

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860903

研究課題名(和文) インターロイキン33の活性化と皮膚炎の病態に関する研究

研究課題名(英文) Dermatitis and activation of IL-33

研究代表者

羽田 孝司 (HANEDA, Takashi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90580035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、角化細胞でIL-33を高発現させた遺伝子改変マウス(hK14mIL33tg#1)においてアトピー性皮膚炎に類似した皮膚炎が自然発症することを報告している。このマウス系列の皮膚における活性型IL-33の構造がFull lengthのIL-33であることをウエスタンブロッティング法などで同定した。また、hK14mIL33tg#1とRAG2ノックアウトマウスの交配を開始し、T、B、NKT細胞がない条件下で角化細胞にIL-33を高発現するマウス系列“Rag2K0/IL33Tgマウス”を樹立したところ、やはり肉眼的に皮膚炎が発症し、Th2細胞ではなく2型自然リンパ球の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：IL-33, a new member of the IL-1 cytokine family, is a ligand for the receptor ST2. We examined the role of IL-33, by making transgenic mice (hK14mIL33tg#1) which express IL-33 specifically in keratinocyte. Western blot analysis showed increased expression of full-length IL-33, not cleaved IL-33, in hK14mIL33tg#1 mice. Next, we generated Rag2K0/hK14mIL33tg#1 mice which lacks Th2 cells. Interestingly, Rag2K0/hK14mIL33tg#1 mice spontaneously developed atopic dermatitis. These results suggested that group2 innate lymphoid cells produce Th2 cytokines in Rag2K0/hK14mIL33tg#1 mice.

研究分野：皮膚科学、皮膚免疫学、皮膚放射線医学

キーワード：IL-33 2型自然リンパ球

1. 研究開始当初の背景

IL-33はIL-1ファミリーのサイトカインとして同定されたタンパクで、IL-1 α/β と同様の立体構造を有し、第9番染色体に存在するIL33遺伝子にコードされている。IL-33は、AD、乾癬、扁平苔癬などの炎症性皮膚疾患や、UVB照射、単純ヘルペスウイルスの感染に際して、表皮で発現増加することが知られている。最近、申請者らは、遺伝子改変マウスを用いて、角化細胞でIL-33を高発現させると、SPFの飼育環境下、6から8週齢でアトピー性皮膚炎に類似した皮膚炎が自然発症することを見いだした。

この遺伝子改変マウスの作製には、IL-33全長を発現させたが、角化細胞ではIL-33 mRNAは複数報告があり、また、翻訳後にはカテプシンGあるいはエラスターゼなどのプロテアーゼによりプロセッシングを受けたIL-33の方が活性が高くなることが知られている。しかし、このマウスで皮膚炎を誘導する実際の活性型IL-33は不明である。

また、このマウスで誘導される皮膚炎は、2型自然リンパ球の増加とIL-5、IL-13などTh2型のサイトカインの産生増加を伴っており、この2型自然リンパ球はIL-5、IL-13を産生する能力を有している。しかし、IL-33の受容体 α 鎖に相当するST2は2型自然リンパ球のみならず、Th2細胞やそれ以外の免疫細胞にも発現しており、2型自然リンパ球以外にも、Th2型のサイトカインの産生に関わる機序が働いている可能性があった。

2. 研究の目的

本研究では、本遺伝子改変マウスにおける活性型IL-33の同定と、Th2型皮膚炎に関わる免疫系について探索を進め、IL-33によって誘導される皮膚炎の病態の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 申請者らが作製した角化細胞特異的にIL-33を高発現するマウス系列(hK14mIL33tg#1)の皮膚におけるIL-33 mRNAアイソフォームおよび活性型IL-33の構造を同定する。

(2) hK14mIL33tg#1とRAG2ノックアウトマウス(RAG2KO)の交配を開始し、T、B、NKT細胞がない条件下で角化細胞にIL-33を高発現するマウス系列“hK14mIL33RAG2KO”を樹立し、T、B、NKT細胞のない生体における皮膚炎発症経過とサイトカインプロファイルの変化を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 野生型マウス(B6)ならびにhK14mIL33tg#1マウス皮膚炎組織のホモゲネートから可溶性タンパクを抽出し、抽出した可溶性タンパクをマウスIL-33C末端抗体と反応させ、ウエスタンブロッティング法にて解析した(図1)。抗体は市販品で反応が良いものが無かったためオリジナルのポリクローナル抗体を自作した(Rabbit)。抗体の信頼性を担保するため、IL-33KOマウス皮膚のホモゲネートから抽出したサンプルをネガティブコントロールとして使用した。また、ポジティブコントロールとしてはリコンビナントのマウスIL-33を使用した。

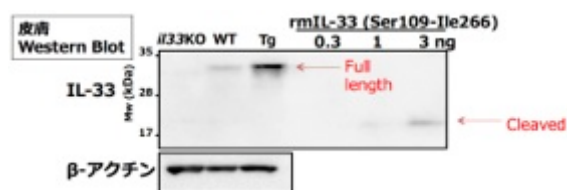


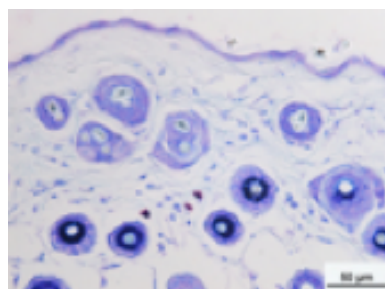
図1 ウエスタンブロッティング法

結果は図1にあるように、野生型マウス(図1, WT)でも少量のIL-33が存在することが知られていたが、予想通り、これはFull lengthのIL-33であることが判明した。ところが驚くべき事に、hK14mIL33tg#1マウスの皮膚炎部分で高発現しているのはFull lengthのIL-33であり、従来活性化型として複数のメーカーから市販されてきたCleaved IL-33ではないことが判明した。以前はFull lengthのIL-33には活性が無いと言われていたが、Full lengthのIL-33が*in vivo*で炎症を惹起できることが判明したことから、本マウス系統においてはFull lengthのIL-33が活性型IL-33であることが判明した。以上のような皮膚ホモゲネートからIL-33を検出する方法は他からはまだ発表されておらず、非常に多くの最適化を要する高度な技術であることから、現在論文投稿準備中である。

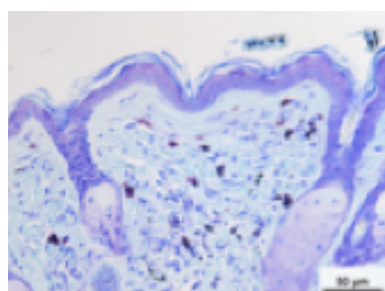
(2) hK14mIL33tg#1とRAG2ノックアウトマウス(RAG2KO)の交配を開始し、T、B、NKT細胞がない条件下で角化細胞にIL-33を高発現するマウス系列“Rag2KO/IL33Tgマウス”を樹立した。皮膚炎の発症過程においては、驚くべき事にRag2KO/IL33Tgマウスにおいても肉眼的に皮膚炎が発症した。

① 組織学的解析については、HE染色と、マスト細胞を染め分ける特殊染色であるトルイジンブルー染色を行ったところ、HE染色では通常のIL-33Tgマウスと類似の慢性皮膚炎像を呈し、好酸球浸潤があるなどアトピー性皮膚炎様の外観を呈した。トルイジンブルー染色ではT、B、NKT細胞が無いにもかかわらず

ず皮膚炎部分では Rag2KO マウスと比較して Rag2KO/IL33Tg マウスにおいては、マスト細胞が増加していることが判明した (図 2)。



Rag2KO



Rag2KO/IL-33Tg

図 2 トルイジンブルー染色

トルイジンブルー染色はマスト細胞が異染色性に染まる染色法であり、図 2 ではマスト細胞が 3 倍以上に増加している様子が示されている。このことは、IL-33 によるマスト細胞の recruitment に獲得免疫や IgE が必要で無いことを *in vivo* で明確に示したデータであり、新規性が高いことから、これらの内容を現在投稿中である。

②野生型(WT)マウス、IL-33Tg マウス、Rag2KO マウス、Rag2KO/IL33Tg マウスについて、それぞれ皮膚より mRNA を抽出し、皮膚炎発現にかかわる遺伝子を包括的に検証した。quantitative real-time PCR (qRT-PCR) の手法を用い、キットと機器は TaqMan RNA-to-Ct Kit (Applied Biosystems) ならびに ABI7900HT sequence detection system (Applied Biosystems) を使用した。また、Gapdh 遺伝子をコントロールとして使用した。驚くべき事に、Th2 細胞が無いにもかかわらず、Rag2KO/IL33Tg マウスの皮膚においては IL-4、IL-5、IL-13 といった Th2 サイトカインが上昇しており、Rag KO マウスを基準として IL-4 で約 6 倍、IL-5 で約 5 倍、IL-13 で約 9 倍の上昇であった。したがって、IL-33 の皮膚炎に関する関与としては Th2 細胞ではなく 2 型自然リンパ球といった自然免疫系

の細胞の関与が示唆された。

③そこで、2 型自然リンパ球に着目して解析をすすめると、Rag2KO/IL33Tg マウスにおいては全身で 2 型自然リンパ球が増加していることが判明した。そこで、Rag2KO/IL33Tg マウスのリンパ節のフローサイトメトリーを検討した。Rag2KO マウスは T, B, NKT 細胞を欠いているためリンパ節は肉眼的にほとんど確認できないが、Rag2KO/IL33Tg マウスにおいてはリンパ節腫脹を皮膚炎が自然発症した部分を中心にみる事ができる。通常、自然リンパ球は全リンパ球の 0.01% 以下であるため、フローサイトメトリーを用いても 2 型自然リンパ球の細胞集団をとらえることは困難とされてきたが、Rag2KO/IL33Tg マウスにおいてはフローサイトメトリーではっきりと 2 型自然リンパ球の細胞集団が見える (約 20%) ことが判明した。これは、T, B, NKT 細胞といった既存の (従来知られていた) 細胞に乏しいマウスであるため 2 型自然リンパ球の占める割合が大きいものと推測される。このように Rag2KO/IL33Tg マウスにおいては 2 型自然リンパ球の割合が高いため、ここからセルソーターを用いて自然リンパ球だけを分離するなど、実験のツールとしても Rag2KO/IL33Tg マウスが有用であることが示唆された。また、以上のように IL-33 が過剰な状態では 2 型自然リンパ球がその病態に大きく関与することが判明した。これらの内容は現在論文投稿を準備中である。

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 3 件)

- ① 井上 裕香子、夏秋 優、羽田 孝司、山西 清文、政近 江利子、金村 晋吾、中野 孝司、マダニ刺症に対して処方されたミノサイクリンによる好酸球性肺炎、皮膚病診療、査読有、37 巻、2015、545-548
- ② Ide Yoshi-Hiro, Tsukamoto Yoshitane, Ito Takaaki, Watanabe Takahiro, Nakagawa Noboru, Haneda Takashi, Nagai Makoto, Yamanishi Kiyofumi, Hirota Seiichi, Penile pseudomyogenic hemangioendothelioma/epithelioid sarcoma-like hemangioendothelioma with a novel pattern of SERPINE1-FOSB fusion detected by RT-PCR - Report of a case, Pathology - Research and Practice, 査読有、211 巻、2015、415-420
DOI: 10.1016/j. prp. 2015. 02. 003
- ③ 羽田 孝司、夏秋 優、谷口 怜子、山西 清

文、齋藤 正紀、テラプレビルを含む3剤併用療法による慢性C型肝炎治療中に生じた多形滲出性紅斑型薬疹の1例、皮膚の科学、査読無、13巻、2014、79-83

<http://doi.org/10.11340/skinresearch.13.79>

[学会発表] (計6件)

- ① 井上 裕香子、夏秋 優、山本 雅章、羽田 孝司、今井 康友、山西 清文、西井 理恵、松永 寿人、皮疹の軽快後に抑うつ状態を発症したカルバマゼピンによる非典型 DHIS の1例、第45回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、2015/11/21、島根県民会館 (島根県・松江市)
- ② 羽田 孝司、夏秋 優、今井 康友、山西 清文、ヨード系造影剤による薬疹の1例、第45回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、2015/11/21、島根県民会館 (島根県・松江市)
- ③ 羽田 孝司、夏秋 優、山西 清文、ジヒドロコデインリン酸塩による Stevens-Johnson 症候群の1例、第64回日本アレルギー学会学術大会、2015/5/26、グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール (東京都・港区)
- ④ 夏秋 優、井上 裕香子、羽田 孝司、山西 清文、政近 江利子、金村 晋吾、中野 孝司、マダニ刺症後に高熱、肝障害、肺炎を生じた1例-ミノサイクリンによる肝障害と好酸性肺炎-、第7回日本リケッチア症臨床研究会、2015/1/11、滋賀県立県民交流センター・ピアザ淡海 (滋賀県・大津市)
- ⑤ 中川 登、伊藤 孝明、山本 雅章、井上 裕香子、永井 諒、石村 直也、羽田 孝司、夏秋 優、山西 清文、当科における下肢静脈瘤治療の現状、第29回日本皮膚外科学会総会・学術集会、2014/9/13、和歌山マリーナシティロイヤルパインズホテル (和歌山県・和歌山市)
- ⑥ 石村 直也、羽田 孝司、伊藤 孝明、山西 清文、黒川 一郎、縹良 愛郎、毛包膨大部への分化を示した表皮嚢腫の1例、第113回日本皮膚科学会総会、2014/5/31、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

[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

羽田 孝司 (HANEDA, Takashi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90580035

(2) 研究協力者

2) 研究協力者

今井 康友 (IMAI, Yasutomo)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10529514

山西 清文 (YAMANISHI, Kiyofumi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10182586

筒井 ひろ子 (TSUTSUI, Hiroko)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40236914

坂口 祥子 (SAKAGUCHI, Yoshiko)

兵庫医科大学・医学部・実験補助