

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590475

研究課題名(和文) IL-23によるNotchシグナルを介した新しい免疫制御機構

研究課題名(英文) New mechanism whereby IL-23 regulates immune responses through Notch signalling

研究代表者

徐 明利 (Xu, Mingli)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80597964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：IL-23は、炎症誘導性のTh17細胞の増殖維持に重要なサイトカインである。自己免疫性肝炎モデルマウスを用いて、内在性のIL-23が、IL-22産生を介し肝炎を抑制し、外来性のIL-23は、Notchシグナルを介しIL-22の他にIL-17などの炎症性サイトカインの産生も誘導し肝炎抑制効果は殆ど見られないことがわかった。また、腫瘍モデルにおいては、内在性のIL-23は、T細胞からのIL-17産生を促進し炎症を増強し腫瘍増殖を増大させるが、外来性のIL-23は腫瘍増殖を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：IL-23 is an important cytokine for maintenance of inflammatory Th17 cells. Using a autoimmune hepatitis mouse model, endogenous IL-23 was demonstrated to induce IL-22-mediated protection from hepatitis, whereas exogenous IL-23 failed to protect from it because of the production of inflammatory cytokines such as IL-17 in addition to IL-22. Moreover, in a tumor model, endogenous IL-23 was revealed to promote the tumor growth via enhancing inflammation through augmentation of IL-17 production. On the other hand, exogenous IL-23 turned out to suppress the tumor growth.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：IL-23 IL-22 IL-17 Notch

1. 研究開始当初の背景

IL-23 は、自己免疫性疾患などの誘導に関与する炎症性 Th17 細胞の増殖や維持に重要なサイトカインである。Notch シグナルは、神経、造血、血管、体節などの種々の細胞の発生・分化・増殖など細胞の運命決定に重要な役割を果たしている。我々は、最近、活性化 Notch シグナルにより CD4⁺T 細胞で発現誘導される分子をマイクロアレイを用い網羅的に調べたところ、IL-22 発現が著明に増強していることを見出した (Alam et al. PNAS 107, 5943-8, 2010)。IL-22 は、IL-10 ファミリーに属するサイトカインで、Th17 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、CD11c⁺ 骨髄細胞、リンパ組織誘導様細胞などの細胞から分泌され、上皮系細胞に作用し皮膚炎症や傷創治癒に重要な役割を果たす。IL-22 は炎症促進と炎症からの保護の二重特性を持っており、乾癬やリウマチ関節炎には炎症促進的であり、炎症性腸疾患や肝炎には炎症抑制的、つまり、組織保護の役割を果たしている。そこで、我々は、さらにコンカナバリン A (Con A) 投与で誘導するマウス肝炎モデルを用いて、Notch シグナルに必須の転写因子 RBP-J 遺伝子の欠損マウスでは肝炎が増悪化し、さらにこの RBP-J 遺伝子欠損マウスに IL-22 を投与することにより、肝炎が軽減されることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、Con A 誘導自己免疫性肝炎モデルの他に、炎症発癌モデルと IL-23 遺伝子導入膀胱癌モデルを用いて、内在性および外来性 IL-23 による IL-22 や IL-17 の産生誘導や、Notch やさらに薬物代謝酵素発現を誘導し異物の代謝や IL-22 の産生誘導にも関与している芳香族炭化水素受容体 (AHR) を介したこれらの病態形成における役割やその作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Con A 誘導自己免疫性肝炎モデル

野生型 C57BL/6 マウスおよび IL-23p19、IL-17 遺伝子欠損マウスに Con A (5, 10, 20 μ g/g) を尾静脈より静注後、経時的 (0, 12, 24, 48, 72 時間) に、心臓より採血し血清を調製し、市販のキットを用いて AST および ALT のトランスアミナーゼ活性と、各種サイトカイン量を ELISA 法にて定量した。肝臓は、一部をホルマリン固定し HE 染色による炎症の程度をその面積により定量した。残りの肝臓よりパーコールを用いた密度勾配分法により単核球を精製した。さらに、単核球から RNA を抽出し cDNA を作製し、半定量 RT-PCR 法により mRNA 発現を解析した。

(2) 炎症発癌モデル

野生型 C57BL/6 マウスおよび IL-23p19、IL-17、MyD88 遺伝子欠損マウスの背部の毛を剃った後、皮下にゼラチンスポンジ

(Spongel) を挿入後、その中へ線維肉腫細胞 (QR-32) を植えると正着し腫瘍が致死的に増殖する。この時、ゼラチンスポンジがないと腫瘍は正着せず、炎症により皮下増殖能を獲得する実験系である。腫瘍内に浸潤する細胞は、移入したゼラチンスポンジをコラゲナーゼ処理により溶解し回収し、各種細胞表面マーカーに対する染色やサイトカインに対する抗体を用いた細胞内染色を行い FACS で解析した。

(3) IL-23 遺伝子導入膀胱癌モデル

IL-23 のサブユニット p40 と p19 を自由度の高いリンカー (Gly₄Ser₃) を挟んで 1 本に繋いだ発現ベクターを構築し、Lipofectamine 2000 を用いて膀胱癌腫瘍株 MBT2 に遺伝子導入し、G418 耐性クローンを複数樹立した。C3H マウスの皮下に腫瘍を植えた後、経時的に腫瘍径を測定した。ワクチン効果は、腫瘍細胞をマイトマイシン C 処理し 1 日あけて 2 度投与し、その 5 日後に親細胞 MBT2 を皮下投与した。腫瘍移植後 14 日目に所属リンパ節よりリンパ球を取り出し FACS 解析した。抗体投与による細胞除去実験は、それぞれの精製抗体を、腫瘍を植える 24 時間前と植えた後 5 日ごとに投与した。

4. 研究成果

(1) IL-23 による IL-17 および IL-22 を介した自己免疫性肝炎誘導における役割とその作用機序

まず、Con A 誘導性の肝炎モデルにおける IL-23 の役割を明らかにするため、p19 遺伝子欠損マウスを用いて感受性を調べたところ、p19 を欠損すると、血中 IL-22 および IL-17 産生の低下と共に、肝臓の損傷マーカーである血中 AST/ALT 値が上昇し、組織学解析からも炎症が増大していた。さらに、この時肝臓の単核球での種々の分子の mRNA レベルでの発現を RT-PCR により調べると、p19 遺伝子欠損マウスでは、IL-22 や IL-17 発現が低下していたが、Notch3 発現は逆に増加していた。そこで、次に IL-23 の下流での IL-17 および IL-22 の役割を明らかにするため、p19 欠損マウスにこれらのサイトカインを投与すると、IL-23 投与では肝炎の抑制および増悪化効果が見られなかったが、IL-22 により肝炎が軽減され、IL-17 により増悪化傾向にあった。さらに、肝臓由来単核球を *in vitro* で Con A と IL-23 で刺激し、各種シグナル伝達分子の IL-17 および IL-22 産生への影響を調べると、STAT1 および STAT3 シグナルは共にいずれのサイトカイン産生に部分的に必要なで、さらに、Notch シグナルは IL-17 と IL-22 両方に、AHR シグナルは IL-22 産生にのみに必要であった。以上の結果より、IL-23 は生体内において肝炎誘導においては反対の作用を示す 2 つのサイトカイン産生を Notch および AHR シグナルを介し巧妙に制御していることが明らかになった (Xu et al. Eur. J. Immunol. 41,

(2) 炎症発癌誘導における内在性 IL-23 および IL-17 の役割とその作用機序

近年、IL-23p19 欠損マウス等を用いた化学発癌による自然発生癌の解析より、炎症と発癌の正の相関性が明らかになってきているが、未だ不明の点が多い。そこで、本研究では、炎症発癌誘導性の繊維肉腫細胞 QR-32 を用いて、炎症により誘発される癌の増殖に必要な細胞とその因子について検討を行った。この腫瘍は、ゼラチンスポンジと一緒に移植すると、このスポンジにより炎症が誘発され腫瘍が正着し増殖が促進されるユニークな実験系である。IL-17 および MyD88, IL-23p19 などの遺伝子欠損マウスを用いた解析より、 $\gamma\delta$ T 細胞から MyD88/IL-23 依存的に産生される IL-17 が腫瘍増殖を促進していることが明らかになった。以上の結果より、内在性の IL-23 は、炎症を誘導し腫瘍の正着と増殖を促進していることが示唆された(論文投稿準備中、富山大学早川芳弘先生等との共同研究)。

(3) 外来性 IL-23 による膀胱癌に対する抗腫瘍効果

我々は以前にメラノーマ腫瘍を用いて IL-23 が抗腫瘍効果を示すことを報告しているが、上述の様な IL-23p19 欠損マウスを用いた結果とは正反対である。そこで、本研究ではさらに膀胱癌細胞 MBT2 を用いて IL-23 発現腫瘍を作製し、その腫瘍増殖への影響を調べた。その結果、IL-23 は、種々の細胞に対する抗体を用いた細胞除去実験より CD8⁺T 細胞の活性化を介し腫瘍増殖を抑制していた。また、この IL-23 産生腫瘍はワクチン効果を有しており、さらに、CD25 に対する抗体により制御性 T 細胞を除去すると相乗的に抗腫瘍効果を示すことなども明らかになった。以上の結果より、外来性の IL-23 は、CD8⁺T 細胞を介し抗腫瘍免疫を増強することが示された(Kuramoto et al. BJU Int. 108, 914-921, 2011)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

1. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J, Kaneko K, Watanabe K, Mizuguchi J, Itoh M, Kawakami Y, Yoshimoto T. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22 and IL-23, in inflammatory diseases. Clin. Dev. Immunol. 2013;2013:968549. doi: 10.1155/2013/968549. 査読有
2. Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, Mamura M. Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. EMBO Mol Med. 2013; 5(11):1720-1739. 査読有
3. Osada Y, Yamada S, Nabeshima A, Yamagishi Y, Ishiwata K, Nakae S, Sudo K, Kanazawa T. Heligmosomoides polygyrus infection reduces severity of type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin in mice via STAT6- and IL-10-independent mechanisms. Exp Parasitol. 2013; 135(2):388-396. 査読有
4. Takada E, Furuhashi M, Nakae S, Ichijo H, Sudo K, Mizuguchi J. Requirement of apoptosis-inducing kinase 1 for the induction of bronchial asthma following stimulation with ovalbumin. Int Arch Allergy Immunol. 2013; 162(2):104-114. 査読有
5. Kamijo S, Takeda H, Tokura T, Suzuki M, Inui K, Hara M, Matsuda H, Matsuda A, Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S, Sudo K, Suto H, Ichikawa S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-induced allergic airway inflammation. J Immunol. 2013; 190(9):4489-4499. 査読有
6. Chiba Y, Mizoguchi K, Mitobe I, Higuchi K, Nagai H, Nishigori C, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 enhances the expression of TRAIL and TLR3 in human melanomas and inhibits their tumor growth in cooperating with a TLR3 agonist poly(I:C) partly in TRAIL-dependent manner. PLoS One 2013; 8(10):e76159. doi: 10.1371/journal.pone.0076159. 査読有
7. Nakajima K, Maekawa Y, Kataoka K, Ishifune C, Nishida J, Arimochi H, Kitamura A, Yoshimoto T, Tomita S, Nagahiro S, Yasutomo K. The ARNT-Stat3 axis regulates the differentiation of intestinal intraepithelial TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ cells. Nat. Commun. 2013; 4:2112. doi: 10.1038/ncomms3112. 査読有
8. Shimizu M, Ogura K, Mizoguchi I, Chiba Y, Higuchi K, Ohtsuka H, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes nitric oxide production induced by LPS through STAT1, NF- κ B and MAPKs. Immunobiology 2013; 218:628-634. 査読有
9. Xu M, Takanashi M, Oikawa K, Nishi H, Isaka K, Yoshimoto T, Ohyashiki J, Kuroda M. Identification of a novel role of septin 10 in paclitaxel-resistance in cancers through a functional genomics screen. Cancer Sci. 2012; 103(4):821-827. 査読有
10. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwaru N, Ohno T, Ishii A, Körner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. J Immunol. 2012; 189(7):3641-3652. 査読有

11. Shibui A, Shimura E, Nambu A, Yamaguchi S, Leonard WJ, Okumura K, Sugano S, Sudo K, Nakae S. Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production. *Cytokine*. 2012; 59(1):108-114. 査読有
 12. Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. ST2 requires Th2-, but not Th17-, type airway inflammation in epicutaneously antigen-sensitized mice. *Allergol Int*. 2012; 61(2):265-273. 査読有
 13. Fujiwara, S., Nagai, H., Oniki, S., Yoshimoto, T. and Nishigori, C. Interleukin (IL)-17 versus IL-27: opposite effects on TNF- α -induced chemokine production in human keratinocytes. *Exp. Dermatol*. 2012; 21:70-72. 査読有
 14. 千葉祐規乃、溝口出、森嶋紀子、徐明利、善本隆之：サイトカインのすべて IL-27、臨床免疫・アレルギー科、2012; 57 (Suppl. 21):172-183. 査読無
 15. 河上裕、谷口智恵、中村公子、川瀬芳恵、野路しのぶ、大泉梓、南雲春菜、長谷川舞、徐明利、岡本正人、桜井敏晴、藤田知信：がん免疫病態と免疫動態の評価、血液フロンティア、2012; Vol.22, No.8:1183-1190. 査読無
 16. 太田裕士、徐明利、溝口出、高梨正勝、須藤カツ子、黒田雅彦、善本隆之、粕谷和彦、土田明彦、畝崎榮：DCワクチンをリンパ節投与した際の局所滞留性と免疫誘導能の検討、東京医科大学雑誌、2012; 70 (4):444-449. 査読有
 17. 徐明利、千葉祐規乃、善本隆之：サイトカインのすべて IL-35、臨床免疫・アレルギー科、2012; 57 (Suppl. 21):220-230. 査読無
 18. Xu M, Morishima N, Mizoguchi I, Chiba Y, Fujita K, Kuroda M, Iwakura Y, Cua DJ, Yasutomo K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production. *Eur J. Immunol*. 2011; 41 (10): 2828-2839. 査読有
 19. Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura E, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, Nakae S, Fischbein MP. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. *Circulation*. 2011; 124(11 Suppl):S187-196. 査読有
 20. Ohno T, Oboki K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Iikura M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito H, Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS One*. 2011; 6(4):e18404. doi: 10.1371/journal.pone.0018404. 査読有
 21. Meguro A, Ozaki K, Hatanaka K, Oh I, Sudo K, Ohmori T, Matsu H, Tatara R, Sato K, Sakata Y, Nakae S, Leonard WJ, Ozawa K. Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46(12):1557-1565. 査読有
 22. Kuramoto T, Fujii R, Nagai H, Belladonna ML, Yoshimoto T, Kohjimoto Y, Inagaki T, Hara I. IL-23 gene therapy for mouse bladder tumor cell lines. *BJU Int*. 108, 914-921, 2011. 査読有
 23. Pickens SR, Volin MV, Mandelin II, AM, Matsui M, Yoshimoto T, Shahrara S. Local expression of IL-27 ameliorates collagen induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:2289-2298. 査読有
 24. Kamiya S, Okumura M, Chiba Y, Nakamura C, Fukawa T, Nimura N, Mizuguchi J, Wada S, Yoshimoto T. IL-27 suppresses RANKL expression in CD4⁺ T cells in part through STAT3. *Immunol. Let*. 2011; 138:47-53. 査読有
 25. 奥村昌恵、徐明利、善本隆之：IL-12、モデル動物利用マニユアル、LIC、2011; 266-275. 査読無
- 〔学会発表〕(計 14 件)
1. Xu M, Noji S, Popivanova B, Okamoto M, Sakurai T, Fujita T, Torigoe T, Sato N, Sugiura F, Okuno K, Hazama S, Oka M, Kawakami Y. Strong correlation of tumor-infiltrating CD8⁺ and FOXP3⁺ T cells with favorable prognosis of patients with colon cancer. 第42回日本免疫学会学術集会(幕張メッセ、千葉県)2013年12月11日~13日
 2. Mizoguchi I, Mitobe K, Tsunoda R, Higuchi K, Mizuguchi J, Yoshimoto, T. EBI3 functions as an intracellular molecule to regulate the development of colitis in naive CD4⁺CD25⁻ T cells. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy, Aug. 22-27, 2013.
 3. Katagiri S, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Mizuguchi J, Ohyashiki JH, Tauchi T, Inokuchi K, Ohyashiki K. The percentage of effector populations of NK cells correlated highly with sustained CMR with or without imatinib in chronic myeloid leukemia patients. 18th Congress of the European Hematology Association. Stockholm, Sweden, Jun. 13-16, 2013.
 4. Katagiri S, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Mizuguchi J, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Activation levels of natural killer cells and CD8⁺ T cells correlate highly with sustained complete molecular response after discontinuation of imatinib in chronic

- myeloid leukemia patients. 2012 ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta GA, USA, Dec. 8-11, 2012.
5. Nagaoka K, Miki K, Yoshimoto T, Kamigaki T, Maekawa R. Comparison of antigen-loading methods into dendritic cells with protein, mRNA or peptides derived ovalbumin for antigen presenting activity. The 12th International Symposium on Dendritic Cells. Daegu, Korea, Oct. 7-11, 2012.
 6. 川瀬芳恵、藤田知信、大泉梓、野路しのぶ、桜井敏晴、南雲春菜、徐明利、中山一、垣見和宏、鳥越俊彦、池田裕明、珠玖洋、岡本正人、河上裕：能動免疫療法における免疫誘導・抗腫瘍効果を規定するバイオマーカーの検索. 第16回日本がん免疫学会総会. 2012年7月26日～28日、札幌
 7. 溝口出、千葉祐規乃、徐明利、樋口要、善本隆之、水口純一郎：IL-27とPoly(I:C)による協調的 TRAILとTLR3発現増強を介したメラノーマ腫瘍増殖のTRAIL依存的抑制. 第87回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会. (2012)5月29日、東京
 8. Nagaoka K, Takahara M, Yoshimoto T, Teruya T, Shiroma H, Maekawa R. Efficient antigen presentation and induction of anti-tumor immunity by dendritic cells loaded with antigens by electroporation. American Association of Cancer (AACR) Annual Meeting 2012, Chicago, IL, USA, Mar. 31-Apr. 4, 2012.
 9. 太田裕士、徐明利、溝口出、高梨正勝、須藤カツ子、黒田雅彦、善本隆之、粕谷和彦、土田明彦、畝崎榮：DCワクチンをリンパ節投与した際の局所滞留性と免疫誘導能の検討. 第132年会日本薬学会. (2012)3月28-31日、札幌
 10. Terayama H, Hirai S, Qu N, Hirayanagi Y, Musha M, Naito M, Yoshimoto T, Itoh M. Role of intratesticular Epstein-Barr virus-induced gene-3 (EBI3) in the mouse. The Japan Society of Andrology The 31st Annual Meeting & The 18th Japanese Testis Workshop. Kobe, Japan, Jun. 29-30, 2012.
 11. Chiba Y, Xu M, Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 enhances poly (I:C)-induced apoptosis of tumor cells. 第40回日本免疫学会学術集会. (2011)11月27-29日、千葉
 12. Yoshimoto T, Xu M, Mizoguchi I, Chiba Y, Kamiya S, Matsui M, Shahrara S, Mizuguchi J. Regulation of inflammatory immune responses leading to the development of bone destructive autoimmune disease rheumatoid arthritis by IL-27. Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo, The 8th GARN Meeting, Chiba, Japan, Nov. 14-16, 2011.
 13. Xu M, Morishima N, Mizoguchi I, Chiba Y, Fujita K, Kuroda M, Iwakura Y, Cua DJ, Yasutomo K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production. 第168回東京医科大学医学学会総会. (2011)11月5日、東京
 14. Xu M, Morishima N, Mizoguchi I, Chiba Y, Fujita K, Kuroda M, Iwakura Y, Cua DJ, Yasutomo K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production. The 98th American Association of Immunologists Annual Meeting, San Francisco, California, USA, May 13-17, 2011.
- 〔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〕
ホームページ等 なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者
徐明利(XU, Mingli)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80597964
- (2)研究分担者
善本隆之(YOSHIMOTO, Takayuki)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：80202406

須藤カツ子(SUDO, Katsuko)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：50126091
- (3)連携研究者 なし