

研究報告書

「炎症誘導因子による炎症抑制機構の解明と慢性炎症制御技術基盤の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中江 進

1. 研究のねらい

「炎症」は病原体からの生体防御に必要な免疫応答であるが、アレルギー疾患や自己免疫疾患はいうまでもなく、癌や糖尿病等の疾病の発症や慢性化においても「炎症」が関与する。したがって、「炎症誘導因子」の同定と機能解析は、その因子の機能阻害が炎症抑制剤の開発への可能性をもつことから、難治性慢性炎症疾患の治療法の確立にとって重要な位置を占める。事実、その研究成果から抗体医薬等の治療薬が生まれ、各種疾患の治療への有効性が示されている(ただし、後述するが万能ではなく副作用が問題視されている)。しかしながら、本申請では、そのような「炎症誘導因子」による炎症誘導作用に焦点をあてた難治性疾患の発症機構の解明、いわば、正攻法的な戦略ではなく、「炎症誘導因子」による「炎症の“鎮静・抑制化”」という従来の概念とは正反対の視点にたった、難治性慢性炎症疾患の炎症誘導制御機構の解明計画を提案する。

「炎症誘導因子」による「炎症の鎮静・抑制化」に注視する意義は何か？正常な個体では、炎症が起きた組織では、免疫細胞によってその炎症を惹起した原因が取り除かれ、その後、自然に炎症が消失する(「自然に(副作用なく)」ということが重要である)。その自然に炎症を鎮静・抑制化させるためには、「炎症誘導因子」自体が必要であることを、申請者らは証明した(Nat Immunol, 8, 1095, 2007)。つまり、ある種の「炎症誘導因子」は、炎症誘導(アクセル)と鎮静化(ブレーキ)の両特質を併せ持つ。そこで、本研究では、マウス大腸炎モデルを用いて、炎症誘導因子である IL-33 による炎症の沈静・抑制化機構について個体・細胞・分子レベルでの解明を目的とする。炎症誘導因子による炎症誘導(アクセル)と鎮静化(ブレーキ)のスイッチは、どのようにして切り替わるのか、その分子機構を明確にすることより、「炎症誘導因子」による炎症を鎮静化するブレーキスイッチを選択的に作動させる事で、副作用のない、より自然な炎症抑制方法をデザインすることが可能となることが期待され、難治性慢性炎症疾患に対する新しい治療法の開発基盤の確立に寄与できることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性大腸炎は国内に約 15 万人の患者がおり、厚生労働省より特定疾患に指定される原因不明の慢性炎症疾患である。治療法としてステロイドや免疫抑制剤が有用であるが根治に至らないことが多い。

IL-33 をマウスに投与した場合、肺と腸管に炎症が誘導される。クローン病や潰瘍性大腸炎の患者の標本では、健常者の標本と比較して、IL-33 や IL-33 受容体の発現が高いことが

知られている。また、海外では、クローン病や潰瘍性大腸炎の患者のIL-33やIL-33受容体遺伝子に多型(SNP)があることが報告されており、そのSNPの有無と大腸炎の重症度の間に相関があることが報告されている。したがって、IL-33は、大腸炎の発症に関わり、症状の悪化を引き起こすサイトカインであることが推測された。しかしながら、大腸炎の発症および病態の形成におけるIL-33の役割については不明であったため、マウスの大腸炎モデルを用いて、大腸炎の発症機序におけるIL-33の機能解析を行った。

マウス大腸炎には、飲料水にデキストランを混ぜて摂取させることにより誘導するデキストラン大腸炎、トリニトロベンゼンスルホン酸やオキサゾロンなどの化学物質を用いたハプテン誘導性大腸炎、IL-10欠損マウスなどの遺伝子改変マウスで見られる自然発症型大腸炎、T細胞が存在しないマウス(scidやRag欠損マウス)へのナイーブ(CD4⁺CD45RB^{hi})T細胞の移植による大腸炎(CD4⁺CD45RB^{hi}T細胞大腸炎)などが知られている。デキストラン大腸炎とハプテン大腸炎は、T細胞が存在しないRag欠損マウスでも発症する。一方で、ヒトの慢性大腸炎では、炎症局所にT細胞の浸潤が認められるため、本研究では、T細胞依存的に発症するCD4⁺CD45RB^{hi}T細胞大腸炎を採用した。

Rag欠損マウスとIL-33欠損Rag欠損マウスにCD4⁺CD45RB^{hi}T細胞大腸炎を誘導したところ、IL-33欠損Rag欠損マウスではRag欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。したがって、IL-33は大腸炎を誘導するのではなく、むしろ、抑制する働きがあることが明らかになった。現在、IL-33は、これまでに知られていない免疫機構によって、大腸炎の抑制に関わることが明らかになりつつある。

(2) 詳細

正常のRag欠損マウスの大腸と比較して、CD4⁺CD45RB^{hi}T細胞大腸炎を誘導したRag欠損マウスの大腸では、IL-33 mRNAの発現レベルの増強が認められた。免疫染色解析により、大腸病変部でIL-33を発現している細胞は主に、マクロファージの一部とマスト細胞であることが明らかになった。これらの結果より、CD4⁺CD45RB^{hi}T細胞大腸炎の発症に、IL-33が何らかの関わりがある可能性が示唆された。

そこで、Rag欠損マウスとIL-33欠損Rag欠損マウスにCD4⁺CD45RB^{hi}T細胞大腸炎を誘導したところ、IL-33欠損Rag欠損マウスではRag欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。Rag欠損マウスと比較してIL-33欠損Rag欠損マウスの大腸組織では、炎症細胞の浸潤が多く認められ、病理学的な評価においても重症化していることが明らかになった。これに相関して、大腸組織における炎症誘導因子IL-1 β 、IL-6やIFN- γ mRNA発現も亢進していた。以上より、IL-33は、T細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症及び病態の形成を抑制する働きがあることが明らかになった。

CD4⁺CD45RB^{hi}T細胞大腸炎の炎症局所において、IL-33は大腸のマクロファージとマスト細胞で発現していることが明らかになっている。マクロファージは腸内細菌構成成分であるLPSの刺激によってIL-33を発現し、マスト細胞はIL-33の刺激により、IL-33を発現することが知られている。正常の大腸では、常在マクロファージは存在するが、マスト細胞はほとんど見られないため、最初に腸内細菌構成成分LPSの刺激によってマクロファージが活性化してIL-33を発現することが予期された。LPSによって活性化されたマクロファージは、IL-33と同

時に、マスト細胞遊走因子を産生して、大腸の炎症部位にマスト細胞を引き寄せ、引き続き、マクロファージからの IL-33 によってマスト細胞が刺激されることにより、マスト細胞が大腸炎の抑制に関わるという可能性が考えられた。しかしながら、T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症におけるマスト細胞の関与については現時点で報告がなされていない。そこで、マスト細胞が T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症に関与するかどうかを明らかにするため、Rag 欠損マウスとマスト細胞欠損 ($Kit^{W-sh/W-sh}$) Rag 欠損マウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した。その結果、IL-33 欠損 Rag 欠損マウスと同様に、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスでは Rag 欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。Rag 欠損マウスと比較して、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスの大腸病変部位では、炎症細胞の浸潤増強、炎症誘導因子 RNA の発現増強が認められた。

マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスに、野生型マウスのマスト細胞あるいは IL-33 欠損マウスのマスト細胞を移植し、これらのマウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した。その結果、両群間での大腸炎の発症率や重症度に差は認められなかった。これらの結果から、マスト細胞が産生する IL-33 は $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎の抑制には無関係であることが明らかになった。

一方で、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスに、野生型マウスのマスト細胞あるいは IL-33 受容体欠損マウスのマスト細胞を移植し、これらのマウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した場合は、IL-33 受容体欠損マウスのマスト細胞を移植した群では、大腸炎が重症化することが明らかになった。これらの結果から、マクロファージなどが産生する IL-33 がマスト細胞を活性化することが $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎の抑制に重要であることが明らかになった。

IL-33 によって活性化されたマスト細胞はどのような機序で大腸炎の抑制に関わるのか？ In vitro でマスト細胞を IL-33 で刺激を行うと、マスト細胞は炎症誘導因子である IL-6 や TNF を産生するだけでなく、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) や TGF- β 1 といった抗炎症性サイトカインを産生する。これら抗炎症性サイトカインの遺伝子欠損マウスは大腸炎を自然発症することが知られていることから、マスト細胞が産生するこれら抗炎症性サイトカインが大腸炎の抑制に関わっている可能性が考えられた。そこで、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスに野生型マウスのマスト細胞、IL-10 欠損マウスのマスト細胞、IL-1Ra 欠損マウスのマスト細胞、および、TGF- β 1 欠損マウスのマスト細胞を移植し、マスト細胞でのみ、これらサイトカインが産生されないマウスを用意した。これらマウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した結果、大腸炎誘導後の生存率は、(Rag 欠損マウス = 野生型マスト細胞移植群 = IL-10 欠損マスト細胞移植群 = IL-1Ra 欠損マスト細胞移植群) > (TGF- β 1 欠損マスト細胞移植群 = マスト細胞欠損 Rag 欠損マウス) となった。したがって、マスト細胞が産生する TGF- β 1 が大腸炎の抑制に必須であることが明らかになった。

3. 今後の展開

TGF- β 1 欠損マウスでは、大腸炎を自然発症することが知られている。したがって、TGF- β 1 が大腸炎の抑制に重要であることが明らかになっているが、どのような機序で大腸炎の抑制に関わるのかは明確になっていない。大腸内の樹状細胞や 3 型自然リンパ球が大腸炎の炎症誘導に関わっていることが報告されている。そこで、マスト細胞が産生する TGF- β 1 が樹状細胞や 3 型自然リンパ球の活性化の抑制に関わるのかどうか、明確にする。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、大腸炎の抑制機序の解明を目指して、マウスの慢性大腸炎モデルを採用した。慢性大腸炎の誘導にはマウスであっても長い時間を必要としたが、概ね、計画通りに遂行できたが、進めていくうちに、解析の幅が広がり、期間内に論文として公開できなかった点は反省すべき点と考えている。本研究の成果の一つに、大腸炎の抑制に IL-33 がマスト細胞を刺激することが重要であることを新しく見出した点が挙げられる。本研究は、IL-33 がいかにして大腸炎の抑制に働くのか、その機序についての基礎的な理解の研究であるため、その成果は大腸炎の治療にすぐに利用できるものではないが、今後、IL-33 を標的とした創薬の開発への基礎的な知識の提供には大きな意味を持つと見込んでいる。

この研究から派生した様々な研究を学術誌に複数公表することができ、その成果が認められ、国内外の多くの研究者からの共同研究の申し込みがあり、また、国内外の招待講演、著名な科学雑誌の総説執筆や査読依頼、海外研究機関の研究費申請書の査読依頼が増えるようになり、当該分野の一研究者として認知されるようになった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

炎症を悪化させる因子と考えられていた、IL-33 やマスト細胞の自己免疫様慢性大腸炎における役割を解析するため、IL-33 あるいはマスト細胞を欠損する免疫不全 Rag 欠損マウスにナイーブ(CD4+CD45RBhi) T細胞を移植して慢性の大腸炎を誘導した。そのマウスにおいては大腸炎発症と死亡が早期に認められた。そこで IL-33 やマスト細胞の大腸炎抑制機構を解析したところ、腸内細菌構成成分によって主にマクロファージが IL-33 を産生し、それが IL-33 受容体を発現するマスト細胞を刺激して TGF- β 1 産生を誘導し、大腸炎の抑制に必須であることを見いだしている。本研究成果を得るために、大腸炎発症に関与すると考えられる種々の分子の遺伝子欠損マウスを利用し、それらのマウスからマスト細胞を調製、あるいはそれらマウスの骨髄細胞からマスト細胞を培養・増殖させて移植するなど、時間と根気を要する詳細な実験を行っている。数多くの因子や細胞種が関与する中から、多大な努力によって新たな知見を見いだした。

未発表ながら、上記以外にも多くのデータを取得して当初の計画は概ね達成できており、今後における早期の論文化が期待できる。炎症性大腸炎は、近年日本においても年々患者数の増加がみられる原因不明とされている疾患である。中江研究者は、本研究課題と関連する研究において、多数の研究者と共同研究を行い、多くの論文・総説の発表、国内外の招待講演などを行っている。今後炎症性大腸炎の治療戦略を立案するにあたって、本研究成果が重要な示唆を与えうるものと確信する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, <u>Nakae S</u> . An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. <i>Immunity</i> . 2015, 43(1):175-186.
2. Morita H, Arae K, Unno H, Toyama S, Motomura K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Saito H, Matsumoto K, <u>Nakae S</u> . IL-25 and IL-33 Contribute to Development of Eosinophilic Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen-Sensitized Mice. <i>PLoS One</i> . 2015;10(7):e0134226.
3. Shibui A, Takamori A, Tolba EMT, Nambu A, Shimura E, Yamaguchi S, Sanjoba C, Suto H, Sudo K, Okumura K, Sugano S, Morita H, Saito H, Matsumoto K & <u>Nakae S</u> . IL-25, IL-33 and TSLP receptor are not critical for development of experimental murine malaria. <i>Biochem Biophys Rep</i> . 2016, 5:191-195.
4. Nakanishi W, Hiraishi Y, Yamaguchi S, Takamori A, Morita H, Matsumoto K, Saito H, Sudo K, Yamasoba T and <u>Nakae S</u> . TSLP receptor is not essential for house dust mite-induced allergic rhinitis in mice <i>Biochem Biophys Rep</i> . 2016, 7:119-123.
5. Morita H, Saito H, Matsumoto K, <u>Nakae S</u> . Regulatory roles of mast cells in immune responses. <i>Semin Immunopathol</i> . 2016, 38(5):623-629.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演・学会発表等

1. Nakae S. "IL-17 family cytokines in allergy." The Centre for Allergy Research Seminar: this year's PhARF awardees, Karolinska Institute, Sweden. Oct 20, 2011
2. Nakae S. "Role of IL-33 in allergy." The 22nd World Allergy Congress, Cancun, Mexico. Dec 5, 2011
3. Nakae S. "Role of IL-33 in allergy." The 29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, Jeju, Korea. Oct 17, 2012.
4. Nakae S. "IL-33 in Inflammation." The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting, Tokyo. Oct 24, 2012.
5. Nakae S. "Role of IL-33 in innate-type immune cells in allergy." WAO Symposium on Immunology & Biologics, Chicago. Dec 14, 2013.

受賞

1. 2011年11月 第21回 アボットジャパン・アレルギー学術奨励賞(公益財団法人日本アレルギー協会)
2. 2014年9月 Highly Cited Researchers(トムソン・ロイター)

3. 2015年9月 Highly Cited Researchers(トムソン・ロイター)

著作物

(英文総説)

1. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy* 2012, 67; 1203-14.
2. 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.
3. Ikutani, M., Tsuneyama, K., Nakae, S. and Takatsu K. Emerging roles of IL-33 in inflammation and immune regulation. *Inflammation and Regeneration*, 2015; 35(2), 69-77.
4. Morita H, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Regulatory roles of mast cells in immune responses. *Semin Immunopathol.* 2016 Sep;38(5):623-9.

(日本語総説)

1. 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年、第30巻第6号、918-925頁。
2. 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年、第30巻第19号、3062-3071頁。
3. 新江 賢、森田英明、大野建州、松本健治、中江 進:IL-33 とアレルギー。最新医学、2013年、第68巻第3号、552-567頁。
4. 海野浩寿、森田英明、新江 賢、大野建州、斎藤博久、松本健治、中江 進:細胞死によるアレルギー疾患への影響—IL-33、HMGB-1などのDAMPsによる免疫応答。実験医学増刊、2013年、第31巻第17号、105-112頁。
5. 鈴川真穂、中江 進:IL-33。標的分子の基礎医学的 pursuit。アレルギーの臨床、2014年、第34巻、1239-1242頁。
6. 森田英明、松本健治、中江 進:IL-33 とマスト細胞を介した新規気道炎症抑制機構、感染 炎症 免疫、2016年、第46巻第2号、68-70頁。羊土社

著書

1. Ishigame, H., Nakae, S. The roles of IL-17A and IL-17F in infection and inflammatory disorders. In “Cytokine Frontiers” (ed. Y. Yoshimoto & Y. Yoshimoto). Springer Science + Business Media, LLC, New York, NY, p 79-101, 2014.

プレスリリース

1. 科学新聞(2015年7月31日):気管支喘息抑える新たなメカニズム
2. 日刊工業新聞(2015年7月22日):東大など、「気管支ぜんそく」抑える生体内の新しい仕組み発見
3. 日経プレスリリース(2015年7月22日):東大など、気管支喘息を抑える新しい免疫応答機構を解明