

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580196

研究課題名(和文) GFPマーキングを用いた食品アレルギーにおけるIL-5産生細胞の挙動・機能解析

研究課題名(英文) Functional study of IL-5-producing cells in food allergy using GFP marking system

研究代表者

橋口 昌章 (Masaaki, Hashiguchi)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20372443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー応答に関与する好酸球の分化・増殖を担うIL-5の発現調節機能の解明はアレルギー疾患を制御するにあたり重要であり、本研究では、IL-5プロモーター制御下でEGFPを発現するトランスジェニック(tg)マウスを樹立し、IL-5産生細胞のGFPによるマーキングを可能にした。このマウスをもちいて、好酸球のin vivoにおける活性化を検討した結果、好酸球はin vivoにおいて、IL-33により直接活性化される経路と、IL-33がグループ2自然リンパ球(ILC2)を活性化し、その結果産生されるIL-5によって活性化される経路の2つの経路があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Eosinophils are multifunctional leukocytes involved in parasite elimination, evocation of allergic reactions, and regulation of adipose tissue. IL-5 is required for eosinophil survival; however, the in vivo mechanisms of eosinophil regulation are not fully understood. A transgenic (tg) mouse model with IL5 promoter-driven EGFP expression was established for detecting the IL-5-producing cells in vivo. The first part of the results demonstrate that innate lymphoid cells (ILCs) activate eosinophils in GAT. The blockage of IL-33R, on the other hand, did not impair EGFP+ ILC numbers but did impair eosinophil numbers in vivo. IL-33 was found to expand eosinophil numbers in CD90+ cell-depleted mice. The latter part of findings demonstrate that IL-33 directly activates eosinophils in GAT, and together with our other findings described above, our findings show that IL-33 has dual pathways via which it activates eosinophils in vivo: a direct activation pathway and a group 2 ILC-mediated pathway.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー IL-5 IL-33 好酸球 GFP マーキング

1. 研究開始当初の背景

食品アレルギーは、近年増加の一途をたどり、その予防・治療方法の開発は急務となっている。その発症には、全身性アレルギーと同様に IL-4 などのサイトカインや肥満細胞・好塩基球が重要であることは明らかとなっているが、それらだけではなく、好酸球の浸潤が認められる。好酸球の分化・増殖は IL-5 が担っており、IL-5 の発現調節機能の解明は食品アレルギーをはじめとするアレルギー疾患の制御へつながる。IL-5 産生は *in vitro* においては CD4⁺ T 細胞 (Th2 細胞)、マスト細胞などより産生されることが明らかとなっているものの、実際に *in vivo* でのアレルギー応答において、どういった細胞が主たる IL-5 産生細胞であるかは明らかとなっていない。

これまで、食品アレルギーにおいて IL-5 の関与は不明瞭であったが、申請者らは、食品アレルギーモデルとして、卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞抗原受容体 (TCR) トランスジェニック (tg) マウスに OVA を摂取させると、血中に抗原特異的 IgE が増加し、食品アレルギー様症状を呈するだけでなく、脾臓リンパ球の IL-5 産生が亢進することを明らかにした。また、そのマウスでは好酸球の腸管壁への浸潤が多く認められる。

前述のように、IL-5 の産生はこれまで、*in vitro* において Th2 細胞やマスト細胞において発現が確認されている。しかしながら、これらの細胞において、個々の細胞あたりの IL-5 産生量は低く、また、*in vivo* においては産生細胞の頻度は低いため、IL-5 産生細胞の解析は重要であることは示唆されながらも、*in vivo*, *in situ* で検出することは困難であり、達成されていないのが、現状である。一方で、申請者らが報告した細胞は IL-5 を高産生し、アレルギー応答に関与することが示唆される。

2. 研究の目的

IL5-egfp tg マウスを作製し、これを用いることで、IL-5 産生細胞を *in vivo* において可視化し、アレルギーにおけるその挙動を観察し、さらに、その細胞の機能を評価することで基礎となる知見を得ることを目的とした。

IL5-egfp tg マウスでは、IL-5 を産生している細胞が EGFP 陽性となり、IL-5 産生を GFP にてリアルタイムに検出できる、このため、エフェクター細胞の解析ができる他、産生量を検討することも可能である。本研究では、このマウスを樹立し、そのシステムを用いて、IL-5 産生細胞の局在・挙動、機能および IL-5 発現に至る機構を明らかにする。

また、アレルギー応答には好酸球が重要であり、その制御には IL-5 が重要なことが知られているが、その *in vivo* での制御については、不明な点が多い。一方、近年、IL-5 を高産生する細胞として新たにカテゴライズされた自然リンパ球 (innate lymphoid cell, ILC) が

報告されている。そこで、本研究では、好酸球の制御機構を、先述の IL5-egfp tg マウスを用いて、ILC の関与も鑑みつつ総合的な解析を行った。

3. 研究の方法

(1) IL5-egfp tg マウスの樹立

IL5 プロモーター制御下で EGFP を発現する tg マウスは、IL5 プロモーター領域を有する BAC において開始コドン以下エクソン 1 を EGFP に置換し、トランスジェニックマウスを樹立した。野生型マウスとして C57BL/6 を日本クレアから購入し用いた。

(2) 抗 IL-33R モノクローナル抗体 (mAb) の樹立

抗マウス IL-33R mAb は、SD ラットを IL-33R-Fc を免疫し、PEG4000 を用いて、リンパ節細胞をミエロームと細胞融合させることによりハイブリドーマを作製し、IL-33R 遺伝子導入株を認識するものを選択することにより、樹立した。このうち DIH4 は IL-33 の受容体への結合を阻害した。フローサイトメトリーにおいては、DIH9 が最も染色能が高く、これを用いた。

(3) *In vivo* 処理

In vivo でのサイトカインの効果は、マウスプラズマサイトーマ J558L 遺伝子導入株をレトロウイルス感染により樹立し、これを腹腔内に投与して、検討した。自然リンパ球の除去は抗 CD90 抗体を腹腔内に 2 日おきに 4 回投与することで行った。

4. 研究成果

(1) IL-5 は脂肪組織に存在する ILC により多量に産生される

IL5-egfp tg マウスを樹立し、その肺細胞を用いて、IL-5 発現と EGFP 発現の相関を検討したところ、IL-5 に比して検出感度は若干低いものの概ね相関した発現が認められた。

そこで、IL-5 発現を脾臓、肺、小腸および粘膜固有層、生殖器脂肪組織において観察すべく、IL5-egfp tg マウスの各組織由来細胞で観察したところ、これまで報告があったように肺で発現が認められたものの、それほど多くなく、これより生殖器脂肪組織由来細胞で高い発現が認められた。その産生細胞は、近年カテゴライズされた ILC であり、そのうちグループ 2 に属する表現系を有していた。

(2) IL-33 は脂肪組織において IL-5 産生 ILC および好酸球を増加させる

IL-5 産生を誘導することが知られているサイトカインに IL-25, IL-33, TSLP があり、これらが脂肪組織 IL-5 産生 ILC および好酸球に与えるかどうかを検討した結果、IL-33 が顕著にそれらを増大させた (図 1)。

(3) ILC は好酸球を活性化する

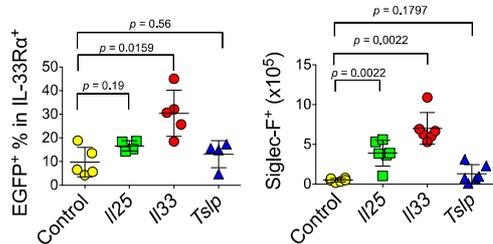


図1 IL-33はILCと好酸球の両方を増加させる。

IL-33はIL-5産生ILCと好酸球の両方を増大させたので、その機序として、ILCが好酸球を活性化するかどうかを検討した。EGFP陽性ILCと好酸球をセルソーターにより単離し、共培養したところ、EGFP陽性ILCは好酸球の機能に特徴的なMBPとケモカインの一種であるCXCL2のmRNA量を上昇させ、これは、抗IL-5抗体の添加により、その亢進が解除された。これにより、ILCはIL-5を介して好酸球を活性化することが示唆された。

(4) IL-33は直接好酸球を活性化する

次にIL-33がIL-5産生ILCと好酸球に影響を与えるかどうかを、抗IL-33Rモノクローナル抗体を樹立し、*in vivo*に投与することで評価した。その結果、定常状態で抗IL-33R抗体を投与してもILCにはなんら影響を与えなかった。しかしながら、その時、好酸球数は減少し、好酸球の活性化にはILCを介さない経路の存在が示唆された(図2)。

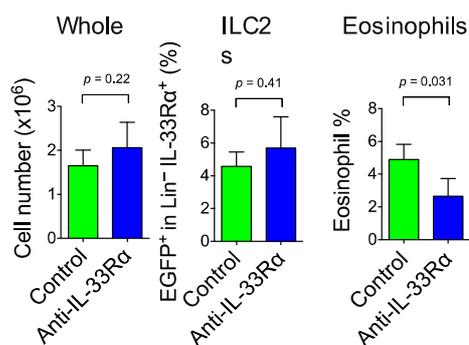


図2 IL-33は好酸球維持に必要である。

そこで抗CD90抗体を投与することでILCを除去したマウスにIL-33発現遺伝子導入株を導入したところ、除去しないものと同様に好酸球の増加が認められた(図3)。また、好酸球をセルソーターにより単離し、*in vitro*にてrIL-33と共培養したところRELMα、EPO、CXCL10、CXCL17のmRNA量が上昇しており、IL-33が直接好酸球を活性化することが明らかとなった。

以上のことからIL-33はILCを活性化し、その結果産生されるIL-5により好酸球を活性化する経路と、IL-33が直接好酸球を活性化する経路の2つの経路が存在することが明

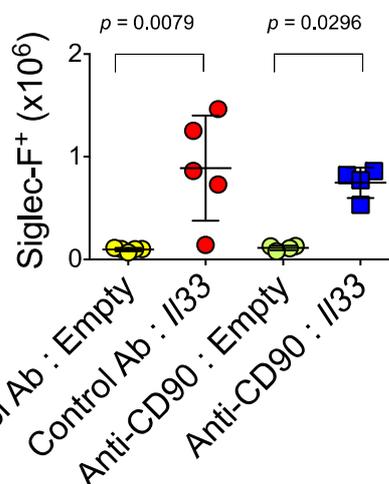


図3 IL-33はILC非依存的に好酸球を増大させる。

らかとなった。

この結果は、下記に示すように学術雑誌に受理されており、評価できる。また、脂肪細胞とILCおよびIL-33は関係が深いことがNature, Cellに報告され、この点でもこの成果のもつ意義は大きいと考えられる。

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2件)

- Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kobayashi, A., Kanno, Y., Kobata, T. IL-33 activates eosinophils of visceral adipose tissue both directly and via innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* 45: 876-885. 2015. doi: 10.1002/eji.201444969.
- Hashiguchi, M., Kobayashi, A., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y., Kurosu, A., Tokudome, S., Kobata, T. NFκB attenuates IL-5 production and upregulates T-box transcription factors in Th2-like T cells. *Cytotechnology* 66:373-382. 2014. doi: 10.1007/s10616-013-9585-z.

〔学会発表〕(計4件)

- Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y., Kobata, T. Dual activation pathways of visceral adipose tissue eosinophils by interleukin-33 *in vivo*: innate lymphoid cell-mediated and direct actions. 日本免疫学会学術集会. 2014年12月11日. 京都
- Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kojima, H., Kobata, T. IL-5 is produced by a novel subset of innate lymphoid cell with phenotypes of Lin⁻Thy1.2^{low-int}CD25⁺IL-33Rα⁻ in Peyer's patches. 日本免疫学会学

術集会. 2013 年 12 月 11 日. 幕張

3. Hashiguchi, M., Kojima, H., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kobata, T. NF- κ B downregulates IL-5 production via upregulation of T-box proteins. 日本免疫学会学術集会. 2012 年 12 月 7 日. 神戸

4. Hashiguchi, M., Kobayashi, A., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y., Kobata, T. NF κ B attenuates IL-5 production and upregulates T-box transcription factors in Th2-like T cells. International Congress of Immunology Meeting. 2012 年 8 月 25 日. Italy Milan

〔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

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋口 昌章 (HASHIGUCHI, Masaaki)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20372443

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

小林彩乃 (KOBAYASHI, Ayano)