

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860319

研究課題名(和文) IL-33誘発性血管壁肥厚におけるIL-5産生ILC2と好酸球の役割

研究課題名(英文) Roles of IL-5-producing ILC2 and eosinophil in IL-33-induced arterial hypertrophy

研究代表者

生谷 尚士 (Ikutani, Masashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・客員講師

研究者番号：40513718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では難病に指定されている肺動脈性肺高血圧症の発症メカニズムの解明を研究目的としている。これまでに申請者らは肺動脈性肺高血圧症の新規動物モデルの構築に成功している。本モデルの解析から白血球に含まれるILC2と好酸球という細胞が発症の起点となっている可能性を見出した。これらの細胞は血管周囲に集積し血管肥厚を誘導していることが判明した。また、これらの細胞の関与は、これまでほとんど指摘されておらず、新たな視点から治療法開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed at clarifying the pathogenic mechanism (s) underlying pulmonary arterial hypertension (PAH). Previously, we developed an animal model of PAH. In the model, ILC2 and eosinophils were identified as the primary cause to develop PAH. These cells were accumulated around arterial blood vessels and this resulted in arterial hypertrophy. Involvement of these cells has not been reported and the findings from this study will lead to a new therapeutic approach.

研究分野：免疫学

キーワード：IL-5 IL-33 ILC2 好酸球

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症は、肺動脈の肥厚により肺動脈圧が上昇し、心臓に過度の負担を強い、心臓や肺の機能障害を引き起こす難治性疾患である。血管壁肥厚の原因には遺伝的背景や物理的閉塞などが示唆されているが、未だ特定されてはいない。治療法としては近年高い治療効果が得られている血管拡張薬に加え、一般的に用いられる抗凝固薬、利尿薬、強心薬の投与や酸素吸入療法などが挙げられる。しかしながら対症療法が現状である。また、肺動脈性肺高血圧症は自覚症状が無いまま進行するため、診断時には末期の状態である場合が多く、発症メカニズムの解明は極めて困難な状況である。ヒトにおいて経時的な観察は不可能であるため、発症メカニズムの研究には動物モデルが用いられる。これまでに複数の動物モデルが開発され貴重な知見が得られているが、ヒトの肺高血圧症を忠実に再現しているものは少ない。そのため根本的な治療法の確立へと導く最適な動物モデルが切望されている。

申請者は白血球に属する ILC2 という細胞に係わる研究を行ってきた。この細胞はアレルギー反応が起こると著しく増加し大量のインターロイキン (Interleukin: IL) -5などを産生することが報告されている。IL-5は気管支喘息などのアレルギーの増悪に係わる好酸球を制御する因子として知られている。申請者は IL-5 を産生する細胞をモニターすることを可能にした IL-5 レポーターマウスを作成し、肺に多数の IL-5 産生 ILC2 が存在することを突き止めた (Ikutani et al., J Immunol, 188:703-713, 2012)。この IL-5 産生 ILC2 の増加には上皮細胞から産生される IL-33 が重要である。

近年、IL-33 はアレルギーのみならず膠原病などの様々な慢性疾患との関連が指摘されている。ヒトの肺動脈性肺高血圧症の発症には慢性的な炎症が深く関与しているとの指摘がある。興味深いことに肺動脈性肺高血圧症を患う人の末梢血液の研究からは IL-33 シグナルの関与が報告されている。したがって、IL-33 が肺高血圧症の発症に関与している可能性は高いものと推察される。

2. 研究の目的

申請者は長期的に IL-33 を作用させることでヒト肺動脈性肺高血圧症の新規動物モデルの構築に成功した (特願 2013-183870)。本モデルではヒトの病態に酷似した肺動脈の肥厚が観察される。これまでの申請者の研究から、肺動脈肥厚は IL-5 産生 ILC2 によって誘導されることが判明した。この細胞の IL-5 産生が障害されると、肥厚が劇的に抑制され病態が改善することを突き止めた。本研究では IL-5 産生 ILC2 が起点となる新たな血管壁

肥厚のメカニズムを提唱し、その解析を通じ、根本的な治療法確立に寄与することを研究目的とする。

3. 研究の方法

申請者らが開発した動物モデルを利用し、肺動脈肥厚のメカニズムを解明する。既存の肺高血圧症の動物モデルに比べて、我々が開発したモデルでは、より重度の血管肥厚が観察され、また発症の誘導期間が短いなどのメリットがある。本研究は以下の3点を重点的に研究し、研究目的を達成する。

(1) IL-33 誘発性肺動脈性肺高血圧症モデルの免疫学的解析

申請者らが開発したモデルによってどのような免疫系の細胞が影響を受けるかを検討する。長期間 IL-33 を投与し、フローサイトメトリー法により肺に存在する種々の免疫担当細胞を検出し、その数的変化を観察する。

(2) IL-5 産生 ILC2 の動態解析

特に重大な関与が予想される IL-5 産生 ILC2 細胞に関しては申請者らが作製した IL-5 レポーターマウスを用い検討する。長期間 IL-33 を投与し、蛍光免疫染色法で肺組織における局在を観察する。

(3) 好酸球の機能解析

IL-5 の産生増強によって最も影響される細胞は好酸球である。したがって、好酸球が減少もしくは欠損するマウスを用いて疾患を発症させ、血管肥厚の程度をヒトの疾患に用いられる指標を利用し評価する。

4. 研究成果

以下に「3. 研究の方法」の番号に対応するように研究成果を報告する。

(1) IL-33 の投与による免疫細胞の数的変化を観察した。顕著に変化があった細胞は ILC2 細胞と好酸球であった。ILC2 細胞はおよそ 10 倍に、好酸球はおよそ 30 倍以上に増加した。主要な IL-5 産生細胞として知られる T 細胞の増加は観察されなかった。

(2) 免疫蛍光染色法により検討した結果、IL-5 産生 ILC2 は重度に肥厚した肺動脈の周囲に存在していることが判明した。さらに好酸球も同時に検出すると同じ血管周囲に集積していることが明らかとなった (図 1)。この現象は短期的な IL-33 の投与では観察されず、長期的に投与した時のみにみとめられた。

(3) 血管周囲の顕著な好酸球の集積は好酸球が血管肥厚に関与する可能性を強く示唆する。好酸球に障害のあるマウスに疾患を誘導すると通常みとめられる重度の血管肥厚の抑制が観察された (図 2)。

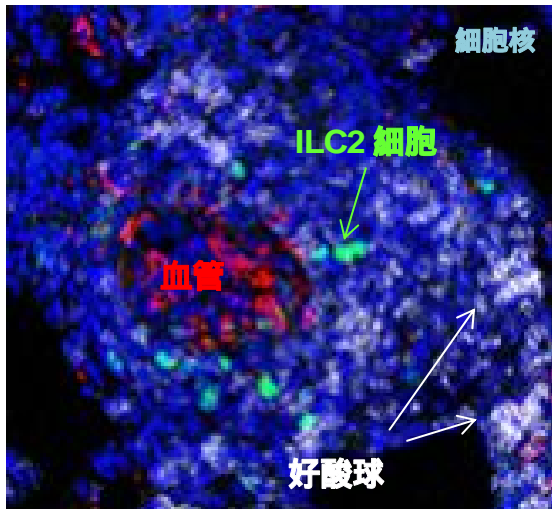


図1 重度に肥厚している血管周囲の IL-5 産生 ILC2 細胞と好酸球

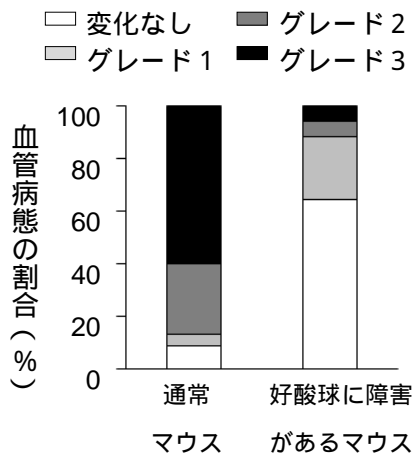


図2 血管肥厚を誘導させたマウスの血管病態の割合

グレードは血管肥厚の程度を示す(グレード1:軽度、グレード2:中程度、グレード3:重度)

本研究では、IL-5 産生 ILC2 が血管周囲に集まり、さらに好酸球を呼び集めることで血管肥厚を引き起こしていることを明らかにした。ILC2 細胞の関与はこれまでに報告がなされておらず、肺動脈性肺高血圧症の新たな発症メカニズムを明らかにした。

現在までのところ、ヒトにおいて IL-33 が肺動脈性肺高血圧症の原因であるかは不明である。本研究では疾患の原因として好酸球が同定されたが、これまでのヒトに係わる研究では好酸球の関与は指摘されていない。肺動脈性肺高血圧症は何年もの時間を経て発症するため、発症初期の状態からは大きく変化している可能性は十分にある。そこで IL-33 の投与をさらに延長し検討した。興味

深いことに投与期間を延長した場合も血管肥厚は観察されたが、その周囲には ILC2 細胞と好酸球の集積はみられなかった。これは血管肥厚の初期段階においては両者が関与するが、時が経つにつれて血管から離脱している可能性が考えられる。つまり同様の現象がヒトでも起こっている可能性が示された。

次に欧米で実際に治療に使用されている薬剤を IL-33 と同時に投与した。その結果、血管肥厚の抑制がみとめられた。これは本動物モデルが肺動脈性肺高血圧症の研究を行う上で有用であることを示すとともに、ヒトの発症メカニズムを反映している可能性を示唆するものでもある。

今後はヒトの疾患との関連性を証明していくべきだと考える。ヒト肺動脈性肺高血圧症には様々な原因があり分類されているが、膠原病や寄生虫感染を合併する肺動脈性肺高血圧症に本モデルは特に有用ではないかと期待する。また他の動物モデルとの詳細な比較検討も必要である。本モデルの有用性が確立されれば、発症の初期段階で検出されてくるバイオマーカーの同定や IL-5 産生 ILC2 や好酸球を制御する方法の開発など、多くの研究に利用することが可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

生谷 尚土、常山 幸一、中江 進、高津 聖志、Emerging roles of IL-33 in inflammation and immune regulation、Inflammation and Regeneration 誌、査読有、35巻、2015、69 - 77
<http://doi.org/10.2492/inflammregen.35.069>

〔学会発表〕(計3件)

生谷 尚土、常山 幸一、中江 進、有田 誠、長井 良憲、高津 聖志、IL-33 誘発性血管肥厚における IL-5 産生 ILC2 と好酸球の役割、第36回日本炎症・再生医学会、2015年7月21日~22日、虎の門ヒルズフォーラム(東京都)

生谷 尚土、常山 幸一、長井 良憲、高津 聖志、Roles of IL-5-producing ILC2 in vascular pathogenesis、第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10日~12日、国立京都国際会館(京都府)

生谷 尚土、常山 幸一、長井 良憲、高津 聖志、IL-33 に誘導される血管壁肥厚と IL-5 産生 ILC2、第35回日本炎症・再生医学会、2014年7月1日~4日、万国津梁館(沖縄県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生谷 尚士 (IKUTANI, Masashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・

客員講師

研究者番号：40513718