

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460108

研究課題名(和文) インターロイキン-33をターゲットとした難治性アトピー疾患の制御に関する研究

研究課題名(英文) Researches on regulation of intractable atopic disease by targeting IL-33

研究代表者

奈邊 健 (Nabe, Takeshi)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：40228078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性喘息において、獲得免疫系と自然免疫系を繋ぐ鍵分子であるIL-33の産生機序を解析するとともに、IL-33の免疫薬理的制御方法について検討した。感作マウスに抗原を気管内投与することによるIL-33産生には肥満細胞やTh2細胞は関与せず、投与された抗原が抗原特異的IgG抗体と免疫複合体を形成し、これがマクロファージ上のFcγRII/IIIを介して細胞内に取り込まれた結果、IL-33が産生されることが示唆された。また、IL-33産生はステロイド感受性であった。一方、アレルギー制御の新しい方法として、試験管内で誘導したIL-10産生性T細胞の養子移入は、喘息反応を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the pathogenesis of intractable asthma, IL-33 has been known to be a key molecule bridging between the innate and acquired immune systems. In this study, we analyzed mechanisms underlying IL-33 production, and immunopharmacological modulation of IL-33. Allergic IL-33 production induced by an intratracheal antigen challenge in sensitized mice was mediated by neither mast cells nor Th2 cells. The administered antigen formed an immune complex with the antigen-specific IgG antibody, followed by incorporation into the alveolar macrophages through the cellular surface FcγRII/III, leading to the IL-33 production in the lung. The IL-33 production was sensitive to steroid anti-inflammatory drug treatment. On the other hand, as a new method for regulation of allergy, adoptive transfer of in vitro-differentiated IL-10-producing T cells effectively suppressed asthmatic responses in mice in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：IL-33 喘息 アトピー 制御性T細胞 抗アレルギー薬

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息などのアトピー疾患は、一般に、生体内に侵入した抗原と IgE 抗体が反応して肥満細胞や好塩基球が活性化することによって誘起される。また、抗原提示細胞によって貪食された抗原は Th2 細胞を活性化して好酸球性の気道炎症を引き起こす。

一方、重症・難治性の病態では、上記のような「獲得免疫系」のみならず「自然免疫系」も活性化し、さらに「組織構成細胞」の活性化も引き起こされ複雑な病因を形成すると考えられている。

インターロイキン (IL)-33 は、IL-1 ファミリーに属するサイトカインであり、組織構成細胞の 1 つである上皮系細胞から産生され、自然免疫系のみならず獲得免疫系の細胞にまで作用して難治性喘息などの病態の形成に関与することが示唆されつつある。しかし、IL-33 の産生や作用を特異的に阻害する方法や薬物は見出されていない。IL-33 を産生する細胞やその機序を明らかにすることは、難治性アトピー疾患に対する新たな治療薬・治療法の開発に有用であると考えられる。

一方、制御性 T 細胞のサブセットの 1 つである Tr1 細胞は、抗原特異的に反応して抗炎症性サイトカイン IL-10 を産生する。Tr1 細胞を *in vitro* 誘導してアレルギーの個体に養子移入すれば、生体が抗原に暴露された際にのみ IL-10 が産生されることから、抗原特異的にアレルギー反応を抑制する治療法になり得る可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、1) アレルギー性気道炎症の病態における IL-33 の産生機序を明らかにすること、2) IL-33 の産生を制御することができる薬物や方法を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) 喘息モデルの作成：抗原とした卵白アルブミン (OVA) を水酸化アルミニウム Al(OH)₃ ゲルとともに腹腔内投与することにより感作した BALB/c マウスに、OVA 溶液を気管内投与することにより反応を惹起した。

(2) IL-33 の検出：肺組織ホモジネート中の IL-33 タンパクは、酵素免疫測定法 (ELISA) により、IL-33 mRNA は real time PCR 法により定量した。

(3) 各種白血球系細胞の検出：蛍光ラベル抗体を用いて、flowcytometer により解析した。

(4) Tr1 細胞の分化・誘導：感作マウスより得た脾細胞を、抗原 (OVA)、IL-21、IL-27 および TGF-β とともに 7 日間培養し、IL-10 産生細胞を flow cytometer によって解析した。

4. 研究成果

(1) 喘息モデルにおける反復反応惹起による肺における IL-33 産生

感作 BALB/c マウスに抗原 (OVA) を 4 回気

管内投与することにより反応惹起を行うと、1 回目の反応惹起によりすでに明らかな IL-33 産生が認められ、反応惹起の反復により産生量の増加が認められた。

1 回目の反応惹起による IL-33 は主として気道上皮細胞由来であり、4 回目の反応惹起時においては気道上皮細胞とともに肺に浸潤した M2 マクロファージおよび樹状細胞からの産生も認められた。

これらの IL-33 産生は反応惹起 4 時間以内に遺伝子転写を介して誘起されるものであった。

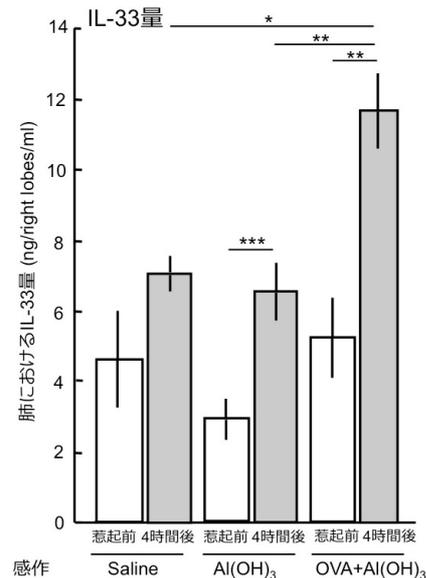
(2) IL-33 産生に及ぼす薬物の効果

上記(1)における 1 および 4 回目反応惹起による IL-33 は、いずれもステロイド性抗炎症薬 (デキサメサゾン) の投与によりほぼ完全に抑制された。また、プロテインキナーゼ C 阻害作用を有するとされるケルセチンは、4 回目の惹起による IL-33 産生を一部抑制する傾向を示した。

(3) IL-33 産生機序の解析

単回の抗原惹起による IL-33 産生に焦点を当てその産生機序を解析した (下図)。非感作 (Saline および Al(OH)₃ 投与) マウスにおいて、抗原溶液の気管内投与により投与前 (惹起前) に比して IL-33 の増加あるいは増加傾向が認められた。感作マウス (OVA+Al(OH)₃ 投与) においては、抗原惹起により非感作マウスに比して明らかに顕著な IL-33 の産生が認められた。

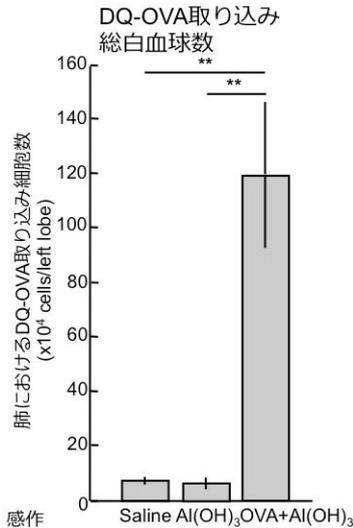
したがって、抗原を気管内投与することによる IL-33 産生には、自然免疫性の機序と獲得免疫性の機序の両方が存在することが明らかとなった (下図)。



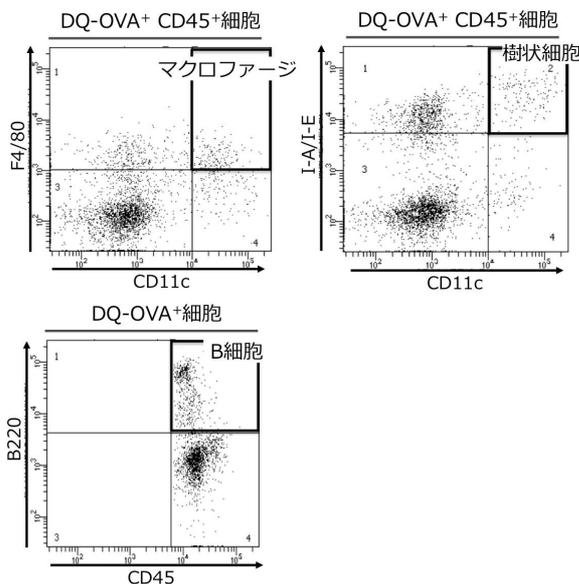
次に、この獲得免疫性の機序に焦点を当て解析した。各種中和抗体 (抗 FcεR1 抗体、抗 IgE 抗体および抗 CD4 抗体) を用いて検討を行ったところ、予想に反し、抗原による IL-33

産生の機序には、肥満細胞・好塩基球 - IgE 抗体を介した機序ならびに Th2 細胞を介した機序のいずれも関与しないことが明らかとなった（データには示さず）。

しかし、肺に投与された抗原の認識機構は明らかではなかった。したがって、細胞内プロテアーゼによって蛍光を発する OVA (DQ-OVA) を用いて検討を行ったところ、非感作マウスの肺細胞に比較して、感作マウスのそれは顕著に多量の DQ-OVA の取り込みを示した。すなわち、気管内投与した DQ-OVA は、抗原特異的に肺の細胞に取り込まれることが明らかとなった（下図）。

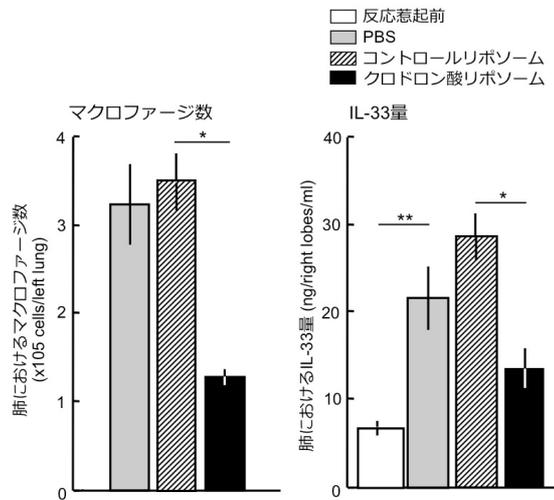


つぎに、DQ-OVA を取りこんだ細胞を flowcytometer を用いて解析したところ、少なくともマクロファージ (CD45⁺ F4/80⁺ CD11c⁺ 細胞)、樹状細胞 (CD45⁺ CD11c⁺ I-A/I-E⁺ 細胞) および B 細胞 (CD45⁺ B220⁺ 細胞) は、抗原を抗原特異的に顕著に取りこんでいることが明らかとなった（下図）。



この中で、マクロファージに着目して検討を行った。すなわち、クロドロン酸リポソーム

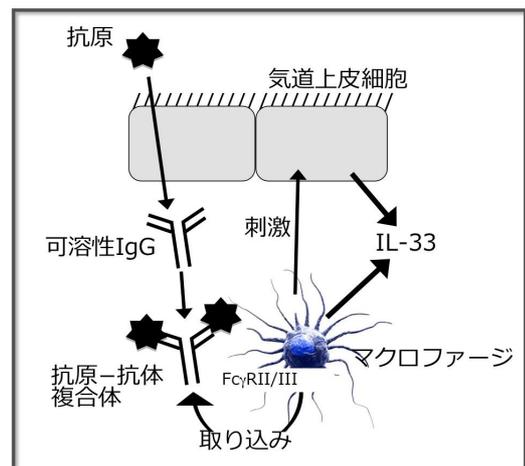
を気管内投与することによって肺内のマクロファージを枯渇すると、IL-33 産生量が有意に減少した（下図）。



さらに、抗 Fc γ RII/III 抗体の投与は IL-33 産生を抑制した（図には示さず）。

また、これまで研究代表者は、本モデルにおいて血中に抗原特異的 IgE 抗体のみならず抗原特異的 IgG 抗体が大量に産生されていることを明らかにしてきた。

以上の成績より、感作マウスに単回で抗原を投与することによる IL-33 産生には、肺に侵入した抗原が抗原特異的 IgG 抗体と抗原抗体複合体を形成し、これが肺内のマクロファージ上の Fc γ RII/III を介してマクロファージ内に取り込まれる機序が存在することが明らかとなった（下図）。



(4) Tr1 細胞の移入による抗アレルギー作用の基礎的検討

IL-33 産生などを抑制する方法として、抗原特異的に反応する制御性 T 細胞 (Tr1 細胞) を移入することによる治療法の基礎的検討を行った。すなわち、感作マウス脾細胞を特異抗原および種々サイトカイン (IL-21、IL-27 および TGF- β) とともに 7 日間培養することにより、抗原刺激 (抗原提示細胞の存

在下)によって IL-10 を産生する CD4⁺T 細胞を誘導することができた。

上記のように invitro 誘導した CD4⁺細胞を喘息マウスに移入し、in vivo 系で抗原惹起したところ、肺内の IL-10 産生が強く増強されるとともに、アレルギー性の好酸球浸潤ならびに気道上皮における粘液貯留が有意に抑制された。

一方、Tr1 細胞は特異的なマーカーがなく、上記のように CD4⁺細胞を移入せざるを得なかった。この CD4⁺細胞には、Th2 細胞などの Tr1 細胞以外も含有されていたことから、Tr1 細胞をさらに高純度に精製する方法を検討した。すなわち、Th2 細胞に特異的に発現する CCR4 の抗体を用いて Th2 細胞を除去する方法などを予備的に検討したが、高純度に精製することは現在のところ確立できていない。また、Tr1 細胞を移入することによってアレルギー性の IL-33 産生を抑制することができるか否かも現在のところ明らかではない。

(5)総括

本研究により、気道におけるアレルギー性 IL-33 産生の機序のうち、獲得免疫性に誘起される機序の一部が明らかとなった。また、IL-33 産生はステロイド感受性であることも明らかとなった。今後、反復抗原惹起による IL-33 産生に関する検討も行う必要がある。これらの IL-33 産生機序に関する知見は、今後、IL-33 産生を制御する薬物や方法を開発するに当たり、有益な情報となる。

一方、in vitro 誘導した Tr1 細胞は、養子移入により in vivo で抗アレルギー効果を発揮することが明らかとなり、今後、新たな治療法の開発に繋げていきたい。しかし、Tr1 細胞を大量かつ高純度に精製することが喫緊の課題である。

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9件)

奈邊 健, アレルギー性気道炎症における IL-33 産生細胞の解析. 眼薬理, 査読有, 30, 2016, 53-56

DOI: なし

Takeshi Nabe, Hiroki Wakamori, Chihiro Yano, Ayumi Nishiguchi, Rino Yuasa, Hitomi Kido, Yusaku Tomiyama, Ayumi Tomoda, Haruka Kida, Anna Takiguchi, Masaya Matsuda, Keiichi Ishihara, Satoshi Akiba, Susumu Ohya, Hiroyuki Fukui, Nobuaki Mizutani, and Shin Yoshino, Production of interleukin (IL)-33 in the lungs during multiple antigen challenge-induced airway inflammation in mice, and its modulation by a glucocorticoid. Eur. J. Pharmacol., 査読有, 757, 2015, 34-41

DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.015

Takeshi Nabe, Current Perspective, Interleukin (IL)-33: New therapeutic target for atopic diseases. J. Pharmacol. Sci., 査読有, 126, 2014, 85-91

DOI: なし

[学会発表](計25件)

金谷 春奈、高橋 弘夢、石田 有希、辻本 奈有、松田 将也、奈邊 健、気道のアレルギー性 IL-33 産生過程における種々免疫担当細胞による抗原取り込みについての解析、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 26 日、仙台

土井加菜、堤 達哉、西村和真、松田将也、奈邊 健、IL-10 を高産生する CD4⁺T 細胞の養子移入によるアレルギー性気道炎症の制御、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎

Masaya Matsuda, Takeshi Nabe, Induced Tr1 cells is available for antigen-specific immunotherapy for allergic airway inflammation、第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 7 日、那覇

辻本奈有、石田有希、松田将也、奈邊 健、気道のアレルギー性 IL-33 産生におけるマクロファージおよび B 細胞の関与について、第 130 回日本薬理学会近畿部会、2016 年 11 月 19 日、京都

松田将也、藤飯慎也、貴島真貴、黒田郁江、棚橋 優、湯浅梨乃、奈邊 健、アトピー疾患の治療を指向した Tr1 細胞による新規免疫療法の基礎的検討、第 65 回日本アレルギー学会学術大会、2016 年 6 月 18 日、東京

辻本奈有、石田有希、木戸仁美、松田将也、武田瀬名、西尾郁美、吉田智紀、水谷暢明、吉野 伸、大矢 進、奈邊 健、マウス喘息モデルを用いた IL-33 産生機序の解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、横浜

奈邊 健、水谷暢明、一般公募シンポジウム 8 「医薬品評価に活用できる新しいアレルギー疾患モデル」(シンポジスト)アレルギー性気道炎症における IL-33 産生細胞および機序の解析、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、横浜

奈邊 健、シンポジウム 1 「眼アレルギーと薬理学の接点(免疫抑制薬点眼薬を越えて)」(オーガナイザーおよびシンポジスト)アレルギー性気道炎症における IL-33 産生機序の解析、第 35 回日本眼薬理学会、2015 年 9 月 5 日、東京

福井裕行、水口博之、奈邊 健、北村嘉章、武田憲昭、Swiss 3T3 細胞における蛋白キナーゼ C-活性化によるインターロイキン-33 遺伝子発現亢進、第 64 回日本アレルギー学会学術大会、2015 年 5 月 28

日、東京
松田将也、黒田郁江、棚橋 優、大矢 進、
奈邊 健、アトピー疾患の免疫療法に利用
可能な誘導型制御性T細胞 (Tr1 細胞)の
抗原特異的 IL-10 産生、次世代を担う創
薬・医療薬理シンポジウム 2014、2014 年
8 月 30 日、大阪
奈邊 健、西口愛弓、矢野智大、湯浅梨
乃、木戸仁美、喜田遥香、滝口杏奈、若
森裕生、大矢 進、水谷暢明、吉野 伸、
気管支喘息における肺でのインターロイ
キン (IL)-33 産生細胞の解析、第 64 回 日
本薬学会近畿支部総会・大会、2014 年 11
月 1 日、京都

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔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

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakko/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奈邊 健 (NABE, Takeshi)

摂南大学・薬学部・薬効薬理学研究室・
教授

研究者番号：4 0 2 2 8 0 7 8

(2) 研究分担者

水谷 暢明 (MIZUTANI, Nobuaki)

神戸薬科大学・薬理学研究室・講師

研究者番号：9 0 3 4 0 4 7 7

福井 裕行 (FUKUI, Hiroyuki)

徳島大大学院・医歯薬学研究部・分子難病
学・教授

研究者番号：9 0 1 1 2 0 5 2

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし