘導に重要な役割を演じているが、その寄与はマウスの遺伝的背景によって大きく異なることが明らかになった。

(2) ハプテン感作期における IL-25 の役割

接触型過敏症の誘導には、感作期におけるハプテン特異的な T 細胞の誘導が必要である。その過程は、まず、ハプテンが接触した表皮のランゲルハンス細胞や樹状細胞が、ハプテンによって修飾されて抗原性をもった抗原を取り込むことから始まる。ハプテン化抗原を取り込んだ表皮のランゲルハンス細胞や樹状細胞は、皮膚から従属リンパ節へ移動する。その後、リンパ節内の T 細胞領域へ移動し、そこで、T 細胞に抗原を提示することで、ハプテン特異的な T 細胞の誘導、すなわち、ハプテンに関する感作が成立する。IL-25 欠損マウスで、接触型過敏症が抑制されるのは、感作期における表皮のランゲルハンス細胞や樹状細胞の遊走能やハプテン特異的な T 細胞の誘導に影響をあたえているのかどうかを評価する必要がある。

① 皮膚ランゲルハンス・樹状細胞の遊走における IL-25 の役割

IL-25 を過剰発現させたマウスでは、Th2 サイトカインだけでなく、TNF などの炎症性サイトカインの産生亢進が認められる。TNF

は表皮からリンパ節へのランゲルハンス・樹状細胞の遊走に関わる重要なサイトカインである。そこで、in vivo で TNF 産生を促進する IL-25 は、皮膚ランゲルハンス・樹状細胞の遊走に影響をもつのかどうか、IL-25 欠損マウスを用いて評価を行った。マウスの片側の耳介皮膚に、FITC を塗布し、もう一方の耳介皮膚にはコントロールとして溶媒のみを塗布する。翌日、FITC を塗布した側のリンパ節 (FITC side) と溶媒のみを塗布した側のリンパ節 (Vehicle side) をそれぞれ、回収する。FITC を塗布した側のリンパ節のみに、FITC で修飾された自己の抗原を取り込んだ皮膚のランゲルハンス細胞および樹状細胞が、リンパ節へ移動し、FITC 陽性の樹状細胞として FACS により検出される。その結果、リンパ節へ移動してくる FITC 陽性の樹状細胞の数は、野生型マウスと IL-25 欠損マウスとの間に差は認められなかった。したがって、IL-25 は、接触型過敏症の感作期におけるランゲルハンス・樹状細胞の遊走には必須ではないことが明らかになった。

② ハプテン特異的な T 細胞の誘導における IL-25 の役割

マウスにハプテンを塗布した後、5 日目にはハプテンに対する感作が成立している。つまり、ハプテン特異的な T 細胞の誘導が起きている。実際に、その時点で、従属リンパ節を回収し、このリンパ節細胞をハプテンとともに培養すると、リンパ球 (主に T 細胞) の増殖やサイトカイン産生といったハプテン特異的な活性化が観察できる。FITC で感作した IL-25 欠損マウスのリンパ節では、FITC 特異的な増殖及びサイトカイン産生能は、野生型マウスと同程度、観察された。したがって、IL-25 は感作期におけるハプテン特異的な T 細胞の誘導には必須ではなく、IL-25 欠損マウスにおいて、FITC による接触型過敏症の抑制は感作の成立異常ではないことが示唆された。

(3) 接触型過敏症の炎症惹起相における IL-25 の役割

IL-25 は、感作相ではなく、炎症惹起相に重要であることを証明するために、FITC で感作した野生型マウスのリンパ節細胞の T 細胞を、未感作の IL-25 欠損マウス (WT LN cells → IL-25 欠損マウス) および野生型マウス (WT LN cells → 野生型マウス) に移入し、そのマウスの耳介皮膚に、FITC を塗布して接触型過敏症を誘導した。この場合、すでに FITC で感作された野生型マウスの LN 細胞を同数移

入しているため、感作相の影響は (WT LN cells → IL-25 欠損マウス) と (WT LN cells → 野生型マウス) では同じと考えることができる。したがって、このマウスに接触型過敏症を誘導した場合、炎症惹起相における IL-25 の影響について評価することができる。その結果、(WT LN cells → IL-25 欠損マウス) では (WT LN cells → 野生型マウス) に比べて、FITC による接触型過敏症は有意に抑制された。従って、これまでの結果から、IL-25 は、FITC による接触型過敏症の誘導において、感作相ではなく、炎症惹起相における炎症の誘導に重要なサイトカインであることが明らかになった。

(4) 接触型過敏症における IL-25 産生細胞

免疫系細胞では、Th2 細胞の他に、マスト細胞や好塩基球、好酸球で IL-25 の発現が認められる。しかしながら、接触型過敏症の炎症誘導の際、どのような細胞が IL-25 を産生しているのかどうかは不明である。

そこで、その候補として皮膚に常在するマスト細胞に注目した。接触型過敏症の誘導におけるマスト細胞が産生する IL-25 の役割を評価するために、IL-25 欠損マウスのマスト細胞をマスト細胞欠損マウス (*l^{sh/sh}* マウス) に移植することにより、マスト細胞特異的に IL-25 を欠損するコンディショナル欠損マウスを作製した (IL-25 欠損マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス)。

マスト細胞欠損マウスでは、FITC による接触型過敏症は、野生型マウスに比べて有意に抑制される。一方、あらかじめ、野生型マウスのマスト細胞を移植したマスト細胞欠損マウス (野生型マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス) では、野生型マウスと同程度の接触型過敏症が誘導される。しかしながら、(IL-25 欠損マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス) では、マスト細胞欠損マウスと同様に、野生型マウスと比較して、接触型過敏症は抑制されたままであった。したがって、マスト細胞が産生する IL-25 が FITC による接触型過敏症の誘導に重要であることが明らかになった。

以上より、IL-25 は、接触型皮膚炎の発症および病態形成に関与する炎症誘導性サイトカインであることが初めて明らかになった。

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 24 件)

- ① Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. and Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011 Feb 25;34(2):149-62. 査読有
- ② Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, K., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Sudo, K., Okumura, K., Saito, H. and Nakae, S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18581-6. 査読有
- ③ Ishii, A., Oboki, K., Nambu, A., Morita, H., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Sudo, H., Okumura, K., Saito, H. and Nakae, S. Development of IL-17-mediated delayed-type hypersensitivity is not affected by down-regulation of IL-25 expression. *Allergol Int*. 2010 Sep 25;59(4):399-408. 査読有
- ④ Yagami, A., Kajiwara, N., Oboki, O., Ohno, N., Morita, H., Sunnarborg, S.W., Okumura, K., Ogawa, H., Saito, H. and Nakae, S. Amphiregulin is dispensable for induction of contact hypersensitivity. *Allergol Int*. 2010 Sep;59(3):277-84. 査読有
- ⑤ Nishida, K., Hasegawa, A., Nakae, S., Oboki, K., Saito, H., Yamasaki, S. and Hirano, T. Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction, but not the immediate-type reaction. *J Exp Med*. 2009 Jun 8;206(6):1351-64. 査読有.

[学会発表] (計 15 件)

[図書] (計 1 件)

- ① Ishigame, H., Nakae, S., and Iwakura, Y. The roles of IL-17A and IL-17F in mucosal infection and allergy. In “*Th17 cells in health and disease*”, (ed. S. Jiang). Springer Science + Business Media, LLC, New York, NY, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中江 進 (NAKAE SUSUMU)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：60450409

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし