

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月2日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012年度～2012年度

課題番号：24659520

研究課題名（和文）2型サイトカインを産生する自然リンパ球様細胞に着目した  
皮膚硬化性病変の検討研究課題名（英文）Pathological analysis of skin fibrosis,  
focused on type 2 innate immune lymphoid cells

研究代表者

神戸 直智(KAMBE NAOTOMO) (千葉大学・医学研究院・准教授)

研究者番号：50335254

研究成果の概要（和文）：我々は、細胞内パターン認識受容体である NLRP3 の変異によってインフラマソームが自発的に活性化され、IL-1 $\beta$  が過剰産生されることで臨床症状を呈するクリオピリン関連周期性症候群の解析に従事し、皮膚における IL-1 分子の役割に着目して解析を進めている。最近、IL-1 family 分子の1つとして、炎症に伴う細胞障害によって放出され、Th2 タイプのサイトカインを誘導し、肥満細胞の脱顆粒を惹起して炎症に関わる IL-33 が注目を集める。特に、消化管の脂肪組織中に見られるリンパ節様構造に存在し、幹細胞に近い表面マーカーを有するリンパ球様細胞 (ILCs) が、IL-33 に反応して大量の Th2 サイトカインを産生すること、ILCs が存在するリンパ節様構造が現局性強皮症の組織で散見されるリンパ球様細胞が集簇した構造に類似すること、血清 IL-33 が強皮症患者で上昇しており皮膚硬化の程度と相関すると報告されることから、皮膚硬化性病変における IL-33 の効果を検討する目的で、この IL-33 欠損マウスと野生型マウスにおいて、ブレオマイシン投与時にみられる皮膚硬化に差違が見られるかを検証した。しかしながら、ブレオマイシン投与6週間の時点で、野生型マウスにおいて、ブレオマイシン投与部位に一致して組織学的な線維の増殖を伴う皮膚硬化を認めるものの、細胞浸潤は殆ど見られなかった。また、期待に反して、IL-33 欠損マウスにおいても野生型同様に組織学的な皮膚硬化が観察され、野生型との差違は見られなかった。以上の結果から、皮膚における IL-33 の効果を検証する際には、Th2 タイプの反応に関わる免疫反応に着目して、その作用を検証すべきと考え、現在そのモデルを構築中である。

研究成果の概要（英文）： We have studied the mechanism of cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS), in which an active mutant of NLRP3 spontaneously forms inflammasome and induces hyper-production of IL-1 $\beta$ . This study led us to focus on the pivotal role of IL-1 in skin diseases. Recently, people pay attention to another IL-1 family molecule, IL-33, because IL-33 released from damaged cells in inflammation is critically involved in inflammatory response by a production of Th2 cytokines and a degranulation of mast cells. In addition, IL-33 induces a large amount of Th2 cytokine production from innate lymphoid cells (ILCs). ILCs are newly identified lymphoid lineage cells, keep haematopoietic stem cell markers and are present in the mesenteric fat-associated lymphoid clusters.

Interestingly, the structure of mesenteric fat-associated lymphoid clusters shares the similar feature with that of aggregated clusters of lymphoid cells in subcutaneous fat in localized scleroderma. Also serum IL-33 is reported to be elevated in scleroderma and serum levels of IL-33 is well correlated with the severity of cutaneous sclerosis in scleroderma. Therefore, we studied the role of IL-33 in bleomycin-induced scleroderma murine model by comparing the effect in IL-33 deficient mice and wild type mice.

Six weeks after bleomycin-treatment, we obtained localized cutaneous sclerosis accompanied with increased skin fibrosis in wild type mice. However, lymphoid cell infiltration was not observed in the skin lesion. Unfortunately, the cutaneous sclerosis including histological features in IL-33 deficient mice was almost identical to that in wild type mice. We concluded from

these results that we should verify the cutaneous role of IL-33 by focusing on Th2 immune response, and now we are establishing such a model to confirm it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学，皮膚硬化性病変

### 1. 研究開始当初の背景

IL-1 family 分子の1つであり炎症に伴う細胞障害によって放出される IL-33 によって、大量の Th2 サイトカインを産生する細胞として、脂肪組織中に見られるリンパ節様構造に存在する自然リンパ球様細胞 (ILCs) が注目を集めている。

すなわち、我々は、細胞内パターン認識受容体である NLRP3 の変異によってインフラマソームが自発的に活性化され、IL-1 $\beta$  が過剰産生されることで臨床症状を呈するクリオピリン関連周期性症候群の解析に従事してきた。この研究を通じて我々は、IL-1 分子に精通することができたが、最近、IL-1 family 分子の1つとして、炎症に伴う細胞障害によって放出され、Th2 タイプのサイトカインを誘導するとともに、肥満細胞の脱顆粒を惹起して炎症に関わるサイトカインとして IL-33 が注目を集める (Liew FY, et al. *Nat Review Immunol* 2010)。

一方、自然免疫や組織のリモデリングにおいて重要な役割を果たす細胞として、自然リンパ球様細胞 (innate lymphoid cells, ILCs) が近年注目されている。特に、消化管の脂肪組織中に見られるリンパ節様構造に存在し、幹細胞に近い表面マーカー (lineage-negative, Kit+, Sca-1+) を有するリンパ球様細胞が、IL-25, IL-33 に反応して大量の Th2 サイトカインを産生し、炎症に関わるとして注目を集める (Moro K, et al. *Nature* 2010)。さらにヒトにおいても、同様の振る舞いをみせる細胞の存在が消化管や肺で確認され、それらは CD161 とともに CRTH2 を発現すると報告された (Mjosberg JM, et al. *Nat Immunol* 2011)。

### 2. 研究の目的

ILCs が存在するリンパ節様構造が現局性強皮症の組織で散見されるリンパ球様細胞が集簇した構造に類似していること、血清 IL-33

が強皮症患者で上昇しており、皮膚硬化の程度と相関すると報告されることから、IL-33 とそれによって誘導される Th2 サイトカインを産生する ILCs に着目して、皮膚硬化性病変の機序を検討することを目的とした。

すなわち、我々は、1) IL-33 に反応して Th2 サイトカインを産生する ILCs が存在する消化管の脂肪組織中のリンパ節様構造が、現局性強皮症 (モルフェア) の脂肪組織間や膨化した膠原線維間に散見されるリンパ球様細胞が集簇した構造に類似していること。2) 血清 IL-33 が強皮症患者で上昇しており、皮膚硬化の程度と相関が見られると報告される (Yanaba K, et al. *Clin Rheumatol* 2011) ことから、IL-33 とそれによって誘導される Th2 サイトカインを産生する ILCs に着目して、皮膚硬化性病変の機序を検討することを着想した。

これらの仮定にたって、IL-33 欠損マウスを用いて、ブレオマイシンを用いた皮膚硬化モデルにおいて、皮膚硬化と ILCs の出現に野生型と差異が見られるかを検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

IL-33 欠損マウスを用いて、ブレオマイシン誘発による皮膚硬化をモデルとして、皮膚硬化の程度と組織中に出現する ILCs に、野生型と差異が見られるかを検証する。

すなわち、野生型マウスにブレオマイシンを皮下投与し、誘導される皮膚線維化の程度とともに、そこに ILCs に合致する細胞が同定されるかを、免疫組織染色、および抽出細胞を用いての FACS にて検討する。上記に実験において、ILCs の同定は、これまでの知見を参考に、lineage-negative, Kit+, Sca-1+細胞を指標とする。

また、野生型マウスへのブレオマイシン投与時に、線維化の進行に合わせて定時的に組

織中の IL-33 を定量 PCR および ELSIA にて、血清中の IL-33 を ELISA にて検討する。

IL-33 欠損マウスに対して、上記の野生型マウスへの検討と同様に、ブレオマイシンを投与し、線維化の程度を評価するとともに ILCs に合致する細胞が同定されるかを検討する。

また、ILCs からの産生が確認される Th2 サイトカインの組織での定量を PCR および ELISA で検討する。

IL-33 は組織破壊に伴って上皮細胞や間葉系支持細胞から広く放出されることから、線維化に際して Th2 サイトカインを産生する細胞における ILCs の役割を検証するため、ILCs 以外の Th2 サイトカインの産生細胞である T 細胞を欠損するマウスを用いて、ブレオマイシンを投与時の線維化の程度と、ILCs に合致する細胞の存在を評価する。

#### 4. 研究成果

IL-33 欠損マウスは、分担研究者である中江進（東大・医科研）によって既に樹立されている。皮膚硬化性病変の病態形成における IL-33 の効果を検討する目的で、まずは、この IL-33 欠損マウスと野生型マウスにおいて、ブレオマイシン投与時にみられる皮膚硬化（皮膚線維化）に差違が見られるかを検証した。

入手した IL-33 欠損マウスのバックグラウンドが B6 であることから、野生型としての B6 マウスとともに、6 週齢のマウスの背部中央の皮下に、0.5 mg/mL に希釈したブレオマイシンを 100  $\mu$ L/匹で 1 週間に 3 回ずつ、6 週間に渡って投与した。

3 週間の時点では、IL-33 欠損マウス、野生型マウスともに線維化は殆ど見られず、またブレオマイシン投与局所において、炎症細胞の浸潤も確認できなかった（このため、炎症細胞のタイピングや、炎症細胞が産生するサイトカインの染色は施行しえなかった）。

さらに、投与を続け 6 週間の時点では、野生型マウスにおいて、ブレオマイシン投与部位に一致して組織学的な線維の増殖を伴う皮膚硬化を認めるものの、やはり細胞浸潤は殆ど見られなかった。また、期待に反して、IL-33 欠損マウスにおいても野生型同様に組織学的な皮膚硬化が観察され、野生型との差違は見られなかった。

核内に存在する蛋白がネクロシスなどの細胞死に伴って放出され、生体が発する危

険信号 (danger signal) としての機能が注目される IL-33 は、IL-1 $\beta$  や IL-18 といった他の IL-1 ファミリー分子とは異なり、近年、炎症の起点として注目を集めるインフラマソームの形成によって活性化する caspase-1 によって、むしろ不活化を受けるサイトカインとして知られる。また、肥満細胞など作用して、Th2 タイプの液性免疫の活性化に関わることが注目を集めている。このことから、皮膚における IL-33 の効果を検証する際には、Th2 タイプの反応が関わる免疫反応に着目して、その作用を検証すべきと考え、現在そのモデルを構築中である。

#### 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 13 件)

原著論文

1. Mashima R, Arimura S, Kajiwara S, Oda H, Nakae S, Yamanashi Y. Dok adaptors play anti-inflammatory roles in pulmonary homeostasis. *Genes Cells*. 2013; 18: 56-65. doi: 10.1111/gtc.12016 査読：有
  2. 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: 265-73. doi: 10.2332/allergolint.11-OA-0379 査読：有
  3. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara 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: 3641-52. 査読：有
3. 総説
1. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of Interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int*. 2013; 62: 13-20. doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0538 査読：有

2. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy*. 2012; 67: 1203-14.  
doi: 10.1111/all.12004 査読：有
3. 中野 倫代, 神戸 直智. 「皮膚免疫学－免疫臓器としての意義と病態」皮膚と自己炎症性機序による肉芽腫性疾患. 医学のあゆみ. 2012;242:791-4. 査読：無
4. 神戸 直智, 中村 悠美. NLRP3 インフラマソームを介したマスト細胞の活性化. 臨床免疫・アレルギー科. 2012; 58: 560-4. 査読：無
5. 大野 建州, 東 みゆき, 中江 進. IL-33 と慢性アレルギー炎症. 実験医学. 2012; 30: 918-5. 査読：無
6. 新江 賢, 大野 建州, 森田 英明, 松本 健治, 中江 進. IL-33 によるマスト細胞の活性化. 臨床免疫・アレルギー科. 2012; 57: 625-3. 査読：無
7. 森田 英明, 新江 賢, 大野 建州, 松本 健治, 中江 進. IL-33 によるマスト細胞・好塩基球の活性化とアレルギー疾患. 炎症と免疫, 2012; 20: 340-50. 査読：無
8. 大野 建州, 森田 英明, 新江 賢, 松本 健治, 中江 進. IL-33 とアレルギー. IgE practice in asthma. 2012; 6: 11-17. 査読：無
9. 大野 建州, 森田 英明, 新江 賢, 松本 健治, 中江 進. IL-33 による慢性アレルギー炎症. アレルギーの臨床. 2012; 32: 918-23. 査読：無
10. 大野 建州, 東 みゆき, 中江 進. IL-25, IL-33 と自然リンパ球～感染防御, アレルギー疾患へのかかわり～. 実験医学. 2012; 30: 3062-71. 査読：無

[学会発表] (計 0 件)

[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

神戸 直智 (KAMBE NAOTOMO) (千葉大学・医学研究院・准教授)

研究者番号：50335254

### (2) 研究分担者

中江 進 (NAKAE SUSUMU) (東京大学・医科学研究所・准教授)

研究者番号：60450409

### (3) 連携研究者

なし