

総括研究報告書

課題番号：29-29

課題名：広範囲に上皮や内皮細胞の傷害を引き起こす疾患（アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、川崎病、好酸球性胃腸炎）における
活性型 IL-33 のサブタイプの解析

主任研究者名（所属施設） 国立成育医療研究センター研究所

（所属・職名）免疫アレルギー・感染研究部 研究員

杉江 真以子

（研究成果の要約）アレルギー疾患を初めとする 2 型炎症の発症や増悪には IL-33 が重要であり、上皮細胞や内皮細胞の傷害で放出され alarmin として働く。そのため、広範囲に上皮や内皮細胞の傷害を引き起こす疾患（アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、川崎病、好酸球性胃腸炎）でも IL-33 が高濃度に放出され、病態に関与している可能性が考えられるが、現在市販されている ELISA kit では不活性型の IL-33 しか検出できない。そのため、IL-33 の機能分子としての役割を検討するためには、活性型の IL-33 の測定系を構築が必要である。そこで、本研究では①活性型 IL-33 の測定系の構築を行い、その後、②アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、川崎病、好酸球性胃腸炎の患者の急性期と寛解期の血清中の IL-33 濃度と活性、分子量の測定を行い、IL-33 のこれらの疾患の病態形成における機能分子としての役割を検討する。

高感度な活性型 IL-33 測定系の構築には、まず IL-33 応答性が高い細胞株を用いて、特異的に誘導されるアウトプット遺伝子を用いた reporter assay 系を構築する必要がある。我々は IL-33 応答性が高い細胞株を探索し、HMC1.2 (human mast cell line) が顆粒球の細胞株の中でも IL-33 応答性が高い細胞株であることを確認した。また、マイクロアレイ解析の結果から、HMC1.2 において 遺伝子 C が 50pg/ml という非常に低濃度の IL-33 でも有意に誘導されることを確認した。さらに、この遺伝子 C が IL-33 特異的に誘導されることを確認するため、IL-33 と共通の受容体(IL1RAP)を持つ IL-1 α や IL-1 β 、また IFNs で刺激を行ったが、遺伝子 C は誘導されなかった。このことから 遺伝子 C は IL-33 特異性と感度が高い遺伝子であると言える。来年度は遺伝子 C を用いて reporter assay 系を構築し、患者血清中の IL-33 活性を測定することで、IL-33 の病態形成における機能分子としての役割を検討する予定である。

1. 研究目的

IL-33 はアレルギー疾患を初めとする 2 型炎症の発症や増悪に重要なサイトカインである。上皮細胞や内皮細胞の傷害で放出されることから、広範囲に上皮や内皮細胞の傷害を引き起こす疾患（アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、川崎病、好酸球性胃腸炎）においても高濃度に放出され、病態に関与している可能性が考えられる。本研究の目的は、これらの疾患において、これまで明らかになっていない **IL-33** の分子量と活性を調べることで、**IL-33** がこれらの疾患の病態形成における機

能分子としての役割を検討することである。

2. 研究組織

研究者 杉江真以子

所属施設 国立成育医療研究センター

3. 研究成果

(1). 検体収集

現在、臨床検体の収集のための倫理申請中である。倫理申請は本年度中に申請し、検体収集を開始する。

(2). レポーターアッセイを用いた IL-33 の bioassay 系の確立

(イ). IL-33 応答遺伝子としての IL-6 と IL-8

IL-33 bioassay 系を確立するためには、初代細胞ではなく、長期培養が可能で、細胞特性が安定な細胞株か、レポーター組換え可能な細胞を用いる必要がある。そこで IL-33 特異的なサイトカイン(2型サイトカインなど)を産生するエフェクター細胞(マスト細胞など)がレポーター組換え細胞の候補になると考えた。そこでマスト細胞(HMC1.2)と好塩基球(KU812)の細胞株を用いて IL-6, IL-8 の発現誘導を確認したが、IL-33 刺激後の発現上昇が非常に低く、IL-33 bioassay のアウトプットの遺伝子には適さないことが明らかになった。

(ロ). アウトプット遺伝子の抽出

そこで新たな IL-33 bioassay のアウトプット遺伝子を探索するために、IL-33 の刺激が入り活性化されることが確認されているヒト末梢血由来マスト細胞を用いて、IL-33 感受性が高い遺伝子を抽出することを考えた。ヒト末梢血由来 CD34 陽性細胞を 12 週間かけてマスト細胞に分化させ、100 ng/ml IL-33 で 6 時間刺激後の細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。本研究では患者血清中の IL-33 活性を測定することを目的としているため、アウトプット遺伝子は IL-33 に特異的である必要がある。そこで、ヒトマスト細胞において IL-33 応答性の高く特異的な遺伝子として CCR7, IL-5, IL-13, TNFSF9 を抽出した。(表 1)

(ハ). IL-33 bioassay に用いる細胞株の選択

次に、これらの遺伝子発現(CCR7, IL-5, IL-13, TNFSF9)を KU812 と HMC1.2 を用いて IL-33 刺激後に誘導される遺伝子を比較した。

(a). KU812

KU812 では IL-33 刺激後 24h で IL-5 が確認されたが、24h 以降と非常に遅く二次的な反応であることが分かった。(図 1 上)また IL-33 感受性は HMC1.2 より低く、bioassay には適さないことが明らかになった。

(b). HMC1.2

HMC1.2 では IL-33 刺激後 2h で TNFSF9 の mRNA の有意な上昇が確認された。(図 1 下)ま

た、HMC1.2 は KU812 に比べて、低濃度の IL-33 で細胞を活性化することを確認した。(図 2) 通常、IL-33 は 10~100 ng/ml の濃度で細胞への活性化が見られるが、HMC1.2 では通常用いる 1000 分の 1 の濃度の IL-33 (10 pg/ml)でも有意な TNFSF9 の mRNA の上昇がみられた。このことから HMC1.2 は IL-33 応答性が非常に高い細胞株であり、bioassay に非常に適していることが明らかになった。

(ニ). HMC1.2 における IL-33 応答遺伝子の抽出

図1. KU812とHMC1.2におけるIL-33応答遺伝子の発現比較

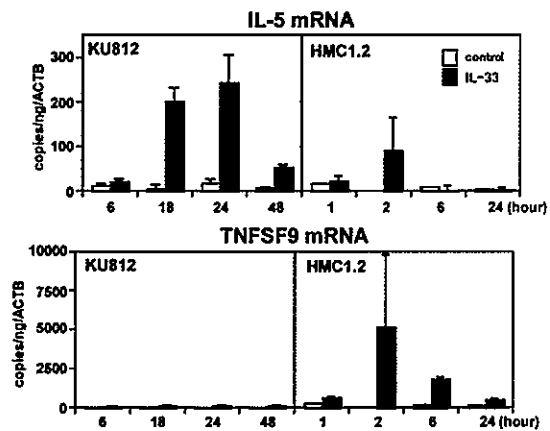
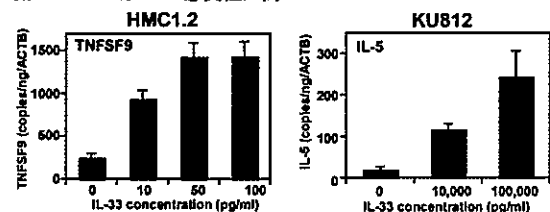


図2. HMC1.2はIL-33感受性が高い



出

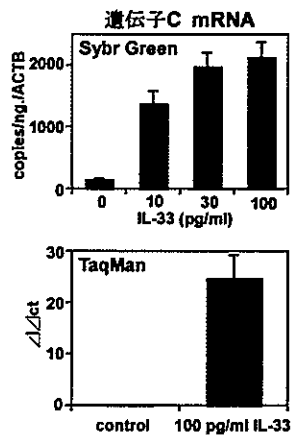
TNFSF9 はヒトマスト細胞を IL-33 刺激した時に動く遺伝子として抽出してきたため、HMC1.2 において IL-33 応答性が最も高く、特異性も高い遺伝子を抽出する必要がある。そこで HMC1.2 に低濃度(10 pg/ml)の IL-33 で 6 時間刺激を行い、マイクロアレイ解析にて IL-33 応答性の高い遺伝子を探索した。IL-33 bioassay には IL-33 応答性が高く、患者血清中の IL-33 以外のサイトカイン、ケモカインの影響を受けにくい遺伝子である必要がある。そこで、研究代表者は IL-33 刺激後誘導される上位遺伝子の中から bioassay に用いるアウトプット遺伝子の候補として遺伝子 C を抽出した。(表 2)

表1. IL-33刺激後のヒトマスト細胞における発現遺伝子

Gene symbol	Agilent probe ID	Description	Control		IL-33		Fold change
			Raw signal	D/N	Raw signal	D/N	
CCR7	A_23_P343398	Chemokine (C-C motif) receptor 7	6.1	N	10293.3	D	2316.5
IL-13	A_23_P251031	Interleukin 13	5.7	N	8001.2	D	1918.0
IL-5	A_24_P209047	Interleukin 5	5.7	N	5052.9	D	1227.9
AREG	A_23_P259071	Amphiregulin	5.8	N	4238.6	D	1035.2
TNFSF9	A_23_P51936	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	26.6	D	3778.6	D	195.3

マイクロアレイの解析で抽出した遺伝子CがIL-33刺激で有意に誘導することを確認するため、SYBR green qPCRを行ったところ、30 pg/ml IL-33刺激で遺伝子Cの有意な発現誘導(約2000 copies/ng/ACTB)を確認した(図3上)。しかしながら、SYBR green qPCRではプライマー二量体のような非特異的な二本鎖DNAも検出している可能性がある。そこで、遺伝子Cの発現が特異的に上昇していることを再確認するため、非特異的な検出がないTaqMan PCRを行ったところ、 $\Delta\Delta ct$ が約25倍であり遺伝子CがIL-33で特異的に有意に発現上昇することを確認した。(図3下)

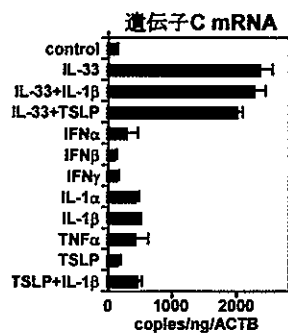
図3. 遺伝子CはIL-33刺激で有意に上昇する



(ホ). 遺伝子Cの特徴

IL-33 bioassay で用いるアウトプット遺伝子は、患者血中に存在するIL-33以外のサイトカインやケモカインでは誘導されない遺伝子である必要がある。そのため、この遺伝子CのmRNA誘導がIL-33特異的かどうかを確認するため、IFNsやIL-33と同様に上皮由来サイトカインであるTSLP、IL-33

図4. 遺伝子CはIL-33特異的に誘導される



の作用を増強する効果のあるIL-1βで刺激したところ、遺伝子CはIL-33刺激でのみ有意な誘導を引き起こすことを確認した。(図4)

遺伝子Cにはp53の結合部位があり、既報ではレポーターアッセイにも用いられているためIL-33 bioassayのアウトプット遺伝子として用いることが可能であると考えられる。

①、②を通じて、本研究は当初の予定通りおむね順調に進んでいる。

4. 研究内容の倫理面への配慮

- (1). 倫理審査：臨床検体を用いる研究計画および臨床研究について、国立成育医療研究センターの倫理審査委員会に申請中である。(受付番号 1770)
- (2). 医学的研究及び医療行為の対象となる個人の個人情報の保護：臨床検体を用いる研究においては、試料は個人情報管理者により匿名化されたのちに国立成育医療研究センター研究所に搬送され、実験に供される。個人識別情報は個人情報管理者により試料等採取機関にて管理され、研究実施機関には個人情報の伝達は行われない。
- (3). 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益：検体の採取の方法および研究の目的と内容について十分に説明する。研究計画は、対象患者の治療にとって直接利益をもたらすものではないこと、協力しないことによって何らの不利益も生じないことを説明する。
- (4). 医学的研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法：本研究の目的及び医学的貢献について対象患者あるいは代諾者に十分に説明した上で、各研究協力施設における倫理規定に合わせて検体採取の同意を得る。

表2. HMC1.2においてIL-33刺激後に誘導される上位3遺伝子

遺伝子名	raw signal				Fold change
	control	10 pg/ml IL-33	100 pg/ml IL-33	10pg/ml IL-33 + 0.2ng/ml IL-1β	
遺伝子A	38.3	1626.2	2871.1	1403.1	44.6
遺伝子B	61.9	1067.3	1451.1	1141.6	18.1
遺伝子C	3180.3	45803.8	67528.7	42990.3	15.1