

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 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度 ～2011 年度

課題番号：22790748

研究課題名（和文） IL-25 による肺動脈炎・血管壁リモデリング発症機序の解明

研究課題名（英文） Roles of IL-25 in the development of pulmonary arterial inflammation and remodeling

研究代表者

池田 啓（IKEDA KEI）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10456014

研究成果の概要（和文）：

肺特異的に IL-25 を発現するトランスジェニックマウス（C57BL/6 CC10 IL-25 マウス）および C57BL/6 CC10 IL-25 NKT 細胞欠損マウスを作製し、肺の病理組織、免疫染色、ならびに遺伝子発現を検討した。その結果、肺動脈平滑筋増生の発症には IL-25-NKT 細胞経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We generated lung specific IL-25 transgenic (C57BL/6 CC10 IL-25) mice and C57BL/6 CC10 IL-25 NKT cell-deficient mice, and performed histopathological analysis, immune-histochemistry, and gene expression analysis. The results suggest that IL-25-NKT cell pathway is involved in the development of pulmonary arterial muscularization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
統計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：閉塞性肺疾患、肺線維症、呼吸器感染症、その他

キーワード：IL-25、肺血管リモデリング

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension: PAH) は、肺動脈炎及び血管壁のリモデリングにより肺動脈圧が上昇する難治性病態の総称であり、その原因は多岐にわたる。PAH はまれな疾患であるが、膠原病では比較的高率に合併するため、その病態の解明および治療戦略の確立が期待されている。膠原病性 PAH では、免疫異常に起因する内皮障害とそれに続く炎症細胞浸潤により血管壁のリモデリングがおこることが示唆されているが、その詳細は依然不明である。

IL-25 (IL-17E) は、IL-17 ファミリーに属

するサイトカインであるが、その作用は他の IL-17 ファミリーサイトカインとは大きく異なり、Th2 型炎症を誘導することが知られている。本研究者はアレルギー性炎症における IL-25 の役割を解析する過程で、マウスの肺に IL-25 を発現させると肺動脈周囲の炎症と血管壁の著明なリモデリングが誘導されることを発見した。他方、谷口らは、IL-25 による炎症の惹起に、NKT 細胞が関与することを明らかにした (Terashima, et al., J Exp Med. 2008)。これらの結果は、PAH の病態に IL-25-NKT 細胞経路が関与している可能性を推測させるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

従って本研究では、PAH の病態形成における IL-25 の役割およびその作用メカニズムを解明し、IL-25 を標的とした PAH の新規治療法の確立に向けた基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗原誘発性肺動脈平滑筋増生の誘導
OVA で感作した C57BL/6 マウスに OVA を反復して吸入投与することにより肺動脈平滑筋増生を誘導した。さらにこのマウスの肺における IL-25 の発現を定量的 RT-PCR 法により検討した

(2) 抗原誘発性肺動脈平滑筋増生における IL-25 の働き

OVA で感作した C57BL/6 マウスに抗 IL-25 中和抗体を投与し、その後 OVA を反復吸入投与し肺動脈平滑筋増生における IL-25 の働きを検討した

(3) 肺動脈平滑筋増生における IL-25-NKT 細胞経路の役割の解析

ラット CC10 promoter の制御下で IL-25 を発現する肺特異的 IL-25 過剰産生マウス (C57BL/6 CC10 IL-25 マウス) を作製し、肺動脈平滑筋増生の有無を組織学的解析、ならびに免疫組織学的解析により検討した。さらに C57BL/6 CC10 IL-25 マウスを NKT 細胞欠損マウスと交配し IL-25-NKT 細胞経路の肺動脈平滑筋増生における働きを検討した。

4. 研究成果

(1) 抗原誘発性肺動脈平滑筋増生の誘導
OVA で感作した C57BL/6 マウスに OVA を計 9 回吸入投与した。その後、これらのマウスの肺を組織学的に解析し肺動脈平滑筋増生の有無を検討した。その結果、OVA を吸入投与したマウスの肺では、小-中動脈周囲の炎症細胞浸潤と動脈周囲の平滑筋増生が生じることが明らかとなった (図 1)。

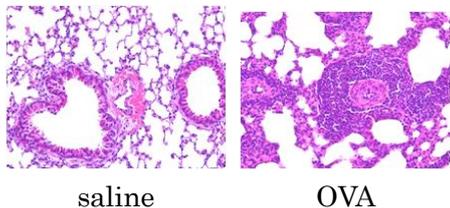


図 1

C57BL/6 マウスを OVA/Alum で感作し、24 時間間隔で計 9 回 OVA あるいは生理食塩水を吸入投与した。最終投与から 24 時間後に肺組織の検討を行った。

(2) 抗原誘発性肺動脈平滑筋増生における IL-25 の働き

抗原誘発性肺動脈平滑筋増生における IL-25 の役割を明らかにするため、OVA を反復吸入投与したマウスの肺における IL-25 の発現を定量的 RT-PCR 法により検討した。その結果、OVA を吸入投与したマウスの肺では IL-25 の発現が認められることが明らかとなった (図 2)。

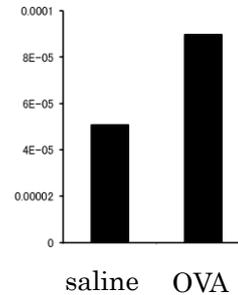


図 2

OVA/Alum で感作した C57BL/6 マウスに 24 時間間隔で計 9 回 OVA あるいは生理食塩水を吸入投与した。最終投与から 24 時間後の肺組織における IL-25 の発現を半定量的 RT-PCR 法により検討した。

次に肺動脈平滑筋増生の発症における IL-25 の関与を明らかにするために OVA で感作した C57BL/6 マウスに抗 IL-25 中和抗体を腹腔内投与し、その後 OVA を反復吸入投与した。その結果、抗 IL-25 中和抗体を投与したマウスの肺では肺動脈平滑筋増生が有意に抑制されることが明らかとなった (図 3)。

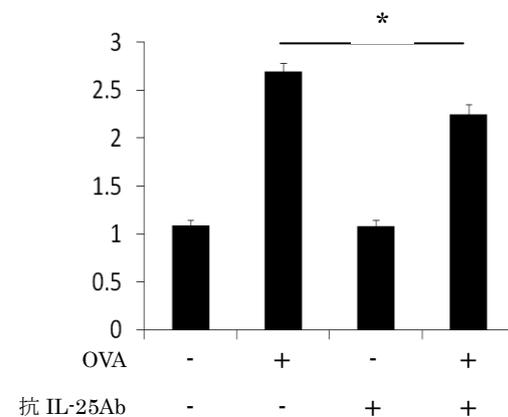
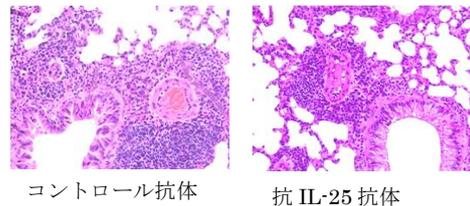


図 3

Ova/Alum で感作した C57BL/6 マウスに抗

IL-25 中和抗体あるいはコントロール抗体を投与し、投与 24 時間後より OVA を反復吸入投与し肺動脈平滑筋増生を比較した (* p<0.05)。

以上より肺における IL-25 産生が抗原誘発性肺動脈平滑筋増生を増強していることが明らかとなった。

(3) 肺動脈平滑筋増生における IL-25-NKT 細胞経路の働き

肺動脈平滑筋増生における IL-25 の作用メカニズムを明らかにするため、肺特異的に IL-25 を過剰発現するトランスジェニックマウス (C57BL/6 CC10 IL-25 マウス) を作製し、肺組織を解析した。その結果、C57BL/6 CC10 IL-25 マウスの肺では、生後 6 ヶ月頃より小～中肺動脈周囲に炎症細胞浸潤と平滑筋増生が生じることが明らかとなった (図 4)。

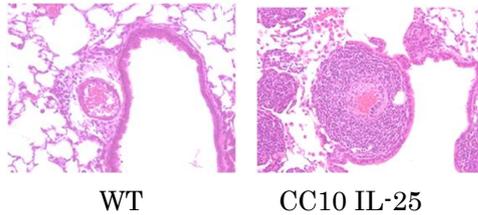


図 4 6 か月齢の C57BL/6 CC10 IL-25 マウスと野生型 (WT) マウスの肺組織を比較した。

また、平滑筋アクチンに対する抗体を用いた免疫染色により、C57BL/6 CC10 IL-25 マウスでは、コントロールマウスに比して肺動脈周囲平滑筋が肥厚していることが明らかとなった (図 5)。

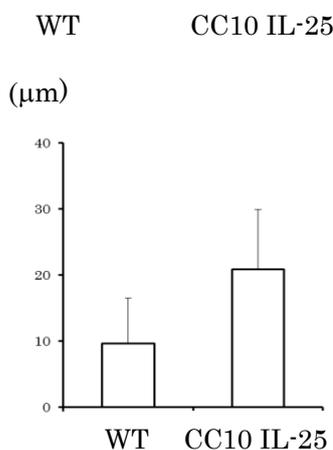
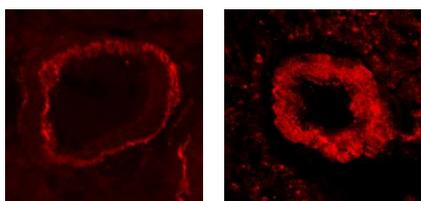


図 5 生後 6 か月齢の野生型 (WT) マウス、C57BL/6 CC10 IL-25 マウスの肺組織を抗平滑筋アクチン抗体により免疫染色を行った。上段に免疫染色、下段に平滑筋厚の平均±SD を示す。

近年 IL-25 受容体が NKT 細胞に発現していること、さらに NKT 細胞は IL-25 刺激により IL-4、IL-13 を産生することが示された (Terashima, et al., J Exp Med. 2008)。本研究では肺動脈平滑筋増生における IL-25-NKT 細胞経路の働きを検討するため C57BL/6 CC10 IL-25 マウスと NKT 細胞欠損マウス (NKT^{-/-}マウス) を交配し C57BL/6 CC10 IL-25 NKT^{-/-}マウスを作製し肺組織を比較した。その結果、C57BL/6 CC10 IL-25 マウスで生後 6 か月ごろより認められる肺動脈周囲の平滑筋増生が、同腹子の C57BL/6 CC10 IL-25 NKT^{-/-}マウスでは有意に減弱していた (図 6)。

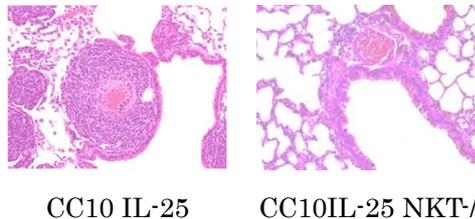


図 6 C57BL/6 CC10 IL-25 マウス、C57BL/6 CC10 IL-25 NKT^{-/-}マウスの肺組織を比較した。

(4) 考察

本研究より肺動脈平滑筋増生に IL-25-NKT 細胞経路が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これまで肺動脈性肺高血圧症に対しては有効な治療法が限られていたが、本研究の結果により IL-25-NKT 細胞経路が新たな治療標的となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件、全て査読有)

- ① Nakagomi D, Ikeda K, et al. Bucillamine-induced yellow nail in Japanese patients with rheumatoid arthritis: two case reports and a review of 36 reported cases. Rheumatol Int in press
- ② Oya Y, Watanabe N, Ikeda K et al. Int Immunol. Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-lpr/lpr mice. Int Immunol. 2011; 23: 335-344.
- ③ Horikoshi M, Suzuki T, Ikeda K, et al. Comparison of low-field dedicated

extremity magnetic resonance imaging with articular ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2010; 20:556-560.

④ Oki M, Watanabe N, Ikeda K, et al. A functional polymorphism in B and T lymphocyte attenuator is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol*, in press.

⑤ Koga S, Ikeda K, Nakagomi D et al. A patient with neuromyelitis optica with positive anti-Ro (SS-A) antibody presenting with intractable hiccup and nausea. *Mod Rheumatol.* 2011; 21: 561-562.

⑥ Kashiwakuma D, Suto A, Ikeda K, et al. B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses. *J Immunol.* 2010; 185: 2730-2736.

⑦ Kanari H, Kagami S, Ikeda K, et al. Role of Th2 cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152 s1:47-53.

⑧ Hiramatsu Y, Suto A, Ikeda K, et al. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. *J Leukoc Biol.* 2010; 87: 703-712.

[学会発表 (国内)] (計 14 件)

① 2011 年 11 月 10 日 加々美新一郎、細川淳一、池田 啓、他. IgG4 関連涙腺腫脹症例における PGD2-CRTH2 経路の役割の解析 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会

② 2011 年 7 月 20 日 池田 啓、瀬戸洋平、大野滋、他. リウマチ性疾患の画像 滑膜ドプラ血流測定に対する PRF (Pulse Repetition Frequency) の与える影響の検討. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会

③ 2011 年 7 月 19 日 松村竜太郎、池田 啓、海辺剛志、他. 生物学的製剤増量、変更 関節リウマチ患者はどう評価しているか? 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会

④ 2011 年 7 月 19 日 松浦功、山形美絵子、池田 啓、他. トシリズマブ 関節リウマチ患者の骨代謝に対するトシリズマブの効果. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会

⑤ 2011 年 7 月 19 日 大久保綾子、岩本太郎、池田 啓、他. 全身性エリテマトーデスの治療中に腸管囊腫様気腫症および気腫性膀胱炎を合併した一例. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会

⑥ 2011 年 7 月 18 日 古田俊介、山形美絵子、池田 啓、他. トシリズマブ DNA アレイ解析によるトシリズマブの関節リウマチに対する薬効予測. 第 55 回日本リウマチ学会総

会・学術集会

⑦ 2011 年 7 月 18 日 池田 啓、瀬戸洋平、大野滋、他. リウマチ性疾患の画像 滑膜ドプラ血流測定に対する検者、機器、ならびにプローブの劣化の与える影響の検討. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会

⑧ 2011 年 5 月 15 日 横田雅也、須藤明、池田 啓、他. 気管支喘息患者の QOL 調査 第 60 回日本アレルギー学会春季臨床大会

⑨ 2011 年 5 月 15 日 大久保綾子、中込大樹、池田 啓、他. Nutcracker esophagus (NE) を合併した好酸球性食道炎の一例. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会

⑩ 2011 年 5 月 15 日 池田 啓、川島広稔、高橋健太郎、他. 膠原病ならびにリウマチ性疾患患者の Quality of Life 調査. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会

⑪ 2010 年 11 月 27 日 丹羽佑輔、川島沙紀、池田 啓、他. 肺動脈リモデリングにおける IL-25 の働き 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会

⑫ 2010 年 11 月 26 日 中込大樹、古賀俊輔、池田 啓、他. 両側視神経炎を合併した Churg-Strauss 症候群の一例 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会

⑬ 2010 年 11 月 26 日 中込大樹、古賀俊輔、池田 啓、他. 両側視神経炎を合併した Churg-Strauss 症候群の 1 例. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会

⑭ 2010 年 11 月 13 日 林 彰子、増田和司、池田 啓、他. 高用量ステロイド投与中の膠原病患者への ST 合剤投与による副作用発現率と危険因子に関する研究. 第 20 回日本医療薬学会年会

[学会発表 (海外)] (計 6 件)

① 2011 年 11 月 18 日 K. Ikeda. New approach through a beneficial tool - The application of ultrasonographic evaluation of synovium in the management of rheumatoid arthritis. The 5th Asian Congress on Autoimmunity, Satellite Symposium. Singapore

② 2011 年 11 月 6 日 D. Nakagomi, K. Ikeda, A. Okubo, et al. The impact of ultrasonography on the classification of rheumatoid arthritis with 2010 ACR/EULAR criteria: ultrasound-combined classification with two different definitions of gray-scale synovitis for joint involvement. ACR (American College of Rheumatology) Annual Scientific Meeting, Chicago, USA

③ 2011 年 5 月 27 日 D. Nakagomi, K. Ikeda, A. Okubo, et al. (2011) The impact of ultrasonography on the classification of RA with 2010 ACR/EULAR criteria. EULAR

(European League Against Rheumatism)
Congress, London, UK

④ 2010年6月18日 K. Ikeda, D. Nakagomi,
H. Kawashima, et al. Comparison of
ultrasonographic findings with established
measures in the evaluation of drug
response in rheumatoid arthritis. EULAR
(European League Against Rheumatism)
Congress 2010, Roma, Italy

⑤ 2010年10月23日 K. Ikeda The
application and benefit of ultrasonography
in rheumatic conditions. TLAR (Turkish
League Against Rheumatism) Symposium
in Antalya: The Benefit of
Ultrasonography and Nuclear Medicine in
Rheumatic Conditions, Antalya, Turkey

⑥ 2010年10月23日 K. Ikeda How to
evaluate synovial inflammation in each
joint with ultrasound in rheumatic
conditions. TLAR (Turkish League Against
Rheumatism) Symposium in Antalya: The
Benefit of Ultrasonography and Nuclear
Medicine in Rheumatic Conditions,
Antalya, Turkey

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ

[http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/
index.html](http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 啓 (IKEDA KEI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10456014