

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790698

研究課題名（和文） アレルギー性炎症における IL-33 の作用解析と治療応用への試み

研究課題名（英文） Analysis of IL-33-induced allergic inflammation

研究代表者

鈴木 真穂 (SUZUKAWA MAHO)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：20453699

研究成果の概要（和文）：

アレルギー性炎症において中心的作用が注目されている IL-33 は、ヒト好塩基球および好酸球のサイトカイン産生、脱顆粒、接着、遊走、生存能などを強力に活性化した。一方、IL-33 の培養ヒト気道上皮細胞に対する直接作用は認めなかった。喘息モデルマウスにおいて、抗原チャレンジと同時に IL-33 を投与すると、好酸球性気道炎症が著明に増悪した。IL-33 は炎症細胞を活性化することにより、アレルギー性炎症を増悪することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

IL-33, recognized as one of the key cytokines enhancing Th2-balanced immune response exhibited a strong activating effect on human basophils and eosinophils. Although IL-33 did not show any effect on human bronchial epithelial cell line, it showed a significant worsening of eosinophilic inflammation in asthmatic mouse model when intranasally challenged with the antigen. Taken together, IL-33 may be a key cytokine in the pathogenesis of Th2-dominant allergic diseases, partly by acting on basophils and eosinophils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・アレルギー内科学

キーワード：IL-33、ST2、好塩基球、好酸球、アレルギー学、喘息、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患は、罹患率が増加傾向にあり、その病態解明と治療確立は急務となっている。

(2) アレルギー性炎症の主要なエフェクター細胞と考えられている好塩基球、好酸球の制御機構を解明することは、アレルギー性疾

患の病態解明、治療の確立につながると考えられるが、未だアレルギー性炎症細胞に作用する中心的因子の同定、アレルギー性炎症の全貌解明には至っていない。

(3) IL-33 は Schmitz らにより 2005 年に同定された新規サイトカインであり、アレルギー性炎症における中心的な調節性サイトカインの一つである可能性が考えられている。

2. 研究の目的

アレルギー性炎症の主要なエフェクター細胞である好塩基球や好酸球の動態制御に対する IL-33 の作用を解析することで、アレルギー疾患の病態における IL-33 の意義、位置付けを解明することを目的とした。結果は、アレルギー性炎症の病態メカニズムの理解に有益であるだけでなく、これらエフェクター細胞および調節性細胞の動態制御をターゲットとする治療戦略確立のために有効となることが期待される。

3. 研究の方法

ヒト好塩基球、好酸球は健常人末梢血から分離して用いる。

培養ヒト気道上皮細胞には、BEAS-2B を用いる。

喘息モデルマウスは A/J マウスを卵白アルブミンの腹腔内投与で感作し、点鼻吸入によりチャレンジを行う。

(1) real-time PCR および flowcytometry を用いて好塩基球、好酸球における ST2 mRNA およびタンパク発現を解析する。

(2) リコンビナント IL-33 存在下に好塩基球、好酸球を培養した後、Annexin V、および PI で標識し、flowcytometry で生存細胞、死細胞の割合を計測する。

(3) 好塩基球、好酸球をリコンビナント IL-33 で刺激し、脱顆粒、サイトカイン産生を主に ELISA を用いて解析する。

(4) 好塩基球、好酸球の接着、遊走に対する IL-33 の作用を解析する。好塩基球は接着細胞内含有ヒスタミン、好酸球は接着細胞内含有 EPO を測定し、遊走実験には Chemotaxicell を用いる。

(5) 好塩基球、好酸球の活性化マーカーである CD11b 発現に対する IL-33 の作用を flowcytometry で解析する。

(6) 培養ヒト気道上皮細胞に IL-33 を作用させ、サイトカイン産生を主に ELISA を用いて解析する。

(7) 喘息モデルマウスにチャレンジと同時に IL-33 を点鼻吸入させ、アレルギー性気道炎症の状態を解析する。アセチルコリン吸入による気道抵抗の変化、気管支肺胞洗浄液中の細胞分画を解析する。

4. 研究成果

(1) IL-33 によるヒト好酸球および好塩基球の活性化

はじめに、アレルギー性炎症においてエフェクター細胞として重要な役割を担う好塩基球および好酸球を、健常人の末梢血から分離し、IL-33 のレセプターである ST2 の発現を解析した。Realtime PCR により、ヒト好塩基球、好酸球において ST2 mRNA の発現を認め (図 1)、flow cytometry によりタンパク

レベルでの発現も確認された。

次に好塩基球、好酸球の機能解析を行った。アポトーシス解析の結果、IL-33 はヒト好酸球の有意な生存延長作用を示し、その作用は ST2 を中和抗体で中和することで抑制された

(図 2)。ヒト好塩基球の IL-4、IL-13 mRNA 発現は、IL-33 刺激により有意に亢進した (図 3)。IL-33 はヒト好酸球、好塩基球の接着能を有意に増強し (図 4)、細胞表面活性化マーカーである CD11b 発現も増強した。さらに、IL-33 はヒト好塩基球の eotaxin に対する遊走能を有意に増強した (図 5)。また、ヒト好塩基球の IgE 架橋刺激による脱顆粒を有意に増強した。以上の結果より、IL-33 はヒト好塩基球および好酸球に対して、それぞれ ST2 を介して強力な活性化作用を有することが示された。

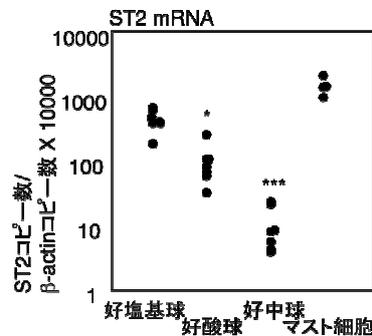


図1 高純度に精製した好塩基球 (n=7)、好酸球 (n=7)、好中球 (n=7)、およびマスト細胞 (n=4) 由来の cDNA を用いて、realtime PCR により ST2 の発現を解析した。ST2 コピー数 / copy β -actin コピー数 \times 10,000。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs 好塩基球。

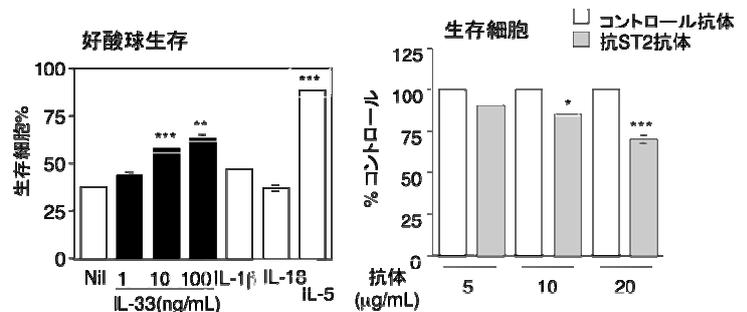


図2 高純度に精製した好酸球を IL-33 (1, 10, 100 ng/ml), IL-1 β (100 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml), IL-5 (300 pM) と共に 24 時間培養し、annexin V および PI で染色した後 flow cytometry にて解析した。** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. Nil. さらに、抗 ST2 中和抗体またはコントロール抗体および IL-33 10 ng/ml を加え、生存細胞を解析した。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

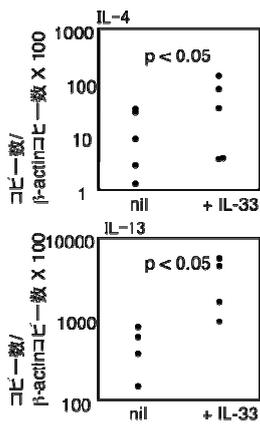


図3
好塩基球をIL-33 100 ng/mlと共に4時間培養した後、cDNAを抽出しrealtime PCRでIL-4、IL-13の発現を解析した。

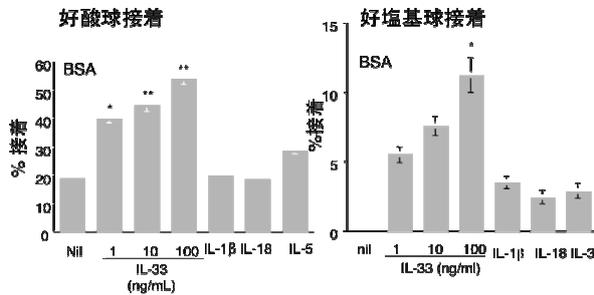


図4
好塩基球および好酸球をIL-33 (1, 10, 100 ng/ml), IL-1β (100 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml), IL-3またはIL-5 (300 pM)と共に45分培養した後、BSAでコーティングしたプレートに接着させた。接着細胞は、細胞由来のヒスタミン(好塩基球)、EPO(好酸球)を測定し、定量した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Nil.

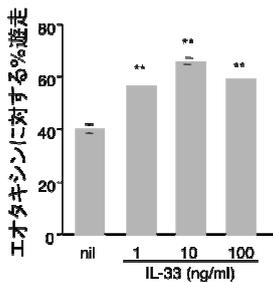


図5
好塩基球をケモカキセルの上室へ、エオタキシン10 nMを下室に入れ、好塩基球の遊走を解析した。** $P < 0.01$ vs. Nil.

(2) IL-33による気道上皮細胞の活性化

次に、IL-33がヒト培養気道上皮細胞を活性化するか検討した。Flow cytometryで解析を行ったところ、IL-33刺激では、BEAS-2Bの細胞表面ICAM発現レベルは変化しなかった。また、LUMINEXを用いてサイトカイン産生を解析したところ、IL-33刺激により、

BEAS-2Bのサイトカイン産生は変化しなかった。以上の結果から、IL-33単独刺激により気道上皮細胞機能は修飾されないことが示唆された。

(3) IL-33によるマウスの気道炎症増悪

最後に、喘息モデルマウスにおけるIL-33投与のアレルギー性気道炎症への影響を解析した。OVAで感作したA/Jマウスに、OVA challengeと同時にIL-33を点鼻投与すると、アセチルコリンに対する気道過敏性が有意に亢進し(図6)、BAL中の総細胞数、好酸球数が有意に増加した(図7)。また、病理組織においても、気道炎症の著明な増悪を認めた。このことから、IL-33は生体内において好酸球性気道炎症を増悪し、気道過敏性を亢進することが示唆された。

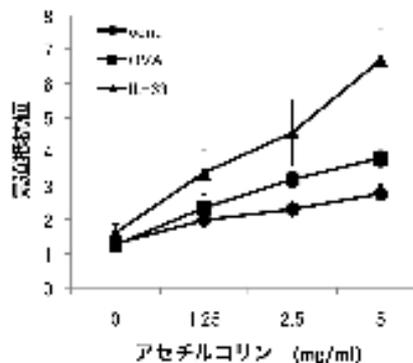


図6
A/JマウスをOVAで感作した後、チャレンジを行わなかったマウス(control)、OVAでチャレンジを行ったマウス(OVA)、OVAと共にIL-33でチャレンジを行ったマウス(IL-33)で、気道抵抗を測定した。** $P < 0.01$ vs. controlおよびOVA.

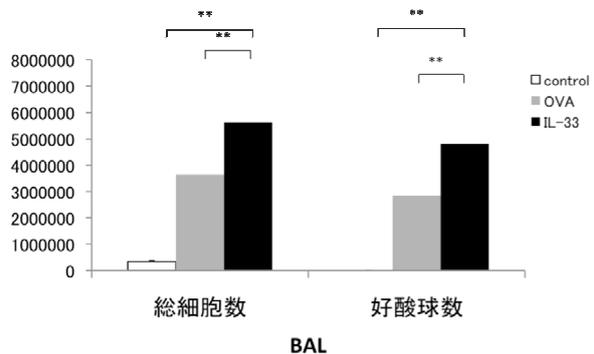


図7
A/JマウスをOVAで感作した後、チャレンジを行わなかったマウス(control)、OVAでチャレンジを行ったマウス(OVA)、OVAと共にIL-33でチャレンジを行ったマウス(IL-33)で、BALを行い、総細胞数および好酸球数を計測した。** $P < 0.01$.

(4) 考察

IL-33 は比較的新しいサイトカインであり、*in vivo* での投与によりアレルギー性炎症を引き起こすことが既に報告されているが、本研究では IL-33 がアレルギー性炎症を増悪させる作用機序を解明することを目的とした。IL-33 はアレルギー性炎症のエフェクター細胞、すなわち好塩基球や好酸球を活性化し、接着能、遊走能を亢進し、生存延長作用を示したことから、炎症細胞の局所浸潤を促すことが推察された。また、炎症細胞の脱顆粒およびサイトカイン産生を亢進することで、アレルギー性炎症の増悪に寄与していることが示唆された。また感作された生体内においても、IL-33 は抗原と共に局所炎症を増悪することが明らかとなった。本研究から、IL-33 のアレルギー性炎症における作用機序の一部が明らかとなり、IL-33-ST2 の系に介入することがアレルギー性炎症の治療戦略につながる可能性が考えられた。特にアレルギー性炎症細胞の解析は、今までの報告と異なり、ヒト細胞で示されたことから、より実質的な治療手段に結びつくことが期待される。今後は IL-33-ST2 経路を阻害し、検証することを主体とした研究を更に進める必要がある。

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 9 件)

- ①Maho Suzukawa, Masao Yamaguchi, Motoyasu Iikura, Rikiya Koketsu, Akiko Komiya, Hiroyuki Nagase, Susumu Nakae, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, Kouji Matsushima, Kazuhiko Yamamoto, Ken Ohta. IL-33-induced activation of human basophils and eosinophils via ST2. *Inflammation and Regeneration*, in press. 査読あり。
- ②Yamaguchi M, Koketsu R, Suzukawa M, Kawakami A, Iikura M. Human Basophils and Cytokines/Chemokines. *Allergol Int.* 2009;58(1):1-10. 査読あり。
- ③Maho Suzukawa, Masao Yamaguchi, Rikiya Koketsu, Motoyasu Iikura, Hiroyuki Nagase, Susumu Nakae, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, Kouji Matsushima, Tetsuya Adachi, Ken Ohta, Kazuhiko Yamamoto. IL-33 induces human eosinophil activation. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149 (suppl 1):113. 査読あり。
- ④Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H, Saito H,

Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest.* 2008;88(11):1245-53. 査読あり。

- ⑤Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, Nakae S, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol.* 2008;181(9):5981-9. 査読あり。

[学会発表] (計 18 件)

- ①Maho Suzukawa, Motoyasu Iikura, Rikiya Koketsu, Akiko Komiya, Hiroyuki Nagase, Tetsuya Adachi, Susumu Nakae, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, Kouji Matsushima, Kazuhiko Yamamoto, Masao Yamaguchi and Ken Ohta. An IL-1 cytokine member, IL-33 induces human basophil and eosinophil activation via ST2. 第 38 回免疫学会総会・学術集會にて発表。京都。
- ②鈴木真穂、飯倉元保、山口正雄、瀬瀬力也、小宮明子、中江進、長瀬洋之、足立哲也、松島綱治、山本一彦、大田健。IL-33 によるヒト好塩基球活性化。第 58 回アレルギー学会秋期学術大会にて発表。東京国際フォーラム。
- ③鈴木真穂、飯倉元保、瀬瀬力也、小宮明子、長瀬洋之、足立哲也、中江進、松本健治、斉藤博久、松島綱治、山本一彦、山口正雄、大田健。IL-33 によるヒト好酸球およびヒト好塩基球の活性化。第 21 回気道病態研究会にて発表。東京。
- ④Maho Suzukawa, Masao Yamaguchi, Motoyasu Iikura, Rikiya Koketsu, Akiko Komiya, Hiroyuki Nagase, Susumu Nakae, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, Kouji Matsushima, Kazuhiko Yamamoto, Ken Ohta. IL-33-induced activation of human basophils and eosinophils via ST2. 第 9 回国際炎症学会 (第 30 回日本炎症・再生医学会合同開催) にて発表。京王プラザホテル。
- ⑤鈴木真穂、原麻恵、飯倉元保、中江進、長瀬洋之、山口正雄、大田健。IL-33 によるアレルギー性気道炎症増悪機序の解析。第 23 回アレルギー・好酸球研究会 2009 にて発表。大手町サンケイプラザ。
- ⑥鈴木真穂、飯倉元保、瀬瀬力也、小宮明子、長瀬洋之、足立哲也、中江進、松本健治、斉藤博久、松島綱治、山本一彦、山口正雄、大田健。IL-33 によるアレルギー性気道炎症増悪とその機序に関する解析。第 22 回気道病態研究会にて発表。東京。

- ⑦鈴木真穂, 原麻恵, 飯倉元保, 中江進, 長瀬洋之, 山口正雄, 大田健. IL-33によるアレルギー性気道炎症増悪機序の解析. 第13回アレルギー・気道上皮細胞研究会にて発表. シェーンバッハ・サボア.

[図書] (計3件)

- ①鈴木真穂. 【好塩基球 新たな視点からみたアレルギー性炎症の誘導】 IL-33によるヒト好塩基球活性化. 炎症と免疫. 18(1):28-34. 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 真穂 (SUZUKAWA MAHO)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号: 20453699