

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590435

研究課題名（和文） 免疫抑制性 IL-12 関連サイトカインによる自然免疫制御とその治療応用に関する研究

研究課題名（英文） Studies of the immune regulation by IL-12-related immunosuppressive cytokines and their therapeutic application

研究代表者

吉田 裕樹 (HIROKI YOSHIDA)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40260715

研究成果の概要（和文）：IL-27 は、免疫・炎症抑制作用を持つ IL-12 ファミリーサイトカインである。本研究では、1) IL-27 が自然免疫細胞に及ぼす抑制効果、2) IL-27 のサイトカイン産生抑制機構・細胞機能抑制機構、3) IL-27 シグナルを制御することによる免疫・炎症疾患に対する治療効果を検討した。IL-27 刺激が樹状細胞などにおいて、Notch 関連遺伝子や脂質メディエーター関連遺伝子の発現を制御することを見出した。これは、IL-27 による新しい免疫反応・細胞分化制御機構の存在を示唆している。また、動脈硬化など代謝性疾患の背景に存在する炎症病態における IL-27 の関与と治療効果を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：IL-27 is an IL-12-related cytokine with immunosuppressive function. In this study, we analyzed 1) immunosuppression on innate immunity by IL-27, 2) its immunosuppressive mechanisms, and 3) its therapeutic effects on immune and/or inflammatory diseases (in mouse models). We found that IL-27 regulated expression of Notch-related genes as well as lipid mediator-related genes, by which IL-27 may exert its novel immunoregulatory effects. We also found that involvement in and therapeutic effects of IL-27 on inflammation-induced metabolic diseases including atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：IL-12、免疫、炎症、抑制

1. 研究開始当初の背景

IL-27 などの IL-12 関連サイトカインは免疫抑制効果を有するが、自然免疫系に対する抑制効果の詳細は不明である。T 細胞においては STAT1 依存性の抑制作用が知られているが、その下流経路、また自然免疫系細胞

における抑制機構も不明である。

これまでに、申請者らにより、1) IL-27 の持つ Th1 誘導作用は実験的、あるいは限局的であり、また 2) IL-27 活性化した T 細胞に対してサイトカイン産生抑制作用を示すことなどが明らかにされ、実際の免疫・炎症反

応の場においては、IL-27 の主要な役割は T 細胞に対する過剰な免疫・炎症の抑制であると推測されている。一方、IL-27 と EBI-3 サブユニットを共有する IL-35 は、Th1 誘導作用に加えて IL-27 に似た免疫抑制作用を有すること、また制御性 T 細胞(Treg)から産生され Treg の免疫抑制作用の一部を担っていることが報告されている。これまで IL-27 の役割に関しては T 細胞に対するもののみが解析され、申請者らのグループを中心に、IL-27 が Th17 細胞の分化を抑制すること、および IL-10 産生を誘導することを明らかにしてきたが、この抑制の分子機構には不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、具体的には申請期間の 3 年間に以下の 3 点を明らかにする事を目的とした。

1. IL-27、および関連サイトカイン IL-35 が自然免疫細胞に及ぼす抑制効果を検討する。特に、樹状細胞やマクロファージなどの機能に与える影響を明らかにする。
2. IL-27 のサイトカイン産生抑制機構・細胞機能抑制機構を解明する。T 細胞系と自然免疫系に分けて、それぞれに共通な機構と独自の機構との存在を明らかにする。
3. 試験管内およびマウスモデルにおいて IL-27 および IL-35 シグナルを制御することによる免疫・炎症疾患に対する治療効果を検討する。

これらの解析を通じて、1) IL-27 を主とする免疫抑制性 IL-12 関連サイトカインが自然免疫細胞に及ぼす影響を解析した上で、2) IL-27 の免疫抑制シグナルを細胞種ごとに解明し、3) ノックアウトマウスなどを利用して、疾患モデルにおけるこれらサイトカインの個体内での役割を明らかにし、得られる知見を元に、自然・獲得免疫を増強・抑制することによる疾患の治療効果を検討、さらに、ヒトの疾患に対する治療応用の可能性を検討した。

3. 研究の方法

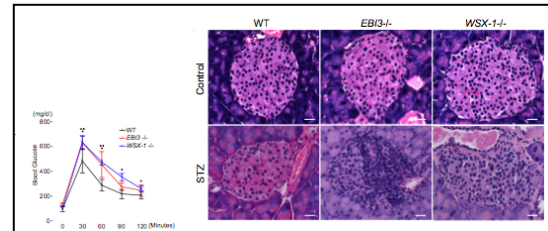
本研究では、以下の計画・方法により IL-27 などの機能探索と治療応用を検討した。

1. 自然免疫細胞に対する IL-27 の抑制作用の検討 IL-27/IL-27 受容体欠損樹状細胞、マクロファージを用い、LPS など刺激し、産生されるサイトカインや、受容体下流のシグナル伝達分子の活性化を検討し、IL-27 や関連サイトカインの自然免疫細胞に対する抑制作用を明

らかにする。

2. 個体内における IL-27 の役割の検討 IL-27/IL-27 受容体欠損マウスに薬剤処理による膵島炎/糖尿病を誘導する、また、LDL 受容体欠損マウスと交配し高脂肪食を付加することで動脈硬化モデルマウスを作成し、これらのモデル動物を用いて、IL-27 の病態における役割を個体内で解析する。
3. IL-27 の抑制シグナルの解明 STAT1 依存性などに着目し、アレー法などを用いて T 細胞、および自然免疫細胞における IL-27 の抑制シグナルを解明する。
4. IL-27 シグナル制御による免疫制御法の確立 2. のモデルマウスや、培養細胞に対して IL-27 を投与/添加することにより、病態の改善や、細胞の活性化抑制作用を解析し、IL-27 シグナル制御により自然免疫細胞の機能制御を行い、免疫疾患に対する治療効果を検討する。

以上により、IL-27 等による抑制シグナルを

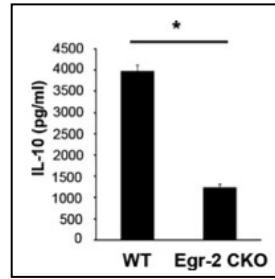


明らかにし、新規免疫制御法を確立を目指した。

4. 研究成果

1. 変成自己、変成成分により生じる炎症病態における IL-27 の関与と治療効果を明らかにした。ストレプトゾトシンにより誘導される膵島炎と引き続く糖尿病の発症において IL-27 シグナルを欠損するマウスでは、炎症の増悪と血糖値の上昇（糖尿病対の増悪）が認められた。また、IL-27 シグナルを欠損するマウスでは、高脂肪食負荷により動脈硬化の増悪と、酸化 LDL 刺激時のマクロファージによる炎症性サイトカイン産生の亢進が認められた。また、これらの病態モデルに対してリコンビナント IL-27 は治療効果を示した。すなわち、IL-27 シグナルは、代謝性疾患の背景にある炎症の抑制作用を有することが示され、炎症抑制による代謝性疾患の制御という新しい治療法の可能性が示された。
2. IL-27 の抑制シグナルに関し、転写因子 Egr-2 が IL-10 産生に必須であることを見出した。これからのデータから、IL-27 受容体の下流で、STAT1 の活性化を介して、Egr-2、および Blimp-1 依存性に IL-10 産生が誘導されることを見出し

た。T 細胞に関しては、IL-10 産生が IL-27 による主要な抑制因子とされているため、その抑制シグナル伝達系の全容が明らかにされた。



3. IL-27 によるマクロファージなど自然免疫細胞に対する抑制作用は、IL-10 非依存性のものがあると考えられている。IL-27 シグナル欠損マクロファージでは、免疫抑制作用や Th 分化制御作用を有する脂質メディエーターの産生亢進が認められたことから、IL-27 がこの脂質メディエーター産生制御を介して、T 細胞以外の（あるいは、T 細胞を含む）多くの細胞に対して、免疫/炎症抑制作用を示す可能性が示唆された。これは、IL-27 による新しい免疫反応・細胞分化制御機構の存在を示唆しており、今後の詳細な解析が待たれる。
4. IL-35 に関しては、Treg 細胞により産生され、また Treg 細胞の機能を亢進させることなどが明らかとされたため、本研究では、詳細な解析は行わなかった。IL-27 との比較検討は、将来的に必要となると考えている。

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 14 件)

- ① Iwasaki, Y., F. Keishi, T. Okamura, A. Yanai, S. Sumitomo, H. Shoda, T. Tamura, H. Yoshida, P. Charnay, and K. Yamamoto. 2013. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. *Eur J Immunol*.
- ② Ozaki, N., S. Suzuki, M. Ishida, Y. Harada, K. Tanaka, Y. Sato, T. Kono, M. Kubo, D. Kitamura, J. Encinas, H. Hara, and H. Yoshida. 2012. Syk-dependent signaling pathways in neutrophils and macrophages are indispensable in the pathogenesis of anti-collagen antibody-induced arthritis. *Int Immunol* 24:539-550.
- ③ Jeon, S. G., H. Kayama, Y. Ueda, T. Takahashi, T. Asahara, H. Tsuji, N. M. Tsuji, H. Kiyono, J. S. Ma, T. Kusu, R. Okumura, H. Hara, H. Yoshida, M. Yamamoto, K. Nomoto, and K. Takeda. 2012. Probiotic Bifidobacterium breve Induces IL-10-Producing Tr1 Cells in the Colon. *PLoS Pathog* 8:e1002714.
- ④ Hasegawa, E., Y. Oshima, A. Takeda, K. Saeki, H. Yoshida, K. H. Sonoda, and T. Ishibashi. 2012. IL-27 inhibits pathophysiological intraocular neovascularization due to laser burn. *J Leukoc Biol* 91:267-273.
- ⑤ Kido, M., S. Takeuchi, N. Sugiyama, H. Esaki, H. Nakashima, H. Yoshida, and M. Furue. 2011. T cell-specific overexpression of interleukin-27 receptor alpha subunit (WSX-1) prevents spontaneous skin inflammation in MRL/lpr mice. *Br J Dermatol* 164:1214-1220.
- ⑥ Fujimoto, H., T. Hirase, Y. Miyazaki, H. Hara, N. Ide-Iwata, A. Nishimoto-Hazuku, C. J. Saris, H. Yoshida, and K. Node. 2011. IL-27 inhibits hyperglycemia and pancreatic islet inflammation induced by streptozotocin in mice. *Am J Pathol* 179:2327-2336.
- ⑦ Tong, H., Y. Miyazaki, M. Yamazaki, H. Hara, H. Waldmann, S. Hori, and H. Yoshida. 2010. Exacerbation of delayed-type hypersensitivity responses in EBV-induced gene-3 (EBI-3)-deficient mice. *Immunol Lett* 128:108-115.
- ⑧ Miyazaki, Y., S. Hamano, S. Wang, Y. Shimano, Y. Iwakura, and H. Yoshida. 2010. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol* 185:1150-1157.
(以上査読あり)
- ⑨ 吉田裕樹. 2012. IL-23, 27 と IL-12 ファミリー. *細胞工学* 31:758-762.
- ⑩ 吉田裕樹. 2010. IL-27 による免疫制御と炎症抑制. *実験医学 (増刊)* 28:1954-1959.
- ⑪ 吉田裕樹. 2010. IL-27. *分子リウマチ治療* 3:100-104.
- ⑫ 吉田裕樹. 2010. IL-12 サイトカインファミリー. *臨床検査* 54:599-605.
- ⑬ 吉田裕樹. 2010. インターロイキン 27. *日本臨牀 増刊号 関節リウマチ (第 2 版)* -寛解を目指す治療の新時代- 68:164-168.
- ⑭ 平瀬徹明, 吉田裕樹, and 野出孝一. 2010. 動脈硬化の病態基盤としての血管炎症. *細胞工学* 29:788-792.
(以上査読無し)

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① 吉田裕樹. 原虫感染に対する新規自然免疫活性化経路とサイトカインによる免疫制御. In 長崎大学「感染症・放射線障害を中心とする下村脩博士ノーベル化学賞顕彰記念創薬拠点」における研究支援と高度化」創薬シンポジウム: アカデミア創薬と探索医療. 日本, 長崎. 2013. 3. 19
- ② 木村大輔, 都田真奈, 本間季里, 木村一美, 原博満, 吉田裕樹, and 由井克之. マラリア原虫特異的 CD4T 細胞は EB13 陽性サイトカインを介して他の CD4T 細胞の IL-2 産生を抑制する. In 第 82 回日本寄生虫学会大会. 日本, 東京. 2013. 3. 29~31
- ③ Iwasaki, Y., K. Fujio, T. Okamura, A. Yanai, S. Sumitomo, H. Shoda, T. Tamura, H. Yoshida, and K. Yamamoto. A novel IL-27 signaling pathway mediated by Egr-2 regulates IL-10 production in naive T cells. In 第 41 回日本免疫学会学術集会. 日本, 神戸. 2012. 12. 5~7
- ④ Sato, Y., S. Suzuki, H. Hara, T. Kiasho, and H. Yoshida. IL-27 affects immune responses via rgulation of prostagrandin E2 production by macrophages. In 第 41 回日本免疫学会学術集会. 日本, 神戸. 2012. 12. 5~7
- ⑤ Yoshida, H., T. Hirase, H. Hiromitsu, and K. Node. Interleukin 27 Ameriolates Atherosclerosis by Inhibiting Bone Marrow-Derived Macrophage Activation in Arterial Walls in Mice. In 8th International Congress on Autoimmunity. Spain, Granada. 2012. 5. 9~13
- ⑥ 吉田裕樹, 原博満, and 見市文香. リーシュマニア原虫に対する自然免疫機構の解明. In 第 81 回日本寄生虫学会大会. 日本, 兵庫. 2012. 3. 23
- ⑦ 木村大輔, 都田真奈, 本間季里, 木村一美, 原博満, 吉田裕樹, and 由井克之. マラリア原虫感染によって引き起こされる CD4+ T 細胞の IL-2 産生抑制機序の解析. In 第 81 回日本寄生虫学会大会. 日本, 兵庫. 2012. 3. 23
- ⑧ Yoshida, H., H. Fujimoto, H. Hara, T. Hirase, and K. Node. Interleukin 27 inhibits hyperglycemia and pancreatic islet inflammation induced by streptozotocin in mice. In 6th leukocyte signal transduction workshop. Greece, Chania, Crete. 2011. 6. 5~10
- ⑨ Yoshida, H., T. Hirase, H. Hara, Y. Miyazaki, N. Ide-Iwata, A. Nishimoto-Hazuku, H. Fujimoto, and K. Node. Interleukin 27 ameliorates atherosclerosis by inhibiting bone marrow-derived macrophage activation in arterial walls in mice. In 9th Joint Meeting of ICS-ISICR. Italy, Florence. 2011. 10. 9~12
- ⑩ Fujimoto, H., T. Hirase, Y. Miyazaki, H. Hara, N. Ide-Iwata, A. Nishimoto-Hazuku, C. J. M. Saris, H. Yoshida, and K. Node. Interleukin 27 Inhibits Hyperglycemia and Pancreatic Islet Inflammation Induced by Streptozotocin in Mice. In The 14th International Congress of Immunology (ICI 2010)I. Japan, Kobe. 2010. 8. 22~27
- ⑪ Hirase, T., H. Hara, Y. Miyazaki, N. Ide-Iwata, A. Nishimoto-Hazuku, H. Fujimoto, H. Yoshida, and K. Node. Interleukin 27 ameliorates atherosclerosis by inhibiting bone marrow-derived macrophage activation in arterial walls in mice. In The 14th International Congress of Immunology (ICI 2010). Japan, Kobe. 2010. 8. 22~27
- ⑫ Yoshida, H. Cytokine regulation of inflammation in atherosclerosis. In US-Japan-Asia Dialogue on Cardiovascular Diseases. Japan, Tokyo. 2010. 8. 21
- ⑬ Yoshida, H., M. Furukawa, and H. Takaishi. IL-27 ABROGATES RANKL-MEDIATED OSTEOCLASTOGENESIS THROUGH STAT1- DEPENDENT INHIBITION OF C-FOS. In 9th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy. Swiss, Geneva. 2010. 2. 4~6

〔図書〕(計 3 件)

- ① 吉田裕樹, and 松崎吾朗. 2012. 宿主と病原体の攻防. In 免疫学コア講義, 3 ed. 熊ノ郷淳, 阪口薫雄, 竹田潔, and 吉田裕樹, eds. 南山堂, 東京. 157-168.
- ② 吉田裕樹, and 中西憲司. 2012. サイトカインとケモカイン. In 免疫学コア講義, 3 ed. 熊ノ郷淳, 阪口薫雄, 竹田潔, and 吉田裕樹, eds. 南山堂, 東京. 101-112.
- ③ 吉田裕樹. 2011. IL-27/WSX-1. In 疾患モデルの作成と利用 免疫疾患. 岩倉洋一郎, ed. エル・アイ・シー, 東京.

325-331.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

www.mcis.med.saga-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 裕樹 (YOSHIDA HIROKI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：40260715

(2) 研究分担者

原 博満 (HARA HIROMITSU)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：20392079

(3) 連携研究者

()

研究者番号：