

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591156

研究課題名（和文）重症喘息の病態における IL-17 ファミリーサイトカインの役割の解明

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

研究代表者

氏名（ローマ字）：中島 裕史（Nakajima, Hiroshi）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024

研究成果の概要：

アレルギー性気道炎症における IL-23-Th17 細胞経路の役割を解析し、IL-23 はアレルギー性気道炎症の局所において産生され、Th17 細胞の分化と好中球性炎症を誘導するとともに、Th2 細胞による好酸球性炎症にも促進的に作用すること、一方、Th17 細胞自体も IL-17A 非依存的な機構で Th2 細胞により誘導される好酸球性気道炎症を増強することを明らかにした。近年、Th17 細胞依存性気道炎症はステロイド抵抗性であることが示されており、IL-23-Th17 細胞経路は喘息の重症化/難治化との関係が示唆される。本研究成果により、喘息患者における IL-23-Th17 細胞経路の役割の解明が進み、重症喘息の新規治療法開発へと進展することが期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・感染症内科学

キーワード：気管支喘息、難治化、IL-17、IL-23、Th17 細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は人口の約 4%が罹患する最も頻度の高い重要なアレルギー性呼吸器疾患である。その多くは吸入ステロイドを中心とした既存の治療でコントロール可能であるが、10%が治療抵抗性の重症喘息であり、その病態の解明および治療戦略の確立が急がれている。

2. 研究の目的

本申請研究では、重症喘息の病態に焦点を当て、喘息の重症化を規定する因子の同定とそれに基づく新規治療法の開発を目指した。

特に近年、自然免疫と獲得免疫の両者で重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある IL-17 ファミリーサイトカインに着目し、1) T-bet や STAT 蛋白による IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞(Th17 細胞)の制御機構、2)アレルギー性気道炎症における Th17 細胞の役割とその制御機構を解明し、その作用点をターゲットとした新規治療法開発の基盤構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗原誘発性アレルギー性気道炎症における IL-23 の役割の検討

卵白アルブミン (OVA) を抗原としたマウス喘息モデルを用い、抗原吸入による気道における IL-23 の産生、IL-23 を中和した際の気道炎症に対する影響を検討した。

(2) IL-23 によるアレルギー性気道炎症の誘導機構の検討

肺特異的に IL-23 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、マウス喘息モデルに対する IL-23 過剰発現の影響を検討した。

(3) アレルギー性気道炎症における Th17 細胞の役割の検討

抗原特異的 Th17 細胞を移入したマウスを用いて Th17 細胞のアレルギー性炎症に対する作用を検討した。

(4) Th17 細胞依存性気道炎症に対する T-bet 及び STAT 蛋白の役割の検討

T-bet 欠損マウスで認められるアレルギー性炎症気道炎症の増強に STAT6 や STAT4 が関与しているか否かを T-bet/STAT6 ダブル欠損マウス及び T-bet/STAT4 ダブル欠損マウスを作製して解析した。

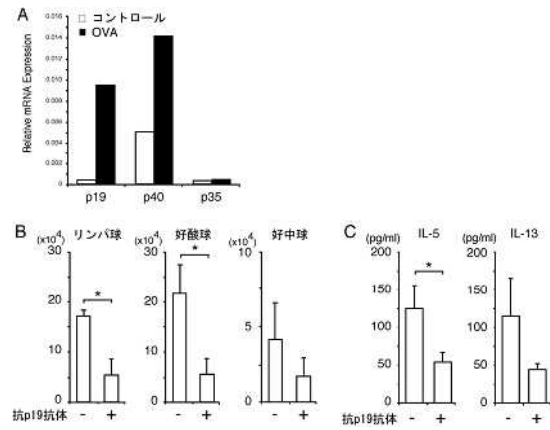
4. 研究成果

(1) 抗原誘発性アレルギー性気道炎症における IL-23 の役割の検討

アレルギー性炎症における IL-23 の関与を明らかにするため、まず本研究者は、アレルギー性気道炎症の局所で IL-23 の発現が誘導されるか否かを検討した。BALB/c マウスを卵白アルブミン (OVA) で腹腔内感作し、その後 OVA を吸入投与し、アレルギー性気道炎症を惹起した。OVA 吸入 2 時間後の肺より mRNA を調整し、IL-23 p19, IL-12 p35, IL-12 p40 の発現を real-time PCR 法により測定した。その結果、IL-23 p19 は、OVA 吸入により強く発現誘導されることが明らかとなった。一方、IL-23 のもう一つのコンポーネントである IL-12 p40 は、OVA 吸入前より発現し、OVA 吸入によりさらに発現が増強した (図 1 A)。他方、IL-12 p40 の発現は、OVA 吸入により誘導されなかった。

次に本研究者は、抗原誘発性気道炎症における IL-23 の役割を明らかにするため、抗原吸入 24 時間前に IL-23 p19 に対する中和抗体を投与し、その気道炎症に対する効果を検討した。その結果、抗 IL-23p19 抗体の投与は、気道への好中球浸潤のみでなく、リンパ球や好酸球の浸潤も有意に抑制した (図 1 B)。また抗 IL-23p19 抗体の投与は、OVA 吸入による IL-5 や IL-13 の産生も抑制した (図 1 C)。これまでに IL-23 は炎症性腸疾患や乾癬など、Th17 細胞による慢性炎症の惹起や遷延化に関与していることが示されていたが、本研究により、IL-23 はアレルギー性気道炎症の局所で産生され、気道炎症に対し促進的に作用することが明らかとなった。

図 1 アレルギー性炎症における IL-23 の役割



(2) IL-23 によるアレルギー性気道炎症の誘導機構の検討

次に本研究者は、IL-23 によるアレルギー性炎症促進の分子機構を明らかにするため、クララ細胞 10kD 蛋白 (CC10) プロモーターの制御下に肺特異的に IL-23 を発現するトランスジェニックマウス (CC10 IL-23 マウス) を作製した。

図 2 アレルギー性炎症に対する IL-23 の作用

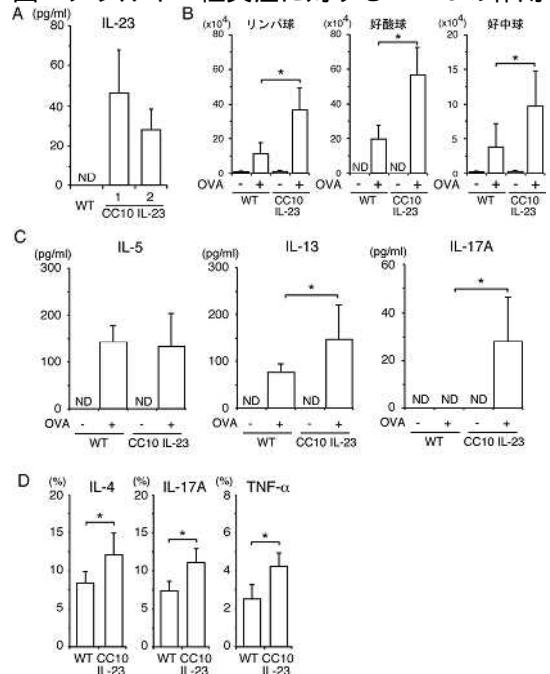
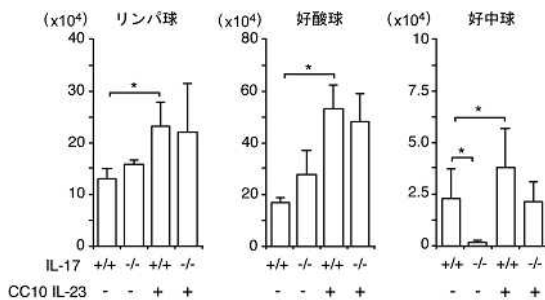


図 2A に示す様に、CC10 IL-23 マウスでは、BALF 中に IL-23 の蛋白発現が確認されたが、このマウスの肺組織は正常であり、IL-23 の発現のみでは気道炎症が惹起されないことが明らかとなった。次に、OVA で感作した CC10 IL-23 マウス及び野生型 (WT) マウスに OVA を吸入投与し、抗原誘発性気道炎症に対する IL-23 の作用を検討した。その結果、CC10 IL-23 マウスでは WT マウスに比して、気道へのリンパ球や好中球の浸潤のみでなく、好酸球の浸潤も増強していた (図 2B)。さらに CC10

IL-23 マウスでは、BALF 中における IL-13 と IL-17A の産生レベルも亢進していた(図 2C)。また、OVA 吸入後の肺組織から純化した単核球分画を抗 CD3 抗体で刺激し、細胞内サイトカイン染色法により CD4 陽性 T 細胞における IL-4、IL-17A、TNF- α の産生細胞比率を検討したところ、CC10 IL-23 マウスでは IL-17A 産生細胞 (Th17 細胞) に加え、IL-4 産生細胞 (Th2 細胞) や TNF- α 産生細胞の増加も認められた(図 2D)。これらの結果から、気道における IL-23 の発現は、Th17 細胞と Th2 細胞の肺への浸潤を促進し、それにより好中球性炎症と好酸球性炎症を増強していることが示唆された。ウイルスや細菌感染により IL-23 の発現が誘導されることが示されており、本機構は感染による喘息悪化への関与も示唆される。

次に CC10 IL-23 マウスにおける好酸球性炎症と好中球性炎症の増強が IL-17A に依存するか否かを明らかにするため、CC10 IL-23 マウスと IL-17A 欠損マウスを交配し CC10 IL-23/IL-17A 欠損マウスを作製し、好酸球性炎症や好中球性炎症の増強が解除されるか否かを検討した(図 3)。その結果、CC10 IL-23/IL-17A 欠損マウスにおいても、CC10 IL-23 マウスと同レベルの好酸球性炎症の増強が認められたが、好中球性炎症は、減弱する傾向が認められた。これらの結果より、IL-23 による好酸球性炎症の増強は、IL-17A 非依存的であることが明らかとなった。

図 3 アレルギー性炎症における IL-23 の役割

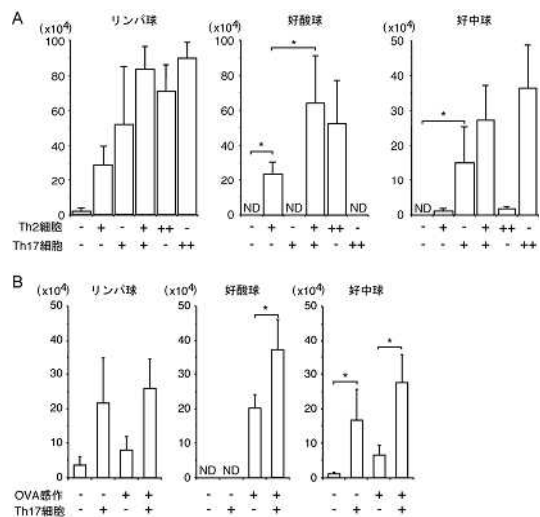


(3) アレルギー性気道炎症における Th17 細胞の役割の検討

抗原吸入後の CC10 IL-23 マウスの気道では Th17 細胞の浸潤が認められること、一方で、CC10 IL-23 マウスにおける好酸球性炎症の増強は IL-17A 非依存的であることより、次に本研究者らは、Th17 細胞が好酸球性気道炎症に対して如何なる作用を示すのかを細胞移入実験により検討した。OVA 特異的な TCR を発現する D011.10 マウスの脾臓 CD4 陽性 T 細胞を IL-6+TGF- β の存在下で、OVA ペプチドで刺激し、その後 IL-23 を加え Th17 細胞を誘導した。並行して IL-4 存在下において OVA 特異的な Th2 細胞を誘導した。OVA 特異的な Th2 細胞と Th17 細胞をそれぞれ単独で、もしくは

は同時に BALB/c マウスに移入し、その後 OVA を吸入投与し気道炎症を誘導した。その結果、既報の通り、OVA 特異的な Th2 細胞を移入したマウスでは、好酸球性炎症が誘導されたが、好中球性炎症は誘導されなかった。一方、OVA 特異的な Th17 細胞を移入したマウスでは、好中球性炎症が誘導されたが、好酸球性炎症は誘導されなかった(図 4A)。しかし、興味深いことに、Th2 細胞と同時に Th17 細胞を移入したマウスでは、好中球性炎症の誘導のみでなく、好酸球性炎症の著明な増強が認められた。

図 4 アレルギー性炎症における Th17 細胞の役割

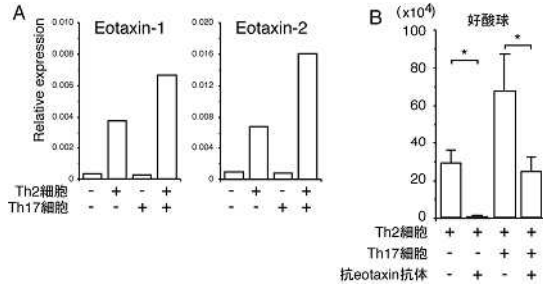


次に、Th2 細胞の感作が成立しているマウスに Th17 細胞を移入することで好酸球性炎症の増強が認められるか否かを検討した(図 4B)。OVA で腹腔内感作した BALB/c マウスに OVA 特異的な Th17 細胞を移入し、その後 OVA を吸入投与した。その結果、OVA で感作したマウスに Th17 細胞を移入すると好中球性炎症の誘導に加え、好酸球性炎症の増強が認められた。一方、非感作マウスに Th17 細胞を移入すると好中球性炎症は誘導されたが好酸球性炎症は誘導されなかった。これらの結果より、Th17 細胞は単独では好酸球性炎症を誘導しないが、Th2 細胞の存在下では、好酸球性炎症を増強することが明らかとなった。

次に Th17 細胞による好酸球性炎症増悪の分子機構を明らかにするため、Th2 細胞と Th17 細胞を移入したマウスにおいて、抗原吸入後の肺組織におけるケモカインの発現を検討した。その結果、既報の通り、Th2 細胞を移入したマウスでは、抗原吸入後に eotaxin-1 と eotaxin-2 の発現誘導が認められたが、Th17 細胞を移入したマウスでは、これらの発現は認められなかった。興味深いことに Th2 細胞と Th17 細胞を同時に移入したマウスでは、eotaxin-1 と eotaxin-2 の発現の増強が認められた(図 5A)。eotaxin-1 と eotaxin-2 は、好酸球の組織浸潤を誘導する

ことが示されており、Th17 細胞による好酸球浸潤増強への関与が示唆される。そこで Th17 細胞による好酸球性炎症の増強に eotaxin-1 と eotaxin-2 が関与しているか否かを明らかにするため、OVA 吸入 24 時間前に eotaxin-1 と eotaxin-2 に対する中和抗体を投与し、その効果を検討した。その結果、eotaxin-1/2 中和抗体の投与により、Th17 細胞による好酸球炎症の増強作用は抑制された(図 5B)。

図 5 Th17 細胞依存性炎症における eotaxin-1/2 の役割

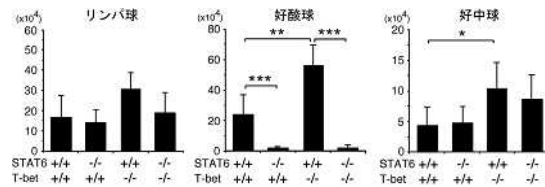


これまでに IL-17A は eotaxin-1、MDC、MCP3 といったケモカイン遺伝子の発現を誘導すること、さらに Th17 細胞の産生する TNF- α も NF- κ B の活性化を介して気道上皮に eotaxin-1 の発現を誘導することが報告されている。eotaxin-1 のプロモーター領域には STAT6 の結合配列が存在し、STAT6 活性化によりその発現が誘導されることも示されている。Th2 細胞由来の IL-13 による STAT6 の活性化と Th17 細胞由来の IL-17A や TNF- α による NF- κ B の活性化が協調することで eotaxin の発現が増強されている可能性が示唆される。

(4) Th17 細胞依存性気道炎症に対する T-bet 及び STAT 蛋白の役割の検討

Glimcher らは、C57BL/6 背景の T-bet 欠損マウスは、ヒト喘息と類似した気道炎症を自然発症すること、さらに喘息患者の肺浸潤 T 細胞では T-bet の発現が低下していることを明らかにし、T-bet の機能不全が喘息の発症に関与している可能性を示した。そこで本研究者らは、気道炎症を自然発症しない BALB/c 背景の T-bet 欠損マウスを用いて、抗原特異的なアレルギー性気道炎症における T-bet の役割を解析した。その結果、T-bet 欠損マウスでは、抗原吸入による好酸球性気道炎症や Th2 サイトカインの産生のみでなく、好中球性気道炎症が野生型マウスに比して増強していた(図 6)。そして T-bet/STAT6 ダブル欠損マウスを用いた解析により T-bet 欠損マウスで認められる好酸球性気道炎症の増強は STAT6 に依存していること、一方、好中球性気道炎症の増強は、STAT6 に非依存的であることが明らかとなった(図 6)。

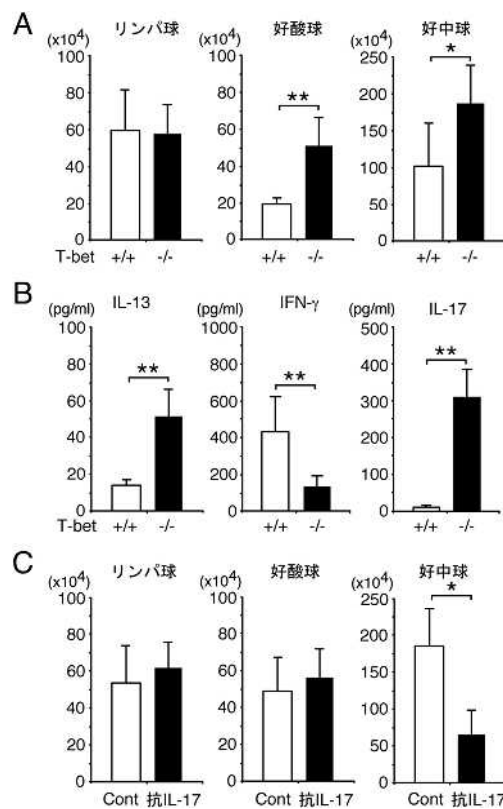
図 6 T-bet/STAT6 ダブル欠損マウスの解析



さらに D011.10 マウス及び D011.10 T-bet 欠損マウスの CD4 陽性 T 細胞を T-bet/Rag-2 ダブル欠損マウスに移入する実験により、抗原特異的な好酸球性気道炎症と好中球性気道炎症の抑制には、CD4 陽性 T 細胞における T-bet の発現が重要であることが明らかとなった(図 7A)。

また、T-bet 欠損マウスの CD4 陽性 T 細胞を移入したマウスでは、肺胞洗浄液中の IL-13 の産生亢進に加え、IL-17 の産生亢進が認められること(図 7B)、抗 IL-17 抗体を用いて IL-17 を中和すると好中球性気道炎症が減弱することが明らかとなった(図 7C)。以上の結果より、T-bet は、Th2 細胞依存的な好酸球性気道炎症の抑制に加え、Th17 細胞依存的な好中球性気道炎症の抑制にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

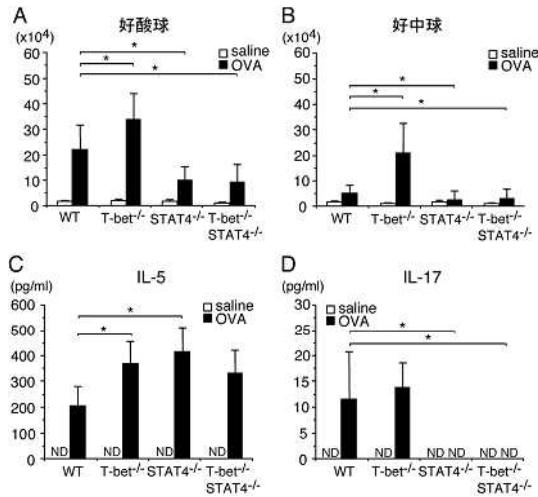
図 7 CD4 陽性 T 細胞における T-bet の役割



最後に T-bet 欠損マウスにおける好酸球性気道炎症や好中球性気道炎症の増強に Th17 細胞の生存維持に重要な役割を果たす STAT4 が関与しているか否かを STAT4 と T-bet のダブル欠損マウスを用いて解析した。その結果、T-bet/STAT4 ダブル欠損マウスでは T-bet 欠

損マウスで認められる好中球性炎症や好酸球性炎症の増強と IL-5 や IL-17 の産生亢進が認められなくなることが明らかとなった(図 8)。

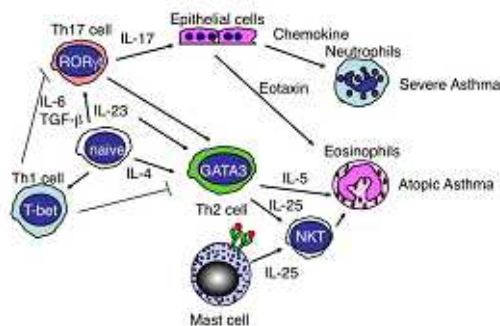
図 8 T-bet/STAT4 ダブル欠損マウスの解析



結語

IL-23-Th17 細胞経路のアレルギー性気道炎症における役割を解析し、IL-23 はアレルギー性気道炎症の局所において産生され、Th17 細胞の分化と好中球性炎症を誘導するとともに、Th2 細胞による好酸球性炎症にも促進的に作用することが明らかとなった(図 9)。一方、Th17 細胞も IL-17A 非依存的な機構で Th2 細胞により誘導される好酸球性気道炎症を増強することが明らかとなった(図 9)。近年、Th17 細胞依存性の気道炎症はステロイド抵抗性であることが報告されており、IL-23-Th17 細胞経路は喘息の重症化/難治化との関係が示唆される。今後、喘息患者における IL-23-Th17 細胞経路の役割の解明が進み、本機構をターゲットとした重症喘息の治療法が開発されることが期待される。

図 9 アレルギー性炎症における IL-17 ファミリーサイトカインの役割



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 11 件)

1. Kagami S, Owada T, Kanari H, Saito Y, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H. Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.* in press. (査読有り)
2. Oya Y, Watanabe N, Owada T, Oki M, Hirose K, Suto A, Kagami S-i, Nakajima H, Kishimoto T, Iwamoto I, Murphy TL, Murphy KM, Saito Y. Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator. *Arthritis Rheum.* 58:2498-2510, 2008. (査読有り)
3. Kagami S-i, Kanari H, Suto A, Fujiwara M, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits proinflammatory cytokine production from murine mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 146:61-66, 2008. (査読有り)
4. Furuta S, Kagami S-I, Tamachi T, Ikeda K, Fujiwara M, Suto A, Hirose K, Watanabe N, Saito Y, Iwamoto I, Nakajima H. Overlapping and distinct roles of STAT4 and T-bet in the regulation of T cell differentiation and allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 180: 6656-6662, 2008. (査読有り)
5. Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S-I, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, Saito Y, Nakayama T, Grusby MJ, Iwamoto I, Nakajima H. Development and characterization of IL-21-producing CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 205:1369-1379, 2008. (査読有り)
6. Hirose K, Wakashin H, Oki M, Kagami S-I, Suto A, Ikeda K, Watanabe N, Iwamoto I, Furuichi Y, Nakajima H. GS143, an IκB ubiquitination inhibitor, inhibits allergic airway inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 374:507-511, 2008. (査読有り)
7. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S-I, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H. IL-23 and Th17 cells enhance Th2 cell-mediated eosinophilic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178:1023-1032, 2008. (査読有り)
8. Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, Iwamura C, Nakajima H, Nakayama T, Taniguchi M. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* 205:2727-2733,

2008. (査読有り)

9. Fujiwara M, Hirose K, Kagami S-I, Takatori H, Wakashin H, Tamachi T, Watanabe N, Saito Y, Iwamoto I, Nakajima H. T-bet inhibits both Th2 cell-mediated eosinophil recruitment and Th17 cell-mediated neutrophil recruitment into the airways. J. Allergy Clin. Immunol. 119: 662-670, 2007. (査読有り)

10. Tamachi T, Watanabe N, Oya Y, Kagami S-I, Hirose K, Saito Y, Iwamoto I, Nakajima H. BTLA inhibits antigen-induced eosinophil recruitment into the airways. Int. Arch. Allergy Immunol. 143: s50-55, 2007. (査読有り)

11. Tokumasa N, Suto A, Kagami S-i, Furuta S, Hirose K, Watanabe N, Saito Y, Shimoda K, Iwamoto I, Nakajima H. Expression of Tyk2 in dendritic cells is required for IL-12, IL-23, and IFN- γ production and the induction of Th1 cell differentiation. Blood. 110: 553-560, 2007. (査読有り)

〔学会発表〕(計 18 件) 主要なものを示す

1. 中島裕史 (2009) IL-23-Th17 細胞経路とアレルギー性気道炎症 第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会教育講演、千葉

2. 廣瀬晃一、若新英史、池田 啓、須藤 明、加々美新一郎、渡邊紀彦、中島裕史 (2008) アレルギー性気道炎症に対する I B 特異的ユビキチン化阻害剤の効果の検討 第 58 回日本アレルギー学会、東京

3. 若新英史、廣瀬晃一、池田 啓、須藤 明、渡邊紀彦、加々美新一郎、岩本逸夫、中島裕史 (2008) アレルギー性炎症機序解明における将来展望 抗原誘発性気道炎症における IL-23/Th17 細胞経路の役割 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京

4. 岩田有史、渡邊紀彦、大和田高義、大矢佳寛、須藤 明、加々美新一郎、廣瀬晃一、中山俊憲、中島裕史 (2008) NKT 細胞における BTLA の役割 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、京都

5. 加々美新一郎、大和田高義、須藤 明、廣瀬晃一、渡邊紀彦、中島裕史 (2008) Th17 細胞及び FoxP3 陽性細胞分化に対する HMG-CoA 還元酵素阻害剤の作用 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、京都

6. 柏熊大輔、須藤 明、岩本逸夫、中島裕史 (2008) CD4 陽性 T 細胞における IL-21 産生制御機構 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、京都

7. 中島裕史 (2008) Development and Characterization of IL-21-producing CD4+ T Cells. 第 4 回日本免疫学会(JSI)-理研免疫アレルギーセンター(RCAI)免疫ワークショップ、山梨

8. 玉地智宏、藤原道雄、高取宏昌、廣瀬晃一、須藤 明、加々美新一郎、渡邊紀彦、齋

藤 康、岩本逸夫、中島裕史 (2007) T-bet および STAT6 によるヘルパー T 細胞分化制御機構の解明 第 57 回日本アレルギー学会

9. 古田俊介、加々美新一郎、須藤 明、廣瀬晃一、渡邊紀彦、岩本逸夫、中島裕史 (2007) アレルギー性気道炎症における Stat4 と T-bet の役割の解明第 37 回日本免疫学会

10. 若新英史、廣瀬晃一、渡邊紀彦、加々美新一郎、幡野雅彦、岩本逸夫、岩倉洋一郎、徳久剛史、中島裕史 (2007) 抗原誘発性気道炎症における IL-17 および IL-23 の役割の解明 第 37 回日本免疫学会、横浜

〔図書〕(計 2 件) 主要なものを示す

1. 若新英史、廣瀬晃一、中島裕史 (2008) アレルギー性気道炎症における IL-23 と Th17 細胞の役割 臨床免疫・アレルギー科 50: 652-659.

2. 須藤明、中島裕史 (2008) CD4 陽性 T 細胞における IL-21 産生制御機構 医学のあゆみ 227: 373-378.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ゲラニルゲラニル化阻害による制御性 T 細胞の分化誘導およびその治療応用
発明者: 中島裕史、加々美新一郎、須藤 明、金成博子

権利者: 千葉大学

番号: 特願 2009-029880 号

出願年月日: 平成 21 年 2 月 1 2 日

国内外の別: 国内出願

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/publication.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 00322024

(2) 研究分担者

須藤 明 (SUTO AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 50447306

渡辺 紀彦 (WATANABE NORIHIKO)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20375653

(3) 連携研究者

なし