

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17224

研究課題名（和文）ステロイド抵抗性重症喘息に対するIL-27の抑制効果の検討

研究課題名（英文）Suppressive effect of IL-27 on corticosteroid-resistant severe asthma

研究代表者

持丸 貴生（MOCHIMARU, Takao）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：60594570

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）：2型自然リンパ球（ILC2）はステロイド抵抗性の好酸球性気道炎症を誘導し、重症喘息の病態に關与している可能性が示唆されている。申請者のグループは以前IL-27がILC2の強力な抑制因子であることを発見した。今回我々は、IL-27がヒトILC2に対しても抑制効果を有することを明らかにした。さらに、生体内でIL-27を誘導する物質としてToll-like receptor 7（TLR7）アゴニストを同定し、間質マクロファージからのIL-27産生によってILC2を介した喘息病態を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ILC2はステロイド抵抗性を獲得する故、その制御方法は不明な点が多い。今回IL-27がヒト由来のILC2に対して有力な抑制サイトカインであることを明らかにし、さらに生体内でIL-27を効率よく誘導しILC2を抑制する方法を見出した。この知見がILC2を介した喘息病態に対する新たな治療につながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) induce corticosteroid-resistant eosinophilic inflammation and are associated with the pathophysiology of severe asthma. We previously found that IL-27 is a potent suppressive cytokine for ILC2s. In this study, we found that Toll-like receptor 7(TLR7) agonist stimulates interstitial macrophages to produce IL-27 in the lung, which contribute to suppression of ILC2-mediated airway inflammation

研究分野：免疫アレルギー

キーワード：2型自然リンパ球 IL-27 Toll-like receptor 7

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

従来、気管支喘息は抗原の感作・曝露により形成される獲得免疫が病態の中心と考えられていた。しかし、近年新たに自然免疫を担う 2 型自然リンパ球 (ILC2) が発見された。ILC2 は抗原を介さず IL-33 などのサイトカインに反応し 2 型炎症を惹起する。更に ILC2 は IL-33 と TSLP の存在下でステロイド抵抗性を獲得することが明らかになった (Kabata H et al. Nat Commun, 2013)。IL-33 や TSLP は重症喘息患者の気道において発現が亢進していることが報告されており、ILC2 はステロイドが効かない重症・難治性喘息の病態に関与している可能性が示唆されている。一方で申請者のグループは、マウスより単離した ILC2 を用いて様々なサイトカインの影響をスクリーニングしたところ、IL-27 が ILC2 の増殖やサイトカイン産生能を抑制することを明らかにした。ILC2 の制御方法として IL-27 は有力な候補となるが、IL-27 をどのように生体に投与するか、IL-27 がステロイド抵抗性の喘息患者に奏効するか、という疑問に答えられる解決手段は今のところない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、IL-27 がヒトにおける ILC2 に対しても抑制効果を有するかを検討するとともに、IL-27 自体もしくは IL-27 を生体内で産生誘導する方法を見出すことである。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト ILC2 に対する IL-27 の抑制効果の検討

末梢血からフローサイトメトリーにて Lineage 陰性、CD45 陽性、CD127 陽性、CRTH2 陽性の ILC2 を単離し、*in vitro* にて IL-27 の抑制効果を検討した。

### (2) IL-27 による IL-33 誘導性自然免疫型喘息に対する抑制効果

我々は以前、アルテルナリアによって誘導される喘息モデルマウスの気道炎症がマウスに IL-27 を直接点鼻投与することで、好酸球性炎症が抑制されることを報告した。今回、IL-33 を直接点鼻する自然免疫型喘息モデルマウスに対する IL-27 の抑制効果を検討した。

### (3) TLR7 アゴニスト(R848)の IL-27 誘導作用と IL-33 誘導性自然免疫型喘息に対する抑制効果

TLR7 アゴニストが生体内で IFN- $\gamma$  や IL-27 の産生を誘導することが報告されており、TLR7 のアゴニストである R848 を点鼻投与し、IL-33 による自然免疫型喘息モデルマウスに対する抑制効果を検討した。同時に、Day7 における気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の IFN- $\gamma$  および IL-27 の濃度を ELISA で測定した。

### (4) IL-27 産生細胞の同定

R848 投与によって気管支肺胞洗浄液中の IL-27 が有意に上昇することが明らかになり、IL-27 の産生細胞を同定するため R848 の標的細胞を探索した。フローサイトメトリーを用い、ILC2 を含むリンパ球、及びマクロファージや樹状細胞における TLR7 の発現を網羅的に解析した。TLR7 発現細胞を単離し R848 で刺激後 IL-27 の産生について ELISA で評価した。

### (5) R848 の ILC2 抑制効果における IL-27 の役割

TLR7 を高発現し、R848 の刺激で IL-27 を産生する間質マクロファージ (interstitial macrophage IM) と ILC2 を共培養し、*in vitro* で ILC2 の増殖やサイトカイン産性能の変化を評価した。また、R848 の気道炎症抑制効果における IL-27 の関与を調べるため、IL-27 受容体 (WSX-1) ノックアウトマウスを用いて検証した。

## 4. 研究成果

### (1) IL-27 はヒト ILC2 を抑制する働きがある

ヒト ILC2 に対して IL-2+IL-33 刺激を行い、同時に IL-27 を加えた際の細胞増殖および 2 型サイトカインの産生を評価した。その結果、マウス由来の ILC2 と同様に、ヒト由来の ILC2 も IL-27 によって増殖や 2 型サイトカイン産生が抑制されることがあきらかになった。このことから、IL-27 がヒトにおいても ILC2 をターゲットとした有力な抑制候補サイトカインであると考えられた。

### (2) IL-27 は IL-33 誘導性自然免疫型喘息を抑制する

IL-33 による自然免疫型喘息モデルマウスに対して IL-27 を IL-33 と同時に点鼻投与すると、BALF 及び肺組織に集積する ILC2、好酸球が有意に抑制された。IL-33 により活性化した ILC2 は IL-5、IL-13 を産生することで、好酸球性気道炎症や杯細胞の過形成を惹起する。そこで BALF 中のサイトカインを ELISA で測定したところ、IL-27 投与群では非投与群と比較し IL-5、IL-13 が有意に低下した。また、病理組織の検討においても R848 の投与により炎症細胞浸潤及び杯細胞の過形成が抑制された。

### (3) TLR7 アゴニスト(R848)は IL-33 誘導性自然免疫型喘息を抑制する

IL-33 による自然免疫型喘息モデルマウスに対して R848 を単回点鼻投与すると、BALF 及び肺組織に集積する ILC2、好酸球が有意に抑制された。BALF 中のサイトカインを測定した結果、R848 投与群では非投与群と比較し IL-5, IL-13 が有意に低下した。また、病理組織の検討においても R848 の投与により炎症細胞浸潤及び杯細胞の過形成が抑制された。興味深いことに、R848 投与群では BALF 中の IL-27p28 の有意な上昇が認められた。一方、IFN- $\gamma$  はいずれのサンプルにおいても測定感度以下であった。以上の結果より、R848 は IL-33 の投与による ILC2 を介した気道炎症を抑制し、更に生体内で IL-27 を誘導することが明らかになった。

### (4) 間質マクロファージは TLR7 を高発現し、R848 の刺激で IL-27 を産生する

次に R848 が作用する細胞を同定するため TLR7 の発現細胞を無刺激マウス、IL-33 刺激マウスで比較検討した。まず ILC2 には TLR7 の発現は殆ど認められず、R848 の ILC2 への直接的な影響は乏しいと考えられた。実際に ILC2 に対し R848 で刺激しても、サイトカイン産性能に変化は認められなかった。次にマクロファージと樹状細胞における TLR7 の発現を確認した。すると肺胞マクロファージ (alveolar macrophage: AM)、間質マクロファージ (interstitial macrophage: IM)、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC) で TLR7 が高発現していた。更に IM は IL-33 の刺激により生体内で有意な増加を示した。続いて AM、IM を単離し R848 で刺激したところ、IM より著明な IL-27 の産生を認めた。更に、IL-33 の投与により生体内で誘導された IM は *Arg-1* (arginase1), *Fizz1* (found in inflammatory zone 1), *Ym1* (chitinase 3-like 3), *Cc117* (TARC), *Cc124* (eotaxin-2) など M2 マーカーの高発現を示したが、R848 の刺激によりそれらの pro-allergic な遺伝子発現が著明に低下した。R848 の標的細胞として IM を同定し、更に IM は IL-27 を産生することを明らかにした。

### (5) R848 の ILC2 抑制効果は IL-27 に依存する

IL-33 の投与で誘導された IM は R848 の刺激により IL-27 を産生し、更に M2 マーカーの発現が低下するなどフェノタイプの変化を来すことが明らかになった。IM と ILC2 を共培養させたところ、R848 の刺激下では ILC2 の増殖及び 2 型サイトカイン産生が有意に低下した。続いて R848 の抑制機序における IL-27 の関与について IL-27 受容体 (WSX-1) ノックアウトマウスを用いて検証したところ、WSX-1 ノックアウトマウスでは R848 の ILC2 に対する抑制効果が消失した。また、気管支肺胞洗浄液中の IL-5, IL-13 も R848 投与群、非投与群で変わらない結果となった。病理組織の検討において気道上皮の粘液産生を反映したムチンスコアも R848 投与による抑制効果が消失した。以上の結果より、R848 の ILC2 への抑制効果は IL-27 に依存している可能性が示唆された。

### (6) 今後の展望

今回、IL-27 がヒト由来の ILC2 に対して有力な抑制サイトカインであることが明らかになった。さらに、生体内で TLR7 アゴニストが肺における間質マクロファージから IL-27 を効率よく誘導することを発見した。本知見が ILC2 を介した喘息病態に対する新たな治療につながる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuzumi S, Miyata J, Kabata H, Mochimaru T, Kagawa S, Masaki K, Irie M, Morita H, Fukunaga K.	4. 巻 65
2. 論文標題 TLR7 Agonist Suppresses Group 2 Innate Lymphoid Cell - mediated Inflammation via IL-27 - Producing Interstitial Macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 309-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2021-00420C.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 奥隅真一、宮田純、加畑宏樹、正木克宜、加川志津子、田野崎貴絵、入江美聡、秋山勇人、西江美幸、浅岡雅人、砂田啓英也、笹原広太郎、富保紗希、福永興吉
2. 発表標題 TLR7アゴニスト(R848)による好酸球性気道炎症抑制機序の解明
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥隅真一、宮田純、加畑宏樹、正木克宜、加川志津子、田野崎貴絵、入江美聡、秋山勇人、西江美幸、浅岡雅人、砂田啓英也、笹原広太郎、富保紗希、福永興吉
2. 発表標題 TLR7を介したIL-33誘導性自然免疫型喘息の抑制効果における間質マクロファージの役割
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichi Okuzumi, Jun Miyata, Hiroki Kabata, Shizuko Kagawa, Katsunori Masaki, Takao Mochimaru, Misato Irie, Hideaki Morita, and Koichi Fukunaga
2. 発表標題 TLR7 agonist suppresses type 2 airway inflammation via IL-27-producing interstitial macrophages
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichi Okuzumi, Jun Miyata, Hiroki Kabata, Hideaki Morita, and Koichi Fukunaga
2. 発表標題 TLR7 agonist stimulates alternatively activated interstitial macrophages to suppress type 2 airway inflammation via IL-27
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------