

平成21年4月17日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790700
 研究課題名 (和文) 間質性肺炎における炎症性サイトカイン (IL-18) の関与の解明
 研究課題名 (英文) Roles of proinflammatory cytokine (IL-18) in idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者
 岡元昌樹 (OKAMOTO MASAKI)
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号：50352133

研究成果の概要：

本研究でブレオマイシンによる肺障害で死亡した患者の病変部に IL-18 と IL-18 受容体 α 鎖が健常人に比べ強く発現していることが判明した。ブレオマイシンを投与したマウスの肺では F4/80 陽性の好中球が IL-18 を強く産生していた。加えてブレオマイシンを投与したマウスの肺障害は IL-18 欠損 (KO) マウス、IL-18RKO マウス、caspase-1KO マウスでコントロールの野生型マウスに比べ有意に抑制されていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器病学

キーワード：間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

これまで肺障害・間質性肺炎動物モデルは外来物質、例えば超大量(例 100mg/kg iv 投与)のブレオマイシンを投与するブレオマイシン肺炎やシリカ吸入肺炎モデルぐらいしかなかった。申請者は IL-18 と IL-2 の連日投与で誘導される致死性間質性肺炎モデルを確立した。特発性間質性肺炎(IPF)患者の肺病変部に著明な IL-18 およびその受容体である IL-18R α 鎖の発現著明に認められることを報告した。また Tet on system を用いて肺特

異的に成熟マウスに IL-18 を発現させると間質性肺炎が誘導された。ブレオマイシンやイレッサによる致死性の肺障害患者の肺局所で IL-18 と IL-18 受容体が著明に発現していた(現在論文 Epub で公表)。これらの事実は炎症性サイトカイン、特に IL-18 が肺障害・間質性肺炎の病変形成に関与している可能性が極めて高い。我々が樹立した致死性間質性肺炎モデル、肺特異的発現 TG マウス等のマウスモデルと ARDS を含む急性肺障害や間質性肺炎(例えば IPF, NSIP, LIP, 膠原病肺)患者と比較検討することでヒト間質性肺

炎の病態が解明できる可能性がある。また申請者によって樹立されたヒト間質性肺炎マウスモデルの特徴は内因性物質(炎症性サイトカイン)である IL-18 により肺障害・間質性肺炎が誘導されるということである。それゆえこの IL-18 による間質性肺炎モデルは間質性肺炎の原因解明に非常に有用なだけでなく IL-18 のシグナルを制御することがこの疾患の治療への応用が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

① 研究の全体構想および本研究課題の具体的な目的

申請者が樹立した IL-18/IL-2 で誘導される新規間質性肺炎マウスモデル、肺特異的発現 transgenic(TG)マウス、knock-down(KD)マウス等の遺伝子改変マウスと間質性肺炎患者検体を用い間質性肺炎の原因解明と新しい間質性肺炎治療薬を開発することを目標とする。

② 当該分野におけるこの研究(計画)の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

これまで肺障害・間質性肺炎動物モデルは外来物質、例えば超大量(例 100mg/kg iv 投与)のブレオマイシンを投与するブレオマイシン肺炎やシリカ吸入肺炎モデルぐらいしかなかった。申請者は IL-18 と IL-2 の連日投与で誘導される致死性間質性肺炎モデルを確立した。特発性間質性肺炎(IPF)患者の肺病変部に著明な IL-18 およびその受容体である IL-18R α 鎖の発現著明に認められることを報告した。また Tet on system を用いて肺特異的に成熟マウスに IL-18 を発現させると間質性肺炎が誘導された。ブレオマイシンやイレッサによる致死性の肺障害患者の肺局所で IL-18 と IL-18 受容体が著明に発現していた。これらの事実は炎症性サイトカイン、特に IL-18 が肺障害・間質性肺炎の病変形成に関与している可能性が極めて高い。我々が樹立した致死性間質性肺炎モデル、肺特異的発現 TG マウス等のマウスモデルと ARDS を含む急性肺障害や間質性肺炎(例えば IPF, NSIP, LIP, 膠原病肺)患者と比較検討することでヒト間質性肺炎の病態が解明できる可能性がある。また申請者によって樹立されたヒト間質性肺炎マウスモデルの特徴は内因性物質(炎症性サイトカイン)である IL-18 により肺障害・間質性肺炎が誘導されるということである。それゆえこの IL-18 による間質性肺炎モデルは間質性肺炎の原因解明に非常に有用なだけでなく IL-18 のシグナルを制御することがこの疾患の治療への応用が期待できると考えられる。

本研究は新たな間質性肺炎に関する研究の創造だけでなく IL-18 阻害薬が肺傷害・間質性肺炎の新規治療薬への期待ができるので本研究を申請する。

③ 国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

数多くの研究者により IL-18 は IL-12 と協同し Th2 誘導を抑制し Th1 型サイトカイン(IFN-g)産生及び Th1 型細胞への分化を強力に誘導すると考えられていた。しかし我々と兵庫医大の中西らによって別々に IL-18 が Th1 誘導だけでなく Th2 誘導及び IgE, IgG1 産生誘導に関与していると報告した(文献 3,4)。申請者らは久留米大学で *in vivo* における IL-18 の役割解析のため immunoglobulin プロモーターを用いて世界初の IL-18 transgenic マウスを樹立した。これらの結果より IL-18 は Th1, Th2 の両方の分化誘導に関与していることが判明した。また我々を含む最近の研究で間質性肺炎、骨粗鬆症、感染症、アレルギー性皮膚炎、動脈硬化、膠原病等の疾患に IL-18 の関与が明らかになった(文献 6,7)。IL-18 を単独でマウスに投与すると抗原非特異的に IgE, IgG1 産生が誘導される。IL-18, IL-2 を同時に投与すると IgE, IgG1 産生が著明に増強される。ところが IL-18, IL-2 を同時に連日投与するとマウスが致死反応を起こすことに気付いた。そこで C57BL/6 マウス等に IL-18, IL-2 を併用か単独で連日腹腔内投与した。その結果、併用投与群のみに、肺間質の炎症とマウスの致死反応が観察された。この IL-18/IL-2 によって誘導される致死の変化は肺特異的に起こる。そこで我々は“間質性肺炎・肺障害の病因に酸化ストレスが関与する”という作業仮説をたて redox 蛋白チオレドキシシン(TRX)が IL-18/IL-2 とブレオマイシンが誘導する2つの間質性肺炎・肺障害モデルを抑制することを米国呼吸器学会誌に報告した。この論文は掲載号の editorial でも取り上げられ表紙を飾った。

3. 研究の方法

薬剤性肺障害患者の病変部、血清、呼気中及び BALF の IL-18 に関する解析

1. 抗 IL-18 抗体の樹立

我々はすでに RT-PCR 法を用いてマウス及びヒト IL-18 の cDNA を作製した。これを発現ベクター pQE30(キアゲン製)に組み込みリコンビナントマウス及びヒト IL-18 を大量に作製した。このリコンビナント蛋白を免疫原にして免疫組織染色及び *intra cellular staining* が可能な抗マウス及びヒト IL-18 抗体を作製した。

2. 患者肺組織の炎症性サイトカイン IL-18 の肺病変部での発現検討

ARDS を含む急性肺障害や間質性肺炎 (例えば IPF, NSIP, LIP, 膠原病肺) 患者 20-40 名 (目標) の剖検肺及び摘出肺組織のパラフィンブロックを作製。各パラフィン切片から組織染色用に未染スライドを 7 から 10 枚ずつ作製。これを用いて炎症性サイトカイン IL-18 の発現を我々のグループが自前で作製した抗 IL-18(clone 8), IL-18R α (H44) 抗体で免疫化学染色を行った。同時に患者の血清、呼気中及び BALF の IL-18 と TRX を樹立した ELISA にて解析した。

3. 遺伝子改変マウスを用いたブレオマイシンは肺障害の解析

ブレオマイシンを投与したマウスの肺障害は IL-18 欠損 (KO) マウス、IL-18RKO マウス、caspase-1KO マウスでブレオマイシンは肺障害を解析した。

4. 研究成果

ブレオマイシンによる肺障害で死亡した患者の病変部に IL-18 と IL-18 受容体 α 鎖が健康人に比べ強く発現していることが判明した。ブレオマイシンを投与したマウスの肺では F4/80 陽性の好中球が IL-18 を強く産生していた。加えてブレオマイシンを投与したマウスの肺障害は IL-18 欠損 (KO) マウス、IL-18RKO マウス、caspase-1KO マウスでコントロールの野生型マウスに比べ有意に抑制されていた。(子細は AJRCMB に報告)

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 15 件)

1. Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, Kato S, Young HA, Aizawa H. Role of proinflammatory cytokine il-18 and il-1 β in bleomycin-induced lung injury in humans and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009. 査読有り

2. Hoshino T, Okamoto M, Takei S, Sakazaki Y, Iwanaga T, Aizawa H. Redox-regulated mechanisms in asthma. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(4):769-783. 査読有り

3. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kato S, Iwasaki H, Watanabe K, Aizawa H.

Interleukin-18 production and pulmonary function in copd. *Eur Respir J* 2008;31(2):287-297. 査読有り

4. Inoue H, Hiraoka K, Hoshino T, Okamoto M, Iwanaga T, Zenmyo M, Shoda T, Aizawa H, Nagata K. High levels of serum il-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis. *Bone* 2008;42(6):1102-1110. 査読有り

5. 木下隆, 東公一, 岡元昌樹, 池田二郎, 星野友昭, 岩永知秋, 相澤久道. 当院における間質性肺炎合併肺癌の予後と治療についての検討. 日本呼吸器学会雑誌 2008;46(増刊):208. 査読なし

6. 木下隆, 東公一, 岡元昌樹, 今村陽平, 池田二郎, 藤本公則, 相澤久道. 当院における間質性肺炎合併肺癌における予後と治療についての検討. 肺癌 2008;48(5):635. 査読なし

7. 東公一, 岡元昌樹, 木下隆, 池田二郎, 相澤久道. シスプラチン、ドセタキセル、放射線同時併用療法を行った局所進行非小細胞肺癌患者における ercc1, tubulin の発現と無増悪および全生存期間の検討. 日本呼吸器学会雑誌 2008;46(増刊):292. 査読なし

8. 太田昭一郎, 岡元昌樹, 内田賢, 星野友昭, 白石裕士, 大島孝一, 相澤久道, 出原賢治. 特発性間質性肺炎における細胞外マトリクス分子 periostin 発現解析の意義. 臨床病理 2008;56(補冊):151. 査読なし

9. 坂崎優樹, 星野友昭, 武井仁子, 今岡治樹, 木下隆, 岡元昌樹, 川山智隆, 岩永知秋, 相澤久道. 喘息死患者の肺病変部における il-18 の発現. 日本呼吸器学会雑誌 2008;46(増刊):145. 査読なし

10. 坂崎優樹, 星野友昭, 武井仁子, 今岡治樹, 木下隆, 岡元昌樹, 川山智隆, 岩永知秋, 相澤久道. 喘息死患者の肺病変部における t 細胞サブセットとサイトカイン発現の解析. アレルギー 2008;57(3-4):443. 査読なし

11. 岩田安弘, 岡元昌樹, 星野友昭, 北里裕彦, 岩永知秋, 相澤久道. 特発性肺線維症と非特異性間質性肺炎におけるレドックス活性蛋白 thioredoxin 1 の発現の検討. 日本呼吸器学会雑誌 2008;46(増刊):274. 査読なし

12. 岡元昌樹, 東公一, 星野友昭, 池田二

郎, 戸田玲子, 今岡治樹, 木下隆, 岩永知秋, 相澤久道. 血清 il-18 値は、進行性非小細胞癌における予後予測因子である. 日本呼吸器学会雑誌 2008;46(増刊):299. 査読なし

13. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Sakazaki Y, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Iwanaga T, et al. Effects of thioredoxin on established airway remodeling in a chronic antigen exposure asthma model. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;360(3):525-530. 査読有り

14. Karube K, Suzumiya J, Okamoto M, Takeshita M, Maeda K, Sakaguchi M, Inada T, Tsushima H, Kikuchi M, Ohshima K. Adult t-cell lymphoma/leukemia with angioimmunoblastic t-cell lymphomalike features: Report of 11 cases. *Am J Surg Pathol* 2007;31(2):216-223. 査読有り

15. Kinoshita T, Hoshino T, Imaoka H, Ichiki H, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Aizawa H. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(3):712-719. 査読有り

[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]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/imed1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡元昌樹 (OKAMOTO MASAKI)
久留米大学・医学部・助教

研究者番号 : 503252133

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :