

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461492

研究課題名(和文)重症喘息におけるIL-23産生樹状細胞誘導機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms underlying IL-23 production from dendritic cells in refractory asthma

研究代表者

玉地 智宏 (Tamachi, Tomohiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20456015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では気管支喘息の難治化機構の解明を目的に、樹状細胞によるIL-23産生を誘導する因子の同定、及びアレルギー性気道炎症における真菌成分 マンナン の受容体Dectin-2とNF- $\kappa$ B関連蛋白であるI BNSの役割の解明を行った。その結果、Dectin-2を発現するCD11b陽性樹状細胞はIL-23を発現しており、アレルギー性気道炎症を誘導すること、血球系細胞に発現するI BNSはアレルギー性気道炎症を抑制することを明らかにした。現在、樹状細胞にIL-23産生を誘導する気道上皮細胞由来分子の同定を目指し、研究を継続している。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the underlying mechanisms of refractory asthma, our objective was to identify the factor that induces IL-23 production from dendritic cells. We also aimed to clarify the roles of Dectin-2, a C-type lectin receptor for fungal  $\alpha$ -mannan, expressed on dendritic cells and the roles of I BNS expressed in hematopoietic cells in HDM-induced allergic airway inflammation.

We found Dectin-2 expressed on CD11b+ DCs induced IL-23 expression and promoted HDM-induced airway inflammation. We also found CD11b+ DCs isolated from Dectin-2-deficient mice expressed lower levels of proinflammatory cytokines and co-stimulatory molecules which could lead to Th2 and Th17 cell differentiation than those from wild-type mice. In addition, we found HDM-induced airway inflammation was exacerbated in mice lacking I BNS in hematopoietic cells. We are currently searching for epithelial cell-derived factors that induce IL-23 production from dendritic cells in asthma by a novel co-culture approach.

研究分野：アレルギー学

キーワード：難治性喘息 IL-23 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息患者の 5-10%は、ステロイド吸入薬を基本とした通常の治療に抵抗性を示し、難治性の病態をとることで多くの医療資源を必要としており問題となっている。本研究では、①気道上皮細胞から産生される IL-25 が好酸球性気道炎症の増悪に関与すること (Tamachi et al. J Allergy Clin Immunol 2006)、②アレルギー性気道炎症の局所で樹状細胞が IL-23 を産生し、Th17 細胞依存的な好中球性炎症を誘導するとともに、Th2 細胞依存的な好酸球性炎症を増強すること (Wakashin et al. Am J Respir Crit Care Med 2008) を報告してきた。

このようにアレルギー性気道炎症においては、気道上皮細胞と樹状細胞の相互作用が、Th 細胞の分化に影響を与えることが明らかにされてきたが、樹状細胞に IL-23 産生を誘導する分子機構は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、樹状細胞に IL-23 産生を誘導する分子の同定と重症喘息における同分子の役割を解明することにより、重症喘息に対する新たな治療戦略の基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究計画 1. 樹状細胞に IL-23 産生を誘導する因子の同定

- マウスにチリダニ (house dust mite (HDM)) を反復気道投与する重症喘息モデル (HDM 喘息モデル) と非喘息コントロールの気道上皮細胞を単離し、それぞれ骨髄由来樹状細胞 (BMDC) と共培養し、BMDC における IL-23p19 の発現を定量的 RT-PCR 法により解析し、重症喘息モデルの気道上皮細胞が IL-23p19 産生を誘導するか否かを検討する。
- HDM 喘息モデルと非喘息コントロールのマウスから単離した気道上皮細胞より RNA を抽出し、RNAseq 解析を行い、重症喘息モデルの気道上皮細胞に特異的に発現する分子を抽出する。
- 候補分子を上皮細胞株に発現させ、BMDC と共培養する。IL-23p19 産生をハイスループットな定量 RT-PCR 法で評価し、IL-23p19 産生誘導能を有する分子を同定する。

研究計画 2. 重症喘息モデルの樹状細胞における Dectin-2 の役割の解明

- HDM 喘息モデルを誘導したマウスの肺から上皮細胞及び血球系細胞を単離し、各細胞分画の Dectin-2 の発現を検討する。
- Dectin-2 欠損 (Clec4n<sup>-/-</sup>) マウスおよびコントロールの野生型 (WT) マウスに HDM 喘息モ

デルを誘導し、アレルギー性気道炎症における Dectin-2 の役割を明らかにする。

- Clec4n<sup>-/-</sup> マウスおよび WT マウス由来の BMDC における IL-23 産生能を比較検討する。
- Clec4n<sup>-/-</sup> マウスおよび WT マウスから BMDC を調整し、HDM 刺激をした後に経気道的に Clec4n<sup>-/-</sup> マウスに移入し、HDM 喘息モデルの解析を行うことで、樹状細胞に発現する Dectin-2 の役割を明らかにする。

研究計画 3. 重症喘息モデルの樹状細胞における IκBNS の役割の解明

- IκBNS 欠損 (Nfkbid<sup>-/-</sup>) マウスおよび WT マウスに HDM 喘息モデルを誘導し、アレルギー性気道炎症における IκBNS の役割を明らかにする。
- WT マウスに Nfkbid<sup>-/-</sup> マウスの骨髄細胞を移植する骨髄キメラマウスを作成し、そのマウスに HDM 喘息モデルを誘導することで、アレルギー性気道炎症における血球系細胞に発現する IκBNS の役割を明らかにする。
- Nfkbid<sup>-/-</sup> マウスおよび WT マウス由来の BMDC を HDM 刺激した後に経気道的に Nfkbid<sup>-/-</sup> マウスに移入し、HDM 喘息モデルの解析を行うことで、樹状細胞に発現する IκBNS の役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

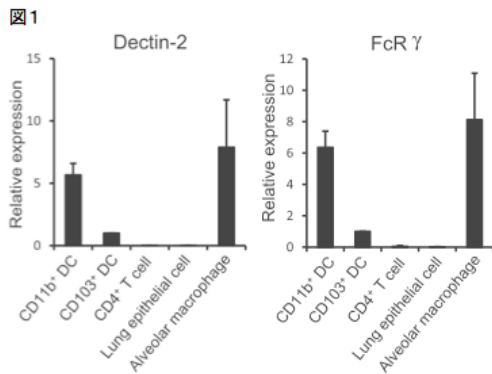
研究 1. 樹状細胞に IL-23 産生を誘導する因子の同定

- HDM 喘息モデルの気道上皮細胞を単離し BMDC と共培養を行ったが、BMDC における IL-23p19 の発現を確認するに至らなかった。原因として、今回の培養法では気道上皮細胞の viability が十分に保てていない可能性を考え、現在培養方法の改良を行っている。
- HDM 喘息モデルと非喘息コントロールの気道上皮細胞から RNA を抽出し、RNAseq 解析を行い、HDM 喘息モデルの気道上皮細胞に特異的に発現する候補遺伝子の抽出を行った。現在、候補遺伝子を上皮細胞株に発現させ、BMDC と共培養することで、BMDC に IL-23p19 産生を誘導する分子の同定を進めている。

研究 2. 重症喘息モデルの樹状細胞における Dectin-2 の役割の解明

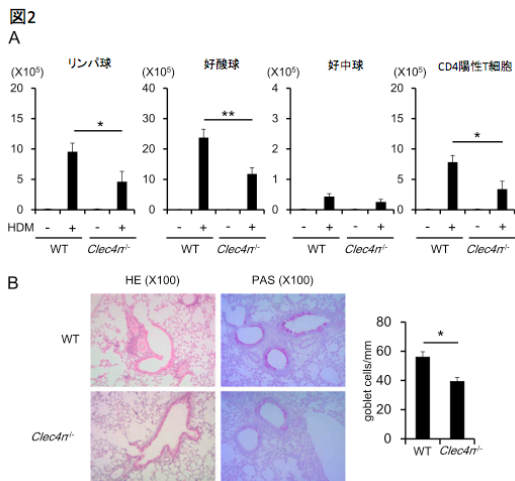
真菌感染は喘息の重症化への関与が知られており、また、真菌の α マンナンを受容体である Dectin-2 は Th17 細胞分化を誘導することが報告されている。

- 肺の樹状細胞において Dectin-2 が発現しているか否かを明らかにするため、HDM 喘息モデルを行ったマウスの肺から各細胞分画を単離し、Dectin-2 の発現を qPCR 法にて解析した。



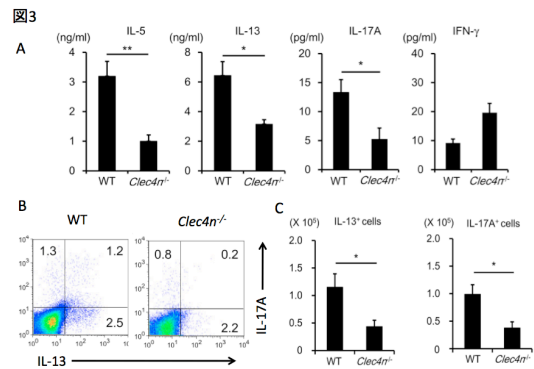
その結果 CD11b 陽性樹状細胞および肺胞マクロファージに Dectin-2 の発現を強く認めた。Dectin-2 シグナルを伝達する Fc $\gamma$ 鎖も同細胞に発現していることを確認した(図 1)。

b) アレルギー性気道炎症における Dectin-2 の役割を明らかにするため、Dectin-2 欠損 (*Clec4n<sup>-/-</sup>*) マウスおよびコントロールの WT マウスに HDM 喘息モデルを誘導し、気道炎症を評価した。

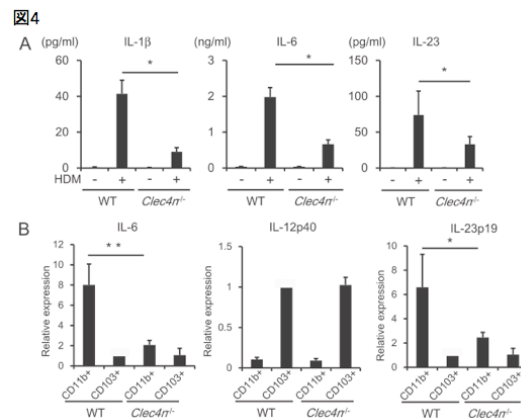


その結果、*Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスでは WT マウスに比して、BALF 中への好酸球、リンパ球および CD4 陽性 T 細胞の浸潤(図 2A)、肺組織における炎症細胞浸潤および杯細胞分化(図 2B)が減弱していた。またそれに伴い気道過敏性も減弱しており (data not shown)、*Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスではアレルギー性気道炎症が減弱することが明らかになった。

次にサイトカインプロファイルを明らかにするため、縦隔リンパ節から調整した細胞を HDM で再刺激した際のサイトカイン産生を比較した。その結果、*Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスでは WT マウスに比して上清中の IL-5, IL-13, IL-17A レベルが低下し(図 3A)、細胞内サイトカイン染色でも *Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスでは IL-13 および IL-17A 陽性細胞は減少していた(図 3B, 3C)。以上の結果より、Dectin-2 は Th2 細胞および Th17 細胞の誘導とアレルギー性気道炎症の惹起に重要な役割をもつことが明らかとなった。



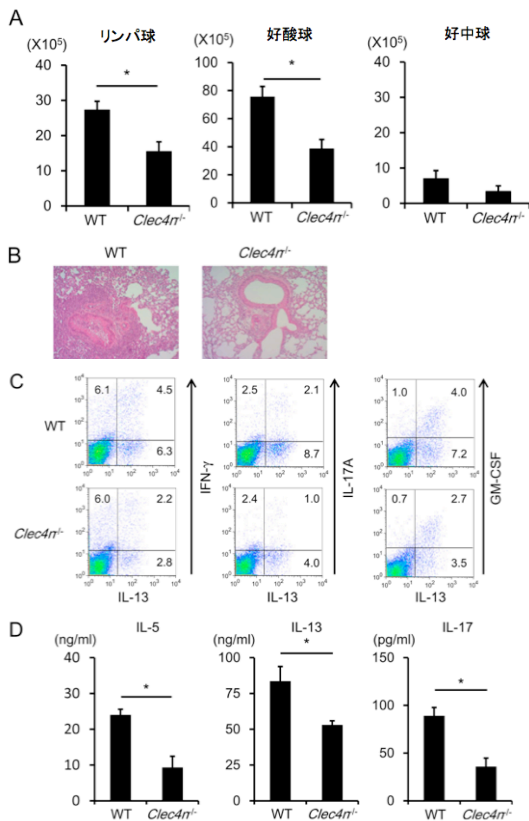
c) HDM 刺激が Dectin-2 依存的に樹状細胞を活性化し、IL-23 を含めたサイトカイン産生に影響を与えるか否かを明らかにするため、*Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスおよび WT マウスの BMDC を in vitro で刺激する実験系(図 4A)、および HDM 喘息モデル(図 4B)を用いて解析した。



その結果、*Clec4n<sup>-/-</sup>* BMDC では WT BMDC に比して IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 の産生が低下していた(図 4A)。また HDM 喘息モデルにおいても *Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスでは WT マウスに比して CD11b 陽性樹状細胞における IL-6, IL-23 p19 の発現が低下していた(図 4B)。*Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスでは CD11b 陽性樹状細胞における OX40, CD40, CD80, CD86 の発現も低下していた (data not shown)。以上より、Dectin-2 は HDM による DC の活性化と、IL-23 のみならず IL-1 $\beta$  と IL-6 の産生にも関与していることが明らかとなった。

d) 樹状細胞に発現する Dectin-2 のアレルギー性気道炎症における生体内での役割を明らかにするため、*Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスおよび WT マウス由来の BMDC を HDM 刺激した後に経気道的に *Clec4n<sup>-/-</sup>* マウスに移入し、その後 HDM 喘息モデルを誘導し、気道炎症を評価した。その結果、*Clec4n<sup>-/-</sup>* BMDC を移入した群は WT BMDC を移入した群に比して、好酸球性の炎症(図 5A, B)、気道における IL-5, IL-13, および IL-17A の産生(図 5C, D)が低下した。以上より、樹状細胞に発現する Dectin-2 が HDM 喘息モデルにおけるアレルギー性炎症の惹起に重要な役割を果たしていることが示唆された(文献 1)。

図5

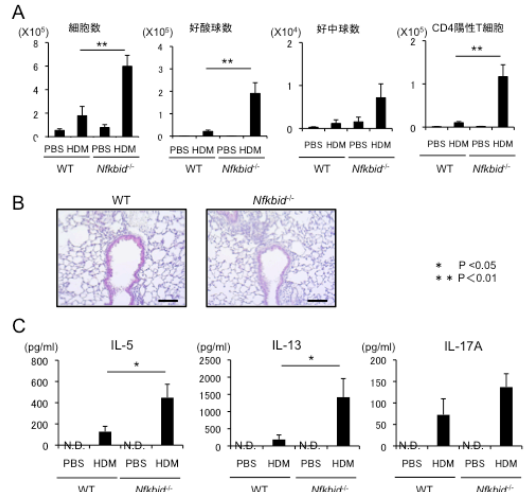


研究 3. 重症喘息モデルにおける樹状細胞に発現する I $\kappa$ BNS の役割の解明

HDMはNF- $\kappa$ Bの活性化を介して炎症病態を惹起する。NF- $\kappa$ Bシグナルの制御には atypical I $\kappa$ Bファミリー蛋白の一つである I $\kappa$ BNS が重要な役割を果たすことが知られているが、そのアレルギー性気道炎症における役割は不明である。

a) アレルギー性気道炎症における I $\kappa$ BNS の役割を明らかにするため、I $\kappa$ BNS 欠損 (*Nfkbid*<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、HDM 喘息モデルの解析を行った (図 6A-C)。

図6

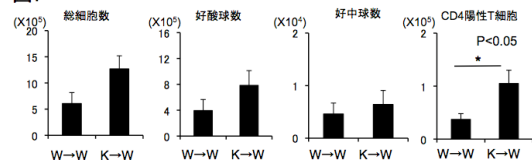


その結果、*Nfkbid*<sup>-/-</sup> マウスでは WT マウスに比

して、BALF 中への好酸球、リンパ球および CD4 陽性 T 細胞の浸潤 (図 6A)、肺組織における炎症細胞浸潤および杯細胞分化 (図 6B) が増強していた。またサイトカインプロファイルを明らかにするために、HDM 喘息を誘導したマウスから調整した血球系細胞を HDM で再刺激した際のサイトカイン産生を比較した。その結果、*Nfkbid*<sup>-/-</sup> マウスでは WT マウスに比して上清中の IL-5、IL-13、IL-17A レベルの上昇を認めた (図 6C)。

b) 血球系細胞に発現する I $\kappa$ BNS のアレルギー性気道炎症における役割を明らかにするため、WT マウスに *Nfkbid*<sup>-/-</sup> マウスの骨髄細胞を移植する骨髄キメラマウス (K $\rightarrow$ W) を作成し、HDM 喘息モデルの解析を行った (図 7)

図7



その結果、血球系細胞で I $\kappa$ BNS を欠損するマウス (K $\rightarrow$ W) では、コントロールの野生型マウスの骨髄細胞を移植したマウス (W $\rightarrow$ W) に比して、BALF 中への好酸球、リンパ球および CD4 陽性 T 細胞の浸潤が増強する傾向を認めた (図 7)。

以上の結果より、血球系細胞に発現する I $\kappa$ BNS はアレルギー性気道炎症を抑制していることが明らかになった。

現在、血球系細胞の中でも樹状細胞に発現する I $\kappa$ BNS のアレルギー性気道炎症における役割を明らかにするために、*Nfkbid*<sup>-/-</sup> マウスおよび WT マウス由来の BMDC を HDM 刺激した後に経気道的に *Nfkbid*<sup>-/-</sup> マウスに移入し、その後 HDM 喘息モデルを誘導する実験系を用いて解析を進めている。

<引用文献>

① Norimoto A, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;51(2):201-9.

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 7 件、全て査読有)

① Takatori H, Kawashima H, Matsuki A, Meguro K, Tanaka S, Iwamoto T, Sanayama Y, Nishikawa N, Tamachi T, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Kubo M, Hori S, Nakajima H. Helios Enhances Treg Cell Function in Cooperation With FoxP3. Arthritis Rheumatol. 2015 Jun;67(6):1491-502. doi: 10.1002/art.39091.

② Nakagomi D, Suzuki K, Meguro K, Hosokawa J, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Matsue

- H, Ohara O, Nakayama T, Shimada S, Nakajima H. Matrix metalloproteinase 12 is produced by M2 macrophages and plays important roles in the development of contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 May;135(5):1397-400. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.055.
- ③ Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kashiwakuma D, Kagami S, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR $\gamma$ t induction as downstream targets of Stat3. *J Exp Med.* 2014 Aug 25;211(9):1857-74. doi: 10.1084/jem.20130791
- ④ Norimoto A, Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Yokota M, Takahashi K, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Aug;51(2):201-9. doi: 10.1165/rcmb.2013-05220C.
- ⑤ Iwata A, Kawashima S, Kobayashi M, Okubo A, Kawashima H, Suto A, Hirose K, Nakayama T, Nakajima H. Th2-type inflammation instructs inflammatory dendritic cells to induce airway hyperreactivity. *Int Immunol.* 2014; 26(2):103-14. doi:10.1093/intimm/dxt047.
- ⑥ Kawashima S, Hirose K, Takahashi K, Tamachi T, Ikeda K, Tokoyoda K, Nakayama T, Nakajima H. Interleukin-25 induces pulmonary arterial remodeling via natural killer T cell-dependent mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161 Suppl 2:118-24. doi: 10.1159/000350379.
- ⑦ Hosokawa J, Suzuki K, Nakagomi D, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Nakajima H. Role of calcium ionophore A23187-induced activation of IkappaB kinase 2 in mast cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161 Suppl 2:37-43. doi: 10.1159/000350357.
- [学会発表] (計 5 件)
- ① Ito T, Hirose K, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-1 expressed on CD11b+ dendritic cells promotes house dust mite-induced allergic airway inflammation in mice. 日本免疫学会学術集会 11/20/2015 札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)
- ② Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Takatori H, Tamachi T, Suzuki K, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR $\gamma$ t induction as downstream targets of Stat3. 日本免疫学会学術集会 12/12/2014 国立京都国際会館(京都府、京都市)
- ③ 大久保綾子, 廣瀬晃一, 西城忍, 岩倉洋一郎, 中島裕史 チリダニ誘発性アレルギー性気道炎症発症における真菌認識機構Dectin-2の役割 日本アレルギー学会秋期学術大会 11/28/2013 ホテルニューオータニ(東京都, 千代田区)
- ④ 玉地智宏 腸管免疫と脊椎関節炎 日本脊椎関節炎学会学術集会 9/14/2013 京王プラザホテル(東京都, 新宿区)
- ⑤ 廣瀬晃一, 豊留孝仁, 亀井克彦, 岩本逸夫, 中島裕史 日本アレルギー学会春期臨床大会 5/11/2013 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
- [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
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
玉地 智宏 (TAMACHI, Tomohiro)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号: 20456015
- (2)研究分担者  
廣瀬 晃一 (HIROSE, Koichi)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 90400887
- 高取 宏昌 (TAKATORI, Hiroaki)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 30568225
- (3)連携研究者  
なし