

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790474

研究課題名（和文） IL-27 および関連サイトカインの炎症制御機能および治療応用に関する研究

研究課題名（英文） Studies on function of IL-27 and the related cytokines on regulation of inflammation and the clinical application.

研究代表者

宮崎 義之 (MIYAZAKI YOSHIYUKI)

九州大学・大学院農学研究院・学術共同研究者

研究者番号：40380779

研究成果の概要（和文）：

IL-27は、2つの異なるタンパク質（EBI-3およびp28）から構成されるサイトカインであり、ヘルパーT細胞の分化誘導や炎症の抑制などの免疫制御に関わる重要な生理機能分子である。本研究では、アレルギー病態の一つである遅延型過敏反応について、EBI-3遺伝子欠損マウスを用いたモデル試験を行い、IL-27が遅延型過敏症の緩和に働くことを示した。また、原虫やウイルスおよび細菌感染などで生じ、患者の死亡にもつながる炎症反応に関して、IL-27が緩和に働くことを示した。IL-27は、炎症性サイトカインIL-17の産生を抑制することなどを通して、炎症抑制機能を発揮するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

IL-27 is a cytokine composed of two subunit proteins (EBI-3 and p28), and plays important roles in maturation of helper T lymphocytes and inhibition of inflammation. In this study, we performed an animal model experiment for delayed type hypersensitivity (DTH), and revealed that IL-27 acts in amelioration of DTH. Furthermore, we proved that IL-27 suppresses terrible inflammation developed in infection of protozoan parasites, viruses and bacteria. We suggested that IL-27 weaken the inflammatory responses by inhibiting production of an inflammatory cytokine IL-17.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー・ぜんそく、炎症、感染症、サイトカイン、免疫学

1. 研究開始当初の背景

サイトカインは、感染や自己免疫疾患あるいはアレルギー性疾患などにおける病態形成で重要な役割を果たしている。IL-27は、IL-12に相同性を有するタンパク質として2002年に同定されたサイトカインであり、2つのサブユニット（EBI-3およびp28）から構成される。また、IL-27の機能的受容体は、WSX-1（IL-

27R α ）とgp130（IL-6R β ）から構成されることが2004年に報告されている。IL-27は、感染などの刺激に応じて主にマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞から産生され、一方、IL-27受容体は、CD4陽性T細胞を初めとして各種免疫細胞に発現することが報告されている。我々は、WSX-1欠損マウスではリーシュマニア原虫感染に対するTh1応答

の誘導が遅延することで感染抵抗性が減弱することを明らかにし (Yoshida H. et al, *Immunity*, 15: 569-78, 2001)、WSX-1がTh1分化 (IFN- γ 産生) 誘導において重要な因子として機能することを示した。その一方で、トキソプラズマやトリパノソーマに感染したWSX-1欠損マウスにおいて、リンパ球の過剰な活性化および炎症性サイトカインの過剰産生を伴う壊死性の肝傷害を観察し (Villarino A. et al, *Immunity*, 19: 645-55, 2003; Hamano S. et al, *Immunity*, 19: 657-67, 2003)、WSX-1がリンパ球機能やサイトカイン産生に対するネガティブレギュレーターとして新規な機能を有することを報告した。以上の結果から、IL-27/IL-27受容体は、「Th1分化の誘導因子」もしくは「炎症応答のネガティブレギュレーター」として機能し、感染免疫の構築あるいは感染に伴う炎症性組織病態の形成阻止において重要な役割を担うことが示されている。

これに引き続いて、「IL-27受容体およびIL-27がアレルギー性疾患の病態形成に果たす役割 (平成17-18年度の若手研究B)」および「IL-27受容体シグナルによる炎症制御機構および治療応用 (平成19-20年度の若手研究B)」を検討し、WSX-1欠損マウスではTh2サイトカインの産生亢進を伴ってアレルギー性喘息症状が増悪すること (Miyazaki Y. et al, *J. Immunology*, 175, 2401-7, 2005) や、遅延型過敏症 (DTH) モデル試験に供したWSX-1欠損マウスでは野生型マウス以上に病態が悪化すること、さらに、IL-27投与によりDTH反応を抑制できること (Miyazaki Y. et al, *Biochem Biophys Res Commun.* 373, 397-402, 2008) を明らかにした。一方で、アレルギー性鼻炎モデル試験では、WSX-1欠損マウスで鼻炎症状がより軽微であることが示され、疾患の違いあるいは炎症やアレルギー反応が誘導される部位や環境等によって、IL-27/WSX-1が果たす役割が異なるものと考えられた (Shimanoe Y. et al, *Ann Allergy Asthma Immunol.* 102,223-32, 2009)。

さらに、EBI-3およびp35から構成される新規サイトカインIL-35が報告され、免疫抑制機能を有する制御性T細胞 (Treg) の免疫抑制作用の一翼を担うことが近年示されている。IL-35受容体は未だ同定されていないが、作用する細胞や生理機能にIL-27との重複あるいは相違があるものと推察された。

2. 研究の目的

(1) 先に述べた様に、我々は、WSX-1欠損マウスを用いた検討から、アレルギー性

喘息や遅延型過敏反応がWSX-1欠損によって増悪することを報告しており、IL-27受容体を介したシグナルが、それらの疾患における過剰な免疫応答を抑制することを示してきた。しかし、他の研究グループからは、EBI-3欠損マウスでは気道過敏性などの喘息症状が野生型マウスよりも減弱していることが最近報告され、両マウスで相反する表現型を呈することが分かってきた。一方、同じWSX-1欠損マウスで実験を行っても、アレルギー性喘息とアレルギー性鼻炎とは、それぞれ症状の増悪あるいは緩和という異なる結果が得られており、疾患によって機能が異なることが推察される。そこで本研究では、EBI-3欠損マウスを用いて、遅延型過敏反応などの疾患モデル試験を行い、アレルギー性疾患の病態形成におけるEBI-3の役割を明らかにすることを目的とした。また、EBI-3欠損の影響が、Treg機能 (IL-35産生) の低下によるものか否かを明らかにするため、Tregレポーターマウスを用いて、EBI-3欠損マウスにおけるTreg機能などを解析した。

(2) 先に述べた様に、我々は、WSX-1欠損マウスを用いた検討から、トリパノソーマ原虫感染試験やウイルス感染のモデルであるコンカナバリンA誘導性肝炎 (ConA肝炎) モデル試験、細菌成分であるLPSの投与による全身炎症応答などにおいて、WSX-1欠損により病態が悪化することを報告しており、IL-27受容体の免疫抑制機能を見出してきた。しかし、アレルギー疾患と同様に、他の研究グループから我々とは異なる研究結果が報告されており、WSX-1欠損マウスと遺伝子背景をそろえた状態でEBI-3欠損の影響を検証することが必要と考えられた。

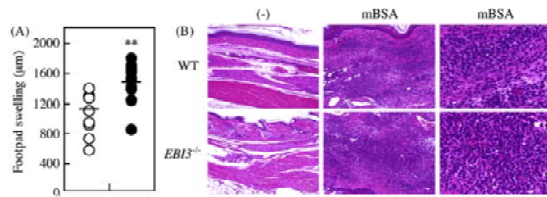
(3) 近年の研究から、IL-27は炎症の誘導に極めて重要な役割を担うサイトカインであるIL-17の産生制御を介して生理機能を発揮することが示されている。そこで、WSX-1欠損マウスにおけるトリパノソーマ原虫感染時の致死的炎症の誘導におけるIL-17産生との関わりを明確にするため、WSX-1/IL-17両欠損マウスを作製し、同様の感染試験を行った結果、病態の緩和 (死亡率の低下) は認められず、IL-17以外のサイトカインがトリパノソーマ原虫感染に伴う炎症反応に重要な役割を持つ可能性が考えられると共に、IL-17が原虫感染に対する防御免疫の活性化に必要とされることが推察された。そこで、原虫感染におけるIL-17の機能に関する新たな知見を得るべく、IL-17欠損マウスを用いてトリパノソーマ感染試験を行った。

3. 研究の方法

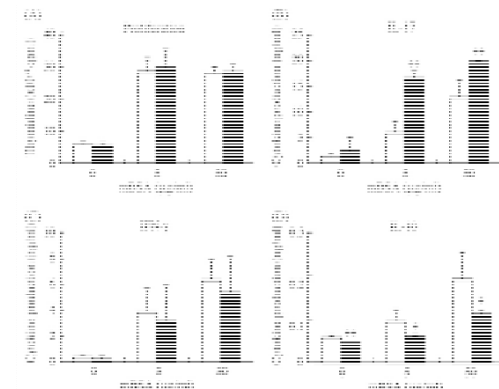
アレルギー性疾患（遅延型過敏反応）や感染症（トリパノソーマ感染、模倣的炎症誘導）に関する一般的なモデル試験をEBI-3欠損マウスやIL-17欠損マウスを用いて行い、それらの病態形成や免疫・炎症応答の制御における当該分子の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) メチル化ウシ血清アルブミン(mBSA)を抗原として誘導される遅延型過敏反応は、EBI-3欠損マウスにおいて病態（抗原投与部位での腫脹）の悪化が観察された。



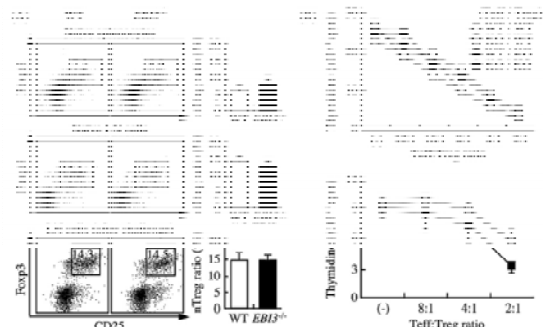
この時、炎症局所近辺に位置するリンパ節から単離したヘルパーT細胞は、EBI-3が欠損することでより多くのIL-17を産生する一方で、IL-10産生は減少することが明らかとなった。IL-17およびIL-10は、それぞれ、炎症反応の誘導および免疫応答の抑制に働くサイトカインであり、IL-27によって産生が調節されることが報告されている。従って、EBI-3欠損マウスにおけるDTH反応の増悪に、それらサイトカイン制御の欠如が関与したものと推察された。



一方で、我々は、先の研究でIL-27受容体(WSX-1)欠損マウスにおいてもDTH反応が増悪することを報告しているが、興味深いことに、そのサイトカイン産生に対する影響は、EBI-3欠損マウスとは一部異なっていた(WSX-1欠損マウスでは、IL-17に加えてIFN- γ 産生が亢進するが、IL-10産生には影響を与えなかった)。IL-27(EBI-3/p28)受容体は、WSX-1とgp130の2種類のタンパク質から構成され、それぞれの下流では別のシグナル伝達分子が機能している。従って、それらのシグナルバランスが変化することで、異なる

表現型を呈する可能性が考えられた。

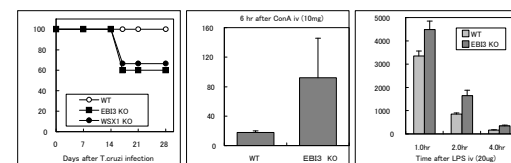
また、本研究では、新規サイトカインIL-35(EBI-3/p35)の作用の関与を検討するため、これまでにIL-35の機能として報告されているTreg細胞の分化および機能に及ぼすEBI-3欠損の影響を検討した。その結果、DTHモデル試験に供したEBI-3欠損マウスにおいて、Tregの数およびT細胞増殖抑制機能に顕著な障害は観察されず、本モデル試験におけるIL-35の寄与は小さいものと推察された。



IL-35の免疫抑制作用を検証するために、IL-35発現ベクターの構築を試みたが、ベクター導入細胞内における発現を確認したものの、分泌が認められず、当初計画していたリコンビナントIL-35投与試験(IL-27との作用比較)を行うことは出来なかった。

以上の結果から、DTH反応における炎症では、IL-17が重要な役割を果たしており、その産生制御を通じてIL-27およびその受容体が抑制的機能を発揮することが立証された。

(2) 感染免疫の制御におけるEBI-3の機能を検証するために、EBI-3欠損マウスを用いて、トリパノソーマ感染試験および炎症モデル試験を行った。その結果、WSX-1欠損マウスと同様に、EBI-3欠損マウスにおける病態の悪化(トリパノソーマ感染に伴う生存率の低下、ConA誘導性肝障害の増悪およびLPS投与に伴う炎症性サイトカイン産生の増大)が観察された。これは、IL-27が炎症の抑制に働くことの更なる傍証であった。

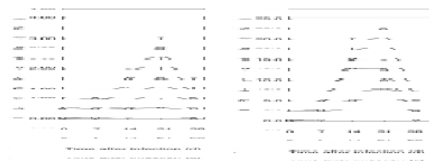


しかし、特にEBI-3欠損マウスにおけるConA肝炎に関しては、別の研究グループが我々とは異なる知見(IFN- γ 産生の低下に伴う病態緩和)を報告している。この矛盾が生じた要因として、使用したマウスの遺伝子背景が異なることが考えられるが、科学的根拠に欠けるため、これらの研究結果について、

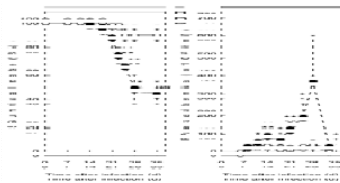
学術誌等での公表には至っていない。

(3)「IL-27受容体シグナルによる炎症制御機構および治療応用(平成19-20年度の若手研究B)」において、IL-27によって産生制御されるIL-17が炎症の誘導だけでなく、トリパノソーマ感染に対する生体防御に働くことを示唆する研究データが得られたので、本研究課題において、引き続き、IL-17欠損マウスを用いたトリパノソーマ感染試験を実施し、作用機構の更なる解明を試みた。

IL-17の産生は、トリパノソーマ感染の拡大に伴って上昇し、原虫排除に重要なサイトカインであるIFN- γ も、IL-17と同様の時間経過で上昇することが明らかとなった。

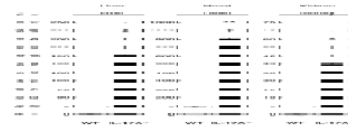


また、CD4陽性Th17細胞だけでなく、CD8陽性T細胞、ナチュラルキラー細胞および $\gamma\delta$ T細胞なども、トリパノソーマ感染に応じてIL-17を産生することが確認された。IL-17欠損マウスでは、IFN- γ やTNF- α をはじめとして各種炎症性サイトカインの産生量が低下しており、原虫に対する防御機構が弱まっていることが考えられた。このことを裏付けるように、IL-17欠損マウスでは、トリパノソーマ感染の拡大が著しく、生存率も顕著に低下した。



従って、IL-17は各種免疫系細胞から産生され、原虫感染に対する防御免疫の増強に働く重要なサイトカインであることが示唆された。

一方、炎症性サイトカインであるIL-17が欠損した結果、炎症による臓器障害が軽減されることも予想されたが、実験の結果、トリパノソーマに感染したIL-17欠損マウスにおいて、臓器障害の重篤化(ALT, ASTなどの逸脱酵素の血中レベル上昇)が観察された。本結果に関連して、臓器中の原虫DNAを検出した結果、IL-17欠損マウスで著しく多いことが明らかとなった。従って、この臓器障害は過度の炎症によるものではなく、原虫の感染による物理的な傷害によってもたらされた可能性が示された。



以上の検討から、IL-17が正常に働くことは、感染したトリパノソーマの効率的な排除に必要な免疫系(サイトカイン産生)の誘導に必須であり、IL-17がトリパノソーマ感染に対する防御免疫の構築において重要な働きを担うことが明らかとなった。また、その産生を制御する機能が失われた場合(例えば、遺伝子欠損マウスのように、IL-27およびその受容体の機能に障害がある場合)には、過剰に産生されたIL-17が、宿主組織に対して破壊的な炎症を引き起こし得ることが考えられ、IL-27の様な免疫抑制因子の働きによって、感染防御免疫のバランスが保たれているものと推察された。

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3件)

- ① Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. (2010) IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection. J Immunol. 185(2):1150-7. 査読有
- ② Tong H, Miyazaki Y, Yamazaki M, Hara H, Waldmann H, Hori S, Yoshida H. (2010) Exacerbation of delayed-type hypersensitivity responses in EBV-induced gene-3 (EBI-3)-deficient mice. Immunol Lett. 128(2):108-15. 査読有
- ③ Yoshida H, Nakaya M, Miyazaki Y. Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. (2009) J Leukoc Biol. 86(6):1295-303. 査読有

[学会発表](計2件)

- ① 宮崎 義之. 遅延型過敏反応の病態形成におけるEBV-induced gene 3 (EBI3)の役割. 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 2009年6月26日. 京都大学芝蘭会館(京都).
- ② Yoshiyuki Miyazaki. Exacerbation of delayed-type hypersensitivity responses in EBV-induced gene-3 (EBI-3)-deficient mice. 日本免疫学会. 2009年12月3日. 大阪国際会議場(大阪).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 義之 (MIYAZAKI YOSHIYUKI)

九州大学・大学院農学研究院・学術共同研究者
研究者番号: 40380779