

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18891

研究課題名(和文)慢性重症アレルギー性結膜炎におけるIL-25とiILC2の機能解析

研究課題名(英文)Role of IL-25 and iILC2 in chronic severe allergic conjunctivitis

研究代表者

浅田 洋輔 (Asada, Yosuke)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70596626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はアレルギー性角結膜炎における慢性化および重症化におけるIL-25の役割を明らかにすることである。IL-25シグナルがアレルギー性角結膜炎の慢性化ならびに重症化に重要ではないかとの仮説を着想し、新たに慢性アレルギー性結膜炎モデルを作成した。また、結膜内にあるTuft細胞のマーカーである抗-DCAMKL1抗体とIL-25抗体を用い、結膜におけるTuft細胞の局在ならびにIL-25染色を行い、慢性アレルギー性結膜炎マウスモデルのマウス結膜にはIL-25並びにtuft細胞が存在することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-25と慢性重症アレルギー性角結膜炎の病態成立との関連を調べた先行研究はないため、IL-25シグナルがアレルギー性角結膜炎の慢性化ならびに重症化に重要ではないかとの仮説を着想し、新たに慢性アレルギー性結膜炎モデルを作成した。また、Tuft細胞のマーカーである抗-DCAMKL1抗体とIL-25抗体を用い、結膜におけるTuft細胞の局在ならびにIL-25染色を行い、慢性アレルギー性結膜炎マウスモデルのマウス結膜にはIL-25並びにtuft細胞が存在することが判明した。アレルギー性結膜炎の病態の一部にIL-25が関与していることが明らかになり、IL-25を抑制することが治療となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the role of IL-25 in the chronicity and severity of allergic keratoconjunctivitis. Using anti-DCAMKL1 and IL-25 antibodies, which are markers of Tuft cells in the conjunctiva, we localized Tuft cells in the conjunctiva and stained for IL-25, and found that IL-25 and Tuft cells were present in the conjunctiva of the mouse model of chronic allergic conjunctivitis.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー性結膜炎 IL-25 ILC2 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

「視機能を障害する慢性重症アレルギー性角結膜炎の病態生理において、2型炎症起因サイトカイン IL-25 が慢性化ならびに重症化の鍵となっているのではないか」

春季カタル(VKC)とアトピー性角結膜炎(AKC)は、慢性重症アレルギー性角結膜炎で、結膜の増殖性変化を伴い、重症例では角膜混濁や不正乱視による視覚障害を生ずる。近年、アレルギー性疾患などの2型炎症反応の分子メカニズムが精力的に研究され、アレルゲン刺激により外界とのバリアを形成する上皮細胞から、IL-25, IL-33, TSLP といった2型炎症起始サイトカインが産生・放出され、2型炎症反応のトリガーとなっていることがわかってきた。また、自然リンパ球 (innate lymphoid cells : ILCs) 特に ILC2 がアレルギーの発症や病態形成に重要であること、IL-33 や IL-25 が ILC2 の維持ならびに活性化に重要な働きをしていることが報告(Nat Rev Immunol. 13:145-149, 2013.)されている。実際我々は、VKC/AKC 患者の巨大乳頭結膜生検組織から ILC2 の存在を同定している (未発表データ、図1)。ILC2 には IL-33 受容体を高発現する natural ILC2 (nILC2)と IL-25 受容体を高発現する inflammatory ILC2 (iILC2)のサブタイプが報告されている。すなわち、アレルギー性炎症によって産生される IL-25 によって ILC が活性化されると IL-17 産生能を有する iILC2 が誘導することが報告(Nature Immunol 16:161-169, 2015)されている。また、IL-25 は上皮組織の中でも特に盃細胞の近傍に存在する Tuft 細胞から産生されることが報告された。VKC/AKC における IL-17 発現の亢進(Seminar Ophthalmol 32:721-724, 2017)や、VKC/AKC 組織の中には著明な好中球浸潤をとまなう症例があることから、IL-25/iILC2 シグナルと慢性重症アレルギー性角結膜炎の病態との間に関連が予想された。さらに最近、IL-25 と神経細胞から放出されるニューロペプチドニューロメジン U (NMU) が協調してアレルギー性炎症を重症化させているとの報告(Nature. 549(7672):351-356, 2017)がなされており、IL-25/iILC2/NMU シグナル経路がアレルギー性角結膜炎の慢性化、重症化に関連する key factor である可能性を探る本研究を着想した。

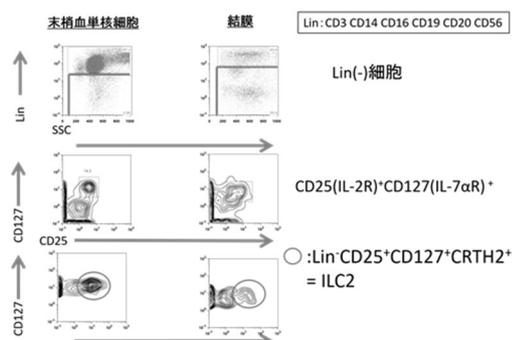


図1 ヒト結膜組織におけるILC2

2. 研究の目的

本研究の目的はアレルギー性角結膜炎における慢性化および重症化における IL-25 の役割を明らかにすることである。申請者は、ブタクサ花粉誘発アレルギー性結膜炎モデルマウスにおいて IL-33 が病態形成に重要であること(Invest Ophthalmol Vis Sci 56, 5194-5202, 2015.)、さらにはパイン吸着ソフトコンタクトレンズをマウスに装着させて、自然免疫依存性のアレルギー性角結膜炎モデルを樹立したところ、IL-33, TSLP ならびに ILC2 が病態形成に必須であることを報告(Immun Inflamm Dis. 5:515-525, 2017.)した。しかし、これらの急性期アレルギー性結膜炎マウスモデルでは IL-25 欠損マウスと野生型マウスとの間で炎症の程度に差はみられなかった。一方、ヒト AKC/VKC の患者由来の結膜組織において対照結膜と比較して IL-25 mRNA の発現が上昇、また IL-25 受容体である IL-17RB の mRNA 発現レベルが上昇していること、さらに難治性 AKC 患者由来組織と対照結膜を用いた網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)の結果 IL-

17RB 遺伝子の発現が有意に亢進していることを見出した。そこで、IL-25 シグナルがアレルギー性角結膜炎の慢性化ならびに重症化に重要ではないかとの仮説を着想した（図 2）。実際、IL-25 がアレルギー性鼻炎の慢性化・重症化に参与していること、IL-25 刺激によって iILC2 が誘導され（Nat Immunol 16, 161-169, 2015.）、IL-25 と NMU との協調作用でアレルギー性炎症が増強されるといった報告は我々の仮説を支持するものである。これまでに IL-25 と慢性重症アレルギー性角結膜炎の病態成立との関連を調べた先行研究はない。また、急性期のアレルギー性結膜炎モデルはこれまで数多く報告されているが、ヒト VKC/AKC の病態に近い、結膜組織の増殖性変化を伴うような慢性重症アレルギー性角結膜炎マウスモデルは樹立を目的としている。

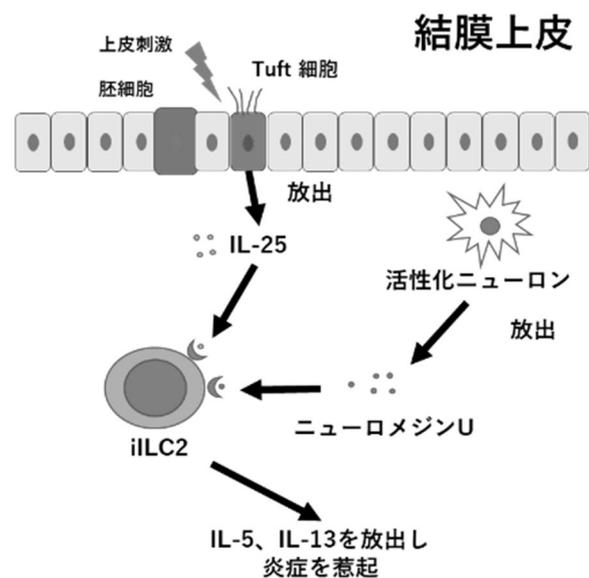


図 2 アレルギー性結膜炎におけるIL-25の役割（仮説）

3. 研究の方法

(1) アレルギー性角結膜炎における IL-25 発現の局在の再検証

AKC/VKC 臨床サンプルを利用して、これまでに IL-25 のタンパク質レベルでの発現局在を免疫組織学的手法で検討してきたが、弱いレベルで IL-25 発現をマスト細胞および結膜上皮に認めるものの、Tuft 細胞との関連はこれまで検討したことがなく、非特異的染色と解釈されてきた結果の中に IL-25 陽性 Tuft 細胞が結膜上皮内に存在していた可能性がある。そこで、Tuft 細胞のマーカである抗-DCAMKL1 抗体と IL-25 抗体を用い、結膜における Tuft 細胞の局在ならびに IL-25 染色性を評価する。

(2) IL-25シグナルを増強したマウス慢性重症結膜炎モデルの作成

慢性重症アレルギー性角結膜炎の病態に IL-25 シグナルと、それによって活性化される ILC2、ならびに NMU シグナルがどのように関連しているかを明らかにするため、それらのシグナルを増強した状態で、ヒト慢性重症アレルギー性角結膜炎 VKC/AKC に似た症状・所見を伴うマウス結膜炎モデルを樹立する。まず、角結膜上皮細胞に発現するケラチン 14 のプロモーターを用いて IL-25 遺伝子トランスジェニックマウスを BALB/c 背景で作成する。このマウスを用い、アレルゲンとしては、精製ダニ抗原とブタクサ花粉、並びにその混合物を皮下免疫し、7 日後から結膜増殖反応が得られるまで点眼刺激を継続する（結膜組織の増殖反応はヒト VKC/AKC における特徴的な病理変化であり、今回のマウスモデルにおいても慢性化・重症化の重要な指標である）。また、炎症反応を増強するために NMU を抗原点眼と同時に投与するモデルも作成する。慢性重症モデルの成否は結膜増殖反応の他に、結膜の充血、腫脹、流涙といったクリニカルスコア、好酸球浸潤数および結膜組織中の炎症性サイトカインを定量による重症度の評価を元に行う。また、IL-25 を産生する Tuft 細胞の免疫組織学染色を用いた同定を施行する。さらに、BALB/c IL-25 欠損マウスを用い、上述の

マウス慢性アレルギー性角結膜炎モデルの病態形成がキャンセルされるか確認実験を遂行する。

(3) 網羅的遺伝子発現解析(sc-RNAseq)を用いたILCサブタイプの同定と角結膜炎モデルにおける役割の評価

マウスアレルギー性角結膜炎の発症において、ブタクサ花粉を使用した急性モデルにおいては IL-33 とその下流にある natural ILC2(nILC2)が重要な役割を果たしている。一方慢性モデルにおいては我々の仮説が正しければ IL-25 と iILC2 の働きが重要と考えられる。急性モデル、慢性モデルから結膜組織を採取し、FACS を用いて ILC2 細胞分画を分取、single cell (sc)-RNA seq の手法で、アレルギー性角結膜炎発症時における結膜 ILC2 細胞をクラスタリングし、急性モデル、慢性モデルにおける nILC2, iILC2 の役割を明らかにする。

4. 研究成果

本研究の目的はアレルギー性角結膜炎における慢性化および重症化における IL-25 の役割を明らかにすることである。IL-25 シグナルがアレルギー性角結膜炎の慢性化ならびに重症化に重要ではないかとの仮説を着想し、新たに慢性アレルギー性結膜炎モデルを作成した。

(1) 結膜内にある Tuft 細胞のマーカーである抗-DCAMKL1 抗体と IL-25 抗体を用い、結膜における Tuft 細胞の局在ならびに IL-25 染色を行い、慢性アレルギー性結膜炎マウスモデルのマウス結膜には IL-25 並びに tuft 細胞が存在することが判明した。

(2) 角結膜上皮細胞に発現するケラチン 14 のプロモーターを用いて IL-25 遺伝子トランスジェニックマウスを BALB/c 背景で作成したところ、高い確率でアレルギー性結膜炎を発症することが判明した。

(3) 慢性アレルギー性結膜炎モデルマウスの網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、対照結膜と比較して、2 倍以上に発現が亢進していた 993 個の遺伝子群に対して gene ontology 解析を行ったところ、細胞外マトリックス、ケラチンといったアノテーションを持つ遺伝子が多く発現していた。パスウェイ解析では TNF シグナル伝達経路、サイトカイン受容体シグナル経路との関連を認めた。

今後もこの研究成果を用いて継続的に解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuda Akira, Hirakata Toshiaki, Asada Yosuke, Nakae Susumu	4. 巻 2223
2. 論文標題 Experimental Mouse Models of Ragweed- and Papain-Induced Allergic Conjunctivitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 133 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1001-5_10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asada Yosuke	4. 巻 39
2. 論文標題 Roles of Type 2 Immune Response-Initiating Cytokines and Detection of Type 2 Innate Lymphoid Cells in Mouse Models of Allergic Conjunctivitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 S47 ~ S50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000002548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Akira, Hirakata Toshiaki, Asada Yosuke, Nakae Susumu	4. 巻 2223
2. 論文標題 Experimental Mouse Models of Ragweed- and Papain-Induced Allergic Conjunctivitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 133 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1001-5_10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asada Yosuke, Okano Mikiko, Ishida Waka, Iwamoto Satoshi, Fukuda Ken, Hirakata Toshiaki, Tada Norihiro, Fukushima Atsuki, Ebihara Nobuyuki, Kudo Akira, Matsuda Akira	4. 巻 68
2. 論文標題 Periostin deletion suppresses late-phase response in mouse experimental allergic conjunctivitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 233 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Akira, Asada Yosuke, Suita Naomasa, Iwamoto Satoshi, Hirakata Toshiaki, Yokoi Norihiko, Ohkawa Yasuyuki, Okada Yukinori, Yokomizo Takehiko, Ebihara Nobuyuki	4. 巻 143
2. 論文標題 Transcriptome profiling of refractory atopic keratoconjunctivitis by RNA sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1610 ~ 1614.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.11.007	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 浅田洋輔
2. 発表標題 細菌とウイルス感染を模した刺激下におけるマウスアレルギー性角結膜炎モデルの樹立
3. 学会等名 第4回眼アレルギー学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅田洋輔
2. 発表標題 マウス慢性アレルギー性結膜炎モデルの作成とその病態
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本 怜, 浅田 洋輔, 足立 啓介, 中村 衣里, 多田 昇弘, 松田 彰
2. 発表標題 眼表面におけるIL-25発現は慢性アレルギー性角結膜炎を引き起こす
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅田 洋輔, 平形 寿彬, 足立 啓介, 岩本 怜, 松田 彰
2. 発表標題 マウス慢性アレルギー性結膜炎モデルの作成と網羅的遺伝子解析
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------