

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591455

研究課題名(和文)新規サイトカインIL-33によるIL-17Fの発現と喘息との関連

研究課題名(英文)Expression of IL17F induced by a novel cytokine IL-33

研究代表者

川口 未央(KAWAGUCHI, MIO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50365748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：IL-17Fは喘息に関与するサイトカインの一つである。産生細胞として気道上皮細胞が注目されているが誘導因子や発現機構は不明である。そこで喘息の病態に深く関連するIL-33を用いてIL-17Fの発現とそのメカニズムを検討した。その結果、IL-33は気道上皮細胞からIL-17Fを有意に産生した。気道上皮細胞はIL-33の受容体ST2を有しており、ERK1/2とMSK1をリン酸化した。これらのシグナル伝達経路を阻害するとIL-17Fの発現は抑制された。以上から気道上皮細胞におけるIL-33によるIL-17Fの産生にST2-ERK1/2-MSK1経路が関与し、喘息の新たな病態が解明された。

研究成果の概要(英文)：IL-17F is also involved in the pathogenesis of asthma. However, the regulatory mechanisms of IL-17F expression remain to be defined. Therefore we investigated the expression of IL-17F by IL-33 in bronchial epithelial cells, and its signaling mechanisms. IL-33 significantly induced IL-17F gene and protein expression. The receptor for IL-33, ST2, was expressed in bronchial epithelial cells. Among MAP kinases, IL-33 phosphorylated ERK1/2. It was inhibited by the pretreatment of anti-ST2 neutralizing (blocking) Abs. MEK inhibitor significantly blocked IL-17F production. Moreover, IL-33 phosphorylated MSK1, and MEK inhibitor diminished its phosphorylation. Finally, MSK1 inhibitors and transfection of the siRNAs targeting MSK1 significantly blocked IL-17F expression. IL-33 induces IL-17F via ST2-ERK1/2-MSK1 signaling pathway in bronchial epithelial cells. These data suggest that the IL-33/IL-17F axis is involved in allergic airway inflammation, and may be a novel therapeutic target.

研究分野：呼吸器・アレルギー内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：気管支喘息 IL-17F IL-33 気道上皮細胞

## 様式C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の病態には複雑なサイトカインネットワークが関与している。しかしながら既存のネットワークだけでは喘息の病態全ては説明できない。この問題を解決する有力な方法の一つのとして新しいサイトカインの発見やそのサイトカインネットワークを解明することが挙げられる。2001年に我々は新しいサイトカインであるIL-17F(ML-1)を発見した(Kawaguchi et al. J. Immunol. 2001)。さらに2003年にマウスIL-17F (IL-17Ftv) 遺伝子を発見した (GenBank accession number: AB116259)。その機能は多彩であり、我々は様々なサイトカイン、ケモカイン、接着分子を気道上皮細胞、血管内皮細胞から誘導することを報告してきた (Kawaguchi et al. J. Allergy Clin. Immunol. 2004., Kawaguchi et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009., Kawaguchi et al. Clin. Exp. Allergy. 2010など)。さらに喘息患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)中で IL-17F 遺伝子の発現が亢進し (Kawaguchi et al. J. Immunol. 2001)、IL-17F 遺伝子のアミノ酸変異を伴う一塩基多型 7488T/C が気管支喘息と有意な相関を認め、喘息の重症化に関与することも報告してきた (Kawaguchi et al. J. Allergy Clin. Immunol. 2006, Kawaguchi et al. Clin. Exp. Allergy. 2006)。このことからIL-17Fがアレルギー性気道炎症の病態形成に深く関与していることが予想される。しかしながら、喘息の気道における主たる産生細胞や誘導因子は不明であった。我々の様々な予備実験から2005年に発見された新しいサイトカインであるIL-33が気道上皮細胞からIL-17Fを誘導することを初めて発見した。

IL-33は2005年に発見された新しいサイトカインであり、強力にアレルギー性炎症を誘導することが知られている(Schmitz et al. Immunity. 2005)。さらに喘息患者の気道では高発現しており(Préfontaine et al. J. Allergy Clin. Immunol. 2010)、その遺伝子多型も喘息発症に関係が深いことが報告されており(Gudbjartsson et al. Nat. Genet. 2009)、新たな治療標的として大変注目されている。シグナル伝達経路は受容体がST2であり、その下流でMAPキナーゼの関与が報告されているが詳細は不明である (Carriere et al. J. Immunol. 2007)。以上からIL-33によるIL-17Fの発現解析は喘息の新しい病態の解明につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

2001年に我々が発見したサイトカインIL-17Fは喘息患者の気道で高発現してお

り、様々なサイトカインの産生を誘導することから喘息の治療戦略上重要な標的の一つと考えられている。しかしながら、その誘導因子は不明であった。種々の検討の結果、2005年に発見された新規サイトカインであり、アレルギー性気道炎症を強力に誘導するIL-33がその誘導因子であることを発見した。本研究ではIn vitroの実験系でIL-33によるIL-17Fの発現とそのメカニズムを解析し、喘息の新たな病態を解明する。

### 3. 研究の方法

#### 方法1: IL-33によるIL-17Fの発現

IL-33(10, 100ng/ml)にて気道上皮細胞(ヒト正常気道上皮細胞および細胞株 BEAS-2B)を刺激し、細胞および上清を回収した。IL-17Fの発現をReal time PCR、ELISAを用いて検討する。尚、ELISAは我々が構築した高感度ELISAシステムを用いた。

#### 方法2-1: IL-33の上流のシグナル伝達経路

まずIL-33の受容体であるST2の存在をST2抗体を使ってWestern blottingで検討する。続いて上流のシグナル伝達経路を解明するためにIL-33(100ng/ml)で気道上皮細胞を刺激後、MAPキナーゼ(ERK1/2, p38MAPK, JNK), Jak, STATのリン酸化をWestern blottingで検討した。次に各種MAPキナーゼ阻害薬(PD98059, U0126, SB202190, SP600125)を用いてIL-17F発現に与える影響について検討した。さらにST2中和抗体を用いてMAPキナーゼなどの上流のシグナル伝達経路およびIL-17F発現に与える影響についてWestern blottingとELISAで検討した。

#### 方法2-2: IL-33の下流のシグナル伝達経路

IL-33の下流のシグナル伝達経路解明するためにIL-33(100ng/ml)で気道上皮細胞を刺激後MSK1のリン酸化をWestern blottingで検討した。さらに上流のシグナル伝達経路の特異的阻害剤を用いて、これら下流の経路とのつながりをWestern blottingで検討した。またMSK1阻害剤(H89, Ro-31-8220)、MSK1とp90RSKの特異的siRNAを用いてIL-17F発現の抑制効果をELISAにて検討した。

細胞培養、Real time PCR, ELISA, Western blotting, siRNA 移入などの方法は以下の論文を参考にした。

- Kawaguchi et al. J Immunol. 2001
- Kawaguchi et al. J Bio Chem. 2002
- Kawaguchi et al. J Allergy Clin

Immunol. 2007

- Kawgauchi et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009.

#### 4. 研究成果

real-time PCR より BEAS-2B において IL-33 は濃度依存性に IL-17F mRNA を産生誘導した(図 1A). ELISA より IL-33 は濃度依存的に刺激後 24 時間をピークとして, BEAS-2B と NHBEs で IL-17F 蛋白の産生を誘導した(図 1B). IL-17A は IL-17F と高い相同性を持っているが, IL-33 による産生誘導は認められなかった(図 1C).

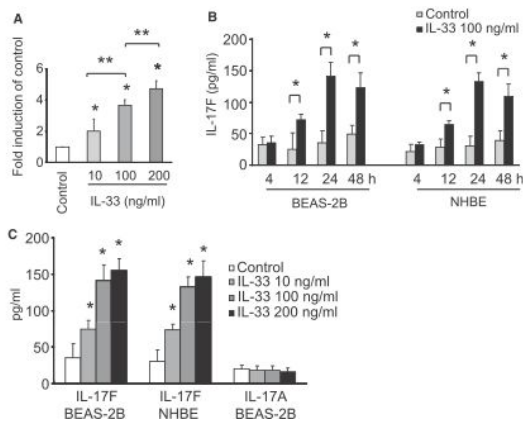


図 1 IL-33 による IL-17F 遺伝子および蛋白の発現

BEAS-2B および NHBEs 共に ST2 の発現が Western blotting にて認められた(図 2A). 更に抗 ST2 抗体は IL-33 による IL-17F 産生誘導を BEAS-2B において濃度依存的に抑制した(図 2B). また isotype control は IL-17F 産生誘導に影響しなかった. 以上の結果から, IL-33 は ST2 を介して IL-17F を産生誘導することが明らかとなった.

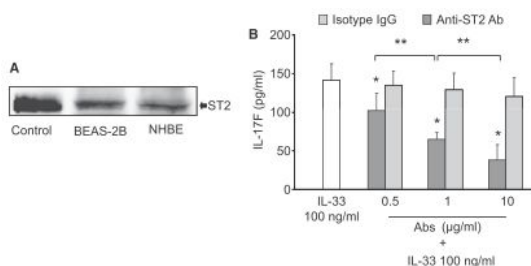


図 2 気道上皮細胞における ST2 の発現と IL-17F 発現への関与

Western blotting にて p38MAPK および JNK の IL-33 刺激による活性化は BEAS-2B で認められなかった. BEAS-2B において ERK1/2 は IL-33 刺激後 20 分をピークとして活性化が認められ, 120 分には定常状態に

戻った(図 3A). 抗 ST2 抗体で前処理した BEAS-2B では ERK1/2 の活性化は減弱していた(図 3B). 更に MEK1/2 阻害剤(PD98059)にて前処理した BEAS-2B は ERK1/2 の活性化は減弱した(図 3C). Vehicle control である DMSO は ERK1/2 の活性化に影響しなかった. 以上の結果から, IL-33 は ST2 を介して MEK1/2-ERK1/2 を活性化させることが明らかとなった.

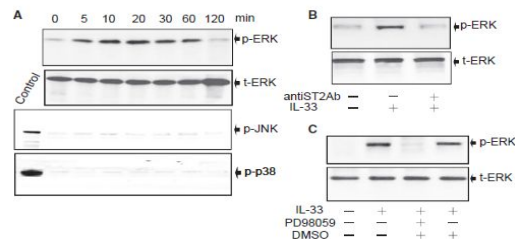


図 3 IL-33 による MAP kinase のリン酸化と ST2 中和抗体と MEK1/2 阻害薬の抑制効果

MEK1/2 阻害剤(PD98059)による 1 時間の BEAS-2B 前処理は IL-33 による IL-17F 産生誘導を抑制した. また DMSO は IL-17F 産生誘導には影響しなかった. JNK 阻害剤(SP600125) および p38MAPK 阻害剤(SB202190)は BEAS-2B において IL-17F 発現誘導に影響しなかった(図 4). 以上の結果から, IL-33 は MEK1/2-ERK1/2 を介して IL-17F を産生誘導することが明らかとなった.

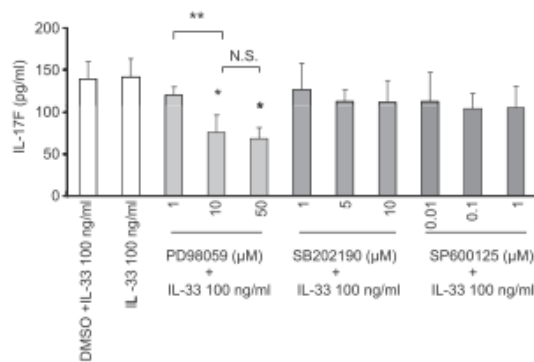


図 4 MAP kinase 阻害剤による IL-17F 発現への抑制効果

BEAS-2B において IL-33 刺激後 30 分をピークとする MSK1 の活性化が認められた(図 5A). MEK1/2 阻害剤(PD98059)にて前処理された BEAS-2B を IL-33 で刺激すると MSK1 活性化の減弱が認められた(図 5B). 以上の結果から, IL-33 は MEK1/2-ERK1/2 を介して MSK1 を活性化することが明らかとなった.

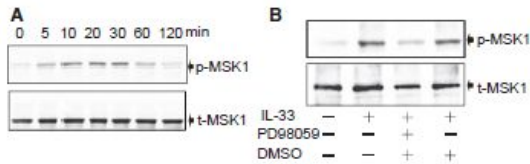


図 5 IL-33 による MSK1 のリン酸化と MEK1/2 阻害薬の抑制効果

MSK1 阻害剤(Ro-31-8220 および H89)による前処理にて IL-33 による IL-17F 産生誘導は BEAS-2B で阻害された(図 6A) . siRNA を用いるに先立ち MSK1 siRNA 移入にて total MSK1 発現が減弱することを Western blotting にて確認した(図 6B) . BEAS-2B への MSK1 siRNA 移入によって IL-17F 産生誘導は抑制された(図 6C) . control siRNA では IL-17F の産生誘導に影響はなかった .以上の結果から, IL-33 は MSK1 を介して IL-17F を産生誘導することが明らかとなった .

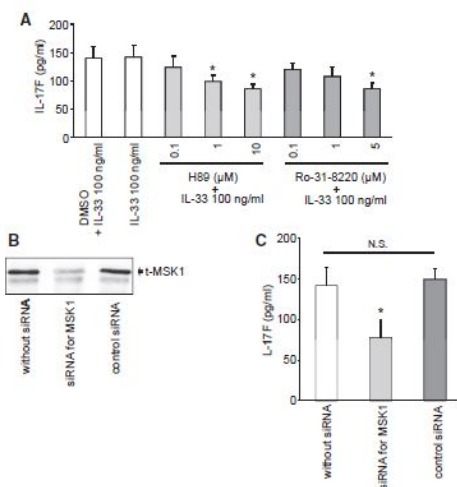


図 6 MSK1 阻害による IL-17F 発現への抑制効果

IL-17 ファミリーの最初の遺伝子である IL-17A が 1995 年に報告された。その後 IL-17A に類似性を示す遺伝子が続々と発見され、現在 IL-17B から IL-17F までの 5 種類が知られている。現在これらの遺伝子群は IL-17 ファミリーを形成している。これら 6 つの IL-17 ファミリーはアミノ酸配列の構造上 5 つの共通のシステイン残基を有しており、その位置関係は既知のいかなるサイトカインやケモカインとも異なる大変ユニークなものとなっている。IL-17F は我々が 2001 年に報告したサイトカインであり、これまで前述のように多くの論文を発表し、この分野をリードしてきた。近年、IL-17A と IL-17F

を産生する新しい CD4 陽性 T 細胞のサブセット : Th17 が大変注目されている。特に Th17 細胞は自己免疫疾患の病態では中心的な役割を担っていることから IL-17F を研究することは大変意義があると考えられる。さらに我々は喘息のようなアレルギー性気道炎症の場においては Th17 細胞以外に気道上皮細胞が IL-17F は主たる産生細胞であることを発見した。しかしながら IL-17F の誘導因子やその発現メカニズムは全く不明であったが本研究により IL-33 が誘導因子であることが同定された。

IL-33 は 2005 年に報告された IL-1 ファミリーに属する新しいサイトカインであり、喘息との関与が大変注目されているがその機能やシグナル伝達経路は完全に解明されていない。IL-33 は喘息患者の気道に高発現しており、その一塩基多型も喘息の罹患感受性と相関が報告されている。このことから喘息の病態を考える上で IL-33 も IL-17F と共に Key Cytokine であり、アレルギー性気道炎症の病態解明に役立つと期待されている。そのため現在 IL-33 は国内外を問わず積極的に研究されている。本研究では喘息に深く関与する IL-33 が気道上皮細胞から IL-17F を誘導する刺激因子であることを示し、その分子メカニズムを明らかにしていく。さらには IL-17F と IL-33 やそのシグナル伝達経路を標的とした臨床応用が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

Ota K, Kawaguchi M, Matsukura S, Kurokawa M, Kokubu F, Fujita J, Morishima Y, Huang SK, Ishii Y, HSatoh H, Nobuyuki Hizawa N. Potential involvement of IL-17F in asthma, *Journal of Immunology Research*, Vol.2014, 2014, pp1-8, doi.org/10.1155/2014/602846, 査読有

Fujita J, Kawaguchi M, Kokubu F, Ohara G, Ota K, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N. Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells. *Allergy*, Vol.67, 2012, pp744 - 750, doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02825.x. 査読有

川口未央, 太田恭子, 藤田純一, 檜澤伸之 [アレルギーに対するサイトカイン]IL-17, アレルギー・免疫, Vol.19, 2012, pp.1892-1898, 査読無

川口未央, 太田恭子, 藤田純一, 檜澤伸之 [難治性喘息研究の新展開]サイトカインからみた難治性喘息, 呼吸器内科, Vol.21, 2012, pp.48 - 53, 査読無

藤田純一, 川口未央, 檜澤伸之 IL-17A と

IL17F におけるシグナル伝達、アレルギー・免疫、Vol.55、2011、pp.585 - 588、  
査読無

[学会発表](計6件)

Kawaguchi M, Fujita J, Ota K, Kurishima K, Morishima Y, Ishii Y, Sakamoto T, Satoh H, Hizawa N, Expression of IL-17F in bronchial epithelial cells、KAPARD-KAAACI & West Pacific Allergy Symposium Joint International Congress, 2013年5月11日、Grand Hilton Seoul(ソウル)韓国  
藤田純一、川口未央、國分二三男、松倉聡、黒川真嗣、野里 恭子、阿野哲士、金子美子、増子裕典、山鳥忠宏、森島祐子、石井幸雄、坂本透、足立 満、檜澤伸之、気道上皮細胞からの IL-17F 産生、第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012年4月22日、神戸コンベンションセンター、神戸

Fujita J, Kawaguchi M, Kokubu F, Matsukura S, Kurokawa M, Nozato K, Ano S, Kaneko Y, Masuko H, Yamadori T, Yageta Y, Morishima Y, Ishii Y, Sakamoto T, Satoh H, Hizawa N, IL-33 Induces IL-17F In Bronchial Epithelial Cells, International Conference of American Thoracic Society, 2012年5月20日、モスコーニ センター、サンフランシスコ、米国

川口未央、藤田純一、國分二三男、松倉聡、黒川真嗣、野里恭子、森島祐子、石井幸雄、佐藤浩昭、坂本透、足立満、檜澤伸之、気道上皮細胞における IL-17F の発現とそのメカニズム、第15回アレルギー・気道上皮細胞研究会、2011年12月10日、東京

藤田純一、川口未央、國分二三男、松倉聡、黒川真嗣、野里恭子、阿野哲士、金子美子、増子裕典、山鳥忠宏、森島祐子、石井幸雄、坂本透、足立満、檜澤伸之、気道上皮細胞からの IL-33 による IL-17F 産生：MSK1 の関与、第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、2011年11月12日、グランドプリンスホテル新高輪、東京

藤田純一、川口未央、國分二三男、松倉聡、黒川真嗣、野里恭子、阿野哲士、金子美子、増子裕典、山鳥忠宏、森島祐子、石井幸雄、坂本透、足立満、檜澤伸之、気道上皮細胞からの IL-33 による IL-17F 産生、第8回北関東信越呼吸器フォーラム、2011年7月9日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 未央 (KAWAGUCHI, MIO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50365748