

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591652

研究課題名(和文) 接触過敏反応におけるインターロイキン33とその受容体の関与についての検討

研究課題名(英文) The role of IL-33 and its receptor in contact hypersensitivity reaction

研究代表者

小宮根 真弓 (Komine, Mayumi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00282632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ST2LはIL-33受容体であり、可溶性ST2はIL-33とST2Lの相互作用およびそのシグナル伝達を阻害することが報告されている。われわれは、野生型マウスおよび可溶性ST2トランスジェニックマウスを用いて、FITCあるいはオキサゾロンによる接触過敏反応について検討し、組織学的にも検討したが、野生型マウスと可溶性ST2トランスジェニックマウスの間で、統計学的有意差は認めなかった。また、培養表皮ケラチノサイトを用いて、IL-33の産生メカニズムに関する検討を行った。その結果、UVB、IL-17、IFN γ によってIL-33産生が誘導され、その誘導はEGF受容体に依存していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the hypersensitivity reaction to FITC and oxazolone in wild type and soluble ST2 transgenic mice. There were no statistical differences in ear thickness and histopathological observation in these mice. UVB, IFN γ , and IL-17 induced IL-33 expression in protein and mRNA levels in cultured normal human epidermal keratinocytes (NHEKs). The induction of IL-33 expression in NHEKs was dependent on EGFR and ERK with these stimulations. In case of IL-17 and IFN γ , the induction was dependent also on STAT1 and JAK. We have identified three distinct exon1s in the upstream of exon2. The putative promoter regions of IL-33 were cloned into luciferase vectors, and we identified active promoter region in the 5' flanking region of second exon1 (exon1b). This promoter region was active in NHEKs, normal human dermal fibroblasts, and human umbilical vein endothelial cells. The promoter activity was induced by the stimulation with IFN γ and IL-17, consistent to our protein and mRNA results.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：IL-33 ケラチノサイト 発現調節 インターフェロン UVB

1. 研究開始当初の背景

接触過敏反応は、皮膚科領域における疾患のなかで非常に重要な位置を占める病態である。化粧品や金属に対する接触過敏反応は日常診療でもしばしば遭遇する疾患であり、またアトピー性皮膚炎はダニなどの刺激に対する接触過敏反応を伴うことが報告されている。IL-33 は表皮細胞に発現し、外的刺激により細胞外に放出されて Group2 innate lymphoid cell を刺激することにより IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカイン産生を誘導してアレルギー反応の形成にかかわることから、これらの疾患および接触過敏反応の病態に深く関与することが予想された。我々は、野生型マウスと IL-33 ノックアウトマウス、および可溶性 ST2 トランスジェニックマウスにて、接触過敏反応を惹起し、比較検討する計画を立てた。野生型と可溶性 ST2 トランスジェニックマウスとの間には有意な差は検出できなかった。次に IL-33 ノックアウトマウスと野生型マウスを比較する実験を計画していたが、細胞レベルでの実験が軌道に乗ったため、まずは *in vitro* の実験を中心に研究を進めた。表皮は体の最外層を覆い体内と外界を境界する非常に重要な組織であり、常に外界の刺激にさらされているため、種々の刺激を享受する。どのような刺激で IL-33 がどのようなメカニズムで産生されるのかを検討することは、皮膚疾患の病態に重要であると考え、*In vitro* の実験では、表皮細胞を刺激することにより、IL-33 がどのようなメカニズムで産生されるのかを検討した。

2. 研究の目的

培養表皮細胞に種々の刺激を加え、IL-33 の産生メカニズムを検討する。

3. 研究の方法

培養正常ヒト表皮角化細胞を keratinocyte serum free medium (Keratinocyte-SFM) に、Epidermal growth factor および牛下垂体抽出物を加えた Keratinocyte growth medium (KGM) にて培養、80%サブコンフルエントの状態ですべてトリプシナイズし継代した。3~4継代目を実験に用いた。刺激 24 時間前に培地を Keratinocyte basal medium (KBM) に変え、サイトカインあるいは B 波紫外線 (UVB) にて刺激し、記載されたタイムポイントで細胞を回収、蛋白を抽出しウェスタンブロットを施行、あるいは Total RNA を抽出して real time PCR に用いた。各種阻害剤は、刺激 30 分前に培地に加えた。

4. 研究成果

表皮細胞を UVB で刺激することにより、IL-33 産生が誘導され、その誘導は、ERK、p38 に依存することが明らかとなり、Journal of Dermatological Science に報告した。IFN γ は単独で IL-33 産生を誘導し、また TNF α

と共同で、IL-33 の分解 (maturation) を誘導した。IFN γ の IL-33 誘導は EGF 受容体、ERK、STAT1、JAK に依存的であった。IFN γ + TNF α による IL-33 の分解は、Calpain 阻害剤によって阻害されたが、Caspase 阻害剤によっては阻害されなかった。Calpain 阻害剤により、25kD の新たなバンドが出現し、このバンドは IL-33 の siRNA を加えることにより消失したことから、IL-33 の産物であると推定された。この結果は、Journal of Investigative Dermatology に報告した。

また我々は、IL-33 には、複数の Splice variant が存在することを見出した。これらの splice variant の発現パターンは、いくつかの細胞種間で異なることも明らかとなり、この結果を Journal of Investigative Dermatology に報告した。上記 25kD のバンドが、splice variant であるのか、IL-33 の分解産物であるかは、現在検討中である。

さらに、培養表皮細胞を IL-17 で刺激することによっても IL-33 の産生が誘導され、この誘導は、EGF 受容体、ERK、STAT1、JAK に依存的であった。この結果は Journal of Dermatological Science に報告した。

乾癬、アトピー性皮膚炎、扁平苔癬などの炎症性疾患の病変部皮膚を抗 IL-33 抗体を用いて免疫染色することにより、毛細血管内皮細胞および表皮細胞の核に IL-33 が検出された。これらの疾患において、表皮細胞に発現した IL-33 が細胞外に放出されているか否かは不明であるが、以上の結果は、表皮細胞の核に IL-33 が発現することがこれらの疾患の病態において何らかの意味を持つことを示唆している。核内の IL-33 は、33kD の full length であり、細胞外に存在する 18kD の mature IL-33 とは逆に、炎症抑制的に作用することが報告されている。特に、NF κ B の活性化を抑制することが報告されており、我々の実験でも、細胞内の IL-33 をノックダウンすることにより、TNF α 刺激による IL-8 産生が亢進したことから、細胞内に存在する IL-33 は炎症抑制的に働くことが推測された。炎症性皮膚疾患において表皮細胞の核内に IL-33 が発現していることにより、炎症の過度な進展が抑制される可能性を考えている。

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 8 件)

- 1) Meehansan J, Komine M, Hosoda S, Tsuda H, Karakawa M, Murata S, Demitsu T, Ohtsuki M. Possible involvement of SDF-1/CXCL12 in the pathogenesis of Degos disease. J Am Acad Dermatol. 2013 Jan;68(1):138-43.

- 2) Meephansan J, Komine M, Tsuda H, Ohtsuki M. Suppressive effect of calcipotriol on the induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-13 in a human squamous cell carcinoma cell line. *Clin Exp Dermatol.* 2012 Dec;37(8):889-96.
- 3) Tsuda H, Komine M, Karakawa M, Etoh T, Tominaga S, Ohtsuki M. Novel splice variants of IL-33: differential expression in normal and transformed cells. *J Invest Dermatol.* 2012 Nov;132(11):2661-4.
- 4) Meephansan J, Tsuda H, Komine M, Tominaga S, Ohtsuki M. Regulation of IL-33 expression by IFN- γ and tumor necrosis factor- α in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2012 Nov;132(11):2593-600.
- 5) Wakatabi K, Komine M, Meephansan J, Matsuyama Y, Tsuda H, Tominaga S, Ohtsuki M. The levels of soluble ST2 in sera and bullous fluid from patients with bullous pemphigoid. *Eur J Dermatol.* 2012 May-Jun;22(3):333-6.
- 6) Meephansan J, Komine M, Tsuda H, Tominaga S, Ohtsuki M. Ultraviolet B irradiation induces the expression of IL-33 mRNA and protein in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2012 Jan;65(1):72-4.
- 7) Matsuyama Y, Okazaki H, Hoshino M, Onishi S, Kamata Y, Nagatani K, Nagashima T, Iwamoto M, Yoshio T, Ohto-Ozaki H, Tamemoto H, Komine M, Sekiya H, Tominaga S, Minota S. Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1 β signaling and a poor clinical response. *Rheumatol Int.* 2012 May;32(5):1397-401.
- 8) ジトラダ ミーファンサン、小宮根真弓、津田英利、富永眞一、大槻マミ太郎：表皮角化細胞における IL-33 産生機序について、*医薬の門*、2012 年。

[学会発表] (計 12 件)

- 1) Jitlada Meephansan, Mayumi Komine, Hidetoshi Tsuda, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki. Regulation of IL-33 by inflammatory

cytokines in normal human epidermal keratinocytes. *東京皮膚フォーラム* 2012 年 3 月 3 日、丸の内、東京。

- 2) Jitlada Meephansan, Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Satomi Hosoda, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki. Regulation of IL-33 by inflammatory cytokines in normal human epidermal keratinocytes. *分子皮膚科フォーラム* 2012 年 4 月 13 日、青森。
- 3) Jitlada Meephansan, Mayumi Komine, Hidetoshi Tsuda, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki. IL-33 is produced by normal human keratinocytes with environmental and inflammatory stimuli: a novel "alarmin" in the skin. Annual meeting of Society for Investigative Dermatology 2012 May 9~12. North Carolina, USA.
- 4) Jitlada Meephansan, Mayumi Komine, Hidetoshi Tsuda, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki. IL-17A up regulates IL-33 expression in keratinocytes; negative feedback loop in psoriatic epidermis. Annual meeting of European Society for Dermatological Research, Venice, Italy. 2012 September
- 5) Jitlada Meephansan, Mayumi Komine, Hidetoshi Tsuda, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki. Regulation of IL-33 expression by inflammatory cytokines and its putative role in inflammatory skin disorders. Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012 年 12 月 7~9 日 沖縄。
- 6) Satomi Hosoda, Mayumi Komine, Masaru Karakawa, Jitlada Meephansan, Hidetoshi Tsuda, Mamitaro Ohtsuki. Retinoids regulates the production of matrix metalloproteinases in the human epidermal keratinocyte cell line HaCaT. Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012 年 12 月 7~9 日 沖縄。
- 7) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Tomoyuki Oshio, Satomi Hosoda, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro

Ohtsuki. Novel splice variants of IL-33 expressed in normal human keratinocyte. Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012 年 12 月 7～9 日 沖縄。

- 8) 津田英利・小宮根真弓・大塩智之・富永眞一・大槻マミ太郎：IL-33 は核内でケラチノサイトの proliferation に関与している。平成 23 年 12 月 11 日～14 日。第 35 回日本分子生物学会年会。福岡。
- 9) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Tomoyuki Ohshio, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki. **IL-33 as a nuclear protein to affect proliferation and differentiation of normal human epidermal keratinocytes. International Investigative Dermatology, Edinburgh, Scotland, 2013 May.**
- 10) 津田英利・小宮根真弓・大塩智之・富永眞一・大槻マミ太郎。ケラチノサイトにおけるヒト IL-33 プロモーター領域の解析。第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月、神戸。

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織
(1) 研究代表者

小宮根 真弓

研究者番号：00282632