

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08637

研究課題名(和文) IL-18, IL-38と補体制御による炎症性肺疾患の治療の研究

研究課題名(英文) Regulation of IL-18, IL-38 and complements for the treatment of inflammatory pulmonary diseases

研究代表者

星野 友昭 (Hoshino, Tomoaki)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：00261066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：IL-38は喘息患者ではIL-38は炎症を誘導するサイトカインであることが示唆された。IL-38はマウス坦がん(tumor bearing)モデルでCD8(+) tumor-infiltrating lymphocyteを抑制してがんを増殖することを報告した。潰瘍性大腸炎(UC)の活動型粘膜にIL-38 mRNAと蛋白が強発現していた。一方、クローン病ではIL-38はほとんど発現していなかった。Dextran sulfate sodium(DSS)で誘導したマウスIBDモデルでIL-38はIL-36が誘導する炎症を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息、癌、炎症性腸疾患の克服は大きな課題である。本研究では、これら疾患におけるサイトカインIL-38と炎症の制御を研究した。マウス喘息モデル、坦がん(tumor bearing)モデルとDextran sulfate sodium(DSS)で誘導した炎症性腸疾患モデルでサイトカインIL-38は炎症を制御することを示した。サイトカインの制御は喘息、癌、炎症性腸疾患の治療に応用できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Interleukin (IL)-38 was discovered in 2001 and is a member of the IL-1 family of cytokines. IL-38 shows anti-inflammatory activity in several inflammatory diseases. We reported that IL-38 may enhance airway eosinophilic inflammation in asthma through IL-5 induction. We demonstrated that high IL-38 expression in tumor cells was significantly associated with reduction of CD8(+) TILs and tumor progression. These results suggest that IL-38 could be a therapeutic target for lung cancer. The IL-38 mRNA and protein expression were enhanced in the active mucosa of ulcerative colitis (UC), but not in Crohn's disease. DSS-colitis was significantly exacerbated in IL-38KO mice compared to wild type mice. IL-38 may play an anti-inflammatory and protective role in the pathophysiology of IBD, in particular ulcerative colitis, through the suppression of IL-36-induced inflammatory responses.

研究分野：内科

キーワード：炎症 IL-38

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者や他の研究グループにより IL-1 ファミリーサイトカイン IL-1 α/β , IL-18, IL-33, IL-36, IL-37, IL-38 がマクロファージ、Th1 細胞、Th2 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、 γ/δ T 細胞を活性化することは判明した^{1,2}。しかしながら、IL-1 ファミリーサイトカインの好中球炎症における役割は現在でも不明である。Iwakura らによって発見された補体の内因性抑制因子(C1q/TNF-related protein 6, CTRP6, C1qtnf6)で補体の副経路を抑制し、RA モデルマウスの関節の好中球炎症を改善する可能性を示唆した(Nature Communication 2015)。

2. 研究の目的

炎症性サイトカイン IL-1 ファミリー、とりわけ IL-18 と IL-38 が IL-17A, IL-36 シグナルを活性化し、好酸球炎症を誘導すると考えられている。本研究では IL-18 と IL-38 が好中球炎症にも関与しているという作業仮説を持った。本研究では、IL-18, IL-38 と補体の制御による炎症性疾患の治療の研究を行う。

3. 研究の方法

抗ヒト IL-38 モノクローナル抗体の樹立し免疫染色 (IHC) を行う

喘息モデルマウスを用いた気道炎症の解析

● 喘息モデルマウス

day0 と day5 に鶏卵由来 OVA (OVA, grade V, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) 10ug を腹腔内投与し、day18 に超音波ネブライザーを用いて 5%OVA(非 OVA 曝露群は生食) を 20 分間吸入させる。

● 気道過敏性(AHR)測定

全身麻酔下に気管剖出、気管挿管、人工換気を行い、超音波ネブライザーを使用しアセチルコリン吸入負荷(0.625mg/ml から段階的に濃度を上げて 160 mg/ml まで 9 段階)を行い、log-linear interpolation で PC200(気道内圧がベースラインの 2 倍になるアセチルコリン濃度)を算出する。気道過敏性測定は呼吸機能測定器(Finepointe シリーズ, BUXCO 社)を用いて測定する。

● 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞数、細胞分画測定

全身麻酔下に気管剖出、気管挿管する。生食を自然滴下させ滴下が止まったところで 1ml シリンジにて陰圧をかけて回収する。それを 3 回繰り返し回収した肺胞洗浄液(約 3ml)を用いて細胞数測定およびメイギムザ染色し、細胞分画を測定する。同時にフローサイトメトリーでも解析を行う。

COPDモデルマウスを用いた肺気腫、炎症の解析

- COPDモデルマウスにはSPCプロモーターを用いた肺特異的IL-18トランスジェニックマウス（以下SPC-IL-18 TG）を用いる。このSPC-IL-18 TGマウスはIL-13依存性に炎症細胞を伴った肺気腫を誘導する(American journal of respiratory and critical care medicine. 2007; 176: 49-62.)。

- 補体の抑制によるCOPDの抑制実験

SPC-IL-18 TG マウスとC1qtnf6 欠損マウス、補体 C3 欠損マウス、C1qtnf6, C3 ダブル欠損マウス、CAG プロモーターを用いた全身発現型 C1qtnf6 過剰発現マウスをバッククロスする。補体の抑制による COPD の抑制実験を行う。生後、4,8, 12 週間後に以下の評価を行う。

- a) 気腫化の程度の比較（病理学的解析）、肺のコラーゲン量の測定
- b) 静的肺コンプライアンスの測定
- c) 免疫染色法を用いた肺局所における炎症性サイトカイン発現の局在の解析
- d) 血清中及びBAL液中の好中球機能、炎症細胞、炎症性サイトカイン及びキチナーゼ様蛋白の測定

新規高感度マルチプレックスアッセイの樹立

一般にサイトカイン等の血清タンパクの ELISA 法による検出限界値は数 pg から 100pg per mL であることが多い。そこで、電気化学発光法（メソスケール ECL システム）を用いて新規高感度 IL-38 マルチプレックスアッセイを樹立する。

4. 研究成果

喘息と IL-38

本研究でマウス抗ヒト IL-38 モノクローナル抗体 H127C を樹立した。H127C を用いて免疫染色（IHC）を行った。喘息死患者では肺の病変部に IL-38 が強く発現していた（図 1 A）。IL-38 の発現は喘息死患者では肺の病変部の好酸球数と相関していた（図 1 B）。C56/BL6 バックグラウンドの IL-38 欠損マウスを用いて喘息モデルマウスを用いた気道炎症の解析を行った。IL-38 欠損マウスでは肺において IL-5 の発現が減少し、好酸球性の炎症が抑制された。興味深いことに、IL-38 は抗炎症性サイトカインの機能を持つだけでなく、喘息患者で IL-38 は炎症を誘導するサイトカイン（pro-inflammatory cytokine）であることが示唆された³。

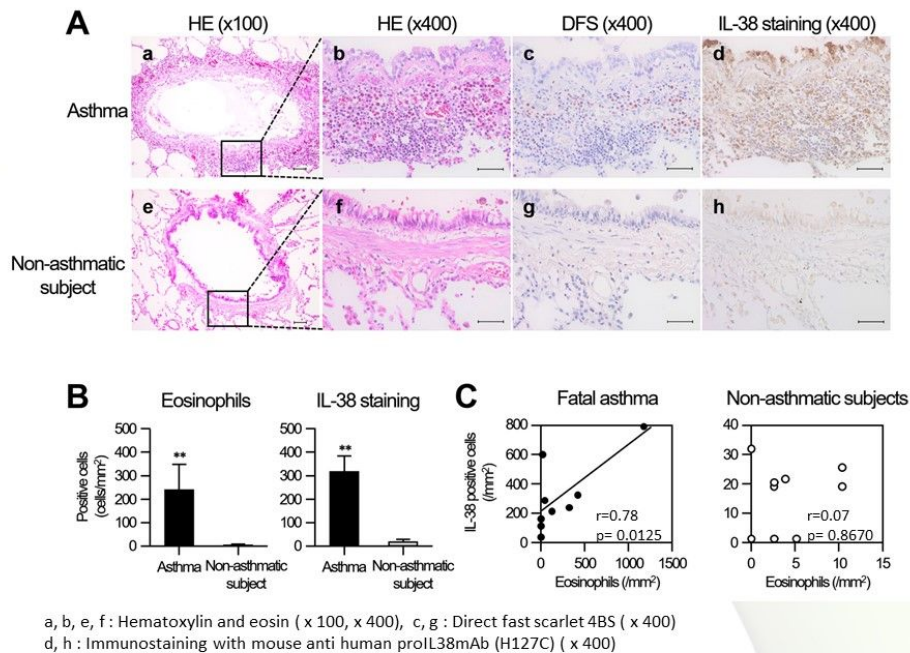


図1. 喘息死患者では肺病変部にIL-38が強く発現し好酸球数と相関していた

IL-38 と癌

IL-38 はマウスタンがん (tumor bearing) モデルで CD8(+) tumor-infiltrating lymphocyte を抑制してがんを増殖することを報告した⁴。

IL-38 と炎症性腸疾患 (IBD)

IBDにおけるIL-38の役割をIBD患者検体とIBDマウスモデルで検討した。潰瘍性大腸炎 (UC) の活動型粘膜にIL-38 mRNA と蛋白が強発現していた。一方、クローン病ではIL-38はほとんど発現していなかった。Dextran sulfate sodium(DSS)で誘導したマウスIBDモデルでIL-38はIL-36が誘導する炎症を抑制した⁵。

新規高感度マルチプレックスアッセイの樹立

電気化学発光法 (メソスケール ECL システム) を用いて新規高感度 IL-38 マルチプレックスアッセイを樹立した (未発表)。

喘息モデルにおける補体の役割の役割の検討

上記補体の内因性抑制因子 (C1q/TNF-related protein 6, CTRP6, C1qtnf6) で補体の副経路を抑制し、RAモデルマウスの関節の好中球炎症を改善する可能性を示唆した⁶。

そこで本研究では野生型 (WT) マウス, 補体 C3 欠損マウスと C1qtnf6 欠損マウス用いた喘息モデルマウスで肺の炎症を検討した。day0 と day5 に鶏卵由来 OVA (OVA, grade V, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) 10ug を腹腔内投与し、day18 に超音波ネブライザーを用いて 5% OVA (非 OVA 曝露群は生食 saline) を 20 分間吸入させる。N=8 から 9 とした。

結果: 肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数、好中球数、マクロファージと好酸球は OVA/OVA 群で C3KO は WT より減少傾向であった。しかし有意差はない (図 2)。

また、C1qtnf6KO マウスも有意な変化は無かった。よって、この喘息モデルでは補体 C3

と C1qtnf はあまり関与していないと考えている（未発表）。

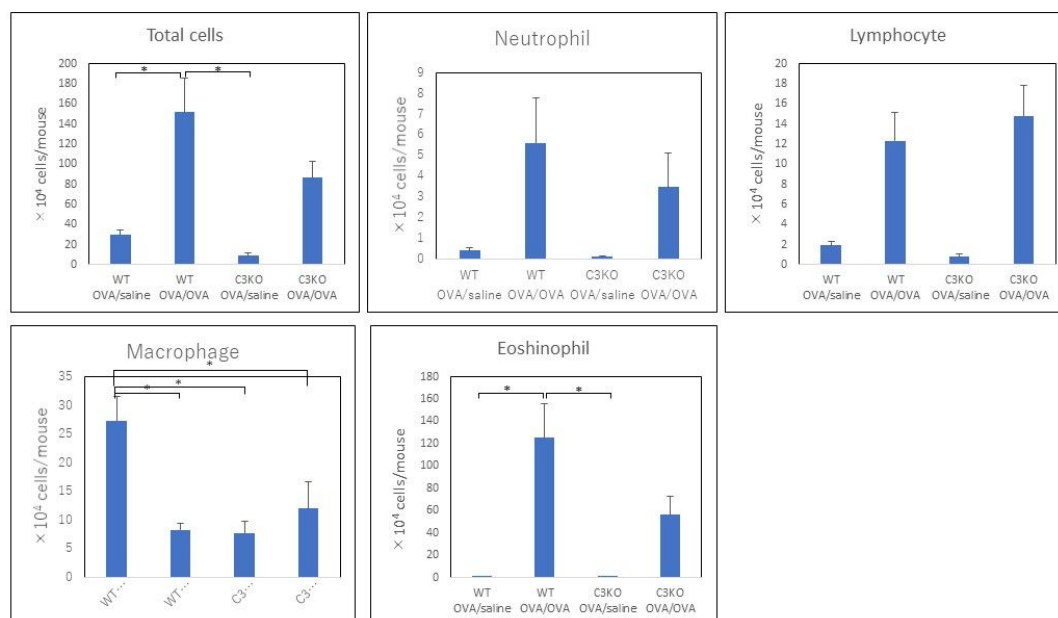


図 2. C3KOマウスを用いた喘息モデルの解析

< 参考文献 >

1. Kawayama T, Okamoto M, Imaoka H, Kato S, Young HA, Hoshino T. Interleukin-18 in pulmonary inflammatory diseases. *J Interferon Cytokine Res* 2012; **32**: 443-9.
2. van de Veerdonk FL, de Graaf DM, Joosten LA, Dinarello CA. Biology of il-38 and its role in disease. *Immunol Rev* 2018; **281**: 191-96.
3. Matsuoka M, Kawayama T, Tominaga M, Kaieda S, Tokunaga Y, Kaku Y, et al. Attenuated airway eosinophilic inflammations in il-38 knockout mouse model. *Kurume Med J* 2019; **65**: 37-46.
4. Kinoshita F, Tagawa T, Akamine T, Takada K, Yamada Y, Oku Y, et al. Interleukin-38 promotes tumor growth through regulation of cd8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2021; **70**: 123-35.
5. Ohno M, Imai T, Chatani M, Nishida A, Inatomi O, Kawahara M, et al. The anti-inflammatory and protective role of interleukin-38 in inflammatory bowel disease. *J Clin Biochem Nutr* 2022; **70**: 64-71.
6. Murayama MA, Kakuta S, Inoue A, Umeda N, Yonezawa T, Maruhashi T, et al. Ctrp6 is an endogenous complement regulator that can effectively treat induced arthritis. *Nat Commun* 2015; **6**: 8483.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kinoshita Fumihiko, Tagawa Tetsuzo, Akamine Takaki, Takada Kazuki, Yamada Yuichi, Oku Yuka, Kosai Keisuke, Ono Yuki, Tanaka Kensuke, Wakasu Sho, Oba Taro, Osoegawa Atsushi, Shimokawa Mototsugu, Oda Yoshinao, Hoshino Tomoaki, Mori Masaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Interleukin-38 promotes tumor growth through regulation of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer tumor microenvironment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 123 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02659-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yano Chiyo, Kawayama Tomotaka, Kinoshita Takashi, Tokunaga Yoshihisa, Sasaki Jun, Sakazaki Yuki, Matsuoka Masanobu, Imaoka Haruki, Nishiyama Mamoru, Matsunaga Kazuko, Furukawa Kyoji, Hoshino Tomoaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Overweight improves long-term survival in Japanese patients with asthma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 201 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Hidenobu, Azuma Koichi, Kawahara Akihiko, Matsuo Norikazu, Tokito Takaaki, Hoshino Tomoaki	4. 巻 39
2. 論文標題 Atezolizumab plus carboplatin and etoposide in small cell lung cancer patients previously treated with platinum-based chemotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigational New Drugs	6. 最初と最後の頁 269 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10637-020-00983-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Hidenobu, Azuma Koichi, Kawahara Akihiko, Kinoshita Takashi, Matsuo Norikazu, Naito Yoshiko, Tokito Takaaki, Yamada Kazuhiko, Akiba Jun, Hoshino Tomoaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Predictive value of CD73 expression for the efficacy of immune checkpoint inhibitors in NSCLC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 950 ~ 955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogata-Suetsugu Saiko, Hamada Naoki, Tsuda Toru, Takata Shohei, Kitasato Yasuhiko, Inoue Naoyuki, Nagata Nobuhiko, Yatera Kazuhiro, Mukae Hiroshi, Yoshii Chiharu, Hoshino Tomoaki, Fujita Masaki, Watanabe Kentaro, Tokunaga Shoji, Nakanishi Yoichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Characteristics of tobacco-related lung diseases in Fukuoka Prefecture, Japan: A prospective, multi-institutional, observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 74 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2019.10.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogata-Suetsugu Saiko, Hamada Naoki, Tsuda Toru, Takata Shohei, Kitasato Yasuhiko, Inoue Naoyuki, Nagata Nobuhiko, Yatera Kazuhiro, Mukae Hiroshi, Yoshii Chiharu, Hoshino Tomoaki, Fujita Masaki, Watanabe Kentaro, Tokunaga Shoji, Nakanishi Yoichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Characteristics of tobacco-related lung diseases in Fukuoka Prefecture, Japan: A prospective, multi-institutional, observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 74 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2019.10.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Hidenobu, Azuma Koichi, Sakai Kazuko, Naito Yoshiko, Matsuo Norikazu, Tokito Takaaki, Yamada Kazuhiko, Hoshino Tomoaki, Nishio Kazuto	4. 巻 10
2. 論文標題 Determination of Somatic Mutations and Tumor Mutation Burden in Plasma by CAPP-Seq during Afatinib Treatment in NSCLC Patients Resistance to Osimertinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 57624-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57624-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Hidenobu, Azuma Koichi, Kawahara Akihiko, Kinoshita Takashi, Matsuo Norikazu, Naito Yoshiko, Tokito Takaaki, Yamada Kazuhiko, Akiba Jun, Hoshino Tomoaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Predictive value of CD73 expression for the efficacy of immune checkpoint inhibitors in NSCLC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 950 ~ 955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13346	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toyama Takayuki, Kawayama Tomotaka, Kinoshita Takashi, Imamura Yohei, Yoshida Makoto, Takahashi Koichiro, Fujii Kazuhiko, Higashimoto Ikkou, Hoshino Tomoaki	4. 巻 58
2. 論文標題 Differences in Adherence Barriers to Inhaled Medicines between Japanese Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma Evaluated using the "Adherence Starts with Knowledge 20" (ASK-20) Questionnaire	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 175 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.0488-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tokunaga Yoshihisa, Imaoka Haruki, Kaku Yoichiro, Kawayama Tomotaka, Hoshino Tomoaki	4. 巻 123
2. 論文標題 The significance of CD163-expressing macrophages in asthma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Allergy, Asthma & Immunology	6. 最初と最後の頁 263 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anai.2019.05.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------