

(別紙1)

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。初年度は、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 50 pg/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。

今年度は遺伝子 C の promotor 配列を作成し、遺伝子 C の reporter plasmidを作成し、plasmid が functional であることを確認した。また HMC1.2 へ遺伝子 C の reporter plasmid を transfection するための electrophoration の条件を決定した。また HMC1.2 の reporter assay がうまくいかない時の対応として、IL-33 の受容体を過剰発現させた細胞株の作成するため、ST2 受容体を発現する plasmid を作成した。

来年度は遺伝子 C の reporter assay を行い、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

本研究の目的

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

【2017 年度の成果】

(1). 検体収集

現在、臨床検体の収集のための倫理申請の準備中である。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) (Emi-sugie M et al, J Allergy Clin Immunol リバイス中)

(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

図1. KU812とHMC1.2におけるIL-33応答遺伝子の発現比較

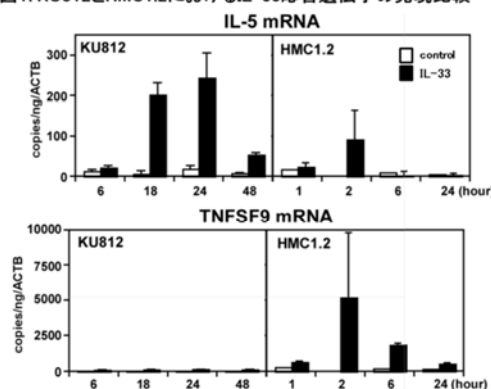


表1. IL-33刺激後のヒトマスト細胞における発現遺伝子

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	1005.2
TNFSF9	A_23_P51936	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	26.6	D	3778.6	D	195.3

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

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。

(二) HMC1.2 における IL-33 応答遺伝子の抽出

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

図1. HMC1を用いた遺伝子Cレポーターアッセイ

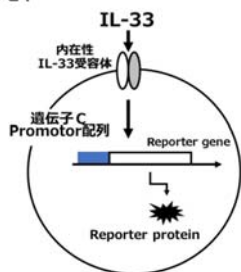
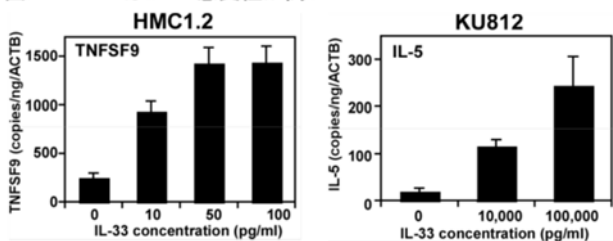


図2. HMC1.2はIL-33感受性が高い



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)

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)

(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 の作用を増強する効果のある IL-1 β 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 p 53 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。

【2018 年度の成果】

(1) 患者の急性期と寛解期の血清を採取・保存

臨床検体の収集のため倫理申請を行い、国立成育医療研究センターの倫理委員会に申請承認を終了し(受付番号: 1770 研究責任者: 杉江真子 「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、TSLP、IL-25 のサブタイプ解析」を行い、検体収集を開始した。

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

(イ) HMC1.2 を用いた遺伝子 C レポーターアッセイ

昨年までの研究結果で、ヒトマスト細胞株

図3. 遺伝子CはIL-33刺激で有意に上昇する

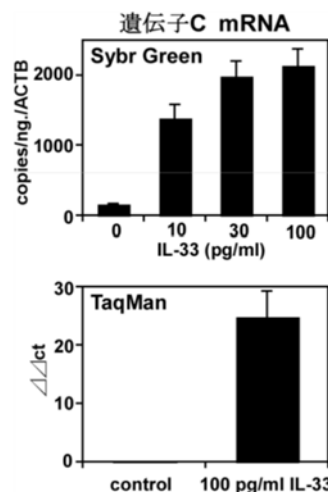
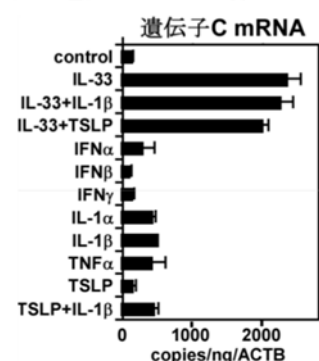


図4. 遺伝子CはIL-33特異的に誘導される

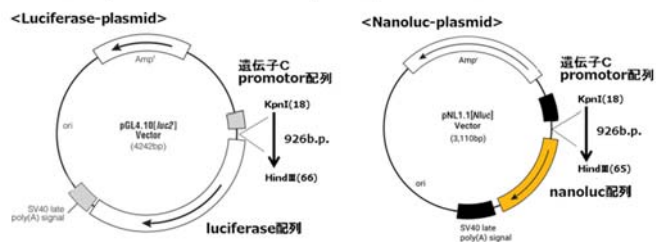


HMC1.2 を IL-33 で刺激すると、遺伝子Cが特異的に誘導することが明らかになった。そこで、遺伝子Cの promoter 配列を用いて、レポーターアッセイの系を構築し、IL-33 特異的な Bioassay を行うことにした。(図1)

A) 遺伝子Cの promoter 配列の作成

遺伝子Cの promoter 配列は、既報ではまだ報告されていないが、SwitchGear Genomics 社の予測配列と遺伝子Cの mRNA 配列の上流配列が一致したため、この予測配列を用いて遺伝子Cのレポーター配列(926b.p.)を作成し、シーケンス解析にて目的配列であることを確認した。また、発光レポーター遺伝子には luciferase と nanoluc の二種類を用い、pGL4.10[luc2]-zeo vector には KpnI(18)と HindIII(66)部位に、pNL1.1[nanoluc2]-zeo vector には KpnI(18)と HindIII(65)部位にそれぞれ遺伝子Cの promoter 配列(926b.p.)を挿入し、遺伝子C promoter 配列を挿入した reporter plasmid を作成した(図2)。

図2 遺伝子C promoter配列を挿入したreporter plasmidの作成



B) 遺伝子C promoter 配列を挿入したレポーター plasmid の機能確認

作成した遺伝子Cの promoter 配列を挿入した plasmid が機能するかどうかを確認するため、**遺伝子Cを恒常的に発現している細胞株に transfection し、レポーターアッセイにて作成した plasmid の機能を確認**した。まず NextBio 検索にて遺伝子Cを恒常的に発現している細胞株を検索したところ、上皮細胞系の細胞株 A549 と T24 の二つが候補として挙げられた。そこでこれらの細胞株で遺伝子Cの mRNA 発現が高いことを確認するため、qPCR を行ったところ、A549 と T24 における遺伝子Cの mRNA 発現は、それぞれ 1136、652 copies/ng/ACTB であった。この発現量は、遺伝子Cを発現していない細胞株(無刺激の HMC1.2 : 146 copies/ng/ACTB)に比べて若干高い発現であったため、この二つの細胞株を用いて、遺伝子C promoter を挿入したレポーター plasmid の機能確認を行うことにした。

まずは、A549 と T24 細胞株に遺伝子C promoter 配列を挿入したレポーター plasmid を

transfection し、48 時間後のレポーター活性を確認したところ、**T24 細胞株では低いものの有意な遺伝子Cのレポーター活性を確認**できた。このことから、この遺伝子C promoter 配列を挿入したレポーター plasmid を用いて HMC1.2 に transfection を行うことにした。

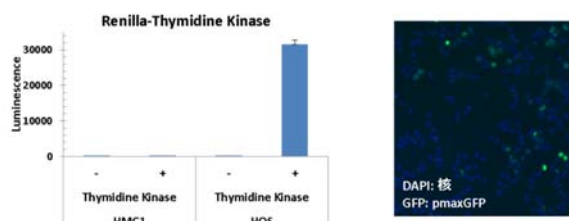
C). HMC1.2 selection 条件検討

次に、遺伝子Cの promoter の定常発現細胞株の樹立を行うため、遺伝子Cの promoter を発現した細胞のみを選択する必要がある。そのため用いるマーカー遺伝子として使用する抗生物質の濃度の条件検討を行った。HMC1 は既報では zeocin (1 µg/ml) で selection されていることから、HMC1.2 を zeocin で selection を行ったが、zeocin 1000 µg/ml まで濃度を上げ、2 週間以上培養したが、zeocin 1000 µg/ml でも transfection していない細胞の約 1 % が生き残り、遺伝子Cの promoter 配列を transfection した細胞のみを選択することができないことが明らかになった。zeocin 以外の選択用抗生物質として neomycin と puromycin でも同様の検討を行ったが、HMC1.2 は抗生物質耐性能が高く選択できないことが明らかになった。そのため、今回は一過性の系を用いてレポーターアッセイを行うことにした。

D). HMC1.2 への一過性の transfection

ヒトマスト細胞への一過性の transfection は、既報では electroporation またはレンチウイルスが用いられていることから、まずは electroporation を試すために LONZA 4D-nucleofector で transfection が可能か検討した。しかしながら、HMC1.2 には LONZA の推奨プログラムがないこと、また SF 試薬、プログラム(DS-104)の条件下では pmaxGFP plasmid の transfection 効率が悪いことが明らかになった。まずは HMC1.2 で効率の良く transfection するため、磁気を用いた transfection (CombiMag) や 4D-nucleofector で別の electroporation のプログラムなどを使用することを検討中である。(図3)

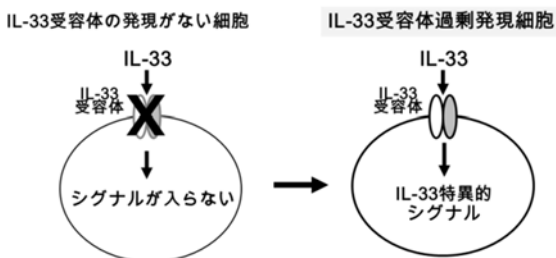
図3 4D-nucleofectorを用いたHMC1のtransfection効率



(口) IL-33 受容体こう過剰発現細胞の作製

HMC1.2 を用いた Bioassay では、選択用抗生物質を用いた遺伝子 C の promotor 配列を定常発現する細胞株の樹立ができないことが明らかになった。そのため、**より安定な Bioassay 系を構築するため、IL-33 受容体を過剰発現する細胞株の作成**を行った(図 4)。

図4 IL-33受容体過剰発現細胞を用いたBioassay系の確立

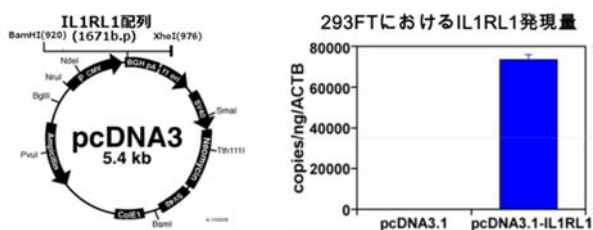


A) IL1RL1 発現 plasmid の作成

IL-33 の受容体は IL1AcP と IL1RL1(ST2)の二量体で構成されているが、IL1AcP は IL-1 α のヘテロダイマー受容体でもある。そこで IL-1 α の刺激が入る細胞(IL1AcP を発現している細胞)に、IL1RL1 を過剰発現させれば IL-33 受容体を発現する細胞株を作成できると考えた。

そこで、HMC1.2 由来の cDNA を鋳型として全長体 IL1RL1(1671 b.p.)を作成した。293FT が neomycin 耐性であることから、発現ベクターには zeocin 耐性遺伝子を挿入した pcDNA3.1-zeo を用い、pcDNA3.1-zeo の BamHI(920)と XhoI(976)に全長体 IL1RL1(1671 b.p.)を挿入し、pcDNA3.1[IL1RL1]-zeo を作成した(図 5 左)。作成した plasmid に IL1RL1 mRNA 発現活性があることを確認するため、293FT に plasmid を transfection し 48 時間後の IL1RL1 mRNA の発現を確認したところ、**有意に IL1RL1 mRNA の発現が上昇**することを確認した (図 5 右)。

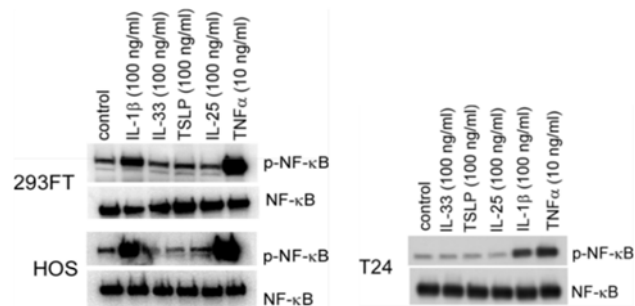
図5 . IL1RL1-plasmid作成



B) IL-33 受容体過剰発現細胞を作成するための細胞株の選択

IL-33 受容体高発現細胞を作成するためには IL1AcP は発現しているが、IL1RL1 は発現していない細胞株を選ぶ必要がある。そこで、主に安定株樹立に用いられている細胞株

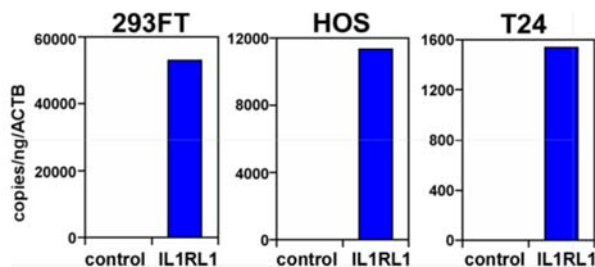
図6. 様々な細胞株を用いたIL-1 β 、IL-33応答の確認



(293FT、HOS、T24)を用いて IL-33、IL-1 β 刺激応答が入るかどうかを IL-33 下流シグナルである NF- κ B のリン酸化で確認した。また IL-33 特異的な Bioassay 系を構築するため、IL-33 以外の上皮由来サイトカインで(TSLP、IL-25)の刺激も同時に行った。Western blot の結果、全ての細胞で IL-1 β の刺激が入り、**IL1AcP は発現しているが、IL1RL1 は発現していないことが明らかになった**(図 6)。そこでこの 3 種類の細胞株(293FT、HOS、T24)を用いて、IL1RL1 を過剰発現した細胞を作成することにした。

A)で作製した IL1RL1 発現ベクターを 3 種類の細胞株に transfection 後、48 時間後の IL1RL1 の mRNA の発現量を確認したところ、**全ての細胞 (293FT、HOS、T24) で有意に IL1RL1 の mRNA の発現が上昇**していた(図 7)。IL1RL1 安定発現細胞株を作成するため、zeocin (293FT: 100 μ g/ml、HOS: 200 μ g/ml、T24: 200 μ g/ml)で約 4 週間培養し、IL1RL1 過剰発現細胞の作成を行った。今後は、作成した細胞を用いて IL-33 のシグナルが入ることを確認し、さらには、IL-33 特異的に誘導される遺伝子を探索する予定である。

図7. transfection後のIL1RL1 mRNA発現量



本研究計画では本年度中に Bioassay 系を構築する予定であったが、現在のところ HMC1.2 への plasmid の transfection と transfection した細胞の選別がうまくいっていないため、現在のところまだ Bioassay 系を構築できていない。しかしながら、IL-33 受容体を過剰発現した細胞株の樹立に関しては、IL-33 受容体を過剰発

現した細胞の準備ができたため機能解析を始めており、また HMC1.2 の transfection に関しても、当初の計画通り本年度中には transfection を終了させ Bioassay 系を構築する予定である。また、臨床検体収集に関しては、**国立成育医療研究センターの倫理委員会の申請承認**を終了し、検体収集を始めているため、**概ね当初の研究計画に沿った進捗状況**であると考えている。

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。