

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09209

研究課題名(和文) 難治性喘息の病態解明：IL-17Fの意義

研究課題名(英文) Role of IL-17F in severe asthma

研究代表者

川口 未央 (Kawaguchi, Mio)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50365748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：難治性喘息の病態は明らかではない。これまでの報告からインターロイキンIL-17Fは難治性喘息への関与が示唆されているがそのメカニズムは不詳であった。我々は以下を明らかにした。IL-17Fは気道平滑筋細胞からのIL-8の発現を介して難治性喘息に関与する可能性が示唆された。転写伸長因子P-TEFbは難治性喘息の新たな治療標的になるであろう。

研究成果の概要(英文)：IL-17F is involved in the pathogenesis of severe asthma. However, the effects of steroids on the function of IL-17F signaling mechanisms are largely unknown. One of the transcription elongation factors, P-TEFb composed of cyclin T1 and CDK9, is known as a novel checkpoint regulator of gene expression via Brd4. We reported that IL-17F markedly induced the expression of the IL-8 in human airway smooth muscle cells. Pretreatment of CDK9 inhibitor and transfection of siRNAs targeting CDK9 abrogated IL-17F-induced IL-8 production. Transfection of siRNAs targeting Brd4 and cyclin T1 diminished IL-17F-induced phosphorylation of CDK9 and IL-8 production. Moreover, budesonide decreased CDK9 phosphorylation and markedly inhibited IL-17F-induced IL-8 production. P-TEFb is involved in IL-17F-induced IL-8 expression and that steroids diminish it via the inhibition of CDK9 phosphorylation. IL-17F and P-TEFb might be novel therapeutic targets for severe asthma.

研究分野：アレルギー

キーワード：難治性喘息 インターロイキン17F 気道平滑筋 インターロイキン8 P-TEFb ステロイド

## 1. 研究開始当初の背景

難治性喘息の病態には好中球性炎症とステロイド抵抗性が関与している。近年、Th17細胞がこれらの病態に関与することが報告されたがそのメカニズムは不詳である。Th17細胞はIL-17Fを産生することが知られている。2001年に我々はIL-17F(ML-1)を発見した(Kawaguchi et al. J. Immunol. 2001)。さらに2003年にマウスIL-17F(IL-17Ftv)のクローニングにも成功した(GenBank#AB116259)。IL-17Fの機能は多彩であり、様々なサイトカインやケモカインの産生を気道上皮細胞などから誘導することを報告してきた(Kawaguchi et al. J Allergy Clin Immunol. 2004, Kawaguchi et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009, Kawaguchi et al. Clin Exp Allergy. 2010など)。さらに喘息患者の気道でIL-17Fの発現が亢進し(Kawaguchi et al. J Immunol. 2001)、IL-17F遺伝子のアミノ酸変異を伴う一塩基多型7488T/Cが喘息と有意な相関を認め、喘息の重症化に関与することも報告してきた(Kawaguchi et al. J Allergy Clin Immunol. 2006)。このことからIL-17Fが喘息の病態形成に深く関与していることが予想される。一方、これまで気道平滑筋細胞におけるIL-17Fの機能とシグナル伝達経路は全く検討されていない。気道平滑筋細胞は気道収縮のみに関与するだけではなく、サイトカインやケモカインを強力に産生し、積極的に喘息の病態に関与する。これまでの予備実験からIL-17Fがヒト正常気道平滑筋細胞からIL-6、IL-8の産生を誘導し、喘息患者由来の気道平滑筋細胞ではさらにその産生が増強することを発見した。IL-6やIL-8は重症喘息で高発現しており、強力に好中球を気道に遊走させ、活性化させる作用を有している。難治性喘息の病態には好中球性炎症が関与していることからIL-17Fは治療標的となる可能性が示唆される。さらに最近TGF- $\beta$ -activated kinase(TAK)1のステロイド感受性への関与が報告されたがその誘導因子は不明である(Am J Respir Crit Care Med. 2013)。そこでTAK1がIL-17Fによって活性化されると考えた。以上より気道平滑筋細胞の機能におけるIL-17Fの役割を詳細に検討することは難治性喘息の主たる病態である好中球性炎症とステロイド抵抗性の解明と臨床応用につながると思われる。

## 2. 研究の目的

難治性喘息患者の病態を解明することは今日の喘息診療において最重要課題の一つである。難治性喘息には好中球性炎症やステロイド抵抗性が関与するがその分子機構は不明である。2001年に我々が発見したIL-17Fは喘息患者の気道で高発現しており、難治性喘息の病態に深く関与するTh17細胞から産生される。IL-17Fは喘息の治療戦略上重要

な標的分子の一つと考えられるが、その機能的役割の全容は未だ明らかではなく、特に気道平滑筋細胞は全く検討されていない。さらに吸入ステロイド薬(ICS)と長時間作用性2刺激薬(LABA)がIL-17Fの機能に与える効果も不明である。そこで今回、2つの基礎的な研究を立案した。気道平滑筋細胞をIL-17Fで刺激してIL-6,8の発現とその発現機構、ICSとLABAがIL-17Fの機能に与える影響とその分子メカニズムを検討することで難治性喘息の病態解明および治療におけるIL-17Fの意義を明らかにした。

## 3. 研究の方法

研究1-1: IL-17Fによる炎症性サイトカインの発現解析. 6ウェルプレートにまかれた気道平滑筋細胞をヒトリコンビナントIL-17F(10, 100ng/ml)にて4~48時間刺激した。細胞および上清を回収し、細胞からはRNAを抽出し、IL-6, IL-8の遺伝子発現をReal time PCR法で解析した。上清中のIL-6とIL-8蛋白濃度をELISA法で解析した。

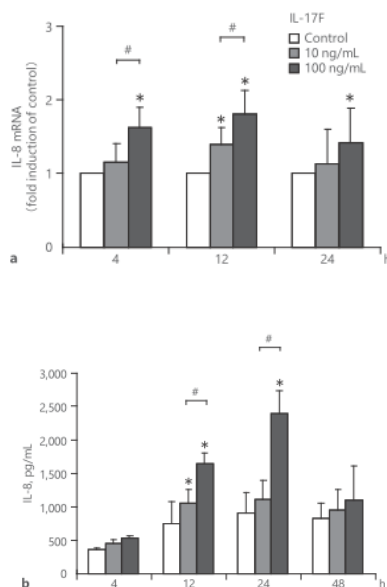
研究1-2: IL-17Fによる細胞内シグナル伝達経路の解析. IL-17FによるTAK1, NF- $\kappa$ B(p65)およびP-TEFb(CDK9)の活性化についてWestern blottingで検討した。ヒトリコンビナントIL-17F(100ng/ml)で6ウェルプレートにまかれた気道平滑筋細胞を0~120分間刺激し、細胞を回収した。その後、TAK1, NF- $\kappa$ B(p65)およびP-TEFb(CDK9)の活性化を各々の抗体と対応するリン酸化抗体を用いてWestern blottingで検討した。メンブレンの撮影はゲル撮影装置を用いた。次に0.1~10 $\mu$ MのTA K1阻害薬(5Z-7-Oxozeaenol)と0.5~5 $\mu$ MのNF- $\kappa$ B阻害薬(Bay-11-7082)で気道平滑筋細胞を1時間前処理し、その後、ヒトリコンビナントIL-17F(100ng/ml)で24~48時間刺激した。次にTAK1, NF- $\kappa$ B, P-TEFbを標的としたsiRNAを気道平滑筋細胞にそれぞれ移入した。移入後にヒトリコンビナントIL-17F(100ng/ml)で24~48時間刺激し、細胞と上清を回収した。研究1-1と同様にIL-17FによるIL-6, IL-8発現への阻害効果をReal time PCR法とELISA法で検討した。さらにTAK1のsiRNAを移入した検体でIL-17FによるNF- $\kappa$ B(p65)およびP-TEFb(CDK9)のリン酸化への抑制効果をWestern blottingで解析し、TAK1-NF- $\kappa$ B(p65), TAK1-P-TEFb(CDK9)経路のつながりを検討した。

研究2: 吸入ステロイド薬のIL-17Fの機能への抑制効果とそのメカニズムの同定. 6

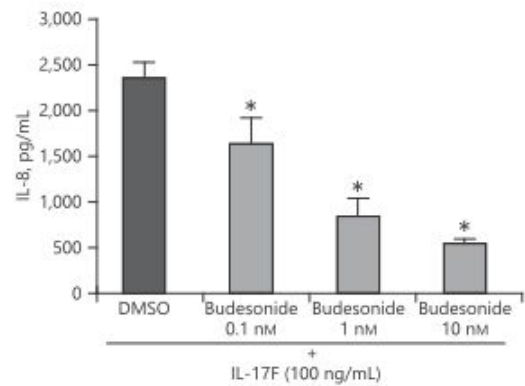
ウェルプレートにまかれた気道平滑筋細胞を ICS (Budesonide : 0.1 ~ 10nM) で前処理し、ヒトリコンピナント IL-17F (100ng/ml) で 4 ~ 48 時間刺激し、細胞および上清を回収した。IL-6, IL-8 の遺伝子発現を Real time PCR 法で、上清中の蛋白発現を ELISA 法にて検討した。次に Budesonide で前処理し、IL-17F (100ng/ml) にて 0 ~ 120 分刺激し、細胞を回収した。細胞溶解液にて細胞抽出液を作成し、SDS-PAGE を行い、Budesonide による NF- $\kappa$ B および P-TEFb (CDK9) の活性化への抑制効果を抗 NF- $\kappa$ B (p65) 抗体、抗 P-TEFb (CDK9) 抗体および対応するリン酸化抗体を用いて Western blotting で検討した。次に P-TEFb (CDK9) の siRNA を気道平滑筋細胞に移入し、Budesonide による IL-17F 刺激により誘導された IL-8 発現への抑制効果が減弱するか IL-8 の遺伝子発現レベルおよび上清中の蛋白濃度で検討した。同様に NF- $\kappa$ B (p65) の siRNA を気道平滑筋細胞に移入し、Budesonide による IL-17F 刺激により誘導された IL-6 発現への抑制効果が減弱するか IL-6 の遺伝子発現レベルおよび上清中の蛋白濃度で検討した。

#### 4. 研究成果

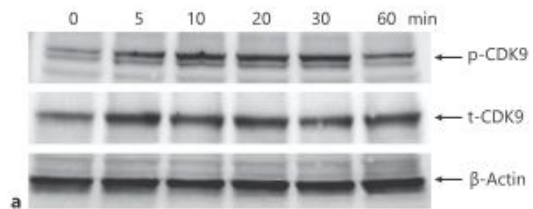
結果の一部を報告する。IL-17F は気道平滑筋細胞から濃度依存的に IL-8 mRNA の発現を誘導し、IL-8 蛋白の産生を刺激後 2 ~ 4 時間をピークに誘導した (下図)。



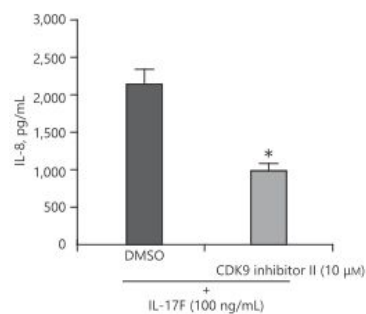
続いてステロイドの抑制効果を検討した。吸入ステロイドで使用される (Budesonide : 0.1 ~ 10nM) は濃度依存的に IL-17F による IL-8 の産生を有意に抑制した (右上)。



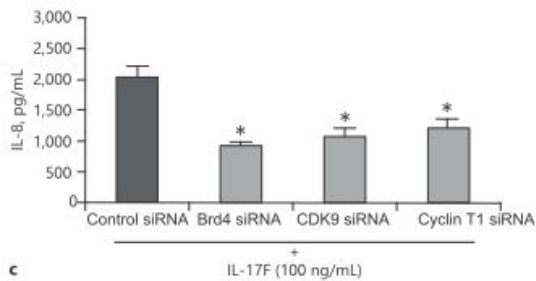
次に転写伸長因子である P-TEFb の構成因子である CDK9 のリン酸化を検討した。その結果、下図のように IL-17F 刺激後 5 分で CDK9 のリン酸化を認め、60 分にはベースラインまでリン酸化が戻った。対照的にトータル CDK9 は各タイムポイントで等しく発現していた (下図)。



次に CDK9 の阻害剤を用いて、IL-8 の発現に対する影響を検討した。その結果、CDK9 阻害剤は有意に IL-17F による IL-8 の産生を抑制したことから P-TEFb は IL-8 の産生に重要な役割を担うことが明らかになった (下図)。

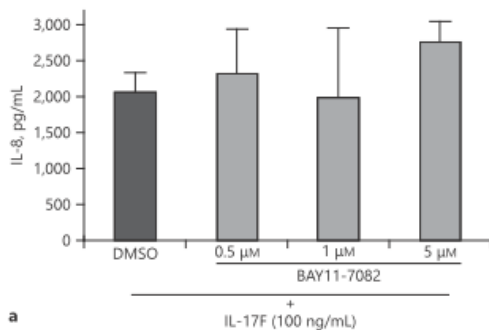


次に P-TEFb の IL-8 産生への関連をさらに詳細に検討するために上流の Brd4、P-TEFb の構成分子である CDK9、Cyclin T をそれぞれ siRNA で阻害するといずれの siRNA も有意に IL-17F による IL-8 の産生を有意に抑制した (下図)。このことから Brd4- P-TEFb 経路が IL-8 産生に重要であることが判明した。

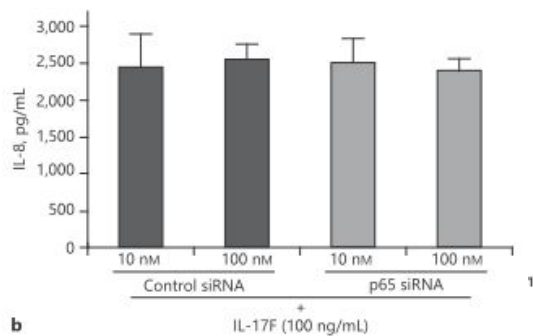


c

次に NF- $\kappa$ B (p65) の関連について検討した。その結果、NF- $\kappa$ B の阻害剤や siRNA は IL-17F による IL-8 の産生を抑制しなかった (下図)。このことから IL-17F による IL-8 の発現に NF- $\kappa$ B の関与は低いと考えられた。

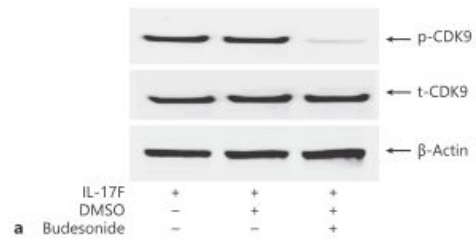


a

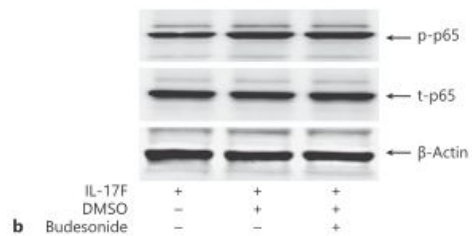


b

最後に Budesonide による CDK9 の活性化への影響を検討した。その結果、Budesonide は CDK9 のリン酸を抑制した。しかしながら Budesonide は NF- $\kappa$ B (p65) の活性化を抑制しなかった。このことからステロイド薬の新たな薬理作用として P-TEFb の活性化を抑制することを我々は明らかにした (右上)。



a



b

以上から難治性喘息において IL-17F や P-TEFb は新たな治療標的になる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Nakajima M, Kawaguchi M, Matsuyama M, Ota K, Fujita J, Matsukura S, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N. Transcription Elongation Factor P-TEFb Is Involved in IL-17F Signaling in Airway Smooth Muscle Cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;176(2):83-90. doi: 10.1159/000488154.

Nakajima M, Kawaguchi M, Ota K, Fujita J, Matsukura S, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N. IL-17F induces IL-6 via TAK1-NF- $\kappa$ B pathway in airway smooth muscle cells. *Immun Inflamm Dis.* 2017;5(2):124-131. doi: 10.1002/iid3.149.

Nakajima M, Kawaguchi M, Watanabe H, Morishima Y, Huang SK, Satoh H, Hizawa N.

Role of IL-17F in the Pathogenesis of Psoriasis. Current Immunology Reviews. 2016;12(2)  
doi:10.2174/1573395513666161214121923.

〔学会発表〕(計6件)

中嶋 真之、太田 恭子、藤田 純一、川口 未央、松倉 聡、塩澤 利博、中澤 健介、増子 裕典、際本 拓未、松野 洋輔、森島 祐子、佐藤 浩昭、坂本 透、檜澤 伸之. IL-17F による気道平滑筋細胞からの IL-6 発現とその分子機構. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会.2017. 5 月.東京.

太田 恭子、川口 未央、中嶋 真之、藤田 純一、國分 二三男、松倉 聡、中澤 健介、塩澤 利博、増子 裕典、際本 拓未、松野 洋輔、森島 祐子、佐藤 浩昭、坂本 透、檜澤 伸之. 気道平滑筋細胞における IL-17F による IL-8 の発現機構. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会.2016. 4 月.京都.

中嶋 真之、川口 未央、藤田 純一、太田 恭子、國分 二三男、松倉 聡、増子 裕典、際本 拓未、松野 洋輔、森島 祐子、佐藤 浩昭、坂本 透、檜澤 伸之. IL-17F による IL-8 の発現機構 : P-TEFb の関与. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会.2016. 6 月.東京.

Mio Kawaguchi, Kyoko Ota, Junichi Fujita, Fumio Kokubu, Yuko Morishima, Satoshi Matsukura, Yukio Ishii, Hiroaki Satoh, Tohru Sakamoto, Nobuyuki Hizawa. IL-17F induces IL-8 in airway smooth muscle cells via NF- B-independent pathway. International Conference of American Thoracic Society.2015.May. Denvor.

藤田 純一、川口 未央、太田 恭子、國分 二三男、松倉 聡、黒川 真嗣、際本 拓未、森島 祐子、石井 幸雄、坂本 透、佐藤 浩昭、檜澤 伸之. 気道平滑筋細胞からの IL-17F による炎症性サイトカインの発現とステロイドの抑制機構. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会.2015. 5 月.東京.

藤田 純一、川口 未央、太田 恭子、國分 二三男、松倉 聡、黒川 真嗣、際本 拓未、

森島 祐子、石井 幸雄、坂本 透、佐藤 浩昭、檜澤伸之. IL-17F による気道平滑筋細胞からのサイトカイン発現とステロイドの抑制効果. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会. 2015.4 月.東京.

〔図書〕(計1件)

川口 未央、中嶋 真之、檜澤 伸之. ウイルス・細菌感染と喘息」に寄せる ウイルス感染による喘息増悪のメカニズム. アレルギーの臨床.36.52-56.2016.北隆館.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川口 未央 (KAWAGUCHI, Mio)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号 : 50365748

### (2)研究協力者

中嶋 真之 (NAKAJIMA, Masayuki )  
藤田 純一 (FUJITA, Junichi )  
太田 恭子 (OTA, Kyoko )  
檜澤 伸之 (HIZAWA, Nobuyuki )